

DOI: 10.31793/1680-1466.2022.27-4.325

# Основні транскрипційні фактори, які беруть участь у функціонуванні стовбурових клітин. Особливості їх активації та експресії в $\beta$ -клітинах підшлункової залози (Частина 1)

М.Д. Тронько,  
В.М. Пушкарьов,  
О.І. Ковзун,  
Л.К. Соколова,  
В.В. Пушкарьов

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

**Резюме.** Трансплантація клітин є найбільш перспективним і фізіологічним підходом до лікування дисфункції ендокринних залоз. Отримані дані свідчать про ефективність застосування стовбурових клітин (stem cells, SC) для лікування низки ендокринних захворювань і, в першу чергу, цукрового діабету 1-го типу. SC — це клітини з клонотенним потенціалом, які можуть самостійно відновлюватися та диференціюватися в різні типи клітин. Вони відповідають за регенерацію та розвиток органів і тканин. SC надають багато можливостей для регенеративної медицини та слугують перспективною модельною системою для вивчення ранніх стадій розвитку ембріона людини. З'ясовано багато молекулярних механізмів, що лежать в основі самовідновлення та диференціації SC. Основні сигнальні шляхи, задіяні в SC, є JAK/STAT, Notch, MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B, Wnt, Hedgehog (Hh), TGF- $\beta$  та Hippo, які реалізують свою дію через численні, специфічні для кожного шляху транскрипційні фактори. Аналіз їх статусу та послідовності активації, пригнічення і взаємодії надзвичайно важливий в контексті функціонування SC.

Прорив у генерації плюрипотентних клітин із соматичних був досягнутий шляхом надекспресії специфічних факторів транскрипції. І ембріональні SC (embryonic stem cells, ESC), і індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (induced pluripotent stem cells, iPSC) відрізняються здатністю розмножуватися в недиференційованому стані та диференціюватися в будь-який тип клітин в організмі людини, що відображає їх величезний терапевтичний потенціал.

Розробка протоколів для диференціації плюрипотентних клітин до  $\beta$ -клітин, що виробляють інсулін, вимагає

## Огляди

чіткого розуміння участі та перехресної взаємодії цілого ряду сигнальних систем клітини та залежних від них транскрипційних факторів. У протоколах розвитку  $\beta$ -клітин із плюрипотентних клітин було встановлено шість стадій із використанням специфічних індуквальних факторів. Для оцінки прогресу та ефективності процесу диференціації використовуються специфічні маркери.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, сигнальні шляхи, транскрипційні фактори.

Прорив у генерації плюрипотентних клітин із соматичних було досягнуто шляхом над-експресії специфічних факторів транскрипції [1]. ESC та iPSC відрізняються здатністю розмножуватися в недиференційованому стані та диференціюватися в будь-який тип клітин в організмі людини, що відображає їх величезний терапевтичний потенціал. Однак та сама пластичність, яка дозволяє плюрипотентним стовбуровим клітинам генерувати сотні різних типів клітин, ускладнює їх контроль та представляє певну небезпеку з точки зору розробки клітинного продукту зі стовбурових клітин. На щастя, шляхи розвитку для різних видів дуже консервативні; сигнальні шляхи, які регулюють диференціацію клітин людини, подібні до тих, які регулюють ці процеси в інших організмах [2].

Розробка протоколів для диференціації плюрипотентних клітин до  $\beta$ -клітин, вимагає серії молекулярних сигналів, які можна було б виявити в моделях *in vivo* [3]. У протоколах розвитку  $\beta$ -клітин із плюрипотентних клітин було встановлено шість стадій із використанням специфічних індуквальних факторів для отримання острівців, що містять  $\beta$ -клітини. Для оцінки прогресу та ефективності процесу диференціації використовуються специфічні маркери [4]. Перші три стадії диференціації породжують майже однорідну (приблизно на 90% клональну) популяцію попередників, які експресують основний фактор транскрипції гомеобокс підшлункової залози та дванадцятипалої кишки 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1). Після цього окремі популяції ідентифікуються шляхом визначення С-пептиду, пан-ендокринного маркера хромограніну А (chromogranin A, CHGA) та фактора транскрипції  $\beta$ -клітин NKX6.1.

Індукцію ентодерми з плюрипотентних SC вивчали на моделях тварин, і серед

найважливіших факторів, які регулюють цей початковий крок до зародкової лінії, є надродина факторів росту, зокрема трансформувальний фактор росту бета (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ). Утворення дефінітивної ентодерми визначається експресією білка forkhead box protein A2 (FOXA2) та транскрипційного фактора SRY-box 17 (SOX17). Після появи дефінітивної ентодерми, ентодерма підшлункової залози (ПШЗ) детермінується наявністю факторів PDX1, NK6 homeobox 1 (NKX6.1), SOX9 та асоційований із підшлунковою залозою фактор транскрипції 1A (pancreas-associated transcription factor 1A, PTF1A) [5]. Потім клітини ентодерми ПШЗ діляться на ендокринну та екзокринну залозу. Протоки екзокринної ПШЗ підтримують експресію SOX9, а ацинарні клітини – експресію PTF1A [6]. Ендокринні клітини-попередники зберігають експресію PDX1 та NKX6.1, але, перш за все, вони індукують експресію нейрогенін 3 (neurogenin-3, NEUROG3) та нейронна диференціація 1 (neuronal differentiation 1, NEUROD1).

Деякі фактори транскрипції мають вирішальне значення для специфікації та диференціації ендокринного лінеажу, такі як NEUROG3 та NEUROD1. Показано, що пізні дозрівання  $\beta$ -клітин регулюється такими факторами, як V-maf гомолог А онкогену м'язово-апоневротичної фібросаркоми (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A, MAFA), MAFB, білок парного боксу (paired box gene, PAX6) та естроген-зв'язаний рецептор- $\gamma$  (estrogen-related receptor- $\gamma$ , ERR- $\gamma$ ), також відомий як NR3B3 [7, 8].

### **PDX1**

PDX1 є фактором транскрипції, експресія якого спостерігається ще на ембріональному 8,5 дня (E8,5) на 5-6 стадіях сомітів у мишей та приблизно на 4-му тижні вагітності в

людини [7, 9]. PDX1 необхідний для раннього ембріонального розвитку ПШЗ, а також для подальшої диференціації лінеажів залози. Коли експресія PDX1 з E11.5 (після утворення нормального епітелію та протоків ПШЗ) блокується - протягом усього періоду пологів у вагітних мишей, розвиток ПШЗ також зупиняється, про що свідчить нерозвинений залишок ПШЗ, що складається лише з протоків, але без ацинарів або  $\beta$ -клітин.

У зрілих  $\beta$ -клітинах виснаження та зниження кількості PDX1 індукує непереносність глюкози, що свідчить про критичну роль PDX1 у підтримці функції  $\beta$ -клітин [7]. Це уявлення також підтверджується ідентифікацією MODY4 (maturity-onset diabetes of the young 4) – типу діабету, спричиненого моногенними гетерозиготними дефектами в гені PDX1 [10]. У мишей із нецукровим діабетом (NOD) та в пацієнтів із цукровим діабетом 1-го типу (ЦД1) виявляють аутоантитіла до PDX1, а це свідчить, що PDX1 може бути аутоантигеном при ЦД1 [11]. При цукровому діабеті 2-го типу людини (ЦД2) рівень експресії PDX1  $\beta$ -клітин острівців також порушується [12]. Ці дані підкреслюють вирішальну роль PDX1 у ранньому формуванні ембріональної ПШЗ, специфікації різних ендокринних лінеажів і пізнішого дозрівання функціональних  $\beta$ -клітин.

ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) для PDX1 виявив загалом 8088 зв'язаних із PDX1 областей, які відносяться до 5664 генів в РР (human pancreatic progenitors), отриманих з iPSC. Таргетні області PDX1 включають важливі транскрипційні фактори ПШЗ, такі як сам PDX1, RFX6, HNF1B і MEIS1, які активуються під час процесу диференціювання. Це було виявлено за допомогою активного маркера хроматину H3K27ac і профілю експресії мРНК, що свідчить про існування авторегуляторного зворотного зв'язку, який підтримує експресію PDX1 та ініціює програму активації факторів транскрипції ПШЗ. Було ідентифіковано кілька таргетних генів PDX1 людини, включаючи RFX3, необхідний для цикліогенезу та ендокринної диференціації в мишей, і ліганд рецептора Notch DLL1, який важливий для ендокринної індукції. Порівняння профілів експресії PDX1 з РР і острівців дорослої людини виявило набори специфічних для стадії

генів-мішеней, пов'язаних із раннім розвитком ПШЗ та функцією дорослих  $\beta$ -клітин відповідно. Крім того, виявили збагачення ЦД2-асоційованих SNP у ділянках активного хроматину з РР, отриманих з iPSC. Два з цих SNP знаходяться в ділянках зайнятих PDX1, які розташовані в інтронних областях *TCF7L2* і *HNF1B*. Обидва ці гени є ключовими регуляторами транскрипції ендокринної індукції, а мутації в цис-регуляторних областях визначають схильність до діабету [10].

Було зазначено, що комбінація PDX1, MAFA та NEUROG3 здатна перепрограмувати різні типи клітин на  $\beta$ -подібні клітини ПШЗ (pancreatic  $\beta$ -like cells – p $\beta$ LC) [13]. Pax4, фактор транскрипції, відіграє ключову роль у регуляції дозрівання  $\beta$ -клітин ПШЗ (p $\beta$ C). Досліджувалась здатність Pax4 синергетично діяти з PDX1, NEUROG3 і MAFA для диференції мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини (HuMSC) у функціональні p $\beta$ Cs *in vitro*. HuMSC трансфіковані аденовірусом (Ad), що експресує GFP (enhanced green fluorescence protein), Pax4 (Ad-Pax4), PDX1+MAFA+NEUROG3 (Ad-3F) або Ad-Pax4 + Ad-3F.

Результати свідчать про те, що порівняно з Ad-3F клітинами, котрансфіковані Ad-Pax4 і Ad-3F, експресували вищі рівні інсуліну і С-пептиду, а також гени, що експресуються в клітинах-попередниках  $\beta$  ПШЗ, і секретували більше інсуліну у відповідь на підвищення рівня глюкози. Це дослідження продемонструвало, що Pax4 був здатний синергетично діяти з факторами транскрипції PDX1, NEUROG3 і MAFA для перетворення HuMSC у функціональні p $\beta$ LC. HuMSC можуть бути потенційними посівними клітинами для генерування функціональних p $\beta$ LC при терапії діабету [14].

### **NEUROG3**

NEUROG3 є членом сімейства факторів транскрипції типу основна спіраль-петля-спіраль (bHLH), які беруть участь у функціонуванні центральної нервової системи та розвитку ембріональної ПШЗ. Він є раннім маркером клітин, що диференціюються до первинної ендокринної долі. NEUROG3-нульові миші демонструють нездатність до утворення ендокринних клітин-попередників, тоді як надекспресія фактора призводить до прискорення диференціації.

## Огляди

Під час ембріонального розвитку ПШЗ миші експресія *NEUROG3* спочатку спостерігається в дорсальному епітелії ПШЗ на стадії E9, зростає між E9,5 та E15,5, а потім зменшується до дуже низького рівня в підшлунковій залозі новонароджених. За розвитку ПШЗ людини експресія спостерігається з 8-го тижня і досягає свого піка приблизно на 11-му тижні [9]. *NEUROG3* розглядається як проендокринний ген, критичний для ендокринної долі ПШЗ, оскільки він не ко-експресується з гормонами зрілих ендокринних клітин, таких як інсулін, глюкагон, соматостатин та поліпептид ПШЗ. Форсована експресія гена *NEUROG3* в клітинах-попередниках ПШЗ в ембріонах миші під контролем промотора *PDX1* викликає диференціювання ендокринних клітин, насамперед альфа-клітин, і блокує розвиток екзокринних клітин. І навпаки, у мишей із дефіцитом *NEUROG3* чотири типи клітин острівців (альфа, бета, дельта та клітини поліпептиду ПШЗ) та клітини-попередники ендокринної системи не генеруються, і новонароджені вмирають від діабету [15].

Цікаво, що *NEUROG3*<sup>+/-</sup> гетерозиготні острівці не виявляють помітної різниці від острівців *NEUROG3*<sup>+/+</sup> щодо експресії *PDX1*, *NKX6.1*, *GLUT2*, *MAFA* та *MAFB* на клітину [16]. Це свідчить про те, що поки клітини розвиваються в ендокринному напрямку замість екзокринного під час стимуляції *NEUROG3*, відносно низький рівень *NEUROG3* в клітинах несуттєво впливає на диференціацію  $\beta$ -клітин.

Всупереч цим спостереженням, залишається неясним, чи необхідний *NEUROG3* для розвитку  $\beta$ -клітин у людини. На відміну від досліджень на мишах, усі зареєстровані пацієнти з біалельними мутаціями в *NEUROG3* мали функціональні ендокринні клітини, здатні вивільняти С-пептид, попри важкий кишковий анендокриноз із дитинства [17]. Ці випадки вказують на наявність клітин, що секретують інсулін, і причина цього поки що невідома. Цілком можливо, що ці мутації є гіпоморфними або нульовими, враховуючи той факт, що тести на функціональність в основному обмежуються здатністю активувати *NEUROD1*. Однак, очевидно, що *NEUROG3* має велике значення для розвитку та функціонування  $\beta$ -клітин, оскільки всі біалельні мутувані

пацієнти мають постійний діабет, хоча граничний рівень потреби в *NEUROG3* може бути відносно низьким, оскільки всі гетерозиготні батьки не мають діабету. У мишей ЦД1 db/db рівень експресії *NEUROG3* помітно підвищується [18]. На відміну від цього, немає жодних доказів, що свідчать про зміну експресії *NEUROG3* у  $\beta$ -клітинах людини при ЦД2 [12]. У мишей із NOD хронічна інфільтрація імунних клітин у підшлункову залозу корелює з появою *NEUROG3*-позитивних клітин, що вказує на певну ступінь неогенезу  $\beta$ -клітин під час автоімунного запалення [19]. Подібно до  $\beta$ -клітин людини при ЦД2, дослідження не показують різниці у відсотках клітин із *NEUROG3* (5-10%) між здоровими і ЦД1-острівцями людини [7, 20].

**MAFA**

*MAFA*, також відомий як *RIPE3b1*, є членом сімейства MAF з основною лейциновою застібкою. Він ідентифікований як фактор транскрипції, який специфічно зв'язується з консервативним інсуліновим енансерним елементом — *RIPE3b/C1-A2* і активує експресію гена інсуліну. У мишей *MAFA* спочатку виявляється в E13,5 тільки в інсулін-продукуючих клітинах і експресується виключно в  $\beta$ -клітинах ПШЗ дорослих тварин. Подібно до гризунів, *MAFA* майже не виявляється в ембріонах людини до 21 тижня та експресія поступово зростає після народження. Зв'язок між експресією *MAFA* та розвитком *GSIS*, а також, між експресією *MAFA* та зрілістю  $\beta$ -клітин, підтверджується дослідженнями на мишах із дефіцитом *MAFA*, які демонструють порушення *GSIS*, аномальну архітектуру острівців та явний діабет після пологів через 50 тижнів [7]. Навпаки, чутливість до глюкози може бути досягнута в неонатальних острівцях дводенних тварин (P2), якщо утворення *MAFA* індукується аденовірус-опосередкованою гіперекспресією [21]. Дослідження показали, що острівці осіб із ЦД2 мають гіршу здатність до *GSIS*, ніж нормальні острівці, що супроводжується порушенням експресії *MAFA* [12]. Крім того, було показано, що функціональні поліморфізми *MAFA* асоціюються з ЦД1 на моделі мишей NOD та в пацієнтів [22]. Індукція експресії *MAFA* також важлива для регенерації функціональних і зрілих  $\beta$ -клітин із плюрипотентних стовбурових

клітин. Фізіологічно керована індукція MAFA в hESC виявляється корисною для поліпшення GSIS [23]. Крім того, ектопічна експресія MAFA поза нормальним контекстом щодо розвитку PDX1-позитивних або NEUROG3-позитивних ендокринних попередників ПШЗ, шкідлива для диференціації β-клітин [24]. А це підкреслює, що тонке налаштування часового вікна та рівня експресії MAFA мають вирішальне значення для правильного дозрівання β-клітин.

#### **Взаємодія між PDX1, NEUROG3 та MAFA**

На додаток до своєї незалежної ролі в розвитку та дозріванні β-клітин, PDX1, NEUROG3 та MAFA також взаємодіють та взаємно регулюються в процесі розвитку ПШЗ. Через обмежену доступність β-клітин людини взаємодія між трьома факторами краще вивчена на моделях гризунів. PDX1 регулює експресію NEUROG3. Миші з гомозиготною мутацією передчасного усічення PDX1 на С-кінці, яка не важлива для органогенезу ПШЗ, демонструють зменшення кількості NEUROG3-позитивних клітин починаючи від E13,5 до P1. Крім того, рівні транскрипції NEUROG3, а також інших факторів транскрипції, що регулюють експресію гена NEUROG3, включаючи SOX9, Hnf6, Hnf1b та FOXA2, зменшуються у мишей з мутованим PDX1. Це свідчить про те, що PDX1 регулює NEUROG3 безпосередньо, але не виключно, завдяки його ролі у формуванні клітин-попередників ПШЗ. PDX1 також регулює експресію MAFA [7], оскільки експресія гена MAFA в острівцях мишей із нокаутом PDX1 знижується порівняно з мишами дикого типу.

Схоже, що NEUROG3 має мінімальний вплив на PDX1, оскільки мовчання NEUROG3 в hESC лише незначно зменшує кількість PDX1-позитивних клітин порівняно з hESC дикого типу [25]. Інші фактори β-клітин також беруть участь у функціональній взаємодії між PDX1, NEUROG3 та MAFA. Наприклад, PDX1 безпосередньо взаємодіє з NEUROD1 і утворює комплекс активації транскрипції на промоторі гена інсуліну [7]. Разом з NKX2.2, транскрипційним фактором нижче в регуляторному ланцюгу щодо NEUROG3 [26] та FOXA2, ключовим маркерним геном клітин дефінітивної ентодерми, PDX1 регулює

експресію MAFA, специфічну для β-клітин, шляхом зв'язування з енхансерним регіоном MAFA. MAFA та споріднені з ним білки MAFB також регулюють експресію PDX1 шляхом зв'язування з контрольним регіоном Area II, що сприяє транскрипції PDX1 *in vivo* [7].

#### **NEUROD1**

Фактор транскрипції NEUROD1 (Neuronal Differentiation 1) необхідний для дозрівання β-клітин та збільшення клітинної маси острівців ПШЗ. Мутації гена *Neurod1* викликають діабет у людей та мишей. Однак деякі аспекти щодо необхідності NEUROD1 для розвитку ПШЗ до кінця не вивчені [27].

Комплексна взаємодія мереж факторів транскрипції регулює специфіку, диференціацію, експансію та дозрівання ендокринних клітин у підшлунковій залозі, що розвивається [28, 29]. Фактор транскрипції NEUROD1 зі структурним мотивом — основна структура спіраль-петля-спіраль (bHLH — basic helix–loop–helix) утворює гетеродимери з іншими білками bHLH і активує транскрипцію генів, які містять специфічну послідовність ДНК, відому як E-box. Білок масою 39920 Да складається з 356 амінокислот. В острівцевих клітинах, фосфорилується по Ser-274 при стимуляції глюкозою, що може бути необхідним для ядерної локалізації. В активованих нейронах, фосфорилування по Ser-335 сприяє росту дендритів. Фосфорилується MAPK1, що регулює гетеродимеризацію та зв'язування ДНК. Фосфорилування по Ser-266 та Ser-274 посилює трансактивацію інсулінового промотора в клітинах інсуліноми, стимульованих глюкозою [27].

Він є необхідним для розвитку ПШЗ, оскільки миші з делеціями в гені NEUROD1 гинуть перинатально внаслідок важкого діабету [30]. Мутації в гені NEUROD1 у людей пов'язані з діабетом дорослого типу в дітей (MODY — maturity-onset diabetes of the young), особливо MODY6, а також зі сприйнятливістю до гострого розвитку цукрового діабету 1-го типу. Він регулює експресію гена інсуліну і мутації цього гена призводять до цукрового діабету 2-го типу. Інактивація NEUROD1 в ембріональних стовбурових клітинах людини призводить до втрати можливості активувати транскрипційну мережу β-клітин і їх диференціювання у функціональні β-клітини [30]. NEUROD1 разом із PDX1, ISL1 та MAFA є ключовими факторами

## Огляди

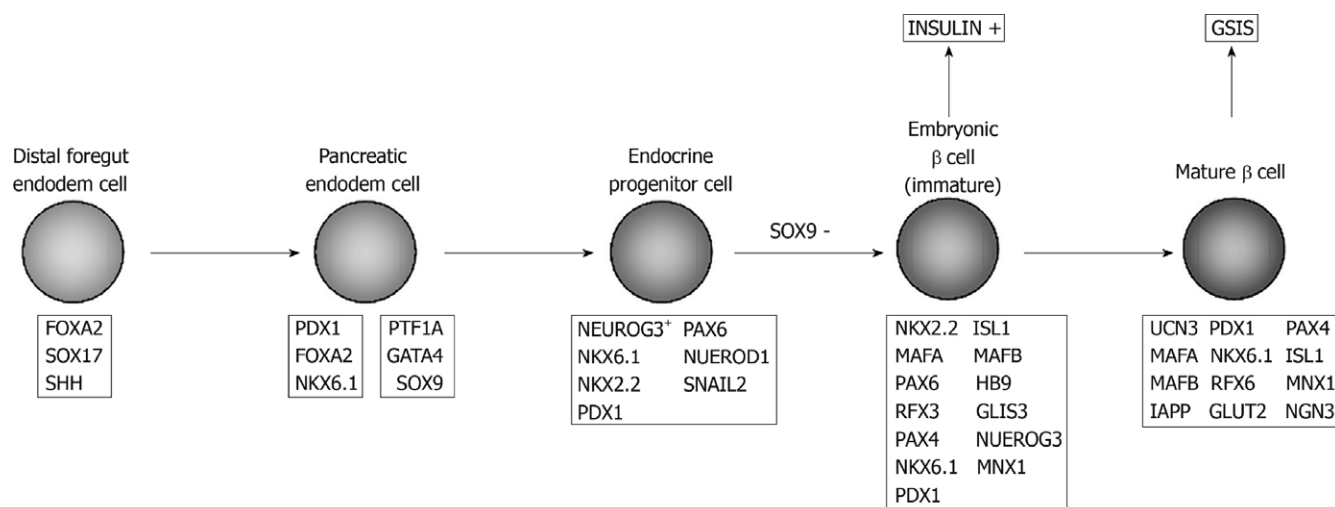
транскрипції, що регулюють синтез інсуліну в  $\beta$ -клітинах ПШЗ у відповідь на зміни рівня глюкози в крові [27]. Згідно з цими спостереженнями, видалення NEUROD1 у популяції клітин, що виробляють інсулін, на початку їх утворення під час розвитку ПШЗ призводить до вираженої непереносності глюкози та незрілості  $\beta$ -клітин, хоча в таких мишей формувались острівці, порівнянні за розміром з контролем і тварини доживали до дорослого віку.

Під час розвитку ПШЗ миші мРНК NEUROD1 спочатку експресується в примордії ПШЗ на стадії E9,5 разом із першими глюкогон+ клітинами та продовжує експресуватися в ендокринних попередниках  $\alpha$ - і  $\beta$ -клітин (рис.). Попри те, що глюкогон-продукуючі  $\alpha$ - та інсулін-продукуючі  $\beta$ -клітини, виявляються під час вторинного переходу в NEUROD1-нуль підшлунковій залозі, елімінація NEUROD1 призводить до неспроможності збільшувати масу  $\beta$ -клітин через зниження проліферації на стадії E17,5 [30] або апоптоз [27]. Цей факт свідчить про функціональну роль NEUROD1 під час фази експансії  $\beta$ -клітин. Однак роль NEUROD1 у ранньому розвитку ПШЗ та диференціації  $\alpha$  та  $\beta$ -клітин досі незрозуміла. Елімінація NEUROD1 у мишей суттєво впливала на мережі транскрипційних факторів  $\alpha$ - та  $\beta$ -ендокринних ліній під час ранньої фази вторинного переходу розвитку ПШЗ, включаючи зниження експресії

Arx, PDX1, NKX2.2, MAFA, MAFB, Insm1, Pax6, Pax4 і POU3F4. Нокаут NEUROD1 у hESC призводив до значного зменшення експресії найважливіших факторів транскрипції  $\beta$ -клітин, включаючи MAFA, Pax6, NKX2.2, Insm1 та PDX1 [30]. Комбінаторні взаємодії NEUROD1 і NKX2.2 [31] та NEUROD1 з Insm1 і FOXA2 важливі для розвитку та функціонування  $\beta$ -клітин.

**OCT**

Сімейство білків OCT (октамер-зв'язуючий транскрипційний фактор (octamer-binding transcription factor)) включає вісім факторів транскрипції, які зв'язуються зі специфічними послідовностями-мішенями й регулюють експресію генів [34]. Ці фактори відіграють важливу роль у підтримці клітинної ідентичності в різних тканинах та в опосередкованні рішень щодо долі клітин протягом усього ембріонального розвитку [35]. Оскільки білки OCT регулюють експресію сотень генів-мішеней, які визначають і підтримують клітинну ідентичність, ектопічна експресія цих білків широко використовується як засіб для перенаправлення та перепрограмування клітинної ідентичності [36]. Прикладом може бути перепрограмування соматичних клітин в індуковані нейронні стовбурові клітини (iNSC) з OCT9 або в індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC) з OCT4 [37].



**Рис.** Транскрипційні фактори, які беруть участь у розвитку і дозріванні  $\beta$ -клітин *in vivo* [32].

Примітка: деталі в тексті; див. «Список скорочень».

**Fig.** Transcription factors involved in the development and maturation of  $\beta$ -cells *in vivo* [32].

Note: details are in the text; see «List of abbreviations».

Можливо, найбільш вивченим членом родини ОСТ є ОСТ4, не тільки через його істотну фізіологічну роль у ранньому ембріональному розвитку, а й завдяки його унікальним транскрипційним функціям у біології перепрограмування [38, 39]. ОСТ4 – єдиний білок ОСТ, який може індукувати плюрипотентність [40, 41], що стало дещо несподіваним відкриттям, оскільки члени родини ОСТ демонструють глибоку консервативність їх амінокислотних послідовностей. Ці спостереження викликали значний інтерес до досліджень, як саме ОСТ4 викликає плюрипотентність і чому інші члени сім'ї ОСТ не мають такого ефекту.

Останні дослідження сформували нові уявлення про біологію перепрограмування як із, так і, без екзогенного введення ОСТ4. Було показано, що перепрограмування соматичних клітин до плюрипотентності насправді можна досягти шляхом повного скасування ектопічної експресії ОСТ4 [42, 43]. Цей результат вказує на те, що перепрограмовані клітини набувають і встановлюють самопідтримуваний плюрипотентний стан, який викликається ендогенною експресією ОСТ4. Важливо, що перепрограмування без використання екзогенного ОСТ4 значно покращує загальну якість iPSC, оскільки екзогенний ОСТ4 може порушувати експресію імпринтованого гена та провокувати нецільові ефекти [43]. Дійсно, iPSC, створені без використання екзогенного ОСТ4 демонструють визначний потенціал розвитку. Ці спостереження показали, що індукція плюрипотентності може бути досягнута до тих пір, поки ендогенний ОСТ4 може бути активований, прямо чи опосередковано. Стало зрозуміло, що, хоча ендогенна експресія ОСТ4 є необхідною, екзогенний ОСТ4 – достатній, але не необхідний фактор для перепрограмування соматичних клітин.

Нещодавно було показано, що практично всі білки ОСТ компетентні щодо перепрограмування і вони можуть активувати в різному ступені мережу плюрипотентності за оптимальних умов [44, 45], що визначаються різними епігенами клітин-донорів, які відрізняються не тільки між типами клітин-донорів, але й між видами.

Сімейство білків POU (Pit-OST-Unc) включає 15 факторів транскрипції, які зв'язуються зі специфічними послідовностями-мішенями.

Білки POU відіграють різноманітну роль у широкому діапазоні клітинних процесів [35] і поділяються на шість класів (POU I до POU VI) на основі подібності послідовностей їх ДНК-зв'язуючих доменів (DBD – DNA-binding domain). Лише білки класів POU II, III та V, які переважно зв'язуються з октамерним мотивом (консенсусна послідовність ATGCAAAT) та його варіантами, класифікуються як октамер-зв'язуючі (ОСТ) білки. Білки інших класів POU (POU I, IV і VI) демонструють нижчу афінність зв'язування з октамерним мотивом [34].

Група ОСТ складається з восьми білків (ОСТ1, ОСТ2, ОСТ4, ОСТ6, ОСТ7, ОСТ8, ОСТ9 та ОСТ11), а нумерація кожного білка ґрунтується на позиції, до якої зв'язуються ДНК-зонди, що використовуються в аналізах зсуву електрофоретичної рухливості (EMSA). Білки ОСТ мають висококонсервативний дводольний DBD, що складається з двох структурно незалежних субдоменів, 75-амінокислотного N-кінцевого POU-специфічного домену (POU S) та 60-амінокислотний C-кінцевий POU гомеодомен (POU H) [34]. Кожен домен POU може зв'язувати послідовність із чотирьох пар основ у головній канавці ДНК, тим самим розміщуючи кожен домен POU по обидві сторони від спіралі ДНК і ефективно оточуючи таргетні послідовності ДНК [37, 38]. Лінкер, який різниться по довжині та послідовності між білками ОСТ, фланкований цими двома доменами POU [35]. Цей лінкер також впливає на специфічність зв'язування до послідовностей ДНК та конформацію білків ОСТ, хоча, схоже, він фізично не взаємодіє з самою послідовністю ДНК.

Посттрансляційні модифікації доменів POU, включаючи убіквітінацію, глікозилювання, SUMOїлювання, фосфорилування й окислення, також впливають на здатність зв'язування білків ОСТ до споріднених послідовностей ДНК [46, 47].

Білки ОСТ утворюють гомодимери або гетеродимери з іншими білками-партнерами на специфічних таргетних послідовностях, додаючи додатковий механізм контролю генів-мішеней. Білки ОСТ містять два транскрипційні домени (TAD), які розташовані по обидва боки DBD. На відміну від DBD, TAD мають мало консервативних послідовностей і

## Огляди

різняються по довжині між білками OCT. Відомо, що TAD відіграють важливу роль у транскрипційній стимуляції генів-мішеней шляхом взаємодії з базальною транскрипційною машинерією та іншими кофакторами [34].

OCT4 належить до класу POU V [35]. Це найкраще охарактеризований OCT через його важливе біологічне значення в ранньому ембріональному розвитку, підтримці статевих клітин, плюрипотентності SC та перепрограмуванні клітин [38, 39]. OCT4 інтенсивно експресується в тотипотентних і плюрипотентних клітинах, включаючи ооцити, ембріони ранніх етапів, внутрішню клітинну масу (ICM) бластоцист, епібласти, ESC та статеві клітини. Експресія OCT4 регулюється двома цис-енхансерними елементами (дистальні та проксимальні енхансери), які розташовані за 2 kb вище від місця старту транскрипції. Активність цих енхансерів відрізняється між різними типами клітин. Проксимальний енхансер (PE) активний в епібластих постімплантаційних ембріонів та стовбурових клітинах епібластів (EpiSC), тоді як дистальний енхансер (DE) активний в ICM, ESC та статевих клітинах. Зниження рівня експресії OCT4 в ESC ініціює їх диференціацію до первинних ентодермальних, мезодермальних та трофктодермальних клітинних ліній. Ці спостереження разом із відкриттям технології iPSC [37] підкреслили функціональне значення OCT4 як для підтримки, так і для встановлення плюрипотентності.

Протягом багатьох років із кількох причин широко вважалося, що екзогенне введення OCT4 є найважливішим і незамінним фактором у процесі перепрограмування. Так, SOX2, KLF4 та c-Myc можуть бути замінені членами своїх родин, а OCT4 не може бути замінений жодним із його паралогів [40, 41]. Також, на відміну від SOX2, KLF4 або c-Myc, тільки OCT4 сам по собі може викликати перепрограмування, коли певні шляхи або молекули інгібуються сполуками (наприклад, VPA, інгібітор HDAC або CHIR-99021, інгібітор GSK-3) або коли специфічний тип клітин використовується як клітини-донори (наприклад, NSC)). Нарешті, порушення ключових функцій OCT4 шляхом делецій у структурних компонентах або введення інактивуючих точкових мутацій повністю скасовує процес перепрограмування [40, 41].

Однак, точка зору, що екзогенний OCT4 необхідний для перепрограмування, нещодавно змінилася. Безперечно, включення OCT4 в суміші для перепрограмування є найбільш ефективним засобом для утворення iPSC. Проте останні дослідження показали, що екзогенний OCT4 може бути повністю виключений із сумішей перепрограмування або його можна замінити членами його родини, різними факторами транскрипції або малими молекулами [42, 44, 45, 48, 49]. Наприклад, Nr5a1 (Sf-1), Nr5a2 (Lrh1) або Sall4/NANOG кожен може функціонально замінити OCT4 і викликати перепрограмування разом із SOX2, KLF4 та c-Myc. Примітно, що ці гени знаходяться генетично вище від OCT4, так що їх ектопічна експресія може безпосередньо активувати ендегенну експресію OCT4, що призводить до генерації iPSC. ДНК-деметиلاза Tet1 також може функціонально замінити OCT4 при перепрограмуванні. Ектопічна експресія Tet1 опосередковує деметилювання в регуляторних областях OCT4, що призводить до активації ендегенного OCT4. Ці дослідження чітко демонструють, що індукція плюрипотентності в поєднанні з SOX2, KLF4 та c-Myc може опосередковуватися без екзогенного OCT4 шляхом використання альтернативних факторів, здатних безпосередньо активувати ендегенну експресію OCT4 [34].

Цікаво, що гени, які безпосередньо не регулюють ендегенний локус OCT4, також можуть викликати перепрограмування разом із SOX2, KLF4 та c-Myc. Ці гени включають GATA1-6, SOX7, PAX1, Sebpa, Hnf4a та Grb2, більшість з яких у нормальних фізіологічних процесах не знаходяться генетично вище за OCT4 і не експресуються в ESC або iPSC. Більшість із цих факторів зазвичай функціонують як фактори транскрипції, специфічні для клітинної лінії, і відіграють важливу роль у визначенні долі клітин мезодермальних та ентодермальних лінеажів під час ембріонального розвитку. Дослідження, спрямоване на розшифровку молекулярних механізмів перепрограмування на основі фактора GATA, показало, що ектопічна експресія цього фактора може активувати Sall4, який, своєю чергою, активує ендегенний OCT4, і в результаті призводить до генерації iPSC без екзогенного введення OCT. Було висловлено припущення, що непряма активація

ендогенної експресії OCT4 може бути звичайним способом ініціації перепрограмування усіма іншими факторами транскрипції, специфічними для даної лінії [50].

На додаток до ектопічної експресії генетичних факторів, специфічні хімікати також можуть функціонально замінювати екзогенний OCT4 та індукувати плюрипотентність у поєднанні з SOX2, KLF4 та c-Myc. Наприклад, NSC, трансдуковані з SOX2, KLF4 та c-Myc та культивовані в присутності VIX-01294, інгібітора гістонової метилтрансферази G9a, утворюють колонії iPSC. G9a критично важливий для метилювання ДНК *de novo* в регуляторних регіонах OCT4. Таким чином, додавання VIX-01294 спричиняє деметилювання в регуляторних областях OCT4, що призводить до активації ендогенної експресії OCT4 [34].

У ембріональних фібробластах миші екзогенний OCT4 можна функціонально замінити різними іншими малими молекулами, включаючи агоніст cAMP форсколін, агоніст 5-HT<sub>3</sub> 2-метил-5-гідрокситриптамін або інгібітор казеїнкінази 1 D4476.

Низька якість iPSC в результаті перепрограмування є ключовим обмеженням, яке обмежує застосування iPSC у регенеративній біомедицині. Було показано, що на якість iPSC може безпосередньо впливати стехіометрична експресія факторів перепрограмування (наприклад, OCT<sub>4<sup>high</sup></sub>/KLF<sub>4<sup>high</sup></sub>/SOX<sub>2<sup>low</sup></sub>/c-Myc<sub>low</sub>), добавки в клітинні культуральні середовища (наприклад, вітаміну C) та/або вибір факторів перепрограмування (наприклад, Sall4/NANOG/Esrrb/Lin28a або OCT4/SOX2/KLF4) [51].

Хоча перепрограмування за допомогою c-Myc разом з OCT, SOX2 та KLF4 забезпечує більший вихід iPSC, c-Myc чинить негативний вплив на імпринтовані локуси, що призводить до значного зниження потенціалу розвитку [51]. Нещодавно виявили, що якість iPSC різко знижується при експресії екзогенного OCT4 [49].

Фактично, лінії клітин, генеровані поліцистронною експресією SOX2, KLF4 та c-Myc без OCT4, утворювали iPSC набагато ефективніше, ніж лінії, генеровані звичайною поліцистронною експресією чотирьох факторів. Порівнюючи транскриптоми та епігеноми між серією ліній iPSC, створених із двома різними

сумішами для перепрограмування, тобто з екзогенним OCT4 та без нього, прийшли до вирішального висновку, що ектопічна експресія OCT4 знижує якість iPSC шляхом аномальної активації офф-таргетних генів, не пов'язаних із плюрипотентністю та порушення експресії імпринтованого гена [49]. Було показано, що отримання високоякісних iPSC сильно корелює з меншою ефективністю перепрограмування [51]. Перепрограмування без OCT4, але з SOX2, KLF4 та c-Myc дає менше колоній iPSC із повільнішою кінетикою перепрограмування, але більшість ліній iPSC, отриманих із цих колоній, мають високу якість, яка оцінюється за допомогою молекулярного профілювання та їх внеску в тетраплоїдну комплементацію [49].

Попри високу схожість білкових послідовностей, ДНК-зв'язуючі профілі білків OCT та їхня ДНК-залежна димеризація з SOX2 значно відрізняються [40, 41]. Зокрема, OCT4 переважно утворює гетеродимери з SOX2 через канонічний мотив SOX-OCT (CATTTGTTATGCAAAT), який сильно збагачений енхансерами генів плюрипотентності, таких як NANOG, FGF4, Utf1 та POU5F1. Навпаки, інші білки OCT, як OCT6 та OCT7, переважно утворюють гомодимери через більш паліндромний октамерний елемент розпізнавання (MORE; ATGCATATGCAT), який переважно зустрічається в регуляторних областях нейронних генів, включаючи NEUROG1, Olig1 та Ascl1 [40]. Формування гетеродимерів OCT4-SOX2 за допомогою мотивів SOX-OCT напевно є необхідним для індукування плюрипотентності, оскільки мутації, які порушують формування гетеродимерів OCT4-SOX2, скасовують компетентність перепрограмування [34, 40].

Необхідно зазначити, що OCT4 повторно експресується в різних типах ракових стовбурових клітин, які є кластерами пухлинних клітин, що забезпечують стійкість пухлини до хіміотерапії та її рецидивів [52]. Епігенетичні зміни, ймовірно, відіграють вирішальну роль як у стовбуровості, так і в пухлиноутворенні [53, 54]. Специфічні для лінії патерни метилювання ДНК, які встановлюються під час ембріонального розвитку, як правило, зберігаються в диференційованих дорослих клітинах. У цьому контексті ключову роль відіграє ДНК

## Огляди

(цитозин-5)-метилтрансфераза 1 (DNMT1 – DNA-(cytosine-5)-methyltransferase 1), яка каталізує метилювання ДНК і кодується геном *DNMT1* [55]. Попередні дослідження показали, що інгібітори DNMT1 та лікування модифікаторами гістондеацетилази SIRT1 можуть значно підвищити ефективність процесу перепрограмування, а також канцерогенезу.

**NANOG**

NANOG є важливим фактором транскрипції стовбурових клітин, який бере участь у розвитку людини та канцерогенезі [56]. Подібно до OCT4, фактор транскрипції NANOG переважно експресується в клітинах ICM (inner cell mass), PGC (Primordial Germ Cells), ESC та EG (Embryonic Germ). Було показано, що NANOG підтримує плюрипотентність у клітинах ICM та ESC, а також підтримує самовідновлення клітин ES миші за відсутності LIF, цитокіну, необхідного для ESC мишей [57]. NANOG має вирішальне значення для преміплантаційної фази розвитку і його кількість поступово зменшується під час диференціації ембріональних стовбурових клітин, регулюючи таким чином ембріональний та внутрішньоутробний розвиток. Постнатально NANOG не виявляється або експресується в дуже малих кількостях у більшості тканин людини. Однак експресію NANOG можна виявити в ракових стовбурових клітинах [58, 59].

NANOG є символом гена, який відповідає повній назві NANOG homebox, і це третій фактор транскрипції стовбурових клітин, який відіграє важливу роль у регуляції розвитку людини. Він бере участь у визначенні долі, проліферації та апоптозі клітин. В ESC NANOG має вирішальне значення для підтримки плюрипотентності [58].

Експресія NANOG регулюється на різних рівнях, включаючи ДНК (зміна кількості копій, метилювання), мРНК (міРНК) та на рівні білка. Припускають, що NANOG як білок може регулювати експресію сотень генів-мішеней шляхом зв'язування з їхніми промоторними областями. Різні шляхи та наслідки розвитку пухлини (наприклад, гіпоксія) є модуляторами експресії NANOG. OCT4 та SOX2 є одними з найважливіших білкових регуляторів NANOG. Вони утворюють комплекс із KLF4 і зв'язуються з мотивом OCT4/SOX2 вище стартового сайту транскрипції

промотора NANOG. Крім того, експресія NANOG може безпосередньо негативно регулюватись TCF3 та P53, тоді як BM-1 та SNAIL є позитивними регуляторами. Фосфорилування білка NANOG за допомогою PKCε або FAK посилює його активність. Поряд із білковими регуляторами експресія NANOG також регулюється епігенетичними механізмами – міРНК та метилюванням, а також різними посттрансляційними модифікаціями [58, 59].

Дослідження виявили NANOG як частину транскрипційної мережі, яка регулює активність численних генів у кооперації з OCT4 та SOX2. Оскільки кожен із цих трьох генів містить сайти зв'язування для кожного з трьох факторів транскрипції, було запропоновано, що вони можуть діяти як самоорганізований комплекс, який підтримує рівні експресії, необхідні для забезпечення плюрипотентності. Однак було показано, що можна отримати ESC, у яких відсутній NANOG, але вони все ще зберігають експресію маркерів плюрипотентності, включаючи OCT4 та SOX2. Хоча ці ESC схильні до диференціації, вони здатні до самовідновлення за відсутності NANOG, і можуть сприяти розвитку всіх трьох зародкових шарів в химерах. Отже, виявляється, що NANOG не є необхідним для встановлення плюрипотентності, але може функціонувати для посилення стабільності плюрипотентного стану [57].

Щоб окреслити регуляторні відносини між OCT4, SOX2 та NANOG та їхніми мішенями, об'єднали дані, одержані мікроерей-методом у поєднанні з імунопреципітацією хроматину, із профілем генетичної експресії ESC, що диференціюються, а також ESC, дефіцитних по OCT4 або SOX2. Вони виявили, що гени полікомбової групи Eed і Phc1 обидва зв'язуються як OCT4, так і NANOG, і їх регуляція знижується з down-регулюванням OCT4/NANOG. Всі ці чотири фактори спрямовані на промотори одного і того ж набору генів, що призводить до пригнічення генів, пов'язаних із розвитком. Хоча досліджень експресії генів або зв'язування факторів транскрипції недостатньо для ідентифікації регуляторних взаємодій фактора транскрипції та мішені, цей інтегративний підхід дозволив передбачити існування нових регуляторів та регуляторних мереж, що контролюють долю ESC, деякі з яких були перевірені за допомогою RNAi у поєднанні з аналізом експресії генів [57].

Розвиток багатоклітинних організмів з одноклітинної зиготи (запліднених ооцитів) чітко регулюється багатьма генами, включаючи NANOG. NANOG є основним фактором транскрипції для передімплантаційної фази розвитку, а також в ембріональному та внутрішньотробному розвитку. Під час цього процесу NANOG підтримує плюрипотентність, регулює інші гени, пов'язані з плюрипотентністю, і його кількість поступово зменшується в міру диференціації ESC [56, 59].

NANOG, головний регулятор плюрипотентності та розвитку, був першим геном плюрипотентності, для якого спостерігали гетерогенність та тимчасові флуктуації. Після цього було виявлено гетерогенну експресію інших факторів плюрипотентності, таких як T-box 3, цинк-фінгер білок 42 (Rex1), KLF4, Stella, Esrrb та  $\beta$ -катенін. Важливо, що мозаїчний і взаємоконвертований розподіл генів плюрипотентності часто корелює з різними ступенями потенції: на рівні популяції mESC є повністю плюрипотентними, але субпопуляції демонструють різну схильність до диференціації [60].

Було отримано перші експериментальні докази мультимодального розподілу NANOG. У mESC, культивованих у середовищі сироватка/LIF, показано співіснування двох субпопуляцій, одна позитивна для OCT4 і NANOG і одна позитивна лише для OCT4. Інші дослідження підтвердили ці результати та висвітлили нові особливості гетерогенності NANOG. Мікроерей-аналіз виявив дві субпопуляції NANOG. Чітка сигнатура плюрипотентності характеризувала клітини з високим рівнем NANOG, тоді як клітини з низьким рівнем NANOG показали виражену експресію мезодермальних генів. Ці дослідження показали як мультимодальний розподіл NANOG, так і його тимчасові коливання між двома станами. Прийшли до висновку, що NANOG діє як молекулярний воротар, який точно контролює долю клітин у відповідь на регуляцію генів плюрипотентності та диференціювання, внутрішній шум і зовнішні подразники [60].

#### **Крюпель-подібний фактор 4 (KLF4)**

KLF4 — це еволюційно консервативний фактор транскрипції, що містить структурний мотив цинковий палець (zinc finger), і який регулює різноманітні клітинні процеси, такі як

ріст клітин, проліферація та диференціація. Ген є консервативним для хребетних — від риб до людини. В останні роки KLF4 здобув відомість не тільки завдяки своїм різноманітним функціям у фізіологічних процесах та при захворюваннях, а і як один із чотирьох ключових факторів, необхідних для індукції плюрипотентних стовбурових клітин (iPSC) [61].

KLF4 належить до сімейства факторів SP/KLF, які характеризуються трьома цинковими пальцями в межах своїх карбоксильних кінцевих послідовностей. У межах свого амінокінця KLF4 міститься домен трансактивації (TAD) і прилеглий до нього домен репресії, які разом визначають специфічність транскрипційної регульовальної активності KLF4 шляхом взаємодії з іншими факторами та модуляції ефективності зв'язування ДНК. Два сигнали ядерної локалізації (NLS — nuclear localization signals) також були ідентифіковані в KLF4 миші. Перший безпосередньо прилягає до амінокінцевого мотиву цинкового пальця, а другий охоплює перший і половину другого доменів цинкових пальців. KLF4 мишей містить 483 амінокислоти з молекулярною масою 53 кДа, і на 91% ідентичний KLF4 людини. У нормальних і ракових клітинах було виявлено кілька варіантів сплайсингу гена KLF4 людини (наприклад, ракові клітини ПШЗ людини [62]).

*Регуляція KLF4.* Експресія KLF4 регулюється як на рівні транскрипції, так і на пост-транскрипційному рівні. Показано, що гіперметилування острівців CpG у промоторі KLF4 та метилування гістонів модулюють його активність у стовбурових клітинах. Мікро-РНК — це ще один механізм, важливий для контролю експресії KLF4 у стовбурових клітинах, клітинах-попередниках, при ремоделюванні серцево-судинної системи та канцерогенезі [61, 63]. Кілька сигнальних шляхів регулюють патерн експресії KLF4 за допомогою своїх ефекторів. На посттрансляційному рівні активність KLF4 негативно регулюється фосфорилуванням ERK1 та ERK2 по серину 132, що призводить до індукції диференціації ембріональних стовбурових клітин. Це фосфорилування має вторинний ефект через рекрутування білків F-box  $\beta$ -TrCP1 або  $\beta$ -TrCP2 до N-кінцевого домену KLF4, що, своєю чергою, призводить до убіквітинування та деградації KLF4.

## Огляди

Ацетилювання KLF4 по залишках лізину 225 та 229, опосередковане комплексом p300/CBP, пригнічує здатність KLF4 активувати мішені, що знаходяться нижче в регуляторному ланцюгу. У ракових клітинах взаємодія p21/СК2 посилює фосфорилювання HDAC2, обмежує деацетилювання KLF4 і сприяє розвитку пухлини [64]. Навпаки, надекспресія p300/CBP викликає ацетилювання KLF4 і перемикає його активність на супресію пухлини. Показано, що KLF4 взаємодіє з SUMO-1 за допомогою SUMO-взаємодіючого мотиву (SIM) в кислотній та багатій гідрофобними залишками ділянці KLF4, що потрібно для KLF4-залежної трансактивації промоторів-мішеней. З іншого боку, в ESC сумоїлювання KLF4 по лізину 275 зменшує його транскрипційний потенціал, що свідчить про зниження активності промотора NANOG та інгібування індукції іPSC. Крім того, сумоїлювання KLF4 людини, опосередковане PIAS1, сприяє його деградації, хоча детальний механізм поки що невідомий. Кілька залишків лізину (32, 52, 232 та 252 в KLF4 мишей) беруть участь у сприянні убіквітинуванию KLF4 та його деградації в протеасомах. PRMT5, білок-аргінін метилтрансферази, безпосередньо взаємодіє з KLF4 людини та каталізує метилювання залишків аргініну 374, 376 та 377, а згодом стабілізує та збільшує транскрипційну активність KLF4. Нарешті, мотиви розпізнавання казеїнкінази II (СКII) були ідентифіковані в домені активації KLF4 – TИQE [61].

*Вплив KLF4 на біологічні процеси.* KLF4 є універсальним фактором транскрипції, який бере участь у регулюванні численних клітинних процесів. Трансактивація генів, опосередкована KLF4, регулюється на кількох рівнях шляхом модуляції статусу KLF4 через фосфорилювання, ацетилювання, метилювання та убіквітинувания залежно від контексту.

KLF4 спочатку був ідентифікований як фактор, пов'язаний із зупинкою росту. У клітинах NIH3T3, які активно проліферують, рівень KLF4 надзвичайно низький, але значно підвищується в клітинах із зупинкою росту, викликаною сироватковим голодуванням або контактним гальмуванням. Надекспресія KLF4 викликала зупинку клітинного циклу в кількох клітинних лініях. Основним механізмом, за допомогою якого KLF4 регулює

клітинний цикл, є індукція експресії *CDKN1A* (ген, що кодує інгібітор CDK1 – p21<sup>CIP1/WAF1</sup>). Це було з'ясовано при дослідженні ролі KLF4 у модуляції прогресування клітинного циклу після пошкодження ДНК. Після обробки культивованих клітин агентами, що ушкоджують ДНК, було встановлено, що KLF4 трансактивує промотор *CDKN1A* шляхом зв'язування зі специфічним SP1-подібним цис-елементом у проксимальній області промотора, після чого KLF4 рекрутує p53 до промотора *CDKN1A*, що дозволяє p53 стимулювати транскрипцію гена *CDKN1A*. Активація експресії p21<sup>CIP1/WAF1</sup> після пошкодження ДНК викликає зупинку клітинного циклу як у точках переходу G1/S, так і в G2/M. Крім того, KLF4 інгібує експресію CCND1 та CCNB1, які сприяють прогресуванню клітинного циклу через чекпойнти G1/S та G2/M відповідно. Також було показано, що KLF4 пригнічує транскрипцію CCNE, запобігаючи ампліфікації центросом після пошкодження ДНК γ-опроміненням. KLF4 не тільки відіграє роль у регулюванні дуплікації центросом після пошкодження ДНК, але і контролює дублювання центросом і кількість хромосом (генетична стабільність) як *in vitro*, так і *in vivo* [61, 65].

Одна з головних функцій KLF4 у клітині – сприяння виживанню шляхом пригнічення апоптозу [66]. Було виявлено, що KLF4 пригнічує p53-залежний апоптотичний шлях безпосереднім інгібуванням *TP53* та прямим пригніченням експресії BAX. Також показано, що після індукованої інгібітором HDAC активації каспази, KLF4 перешкоджає апоптозу, пригнічуючи шлях SAPK, діючи на CDKN1C. Однак пізніше було виявлено, що за певних умов KLF4 може змінити свою роль з антиапоптотичної на проапоптотичну [67]. Таким чином, ефекти KLF4 залежать від контексту.

Була встановлена участь KLF4 у регулюванні запалення. У відповідь на IFN-γ та LPS KLF4 фізично взаємодіє з субодиницею NF-κB p65, індуюючи промотор гена *NOS2* (Nitric Oxide Synthase 2). Отже, з одного боку, KLF4 залучений до опосередкованого NF-κB запалення. І навпаки, KLF4 може пригнічувати активацію запального сигналіну. Його надмірна експресія в ендотеліальних клітинах індуює експресію множинних протизапальних та антитромботичних факторів, включаючи ендотеліальну

NOS та тромбомодулін, тоді як його нокдаун посилює TNF $\alpha$ -індуковану експресію молекули адгезії судинних клітин (VCAM1 – vascular cell adhesion molecule) [61].

*KLF4 в стовбурових клітинах.* Важливість KLF4 як фактора стовбуровості вперше виявили у 2006 р., коли було продемонстровано, що за певних умов культивування ембріональні та дорослі фібробласти мишей можуть бути індуковані в плюрипотентні SC шляхом надекспресії чотирьох специфічних факторів: OCT3/4, SOX2, c-Мус та KLF4. Пізніше це було повторено на фібробластах дорослої людини [37]. Ці перші публікації відкрили нові можливості для розширених та клінічно значущих досліджень при вивченні стовбурових клітин, які закріплюють ключову роль KLF4 (разом з іншими трьома факторами) у стовбурових клітинах. Пізніші дослідження показали, що KLF4 відіграє подвійну роль під час індукції плюрипотентності, спочатку пригнічуючи маркери диференціації і полегшуючи експресію генів плюрипотентності на пізній стадії. Показано, що він безпосередньо регулюється інгібувальним фактором лейкемії (LIF – leukemia inhibitory factor)/STAT3 шляхом [68].

### Список використаної літератури

- Latres E, Finan DA, Greenstein JL, Kowalski A, Kieffer TJ. Navigating Two Roads to Glucose Normalization in Diabetes: Automated Insulin Delivery Devices and Cell Therapy. *Cell Metab.* 2019 Mar 5;29(3):545-563. doi: 10.1016/j.cmet.2019.02.007.
- Johnson JD. The quest to make fully functional human pancreatic beta cells from embryonic stem cells: climbing a mountain in the clouds. *Diabetologia.* 2016 Oct;59(10):2047-57. doi: 10.1007/s00125-016-4059-4.
- Ameri J, Borup R, Prawiro C, Ramond C, Schachter KA, Scharfmann R, et al. Efficient Generation of Glucose-Responsive Beta Cells from Isolated GP2+ Human Pancreatic Progenitors. *Cell Rep.* 2017 Apr 4;19(1):36-49. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.032.
- Russ HA, Parent AV, Ringler JJ, Hennings TG, Nair GG, Shveygert M, et al. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells *in vitro*. *EMBO J.* 2015 Jul 2;34(13):1759-72. doi: 10.15252/embj.201591058.
- Korytnikov R, Nostro MC. Generation of polyhormonal and multipotent pancreatic progenitor lineages from human pluripotent stem cells. *Methods.* 2016 May 15;101:56-64. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.10.017.
- Arroyave F, Montaño D, Lizcano F. Diabetes Mellitus Is a Chronic Disease that Can Benefit from Therapy with Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 18;21(22):8685. doi: 10.3390/ijms21228685.
- Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Nov 2;8(1):240. doi: 10.1186/s13287-017-0694-z.
- Yoshihara E, Wei Z, Lin CS, Fang S, Ahmadian M, Kida Y, et al. ERR $\gamma$  Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive  $\beta$  Cells. *Cell Metab.* 2016 Apr 12;23(4):622-34. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.005.
- Jennings RE, Berry AA, Kirkwood-Wilson R, Roberts NA, Hearn T, Salisbury RJ, et al. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes.* 2013 Oct;62(10):3514-22. doi: 10.2337/db12-1479.
- Wang X, Sterr M, Burtscher I, Chen S, Hieronimus A, Machicao F, et al. Genome-wide analysis of PDX1 target genes in human pancreatic progenitors. *Mol Metab.* 2018 Mar;9:57-68. doi: 10.1016/j.molmet.2018.01.011.
- Li SW, Koya V, Li Y, Donelan W, Lin P, Reeves WH, et al. Pancreatic duodenal homeobox 1 protein is a novel beta-cell-specific autoantigen for type I diabetes. *Lab Invest.* 2010 Jan;90(1):31-9. doi: 10.1038/labinvest.2009.116.
- Guo S, Dai C, Guo M, Taylor B, Harmon JS, Sander M, et al. Inactivation of specific  $\beta$  cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2013 Aug;123(8):3305-16. doi: 10.1172/JCI65390.
- Cavelti-Weder C, Zumsteg A, Li W, Zhou Q. Reprogramming of Pancreatic Acinar Cells to Functional Beta Cells by In Vivo Transduction of a Polycistronic Construct Containing Pdx1, Ngn3, MafA in Mice. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2017 Feb 2;40:4A.10.1-4A.10.12. doi: 10.1002/cpsc.21.
- Zhang T, Wang H, Wang T, Wei C, Jiang H, Jiang S, et al. Pax4 synergistically acts with Pdx1, Ngn3 and MafA to induce HuMPCs to differentiate into functional pancreatic  $\beta$ -cells. *Exp Ther Med.* 2019 Oct;18(4):2592-2598. doi: 10.3892/etm.2019.7854.
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 15;97(4):1607-11. doi: 10.1073/pnas.97.4.1607.
- Wang S, Yan J, Anderson DA, Xu Y, Kanal MC, Cao Z, et al. Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas. *Dev Biol.* 2010 Mar 1;339(1):26-37. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.12.009.
- German-Diaz M, Rodriguez-Gil Y, Cruz-Rojo J, Charbit-Henrion F, Cerf-Bensussan N, Manzaneres-López Manzaneres J, et al. A New Case of Congenital Malabsorptive Diarrhea and Diabetes Secondary to Mutant Neurogenin-3. *Pediatrics.* 2017 Aug;140(2):e20162210. doi: 10.1542/peds.2016-2210.
- Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic  $\beta$  cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic  $\beta$  cell failure. *Cell.* 2012 Sep 14;150(6):1223-34. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.029.
- Valdez IA, Dirice E, Gupta MK, Shirakawa J, Teo AKK, Kulkarni RN. Proinflammatory Cytokines Induce Endocrine Differentiation in Pancreatic Ductal Cells via STAT3-Dependent NGN3 Activation. *Cell Rep.* 2016 Apr 19;15(3):460-470. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.036.
- Cheng CW, Villani V, Buono R, Wei M, Kumar S, Yilmaz OH, et al. Fasting-Mimicking Diet Promotes Ngn3-Driven  $\beta$ -Cell Regeneration to Reverse Diabetes. *Cell.* 2017 Feb 23;168(5):775-788.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.040.
- Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I, Li WC, Toschi E, Jermendy A, et al. Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia.* 2011 Mar;54(3):583-93. doi: 10.1007/s00125-010-2026-z.
- Noso SKY, Kawabata Y, Babaya N, Hiromine Y, Kawasaki E, Awata T, et al. Association Study of MAFA and MAFB Genes Related to Organ-Specific Autoimmunity, with Susceptibility to Type-1 Diabetes in Japanese and Caucasian Populations. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2013;4:204. doi: 10.4172/2157-7412.1000204.
- Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014;32:1121-33. doi: 10.1038/nbt.3033.
- He KH, Juhl K, Karadimos M, El Khattabi I, Fitzpatrick C, Bonner-Weir S, et al. Differentiation of pancreatic endocrine progenitors reversibly blocked by premature induction of Mafa. *Dev Biol.* 2014 Jan 1;385(1):2-12. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.10.024.
- Zhu Z, Li QV, Lee K, Rosen BP, González F, Soh CL, et al. Genome Editing of Lineage Determinants in Human Pluripotent Stem Cells Reveals Mechanisms of Pancreatic Development and Diabetes. *Cell Stem Cell.* 2016 Jun 2;18(6):755-768. doi: 10.1016/j.stem.2016.03.015.

## Огляди

26. Churchill AJ, Gutiérrez GD, Singer RA, Lorberbaum DS, Fischer KA, Sussel L. Genetic evidence that Nkx2.2 acts primarily downstream of Neurog3 in pancreatic endocrine lineage development. *Elife*. 2017 Jan 10;6:e20010. doi: 10.7554/eLife.20010.
27. Bohuslavova R, Smolik O, Malfatti J, Berkova Z, Novakova Z, Saudek F, et al. NEUROD1 Is Required for the Early  $\alpha$  and  $\beta$  Endocrine Differentiation in the Pancreas. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 23;22(13):6713. doi: 10.3390/ijms22136713.
28. Bastidas-Ponce A, Scheibner K, Lickert H, Bakhti M. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. *Development*. 2017 Aug 15;144(16):2873-2888. doi: 10.1242/dev.140756.
29. Jennings RE, Scharfmann R, Staels W. Transcription factors that shape the mammalian pancreas. *Diabetologia*. 2020 Oct;63(10):1974-1980. doi: 10.1007/s00125-020-05161-0.
30. Romer AI, Singer RA, Sui L, Egli D, Sussel L. Murine Perinatal  $\beta$ -Cell Proliferation and the Differentiation of Human Stem Cell-Derived Insulin-Expressing Cells Require NEUROD1. *Diabetes*. 2019 Dec;68(12):2259-2271. doi: 10.2337/db19-0117.
31. Mastracci TL, Anderson KR, Papizan JB, Sussel L. Regulation of Neurod1 contributes to the lineage potential of Neurogenin3+ endocrine precursor cells in the pancreas. *PLoS Genet*. 2013;9(2):e1003278. doi: 10.1371/journal.pgen.1003278.
32. Sun ZY, Yu TY, Jiang FX, Wang W. Functional maturation of immature  $\beta$  cells: A roadblock for stem cell therapy for type 1 diabetes. *World J Stem Cells*. 2021 Mar 26;13(3):193-207. doi: 10.4252/wjsc.v13.i3.193.
33. Aigha II, Abdelalim EM. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic  $\beta$  cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Oct 29;11(1):459. doi: 10.1186/s13287-020-01977-0.
34. Kim KP, Han DW, Kim J, Schöler HR. Biological importance of OCT transcription factors in reprogramming and development. *Exp Mol Med*. 2021 Jun;53(6):1018-1028. doi: 10.1038/s12276-021-00637-4.
35. Malik V, Zimmer D, Jauch R. Diversity among POU transcription factors in chromatin recognition and cell fate reprogramming. *Cell Mol Life Sci*. 2018 May;75(9):1587-1612. doi: 10.1007/s00018-018-2748-5.
36. Tsunemoto R, Lee S, Szücs A, Chubukov P, Sokolova I, Blanchard JW, et al. Diverse reprogramming codes for neuronal identity. *Nature*. 2018 May;557(7705):375-380. doi: 10.1038/s41586-018-0103-5.
37. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
38. Tantin D. Oct transcription factors in development and stem cells: insights and mechanisms. *Development*. 2013 Jul;140(14):2857-66. doi: 10.1242/dev.095927.
39. Wu G, Schöler HR. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen*. 2014 Apr 29;3(1):7. doi: 10.1186/2045-9769-3-7.
40. Jerabek S, Ng CK, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Kim KP, Esch D, et al. Changing POU dimerization preferences converts Oct6 into a pluripotency inducer. *EMBO Rep*. 2017 Feb;18(2):319-333. doi: 10.15252/embr.201642958.
41. Malik V, Glaser LV, Zimmer D, Velychko S, Weng M, Holzner M, et al. Pluripotency reprogramming by competent and incompetent POU factors uncovers temporal dependency for Oct4 and Sox2. *Nat Commun*. 2019 Aug 2;10(1):3477. doi: 10.1038/s41467-019-11054-7.
42. An Z, Liu P, Zheng J, Si C, Li T, Chen Y, et al. Sox2 and Klf4 as the Functional Core in Pluripotency Induction without Exogenous Oct4. *Cell Rep*. 2019 Nov 12;29(7):1986-2000.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.026.
43. Velychko S, Kang K, Kim SM, Kwak TH, Kim KP, Park C, et al. Fusion of Reprogramming Factors Alters the Trajectory of Somatic Lineage Conversion. *Cell Rep*. 2019 Apr 2;27(1):30-39.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.023.
44. Kim KP, Choi J, Yoon J, Bruder JM, Shin B, Kim J, et al. Permissive epigenomes endow reprogramming competence to transcriptional regulators. *Nat Chem Biol*. 2021 Jan;17(1):47-56. doi: 10.1038/s41589-020-0618-6.
45. Kim KP, Wu Y, Yoon J, Adachi K, Wu G, Velychko S, et al. Reprogramming competence of OCT factors is determined by transactivation domains. *Sci Adv*. 2020 Sep 2;6(36):eaz7364. doi: 10.1126/sciadv.aaz7364.
46. Constable S, Lim JM, Vaidyanathan K, Wells L. O-GlcNAc transferase regulates transcriptional activity of human Oct4. *Glycobiology*. 2017 Oct 1;27(10):927-937. doi: 10.1093/glycob/cwx055.
47. Li S, Xiao F, Zhang J, Sun X, Wang H, Zeng Y, et al. Disruption of OCT4 Ubiquitination Increases OCT4 Protein Stability and ASH2L-B-Mediated H3K4 Methylation Promoting Pluripotency Acquisition. *Stem Cell Reports*. 2018 Oct 9;11(4):973-987. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.09.001.
48. Mai T, Markov GJ, Brady JJ, Palla A, Zeng H, Sebastiano V, et al. NKX3-1 is required for induced pluripotent stem cell reprogramming and can replace OCT4 in mouse and human iPSC induction. *Nat Cell Biol*. 2018 Aug;20(8):900-908. doi: 10.1038/s41556-018-0136-x.
49. Velychko S, Adachi K, Kim KP, Hou Y, MacCarthy CM, Wu G, et al. Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2019 Dec 5;25(6):737-753.e4. doi: 10.1016/j.stem.2019.10.002.
50. Shu J, Zhang K, Zhang M, Yao A, Shao S, Du F, et al. GATA family members as inducers for cellular reprogramming to pluripotency. *Cell Res*. 2015 Feb;25(2):169-80. doi: 10.1038/cr.2015.6.
51. Buganim Y, Markoulaki S, van Wietmarschen N, Hoke H, Wu T, Ganz K, et al. The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell*. 2014 Sep 4;15(3):295-309. doi: 10.1016/j.stem.2014.07.003.
52. Balzano F, Garroni G, Cruciani S, Bellu E, Dei Giudici S, Oggiano A, et al. Behavioral Changes in Stem-Cell Potency by HepG2-Exhausted Medium. *Cells*. 2020 Aug 12;9(8):1890. doi: 10.3390/cells9081890.
53. Ferhi S, Santaniello S, Zerizer S, Cruciani S, Fadda A, Sanna D, et al. Total Phenols from Grape Leaves Counteract Cell Proliferation and Modulate Apoptosis-Related Gene Expression in MCF-7 and HepG2 Human Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2019 Feb 10;24(3):612. doi: 10.3390/molecules24030612.
54. Franko A, Hartwig S, Kotzka J, Ruoß M, Nüssler AK, Königsrainer A, et al. Identification of the Secreted Proteins Originated from Primary Human Hepatocytes and HepG2 Cells. *Nutrients*. 2019 Aug 3;11(8):1795. doi: 10.3390/nu11081795.
55. Mudbhary R, Hoshida Y, Chernyavskaya Y, Jacob V, Villanueva A, Fiel MI, et al. UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2014 Feb 10;25(2):196-209. doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.003.
56. Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, Kos M, Zidar N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020 Mar;245(5):456-464. doi: 10.1177/1535370220905560.
57. Grskovic M, Chaivorapol C, Gaspar-Maia A, Li H, Ramalho-Santos M. Systematic identification of cis-regulatory sequences active in mouse and human embryonic stem cells. *PLoS Genet*. 2007 Aug;3(8):e145. doi: 10.1371/journal.pgen.0030145.
58. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog*. 2015 Sep;54(9):679-87. doi: 10.1002/mc.22340.
59. Mato Prado M, Frampton AE, Stebbing J, Krell J. Gene of the month: NANOG. *J Clin Pathol*. 2015 Oct;68(10):763-5. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203238.
60. Marucci L. Nanog Dynamics in Mouse Embryonic Stem Cells: Results from Systems Biology Approaches. *Stem Cells Int*. 2017;2017:7160419. doi: 10.1155/2017/7160419.
61. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*. 2017 May 5;611:27-37. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025.
62. Camacho-Vanegas O, Till J, Miranda-Lorenzo I, Ozturk B, Camacho SC, Martignetti JA. Shaking the family tree: identification of novel and biologically active alternatively spliced isoforms across the KLF family of transcription factors. *FASEB J*. 2013 Feb;27(2):432-6. doi: 10.1096/fj.12-220319.
63. Lv H, Zhang Z, Wang Y, Li C, Gong W, Wang X. MicroRNA-92a Promotes Colorectal Cancer Cell Growth and Migration by Inhibiting KLF4. *Oncol Res*. 2016;23(6):283-90. doi: 10.3727/096504016X14562725373833.
64. Jia ZM, Ai X, Teng JF, Wang YP, Wang BJ, Zhang X. p21 and CK2 interaction-mediated HDAC2 phosphorylation modulates KLF4 acetyl-

- ation to regulate bladder cancer cell proliferation. *Tumour Biol.* 2016 Jun;37(6):8293-304. doi: 10.1007/s13277-015-4618-1.
65. El-Karim EA, Hagos EG, Ghaleb AM, Yu B, Yang VW. Krüppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cancer.* 2013 Aug 6;12:89. doi: 10.1186/1476-4598-12-89.
66. Kuruvilla JG, Kim CK, Ghaleb AM, Bialkowska AB, Kuo CJ, Yang VW. Krüppel-like Factor 4 Modulates Development of BMI1(+) Intestinal Stem Cell-Derived Lineage Following  $\gamma$ -Radiation-Induced Gut Injury in Mice. *Stem Cell Reports.* 2016 Jun 14;6(6):815-824. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.04.014.
67. Wang B, Zhao MZ, Cui NP, Lin DD, Zhang AY, Qin Y, et al. Krüppel-like factor 4 induces apoptosis and inhibits tumorigenic progression in SK-BR-3 breast cancer cells. *FEBS Open Bio.* 2015 Mar 2;5:147-54. doi: 10.1016/j.fob.2015.02.003.
68. Fadous-Khalife MC, Aloulou N, Jalbout M, Hadchity J, Aftimos G, Paris F, et al. Krüppel-like factor 4: A new potential biomarker of lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2016 Jul;5(1):35-40. doi: 10.3892/mco.2016.883.

## Список скорочень:

**ПШЗ** — підшлункова залоза

**ЦД1** — цукровий діабет 1-го типу

**ЦД2** — цукровий діабет 2-го типу

**Ad** — аденовірус (Adenovirus)

**ESC** — ембріональні стовбурові клітини (Embryonic stem cells)

**GSIS** — секреція інсуліну, стимульована глюкозою (Glucose-stimulated insulin secretion)

**iPSC** — індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (Induced pluripotent stem cells)

**KLF4** — Krüppel-подібний фактор 4 (Krüppel-like factor 4)

**MAFA** — V-maf гомолог А онкогену м'язово-апоневротичної фібросаркоми (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A)

**NANOG** — скорочено від Tіg на nOg (ірл. Земля юних)

**NEUROD1** — нейронна диференціація 1 (Neuronal Differentiation 1)

**NEUROG3** — нейрогенін 3 (neurogenin 3)

**NKX6.1** — NK6 гомеобокс 1 (NK6 homeobox 1)

**OCT** — октамер-зв'язуючий транскрипційний фактор (octamer-binding transcription factor)

**PAX** — білок парного боксу (paired box gene)

**PDX1** — гомеобокс підшлункової залози та дванадцятипалої кишки 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1)

**POU** — Pit-OCT-Unc домен

**SC** — стовбурові клітини (stem cells)

**SOX** — транскрипційний фактор SRY-box (Transcription Factor SRY-box).

## Main transcription factors involved in the functioning of stem cells. Characteristics of their activation and expression in pancreatic $\beta$ -cells (Part 1)

**M.D. Tronko, V.M. Pushkarev, O.I. Kovzun, L.K. Sokolova, V.V. Pushkarev**

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**Abstract.** Cell transplantation is the most promising and physiological approach to the treatment of endocrine gland dysfunction.

The data obtained indicate the effectiveness of the use of stem cells (SC) for the treatment of a number of endocrine diseases and, first of all, type 1 diabetes. SC are cells with clonogenic potential that can self-repair and differentiate into different cell types. They are responsible for the regeneration and development of organs and tissues. SC offer many opportunities for regenerative medicine and serve as a promising model system for studying the early stages of human embryonic development. Numerous molecular mechanisms underlying SC self-repair and differentiation have been elucidated. The main signaling pathways involved in SC are JAK/STAT, Notch, MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B, Wnt, Hedgehog (Hh), TGF- $\beta$ , and Hippo, which mediate their action through numerous, specific to each transcription factors pathways. Analysis of their status and sequence of activation, suppression and interaction is very important in the context of SC functioning. A breakthrough in the generation of pluripotent cells from somatic cells was achieved through over-expression of specific transcription factors.

Both embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) differ in the ability to multiply in an undifferentiated state and differentiate into any cell type in the human body, which reflects their great therapeutic potential.

The development of protocols for differentiating of pluripotent cells to insulin-producing  $\beta$ -cells requires a clear understanding of the involvement and cross-talk of a number of cell signaling systems and transcription factors dependent on them. In the protocols for the development of  $\beta$ -cells from pluripotent cells, six stages using specific were established using specific inducing factors. To assess the progress and effectiveness of differentiation, specific markers are used.

**Keywords:** stem cells, signaling pathways, transcription factors.

**Для цитування:** Тронько МД, Пушкар'єв ВМ, Ковзун ОІ, Соколова ЛК, Пушкар'єв ВВ. Основні транскрипційні фактори, які беруть участь у функціонуванні стовбурових клітин. Особливості їх активації та експресії в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози (Частина 1). *Ендокринологія.* 2022;27(4):325-340. DOI: 0.31793/1680-1466.2022.27-4.325.

**Адреса для листування:** Пушкар'єв Володимир Михайлович; pushkarev.vm@gmail.com; ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, Київ 04114, Україна.

**Відомості про авторів:** Тронько Микола Дмитрович, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН України, акад. НАМН України, завідувач відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, директор Інституту, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Пушкар'єв Володимир Михайлович, д-р біол. наук, старш. наук. співроб., головний науковий співробітник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, ORCID: 0000-0003-0347-7771; Ковзун Олена Ігорівна, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАМН України, заступник директора Інституту з наукових питань, ORCID: 0000-0001-8164-7671; Соколова Любов Костянтинівна, д-р мед. наук, старш. наук. співроб., завідувачка відділу діабетології, ORCID: 0000-0003-0011-0106; Пушкар'єв Віктор Володимирович, канд. біол. наук, старш. наук. співроб. відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, ORCID: 0000-0001-5940-5510.

## Огляди

**Особистий внесок:** Тронько М.Д. — ідея роботи й консультації під час редагування статті; Пушкарьов В.М., Ковзун О.І. і Соколова Л.К. — аналіз літератури та редагування тексту; Пушкарьов В.В. — оформлення статті та переклад.

**Фінансування:** стаття підготовлена в рамках бюджетного фінансування Національної академії медичних наук України.

**Декларація з етики:** автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

**Стаття:** надійшла до редакції 01.12.2022 р.; перероблена 15.12.2022 р.; прийнята до друку 16.12.2022 р.; надрукована 30.12.2022 р.

**For citation:** Tronko MD, Pushkarev VM, Kovzun OI, Sokolova LK, Pushkarev VV. Main transcription factors involved in the functioning of stem cells. Characteristics of their activation and expression in  $\beta$ -cells of the pancreas (Part 1). *Endokrynologia*. 2022;27(4):325-340. DOI: 0.31793/1680-1466.2022.27-4.325.

**Correspondence address:** Pushkarev Volodymyr Mykhaylovych; pushkarev.vm@gmail.com; State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine», 69, Vyshgorodska Str., Kyiv 04114, Ukraine.

**Information about the authors:** Tronko Mykola Dmytrovych, Dr. Sci. (Medicine), Cor. Member of the NAS of Ukraine, Acad. of the

NAMS of Ukraine, Head of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, Director of the Institute, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Pushkarev Volodymyr Mykhaylovych, Dr. Sci. (Biology), Senior Research Fellow, Chief Researcher of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, ORCID: 0000-0003-0347-7771; Kovzun Olena Ihorivna, Dr. Sci. (Biology), Prof., Cor. Member of the NAMS of Ukraine, Deputy Director of the Institute for Scientific Affairs, ORCID: 0000-0001-8164-7671; Sokolova Liubov Kostyantynivna, Dr. Sci. (Medicine), Senior Research Fellow, Head of Diabetology Department, ORCID: 0000-0003-0011-0106; Pushkarev Viktor Volodymyrovych, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, ORCID: 0000-0001-5940-5510.

**Personal contribution:** Tronko M.D. — the idea of work and advice when editing an article; Kovzun O.I., Sokolova L.K. and Pushkarev V.M. — analysis of literature sources and text writing, and editing; Pushkarev V.V. — article design and translation.

**Funding:** the article was prepared within the budget funding of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

**Declaration of ethics:** the authors declared the absence of a conflict of interest and financial obligations.

**Article:** received December 01, 2022; revised December 15, 2022; accepted December 16, 2022; published December 30, 2022.