

ОБЗОРЫ

На пути к расшифровке кодов эмбриональных стволовых клеток

В.С. Репин, И.Н. Сабурин

Лаборатория клеточной биологии и патологии развития НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

On a way to decoding codes embryonic stem cells

V.S. Repin, I.N. Saburina

Laboratory of cellular biology and pathology of development of Scientific research institute of the General pathology and pathophysiology RAMS, Moscow

В обзоре представлен оригинальный авторский анализ накопившейся информации о факторах регуляции плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток.

Ключевые слова: плюрипотентность, самообновление, гены, эмбриональные стволовые клетки.

In the review the original author's analysis of the collected information on factors of regulation pluripotency of embryonic stem cells is submitted.

Key words: pluripotency, self-renewal, genes, embryonic stem cells.

После завершения программы «Геном человека», открытия регуляторной ДНК и цис-регуляторного кода на повестку дня вышел вопрос вопросов: каким образом регуляторная информация («углеродные мегабайты») управляет «молекулярными машинами» и внутриклеточными механизмами соматических клеток? В соматических «клетках-автоматах» сигнальные регуляторные системы определяют: 1) химический гомеостазис; 2) объемы и амплитуды физиологической функции. В отличие от большинства клеток взрослого организма, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) предоставляют в руки экспериментатора живой «микрощедро», серийный множитель soft-программ в виде клон клеток. ЭСК по затратам энергии сопоставимы с клетками головного мозга и кишечника. Однако 90% всех белков ЭСК — это компоненты регуляторных сетей. 90% всей РНК в ЭСК — это мРНК регуляторных генов, иРНК — первичные триггеры раннего эмбриогенеза и селекторы соматических линий, РНК — регуляторы хроматина, компоненты молчащих — «дормантных» молекулярных структур в резервных стволовых клетках.

Где хранятся и накапливаются регуляторные мегабайты, как идентифицировать soft-материю в клетках? Электронный микроскоп не выявил принципиальных отличий в организации обычных соматических и стволовых клеток. Все стволовые клетки (СК) имеют более примитивный (минимальный) фенотип с меньшей плотностью элементов цитоскелета и органелл, отвечающих за специализацию клетки. Однако *in vitro* можно заставить «забыть» ЭСК свое прошлое и место в организме. Вне организма в культуре над фидером ЭСК серийно копируют гены и программы эмбриогенеза в виде инфо-сырья на будущее. Сейчас разработаны методы серийного клонирования ЭСК в простых суспензионных средах или на малоадгезивном матриксе (гидрогель или Matrigel™). Нарботка любого сырья из ЭСК опирается на два свойства — плюрипотентность и самообновление.

Что такое плюрипотентность (ПП) ЭСК на языке измерений?

Описать феномен плюрипотентности можно в виде набора обязательных свойств.

1. Характерный рост плотными эпителиоидными колониями на подложке или в виде 3D-сфер над фидером.

2. Наличие около 100 генов и молекулярных маркеров, экспрессирующихся только в незрелых пролиферирующих клонках ЭСК. Эти белки-маркеры не найдены в соматических клетках плода или взрослого организма.

3. По закону антагонизма генов в развитии, в ЭСК нет белков зародышевых листков и клеток взрослых тканей. Гены ПП облигатно выключены во всех соматических клетках.

4. При введении в бластоцисту, ЭСК соучаствуют в развитии, встраиваясь в ткани зародыша; они в 100% туморогенны при введении в ткани взрослого организма; в 40–70% туморогенны при введении в постимплантационные зародыши.

5. Экстраэмбриональные ткани индуцируют ускоренную дифференцировку ЭСК в соматические линии через промежуточное образование зародышевых листков и аксиальный паттернинг.

6. В простых средах и при добавлении химических индукторов ЭСК дифференцируются в линии соматических клеток в обход зародышевых листков, не демонстрируя аксиального развития и органогенеза.

7. Плюрипотентные 3D-сферы или 2D-колонии не продуцируют собственного матрикса. Первый матрикс в сферах вырабатывают клетки примитивной висцеральной энтодермы. Кавитация запускает вторичную индукцию мезодермы и кардиомиоцитов. В настоящее время разработан арсенал матриксов, на которых ЭСК животных и человека сохраняют ПП и способность к самообновлению.

Пути расшифровки кодов ЭСК

Молекулярные биологи первыми попытались отыскать простые молекулярные «отмычки» для объяснения феномена плюрипотентности. Многие лаборатории делали замеры спектра мРНК в недифференцированных ЭСК; сравнивали полученные данные с показателями клеток, вступивших в дифференцировку. Разные схемы сопоставления профиля мРНК/белков ПП-ЭСК и клеток прогениторов-derivатов привели к идентификации 109 генов плюрипотентности, которые в дальнейшем разделили на 4 подгруппы [1–3]. Установлено, что «выключение» плюрипотентности происходит в течение 17–72 часов после запуска дифференцировки. Методические трудности были связаны с тем, что только первые 20 белков ПП находились в клетках в высокой концентрации. 80% белков оказались на грани порога

детекции. Увеличение численности анализируемых клеток вело к нарастанию гетерогенности РНК и белков из-за не-избежной неоднородности биоматериала. Как уже много раз бывало в молекулярной биологии, анализ списка белков из «клуба плюрипотентности» мало что подсказал относительно молекулярного кода ПП-сети. (таб. 1). Полученные «снизу» данные не проливают свет на то, как система регуляторов работает на уровне хроматина и выходного поведения клеток.

На основании каталога генов ПП комиссия международных экспертов предложила «канонизировать» 17 поверхностных антигенов и 90 генов ПП для паспортизации выделяемых линий ЭСК [4]. Молекулярная биология сделала свое дело: предложила надежные маркеры для выделения однородных клеток.

Таблица 1. Молекулярное «досье» на 40 белков «клуба плюрипотентности»

Название белка	Функция, авторы
Oct4/Nanog	Блок преждевременного образования и экспрессии генов мезо-, энто- и эктодермы, экстраэмбриональных тканей [5]
Sox2/Tcf3	Поддержание сети плюрипотентности
Nanog	Агонист энтодермы, антагонист нейроэктодермы; в комплексе с Smad1 – блок BMP-сигналикации в ЭСК [6]
Tcf3	Ядерный рецептор Wnt-beta-Cat-сигналикации в ядре [7]
Sox2	Авторегулятор экспрессии Oct4, Nanog, Utf1, FGF4 [8]
Klf2/Klf4/Klf5	Кофактор самообновления плюрипотентных ЭСК [9]
FoxD 3	Grg4/FoxD3 нейтрализуют Groucho репрессорный комплекс [10]
Zpf42 (Rex1)	Гуанин-нуклеотид-фактор для Rac GTP-азы
Utf1	Белок-репрессор хроматина [11]
CD9	Трансмембранный тетраспанин, модулятор EGF-сигналикации [12]
TdGF1 (Cripto)	Репрессор GCNF в первичной полоске, ко-активатор Nodal-Smad2-сигнального каскада
Dppa2/Dppa4 DppA4/DpA2 Dppa3/DppA5	Экспрессированы в недифференцированных Maldonado-ЭСК и герминативных клетках
DppA4	Белок хроматина, защищающий ПП-ЭСК от проэктодермальной дифференцировки [13]
DppA4	Дифференцировка в эктодерму
DAB2 (disabled)	Антагонист Wnt-каскада [9]
Zfx	В кооперации с h Tbx3/Tcl1 контролирует самообновление ЭСК [14]
Zpf206 (mice) Znf206 (human)	Агонист-коактиватор Oct4/Nanog [15]
Tcf3	Связывается с промотером Nanog [16]
c-myc	Трансфекция c-myc, Oct4, Sox2, Klf4 ревертирует фибробласты к фенотипу ПП-ЭСК [17]
Nanog+ Fbx15(Fbxo1)	Сверхэкспрессия индуцирует образование герминативного ПП эпителия из Oct4 ⁺ Sox2 ⁺ cmyc ⁺ Klf4 ⁺ индуцированных ПП клеток [18]
LeftB (Lefty1)	Метастатические опухолевые стволовые клетки лишены Lefty1 [19]
Oct4-Sox2-Klf4	Активируют Lefty1в ЭСК [20]
Lefty1	Блокирует фосфорилирование Smad4 (TGFB-R) [21]
Lin28	Oct4/Nanog/Sox2 трансфекция индуцирует образование ПП-СК из фибробластов; связан с малыми регуляторными РНК в ядре [22, 23]
P19	Специфический ядерный белок из сети Oct4/Nanog
Zic3	Защита ПП-ЭСК от проэнтодермальных сигналов [24]
Gbx2	Взаимодействует с репрессорным Groucho-Tle комплексом [25]
Dnmt3B	Метилаза H3 гистонов, cis-регуляторных повторов, энхансеров, сайленсеров, промотеров [26]

Окончание таблицы 1.

Название белка	Функция, авторы
GDF3	GDF3/Lefty1 – антагонисты BMP [27, 28]
BTF3	Транскрипционный фактор; BTF3-/- зародыши мыши погибают после имплантации
Gja1	Медиатор компактизации ЭСК агрегатов (коннексин 43) блокирует ЭМТ эпибласта
Notch1	Блок Notch1 индуцирует кардиомиогенез из ЭСК; поддерживает ПП-нейральные стволовые клетки [29]
Tal1	Транскрипционный фактор, клоногенный фактор
Lmo2	Транскрипционный фактор, клоногенный фактор гемопоэтических клонов
HoxA9	Активатор онко-Pim-киназы [30]
Bmi1	Из группы PcG, контролирует самообновление нейральных и кроветворных стволовых клеток [31, 32]
BMP-4	Триггер ЭСК-васкулогенеза через BMP4-FoxF1-SHH каскад; стимулятор пролиферации ЭСК в среде без сыворотки [33, 34]
Meis1	Активатор cyclin D1 и c-myc [35]
Pax6	Поддерживает экспрессию Sox2 в нейральных стволовых клетках [36]
Otx2	Индуктор нервной пластинки
Lhx2	Cyclin D1 контроль в G1 и S-фазу через ERK [37]

Пояснения

Oct4 – фактор транскрипции, обнаруженный только в СК млекопитающих. Его нет в дифференцированных соматических клетках. Oct4 не найден в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (мезенхимальных стволовых клетках) и региональных СК. Максимальное количество Oct4 выявлено в комплексе с другими белками плюрипотентности и ДНК в ядре. 50%-снижение Oct4 ведет к образованию трофобласта из ЭСК. Повышение Oct4 на 50% ведет к образованию энтодермы. В эпителиоидных линиях ЭСК прослеживается корреляция между уровнем Oct4-Nanog-Sox2 в ядре и уровнем E-кадгерина на поверхности клеток. Зародыши-мутанты Oct4-/- в 100% случаев погибают на стадии двухслойного цилиндра. Комплекс FoxD3-Oct4 взаимодействует с промотором остеопонтина, открывает путь спецификации энтодермы. Одновременно комплекс Oct4-FoxD3 блокирует преждевременную активацию промоторов FoxA1/FoxA2 [38]. В поздней гастреле исчезающий Oct4 находится в комплексе с Mixl1 (маркер первичной полоски). Все линии ПП-ЭСК отличаются рекордно высоким уровнем синтеза РНК, белков, пятикратно повышенным уровнем всех рибосомальных РНК. Полагают, что это связано с важной ролью регуляторных мРНК и иРНК. В недалеком будущем наборы регуляторных микроРНК будут использоваться для лабораторной унилинейной дифференцировки ЭСК или других СК в обход эмбриональной индукции и зародышевых листков.

Сопоставление 2D–протеомных карт всех известных ЭСК по тому же принципу выявило 92 белка. Сопоставление 2D–протеомных карт незрелых ЭСК и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) привело к идентификации 52 общих белков, соучаствующих в сети ПП [39]. Однако найти общий функциональный смысл работы этой весьма гетерогенной группы белков пока не удалось. Oct4, Nanog, Sox2 и другие белки сети ПП–ЭСК не найдены в ядре эпителиальных региональных СК и региональных МСК [40]. Напомним, что функции 40% генов, работающих в ЭСК человека и млекопитающих, ещё не установлены.

Ясно, что плюрипотентность ЭСК не сводима только к набору молекулярных маркеров или профилю выходных физиологических реакций. Скорее, плюрипотентность можно определить паттернами поведения ЭСК, которое управляется эпигенетическими сигналами. Корпоративный молекулярный подход позволяет лучше понять сетевую организацию плюрипотентности ЭСК. Центральное ядро из ключевых генов плюрипотентности окружено сетью из сигнальных белков–агонистов и сигнальных белков–антагонистов (Brachyury, Dkk1, Hlx1, GATA6, Id2, Dlx5). Сигнальная сеть из белков–антагонистов с входной стороны связана с основными потоками дифференцировочных сигналов, поступающих через 4

главных пути: Wnt–, Activin/Nodal–, BMP– и FGF–каскады. Эффекторной частью сеть антагонистов связана с ядром плюрипотентных генов. Поэтому с помощью сети агонистов/антагонистов главная программа плюрипотентности получает шкалу «тонкой настройки» [41]. Если начальные ЭСК имеют индивидуальный фенотип и профиль ключевых генов ПП, то разные клоны и регенерационные модули на базе одиночных ЭСК имеют «корпоративный» фенотип. Поэтому характеристики линий ЭСК, отдельных клеток и клеточных модулей должны существенно различаться.

Новые функциональные признаки «клуба белков плюрипотентности» приоткрылись на стыке анализа сиквенсов промоторов и взаимодействующих с ними регуляторных белков (методом иммунопреципитации на ДНК). Оказалось, что главные белки плюрипотентности Oct4, Nanog и Sox2 в ЭСК человека связаны соответственно с промоторами 523, 1271 и 1687 генов. В мышиных ЭСК Oct4 и Nanog связаны с 1083 и 3000 генами развития соответственно (включая транскрипционные факторы) [42]. Интересно, что 353 гена развития связывали по промоторам сразу весь комплекс Oct4/Nanog/Sox2. Половина генов активируется комплексом Oct4/Nanog/Sox2, остальные остаются под стабильной репрессией. Среди активированных генов имеются кластеры

Wnt- и TGF β -сигнальных каскадов. Высокий уровень белков ПП регулируется множественными петлями обратной положительной и отрицательной связи [8]. Например, незначительное повышение уровня Sox2, Oct4 или Nanog белков

индуцирует репрессию их синтеза. Изучение функций генов из «клуба плюрипотентности» с помощью техники нокаут и нокдаун позволило в первом приближении оценить вклад отдельных генов (табл. 2).

Таблица 2. Краткая характеристика некоторых генов «клуба полипотентности»

Название гена	Результат нокаута или лишней дозы
Rac1, CDC 42	Превращают эмбриобласт в эпибласт
Двойная доза гена CDC42, Rac-1	Блок ЭМТ в эпибласте, нет первичной полоски, гигантские клетки эпибласта
mESC E- Cadherin-/-	Фрагментация эпибласта, дезорганизованная мезодерма, ранняя экспрессия генов мезодермы
Oct4 -/-	Уродства эпибласта, яйцевого цилиндра, выключение сети плюрипотентности
FoxD3-/-	Выключение генов ПП и mRNA для Cripto, Nodal, Otx2
Sox-2 -/-	Полный блок эпибласта
v1 integrin -/-	Блок образования эпибласта за счет остановки синтеза базальной мембраны
Cdx2-/-	Нет трофэктодермы
Eomes-/-	Нет имплантации и трофэктодермы
Wnt3a-/-	Уродства гастрюлы
Tcf3-/-	Эктопическая дупликация гастрюлы
Lefty -/-	Множественные экто-копии ПП
Cerebrus -/-	Множественные экто-копии ПП
FGF-4-/- FGF-8-/-	Летальные аномалии гастрюлы
TGFB1 -/-	Летальные аномалии гастрюлы без мезодермы
BMP-4 -/-	Летальные аномалии гастрюлы без мезодермы
Nodal -/- Smad4 -/-	Блок миграции мезодермы, нет ПП, узелка, мезодермы, блок экспрессии Brachyury
Frz-/- Wnt-11 -/-	Блок ПП
Wnt3a -/-	Блок ПП
Goosecoid -/-	Блок ПП
Nodal -/-	Блок ПП
Nodal, Wnt3, FGF8	Первичные сигналы ПП
FGF4, BMP - 4, Otx2	
Smad 4 -/-	Дефекты образования примитивной энтодермы
Suz12 -/-	Нет H3K27- триметилирования, преждевременная дифференцировка ЭСК
5-аза-цитидин -/-	Низкая численность клеток в эпибласте
BMP8 -/-	Уменьшена численность примордиальных половых клеток

Регуляторные РНК и плюрипотентность

В ЭСК и ранних зародышах идентифицировано 20 000–40 000 иРНК, контролирующих включение и/или выключение разных групп генов раннего и позднего эмбриогенеза [43]. Часть иРНК контролирует компактную упаковку гетерохроматина [44]. Избыток регуляторных РНК, контролирующих осевой паттернинг, органогенез, коммитирование соматических линий позволяет использовать эти сигналы без остановки пролиферации клеток и «на ходу» реструктурировать хроматин в делящихся клетках. Молекулярным инструментом эмбриональной индукции, либо сигнальных «диалогов» между зародышем и экстраэмбриональными тканями служат так называемые секреторные микровезикулы, нафаршированные регуляторными мРНК и иРНК [45]. Например, супрессия Oct4 в ЭСК с помощью се-

лективной иРНК, индуцирует селективную экспрессию Cdx2, Hand1, PL-1 и других генов трофэктодермы с образованием характерных гигантских клеток трофобласта. Направленное иРНК выключение Nanog в ЭСК индуцирует образование экстраэмбриональной энтодермы и экспрессию её ключевых генов (GATA-4, GATA-6, ламинин В1). С помощью микровезикул, изолированных из ЭСК, кроветворные стволовые клетки удалось репрограммировать в Oct4⁺ Nanog⁺ Rex-1⁺ плюрипотентные клетки [45].

Например, полное подавление активности мРНК гена Oct4 приводит к автоматическому запуску экспрессии гена Cdx2 и дифференцировке трофэктодермы и трофобласта из ЭСК. Пятидесятипроцентное выключение активности мРНК Oct4 в тех же клетках индуцирует образование энтодермы с экспрессией GATA-4/GATA-6/Sox-17 [46].

Плюрипотентность и хроматин

Геном человека, включающий 35 000 генов и 3,2 млрд азотистых оснований, подвергается 400 000 кратной микроупаковке, чтобы уместиться в клеточном ядре. Как упакованы 2% «смысла» среди 98% бессмысленной цепочки длиной 2 метра в клеточном ядре? [47]. Ядро обычной интерфазной соматической клетки компартиментализовано на функциональные модули — ядерные поры, гетеро- и эухроматин, белковые тела, фибриллы и комплексы, петли хроматина, фабрики транскрипционных факторов, регуляторные модули супрессии и активации генов, межхромосомные комплексы. Специальные исследования под конфокальным микроскопом показали, что хроматин плюрипотентных ЭСК содержит менее компактные территории эухроматина и более диффузные области гетерохроматина [48, 49]. Одновременно все модули хроматина организованы более пластично и динамично.

Как правило, периферия ядра соматических клеток лишена эухроматина, тогда как наиболее активная часть петель хроматина локализована внутри сердцевины ядра [50]. Стабильно «дормантные» гены собраны около центрального ДНК. Градиент эухроматина/гетерохроматина менее выражен в ядрах ЭСК за счет нарастания факультативного гетерохроматина. Конститутивный хроматин, как известно, маркируется метилированными 7-лизинами в H3 гистонах. Метилирование ДНК и гистонов в плюрипотентных клетках передается новым поколениям клеток (эпигенетическая память). Используя флуоресцентно меченые гистоны H2B и H3, обнаружена их повышенная мобильность и обменяемость в гетерохроматине ЭСК [51].

Хроматин стволовых клеток полностью репрессирует все гены раннего, позднего эмбриогенеза и дифференцировки всех клеточных линий. В активном состоянии находятся гены, участвующие в самообновлении плюрипотентных клеток.

Главной особенностью плюрипотентных ЭСК считают гипердинамическую («дышащую») организацию хроматина, основанную на рыхлых контактах гистонов и главных транскрипционных комплексов с фибриллами и матриксом [51, 52].

В самое последнее время удалось установить первые прямые молекулярные маркеры состояния хроматина в эмбриональных стволовых клетках, некоторых региональных стволовых клетках (нейральных стволовых клетках, HСК) и соматических клетках (фибробластах). Оказалось, что карты триметилированных лизинов в гистонах существенно отличаются в ЭСК, HСК и фетальных фибробластах [53]. 90% промоторов в хроматине ЭСК маркировались триметилированным 4-лизином гистона H3 (что характерно для неактивного хроматина дормантных локусов). Другой вариант неактивного хроматина — это триметилированный 27-й лизин гистона H3. Активные зоны хроматина имеют H3 гистон, ацетилованный по 9-му лизину и метилированный по 4-му лизину [54].

Клон ЭСК как строительный модуль

Каждый клон ЭСК представляет естественный мост между отдельной клеткой и регенерационной тканью, между индивидуальным и корпоративным фенотипом, между индивидуальным и корпоративным поведением клеток. Все эпителиальные региональные стволовые клетки делятся асимметрично. Если истинные стволовые клетки контролируют численность первого поколения прогениторов, то потомство прогениторных клеток контролирует занимаемую территорию и обновление клеток на этой территории.

Клетки приходят и уходят, но контролируемые территории остаются.

Современная геномика и протеомика позволяет очертить этот переход от плюрипотентности и самообновления к мезо-энтодерме или экстраэмбриональным тканям. Новообразованная зародышевая эмбриональная ткань оснащена набором наиболее известных лигандов/рецепторов, TGF β -, Wnt-, BMP-, FGF-сигнальными каскадами. Новые гены зародышевых листков и сигнальных каскадов автоматически выключают «ядро» из 109 генов плюрипотентности и самообновления [55–57]. Эмпирически было найдено, что тандем Oct4–Sox2 кооперативно активирует экспрессию FGF4 и UTF1 [58]. Тандем белков Oct4/FoxD3 связывается и активирует промотор остеопонтина и одновременно блокирует экспрессию генов энтодермы FoxA1/FoxA2 [38]. LIF/Stat3 сигнальный каскад и синхронная экспрессия CD9 рецептора–тетраспанина облигатно связаны с плюрипотентностью/самообновлением ЭСК мыши; в ЭСК человека эта связь не установлена [58, 59]. Это объясняется тем, что LIF/Stat3 каскад активирует высокий тус в цитоплазме ЭСК именно мыши [60].

Антагонизм в экспрессии Oct4 и Cdx2 регулирует пропорцию ЭСК и трофэктодермы в культуре [61, 62]. Высокий уровень Oct4/Sox2/Nanog белков в хроматине линейно коррелирует с уровнем E-кадгерина в плазматической мембране и эпителиальным статусом ЭСК [2].

Избирательное выключение Oct4 с помощью иРНК приводит к изменению экспрессии более 1000 генов в ЭСК человека [41]. Активируется экспрессия Cdx2/Eomes, хотя появление клеток трофобласта не было верифицировано под микроскопом. Одновременное подавление экспрессии Nanog, Sox2, Rex1, LeftA, LeftB, DPPA4, Zic3, Thy1, TDGF1, PRDM14 сочеталось с активацией экспрессии генов мезо-энтодермы (Brahury, Tbx18, BMP4, Wnt, FGF/FGFR, activin, Notch, GATA-4, GATA6, Dkk, Id2, HLX1). Половина генов из группы репрессированных иРНК анти-Oct4 были гены из «клуба плюрипотентности», связанные промоторной сетью с Nanog, Sox2, Rex1 и т.д. Селективное выключение Oct4 с помощью иРНК вызывало сильную активацию экспрессии/синтеза лизин-метилтрансферазы (H3–K4–HMTase) гистонов, а также ацетилазы H2AFY/H2AFY2, деацетилазы HDAC6. Между тем экспрессия гистон-лизин-метилтрансферазы H3–K27–HMTase практически полностью подавлялась.

В модуле или клоне ЭСК работает закон антагонизма ведущих программ развития. Например, программа поддержания плюрипотентности исключает одновременный запуск дифференцировки, факторов транскрипции гастролы и зародышевых листков. Закон антагонизма программ развития имеет огромное значение для понимания организации работы хроматина в ЭСК. Высокая экспрессия Oct4–Nanog–FoxD3 не только стабилизирует от помех модуль генов, ответственных за самообновление ЭСК. Одновременно эта сигнальная сеть мозаично снижает чувствительность клеток к индукторам дифференцировки [63]. Например, транскрипционный фактор Zic3 не только корпоративно держит «планку плюрипотентности», но и одновременно направленно поддерживает экспрессию Nanog на высоком уровне. Селективная иРНК против Zic3, избирательно снижая уровень Nanog в клетках, направленно смещает дифференцировку в сторону энтодермы.

В развитии работает закон клеточных сигнальных корпораций, которые с помощью синергизма/антагонизма программ намечают баланс территорий, предназначенных для разных путей развития.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Brandenberger R, Wei H, Zhang S. et al. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ESC growth and differentiation. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 707–16.
2. Cai J, Olson J.M., Rao M.S. et al. Development of antibodies to human embryonic stem cell antigens. *BMS Dev. Biol.* 2005; 5: 26–31.
3. Wei C.L., Miura T., Robson P. et al. Transcriptome profiling of hESC and mESC identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. *Stem Cells* 2005; 23: 166–85.
4. International Stem Cell Initiative. Characterization of hESC cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 893–2001.
5. Ma L., Sun B., Hood L. et al. Molecular profiling of stem cells. *Clin. Chim. Acta.* 2007; 378: 24–32.
6. Suzuki A., Raya A., Kawakami Y. et al. Nanog binds to Smad1 and blocks BMP-induced ESC differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 10294–99.
7. Cole M.F., Johnstone S.E., Newman J.J. et al. Tcf3 is an integral of the core regulatory circuitry of ESCs. *Genes Dev.* 2008; 22: 746–55.
8. Kopp J.L., Ormsbee B.D., Desler M. et al. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mESCs. *Stem Cells* 2008; in press.
9. Jiang J., Chan Y.S., Loh Y.S. et al. A core Klf circuitry regulate self-renewal of ESCs. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10: 353–60.
10. Yaklichkin S., Steiner A.B., Lu Q. et al. FoxD3 and Grg4 interact to induce transcription in *Xenopus* mesoderm. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 2548–57.
11. van den Boom V., Kovistra S.M., Boesjes B. et al. UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ESC differentiation. *J. Cell Biol.* 2007; 178: 913–24.
12. Murayama Y., Shinomura Y., Oritani K. et al. The tetraspanin CD9 modulates EGF receptor signaling. *J. Cell Physiol.* 2008. in press.
13. Masaki H., Nishida T., Kitajima S. et al. Developmentally associated pluripotency protein DppA4 localized in active chromatin inhibits mESC differentiation into a primitive ectoderm lineage. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 33034–42.
14. Galan-Caridad J.M., Harel S., Arenzana T.L. et al. Zfx controls self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* 2007; 129: 239–41.
15. Wang Z. X., Kueh J.L., Thei C.H. et al. Zfp206 is a transcription factor that controls the pluripotency of ESCs. *Stem Cells* 2007; 25: 2173–82.
16. Pereira L., Yi F., Merrill B.J. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits ESC self renewal. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26: 7479–87.
17. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblasts by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
18. Okita K., Ishisaka T., Yamanaka S. Generation of germ-line competent induced pluripotent cells. *Nature* 2007; 448: 313–17.
19. Postovit L.M., Margaryan N.V., Sefter E.A. et al. hESCs suppress the aggressive phenotype of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 4329–34.
20. Nakatake Y., Fukui N., Twamatsu M. et al. Klf4 cooperates with Oct4/Sox2 to activate Lefty 1 in ESCs. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26: 7772–82.
21. Ulloa L., Tabizadeh S. Lefty1 inhibits Smad4 phosphorylation induced by TGF β . *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 1397–404.
22. Yu J., Vojanik M.A., Smuga-Otto K. et al. Induced pluripotent stem cell lines from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917–20.
23. Balzer E., Moss E.G. Localization of developing timer regulator Lin28 to RNP complexes. *RNA Biol.* 2007; 4: 16–25.
24. Lim L.S., Loh Y.H., Zhang W. et al. Zic3 is required for maintenance of pluripotency in ESCs. *Mol. Biol. Cell.* 2007; 18: 1348–58.
25. Heimbucher T., Murko C., Bajoghli B. et al. Gbx2 and Otx2 interact with Groucho/Tle co-repressors. *Mol. Cell Biol.* 2007; 27: 340–51.
26. Li J.Y., Pu M.T., Hirasawa R. et al. Synergistic function of DNA-methyltransferase Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog promoters. *Mol. Cell Biol.* 2007; 27: 8748–59.
27. Levine A.J., Brivanlou A.H. GDF3 – a BMP inhibitor – regulates cell fate in stem cells and embryos. *Dev.* 2006; 144: 209–16.
28. Peerani R., Rao B.M., Bauwens C. et al. Niche-mediated control of human ES cell renewal and differentiation. *EMBO J.* 2007; 26: 4744–55.
29. Nemir M., Crocquelois A., Pedrazzini T. et al. Induction of ESC-cardiogenesis via Notch1 downregulation. *Circ. Res.* 2006; 98: 1471–78.
30. Hu Y.L., Passegue E., Fong S. et al. Evidence that Pim1 kinase is a direct target of HoxA9. *Blood* 2007; 109: 4732–38.
31. Zenak D., Lingbeck M., Kostic C. et al. Bmi1 loss produces an increase of astroglial cells and a decrease of NSC population and their proliferation. *J. Neurosci.* 2005; 25: 5774–83.
32. Riso A., Dontje B., Vellenga E. et al. Long term maintenance of human HSCs by expression of Bmi1. *Blood* 2008; 111: 2621–30.
33. Astorga J., Carlsson P. SHH induction of murine vasculogenesis is mediated by BMP4 and Foxf1. *Dev.* 2007; 134: 3753–61.
34. Ogawa K., Saito A., Matsui H. et al. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mESCs. *J. Cell Sci.* 2007; 120: 55–65.
35. Bessa J., Tavaréz M.J., Santos J. et al. Meis1 remodulates cyclin D1 and c-myc expression. *Dev.* 2008; 135: 799–803.
36. Wen H., Hu Q., Li M. et al. Pax6 directly modulates Sox2 in NSCs. *Neurorep.* 2008; 19: 413–17.
37. Jirmanova L., Affanassieff M.A., Gobert-Gosse S. et al. Differential contribution of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclinD1 and to the control of G1/S transition in mESCs. *Oncogene* 2002; 36: 5515–28.
38. Guo Y., Costa R., Ramsey H. The ESC transfected by Oct4 and FoxD3: interaction to regulate endoderm-specific promoter expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 3663–67.
39. Baharvand F.J., Fathi A., van Hoof G. et al. Concise Review: Trends in stem cells proteomics. *Stem Cells* 2007; 25: 1888–93.
40. Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedinger K. et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 359–62.
41. Babaie J., Herwig R., Greber B. et al. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in hESCs. *Stem Cells* 2007; 25: 500–10.
42. Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L. et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 2006; 38: 431–40.
43. Sharov A.A., Piao J., Matoba R. et al. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS Biol.* 2003; 1: 410–21.
44. Probst A.V., Almonzri G. Pericentric chromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Different.* 2008; 76: 15–23.
45. Ratajczak J., Miekus K., Kucia M. et al. ESC-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847–56.
46. Hay D.C., Sutherland L., Clark J. et al. Oct4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation in human and mouse ESC. *Stem Cells* 2004; 22: 225–35.
47. Schneider R., Grosschedl R. Dynamic and interplay of nuclear architecture, genome organization and gene expression. *Genes Dev.* 2007; 21: 3027–43.
48. Arney K.L., Fischer A.G. Epigenetic aspects of differentiation. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 4355–63.
49. Meshorer E., Yellajoshula D., George E. et al. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent ESCs. *Dev. Cell* 2006; 10: 105–15.
50. Schofer C., Weipottahammer K. Gene dynamics and nuclear architecture during differentiation. *Different.* 2008; 76: 41–56.
51. Meshorer E., Misteli T. Chromatin in pluripotent ESC and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7: 540–46.
52. Zwaka T.P. Breathing chromatin in pluripotent stem cells. *Dev. Cell.* 2006; 10: 1–2.
53. Mikkelsen T.S., Ku M., Jaffe D.B. et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007; 448: 553–63.
54. Spivakov M., Fischer A.G. Epigenetic signatures of stem cell identity. *Nat. Rev. Genet.* 2007; 8: 263–7.
55. Pesce M., Scholer H.R. Oct4: gatekeeper in the beginning of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19: 271–78.
56. Sato N., Meijer L., Skaltsounis L. et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse ESCs through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 2004; 10: 55–63.
57. Mikkers H., Frisen J. Deconstructing stemness. *EMBO J.* 2005; 24: 2715–19.
58. Oka M., Tagoku K., Russell T.L. et al. CD9 is associated with LIF mediated maintenance of ESC. *Molec. Biol. Cell* 2002; 13: 1274–81.
59. Humphrey R.K., Beattie G.M., Lopez A.D. et al. Maintenance of pluripotency in human ESCs is STAT3 independent. *Stem Cells* 2004; 22: 522–30.
60. Heins N., Englund M., Sjoblom C. Derivation, characterization and differentiation of hESC. *Stem Cells* 2004; 22: 367–76.
61. Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct. Funct.* 2004; 26: 137–48.
62. Niwa H. Open conformation chromatin and pluripotency. *Genes Dev.* 2007; 21: 2671–76.
63. Pan G., Li J., Zhou Y. et al. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.* 2006; 20: E1094–102.

Поступила 11.04.2008