

УДК 57.017.6; 57.085.23; 57.032; 616-006.2.04

ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДЛЯ ЛИНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК, В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА СВЯЗАНЫ С РЕГУЛЯЦИЕЙ БАЗОВОГО И ПЕРВИЧНОГО СТАТУСОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

© 2011 г. О. Ф. Гордеева, Н. В. Лифанцева, С. В. Хайдуков*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.11 г.

Окончательный вариант получен 24.06.11 г.

Одним из основных критериев плюрипотентного потенциала клеточных линий является их способность дифференцироваться в линию половых клеток. Линии плюрипотентных стволовых клеток с базовым статусом (ground state) плюрипотентности отличаются от линий с первичным статусом (primed state) способностью обеспечивать развитие полноценных гамет. С целью определения молекулярных механизмов, вовлеченных в регуляцию различных статусов плюрипотентности, мы исследовали паттерны экспрессии генов, участвующих в регуляции развития линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках различных типов и клетках эмбриональных тератокарцином мыши и человека. Было установлено, что плюрипотентные стволовые клетки *in vitro* и в бластоцисте, а также гоноциты на стадии E13.5 имеют сходные профили экспрессии в отличие от клеток эпибласта на стадии E6.5. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени показал, что ген *Vasa/Ddx4* экспрессируется в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека на более низком уровне, чем в бластоцисте и гоноцитах. Кроме того, уровни экспрессии генов *Vasa/Ddx4* и *E-ras* значительно выше в эмбриональных стволовых клетках мыши, чем в эмбриональных стволовых клетках человека. При культивировании дифференцирующихся эмбриональных стволовых клеток и эмбриональных герминативных клеток мыши, а также клеток эмбриональных тератокарцином мыши в системе культивирования, способствующей репрограммированию клеток от первичного (primed) к базовому (ground) статусу плюрипотентности ($2i + LIF$), мы обнаружили, что только плюрипотентные клетки способны регулировать уровни экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4*, восстанавливая исходный статус, тогда как в клетках эмбриональных тератокарцином уровни экспрессии генов практически не изменяются. Мы предполагаем, что паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в частности гена *Vasa/Ddx4*, могут быть вовлечены в регуляцию базового и первичного статусов плюрипотентности.

Ключевые слова: плюрипотентные клетки, эмбриональные стволовые клетки, тератокарцинома, линия половых клеток, бластоциста, ground state, *Vasa*, *Oct4*, *E-ras*.

Плюрипотентные клетки млекопитающих участвуют в формировании всех типов клеток развивающегося организма и некоторых внезародышевых структур. Для исследования механизмов раннего развития млекопитающих широко используются модели *in vitro* — постоянные клеточные линии плюрипотентных стволовых клеток. Для получения линий плюрипотентных стволовых клеток были разработаны технологические подходы, заключающиеся в культивировании и размножении *in vitro* плюрипотентных клеток доимплантационных эмбрионов или первичных половых клеток разных стадий развития, а также в экспериментальном репрограммировании соматических и половых клеток взрослых организмов до плюрипотентного статуса (Gordeeva, 2010). Различные

линии плюрипотентных стволовых клеток обладают сходными биологическими свойствами, однако клетки линий разных видов, а также линий, полученных с помощью разных методов, проявляют существенные различия в регуляции их статуса, в потенциале к дифференцировке и канцерогенезу (Adewumi et al., 2007; Okita et al., 2007; Sharova et al., 2007; Chin et al., 2010; Guenther et al., 2010).

Одним из основных критериев плюрипотентности полученных клеточных линий является их способность дифференцироваться в линию половых клеток. Однако установлено, что не все линии способны обеспечивать развитие полноценных гамет у химерных животных (Hayashi, Surani, 2009). Кроме того, этот критерий не применим для тестирования плюрипотентных стволовых клеток чело-

века. Было показано, что линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека отличаются от линий плюрипотентных стволовых клеток мыши, но сходны с линиями стволовых клеток эпибласта мыши, которые получены из более поздней популяции плюрипотентных клеток эмбрионов (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Известно, что линии стволовых клеток эпибласта мыши способны дифференцироваться только в соматические клетки, но не способны участвовать в развитии линии половых клеток (Guo et al., 2009). Восстановление потенциала стволовых клеток эпибласта мыши до плюрипотентного статуса, а именно способности формировать линию половых клеток, возможно при усилении экспрессии гена *Klf4* или при ингибировании GSK3- и ERK/MAPK-киназ (Guo et al., 2009; Silva et al., 2008; Ying et al., 2008). На основе полученных фактов было предложено различать статусы линий плюрипотентных стволовых клеток. Так, линии ЭСК мыши соответствуют базовому статусу плюрипотентности (ground state), а линии стволовых клеток эпибласта мыши и ЭСК человека — первичному статусу (primed state) (Nichols, Smith, 2009).

Линии плюрипотентных эмбриональных герминативных клеток (ЭГК) были получены из первичных половых клеток разных стадий развития (от E8.5 до E13.5), которые являются более поздней эмбриональной популяцией коммитированных клеток. Однако в отличие от клеток эпибласта при получении линий ЭГК не требуется дополнительных манипуляций для стабилизации базового статуса плюрипотентности. Эти факты свидетельствуют о большом сходстве генных регуляторных сетей плюрипотентных клеток бластоцисты и первичных половых клеток в отличие от клеток эпибласта. Однако молекулярные механизмы, обеспечивающие конверсию первичных половых клеток в плюрипотентные клетки, практически не исследованы (Resnick et al., 1992; Stewart et al., 1994; Nayashi, Surani, 2009).

Стоит отметить, что значительно раньше, чем были получены первые линии плюрипотентных стволовых клеток из бластоцисты, из опухолей семенников и яичников были выделены линии клеток эмбриональных тератокарцином (ЭТК), которые были способны дифференцироваться в эмбриональные клетки различных типов. Эти трансформированные клеточные линии фактически являются первыми линиями “псевдоплюрипотентных” стволовых клеток, подвергшихся аномальному репрограммированию *in vivo* (Kleinsmith, Pierce, 1964). Кроме того, многочисленные исследования показали, что при адаптации и длительном культивировании *in vitro* в ЭСК и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках происходят генетические и эпигенетические изменения, способствующие их онкогенной трансформации (Mayshar et al., 2010; Laurent et al., 2011). В

некоторых трансформированных линиях ЭСК снижается потенциал к дифференцировке, а нуллипотентные линии ЭТК вообще утрачивают способность спонтанно дифференцироваться (Novatta et al., 2010). Таким образом, при трансформации плюрипотентных клеток может происходить изменение статуса от плюрипотентного до нуллипотентного.

Несмотря на интенсивные исследования плюрипотентных стволовых клеток различного происхождения, вопросы эквивалентности их статуса и потенциала к дифференцировке, сходства механизмов поддержания базового и первичного статуса плюрипотентности, обеспечения баланса пролиферации и дифференцировки, а также способности к онкогенной трансформации остаются открытыми. С целью определения молекулярных механизмов, вовлеченных в регуляцию различных фаз плюрипотентности, мы исследовали паттерны экспрессии генов, участвующих в регуляции развития линии половых клеток, в различных типах плюрипотентных стволовых клеток и клеток ЭТ мыши и человека. Мы изучили также возможность реверсии фенотипа и изменения паттернов генной экспрессии дифференцирующихся ЭСК и ЭГК, а также ЭТК мыши в системе культивирования, способствующей репрограммированию клеток от первичного (primed) к базовому (ground) статусу плюрипотентности

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток *in vitro*. В работе были использованы ЭСК мыши линий R1 и SSE, а также ЭГК мыши линий EGC-10 и EG-12.5, любезно предоставленные доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). Линии ЭСК человека ESM01, ESM02 и ESM03 любезно предоставлены проф. Г.П. Георгиевым (Институт биологии гена РАН, Москва). ЭТК мыши линий F9 и P19 и ЭТК человека линии PA-1, а также культуры первичных эмбриональных фибробластов человека (ЭФ) получены из Российской коллекции клеточных культур (Банк клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Все плюрипотентные клеточные линии мыши и человека, а также линии ЭТК культивировали в среде DMEM, содержащей 1 mM L-глутамин, 0.1 mM заменимых аминокислот, 0.1 mM β-меркаптоэтанола и 15% телячьей фетальной сыворотки (“HyClone”, США). Для линий ЭСК человека вместо сыворотки в среду добавляли 15% заменителя телячьей фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, “Gibco”, США) и 10 нг/мл основного фактора роста фибробластов человека (“Invitrogen”, США). Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши и человека поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ), инактивированных митомицином С

(10 мкг/мл) (“Sigma”, США). ЭСК и ЭГК мыши культивировали в бесфидерной системе, добавляя в среду фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF) (10 нг/мл) (“Sigma”, США).

Для получения эмбрионидных тел, формируемых клетками линий R1, SSE, EGC-10, EG-12.5, F9, P19 и PA-1, использовали метод “висячей капли”, описанный ранее (Гордеева и др., 2009). Эмбрионидные тела (ЭТ) из ЭСК человека получали при механическом разделении колоний недифференцированных клеток. Кластеры клеток культивировали в планшетах для суспензионного культивирования (“Greinerbio”, Германия) в течение последующих 5 сут (ЭТ5).

Для изучения процессов репрограммирования, ЭТ линий R1 и EG-12.5 на 3-и сут развития (ЭТ3) и монослойные клеточные культуры линий F9 и P19 (плотностью 5 тыс. клеток/см²) на 2-е сут после посева культивировали в течение 48 ч в среде с добавлением фактора LIF, а также ингибиторов GSK3-киназы BIO (2.5 мкМ) и MEK/ERK-протеинкиназы PD 98059 (50 мкМ) (“Sigma”, США). Число клеток, выросших в среде с LIF и в коктейле ингибиторов с LIF (условия 2i + LIF), подсчитывали через 48 ч и анализировали с помощью проточной цитометрии. Статистический анализ проводили с использованием ANOVA и парного критерия Стьюдента.

Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитометрии. Суспензию клеток фиксировали холодным 70%-ным этанолом, затем промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в течение 30 мин в фосфатно-солевом буфере, содержащем иодид пропидия (20 мкг/мл, “Molecular Probes”, США) и РНКазу А (200 мкг/мл, “Fermentas”, Литва). Пробы анализировали с помощью проточного цитометра Cytomics FC500 (“Beckman Coulter”, США), просчитывая 5000–10000 клеток в образце. Анализ гистограмм проводили с использованием программы MultiCycle AV Software (“Phoenix Flow Systems”, США).

Получение образцов тканей эмбрионов и половозрелых мышей. В работе использовали мышей линий C57Bl/6 из питомника лабораторных животных НПП “Пушино” ФИБХ РАН. Исследовали бластоцисты (стадия E4.5), эпобласты с удаленными оболочками и плацентами (E6.5), зачатки гонад вместе с мезонефросами (E10.5) и семенники зародышей (E13.5), а также органы взрослых животных в возрасте 3–4 мес.

Получение аутопсийного материала тканей человека. Разрешение на изъятие материала для исследований было получено в Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения г. Москвы. Процедуры по изъятию образцов аутопсийного материала проводили в Судебно-медицинском морге № 2 г. Москвы врачи-патологоанатомы в соответствии с биоэтическими требованиями и с соблюдением закона Российской Феде-

рации “О погребении и похоронном деле”. Получение образцов тканей семенника человека проведено в ходе стандартного патолого-медицинского исследования трупов мужчин, погибших насильственно и не имевших при жизни хронических патологий. Объем образца семенника (не более 1–2 мл) помещали в лизирующий раствор для экстракции РНК Trizol (“Invitrogen”, США). Выделение тотальной РНК проводили в день аутопсии.

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. Экспериментальным животным трансплантировали 1 млн клеток подкожно. Развившиеся тератомы и тератокарциномы извлекали через 3–12 нед после инъекции клеток. Образцы опухолей использовали для дальнейших исследований. Для гистологических исследований образцы опухолей фиксировали в фиксаторе Буэна. Гистологические срезы подготавливали с помощью стандартных процедур. 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 30–40 мин при температуре 37°C.

Иммуногистохимический анализ. Экспрессию специфических белков в клеточных культурах выявляли с помощью иммунофлуоресцентного анализа по методике, описанной ранее (Гордеева и др., 2009). Для выявления экспрессии белков Oct4 и Vasa использовали антитела кролика к этим белкам в разведениях 1 : 150 (“Santa Cruz Biotechnology”, США; “Abcam”, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали антитела цыпленка против кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированные флуорохромами Alexa 596, в разведении 1 : 900 (“Molecular Probes”, США). Препараты докрасивали флуоресцентным красителем DAPI 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, в качестве положительного – срезы семенников взрослых мышей. Для получения криосрезов семенники фиксировали 4%-ным параформальдегидом, промывали фосфатно-со-

Таблица 1. Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии в клеточных линиях и эмбрионах мыши

Ген	№ последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>Oct4/Pou5f1</i>	NM_013633.2	5'caccctgggcgttctctttg3' 5'gttctcattgttgcggcttcc3'	142
<i>Nanog</i>	NM_028016	5'caagcgggtggcagaaaaac3' 5'tggataagagcaccgcactg3'	702
<i>Stella/Dppa3</i>	NM_139218.1	5'agagaagggtccgcactttg3' 5'tccccgattttcgacttctc3'	193
<i>Fragilis/Ifitm3</i>	NM_025378.2	5'tgctccgcaccatgaaccac3' 5'gtgaagcacttcaggaccgg3'	460
<i>Dazl</i>	NM_010021.4	5'gccagcactcagttctatc3' 5'gttggaggctgcatgtaagt3'	419
<i>Vasa/Ddx4</i>	NM_010029.2 NM_001145885.1	5'aggaatgccatcaaaggaacaac3' 5'gccaacagcgacaacaag3'	118
<i>C-kit</i>	NM_001122733.1 NM_021099.3	5'atgaagcctggcgtttccta3' 5'ctggctccaaatctctgtg3'	218
<i>Blimp1/Prdm1</i>	NM_007548.3	5'acacagttcccaagaatgccca3' 5'gaagggtgaaatgttgaacg3'	510
<i>Scp3</i>	NM_011517.2	5'gctgatgaaaaggctccagt3' 5'cgaacatttccatctcttg3'	553
<i>E-ras</i>	NM_181548.2	5'gctacaaagtctagcatcttg3' 5'cgaagcattggtgagtcactg3'	191
<i>Gata4</i>	NM_008092	5'tctcactatgggcacagcag3' 5'gggacagcttcagagcagac3'	100
<i>Hprt</i>	NM_013556	5'cgttgggcttacctcactgctttc3' 5'ggtcataacctggttcactcatcgctaac3'	150

левым буфером, импрегнировали раствором сахарозы (20%) и замораживали в среде Tissue-freezing medium ("Leica", Германия) при температуре -20°C . Криосрезы были приготовлены на криостате Leica CM 1900. Иммуногистохимический анализ на срезах семенников проводили по описанному выше протоколу для клеточных культур. 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 плюрипотентных и тератокарциномных клеток, из тканей эмбрионов и взрослых животных, используя смесь Trizol ("Invitrogen", США). Для предотвращения контаминации ДНК все образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, "Ambion", США) по протоколу производителя. Синтез кДНК библиотек проводили с использованием обратной транскриптазы М-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: $94^{\circ}\text{C} - 5'$; отжиг праймеров: $58^{\circ}\text{C} - 45''$; удлинение цепи: $72^{\circ}\text{C} - 45''$; денатурация $94^{\circ}\text{C} - 45''$, 35 циклов; завершающее удлинение цепи: $72^{\circ}\text{C} - 5'$. Специфические праймеры были сконструированы на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank, MGI и Ensemble (табл. 1, 2). Продукты ПЦР-анализа фракционировали в агарозном геле. Результаты электрофореза регистрировали с помощью трансиллюминатора ("Bio-Rad", США).

Количественный анализ генной экспрессии проводили на амплификаторе "Applied Biosystems 7500" (США) с использованием набора для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя Eva Green ("Синтол", Россия) по следующему протоколу. Предварительная денатурация: $94^{\circ}\text{C} - 5'$; отжиг праймеров и элонгация: $60^{\circ}\text{C} - 45''$; денатурация $94^{\circ}\text{C} - 15''$, 40 циклов. Уровень флуоресценции детектировали при 60°C в каждом цикле. Для всех ПЦР продуктов был проведен анализ кривых плавления для исключения образования нескольких ампликонов. Каждый эксперимент был проведен в трех повторах. Уровень экспрессии генов в каждом образце был нормализован к уровню экспрессии мРНК гена гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфера-

Таблица 2. Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии в линиях эмбриональных стволовых и тератокарциномных клеток человека

Ген	№ последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>OCT4/POU5F1</i>	NM_002701 NM_203289	5'cgaagagaaaagcgaaccagtatc3' 5'accagcagcctcaaatcc3'	220
<i>NANOG</i>	NM_024865	5'tgcctcacacggagactgtc3' 5'ctgcgtcacaccattgctattc3'	386
<i>DPPA3</i>	NM_199286	5'gcctagtgtgtgtcaagac3' 5'ggtgcaagaataagatttatggc3'	520
<i>IFITM3</i>	NM_003641	5'ccatgtcgtctggcctctgt3' 5'gaatgacactgtagacaggtg3'	410
<i>DAZL</i>	NM_001351	5'catcctcctccaccacagtt3' 5'aagcattgcccgacttcttc3'	480
<i>VASA/DDX4</i>	NM_001166534.1 NM_001166533.1 NM_024415.2 NM_001142549.1	5'gccagggaatgccatcaag3' 5'acggctgctgaacatctctac3'	160
<i>C-KIT</i>	NM_000222.2 NM_001093772.1	5'ttccttgttgaccgctcctt3' 5'caacgttgccctgacgttcat3'	474
<i>BLIMP1/PRDM1</i>	NM_182907.1 NM_001198.3	5'ctacccttatcccgagagc3' 5'gtacgaggggatgaaagctg	592
<i>SCP3</i>	NM_001177949.1 NM_001177948.1 NM_153694.4	5'gggggtgaagtgcagaatag3' 5'ctcttgcgtgagttcca3'	471
<i>E-RAS</i>	NM_181532.2	5'ctgcttctctctcccacttg3' 5'gctgctgccaacatccc3'	184
<i>GATA4</i>	NM_002052	5'gatgggacgggtcactatctg3' 5'ggcagttggcacaggagag3'	160
<i>HPRT</i>	NM_000194.2	5'aagatggtcaaggtcgcaagc3' 5'gaagtattcattatagtcaggccatccc3'	132

зы (HPRT). Относительный уровень мРНК был рассчитан с помощью сравнительного Ct-метода (ABI Relative Quantification Study software, Applied Biosystems, США). Для определения статистически значимых различий между относительными уровнями экспрессии генов в образцах был проведен анализ вариаций (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы изучали паттерны экспрессии генов, которые являются ключевыми регуляторами детерминации и специализации линии половых клеток у млекопитающих. В изучаемый транскрипционный профиль также были включены гены транскрипционных факторов *Oct4* и *Nanog*, являющиеся основными регуляторами плюрипотентного статуса и также экспрессирующиеся в линии половых клеток (Pesce, Schöler, 2001; Rilianawati et al., 2003; Kehler et al., 2004; Lacham-Kaplan, 2004; Cauffman et al., 2005; Saitou et al., 2005). Мы изучали экспрессию следующих генов:

Stella/Dppa3 (*Developmental pluripotency-associated 3*) и *Fragilis/Ifm3* (*interferon induced transmembrane protein 3*), активных в самых ранних предшественниках первичных половых клеток в развивающемся эпибласте (E6.5–E7.5) (Saitou et al., 2002);

Dazl/Tpx2 (*Deleted in azoospermia-like*), экспрессирующегося на всех стадиях развития половых клеток, а также в доимплантационных эмбрионах (Cauffman et al., 2005; Reynolds, Cooke, 2005; Reynolds et al., 2005, 2007);

Blimp1/Prdm1 (*PR domain containing 1, with ZNF domain*), который является одним из ключевых регуляторов, обеспечивающих ограничение программы развития линий соматических клеток в предгастрюляционном эпибласте (Ohinata et al., 2005);

Vasa/Mvh/Ddx4 (*DEAD-box polypeptide 4*), экспрессирующегося на всех стадиях развития линии половых клеток от стадии мигрирующих первичных половых клеток до стадий пахитенных сперматоцитов в семенниках и первичных ооцитов самок у половозрелых животных (Tanaka et al., 2000; Toyooka et al., 2000; Reynolds et al., 2005);

Scp3 (*Synaptonemal complex protein 3*) – одного из регуляторов мейоза (Reynolds et al., 2007);

E-ras (*ES cell-expressed Ras*), который является специфическим регулятором пролиферации плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, а также первичных половых клеток *in vivo* (Takahashi et al., 2003).

Кроме того, мы исследовали характер экспрессии гена *Gata4*, специфически экспрессирующегося

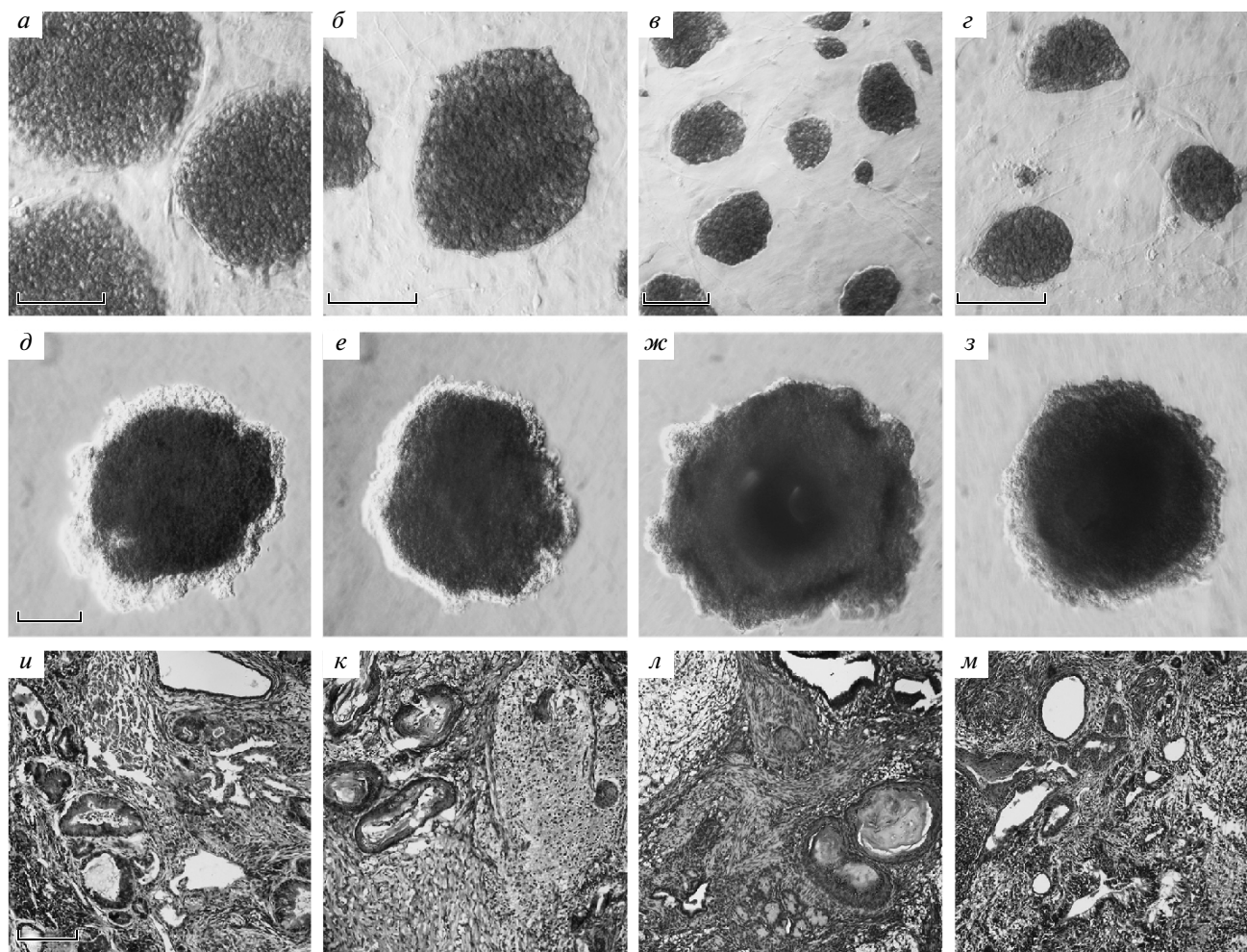


Рис. 1. Линии плюрипотентных стволовых клеток мыши: ЭСК линий R1 (а, д, и) и SSE (б, е, к) и ЭГК линий EGC-10 (в, ж, л) и EG-12.5 (з, з, м). Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных клетках колоний и эмбриоидных тел (а–з), формируемых плюрипотентными клетками на начальных стадиях дифференцировки. Срезы тератом, развившихся после трансплантации в организм взрослых иммунодефицитных мышей Nude плюрипотентных клеток линий R1 (и), SSE (к), EGC-10 (л) и EG-12.5 (м). Масштаб: 100 мкм.

ся в клетках внезародышевой энтодермы на самых ранних стадиях развития плюрипотентных клеток, для изучения динамики ранней дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток различных линий (Zhang et al., 2007).

Изучение паттерна экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в ЭСК и ЭГК мыши. Используемые линии ЭСК SSE, R1 и ЭГК EGC-10, EG-12.5 являются плюрипотентными клеточными линиями и способны участвовать в развитии соматических и половых клеток химерных животных (Nagy et al., 1993; Wood et al., 1993; McLaren, Durcova-Hills, 2001; Durcova-Hills et al., 2003). В наших экспериментах эти клеточные линии сохраняли способность спонтанно дифференцироваться *in vitro* и *in vivo* в клетки в различных типах (рис. 1). Линии ЭСК и ЭГК, поддерживаемые в бесфидерной системе с добавлением фактора LIF, практически не различались по скорости роста и времени удвоения популяции. Анализ рас-

пределения клеток по стадиям клеточного цикла с помощью проточной цитометрии показал, что линии ЭСК и ЭГК имеют аналогичную структуру клеточного цикла с преимущественным накоплением клеток в S-фазе (рис. 2).

Изучение экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, показало, что все исследуемые плюрипотентные клеточные линии имели практически идентичные паттерны экспрессии этих генов (рис. 3). В недифференцированных ЭСК R1, SSE и ЭГК EGC-10, EG-12.5, а также в ЭТ1 и ЭТ5 экспрессировались гены *Stella*, *Fragilis*, *Dazl*, *Vasa/Ddx4*, а также *E-ras* и *C-kit*. В дифференцирующихся клетках ЭТ1 и ЭТ5 было обнаружено усиление экспрессии генов *Blimp1/Prdm1* и *Scp3*, а также гена *Gata4*.

Сравнительный анализ профилей экспрессии изучаемых генов в плюрипотентных и первичных половых клетках эмбрионов мышей показал, что в бластоцистах (E4.5) экспрессируются не только ге-

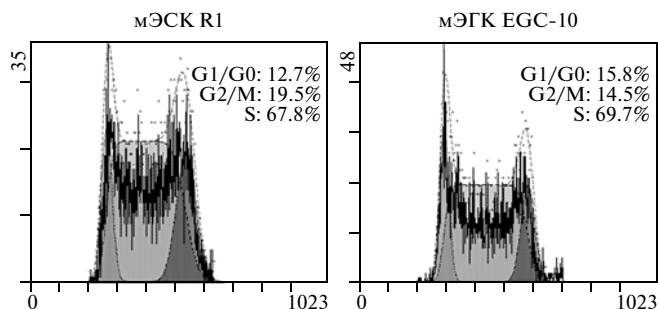


Рис. 2. Анализ клеточного цикла ЭСК R1 и ЭГК EGC-10 мыши. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток.

ны *Oct4*, *Nanog*, *Stella*, *Fragilis*, *Dazl* и *C-kit*, но и *Vasa/Ddx4* и *Scp3*. В предшествующих работах других авторов экспрессия гена *Vasa/Ddx4* в плюрипотентных клетках бластоцист и недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши выявлена не была (Hübner et al., 2003; Toyooka et al., 2003). Обнаруженный нами уровень экспрессии *Vasa/Ddx4* в бластоцистах был сопоставим с таковым в гонцитах на стадии E13.5, где экспрессия была выявлена и другими исследователями (Toyooka et al., 2000). Кроме того, экспрессия *Vasa/Ddx4* в бластоцистах была значительно выше, чем в клетках эпибласта (E6.5) и в первичных половых клетках после их заселения в зачатки гонад (E10.5). Интересно отметить, что у

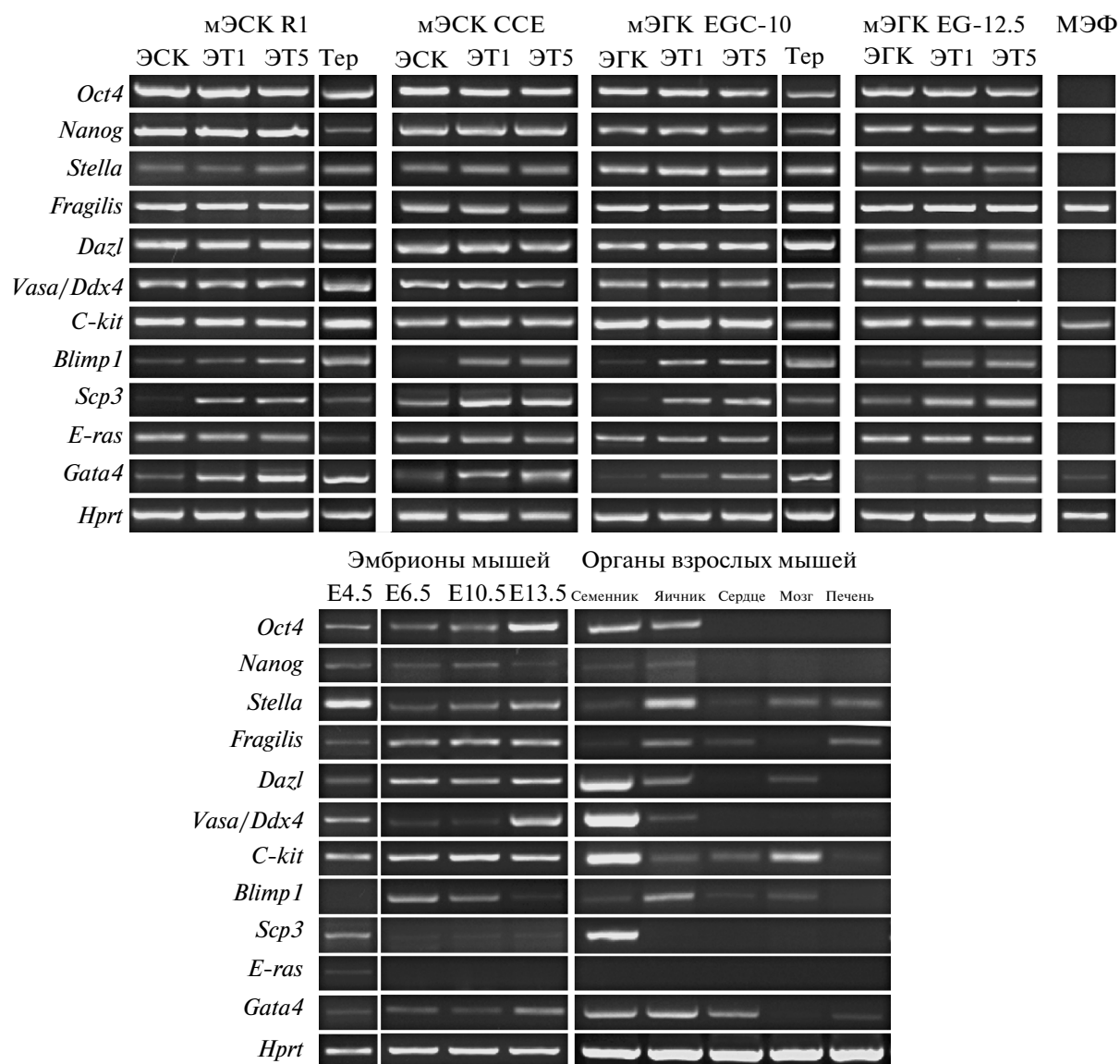


Рис. 3. Профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в линиях плюрипотентных стволовых клеток, в зародышах мыши и органах взрослых мышей.

ЭТ1, ЭТ5 – эмбриональные тела на 1-е и 5-е сут развития, Тер – тератомы, сформированные линией ЭСК или ЭГК; МЭФ – мышечные эмбриональные фибробласты.

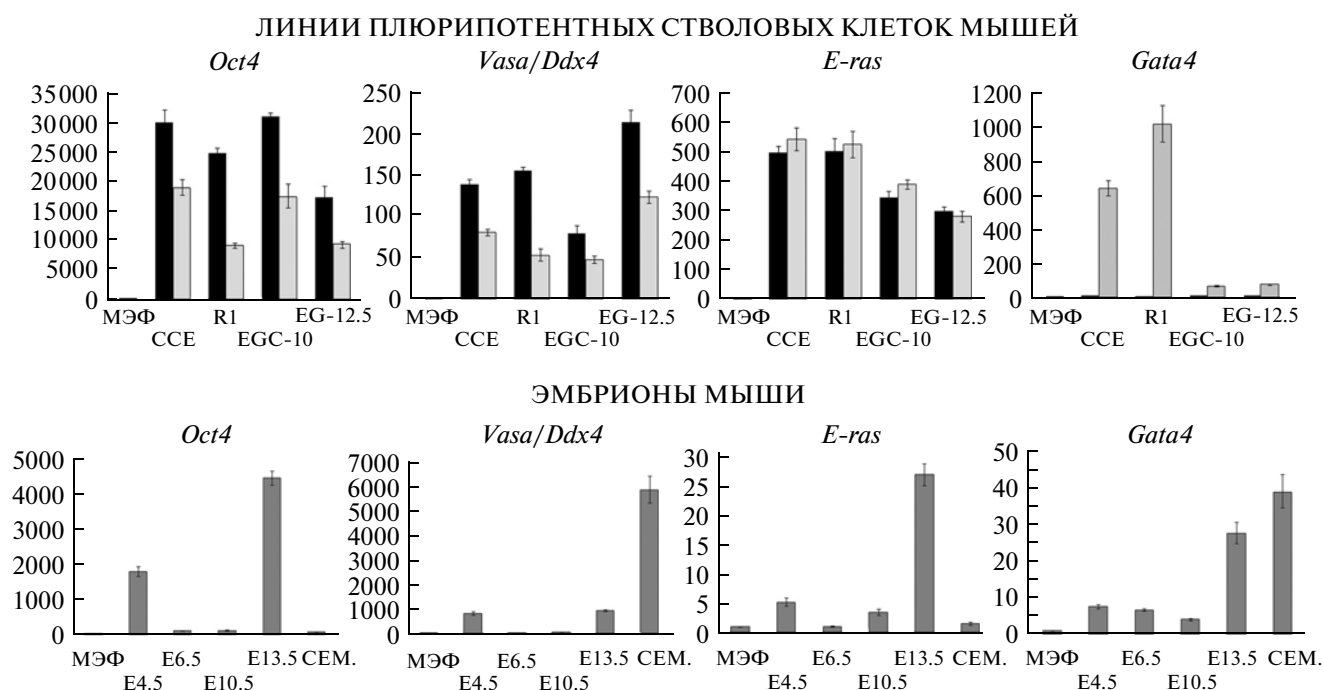


Рис. 4. Количественный анализ экспрессии генов *Oct4*, *Vasa/Ddx4*, *E-ras* и *Gata4* в линиях плюрипотентных стволовых клеток мыши, а также плюрипотентных и первичных половых клетках эмбрионов мыши. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *Hprt* (уровень экспрессии в МЭФ принят за 1 относительную единицу).

(■) – недифференцированные клетки; (■) – ЭТ5; Сем – семенник половозрелого самца.

отличие от ЭСК и ЭГК мы не обнаружили экспрессию гена *E-ras* в эмбриональных клетках ни на одной из изученных стадий развития, как и в органах взрослых животных.

Полученные результаты стимулировали нас к более детальному сравнительному анализу генной экспрессии в линиях плюрипотентных стволовых клеток и эмбрионах, а также в первичных половых клетках. Количественный анализ генной экспрессии показал, что в плюрипотентных стволовых клетках, поддерживаемых *in vitro*, гены *Oct4* и *E-ras* экспрессируются на более высоком уровне, чем в клетках бластоцисты, эпибласта и первичных половых клетках (рис. 4). Так, уровень экспрессии гена *Oct4* в ЭСК и ЭГК мыши в среднем был выше в 10–17 раз, чем в бластоцистах, и более чем в 300 раз выше, чем в клетках эпибласта. Уровни экспрессии гена *E-ras* в линиях ЭСК и ЭГК были в 100, 500 и 20 раз выше, чем в бластоцистах, эпибласте и гонцитах соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что по сравнению с плюрипотентными клетками ранних эмбрионов и развивающимися первичными половыми клетками в плюрипотентных стволовых клетках, поддерживаемых *in vitro*, происходит значительное усиление уровней экспрессии генов, участвующих в регуляции их самообновления.

С другой стороны, уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4* был в среднем в 6 раз ниже в ЭСК и

ЭГК, чем в клетках бластоцисты и гонцитах (E13.5), но существенно выше, чем в клетках эпибласта и первичных половых клетках на стадии E10.5. Интересно отметить, что уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4* в EGC-10 был ниже, чем в EG-12.5, и подобная тенденция была выявлена также и для первичных половых клеток (E10.5) и гонциотов (E13.5). Кроме того, мы обнаружили, что уровни экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* параллельно снижались приблизительно вдвое к 5-м сут дифференцировки ЭТ. Проведенный иммуногистохимический анализ показал, что в недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши и в бластоцистах ген *Vasa/Ddx4* экспрессируется не только на уровне мРНК, но и на уровне белка (рис. 5).

Анализ экспрессии гена *Gata4* в процессе дифференцировки ЭСК и ЭГК мыши показал, что экспрессия этого гена в ЭТ, формируемых ЭСК, была более чем в 20 раз выше, чем в ЭТ, образованных ЭГК (рис. 4). Таким образом, несмотря на значительное сходство этих линий, ЭСК быстрее и эффективнее дифференцировались в клетки внезародышевой энтодермы, чем ЭГК. Эти данные о скорости дифференцировки ЭСК и ЭГК подтверждают наши предыдущие иммуногистохимические исследования экспрессии белка *Gata4* в процессе дифференцировки ЭТ, формируемых ЭСК и ЭГК (Гордеева и др., 2009).

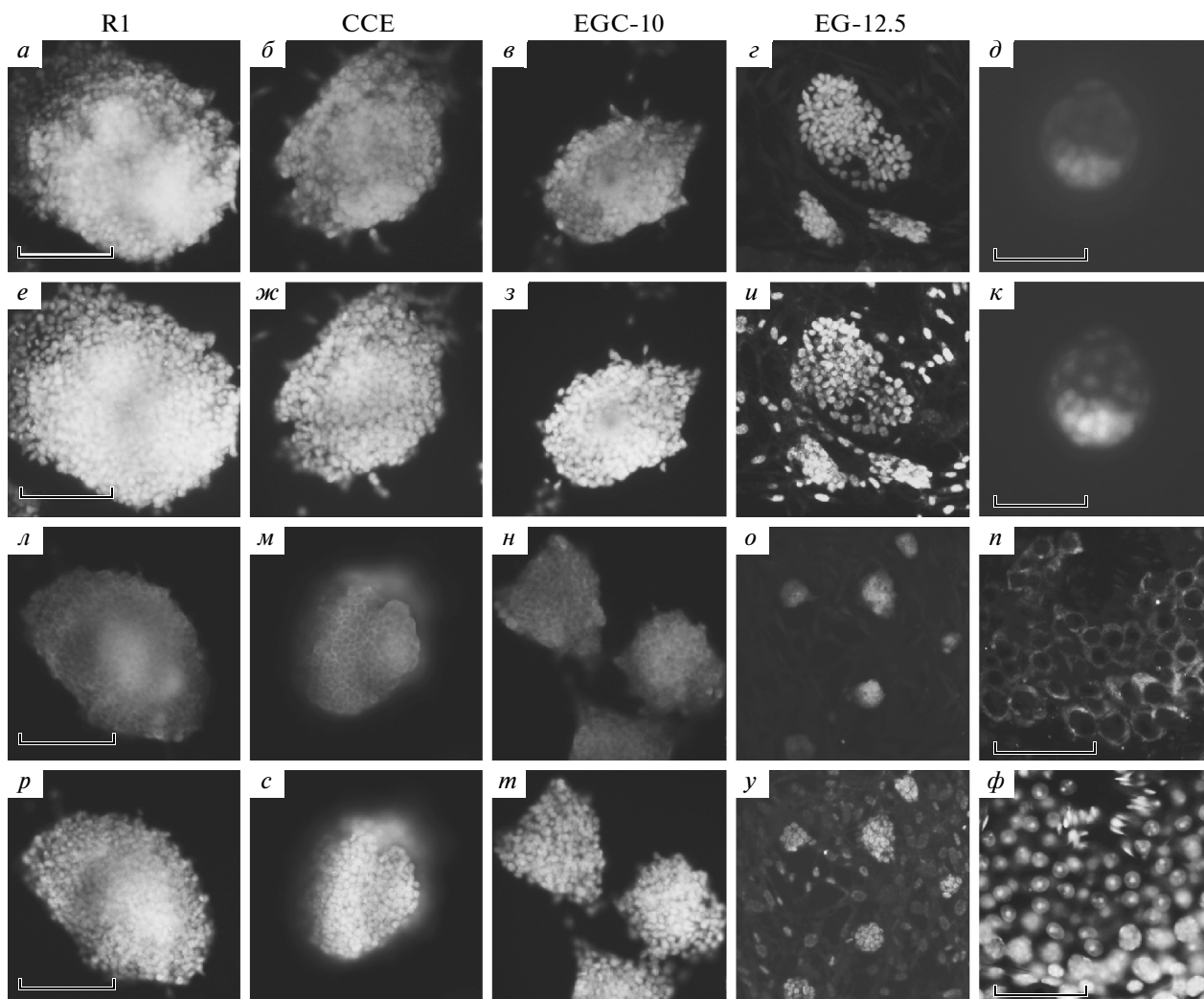


Рис. 5. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков Oct4 (а–г) и Vasa (д, л–п) в недифференцированных клетках линий ЭСК R1, CCE (а, л) и ЭГК EGC-10, EG-12.5 (б, м) в клетках бластоцисты (д) и семенников мыши (п). Ядра клеток на соответствующих препаратах докрашены DAPI (е–к; р–ф).

Масштаб: а–г, е–и, л–о, р–у – 100; д, к, п, ф – 50 мкм.

Анализ экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в ЭСК человека. Далее мы исследовали линии ЭСК человека, которые, как было отмечено выше, отличаются по статусу от плюрипотентных стволовых клеток мыши. Все используемые линии ЭСК человека (ESM01, ESM02 и ESM03) были способны к дифференцировке в различные производные *in vitro* и *in vivo* в тератомах (рис. 6). Анализ клеточного цикла линий ESM01 и ESM02 показал, что структура их клеточного цикла сходна с таковой для линий ЭСК и ЭГК мыши (рис. 7).

Исследование экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в недифференцированных клетках, ЭТ1 и ЭТ5 показало, что паттерны их экспрессии сходны для разных линий и в целом аналогичны ЭСК мыши. Однако обратил на себя внимание очень низкий уровень экспрессии

генов *VASA/DDX4* и *E-RAS* (рис. 8). Количественный ПЦР-анализ показал, что уровни экспрессии генов *VASA/DDX4* и *E-RAS* приблизительно одинаковы и значительно ниже, чем в клетках ЭСК и ЭГК мыши (рис. 9). Так, например, уровень экспрессии гена *VASA/DDX4* в ЭСК человека был в 1000 раз ниже, чем во взрослом семеннике человека, тогда как уровень его экспрессии в ЭСК мыши был только в 40 раз ниже, чем в семеннике мыши. Кроме того, при одинаковой эффективности реакции показатель ΔCt *VASA/DDX4* для ЭСК человека составлял (в среднем для трех линий) 7.150 ± 0.09 , в то время как для ЭСК мыши он был 1.823 ± 0.048 . Эти данные подтверждают и результаты иммуногистохимического анализа, который не выявил *VASA/DDX4*-позитивных клеток в колониях недифференцированных ЭСК ESM01, ESM02 и ESM03 (рис. 10).

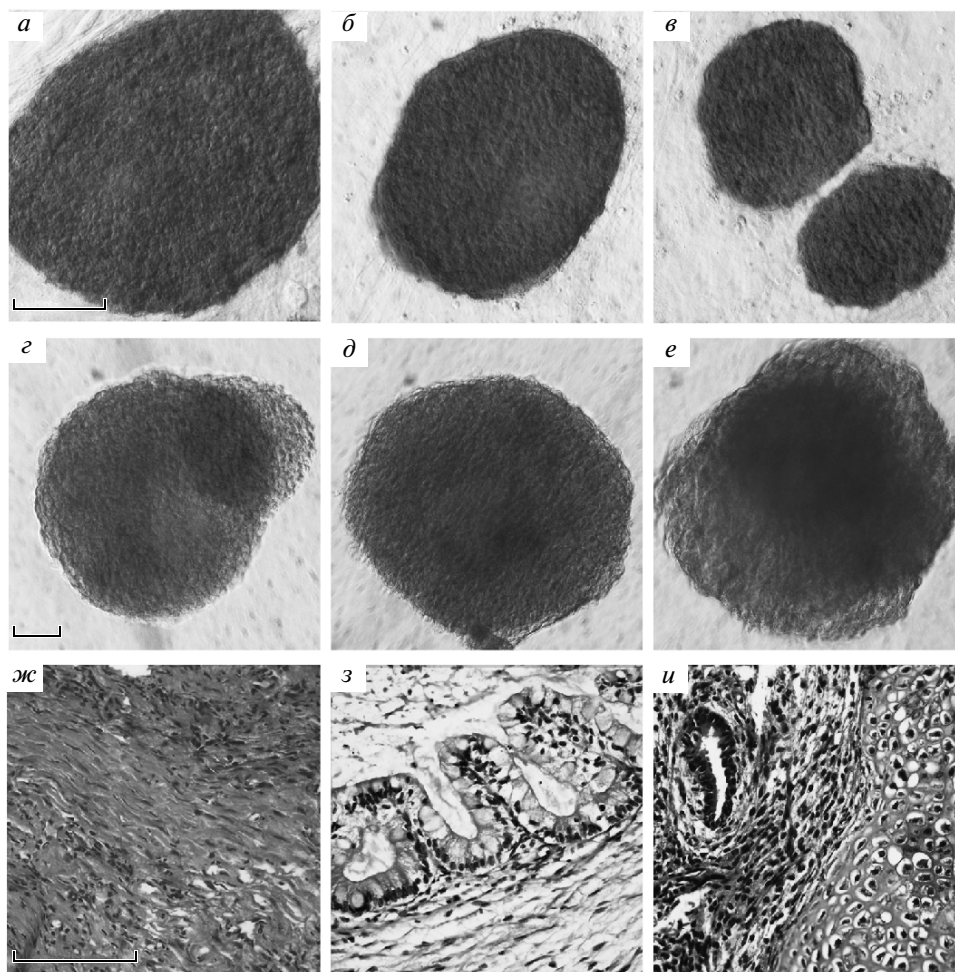


Рис. 6. Линии плюрипотентных ЭСК человека ESM01 (а, з) ESM02 (б, д) и ESM03 (в, е). Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных клетках колоний (а–в) и эмбрионидных тел (з–е). Срезы тератом, сформированных клетками ESM01 (ж, з) и ESM02 (и). Масштаб здесь и на рис. 10, 11, 15, 16 – 100 мкм.

Как было отмечено выше, экспрессия гена *E-RAS* в линиях ЭСК человека резко отличалась от его экспрессии в линиях ЭСК мыши (рис. 4, 9): уровни экспрессии гена *E-RAS* в ЭСК человека были лишь в 40 и в 2 раза выше, чем в эмбриональ-

ных фибробластах и семеннике человека соответственно, тогда как в ЭСК мыши эти различия составляли 500 и 350 раз соответственно. На основании этих фактов можно предположить, что роль гена *E-RAS* в регуляции пролиферации ЭСК человека отличается от функции его гомолога в ЭСК мыши.

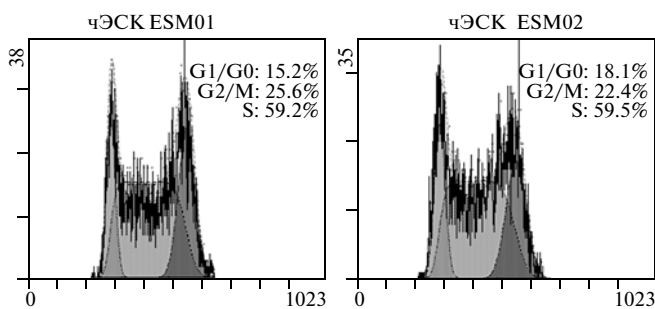


Рис. 7. Структура клеточного цикла ЭСК человека ESM01 и ESM02. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток.

Интересно отметить, что в ЭТ5, сформированных клетками ESM01, ESM02 и ESM03, дифференцировка клеток внезародышевой энтодермы происходила значительно быстрее, чем в ЭТ5 мыши, о чем свидетельствует более резкое увеличение экспрессии гена *GATA4* в ЭТ по сравнению с недифференцированными клетками колоний (рис. 4, 9). Для ЭСК и ЭТ человека уровень экспрессии возрастал в 1000 раз, а для ЭСК и ЭТ мыши – в 150 раз. Полученные данные количественно подтверждают выводы многих исследователей о том, что уровень спонтанной дифференцировки в культурах ЭСК человека значительно выше, чем в ЭСК мыши. Такая усиленная способность к диф-

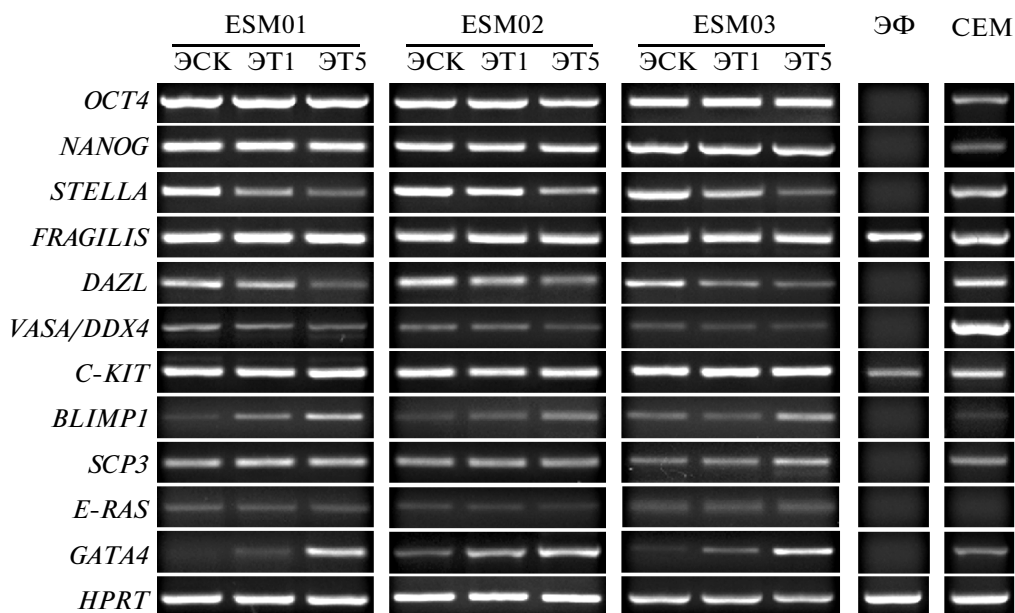


Рис. 8. Профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в ЭСК человека ESM01, ESM02 и ESM03. ЭТ1, ЭТ5 – эмбрионидные тела на 1-е и 5-е сут развития, ЭФ – эмбриональные фибробласты.

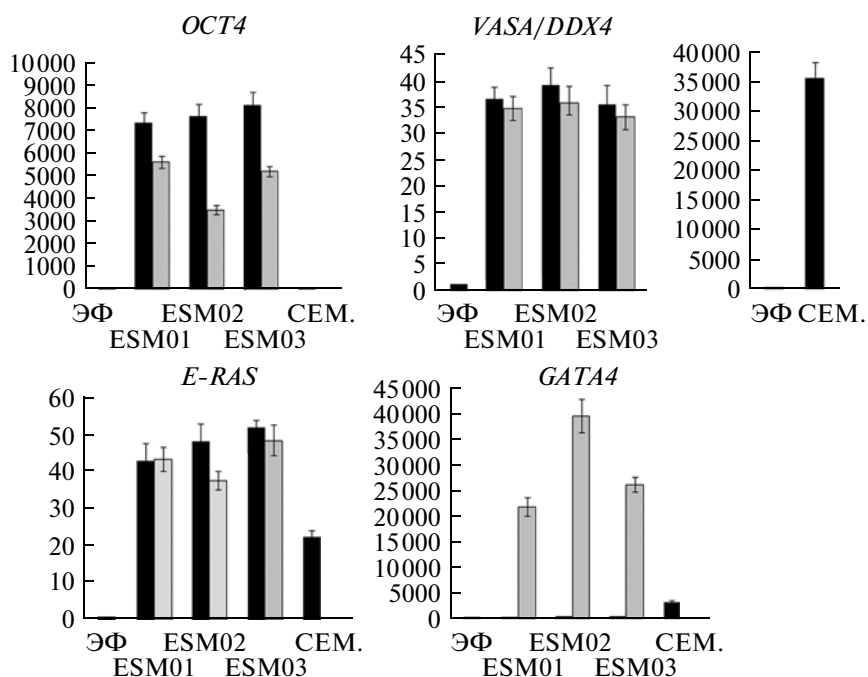


Рис. 9. ПЦР-анализ в реальном времени экспрессии генов *OCT4*, *VASA/DDX4*, *E-RAS* и *GATA4* в линиях ЭСК человека ESM01, ESM02 и ESM03. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT* (уровень экспрессии в ЭФ принят за 1 относительную единицу).

■ – недифференцированные клетки; ■ – ЭТ5; □ – СЕМ – семенник человека.

ференцировке у ЭСК человека, вероятно, является следствием более продвинутого статуса их плюрипотентности, по сравнению с ЭСК мыши. Таким образом, как показывает наш сравнительный анализ линий ЭСК человека и мыши, профили экс-

прессии генов, специфических для линии половых клеток, в значительной мере сходны, однако гены *VASA/DDX4* и *E-RAS* экспрессируются на значительно более низком уровне в ЭСК человека, чем в ЭСК мыши, что, вероятно, связано с различной

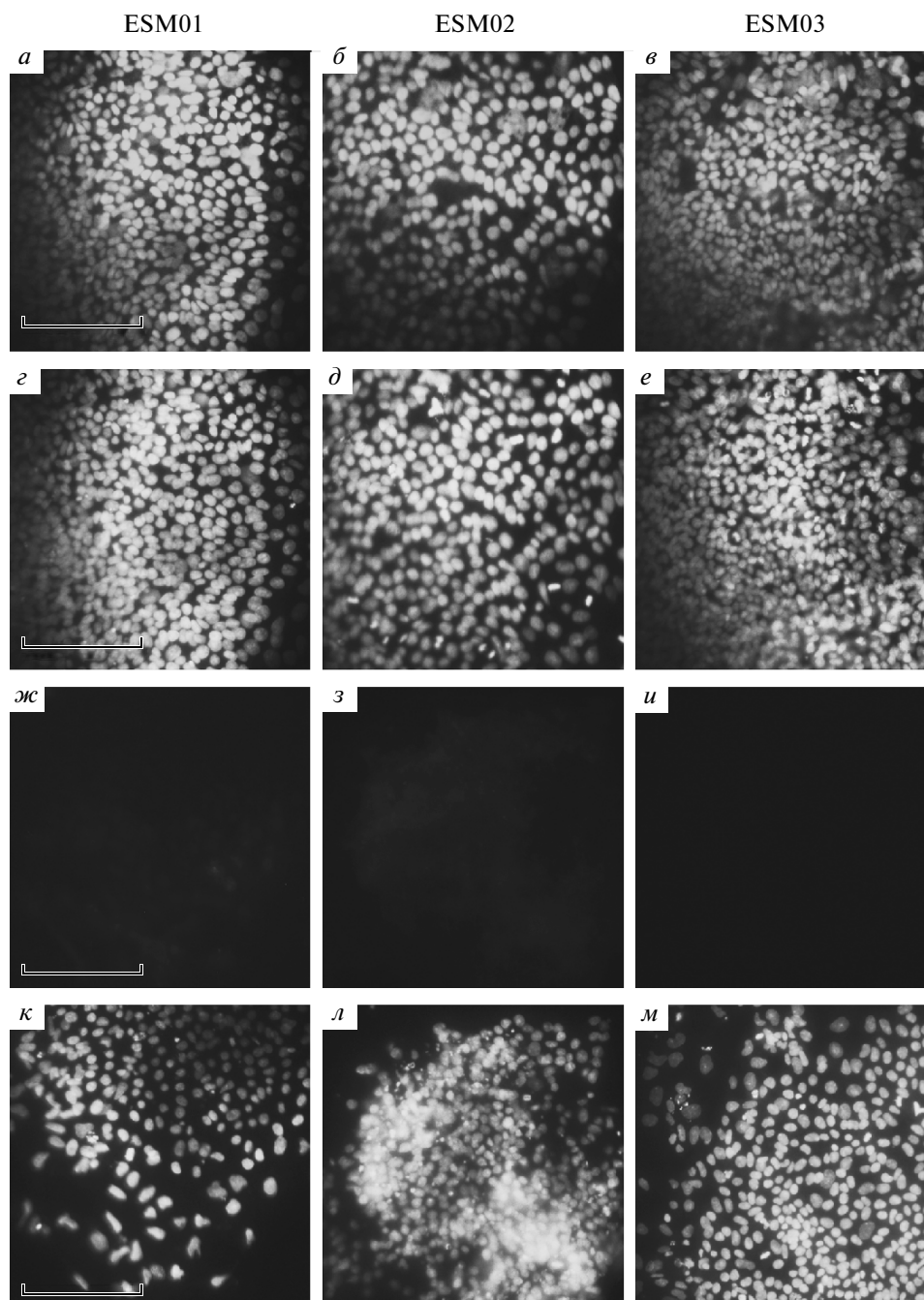


Рис. 10. Анализ экспрессии белков Oct4 (а–в) и Vasa (ж–и) в недифференцированных клетках линий ЭСК человека ESM01 (а, г, ж, к), ESM02 (б, д, з, л) и ESM03 (в, е, и, м). Ядра клеток на соответствующих препаратах докрашены DAPI (г–е; к–м).

ролью, которую играют эти гены в клетках, находящихся на разных фазах плюрипотентности.

Вариабельность экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в линиях ЭТК мыши и человека. Исследуя механизмы детерминации линии половых клеток у млекопитающих, мы использовали в качестве моделей не только нормальные плюрипотентные стволовые клетки, но также и линии ЭТК мыши и человека, которые принято

рассматривать в качестве малигнизированных аналогов плюрипотентных клеток. Все используемые линии ЭТК мыши и человека не были способны к спонтанной дифференцировке *in vitro* (рис. 11). Только в ЭТ, формируемых линией F9, мы наблюдали единичные клетки, дифференцирующиеся в клетки внезародышевой энтодермы. Гистологический анализ тератокарцином, развившихся после трансплантации ЭТК иммунодефицитным мы-

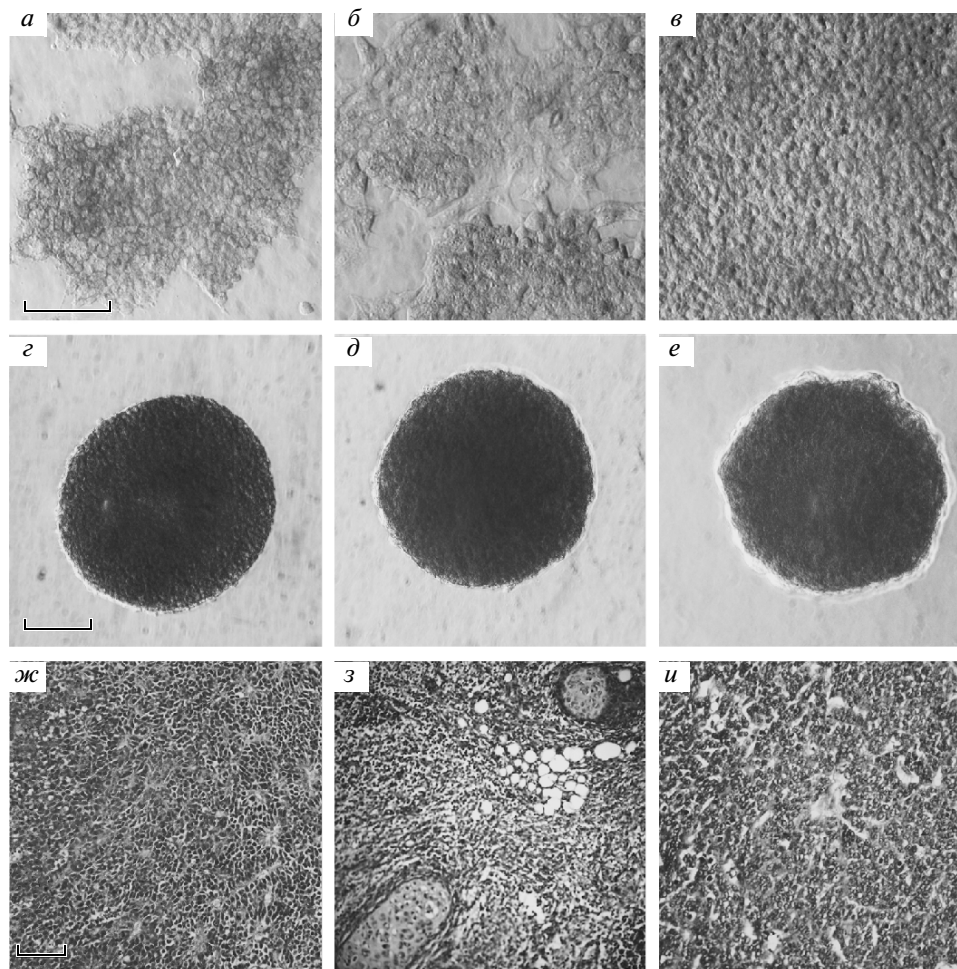


Рис. 11. Линии ЭТК мыши F9 (а, г, ж), P19 (б, д, з) и человека PA-1 (в, е, и). Активность щелочной фосфатазы в клетках колоний (а–в) и эмбрионидных тел (г–е), формируемых этими клеточными линиями. Срезы тератокарцином, развившихся после трансплантации клеток линий F9 (ж), P19 (з) и PA-1 (и) иммунодефицитным мышам.

шам, показал, что ЭТК F9 и PA-1 образовывали опухоли, состоящие только из недифференцированных клеток, тогда как в тератокарциномах, образованных ЭТК P19, наряду с недифференцированными опухолевыми клетками были обнаружены и зачатки хрящевых структур (рис. 11, ж–и). Эти данные свидетельствуют о том, что линии ЭТК F9 и PA-1 являются нуллипотентными тератокарциномными линиями.

Анализ клеточного цикла линий ЭТК выявил существенные различия в структуре для всех изученных линий (рис. 12). Так, митотический индекс (суммарное число клеток в S- и G2/M-фазах клеточного цикла) для клеток тератокарциномы человека PA-1 составлял 37, для ЭТК мыши P19 – 59.6, а для клеток F9 – 76.9%. Эти результаты показывают, что только линия F9 имеет структуру клеточного цикла, наиболее сходную с плюрипотентными стволовыми клетками. В то же время клеточный цикл линий P19 и PA-1 значительно отличается от типичного клеточного цикла плюрипотентных стволовых клеток более низким значением мито-

тического индекса и более продолжительным G1/G0-периодом клеточного цикла.

Существенные различия между линиями ЭТК были выявлены и при исследовании профилей экспрессии генов, специфических для линии половых клеток (рис. 13). Большинство изучаемых генов экспрессировалось только в линии F9, тогда как в линиях P19 и PA-1 ген *Vasa/Ddx4/DDX4* экспрессировался на низком уровне. Кроме того, в линии PA-1 не была выявлена экспрессия генов *BLIMP1* и *SCP3* ни в монослойных культурах, ни в ЭТ. Детальный количественный анализ генной экспрессии (рис. 14) показал, что различия в уровнях экспрессии гена *Vasa/Ddx4* для линий F9 и P19 составляют около 40 раз, при этом по сравнению с ЭСК мыши уровень экспрессии в F9 был ниже в 2.5 раза, а в P19 – почти в 100 раз. Уровень экспрессии *VASA/DDX4* в ЭТК PA-1 был практически равен уровню в ЭФ человека и в 18 раз ниже, чем в ЭСК человека. Иммуногистохимический анализ экспрессии белка *Vasa/Ddx4/DDX4* также подтвердил данные ПЦР-анализа (рис. 15). Наиболее

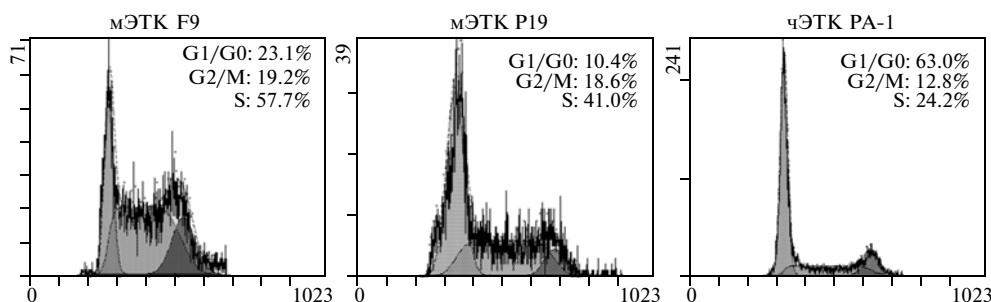


Рис. 12. Анализ клеточного цикла ЭТК мыши (F9, P19) и человека (PA-1). По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток.

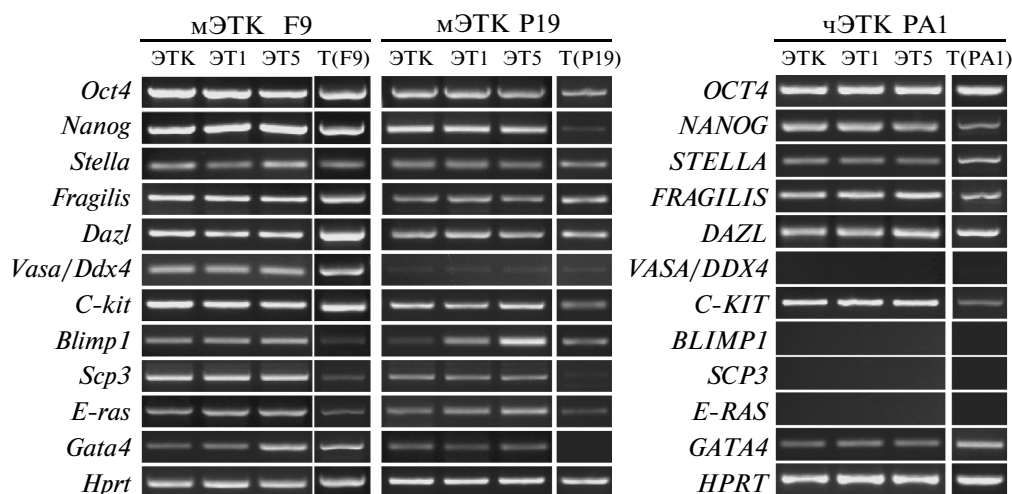


Рис. 13. Экспрессия генов, специфических для линии половых клеток, в линиях ЭТК мыши и человека. ЭТ1, ЭТ5 – эмбрионидные тела на 1-е и 5-е сут развития, T(F9), T(P19), T(PA-1) – тератокациномы, сформированные линиями ЭТК *in vivo*.

неожиданные результаты дал анализ экспрессии гена *E-ras/E-RAS*. Так, в монослойных культурах линий F9 и P19 уровень его экспрессии был сопоставим с уровнями в ЭСК и ЭГК мыши, однако он почти вдвое возрастал в ЭТ5 по сравнению с монослойными культурами. Напротив, в ЭТК PA-1 уровень экспрессии гена *E-RAS* не изменялся и был в 3 раза ниже, чем в ЭСК человека (рис. 14).

Экспрессия гена *Gata4/GATA4* во всех линиях ЭТК была обнаружена на уровне, сходном с уровнем в недифференцированных ЭСК мыши и человека (рис. 14). Однако в отличие от плюрипотентных клеток его экспрессия в ЭТ, формируемых ЭТК, была значительно ниже, чем в ЭСК (для F9 – в 10 раз, для P19 – в 80 раз, для P19 – в 167 раз), а экспрессия белка не детектировалась иммуногистохимически (данные не приведены), кроме единичных клеток ЭТ F9 (см.: Гордеева и др., 2009).

В сумме полученные данные свидетельствуют о том, что тератокарциномные клетки используемых линий в большей или меньшей степени проявляют свойства, сходные с линиями плюрипотентных стволовых клеток. Наблюдаемые разли-

чия в структуре их клеточного цикла в значительной мере коррелируют с их паттерном экспрессии генов, специфических для линий половых клеток, в частности гена *Vasa/Ddx4/DDX4*. Однако данные об экспрессии изучаемых генов в ЭТК не дают возможность прогнозировать их потенциал к дифференцировке, а позволяют судить только о степени отклонения от их прототипа – плюрипотентных стволовых клеток. Такие отличия, вероятно, связаны со значительными перестройками в регуляторных сетях трансформированных опухолевых клеток.

Изменение экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, при культивировании плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток мыши в присутствии ингибиторов PD 98059 и BIO и фактора LIF (2i + LIF). Для того чтобы понять, возможно ли регулировать статус дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клеток или тератокарциномных клеток *in vitro*, мы использовали систему культивирования, разработанную для репрограммирования первичных (primed) плюрипотентных стволовых клеток (ство-

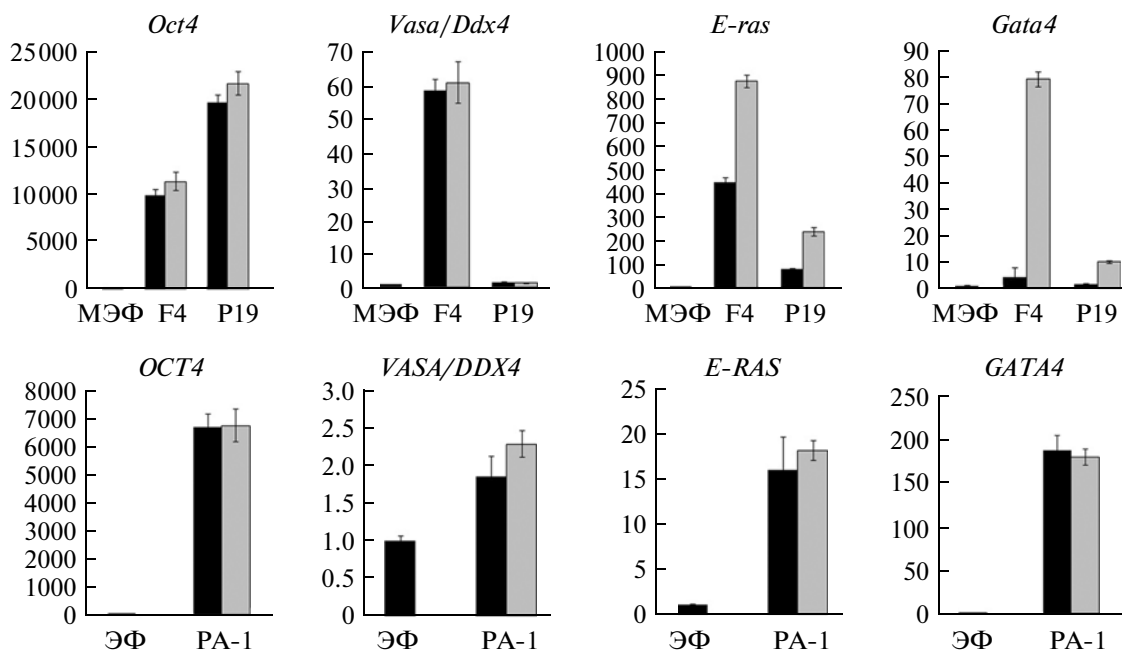


Рис. 14. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени экспрессии генов *Oct4/OCT4*, *Vasa/Ddx4/DDX4*, *E-ras/E-RAS* и *Gata4/GATA4* в линиях ЭТК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *Hprt/HPRT* (уровень экспрессии в МЭФ или ЭФ человека принят за 1 относительную единицу); обозначения см. на рис. 4.

ловых клеток эпибласта) к базовому статусу плюрипотентности (ground state). Монослойные культуры ЭТК F9 и P19, а также дифференцирующиеся ЭТЗ, сформированные ЭСК R1 и ЭГК EG-12.5, культивировали в течение 48 ч в среде с ингибиторами PD 98059 и ВЮ и фактором LIF (2i + LIF условия) (рис. 16). После завершения эксперимента мы обнаружили существенные различия в морфологии экспериментальных и контрольных культур ЭТК. В обеих линиях клеточные кластеры становились многослойными и приобретали сходство с колониями недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши. Кроме того, по сравнению с контрольными культурами, растущими в среде только с фактором LIF, в них значительно возрастала активность щелочной фосфатазы (рис. 16). В условиях 2i + LIF значительно снижалась адгезия ЭТ R1 и ЭТ EG-12.5 к субстрату и поддерживался их объемный рост (рис. 16). При этом не было выявлено значимых различий в скорости роста в контрольных и экспериментальных культурах для всех клеточных линий (рис. 17, а, б). Изучение распределения клеток по стадиям клеточного цикла показало, что в популяциях ЭСК и ЭГК, поддерживаемых в условиях 2i + LIF, число клеток уменьшается в G1/G0-фазе и возрастает в S-фазе по сравнению с контрольными культурами (+ LIF) (рис. 17, в). В то же время в линиях ЭТК не было выявлено существенных изменений (рис. 17, в). Необходимо отметить, что эффект условий культивирования 2 + LIF был полностью обратим после перемещения клеток в стандартные условия.

Количественный анализ генной экспрессии показал, что в условиях культивирования 2i + LIF происходит частичное восстановление экспрессии *Oct4*, *Vasa/Ddx4* и *Gata4* в ЭТ R1 и ЭТ EG-12.5 до уровня недифференцированных ЭСК и ЭГК (рис. 18). В ЭТК P19 экспрессия генов *Oct4* и *Gata4* не изменялась, а уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4* статистически достоверно возрастал ($p < 0.05$), но все равно не достигал значений, выявляемых в ЭСК и ЭГК мыши. В линии ЭТК F9 экспрессия этих генов оставалась без изменений ($p > 0.05$). Однако во всех изучаемых линиях, растущих в условиях культивирования 2i + LIF, мы наблюдали статистически достоверное снижение экспрессии гена *E-ras*. Причины снижения экспрессии гена *E-ras* в экспериментальных культурах сложно объяснить, учитывая что это снижение происходит на фоне высокого уровня экспрессии гена *Oct4* и отсутствия различий в скорости роста клеток в опыте и контроле. Полученный результат указывает на возможную негативную регуляцию экспрессии гена *E-ras* при ингибировании сигнального пути ERK/MAPK-киназ, активного в дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клетках.

Таким образом, в условиях, способствующих переходу плюрипотентных стволовых клеток из первичного в базовый статус плюрипотентности, дифференцирующиеся клетки ЭСК и ЭГК мыши также способны к реверсии исходного статуса и усилению экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4*. В линиях ЭТК мыши, растущих в данной системе культивирования, происходят лишь морфологиче-

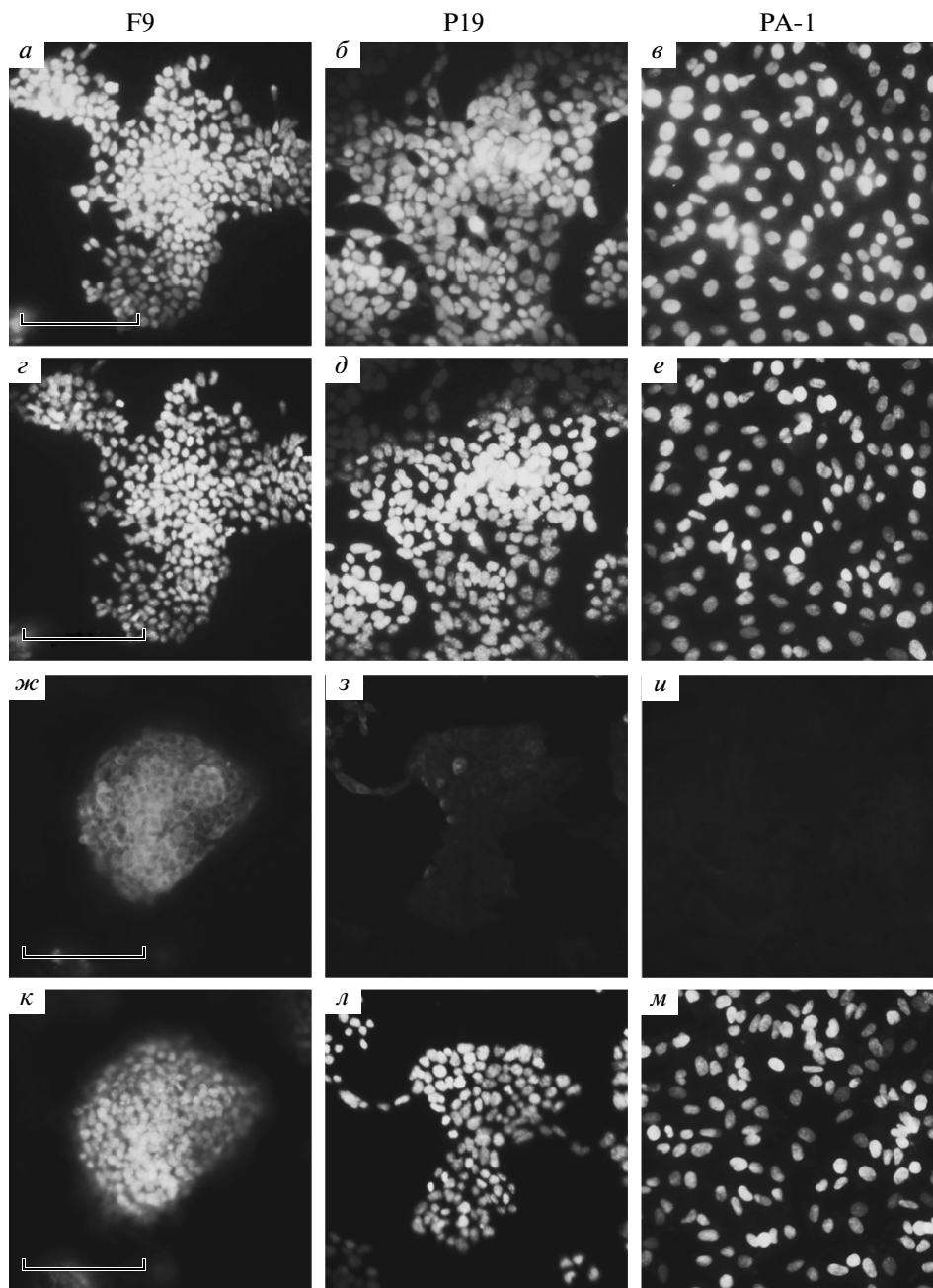


Рис. 15. Экспрессия белков Oct4 (а–в) и Vasa (ж–и) в ЭТК мыши и человека. Ядра клеток на соответствующих препаратах докрашены DAPI (г–е; к–м).

ские изменения без существенных изменений в экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx*, не приводящих к изменению статуса этих клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

В раннем предгастрюляционном развитии млекопитающих происходит разграничение программ дифференцировки линий половых и соматических клеток. Как было показано, способность участвовать в развитии линии половых клеток является

основным отличием клеток, находящихся в статусе базовой плюрипотентности (ground state), от клеток в фазе первичной плюрипотентности (primed state). Одним из регуляторов поддержания клеток в базовом статусе плюрипотентности является транскрипционный фактор Klf4 (Guo et al., 2009). Кроме того, ингибирование сигнального пути ERK/MAPK-киназ, а также стимуляция сигнальных путей Wnt и LIF/Stat3 препятствует утрате плюрипотентными клетками способности дифференцироваться в линию половых клеток (Silva

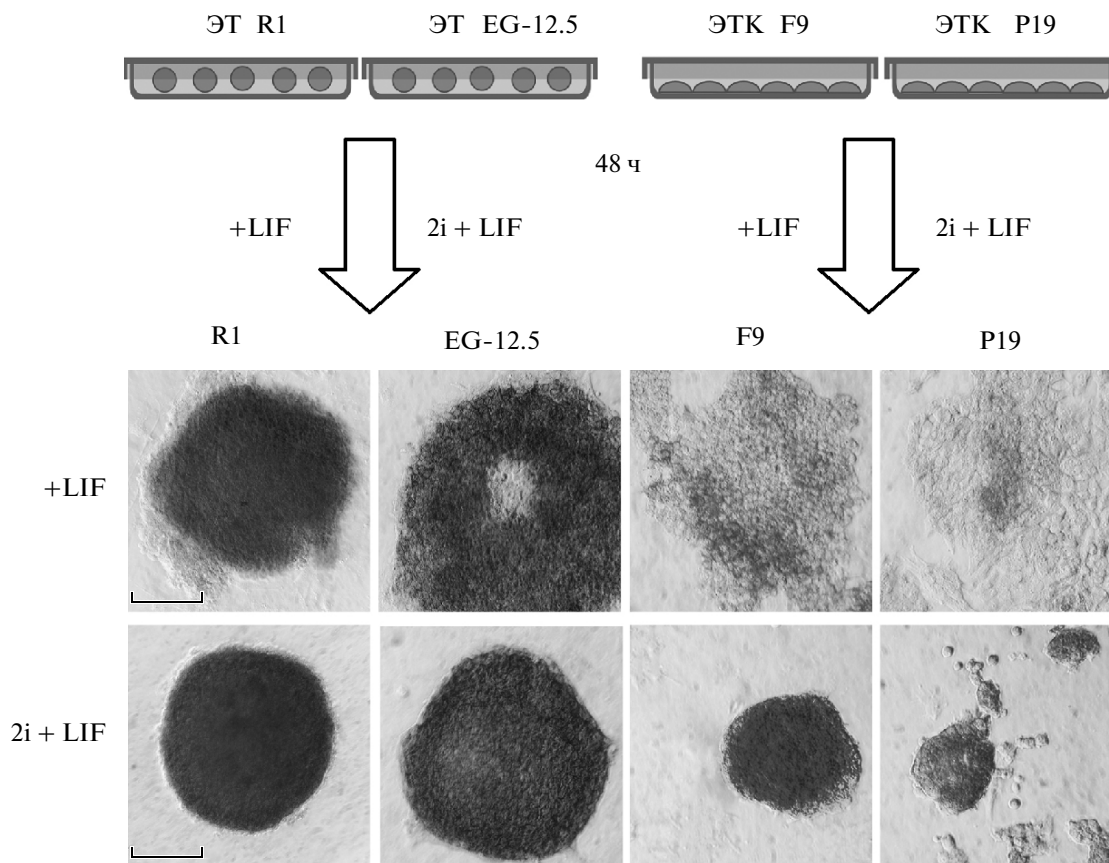


Рис. 16. Репрограммирование статуса дифференцирующихся ЭСК и ЭГК, а также ЭТК мыши в условиях культивирования с ингибиторами PD 98059 и ВЮ и фактором LIF (2i + LIF). Схема эксперимента. Морфология и активность щелочной фосфатазы в ЭТ R1 и EG-12.5 и ЭТК F9 и P19.

et al., 2008; Yang et al., 2010). Известно, что в регуляцию дифференцировки плюрипотентных клеток в линию половых клеток вовлечены и гены с материнским эффектом, которые экспрессируются как в половых клетках, так и в тотипотентных и плюрипотентных клетках ранних эмбрионов (Lacham-Karlan, 2004).

Мы исследовали экспрессию генов, вовлеченных в развитие линии половых клеток, а также экспрессирующихся в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека. Результаты проведенных исследований показали, что клетки бластоцисты, гонциты E13.5, ЭСК и ЭГК мыши имеют очень похожие профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток. Мы впервые обнаружили, что ген *Vasa/Ddx4* экспрессируется не только в мигрирующих половых клетках и гонцитах, но и в клетках бластоцист мыши, причем уровни экспрессии этого гена в бластоцистах и гонцитах были практически одинаковыми, тогда как в клетках эпибласта E6.5 его экспрессия была значительно ниже (в 267 раз). Нельзя исключить, что низкий уровень экспрессии гена *Vasa/Ddx4*, детектируемый в эпибласте и гонцитах E10.5, может быть связан с малым количеством первичных по-

ловых клеток в этих зачатках по отношению к остальным клеткам. Интересно отметить, что недавно и в эпибласте мыши были обнаружены две субпопуляции, различающиеся по активности гена *Oct4* и способности участвовать в развитии химер (Han et al., 2010). Можно предположить, что субпопуляция, сохраняющая способность к формированию химер, представляет собой клетки самых ранних предшественников линии половых клеток. С другой стороны, обнаруженный нами низкий уровень экспрессии гена *VASA/DDX4* в ЭСК человека по сравнению с ЭСК мыши может свидетельствовать о сходстве ЭСК человека с клетками эпибласта мыши и о первичном статусе (primed state) плюрипотентности этих клеточных линий. В ряде работ было показано, что усиление экспрессии *VASA/DDX4* в ЭСК человека и мыши приводит к их дифференцировке в линию половых клеток и даже к формированию гаплоидных половых клеток (Hübner et al., 2003; Clark et al., 2004; Kee et al., 2006; Nayernia et al., 2006). Однако данные по экспрессии этого гена в ЭСК мыши и человека существенно различаются. Так, большинство авторов отмечают низкий уровень экспрессии *VASA/DDX4* в недифференцированных клетках

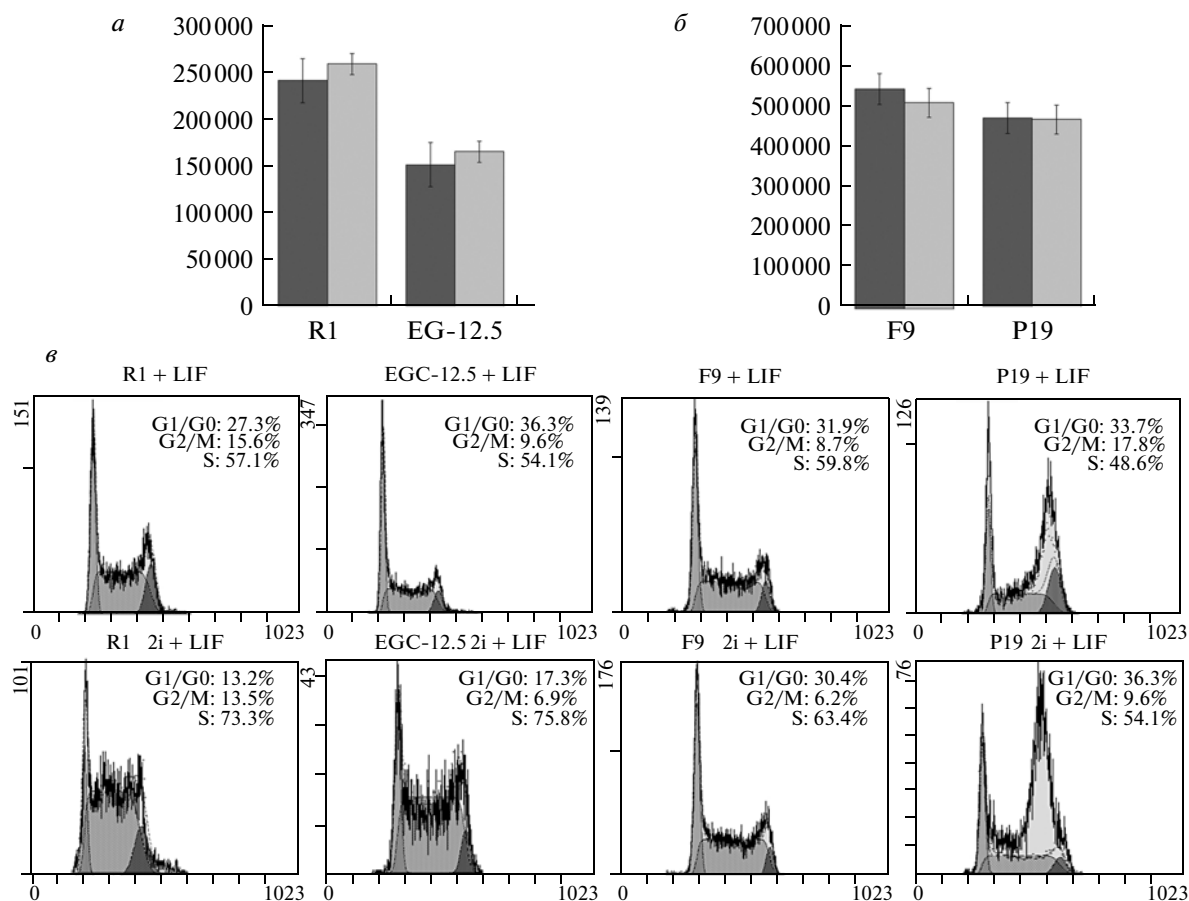


Рис. 17. Скорость роста клеток и структура клеточного цикла линий R1, EG-12.5, F9 и P19 в экспериментах с культивированием в условиях 2i + LIF. *а, б* – скорость роста линий R1, EG-12.5 (*а*), F9 и P19 (*б*) в условиях с LIF (■) и 2i + LIF (▒); *в* – структура клеточного цикла линий R1, EG-12.5, F9 и P19 в контрольных и экспериментальных культурах. По оси абсцисс – клеточные линии, по оси ординат – число клеток в контрольных и экспериментальных культурах.

ЭСК человека, тогда как паттерн его экспрессии в ЭСК мыши очень варьирует (Hübner et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Clark et al., 2004; Tilgner et al., 2008). В нашей работе экспрессия мРНК и белка *Vasa/Ddx4* была обнаружена в недифференцированных ЭСК и ЭГК мыши, хотя уровень экспрессии мРНК был ниже, чем в клетках бластоцисты и гонциотов E13.5. При этом экспрессия этого гена в ЭСК мыши была значительно выше, чем в ЭСК человека.

В контексте этих данных, относительно легкую конверсию первичных половых клеток в плюрипотентные стволовые клетки *in vitro* можно объяснить сходными паттернами экспрессии генов, специфических для линии половых клеток и, в частности, ключевого гена *Vasa/Ddx4*, в клетках бластоцисты и гонциотов мыши. Полученные результаты об экспрессии гена *Vasa/Ddx4* в линиях ЭСК и ЭГК мыши также свидетельствуют о сходстве их статусов с клетками внутренней клеточной массы бластоцисты (ground state). Таким образом, мы полагаем, что паттерн экспрессии гена *Vasa/Ddx4/DDX4* можно рассматривать как еще

один молекулярный детерминант базового статуса плюрипотентности (ground state). Все эти факты свидетельствуют о том, что паттерн экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, может быть ассоциирован с различными фазами плюрипотентности. Кроме того, нельзя исключить, что он преддетерминирован в плюрипотентных клетках для сохранения их потенциала к формированию линии половых клеток.

Несмотря на значительное сходство плюрипотентных и первичных половых клеток в развивающемся зародыше и линий ЭСК и ЭГК, тем не менее полученные нами данные об уровнях экспрессии генов *Oct4* и *E-ras* в этих клетках наглядно демонстрируют различия в механизмах поддержания плюрипотентного статуса *in vivo* и *in vitro*. Резкое возрастание экспрессии *Oct4* и *E-ras* в ЭСК и ЭГК мыши, вероятно, необходимо для поддержания очень высокой скорости самообновления плюрипотентных клеток в условиях *in vitro* в течение длительного периода культивирования. С другой стороны, роль гена *E-RAS* в регуляции пролиферации ЭСК человека (primed state) и мыши

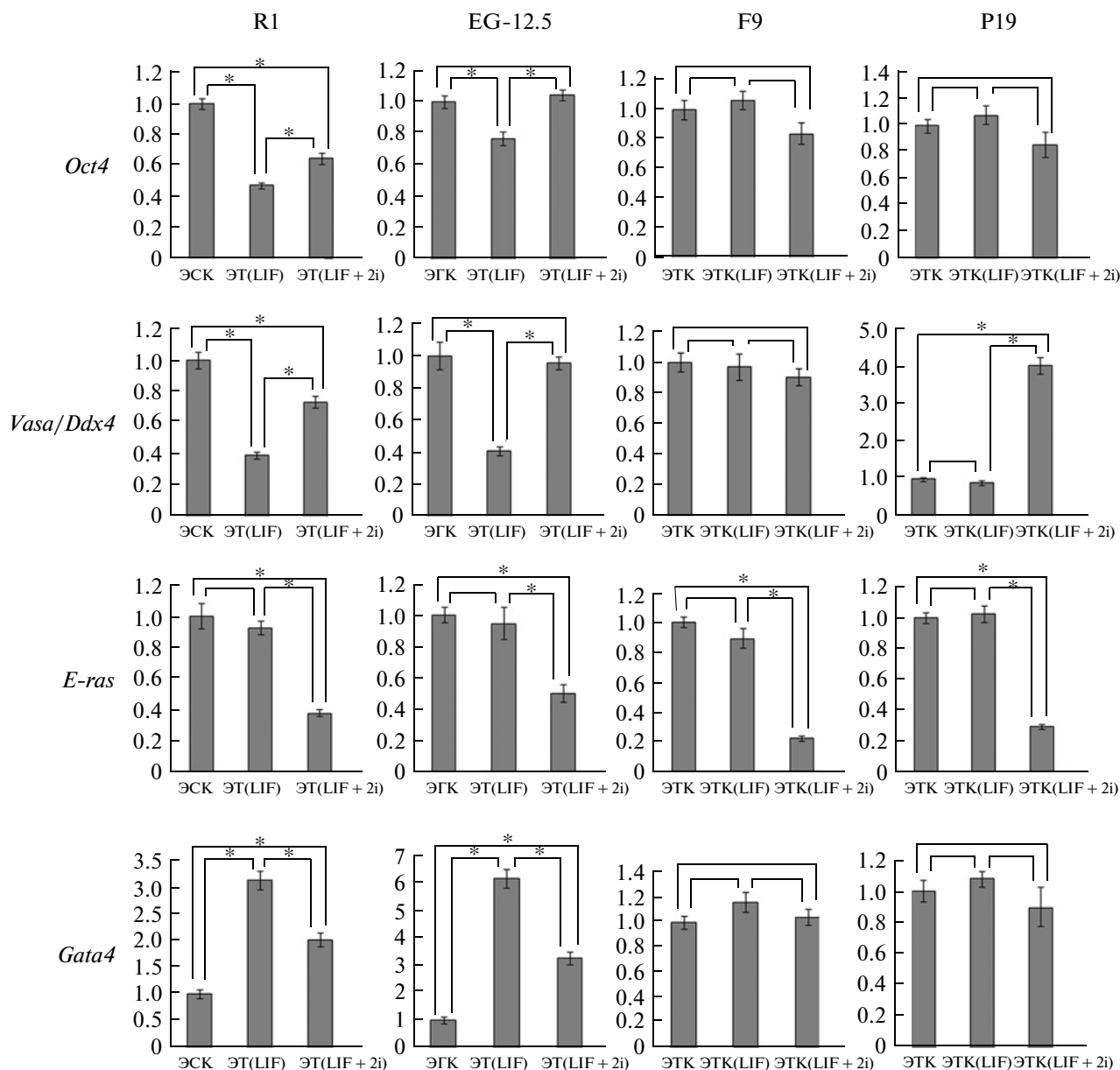


Рис. 18. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени экспрессии генов *Oct4*, *Vasa/Ddx4*, *E-ras* и *Gata4* в линиях R1, EG-12.5, F9 и P19 в экспериментах с культивированием в условиях 2i + LIF. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованный к уровню экспрессии гена *Hprt* (уровень экспрессии в недифференцированных клетках (ЭСК, ЭГК, ЭТК), растущих в стандартных условиях (см. “Материал и методику”), принят за 1 относительную единицу).

ЭТ(LIF), ЭТК(LIF) – контрольные клеточные культуры, растущие в среде с фактором LIF; ЭТ(2i + LIF), ЭТК(2i + LIF) – клеточные культуры, растущие в условиях эксперимента в среде с ингибиторами и фактором LIF.

(ground state) может существенно различаться, так как уровни его экспрессии существенно различаются в этих клетках.

Поддержание регуляторного баланса пролиферативных и антипролиферативных сигналов является основой гомеостаза стволовых клеток, в том числе и плюрипотентных. Нарушение этого баланса в трансформированных опухолевых клетках приводит к снижению их потенциала к дифференцировке и усилению пролиферации. Изучение ли-

ний ЭТК мыши и человека показало, что профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, значительно варьируют в разных линиях и в большей или меньшей степени сходны с профилями соответствующих линий ЭСК мыши и человека. В линиях P19 и PA-1 экспрессия гена *Vasa/Ddx4/DDX4* была значительно ниже, чем в ЭСК, тогда как в линии F9 эти различия были не столь существенны. Кроме того, в клетках ЭТК имела место и несбалансированная экспрессия ге-

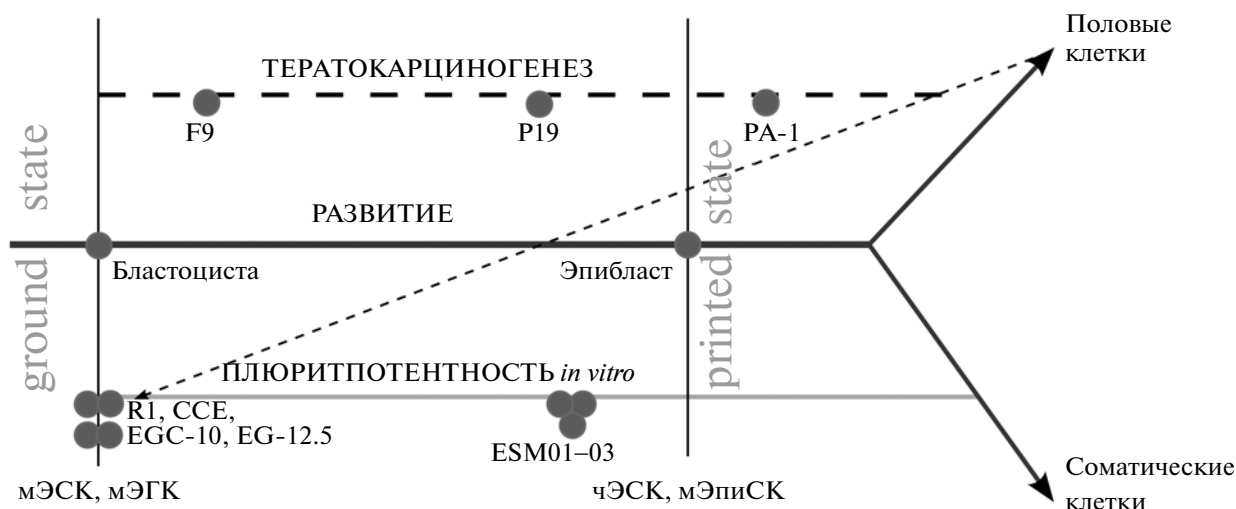


Рис. 19. Изменение статусов плюрипотентных стволовых клеток в развитии, при адаптации и поддержании *in vitro* и в процессе тератоканцерогенеза. Линии плюрипотентных стволовых клеток в процессе адаптации *in vitro* переходят в метастабильное состояние. Статус каждой линии может быть определен в пределах двух фаз плюрипотентности (ground state и primed state). Определенные соотношения уровней экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* могут служить индикаторами удаленности от ground state. Статусы клеток тератоканцином представляют собой неопределенные устойчивые состояния с частичной аналогией статусам плюрипотентных клеток.

нов *E-ras/E-RAS* и *Gata4/GATA4*. На основании полученных результатов можно говорить лишь о сходстве или различиях клеток этих линий с их нормальными клетками-прототипами, но в отличие от плюрипотентных стволовых клеток невозможно определить их статус в рамках двух фаз плюрипотентности (рис. 19).

Интересно отметить, что плюрипотентные стволовые клетки, поддерживаемые *in vitro* в течение длительного времени, способны интегрироваться в эмбрион на стадии бластоцисты и участвовать в развитии всех типов клеток, включая линию половых клеток (Nagy et al., 1993). Таким образом, линии плюрипотентных стволовых клеток сохраняют способность восстанавливать экспрессию генов до соответствующих уровней в плюрипотентных клетках бластоцисты. Интересно, что снижение экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* наблюдается на ранних стадиях дифференцировки ЭТ, однако уровень экспрессии гена *E-ras* практически не изменяется на этих стадиях. В наших экспериментах с культивированием ЭСК, ЭГК и ЭТК мыши в условиях 2i + LIF мы обнаружили, что дифференцирующиеся ЭТ, формируемые ЭСК и ЭГК, способны восстанавливать экспрессию генов *Oct4*, *Vasa/Ddx4* и *Gata4* практически до их уровня в недифференцированных клетках. В отличие от нормальных клеток в линиях ЭТК не было выявлено значимых изменений в экспрессии этих генов. Обнаруженное снижение уровня экспрессии гена *E-ras* во всех линиях, растущих в условиях 2i + LIF, пока не находит своего объяснения, тем более что оно происходит на фоне

подъема экспрессии *Oct4* и *Vasa/Ddx4* в плюрипотентных клетках.

Недавно было обнаружено, что флуктуации уровней экспрессии генов *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* в индивидуальных плюрипотентных стволовых клетках мыши, поддерживаемых *in vitro*, могут достигать 10 раз (Tang et al., 2010). Такие флуктуации генной экспрессии рассматриваются авторами как молекулярная основа инициации разных типов дифференцировки плюрипотентных клеток. Конкурентный выбор клеточной судьбы на начальных стадиях дифференцировки плюрипотентных клеток осуществляется на основе сочетания определенных уровней экспрессии регуляторных факторов в индивидуальных клетках. Высказана новая точка зрения о том, что детерминация различных эмбриональных линий в популяции плюрипотентных клеток определяется флуктуациями в экспрессии факторов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Esrrb* и *Tbx3*, экспрессирующихся на высоком уровне в недифференцированных плюрипотентных клетках и традиционно считающихся репрессорами их дифференцировки (Loh, Lim, 2011). Эти данные убедительно демонстрируют, что флуктуации генной экспрессии являются обязательным свойством плюрипотентных клеток, находящихся в метастабильном состоянии. Вероятно, при трансформации плюрипотентных клеток они могут его утрачивать и переходить в стабильное недифференцированное состояние, как например, линии ЭТК.

В заключение необходимо отметить, что в соответствии с принятыми на сегодняшний день представлениями линии плюрипотентных стволовых клеток составляют группу сходных клеточных ли-

ний различного происхождения, которые в процессе адаптации *in vitro* переходят в метастабильное состояние. Статус каждой клеточной линии может быть определен в пределах двух фаз плюрипотентности (ground state и primed state). Поддержание базового статуса плюрипотентности (ground state), включающего способность клеток данной линии участвовать в развитии половых клеток, может быть ассоциировано с экспрессией генов, специфических для линии половых клеток. Как показывают наши результаты, определенные соотношения уровней экспрессии генов *Oct4* и *Vasa/Ddx4* могут служить молекулярными детерминантами базового и первичного статуса плюрипотентности. Статусы клеток тератокарцином представляют собой неопределенные устойчивые состояния с частичной аналогией статусам плюрипотентных клеток.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-0037-а). Авторы благодарны Т.М. Никоновой за помощь в подготовке гистологических срезов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Никонова Т.М. Регуляция *in vitro* и *in vivo* дифференцировки эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и тератокарциномных клеток мыши факторами семейства TGF β // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 6. С. 403–418.
- Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. P. 803–816.
- Brons I.G.M., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007. V. 448. P. 191–195.
- Cauffman G., Van de Velde H., Liebaers I. et al. DAZL expression in human oocytes, preimplantation embryos and embryonic stem cells // Mol. Hum. Reprod. 2005. V. 11. P. 405–411.
- Chin M.H., Pellegrini M., Plath K. et al. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 263–269.
- Clark A.T., Bodnar M.S., Fox M. et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro* // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. P. 727–739.
- Durcova-Hills G., Wianny F., Merriman J. et al. Developmental fate of embryonic germ cells (EGCs), *in vivo* and *in vitro* // Differentiation. 2003. V. 71. P. 135–141.
- Gordeeva O.F. Normal and Pathological Development of Pluripotent Stem Cells // Pluripotent stem cells. Eds. Rosales D.W., Mullen Q.N. N.Y: Nova Sci. Publ. Ink., 2010. P. 1–45.
- Guenther M.G., Frampton G.M., Soldner F. et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 249–257.
- Guo G., Yang J., Nichols J. et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency // Development. 2009. V. 136. P. 1063–1069.
- Han D.W., Tapia N., Joo J.Y. et al. Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pre-gastrulation stages // Cell. 2010. V. 143. P. 617–627.
- Hayashi K., Surani M.A. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. P. 493–498.
- Hovatta O., Jaconi M., Töhönen V. et al. A teratocarcinoma-like human embryonic stem cell (hESC) line and four hESC lines reveal potentially oncogenic genomic changes // PLoS ONE. 2010. V. 5. P. e10263.
- Hübner K., Fuhrmann G., Christenson L.K. et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells // Science. 2003. V. 300. P. 1251–1256.
- Kee K., Gonsalves J.M., Clark A.T. et al. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells // Stem Cells Devel. 2006. V. 15. P. 831–837.
- Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B. et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival // EMBO Rep. 2004. V. 5. P. 1078–1083.
- Kleinsmith L.J., Pierce G.B. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells // Cancer Res. 1964. V. 24. P. 1544–1551.
- Lacham-Kaplan O. *In vivo* and *in vitro* differentiation of male germ cells in the mouse // Reproduction. 2004. V. 128. P. 147–152.
- Laurent L.C., Ulitsky I., Slavin I. et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture // Cell Stem Cell. 2011. V. 8. P. 106–118.
- Loh K.M., Lim B. A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers // Ibid. 2011. V. 8. P. 363–369.
- Mayshar Y., Ben-David U., Lavon N. et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells // Ibid. 2010. V. 7. P. 521–531.
- McLaren A., Durcova-Hills G. Germ cells and pluripotent stem cells in the mouse // Reprod. Fertil. Devel. 2001. V. 13. P. 661–664.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R. et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 8424–8428.
- Nayernia K., Nolte J., Michelmann H.W. et al. *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice // Devel. Cell. 2006. V. 11. P. 125–132.
- Nichols J., Smith A. Naive and primed pluripotent states // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. P. 487–492.
- Ohinata Y., Payer B., O'Carroll D. et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice // Nature. 2005. V. 436. P. 207–213.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // Ibid. 2007. V. 448. P. 313–317.
- Pesce M., Schöler H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development // Stem Cells. 2001. V. 19. P. 271–278.
- Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L. et al. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture // Nature. 1992. V. 359. P. 550–551.
- Reynolds N., Cooke H.J. Role of the DAZ genes in male fertility // Reprod. Biomed. Online. 2005. V. 10. P. 72–80.

- Reynolds N., Collier B., Maratou K. et al. Dazl binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. P. 3899–3909.
- Reynolds N., Collier B., Bingham V. et al. Translation of the synaptonemal complex component Sycp3 is enhanced in vivo by the germ cell specific regulator Dazl // *RNA.* 2007. V. 13. P. 974–981.
- Rilianawati, Speed R., Taggart M. et al. Spermatogenesis in testes of Dazl null mice after transplantation of wild-type germ cells // *Reproduction.* 2003. V. 126. P. 599–604.
- Saitou M., Barton S.C., Surani M.A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice // *Nature.* 2002. V. 418. P. 293–300.
- Saitou M., Payer B., O'Carroll D. et al. Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse // *Cell Cycle.* 2005. V. 4. P. 1736–1740.
- 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.
- Silva J., Barrandon O., Nichols J. et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. e253.
- Stewart C.L., Gadi I., Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line // *Devel. Biol.* 1994. V. 161. P. 626–628.
- Takahashi K., Mitsui K., Yamanaka S. Role of ERAs in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells // *Nature.* 2003. V. 423. P. 541–545.
- Tanaka S.S., Toyooka Y., Akasu R. et al. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells // *Genes Devel.* 2000. V. 14. P. 841–853.
- Tang F., Barbacioru C., Bao S. et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. P. 468–478.
- Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // *Nature.* 2007. V. 448. P. 196–199.
- Tilgner K., Atkinson S.P., Golebiewska A. et al. Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 3075–3085.
- Toyooka Y., Tsunekawa N., Takahashi Y. et al. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development // *Mech. Devel.* 2000. V. 93. P. 139–149.
- Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R. et al. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 11457–11462.
- Wood S.A., Pascoe W.S., Schmidt C. et al. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture // *Ibid.* 1993. V. 90. P. 4582–4585.
- Yang J., van Oosten A.L., Theunissen T.W. et al. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 7. P. 319–328.
- Ying Q., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal // *Nature.* 2008. V. 453. P. 519–523.
- Zhang C., Ye X., Zhang H. et al. GATA factors induce mouse embryonic stem cell differentiation toward extraembryonic endoderm // *Stem Cells Devel.* 2007. V. 16. P. 605–613.

Expression Patterns of Germ Line Specific Genes in Mouse and Human Pluripotent Stem Cells are Associated with Regulation of Ground and Primed State of Pluripotency

O. F. Gordeeva^a, N. V. Lifantseva^a, and S. V. Khaidukov^b

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

^b Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Makali 16/10, Moscow, 117997 Russia
e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Abstract—One of the main criteria of pluripotent cell lines is their ability to differentiate into the germ cell line. Lines of pluripotent stem cells with ground state of pluripotency are different from the lines with a primed state by ability to supply development of full gametes. To determine molecular mechanisms involved in regulation of different states of pluripotency, we investigated the expression patterns of genes involved in regulation of development of germ cell lines in different type pluripotent stem cells and the cells of mouse and human embryonal teratocarcinoma. We determined that pluripotent stem cells in vitro, cells of blastocyst, and gonocytes at stage E13.5 possess similar expression patterns in contrast to the ectoblast cells at stage E6.5. Quantitative real time PCR analysis showed that expression of gene *Vasa/Ddx4* in mouse and human embryonal stem cells is lower than in blastocyst and gonocytes. In addition, expression level of genes *Vasa/Ddx4* and *E-ras* is significantly higher in mouse embryonal stem cells than in human embryonal stem cells. We determined during cultivation of differentiating embryonal stem cells, embryonal germ mouse cells, and embryonal teratocarcinoma of mouse in the cultivation system promoting reprogramming the cells from primed to ground state of pluripotency (2i+LIF) that only pluripotent cells are able to regulate the expression level of genes *Oct4* and *Vasa/Ddx4* reducing initial state, while the expression level in the cells of embryonal teratocarcinomas remains unchanged. We suppose that gene expression patterns specific for germ cell lines in particular of *Vasa/Ddx4* gene can be involved in regulation of ground and primed states of pluripotency.

Keywords: pluripotent cells, embryonal stem cells, teratocarcinoma, germ cell line, blastocyst, ground state, *Vasa*, *Oct*, *E-ras*