



РОЛЬ МАТЕРИНСКОГО ГЕНА *pou5f3.3/oct60* В РЕГУЛЯЦИИ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ТКАНЕЙ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ *Xenopus laevis*

© 2020 г. Е. А. Паршина*, А. Г. Зарайский*, Н. Ю. Мартынова*, #

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 28.04.2020 г.

После доработки 06.05.2020 г.

Принята к публикации 16.05.2020 г.

Изучена роль материнского фактора Pou5f3.3/Oct60 шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, гомолога регулятора плюрипотентности стволовых клеток млекопитающих, белка Oct4, в раннем эмбриональном развитии. Было показано, что максимум концентрации белка Pou5f3.3/Oct60 наблюдается на стадии бластулы, а в дальнейшем происходит его деградация, стимулируемая посттрансляционными модификациями после активации генома зародыша. При помощи подхода, основанного на овер-экспрессии Pou5f3.3/Oct60 в зародышах было установлено, что этот белок активирует экспрессию ранних генов-маркеров плюрипотентности – *pou5f3.2*, *vent2.2/2.1*, *klf 4/5*, но ингибирует экспрессию генов цитоскелета и клеточной адгезии – *actin*, *claudin*, *zuxin*, *ldb3*. Кроме того, Pou5f3.3/Oct60 ингибирует экспрессию генов *ag1/2* и *agr2*, участвующих в регуляции дифференцировки регенерационной бластемы ампутированных конечностей, а также в регуляции раннего развития мозга. Учитывая консервативность ранних стадий развития у позвоночных животных, данные, полученные на зародышах *Xenopus laevis*, могут быть использованы для лучшего понимания механизмов раннего развития млекопитающих, включая человека.

Ключевые слова: эмбриогенез, плюрипотентность, дифференцировка, транскрипционные факторы, POU5, pou5f3.3, мРНК

DOI: 10.31857/S013234232006024X

ВВЕДЕНИЕ

Развитие многоклеточных животных начинается с оплодотворенного яйца или зиготы, и сначала регулируется транскриптами генов, запасенных в яйцеклетке, т.н. материнскими транскриптами. Далее происходит активация генома зародыша и контроль за развитием переходит от материнских генов к генам зародыша. До и во время активации генома зародыша судьба клеток еще не определена: каждая из клеток может развиваться в любую из тканей зародыша – т.н. состояние плюрипотентности клеток. В ходе дифференцировки клетки теряют это свойство. Для правильного раннего развития необходима как пространственная разметка зародыша, так и точная временная программа перехода клеток от плюрипотентного к дифференцированному статусу.

Для зародышей амфибий, рыб и *Drosophila* материнско-зародышевый переход происходит на стадии бластулы и поэтому называется термином

“Midblastula Transition” (МВТ), его обычно применяют к организмам, начинающим свою жизнь с серии быстрых делений. У этих животных удлинение клеточного цикла, начало клеточных движений, деградация материнских мРНК и начало транскрипции генов зародыша (ZGA, Zygotic Gene Activation), совпадают во времени. Генетические эксперименты последних десятилетий выявили десятки генов, определяющих судьбу клеток в развитии. Большая часть этих генов кодирует эволюционно консервативные факторы транскрипции, что делает возможным использование этих животных, развитие которых протекает во внешней среде, в качестве модельных организмов для получения знаний о молекулярных механизмах, обеспечивающих точную координацию программ дифференцировки клеток разных типов, протекающих одновременно в разных частях зародыша [1].

Классическими генами плюрипотентности, известными также как маркеры стволовых клеток млекопитающих, являются гены семейства POU. Эти гены кодируют транскрипционные регуляторы, содержащие Pou-домен, который состоит из двух ДНК-связывающих областей: С-концевая об-

Автор для связи: (тел: +7 (916) 181-16-32; факс: +7 (495) 336-86-11; эл. почта: martnat61@gmail.com).

ласть содержит консервативный Pou-гомеодомен (POUH), а N-концевая область — уникальный Pou-специфичный домен (POUs). Обе области незаменимы для специфического связывания ДНК, при этом POUH и POU5 области являются структурно независимыми доменами, соединенными гибким линкером. Такая организация доменов позволяет этим факторам участвовать в как в связывании с ДНК, так и в белок-белковых взаимодействиях. POU5 домен является уникальным для POU-белков, по этому домену белки POU классифицируются на 6 семейств транскрипционных регуляторов POU1–POU6.

Белки OCT являются подсемейством POU и включают POU2, POU3 и POU5 семейства. Свое название — OCT — эти белки приобрели благодаря способности распознавать консенсусную последовательность в 8 пар нуклеотидов, называемую “октамерный мотив” [ATGC(A/T)AAT]. Известно, что 5' — область этого мотива, ATGC, связывается POU-специфичным доменом (POUs), в то время как 3'-половина сайта (A/T)AAT связана с POU-гомеодоменом (POUH). Белок OCT4 млекопитающих, кодируемый геном *Pou5f1* был первым идентифицирован как фактор, который экспрессируется в плюрипотентных клетках. Показано, что активация эндогенного фактора OCT4 необходима для индукции плюрипотентных клеток из соматических в экспериментах по перепрограммированию [1, 2]. В то же время, помимо роли в поддержании плюрипотентности в клеточных культурах было показано участие OCT4 в наиболее раннем событии дифференцировки тканей — разделении внутренней клеточной массы (inner cell mass) и трофэктодермы (trophectoderm) на эмбриональных стволовых клетках мыши [2].

Гораздо меньше изучена роль гомологов фактора OCT4 в переходе от состояния плюрипотентности к дифференцировке у низших позвоночных. Известны лишь единичные работы в этом направлении, проведенные с использованием в качестве модельного объекта эмбрионов рыбы *Danio rerio*. В частности, на этом объекте было показано, что фактор Pou 5F1, связываясь с определенными Sox-Pou сайтами в ходе активации генома зародыша, способен активировать самые ранние зиготические гены [1, 3].

Другим перспективным модельным объектом для подобных исследований являются эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Известно, что у шпорцевой лягушки три гена из семейства POU5: *pou5F3.1/oct91*, *pou5F3.2/oct25*, *pou5F3.3/oct60*, кодируют факторы Pou5F3.1/Oct91, Pou5F3.2/Oct25, Pou5F3.3/Oct60 соответственно, которые являются гомологами OCT4 [4, 5]. Транскрипты гена *pou5F3.3/oct60* являются материнскими, запасаются в ооцитах и быстро деградируют в ходе гастрюляции, при появлении активных переме-

ний зародышевых слоев. Кроме этого, есть данные о его экспрессии при регенерации рогавицы на более поздних стадиях развития [6]. Транскрипты *pou5F3.2/oct25* частично запасаются в ооцитах, но их количество возрастает после МВТ в ходе гастрюляции, то есть этот ген транскрибируется начиная с поздних стадий оогенеза и до стадии нейрулы. Транскрипты *pou5F3.1/oct91* появляются только после активации генома зародыша на стадии гастрюлы. Эти три гомологичных гена расположены в одном кластере и их комбинированная пространственно-временная картина экспрессии эквивалентна гену *OCT4* у мыши [2].

Поскольку самым “ранним”, строго материнским геном у шпорцевой лягушки, является *pou5F3.3/oct60*, можно предположить, что его белковый продукт является тем “пусковым агентом”, который участвует в инициации начальных этапов дифференцировки. В настоящей работе мы провели исследование по пространственной (методом гибридизации *in situ*) и временной экспрессии гена *pou5F3.3/oct60* (методами ОТ-ПЦР, вестерн-блоттинга и люциферазного репортерного теста) и показали, что транскрипция этого гена запускается до оплодотворения яйцеклетки на стадиях оогенеза, а трансляция достигает своего максимума у развивающегося зародыша на стадии бластулы. В ходе гастрюляции количество транскриптов гена *pou5F3.3/oct60* сильно уменьшается, а белок Pou5F3.3/Oct60 в ходе гастрюляции меняет свою электрофоретическую подвижность, предположительно, в результате фосфорилирования и подвергается деградации. Мы показали, что оверэкспрессия фактора Pou5F3.3/Oct60 приводит к аномалиям развития эмбрионов и изучили его влияние на экспрессию некоторых генов плюрипотентности и ранней дифференцировки эмбриональных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пространственная и временная экспрессии гена pou5F3.3/oct60

Для исследования и подтверждения временного и пространственного профиля экспрессии *pou5F3.3/oct60* мы, во-первых, методом ОТ-кПЦР показали, что в ходе развития количество транскриптов *pou5F3.3/oct60* резко падает в ходе гастрюляции и остается очень низким практически до формирования всех основных тканей зародыша (рис. 1а), что подтверждает данные, полученные методом тотального секвенирования транскриптомов на разных стадиях развития *Xenopus laevis*, представленные в работе [7].

Во-вторых, мы подтвердили данные ПЦР методом гибридизации *in situ*. Было показано, что транскрипты этого гена диффузно расположены по поверхности зародыша с преобладанием в ани-

мальном полюсе на стадии бластулы, постепенно убывают в ходе развития, очень слабо слабо детектируются на стадии гастрюлы (11–13 стадия) и практически исчезают к моменту формирования нервной трубки (нейрулы) (рис. 1б).

Наконец, для выяснения временного паттерна экспрессии *pou5f3.3/oct60* еще одним независимым методом мы создали люциферазную репортерную конструкцию, экспрессирующую высокочувствительную люциферазу Nanoluc (Promega) под контролем участка промотора *pou5f3.3/oct60* длиной 2454 н.п. Согласно работе [8] этот участок промотора отвечает за активацию транскрипции во время оогенеза. Созданный вектор инъецировали в ооциты или зародыши шпорцевой лягушки, которые выращивали до различных стадий развития с последующим анализом активности люциферазы Nanoluc. В результате было показано, что активация транскрипции *pou5f3.3/oct60* действительно происходит только в оогенезе и отсутствует на всех стадиях после начала дробления (рис. 1в).

Таким образом, мы проверили и подтвердили имеющиеся в литературе данные о материнской природе транскриптов гена *pou5f3.3/oct60*, полученные с использованием двух независимых количественных методов: ОТ-кПЦР и люциферазного репортера. Кроме этого, определили пространственные особенности экспрессии этого гена (в частности, увеличенное количество транскриптов в anteriорной области при отсутствии четких границ локализации зоны экспрессии) при помощи гибридизации *in situ*. Этот метод не дает точной количественной оценки, но наглядно позволяет увидеть паттерн распределения транскриптов в целых зародышах на разных стадиях развития.

Исследование экспрессии белка Pou5F3.3/Oct60

Для изучения экспрессии белка Pou5F3.3/Oct60 важно было получить специфичные антитела, не имеющие кросс-реакции с двумя другими факторами. Согласно работе [9], наилучший результат по специфичности показал пептид 125–135 ак, расположенный в N-концевой области Pou-специфичного домена (POUs). Этот пептид в виде гибрида с GST-связывающим белком был получен в результате бактериальной экспрессии и использован для иммунизации. Этот же синтетический пептид был использован для иммобилизации на BgCN-сефарозе с целью выделения моноспецифических антител из сыворотки (см. Экспериментальную часть). Специфическая активность полученных антител в отношении белка Pou5F3.3/Oct60 была подтверждена с использованием Мус-тагированных экзогенных белков семейства *pou5* (данные не приведены).

В результате исследования помощью полученных антител присутствия белка Pou5F3.3/Oct60 было установлено, что после оплодотворения максимальная концентрация этого белка обнаруживается на стадии средней бластулы (7–8 стадия), т.е. перед МБТ (специфическая полоса на Вестен блоте длиной 55 кДа). Начиная со стадии средней гастрюлы (стадия 11), эта полоса исчезает и начинает детектироваться полоса на уровне 65 кДа. В ходе дальнейшего развития, после гастрюляции, идет ослабление и этой полосы так, что к моменту нейруляции наблюдается незначительный постоянный уровень экспрессии полосы длиной 65 кДа (рис. 1г).

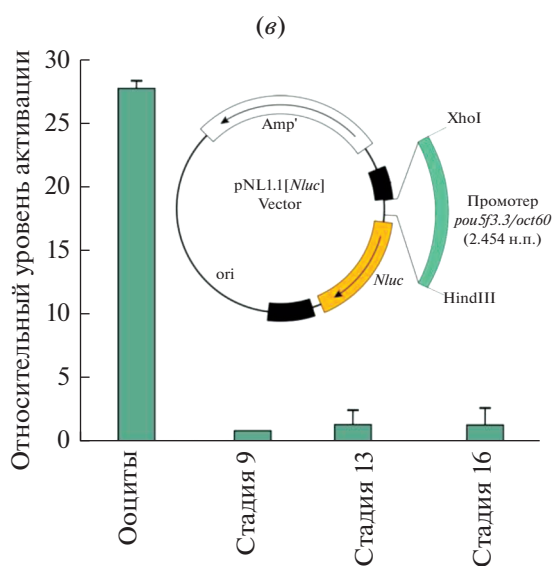
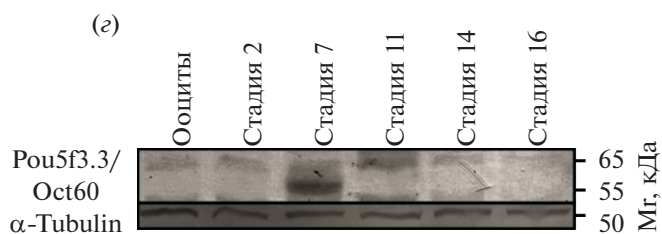
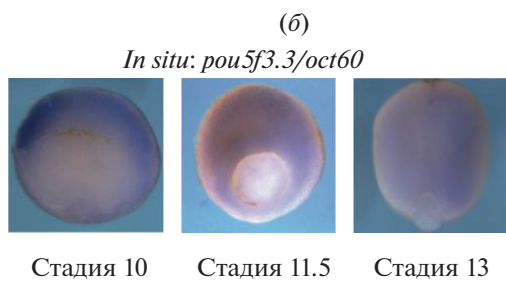
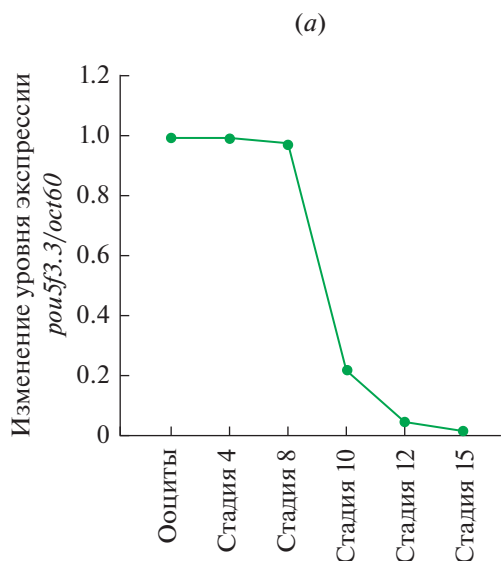
Можно предположить, что выявленная нами смена электрофоретической подвижности Pou5F3.3/Oct60 по ходу развития, вероятно, связана с фосфорилированием этого белка на более поздних стадиях, служащим сигналом для его деградации. Действительно, ранее другими авторами было показано, что в случае мышинового гомолога Pou5F3.3/Oct60-Oct4 именно фосфорилирование является сигналом, вызывающим его протеасомную деградацию [9, 10]. При этом изменение подвижности самого Pou5F3.3/Oct60 в результате фосфорилирования наблюдали авторы работы [11]. Таким образом, можно предположить следующий механизм регуляции уровня белка Pou5F3.3/Oct60 в эмбриогенезе шпорцевой лягушки.

На стадии, предшествующей МБТ происходит накопление фактора Pou5F3.3/Oct60, необходимого для поддержания плюрипотентного состояния зародышевых клеток в начальный период эмбриогенеза. Затем, в результате включения работы генома и началом дифференцировки клеток в дифинитивные ткани, происходит фосфорилирование Pou5F3.3/Oct60, что служит сигналом к его деградации и, как следствие, к снижению его концентрации в зародыше.

Оверэкспрессия фактора Pou5F3.3/Oct60 вызывает аномалии развития и оказывает влияние на экспрессию генов плюрипотентности и генов, участвующих в регуляции эмбриогенеза и регенерации

Для оценки необходимости деградации Pou5F3.3/Oct60 для последующего развития после прохождения начальных этапов дифференцировки мы использовали подход, основанный на оверэкспрессии тагированного Мус-эпитопом Pou5F3.3/Oct60.

В результате мы наблюдали, что на ранних стадиях отклонения развития от нормы не очень заметны. Однако, на более поздних стадиях развития (после 25–30 стадии) становятся очевидны повреждения головных структур зародыша: уменьшение глаз, мозга, деформация присоски (в



(д) Контроль Оверэкспрессия
Pou5f3.3/Oct60

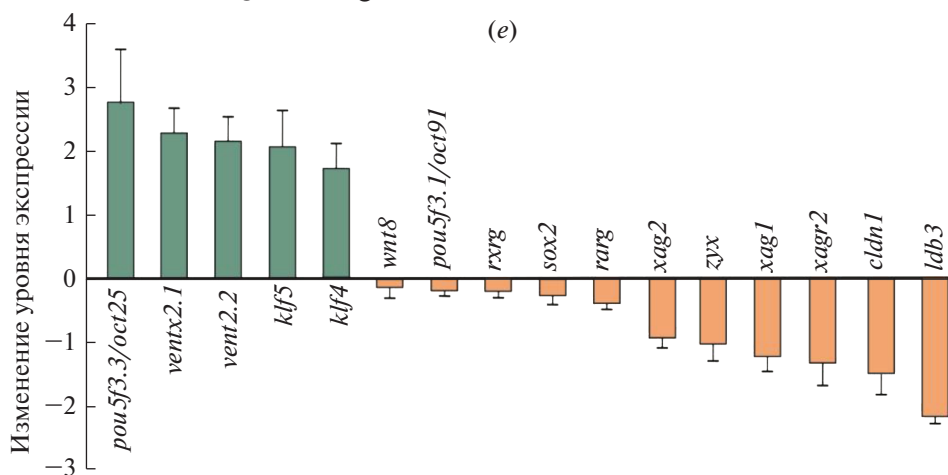
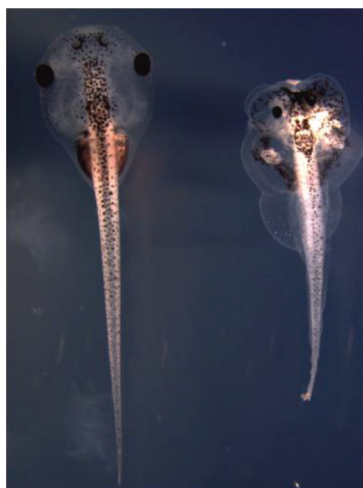


Рис. 1. Экспрессия мРНК и белка Pou5f3.3/Oct60 в ходе эмбрионального развития. (а) Уровень экспрессии мРНК *pou5f3.3/oct60* во время оогенеза и эмбрионального развития по стадиям: оциты – стадия до плодотворения, стадия 4 – начало дробления, стадия 8 – бластула, стадия 10–12 – гастрюла, начало клеточных движений, стадия 13–14 – ранняя нейрула, начало формирования нервной пластинки, стадия 15–16 – поздняя нейрула, начало смыкания нервной трубки. (б) Гибридизация *in situ* на мРНК *pou5f3.3/oct60* в нормальном развитии *X. laevis*. (в) Исследование активности промотора *pou5f3.3/oct60* по стадиям развития при помощи люциферазного репортерного теста. (г) Уровень экспрессии белка Pou5f3.3/Oct60 во время оогенеза и онтогенеза по стадиям, показанный методом вестерн блоттинга со специфическими антителами из лизатов ооцитов и зародышей на разных стадиях развития. В качестве референсного контроля использовали тубулин, детектируемый анти-тубулиновыми моноклональными антителами. (д) Оверэкспрессия Pou5f3.3/Oct60 приводит к дефектам развития зародышей *X. laevis* на поздних стадиях развития. (е) Изменение уровня экспрессии генов плюрипотентности и дифференцировки в ответ на оверэкспрессию Pou5f3.3/Oct60, показанное методом ОТ-кПЦР. Данные представлены в виде кратного изменения экспрессии генов в опытных эмбрионах по сравнению с экспрессией в контрольных эмбрионах (положительные значения – кратное усиление экспрессии, отрицательные – кратное подавление). Для нормализации данных были использованы гены *ODC* и *EFA*, показаны стандартные отклонения, полученные в результате трех независимых экспериментов.

25 случаях из 30 зародышей) и реже – укорочение оси зародыша (в 15 случаях из 30) (рис. 1д).

Для изучения наблюдаемых аномалий на молекулярном уровне, мы проверили, как меняется уровень транскриптов основных генов-регуляторов плюрипотентности и дифференцировки при оверэкспрессии Pou5F3.3/Oct60. Для этой цели мы провели инъекции синтетической мРНК, кодирующей тагированный Мус-пептидом Pou5F3.3/Oct60, в зародыши шпорцевой лягушки на стадии начала дробления (стадия 2х клеток). На стадии поздней гастрюлы, когда согласно полученным нами данным в нормальных условиях должно происходить уменьшение транскриптов Pou5F3.3/Oct60, проводили лизис этих зародышей и анализировали экспрессию выбранных генов методом ОТ-кПЦР.

В результате было показано, что оверэкспрессия фактора Pou5F3.3/Oct60 вызывает, во-первых: усиление экспрессии генов-маркеров плюрипотентности, которые участвуют в сдерживании процесса дифференцировки. Это гены *klf4* и *klf5* семейства *KLf* (Grüppel-Like Factor-транскрипционные факторы с цинк-содержащими доменами, регуляторы плюрипотентности и дифференцировки [12]), гены *vent2.1* и *vent2.2*, кодирующие транскрипционные регуляторы – функциональные гомологи известного маркера стволовых клеток *NANOG* [12], а так же фактора Pou5F3.2/Oct25 из семейства *POU5*.

Кроме того, было установлено, что важные для ранней дифференцировки гены, которые экспрессируются и как материнские и как зародышевые транскрипты, такие как *sox2*, рецепторы ретиноевой кислоты *rxrg* и *rarg*, *wnt8* меняются незначительно в сторону уменьшения. Эти гены обеспечивают начальные этапы дифференцировки, и только *sox2* рассматривается и как маркер плюрипотентности и как регулятор дифференцировки нейроэктодермы [12–14]. Так же незначительно менялась экспрессия третьего представителя *POU5* семейства, зиготического фактора Pou5F3.1/Oct91.

Наконец, мы обнаружили, что гены, отвечающие за процессы дифференцировки и экспресси-

рующиеся активно уже после гастрюляции в значительной степени подавляются. Так, в зародышах оверэкспрессирующих Pou5F3.1/Oct91 подавлялась экспрессия генов, кодирующих белки клеточной адгезии, включая гены трансмембранных рецепторов, участвующих в межклеточных взаимодействиях и связанных с ними белков – *actin*, *claudin*, *zuxin*, *ldb3*. Кроме того, ингибировалась экспрессия генов семейства *AGR*, участвующих в регенерации и дифференцировке клеток бластемы, а так же регулирующие развитие головных структур – *ag1/2* и *agr2* [15, 16] (рис. 1е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что *pou5f3.3/oct60* является материнским геном, т.е. таким геном, транскрипты которого накапливаются в ооцитах и начинают транслироваться перед стадией МБТ. Количество мРНК и белкового продукта *pou5f3.3/oct60* достигают максимума, соответственно, на стадии бластулы и ранней гастрюлы. Появление фактора Pou5F3.3/Oct60 приводит к активации ранних генов развития: *pou5f3.2/oct25*, *klf4*, *klf5*, *vent2.2*, *vent2.1*, которые, с одной стороны, являются генами плюрипотентности, а с другой, участвуют в начальных этапах дифференцировки, когда в процессе гастрюляции формируются основные типы зародышевых тканей. На этом этапе, когда клетки только начинают дифференцировку, важно сохранить тонкий баланс между плюрипотентностью и дифференцировкой, и только после того, как все клетки распределились по своим зародышевым листкам и готовы к образованию различных тканей, можно “включить” в них программы дифференцировки. Можно предположить, что фактор Pou5F3.3/Oct60, который присутствует в зародыше уже на самых ранних стадиях развития, селективно разрешает работу генов плюрипотентности и подавляет гены дифференцировки. Наиболее вероятной активируемой мишенью этого фактора является принадлежащий к этому же семейству ген Pou5F3.2/Oct25, который активируется в ходе гастрюляции. В то же время, имеющиеся в литературе

данные о непосредственной активации транскрипции белком Pou5F3.3/Oct60 гена *pou5F3.1/oct91* [17] не подтвердились в наших экспериментах. Возможно, в активации этого гена должен участвовать каскад из факторов семейства POU5: самый ранний, материнский Pou5F3.3/Oct60 подключает зиготическую транскрипцию *pou5F3.2/oct25*, и уже фактор, кодируемый этим геном, или их комбинация активирует *pou5F3.1/oct91*, который так же является одним из наиболее ранних зиготических транскриптов [18]. Отметим, что включение всех трех факторов семейства POU5 функционально гомологично работе фактора OCT4 млекопитающих в развитии и поддержании стволового статуса клеток [18, 19].

Полученные нами данные об активации Pou5F3.3/Oct60 генов *klf4*, *klf5*, *vent2.2*, *vent2.1* являются новыми для *Xenopus laevis* и являются хорошим дополнением к имеющимся в мировом научном сообществе данным о влиянии факторов POU5 на гомологи этих генов у других модельных организмов. Так, показано, что фактор Pou5f1 может усиливать экспрессию генов *klf* на уровне транскрипции в *Danio rerio* [20, 21]. Точно так же Pou5f3.2/Oct25 может активировать экспрессию Vent2b [22]. Кроме того, недавно было показано, что активация Klf4 происходит под влиянием комплекса Pou5f3/Stat3 у японской камбалы [23].

Значительный интерес и хорошую основу для дальнейших исследований представляют также данные об ингибирующем влиянии фактора Pou5F3.3/Oct60 на экспрессию генов-участников сигнальных каскадов клеточной адгезии, *actin*, *claudin*, *zyxin*, *ldb3*, и генов-регуляторов раннего развития мозга и регенерации *ag1/2* и *agr2*. Ранее другими авторами было показано, что подавление активности генов клеточной адгезии может происходить при участии двух других факторов семейства POU5. При этом влияние генов этого семейства на регулирование адгезии происходит как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровне – в результате белковых взаимодействий с факторами транскрипции [24]. В ходе дальнейших исследований предстоит выяснить, какие из этих механизмов ответственны за наблюдаемые эффекты ингибирования этих генов белком Pou5F3.3/Oct60.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение векторов, использованных в работе

Стратегии создания ДНК конструкций описаны в табл. 1.

Получение синтетической мРНК и микроинъекции мРНК в зародыши

мРНК *бмус-pou5f3.3/oct60* была синтезирована на линеаризованной рестриктазой *Not1* плазмиде *pCS2MT-pou5f3.3* с использованием коммерческого набора Ambion SP6 mRNA Message Machine. После синтеза мРНК очищали при помощи набора CleanRNA Standard (Евроген). Экспрессия тагированного белка бмус- Pou5f3.3/Oct60 в эмбрионах была подтверждена при помощи иммуноблоттинга с анти-бмус моноклональными антителами (Sigma).

Зародышей *Xenopus* получали в результате оплодотворения *in vitro* и растворяли оболочку в 2% цистеине при pH 7.8 мРНК *бмус-pou5f3.3/oct60* смешивали с флуоресцеин-лизин-декстраном (FLD, Invitrogen, 40 кДа, 5 мкг/мкл) и микроинъекцировали (250 нг/бластомер) в эмбрионы *Xenopus laevis* на стадии 2-х бластомеров в один или оба, в зависимости от целей эксперимента, в 0.1 × MMR с 4% фиколлом по методике, представленной в работе [25].

Гибридизация *in situ*

Для синтеза антисмыслового зонда к *pou5f3.3/oct60* использовали набор mMessage mMachine SP6 (Ambion) и digNTP. Гибридизацию *in situ* всех эмбрионов с антисмысловыми dig-зондами к *pou5f3.3/oct60* проводили по стандартной методике [26] с небольшими дополнениями [27, 28].

Выделение тотальной РНК из эмбрионов *Xenopus laevis*, получение кДНК и ОТ-кПЦР

Выделение тотальной РНК из эмбрионов *Xenopus laevis* проводили на стадии нейрулы (стадия 13) с использованием реагента ExtractRNA (Евроген) и набора CleanRNA (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT (Евроген) из 250 нг РНК образца, а ПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR (Евроген). ОТ-кПЦР проводили в амплификаторе DTPPrime 4 qPCR (DNA-Technology) по методике, представленной в работе [29].

Используемые нами праймеры перечислены в табл. 2.

Анализ люциферазной активности

Для исследования промоторной активности плазмиду pNL1.1-рг *pou5f3.3 L* (62.5 пг/ооцит или 12.5 пг/бластомер) смешивали с контрольной плазмидой pRL-TK-Renilla (250 пг/ооцит или 50 пг/бластомер) и микроинъекцировали в ооциты или эмбрионы *Xenopus laevis* на стадии 2-х бластомеров. Ооциты инкубировали в течение суток при температуре 18°C, эмбрионы – до

Таблица 1. Векторные конструкции полученные в ходе работы

ДНК-конструкция	ПЦР-праймеры и стратегия клонирования
pAL2-T-pou5f3.3	ПЦР с тотальной кДНК Прямой праймер: atgc gaattcaATGGACCAGCCCATATTGTA Обратный праймер: atgc ctcgag TCAGCCGGTCAGGACCCC Полученный ПЦР-фрагмент был клонирован в pAL2-T Vector (Evrogen) В полученной конструкции кодирующая последовательность <i>pou5f3.3</i> располагается перед промотором <i>srb</i> , что позволяет синтезировать антисмысловый зонд
pNL1.1-pr pou5f3.3.L	ПЦР с ДНК <i>X. laevis</i> Прямой праймер: atgc ctcgag ATTTTATGCTTCCAGGATGTAAGC Обратный праймер: atgc aagctt AACTCTTCCAACCCAAGGCCTG Клонирование в pNL1.1 vector (Promega) по сайтам рестрикции XhoI-HindIII
pGEX4T1-pou5f3.3.L126-136aa	Вставка была получена отжигом двух праймеров: Прямой праймер: AATTCTGGCATTATCCCTCCTGGCAGCAGGGGAACCTAc Обратный праймер: tcgagtaggtccctgctgccaggaggataatgccag Клонирование в плазмиду pGEX4T1 pCS2MT по сайтам рестрикции EcoRI-XhoI
pCS2MT-pou5f3.3	ПЦР с плазмиды pAL2-T-pou5f3.3 Прямой праймер: atgc gaattcaATGGACCAGCCCATATTGTA Обратный праймер: atgc ctcgag TCAGCCGGTCAGGACCCC Полученный ПЦР-фрагмент был клонирован в pCS2MT по сайтам рестрикции EcoRI-XhoI

необходимой стадии. Затем ооциты и эмбрионы собирали, лизировали и измеряли активность люциферазы с помощью наборов Nano-Glo kit (Promega) и Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) по протоколу производителя. Для каждого из образцов подсчитывали отношение активности люциферазы Nanoluc к активности контрольной люциферазы Renilla. При описании результатов люциферазного теста за условную единицу принималось отношение активностей на стадии 9.

Получение специфических антител к Pou5f3.3/Oct60, гель-электрофорез и иммуноблоттинг

Антитела к Pou5f3.3/Oct60 получали против фрагмента, содержащего аминокислотные остатки 125–136 (WHYPSWQQGNLК). Соответствующую вставку клонировали в вектор pGEX-4T, как описано в табл. 1, экспрессировали в штамме DH-5 α *Escherichia coli* DH-5 α , адсорбировали на глутатион-агарозе (Sigma) из бактериальных лизатов, промывали PDB (Pull-Down Buffer: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 175 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5% глицерин, 0.5% NP-40, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma)), элюировали 50 mM восстановленного глутатиона и использовали для имму-

низации кролика. Антитела из сыворотки выделяли на аффинной колонке, в которой синтетический пептид, соответствующий 125–136 а.а. белка Pou5f3.3/Oct60 был иммобилизован на BrCN-сфарозе (Sigma). Аффинную очистку моноспецифических антител проводили, как описано в [25]. Уровень эндогенного белка Pouf3.3/Oct60 измеряли по методике [29] на лизатах ооцитов или эмбрионов *Xenopus* и с помощью SDS-PAGE электрофореза с последующим вестерн-блоттингом с детектированием антител против Pou5f3.3/Oct60. Вторичные антитела представляли собой козий анти-кроличий F (ab') фрагмент, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma). Стабилизированный субстрат Western Blue (Promega) использовали для обнаружения антител, конъюгированных щелочной фосфатазой.

Статистические методики, использованные для анализа достоверности данных

Для проверки статистической достоверности данные ОТ-кПЦР, полученные от трех независимых экспериментов, были импортированы в Microsoft Excel и проанализированы с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ [30]. Для нормировки уровня экспрессии генов в качестве внутреннего контроля исполь-

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов (праймеров), использованных для анализа экспрессии исследуемых факторов (с их идентификационными номерами в системе PubMed–NCBI) методом кПЦР с указанием длины амплифицированного фрагмента

№	Название гена	Идентификационный номер белка в NCBI	Последовательность праймера	Длина амплификата, н.п. (нуклеотидных пар)
1	Elongation factor 1 Alpha (<i>EF-α</i>)	NP_001080911	Прямой: GTTCATTTACCGCACAGTTATCA Обратный: ACACAGGGGCATATCCAGCA	70
2	Ornithine decarboxylase 1 (<i>ODC</i>)	NP_001080167.1	Прямой: GCCAGTTCTAACAAGAAACCCA Обратный: TCTACGATACGATCCAGCCCA	93
3	Pou class 5 homeobox 3, gene3 (<i>pou5f3.3</i>)	NP_001081583.1	Прямой: CACAAAACCTGGACTTACTGGGG Обратный: TCTCAACTGCCCTTACSTTCTC	70
4	Pou class 5 homeobox 3, gene 2 (<i>pou5f3.2</i>)	NP_001079832	Прямой: CCCTGTTGGACACTATGCG Обратный: CCCTGTTGGACACTATGCG	113
5	Xvent-2B protein (<i>ventx2.1</i>)	NP_001081607.1	Прямой: GCACCGCAGCCCAC Обратный: GGAGTTGAAGGGAGTCAGG	141
6	Xbr-1a/xvent2 protein (<i>ventx2.2</i>)	NP_001080931	Прямой: CAACAGCACCTTGGGC Обратный: CTGCGGGAGGACAGAAGTC	125
7	Kruppel-like factor 5 (<i>klf5</i>)	NP_001090064.1	Прямой: АСТАССТGGTAAGAACCTACA Обратный: CCSTTTCCCATGACAGGA	132
8	Kruppel-like factor 4 (<i>klf4</i>)	NP_001079828.1	Прямой: ATGAACCGACCCGCCAC Обратный: AAGCTCGATCACATCGCTGA	171
9	Xwnt-8 protein (<i>wnt8</i>)	AAH82627.1	Прямой: GCACAGTCAAATGCGAGCAA Обратный: AAACAAATCCACTGGCCCGA	167
10	Pou class 5 homeobox 3, gene1 (<i>pou5f3.1</i>)	AFU51783.1	Прямой: АТТАGGGAGAATGGCGGGGA Обратный: CAGTGGGACCGTGGGAAAA	117
11	Retinoid X receptor gamma (<i>rxrg</i>)	NP_001088948	Прямой: AGCATTTGGAGACGCTGGAT Обратный: TGCTCGCAGCAGAATGACTT	160
12	SRY-box 2 (<i>sox2</i>)	NP_001081691.1	Прямой: GCTGTGGCGGGAGAGAGAAAGT Обратный: TGGTTGTTGGACGCAGAGTTGGA	178
13	Retinoic acid receptor gamma (<i>rarg</i>)	NP_001081663.1	Прямой: GTCGACGAAGGCCTGACAAA Обратный: GAATCAGCGGAGGCATAGGT	141
14	Anterior gradient 2 (<i>xag2</i>)	NP_001081669.1	Прямой: TGCTGCCAAGTCTGAGCCTGC Обратный: TCCTGAGCCAGTTTCTGTGCCA	227
15	Zyxin (<i>zyx</i>)	NP_001092151.1	Прямой: CATTTAAGGCCCCGGAAGAGC Обратный: TGGGAATGAACCACCAGAGG	245
16	Anterior gradient 1 (<i>xag1</i>)	NP_001079667.1	Прямой: GCAGGAACAACCTGATACAAAACCT Обратный: GGACAATCTTCCAGGTGGTG	182
17	Anterior gradient 2 (<i>xagr2</i>)	NP_001079720.1	Прямой: TGGCCAGTATGTTCCCAAGGTTGT Обратный: CATCACTTTAGCATACACCTCCGC	238
18	Claudin 1 (<i>clnd1</i>)	NP_001079445.1	Прямой: TCTTACAAAACCCACACCCT Обратный: ACCATGATTGCTGTTGCTAGT	150
19	LIM domain binding 3 (<i>ldb3</i>)	NP_001080237.1	Прямой: СТССАGТGТATCAGGCGGTG Обратный: GGGCTGTTACGTTCCGTTTC	199

зовали уровень экспрессии гена фактора элонгации EF-1 α и орнитин-декарбоксилазы (ODC) согласно работе [31] уровни экспрессии которых в данных экспериментальных условиях считались неизменными.

Эксперименты по анализу изменений в экспрессии *Pou5f3.3/Oct60* на проявленных специфическими антителами PVDF мембранах проводили в более чем 5-кратном повторении.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 18-04-00674 а. Эксперименты по определению люциферазной активности были выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90017. Эксперименты по ОТ-кПЦР для генов *ag1/2* и *agr2* были выполнены при поддержке проекта РФФИ № 20-04-00675 а. Эксперименты по иммуноблоттингу проводили при поддержке проекта РНФ № 19-14-00098.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей в качестве объектов исследования. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Onichtchouk D.* // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016. V. 1859. P. 770–779. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.03.013>
2. *Cao Y.* // *Cell & Bioscience* 2013. V. 3 P. 15. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-15>
3. *Leichsenring M., Maes J., Mössner R., Driever W., Onichtchouk D.* // *Science*. 2013. V. 341. P. 1005–1009. <https://doi.org/10.1126/science.1242527>
4. *Hinkley C.S., Martin J.F., Leibham D., Perry M.* // *Mol. Cell. Biol.* 1992. V. 12. P. 638–649. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.2.638>
5. *Whitfield T., Heasman J., Wylie C.* // *Dev. Biol.* 1993. V. 155. P. 361–370. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1035>
6. *Kimberly J.P., Alvin G.T., Jonathan J.H.* // *Developmental Biology*. 2013. V. 374. P. 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.005>
7. *Briggs J.A., Weinreb C., Wagner D.E., Megason S., Peshkin L., Kirschner M.W., Klein A.M.* // *Science*. 2018. V. 360. P. 6392. <https://doi.org/10.1126/science.aar5780>
8. *Morichika K., Sugimoto M., Yasuda K., Kinoshita T.* // *Zygote*. 2014. V. 22. P. 266–274. <https://doi.org/10.1017/S0967199412000536>
9. *Whitfield T.T., Heasman J., Wylie C.C.* // *Dev. Biol.* 1995. V. 169. P. 759–769. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1185>
10. *Lippok B., Sungmin Song S., Driever W.* // *Dev. Dyn.* 2014. V. 243. P. 468–477. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24079>
11. *Bae K.B., Yu D.H., Lee K.Y., Yao K., Ryu J., Lim D.Y., Zykova T.A., Kim M.O., Bode A.M., Dong Z.* // *Stem Cell Reports*. 2017. V. 9. P. 2050–2064. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.017>
12. *Cao Y.* // *Sci. China Life Sci.* 2015. V. 58. P. 336–342. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4799-2>
13. *Dollé P.* // *Nucl Recept Signal*. 2009. V. 12. P. 006. <https://doi.org/10.1621/nrs.07006>
14. *Chu C.W., Sokol S.Y.* // *Elife*. 2016. V. 23. P. e16463. <https://doi.org/10.7554/eLife.16463>
15. *Tereshina M.B., Ermakova G.V., Ivanova A.S., Zاراisky A.G.* // *Biol. Open*. 2014. V. 15. P. 192–203. <https://doi.org/10.1242/bio.20147401>
16. *Ivanova A.S., Tereshina M.B., Ermakova G.V., Belousov V.V., Zاراisky A.G.* // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 1279. <https://doi.org/10.1038/srep01279>
17. *Exner C.R.T., Kim A.Y., Mardjuki S.M., Harland R.M.* // *Dev. Biol.* 2017. V. 425. P. 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.015>
18. *Venkatarama T., Lai F., Luo X., Zhou Y., Newman K., King M.L.* // *Development*. 2010. V. 137. P. 651–660. <https://doi.org/10.1242/dev.038554>
19. *Morrison G.M., Brickman J.M.* // *Development*. 2006. V. 133. P. 2011–2022. <https://doi.org/10.1242/dev.02362>
20. *Onichtchouk D., Geier F., Polok B., Messerschmidt D.M., Mössner R., Wendik B., Song S., Taylor V., Timmer J., Driever W.* // *Molecular Systems Biology*. 2010. V. 6. P. 354. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.9>
21. *Kotkamp K., Mössner R., Allen A., Onichtchouk D., Driever W.* // *Dev. Biol.* 2014. V. 385. P. 433–447. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.025>
22. *Cao Y., Knochel S., Donow C., Mieth J., Kaufmann E., Knochel W.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 43735–43743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407544200>
23. *Sun Y., Liu J., Wang B., Liu X., Du X., Liu Y., Zhang Q.* // *Gene*. 2019. V. 687. P. 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.029>
24. *Livigni A., Peradziryi H., Sharov A.A., Chia G., Hamachi F., Portero Migueles R.P., Sukparangsi W., PernaGallo S., Bradley M., Nichols J., Ko M. S.H., Brickman J.M.* // *Current Biology*. 2013. V. 23. P. 2233–2244. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.048>
25. *Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Zاراisky A.G.* // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 736–749. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21471>

26. Harland R.M. // *Methods. Cell. Biol.* 1991. V. 36. P. 685–695.
[https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60307-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60307-6)
27. Eroshkin Ф.М., Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Зарайский А.Г., Мартынова Н.Ю. // *Биоорган. химия.* 2018. Т. 44. С. 303–316. [*Eroshkin F.M., Bayratov A.V., Ermakova G.V., Zاراisky A.G., Martynova N.Y.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 310–321.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162018030032>
28. Мартынова Н.Ю., Eroshkin Ф.М., Зарайский А.Г. // *Биоорган. химия.* 2018. Т. 44. С. 353–356. [*Martynova, N.Y., Eroshkin, F.M., Zاراisky, A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 362–365.]
<https://doi.org/10.1134/S106816201803010X>
29. Мартынова Н.Ю., Паршина Е.А., Eroshkin Ф.М., Зарайский А.Г. // *Биоорган. химия.* 2020. Т. 46. С. 396–403. [*Martynova N.Y., Parshina E.A., Eroshkin F.M., Zاراisky A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 530–536.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162020040147>
30. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods.* 2001. V. 25. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
31. Иванова А.С., Короткова Д.Д., Мартынова Н.Ю., Аверьянова О.В., Зарайский А.Г., Терешина М.Б. // *Биоорган. химия.* 2018. Т. 44. С. 348–352. [*Ivanova A.S., Korotkova D.D., Martynova N.Y., Averyanova O.V., Zاراisky A.G., Tereshina M.B.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 358–361.]
<https://doi.org/10.1134/S106816201803007X>

Role of Pou5f3.3/Oct60 in the Regulation of Initial Stages of Tissues Differentiation in the *Xenopus laevis* Embryogenesis

E. A. Parshina*, A. G. Zاراisky*, and N. Y. Martynova*^{*,#}

[#]Phone: +7 (916) 181-16-32; fax: +7 (495) 336-36-22; e-mail: martnat61@gmail.com

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The present work is devoted to the study of the role of the maternal factor Pou5f3.3/Oct60 of the *Xenopus laevis* homolog of the mammalian stem cell pluripotency regulator, Oct4, in the early embryonic development. It was shown that the maximal concentration of the Pou5f3.3/Oct60 protein is observed at the blastula stage, and then its degradation begins been stimulated by post-translational modifications after activation of the embryo genome. Using an approach based on the overexpression of Pou5f3.3/Oct60 in embryos, it was found out that this protein stimulates the expression of early pluripotency marker genes, *pou5f3.2*, *vent2.2/2.1*, *klf4/5*, but inhibits the expression of cytoskeletal and cell adhesion genes: *actin*, *claudin*, *zyxin*, *ldb3*. In addition, Pou5f3.3/Oct60 inhibits the expression of the *ag1/2* and *agr2* genes, which are involved in the regulation of differentiation of the regenerative blastema of amputated limbs, as well as in the regulation of early brain development. Given the conservatism of the early stages of development in vertebrates, the data obtained on the embryos of *Xenopus laevis* can be used to better understand the mechanisms of the early development in mammals, including humans.

Keywords: *embryogenesis, pluripotency, differentiation, transcription factors, POU5, pou5f3.3*