

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ИЗ ТРЕТЬИХ МОЛЯРОВ ЧЕЛОВЕКА, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ПЛАЗМИДОЙ pBUD-SOX2-OCT4

В.В. Соловьева¹, Н.Л. Блатт¹, Д.С. Гусева^{2,3}, М.Э. Ялвач^{4,5}, Ф. Шахин⁴, Р.Р. Исламов², А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

³ Ганноверский медицинский университет, Ганновер, Германия

⁴ Университет Едитепе, Стамбул, Турция

⁵ Детский госпиталь в Колумбусе, Колумбус, США

Expression of pluripotency transcription factors in human third molar tooth germ derived multipotent mesenchymal stromal cells transfected by plasmid pBud-Sox2-Oct4

V.V. Solovyeva¹, N.L. Blatt¹, D.S. Guseva^{2,3}, M.E. Yalvac^{4,5}, F. Sahin⁴, R.R. Islamov², A.A. Rizvanov¹

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

³ Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁴ Yeditepe University, Istanbul, Turkey

⁵ Children's Hospital Columbus, Columbus, United States

В ходе работы была создана двухкассетная плазмидная конструкция на основе вектора pBudCE4.1, кодирующая факторы транскрипции SOX2 и OCT4. Экспрессия рекомбинантных генов подтверждена с помощью иммуноблоттинга. Показано, что генетическая модификация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выделенных из зачатков третьих моляров человека, полученной рекомбинантной плазмидой приводит к увеличению уровня экспрессии не только факторов транскрипции SOX2 и OCT4 в исследуемых клетках, но и фактора транскрипции NANOG. Анализ гистологических срезов подкожных имплантатов Матригеля, содержащих флуоресцентно меченные ММСК, показал, что генетическая модификация не оказывает влияния на их жизнеспособность.

Ключевые слова: экспрессионная плазида, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, зачатки третьих моляров человека, факторы транскрипции, SOX2, OCT4, плюрипотентность, трансфекция.

Введение

Возможность возврата дифференцированных клеток в плюрипотентное состояние впервые была показана К. Takahashi и S. Yamanaka в 2006 г. путем репрограммирования с помощью факторов транскрипции [1]. В начале 2007 г. было опубликовано три независимых исследования, в которых авторы продемонстрировали, что трансфекция культуры фибробластов четырьмя факторами транскрипции OCT3/4, SOX2, C-MYC и KLF4 приводит к репрограммированию клеток и индукции плюрипотентного состояния [2–4]. Описанный подход получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) имеет большой потенциал для развития клеточной терапии различных заболеваний человека. ИПСК обладают свойствами эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и в экспериментах *in vitro* способны спонтанно дифференцироваться в эмбриональные клетки эктодермы, энтодермы и производные мезодермы.

На сегодняшний день для доставки кДНК генов факторов транскрипции в клетки-мишени применяются как вирусные векторные системы (в основном рекомбинантные ретровирусы), так и невирусные системы (например, доставка кДНК генов факторов

In this study, the double expression cassette plasmid, based on pBudCE4.1 vector encoding transcription factors SOX2 and OCT4 was constructed using standard gene engineering techniques. Expression of recombinant genes was confirmed by immunoblotting. It is shown that genetic modification of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC), isolated from human third molar tooth germs, with resulting recombinant plasmid increases the level of expression both, transcription factors SOX2 and OCT4 in the treated cells, and also transcription factor NANOG. Analysis of histological sections of subcutaneous Matrigel implants, containing fluorescently labeled MMSC, showed that genetic modification had no effect on cell viability.

Keywords: expression plasmid, multipotent mesenchymal stromal cells, third molar dental follicles, transcription factors, SOX2, OCT4, pluripotency, transfection.

транскрипции в составе экспрессионных плазмидных векторов). Данные системы позволяют избежать онкогенных и иммуногенных свойств вирусных векторов, а также инсерционного мутагенеза.

Решающее значение для поддержания плюрипотентности ЭСК имеют факторы транскрипции SOX2 и OCT4. Показано, что при снижении уровня экспрессии OCT4 ЭСК дифференцируются в трофобласт-подобные клетки [5–6].

Ранее М.Е. Ялвач с соавт. (2009) данной публикации показали, что пульпа зуба, в частности, пульпа зачатка третьего моляра человека (зуба мудрости), является источником «мультипотентных стволовых клеток» [7–8]. По своим морфологическим и фенотипическим свойствам эти клетки аналогичны мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (ММСК). Основным преимуществом для использования ММСК, выделенных из зачатков третьих моляров человека (ММСК-ЗТМ), является доступность биологического материала. При определенных условиях культивирования ММСК-ЗТМ способны дифференцироваться в остеогенном, адипогенном, хондрогенном и нейрогенном направлениях, а также образовывать капилляро-подобные

структуры на Матригеле, что свидетельствует об их ангиогенном потенциале [8]. Эти свойства ММСК-ЗТМ открывают перспективы их использования в биомедицинских приложениях, таких как клеточной терапии и тканевой инженерии.

Последние исследования показали, что предшественниками значительной популяции ММСК в процессе развития зуба и регенерации, включающей производящие клетки пульпы и одонтобласты, являются клетки глии периферических нервов [9]. Стоит отметить, что эти данные отличаются от ранее выдвинутой теории о происхождении стволовых клеток «мягких тканей» зуба из клеток нервного гребня [10].

Все эти свойства позволяют предположить, вероятно, более выраженный регенеративный потенциал ММСК-ЗТМ с целью стимуляции посттравматической нейрорегенерации и терапии нейродегенеративных заболеваний в сравнении с ММСК жировой ткани и костного мозга, на сегодняшний день считающихся наиболее перспективными и имеющих другое эмбриональное происхождение по сравнению с ММСК пульпы зубов.

ММСК имеют потенциал трансдифференцировки в нейральную стволовую клетку. Все эти свойства позволяют рассматривать ММСК зубов как один из источников клеточного материала для терапии нейротравм и нейродегенеративных заболеваний [11].

Ранее было показано, что ММСК-ЗТМ экспрессируют поверхностные антигены, характерные для ММСК, но не для гемопоэтических стволовых клеток [12]. Также было показано, что ММСК-ЗТМ имеют значительный уровень экспрессии мРНК генов *c-myc* и *klf-4* в сравнении с ЭСК человека [8].

В настоящем исследовании для повышения плюрипотентного потенциала ММСК, выделенных из зачатков третьих моляров человека, нами был сконструирован экспрессионный плазмидный вектор рBud-Sox2-Oct4, одновременно экспрессирующий факторы транскрипции SOX2 и OCT4. Исследована функциональность полученной экспрессионной плазмиды, а также жизнеспособность генетически модифицированных плазмидой рBud-Sox2-Oct4 ММСК-ЗТМ в подкожных имплантатах Матригеля® у лабораторных животных.

Материал и методы

Создание экспрессионного плазмидного вектора

Клонирование генов *sox2* и *oct4* человека осуществляли в несколько этапов. На первом этапе была проведена ОТ-ПЦР-амплификация кДНК соответ-

ствующих генов с использованием специфических праймеров (табл. 1) и ДНК-полимеразы PrimeSTART (Takara bio Inc.). В качестве источника РНК для ОТ-ПЦР амплификации гена *oct4* использовали культуру ЭСК (линия hESM 01) [13]. В качестве матрицы для ПЦР-амплификации гена *sox2* была использована плаزمида с клонированной кДНК, любезно предоставленная проф. С.Л. Киселевым (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва).

На следующем этапе путем инкубации с GoTaq полимеразой (Promega) к 3' концам ПЦР-продуктов были добавлены аденозины. После очистки ПЦР-продуктов проводили ТА-клонирование в вектор рGEM®-T Easy (Promega) в соответствии с инструкцией производителя. кДНК генов *sox2* и *oct4* из полученных плазмид рGEM-Sox2 и рGEM-Oct4 субклонировали в экспрессионный плазмидный вектор рBudCE4.1 (Life Technologies) путем рестрикционного расщепления ферментами *KpnI/XhoI* и *Sall/XbaI* (Promega), соответственно. Правильность сборки плазмидной конструкции рBud-Sox2-Oct4 подтверждали секвенированием с помощью стандартных вектор-специфичных праймеров на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Культуры клеток

ММСК были выделены из непрорезавшихся зачатков третьих моляров, извлеченных хирургическим путем у здоровых добровольцев (11–17 лет) как часть подготовительного лечения по ортодонтическим причинам. Выделение ММСК проводили по методике, описанной ранее [7–8].

Для подтверждения функциональности плазмиды рBud-Sox2-Oct4 в работе использовали иммортализованную линию первичных эмбриональных клеток почки HEK293 человека (human embryonic kidney 293 cells) (ATCC Number: CRL-11268).

Культуры клеток ММСК-ЗТМ и HEK293 поддерживали в среде DMEM (Invitrogen, США), с содержанием сыворотки крови плодов коровы (fetal bovine serum, FBS) в конечной концентрации 10% (Sigma, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Sigma, США) и 2 мМ L-глутамин (Sigma, США). Инкубацию проводили при 37°C во влажной атмосфере и 5% содержанием CO₂.

Для генетической модификации клеток HEK293 и МСК-ЗТМ экспрессионной плазмидой рBud-Sox2-Oct4 использовали трансфекционный агент TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Таблица 1. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР-амплификации специфических генов

Название	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Комментарии
hSox2-ORFF-KpnI	CACgGtaCCacCATGTACAACATGATGG	Прямой/Первый раунд ОТ-ПЦР
hSox2-ORFR-Stop-XhoI	TCCtctgagTCACATGTGTGAGAGGGGCGAG	Обратный/Первый раунд ОТ-ПЦР
hOct4-6F(1st)	GCAAGCCCTCATTTCACC	Прямой/Первый раунд ОТ-ПЦР
hOct4-1384R(1st)	TGTGTCCCAGGCTTCTTTATT	Обратный/Первый раунд ОТ-ПЦР
hOct4v1-ORFF-BamHI-Sall	GGGgatCcggtCgaCaCCATGGCGGGA	Прямой/Второй раунд ПЦР
hOct4v1-ORFR-Stop-XbaI-EcoRI	CCCCATTCCTAGAgattctctAgaTCAGTTTGAATGC	Обратный/Второй раунд ПЦР

Иммуноблоттинг (вестерн блот анализ)

Электрофорез белков лизатов клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pBud-Sox2-Oct4, в полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли [14]. Вестерн блот анализ белков был проведен с применением первичных поликлональных антител кролика к OCT4 (Oct-3/4(H-134), sc-9081, Santa Cruz Biotechnology, разведение 1:500), поликлональных антител козла к SOX2 (Sox-2(Y-17), sc-17320, Santa Cruz Biotechnology, разведение 1:500) и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Anti-Goat IgG-HRP #A5420, Anti-Rabbit IgG-HRP #A0545, Sigma-Aldrich, разведение 1:2000). Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью набора для хемилюминесцентной детекции белка Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Германия). Люминесценцию детектировали на приборе ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, Сингапур).

Анализ экспрессии мРНК генов факторов транскрипции в генетически модифицированных ММСК-ЗТМ

Через 48 ч. после трансфекции клеточный осадок собирали с помощью центрифугирования. Общую РНК из клеточных осадков выделяли с помощью набора High Pure RNA Isolation Kit (Roche) согласно инструкции фирмы производителя. мРНК, выделен-

ная из ЭСК человека hESM 01, была любезно предоставлена проф. С.Л. Киселевым (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва) [13]. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, США), согласно инструкции фирмы производителя.

Праймеры и пробы TaqMan для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) были разработаны с использованием программы PrimerExpress (Applied Biosystems, США) на основании нуклеотидных последовательностей генов-мишеней, полученных из базы данных GeneBank. Пробы для ПЦР-РВ содержали 5'-концевую флуоресцентную метку FAM и 3'-концевой гаситель RTQ-1. Синтез праймеров и проб осуществляла компания Синтол (Москва, Россия) (табл. 2). Для ПЦР-РВ по технологии TaqMan применяли 2,5x реакционную смесь (Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР-РВ для количественного анализа экспрессии мРНК генов факторов транскрипции и *b-actin* проводили на оборудовании iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США), как описано ранее [8]. Реакции ПЦР-РВ выполняли в дубликатах.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента в программе Excel 2007. Уровень экспрессии мРНК генов факторов транскрипции в ЭСК считали за 100%.

Таблица 2. Праймеры и пробы для ПЦР в режиме реального времени

Название	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
h-β-Actin-TMprobe	CCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGC
h-β-Actin-TM-F	GCGAGAAGATGACCCAGGATC
h-β-Actin-TM-R	CCAGTGGTACGGCCAGAGG
h-Oct4-TMprobe621	TCTGCAGCTTAGCTTCAAGAACATGT
h-Oct4-TM499F	CGACCATCTGCCGCTTTG
h-Oct4-TM664R	GCAAGGGCCGCAGCTTA
h-c-Мyc-TMprobe1494	TACGCAGCGCCTCCCTCCACTC
h-c-Мyc-TM1472F	CGTCTCCACACATCAGCACAA
h-c-Мyc-TM1539R	TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT
h-Klf4-TMprobe1414	CCGGTTCCTGCATGCCAGAGGA
h-Klf4-TM1387F	CGCTCCATTACCAAGAGCTCAT
h-Klf4-TM1463R	CGATCGTCTCCCCTCTTTG
h-Nanog-TMprobe453	TGCAGAGAAGAGTGTGCGCAAAAAGG
h-Nanog-TM431F	CCAAAGGCAAACAACCCACTT
h-Nanog-TM499R	TCTTGACCGGGACCTTGTCT
h-Sox2-TMprobe763	CCGGCGGAAAACCAAGACGCT
h-Sox2-TM717F	TGCGAGCGCTGCACAT
h-Sox2-TM809R	GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA

Трансплантация клеток лабораторным животным

Все процедуры с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике. Лабораторные крысы *Rattus norvegicus* линии Wistar были приобретены в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Московская область). Животные содержались в питомнике Казанского государственного медицинского университета с неограниченным доступом к корму и воде.

Перед трансплантацией ММСК-ЗТМ метили флуоресцентным красителем РКН67 (зеленый спектр флуоресценции) в соответствии с инструкциями производителя (Sigma-Aldrich, США), который позволяет идентифицировать трансплантированные клетки в гистологических срезах. Используемый флуоресцентный краситель позволяет проводить окрашивание мембран живых клеток (витальный краситель) без существенного влияния на их жизнеспособность и другие биологические свойства.

Генетически модифицированные ММСК-ЗТМ вводили крысам подкожно в виде суспензии в Матригеле — компонент базальной мембраны, секретлируемый клетками мышины саркомы Энгельбрета — Хольма — Сварма. Эта смесь является аналогом внеклеточного матрикса и используется в экспериментальной биологии в качестве субстрата для культивирования клеток [15].

Для 1 инъекции 400 мкл холодного (4°C) Матригеля (Matrigel™ Matrix, BD Biosciences, США) смешивали со 100 мкл суспензии клеток в культуральной среде. Инъекции проводили инсулиновым шприцем с иглой толщиной 23G таким образом, чтобы Матригель успевал полимеризоваться под кожей и образовывал желеобразный имплантат. Через 72 ч. после трансплантации Матригеля изымали под наркозом (хлоралгидрат 6,4% раствор внутривенно из расчета 400 мг/кг массы животного) и замораживали в жидком азоте в среде для заморозки тканей Richard-Allan Scientific™ Neg-50™ Frozen Section Medium (Thermo Fisher Scientific, США) для последующего приготовления срезов толщиной 5 мкм на криостате Microm HM560 (Thermo Scientific Inc.).

Флуоресцентный анализ

Перед флуоресцентным анализом срезы фиксировали в 10% забуференном формалине (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин. при комнатной температуре. Далее срезы обрабатывали 0,1% раствором Тритона X100 на TBS буфере в течение 20 мин. Для визуализации ядер клеток срезы обрабатывали флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Sigma-Aldrich) в течение 10 мин. при комнатной температуре. После отмывки в TBS срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, Mounting Medium Vectashield™ (Vector Laboratories Inc.). Готовые препараты хранили при +4°C в темноте. Полученные препараты анализировали при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8.

Результаты и обсуждение

Факторы транскрипции SOX2 и OCT4 являются ключевыми регуляторами плюрипотентности. Коэкспрессия SOX2 и OCT4 начинается уже на стадии ранней морулы. Эти факторы обнаружены во внутренней клеточной массе бластоцисты. Экспрессия обоих факторов происходит и в эпибласте [16]. Было показано, что ЭКС теряют способность к поддержанию плюрипотентности после нокадауна генов *sox2* и *oct4* путем РНК-интерференции [17]. Недавние исследования показали, что трансфекция стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, с помощью кДНК генов *sox2* и *oct4* усиливает пролиферативную активность клеток и сокращает время перехода клеток от G1 до S клеточного цикла. Кроме того у клеток со сверхэкспрессией факторов транскрипции SOX2 и OCT4 способность к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях была выше, чем у контрольной группы клеток [18]. В связи с этим, для экспериментов по репрограммированию клеток мы создали экспрессионный плазмидный вектор, кодирующий кДНК генов *sox2* и *oct4*.

В результате ПЦР-амплификации и последующих этапов клонирования получен экспрессионный двухкассетный плазмидный вектор pBud-Sox2-Oct4 (рис. 1). Правильность сборки рекомбинантной плазмиды подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием (информация не приведена). Преимуществом данного вектора является одновременная и независимая экспрессия трансгенов, контролируемая промоторами CMV и EF-1 α .

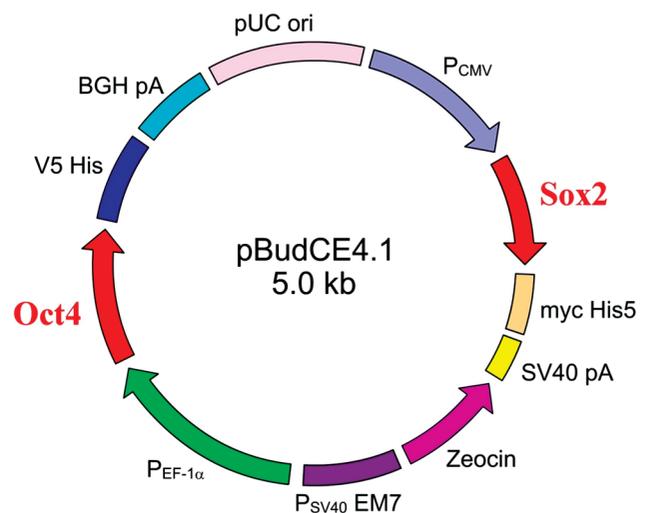


Рис. 1. Схема двухкассетного плазмидного вектора pBud-Sox2-Oct4, сконструированного на основе вектора pBudCE4.1. Вектор одновременно и независимо экспрессирует факторы транскрипции SOX2 и OCT4

Для подтверждения экспрессии рекомбинантных генов полученной двухкассетной плазмидой проводили трансфекцию клеток HEK293 с использованием трансфекционного агента TurboFect. Анализ белковых лизатов генетически модифицированных клеток HEK293 показал наличие специфических белковых полос на мембране с молекулярными массами 34 кДа и 48 кДа, что соответствует ожидаемым размерам факторов транскрипции SOX2 и OCT4,

соответственно (рис. 2). Таким образом, показано, что полученная двухкассетная генетическая конструкция *pBud-Sox2-Oct4* экспрессирует факторы транскрипции *SOX2* и *OCT4*.

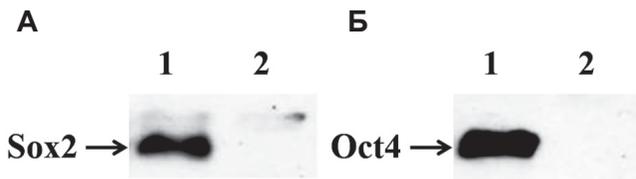


Рис. 2. Экспрессия рекомбинантных факторов транскрипции *SOX2* (панель А, 34 кДа) и *OCT4* (панель Б, 48 кДа) в клетках *HEK293*, трансфицированных плазмидой *pBud-Sox2-Oct4*: 1 – клетки *HEK293*, трансфицированные плазмидой *pBud-Sox2-Oct4*; 2 – нетрансфицированные клетки *HEK293*. Вестерн блот анализ

В ходе работы были выделены ММСК из зачатка третьего моляра человека («зуба мудрости»). Известно, что для эффективного препрограммирования клетки необходим высокий уровень экспрессии четырех факторов транскрипции: *C-MYC*, *KLF4*, *SOX2* и *OCT4*. Ранее было показано, что ММСК-ЗТМ имеют значительный уровень экспрессии мРНК генов *c-myc* и *klf4* в сравнении с ЭСК человека [8]. Для повышения плюрипотентного потенциала ММСК-ЗТМ была проведена их генетическая модификация полученной генетической конструкцией *pBud-Sox2-Oct4*.

Результаты количественного анализа экспрессии мРНК генов *b-actin*, *oct4*, *c-myc*, *klf4*, *nanog*, *sox2* в ММСК-ЗТМ до и после генетической модификации плазмидой *pBud-Sox2-Oct4* представлены на рис. 3.

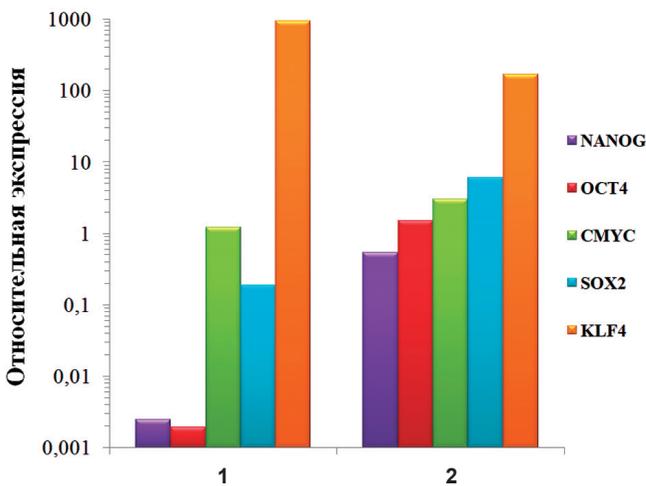


Рис. 3. Уровень экспрессии мРНК генов *nanog*, *oct4*, *c-myc*, *sox2*, *klf4* в ММСК-ЗТМ, трансфицированных плазмидой *pBud-Sox2-Oct4*. Уровень экспрессии мРНК генов факторов транскрипции в ЭСК принят за 100%: 1 – нетрансфицированные ММСК-ЗТМ; 2 – ММСК-ЗТМ, трансфицированные плазмидой *pBud-Sox2-Oct4*. ПЦР-РВ

Анализ проводили методом ПЦР-РВ. ММСК-ЗТМ, трансфицированные плазмидой *pBud-Sox2-Oct4*, показали значительное увеличение уровня мРНК генов *sox2* и *oct4*, что свидетельствует о функциональности полученной целевой генетической конструкции *in vitro*. Также показано, что генетическая модификация ММСК-ЗТМ плазмидой *pBud-Sox2-Oct4* приводит к увеличению экспрессии мРНК гена *nanog*. Это согласуется с данными, полученными нами при генетической модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека плазмидой *pBud-Sox2-Oct4*. В результате трансфекции кДНК генов *sox2* и *oct4* наблюдалось увеличение уровня мРНК не только трансгенов, но и эндогенных мРНК генов *klf4* и *nanog* [19].

Фактор транскрипции *NANOG* является ранним регулятором плюрипотентности и транскрипционно регулируется непосредственно *SOX2* и *OCT4*. Факторы транскрипции *SOX2*, *OCT4* и *NANOG* совместно регулируют многие гены, такие как *yes1*, *fgf4*, *utf1*, *fbx15*, *zic3* и *zfp206* [20]. Этим можно объяснить, что эктопическая экспрессия факторов транскрипции *SOX2* и *OCT4* в ММСК-ЗТМ привела к увеличению экспрессии эндогенного уровня *NANOG*. Это может свидетельствовать о запуске репрограммирования ММСК-ЗТМ.

С целью исследования влияния генетической модификации на морфологию и жизнеспособность клеток, ММСК-ЗТМ были трансплантированы лабораторным крысам в составе Матригеля. Для идентификации ММСК-ЗТМ в имплантатах Матригеля клетки перед трансплантацией метили витальным флуоресцентным красителем *PKH67*. Флуоресцентный анализ гистологических срезов имплантатов через 72 ч. после трансплантации показал наличие жизнеспособных ММСК-ЗТМ (рис. 4).

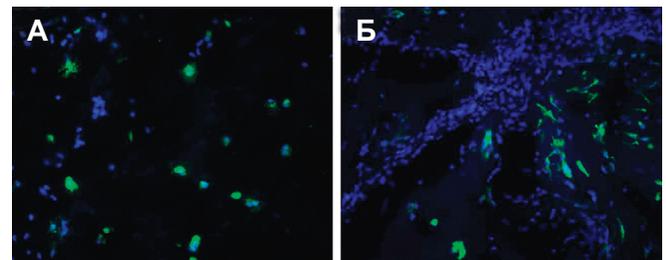


Рис. 4. Имплантаты из Матригеля®, содержащие клетки: А – ММСК-ЗТМ, генетически модифицированные плазмидой *pBud-Sox2-Oct4*; Б – нетрансфицированные ММСК-ЗТМ. Флуоресцентная микроскопия, докраска ядер *DAPI* (синий). Окр.: *PKH67* (зеленый). Ув. $\times 200$

Таким образом, генетическая модификация МСК-ЗТМ созданной рекомбинантной плазмидой *pBud-Sox2-Oct4* приводит к увеличению экспрессии мРНК трансгенов *sox2* и *oct4*, а также мРНК гена *nanog*. Данный факт может свидетельствовать о запуске процессов репрограммирования клеток, повышая их потенциал к дифференцировке в различных направлениях. В связи с большим интересом к разработке генных и клеточных технологий для регенеративной медицины, подобные способы временной (транзиторной) модуляции клеточного фенотипа могут лечь в основу новых методов лечения заболеваний человека.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-04-07527. Анализы выполнены в лаборатории лазерной конфокальной микроскопии Междисциплинарного центра аналитической микроскопии на приборе LSM 780 компании CARL ZEISS. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому

федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003) и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
2. Maherali N., Sridharan R., Xie W. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 55-70.
3. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
4. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 318-24.
5. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95(3): 379-91.
6. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Gen.* 2000; 24(4): 372-6.
7. Yalvac M.E., Ramazanoglu M., Gumru O.Z. et al. Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electroporation. *Neurochem. Res.* 2009; 34(7): 1272-7.
8. Yalvac M.E., Ramazanoglu M., Rizvanov A.A. et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenom. J.* 2010. 10(2): 105-13.
9. Kaukua N., Shahidi M.K., Konstantinidou C. et al. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* 2014; 513(7519): 551-4.
10. Thesleff I., Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech. Dev.* 1997; 67(2): 111-23.
11. Yalvac M.E., Rizvanov A.A., Kilic E. et al. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15(33): 3908-16.
12. Соловьева В.В., Блатт Н.Л., Шафигуллина А.К. и др. Исследование эндогенной секреции сосудистого эндотелиального фактора роста мультипотентными мезенхимными стромальными клетками из зачатков третьих моляров человека. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; VII(3): 155-58.
13. Lagarkova M.A., Volchkov P.Y., Lyakisheva A.V. et al. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. *Cell Cycle* 2006; 5(4): 416-20.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
15. Hughes, C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 2010; 10(9): 1886-90.
16. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2009; 1(2): 228-36.
17. Matin M.M., Walsh J.R., Gokhale P.J. et al. Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 2004; 22(5): 659-68.
18. Han S.M., Han S.H., Coh Y.R. et al. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Exp. Mol. Med.* 2014; 46: e101.
19. Guseva, D., Rizvanov A.A., Salafutdinov I.I. et al. Overexpression of oct4 and sox2 transcription factors enhances differentiation of human umbilical cord blood cells in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 451(4): 503-9.
20. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H. et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(26): 24731-7.

Поступила: 11.12.2014