ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 4, с. 241–257

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 57.085.23

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОДХОДА К РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ ПРАЙМИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В НАИВНОЕ СОСТОЯНИЕ

© 2023 г. В. К. Абдыев[a], *, А. Л. Риппа[a], Н. А. Аракелян[a], Е. А. Воротеляк[a], А. В. Васильев[a]

[a] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия*

**e-mail: mailtovepa@gmail.com*

Поступила в редакцию 03.11.2022 г.
После доработки 23.06.2023 г.
Принята к публикации 16.07.2023 г.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека в условиях *in vitro* находятся в наивном или праймированном состоянии плюрипотентности. Находясь в том или ином состоянии, ПСК имеют различные потенциалы дифференцировки во внезародышевые и зародышевые клетки эмбриона. Наивные ПСК по профилю экспрессии и эпигенетическому паттерну генома сравнимы с клетками внутренней клеточной массы бластоцисты. В то же время, праймированные ПСК по своим характеристикам схожи с клетками постимплантационного эпибласта. Репрограммирование праймированных ПСК в наивное состояние и поддержание этого состояния при культивировании является инструментом для изучения эпигенетических процессов преимплантационного развития эмбриона человека, а также механизмов дифференцировки ПСК в производные зародышевых листков и внезародышевых тканей эмбриона. Целью нашего исследования было репрограммирование праймированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в наивное состояние плюрипотентности, а в дальшейшем получение культуры ИПСК, гомогенной по состоянию плюрипотентности. Благодаря разработанному нами протоколу, удалось получить ИПСК, близкие к наивному состоянию. Протокол включает применение ростовых факторов FGF2, TGFβ1 и ингибирования GSK3β и сигнального пути MEK/ERK (2iF среда). При этом обязательна предварительная обработка праймированных ИПСК ингибиторами деацетилазы гистонов (HDACi), которая приводит к измению морфологии клеток и профиля и экспрессии генов ПСК в сторону более раннего состояния плюрипотентности. При обработке праймированных ИПСК HDACi и последующим их культивировании в 2iF среде получили ИПСК, сопоставимые по морфологии колоний и профилю экспрессии генов-маркеров наивного состояния с контрольными наивными ИПСК, полученными в среде RSeT.

Ключевые слова: ПСК, ИПСК, наивные ИПСК, праймированные ИПСК, репрограммирование, HDACi, 2iF среда, RSeT среда

DOI: 10.31857/S047514502304002X, **EDN:** NRZKVC

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриогенез – это комплексный процесс поэтапного усложнения эмбриона, который начинается с одноклеточной стадии – зиготы, последующего дробления и, в результате точно скоординированных клеточных и морфогенетических процессов (Molè et al., 2021; Weatherbee et al., 2021), приводит к формированию функционально сбалансированного, сложного организма (Shahbazi, 2020). Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) – это уникальный тип клеток, способный дифференцироваться во все типы клеток зародыша. В преимплантационном и постимплантационном раннем развитии у мыши и человека были определены различные состояния плюрипотентности (Novo, 2021; Sim et al., 2017; Ying et al., 2008). В преимплантационный период ПСК находятся в состоянии наивности, а в постимплантационый период у мыши и человека различают розеточное, формативное и праймированное состояния плюрипотентности (Gordeev et al., 2021). Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши выделяются из преимплантационного эпибласта и находятся в наивном состоянии *in vitro* (Evans, Kaufman, 1981; Lagarkova et al., 2010; Nichols, Smith, 2009). Однако ЭСК человека удается поддерживать в культуре только в праймированном состоянии несмотря на то, что культура ЭСК выделяется из наивных клеток внутренней клеточной массы преимплан-

тационной бластоцисты (Rossant, Tam, 2017). Причина различного состояния ЭСК мыши и человека *in vitro* в том, что в условиях культивирования для поддержания ЭСК мыши в наивном состоянии необходим LIF, тогда как праймированное состояние ЭСК человека определяется наличием ростовых факторов FGF2 и TGFb (Ávila-González et al., 2021). При определенных условиях культивирования, таких как культивирование с использованием сред NHSM, RSeT, 5iLAF и t2iLGöY, можно репрограммировать праймированные ЭСК человека в наивное состояние (Liu et al., 2017). ЭСК мыши и человека также различаются потенциями к дифференцировке в трофэктодерму (Guo et al., 2021). Известно, что наивные ЭСК мыши *in vitro* и *in vivo* не способны давать трофэктодерму при подсадке в бластоцисту (Posfai et al., 2021), тогда как наивные ЭСК человека способны дифференцироваться в трофэктодерму и развиваться в цитотрофобласт *in vitro* (Guo et al., 2021). Культивируемые праймированные ПСК человека являются гетерогенной популяцией клеток, коммитированных к формированию трех зародышевых листков (Lau et al., 2020). Строгим критерием идентификации линии ЭСК мыши и крысы считается интеграция этих клеток в химерную структуру зародыша после подсадки в бластоцисту или морулу (Nichols, Smith, 2009; Smith, 2003). Праймированные ПСК не способны образовывать химеру при имплантации в бластоцисту животного-хозяина (Leitch et al., 2013). Попытки создания межвидовых химерных животных с подсадкой праймированных ПСК человека не удавались (T. Liu et al., 2021). Изучение пре- и постимплантационного развития человека ограничено. Репрограммирование праймированных ПСК человека в наивное состояние открывает возможности ответа на фундаментальные вопросы поддержания плюрипотентности и передачи эпигенетического паттерна в раннем развитии человека. Разработка эффективного протокола репрограммирования гетерогенной популяции праймированных ИПСК человека в наивное состояние плюрипотентности *in vitro* необходима для дальнейшего проведения эффективной дифференцировки в целевые клетки.

Наше исследование было посвящено репрограммированию праймированных ИПСК в наивное состояние плюрипотентности и последующему получению популяции ИПСК, гомогенной по состоянию плюрипотентности. Мы разработали протокол и среды, позволяющие получать ИПСК, схожие по морфологии и профилю экспрессии генов с ПСК в более раннем состоянии плюрипотентности. Такой результат достигается при следующих условиях культивирования: применение ростовых факторов FGF2, TGFβ1; ингибирование GSK3β и сигнального пути MEK/ERK (2iF среда); предварительная обработкой праймированных ИПСК ингибиторами деацетилазы гистонов (HDACi). Полученные в данных условиях ИПСК, близкие к наивному состоянию, были сопоставимы с охарактеризованными нами контрольными наивными ИПСК в среде RseT.

Таким образом, разработанный нами протокол дает возможность получить ИПСК, близкие к наивному состоянию. Однако для подтверждения истинного наивного состояния плюрипотентности ИПСК, полученных нами в новых условиях культивирования, нужно в дальнейшем провести секвинирование транскриптома единичных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование линии ИПСК

Клеточные линии культивировали в чашках Петри (Thermo Fisher Scientific, США) и планшетах (Corning, США) в мультигазовом инкубаторе при температуре 37°C и составе газов 5% CO_2 и 5% O_2.

В работе использовалась линия ИПСК человека (hiPSC-KYOU-DXR0109B [201B7] (ANCC ACS-1023)), которая была приобретена в коллекции типовых культур (ATCC, США).

Праймированные ИПСК поддерживали в среде mTESR1 (STEMCELL Technologies, Канада) в соответствии с инструкциями производителя в культуральном пластике, предварительно покрытом матригелем (STEMCELL Technologies, США). Матригель наносили на поверхность культуральной посуды и инкубировали 15 мин в мультигазовом инкубаторе при 37°C. Далее оставшийся раствор матригеля, которой не подвергся собрции удаляли. Клетки культивировали в среде mTESR1 с добавлением 5 мкМ ROCK-ингибитора (Y-27632) (Stemgent, США). По достижении 60–80% конфлюентности, клетки пересевали с помощью добавления 1 мг/мл аккутазы (STEMCELL Technologies, Канада) каждые 5 дней, предварительно промывая раствором DPBS (ПанЭко, Россия).

Культуральные среды для получения наивных ИПСК

Для получения наивных ИПСК человека в качестве положительного контроля стандартная среда mTeSR1 была заменена на RSeT (STEMCELL Technologies, США). В первые сутки посева ИПСК в среду RSeT также добавляли ROCK-ингибитор (ROCKi) – клеточные линии культивировались на матригеле в среде RSeT в течение 3 пассажей (13–16 дней), пересев культуры осуществляли каждые 3–5 дней.

Для получения наивных ИПСК человека стандартная среда mTeSR1 была заменена на среду HDACi. При пассировании ИПСК добавляли ROCKi и на следующие сутки ROCKi отменялся.

Таблица 1. Состав среды для репрогроммирования праймированных ипск в наивное состояние

1	Среда HDACi	HDACi – VPA (Valproic acid)	50 нмоль
		HDACi – NaB (Sodium Butyrate)	0.1 ммоль
		N2B27	50%
		mTeSR (FGF2, TGFb)	50%
2	Среда 2iF	MEKi –PD0325901	1 мкмоль
		GSK3β –CHIR99021	3 мкмоль
		mTeSR (FGF2, TGFb)	50%
		N2B27	50%

Состав базовой среды N2B27*

Компоненты	Производитель	Концентрация
Нейробазальная среда (Neurobasal™ medium)	Gibco	1×
DMEM/F-12 (модифицированная по способу Дульбекко среда Eagle/питательная смесь F-12) без глутамина	Gibco	1×
Бессывороточная добавка N-2	Gibco	1.0%
Бессывороточная добавка B-27	Gibco	2%
L-глютамин	Gibco	2 ммоль
β-меркаптоэтанол (β -mEtOH)	Sigma	0.1 ммоль
Антибиотики (пенициллин и стрептомицин)	Gibco	1.0%
Незаменимые аминокислоты (NEAA (MEM Non-Essential Amino Acids Solution)**	Gibco	1%
Бычий сывороточный альбумин (BSA)**	Sigma	50 мкг/мл

На следующие сутки среду HDACi заменяли на среду 2iF (табл. 1).

Иммуноцитохимическое маркирование

Перед фиксацией культуру клеток трижды промывали раствором PBS, далее клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 мин при +4°C. После фиксации клетки трижды промывали раствором PBS по 3–5 мин. Далее производили пермеабилизацию 0.2% Triton-X-100 в PBS в течение 15 мин. Затем клетки дважды промывали PBS в течение 10–15 мин. Для блокировки неспецифической сорбции антител клетки предварительно инкубировали в блокирующем растворе (5% FBS; 0.3% Triton; 0.01% Tween) при 37°C на 60 мин. Далее удаляли блокирующий раствор и наносили первичные антитела в блокирующем растворе, содержащем PBS и 2% бычьего сывороточного альбумина. Первичные антитела наносили в разведениях согласно протоколу производителя, инкубацию в них производили при +4°C в течение ночи. После инкубации клетки трижды промывали раствором PBS. Вторичные антитела наносили в разведении 1 : 1000. Далее инкубировали 90 мин при 37°C. Далее клетки трижды отмывали раствором PBS. Ядра клеток окрашивали DAPI в конечной концентрации 0.1 мкг/мл в течение 5 мин. Клетки визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе EVOS FL AUTO (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения обрабатывали в программе ImageJ (https://imagej.net/). Список первичных и вторичных антител представлен в табл. 2.

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК

Выделения РНК из клеточных культур осуществляли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. ExtractRNA монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК. Реагент добавляли в суспензию клеток в объеме 1 мл из расчета 1×10^6–10^7 клеток и оставляли при комнатной температуре 10–15 мин для полной диссоциации нуклеотидных комплексов. Далее центрифугировали 10 мин при 12000 *g* для удаления нерастворимых фрагментов, а супернатант переливали в новую пробирку. Для разделения фаз в пробирку с супернатантом добавляли 0.2 мл хлороформа и встряхивали ее в течение 15 с. Далее образец инкубировали 3–5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Образец

Таблица 2. Список первичных и вторичных антител

Антитела	Описание	Тип	Источник	Каталожный номер	Рабочее разведение
OCT4	Маркер плюрипотентности	IgG кролика поликлональные	Abcam	ab181557	1 : 250
KLF17	Маркер наивной плюрипотентности	IgG мыши моноклональные	Santa Cruz	sc-398132	1 : 200
Alexa Flour 568 anti mouse IgG (H + L)	Гибридизуются с IgG и IgM мыши, выявляются в виде красного сигнала	IgG козы	Invitrogen	A-21201	1 : 1000
Alexa Flour 488 anti rabbit IgG (H + L)	Гибридизуются с IgG и IgM кролика, выявляются в виде зеленого сигнала	IgG козы	Invitrogen	A-21441	1 : 1000

центрифугировали при 12000 *g* в течение 15 мин при 4°C. В ходе центрифугирования происходило разделение смеси на три фазы: нижнюю – органическую фенол-хлороформную фазу, интерфазу и верхнюю водную фазу, содержащую РНК. Держа пробирку под углом 45°, отбирали водную фазу и перемещали в новую пробирку. Далее в водную фазу добавляли 0.5 мл 100% изопропанола и инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем образец центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Отбирали супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки, и по стенке добавляли 2 мл 75% этанола. Далее центрифугировали на 15000 *g* в течение 5 мин при комнатной температуре, удаляли этанол, высушивали осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5–7 мин. Осадок растворяли в 20 мкл воде, свободной от РНКаз, прогревая образцы 3–5 мин при 55–60°C Концентрацию выделенной РНК определяли на приборе BioPhotometer plus (Eppendorf, США).

Для реакции обратной транскрипции брали 1 мкг РНК. Реакцию проводили с использованием MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно протоколу производителя. Для осуществления реакции готовили две смеси. Первая смесь в объеме 9 мкл содержала 1 мкг РНК-матрицы, 20 мкМ праймеров, 1 мкл игибитора РНКаз и деионизированную, свободную от нуклеаз воду. Смесь перемешивали пипетированием и прогревали 2 мин при 70°C для денатурации вторичных структур РНК и переносили образцы в лед. Состав второй смеси в объеме 11 мкл включал: деионизированную воду, свободную от нуклеаз; 4 мкл 5X буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DTT (20 мМ), 1 мкл MMLV ревертазы. Обе смеси смешивали и инкубировали 60 мин при 42°C. Для остановки реакции итоговую смесь прогревали при 70°C в течение 10 мин. Образцы хранили при –20°C, заранее разделив на аликвоты. Перед применением аликвоту прогревали 2 мин при 65°C для дезагрегации молекул кДНК. После обратной транскрипции для проведения реакции ПЦР-РВ кДНК разводили в 10 раз.

Подбор праймеров

Праймеры были подобраны с помощью онлайн ресурса Primer-BLAST, интегрированного в базу данных NCBI (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Дополнительную проверку праймеров проводили в программах Primer Select и Oligo Analyzer. Температуру отжига праймеров определяли с помощью программы Oligo или опытным путем. Нуклеиновые последовательности праймеров к соответствующим генам указаны в табл. 3.

ПЦР, ПЦР-РВ

Качественную и количественную оценки экспрессии исследуемых генов проводили с помощью ПЦР и ПЦР-РВ. ПЦР проводили на матрице, ранее синтезированной кДНК с помощью набора Screen-mix (Евроген, Россия) для амплификации в соответствии с инструкцией производителя на амплификаторе T1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad, США).

Для проверки контаминации реакционной смеси и эффективности ПЦР в каждый эксперимент включали отрицательный (вода, свободная от ДНК и РНК) и положительный контроли (известная ДНК, дающая ампликон определенного размера). Для ПЦР в реальном времени в качестве матрицы использовали кДНК (синтезированна из 1 мкг тотальной РНК) и готовую смесь для ПЦР qPCR mix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия). Относительный уровень экспрессии генов

Таблица 3. Праймеры*, использованные при проведении ПЦР-РВ

Праймер	Последовательность (5'–3')
DAZL – forward	ATGTTGTACCTCCGGCTTATTCA
DAZL – reverse	CCATTTCCAGAGGGTGGAGTA
GAPDH – forward	CACCCACTCCTCCACCTTGAC
GAPDH – reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG
KLF2 – forward	CAAGAGTTCGCATCTGAAGGC
KLF2 – reverse	AGAAGGCACGATCGCACAG
KLF4 – forward	ACCAGGCACTACCGTAAACACA
KLF4 – reverse	GGTCCGACCTGGAAAATGCT
KLF17 – forward	TAGACCCCACCCAGTCTTCAT
KLF17 – reverse	CGCTGAGTTCTCGTTATCCTGGG
NANOG – forward	CAATGGTGTGACGCAGGGAT
NANOG – reverse	TGCACCAGGTCTGAGTGTTC
OCT4/Pou5f1 – forward	ACCCACACTGCAGCAGATCA
OCT4/Pou5f1 – reverse	CACACTCGGACCACATCCTTCT
PRDM14 – forward	AAGCAACTGGATGCGCTATGT
PRDM14 – reverse	GGGATGGGCTTAATGGTGTAGAA
REX1 – forward	GCCTTATGTGATGGCTATGTGT
REX1 – reverse	ACCCCTTATGACGCATTCTATGT
SOX2 – forward	TGCGAGCGCTGCACAT
SOX2 – reverse	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA
STAT3 – forward	CGGAGAAACAGGATGGCCC
STAT3 – reverse	GCGGCTATACTGCTGGTCAA
STELLA/DPPA3 – forward	AGAGAAGGGTCCGCACTTTG
STELLA DPPA3 – reverse	TTCCCGATTTTCGCATTCTC
TFE3 – forward	AGCCATCACTGTCAGCAACT
TFE3 – reverse	TGTCTTTCTTCTGCCGTTCCT
YAP – forward	TCCCAGATGAACGTCACAGC
YAP – reverse	GAAGAGGACTGAAGCCGAG
DNMT3B – forward	TGGAGCCACGACGTAACAAA
DNMT3B – reverse	GCATCCGTCATCTTTCAGCCTA

* Производитель всех праймеров – Евроген, Россия.

интересов определяли с помощью калибровочной кривой и нормализовали на экспрессию гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Исследование проводилось в трех технических и трех независимых экспериментальных повторах. Реакции проводились на приборе LightCycler 96 System (Roche, Швейцария). Для сравнения экспрессии генов в различных условиях использовался сравнительный CT-метод для относительного количественного анализа. По полученным значениям CT рассчитывался ΔΔCT для оценки различий в экспрессии генов. Специфичность реакции оценивалась по кривым плавления и с помощью электрофореза в агарозном геле.

Данные экспрессии генов-маркеров представлены в виде средних значений с разбросом в виде ошибки среднего.

Гель-электрофорез

Для подтверждения качества РНК, наличия продукта ПЦР и специфичности этого продукта был использован метод гель-электрофореза. Результаты регистрировали после электрофоретического разделения в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Размер продукта ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия).

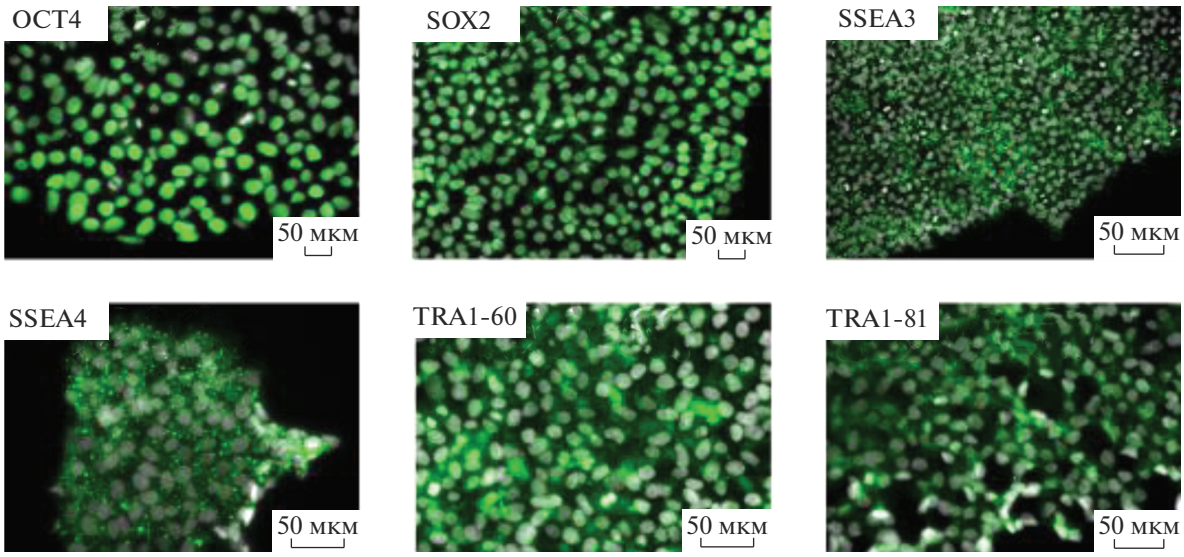


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ праймированных ИПСК. OCT4, SOX2, SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 показаны зеленым цветом. Ядра докрашены Dapi (показано серым цветом). Масштабный отрезок 50 мкм.

Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете ($\lambda = 310$ нм) и фотографировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика праймированных ИПСК

В данной работе использовали линию ИПСК-KYOU, которую поддерживали в культуральной среде для ПСК человека mTeSR1. Для поддержания самообновления и плюрипотентного состояния ПСК использовали полную среду mTeSR1 с включением факторов роста FGF2 и TGFb1 (Levenstein et al., 2006). FGF2 обеспечивает чувствительность ИПСК по отношению к сигналам дифференцировки в производные трех зародышевых листков. Поэтому считается, что при культивировании в полной культуральной среде mTeSR1, ИПСК находятся и поддерживаются в праймированном состоянии и компетентны к дифференцировке. Исходя из этого, в нашей работе ИПСК, культивируемые в полной среде mTeSR1, считались праймированными. Кроме того, ИПСК были охарактеризованы как праймированные по наличию экспрессии специфических маркеров – ядерных OCT4, SOX2 (рис. 1а, 1б) и поверхностных SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 (рис. 1в–1е), характерных для культуры ИПСК.

Репрограммирование праймированных ИПСК в наивное состояние с помощью культуральной среды RSeT

Культуральная среда RSeT является общепринятой средой для получения наивных ИПСК (X. Liu et al., 2017), которая была разработана по результатам экспериментальной работы Гафни и соавторов (Gafni et al., 2013). Из состава данной среды исключены ростовые факторы FGF2 и TGFb1, что позволяет репрограммировать клетки в состояние наивной плюрипотентности (Collier et al., 2017; Kilens et al., 2018; X. Liu et al., 2017; Mazid et al., 2022; Weatherbee et al., 2021). Репрограммирование на среде RSeT праймированных ПСК в наивное состояние удается за счет фактора LIF и ингибиторов ERK1/2 (PD0325901), GSK3β (CHIR99021), JNK (SP600125), p38 (SB204590), PKC (Go6985) (Gafni et al., 2013; Weatherbee et al., 2021). В нашей работе мы применили коммерческую среду RSeT для получения наивных ИПСК и использовали их в качестве положительного контроля для разработки протокола получения наивных ИПСК. На 3 и 5 сут культивирования в среде RSeT колонии ИПСК приобретают компактную, округлую и выпуклую форму, что морфологически отличает их от колоний праймированных ИПСК (рис. 2).

Иммунноцитохимический анализ наивных ИПСК показал, что основные маркеры плюрипотентности, а именно ядерные транскрипционные факторы OCT4 и SOX2 и мембранные маркеры TRA1-60 TRA1-81, экспрессируются в округлых и компактных колониях клеток (рис. 3а). Экспрессия маркера наивных ПСК STELLA была выявлена в цитоплазме и в перинуклеарной области клеток (рис. 3а). Мы использовали KLF17 как дополнительный маркер наивности, так как ранее было показано, что экспрессия *KLF17* увеличивается именно в наивных ПСК (Kilens et al., 2018; Yamauchi et al., 2020). Экспрессия KLF17 детектируется в цитоплазме и ядре наивных ИПСК (рис. 3а). Мы обнаружили колокализацию KLF17 с основным

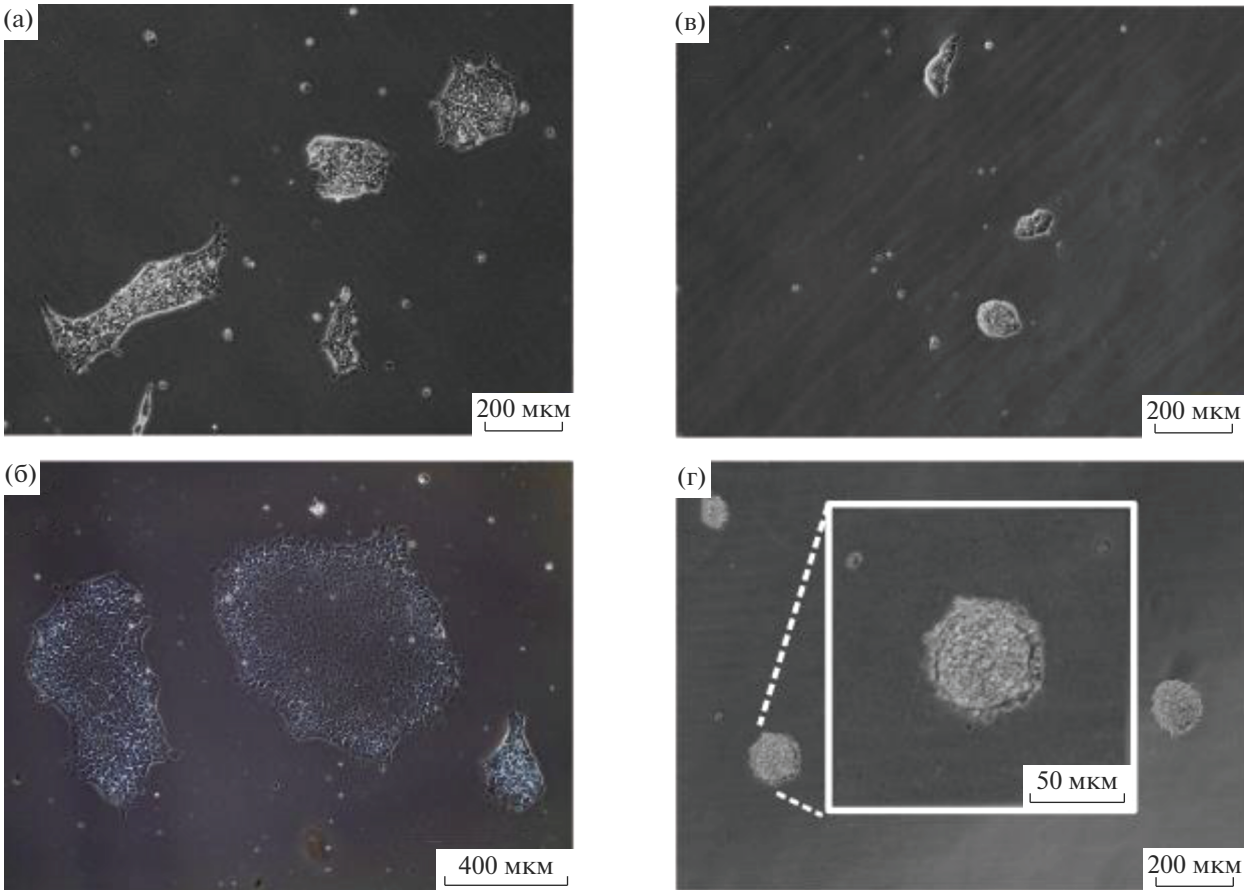


Рис. 2. Морфология колоний ИПСК. Фазово-контрастная микроскопия. (а) Праймированные ИПСК в среде mTeSR1 на 3 сут культивирования. (б) Праймированные ИПСК в среде mTeSR1 на 5 сут культивирования. (в) Наивные ИПСК в среде RSeT на 3 сут культивирования. (г) Наивные ИПСК в среде RSeT на 5 сут культивирования. Масштабный отрезок 200 мкм.

маркером плюрипотентности OCT4 в наивных ИПСК, культивируемых на среде RSeT (рис. 3а). При этом экспрессия KLF17 отсутствовала в праймированных ИПСК (рис. 3б). Ранее было показано, что *STELLA* экспрессируется в наивных ПСК человека (Ávila-González et al., 2021) и при подавлении его экспрессии предотвращается репрограммирование праймированных ПСК в наивное состояние (Mazid et al., 2022). Таким образом, изменение морфологии колоний и наличие маркеров наивного состояния ИПСК STELLA и KLF17 подтверждает репрограммирование праймированных ИПСК в наивное состояние культуральной средой RSeT.

2iF культуральная среда обладает свойством репрограммировать праймированные ИПСК в состояние, близкое к наивным

Отличительной чертой ПСК человека, в отличие от ПСК мыши, является то, что ПСК человека постоянно нуждаются в ростовых факторах FGF2 (Levenstein et al., 2006) и TGFb1 (Vallier et al., 2009) для самообновления в условиях *in vitro*. В отличие от них, ЭСК мыши сохраняют плюрипотентный потенциал и самообновляются в культуре только при наличии фактора LIF посредством активации сигнального каскада STAT3 (Dahéron et al., 2004; Ying et al., 2008). Для репрограммирования праймированных ИПСК человека в наивное состояние мы включили в состав базальной среды два ингибитора (2i), а именно ингибитор GSK3β (CHIR99021) и ингибитор сигнального пути MEK/ERK (PD0325901), а концентрации ростовых факторов FGF2 и TGFb1 снизили в два раза (2iF). Предварительно, то есть до начала культивирования в среде 2iF, праймированные ИПСК были обрабатывались ингибитором деацетилазы гистонов (HDACi) (рис. 4а).

Регуляция экспрессии гена зависит от локального ремоделирования хроматина и динамичных изменений нуклеосомной упаковки ДНК (Wolffe, 1997). В результате перестройки хроматина регулируется экспрессия генов, ответственных за самооб-

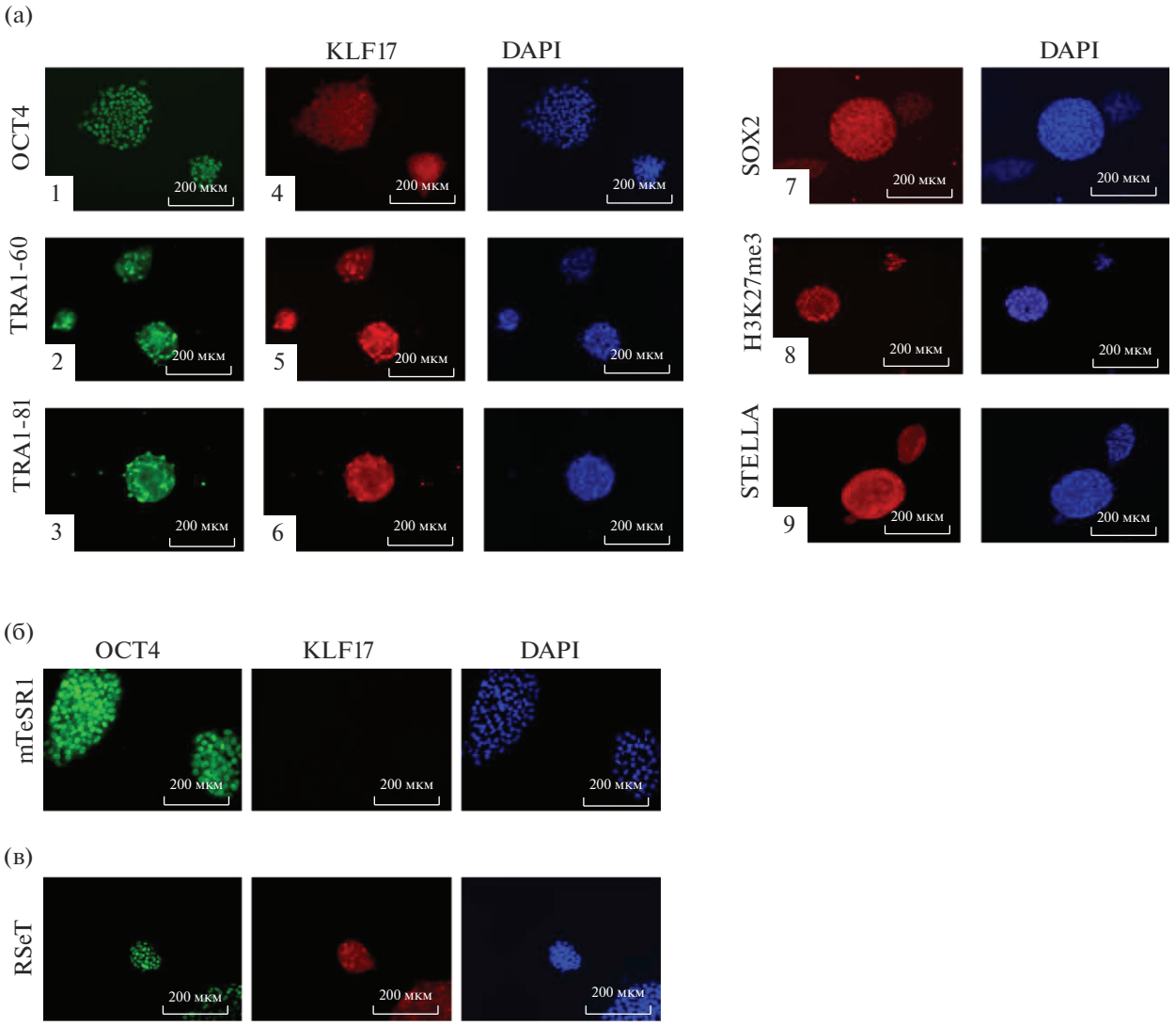
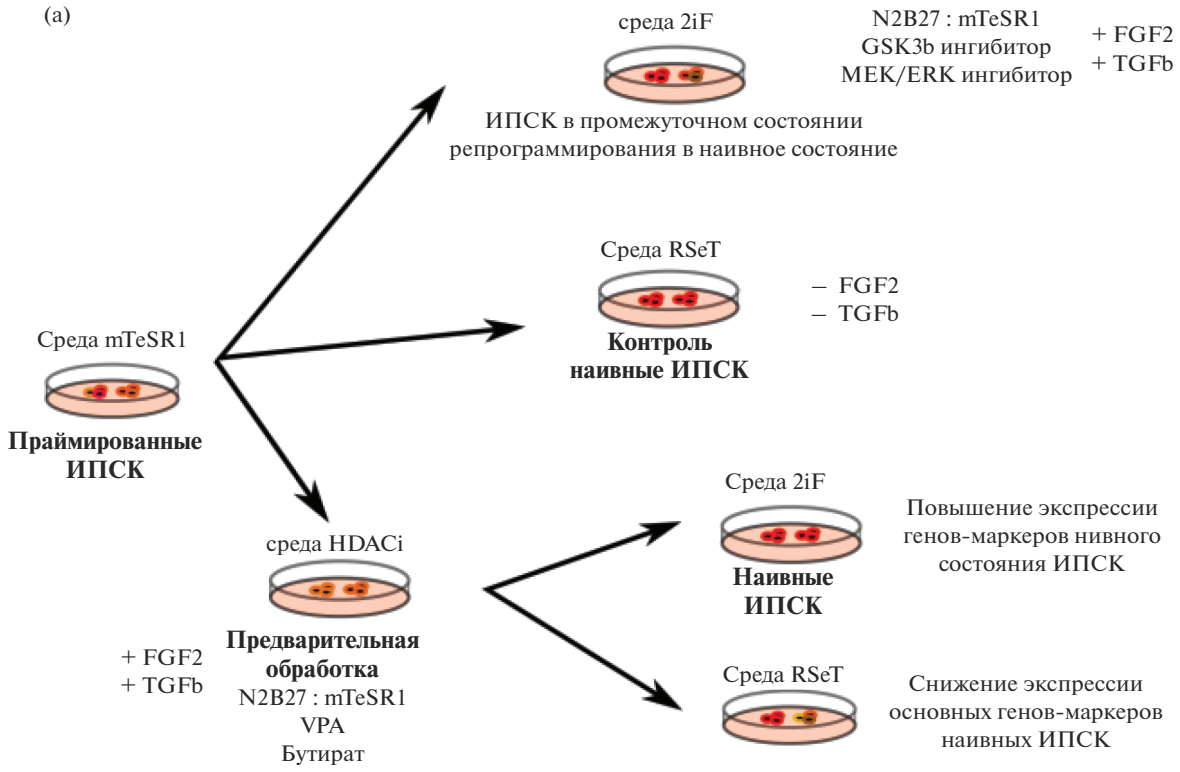
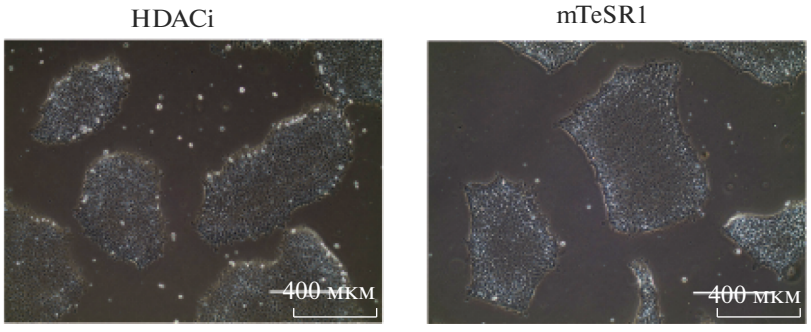


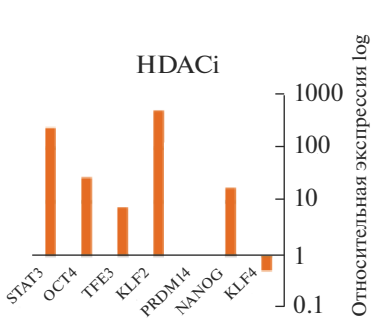
Рис. 3. Иммунноцитохимический анализ наивных ИПСК. (а) Экспрессия маркеров плюрипотентности в наивных ИПСК в среде RSeT, А1) OCT4, А2)TRA1-60, А3)TRA1-81 (зеленый), А4-А6) KLF17 (красный), А7) SOX2, А8) H3K27me3, А9) STELLA (красный). (б) Экспрессия маркеров плюрипотентности в праймированных ИПСК в среде mTeSR1. Б1) OCT4 (зеленый), Б2) KLF17 (красный). Флуоресцентная микроскопия. 5-е сут культивирования. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 200 мкм.

новление стволовых клеток и их дифференцировку (T. Liu et al., 2021). Ацетилирование N-конца гистона является одним из механизмов ремоделирования хроматина (Strahl, Allis, 2000), которое осуществляется ацетилтранферазой гистонов (HAT). Ацетилирование способствует распаковке ДНК (Ito, Adcock, 2002): с его помощью открываются участки промотеров генов для взаимодействия с транкрипционными факторами и РНК полимеразой II (Ito, Adcock, 2002), что приводит к активации экспрессии генов в участке ацетилированного гистона (Saraiva et al., 2010). Было показано, что при репрограммировании фибробластов мыши в ИПСК в промотерных областях генов *Oct3/4* и *Nanog* увеличивался уровень ацетилирования H3 гистонов относительно исходной линии клеток (Takahashi, Yamanaka, 2006). Уровень ацетилирования H3 гистонов в ЭСК мыши также оказался

Рис. 4. Предварительная обработка ИПСК в среде HDACi. (а) Схема эксперимента. (б) Морфология колоний ИПСК в среде HDACi (слева). Морфология колоний ИПСК в среде mTeSR1 (справа). Фазово-контрастная микроскопия, 5 сут культивирования. Масштабный отрезок 400 мкм. (в) Профиль экспрессии генов-маркеров плюрипотентности в ИПСК в среде HDACi относительно контрольных праймированных ИПСК в среде mTeSR1.


(а)
среда 2iF
N2B27 : mTeSR1
GSK3b ингибитор
MEK/ERK ингибитор
+ FGF2
+ TGFb
ИПСК в промежуточном состоянии
репрограммирования в наивное состояние
Среда RSeT
– FGF2
– TGFb
Контроль
наивные ИПСК
Среда mTeSR1
Праймированные
ИПСК
среда HDACi
+ FGF2
+ TGFb
Предварительная
обработка
N2B27 : mTeSR1
VPA
Бутират
Среда 2iF
Наивные
ИПСК
Повышение экспрессии
генов-маркеров нивного
состояния ИПСК
Среда RSeT
Снижение экспрессии
основных генов-маркеров
наивных ИПСК
0 сут
среда mTeSR1
+ ROCKi
1 сут
среда HDACi
– ROCKi
2–5 сут
среда HDACi
0 сут
+ ROCKi
среда HDACi
1 сут
+ ROCKi
среда 2iF
2–5 сут
– ROCKi
среда 2iF


(б)
HDACi
mTeSR1
400 мкм
400 мкм


(в)
HDACi
1000
100
10
1
0.1
Относительная экспрессия log
STAT3
OCT4
TFE3
KLF2
PRDM14
NANOG
KLF4

высоким (Takahashi, Yamanaka, 2006). Деацетилаза гистонов (HDAC) удаляет ацетильные группы с гистонов и способствует компактизации хроматина (Johnstone, 2002; Saraiva et al., 2010), при этом изменяется доступность промотерных регионов генов для транскрипционных факторов в деацетилированном участке гистонов, что приводит к подавлению экспрессии генов (Seto, Yoshida, 2014). Ингибирование HDAC приводит к гиперацетилированию гистонов (Seto, Yoshida, 2014) и повышению доступности ДНК в данном участке генома. Например, воздействие трихостатина А, одного из ингибиторов HDAC (HDACi), в малых дозах на ЭСК мыши вызывает замедление их пролиферации, увеличение дифференцировки и рост апоптотических клеток (Saraiva et al., 2010). Известны и другие HDACi, такие как вальпроевая кислота (VPA) и субероиланилид гидроксамовой кислоты (SAHA). Ингибирование HDAC с помощью VPA в гемопоэтических клетках-предшественниках при остром миелоидном лейкозе способствует дифференцировке данных опухолевых клеток и снижению метастазирования (Göttlicher et al., 2001; Seto, Yoshida, 2014). Бутират Na (бутират) также ингибирует HDAC, применение бутирата при культивировании ЭСК человека способствует поддержанию клеток в состоянии плюрипотентности (Ware et al., 2009). Бутират в отсутствии FGF2 способствует самообновлению ЭСК и их репрограммированию в более раннее состояние плюрипотентности (Ware et al., 2009). Ранее предварительная обработка культур ПСК HDACi использовалась в протоколах перепрограммирования клеток из праймированного состояния в наивное (Ware et al., 2014; Guo et al., 2018), которая была названа “эпигенетической перезагрузкой” (epigenetic resetting) (Guo et al., 2018). Ингибирование HDAC также использовалось для устранения “эпигенетической памяти” ИПСК и выравнивания клеток культуры по паттерну экспрессии генов (Huangfu et al., 2008). Соответственно, в данной работе мы применили бутират и VPA (HDACi) для предварительной обработки ИПСК перед репрограммированием в наивное состояние.

Для предварительной обработки праймированных ИПСК мы разработали состав базальной среды, которая включала среду N2B27 (на основе DMEM/F12 и Neurobasal) и среду mTeSR1 в соотношении 1 : 1. К базальной среде добавили VPA и бутират (HDACi). Эту среду мы далее будем называть HDACi среда. Предварительная обработка праймированных ИПСК проводилась в базальной среде с концентрацией FGF2 и TGFb1, сниженной в два раза по сравнению с mTeSR1 (рис. 4а). В результате в среде HDACi мы наблюдали морфологию клеток и колоний ИПСК, сопоставимую с данными в среде mTeSR1 (рис. 4б). В HDACi среде концентрация факторов роста FGF2 и TGFb1 снижена в 2 раза по сравнению со средой mTESR1. Следует отметить, что снижение концентрации данных факторов роста приводит к спонтанной дифференцировке праймированных ИПСК человека (данные не придоставлены), но наличие HDACi препятствует этому процессу (рис. 4б).

Уровень экспрессии генов *STAT3*, *OCT4*, *TFE3*, *KLF2*, *NANOG* увеличивался в ИПСК в HDACi среде относительно ИПСК, культивируемых в среде mTeSR1 (рис. 4в). Следует отметить, что в среде HDACi экспрессия *PRDM14* не изменяелась, в то время как экспрессия *KLF4* снижется относительно контроля праймированных ИПСК. Мы наблюдали повышение экспрессии генов-маркеров наивных ПСК в среде HDACi, однако морфология клеток и клеточных колоний была подобна праймированным ИПСК. Это свидетельствует о сохранении плюрипотентного состояния ИПСК в среде HDACi одновременно с их сдвигом в наивное состояние, о чем можно судить по данным, полученным с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

На следующем этапе исследования мы репрограммировали ИПСК, культивированные в среде HDACi, в наивное состояние с помощью применения среды RSeT и 2iF.

Анализ ПЦР-РВ ИПСК человека, культивированных в среде 2iF с предварительной обработкой HDACi, показал достоверное повышение экспрессии генов-маркеров наивного состояния *KLF4*, *KLF17*, *PRDM14*, *YAP*, *DAZL*, *STELLA*, *REX1* и понижение экспрессии *KLF2*, *STAT3* по сравнению с праймированными клетками. В то же время, у ИПСК в среде RSeT, также предварительно обработанных HDACi, наблюдали повышенный уровень экспрессии *KLF17, STELLA, REX1* и пониженный уровень экспрессии *KLF2*, *KLF4*, *PRDM14*, *STAT3*, и *DAZL* (рис. 5а). Экспрессия *OCT4* повышалась в обеих культурах, в то время как экспрессия *SOX2* не менялась. Уровень экспрессии *NANOG* снижался в обеих культурах. К нашему удивлению, в культуре 2iF с предварительной обработкой HDACi повышалася экспрессия гена ДНК метилтрансферазы 3B (*DNMT3B*), а в среде RSeT она понижалась относительно контроля (праймированных ИПСК на среде mTeSR1) (рис. 5а). DNMT3B ответственна за *de novo* полногеномное метилирование ДНК в ходе развития эмбриона мыши (T. Chen et al., 2002). Ранее было показано, что при культивировании ПСК в условиях 2i происходит гипометилирование за счет подавление *DNMT3B* (Sim et al., 2017). А подавление экспрессии *DNMT3B* в наивных ПСК опосредуется активацией экспрессии PRDM14 (Okashita et al., 2014). В свою очередь PRDM14, является сайт специфическим транскрипционным активатором и репрессором во время репрограммирования ПСК из праймированного состояния плюрипотентности в наивное

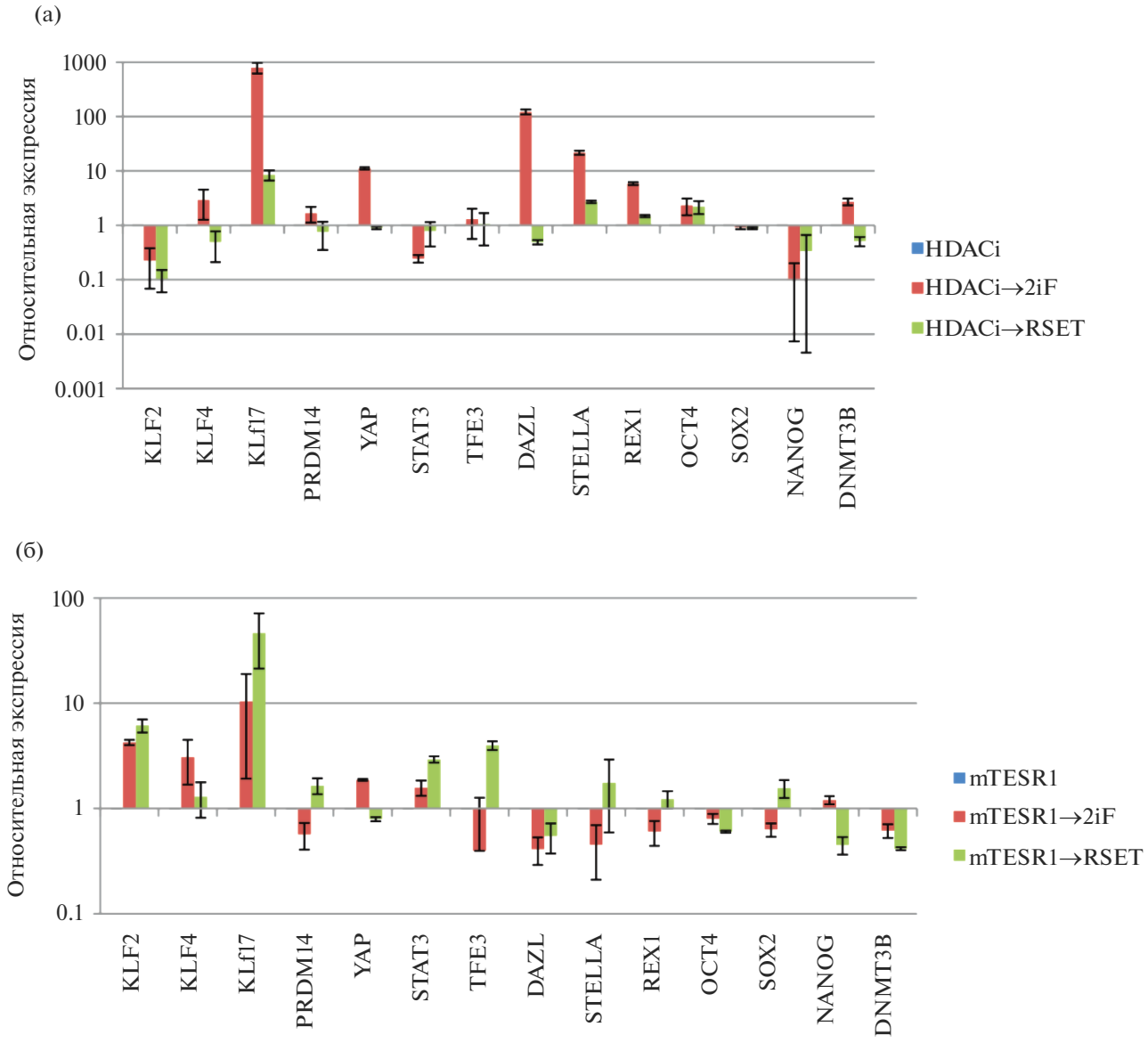


Рис. 5. Экспрессия генов-маркеров плюрипотентности в ИПСК при различных условиях репрограммирования в наивное состояние. (а) Сравнение профиля экспрессии маркерных генов в ИПСК в среде 2iF и RSeT с предварительной обработкой праймированных ИПСК в среде HDACi. (б) Сравнение профиля экспрессии маркерных генов в ИПСК в среде 2iF и RSeT без предварительной обработки праймированных ИПСК в среде HDACi. Представлены средние значения и разброс в виде ошибки среднего.

(Yamamoto et al., 2020). PRDM14 транзиентно экспрессируется в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты мыши и его уровень экспрессии снижается в пост-имплантационном эпибласте (Seki, 2018). Мы обнаружили, что экспрессия *PRDM14* повышается в ИПСК, предварительно обработанных HDACi в среде 2iF. В связи с этим ожидалось снижение экспрессии *DNMT3B* в ИПСК предварительно обработанных HDACi в среде 2iF. Но в нашем эксперименте экспрессия *DNMT3B* в условиях предварительной обработки ИПСК HDACi в среде 2iF повышается. Предварительная обработка HDACi перед культивированием в коммерческой среде RSeT приводит к снижению экспрессии основных маркеров наивных ИПСК человека, в то время как при культивировании ИПСК, предварительно обработанных HDACi, в среде 2iF уровень экспрессии “генов наивности” повышается (рис. 5а).

Полученные данные по экспрессии генов-маркеров наивных ИПСК в средах 2iF и RSeT с предварительной обработкой клеток HDACi подтверждают результаты иммуноцитохимического анализа. По его результатам OCT4 и KLF17-пози-

тивные клетки обнаруживаются в культуре наивных ИПСК на среде RSeT (рис. 3).

В нашем исследовании мы также проанализировали наивные ИПСК в условиях среды RSeT и среды 2iF без предварительной обработки HDACi.

Исследование экспрессии генов, специфичных для наивных ИПСК, необработанных HDACi и культивируемых в среде RSeT, показало, что они характеризуются повышенной экспрессией транскрипционных факторов: *KLF2*, *KLF17*, *PRDM14*, *STAT3*, *TFE-3* и *REX1* (рис. 5б). При этом уровень экспрессии *KLF4* и *YAP* не изменялся, либо снижался. Также было отмечено подавление экспрессии *DAZL* и повышение экспрессии *STELLA* в ИПСК в среде RSeT. При этом экспрессия основных маркеров плюрипотентности ИПСК *OCT4*, *NANOG* в среде RSeT снижалась, а уровень экспрессии *SOX2* увеличивалась. При культивировании ИПСК человека в среде 2iF без предварительной обработки HDACi наблюдался высокий уровень экспрессии ряда исследуемых генов: *KLF2*, *KLF4*, *KLF17*, *STAT3*, и *YAP*. В то же время уровень экспрессии *PRDM14*, *TFE3*, *DAZL*, *STELLA*, и *REX1* достоверно снижаелся по сравнению с их экспрессией в праймированных клетках (рис. 5б). В условиях культивирования в среде 2iF без предварительной обработки HDACi экспрессия основных генов-маркеров плюрипотентности, *OCT4* и *SOX2*, снижалась, а *NANOG* – повышалась. В условиях обеих сред, 2iF и RSeT, наблюдалось подавление экспрессии *DNMT3B,* маркера метилирования ДНК *de novo*, относительно праймированных ИПСК в среде mTeSR1 (рис. 5б). ПЦР-РВ анализ экспрессии генов-маркеров наивных ПСК показал, что в среде RSeT ИПСК стабильно репрограммируются в наивное состояние без необходимости предварительной обработки HDACi. При этом репрограммирование ИПСК в среде 2iF и без обработки HDACi происходит с низкой эффективностью. Результаты ПЦР-РВ анализа также показывают, что репрограммирование праймированных ИПСК человека в наивное состояние плюрипотентности в разработанной нами среде 2iF с предварительной обработкой клеток HDACi соотносится с данными, полученными для наивных ИПСК, культивируемых в среде RSeT без предварительной обработки HDACi (контрольные наивные ИПСК).

Следует отметить, что предварительная обработка ИПСК HDACi изменяет траекторию репрограммирования клеток. Без обработки HDACi в среде 2iF ИПСК частично репрограммируются, но при этом сохраняют повышенную экспрессию *KLF2* (рис. 5). В то же время, при предварительной обработке HDACi в той же среде ИПСК снижают экспрессию *KLF2*. Таким образом, можно предположить, что доступность хроматина определяет механизм репрограммирования праймированных ИПСК в наивное состояние.

FGF2-зависимые ИПСК человека находятся в праймированном состоянии *in vitro*, и по профилю экспрессии и эпигенитическому статусу эквивалентны клеткам постимплантационного эпибласта человека. Кроме того, праймированные ИПСК теряют способность дифференцироваться в трофэктодерму, а вместо нее образуют клетки амниона. Учитывая гетерогенность клеточной популяции ИПСК и предрасположенность этих клеток к дифференцировке в клетки трех зародышевых листков, эффективность направленной диффренцировки праймированных ИПСК будет низкой. Среда mTeSR1 обеспечивает культивирование ИПСК в праймированном состоянии. В нашем эксперименте мы снизили влияние среды mTeSR1 на праймированность за счет снижения концентрации FGF2 и TGFb в два раза. Помимо этого, для получения наивных ИПСК мы ингибировали MEK сигнальный путь и активировали WNT сигнальный каскад путем ингибирования GSK3b. Стоит отметить, что FGF2 активирует как каскад сигнального пути MEK, так и ERK 1/2.

Ранее было показано, что нокаутирование ERK2 в праймированных ЭСК человека приводит к потере ими плюрипотентности. С другой стороны, ингибирование MEK применяется при репрограммировании праймированных ИПСК в наивное состояние. Соответственно, в нашем эксперименте мы ингибировали MEK и сохраняли активность сигнального каскада FGF путем добавления FGF2 в культуральную среду. Наше решение добавить FGF2 и TGFb в разработанную нами среду 2iF для получения наивных ИПСК было подкреплено экспериментальными работами. В этих работах было показано, что FGF2 долгосрочно ингибирует ERK в ЭСК мыши за счет работы FGF2-индуцированной некогерентной петли прямой связи. Тем не менее, добавление в среду FGF2 повышало уровень экспрессии канонических генов-маркеров наивных ЭСК мыши *Klf4*, *Klf5*, *Tfcp2l1*, *Nrob1* и *Essrb* (Gharibi et al., 2020). Кроме того, известно, что ингибирование TGFb сигнального пути в преимплантационном эмбрионе человека приводит к снижению экспрессии *NANOG* и *SOX17*, а также к и полному подавлению экспрессии этих генов в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты человека. Именно это приводит к тому, что у эмбриона человека на стадии E6-E7 (в отличии от мышиного эмбриона) отсутствуют NANOG-положительные плюрипотентные клетки (Blakeley et al., 2015). Следовательно, TGFb сигнальный путь играет важную роль в сохранении клетками плюрипотентности. Помимо этого, можно предположить, что предварительная обработка ИПСК в среде HDACi переводит клетки в более раннее состояние, а 2iF сре-

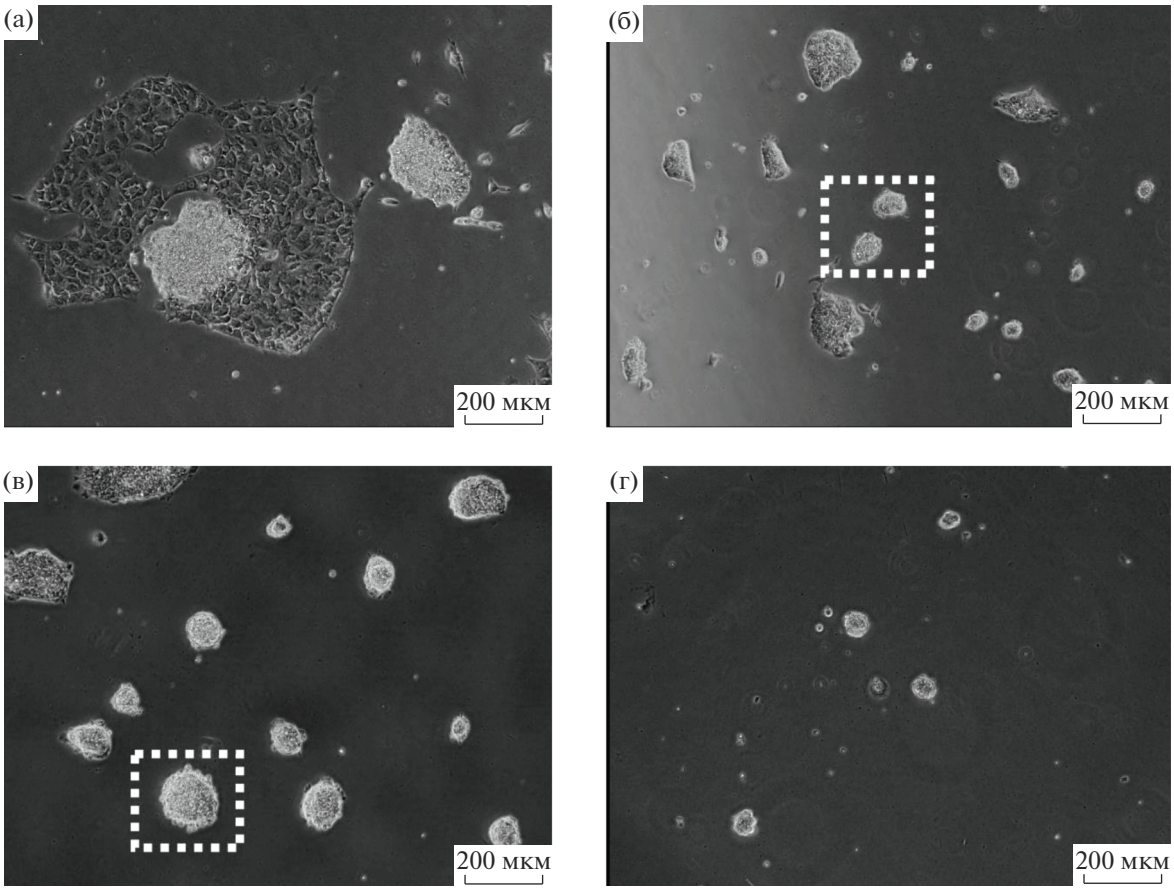


Рис. 6. Морфология ИПСК, репрограммированных в наивное состояние. (а) ИПСК в среде 2iF без предварительной обработки в среде HDACi. (б) ИПСК в среде 2iF с предварительной обработкой в среде HDACi. (в) ИПСК в среде RSeT без предварительной обработки в среде HDACi. (г) ИПСК в среде RSeT с предварительной обработкой в среде HDACi. Пунктиром отмечены колонии клеток с морфологией, типичной для наивных ИПСК. Фазово-контрастная микроскопия, 5-е сут культивирования. Масштабный отрезок 200 мкм.

да успешно репрограммирует ИПСК в наивное состояние (рис. 6).

Проведенные нами эксперименты на ИПСК человека с использованием 2iL (LIF + CHIR + PD) показали, что клетки в таких условиях дифференцируются (рис. 7), что согласуется с данными литературы (Hanna et al., 2010; Ware et al., 2014). Далее было проанализировано влияние на клетки 2iL в присутствии VPA, натрий бутирата и XAV939 (ингибитор WNT сигнального пути). Анализ результатов этих экспериментов подтвердил, что ИПСК дифференцируются и замедляют рост. Основываясь на том, что LIF не способен поддержать плюрипотентность праймированных ЭСК (Dahéron et al., 2004) и ИПСК человека (данные полученные нами), мы перестали использовать фактор LIF при переводе праймированных ИПСК в наивное состояние. Однако известно, что в результате гиперэкспрессии STAT3 активность LIF/JAK переводит праймированные ЭСК человека в наивное состояние в условиях 2iL (H. Chen et al., 2015). Поэтому мы обратили внимание на экспрессию *STAT3* в ИПСК, обработанных HDACi, в сравнении с праймированными ИПСК и определили, что под действием HDACi в отсутствии фактора LIF у ИПСК увеличивается экспрессия *STAT3* (рис. 4б). Убедившись в повышении экспрессии *KLF2*, *TFE3*, *NANOG* (рис. 4б), мы продолжили разработку протокола. Оказалось, что при данных условиях повышается экспрессия *STAT3* и, возможно, LIF/JAK сигнальный путь активируется в отсутствии LIF, но при участии FGF2 и TGFb1. Полученные нами данные не противоречат данным, имеющимся в литературе. Возможно, состояние плюрипотентности ИПСК стабилизируют за счет компенсаторных сигнальных механизмов (так называемые “crosstalk mechanisms”).

Было показано, что глобальная гиперактивация суперэнхасеров приводит к репрограммированию праймированных ПСК в наивное состояние плюрипотентности путем модуляции медиаторов на энхансерах (Lynch et al., 2020). В результате этого, РНК полимераза II привлекается на промоторы, и

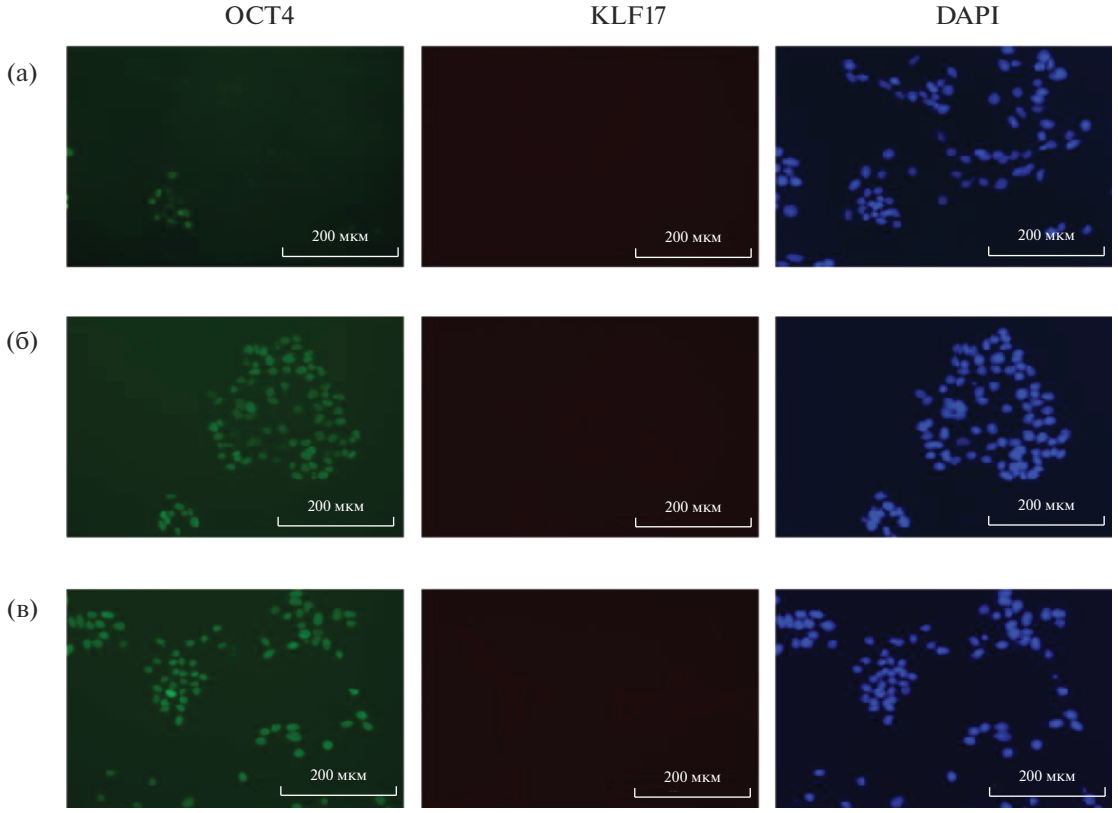


Рис. 7. Иммунноцитохимический анализ ИПСК. Экспрессия маркеров плюрипотентности на OCT4 и KLF17 в ИПСК, культивируемых в условиях: (а) 2iL; (б) 2iL + HDACi; (в) 2iL + HDACi + XAV. Флуоресцентная микроскопия. 5-е сут культивирования. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 200 мкм.

активируется экспрессия генов-маркеров *NANOG*, *KLF4*, *OCT4* (Lynch et al., 2020). ПСК с характеристиками, свойственным состоянию наивной плюрипотентности, были стабилизированы путем глобальной гиперактивации суперэнхасеров за счет применения полной среды mTeSR1 с добавлением ингибиторов циклин-зависимых киназ 8 и 19 (далее CDK8/19) (Lynch et al., 2020). Данные киназы, репрессируют активность комплекса медиаторов на энхансерах, предотвращая связывание РНК полимеразы II с промоторами (Jeronimo, Robert, 2017). В наивных ПСК, полученных путем ингибирования CDK8/19, не наблюдалось глобального удаления меток ДНК метилирования. Регуляция репрограммирования праймированных ПСК в наивное состояние плюрипотентности с ингибированной CDK8/19 происходила на уровне транскриптома. Она осуществлялась за счет увеличения экспрессии “наивных маркеров плюрипотентности” и подавления экспрессии генов, вовлеченных в дифференцировку клеток. В работе Линч с соавторами (2020) сигнальные пути FGF и TGFb1 остаются активными, и ингибирование CDK8/19 достаточно для репрограммирования праймированных ПСК в наивное состояние. В нашей работе для репрограммирования клеток в наивное состояние плюрипотентности мы использовали ингибирование HDAC. Данный подход приводит к де-компактизации хроматина и повышении доступности промоторов и энхансеров. Благодаря его применению мы наблюдали у репрограммируемых клеток экспрессию KLF17 и генов *KLF4*, *YAP*, *DAZL*, *STELLA* (рис. 5).

У эмбрионов человека и мыши различные состояния плюрипотентности ПСК (наивное и праймированное), а также утрата ПСК способности образовывать внезародышевые клетки (трофэктодерму и клетки амниона) с развитием в постимплантационный эпибласт регулируются за счет эпигенетического воздействия, модулирующего активность генома. В настоящее время исследования раннего эмбриогенеза человека сфокусированы на выявлении фундаментальных закономерностей и динамики эпигенетической регуляции генома. Эти эпигенетические регуляции тонко определяют состояние плюрипотентности ПСК *in vivo* и *in vitro*. Разработанный нами протокол получения наивных ИПСК *in vitro* позволит продвинуться в изучении данных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате применения разработанных нами протокола и культуральных сред мы получили ИПСК с более ранним состоянием плюрипотентности, которые повышают экпрессию генов-маркеров наивных ИПСК, таких как *KLF17*, *KLF4*, *STELLA*, *REX1*, *YAP*. Мы показали, что репрограммирование праймированных ИПСК в состояние плюрипотентности *in vitro* осуществимо при их предварительной обработке HDACi и последующим культивированием в разработанной нами среде 2iF. Полученные в данных условиях ИПСК по морфологии и профилю экспрессии маркерных генов ПСК были сопоставимы с охарактеризованными в нашей работе контрольными наивными ИПСК в среде RSeT. Однако следует отметить, что для подтверждения эффективности репрограмирования ИПСК в наивное состояние необходимо проделать дополнительные эксперименты, такие как РНК секвенирование единичных клеток. Кроме того, функциональным подтверждением наивности ИПСК может быть их успешная дифференцировка в трофэктодерму и клетки плаценты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-30015).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.К. Абдыев планировал экспериментальную работу, выполнил эксперименты, анализировал результаты и написал текст статьи, А.Л. Риппа написала и редактировала текст статьи, Н.А. Аракелян выполнила часть экспериментов, Е.А. Воротеляк отредактировала текст и участвовала в разработке концепции исследования, А.В. Васильев редактировал текст статьи и участвовал в разработке концепции исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ávila-González D., Portillo W., García-López G. et al. Unraveling the spatiotemporal human pluripotency in embryonic development // Front. Cell Dev. Biol. 2021. V. 9. https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.676998/BIBTEX

Blakeley P., Fogarty N.M.E., Del Valle I. et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq // Development. 2015. V. 142. № 18. P. 3151–3165. https://doi.org/10.1242/dev.123547

Chen H., Aksoy I., Gonnot F. et al. Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency // Nat. Commun. 2015. V. 6. №1. https://doi.org/10.1038/ncomms8095

Chen T., Ueda Y., Xie S., Li E. A Novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with activede covo methylation // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 41. P. 38746–38754. https://doi.org/10.1074/JBC.M205312200

Collier A.J., Panula S.P., Schell J.P. et al. Comprehensive cell surface protein profiling identifies specific markers of human naive and primed pluripotent states // Cell Stem Cell. 2017. V. 20. № 6. P. 874–890.e7. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2017.02.014

Dahéron L., Opitz S. L., Zaehres H. et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells // Stem Cells. 2004. V. 22. № 5. P. 770–778. https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-770

Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156. https://doi.org/10.1038/292154a0

Gafni O., Weinberger L., Mansour A.A. et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells // Nature. 2013. V. 504. № 7479. P. 282–286. https://doi.org/10.1038/nature12745

Gharibi B., Gonçalves E., Nashun B. et al. A FGF2-mediated incoherent feedforward loop induces Erk inhibition and promotes naïve pluripotency // BioRxiv. 2020. https://doi.org/10.1101/2020.11.11.378869

Gordeev M.N., Bakhmet E.I., Tomilin A.N. Pluripotency dynamics during embryogenesis and in cell culture // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52 № 6. P. 379–389. https://doi.org/10.1134/S1062360421060059

Göttlicher M., Minucci S., Zhu P. et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells // EMBO J. 2001. V. 20. № 24. P. 6969–6978. https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969

Guo G., Meyenn F. Von, Rostovskaya M. et al. Epigenetic resetting of human pluripotency // Development. 2018. V. 145. № 8. https://doi.org/10.1242/dev.166397

Guo G., Stirparo G.G., Strawbridge S.E. et al. Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 6. P. 1040–1056.e6. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2021.02.025

Hanna J., Cheng A.W., Saha K. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 20. P. 9222–9227. https://doi.org/10.1073/pnas.1004584107

Huangfu D., Maehr R., Guo W. et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds // Nat. Biotechnol. 2008.

V. 26. № 7. P. 795–797.
https://doi.org/10.1038/nbt1418

Ito K., Adcock I.M. Histone acetylation and histone deacetylation // Mol. Biotechnol. 2002. V. 20. № 1. P. 99–106.
https://doi.org/10.1385/MB:20:1:099

Jeronimo C., Robert F. The mediator complex: at the nexus of RNA polymerase II transcription // Trends Cell Biol. 2017. V. 27. № 10. P. 765–783.
https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.07.001

Johnstone R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer // Nat. Rev. Drug Discov. 2002. V. 1. № 4. P. 287–299.
https://doi.org/10.1038/nrd772

Kilens S., Meistermann Di., Moreno Di. et al. Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1. P. 1–13.
https://doi.org/10.1038/s41467-017-02107-w

Lagarkova M.A., Eremeev A.V., Svetlakov A.V. Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization // In Vitro Cell. Dev. Biol. 2010. V. 46. № 3–4. P. 284–293.
https://doi.org/10.1007/s11626-010-9282-6

Lau K.X., Mason E.A., Kie J. et al. Unique properties of a subset of human pluripotent stem cells with high capacity for self-renewal // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 1–18.
https://doi.org/10.1038/s41467-020-16214-8

Leitch H.G., McEwen K.R., Turp A. et al. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. № 3. P. 311–316.
https://doi.org/10.1038/nsmb.2510

Levenstein M.E., Ludwig T.E., Xu R.-H. et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal // Stem Cells. 2006. V. 24. № 3. P. 568–574.
https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2005-0247

Liu T., Li J., Yu L. et al. Cross-species single-cell transcriptomic analysis reveals pre-gastrulation developmental differences among pigs, monkeys, and humans // Cell Discov. 2021. V. 7. № 1. P. 1–17.
https://doi.org/10.1038/s41421-020-00238-x

Liu X., Nefzger C.M., Rossello F.J. et al. Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming // Nat. Methods. 2017. V. 4. № 11. P. 1055–1062.
https://doi.org/10.1038/nmeth.4436

Lynch C.J., Bernad R., Martínez-Val A. et al. Global hyperactivation of enhancers stabilizes human and mouse naive pluripotency through inhibition of CDK8/19 Mediator kinases // Nat. Cell Biol. 2020. V. 22. № 10. P. 1223–1238.
https://doi.org/10.1038/s41556-020-0573-1

Mazid M.A., Ward C., Luo Z. et al. Rolling back human pluripotent stem cells to an eight-cell embryo-like stage // Nature. 2022. V. 605. № 7909. P. 315–324.
https://doi.org/10.1038/s41586-022-04625-0

Molè M.A., Coorens T.H.H., Shahbazi M.N. et al. A single cell characterisation of human embryogenesis identifies pluripotency transitions and putative anterior hypoblast centre // Nat. Commun. 2021. V. 12. № 1. P. 1–12.
https://doi.org/10.1038/s41467-021-23758-w

Nichols J., Smith A. Naive and primed pluripotent states // Cell Stem Cell. V. 4. № 6. P. 487–492.
https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015

Novo C.L.A. Tale of two states: pluripotency regulation of telomeres // Front. Cell Dev. Biol. 2021. V. 9.
https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.703466

Okashita N., Kumaki Y., Ebi K. et al. PRDM14 promotes active DNA demethylation through the Teneleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells // Development. 2014. V. 141. № 2. P. 269–280.
https://doi.org/10.1242/dev.099622

Posfai E., Schell J.P., Janiszewski A. et al. Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency // Nat. Cell Biol. 2021. V. 23. № 1. P. 49–60.
https://doi.org/10.1038/s41556-020-00609-2

Rossant J., Tam P.P.L. New insights into early human development: lessons for stem cell derivation and differentiation // Cell Stem Cell. 2017. V. 20. № 1. P. 18–28.
https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.004

Saraiva N.Z., Oliveira C.S., Garcia J.M. Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation // World J. Stem Cells. 2010. V. 2. № 6. P. 121.
https://doi.org/10.4252/WJSC.V2.I6.121

Seki Y. PRDM14 is a unique epigenetic regulator stabilizing transcriptional networks for pluripotency // Front. Cell Dev. Biol. 2018. V. 6. № 12.
https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00012

Seto E., Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes // Cold Spring Harb. perspect. biol. 2014. V. 6. № 4. P. a018713.
https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018713

Shahbazi M.N. Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back // Development. 2020. V. 147. № 14.
https://doi.org/10.1242/dev.190629

Sim Y.-J., Kim M.-S., Nayfeh A., Yun Y.-J. et al. 2i Maintains a naive ground state in ESCs through two distinct epigenetic mechanisms // Stem Cell Reports. 2017. V. 8. № 5. P. 1312–1328.
https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.001

Smith A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2003. V. 17. № 1. P. 435–462.
https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.17.1.435

Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications // Nature. 2000. V. 403. № 6765. P. 41–45.
https://doi.org/10.1038/47412

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. V. 126. № 4. P. 663–676.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Vallier L., Mendjan S., Brown S. et al. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression // Development. 2009. V. 136. № 8. P. 1339–1349.
https://doi.org/10.1242/dev.033951

Ware C.B., Nelson A.M., Mecham B. et al. Derivation of naive human embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 12. P. 4484–4489. https://doi.org/10.1073/pnas.1319738111

Ware C.B., Wang L., Mecham B.H. et al. Histone deacetylase inhibition elicits an evolutionarily conserved self-renewal program in embryonic stem cells // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. № 4. P. 359–369. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.001

Weatherbee B.A.T., Cui T., Zernicka-Goetz M. Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells // Dev. Biol. 2021. V. 474. P. 91–99. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.12.010

Wolffe A.P. Sinful repression // Nature. 1997. V. 387. № 6628. P. 16–17. https://doi.org/10.1038/387016a0

Yamamoto M., Suwa Y., Sugiyama K. et al. PRDM14-CtBP1/2-PRC2 complex regulates transcriptional repression during transition from primed to naïve pluripotency // J. Cell Sci. 2020. https://doi.org/10.1242/jcs.240176

Yamauchi K., Ikeda T., Hosokawa M. et al. Overexpression of nuclear receptor 5A1 induces and maintains an intermediate state of conversion between primed and naive pluripotency // Stem Cell Rep. 2020. V. 14. № 3. P. 506–519. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.01.012

Ying Q.-L., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal // Nature. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523. https://doi.org/10.1038/nature06968

Reprogramming of Primed Human Pluripotent Stem Cells into a Naive State

V. K. Abdyev[1, *], A. L. Rippa[1], N. A. Arakelyan[1], E. A. Vorotelyak[1], and A. V. Vasiliev[1]

[1]Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

**e-mail: mailtovepa@gmail.com*

Human pluripotent stem cells (PSCs) can be maintained in a naive or primed state of pluripotency *in vitro*. Being in one state or another, PSCs have different potentials of differentiation into extra-embryonic and germinal derived cells of the embryo. In terms of the expression profile and epigenetic pattern of the genome, naive PSCs are comparable to the cells of the inner cell mass of the blastocyst, while primed PSCs are similar in their characteristics to the cells of the postimplantation epiblast. Reprogramming of primed PSCs into the naive state and maintenance of naïve PSCs in culture is a crucial issue in studying the epigenetic processes of preimplantation development of the human embryo and methods for efficient differentiation of PSCs into derivatives of embryonic and extra-embryonic cells. The aim of this work is to reprogram primed induced pluripotent stem cells (iPSCs) into a naïve pluripotent state to obtain a homogeneous population of iPSCs according to the state of pluripotency in culture. The task of this work is to develop a protocol and conditions for reprogramming primed iPSCs into a naive state of pluripotency. In this work, naive iPSCs were obtained under conditions of application of growth factors FGF2, TGFβ1 and inhibition of GSK3β and the MEK/ERK signaling pathway (2iF medium). Pretreatment of primed iPSCs with histone deacetylase inhibitors (HDACi) changes the cell morphology and gene expression profile of PSCs towards an earlier state of pluripotency. Using pretreatment of HDACi primed iPSCs followed by maintaining in 2iF medium, we obtained naive iPSCs comparable in colony morphology and expression profile of naive state marker genes with control naive iPSCs obtained in RSeT medium. In order to confirm the naive state of pluripotency of iPSCs obtained 2iF conditions, it is necessary to carry out single cell RNA sequencing.

Keywords: PSCs, iPSCs, naïve iPSCs, primed iPSCs, reprogramming, HDACi, 2iF medium, RSeT