

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Petra Křtěnová**

Kontrola genové exprese vedoucí k pluripotenci buněk  
*Control of gene expression regarding cell pluripotency*

**Bakalářská práce**

Vedoucí závěrečné práce:  
**RNDr. Ing. Vladimír Krylov Ph.D.**

Praha, 2015

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi za cenné rady během psaní mé bakalářské práce, trpělivost a vstřícnost.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.5.2015

Podpis

## Abstrakt

Od derivace embryonálních kmenových buněk (ESC - embryonic stem cells) z myši blastocysty uběhlo více než 30 let, během kterých se tyto buňky staly předmětem zájmu mnoha výzkumných týmů. Hlavním důvodem studia ESC je jejich schopnost diferenciaci do téměř všech buněčných typů. Tato vlastnost se označuje jako pluripotence. Pluripotentní stav je v buňkách udržován prostřednictvím kontroly genové exprese. Pro zachování nediferencovaného stavu ESC je třeba reprimovat diferenciací geny. Tento proces je řízen především pluripotentními transkripčními faktory, z nichž nejdůležitější jsou OCT4, SOX2 a NANOG. Na umlčení diferenciací genů mají vliv také chromatin remodelující komplexy. Regulace genové exprese vedoucí k pluripotenci ale probíhá i na posttranskripční úrovni prostřednictvím miRNA, lncRNA, hnRNP nebo proteinů stabilizujících pluripotentní faktory a znemožňujících jejich degradaci. Cílem této práce je shrnout mechanismy, které vedou v ESC k udržení pluripotence.

**Klíčová slova:** pluripotence, embryonální kmenové buňky (ESC), sebeobnova, genová exprese, OCT4, SOX2, NANOG

## Abstract

ESCs have been of interest to many research teams since their derivation from the mouse blastocyst 30 years ago. The main reason for studying ESCs is their ability to differentiate into almost all cell types. This feature is known as “pluripotency”. The pluripotent state in ESCs is maintained by the control of the gene expression. To maintain their undifferentiated state it is necessary to repress the differentiation genes. This process is controlled primarily by pluripotent transcriptional factors, especially by OCT4, SOX2 and NANOG. Silencing of the differentiation genes is also influenced by the chromatin remodelling complexes. The regulation of the gene expression leading to the cell pluripotency also takes place at the post-transcriptional level via miRNA, lncRNA, hnRNPs or proteins which stabilize pluripotent factors and protect them from degradation. The aim of this thesis is to summarize mechanisms by which pluripotency is maintained in ESC.

**Key words:** pluripotency, embryonic stem cells (ESCs), selfrenewal, gene expression, OCT4, SOX2, NANOG

# Obsah

<i>Seznam zkratek</i> .....	<b>1</b>
<i>Úvod</i> .....	<b>2</b>
<b>1. Regulace na úrovni transkripce</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Centrální transkripční faktory</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. OCT4 .....	3
1.1.2. NANOG .....	5
1.1.3. SOX2 .....	6
<b>1.2. Další transkripční faktory účastníci se pluripotence</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. KLF .....	7
1.2.2. REX1 .....	8
1.2.3. SALL4 .....	8
1.2.4. MYC .....	9
1.2.5. ZFP206 .....	9
1.2.6. Jaderné receptory .....	9
<b>1.3. Chromatin remodelující komplexy a histonové modifikace</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4. Externí signály</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Posttranskripční regulace</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1. miRNA a lncRNA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2. Proteiny účastníci se posttranskripční regulace</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Regulační síť vedoucí k pluripotenci</b> .....	<b>17</b>
<i>Závěr</i> .....	<b>21</b>
<i>Seznam použité literatury</i> .....	<b>22</b>

## Seznam zkratk

BMP4	kostní morfogenetický protein 4 ( <b>B</b> one <b>M</b> orphogenetic <b>P</b> rotein <b>4</b> )
ESRRB	<b>E</b> strogen <b>R</b> elated <b>R</b> eceptor <b>B</b> eta
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor ( <b>b</b> asic <b>F</b> ibroblast <b>G</b> rowth <b>F</b> actor)
hESC	lidské embryonální kmenové buňky ( <b>h</b> uman <b>E</b> mryonic <b>S</b> tem <b>C</b> ells)
hnRNPs	heterogenní jaderné ribonukleoproteinové částice ( <b>h</b> eterogenous <b>n</b> uclear <b>R</b> ibo <b>N</b> ucleo <b>P</b> roteins)
HSP90	protein teplotního šoku ( <b>H</b> eat <b>S</b> hock <b>P</b> rotein <b>90</b> )
IGF	inzulinu podobný růstový faktor ( <b>I</b> nsulin-like <b>G</b> rowth <b>F</b> actor)
LIF	leukemický inhibiční faktor ( <b>L</b> eukemia <b>I</b> nhibitory <b>F</b> actor)
lincRNA	dlouhé intergenové nekódující RNA ( <b>l</b> ong <b>i</b> ntergenic <b>n</b> on-coding <b>R</b> NAs)
lncRNA	dlouhé nekódující RNA ( <b>l</b> ong <b>n</b> on-coding <b>R</b> NAs)
MEF	myší embryonální fibroblasty ( <b>M</b> ouse <b>E</b> mryonic <b>F</b> ibroblasts)
mESC	myší embryonální kmenové buňky ( <b>m</b> ouse <b>E</b> mryonic <b>S</b> tem <b>C</b> ells)
miRNA	<b>m</b> icro <b>R</b> NA
shRNA	malá vlásenková RNA ( <b>s</b> hort <b>h</b> airpin <b>R</b> NA)
siRNA	malá interferující RNA ( <b>s</b> mall <b>i</b> nterfering <b>R</b> NA)
Tet-off systém	<b>T</b> etracyklin- <b>o</b> ff <b>s</b> ystém

## Úvod

Pluripotencí označujeme schopnost buněk diferencovat do všech buněčných typů kromě trofoblastu. Tato schopnost je typická pro embryonální kmenové buňky pocházející z vnitřní buněčné masy embrya ve stadiu blastocysty. Důležitou vlastností embryonálních kmenových buněk je také schopnost sebeobnovy.

Pluripotentní buňky lze uměle připravit i z diferencovaných prekurzorů reprogramováním prostřednictvím 4 transkripčních faktorů: OCT3/4, SOX2, C-MYC a KLF4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Takto vytvořené buňky se označují jako indukované pluripotentní buňky iPS (induced pluripotent stem) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Jejich pluripotentní potenciál je oproti ESC omezený, protože je u nich zachována transkripce určitých genů, specifických pro diferenciační typ dárcovských buněk (Polo et al., 2010).

Hlavními modely pro studium pluripotence buněk jsou myší a lidské embryonální kmenové buňky (mESCs – z anglického mouse embryonic stem cells, resp. hESCs – human embryonic stem cells). Tyto buněčné linie byly poprvé připraveny z myších a lidských blastocyst v roce 1981 a 1998 (Evans & Kaufman 1981; Thomson 1998). mESC a hESC jsou taktéž předmětem předkládané bakalářské práce. Pluripotence je zde udržována prostřednictvím složité regulační sítě transkripčních faktorů a dalších epigenetických procesů. Schopnost diferenciace pluripotentních buněk do většiny typů tkání představuje velký potenciál v regenerativní medicíně. Z tohoto důvodu je studium epigenetických procesů a regulačních sítí vedoucích k pluripotenci předmětem zájmu značné části laboratoří po celém světě. Cílem této práce je shrnout hlavní poznatky o regulaci genové exprese vedoucí k pluripotenci u embryonálních kmenových buněk.

## 1. Regulace na úrovni transkripce

Na udržení pluripotentního charakteru buněk se podílejí zejména transkripční faktory a chromatin remodelující komplexy regulující genovou expresi na úrovni transkripce. V následujících podkapitolách se budu zabývat jednotlivými transkripčními faktory, histonovými modifikacemi a změnou struktury chromatinu vedoucí k udržení pluripotence v buňkách.

### 1.1. Centrální transkripční faktory

Pluripotence je v ESC udržována prostřednictvím komplexní regulační sítě, v jejímž centru jsou transkripční faktory OCT4, NANOG a SOX2. Tyto proteiny byly mnoha studiemi prokázány jako hlavní regulátory pluripotence. Jejich dysregulace vede k diferenciaci ESC a ztrátě pluripotentního stavu. (Niwa et al. 2000; Mitsui et al. 2003; Boyer et al. 2005; Masui et al. 2007). Centrální transkripční faktory jsou kromě vzájemných interakcí asociovány s obrovským množstvím dalších genů, které jimi mohou být reprimovány (diferenciační geny) nebo aktivovány (s pluripotencí spojené geny) (shrnuté v Orkin 2005).

#### 1.1.1. OCT4

OCT4 je DNA vazebný protein z POU rodiny transkripčních faktorů, jehož exprese je typická pro ESC, primordiální zárodečné buňky a neoplozené oocyty (Schöler et al. 1989; Rosner et al. 1990). Řada studií prokázala, že OCT4 je nezbytný pro udržení pluripotence (Nichols et al. 1998; Hay et al. 2004; Matin et al. 2004). OCT4 deficientní myší embrya byla sice schopná vytvořit blastocystu, ale jejich vnitřní buněčná masa nebyla pluripotentní (Nichols et al. 1998). Podobný výsledek poskytuje i OCT4 knockdown prostřednictvím siRNA. U takto ošetřených buněk dochází ke spontánní diferenciaci do trofoblastu. (Hay et al., 2004).

Zajímavostí je, že k diferenciaci mESC a hESC dochází jak v rámci snížení exprese *Oct4*, tak i při jeho overexpresi. Dále pak, zvýšení exprese *Oct4* má za následek diferenciaci ESC do mesodermu a entodermu (Niwa et al., 2000).

Stejně jako přibližně polovina proteinů z rodiny POU transkripčních faktorů, i OCT4 se váže na osmi-nukleotidovou sekvenci v DNA ATGC(A/T)AAT (Tantin, 2013). Tým Y.Babaie zjistil, že v hESC OCT4 ovlivňuje transkripci více jak 1000 genů účastnících se diferenciaci, epigenetických procesů, apoptózy, remodelace chromatinu, extracelulárních

signalizačních drah, metabolismu a udržení pluripotence. Některé z nich jsou ovlivňovány přímo, jiné nepřímo prostřednictvím dalších centrálních faktorů pluripotence jako např. NANOG a SOX2. OCT4 knockdown pomocí siRNA snížil expresi *Sox2*, *Nanog* a dalších genů jako např. *Lefty1*, *Lefty2*, *Tdgf1*, *Dnmt3b* a *Zfp42*. Naopak zvýšení exprese bylo pozorováno u genů *Eomes* a *Bmp4* (Babaie et al., 2007). Aktivace těchto genů v hESC vede k diferenciaci trofoektodermu (Xu et al., 2002; Niwa et al., 2005). BMP4 indukuje diferenciaci i u myších embryí, ale *in vitro* přítomný v médiu je pro mESC hlavním proteinem podílejícím se na udržení pluripotentního stavu (Ying et al., 2003; shrnuto v O'Shea, 2004). Novější studie z roku 2014 se zaměřila na protein P53, který je OCT4 faktorem v rámci ESC inhibován pomocí aktivace transkripce *Sirt1* deacetylázy (Zhang et al., 2014). Aktivní P53 vede ESC k diferenciaci (Lin et al., 2005). SIRT1 však zabraňuje acetylaci P53 a udržuje ho tak v neaktivním stavu (Gu and Roeder 1997; Jain et al. 2012). Represivní účinek má OCT4 i na trofoektodermální marker CDX2, který je zároveň OCT4 inhibítorem (Niwa et al., 2005). Podobné výzkumy zaměřené na geny ovlivněné transkripčním faktorem OCT4 byly opakovaně provedeny i v minulosti (Boyer et al. 2005; Loh et al. 2006). Ačkoli tyto výzkumy naznačují, že OCT4 se chová jako aktivátor genů udržujících pluripotenci i jako represor genů vedoucích k diferenciaci, studie F. Hamachiho a jeho kolegů se s výsledky těchto výzkumů neshodovala. F. Hamachi a jeho tým testovali schopnost OCT4 reprimovat nebo aktivovat geny pomocí dvou speciálně upravených proteinů. Kromě OCT4 DNA vazebné domény, kterou obsahovaly oba proteiny, obsahoval jeden z nich transkripčně aktivační doménu a druhý transkripčně represivní doménu. Protein s transkripčně aktivační doménou byl schopen mESC udržet pluripotentní, ale protein s represorovou doménou nikoliv (Hamachi et al., 2012). Autoři studie se proto domnívají, že OCT4 funguje pouze jako aktivátor genů udržujících buňku v nediferencovaném stavu.

Samotný OCT4 transkripční faktor je ovlivněn mnoha proteiny a je schopen regulovat i sám sebe (Chew et al., 2005). Mezi proteiny v nedávné době spojovanými s udržením pluripotence je i např. protein SURVIVIN, jehož inhibice vedla ke snížení OCT4 a NANOG mRNA v hESC, což nasvědčuje tomu, že se může jednat o další významný protein ovlivňující pluripotenci (Mull et al., 2014). Hlavní interakční partneři OCT4 budou zmíněny i v následujících kapitolách.



### 1.1.2. NANOG

NANOG je homeoprotein exprimovaný v ESC, primordiálních zárodečných buňkách a vnitřní buněčné masy embrya. V ESC se vyskytuje hlavně ve formě dimerů, které jsou nutné pro interakce s ostatními pluripotentními faktory (Wang et al., 2008).

Díky roli v udržení pluripotence dostal NANOG své jméno, podle keltské mytologické země věčného mládí, Tir nan Og (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003). NANOG deficientní mESC, vzniklé narušením genu *Nanog*, exprimovaly ve zvýšené míře transkripční faktory GATA4 a GATA6 a také se u nich výrazně snížila hladina OCT4 a REX1, což je další pluripotentní marker (Mitsui et al., 2003). GATA6 a GATA4 byly dříve prokázány jako transkripční faktory vedoucí k diferenciaci ESC do entodermu (Fujikura, 2002). Skutečnost, že *Gata6* enhancer obsahuje místo rozpoznávané faktorem NANOG, nasvědčuje tomu, že NANOG může udržovat buňky v nediferencovaném stavu právě represí *Gata6* (Mitsui et al., 2003). Snížení exprese *Nanog* tedy vede k diferenciaci, ale na rozdíl od *Oct4*, zvýšení jeho exprese diferenciaci brání a to jak u mESC tak u hESC (Chambers et al. 2003; Darr, Mayshar, and Benvenisty 2006).

NANOG podobně jako OCT4 interaguje s velkým množstvím proteinů. Oproti OCT4 je však toto množství mnohem menší. V roce 2013 A. Gagliardi a jeho tým rozšířili soubor proteinů, které interagují s NANOG na přibližně 130. Jedná se jak o transkripční faktory, tak i o chromatin remodelující komplexy, proteiny účastnící se ubiquitinace, fosforylace, úprav RNA a mnohé další (Gagliardi et al., 2013).

Výzkum I. Chamberse a jeho kolegů z roku 2003 ukázal, že pro expresi *Nanog* není esenciální přítomnost OCT4, ale bez OCT4 není NANOG schopný buňku udržet v nediferencovaném stavu (Chambers et al., 2003). Novější studie z roku 2005 ale zjistily, že exprese *Nanog* je nejvíce regulována právě OCT4 transkripčním faktorem v komplexu se SOX2 (Rodda et al. 2005; Kuroda et al. 2005). OCT4 se SOX2 se váží do cis regulační oblasti v proximálním promotoru *Nanog*, a tím pozitivně ovlivňují jeho expresi (Rodda et al., 2005).

Stejně jako na *Oct4* i na *Nanog* působí mnoho dalších proteinů, z nichž některé jej ovlivňují pozitivně a některé negativně. Mezi typické aktivátory *Nanog* patří KLF4, ZIC3, ESRRB a nebo již zmíněné OCT4 a SOX2 (Rodda et al. 2005; van den Berg et al. 2008; P. Zhang et al. 2010, Lim et al. 2010). Mezi jeho represory patří např. proteiny P53, CDX2 nebo ZFP281. (Lin et al. 2005; Chen et al. 2009; Fidalgo et al. 2011). CDX2 a NANOG se inhibují vzájemně (Chen et al., 2009). Nejasnou roli v regulaci *Nanog* hraje faktor TBX3. H. Niwa a

jeho tým považují TBX3 za možný aktivátor *Nanog*, kdežto výsledky novější studie dokazují spíše jeho represivní vliv (Hitoshi Niwa et al. 2009; Zhao, Wu, and Chen 2014).

### 1.1.3. SOX2

SOX2 je DNA vazebný protein patřící do rodiny transkripčních faktorů SOX poprvé objevených v roce 1990. Na DNA se tyto faktory váží pomocí své HMG vazebné domény (Sinclair et al., 1990). V embryu začíná být *Sox2* exprimován ve stádiu moruly a v blastocystě je jeho exprese koncentrována především do vnitřní buněčné masy (Avilion et al., 2003).

Jak ukázal výzkum N. Ivanové a jejího týmu, SOX2 je důležitý pro udržení buňky v nediferencovaném stavu. Brání buňkám v diferenciaci do trofoektodermu a do tkání odvozených z epiblastu (Ivanova et al., 2006). O rok později prokázali totéž i S.Masui a jeho kolegové, když vytvořili buněčnou linii s indukovatelnou represí genové exprese *Sox2*, tzv. Tet-off systém. Po přidání tetracyklinu k buňkám došlo k zastavení genové exprese *Sox2* a buňky po 72 hodinách diferencovaly do trofoektodermu (Masui et al., 2007).

Snížení hladiny SOX2 v hESC pomocí siRNA také vedlo k významnému snížení ostatních centrálních pluripotentních faktorů. Hladina SOX2 zredukována na 16 % jeho normální koncentrace způsobila snížení hladiny OCT4 na 14 % a NANOG na 18 % jejich původní koncentrace. Stejně tak, pokud byla snížena hladina OCT4, snížila se i hladina SOX2 o 86 % a redukce NANOG způsobila 82% redukci SOX2 (Fong et al., 2008). Tyto výsledky dokazují provázanost SOX2 s ostatními centrálními pluripotentními faktory. Důkazy o spolupráci SOX2 s OCT4 však byly zveřejněny i v roce 2005, kdy se ukázalo, že SOX2 a OCT4 spolu v komplexu pozitivně ovlivňují svojí vlastní expresi (Chew et al., 2005). SOX2 ale ovlivňuje sám sebe i negativně přes signalizaci Akt dráhy (Ormsbee Golden et al., 2013).

SOX2 knockdown však neovlivnil pouze centrální transkripční faktory, ale pozorovány byly i změny v koncentracích mnoha jiných proteinů. Výrazně byly sníženy koncentrace transkripčních faktorů např. STAT3, SALL4, ZIC3, chromatin remodelujících komplexů nebo proteinů účastnících se senescence (Fong et al., 2008). O 4 roky později Z. Gao a jeho tým identifikoval 70 proteinů interagujících se SOX2. Jednalo se jak o známé proteiny účastnící se pluripotence, tak i proteiny důležité pro diferenciaci. Přibližně 25 % těchto interakčních partnerů SOX2 bylo zároveň interakčními partnery i OCT4 (Gao et al., 2012). Množství proteinů interagujících se SOX2 je ale mnohem větší (Boyer et al., 2005).

Na druhou stranu se zdá že SOX2 nejspíše není ten nejdůležitější faktor pro udržení buněk v pluripotentním stavu. Pokud v buňkách s reprimovaným genem *Sox2* byla navozena

overexpresi *Oct4*, buňky byly schopny si zachovat svůj pluripotentní fenotyp a k diferenciaci nedošlo (Masui et al., 2007). SOX2 tedy pravděpodobně udržuje pluripotenci v buňkách pomocí pozitivní regulace *Oct4*.

Stejně jako pro OCT4 i pro SOX2 platí, že pluripotenci je schopen udržet pouze ve správné koncentraci. Zvýšení exprese *Sox2* vede k diferenciaci stejně jako jeho snížení. mESC se zvýšenou hladinou SOX2 začaly diferencovat do mnoha typů buněk, neuroektodermu, mesodermu nebo trofoektodermu (Kopp et al., 2008). Zvýšená exprese *Sox2* vede k diferenciaci i u hESC (Adachi et al., 2010).

## **1.2. Další transkripční faktory účastníci se pluripotence**

Na udržení pluripotence se nepodílí pouze centrální transkripční faktory, ale i další proteiny (J. Wang et al. 2006; Wu et al. 2006; Z.-X. Wang et al. 2007; Varlakhanova et al. 2010; P. Zhang et al. 2010). Ty většinou podporují expresi centrálních transkripčních faktorů a tím zabraňují diferenciaci (Jiang et al. 2008; Z.-X. Wang, Teh, et al. 2007).

### **1.2.1. KLF**

KLF jsou transkripční faktory se zinc finger DNA vazebnou doménou (Schuh et al., 1986). Bylo prokázáno, že tyto faktory mají roli např. v regulaci apoptózy, buněčného cyklu nebo proliferace (shrnutí v McConnell et al. 2007). Kromě těchto funkcí, se ale KLF faktory účastní také udržení pluripotence. Významnou roli hrají hlavně KLF2, KLF4 a KLF5, kteří se váží v blízkosti enhanceru pro *Nanog* a ovlivňují tak jeho expresi. Zablokování exprese jednoho z těchto faktorů pomocí RNA interference v mESC nevedlo k narušení pluripotence, ale blokáce všech těchto faktorů vedla k diferenciaci buněk (Jiang et al., 2008). Ačkoli tyto výsledky naznačují, že ztráta jednoho KLF faktoru může být kompenzována ostatními KLF faktory, dlouhodobá absence KLF4 vede k diferenciaci i při současné expresi ostatních *Klf* (Zhang et al., 2010). Speciální roli KLF4 dokazuje také to, že patří mezi faktory schopné reprogramovat somatické buňky na buňky pluripotentní (Takahashi and Yamanaka, 2006). KLF faktory interagují také se SOX2 a OCT4 a ovlivněny jsou i extracelulárními signály (Zhang et al., 2010). KLF4 dokonce pozitivně ovlivňuje svojí vlastní expresi (Mahatan et al., 1999).

### 1.2.2. REX1

REX1 je díky svému výskytu v ESC, vnitřní buněčné mase blastocysty, trofoblastu a spermatocytech považován za typický marker pluripotence (Rogers et al., 1991). Ačkoli se podílí na udržení buněk v nediferencovaném stavu, u mESC není pro udržení pluripotence nezbytný (Masui et al., 2008). REX1 deficientní buňky byly pouze více citlivé na přítomnost kyseliny retinové, která je schopná, po přidání do média, indukovat u ESC diferenciaci. (shrnutí v Rohwedel, Guan, and Wobus 1999; Scotland et al. 2009). Jinak je tomu ale u hESC, u kterých REX1 hraje mnohem větší roli než jen roli pluripotentního markeru. REX1 se ukázal být nezbytným pro proliferaci a přežívání hESC. Jeho knockdown způsobil u buněk poškození DNA, apoptózu a zastavení v G2 fázi buněčného cyklu, což mělo negativní vliv i na pluripotenci (Son et al., 2013). Hlavním aktivátorem *Rex1* je NANOG, který se váže na jeho promotor. NANOG knockdown v ESC způsobil také výrazné snížení REX1 a naopak indukce *Nanog* v buňkách normálně exprimujících pouze malé množství REX1 vedla ke zvýšení hladiny tohoto proteinu. Na promotor *Rex1* se mohou vázat také ostatní centrální pluripotentní faktory OCT4 a SOX2. SOX2 ale dokázal expresi *Rex1* po předchozí aktivaci faktorem NANOG ještě zvýšit, což naznačuje, že SOX2 je spolu s NANOG hlavním regulátorem *Rex1* (Shi et al., 2006).

### 1.2.3. SALL4

SALL4 je protein s mnoha zinc finger DNA vazebnými doménami patřící do genové rodiny Spalt (Sall) poprvé objevené u rodu *Drosophila* (Kühnlein et al., 1994). Studie z roku 2006 upozornila na možnou spojitost mezi SALL4 a udržením pluripotence. Pokles hladiny SALL4 u mESC vedl ke snížení exprese *Oct4* a následné diferenciaci (Zhang et al., 2006). V rozporu s tímto výzkumem je však novější studie z roku 2009, která neprokázala, že by delece SALL4 vedla k diferenciaci. mESC byly schopny udržovat expresi *Oct4* i bez jeho přítomnosti. Absence SALL4 však zvýšila hladinu trofoektodermálního markeru CDX2, pokud byly mESC kultivovány v médiu bez podpůrných buněk. SALL4 tudíž nehraje v udržení pluripotence nejdůležitější roli, ale spíše stabilizuje ESC (Yuri et al., 2009). Rozdílné výsledky obou studií jsou pravděpodobně způsobeny odlišnými metodami použitými v experimentech. První skupina použila pro SALL4 knockdown metodu RNA interference s využitím shRNA, druhý tým využil techniku Cre-Lox rekombinace a cílil tak přímo na gen *Sall4* (J. Zhang et al. 2006; Yuri et al. 2009). Yuri a jeho tým se domnívají, že shRNA mohla způsobit knockdown i jiných genů a tím vést k diferenciaci buněk (Yuri et al.,

2009). SALL4 se také podílí na regulaci jiných genů spojených s pluripotencí nebo diferenciací. N. Tanimura, M.Saito, M. Ebisuya objevili, že SALL4 se může vázat na promotory až 3068 genů, z toho 917 je společných jak pro SALL4, tak i pro SOX2. Do genů, které SALL4 ovlivňuje, patří i *Oct4*, *Sox2* a *Nanog*, čemuž nasvědčují snížené hladiny těchto faktorů při SALL4 knockdownu (Tanimura et al., 2013).

#### **1.2.4. MYC**

C-MYC a N-MYC jsou proteiny s DNA vazebnou doménou složenou z bazického helix-loop-helix elementu a ze dvou leucine-zipper elementů (shrnuto v Lüscher and Larsson 1999). C-MYC je jedním z faktorů, který dokáže reprogramovat somatické buňky na buňky pluripotentní (Takahashi and Yamanaka, 2006), ale významnou roli má i spolu s N-MYCeM v udržení pluripotence ESC. mESC s výrazně sníženou hladinou MYCu exprimovaly diferenciační markery GATA6 a BMP4. Hladiny dalších transkripčních faktorů jako NANOG, REX-1 a OCT4 ale zůstaly nezměněny (Varlakhanova et al., 2010). MYC regulují v ESC celou řadu procesů, např. buněčný cyklus nebo remodelaci chromatinu (C.-H. Lin et al. 2009; Varlakhanova et al. 2010). Pro udržení pluripotence je však opět nutná správná hladina MYC, kterou v ESC pomáhá udržovat např. TRIM6. Ten způsobuje jeho ubiquitinaci a funguje jako jeho negativní regulátor (Sato et al., 2012).

#### **1.2.5. ZFP206**

ZFP206 je transkripční faktor exprimovaný v ESC a v buňkách embrya. Z tkání dospělého těla ho lze nalézt ve varlatech. ZFP206 může být složen až ze 14 zinc finger motivů, váže se na DNA a zvyšuje expresi *Oct4*, *Nanog* i sám sebe. Blokace exprese *Zfp206* nevedla u ESC k diferenciaci, ale došlo ke snížení hladin OCT4, SOX2, NANOG, ESRRB a dalších pluripotentních markerů, takže buňky byly k diferenciaci náchylnější (Wang et al., 2007a). Genomové mapování odhalilo přes 3000 genů, které může ZFP206 regulovat, přičemž některé z nich jsou regulovány i SOX2 a OCT4, což dokazuje propojenost ZFP206 s centrální pluripotentní sítí (Yu et al., 2009).

#### **1.2.6. Jaderné receptory**

Do regulace pluripotence jsou zapojeny i jaderné receptory neboli transkripční faktory aktivované ligandem. Patří sem např. receptory ESRRB, DAX1 nebo LRH-1 (X. Zhang et al.

2008; Sun et al. 2009; Kelly et al. 2010). ESRRB funguje jako aktivátor transkripce *Oct4* a *Nanog* (Zhang et al. 2008; van den Berg et al. 2008). Jeho knockdown vedl u mESC k diferenciaci (Ivanova et al., 2006).

S ESRRB interaguje další jaderný receptor DAX1, který funguje jako jeho negativní regulátor (Uranishi et al., 2013). DAX1 reprimuje i geny vedoucí k diferenciaci, čímž významně přispívá k udržení pluripotence (Khalfallah et al., 2009). Důležitou úlohou DAX1 je i regulace hladiny OCT4. Samotný DAX1 *Oct4* reprimuje, v komplexu s aktivátorem SRA a jaderným receptorem LRH-1 však aktivuje jeho transkripci (Sun et al. 2009; Kelly et al. 2010). Komplex DAX1 LRH1 se kromě *Oct4* váže až na 288 genů (Kelly et al., 2010).

DAX1 je pozitivně regulován faktory LRH-1 a NANOG. LRH-1 se váže na *Dax1* promotor, NANOG na jeho intron (Kelly and Hammer, 2011). Pozitivním regulátorem *Dax1* je i koaktivátor NCOA3, který aktivuje také *Esrrb*, *Klf4* a *Nanog*, čímž podporuje pluripotentní stav buněk (Percharde et al. 2012; Chitilian et al. 2014).

V současné době se výzkumy zaměřené na pluripotenci buněk soustředily především na identifikaci dalších prvků regulační sítě vedoucí k pluripotenci. To vedlo k odhalení několika dalších proteinů a rozšíření skupiny pluripotentních faktorů. Jedním z těchto proteinů je např. B-MYB, který interaguje s centrálními transkripčními faktory a epigenetickými regulátory. Jeho knockdown způsobil v mESC snížení hladiny OCT4, SOX2 a NANOG (Zhan et al., 2012). Do souvislosti se sebeobnovou ESC se dává i ZFX, který je důležitý pro propagaci myších, ale i lidských ESC. Kolonie hESC po ZFX knockdownu pomocí shRNA rostly podstatně hůře (Galan-Caridad et al. 2007; Harel et al. 2012). Pro růst mESC je důležitý také transkripční faktor RONIN. Buňky s deletovaným genem pro tento faktor nebyly schopny přežít v *in vitro* i v *in vivo* podmínkách (Dejosez et al., 2008). Dalším faktorem s rolí v udržení pluripotence je i FOXP1. V hESC je transkript *Foxp1* genu specificky sestříhán tak, že vzniká varianta proteinu důležitá pro represi diferenciačních genů a aktivaci centrálních pluripotentních faktorů (Gabut et al., 2011).

### **1.3. Chromatin remodelující komplexy a histonové modifikace**

Aby geny, jejichž produkty udržují buňky v pluripotentním stavu, mohly být transkribovány, musí být RNA polymeráze a dalším proteinům umožněn přístup k těmto genům. Tento přístup je závislý na struktuře chromatinu. DNA pevně navázaná na histonech

je pro polymerázu a další proteiny účastníci se transkripce téměř nedostupná. Modifikací histonů je však možné docílit slabé vazby DNA na histony a tím aktivaci transkripce, nebo naopak silné vazby DNA na histony a tím její represi. Aktivaci nebo represi genové exprese provádějí také ATP závislé chromatin remodelující komplexy, které umí např. posunout nukleozóm po DNA. To vede k odhalení některých genů pro transkripční aparát, a naopak zakrytí genů jiných.

Jedním z ATP závislých chromatin remodelujících komplexů je SWI/SNF komplex. B. Kidder, S.Palmer a J.Knott zjistili, že velmi důležitou roli v udržení pluripotence hraje protein BRG1, který funguje jako katalytické jádro komplexu SWI/SNF-BRG1. Umlčení genu *Brg1* vedlo u mESC k zvýšení hladiny diferenciačních markerů a snížení hladiny pluripotentních faktorů (Kidder et al., 2009). Skutečnost, že knockdown BRG1 vede k diferenciaci, potvrdila i studie z roku 2014. Snížení hladiny BRG1, ale vedlo zpočátku ke zvýšení hladiny NANOG a OCT4 a snížení pouze hladiny SOX2. Po delší době však došlo i k poklesu hladiny OCT4. To naznačuje, že BRG1 pomáhá vyladit koncentrace centrálních faktorů tak, aby si buňka udržela pluripotentní stav (Singhal et al., 2014). K SWI/SNF komplexům patří také komplex INO80. Ten se váže na promotory genů jako je *Nanog*, *Sox2* a *Oct4*, rozvolňuje chromatin a umožňuje navázání RNA polymerázy a dalších proteinů důležitých k transkripci těchto genů (Wang et al., 2014).

V roce 2006 B.Bernstein a jeho tým odhalil, že v ESC jsou obzvláště významné metylace na lysinu 27 a 4 histonu H3 (Bernstein et al., 2006). Trimetylace lysinu 27 vede obecně k represi transkripce a trimetylace lysinu 4 naopak k její aktivaci (shrnutí v Ringrose and Paro 2004). Autoři studie objevili, že v ESC se vyskytují diferenciační geny s tzv. bivalentními doménami, které obsahují obě tyto metylace a jejich exprese je proto udržována jen na nízké úrovni. Nízká koncentrace produktů těchto genů je v buňkách důležitá pro iniciaci dalšího vývoje. Tyto bivalentní domény se ale také vyskytují na některých genech, které by byly normálně silně aktivovány centrálními transkripčními faktory. Bivalentní domény ale tuto aktivitu částečně potlačují a tak nejspíš pomáhají udržovat koncentraci některých faktorů spojených s pluripotencí na správné hladině (Bernstein et al., 2006). Podíl na metylaci promotorů genů určených k represi má i transkripční faktor SALL4, který interaguje s příslušnými metyltransferázami. (Yang et al., 2012). Roli v udržení pluripotence mají i demetylázy, konkrétně JMJD1A a JMJD2C. JMJD1A aktivuje pluripotentní geny demetylací lysinu 9 na histonu H3 nacházejícího se v oblastech promotorů těchto genů. JMJD2C aktivuje transkripci *Nanog* taktéž demetylací lysinu 9 na histonu H3 (Loh et al., 2007). Důležité jsou však i další histonové modifikace, např. acetylace lysinu 56 na histonu

H3. Zablokování chaperonu ASF1, který je nezbytný pro acetylaci H3K56 vedlo k narušení pluripotence (Tan et al., 2013).

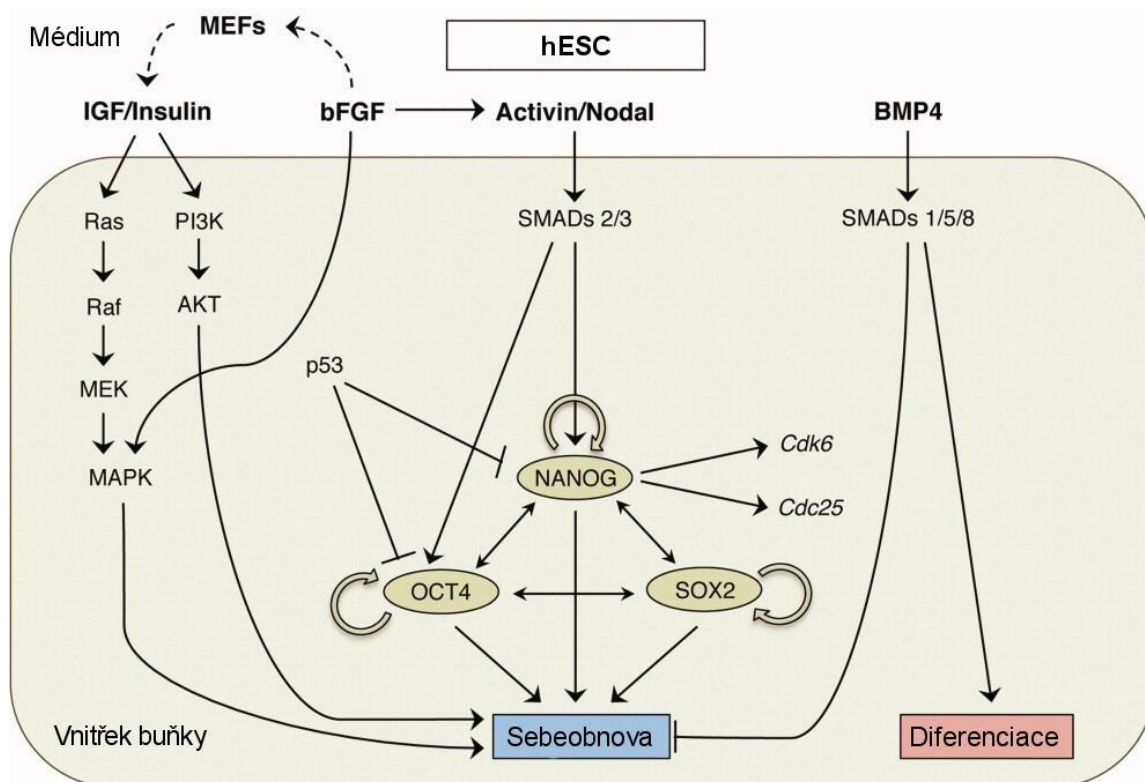
#### **1.4.Externí signály**

Sebeobnova ESC závisí také na prostředí, ve kterém se buňky nacházejí. Komponenty přítomné v médiu, ve kterém jsou ESC kultivovány, mají na další vývoj buněk stejně velký vliv jako vnitřní složení buňky (Gu et al., 2012).

hESC byly dříve vždy kultivovány v médiu společně s myšimi embryonálními fibroblasty, které fungují jako podkladové buňky a pomáhají jim udržovat jejich pluripotentní charakter (Thomson, 1998). Později se ale ukázalo, že hESC lze pěstovat i bez podkladových buněk, na matrigelu pouze s médiem obsahujícím faktory produkované těmito buňkami (Xu et al., 2001). Některé z nich působí na ESC a jsou nezbytné pro udržení jejich nediferencovaného stavu (Ying et al. 2003; Vallier, Alexander, and Pedersen 2005; G. Wang et al. 2005; Bendall et al. 2007). Další výzkumy se proto zaměřily na identifikaci těchto faktorů, které mají na udržení pluripotence hESC největší vliv, a které by mohly zastoupit podkladové buňky nebo jejich médium. G.Wang, H.Zhang, Y. Zhao a jejich kolegové objevili, že takovéto účinky vykazuje bazický fibroblastový růstový faktor bFGF a protein NOGGIN, který funguje jako antagonist BMP (Wang et al., 2005). bFGF spolupracuje s Aktivin/Nodal signalizací, která kontroluje expresi *Nanog* a tím podporuje udržení pluripotence v buňkách (Vallier, Alexander, and Pedersen 2005; Vallier et al. 2009).

Důležitý pro sebeobnovu hESC je také růstový faktor IGF, který pomáhá buňkám v propagaci přes aktivaci protein kinázy Akt (viz Obr.1), (Bendall et al., 2007). Nahradit podpůrné buňky však dokáže i NANOG. Studie z roku 2006 odhalila, že hESC jsou schopny se sebeobnovovat i bez podpůrných buněk pokud ve zvýšené míře exprimují *Nanog* (Darr et al., 2006).



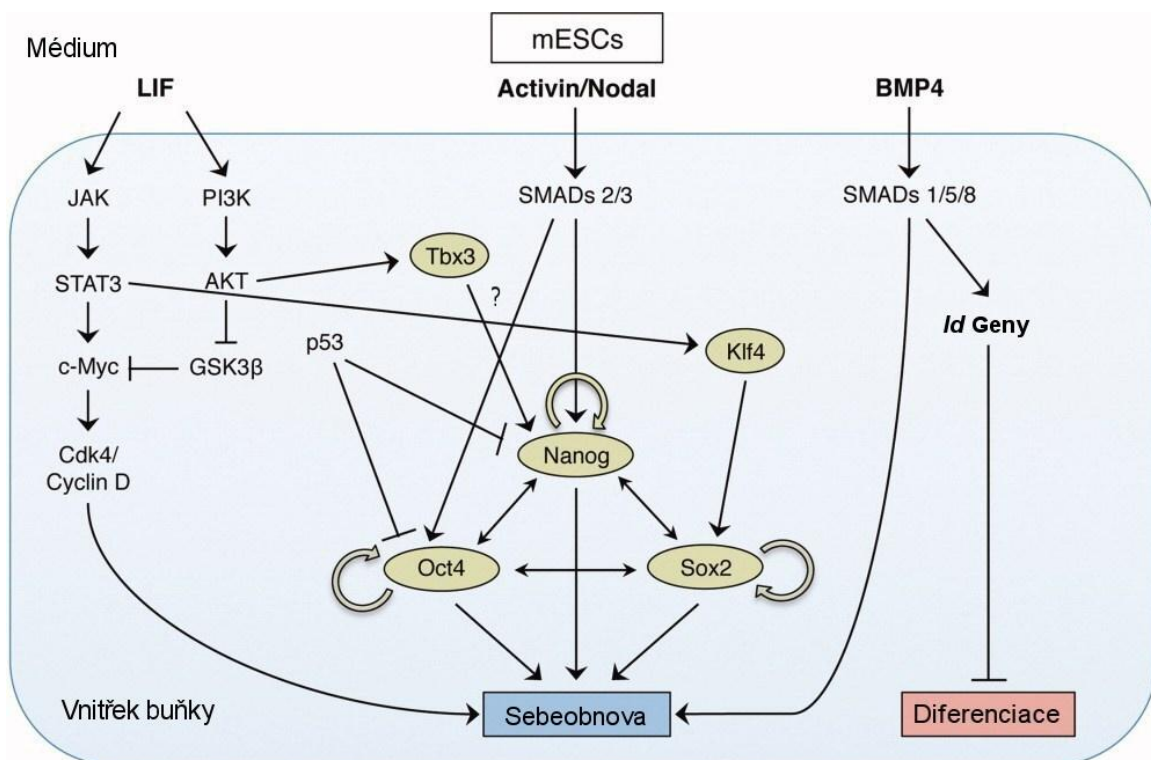


Obr.1: Schéma zapojení externích signálů do centrální transkripční sítě u hESC (převzato a upraveno z Saunders, Faiola, and Wang 2013)

Ačkoli mESC a hESC mají mnoho společného, co se týče extracelulárních signálů ovlivňujících pluripotenci se liší. Z tohoto důvodu se hESC označují někdy také jako „primed“, neboli připravené buňky a mESC jako „naive“ neboli buňky v naivním stavu (Nichols and Smith, 2009). Zatímco hESC lze pěstovat v médiu bez podpůrných buněk s dodáním bFGF a IGF, mESC vyžadují LIF a BMP (viz Obr.2), (Ying et al., 2003). LIF udržuje pluripotenci v mESC přes aktivaci transkripčního faktoru STAT3 (Niwa et al., 1998). Ten dále působí např. na *Myc*, který, jak již bylo zmíněno výše, je důležitý pro pluripotenci (Cartwright et al., 2005). MYC navíc interaguje i s faktorem UTF1 (Laskowski and Knoepfler, 2013). Ten působí na bivalentní domény regulací komplexu PRC2, který metyluje lysin 27 na histonu H3. UTF1 reguluje genovou expresi i na posttranskripční úrovni interakcí s enzymem, který zbaví mRNA přepsanou z genů s bivalentní doménou čepičky, která je následně degradována (Jia et al., 2012). LIF pomocí PI3K také zabraňuje fosforylaci GSK3, která v aktivní formě fosforyluje MYC a působí jeho degradaci (Cartwright et al., 2005),

(Paling et al., 2004). Ačkoli LIF dráha je pro mESC esenciální, u hESC není schopna udržet pluripotenci (Dahéron et al., 2004).

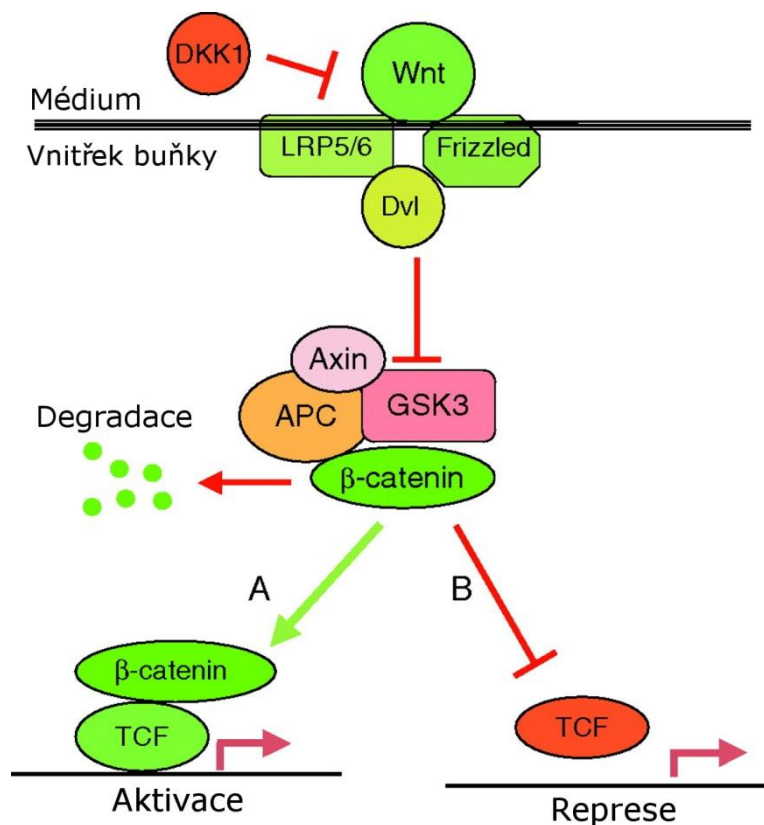
Vzhledem k tomu, že LIF je finančně náročný faktor, objevily se snahy jej nahradit. Podařilo se to např. v roce 2014 týmu asijských vědců, kteří zjistili, že LIF lze substituovat levnou salvianovou kyselinou B (Liu et al., 2014). I některé z cílových proteinů LIF/STAT3 dráhy však mohou pomoci buňkám v sebeobnově bez nutnosti přítomnosti LIF, pokud je jejich exprese uměle zvýšena. Tohoto efektu bylo dosaženo například zvýšením hladiny TFPC2L1 nebo GBX2, které představují cílové proteiny právě LIF/STAT3 dráhy. (Ye et al. 2013; Tai and Ying 2013). Také zvýšená exprese *Nanog* je schopna udržet mESC v nediferencovaném stavu bez podpurných buněk i bez přítomnosti LIF (Chambers et al., 2003). Toho lze dosáhnout např. pomocí retinolu nebo vitamínu C (Liguo Chen et al. 2007; Y. Gao et al. 2013).



Obr.2: Schéma zapojení externích signálů do centrální transkripční sítě v mESC.

TBX3 aktivační šipka je uvedena s otazníkem, neboť nová studie objevila represivní účinky TBX3 na *Nanog* (Zhao et al., 2014), (obrázek převzat a upraven z Saunders, Faiola, and Wang 2013)

Další externí signalizace mající vliv na udržení buněk v nediferencovaném stavu je Wnt signalizace. Jak odhalila studie z roku 2008, Wnt signalizace se podílí na udržení pluripotence mESC prostřednictvím faktoru TCF3. TCF3 funguje v mESC hlavně jako represor exprese genů *Oct4*, *Sox2* a *Nanog*. Umí se ale chovat i jako aktivátor. Aktivace Wnt dráhy, vede k přeměně represivního komplexu TCF3 na aktivační komplex, který podporuje udržení pluripotence (Cole et al., 2008). Navázání WNT proteinu na receptor Frizzled vede ke stabilizaci  $\beta$ -kateninu prostřednictvím inhibice GSK3.  $\beta$ -katenin se pak váže na TCF3 a společně aktivují geny vedoucí k pluripotenci buněk (viz Obr.3), (shrnuo v Sokol 2011). Wnt dráha je důležitá pro udržení pluripotentního stavu i u hESC (Sato et al., 2004).



Obr.3:Schéma Wnt signalizace

A: Z média se na receptor Frizzled naváže WNT protein, aktivuje se protein DVL (Dishevelled), který inaktivuje komplex 3 proteinů (Axin, APC, GSK3). Tento komplex tudíž nedegraduje  $\beta$ -katenin, který se naváže na TCF a spolu aktivují cílové geny.  
 B: Pokud nedojde k aktivaci Wnt dráhy,  $\beta$ -katenin se degraduje a TCF sám funguje jako represor genové exprese (převzato a upraveno z Sokol 2011).

## 2. Posttranskripční regulace

Na kontrole genové exprese vedoucí k pluripotenci se podílí i proteiny, miRNA, lncRNA a hnRNP regulující expresi na posttranskripční úrovni, zejména korigováním hladiny mRNA některých faktorů a inhibitorů, ale i regulací proteinové stability (Moretto-Zita et al. 2010; Guttman et al. 2011; Vizlin-Hodzic et al. 2011; Gruber et al. 2014).

### 2.1.miRNA a lncRNA

V ESC se vyskytuje několik typů miRNA, které mají vliv na jejich pluripotentní stav. V mESC se nachází shluky označované jako miR-290-295 a miR-302-367, které kódují několik miRNA (Houbaviy et al., 2003). Shluk miR-302-367 se vyskytuje i v hESC, ale místo miR-290-295 mají hESC shluk miR-371-373 (Suh et al., 2004). A.Gruber, W.Grandy, P.Balwierz a jejich tým odhalili, že tyto miRNA mají vliv na buněčný cyklus, ale také zvyšují aktivitu faktoru MYC a mají vliv na strukturu chromatinu, což ovlivňuje i pluripotenci (Gruber et al., 2014). Tyto miRNA jsou regulovány prostřednictvím pluripotentních faktorů OCT4, SOX2, NANOG a TCF3, které se vážou na jejich promotory. OCT4 knockdown způsobil i snížení hladiny miR-290-295 a miR-302-367 stejně tak jako dalších 4 zkoumaných miRNA. Delece TCF3, který se nachází v buňkách hlavně ve stavu komplexu reprimujícího pluripotentní geny, způsobila nárůst těchto miRNA (Marson et al., 2008). Některé miRNA např. miR-21 ale pluripotenci potlačují. Neuronální represor REST však reprimuje expresi těchto miRNA a tím se podílí na udržení pluripotence (Singh et al., 2008).

Podobnost s miRNA sdílejí lncRNA, které jsou dlouhé až 200 kb a účastní se remodelace chromatinu a regulace genové exprese na transkripční i posttranskripční úrovni (shrnuto v Caley et al. 2010). Mezi lncRNA patří také lincRNA, neboli dlouhé intergenové nekódující RNA. Studie z roku 2011 zkoumala 226 lincRNA exprimovaných v mESC a zjistila, že 30 % z nich asociovalo alespoň s jedním z 12 vybraných chromatin remodelujících komplexů. Jejich výzkum také dokázal, že lincRNA jsou regulovány pluripotentními faktory SOX2, OCT4, NANOG, KLF4, MYC, ale i mnoha dalšími. Knockdown alespoň jednoho z těchto faktorů způsobil snížení hladiny až o 60 % všech zkoumaných lincRNA. Vědci dále identifikovali 30 lincRNA, jejichž knockdown způsobil produkci diferenciacích markerů. Ve většině případů ale tento knockdown nevedl buňky k diferenciaci (Guttman et al., 2011). Tyto výsledky napovídají, že lincRNA mají roli v potlačování diferenciaci, ale jejich úloha nejspíš není esenciální.

## 2.2. Proteiny účastníci se posttranskripční regulace

Mezi proteiny majícími vliv na pluripotenci buněk patří i hnRNP vázající se na pre-mRNA a tvořící s ní tzv. heterogenní jaderné ribonukleoproteinové částice. Jedním takovým hnRNP proteinem je i hnRNP U neboli SAF-A, jehož knockdown způsobil v buňkách snížení hladiny OCT4 a následnou ztrátu pluripotence (Vizlin-Hodzic et al., 2011). K diferenciaci vedla u hESC také delece hnRNP A2/B1, která způsobila snížení OCT4, NANOG a SOX2 a inhibovala PI3K/Akt signalizaci (Choi et al., 2013). Pro proliferaci ESC je důležitý hnRNP I neboli PTB (Shibayama et al., 2009). Do udržení pluripotence jsou však zapojeny i RNA vazebné proteiny nacházející se v cytosolu. Jedním z těchto proteinů je L1TD1. Jeho knockdown způsobil u buněk výrazné snížení hladiny OCT4, NANOG a SOX2, a produkci diferenciačních markerů (Närvä et al., 2012). Dalším takovým proteinem je i UNR, jehož zapojení do udržení pluripotence dokazuje diferenciaci ESC do primitivního entodermu po jeho knockdownu. UNR v ESC destabilizuje mRNA pro GATA6, čímž napomáhá udržení pluripotence (Elatmani et al., 2011).

Pluripotence je udržována i prostřednictvím regulace stability transkripčních pluripotentních faktorů. Takovouto regulaci provádí např. protein PIN1, který zvyšuje stabilitu OCT4 vazbou na jeho fosforylovaný serin-prolinový motiv. Tím zabraňuje ubiquitinem zprostředkované degradaci proteinu a podporuje udržení pluripotence (Nishi et al., 2011). Stejně funguje PIN1 i pro NANOG, vazbou na jeho fosforylovaný Ser/Thr-Pro motiv zvyšuje jeho stabilitu (Moretto-Zita et al., 2010). Stabilizaci OCT4 a NANOG provádí i chaperon HSP90, který se na tyto faktory váže a brání jejich degradaci v proteazómu. Inhibice HSP90 vedla u ESC k diferenciaci (Bradley et al., 2012).

Roli v udržení pluripotence má i O-glykosilace. Studie z roku 2012 objevila, že OCT4 a SOX2 jsou v ESC glykosylované a po diferenciaci hladina glykosilací klesá. U OCT4 je glykosylován threonin 228 vazbou N-acetylglukosaminu pomocí enzymu OGT. Tato modifikace zvyšuje transkripční aktivitu OCT4 a umožňuje mu aktivovat další pluripotentní geny např. *Tbx3*, *Klf5*, *Lrh-1* (Jang et al., 2012).

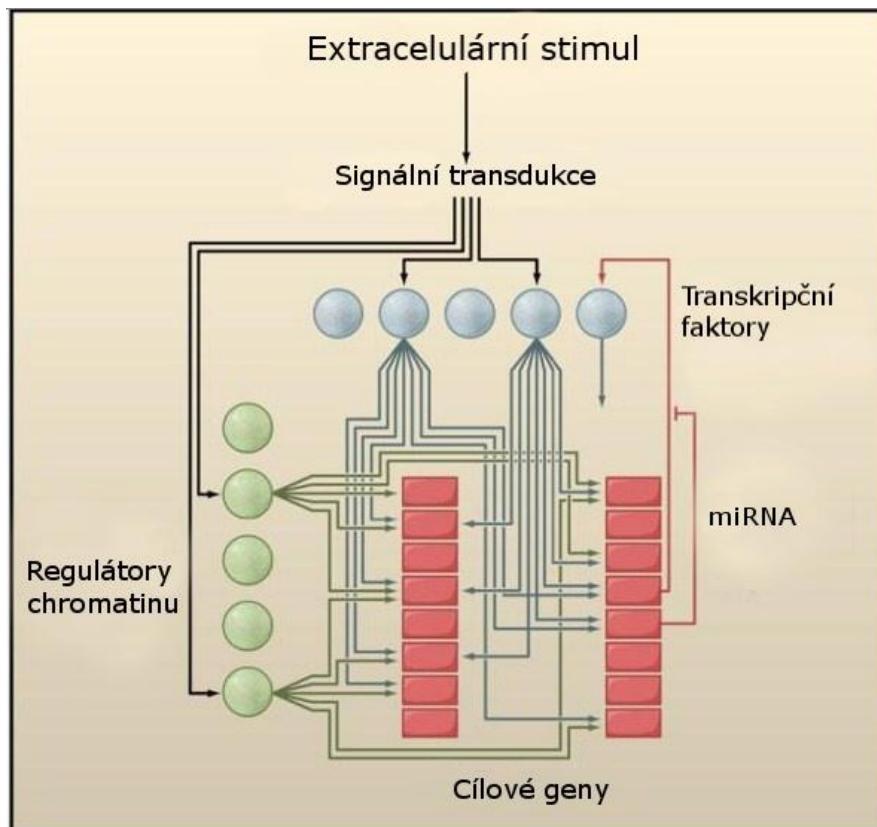
## 3. Regulační síť vedoucí k pluripotenci

Pro úplné pochopení podstaty pluripotence je třeba studovat, kromě funkcí jednotlivých faktorů, také jejich vzájemné interakce a to, jak na buňku působí společně. Knockdown některého z centrálních transkripčních faktorů vždy způsobil u buněk diferenciaci, což vedlo k přesvědčení, že tyto centrální faktory jsou hlavními represory

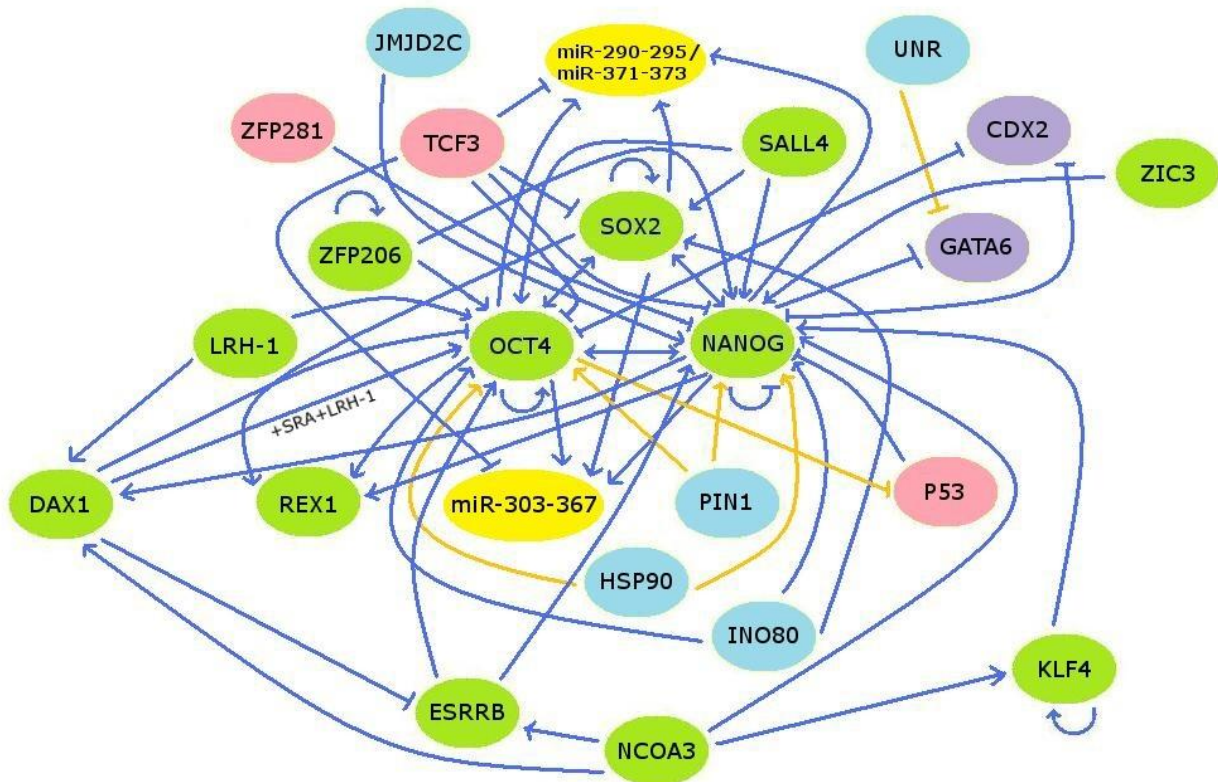
diferenciace (Mitsui et al. 2003; Ivanova et al. 2006; Babaie et al. 2007). Celkový pohled na regulační síť složenou z pluripotentních faktorů však nabízí nová vysvětlení, jakým způsobem může být v ESC udržována pluripotence. K.Loh a B.Lim přišli se zajímavou teorií, že pluripotentní faktory SOX2, NANOG, OCT4, TBX3, SALL4, ESRRB a další ve skutečnosti samostatně vedou k diferenciaci a ne k pluripotenci, ale jejich současné působení jejich diferenciační účinky blokuje, a tak je buňka udržována v pluripotentním stavu (Loh and Lim, 2011). Studium regulační sítě udržující pluripotenci je proto k porozumění celkové problematiky nezbytné.

Transkripční regulační síť vedoucí k pluripotenci lze rozdělit na síť tvořenou centrálními transkripčními faktory a na síť tvořenou ostatními pluripotentními faktory, které více či méně přispívají k udržení pluripotence. Centrální transkripční faktory se vzájemně pozitivně ovlivňují a autoregulují (Boyer et al., 2005). Zatímco SOX2 a OCT4 vytváří komplex a přímo aktivují svou genovou expresi, NANOG sám sebe ovlivňuje negativně (Chew et al. 2005; Navarro et al. 2012). Na druhou stranu NANOG však nepřímo podporuje svou transkripci přes aktivaci *Sox2* a *Oct4*. Na prvky transkripčních sítí ale působí i jiné proteiny a miRNA, takže celková regulační síť udržující pluripotenci v ESC je značně komplexní (viz Obr.4 a Obr.5). Jenom samotné transkripční faktory interagují s obrovským množstvím genů, např. NANOG má min. 130 interakčních partnerů, SOX2 více než 70 a OCT4 knockdown ovlivnil dokonce více než 1000 genů (Babaie et al. 2007; Z. Gao et al. 2012; Gagliardi et al. 2013).

O sestavení transkripční sítě udržující pluripotenci se pokusilo několik studií (J. Wang et al. 2006; Kim et al. 2008; S H Orkin et al. 2008). J. Kim a jeho tým zároveň odhalili způsob, jakým pluripotentní transkripční faktory spolupracují na aktivaci a represii cílových genů. Geny vázané více než 4 faktory byly většinou aktivovány, kdežto geny vázané méně než 4 faktory byly reprimovány (Kim et al., 2008). Ačkoli většina studií zabývajících se vytvářením transkripční sítě regulující pluripotenci zařadila do této sítě větší množství proteinů, S. Dunn, G.Martello, B.Yordanov a jejich tým navrhli počítačový model transkripční sítě mESC složený pouze z 12 prvků, 16 interakcí a 3 vstupů. Autoři studie se domnívají, že pro udržení pluripotence v buňkách není třeba velkého množství proteinů a interakcí (viz Obr.6), (Dunn et al., 2014).

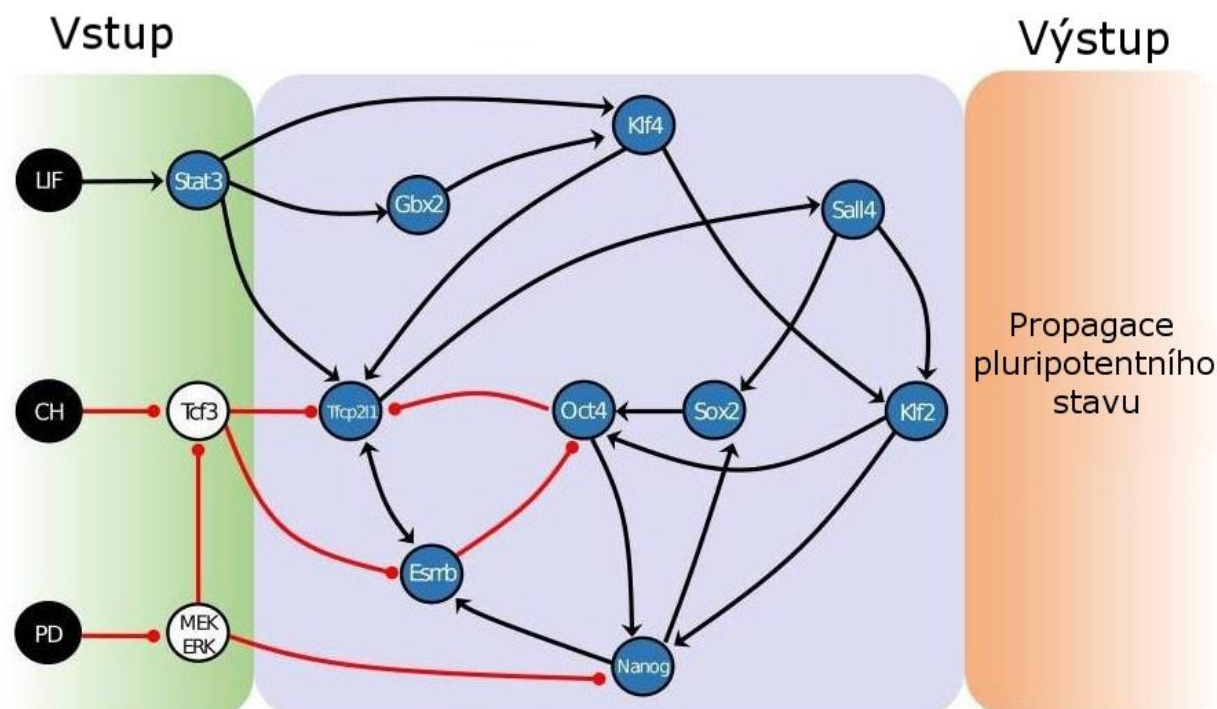


Obr.4: Schéma regulační transkripční sítě v ESC  
 Transkripční faktory jsou znázorněny modře, regulátory chromatinu zeleně, cílové geny růžově  
 (převzato a upraveno z Jaenisch and Young 2008).



Obr.5: Nejdůležitější přímé interakce pluripotentních faktorů s ostatními proteiny a miRNA v ESC  
 Zeleně označené jsou pluripotentní faktory, růžově represory pluripotentních genů, fialově transkripční faktory diferencovaných buněk, žlutě miRNA a modře ostatní proteiny. Tmavě modře jsou označeny interakce na transkripční úrovni, žlutě na posttranskripční úrovni.





Obr.6: Počítačový model transkripční sítě v mESC  
 CH je inhibitor GSK3, PD je inhibitor MEK  
 Červeně jsou zobrazeny inhibující interakce, černě aktivující interakce (převzato a upraveno z Dunn et al. 2014).

## Závěr

Cílem této práce bylo shrnout mechanismy, kterými si ESC udržují svůj jedinečný pluripotentní stav. Kontrola genové exprese vedoucí k pluripotenci probíhá jak na transkripční, tak na posttranskripční úrovni a celý proces je proto velmi složitý. Porozumění této problematice však může být klíčem k léčbě nejrůznějších onemocnění. Poznatky získané studiem ESC mohou být totiž využity v přípravě indukovaných pluripotentních buněk, které by mohly být výborným zdrojem pro náhradu tkání. Znalosti o jednotlivých pluripotentních transkripčních faktorech zase mohou přispět k pochopení mechanismu vzniku rakovinu a tím i k její léčbě. Rakovinné kmenové buňky totiž stejně jako ESC exprimují některé proteiny spojené s pluripotencí (shrnuto v A. Liu, Yu, and Liu 2013).

Dřívější a současné studie zabývající se pluripotencí zaměřily svoji pozornost především na identifikaci proteinů, které se podílejí na jejím udržení. Kromě centrálních

faktorů SOX2, OCT4 a NANOG se tedy regulační síť ESC rozrostla o velké množství dalších proteinů a její složitost narůstala. Lze předpokládat, že i v budoucnu se bude počet proteinů spojených s pluripotencí zvyšovat. Z hlediska praktického využití je však regulační síť vedoucí k pluripotenci příliš komplexní a spíše než na hledání nových proteinů účastnících se pluripotence, by se výzkumy měly zaměřit na hledání nejesenciálnějších interakcí mezi stávajícími pluripotentními faktory.

## Seznam použité literatury

Sekundární zdroje citací jsou označeny \*

- Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S.-Y., Nakatsuji, N., Kawase, E., 2010. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells* 15, 455–70. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01400.x
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–40. doi:10.1101/gad.224503
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., Adjaye, J., 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 500–10. doi:10.1634/stemcells.2006-0426
- Bendall, S.C., Stewart, M.H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bossé, M., Lajoie, G., Bhatia, M., 2007. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448, 1015–21. doi:10.1038/nature06027
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–26. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947–56. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020
- Bradley, E., Bieberich, E., Mivechi, N.F., Tangpisuthipongsa, D., Wang, G., 2012. Regulation of embryonic stem cell pluripotency by heat shock protein 90. *Stem Cells* 30, 1624–33. doi:10.1002/stem.1143
- \*Caley, D.P., Pink, R.C., Trujillano, D., Carter, D.R.F., 2010. Long noncoding RNAs, chromatin, and development. *ScientificWorldJournal*. 10, 90–102. doi:10.1100/tsw.2010.7
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., Dalton, S., 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885–96. doi:10.1242/dev.01670

- Cole, M.F., Johnstone, S.E., Newman, J.J., Kagey, M.H., Young, R.A., 2008. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 22, 746–55. doi:10.1101/gad.1642408
- Dahéron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, M.W., Lensch, W.M., Andrews, P.W., Itskovitz-Eldor, J., Daley, G.Q., 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 770–8. doi:10.1634/stemcells.22-5-770
- Darr, H., Mayshar, Y., Benvenisty, N., 2006. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133, 1193–201. doi:10.1242/dev.02286
- Dejosez, M., Krumenacker, J.S., Zitur, L.J., Passeri, M., Chu, L.-F., Songyang, Z., Thomson, J.A., Zwaka, T.P., 2008. Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Cell* 133, 1162–74. doi:10.1016/j.cell.2008.05.047
- Dunn, S.-J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S., Smith, A.G., 2014. Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science* 344, 1156–60. doi:10.1126/science.1248882
- Elatmani, H., Dormoy-Raclet, V., Dubus, P., Dautry, F., Chazaud, C., Jacquemin-Sablon, H., 2011. The RNA-binding protein Unr prevents mouse embryonic stem cells differentiation toward the primitive endoderm lineage. *Stem Cells* 29, 1504–16. doi:10.1002/stem.712
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. doi:10.1038/292154a0
- Fidalgo, M., Shekar, P.C., Ang, Y.-S., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., Wang, J., 2011. Zfp281 functions as a transcriptional repressor for pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 29, 1705–16. doi:10.1002/stem.736
- Fong, H., Hohenstein, K.A., Donovan, P.J., 2008. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1931–8. doi:10.1634/stemcells.2007-1002
- Fujikura, J., 2002. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* 16, 784–789. doi:10.1101/gad.968802
- Gabut, M., Samavarchi-Tehrani, P., Wang, X., Slobodeniuc, V., O’Hanlon, D., Sung, H.-K., Alvarez, M., Talukder, S., Pan, Q., Mazzoni, E.O., Nedelec, S., Wichterle, H., Woltjen, K., Hughes, T.R., Zandstra, P.W., Nagy, A., Wrana, J.L., Blencowe, B.J., 2011. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* 147, 132–46. doi:10.1016/j.cell.2011.08.023
- Gagliardi, A., Mullin, N.P., Ying Tan, Z., Colby, D., Kousa, A.I., Halbritter, F., Weiss, J.T., Felker, A., Bezstarosti, K., Favaro, R., Demmers, J., Nicolis, S.K., Tomlinson, S.R., Poot, R.A., Chambers, I., 2013. A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. *EMBO J.* 32, 2231–47. doi:10.1038/emboj.2013.161
- Galan-Caridad, J.M., Harel, S., Arenzana, T.L., Hou, Z.E., Doetsch, F.K., Mirny, L.A., Reizis, B., 2007. Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* 129, 345–57. doi:10.1016/j.cell.2007.03.014
- Gao, Y., Yang, L., Chen, L., Wang, X., Wu, H., Ai, Z., Du, J., Liu, Y., Shi, X., Wu, Y., Guo, Z., Zhang, Y., 2013. Vitamin C facilitates pluripotent stem cell maintenance by promoting pluripotency gene transcription. *Biochimie* 95, 2107–13. doi:10.1016/j.biochi.2013.08.001
- Gao, Z., Cox, J.L., Gilmore, J.M., Ormsbee, B.D., Mallanna, S.K., Washburn, M.P., Rizzino, A., 2012. Determination of Protein Interactome of Transcription Factor Sox2 in Embryonic Stem Cells Engineered for Inducible Expression of Four Reprogramming Factors. *J. Biol. Chem.* 287, 11384–97. doi:10.1074/jbc.M111.320143
- Gruber, A.J., Grandy, W.A., Balwierz, P.J., Dimitrova, Y.A., Pachkov, M., Ciaudo, C., van Nimwegen, E., Zavolan, M., 2014. Embryonic stem cell-specific microRNAs contribute to

- pluripotency by inhibiting regulators of multiple differentiation pathways. *Nucleic Acids Res.* 42, 9313–26. doi:10.1093/nar/gku544
- Gu, Q., Hao, J., Zhao, X., Li, W., Liu, L., Wang, L., Liu, Z., Zhou, Q., 2012. Rapid conversion of human ESCs into mouse ESC-like pluripotent state by optimizing culture conditions. *Protein Cell* 3, 71–79. doi:10.1007/s13238-012-2007-8
- Gu, W., Roeder, R.G., 1997. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell* 90, 595–606. doi:10.1016/S0092-8674(00)80521-8
- Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B.W., Garber, M., Grenier, J.K., Munson, G., Young, G., Lucas, A.B., Ach, R., Bruhn, L., Yang, X., Amit, I., Meissner, A., Regev, A., Rinn, J.L., Root, D.E., Lander, E.S., 2011. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477, 295–300. doi:10.1038/nature10398
- Hammachi, F., Morrison, G.M., Sharov, A.A., Livigni, A., Narayan, S., Papapetrou, E.P., O'Malley, J., Kaji, K., Ko, M.S.H., Ptashne, M., Brickman, J.M., 2012. Transcriptional activation by Oct4 is sufficient for the maintenance and induction of pluripotency. *Cell Rep.* 1, 99–109. doi:10.1016/j.celrep.2011.12.002
- Harel, S., Tu, E.Y., Weisberg, S., Esquilin, M., Chambers, S.M., Liu, B., Carson, C.T., Studer, L., Reizis, B., Tomishima, M.J., 2012. ZFX Controls the Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 7, e42302. doi:10.1371/journal.pone.0042302
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J., Burdon, T., 2004. Oct-4 Knockdown Induces Similar Patterns of Endoderm and Trophoblast Differentiation Markers in Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 22, 225–235. doi:10.1634/stemcells.22-2-225
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., Sharp, P.A., 2003. Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs. *Dev. Cell* 5, 351–358. doi:10.1016/S1534-5807(03)00227-2
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113, 643–655. doi:10.1016/S0092-8674(03)00392-1
- Chen, L., Yabuuchi, A., Eminli, S., Takeuchi, A., Lu, C.-W., Hochedlinger, K., Daley, G.Q., 2009. Cross-regulation of the Nanog and Cdx2 promoters. *Cell Res.* 19, 1052–61. doi:10.1038/cr.2009.79
- Chen, L., Yang, M., Dawes, J., Khillan, J.S., 2007. Suppression of ES cell differentiation by retinol (vitamin A) via the overexpression of Nanog. *Differentiation* 75, 682–693. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00169.x
- Chew, J.-L., Loh, Y.-H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.-L., Yeap, L.-S., Li, P., Ang, Y.-S., Lim, B., Robson, P., Ng, H.-H., 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6031–46. doi:10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005
- Chitilian, J.M., Thillainadesan, G., Manias, J.L., Chang, W.Y., Walker, E., Isovich, M., Stanford, W.L., Torchia, J., 2014. Critical components of the pluripotency network are targets for the p300/CBP interacting protein (p/CIP) in embryonic stem cells. *Stem Cells* 32, 204–15. doi:10.1002/stem.1564
- Choi, H.S., Lee, H.M., Jang, Y.-J., Kim, C.-H., Ryu, C.J., 2013. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 regulates the self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cells via the control of the G1/S transition. *Stem Cells* 31, 2647–58. doi:10.1002/stem.1366
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., Lemischka, I.R., 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442, 533–8. doi:10.1038/nature04915
- Jaenisch, R., Young, R., 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567–82. doi:10.1016/j.cell.2008.01.015

- Jain, A.K., Allton, K., Iacovino, M., Mahen, E., Milczarek, R.J., Zwaka, T.P., Kyba, M., Barton, M.C., 2012. p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 10, e1001268. doi:10.1371/journal.pbio.1001268
- Jang, H., Kim, T.W., Yoon, S., Choi, S.-Y., Kang, T.-W., Kim, S.-Y., Kwon, Y.-W., Cho, E.-J., Youn, H.-D., 2012. O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 11, 62–74. doi:10.1016/j.stem.2012.03.001
- Jia, J., Zheng, X., Hu, G., Cui, K., Zhang, J., Zhang, A., Jiang, H., Lu, B., Yates, J., Liu, C., Zhao, K., Zheng, Y., 2012. Regulation of pluripotency and self-renewal of ESCs through epigenetic-threshold modulation and mRNA pruning. *Cell* 151, 576–89. doi:10.1016/j.cell.2012.09.023
- Jiang, J., Chan, Y.-S., Loh, Y.-H., Cai, J., Tong, G.-Q., Lim, C.-A., Robson, P., Zhong, S., Ng, H.-H., 2008. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 353–60. doi:10.1038/ncb1698
- Kelly, V.R., Hammer, G.D., 2011. LRH-1 and Nanog regulate Dax1 transcription in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 332, 116–24. doi:10.1016/j.mce.2010.10.003
- Kelly, V.R., Xu, B., Kuick, R., Koenig, R.J., Hammer, G.D., 2010. Dax1 up-regulates Oct4 expression in mouse embryonic stem cells via LRH-1 and SRA. *Mol. Endocrinol.* 24, 2281–91. doi:10.1210/me.2010-0133
- Khalfallah, O., Rouleau, M., Barbry, P., Bardoni, B., Lalli, E., 2009. Dax-1 knockdown in mouse embryonic stem cells induces loss of pluripotency and multilineage differentiation. *Stem Cells* 27, 1529–37. doi:10.1002/stem.78
- Kidder, B.L., Palmer, S., Knott, J.G., 2009. SWI/SNF-Brg1 regulates self-renewal and occupies core pluripotency-related genes in embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 317–28. doi:10.1634/stemcells.2008-0710
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., Orkin, S.H., 2008. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132, 1049–61. doi:10.1016/j.cell.2008.02.039
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., Rizzino, A., 2008. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 903–11. doi:10.1634/stemcells.2007-0951
- Kühnlein, R.P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, A., Wagner-Bernholz, J.F., Gehring, W.J., Jäckle, H., Schuh, R., 1994. spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 13, 168–79.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T., 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2475–85. doi:10.1128/MCB.25.6.2475-2485.2005
- Laskowski, A.I., Knoepfler, P.S., 2013. Myc binds the pluripotency factor Utl1 through the basic-helix-loop-helix leucine zipper domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 551–6. doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.100
- Lim, L.S., Hong, F.H., Kunarso, G., Stanton, L.W., 2010. The pluripotency regulator Zic3 is a direct activator of the Nanog promoter in ESCs. *Stem Cells* 28, 1961–9. doi:10.1002/stem.527
- Lin, C.-H., Lin, C., Tanaka, H., Fero, M.L., Eisenman, R.N., 2009. Gene regulation and epigenetic remodeling in murine embryonic stem cells by c-Myc. *PLoS One* 4, e7839. doi:10.1371/journal.pone.0007839
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., Xu, Y., 2005. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* 7, 165–71. doi:10.1038/ncb1211
- \*Liu, A., Yu, X., Liu, S., 2013. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chin. J. Cancer* 32, 483–7. doi:10.5732/cjc.012.10282

- Liu, C.H., Shyu, W.-C., Fu, R.-H., Huang, S.-J., Chang, C.-H., Huang, Y.-C., Chen, S.-Y., Lin, S.-Z., Liu, S.-P., 2014. Salvianolic acid B maintained stem cell pluripotency and increased proliferation rate by activating Jak2-Stat3 combined with EGFR-Erk1/2 pathways. *Cell Transplant.* 23, 657–68. doi:10.3727/096368914X678391
- Loh, K.M., Lim, B., 2011. A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell Stem Cell* 8, 363–9. doi:10.1016/j.stem.2011.03.013
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.-Y., Sung, K.W., Lee, C.W.H., Zhao, X.-D., Chiu, K.-P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.-L., Ruan, Y., Lim, B., Ng, H.-H., 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38, 431–40. doi:10.1038/ng1760
- Loh, Y.-H., Zhang, W., Chen, X., George, J., Ng, H.-H., 2007. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev.* 21, 2545–57. doi:10.1101/gad.1588207
- \*Lüscher, B., Larsson, L.G., 1999. The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* 18, 2955–66. doi:10.1038/sj.onc.1202750
- Mahatan, C.S., Kaestner, K.H., Geiman, D.E., Yang, V.W., 1999. Characterization of the structure and regulation of the murine gene encoding gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4). *Nucleic Acids Res.* 27, 4562–9.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J.M., Dennis, L.M., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P.A., Bartel, D.P., Jaenisch, R., Young, R.A., 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134, 521–33. doi:10.1016/j.cell.2008.07.020
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., Ko, M.S.H., Niwa, H., 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 625–35. doi:10.1038/ncb1589
- Masui, S., Ohtsuka, S., Yagi, R., Takahashi, K., Ko, M.S.H., Niwa, H., 2008. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC Dev. Biol.* 8, 45. doi:10.1186/1471-213X-8-45
- Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., Andrews, P.W., 2004. Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 22, 659–68. doi:10.1634/stemcells.22-5-659
- \*McConnell, B.B., Ghaleb, A.M., Nandan, M.O., Yang, V.W., 2007. The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays* 29, 549–57. doi:10.1002/bies.20581
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S., 2003. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631–642. doi:10.1016/S0092-8674(03)00393-3
- Moretto-Zita, M., Jin, H., Shen, Z., Zhao, T., Briggs, S.P., Xu, Y., 2010. Phosphorylation stabilizes Nanog by promoting its interaction with Pin1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13312–7. doi:10.1073/pnas.1005847107
- Mull, A.N., Klar, A., Navara, C.S., 2014. Differential localization and high expression of SURVIVIN splice variants in human embryonic stem cells but not in differentiated cells implicate a role for SURVIVIN in pluripotency. *Stem Cell Res.* 12, 539–49. doi:10.1016/j.scr.2014.01.002
- Närvä, E., Rahkonen, N., Emani, M.R., Lund, R., Pursiheimo, J.-P., Nästi, J., Autio, R., Rasool, O., Denessiouk, K., Lähdesmäki, H., Rao, A., Lahesmaa, R., 2012. RNA-binding protein L1TD1

- interacts with LIN28 via RNA and is required for human embryonic stem cell self-renewal and cancer cell proliferation. *Stem Cells* 30, 452–60. doi:10.1002/stem.1013
- Navarro, P., Festuccia, N., Colby, D., Gagliardi, A., Mullin, N.P., Zhang, W., Karwacki-Neisius, V., Osorno, R., Kelly, D., Robertson, M., Chambers, I., 2012. OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J.* 31, 4547–62. doi:10.1038/emboj.2012.321
- Nichols, J., Smith, A., 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4, 487–92. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A., 1998. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95, 379–391. doi:10.1016/S0092-8674(00)81769-9
- Nishi, M., Akutsu, H., Masui, S., Kondo, A., Nagashima, Y., Kimura, H., Perrem, K., Shigeri, Y., Toyoda, M., Okayama, A., Hirano, H., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S.W., Ryo, A., 2011. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J. Biol. Chem.* 286, 11593–603. doi:10.1074/jbc.M110.187989
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., Smith, A., 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 12, 2048–2060. doi:10.1101/gad.12.13.2048
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G., 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–6. doi:10.1038/74199
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., Adachi, K., 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460, 118–22. doi:10.1038/nature08113
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., Rossant, J., 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917–29. doi:10.1016/j.cell.2005.08.040
- \*O’Shea, K.S., 2004. Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Biol. Reprod.* 71, 1755–1765. doi:10.1095/biolreprod.104.028100
- \*Orkin, S.H., 2005. Chipping away at the Embryonic Stem Cell Network. *Cell* 122, 828–830. doi:10.1016/j.cell.2005.09.002
- Orkin, S.H., Wang, J., Kim, J., Chu, J., Rao, S., Theunissen, T.W., Shen, X., Levasseur, D.N., 2008. The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73, 195–202. doi:10.1101/sqb.2008.72.001
- Ormsbee Golden, B.D., Wuebben, E.L., Rizzino, A., 2013. Sox2 expression is regulated by a negative feedback loop in embryonic stem cells that involves AKT signaling and FoxO1. *PLoS One* 8, e76345. doi:10.1371/journal.pone.0076345
- Paling, N.R.D., Wheadon, H., Bone, H.K., Welham, M.J., 2004. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 48063–70. doi:10.1074/jbc.M406467200
- Percharde, M., Lavial, F., Ng, J.-H., Kumar, V., Tomaz, R.A., Martin, N., Yeo, J.-C., Gil, J., Prabhakar, S., Ng, H.-H., Parker, M.G., Azuara, V., 2012. Ncoa3 functions as an essential Esrrb coactivator to sustain embryonic stem cell self-renewal and reprogramming. *Genes Dev.* 26, 2286–98. doi:10.1101/gad.195545.112
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., Natesan, S., Wagers, A.J., Melnick, A., Evans, T., Hochedlinger, K., 2010. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 848–55. doi:10.1038/nbt.1667
- \*Ringrose, L., Paro, R., 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* 38, 413–43. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091907

- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H., Robson, P., 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280, 24731–7. doi:10.1074/jbc.M502573200
- Rogers, M.B., Hosler, B.A., Gudas, L.J., 1991. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development* 113, 815–24.
- \*Rohwedel, J., Guan, K., Wobus, A.M., 1999. Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells. Tissues. Organs* 165, 190–202. doi:16699
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., Staudt, L.M., 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686–92. doi:10.1038/345686a0
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., Brivanlou, A.H., 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10, 55–63. doi:10.1038/nm979
- Sato, T., Okumura, F., Ariga, T., Hatakeyama, S., 2012. TRIM6 interacts with Myc and maintains the pluripotency of mouse embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 125, 1544–55. doi:10.1242/jcs.095273
- Saunders, A., Faiola, F., Wang, J., 2013. Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. *Stem Cells* 31, 1227–36. doi:10.1002/stem.1384
- Scotland, K.B., Chen, S., Sylvester, R., Gudas, L.J., 2009. Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Dev. Dyn.* 238, 1863–77. doi:10.1002/dvdy.22037
- Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y., Pei, D., 2006. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J. Biol. Chem.* 281, 23319–25. doi:10.1074/jbc.M601811200
- Shibayama, M., Ohno, S., Osaka, T., Sakamoto, R., Tokunaga, A., Nakatake, Y., Sato, M., Yoshida, N., 2009. Polypyrimidine tract-binding protein is essential for early mouse development and embryonic stem cell proliferation. *FEBS J.* 276, 6658–68. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07380.x
- Schöler, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N., Gruss, P., 1989. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* 8, 2543–50.
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Côté, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schröder, C., Kemler, R., 1986. A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell* 47, 1025–32.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–4. doi:10.1038/346240a0
- Singh, S.K., Kagalwala, M.N., Parker-Thornburg, J., Adams, H., Majumder, S., 2008. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 453, 223–7. doi:10.1038/nature06863
- Singhal, N., Esch, D., Stehling, M., Schöler, H.R., 2014. BRG1 Is Required to Maintain Pluripotency of Murine Embryonic Stem Cells. *Biores. Open Access* 3, 1–8. doi:10.1089/biores.2013.0047
- \*Sokol, S.Y., 2011. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development* 138, 4341–50. doi:10.1242/dev.066209
- Son, M.-Y., Choi, H., Han, Y.-M., Cho, Y.S., 2013. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells* 31, 2374–87. doi:10.1002/stem.1509
- Suh, M.-R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.-K., Moon, S.-H., Lee, J.Y., Cha, K.-Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., Kim, V.N., Kim, K.-S., 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 270, 488–98. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.019



- Sun, C., Nakatake, Y., Akagi, T., Ura, H., Matsuda, T., Nishiyama, A., Koide, H., Ko, M.S.H., Niwa, H., Yokota, T., 2009. Dax1 binds to Oct3/4 and inhibits its transcriptional activity in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4574–83. doi:10.1128/MCB.01863-08
- Tai, C.-I., Ying, Q.-L., 2013. Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *J. Cell Sci.* 126, 1093–8. doi:10.1242/jcs.118273
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tan, Y., Xue, Y., Song, C., Grunstein, M., 2013. Acetylated histone H3K56 interacts with Oct4 to promote mouse embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11493–8. doi:10.1073/pnas.1309914110
- Tanimura, N., Saito, M., Ebisuya, M., Nishida, E., Ishikawa, F., 2013. Stemness-related factor Sall4 interacts with transcription factors Oct-3/4 and Sox2 and occupies Oct-Sox elements in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 288, 5027–38. doi:10.1074/jbc.M112.411173
- Tantin, D., 2013. Oct transcription factors in development and stem cells: insights and mechanisms. *Development* 140, 2857–66. doi:10.1242/dev.095927
- Thomson, J.A., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80-. ). 282, 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Uranishi, K., Akagi, T., Sun, C., Koide, H., Yokota, T., 2013. Dax1 associates with Esrrb and regulates its function in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2056–66. doi:10.1128/MCB.01520-12
- Vallier, L., Alexander, M., Pedersen, R.A., 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 118, 4495–509. doi:10.1242/jcs.02553
- Vallier, L., Mendjan, S., Brown, S., Chng, Z., Teo, A., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Cho, C.H.-H., Martinez, A., Rugg-Gunn, P., Brons, G., Pedersen, R.A., 2009. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 136, 1339–49. doi:10.1242/dev.033951
- Van den Berg, D.L.C., Zhang, W., Yates, A., Engelen, E., Takacs, K., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., Poot, R.A., 2008. Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5986–95. doi:10.1128/MCB.00301-08
- Varlakhonova, N. V., Cotterman, R.F., DeVries, W.N., Morgan, J., Donahue, L.R., Murray, S., Knowles, B.B., Knoepfler, P.S., 2010. myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation*. 80, 9–19. doi:10.1016/j.diff.2010.05.001
- Vizlin-Hodzic, D., Johansson, H., Ryme, J., Simonsson, T., Simonsson, S., 2011. SAF-A has a role in transcriptional regulation of Oct4 in ES cells through promoter binding. *Cell. Reprogram.* 13, 13–27. doi:10.1089/cell.2010.0075
- Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., Li, D., Deng, H., 2005. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 934–42. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.058
- Wang, J., Levasseur, D.N., Orkin, S.H., 2008. Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6326–31. doi:10.1073/pnas.0802288105
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W., Orkin, S.H., 2006. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444, 364–8. doi:10.1038/nature05284
- Wang, L., Du, Y., Ward, J.M., Shimbo, T., Lackford, B., Zheng, X., Miao, Y., Zhou, B., Han, L., Fargo, D.C., Jothi, R., Williams, C.J., Wade, P.A., Hu, G., 2014. INO80 facilitates pluripotency

- gene activation in embryonic stem cell self-renewal, reprogramming, and blastocyst development. *Cell Stem Cell* 14, 575–91. doi:10.1016/j.stem.2014.02.013
- Wang, Z.-X., Kueh, J.L.L., Teh, C.H.-L., Rossbach, M., Lim, L., Li, P., Wong, K.-Y., Lufkin, T., Robson, P., Stanton, L.W., 2007a. Zfp206 is a transcription factor that controls pluripotency of embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 2173–82. doi:10.1634/stemcells.2007-0085
- Wang, Z.-X., Teh, C.H.-L., Kueh, J.L.L., Lufkin, T., Robson, P., Stanton, L.W., 2007b. Oct4 and Sox2 directly regulate expression of another pluripotency transcription factor, Zfp206, in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 282, 12822–30. doi:10.1074/jbc.M611814200
- Wu, Q., Chen, X., Zhang, J., Loh, Y.-H., Low, T.-Y., Zhang, W., Zhang, W., Sze, S.-K., Lim, B., Ng, H.-H., 2006. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 281, 24090–4. doi:10.1074/jbc.C600122200
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., Carpenter, M.K., 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 971–4. doi:10.1038/nbt1001-971
- Xu, R.-H., Chen, X., Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* 20, 1261–4. doi:10.1038/nbt761
- Yang, J., Corsello, T.R., Ma, Y., 2012. Stem cell gene SALL4 suppresses transcription through recruitment of DNA methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 287, 1996–2005. doi:10.1074/jbc.M111.308734
- Ye, S., Li, P., Tong, C., Ying, Q.-L., 2013. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *EMBO J.* 32, 2548–60. doi:10.1038/emboj.2013.175
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., Smith, A., 2003. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281–292. doi:10.1016/S0092-8674(03)00847-X
- Yu, H., Kunarso, G., Hong, F.H., Stanton, L.W., 2009. Zfp206, Oct4, and Sox2 are integrated components of a transcriptional regulatory network in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 284, 31327–35. doi:10.1074/jbc.M109.016162
- Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y.-I., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H., Nishinakamura, R., 2009. Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells* 27, 796–805. doi:10.1002/stem.14
- Zhan, M., Riordon, D.R., Yan, B., Tarasova, Y.S., Bruweleit, S., Tarasov, K. V, Li, R.A., Wersto, R.P., Boheler, K.R., 2012. The B-MYB transcriptional network guides cell cycle progression and fate decisions to sustain self-renewal and the identity of pluripotent stem cells. *PLoS One* 7, e42350. doi:10.1371/journal.pone.0042350
- Zhang, J., Tam, W.-L., Tong, G.Q., Wu, Q., Chan, H.-Y., Soh, B.-S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L., Ng, H.-H., Lufkin, T., Robson, P., Lim, B., 2006. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat. Cell Biol.* 8, 1114–23. doi:10.1038/ncb1481
- Zhang, P., Andrianakos, R., Yang, Y., Liu, C., Lu, W., 2010. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J. Biol. Chem.* 285, 9180–9. doi:10.1074/jbc.M109.077958
- Zhang, X., Zhang, J., Wang, T., Esteban, M.A., Pei, D., 2008. Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 283, 35825–33. doi:10.1074/jbc.M803481200
- Zhang, Z.-N., Chung, S.-K., Xu, Z., Xu, Y., 2014. Oct4 maintains the pluripotency of human embryonic stem cells by inactivating p53 through Sirt1-mediated deacetylation. *Stem Cells* 32, 157–65. doi:10.1002/stem.1532

Zhao, D., Wu, Y., Chen, K., 2014. Tbx3 isoforms are involved in pluripotency maintaining through distinct regulation of Nanog transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444, 411–4. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.093