

РЕГУЛЯЦИЯ *in vitro* И *in vivo* ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ, ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГЕРМИНАТИВНЫХ И ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТОК МЫШИ СИГНАЛЬНЫМИ ФАКТОРАМИ СЕМЕЙСТВА TGF β ¹

© 2009 г. О. Ф. Гордеева, Т. М. Никонова, Н. В. Лифанцева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.04.09 г.

Активность специфических сигнальных и транскрипционных факторов определяет выбор клеточной судьбы в нормальном эмбриогенезе и при опухолевой трансформации. Исследованы транскрипционные профили генов-компонентов различных ветвей сигнальных путей факторов семейства TGF β в экспериментальных моделях начальных стадий трехмерной дифференцировки эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и тератокарциномных клеток *in vitro*, а также в тератомах и тератокарциномах, развившихся после трансплантации в организм иммунодефицитных мышей Nude. Проведенный анализ показал, что в исследованных клеточных системах паттерны экспрессии генов *ActivinA*, *Nodal*, *Lefty1*, *Lefty2*, *Tgf β 1*, *Bmp4* и *GDF3* идентичны для плюрипотентных стволовых клеток, в то время как в клетках тератокарциномы обнаружена мРНК всех факторов за исключением гена *Inhibin β_A /ActivinA*. Полученные результаты свидетельствуют, что дифференциальная активность сигнальных путей факторов семейства TGF β контролирует поддержание плюрипотентного статуса, дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток в клетки-предшественники трех зародышевых листков и внезародышевых структур, а также что нормальный паттерн экспрессии факторов семейства TGF β нарушен при опухолевом росте *in vitro* и *in vivo* клеток эмбриональной тератокарциномы.

Ключевые слова: плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, тератокарцинома, эмбриоидное тело, тератома, TGF β , *ActivinA*, дифференцировка.

Плюрипотентные клетки раннего эмбриона дают начало всем типам клеток взрослого организма млекопитающих. Для изучения механизмов раннего развития были получены постоянные линии плюрипотентных стволовых клеток из внутренней клеточной массы бластоцисты млекопитающих, а также из половых клеток различных стадий развития – первичных половых клеток, гоноцитов, сперматогониев, партеногенетически активированных ооцитов (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992; Thomson et al., 1998; Shambloott et al., 1998; Cibelli et al., 2002; Kanatsu-Shinohara et al., 2004; Guan et al., 2006; Lin et al., 2007). Плюрипотентные стволовые клетки – эмбриональные стволовые и эмбриональные герминативные клетки (ЭСК, ЭГК) – способны к неограниченному самообновлению при длительном культивировании и сохраняют способность дифференцироваться в различные типы клеток *in vitro*. Линии плюрипотентных

стволовых клеток при условии сохранения целостности их кариотипа способны обеспечивать развитие всех клеток эмбриона после инъекции их в бластоцисту, включая линию половых клеток (Nagy et al., 1993). Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, созданные экспериментально из соматических клеток взрослого организма с помощью генетических модификаций на основе лентивирусных векторов, также имеют общие свойства с ЭСК и ЭГК (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

Малигнизированные аналоги плюрипотентных стволовых клеток – линии клеток эмбриональной тератокарциномы – были выделены из спонтанных опухолей семенников и яичников у мыши и человека, однако биологические свойства этих линий значительно варьируют, хотя и проявляют некоторые общие черты с плюрипотентными клетками (см. обзор: Andrews, 2002). Существующие литературные данные указывают на то, что появление тератокарциномных клеток в гонадах является результатом нарушения

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-01307а).

механизмов контроля специализации первичных половых клеток из плюрипотентных (Andrews, 2002; Kimura et al., 2003; Gordeeva, 2007). Хромосомные и генные мутации, которые несут тератокарциномные клетки, определяют их способность к дифференцировке в различные типы клеток или полностью ограничивают все дифференцировки, как происходит в случае нуллипотентных клеточных линий (Blelloch et al., 2004).

Исследования механизмов самообновления и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток различного происхождения, различающихся по онтогенетическому и эпигенетическому статусам клеток-источников линий, свидетельствуют о том, что наряду с общими свойствами линий проявляются их различия в генной экспрессии, генетической стабильности и способности дифференцироваться в различные типы клеток (Rohwedel et al., 1996; Allegrucci, Young, 2007; Sharova et al., 2007). Было показано, что онтогенетический статус клеток-источников в меньшей степени оказывает влияние на экспрессию генов в недифференцированных и дифференцирующихся ЭСК и ЭГК, чем их принадлежность к разным генотипам линий мышей (Sharova et al., 2007). Существуют многочисленные данные о различиях в транскрипционных профилях линий ЭСК человека и мыши, которые, тем не менее, не влияют на их общие биологические свойства (Brandenberger et al., 2004; Calhoun et al., 2004; Adewumi et al., 2007; Sharova et al., 2007). В то же время, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные из различных соматических клеток, демонстрируют различный онкогенный потенциал, который, вероятно, зависит от генетического и эпигенетического статусов клеточных источников линий, а также может быть следствием нарушения механизмов репрограммирования (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007; Aoi et al., 2008). Кроме того, наблюдаемая вариабельность свойств линий эмбриональной тератокарциномы указывает на то, что существуют множественные пути регуляции клеточной судьбы при канцерогенезе, которые значительно отличаются от механизмов эмбрионального развития.

Сигнальные пути факторов семейства TGF β , интегрированные в регуляторную сеть клеток, участвуют в различных процессах: в определении судьбы клеток в процессе нормального и патологического развития, а также в контроле пролиферации и клеточной гибели (Miura et al., 2008; Siegel, Massague, 2008). Семейство TGF β насчитывает 40 факторов у человека и других позвоночных, которые, несмотря на структурно-функциональное сходство, обеспечивают тонкую регуляцию клеточных процессов (Derynck, Miyazono, 2008). С другой стороны, один и тот же фактор этого семейства может участвовать в регуляции различных процессов в разных клетках. Одним словом, все факторы семейства TGF β

являются полифункциональными и контекстно-зависимыми, т.е. проявляют свои свойства в зависимости от других факторов в определенных условиях в разных типах клеток (Katagiri et al., 2008; Shilling et al., 2008; Wiater, Vale, 2008). Известно, что факторы этого семейства Nodal, Activin, Lefty, BMP, GDF, TGF β являются ключевыми регуляторами детерминации клеток трех зародышевых листков, линии половых клеток и внезародышевых структур, а также участвуют в регуляции формирования осей тела зародыша и морфогенеза различных зачатков (Beddington, Robertson, 1999; Vincent et al., 2003; Miura et al., 2008). Однако механизмы функционирования сигнальных систем, активирующих специфические гены-мишени, а также взаимодействия различных сигнальных путей в разных типах клеток, остаются далекими от понимания.

Цель нашей работы – изучение различных ветвей сигнальных систем семейства факторов TGF β в процессе дифференцировки ЭСК, ЭГК и эмбриональной тератокарциномы (ЭТК) мыши в трехмерной бессывороточной системе культивирования и после трансплантации их в организм иммунодефицитных мышей линии Nude. В ходе работы на основании сравнительного анализа процессов роста и дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК *in vitro* и *in vivo*, а также анализа их транскрипционных профилей, включающих гены-компоненты различных ветвей сигнальных путей факторов семейства TGF β и гены специфических внутриклеточных факторов, были выявлены общие механизмы регуляции дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, которые существенно отличаются от механизмов, имеющих место в опухолевых тератокарциномных клетках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток in vitro. В работе были использованы ЭСК мыши линии R1, ЭГК мыши линии EGC-10, любезно предоставленные доктором А. Макларен (А. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK), а также ЭТК мыши, сублиния F9 (Банк клеточных культур ИИЦ РАН, СПб). ЭСК, ЭГК и ЭТК культивировали в среде Knockout DMEM, содержащей 1 mM L-глутамин, 0.1 mM заменимых аминокислот, 0.1 mM β -меркаптоэтанола и 15% заменителя телячьей фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, “Gibco”, США). Недифференцированные ЭСК и ЭГК поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши, инактивированных митомицином C (10 мкг/мл) (“Sigma”, США). Для изучения динамики роста ЭСК, ЭГК и ЭТК культивировали в среде с фактором ингибирования лейкемии LIF, 10 нг/мл (“Sigma”, США) или без добавления фактора. Подсчет числа клеток, выросших в среде с LIF и без него, проводили на 5-е сут культивирования. Статистический анализ

различий проводили с использованием парного критерия Стьюдента, а достоверность гипотез о влиянии LIF оценивали с помощью метода анализа вариаций ANOVA.

Для получения стандартных эмбрионидных тел использовали метод “висячей капли”: капли суспензии плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток (500 клеток в капле) помещали на крышку чашки для формирования эмбрионидных тел в течение 3 сут культивирования. Сформированные эмбрионидные тела (ЭТ1) собирали из капель, переносили в новые чашки для суспензионного культивирования в течение последующих 5 сут (ЭТ5). Таким образом, общее время культивирования и дифференцировки клеток в описанных условиях составляло 7 сут.

Получение тератом и тератокарцином *in vivo*. Для получения экспериментальных тератом и тератокарцином в качестве реципиентов были использованы иммунодефицитные мыши линии Nude (Nu/Nu) в возрасте 5–7 мес из питомника лабораторных животных НПП “Пушино” ФИБХ РАН (стоковая линия получена из питомника Charles Rivers, США). Экспериментальным животным трансплантировали под капсулу почки 20 эмбрионидных тел (общее число клеток 200–250 тыс.), сформированных на 3-и сут в “висячих каплях”. Через 6 нед. после инъекции ЭСК и ЭГК животных умерщвляли и извлекали развившиеся тератомы. Сформированные тератокарциномы извлекали через 3 нед. после инъекции клеток, так как их рост происходил значительно быстрее по сравнению с плюрипотентными стволовыми клетками. Образцы тератом и тератокарцином использовали для дальнейших исследований. Для гистологических исследований опухолевый материал фиксировали в 10%-ном формалине, обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин для приготовления срезов. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а затем исследовали с помощью системы анализа микроскопических изображений Leica DMRXA2 (Германия).

Гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы. Клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (“Sigma”, США) в течение 15–20 мин. После промывки в фосфатно-солевом буфере образцы инкубировали в растворе, содержащем 10 мл 0.02 М буфера *трис*-HCl (pH 8.6), 1 мг нафтола AS-BI-фосфата и 5 мг красителя Fast Red- TR (“Sigma”, США), в течение 60 мин при температуре 37°C.

Иммуногистохимический анализ. Выявление экспрессии специфических белков проводили с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере. Для ингибирования неспецифического связывания и пермеабиллизации клеточные препараты инкубировали в растворе 0.3%-ного Тритона X-100 и 4%-ного сывороточного

альбумина быка (фракция V, “Sigma”, США) в фосфатном буфере. Для выявления экспрессии α -фетопротейна и транскрипционных факторов Oct4, GATA4, Brachyury, Pitx2 использовали антитела к этим белкам в разведениях 1 : 150, рекомендованных производителем (“Santa Cruz Biotechnology”, США; “Abcam”, Великобритания; “Biocompare”, США). Для иммунофлуоресцентной детекции использовали соответствующие вторичные антитела против кроличьих, козьих и мышиных иммуноглобулинов, конъюгированные флуорохромами Alexa 488 и 596, в разведении 1 : 900 (“Molecular Probes”, США). Препараты докрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33342 для визуализации клеточных ядер. Контрольные препараты обрабатывали так же, как и опытные образцы, исключая добавление первичных антител. В качестве отрицательного клеточного контроля были использованы первичные эмбриональные фибробласты мыши. Регистрацию специфического окрашивания и фотографирование препаратов проводили с использованием системы анализа изображений Leica DMRXA2.

Анализ генной экспрессии. Для анализа экспрессии изучаемых генов выделяли тотальную РНК из недифференцированных и дифференцированных ЭСК, ЭГК, ЭТК и материала тератом и тератокарцином, используя смесь Trizol (“Invitrogen”, США). Все образцы обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”, США) по протоколу производителя для предотвращения контаминации препарата ДНК, каждый образец проверяли на эффективность обработки ДНКазой в реакции амплификации без синтеза кДНК на матрицах РНК. Синтез кДНК проводили на матрицах мРНК с использованием обратной транскриптазы M-MuLV и олиго(dT)₁₈-праймеров (“Fermentas”, Литва). Для реакции синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК для каждого образца. ПЦР-анализ экспрессии изучаемых генов проводили на амплификаторе “Eppendorf” (Германия) по следующей программе: предварительная денатурация: 94°C – 5'; отжиг праймеров: 58°C – 45"; удлинение цепи: 72°C – 45"; денатурация 94°C – 45", 35 циклов; завершающее удлинение цепи: 72°C – 5'. Специфические праймеры были сконструированы на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GeneBank, MGI и Ensemble (таблица). Продукты ПЦР-анализа фракционировали в агарозном геле. Результаты электрофореза регистрировали с помощью трансиллюминатора (“Bio-Rad”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе начальных стадий дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток и клеток тератокарциномы в трехмерной системе культивирования формируются клеточные сфероиды – эмбрионидные тела. Для изучения роли различных сигнальных факторов семейства TGF β в регуляции дифференцировки плюрипотентных стволо-

Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии

Ген	№ последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>Oct-4/Pou5f1</i>	NM_013633	5'tggagactttgcagcctgag3' 5'catactcttctcgttgggatta3'	621
<i>Nanog</i>	NM_028016	5'caagcgggtggcagaaaaac3' 5'tggataagagcaccgactg3'	702
<i>Gata6</i>	NM_010258	5'gccaaactgtcacaccacaac3' 5'ctgcaaaagcccatctcttc3'	648
<i>Gata4</i>	NM_008092	5'ctgtgccaaactgccagacta3' 5'gcgatgtctgagtgcagga3'	446
<i>Afp</i>	NM_007423	5'agctcagcgaggagaaatgg3' 5'caaaaggcccagaaatctg3'	350
<i>BryT</i>	NM_009309	5'atgaaggcgctgtgtcttt3' 5'ttgagagctgttccgatga3'	496
<i>Pitx2</i>	NM_001042504 NM_001042502 NM_011098	5'gcggggaaaacatactctga3 5'tcagttcacggactctcc3'	537
<i>Nestin/Nes</i>	NM_016701	5'ggagagtcgcttagaggtgcag3' 5'gagagttctcagcctccagcag3'	278
<i>Pax6</i>	NM_013627	5'cagaagatcgtagagctagc3' 5'gaagaactctgtttattgatgac3'	324/295
<i>ActivinA/Inhba</i>	NM_008380	5'acgacttttctgccagat3' 5'cagtgtcttctggtgtgc3'	426
<i>Nodal</i>	NM_013611	5'actctccaagtggctaaagg3' 5'ttggtatcgtttcagcaggc3'	451
<i>Lefty1</i>	NM_010094	5'gctgatgtggaaggatggt3' 5'gtgtggggacagcctcttt3'	282
<i>Lefty2</i>	NM_177099	5'ctggacctcaaggactacgg3' 5'tctctgaggcaacacactgc3'	244
<i>Tdgf1</i>	NM_011562	5'ttgggaccagaaagaacctg3' 5'tgcacagggaacactcttg3'	242
<i>Tgfb1</i>	NM_011577	5'taccttgtaaccggctgct3' 5'gggtcccagacagaagtgg3'	435
<i>Bmp4</i>	NM_007554	5'gggaaccgggcttgagta3' 5'tcggctgattctgacatgct3'	469
<i>Gdf3</i>	NM_008108	5'gccttcacctcacaggttcc3' 5'agggacagaccgcagaaaaa3'	406
<i>Acvr1b</i>	NM_007395	5'agacgtccaggatctcgtc3' 5'ctgggtccagggtgccattat3'	302
<i>Acvr2b</i>	NM_007397	5'gcttcaggaggtggtgtcc3' 5'gagcaggtccacattggtga3'	241
<i>Tgfb1</i>	NM_009370	5'aaatggcggggagaagaagt3' 5'tgggcaatagctgttttcc3'	326
<i>Bmpr1a</i>	NM_009758	5'attcaccgaaagcccagcta3' 5'acctgccgaacctctgaat3'	385
<i>Smad2</i>	NM_010754	5'tgagctcaaggcaatcgaaa3' 5'tccaggtggtgtgtttctg3'	250
<i>Smad4</i>	NM_008540	5'atgagcgggtgtgtcacct3' 5'atactggccggctgactgt3'	283
<i>Smad5</i>	NM_008541	5'gttggggaagcttttcatgc3' 5'gcagctgctgggatcttac3'	288
<i>Hprt</i>	NM_013556	5'-gctggtgaaaaggacctct-3' 5'-cacaggactagaacacctgc-3'	249

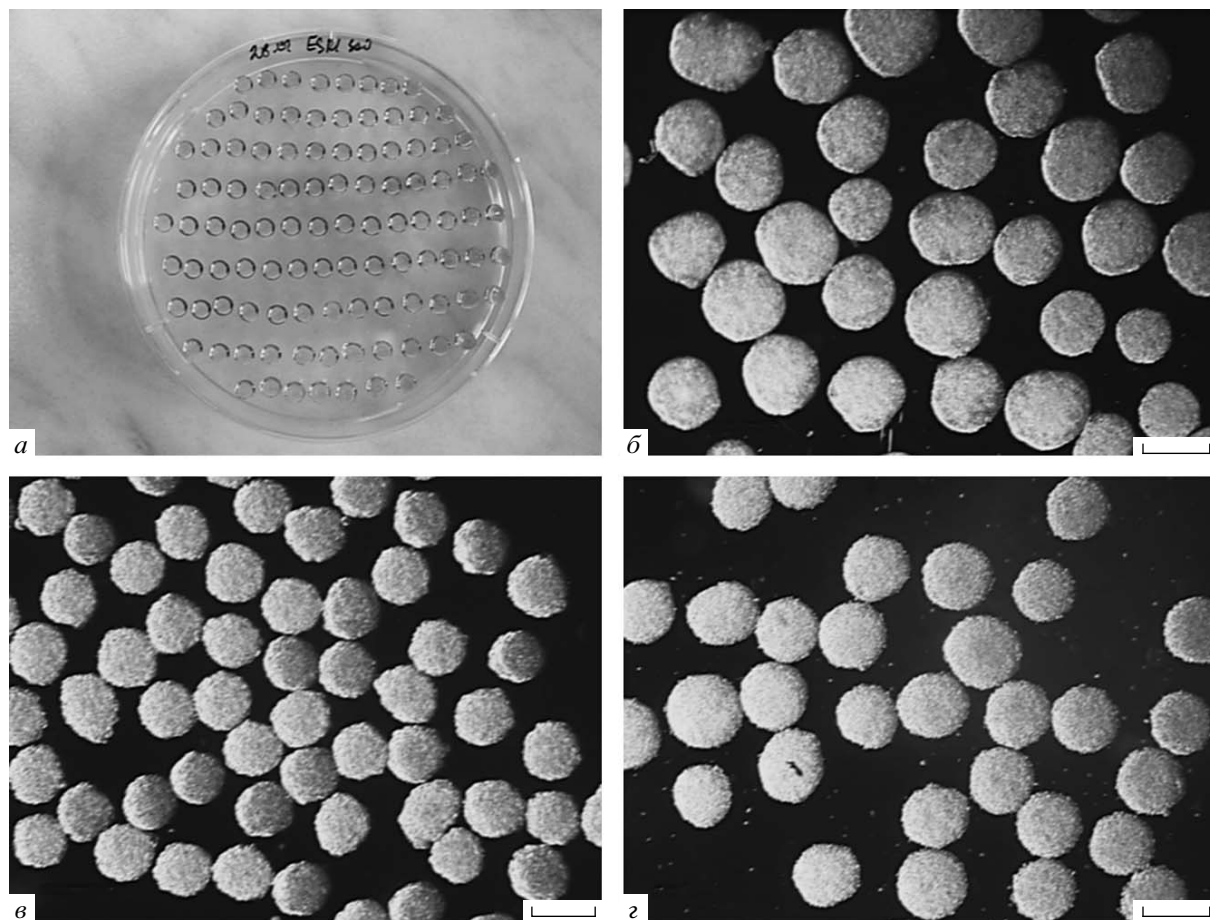


Рис. 1. Формирование стандартизованных эмбриоидных тел из эмбриональных стволовых (ЭСК), эмбриональных герминативных (ЭГК) и эмбриональных тератокарциномных клеток (ЭТК): *a* – образование эмбриоидных тел из клеточной суспензии в “висячей капле”; *б–г* – эмбриоидные тела, сформированные ЭСК, ЭГК и ЭТК на 3-и сут культивирования. Масштаб: 200 мкм.

вых клеток и клеток тератокарциномы в нашей работе была использована стандартизованная культуральная система с применением среды установленного химического состава без включения переменных компонентов – факторов фетальной сыворотки. Вместо фетальной сыворотки в среду для культивирования был включен белковый заменитель сыворотки (Knockout Serum Replacement), содержащий бычий альбумин, аминокислоты, липиды, витамины, инсулин и трансферрин (Price et al., 1998; Garcia-Gonzalo, Izpisua Belmonte, 2008). Этот подход позволяет нам корректно исследовать эффекты различных сигнальных белков, экспрессирующихся в изучаемых клетках. Благодаря применению технологии формирования стандартизованных эмбриоидных тел с помощью метода культивирования клеток в “висячей капле” и далее в планшетах для суспензионного культивирования все получаемые эмбриоидные тела одной клеточной линии имели практически одинаковые размеры и развивались синхронно (рис. 1). Поскольку целью нашей работы

являлось изучение механизмов ранних стадий трехмерной дифференцировки плюрипотентных и опухолевых клеток, принципиальное значение для корректной интерпретации экспериментальных данных имела максимальная стандартизация морфологических параметров эмбриоидных тел.

Изучение дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК in vitro. Известно, что одним из ключевых факторов, регулирующих пролиферацию и блокирующих дифференцировку ЭСК мыши *in vitro*, является фактор ингибирования лейкемии LIF. Однако, несмотря на интенсивные исследования механизмов плюрипотентности, мало что известно о механизмах, в которых он участвует, и о взаимодействиях их с другими сигнальными путями в плюрипотентных стволовых клетках и клетках тератокарцином. Для установления роли фактора LIF в регуляции процессов самообновления недифференцированных ЭСК, ЭГК и ЭТК мы исследовали динамику их роста при культивировании в среде с LIF и без него.

В присутствии LIF в среде для культивирования ЭСК и ЭГК поддерживаются в недифференциро-

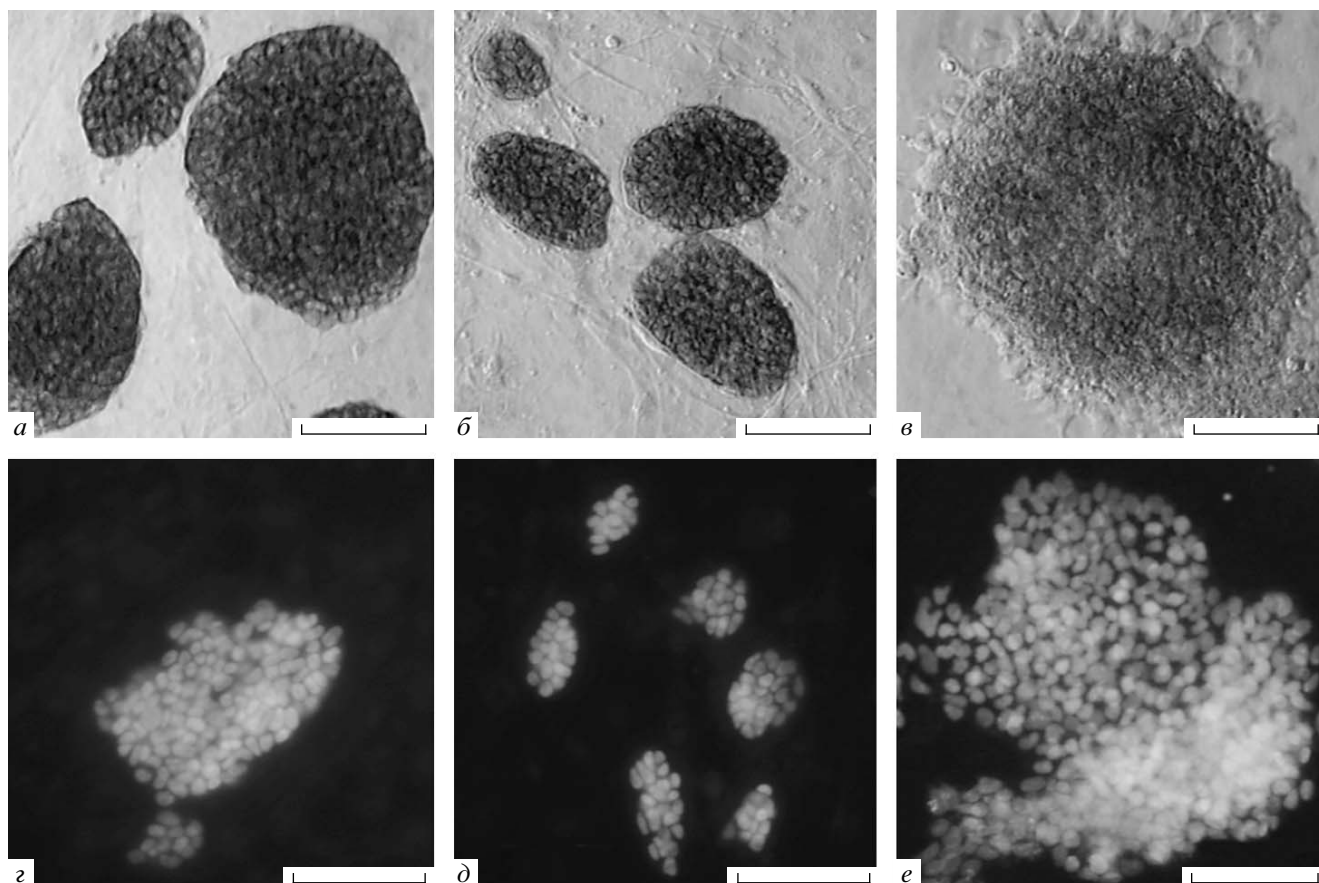


Рис. 2. Активность щелочной фосфатазы (а-в) и экспрессия специфического транскрипционного фактора Oct4 (г-е) в недифференцированных эмбриональных стволовых (а, г), эмбриональных герминативных клетках (б, д) и клетках эмбриональной тератокарциномы (в, е) мыши. Масштаб: 100 мкм.

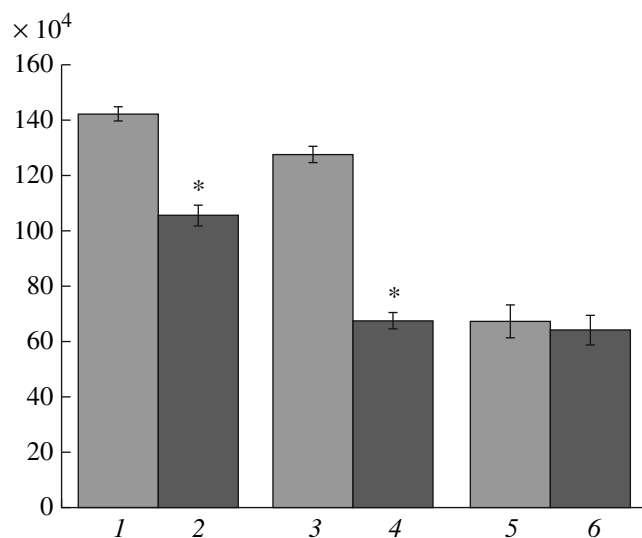


Рис. 3. Рост эмбриональных стволовых (1, 2), эмбриональных герминативных (3, 4) и тератокарциномных клеток (5, 6) в среде определенного химического состава в присутствии (1, 3, 5) и в отсутствие (2, 4, 6) фактора ингибирования лейкемии LIF. По оси ординат – число клеток на 5-е сут культивирования; * различия статистически достоверны при $p < 0.01$.

ванном состоянии, во всех клетках выявляется активность щелочной фосфатазы и экспрессия транскрипционного фактора Oct4 (рис. 2). При подсчете абсолютного числа ЭСК, ЭГК и ЭТК, растущих в среде с LIF и без него, было установлено, что в отсутствие фактора LIF в течение 5 сут культивирования рост ЭСК статистически достоверно снижается на 26%, а рост ЭГК – на 47% по сравнению с контрольными вариантами в присутствии LIF (рис. 3), при этом в популяциях ЭСК и ЭГК, растущих в среде без LIF, появляются дифференцирующиеся клетки, в которых активность щелочной фосфатазы не обнаружена (рис. 4). В то же время не было выявлено влияния фактора LIF на рост ЭТК *in vitro*, так как число клеток в популяциях, растущих в присутствии и в отсутствие LIF, статистически достоверно не различалось (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что одной из особенностей тератокарциномных клеток изучаемой сублинии F9 является независимость механизмов регуляции их самообновления и дифференцировки от фактора LIF. С другой стороны, при сравнении динамики роста ЭСК и ЭГК можно заключить, что снижение роста ЭГК при отсутствии в среде фактора LIF выражено зна-

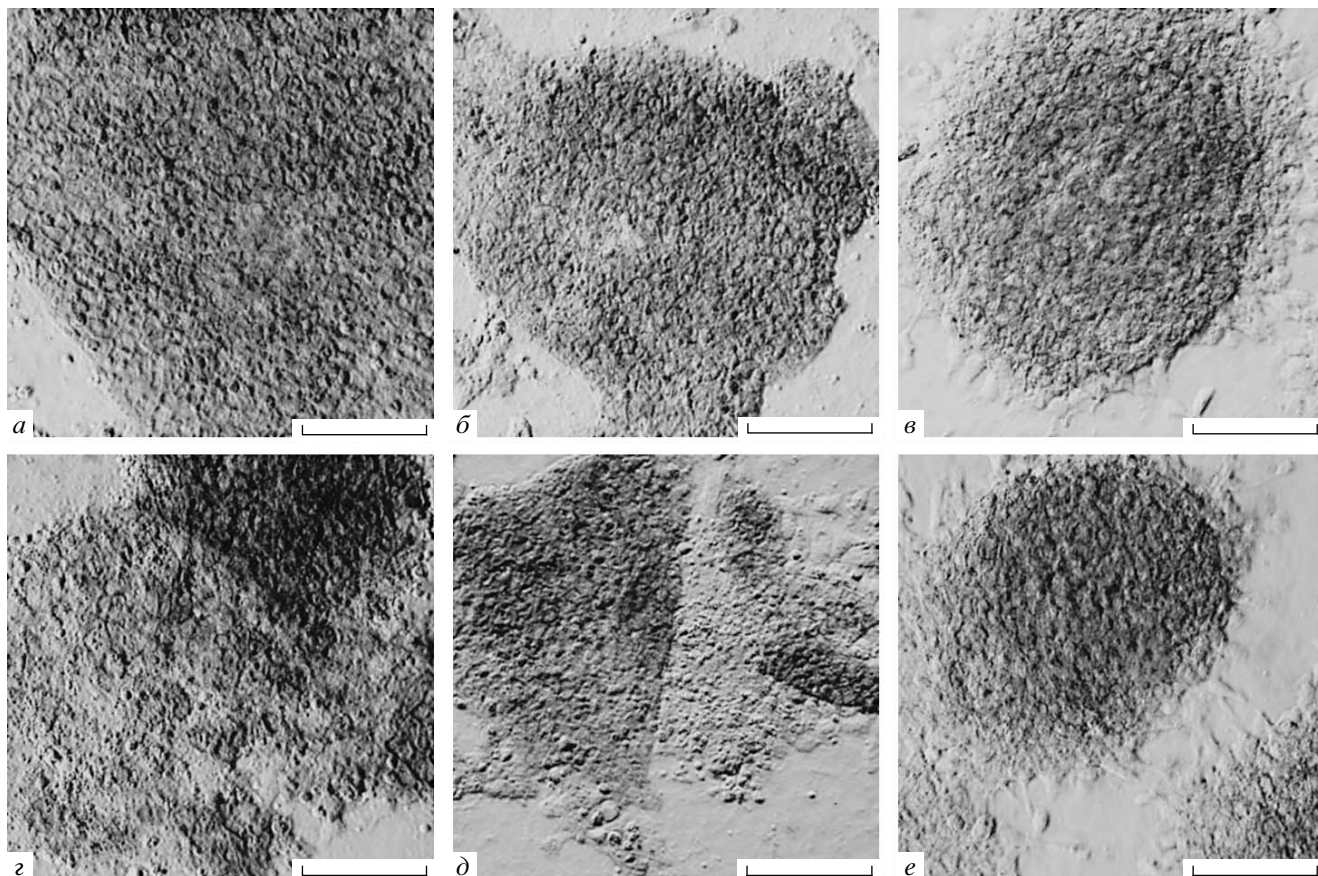


Рис. 4. Активность щелочной фосфатазы в эмбриональных стволовых (*a, г*), эмбриональных герминативных клетках (*б, д*) и клетках эмбриональной тератокарциномы (*в, е*), растущих в среде определенного химического состава в присутствии и в отсутствие фактора ингибирования лейкемии LIF соответственно. Масштаб: 100 мкм.

чительно сильнее, чем у ЭСК. Обращает на себя внимание и тот факт, что абсолютное число ЭСК и ЭГК, выросших на 5-е сут в бессывороточной среде с LIF, значительно превышает число ЭТК ($142.3 \pm 2.4 \times 10^4$; $127.9 \pm 2.9 \times 10^4$ и $68.0 \pm 5.6 \times 10^4$ соответственно). Таким образом, можно утверждать, что механизмы регуляции самообновления и начальных стадий дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК имеют значительные различия.

Далее для инициации трехмерной дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК мы культивировали их в “висячих каплях” в течение 3 сут в среде, не содержащей LIF. Морфологический анализ показал, что все сформированные эмбрионидные тела (ЭТ1) состояли из однотипных клеток, в которых была выявлена высокая активность щелочной фосфатазы. На 5-е сут культивирования эмбрионидные тела (ЭТ5), образованные ЭСК и ЭГК, содержали на внешней поверхности небольшое число клеток внезародышевой энтодермы, не экспрессирующих щелочную фосфатазу, но экспрессирующих транскрипционный фактор *Gata4* и α -фетопроtein (рис. 5). Появление этих факторов в поверхностных клетках эмбрионидных тел указывает на про-

исходящую дифференцировку клеток париетальной и висцеральной внезародышевой энтодермы. Следует отметить, что наибольшее число клеток внезародышевой энтодермы присутствовало в ЭСК, в то время как в ЭГК и ЭТК их было значительно меньше, а α -фетопроtein-позитивные клетки в ЭГК и ЭТК не были выявлены. С помощью гистохимического и иммунофлуоресцентного анализа также было обнаружено, что и на 5-е сут культивирования большинство клеток в ЭТ5 всех трех линий все еще экспрессировало щелочную фосфатазу и транскрипционный фактор *Oct4*. Полученные результаты наглядно демонстрируют, что даже на 7-е сут дифференцировки в бессывороточной среде в отсутствие фактора LIF (ЭТ5) основная часть популяции как ЭСК и ЭГК, так и ЭТК остается в недифференцированном состоянии. Эти данные свидетельствуют и о том, что в регуляции самообновления плюрипотентных стволовых клеток помимо сигнального каскада LIF/Stat3 участвуют и другие сигнальные пути, которые эффективно ингибируют ранние стадии дифференцировки.

Для определения роли факторов семейства TGF β в регуляции самообновления и дифференци-

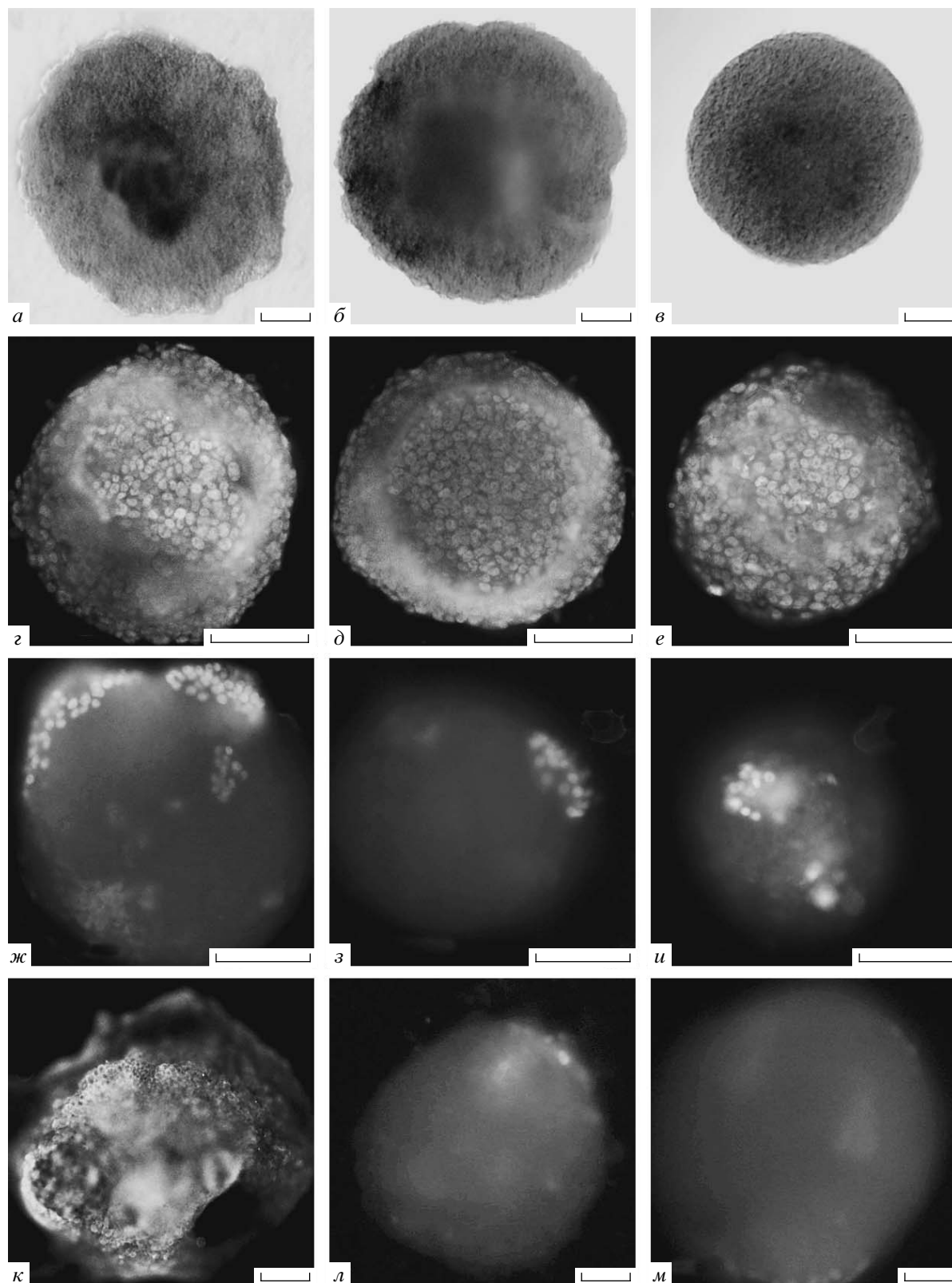


Рис. 5. Экспрессия специфических факторов в эмбрионидных телах, образованных эмбриональными стволовыми (*а, з, ж, к*), эмбриональными герминативными клетками (*б, д, з, л*) и эмбриональными клетками тератокарциномы (*в, е, и, м*), на 5-е сут культивирования в трехмерной бессывороточной системе культивирования (ЭТ5). *а-в* – активность щелочной фосфатазы, экспрессия: транскрипционного фактора Oct4 (*з-е*), Gata4 (*ж-и*) и α -фетопротейна (*к-м*). Масштаб: 100 мкм.

ровки ЭСК, ЭГК и ЭТК были исследованы профили экспрессии генов, являющихся компонентами сигнальных путей, – факторов *ActivinA*, *Nodal*, *Lefty1*, *2*, *GDF3*, *TGFβ1*, *BMP4*, кофактора *Tdgf1/Cripto*, их рецепторов *Actr1*, *Actr2*, *Bmpr1*, *Tβr1*, белков-трансдюсеров сигнала *Smad2,4,5*, а также специфических и транскрипционных факторов *Ost4*, *Nanog*, *Gata4,6*, *Afp*, *Bry*, *Pitx2*, *Nestin*, *Pax6*, дифференциально экспрессирующихся в клетках-предшественниках трех зародышевых листков (рис. 6). Сравнительный анализ транскрипционных профилей показал, что в процессе дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК в бессывороточных условиях в трехмерной культуре происходят незначительные изменения в уровнях экспрессии генов *Ost4* и *Nanog*, кодирующих специфические транскрипционные факторы для плюрипотентных клеток, что соответствует морфологическим наблюдениям. С другой стороны, было установлено, что экспрессия мРНК генов *Gata4*, *6*, *Afp*, специфических для внезародышевой висцеральной и париетальной энтодермы, детектируется в эмбрионидных телах, образованных ЭСК, в то время как в эмбрионидных телах, сформированных ЭГК и ЭТК, выявлен только очень низкий уровень транскриптов этих генов. Низкий базальный уровень транскрипции генов *Bry* и *Pitx2*, специфических для ранних мезодермальных предшественников, также был выявлен во всех эмбрионидных телах, однако экспрессия белков *Bry* и *Pitx2* не была обнаружена иммуногистохимическим методом ни в одной линии ни на одной стадии. В то же время в процессе дифференцировки ЭСК и ЭГК в эмбрионидных телах повышался уровень экспрессии мРНК генов *Nestin* и *Pax6*, характерных для ранних клеток нейроэктодермы. Интересно, что в ЭТК выявлена экспрессия двух транскриптов гена *Pax6*, соответствующих двум сплайс-вариантам, но экспрессия мРНК гена *Nestin* обнаружена лишь на низком базальном уровне.

При анализе транскрипционных профилей мы не выявили существенных изменений уровней экспрессии мРНК большинства генов сигнальных лигандов, их рецепторов и трансдюсеров, за исключением гена *Inhibin β_A*, кодирующего субъединицы фактора *ActivinA*. Экспрессия гена *Inhibin β_A/ActivinA* резко снижается в эмбрионидных телах, сформированных ЭСК и ЭГК, по сравнению со стадией недифференцированных клеток и вообще отсутствует в клетках тератокарциномы на всех изученных стадиях. Необходимо отметить, что изменения в экспрессии большинства сигнальных факторов и специфических транскрипционных факторов находились в строгой корреляции друг с другом. В этой связи можно предположить, что существенное изменение экспрессии гена *Inhibin β_A/ActivinA* является ранним иницирующим событием в ходе спонтанной трехмерной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, так как в данном случае наблюдается прямая корреляция между экспрессией мРНК гена

Inhibin β/ActivinA, недифференцированными ЭСК и ЭГК и присутствием в среде фактора LIF. Напротив, клетки тератокарциномы демонстрируют независимость механизмов регуляции самообновления и от фактора LIF, и от фактора *ActivinA*. В то же время, как показывают результаты нашего исследования, в бессывороточных условиях культивирования ЭТК дифференцировались только в клетки первичной внезародышевой энтодермы и не были способны к дифференцировке в клетки-предшественники трех зародышевых листков. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в отсутствие экзогенных сигнальных белков-индукторов регуляция начальных стадий дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК осуществляется эндогенными синтезируемыми и секретируемыми факторами семейства *TGFβ*, баланс которых в локальных клеточных окружениях определяет направление дифференцировки.

Изучение дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК in vivo. В экспериментах по изучению механизмов самообновления и дифференцировки ЭСК, ЭГК и ЭТК *in vivo* в организме иммунодефицитных мышей линии *Nude* все развившиеся тератомы и тератокарциномы были предметом гистологического и молекулярно-генетического анализа. При изучении гистологического состава тератом, сформированных ЭСК и ЭТК, были выявлены разнообразные клеточные структуры, принадлежащие к производным трех зародышевых листков. Мезодермальные производные представлены клетками хряща, гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры, соединительной и жировой тканями; эктодермальные и энтодермальные производные – в основном трубчатыми структурами, образованными соответственно сливающимися ороговевающим эпителием или секретирующим и реснитчатым эпителием кишечного и респираторного типа (рис. 7). Наряду с дифференцированными клетками во всех тератомах были также выявлены кластеры недифференцированных клеток различного размера. Тератокарциномные опухоли, образованные ЭТК F9, содержали только недифференцированные клетки и были хорошо васкуляризованы (рис. 7).

Наши наблюдения показали, что динамика роста ЭСК, ЭГК и ЭТК в организме иммунодефицитных мышей в виде солидных опухолей с трехмерной организацией имеет ряд различий. Так, было отмечено, что рост ЭТК *in vivo* был значительно более интенсивным, чем рост ЭСК и ЭГК. На 3-й нед. экспериментов тератокарциномы достигали значительных размеров, в то время как тератомы, образованные ЭСК и ЭГК, только начинали формироваться и дифференцироваться. Это можно объяснить тем, что в тератомах дифференцирующиеся клетки значительно снижают темп пролиферации или совсем прекращают делиться, в то время как в тератокарциномах про-

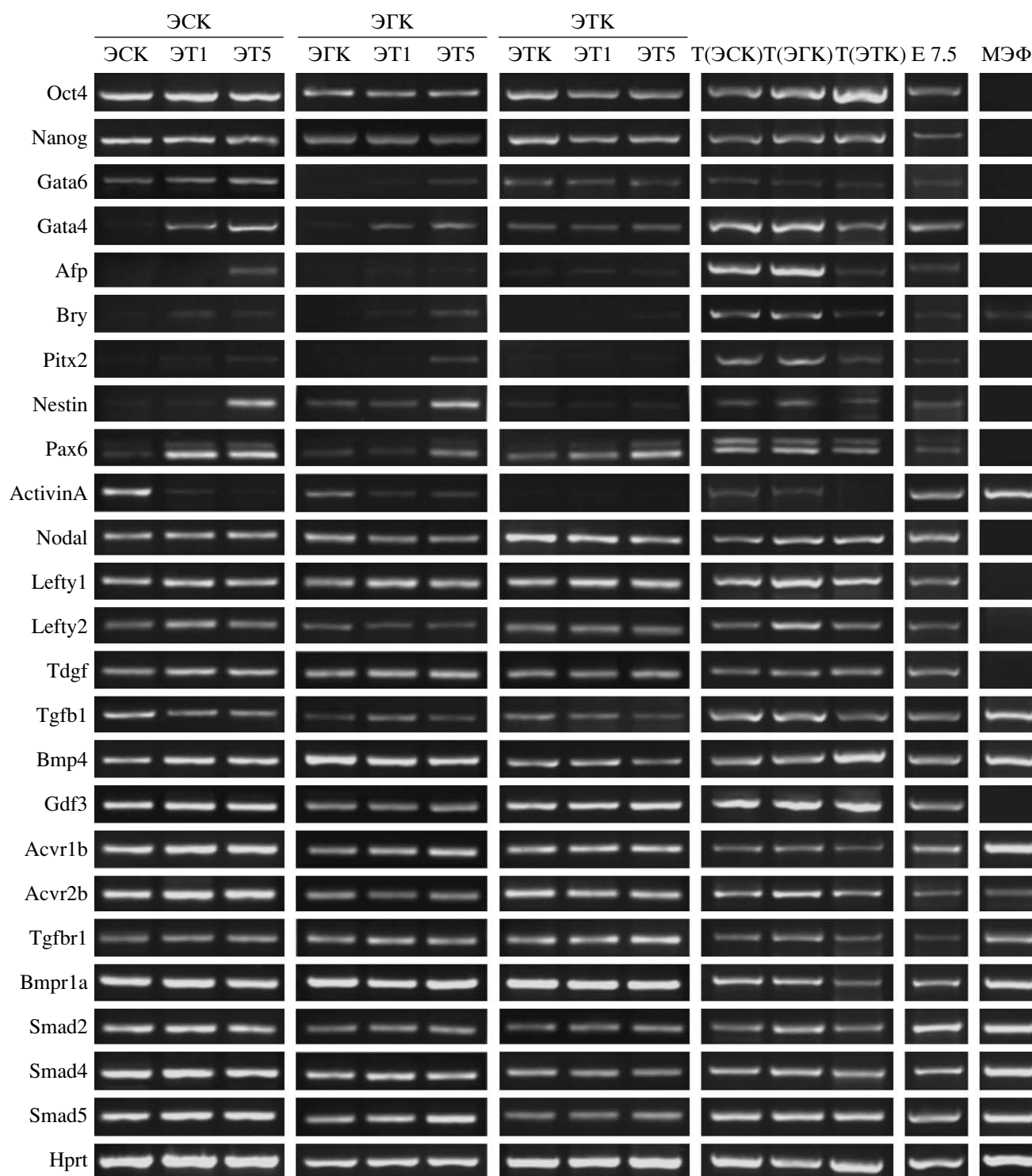


Рис. 6. Транскрипционные профили эмбриональных стволовых (ЭСК), эмбриональных герминативных клеток (ЭГК) и эмбриональных клеток тератокарциномы (ЭТК), сформированных ими *in vitro* эмбрионидных тел, а также образованных *in vivo* тератом и тератокарцином, которые включают гены-компоненты сигнальных путей семейства TGF β и специфические гены, активные во внезародышевой энтодерме и ранних клетках-предшественниках трех зародышевых листков. Обозначения: ЭТ1, ЭТ5 – сформированные в суспензионной культуре эмбрионидные тела на 1-е и 5-е сут культивирования соответственно; Т(ЭСК), Т(ЭГК), Т(ЭТК) – тератомы и тератокарцинома, образованные ЭСК, ЭГК и ЭТК после трансплантации под капсулу почки иммунодефицитных мышей; E7.5 – кДНК эмбриона мыши на стадии 7.5 сут развития (положительный контроль); МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши (негативный контроль).

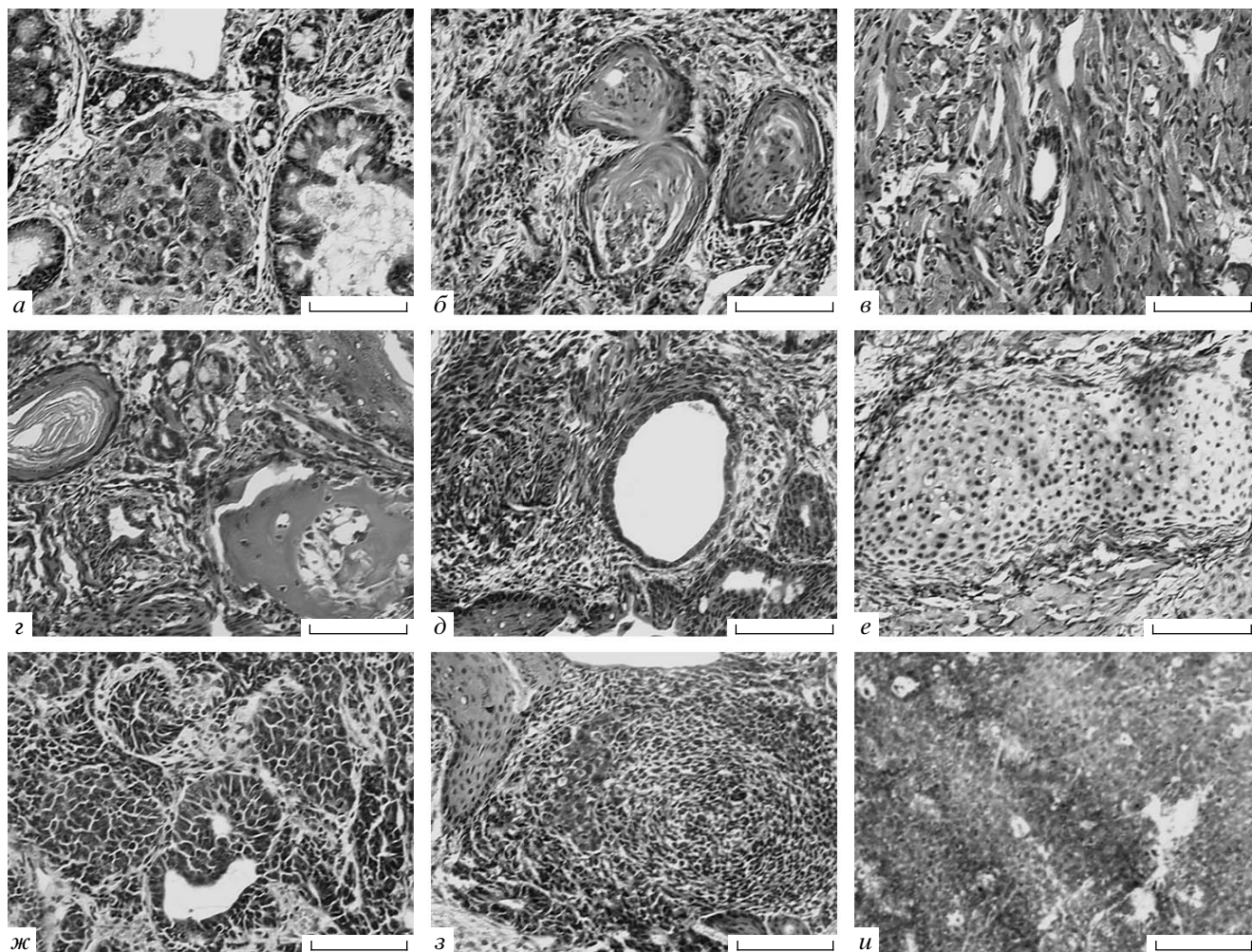


Рис. 7. Гистологический анализ тератом и тератокарцином, сформированных эмбриональными стволовыми (ЭСК) (а–в, ж), эмбриональными герминативными клетками (ЭГК) (г–е, з) и эмбриональными клетками тератокарциномы (ЭТК) (и) после трансплантации их под капсулу почки иммунодефицитных мышей. Недифференцированные клетки присутствуют в тератомах, образованных ЭСК (ж), ЭГК (з) и ЭТК (и). В тератомах ЭСК и ЭТК развиваются различные трехмерные клеточные структуры, принадлежащие к производным трех зародышевых листков. Мезодермальные производные представлены клетками хряща (е), гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры (в, д, е), соединительной и жировой тканями (а, б, г, д); эктодермальные и энтодермальные производные – трубчатыми структурами, образованными слущивающимся ороговевающим эпителием (б, г) или секретирующим и реснитчатым эпителием кишечного и респираторного типа (а, д). Масштаб: 100 мкм.

должается активное деление недифференцированных опухолевых клеток, имеющих значительно меньший по продолжительности клеточный цикл, чем у дифференцирующихся клеток.

Исследование транскрипционных профилей тератом и тератокарцином, сформированных ЭСК, ЭГК и ЭТК, показало, что по наличию транскриптов изучаемых генов они соответствуют профилям соответствующих эмбрионных тел на 7-е сут культивирования *in vitro* (рис. 6). В тератомах и тератокарциномах была обнаружена экспрессия мРНК генов *Oct4* и *Nanog*, специфических для плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток, что также подтверждает данные гистологического анализа о присутствии недифференцированных клеток

во всех типах экспериментальных опухолей. В связи с тем, что развитие тератом происходило в течение 6 нед., дифференцировка плюрипотентных клеток в различные типы клеток была значительно более продвинута по сравнению с экспериментами *in vitro*, поэтому выявление экспрессии генов *Gata4*, *6*, *Pitx2*, *Raxb* в тератомах может указывать не только на наличие клеток внезародышевой энтодермы и ранних мезодермальных клеток, но также и на присутствие других типов дифференцированных клеток, экспрессирующих эти гены (например, предшественников кардиомиоцитов и различных нейральных производных). Тем не менее, как показывают результаты анализа, экспрессия большинства изучаемых сигнальных факторов семейства TGF β , актив-

ных в недифференцированных ЭСК и ЭГК, а также в эмбрионидных телах, продолжается и на более поздних стадиях дифференцировки *in vivo*. Однако их экспрессия, как и в случае транскрипционных факторов, может присутствовать не только в недифференцированных клетках, но и в других клеточных типах, в том числе и тех, которые трудно идентифицировать морфологически. Сравнение транскрипционных профилей генов-компонентов сигнальных путей факторов семейства TGF β в эмбрионидных телах и тератомах, формируемых ЭСК и ЭГК, с транскрипционным профилем, который был получен для тотального эмбриона мыши на стадии ранней гастрюляции (E7.5), также показало их значительное сходство (рис. 6).

Анализ транскрипционных профилей тератоканциномы показал, что они идентичны таковым для недифференцированных ЭТК и эмбрионидных тел, которые они формировали *in vitro*, но не тератомам, развившимся из ЭСК и ЭГК. Экспрессия мРНК генов *Afp*, *Bry*, *Nestin*, *Pitx2* и *Inhibin β_A /ActivinA* детектируется лишь на слабом базальном уровне в клетках тератоканцином, развившихся *in vivo*, как и в случае ЭТК, растущих в бессывороточных условиях в трехмерной системе культивирования *in vitro* (рис. 5). Как показывают результаты нашего исследования, никаких изменений в экспрессии специфических транскрипционных факторов, а также генов-компонентов сигнальных путей факторов семейства TGF β не происходит при трехмерно организованном опухолевом росте клеток тератоканциномы мыши F9 в организме иммунодефицитных мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Линии плюрипотентных стволовых и тератоканциномных клеток являются уникальными клеточными моделями, позволяющими исследовать роль сигнальных и специфических транскрипционных факторов в регуляции поддержания плюрипотентного статуса клеток и детерминации клеточной судьбы плюрипотентных клеток, а также их опухолевых аналогов. Изучение этих проблем в значительной мере затруднено для ранних эмбрионов по ряду методических ограничений, связанных с небольшим числом клеток на ранних стадиях эмбриогенеза млекопитающих. В нашей работе были использованы линии плюрипотентных стволовых клеток различного происхождения – ЭСК и ЭГК, различающиеся по онтогенетическому и эпигенетическому статусу клеток-источников линий, а также линия эмбриональной тератоканциномы, несущая генетические повреждения. Наши исследования были сфокусированы на изучении сигнальных путей, которые активированы в этих линиях при переходе их к дифференцировке, чтобы на основании сравнительного анализа транскрипционных профилей выявить основные принципы регуляции поддержания плюрипотентного статуса и начальных этапов диф-

ференцировки с участием различных ветвей сигнальных путей факторов семейства TGF β . Для корректной интерпретации экспериментальных данных были использованы бессывороточные стандартные среды, чтобы исключить влияние экзогенных факторов фетальной сыворотки, присутствующей в традиционных системах культивирования. В работе также были применены трехмерные системы культивирования *in vitro* и роста *in vivo*, так как в таких системах наиболее точно воспроизводятся события раннего эмбриогенеза. Моделирование процессов дифференцировки *in vitro* и *in vivo* являлось комплексным подходом, так как возможности моделирования дифференцировки плюрипотентных клеток *in vitro* ограничены, однако более точно регулируются в ходе эксперимента; в то же время изучение формирования экспериментальных тератом позволяет исследовать дифференцировку клеток на более продвинутых стадиях. Тератогенез, инициированный трансплантацией ЭСК и ЭГК в организм иммунодефицитных животных, представляет собой модель незавершенного и раскоординированного эмбриогенеза, которая демонстрирует, что дифференцировка плюрипотентных клеток происходит в асинхронной манере с сохранением некоторого количества недифференцированных клеток, природа которых исследована недостаточно. Существует предположение, что плюрипотентные клетки, остающиеся недифференцированными в процессе дифференцировки *in vitro*, а также и *in vivo* в тератомах, представляют собой генетически аномальные клетки, вступившие на путь трансформации и малигнизации. Другая точка зрения поддерживает гипотезу о длительно самоподдерживающейся популяции плюрипотентных клеток, которые очень медленно дифференцируются. Для прояснения этого вопроса мы исследовали транскрипционные профили, включающие специфические транскрипционные факторы – маркерные для ранних эмбриональных клеток – как недифференцированных ЭСК, ЭГК и ЭТК, так и дифференцирующихся *in vitro* и *in vivo* плюрипотентных клеток. При анализе экспрессии этих генов мы проводили параллельный мониторинг изменений в экспрессии сигнальных лигандов семейства TGF β , их рецепторов и внутриклеточных трансдюсеров сигнала для выявления корреляций.

Обнаруженное нами сходство транскрипционных профилей клеточных линий на разных стадиях дифференцировки и профиля экспрессии эмбриона мыши на ранней стадии гастрюляции E7.5 указывает на то, что клетки самых ранних предшественников экто-, энто- и мезодермы дифференцируются в эмбрионидных телах ЭСК и ЭГК в течение 1-й нед. культивирования в бессывороточной среде, не содержащей фактора LIF. Необходимо отметить, что, несмотря на сходство временных параметров, морфогенетические процессы при формировании эмбрионидных тел в данной системе культивирования протекали значительно

медленнее, чем в эмбрионе, а в эмбрионидных телах ЭТК на этой стадии не было обнаружено никаких изменений ни в морфологии, ни в транскрипционных профилях. Как было отмечено ранее, экспрессионные профили изучаемых генов в тератомах и тератокарциномах соответствовали эмбрионидным телам на 7-е сут культивирования (рис. 5, ЭТ5) и профилю эмбриона мыши на стадии E7.5, хотя уровень экспрессии генов *Gata4*, *Afp*, *Bry*, *Pitx2* был значительно выше в тератомах, чем в эмбрионидных телах ЭСК И ЭГК. Учитывая тот факт, что срок развития тератом превышал все время развития зародышей мыши в два раза (6 нед. против 20 сут), присутствие в тератомах недифференцированных Oct4- и Nanog-позитивных клеток, а также ранних клеток-предшественников трех зародышевых листков и внезародышевых структур указывает на то, что и в случае дифференцировки плюрипотентных клеток в эктопических сайтах *in vivo* происходит замедление темпов их развития, но продолжается интенсивный рост. При этом экспрессия мРНК всех сигнальных белков семейства TGF β – ActivinA, Nodal, Lefty1, 2, GDF3, TGF β 1, BMP4, кофактора TDGF1/Cripto, их рецепторов Actr1, Actr2, Bmpr1, T β r1, трансдюсеров Smad 2, 4, 5 – продолжается на уровне, сопоставимом с недифференцированными клетками, что говорит о наложении профилей недифференцированных и дифференцированных клеток.

Ранее было показано, что в поддержании плюрипотентности участвуют не только транскрипционные факторы Oct4 и Nanog и сигнальный путь LIF/JAK/STAT3, но также и различные ветви сигнальных путей факторов семейства TGF β . Так, например, известно, что фактор BMP4 можно рассматривать в качестве антагониста развития нейроэктодермы в эмбрионе мыши и, возможно, поэтому в ЭСК мыши кооперация BMP4 с LIF приводит к усилению эффекта ингибирования дифференцировки (Ying et al., 2003). Предполагается, что их взаимодействие приводит к увеличению пула белков Smad4, которые в свою очередь активируют экспрессию генов ингибиторов дифференцировки семейства Id, причем этот эффект усиливается в присутствии факторов фетальной сыворотки. Однако в отсутствие LIF BMP4 преимущественно активирует внутриклеточный поток трансдюсеров Smad1, 3, 5 и усиливает дифференцировку плюрипотентных клеток в экто- и мезодермальные клетки-предшественники (Watanabe, Miyazono, 2008).

Другая ветвь сигнальных путей семейства факторов TGF β инициируется факторами Activin, Nodal, Lefty1, 2, а также корецептором Tdgf1/Cripto, который участвует в формировании комплекса с рецепторами активина ActRII и ActRI для активации сигнального пути Nodal или для его ингибирования факторами Lefty1 и Lefty 2. Трансформирующие факторы роста (TGF β 1, 2, 3), связываясь с собствен-

ными рецепторами T β RI и RII, как и Activin/Nodal, активируют внутриклеточные сигнальные потоки белков Smad2, 3 путем их фосфорилирования, которые в комплексе со Smad4 транслоцируются в клеточное ядро и инициируют экспрессию генов-мишеней (Shi, Massague, 2003). Для плюрипотентных клеток внутренней клеточной массы бластоцисты мыши было показано, что в случае отсутствия транскрипции белков Smad2 и 3 или при блокировании фосфорилирования этих факторов синтетическим ингибитором SB 431542 наблюдается снижение уровня экспрессии Oct4 и редукция эпибласта (Dunn et al., 2004). Хотя в ЭСК мыши ингибирование пула сигнальных трансдюсеров Smad2, 3 не приводило к значимому изменению уровня экспрессии транскрипционного фактора Oct4 и морфологическим изменениям в популяции клеток (Sato et al., 2004; Ogawa et al., 2007), но оно значительно снижало пролиферативный уровень. С другой стороны, было установлено, что добавление в среду для культивирования ЭСК человека факторов Activin или Nodal и FGF приводило к ингибированию их дифференцировки и стабильному поддержанию плюрипотентного статуса (Vallier et al., 2005; Xu et al., 2005). Наоборот, ингибирование сигналов от рецепторов Activin/Nodal стимулировало дифференцировку ЭСК человека и снижало число Oct4-позитивных клеток даже в присутствии FGF (Vallier et al., 2005; James et al., 2005) в той же манере, что и при воздействии на ЭСК человека факторов BMP, TGF β и Cripto. Было показано, что сигнальные каскады факторов FGF и TGF β /Activin являются синергичными в ингибировании сигнальных путей BMP4 и способны поддерживать высокий уровень экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, так как белки SMAD2, 3 могут связываться с проксимальным промотором гена *NANOG* и активировать его экспрессию (Xu et al., 2008). Все эти данные показывают, что различные факторы семейства TGF β участвуют в регуляции поддержания плюрипотентного статуса клеток как в раннем эмбрионе, так и в ЭСК человека и мыши.

В нашей работе также было установлено, что в бессывороточной системе культивирования при отсутствии фактора LIF в течение 5–7 сут наряду с существенным снижением роста ЭСК и ЭГК и экспрессии в них щелочной фосфатазы значительно снижается экспрессия фактора ActivinA, при этом экспрессия других факторов семейства TGF β , их рецепторов и белков Smad 2, 4, 5 практически не изменяется. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ЭСК мыши, как и в ЭСК человека, фактор ActivinA играет важную роль в поддержании плюрипотентного статуса и, скорее всего, в ЭСК мыши участвует в регуляции плюрипотентности в кооперации с LIF. В то же время в опухолевых клетках тератокарциномы фактор ActivinA вообще не экспрессируется и, как и LIF, не участвует в регуляции их самообновления. В регуляции пролиферации

клеток нуллипотентной тератокарциномы, вероятно, доминируют другие сигнальные пути, которые стабильно ингибируют их дифференцировку в клетки трех зародышевых листков, но не в клетки первичной внезародышевой энтодермы.

Известно, что фактор ActivinA не только ингибирует дифференцировку плюрипотентных клеток, но и при кооперации с другими факторами эффективно стимулирует их дифференцировку. Так, например, ActivinA вместе с Nodal и Wnt регулируют формирование первичной полоски на стадии гаструляции и дифференцировку ранних предшественников мезодермы из ЭСК (Nostro et al., 2008). Кроме того, дифференцировка ЭСК человека в мезоэнтодерму и дифинитивную энтодерму происходит благодаря стимуляции сигнальных путей факторов ActivinA/Nodal, но только в случае ингибирования сигнального пути фосфатидил-инозитол-3-киназы (PI3K), инициирующегося инсулином или инсулиновым фактором роста (IGF) (McLean et al., 2007). Также показано, что индукция дифференцировки ЭСК *in vitro* в ранние гемопоэтические клетки происходит после воздействия BMP и активации сигнальных путей ActivinA/Nodal и Wnt только на определенной стадии (Nostro et al., 2008).

Анализ транскрипционных профилей ЭСК, ЭГК и ЭТК на ранних стадиях их дифференцировки *in vitro*, а также в тератомах и тератокарциномах показал, что все факторы семейства TGF β , необходимые для индукции дифференцировки в различные типы клеток, экспрессируются в ЭСК и ЭГК; практически все, за исключением фактора ActivinA, есть и в ЭТК. Однако, несмотря на этот факт, дифференцировка ЭСК и ЭГК даже в течение 6 нед. *in vivo* остается неполной, так как в тератомах наряду с дифференцированными присутствуют недифференцированные клетки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что собственных ресурсов ЭСК и ЭГК, экспрессирующих и секретирующих сигнальные факторы семейства TGF β , недостаточно для полноценной завершённой дифференцировки клеток и морфогенеза дифинитивных структур. Факторы роста и дифференцировки, присутствующие в сыворотке крови мыши-реципиента, которые доставляются в тератомы и тератокарциномы благодаря интенсивной васкуляризации опухолей, также не способны компенсировать этот дефицит. Вероятно, сывороточные факторы даже ускоряют пролиферацию клеток тератокарциномы и усиливают рост опухоли *in vivo*, но не стимулируют ее дифференцировку.

Проводя параллель с эмбриональным развитием, можно предположить, что основной причиной неполной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток *in vitro* и *in vivo* является изменение пространственно-временного паттерна генной экспрессии в "искусственных" плюрипотентных клеточных системах с нарушением естественных

концентрационных градиентов сигнальных факторов. Создание *de novo* определенных сочетаний и градиентов сигнальных факторов-индукторов в среде для культивирования в определенных временных рамках и последовательностях позволяет воссоздать блоки некоторых гистогенезов и благодаря этому получить необходимые клеточные элементы для фундаментальных и прикладных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative // Nat. Biotech. 2007. V. 25. P. 803–816.
- Allegrucci C., Young L.E. Differences between human embryonic stem cell lines // Hum. Repr. Update. 2007. V. 13. № 2. P. 103–120.
- Andrews P.W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells // Philos. Trans. R. Soc. L. B. Biol. Sci. 2002. V. 357. P. 405–417.
- Aoi T., Yae K., Nakagawa M. et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells // Science. 2008. V. 321. P. 699–702.
- Beddington R.S.P., Robertson E.J. Axis development and early asymmetry in mammals // Cell. 1999. V. 96. P. 195–209.
- Blelloch R.H., Hochedlinger K., Yamada Y. et al. Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 13985–13990.
- Brandenberger R., Wei H., Zhang S. et al. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 707–716.
- Calhoun J.D., Rao R.R., Warrenfeltz S. et al. Transcriptional profiling of initial differentiation events in human embryonic stem cells // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004. V. 323. P. 453–464.
- Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B. et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates // Science. 2002. V. 295. P. 819.
- Derynck R., Miyazono K. TGF- β and the TGF- β family // The TGF- β family / Eds. Derynck R., Miyazono K. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2008. P. 29–43.
- Dunn N.R., Vincent S.D., Oxburgh L. et al. Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo // Development. 2004. V. 131. P. 1717–1728.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.
- Garcia-Gonzalo F.R., Izpisua Belmonte J.C. Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal // PlosOne. 2008. V. 1. P. e1384.
- Gordeeva O.F. Pluripotent cells in embryogenesis and in teratoma formation // Stem cells and cancer / Ed. Parsons D.W. N.Y.: Nova Sci. Publ. Ink., 2007. P. 62–85.

- Guan K., Nayernia K., Maier L.S. *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis // *Nature*. 2006. V. 440. P. 1199–1203.
- James D., Levine A.J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A. TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Development*. 2005. V. 132. P. 1273–1282.
- Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J. *et al.* Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis // *Cell*. 2004. V. 119. P. 1001–1012.
- Katagiri T., Suda T., Miyazono K. The bone morphogenetic proteins // *The TGF- β family* / Eds. Derynck R., Miyazono K. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2008. P. 121–149.
- Kimura T., Suzuki A., Fujita Y. *et al.* Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production // *Development*. 2003. V. 130. P. 1691–1700.
- Lin G., OuYang Q., Zhou X. *et al.* A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following *in vitro* fertilization procedure // *Cell Res*. 2007. V. 17. P. 999–1007.
- Maherali N., Sridharan R., Xie W. *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodelling and widespread tissue contribution // *Cell Stem Cell*. 2007. V. 1. P. 55–70.
- Martin G.R. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryo cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
- Matsui Y., Zsebo K., Hogan B.L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture // *Cell*. 1992. V. 70. P. 841–847.
- McLean A.B., Kevin A., D'Amour K.A. *et al.* Activin A efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed // *Stem Cells*. 2007. V. 25. P. 29–38.
- Miura S., Whitman M., Mishina Y. TGF- β family signaling in early postimplantation development of the mouse // *The TGF- β family* / Eds. Derynck R., Miyazono K. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2008. P. 461–492.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R. *et al.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 8424–8428.
- Nostro C.M., Cheng X., Keller G.M., Gadue P. Wnt, Activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. P. 60–71.
- Ogawa K., Saito A., Matsui H. *et al.* Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells // *J. Cell Sci*. 2007. V. 120. P. 55–65.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2007. V. 448. P. 313–317.
- Price P.J., Goldsborough M.D., Tilkins M.L. Embryonic stem cell serum replacement: Internat. Patent Application WO 98/30679. 1998.
- Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture // *Nature*. 1992. V. 359. P. 550–551.
- Rohwedel J., Sehlmeier U., Shan J. *et al.* Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells *in vitro* resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution // *Cell Biol. Internat.* 1996. V. 20. P. 579–587.
- Sato N., Meijer L., Skaltsounis L. *et al.* Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor // *Nat. Med.* 2004. V. 10. P. 55–63.
- Schilling S.H., Hjilmeland A.B., Rich J.N., Wang X.-F. TGF- β : a multipotential cytokine // *The TGF- β family* / Eds. Derynck R., Miyazono K. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2008. P. 45–77.
- Shamblott M.J., Axelman J., Wang S. *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 13726–13731.
- Sharova L.V., Sharov A.A., Piao Y. *et al.* Global gene expression profiling reveals similarities and differences among mouse pluripotent stem cells of different origins and strains // *Devel. Biol.* 2007. V. 307. P. 446–459.
- Shi Y., Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell*. 2003. V. 13. P. 685–700.
- Siegel P.M., Massague J. Growth control by TGF- β : mechanisms controlling cell cycle progression and apoptosis // *The TGF- β family* / Eds. Derynck R., Miyazono K. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2008. P. 333–362.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki V. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Ibid.* 2007. V. 131. P. 861–872.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. P. 1145–1147.
- Vallier L., Alexander M., Pedersen R.A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells // *J. Cell. Sci.* 2005. V. 118. P. 4495–44509.
- Vincent S.D., Dunn N.R., Hayashi S. *et al.* Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals // *Genes Devel.* 2003. V. 17. P. 1646–1662.
- Watanabe T., Miyazono K. TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation // *The TGF- β family* / Eds. Derynck R., Miyazono K. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2008. P. 585–611.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R. *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state // *Nature*. 2007. V. 448. P. 318–24.
- Wiater E., Vale W. Activins and inhibins // *The TGF- β family* / Eds. Derynck R., Miyazono K. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2008. P. 79–120.
- Xu R.-H., Peck R.M., Li D.S. *et al.* Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells // *Nat. Methods*. 2005. V. 2. P. 185–190.

Xu R.-H., Sampsell-Barron T.L., Gu F. et al. Nanog is a direct target of TGF β /Activin-mediated SMAD signaling in human ESCs // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. P. 196–206.

Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embry-

onic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 // *Cell*. 2003. V. 115. P. 281–292.

Yu J., Vodyanik M., Smuga-Otoo K. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science*. 2007. V. 318. P. 1917–1920.

Regulation of *in vitro* and *in vivo* Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, Embryonic Germ Cells, and Teratocarcinoma Cells by TGF β Family Signaling Factors

O. F. Gordeeva, T. M. Nikonova, and N. V. Lifantseva

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Received April 27, 2009

Abstract—The activity of specific signaling and transcription factors determines the cell fate in normal development and in tumor transformation. The transcriptional profiles of gene-components of different branches of TGF β family signaling pathways were studied in experimental models of initial stages of three-dimensional *in vitro* differentiation of embryonic stem cells, embryonic germ cells and teratocarcinoma cells and in teratomas and teratocarcinomas developed after their transplantation into immunodeficient Nude mice. Gene profile analysis of studied cell systems have revealed that expression patterns of *ActivinA*, *Nodal*, *Lefty1*, *Lefty2*, *TGF β 1*, *BMP4*, and *GDF* were identical in pluripotent stem cells whereas the mRNAs of all examined genes with the exception of *Inhibin β_A /ActivinA* were detected in the teratocarcinoma cells. These results indicate that differential activity of signaling pathways of the TGF β family factors regulates pluripotent state maintenance and pluripotent stem cell differentiation into the progenitors of three germ layers and extraembryonic structures and that normal expression pattern of TGF β family factors is rearranged in embryonic teratocarcinoma cells during tumor growth *in vitro* and *in vivo*.

Key words: pluripotent stem cells, embryonic stem cells, teratocarcinoma, embryoid body, teratomas, TGF β , *ActivinA*, differentiation.