

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА TGF β И ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ FGF2 В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА, ПОДДЕРЖИВАЕМЫХ В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2013 г. Н. В. Лифанцева*, А. М. Кольцова**, Г. Г. Полянская**, О. Ф. Гордеева*

* Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

** Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

Поступила в редакцию 06.08.12 г.

Окончательный вариант получен 04.09.12 г.

Эмбриональные стволовые клетки мыши и человека находятся в разных статусах плюрипотентности — базовом и первичном (naïve/ground and primed states). Механизмы сигнальной регуляции клеток в базовом и первичном статусах плюрипотентности значительно различаются. Для того, чтобы понять вклад эндогенных и экзогенных факторов в поддержании метастабильного состояния клеток в разных статусах плюрипотентности, мы исследовали экспрессию факторов семейства TGF β (ActivinA, Nodal, Lefty1, TGF β 1, GDF3 и BMP4) и FGF2, инициирующие соответствующие сигнальные пути, в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека (мЭСК и чЭСК) и поддерживающих их фидерных клетках. Количественный ПЦР анализ генной экспрессии показал, что паттерны эндогенной экспрессии изучаемых факторов значительно различаются в мЭСК и чЭСК. Наиболее существенные различия были обнаружены в уровнях эндогенной экспрессии TGF β 1, BMP4 и ActivinA, а также FGF2. Источниками экзогенных факторов ActivinA, TGF β 1 и FGF2 для чЭСК являются фидерные клетки (эмбриональные фибробласты мыши и человека), экспрессирующие высокие уровни этих факторов, а также низкий уровень BMP4. Таким образом, наши данные показали, что поддержание метастабильного недифференцированного состояния плюрипотентных клеток *in vitro* достигается в мЭСК и чЭСК с помощью различных схем регуляций ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 и BMP/Smad1/5/8 эндогенных ветвей TGF β сигналинга. Необходимость экзогенной стимуляции или ингибирования этих сигнальных путей обусловлена различиями в паттернах эндогенной экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2 в мЭСК и чЭСК. Для чЭСК усиление ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 сигналинга с помощью экзогенных факторов, возможно, является необходимым для ослабления эффектов BMP/Smad1/5/8 сигнальных путей, стимулирующих дифференцировку в клетки внезародышевых структур. Значительные различия эндогенной экспрессии FGF2 в клетках с базовым и первичным статусом плюрипотентности свидетельствуют о различной степени вовлеченности этого фактора в регуляцию самообновления плюрипотентных клеток.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность, базовый и первичный статусы, дифференцировка, сигнальные пути, TGF β , ActivinA, FGF.

DOI: 10.7868/S0475145013010060

Эмбриональные стволовые клетки мыши и человека являются *in vitro* моделями плюрипотентных клеток эмбрионов млекопитающих, находящихся в разных статусах плюрипотентности — базовом и первичном (naïve/ground and primed states) (Nichols, Smith, 2009). При переходе от базового к первичному статусу плюрипотентные клетки эмбриона утрачивают способность к развитию в линию половых клеток (Hayashi, Surani, 2009; Guo et al., 2009; Han et al., 2010). Эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК), поддерживаемые

in vitro в базовом статусе плюрипотентности, гомологичны клеткам внутренней клеточной массы бластоцисты, т.к. способны к развитию во все типы соматических и половых клеток после инъекции их в бластоцисту. Однако эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК), также полученные из бластоцист человека, отличаются от мЭСК системой поддержания и скоростью их самообновления *in vitro* (Smith et al., 1988; Savatier et al., 1996; Thomson et al., 1998; Burdon et al., 2002; Dahéron et al., 2004; Vallier et al., 2005; Xu et al., 2005;

Becker et al., 2006). Кроме того, обнаружено значительное сходство чЭСК с более поздней эмбриональной популяцией, культивируемой *in vitro*, — стволовыми клетками эпибласта мыши (epiblast stem cells, EpiSCs), которые находятся в первичном статусе плюрипотентности (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009; Hanna et al., 2010; Гордеева и др., 2011).

Для поддержания *in vitro* мЭСК и чЭСК в плюрипотентном статусе используют разные системы культивирования, которые можно рассматривать как искусственные клеточные ниши, обеспечивающие оптимальное микроокружение для самообновления плюрипотентных клеток. ЭСК человека и мыши способны расти на фидерных клетках, полученных из фибробластов различного происхождения, а также в бесфидерных системах, включающих различные компоненты внеклеточного матрикса и определенные наборы факторов роста (Smith et al., 1988; Xu et al., 2001; Stojkovic et al., 2005; Vallier et al., 2005; Yoo et al., 2005; Eiselleova et al., 2008; Evseenko et al., 2009; Montes et al., 2009; Кольцова и др., 2011; Кольцова и др., 2012). Однако для самообновления мЭСК и чЭСК *in vitro* необходимы разные наборы факторов роста, что свидетельствует о различных механизмах сигнальной регуляции базового и первичного плюрипотентного статуса и ранних стадий детерминации эмбриональных популяций. Сигнальные пути факторов семейства TGF β и FGF2 являются одними из ключевых регуляторов поддержания плюрипотентного статуса и дифференцировки ЭСК *in vivo* и *in vitro* (Mummery, 2001; Valdimarsdottir, Mummery, 2005; Dreesen, Brivanlou, 2007; Pucéat, 2007; Lanner, Rossant, 2010), однако функциональные роли этих сигнальных путей в клетках с базовым и первичным статусом плюрипотентности остаются неясными.

Моделирование ранних стадий развития млекопитающих *in vitro* с использованием линий мЭСК и чЭСК позволяет исследовать механизмы функционирования сигнальных путей в развитии плюрипотентных клеток млекопитающих и их специализацию в различные типы клеток. Для того, что исследовать механизмы сигнальной регуляции клеток в разных статусах плюрипотентности, мы проводили анализ экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2/bFGF, инициирующих соответствующие сигнальные пути, которые активно функционируют в мЭСК, чЭСК и поддерживающих их фидерных клетках. На основе данных сравнительного анализа экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2 в мЭСК и чЭСК предложена гипотеза о функциональной роли сигнальных путей, активируемых этими факторами, при переходе плюрипотентных клеток от базового к первич-

ному статусу, а также к ранним стадиям дифференцировки эмбриональных популяций клеток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток *in vitro*. В работе была использована линия мЭСК R1, любезно предоставленная доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). Линия чЭСК ESM02 была любезно предоставлена проф. Г.П. Георгиевым (Институт биологии гена РАН, Москва). Линия чЭСК SC5 и линия эмбриональных фибробластов человека (чЭФ) были получены и охарактеризованы ранее в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург (Кольцова и др., 2011, 2012).

ЭСК мыши и человека культивировали в среде DMEM, содержащей 1мМ L-глутамин, 0.1 мМ заменимых аминокислот (“HyClone”, США), 0.1 мМ β -меркаптоэтанола (“Sigma”, США) и 15% заменителя телячьей фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, “Gibco”, США). Недифференцированные мЭСК поддерживали на фидере из эмбриональных фибробластов мыши (мЭФ, полученных из E12.5 эмбрионов мышей C57Bl/6), инактивированных митомицином C (10 мкг/мл, “Sigma”) или в бесфидерной системе в среде, содержащей фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл, “Sigma”). Недифференцированные чЭСК линии ESM02 поддерживали на инактивированном фидере мЭФ, а чЭСК SC5 — на фидере из чЭФ. В среду для культивирования чЭСК добавляли рекомбинантный фактор роста фибробластов человека (FGF2/bFGF, 10 нг/мл, “Invitrogen”, США).

Для рутинного культивирования мЭФ и чЭФ использовали среду DMEM, содержащую 1 мМ L-глутамин (“HyClone”, США) и 10% телячьей фетальной сыворотки (“HyClone”, США). Для анализа генной экспрессии в фидерных клетках их культивировали в среде для культивирования ЭСК мыши и человека в течение 24 ч.

Фидерные клетки мЭФ и чЭФ, а также мЭСК пассировали с использованием раствора трипсина (0.05% Trypsin-EDTA solution, “HyClone”). Для пассирования чЭСК использовали метод механического разделения колоний недифференцированных клеток на кластеры.

Эмбрионидные тела (ЭТ), формируемые при дифференцировке мЭСК, получали с помощью метода “висячей капли”, описанного ранее (Гордеева и др., 2009). ЭТ ESM02 и SC5 получали при механическом разделении колоний недифференцированных чЭСК и последующем культивировании клеточных кластеров в планшетах для суспензион-

Таблица 1. Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии в эмбриональных стволовых клетках и эмбриональных фибробластах мыши

Ген	№ Последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>Oct4/Pou5f1</i>	NM_013633.2	5'caccctggcggtctctttg3' 5'gttctcattgtgtcggcttcc3'	142
<i>Nanog</i>	NM_028016	5'aactctcctccattctgaacctga3' 5'ggtgctgagcccttctgaatc3'	136
<i>Gata4</i>	NM_008092	5'tctcactatgggcacagcag3' 5'gggacagcttcagagcagac3'	100
<i>ActivinA</i>	NM_002192	5'tggagcagacctcggagatcatcac3' 5'ttggctcctggttctgttagccttgg3'	160
<i>Nodal</i>	NM_013611	5'gcgaggtgcctaaccctgtg3' 5'atgctcagtggttggctg3'	136
<i>Lefty1</i>	NM_010094	5'tgtgtgctctttgcttctctg3' 5'gcagtgaacaatatgaaggacagag3'	123
<i>Tgfb1</i>	NM_011577	5'caattcctggcggttaccttgg3' 5'ccctgtattccgtctccttgg3'	120
<i>Bmp4</i>	NM_007554	5'tctggctccgtccctgatg3' 5'cgctccgaatggcactacg3'	175
<i>Gdf3</i>	NM_008108	5'gatgagtgtgggtgtag3' 5'gtccgattcaagagacataagc3'	109
<i>Fgf2</i>	NM_008006	5'cgtcaactacaactccaagcag3' 5'tccagtcgttcaagaagaaacac3'	147
<i>Hprt</i>	NM_013556	5'cgttgggcttacctactgcttcc3' 5'ggtcataacctggttcatcatcgctaac3'	150

ного культивирования (“Greinerbio”, Германия) в течение последующих 5 сут (ЭТ).

Анализ генной экспрессии. Анализ генной экспрессии проводили в клетках и ЭТ, растущих в бессывороточной среде: фидерных клетках мЭФ и чЭФ, в мЭСК, растущих в среде с LIF, в чЭСК, механически изолированных от фидера, и в ЭТ на 5 сут дифференцировки в средах без LIF и bFGF. Тотальную РНК выделяли из клеток, используя Trizol (“Invitrogen”, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (ThermoScientific, США). Все образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”, США) по протоколу производителя для предотвращения контаминации геномной ДНК. Для синтеза кДНК библиотек использовали 1 мкг тотальной РНК каждого образца. Синтез кДНК библиотек проводили с использованием обратной тран-

скриптазы М-MuLV и олиго (dT)₁₈ праймеров (“Fermentas”, Литва).

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°C – 5'; отжиг праймеров и элонгация: 62°C – 45"; денатурация: 94°C – 15", 40 циклов. Уровень флуоресценции детектировали при 62°C в каждом цикле. Специфические праймеры были сконструированы на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank, MGI и Ensemble (табл. 1, 2). Для всех использованных пар праймеров было подтверждено удвоение количества продукта в каждом цикле амплификации и образование единственного ампликона предсказанного размера. Каждый эксперимент был проведен в трех повторах. Уровень экспрессии генов в каждом образце нормализовали к уровню

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

Ген	№ Последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>OCT4/POU5F1</i>	NM_002701	5'cgaaagagaagcgaaccagatc3'	220
	NM_203289	5'accagcagcctcaaaatcc3'	
<i>NANOG</i>	NM_024865	5'caagaactctcaacatcctgaacc3'	127
		5'tctgcgtcacaccattgctattc3'	
<i>GATA4</i>	NM_002052	5'gatgggacgggtcactatctg3'	160
		5'ggcagttggcacaggagag3'	
<i>ACTIVINA</i>	NM_002192	5'agggcagaaatgaatgaacttatgg5'	198
		5'gaggcggatggtgactttgg5'	
<i>NODAL</i>	NM_018055	5'tcaactgtgtcggaggtaacg3'	190
		5'tcggggggctgtaacg3'	
<i>LEFTY1</i>	NM_020997	5'tcattgttactgtcctgtcactg3'	116
		5'agtctttattatctggattgggatgc3'	
<i>TGFB1</i>	NM_000660	5'tggacatcaacgggtcactac3'	186
		5'gcacgcagcagttcttctcc3'	
<i>BMP4</i>	NM_001202	5'tgagtgccatctccatctgta3'	91
	NM_130850	5'cggcacccacatccctacta3'	
	NM_130851		
<i>GDF3</i>	NM_020634	5'cttcgctttctcccagaccaag3'	128
		5'gccaatgtcaactgttcccttc3'	
<i>FGF2</i>	NM_002006	5'gccagtaatcttccatcttcccttc3'	113
		5'tgtgtgctcttcttctcctg3'	
<i>HPRT</i>	NM_000194.2	5'aagatggtcaaggtcgcaagc3'	132
		5'gaagtattcattatagtaaggcatatcc3'	

экспрессии гена гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы (*HPRT/Hprt*). Для определения относительного уровня экспрессии генов использовали сравнительный Ct метод (ABI Relative Quantification Study software, Applied Biosystems, США). Относительные уровни экспрессии рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$. За одну относительную единицу принимали уровень экспрессии генов в недифференцированных ЭСК или необработанных фибробластах. При анализе относительных уровней экспрессии семейства факторов TGF β и FGF2 в каждом типе клеток уровень экспрессии гена *HPRT* принимали за одну относительную единицу, а уровень экспрессии всех остальных генов в образце рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct} \pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эндогенная экспрессия факторов семейства TGF β и FGF2 в недифференцированных и дифференцирующихся ЭСК мыши и человека. Для анализа роли сигнальных путей факторов семейства TGF β и FGF2 в регуляции плюрипотентного статуса ЭСК мыши и человека мы исследовали экспрессию этих сигнальных факторов и специфических транскрипционных факторов OCT4/Oct4, NANOG/Nanog и GATA4/Gata4 в недифференцированных и дифференцирующихся клетках (рис. 1, 2). По данным количественного ПЦР-анализа (рис. 1б) в ходе дифференцировки ЭТ, формируемых клетками линий ESM02 и SC5, экспрессия гена *OCT4* снижалась в 4.4 и 2.2 раза, а экспрессия гена *NANOG* – в 3.1 и 13.5 раз соответственно. В то же время в ЭТ, формируемых мЭСК, экспрессия генов *Oct4* и *Nanog* снижалась лишь в 1.1–1.2 раза

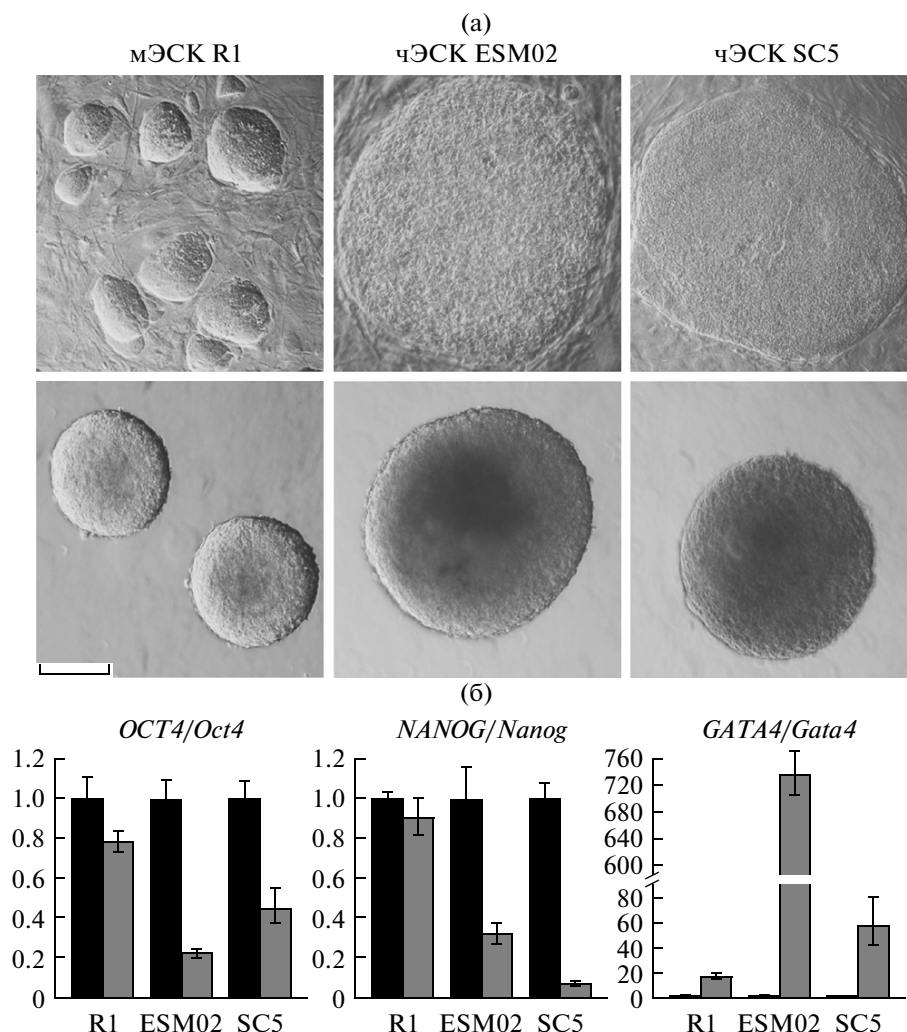


Рис. 1. (а) – колонии недифференцированных ЭСК мыши и человека, поддерживаемых на мЭФ и чЭФ (верхний ряд), и ЭТ, формируемые этими клетками в процессе дифференцировки (нижний ряд). Масштаб: 100 мкм; (б) – количественный анализ экспрессии генов *OCT4/Oct4*, *NANOG/Nanog* и *GATA4/Gata4* в линиях ЭСК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень экспрессии в недифференцированных клетках принят за 1 относительную единицу. (■) – недифференцированные клетки, (■) – ЭТ5.

(рис. 16). Дифференцировка ЭСК во внезародышевую энтодерму сопровождалась увеличением экспрессии гена *GATA4* в 737, 58 и 16 раз в ЭТ линий ESM02, SC5 и R1 соответственно. Таким образом, наши данные показывают, что чЭСК значительно быстрее и эффективнее вступают в дифференцировку, чем мЭСК.

Анализ экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2/bFGF показал, что все изучаемые факторы экспрессируются в недифференцированных ЭСК мыши и человека, однако в процессе дифференцировки ЭТ уровни экспрессии большинства факторов снижаются (рис. 2). Причем, в дифференцирующихся ЭТ человека самое сильное снижение уровней генной экспрессии было обнаружено для *LEFTY1* (в 200 и 16 раз для ESM02 и SC5 соответ-

ственно), а в ЭТ мыши – для гена *ActivinA* (83 раза). Экспрессия генов *TGF β 1* и *BMP4* практически не изменялась во всех линиях ЭСК. Следует отметить, что снижение экспрессии генов *ACTIVINA/ActivinA*, *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2* коррелировало с изменениями в экспрессии генов *OCT4/Oct4*, *NANOG/Nanog* и *GATA4/Gata4* в процессе дифференцировки ЭТ мыши и человека. Причем экспрессия генов *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2* значительно сильнее снижалась в чЭСК. Эти данные свидетельствуют о том, что эндогенные факторы семейства TGF β и FGF2 вовлечены в регуляцию плюрипотентного статуса и дифференцировки ЭСК мыши и человека. Однако эффекты сигнальных путей, инициируемых этими факторами, ве-

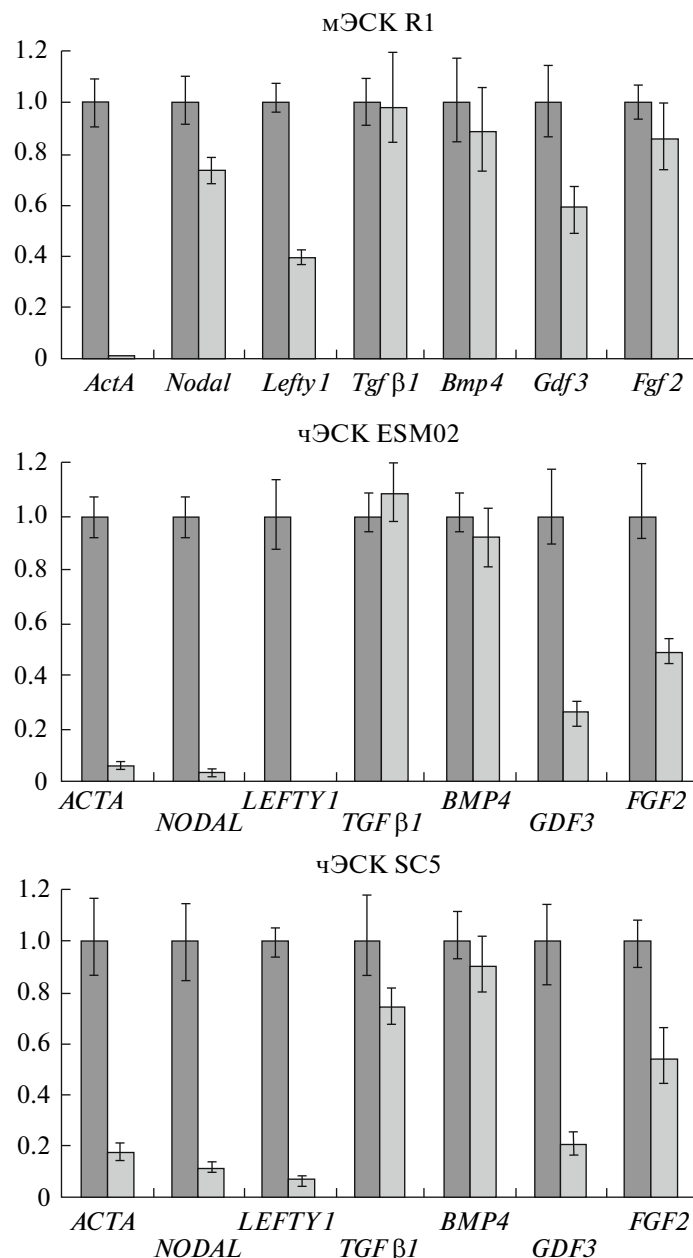


Рис. 2. Количественный анализ экспрессии факторов семейства TGF β и фактора FGF2 в процессе дифференцировки ЭСК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень экспрессии в недифференцированных клетках принят за 1 относительную единицу. (■) – недифференцированные клетки, (□) – ЭТ5.

роятно, различаются в ЭСК мыши и человека, что и обуславливает различную скорость их дифференцировки.

Анализ экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2 в фидерных клетках мЭФ и чЭФ, используемых для поддержания недифференцированных ЭСК мыши и человека. Для анализа роли сигнальных путей, инициируемых факторами семейства TGF β и FGF2, в поддержании недифференцированного статуса ЭСК мыши и человека мы изучили экс-

прессию этих факторов в фидерных клетках мЭФ и чЭФ. Фидерные клетки являются источниками белков внеклеточного матрикса и экзогенных факторов семейства TGF β и FGF2, которые также вовлечены в общую систему регуляции поддержания недифференцированных ЭСК мыши и человека. Факторы семейства TGF β мыши и человека имеют до 90% гомологии, поэтому могут быть утилизированы клетками обоих видов. В наших экспериментах мЭСК R1 и чЭСК ESM02 поддерживались на

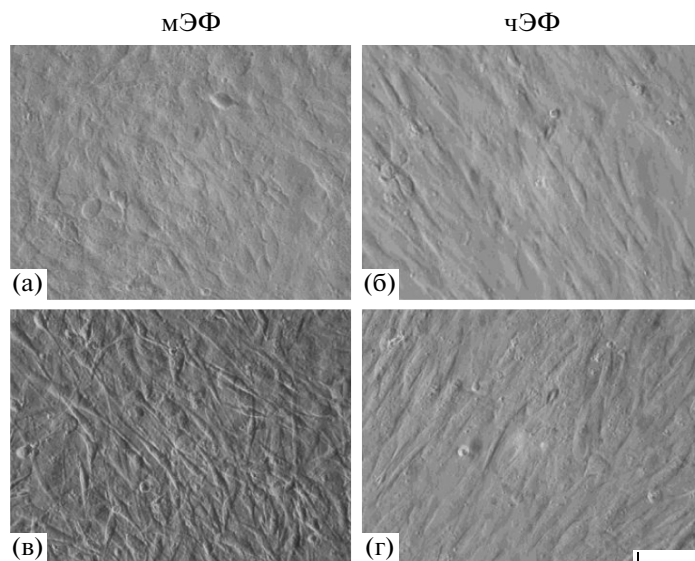


Рис. 3. Фидерные клетки мЭФ и чЭФ до (а, б) и после (в, г) воздействия митомицина и FGF2. Масштаб: 100 мкм.

фидере мЭФ, а чЭСК SC5 — на фидере чЭФ (рис. 3). Обе фидерные системы эффективно поддерживали рост недифференцированных ЭСК мыши и человека. Однако для поддержания самообновления чЭСК, растущих на мЭФ и чЭФ, в среду для культивирования добавляли фактор FGF2/bFGF.

Изучение экспрессии генов семейства TGF β и FGF2 в мЭФ и чЭФ показало, что оба типа фидерных клеток имеют сходный паттерн экспрессии факторов: высокий уровень *ACTIVINA/ActivinA*, *TGF β 1/Tgf β 1* и *FGF2/Fgf2* и низкий уровень *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *BMP4/Bmp4* (рис. 4). Анализ экспрессии изучаемых факторов в фидерных клетках мЭФ и чЭФ до и после обработки митомицином С и добавления FGF2/bFGF показал, что экспрессия генов *ACTIVINA/ActivinA*, *TGF β 1/Tgf β 1* и *FGF2/bFGF* остается на высоком уровне, а низкоэкспрессирующихся факторов — незначительно варьирует (рис. 4). Однако сопоставление уровней экспрессии генов *ACTIVINA/ActivinA*, *TGF β 1/Tgf β 1* и *FGF2/Fgf2* по отношению к эндогенной экспрессии гена *HPRT/Hprt* в обоих фидерах показало, что все три гена экспрессируются на значительно более высоких уровнях в чЭФ по сравнению мЭФ (рис. 4б, 4г). Кроме того, сравнительный анализ показал, что уровни экспрессии *HPRT/Hprt* в мЭФ и чЭФ практически не различаются. Для образцов кДНК, синтезированных из 1мг тотальной РНК, показатели пороговых циклов реакции *St HPRT/Hprt* были 22.907 ± 0.038 и 22.967 ± 0.099 для мЭФ и чЭФ соответственно. Таким образом, фидерные клетки мЭФ и чЭФ, экспрессирующие различные уровни факторов семейства TGF β и

FGF2, формируют различные ниши для поддержания самообновления плюрипотентных ЭСК мыши и человека.

Анализ регуляции плюрипотентного статуса в ЭСК мыши и человека при взаимодействии сигнальных путей, активируемых эндогенными и экзогенными факторами семейства TGF β и FGF2. На основании полученных данных по экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2 в ЭСК и фидерных клетках мы провели анализ соотношений эндогенного и экзогенного сигналинга, обеспечивающего поддержание *in vitro* ЭСК мыши и человека в недифференцированном состоянии (рис. 5). При расчете соотношений уровней экспрессии изучаемых факторов к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt* мы обнаружили, что в мЭСК самый высокий уровень экспрессии был выявлен для гена *Lefty1* (в 6 раз выше уровня *Hprt*), уровни экспрессии генов *ActivinA*, *Tgf β 1* и *Bmp4* были сопоставимы с уровнем экспрессии *Hprt*, а гены *Nodal*, *Gdf3* и *Fgf2* экспрессировались на более низком уровне, чем *Hprt*.

В линиях чЭСК паттерны экспрессии изучаемых факторов значительно отличались от таковых в мЭСК (рис. 5). Наиболее значительные различия были обнаружены в экспрессии генов *TGF β 1* и *BMP4*, причем уровни экспрессии этих генов также в 2 раза различались для линий ESM02 и SC5. В обеих линиях чЭСК самые высокие уровни экспрессии были выявлены для генов *TGF β 1* и *BMP4* (в 10–20 раз выше *HPRT*), уровень экспрессии *LEFTY1* был в 3–6 раз выше, чем *HPRT*, но сопоставим с таковым в мЭСК. Экспрессия генов *NODAL* и *GDF3* в ESM02 и SC5 была в 2–3 раза выше, чем уровни экспрессии *HPRT* в этих линиях

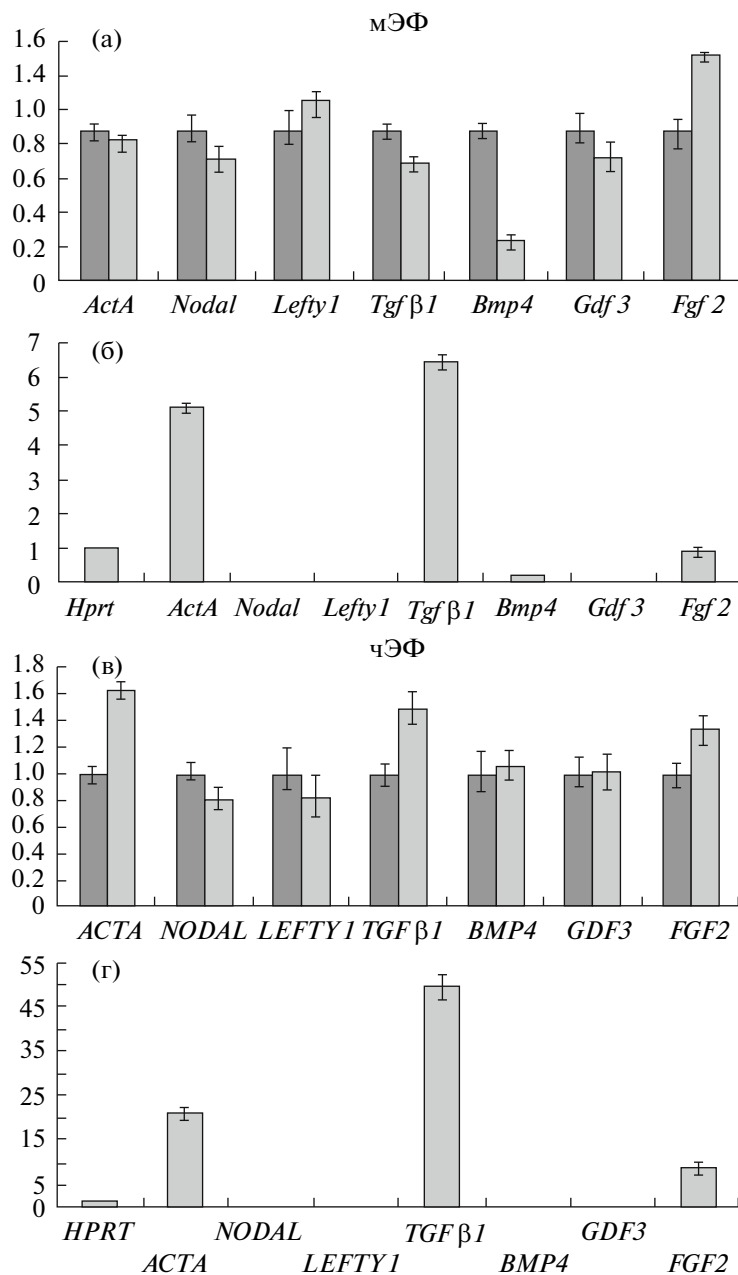


Рис. 4. Анализ экспрессии факторов семейства TGFβ и фактора FGF2 в мЭФ и чЭФ. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень генной экспрессии факторов в необработанных клетках принят за 1 относительную единицу (а, в) или уровень экспрессии гена *HPRT/Hprt* в обработанных клетках принят за 1 относительную единицу (б, г); (■) – необработанные клетки, (□) – клетки, обработанные митомизином С, после добавления фактора FGF2.

соответственно. При этом соответствующие соотношения уровней экспрессии этих генов и *HPRT/Hprt* были в 2–3 раза выше для *NODAL* и в 10 раз выше для *GDF3* для чЭСК по сравнению с мЭСК. В обеих линиях чЭСК были выявлены сходные уровни экспрессии генов *ACTIVINA* и *FGF2*, которые были ниже, чем соответствующие уровни *HPRT*. Однако экспрессия *ACTIVINA* в

чЭСК была ниже, чем в мЭСК, а *FGF2/Fgf2* – более чем в 10 раз выше. Таким образом, уровни экспрессии эндогенных факторов семейства TGFβ и FGF2 различаются в плюрипотентных ЭСК мыши и человека. Однако в обеих линиях чЭСК, поддерживаемых на разных фидерных клетках, паттерны эндогенной экспрессии мРНК изучаемых сигнальных лигандов были сходными.

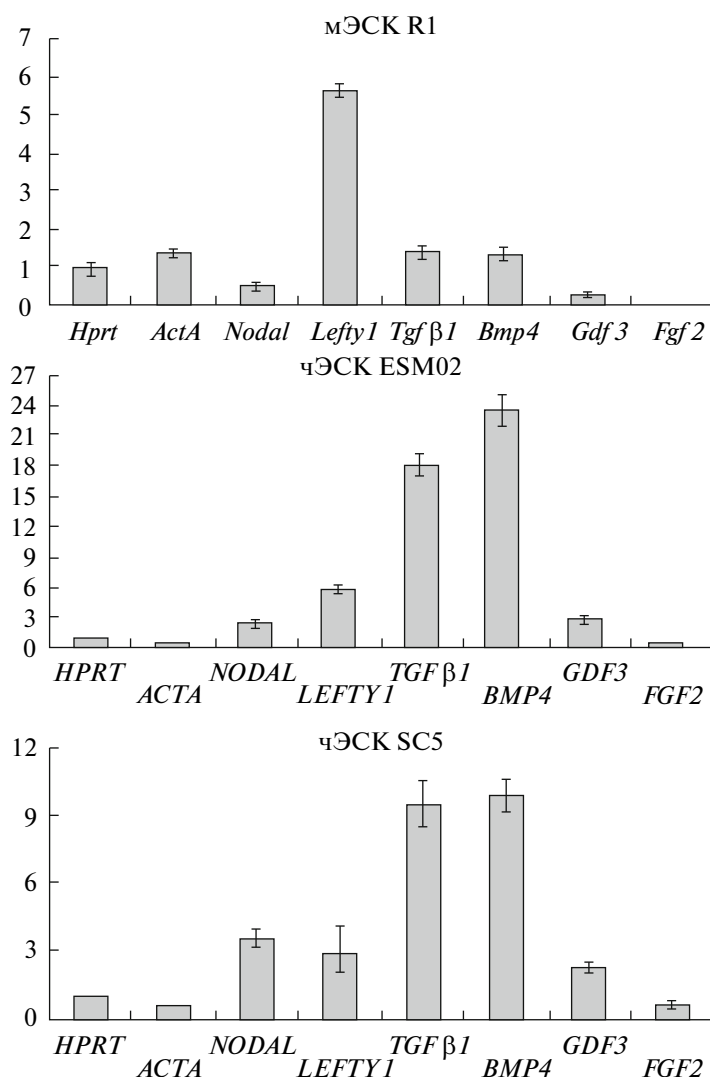


Рис. 5. Экспрессии факторов семейства TGFβ и фактора FGF2 в недифференцированных ЭСК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень экспрессии гена *HPRT/Hprt* принят за 1 относительную единицу.

Анализ соотношений уровней экспрессии факторов семейства TGFβ и FGF2 в ЭСК линий R1 и SC5 и их фидерных клетках показал, что уровни экспрессии *ActivinA/ACTIVINA* в фидерных клетках мЭФ и чЭФ превышают уровни экспрессии в мЭСК и чЭСК в 4 и 42 раза соответственно (рис. 6). В тоже время уровни экспрессии *Tgfβ1/TGFβ1* и *Fgf2/FGF2* были в 5 и 30/16 раз выше в мЭФ и чЭФ, чем в мЭСК и чЭСК соответственно (рис. 6). Учитывая тот факт, что поддержание недифференцированных мЭСК возможно в бесфидерной системе при добавлении в среду фактора LIF, но при отсутствии экзогенных факторов ActivinA, TGFβ1 и FGF2, вероятно, уровни эндогенной экспрессии этих факторов являются оптимальными для сохранения плюрипотентного статуса мЭСК в культуре *in vitro*. Кроме того, факторы ActivinA, TGFβ1 и

FGF2, продуцируемые мЭФ, не оказывают существенного влияния на самообновление и дифференцировку мЭСК, растущих на этом фидере.

Напротив, поддержание определенных уровней и эндогенных, и экзогенных (фидерные клетки и рекомбинантные факторы) факторов *ACTIVINA*, *TGFβ1*, *BMP4* и *FGF2* в среде является критическим для сохранения недифференцированного статуса чЭСК *in vitro*. Очевидно, что фидерные клетки в комбинации с рекомбинантным FGF2 обеспечивают оптимальное количество факторов *ACTIVINA* и FGF2, необходимых для поддержания недифференцированного состояния чЭСК *in vitro*. Кроме того, фактор BMP4, стимулирующий дифференцировку чЭСК, экспрессируется на низком уровне в мЭФ и чЭФ.

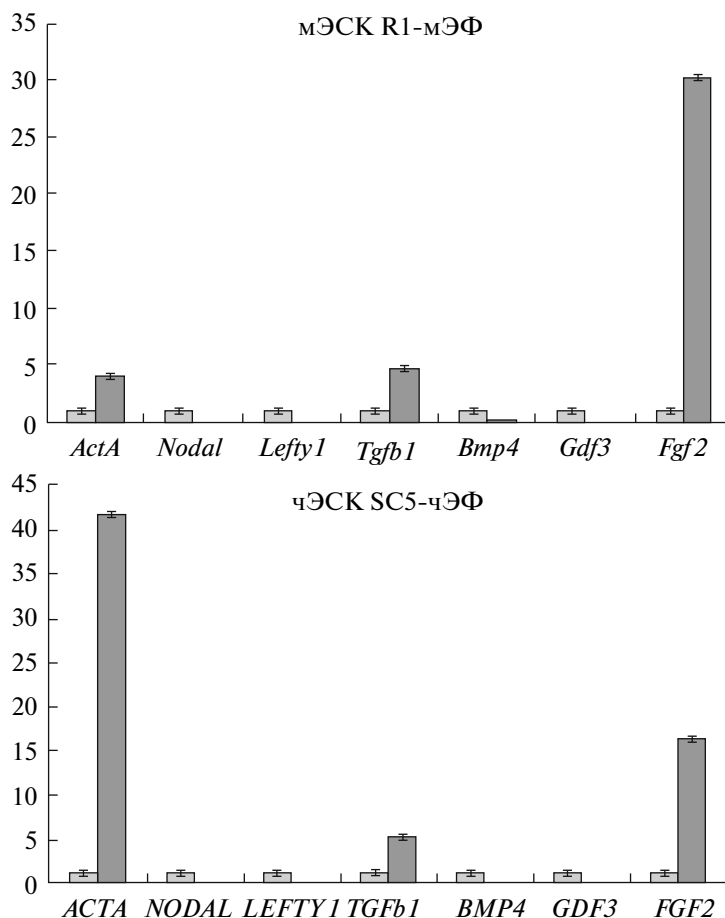


Рис. 6. Соотношение эндогенной и экзогенной экспрессии факторов семейства TGF β и фактора FGF2 в недифференцированных ЭСК мыши и человека и поддерживающих их фидерных клетках. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt* (уровень генной экспрессии факторов в недифференцированных ЭСК принят за 1 относительную единицу).

(□) – недифференцированные мЭСК R1 и чЭСК SC5; (■) – мЭФ и чЭФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы и эпибласта доимплантационных стадий развития находятся в окружении клеток двух внезародышевых структур – трофобласта и гипобласта (первичной внезародышевой энтодермы), представляющих естественную нишу для эмбриональных клеток с базовым статусом плюрипотентности. Клетки трофобласта и гипобласта экспрессируют факторы, необходимые для дальнейшего развития плюрипотентных клеток, в том числе для перехода их в следующую фазу – первичный статус плюрипотентности. Плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы, помещенные на фидерные клетки *in vitro*, оказываются в другом микроокружении, которое способствует их пролиферации и ингибирует дифференцировку. ЭСК мыши и человека возможно поддерживать на мЭФ, но для поддержания чЭСК в недифференцированном состоянии необходимо добавление рекомби-

нантного фактора FGF2 в среду. Кроме того, при бесфидерном культивировании самообновление мЭСК обеспечивается присутствием в среде только фактора LIF, тогда как для чЭСК и стволовых клеток эпибласта мыши необходима более сложная система культивирования, включающая факторы семейства TGF β (ActivinA или Nodal) и FGF2, но не LIF (Smith et al., 1988; Thomson et al., 1998; Dahéron et al., 2004; Vallier et al., 2005; Xu et al., 2005; Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009). Однако в отличие от мЭСК, при использовании фидера и при бесфидерном культивировании часть популяции чЭСК вступает в спонтанную дифференцировку. Таким образом, поддержание самообновления клеток в базовом и первичном статусе плюрипотентности обеспечивается различными сигнальными путями и различной функциональной активностью сигнальных путей LIF/Stat3, Activin/Nodal/TGF β /Smad2/3 и FGF2.

Используя линии ЭСК мыши и человека для изучения сигнальных путей, регулирующих самообновление плюрипотентных стволовых клеток в разных фазах плюрипотентности, в данной работе мы анализировали соотношения эндогенной и экзогенной экспрессии сигнальных лигандов семейства TGF β и bFGF в ЭСК и в их фидерных клетках. В первую очередь, мы обнаружили, что паттерны эндогенной экспрессии этих факторов значительно различаются в мЭСК и чЭСК (рис. 5). Так, в мЭСК самый высокий уровень экспрессии был обнаружен для гена *Lefty1*, а в чЭСК для генов *TGF β 1* и *BMP4*, к тому же экспрессия *NODAL/Nodal*, *TGF β 1/Tgf β 1*, *BMP4/Bmp4*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2* была выше в чЭСК, чем в мЭСК. В то же время экспрессия *ACTIVINA* в обеих линиях чЭСК была ниже, чем в мЭСК. Таким образом, различия в паттернах эндогенной экспрессии изучаемых сигнальных факторов в недифференцированных мЭСК и чЭСК демонстрируют внутренние различия в сигнальной регуляции этих клеточных популяций. Кроме того, более высокая скорость дифференцировки чЭСК по сравнению с мЭСК в ЭТ сопровождалась более динамичным снижением экспрессии факторов *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2*. Подобное снижение уровней экспрессии изучаемых факторов мы наблюдали только на 10 день дифференцировки ЭТ, сформированных мЭСК (неопубликованные данные). При этом уровни экспрессии *TGF β 1/Tgf β 1* и *BMP4/Bmp4* мало изменялись в процессе спонтанной дифференцировки всех клеточных линий и оставаясь самыми высокими по сравнению с другими факторами в ЭТ. На основе этих данных можно предположить, что высокий уровень экспрессии *TGF β 1/Tgf β 1* и *BMP4/Bmp4* на фоне относительно более низкого уровня экспрессии остальных факторов характеризует более дифференцированное состояние ЭСК. В этом случае большую склонность к спонтанной дифференцировке чЭСК по сравнению с мЭСК можно объяснить более высоким уровнем экспрессии *TGF β 1/Tgf β 1* и *BMP4/Bmp4* в исходных популяциях недифференцированных чЭСК, находящихся на более продвинутой стадии развития, чем мЭСК. Другой особенностью сигнальной регуляции в недифференцированных чЭСК является более низкий уровень эндогенной экспрессии *ACTIVINA*, который также драматически снижается в процессе дифференцировки мЭСК и чЭСК.

Анализ экспрессии факторов TGF β и FGF2 в фидерных клетках мЭФ и чЭФ показал, что они являются источниками экзогенных факторов ActivinA, TGF β 1 и FGF2 для ЭСК. Эти факторы экспрессируются на более высоком уровне, чем в ЭСК, хотя уровень их экспрессии в мЭФ был значительно ниже, чем в чЭФ. Как было отмечено вы-

ше, для поддержания самообновления мЭСК *in vitro* не требуются экзогенные факторы ActivinA, TGF β 1 и FGF2, тогда как для чЭСК необходимы экзогенные факторы ActivinA и FGF2. Оба используемых фидера способны эффективно поддерживать самообновление чЭСК, несмотря на значительные различия в уровнях экспрессии *ACTIVINA/ActivinA* и *TGF β 1/Tgf β 1*, следовательно, в этих пределах уровни экспрессии факторов могут быть допустимыми для поддержания чЭСК. Однако при поддержании чЭСК на мЭФ требуется добавление экзогенного рекомбинантного фактора FGF2, т.к. *Fgf2* экспрессируется на низком уровне в этих фидерных клетках. Напротив, при использовании чЭФ или среды, кондиционированной чЭФ, добавление рекомбинантного FGF2 не является необходимым. Способность сред, кондиционированных чЭФ, а также эмбриональными фибробластами, полученными из чЭСК линий SC5 и SC7, поддерживать самообновление этих линий чЭСК была показана нами ранее (Кольцова и др., 2012). Фидерные клетки, используемые для поддержания чЭСК, могут значительно различаться по уровням экспрессии факторов ActivinA, TGF β 1 и FGF2, но такие системы культивирования могут быть скорректированы с помощью экзогенных рекомбинантных факторов (Eiselleova et al., 2008).

Необходимо отметить, что в обоих типах фидерных клеток уровень экспрессии *BMP4/Bmp4* был значительно ниже, чем в ЭСК, что также способствовало поддержанию их в недифференцированном состоянии. Ранее было показано, что BMP4 в кооперации с LIF может поддерживать самообновление мЭСК, хотя его присутствие не является обязательным (Ying et al., 2003). Напротив, в чЭСК экзогенный BMP4 стимулировал дифференцировку в клетки внезародышевых структур, а ингибирование киназ рецепторов BMP способствовало самообновлению чЭСК (Xu et al., 2002, 2005; Vallier et al., 2005, 2009; Greber et al., 2007). Различные эффекты стимуляции BMP/Smad1/5/8 сигнальных путей на дифференцировку ЭСК мыши и человека можно объяснить более высоким уровнем эндогенной экспрессии *BMP4* в чЭСК по сравнению с мЭСК. В связи с тем, что усиление активности BMP/Smad1/5/8 ветви TGF β сигнальных путей приводит к стимуляции дифференцировки чЭСК, поддержание самообновления недифференцированных чЭСК возможно только на фидерных клетках, экспрессирующих низкий уровень факторов BMP.

Для поддержания метастабильного недифференцированного состояния плюрипотентных ЭСК *in vitro* необходима сбалансированная активность различных сигнальных путей, в том числе ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 и BMP/Smad1/5/8 ветвей TGF β сигналинга (Xiao et al., 2006; Dreesen,

Brivanlou, 2007; Greber et al., 2007). По-видимому, высокий уровень эндогенной экспрессии TGF β 1 в чЭСК не достаточен для того, чтобы нейтрализовать стимулирующие дифференцировку эффекты эндогенного BMP4, поэтому для сохранения сигнального баланса необходимо усиление активности ActivinA/Nodal/Smad2/3 ветви с помощью экзогенных факторов ActivinA и Nodal. Необходимость ActivinA/Nodal/TGF β /Smad2/3 сигналинга для пролиферации плюрипотентных клеток blastocysts мыши и поддержания чЭСК в недифференцированном состоянии была продемонстрирована при ингибировании киназ рецепторов ALK-4, -5, -7 ингибитором SB 431542 и воздействии указанных факторов роста (Dunn et al., 2004; James et al., 2005; Vallier et al., 2005). Однако при высокой концентрации этих факторов в среде также может быть стимулирована дифференцировка чЭСК (McLean et al., 2007).

Роль фактора FGF2 в самообновлении чЭСК остается неясной, т.к. имеются противоречивые данные о взаимодействиях FGF2 и ActivinA сигнальных путей. Ранее показано, что FGF2 может стимулировать активность PI3K и ERK сигнальных путей и в кооперации с ActivinA/Nodal сигналингом поддерживать самообновление и жизнеспособность чЭСК *in vitro* (Vallier et al., 2005; Eiseleova et al., 2009). Причем только FGF2 не способен блокировать дифференцировку и стимулировать пролиферацию чЭСК (Vallier et al., 2005; Greber et al., 2007; Na et al., 2010). С другой стороны, в ряде работ было показано, что добавление экзогенного ActivinA является достаточным для поддержания чЭСК в недифференцированном состоянии (Beattie et al., 2005; Xiao et al., 2006;). Более того, при добавлении ActivinA в комбинации с FGF2 чЭСК дифференцировались быстрее (Na et al., 2010). В наших экспериментах чЭСК ESM02 и SC5, поддерживаемые на фидерных клетках с различными уровнями экспрессии FGF2, оставались недифференцированными только в случае высокой концентрации экзогенного FGF2 (на мЭФ только в среде с рекомбинантным FGF2).

Стволовые клетки эпибласта мыши поддерживают *in vitro*, как и чЭСК, в среде с экзогенными факторами ActivinA и FGF2 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009). Реверсия от первичного статуса к базовому статусу плюрипотентности для этих клеток (в мЭСК-подобные) возможна при культивировании их в 2i+LIF условиях — в среде с LIF и ингибиторами ERK1/2 (PD0325901) и GSK3-киназа (CHIR99021) (Silva et al., 2008; Ying et al., 2008). Переход чЭСК из первичного в базовый статус плюрипотентности происходил при культивировании их в 3i+LIF условиях —

PD0325901/ CHIR99021/Forskolin/LIF (Hanna et al., 2010). В обоих случаях ингибирование ERK1/2 сигнальных каскадов приводило к ослаблению зависимости от экзогенных факторов ActivinA и FGF2.

Таким образом, при переходе плюрипотентных клеток от базового к первичному статусу, а также к ранним стадиям дифференцировки эмбриональных популяций изменяются функциональные роли сигнальных путей, активируемых факторами семейства TGF β и FGF2. На основе полученных нами данных можно заключить, что поддержание метастабильного недифференцированного состояния плюрипотентных клеток *in vitro*, обеспечиваемое сбалансированной активностью различных сигнальных путей, достигается в мЭСК и чЭСК с помощью различных схем регуляций ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 и BMP/Smad1/5/8 ветвей TGF β сигналинга. Необходимость экзогенной стимуляции или ингибирования этих сигнальных путей обусловлена внутренними различиями в паттернах экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2 в мЭСК и чЭСК. Для чЭСК (более продвинутой в развитии клеточной популяции) усиление ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 сигналинга с помощью экзогенных факторов является необходимым для ослабления эффектов BMP/Smad1/5/8 сигнальных путей, стимулирующих дифференцировку в клетки внезародышевых структур. Различные модулирующие эффекты FGF2 в клетках с базовым и первичным статусом плюрипотентности, очевидно, обусловлены различной функциональной активностью ERK1/2 сигнальных каскадов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а) и Государственным контрактом Минобрнауки РФ № 16.М04.11.0002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В. Паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека связаны с регуляцией базового и первичного статусов плюрипотентности // Онтогенез. 2011. Т. 42. С. 403–424.
- Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А. и др. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 4. С. 249–263.
- Кольцова А.М., Воронкина И.В., Гордеева О.Ф. и др. Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней линий эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании // Цитология. 2012. Т. 54. № 8. С. 637–651.
- Beattie G.M., Lopez A.D., Bucay N. et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in

- the absence of feeder layers // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 489–495.
- Becker K.A., Ghule P.N., Therrien J.A. et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase // *J. Cell Physiol.* 2006. V. 209. P. 883–893.
- 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.
- Burdon T., Smith A., Savatier P. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells // *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. P. 432–438.
- Dahéron L., Opitz S.L., Zaehres H. et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2004. V. 22. P. 770–778.
- Dreesen O., Brivanlou A.H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells // *Stem Cell Rev.* 2007. V. 3. P. 7–17.
- 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.
- Eiselleova L., Peterkova I., Neradil J. et al. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. V. 52. P. 353–363.
- Eiselleova L., Matulka K., Kriz V. et al. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 1847–1857.
- Evseenko D., Schenke-Layland K., Dravid G. et al. Identification of the critical extracellular matrix proteins that promote human embryonic stem cell assembly // *Stem Cells Dev.* 2009. V. 18. P. 919–928.
- Greber B., Lehrach H., Adjaye J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor β signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal // *Stem Cells*. 2007. V. 25. P. 455–464.
- 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.
- Hanna J., Cheng A.W., Saha K. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 9222–9227.
- Hayashi K., Surani M.A. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. P. 493–498.
- 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.
- Lanner F., Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells // *Development*. 2010. V. 137. P. 3351–3360.
- McLean A.B., D'Amour K.A., Jones K.L. 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.
- Montes R., Ligeró G., Sanchez L. et al. Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF- β and IGF-II // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 698–709.
- Mummery C.L. Transforming growth factor beta and mouse development // *Microscopy Research and Technique*. 2001. V. 52. P. 374–386.
- Na J., Furue M.K., Andrews P.W. Inhibition of ERK1/2 prevents neural and mesodermal differentiation and promotes human embryonic stem cell self-renewal // *Stem Cell Research*. 2010. V. 5. P. 157–169.
- Nichols J., Smith A. Naive and primed pluripotent states // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. P. 487–492.
- Pucéat M. TGF β in the differentiation of embryonic stem cells // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 74. P. 256–261.
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L.A. et al. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells // *Oncogene*. 1996. V. 12. P. 309–322.
- 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.
- Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides // *Nature*. 1988. V. 336. P. 688–690.
- Stojkovic P., Lako M., Stewart R. et al. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 306–314.
- 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.
- 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.
- Valdimarsdóttir G., Mummery C. Functions of the TGF β superfamily in human embryonic stem cells // *APMIS*. 2005. V. 113. P. 773–789.
- 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. 4495–4509.
- Vallier L., Touboul T., Chng Z. et al. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. P. e6082.
- Xiao L., Yuan X., Sharkis S.J. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1476–1486.
- Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells // *Nature Biotechnology*. 2001. V. 19. P. 971–974.
- Xu R.H., Chen X., Li D. et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 1261–1264.

- 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.
- Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 // *Cell*. 2003. V. 115. P. 281–292.
- Ying Q., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal // *Nature*. 2008. V. 453. P. 519–523.
- Yoo S.J., Yoon B.S., Kim J.M. et al. Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells // *Exp. Mol. Med*. 2005. V. 37. P. 399–407.

Expression of TGF β Family Factors and FGF2 in Mouse and Human Embryonic Stem Cells Maintained in Different Culture Systems

N. V. Lifantseva^a, A. M. Koltsova^b, G. G. Poljanskaya^b, and O. F. Gordeeva^{a,*}

^a Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Abstract—Mouse and human embryonic stem cells are in different states of pluripotency (naive/ground and primed states). Mechanisms of signaling regulation in cells with ground and primed states of pluripotency are considerably different. In order to understand the contribution of endogenous and exogenous factors in the maintenance of a metastable state of the cells in different phases of pluripotency, we examined the expression of TGF β family factors (ActivinA, Nodal, Lefty1, TGF β 1, GDF3, BMP4) and FGF2 initiating the appropriate signaling pathways in mouse and human embryonic stem cells (mESCs, hESCs) and supporting feeder cells. Quantitative real-time PCR analysis of gene expression showed that the expression patterns of endogenous factors studied were considerably different in mESCs and hESCs. The most significant differences were found in the levels of endogenous expression of TGF β 1, BMP4 and ActivinA. The sources of exogenous factors ActivinA, TGF β 1, and FGF2 for hESCs are feeder cells (mouse and human embryonic fibroblasts) expressing high levels of these factors, as well as low levels of BMP4. Thus, our data demonstrated that the in vitro maintenance of metastable state of undifferentiated pluripotent cells is achieved in mESCs and hESCs using different schemes of the regulations of ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3/BMP/Smad1/5/8 endogenous branches of TGF β signaling. The requirement for exogenous stimulation or inhibition of these signaling pathways is due to different patterns of endogenous expression of TGF β family factors and FGF2 in the mESCs and hESCs. For the hESCs, enhanced activity of ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 signaling by exogenous factor stimulation is necessary to mitigate the effects of BMP/Smad1/5/8 signaling pathways that promote cell differentiation into the extraembryonic structures. Significant differences in endogenous FGF2 expression in the cells in the ground and primary states of pluripotency demonstrate diverse involvement of this factor in the regulation of the pluripotent cell self-renewal.

Keywords: embryonic stem cells, pluripotent, ground and primed state, differentiation, signaling pathways, TGF β , ActivinA, FGF2.