

## ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

УДК 611-013;57.086.835;577.218

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА TGF $\beta$ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ<sup>1</sup>

© 2007 г. Н. Ю. Красникова, О. Ф. Гордеева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.11.06 г.

Специфические факторы, определяющие выбор клеточной судьбы в раннем эмбриогенезе, модулируются при взаимодействии сигнальных путей, формируя уникальную регуляторную сеть внутри клеток, необходимую для дифференцировки различных клеточных популяций. В работе проведено сравнительное исследование экспрессии генов факторов роста семейства TGF $\beta$  и их рецепторов на начальных стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, при формировании сфероидов эмбриональных тератокарциномных клеток и росте опухолевых клеток *in vivo* в иммунодефицитных мышцах. Показано, что паттерны экспрессии генов факторов *Activin*, *Nodal*, *Lefty1*, *Lefty2*, *BMP*, *TGF $\beta$ 1* и их рецепторов *ActRI*, *ActRII*, *BMPRI*, *TGF $\beta$ IR1*, *Tdgf* идентичны. Экспрессии белков  $\alpha$ -фетопротейна и транскрипционного фактора *Gata4*, специфических для первичной энтодермы, выявлены в клетках эмбриональной тератокарциномы. В недифференцированных эмбриональных стволовых клетках экспрессия *Gata4* обнаружена на уровне мРНК, а экспрессия на уровне белков появляется только в клетках первичной энтодермы в эмбриодных телах. Полученные результаты свидетельствуют, что, несмотря на существование у эмбриональных стволовых клеток и клеток эмбриональной тератокарциномы сходных сигнальных систем, присутствие различных специфических внутриклеточных факторов в целом формирует принципиально различные регуляторные сети в этих клетках, которые определяют программу их дифференцировки.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, тератокарцинома, факторы семейства TGF $\beta$ , дифференцировка, плюрипотентность, сигнальные пути.

Программа эмбрионального развития живых организмов, которая обеспечивается дифференциальной активностью различных генов, создает строго определенные пространственно-временные паттерны экспрессии в развивающихся областях зародыша и координирует их взаимодействия. Известно, что в гистогенезе тканей и при физиологической регенерации обновляющихся тканей во взрослом организме имеются принципиально сходные механизмы регуляции. Нарушения сигнальных и регуляторных каскадов, которые обеспечивают и контролируют дифференцировку стволовых клеток в соответствующие типы клеток, приводят к различным патологическим процессам, включая канцерогенез. Показано, что при многих формах рака в опухолевых клетках обнаруживается активность некоторых белков или их изоформ, характерных для эмбриональных тканей (например,  $\alpha$ -фетопротейн,

AFP), изменяется структурная организация хроматина, т.е. трансформированные клетки приобретают свойства эмбриональных клеток этой ткани (Abelev, 1971; Hair et al., 2002). Сравнительный анализ механизмов гистогенеза эмбриональных тканей и процессов онкогенной трансформации является перспективным подходом в изучении фундаментальных закономерностей нормального и патологического развития.

Плюрипотентные клетки эмбриона, являясь источником всех тканей и органов будущего организма, в процессе раннего развития дифференцируются в предшественников трех зародышевых листков и линию половых клеток. Этот тип клеток существует небольшой период у всех млекопитающих от стадии поздней морулы до стадии раннего яйцевого цилиндра сразу после имплантации (ст. E3–E4.5). Линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), полученные из плюрипотентных клеток эмбрионов, преимущественно стадии бластоцисты (E3.5), сохраняют плюрипотентный статус в течение длительного периода культивирования *in vitro* в соответствующих

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 05-04-49185а, 06-04-08279-офи) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

условиях (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Rosant, 2001). Их малигнизированные аналоги – линии клеток эмбриональной тератокарциномы – были получены из спонтанных опухолей семенников и яичников у мышей и человека, однако биологические свойства этих линий имеют значительное сходство (см. обзор: Andrews, 2002). Существующие литературные данные указывают на то, что появление тератокарциномных клеток в гонадах является результатом нарушения механизмов контроля специализации первичных половых клеток из плюрипотентных клеток (Andrews, 2002; Kimura et al., 2003). Хромосомные и генные мутации, которые несут тератокарциномные клетки, влияют на специфичность их дифференцировки в определенные типы клеток или полностью ограничивают все дифференцировки, что происходит в случае нуллипотентных клеточных линий (Blelloch et al., 2004). Специфические сигналы, которые обуславливают выбор клеточной судьбы в раннем эмбриогенезе, модулируются через взаимодействие нескольких сигнальных путей, формируя уникальную регуляторную сеть внутри клетки, необходимую для дифференцировки определенного типа клеток. Известно, что факторы семейства TGF $\beta$  (Activin, Nodal, Lefty, BMP, TGF $\beta$ ) играют важную роль в специализации предшественников экто-, энто- и мезодермы, а также линии половых клеток (Saijoh et al., 1999; Tremblay et al., 2001; Panchision et al., 2001; Vincent et al., 2003). Эти факторы осуществляют регуляцию процессов морфогенеза, формирование осей полярности и общего плана строения раннего зародыша (Zernicka-Goetz, 2002). Факторы семейства TGF $\beta$  контролируют дифференцировку различных типов клеток в обновляющихся тканях взрослого организма, и их повышенная активность часто обнаруживается в различных раковых опухолях (см. обзор: Reya et al., 2001).

В нашей работе изучение активности сигнальных путей, которые регулируются факторами семейства TGF $\beta$ , в ЭСК и эмбриональных тератокарциномных клетках было сфокусировано на выявлении экспрессии лигандов этого семейства и их рецепторов, а также специфических внутриклеточных переносчиков сигналов для установления характерных профилей экспрессии для недифференцированных и дифференцирующихся клеточных популяций. Мы также проводили сравнительный анализ профилей генной экспрессии в клетках эмбриональной тератокарциномы, растущей *in vitro* и *in vivo*, после трансплантации их иммунодефицитным мышам.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

*Культивирование клеток in vitro.* В работе были использованы ЭСК мыши линии R1, любезно предоставленные доктором А. Макларен

(А. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK), и линия F9 эмбриональной тератокарциномы мыши (Банк клеточных культур ИИЦ РАН, С.-Петербург). ЭСК мыши культивировали в среде DMEM, содержащей 1 mM L-глутамин, 0.1 mM заменимые аминокислоты, 0.1 mM  $\beta$ -меркаптоэтанол и 15% телячьей фетальной сыворотки (“HyClone”, США). Культивирование тератокарциномных клеток линии F9 проводили по стандартному методу в среде DMEM с добавлением L-глутамина и 10% телячьей фетальной сыворотки. Недифференцированные ЭСК R1 поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши, инактивированных митомицином C (10 мкг/мл) в течение 3 ч (“Sigma”, США). Для получения стандартных эмбрионидных тел использовали метод “висячей капли”: капли суспензии ЭСК и клеток линии F9 (концентрация 300 тыс/мл) помещали на крышку чашки для формирования эмбрионидных тел на 4–5 сут культивирования. Одну часть сформированных эмбрионидных тел собирали из капель и использовали для молекулярного анализа, а другую часть переносили в новые чашки, покрытые 0.1%-ным желатином (“Sigma”, США), для получения дифференцирующихся эмбрионидных тел. Исследование экспрессии специфических генов проводили в недифференцированных клетках, сформированных эмбрионидных телах и дифференцирующихся эмбрионидных телах (4–6 сут после прикрепления к адгезивному субстрату).

*Получение тератокарцином in vivo.* Для получения экспериментальных тератокарцином в качестве реципиентов использовали иммунодефицитных мышей линии Nude из питомника лабораторных животных НПП “Пушино” ФИБХ РАН (стоковая линия получена из питомника Charles Rivers, США). Суспензию клеток тератокарциномы линии F9 вводили каждому животному подкожно в область шеи (500 тыс. клеток/мышь). Через 4 нед после инъекции клеток животных забивали, извлекали развившиеся тератокарциномы, размер которых достигал около 2 см в диаметре. Опухолевый материал использовали для дальнейших исследований.

Материал тератокарцином фиксировали в 10%-ном формалине, обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин для приготовления срезов. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а затем исследовали с помощью системы анализа микроскопических изображений Leica DMRXA2, Германия.

*Иммуногистохимический анализ.* Выявление экспрессии специфических белков проводили с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (“Sigma”, США). Для ингибирования неспецифи-

ческого связывания и пермеабиллизации клеточные препараты инкубировали в растворе 0.3%-ного Тритона X-100 и 4%-ного сывороточного альбумина быка (фракция V, "Sigma", США) в фосфатном буфере. Для выявления экспрессии AFP и транскрипционных факторов Oct4 и Gata4 использовали антитела к этим белкам в разведениях, рекомендованных производителем ("R & D Systems", "Santa Cruz Biotechnology", США). Для флуоресцентной детекции использовали соответствующие вторичные антитела в разведении 1 : 900 ("Molecular Probes", США). Препараты докрашивали флуоресцентным красителем DAPI для визуализации клеточных ядер и заключали в среду Mowiol ("Sigma", США). Контрольные препараты обрабатывали так же, как и опытные образцы, исключая добавление первичных антител. Регистрацию специфического окрашивания и фотографирование препаратов проводили с использованием системы анализа изображений Leica DMRXA2 (Германия) и Olympus SK40 (Япония).

**Анализ геной экспрессии.** Для анализа экспрессии изучаемых генов выделяли тотРНК из недифференцированных ЭСК тератокарциномных клеток, эмбрионидных тел и дифференцирующихся эмбрионидных тел линий R1 и F9, используя Tri reagent ("Sigma", США). Фракцию мРНК получали из тотРНК с помощью набора для выделения мРНК на магнитных носителях Dynabeads ("Dyna", Норвегия). Синтез кДНК проводили на матрицах мРНК с использованием обратной транскриптазы M-MuLV и олиго(dT)<sub>18</sub> праймеров ("Fermentas", Литва). ПЦР-анализ экспрессии изучаемых генов проводили на амплификаторе Eppendorf (Германия) по следующей программе: предварительная денатурация: 94° – 5'; отжиг праймеров: 58° – 45"; удлинение цепи: 72° – 45"; денатурация 94° – 45", 40 циклов; завершающее удлинение цепи: 72° – 5'. Специфические праймеры были сконструированы на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank и Ensemble (таблица). Продукты ПЦР-анализа фракционировали в агарозном геле. Результаты электрофореза регистрировали с помощью трансиллюминатора ("Bio-Rad", США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЭСК мыши линии R1, полученные из внутренней клеточной массы бластоцисты, являются плюрипотентными и способны включаться в линию половых клеток химерных мышей, получаемых после инъекции ЭСК R1 в донорские бластоцисты мыши (Nagy et al., 1993). Клетки этой линии также дифференцируются в различные типы соматических клеток *in vitro* и формируют тератомы, в которых обнаружены различные структуры, являющиеся производными трех зародышевых листков (Гордеева и др., 2002, 2003; Gordееva

et al., 2005). Начальные стадии дифференцировки ЭСК *in vitro* сопровождаются формированием двухслойных клеточных сфероидов – эмбрионидных тел, состоящих из внешних клеток, дифференцирующихся во внезародышевую энтодерму, и внутренних недифференцированных клеток, представляющих собой клетки, являющиеся аналогами клеток предгастрюляционного эпибласта (рис. 1, а, в). Для получения эмбрионидных тел из ЭСК и тератокарциномных клеток суспензии клеток определенной концентрации культивировали в висячей капле для синхронизации процесса формирования сфероидов и для предотвращения их гетерогенности по размерам и соотношению типов клеток в эмбрионидном теле. После прикрепления эмбрионидных тел линии R1 к субстрату происходила дифференцировка этих субпопуляций в соответствии с их локальными межклеточными взаимодействиями, которая на продвинутых стадиях приводила к появлению различных дифференцированных клеток. В эмбрионидных телах ЭСК R1 субпопуляции внешних и внутренних клеток морфологически сегрегированы и не способны к обратной дифференцировке или к взаимному переходу из одной субпопуляции в другую. Иная ситуация наблюдается в процессе формирования эмбрионидных тел тератокарциномных клеток линии F9. Субпопуляция внешних клеток практически не отличалась по морфологии от внутренних клеток, а после прикрепления сфероидов к субстрату клетки из него активно мигрировали и практически переходили к исходному монослою (рис. 1, б, г, д). Таким образом, клетки эмбрионидных тел тератокарциномы линии F9 были способны к формированию сфероида, в котором нет четко разделенных по типу клеточных субпопуляций, т.е. эти клетки не способны к спонтанной дифференцировке *in vitro*.

В опытах по изучению тератогенеза *in vivo* после подкожной инъекции клеток линии тератокарциномы F9 иммунодефицитным мышам через 4 нед у всех животных развивались солидные опухоли (рис. 1, ж). Гистологический анализ показал, что они состоят из недифференцированных клеток и пронизаны густой капиллярной сетью. Никаких структур с дифференцированными клетками различного происхождения обнаружено не было (рис. 1, з). Таким образом, клетки субклона линии тератокарциномы F9, использованные в нашей работе, являются нуллипотентной линией, которая не способна дифференцироваться без воздействия экзогенных индукторов ни *in vitro*, ни *in vivo*.

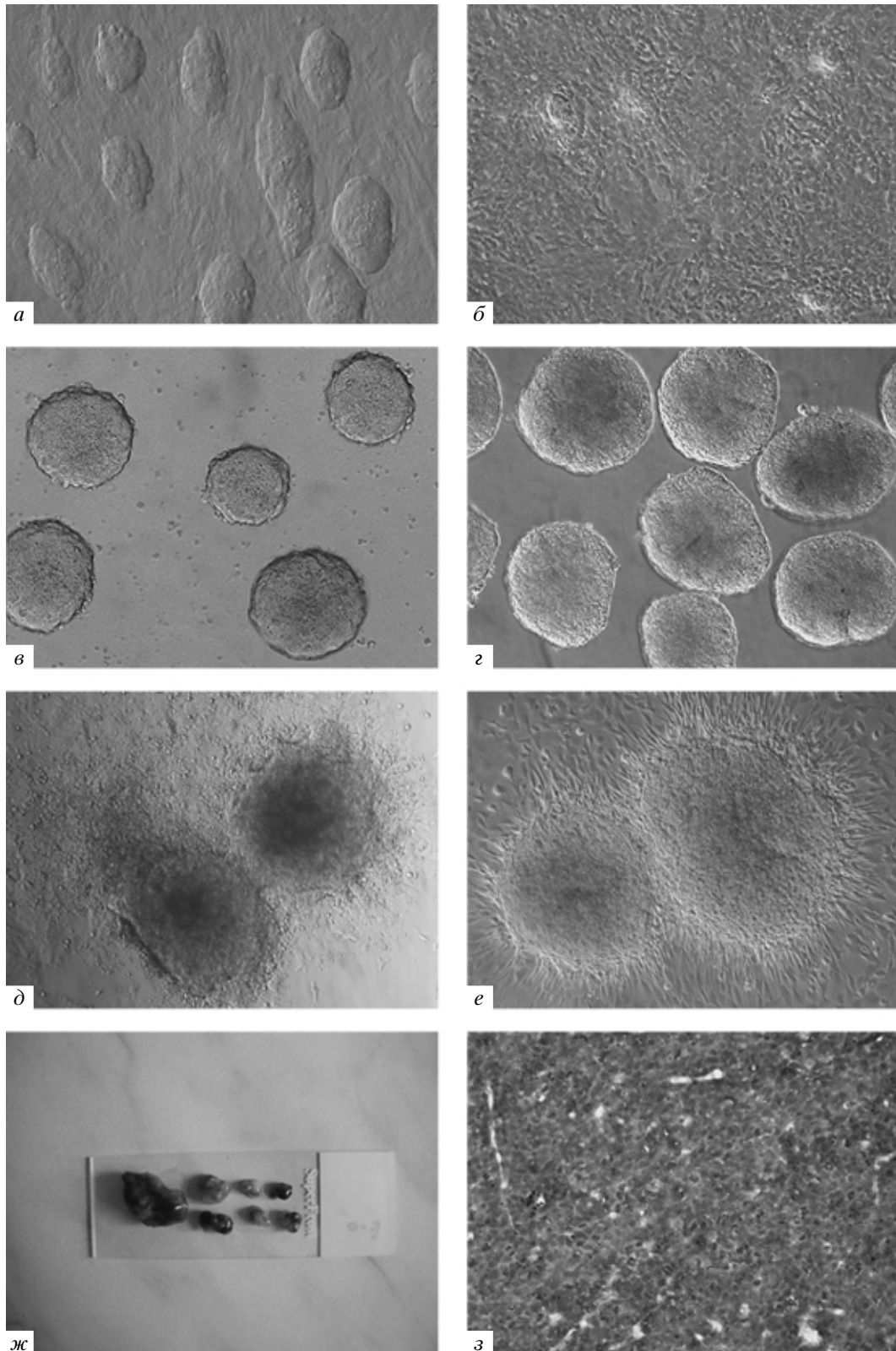
Далее мы исследовали экспрессию генов факторов роста семейства *TGFβ*, их рецепторов и внутриклеточных переносчиков сигналов – транскрипционных факторов Smad2 и Smad5 – во всех экспериментальных клеточных системах. Был также изучен характер экспрессии специфических для

Структура праймеров, использованных для ПЦР-анализа экспрессии изучаемых генов

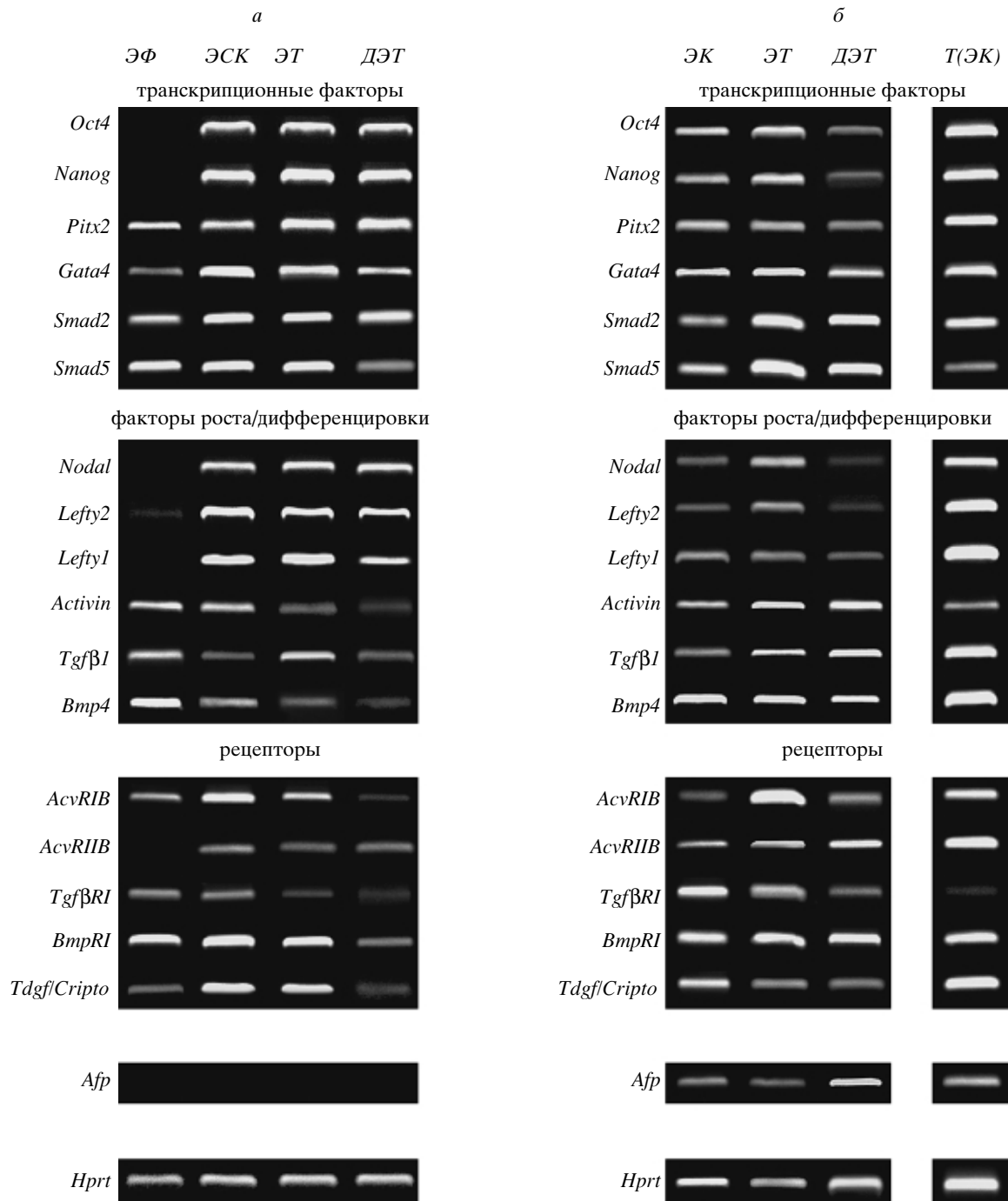
Ген	№ последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>Oct4</i>	NM_013633	5'-tggagactttgcagcctgag-3' 5'-catactcttctcgttgggatta-3'	621
<i>Nanog</i>	NM_028016	5'-tatttcacctggaggagtcaca-3' 5'-gatgaagtgcgaagcgggtggc-3'	475
<i>Pitx2</i>	NM_001042504.1 NM_011098.3 NM_001042502.1	5'-tgtggaccaaccttacggaa-3' 5'-gttattcaggctattgaggc-3'	374/275
<i>Gata4</i>	NM_008092	5'-ctgtgccaaactgccagacta-3' 5'-gcgatgtctgagtacagga-3'	446
<i>Nodal</i>	NM_013611	5'-actctccaagtggctaaagg-3' 5'-ttggtatcgtttcagcaggc-3'	451
<i>Lefty2</i>	NM_177099	5'-ctggacctcaaggactacgg-3' 5'-tctctgaggcaacacactgc-3'	244
<i>Lefty1</i>	NM_010094	5'-gctgatgtggaaggatgg-3' 5'-gtgtggggacagcctctttt-3'	282
<i>Activin</i>	NM_008380	5'-acgacttttctgccaggat-3' 5'-cagtgtcttctggctgtgc-3'	426
<i>Tgfβ1</i>	NM_011577	5'-taccttgtaaccggctgct-3' 5'-gggtcccagacagaagtgg-3'	435
<i>Bmp4</i>	NM_007554	5'-gggaaccgggcttgagta-3' 5'-tcggctgattctgacatgct-3'	469
<i>AcvRIB</i>	NM_007395	5'-agacgctccaggatctctgc-3' 5'-ctgggtccagggtccattat-3'	302
<i>AcvRIIB</i>	NM_007397	5'-gcttcaggaggtggtgtcc-3' 5'-gagcaggtccacattggtga-3'	241
<i>TgfR1</i>	NM_009370	5'-aaatggcggggagaagaagt-3' 5'-tgggcaatagctggtttcc-3'	326
<i>BmpR1</i>	NM_009758	5'-attcaccgaaagcccagcta-3' 5'-acctgccgaacctctgaat-3'	385
<i>Smad2</i>	NM_010754	5'-tgagctcaaggcaatcgaaa-3' 5'-tccaggtggtggtttctg-3'	250
<i>Smad5</i>	NM_008541	5'-gttggggaagcttttcatgc-3' 5'-gcagctgctgggatcttac-3'	288
<i>Tdgl1</i>	NM_011562	5'-ttggaccagaagaacctg-3' 5'-tgcacagggaacactcttg-3'	242
<i>Afp</i>	NM_007423	5'-agctcagcgaggagaatgg-3' 5'-caaaaggcccgagaatctg-3'	350
<i>Hprt</i>	NM_013556	5'-gctggtgaaaaggacctct-3' 5'-cacaggactagaacacctgc-3'	249

плюрипотентных клеток транскрипционных факторов *Oct4* и *Nanog* и белков, специфических для внезародышевой энтодермы, – транскрипционного фактора *Gata4* и AFP в ЭСК R1, в клетках эмбриональной тератокарциномы F9, в эмбрио-

идных телах, формируемых этими клеточными линиями и в клетках тератокарцином, развившихся *in vivo*. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 2. Мы установили, что на начальных стадиях дифференцировки



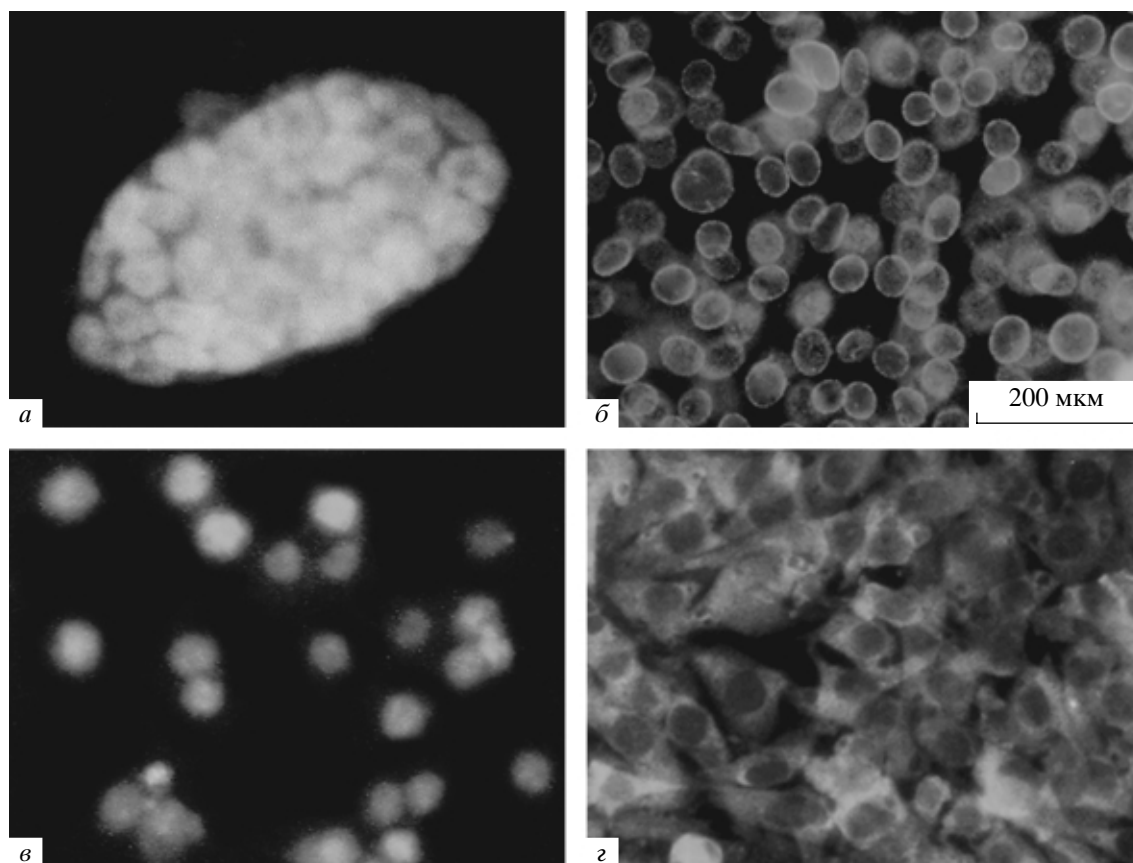
**Рис. 1.** Эмбриональные стволовые клетки мыши линии R1 и клетки эмбриональной тератокарциномы мыши линии F9: недифференцированные ЭСК, эмбрионидные тела и дифференцирующиеся эмбрионидные тела. *a, в, д* – линия R1; *б, г, e* – линия F9; *ж, з* – тератокарциномы, развившиеся в иммунодефицитных мышах после трансплантации линии F9. Увел.: *a–e* –  $\times 200$ ; *з* –  $\times 400$ .



**Рис. 2.** Экспрессия генов факторов сигнальных путей Activin/Nodal/BMP/TGFβ в эмбриональных стволовых клетках (а) и клетках эмбриональной тератокарциномы мыши линии F9 (б). Обозначения: ЭТ – эмбрионные тела, ДЭТ – дифференцирующиеся эмбрионные тела, ЭК – эмбриональная тератокарцинома, ЭФ – эмбриональные фибробласты, Т(ЭК) – тератокарцинома *in vivo*.

ЭСК в культуре экспрессируют мРНК всех изученных факторов семейства TGFβ: Activin, Nodal, Lefty1, Lefty 2, BMP и TGFβ. Интересно, что во всех изученных клеточных популяциях была выявлена мРНК генов фактора Nodal и его антагонистов Lefty1 и Lefty 2, а также корецептора Tdgf/Cripto, который участвует в формировании

комплекса с рецепторами активина ActRII и ActRI для активации сигнального пути Nodal или для его ингибирования факторами Lefty1 и Lefty 2. Было обнаружено, что во всех клеточных системах *in vitro* и в клетках тератокарциномы экспрессируются рецепторы первого типа для факторов BMP и TGFβ, рецепторы ActRII, ActRI (для факто-



**Рис. 3.** Экспрессия специфических факторов в эмбриональных стволовых клетках и клетках эмбриональной тератокарциномы мыши линии F9: *a* – Oct4 в колониях недифференцированных ЭСК R1; *б–г* – Oct4, Gata4 и AFP в недифференцированных клетках F9.

ров *Activin*, *Nodal*, *Lefty1*, *Lefty2*) и транскрипционные факторы *Smad2* и *Smad5*, которые обеспечивают проведение сигналов внутри клетки от соответствующих рецепторов. Как известно, белки *Smad2/3* и *Smad1/5/8* в комплексе со *Smad4* транспортируются в ядро и активируют транскрипцию многих генов-мишеней, которые обеспечивают дальнейшую детерминацию клеток в предшественников трех зародышевых листков (Shi, Massague, 2003; Dunn et al., 2004; Besser, 2004). В нашей работе не было выявлено принципиальных изменений уровней экспрессии генов, которые участвуют в сигнальных путях *Activin/Nodal/BMP/TGFβ*, на начальных стадиях дифференцировки ЭСК мыши и морфогенетических преобразований тератокарциномных клеток F9. Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости паттерна экспрессии генов указанных регуляторных путей в этих сходных клеточных типах. Неизменный характер экспрессии изученных генов на начальных стадиях дифференцировки ЭСК, вероятно, обусловлен тем, что дифференцировка внезародышевой энтодермы в эмбрионных телах в меньшей степени зависит от факторов семейства *TGFβ* или же эти факторы

участвуют в регуляции баланса других регуляторных сигнальных путей, которые важны для детерминации клеток-предшественников трех зародышевых листков.

Экспрессия транскрипционных факторов *Oct4*, *Gata4* и *Pitx2* была выявлена на уровне мРНК во всех изученных клеточных популяциях. Однако на уровне синтеза этих белков были обнаружены существенные различия между ЭСК и клетками тератокарциномы F9. Так, в недифференцированных ЭСК с помощью иммунофлуоресцентного анализа белков был выявлен только транскрипционный фактор *Oct4*, в то время как экспрессию *Gata4* детектировали только в эмбрионных телах (рис. 3, *a*). В клетках линии F9 была обнаружена экспрессия обоих факторов в некоторых недифференцированных клетках (рис. 3, *б, в*). Следует отметить, что в ЭСК и клетках тератокарциномы F9 также были обнаружены различия в экспрессии AFP на уровне синтеза белка и мРНК. На всех изученных стадиях дифференцировки ЭСК *in vitro* не была выявлена ни мРНК AFP, ни сам белок; тогда как в клетках эмбриональной тератокарциномы линии F9 присутствовали и мРНК, и белок (рис. 3, *г*). Необходимо

подчеркнуть, что экспрессию Gata4 и AFP детектировали в некоторых клетках, в то время как практически все клетки были Oct4-позитивными; другими словами, популяция клеток эмбриональной карциномы линии F9 не является однородной. Такой характер экспрессии специфических белков Oct4 и AFP в клетках линии F9 свидетельствует о ее промежуточном статусе между клетками эпибласта и внезародышевой энтодермы.

Ранее было показано, что ингибирование пула Smad2/3 в ЭСК мыши не приводит к значимому изменению уровня экспрессии специфического для плюрипотентных клеток транскрипционного фактора Oct4 и морфологическим изменениям в этой популяции (Sato et al., 2004). Совершенно иная ситуация наблюдается в регуляции роста внутренней клеточной массы бластоцисты: в случае отсутствия транскрипции белков Smad2 и Smad3 или при блокировании фосфорилирования этих факторов синтетическим ингибитором SB 431542 наблюдается снижение уровня Oct4 и редукция эпибласта (Dunn et al., 2004). Интересно, что и для ЭСК человека данные регуляторные пути имеют важное значение в поддержании плюрипотентности. При воздействии на ЭСК человека факторов BMP, TGF $\beta$  и Cripto происходит быстрая стимуляция дифференцировки и снижение числа Oct4-позитивных клеток, в то время как добавление в среду факторов Activin или Nodal и FGF способствует поддержанию плюрипотентного статуса (Vallier et al., 2005; Xu et al., 2005). Ингибирование сигналов от рецепторов Activin/Nodal приводит также к инициации дифференцировки ЭСК человека даже в присутствии FGF (Vallier et al., 2005; James et al., 2005).

На ранних этапах эмбрионального развития происходят события, направленные на выделение трех клеточных субпопуляций – трофоэнтодермы, первичной энтодермы и эпибласта (Rossant et al., 2003). Детерминация этих клеточных линий в эмбрионе регулируется рядом сигнальных и транскрипционных факторов с помощью изменения их комбинации или уровней экспрессии. Так, детерминация клеток трофобласта происходит при снижении экспрессии Oct4 и усилении экспрессии Cdx2 (Palmieri et al., 1994; Rossant et al., 2003). Появление первых предшественников клеток первичной энтодермы сопровождается экспрессией в них факторов Gata6 и Gata4 и снижением уровня экспрессии Oct4. В клетках же эпибласта поддерживается устойчиво высокий уровень Oct4 и Nanog, но не экспрессируются Gata6 и Gata4 (Palmieri et al., 1994; Morrisey et al., 1998; Mitsui et al., 2003; Rossant et al., 2003). По нашим данным и данным других авторов, в ЭСК выявлена транскрипция мРНК факторов, специфических для первичной энтодермы – Gata4 и Lefty1, наряду со специфическими факторами Oct4 и Nanog (Besser, 2004; Calhoun et al., 2004). Однако отсутствие экс-

прессии Gata4 на уровне белка указывает, скорее, на подготовку клеток к последующим событиям дифференцировки, а не на появление клеток первичной энтодермы в популяции. Эти данные демонстрируют устойчивость регуляции молекулярных механизмов, контролирующих детерминацию в ЭСК, при поддержании клеток в стандартных условиях.

В опухолевых клетках эмбриональной тератоканциномы F9, скорее всего, нарушена скоординированная сигнально-регуляторная сеть в результате генетических и эпигенетических повреждений, поэтому на фоне нормального паттерна экспрессии генов сигнальных путей Activin/Nodal/BMP/TGF $\beta$  активность транскрипционных и специфических факторов Oct4, Nanog, Gata4 и AFP проявляется атипично по сравнению с клетками ранних эмбриональных субпопуляций.

Таким образом, заложенные в программе раннего развития млекопитающих механизмы генной регуляции могут изменяться на уровне транскрипции мРНК отдельных генов в ЭСК до начала их дифференцировки. Весьма существенные отклонения от программы специализации эмбриональных клеточных линий наблюдаются в трансформированных клетках. В клетках эмбриональной тератоканциномы F9 исходный паттерн экспрессии генов сигнальных путей или специфических транскрипционных факторов отличается от нормы, что и делает невозможным переход к следующим стадиям дифференцировки без воздействия экзогенными факторами, которые могут изменять баланс этих факторов. В отличие от ЭСК в раковых клетках, вероятно, происходит фиксация паттерна генной экспрессии и установление нового стабильного состояния, что приводит к отклонению от программы нормального развития и препятствует реализации плюрипотентного потенциала.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гривенников И.А. и др. Характеристика плюрипотентной популяции на начальных стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре // Докл. АН. 2002. Т. 386. № 3. С. 555–558.
- Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Паюшина О.В. и др. Изучение дифференцировки плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток в перитонеальной полости облученных мышей // Изв. АН. Сер. биол. 2003. № 3. С. 371–374.
- Abelev G.I. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors // Adv. Cancer Res. 1971. V. 14. P. 295–358.
- Andrews P.W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2002. V. 357. P. 405–417.



- Besser D.* Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3 // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 45076–45084.
- Blelloch R.H., Hochedlinger K., Yamada Y. et al.* Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 13985–13990.
- Bonner A.E., Wang Y., You M.* Gene expression profiling of mouse teratocarcinomas uncovers epigenetic changes associated with the transformation of mouse embryonic stem cells // *Neoplasia.* 2004. V. 6. P. 490–502.
- Calhoun J.D., Rao R.R., Warrenfeltz S. et al.* Transcriptional profiling of initial differentiation events in human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 323. P. 453–464.
- Dunn N.R., Vincent S.D., Oxburgh L. et al.* Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo // *Development.* 2004. V. 131. P. 1717–1728.
- Evans M.J., Kaufman M.H.* Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature.* 1981. V. 292. P. 154–156.
- Gordeeva O., Zinovieva R., Smirnova Yu. et al.* Differentiation of embryonic stem cells after transplantation into peritoneal cavity of irradiated mice and expression of specific germ cell genes in pluripotent cells // *Transpl. Proc.* 2005. V. 37. № 1. P. 295–298.
- Hair A., Razin S.V., Vasetskii E.S.* Changes in chromatin organization during early development and carcinogenesis // *Rus. J. Devel. Biol.* 2002. V. 33. P. 85–89.
- James D., Levine A.J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A.* TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Development.* 2005. V. 132. P. 1273–1282.
- Kimura T., Suzuki A., Fujita Y. et al.* Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production // *Ibid.* 2003. V. 130. P. 1691–1700.
- Martin G.R.* Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryo cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 7634–7638.
- Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H. et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells // *Cell.* 2003. V. 30. P. 631–642.
- Morrissey E.E., Tang Z., Sigrist K. et al.* GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo // *Genes Devel.* 1998. V. 15. P. 3579–3590.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R. et al.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 18. P. 8424–8428.
- Palmieri S.L., Peter W., Hess H., Scholer H.R.* Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation // *Devel. Biol.* 1994. V. 166. P. 259–267.
- Panchision D.M., Pickel J.M., Studer L. et al.* Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate // *Genes Devel.* 2001. V. 15. № 16. P. 2094–2110.
- Rossant J.* Stem cells from mammalian blastocyst // *Stem Cells.* 2001. V. 19. P. 477–482.
- Rossant J., Chazaud C., Yamanaka Y.* Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 2003. V. 358. P. 1341–1349.
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature.* 2001. V. 414. P. 105–111.
- Saijoh Y., Adachi H., Mochida K. et al.* Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of lefty-1 and lefty-2 // *Genes Devel.* 1999. V. 13. P. 259–269.
- Sato N., Meijer L., Skaltsounis L. et al.* Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor // *Nat. Med.* 2004. V. 10. P. 55–63.
- Shi Y., Massague J.* Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell.* 2003. V. 13. P. 685–700.
- Soudais C., Bielinska M., Heikinheimo M. et al.* Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation *in vitro* // *Development.* 1995. V. 121. P. 3877–3888.
- Tremblay K.D., Dunn N.R., Robertson E.J.* Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation // *Ibid.* 2001. V. 128. P. 3609–3621.
- 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.
- Vincent S.D., Dunn N.R., Hayashi S. et al.* Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals // *Genes Devel.* 2003. V. 17. P. 1646–1662.
- 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.
- Zernicka-Goetz M.* Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse // *Development.* 2002. V. 129. P. 815–829.

## Comparative Analysis of Expression of TGF $\beta$ Family Factors and Their Receptors in Mouse Embryonic Stem and Teratocarcinoma Cells

N. Yu. Krasnikova and O. F. Gordeeva

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

*E-mail: olgagordeeva@yandex.ru*

**Abstract**—Specific factors that determine the cell fate in early embryogenesis are modulated during interaction of signaling pathways to form a unique regulatory network inside the cell, which is essential for differentiation of various cell populations. We carried out a comparative study of expression of the genes of TGF $\beta$  growth factors and their receptors at the initial stages of differentiation of the embryonic stem cells, during formation of spheroids of the embryonic teratocarcinoma cells, and during growth of neoplastic cells in vivo in immunodeficient mice. The patterns of expression of the genes *Activin*, *Nodal*, *Lefty1*, *Lefty2*, *BMP*, and TGF $\beta_1$  and their receptors *ActRI*, *ActRII*, *BMPRI*, *TGF $\beta$ IR1*, and *Tdgf* proved to be identical. Expression of  $\alpha$ -fetoprotein and transcription factor Gata4 protein, specific for the primary endoderm, was detected in the embryonic teratocarcinoma cells. In Undifferentiated embryonic stem cells, expression of Gata4 was found at the mRNA level, while expression at the level of proteins appeared only in the primary endoderm cells in the embryoid bodies. The results obtained suggest that despite the existence of similar signaling systems in the embryonic stem and teratocarcinoma cells, the presence of different intracellular specific factors forms radically different regulatory pathways, which determine the program of their differentiation.

*Key words:* embryonic stem cells, teratocarcinoma, TGF $\beta$  factors, differentiation, pluripotency, signaling pathways.