

УДК 615.361:611.018.46:577.2

Ю. И. Бажора, д-р мед. наук, проф.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*Одесский государственный медицинский университет, Одесса, Украина*

УДК 615.361:611.018.46:577.2

Ю. І. Бажора

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

*Одеський державний медичний університет, Одеса, Україна*

Наведено дані про поверхневі молекули ембріональних стовбурових клітин (ЕСК). Описано молекулярні шляхи (LIF і Oct 4), що підтримують плюрипотентність і недиференційовану проліферацію ЕСК, можливості індукції їх диференціювання у певному напрямку, а також значення цих досліджень для клінічної медицини.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, молекулярні шляхи, плюрипотентність.

UDC 615.361:611.018.46:577.2

Yu. I. Bazhora

## MOLECULAR MECHANISMS OF STEM CELLS PLURIPOTENCY

*The Odessa State Medical University, Odessa, Ukraine*

The article gives information about surface molecules of embryonic stem cells. Molecular pathways (LIF and Oct 4) that maintain pluripotency and undifferentiated state of proliferating ESC, possibilities of directed induced differentiation and importance of these researches for practical medicine are discussed.

**Key words:** stem cells, molecular pathways, pluripotency.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), половые клетки и клетки карциномы являются недифференцированными клеточными линиями, которые теоретически способны образовывать любые типы клеток тела. Благодаря широкому потенциалу развития и неограниченной продолжительности жизни в культуре, они представляют исключительный интерес для фундаментальных и прикладных исследований.

Эти клетки могут проходить дифференцировку *in vivo* и *in vitro*, что позволяет использовать их для исследования основных процессов в биологии развития. С ними можно проводить генетические манипуляции и потенциально их можно использовать для восстановления функции органов и тканей путем клеточной инженерии и трансплантации.

Данные клетки характеризуются отличным набором клеточных маркеров, включая присутствие соответствующих антигенов, ферментов и экспрессии определенного количества генов, участвующих в развитии. Однако ни один из этих маркеров не является абсолютно характерным для данного типа клеток.

Ниже кратко изложены данные о плюрипотентной природе линий полученных ЭСК и обсуждаются возможные механизмы и функцио-

нальные молекулы, с помощью которых достигается и поддерживается плюрипотентность в этих уникальных клетках.

Плюрипотентные стволовые клетки (СК) временно присутствуют в период эмбрионального развития в предимплантационном эмбрионе (от зиготы до морулы и во внутренней клеточной массе бластоцисты), а также в фетальных гонадах (примордиальные половые клетки).

Плюрипотентные клетки могут быть получены из внутренней клеточной массы бластоцисты (ЭСК), примордиальных половых клеток (эмбриональных половых клеток); из производных опухолевых зародышевых тканей — карциномы (эмбриональные клетки карциномы) [1–3].

Плюрипотентность полученных из эмбриона СК оценивается по нескольким критериям. Стволовые клетки могут давать начало широкому кругу клеток разного типа *in vitro* и *in vivo*, они бессмертны и могут бесконечно культивироваться с поддержанием недифференцированного фенотипа.

Указанные выше СК хорошо изучены у мышей и описаны у человека [4–7]. Они характеризуются определенным набором поверхност-

ных клеточных молекул, включая стадийспецифические эмбриональные антигены и активность специфических ферментов, таких как щелочная фосфатаза и теломераза [8; 9]. Хотя ни один из этих маркеров не является полностью клеточно-специфическим, присутствие их в комплексе ассоциируется с недифференцированным состоянием клеток. Небольшая группа маркеров быстро инактивируется при дифференцировке мышинных ЭСК. Она включает несколько факторов транскрипции (Rex1, Genesis, GBX2, Oct4, UFT2, Pem, L17), которые принадлежат к хорошо известным семействам генов. К сожалению, ни один из этих маркеров не экспрессируется исключительно плюрипотентными клетками и может быть обнаружен в других типах клеток организма [10–13].

При сравнении потенциала дифференцировки мышинных ЭСК, эмбриональных половых клеток и клеток карциномы установлено, что, несмотря на наличие сходных свойств, различное происхождение клеток часто отражается на потенциале их дифференцировки. Эмбриональные клетки карциномы, например, имеют более ограниченный потенциал дифференцировки. Вероятность их передачи следующим поколениям через герминальные линии химерных животных невелика, и очень часто они имеют дефекты кариотипа. Эмбриональные половые клетки легко переносят спонтанную дифференцировку, но могут не поддерживать нормальное развитие из-за эпигенетической модификации, которая происходит при формировании примордиальных половых клеток [14].

Самый большой потенциал развития имеют ЭСК, дифференцируясь в большое количество клеточных типов. Плюрипотентная природа ЭСК человека может быть продемонстрирована *in vitro* или *in vivo*. Дифференцировка *in vitro* может быть запущена в случае агрегации клеток при культивировании в суспензии [15]. Такие агрегаты клеток получили название эмбрионидных тел. Они в какой-то период времени копируют процессы раннего эмбрионального развития. К 20-му дню в суспензированной культуре (спонтанно) могут быть получены разные типы дифференцированных клеток [16–18]. В определенной степени можно управлять дифференцировкой клеток в специфические типы клеток путем добавления в культуру факторов роста. Эмбриональные стволовые клетки человека могут при этом дифференцироваться *in vitro* в более чем десять разных клеточных типов. С другой стороны, дифференцировка может индуцироваться путем экспрессии факторов транскрипции, которые играют главную роль в раннем вовлечении клеток в специфические клеточные типы, как это было показано для мышинных ЭСК. *In vivo* при инъекции недифференцированных клеток иммунодефи-

цитным мышам формируются опухоли (тератомы), содержащие производные мезодермы, эндодермы и эктодермы.

Наиболее четким доказательством плюрипотентности является способность клеток интегрироваться, пролиферировать и дифференцироваться во все клеточные линии (включая половые клетки) при введении их в бластоцисты. Эксперименты были проведены на мышах. С ЭСК выполняли генетические манипуляции и затем вводили их в бластоцисту хозяина для получения линии половых клеток, передающих генетическую модификацию. По понятным причинам у человека провести подобные манипуляции нельзя. Возможность эффективно управлять дифференцировкой ЭСК человека и массовое получение специфических типов клеток *in vitro* иллюстрируют их огромный потенциал как неограниченного источника клеток для трансплантации и в клеточной терапии [19; 20].

Потенциал использования ЭСК зависит от доступности большой и очищенной популяции недифференцированных клеток и от возможности эффективно направлять их дифференцировку в специфические типы клеток *in vitro*.

Для поддержания плюрипотентности клетки выращивают в условиях, определяющих их недифференцированный рост и включающих фидерный (питательный) слой инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов. Установлено, что мышинные ЭСК способны также поддерживать недифференцированный рост без питательного слоя в присутствии LIF (ингибиторного фактора лейкемии). Присутствие дифференцирующихся клеток запускает элиминацию плюрипотентных СК в культуре путем принуждения к дальнейшей дифференцировке или запуска программы апоптоза [21]. Следовательно, при элиминации дифференцированного потомства можно облегчить поддержание культуры ЭСК и получить однородную популяцию недифференцированных клеток. Этого можно достичь путем введения в геном ЭСК селективного маркера, такого как неомицин, под регуляцией промоторной последовательности, ассоциированной с плюрипотентностью. Недифференцированные клетки экспрессируют этот ген устойчивости к неомицину, который выключается, когда клетки дифференцируются, обуславливая их немедленную элиминацию путем продолжающейся G 418 селекции.

Недифференцированные клетки можно также пометить *in vitro* или *in vivo* путем экспрессии маркерного гена зеленого флуоресцентного протеина (GFP) под контролем промоторов, которые являются специфичными для недифференцированных клеток, таких как регуляторные последовательности Oct4 или Rex1. Метка клеток зеленой флуоресценцией позволяет проанализировать их в соответствии с интен-

сивностью флуоресценции с помощью сортера активированной флуоресценции клеток (FACS) [22]. Так можно получить чистую популяцию недифференцированных клеток, которые после переноса в другую культуру будут поддерживаться или использоваться для дальнейших исследований.

Аналогичные системы могут быть пригодными для элиминации недифференцированных клеток накануне трансплантации во избежание риска индукции опухоли.

Исследования ЭСК мышей позволили выявить два несвязанных молекулярных пути (LIF и Oct4), которые играют роль в поддержании плюрипотентности и недифференцированного роста. Установлено, что LIF поддерживает недифференцированную пролиферацию ЭСК и эмбриональных половых клеток путем присоединения к gp130-LIF рецептору гетеродимера и активации STAT3 фактора транскрипции [23]. Проведенные *in vivo* на мышах исследования с выключенным геном показали, что поддержание плюрипотентности не зависит от gp130-сигнального пути, но только при субоптимальных условиях поздней имплантации [24].

LIF<sup>-/-</sup> эмбрионы развивались нормально и становились фертильными. В то же время LIFR<sup>-/-</sup> и gp130<sup>-/-</sup> эмбрионы погибали в поздние сроки гестации (12,5–18,5-й день) или вскоре после рождения. STAT3<sup>-/-</sup> эмбрионы развивались до цилиндрической стадии и быстро дегенерировали без четко выраженной мезодермы [25].

Кроме того, есть данные о том, что LIF не активен в поддержании недифференцированного роста ЭСК человека *in vitro*. Все это указывает на существование альтернативных путей, участвующих в поддержании самообновления.

Oct4, который является POU-V-ДНК-связанным фактором транскрипции, ассоциирован с фенотипом тотипотентных / плюрипотентных клеток у мышей. Он экспрессируется всеми плюрипотентными клетками во время эмбриогенеза, а также выражено экспрессирован ЭСК, эмбриональными половыми клетками и клетками карциномы. При отсутствии Oct4 мышинные эмбрионы развиваются только до стадии бластоцисты. Они не способны продуцировать отличные от трофобласта дифференцированные клетки и вследствие этого рассасываются вскоре после имплантации. Следовательно, Oct4 необходим для предупреждения соматической дифференцировки внутренней клеточной массы и является основным в поддержании недифференцированного состояния во время эмбрионального развития [26].

Таким образом, оба пути (LIF и Oct4) вовлекаются в контроль над плюрипотентностью, однако молекулярные механизмы и гены, которые управляют ими, в большей части пока неизвестны.

Фактически доказано только участие Oct4 в поддержании *in vivo* недифференцированного состояния клеток. Поиск и обнаружение других генов, специфичных для всех плюрипотентных клеток, позволит продолжить исследование их уникального потенциала развития и изучить механизм поддержания плюрипотентности. Гены можно находить путем сравнения близкородственных популяций недифференцированных и дифференцированных клеток, например, внутренней клеточной массы и трофобласта ранней бластоцисты. Идентификация различно экспрессирующихся генов в предимплантационном эмбрионе технически сложна из-за ограниченного количества исследуемого материала и проводилась путем анализа белков и методом обогащения, основанном на PCR, что давало возможность идентифицировать большое количество генов [27]. Недавно произведено секвенирование кДНК, базирующееся на сборе более чем 25 000 ЭСК, полученных из предимплантационных эмбрионов [28]. Библиотеки стадийспецифических кДНК из неоплодотворенных ооцитов, зигот, 2-, 4-, 8-клеточных эмбрионов, морулы и ранней бластоцисты сравнивались с доступными базами данных. При этом было идентифицировано более 9 700 уникальных генов, основанных на поиске сходных последовательностей. Половина из них оказались новыми. Таким образом, многие гены, экспрессируемые предимплантационным эмбрионом, еще не охарактеризованы. Ряд из них (около 17 %), вероятно, стадийспецифические и только примерно 0,1 % постоянно экспрессировались во время предимплантационного развития.

Другой подход — сравнение ЭСК с их непосредственными дифференцированными производными, что снимает проблему ограниченного количества клеток, доступных для анализа. Таким путем предпринимались попытки идентифицировать гены, находящиеся ниже Oct4, с помощью метода гибридизации, что привело к идентификации новых генов, которые могут играть роль в установлении или поддержании плюрипотентности в мышинных клетках. Более того, возникает возможность провести широкое сравнительное исследование кДНК с использованием микрочипов, позволяющее создать профиль геномной экспрессии этих уникальных клеток.

Достижения в получении плюрипотентных линий СК человека и успехи в клонировании эмбрионов млекопитающих путем переноса ядер (ПЯ) открывают привлекательные перспективы восстановления функций тканей с помощью терапевтического клонирования. При этом ядро соматической клетки пациента вводится в энуклеированный ооцит. Такая клетка *in vitro* развивается до стадии бластоцисты.

ПЯ-бластоцисты могут быть использованы для получения соответствующих линий ЭСК, которые можно стимулировать к дифференцировке *in vitro* и обеспечить пациента аутоклеточным трансплантатом [29].

Прежде чем предложить данную процедуру для клинического применения, необходимо определить, каким образом соматическое ядро можно репрограммировать без передачи через линию половых клеток. Хотя достигнуты определенные успехи в клонировании эмбрионов путем трансплантации ядер соматических клеток, эффективность его все еще очень низкая из-за летальности эмбрионов и повышенной частоты уродств среди первого поколения потомков. Предполагается, что ядро из взрослой клетки или клеток продвинутого эмбриона не может быть полностью репрограммировано цитоплазмой ооцита. Независимо от того, что инактивация X-хромосомы в клонированной из ПЯ-клетки мыши происходит без отклонений, необходимо еще установить, насколько полон этот процесс, с помощью анализа дополнительных маркеров, которые подлежат эпигенетической модификации во время эмбрионального развития. Дефекты в экспрессии и метилировании некоторых импринтированных генов обнаружены у ПЯ-клонированных мышей. Жизнеспособные потомки доживают до взрослого состояния, несмотря на широко распространенную дисрегуляцию этих генов. Возможно, соматические клоны не способны реактивировать ключевые эмбриональные гены, например Oct4, во время преимплантационного и раннего постимплантационного развития и, следовательно, не могут формировать эмбриональные линии. Так как клеточная трансплантационная терапия методом клонирования эмбрионов не требует эмбрионального развития до полного срока, а только формирования бластоцисты и дифференцировки определенных специфических клеточных типов, то этого может быть достаточно.

Альтернативный подход предложен для получения аутологических линий ЭСК, а именно индукцией дифференцировки путем введения соматического ядра в цитоплазму плюрипотентной СК, тем самым обходится проблематичный этап эмбрионального клонирования.

Для выяснения вопроса, могут ли плюрипотентные клетки восстановить плюрипотентность и репрограммироваться, были исследованы гибриды между недифференцированными СК и полностью дифференцированными клетками. Гибридные клетки утрачивали стадие-специфические и тканеспецифические маркеры соматических родительских клеток и *de novo* активировали признаки и гены, характерные для плюрипотентных клеток [30]. Инактивация X-хромосомы — процесс, который связан с

дифференцировкой и происходит в соматических клетках женского организма. Путем демонстрации реактивации X-хромосомы вслед за слиянием клеток и их случайной инактивацией во время дифференцировки можно доказать, что СК способна правильно восстановить метку инактивации. Потенциал развития гибридных клеток можно исследовать также при инъекции их в бластоцисту хозяина. При создании жизнеспособных химер можно наблюдать клеточные гибриды в различных тканях и показать их способность к участию во всех клеточных линиях.

Остается пока неясным, как поддерживается, теряется и восстанавливается плюрипотентность при дифференцировке, образовании опухолей, гаметогенезе и клонировании эмбриона.

Таким образом, плюрипотентные свойства ЭСК, которые определяются способностью формировать эмбриональные зародышевые клетки и их дифференцированные производные *in vitro* и *in vivo*, делают их исключительно интересным объектом для фундаментальных и прикладных исследований, особенно при клеточной терапии и изучении раннего эмбрионального развития.

Этими клетками можно манипулировать *in vitro* путем контроля условий роста или проведения генетических модификаций, управляя их дифференцировкой в специфические типы клеток. Однако механизмы, с помощью которых эти клетки приобретают широкий потенциал развития или остаются недифференцированными, до сих пор в большинстве своем не изучены. Еще предстоит выяснить, какие функциональные молекулы и каким образом участвуют в поддержании самообновления и сохранении плюрипотентности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Evans M. S., Kaufman M. // Nature. — 1981. — Vol. 292. — P. 154-156.
2. Winkel G. K., Pedersen R. A. // Dev Biol. — 1988. — Vol. 127. — P. 143-156.
3. S. L. Resnick, L. S. Bixler et al. // Nature. — 1992. — Vol. 359. — P. 550-551.
4. P. W. Andrews, J. Damajanov et al. // Lab. Invest. — 1984. — Vol. 50. — P. 147-162.
5. Thomson S. A., Marshall V. S. // Curr. Topics Dev Biol. — 1998. — Vol. 38. — P. 133-165.
6. M. S. Shamblott, Gaerhert et al. USA. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1998. — Vol. 95 — P. 13726-31.
7. B. E. Reubinoff, M. E. Pera, C. Y. Fong et al. // Nat Biotech. — 2000. — Vol. 18. — P. 399-404.
8. M. E. Pera, S. Cooper, S. Mills et al. // Differentiation — 1989. — Vol. 42. — P. 10-23.
9. Schuldiner M., Eiges R., Eden A. et al. // Brain Res. — 2001. — Vol. 913. — P. 201-5.
10. Chapman G., Remiszewski J. L., Webb G. C. et al. // Genomics. — 1997. — Vol. 46. — P. 223-233.

11. Nichols S., Zevnik B., Anastassiadis K. et al. // Cell. — 1998. — Vol. 95. — P. 379-391.
12. Fan Y., Melhem M. F., Chaillet S. R. // Dev Biol. — 1999. — Vol. 210. — P. 481-496.
13. Rodda S., Sharma S., Scherer M. // S Biol Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 3324-3332.
14. Tada M., Tada T., Lefebvre L. et al. // EMBO. — 1997. — Vol. 16. — P. 6510-6520.
15. Smith A. G. // Ann Rev Cell Dev Biol. — 2001. — Vol. 17. — P. 435-462.
16. Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Elder et al. // Proc. Natl Acad Sci USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 11307-11312.
17. Reubinoff B. E., Itsykson P., Turetsky T. et al. // Nat Biotechnol. — 2001. — Vol. 19. — P. 1134-1140.
18. Kaufman D. S., Thomson S. A. // S Anat. — 2002. — Vol. 200. — P. 243-248.
19. Schuldiner M., Eiges R., Eden A. et al. // Brain Res. — 2001. — Vol. 913. — P. 201-5.
20. Amit M., Carpenter M. K., Inokuma M. S. et al. // Dev Biol. — 2000. — Vol. 227. — P. 271-278.
21. Mountford P., Nichols S., Zevnik B. et al. // Reprod Fertil Dev. — 1998. — Vol. 10. — P. 527-533.
22. Eiges R., Schuldiner M., Drukker M. et al. // Curr Biol. — 2001. — Vol. 11. — P. 514-518.
23. Burdon T., Chambers J., Stracey C. et al. // Cells Tissues Organs. — 1999. — Vol. 165. — P. 131-143.
24. Nicols S., Chambers J., Tada T. et al. // Development. — 2001. — Vol. 128. — P. 2333-2339.
25. Ware C. B., Horowitz M. C., Renshaw B. R. et al. // Development. — 1991. — Vol. 121. — P. 1283-1299.
26. Pesce M., Anastassiadis K., Scholer H. R. // Cell Tissues Organs. — 1999. — Vol. 165. — P. 144-152.
27. Zimmerman S. W., Schultz R. M. // Proc Natl Acad Sci USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 5456-5460.
28. Ko M. S., Kitchen J. R., Wang X. et al. // Development. — 2000. — Vol. 127. — P. 1737-1749.
29. Ridcutt W. M., Hochedlinger K., Kyba M. et al. // Cell. — 2002. — Vol. 109. — P. 17-27.
30. Tada T., Tada M., Hilton K. et al. // Dev Genes Evol. — 1998. — Vol. 207. — P. 551-561.

*Передплатуйте  
і читайте  
журнал*

# ІНТЕГРАТИВНА АНТРОПОЛОГІЯ

У ВИПУСКАХ ЖУРНАЛУ:

- ◆ Методологія інтегративних процесів
- ◆ Генетичні аспекти біології та медицини
- ◆ Патологічні стани і сучасні технології
- ◆ Філософські проблеми геронтології та геріатрії
- ◆ Дискусії

**Передплатні індекси:**

- для підприємств та організацій — 08210;
- для індивідуальних передплатників — 08207

**Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті**