

УДК 611-013;57.086.835;577.218

## ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ПОДДЕРЖАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ<sup>1</sup>

© 2008 г. О. Ф. Гордеева, Ш. М. Миталипов\*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

\*Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University,  
Beaverton, Oregon

E-mail: mitalipo@ohsu.edu

Поступила в редакцию 30.06.08 г.

Постоянные линии плюрипотентных стволовых клеток человека и приматов могут быть получены с применением различных технологий из различных источников – внутренней клеточной массы бластоцисты, первичных половых клеток, партеногенетических ооцитов и зрелых сперматогониев, – а также при трансгенной модификации различных соматических клеток взрослого организма. Несмотря на различие в происхождении, все плюрипотентные линии демонстрируют значительное сходство основных биологических свойств: интенсивное самообновление и дифференцировку в различные соматические и половые клетки *in vitro* и *in vivo*, сходные профили экспрессии генов и структуру клеточного цикла. За десять лет интенсивных исследований стабильности различных линий эмбриональных стволовых клеток человека и приматов было установлено, что независимо от их происхождения в процессе длительного культивирования *in vitro* происходит накопление хромосомных и генных мутаций, возникают эпигенетические изменения, которые могут привести к онкогенной трансформации клеточной линии. В этом обзоре обобщены результаты исследований генетической и эпигенетической стабильности различных линий плюрипотентных стволовых клеток при длительном культивировании в условиях *in vitro*. На основе известных на сегодняшний день экспериментальных данных проведен анализ предполагаемых причин нестабильности генома и эпигенома в плюрипотентных линиях. Рассмотрены перспективы использования плюрипотентных стволовых клеток различного происхождения в клеточной терапии и фармакологических исследованиях.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, клонирование, плюрипотентные стволовые клетки, хромосомные аномалии, эпигенетические изменения, дифференцировка, метилирование ДНК, клеточный цикл, канцерогенез, клеточная терапия, приматы.

Развитие высших многоклеточных животных начинается с тотипотентной зиготы, затем в период дробления потенциал blastомеров изменяется – появляются плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы blastоцисты, эпибласта, которые дифференцируются в мультипотентные клетки-предшественники различных соматических линий клеток, а последние – в терминально дифференцированные, специализированные клетки. Плюрипотентные клетки появляются в эмбриональном развитии млекопитающих на короткий период – от стадии дробления до начала гаструляции. Этот тип клеток обеспечивает развитие всех типов соматических клеток, включая внезародышевые структуры, и линию половых клеток. Помещенные в культуру

*in vitro* плюрипотентные клетки эмбриона сохраняют свои свойства и приобретают способность к самоподдержанию в недифференцированном состоянии в течение длительного периода культивирования. Для исследования фундаментальных проблем биологии развития, связанных с механизмами реализации клеточного потенциала в эмбриогенезе и при канцерогенезе, широко используются в качестве моделей постоянные линии плюрипотентных клеток, которые получены не только из доимплантационных эмбрионов, но также с помощью экспериментальных манипуляций из коммитированных и дифференцированных клеток. К плюрипотентным клеточным линиям относятся:

эмбриональные стволовые клетки (ЭСК, embryonic stem cells, ESC), полученные из внутренней клеточной массы эмбрионов на стадии blastоцисты;

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-01307).

эмбриональные герминативные клетки (ЭГК, embryonic germ cells, EGC), полученные из примордиальных половых клеток из зачатков гонад эмбрионов различных стадий развития;

сперматогониальные стволовые клетки (ССК, spermatogonial stem cells, GSC), полученные из стволовых сперматогониев семенников неонатальных и взрослых животных;

партеногенетические эмбриональные стволовые клетки, полученные из партеногенетически активированных яйцеклеток на стадии метафазы мейоза II.

Необходимо отметить, что некоторые линии эмбриональной тератокарциномы, полученные из спонтанных тератокарцином в гонадах, также способны дифференцироваться в различные типы клеток, однако не было выявлено половых клеток с генотипом тератокарциномных клеток у химерных животных, что не позволяет считать их плюрипотентными (Andrew, 2002). С помощью экспериментальных манипуляций по репрограммированию соматических клеток были получены еще два типа линий плюрипотентных клеток – ЭСК, реконструированные с помощью переноса ядер соматических клеток в энуклеированный ооцит (somatic cell nuclear transfer, SCNT), и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced pluripotent stem cells, iPS cells), созданные из соматических клеток с помощью трансдукции генетических векторов на основе ретро- и лентивирусов, несущих регуляторные гены плюрипотентных клеток (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *C-myc*).

Изучение механизмов поддержания плюрипотентного статуса клеток и дифференцировки в различные типы клеток представляет интерес для фундаментальной науки, для создания высокотехнологичных тест-систем на основе ЭСК для доклинических исследований новых лекарств и необходимо для разработки эффективных и безопасных клеточных технологий для восстановления поврежденных тканей. Использование всего спектра плюрипотентных клеточных линий различного происхождения в качестве экспериментальных моделей позволит наиболее полно раскрыть механизмы программы нормального и патологического развития различных типов клеток в онтогенезе человека и млекопитающих.

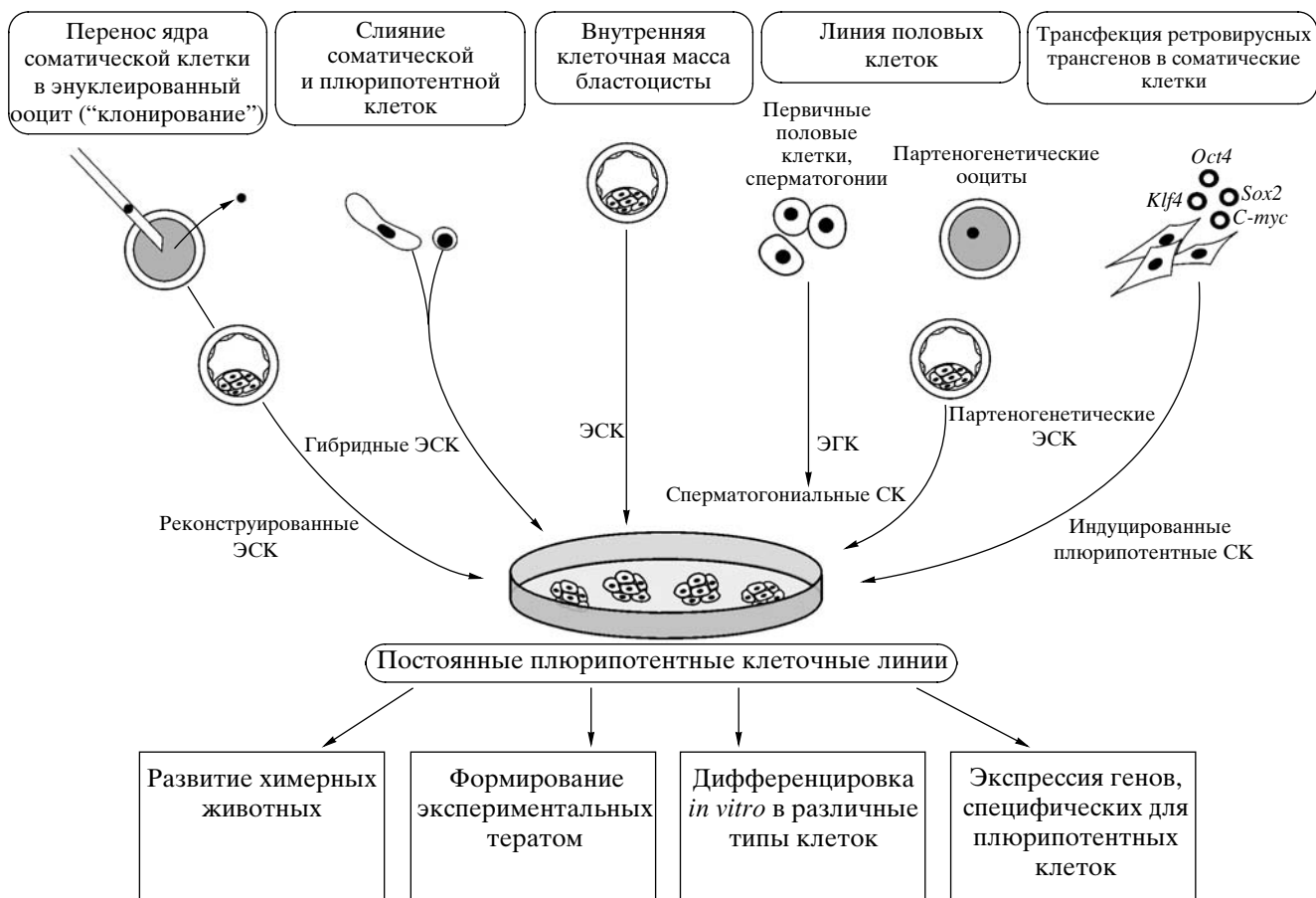
Плюрипотентные клеточные линии являются наиболее перспективным источником клеток для восстановительной терапии, так как из одной клеточной культуры можно получить практически все типы клеток организма, при использовании технологии реконструированных ЭСК и индуцированных плюрипотентных клеток успешно решить проблему гистосовместимости трансплантируемых клеток, а при использовании методов геной инженерии возможна коррекция генетических дефектов в геноме линии ЭСК. По срав-

нению с плюрипотентными постоянными линиями клеток мультипотентные стволовые клетки из различных тканей взрослого организма имеют ограниченные потенции, и получение аутологичных стволовых клеток для клинического применения возможно лишь для некоторых тканей. За последние десять лет интенсивных исследований были разработаны методы индуцированной дифференцировки ЭСК в различные типы клеток в условиях *in vitro*, однако установлено, что наиболее существенной проблемой при работе с ЭСК является генетическая и эпигенетическая нестабильность генома плюрипотентных клеток при продолжительном культивировании. Предметом обзора является анализ существующих экспериментальных данных о генетических и эпигенетических изменениях в ЭСК человека и приматов (низших и человекообразных обезьян), которые необходимо учитывать в дальнейших фундаментальных исследованиях и при разработке технологий клеточной терапии.

#### МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Линии ЭСК приматов были выделены Д. Томсоном с коллегами в 1995 г., а через три года в этой лаборатории были получены первые линии ЭСК человека (Thomson et al., 1995, 1998). Первые пять линий ЭГК человека были получены и охарактеризованы в 1998 г. из примордиальных половых клеток зачатков гонад 5–9-недельных плодов человека (Shamblott et al., 1998). К настоящему времени в различных странах создано более 400 различных линий и сублиний ЭСК и ЭГК человека и около 40 линий ЭСК различных приматов: макака резуса (*Macaca mulatta*), обыкновенной игрунки (*Callithrix jacchus*) и макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*). Полученные линии широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях, также продолжают разработку по усовершенствованию технологии получения, поддержания и дифференцировки линий плюрипотентных клеток (Thomson et al., 1995; Suemori et al., 2001; Nakatsuji, Suemori, 2002; Mitalipov et al., 2006). Первоначально линии ЭСК человека были получены из бластоцист, не востребованных после процедуры экстракорпорального оплодотворения, а позже – из морул и отдельных бластомеров эмбрионов ранних стадий развития (Strelchenko et al., 2004; Klimanskaya et al., 2006). Эффективность получения линий ЭСК приматов и человека варьирует (10–25%) и зависит в значительной степени от качества бластоцист.

В ходе фундаментальных исследований разработано несколько основных стратегий создания гистосовместимых для каждого пациента линий



**Рис. 1.** Методы получения и свойства различных типов линий плюрипотентных стволовых клеток (пояснения см. в тексте).

плюрипотентных клеток в качестве биоматериала для клеточной терапии (рис. 1). Первый подход заключается в получении линий ЭСК с помощью технологии переноса ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты. Из реконструированной зиготы развивается бластоциста, из которой получают линию ЭСК с генотипом донора соматического ядра (стратегия “терапевтического клонирования”). В этом случае факторами репрограммирования служат содержащиеся в ооците активные молекулы, необходимые для нормального развития. Технология получения реконструированных линий ЭСК довольно трудоемкая, и при ее использовании существует ряд ограничений. Во-первых, это недоступность большого числа ооцитов человека для манипуляций по репрограммированию, во-вторых, невысокий процент эмбрионов, развивающихся до стадии бластоцисты вследствие различных механических и химических повреждений. Эти технологические трудности сопровождаются и биологическими ограничениями, связанными с некорректной реактивацией генетической и эпигенетической программ развития в ядрах соматических

клеток. Известно, что при получении реконструированных мышинных линий ЭСК максимальная эффективность технологии составляет не более 20% (Wakayama et al., 1998, 2005), в том случае если такая же эффективность будет достигнута для линий ЭСК человека, то эта технология станет очень перспективной для клеточной терапии. Долгое время не удавалось получить реконструированные бластоцисты человека и приматов, необходимые для выделения линий ЭСК. Первые шаги на пути разработки технологии реконструированных ЭСК приматов были сделаны в 2007 г.: получены две реконструированные линии ЭСК макака резуса (*Macaca mulatta*) – CRES1 и CRES2 (Byrne et al., 2007). Авторам удалось усовершенствовать методику удаления пронуклеусов с помощью новой системы визуализации (Oosight spindle imaging system), при этом число жизнеспособных реконструированных бластоцист возросло с 1 до 16%. В настоящее время проводятся исследования по получению реконструированных линий человека (French et al., 2008). Перспективным подходом в создании таких

линий ЭСК человека может быть получение межвидовых гибридных клеток с использованием донорских ооцитов приматов (как наиболее близких к человеку видов) и ядер соматических клеток человека.

Другой метод создания специфичных для пациентов плюрипотентных клеток – получение партеногенетических линий ЭСК. Эти линии плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих, включая приматов и человека, успешно получены и охарактеризованы в нескольких лабораториях (Cibelli et al., 2002; Vrana et al., 2003; Lin et al., 2007; Revazova et al., 2007; Dighe et al., 2008). Несмотря на то что партеногенетические эмбрионы погибают на ранних постимплантационных стадиях, партеногенетические линии ЭСК растут в культуре и дифференцируются, однако они имеют ограниченную клиническую привлекательность, так как полученная зигота развивается из активированных ооцитов на стадии метафазы мейоза II после прохождения рекомбинации хромосом, т.е. полученные партеногенетические линии лишь частично совместимы с донором яйцеклетки. Кроме того, активированная зигота возникает без участия мужского генома и не экспрессирует ряд импринтированных генов. Тем не менее, эти линии ЭСК представляют собой интересные модели для изучения роли геномного импринтинга в гистогенезе различных тканей.

Репрограммированные линии ЭСК были получены при слиянии различных соматических клеток взрослых тканей и ЭСК, в результате этой процедуры были выделены стабильные тетраплоидные линии ЭСК человека, которые сохраняли все свойства и характеристики плюрипотентных клеток (Cowan et al., 2005; Yu et al., 2006). Относительно простой метод получения этих линий, тем не менее, вряд ли пригоден для практического использования, так как гибридные клетки содержат чужеродный геном и дифференцированные соматические клетки после трансплантации будут распознаваться иммунной системой пациента. Кроме того, нестабильность тетраплоидного генома гибридных клеток может быть причиной онкогенной трансформации. С другой стороны, изучение механизмов реактивации генов, контролирующих плюрипотентный статус, и инактивации экспрессии генов специализированных клеток в процессе репрограммирования может быть успешно при использовании этой экспериментальной системы.

Новый “революционный” метод получения плюрипотентных клеточных линий предложил Ш. Яманака с соавторами в 2006 г., он был опробован сначала на клетках мыши, а затем и человека (Takahashi, Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Эта технология заключается в создании ЭСК-подобных клеточных линий из

соматических клеток (фибробластов) с использованием трансгенной модификации их генома при помощи вирусных конструкций, несущих регуляторные гены. В этом случае после интеграции вирусных конструкций в геном соматических клеток и последующей транзиторной экспрессии регуляторных генов *Oct4*, *Sox2*, *C-myc* и *Klf4* происходит репрограммирование генома фибробластов и возвращение терминально дифференцированных клеток к плюрипотентному статусу. В течение нескольких недель культивирования приблизительно в 0.1% трансдуцированных клеток происходит драматическое изменение их морфологии и потенциала. Опыты с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками мыши продемонстрировали их способность обеспечивать развитие химерных животных, что полностью подтверждает их плюрипотентный статус. Однако у таких особей были обнаружены опухоли гортани, что указывает на изменение программы развития индуцированных плюрипотентных клеток с такой трансгенной модификацией (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007).

Описанные выше эксперименты позволили по-новому переосмыслить наши представления об изменении потенциала клеток и о механизмах, контролирующих плюрипотентный статус клетки, однако необходимы дальнейшие исследования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Несмотря на очень низкий процент репрограммированных клеток, этого числа, тем не менее, вполне достаточно для сравнительно быстрого получения клеточной линии с определенным генотипом. Однако безопасность этого типа плюрипотентных клеточных линий при клиническом применении остается под вопросом, так как неясно, насколько корректно репрограммируются соматические клетки. При получении индуцированных плюрипотентных клеток используются вирусные конструкции, которые могут быть инициаторами генетической нестабильности, кроме того, в состав конструкции включен онкоген *C-myc*, суперэкспрессия которого обнаруживается практически во всех исследованных раковых опухолях человека. Для использования таких клеточных линий в клеточной терапии необходимо исключить применение этого онкогена в предложенной технологии. Первые разботки в этом направлении показали, что при такой модификации технологии значительно снижается эффективность метода, но линии индуцированных плюрипотентных клеток все же могут быть получены (Yu et al., 2007; Nakagawa et al., 2008).

Все плюрипотентные клеточные линии, независимо от происхождения источников клеток и методов, использованных для их получения, обладают общими биологическими свойствами, хотя и обнаруживают индивидуальные различия в некоторых характеристиках роста в культуре, способ-

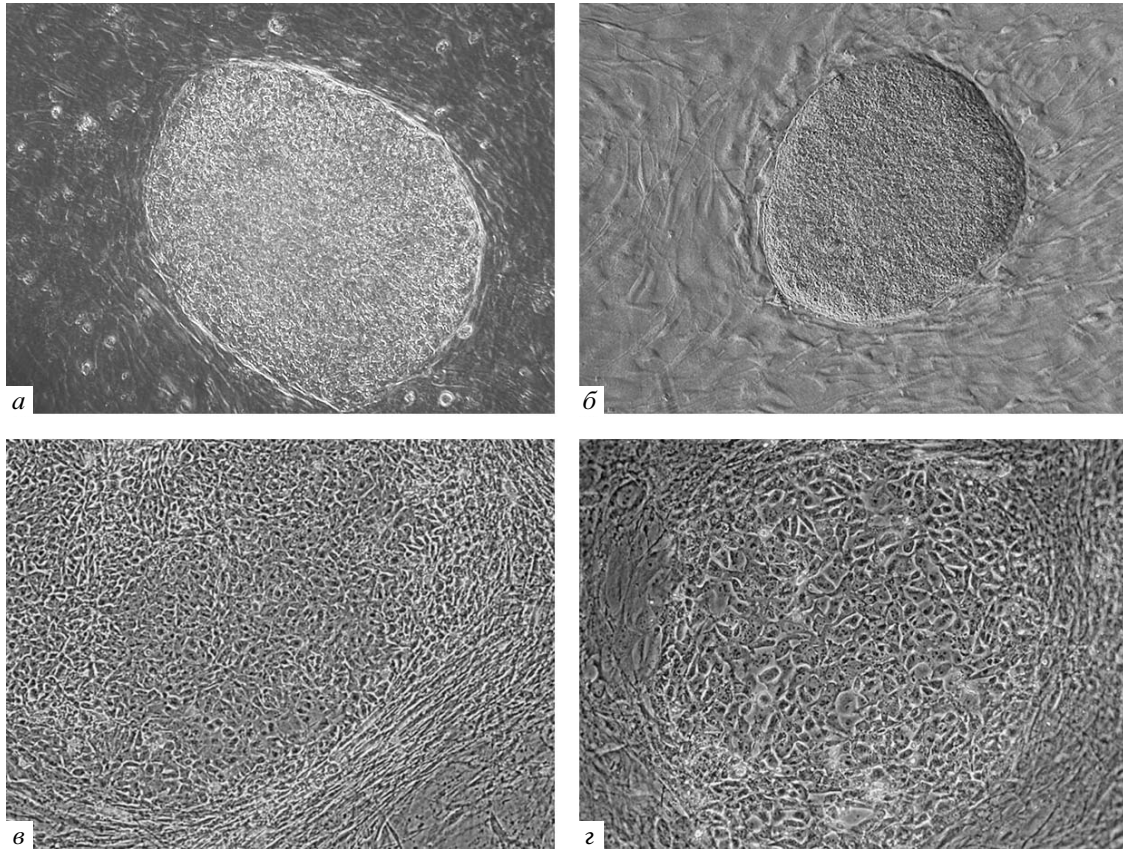
ности дифференцироваться в различные типы соматических клеток, в генетической и эпигенетической стабильности. Выявленные различия могут быть связаны как с наследственными изменениями в эмбрионах, из которых получены эти линии, так и с индивидуальной чувствительностью к различным адаптивным эффектам культивирования *in vitro*, а также с вариациями в методах поддержания в различных лабораториях. В случае индуцированных плюрипотентных клеточных линий пока отсутствуют данные об их различиях, изменчивости или стабильности в течение продолжительного культивирования *in vitro*.

Для получения и поддержания ЭСК человека и приматов, а также индуцированных плюрипотентных стволовых клеток используют практически однотипные системы культивирования *in vitro*, включающие использование различных типов фидерных клеток или различных белковых компонентов внеклеточного матрикса (ламинин, коллаген), добавление в среду для культивирования фетальной сыворотки или белковых заменителей сыворотки, различных факторов роста – фактор роста фибробластов (bFGF), активин, нодал (Xu et al., 2001, 2004, 2005; Novatta et al., 2003; Rosler et al., 2004; Beattie et al., 2005; Vallier et al., 2005; Bigdeli et al., 2008). Основной особенностью ЭСК приматов и человека является низкая выживаемость единичных клеток и соответственно низкая клоногенная способность. При рутинном культивировании ЭСК используют энзиматический и механический способы разделения клеток при пассировании, при котором культуры разделяются на клеточные кластеры, но не на единичные клетки, что увеличивает их жизнеспособность и способствует дальнейшему росту. ЭСК приматов и человека в большей степени, чем мышинные, склонны к спонтанной дифференцировке *in vitro*, поэтому для сохранения основных характеристик линий необходимо удаление дифференцированных клеток из популяции.

Для характеристики плюрипотентных клеточных линий было разработано несколько критериев. “Золотым стандартом” в оценке плюрипотентности ЭСК мыши является способность их включаться в состав различных тканей и органов химерных животных, развивающихся из бластоцисты, в которую были инъецированы ЭСК. Однако существующие этические ограничения не позволяют использовать такой метод для оценки ЭСК человека, поэтому уже полученные и новые линии ЭСК человека и приматов относят к плюрипотентным клеточным линиям, основываясь на других характеристиках, которые в значительной мере идентичны для мышей, приматов и человека.

В первую очередь оценку плюрипотентности проводят с помощью тератомного теста, т.е. спо-

собности ЭСК, ЭГК и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток формировать тератомы в иммунодефицитных животных-биомоделях (мышь линий Nude или SCID). Классические тератомы, формируемые плюрипотентными клетками, содержат зачатки различных тканей и структур, являющихся производными трех зародышевых листков (Przyborski, 2005; Gordeeva, 2007). Все недифференцированные плюрипотентные клеточные линии идентичны морфологически, они растут *in vitro* колониями из мелких, плотно упакованных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (рис. 2). Все клетки колоний экспрессируют специфические транскрипционные факторы OCT4 и NANOG, а также мембранные белки – стадиеспецифические эмбриональные антигены SSEA3 и SSEA4, CD9 и кератансульфатные антигены TRA-160, TRA-1-81, – в них выявлена высокая активность теломеразы и щелочной фосфатазы. За последние годы транскрипционные профили плюрипотентных клеточных линий и их дифференцированных клеток-производных были подробно исследованы с помощью различных олигонуклеотидных микрочипов (microarray technology). Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что в различных линиях ЭСК уровень экспрессии многих генов может значительно варьировать, однако для всех исследованных линий ЭСК и ЭГК человека и приматов, а также и для индуцированных плюрипотентных клеток характерен высокий уровень экспрессии набора “специфических генов стволовых клеток” – *POU5F1(OCT4)*, *SOX2*, *NANOG*, *TDGF1*, *LEFTYB*, *DNMT3B*, *GDF3*, *GABRB3* (Гордеева и др., 2006; Mitalipov et al., 2006; Adewumi et al., 2007; Byrne et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). В сравнительном исследовании 59 линий ЭСК человека, полученных и поддерживаемых в 17 различных лабораториях мира, было показано, что на начальных стадиях дифференцировки ЭСК в значительной степени изменяется экспрессия генов, компонентов различных сигнальных путей и регуляторов пролиферации – *FGF4*, *LEFTYB*, *EBAF(LEFTYA)*, *NODAL*, *TDGF1*, *IFITM1*, *FOXD3*, *GAL*, *LIN28*, *TERT*, *UTF1* и др. (Adewumi et al., 2007). Причины вариабельности экспрессии в различных линиях ЭСК человека неясны. Все исследованные линии получены из эмбрионов с различным генотипом, однако выявленную гетерогенность профилей экспрессии невозможно объяснить только этим, к тому же для взрослых тканей человека различных индивидуумов она составляет не более 2% (Hsiao et al., 2001). Вероятно, причины этих различий связаны с начальными событиями при выделении линии ЭСК, так как клетки внутренней клеточной массы бластоцисты в некоторой степени являются гетерогенной популяцией и по-разному адаптируются к искусственной среде. Не исключе-



**Рис. 2.** Эмбриональные стволовые клетки человека и приматов: а, б – ЭСК человека линии ESM01, ESM03; в – ЭСК макака резуса линии ORMES1; г – ЭСК приматов, полученные с помощью технологии переноса соматического ядра в энуклеированный ооцит, линия CRES1.

но, что существующие различия имеют отношение к использованию различных алгоритмов при обработке экспериментальных данных, полученных с помощью микрочиповой технологии (Allegrucci, Young, 2007).

Для характеристики и изучения стабильности линии также обязательно используют кариологический анализ и анализ эпигенетического профиля, что будет подробно обсуждено далее. Способность линий ЭСК различного происхождения, ЭГК и индуцированных плюрипотентных линий к дифференцировке *in vitro* в различных направлениях также является одним из критериев для оценки плюрипотентного потенциала линий. В ходе многочисленных исследований дифференцировки *in vitro* разных плюрипотентных клеточных линий человека и приматов были разработаны протоколы для получения в культуре различных типов дифференцированных клеток: нейронов и глиальных клеток, кардиомиоцитов, гемопоэтических, эндотелиальных, остеогенных клеток, инсулинпродуцирующих и гепатоцитоподобных клеток, адипоцитов, меланоцитов, кератиноцитов, клеток трофобласта и простаты (Gerami-Naini et al., 2004; Fang et al., 2006;

Mitalipov et al., 2006; Schwanke et al., 2006; Shin et al., 2006; Taylor et al., 2006; Byrne et al., 2007; Rajesh et al., 2007). Фундаментальные исследования механизмов регуляции различных гистогенезов на моделях с использованием плюрипотентных клеточных линий дали импульс к развитию технологий получения определенных типов клеток для потенциального клинического применения.

#### ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ПОДДЕРЖАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Как было уже отмечено, плюрипотентные клетки обладают способностью к интенсивной пролиферации, уровень которой сопоставим с таковым у иммортализованных или трансформированных клеток. В работах по изучению механизмов самообновления плюрипотентных клеток различных животных было показано, что регуляция клеточного цикла ЭСК, действительно, имеет ряд особенностей и значительно отличается от цикла нормальных соматических клеток. В

первую очередь необходимо отметить, что ЭСК мыши, приматов и человека более половины всего времени клеточного цикла находятся в S-фазе, а G1- и G2-периоды у них значительно сокращены. Это свидетельствует о том, что регуляция их клеточного цикла осуществляется таким образом, что разделившиеся клетки входят в новый раунд репликации ДНК практически сразу после завершения предыдущего митоза. Однако в отличие от раковых клеток в ЭСК существуют механизмы, которые обеспечивают нормальную чувствительность к факторам дифференцировки и не препятствуют клеточной гибели аномальных клеток (Savatier et al., 1994, 1996; Burdon et al., 2002; Fluckiger et al., 2006; Becker et al., 2006).

Было обнаружено, что на протяжении всего клеточного цикла в ЭСК приматов постоянно присутствуют гиперфосфорилированные формы белка Rb и циклин E (специфические белки для S- и G2/M-фаз), однако в отличие от ЭСК мыши, циклин A не экспрессируется постоянно в ЭСК приматов, а белок Rb не экспрессируется в ЭСК мыши и человека. Анализ транскрипционных профилей ЭСК человека показал, что ген *p53*, а также гены *p16*, *p19* и *p21*, участвующие в регуляции клеточного цикла, не экспрессируются или экспрессируются на низком уровне. Напротив, в ЭСК мыши выявлен высокий уровень экспрессии мРНК этих генов, а также их негативных регуляторов – генов *MDM* (Brandenberger et al., 2004; Miura et al., 2004). Предполагается, что инактивация *p53*- и Rb-зависимых путей все же является необходимым компонентом в регуляции клеточного цикла плюрипотентных клеток различных млекопитающих (Zeng, 2007). Известно, что другой особенностью регуляции митотического цикла ЭСК является независимость и от стимуляции сывороточными факторами, и от сигнального пути киназы митогенактивированной киназы Ras/Raf/MEK (Savatier et al., 1996).

В исследованиях ЭСК приматов было установлено, что  $\gamma$ -облучение не приводит к остановке их клеточного цикла на стадии G1, это говорит об отсутствии у них типичного для нетрансформированных клеток периода G1-checkpoint, необходимого для репарации повреждений в ДНК. В ЭСК мыши, приматов и человека происходит активация регуляторов апоптоза и быстрая элиминация aberrantных клеток с поврежденной ДНК (Burdon et al., 2002; Fluckiger et al., 2006). В генетически поврежденных ЭСК человека выявлены изменения и в биосинтезе гистоновых белков: нарушается транскрипция и процессинг мРНК, дестабилизируется мРНК гистона H4, что препятствует нормальному протеканию митоза (Becker et al., 2007). Существует и альтернативный путь для поврежденных клеток: было показано, что в ЭСК

мыши белок *p53* способен репрессировать активность промотора специфического для плюрипотентных клеток гена *Nanog*, что приводит к индукции необратимой дифференцировки этих клеток и таким образом к удалению их из пула недифференцированных клеток, но не из популяции в целом (Lin et al., 2005).

С другой стороны, известно, что в недифференцированных ЭСК мыши и человека функционируют эффективные механизмы защиты от повреждений, вызванных оксидативным стрессом, и надежные системы репарации ДНК. Невосприимчивость ЭСК к повреждающим воздействиям может обеспечиваться высокой активностью верапамилчувствительного транспортера множественной лекарственной устойчивости, белков теплового шока и систем репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Интересно, что высокая устойчивость ЭСК к активным формам кислорода, формируемая глутатион/тиоредоксиновой системой, существует только в недифференцированных ЭСК и ее эффективность значительно снижается на ранних стадиях дифференцировки (Saretzki et al., 2004, 2008). Результаты анализа транскрипционных профилей линий ЭСК человека свидетельствуют о том, что различные гены, включая *APEX*, *RAD*, *MSH* и *XRCC*, участвующие в регуляции репарации ДНК, экспрессируются на высоком уровне, обеспечивая надежный уровень защиты генетического материала. Тем не менее, сведения о механизмах регуляции клеточного цикла и устойчивости к различным стрессовым воздействиям различных типов плюрипотентных клеток и о их дифференцированных клетках-производных очень ограничены, эти вопросы нуждаются в дальнейших исследованиях.

Несмотря на сходство клеточного цикла ЭСК различных млекопитающих, остается пока неясным, какими механизмами обеспечивается такой уникальный пролиферативный потенциал плюрипотентных клеток у разных видов и разных типов клеточных линий, полученных из разных источников, так как литературные данные по этому вопросу практически отсутствуют. Суммируя вышесказанное, можно предположить, что механизмы, контролируемые активную пролиферацию плюрипотентных клеточных линий в культуре, возможно, все же несколько отличаются от таковых в эмбрионах. Обеспечение высокой скорости деления клеток для появления необходимой клеточной массы является приоритетной задачей на начальных стадиях эмбриогенеза, однако и в этот недолгий период все-таки происходит дифференцировка внезародышевых структур – трофобластической оболочки и внезародышевой энтодермы, т.е. в них отсутствуют механизмы противодействия процессам дифференцировки. Самообновление плю-

рипотентных клеточных линий в культуре *in vitro* продолжается в течение длительного периода, и для сохранения такого статуса клеток необходимы внешние стимулы, которые поддерживают высокий темп делений клеток и одновременно препятствуют дифференцировке. В таких субоптимальных условиях появление генетически измененных клеток при продолжительном культивировании является неизбежным следствием. Вероятно, и при получении постоянных линий плюрипотентных клеток из различных источников происходит отбор таких клеток-инициаторов линии, которые быстрее адаптируются к условиям *in vitro*, быстрее пролиферируют и не успевают реагировать на сигналы к дифференцировке в течение их короткого *G1*-периода. Таким образом, рассматривая адаптацию плюрипотентных клеток к искусственным условиям *in vitro* как процесс минимальной трансформации, можно предположить, что селективным преимуществом в данной системе будут обладать варианты, которые имеют более короткий цикл, низкий уровень чувствительности к факторам дифференцировки и к повреждающим факторам. Другими словами, искусственные условия культивирования *in vitro*, поддерживающие гиперпролиферацию плюрипотентных клеток, и являются теми исходными факторами, которые инициируют генетические и эпигенетические изменения в этих клетках.

#### ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ И ПРОБЛЕМЫ ОНКОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Поддержание стабильности генома плюрипотентных клеток является определяющим фактором их структурно-функциональной целостности, проявляющейся в сохранении нормального баланса между пролиферацией и дифференцировкой в различные типы клеток *in vitro* и *in vivo*. Было установлено, что при продолжительном культивировании в популяции ЭСК накапливаются клетки с различными генетическими aberrациями и эпигенетическими изменениями. Изучение кариотипа различных линий ЭСК человека на поздних пассажах (34–140-е) показало, что в них наблюдается анеуплоидия по хромосомам X, 12 и 17 (Brimble et al., 2004; Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004; Inzunza et al., 2004; Hanson, Caisander, 2005; Maitra et al., 2005; Mitalipova et al., 2005). Предпочтительная трисомия по хромосомам 12 и 17 была выявлена в линиях HUES, H1, H14, BG01 и BG02 (Brimble et al., 2004; Cowan et al., 2004; Lakshminpathy et al., 2004; Mitalipova et al., 2005; Plaia et al., 2005). Трисомия по хромосомам 13 и 3 выявлена в линиях SA002 и Miz-hES13 соответственно

(Heins et al., 2004; Kim et al., 2005; Caisander et al., 2006). Цитогенетический анализ 18 линий ORMES ЭСК приматов с использованием метода G-banding показал, что 15 из них содержат диплоидный набор из 42 хромосом, а в клетках трех линий – ORMES-1, 2 и 5 – присутствуют различные хромосомные аномалии в форме сбалансированных транслокаций 11 : 16, 5 : 19 и 1 : 18; в одном случае выявлена перичентрическая инверсия внутри хромосомы 1. Однако эти aberrации были обнаружены в ЭСК на ранних пассажах (9-й), поэтому вполне возможно, что аномалии имели место исходно в эмбрионах, из которых получены эти линии (Mitalipov et al., 2006). Анеуплоидия была выявлена на ранних пассажах и в одной из семи партеногенетических линий ЭСК человека (кариотип phESC-7, 47, XXX и 48, XXX + 6), раннее появление этой мутации также указывает на ее наследование из половых клеток (Revazova et al., 2007).

Из двух линий ЭСК приматов, полученных с помощью переноса соматических ядер, линия CRES-1 сохраняла нормальный кариотип 42, XY, в то время как в линии CRES-2 на ранних пассажах были обнаружены хромосомные перестройки. В 12% клеток отсутствовала Y-хромосома, а в других клетках была выявлена Y-изохромосома, включающая две дополнительные копии длинного плеча Y-хромосомы (кариотип 41, X[3]/42, Xi(Y)q10[17]) (Byrne et al., 2007).

Необходимо отметить, что тенденция к накоплению хромосомных аномалий имеет место не во всех линиях ЭСК человека и приматов. В некоторых случаях отмечена спорадически возникающая анеуплоидия, которая может и не иметь селективного преимущества, так, например, клетки линии SA002 с трисомией по хромосоме 13 не имели преимущества клонального роста и при дальнейшем пассировании исчезали из популяции (Caisander et al., 2006).

Остается неясным, что является первопричиной появления aberrантных клеток – предрасположенность определенных генотипов к накоплению мутаций с различной скоростью или определенные условия культивирования ЭСК. Так, например, в работе Миталиповой с соавторами (Mitalipova et al., 2005) был проведен анализ кариотипа двух линий ЭСК человека – BG01 и BG02 – на ранних и поздних пассажах с использованием различных техник поддержания культуры: механического разделения колоний на кластеры и энзиматического, с использованием трипсина или коллагеназы. В случае использования ферментативной обработки ЭСК в обеих линиях были обнаружены клетки с трисомией по хромосомам 12 и 17, в некоторых случаях – экстракопии хромосом 14, 20 и X, в то время как при использовании



механического способа никакие аномалии не обнаружены до 105-го пассажа включительно. В других случаях хромосомные нарушения были выявлены и при использовании механического способа пассирования (Buzzard et al., 2004; Caisander et al., 2006) и не обнаружены при использовании энзиматического (Thomson et al., 2008). Можно предположить, что повреждение генетического материала ЭСК также может быть усилено при увеличении раундов криоконсервации и последующего размораживания клеточного материала.

При изучении свойств различных мутантных сублиний ЭСК было показано, что в большинстве случаев не происходит существенных изменений транскрипционных профилей, однако уровень экспрессии некоторых генов может изменяться (Mitalipova et al., 2005; Plaia et al., 2005). Многие авторы отмечают, что ЭСК человека, несущие в геноме экстракопии хромосом 12 и 17, быстро становятся доминантными в популяции, обладая преимущественным ростом и большей клональной эффективностью (Cowan et al., 2004; Enver et al., 2005; Plaia et al., 2005; Herszfeld et al., 2006). Присутствие изохромосомы 12p было ранее обнаружено в некоторых герминативных опухолях половых органов, в том числе и в тератокарциномах человека (Skotheim et al., 2002; Clark et al., 2004; Draper et al., 2004), а амплификация 17q ассоциирована с некоторыми нейробластомами (Westermann, Schwab, 2002). Известно, что на этих хромосомах располагаются гены, контролирующие процессы самообновления и дифференцировки, – *NANOG*, *STELLAR*, *GDF3*, *GRB2*, *STAT3*, изменение в экспрессии которых при дополнительных копиях соответствующих хромосом может оказывать влияние на клеточный потенциал линий ЭСК (Burdon et al., 2002; Clark et al., 2004). В сравнительном исследовании линий ЭСК человека BG01, BG01V и гиперполиплоидной тератокарциномы человека NTERA было показано, что свойства аномальной линии BG01V с трисомией по хромосомам 12 и 17 все же имеют большее сходство с исходной линией BG01, а не с тератокарциномой NTERA. Дифференцировка клеток линии BG01V в экспериментальных тератомах происходила с формированием различных структур экто-, энто- и мезодермального происхождения, однако по сравнению с тератомами линии BG01 было обнаружено значительное число недифференцированных клеток (Plaia et al., 2005).

Подробное исследование генетических изменений в десяти линиях ЭСК человека при продолжительном культивировании показало (22–105-е пассажи), что в восьми линиях из девяти, изученных на поздних пассажах, присутствует одно (или более) генетическое нарушение, которое обычно выявляют в различных раковых клетках (Maitra

et al., 2005). По данным, полученным авторами работы, эти aberrации в ЭСК включают различные изменения в числе копий генов (45%), изменения последовательности митохондриальной ДНК (22%), изменения в уровне метилирования промоторов некоторых генов (90%). Так, в частности, в указанной работе в некоторых линиях ЭСК на поздних пассажах были обнаружены амплификации генных локусов, содержащих онкоген *C-MYC*, которые присутствуют практически во всех видах рака, в том числе и при спонтанной трансформации мезенхимных стволовых клеток костного мозга (Secombe et al., 2004; Miura et al., 2005). Все полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что при продолжительном культивировании во всех линиях ЭСК накапливаются различные генетические повреждения, которые могут оказывать значительное влияние на изменение клеточного фенотипа и приобретение мутантными клетками онкогенных свойств.

#### ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ НОРМАЛЬНОМ И ПАТОЛОГИЧЕСКОМ РАЗВИТИИ

Различные эпигенетические модификации хроматина происходят наряду со структурными изменениями в геноме плюрипотентных линий клеток человека и приматов при длительном поддержании *in vitro*. Эпигенетические изменения хроматина являются ключевыми факторами в регуляции генного импринтинга и экспрессии неимпринтированных генов, в инактивации X-хромосомы и поддержании стабильности генома (Onyango et al., 2002; Jaenisch, Bird, 2003).

Известно, что комплекс различных эпигенетических модификаций в ДНК и в ассоциированных с ней гистоновых белках определяет время активации экспрессии тех или иных генов в клетке. К эпигенетическим модификациям хроматина относят метилирование цитозина ДНК в промоторных областях генов, в повторяющихся последовательностях и импринтированных генах, а также метилирование и ацетилирование гистонов. В большинстве случаев метилирование ДНК в промоторной или дифференциально метилированной области (DMR) приводит к инактивации экспрессии соответствующих генов. Ошибки в структуре метилирования ДНК в клетках приводят к дефектам развития и возникновению различных патологий, включая канцерогенез (Gurp van et al., 1994; Szabo, Mann, 1995; Nonomura et al., 1997; Nakagawa et al., 2001; Takai et al., 2001; Cui et al., 2002; Hernandez et al., 2003; Ulaner et al., 2003; Feinberg, Tycko, 2004). Так, например, установлено, что инактивация генов-супрессоров онкогенеза в некоторых опухолях про-

исходит вследствие гиперметилирования их промоторов и, наоборот, гипометилирование регуляторных областей онкогенов может приводить к их эктопической транскрипции.

Геномный импринтинг – одна из форм эпигенетической программы, включающей модификации различных генных локусов, экспрессия которых в процессе развития и дифференцировки клеток носит моноаллельный характер в соответствии с родительским происхождением того или иного аллеля. Импринтированные гены имеют тенденцию к кластерному расположению в геноме в так называемых импринтинговых центрах. Один из этих центров расположен на хромосоме 15 (15q11-q13) и ассоциирован с синдромами Праде–Вилли и Адельмана, другой – на хромосоме 11 (11p15.5) и связан с возникновением синдрома Беквита–Видельмана (Nicholls, Knepper, 2001; Weksberg et al., 2003; Soejima, Wagstaff, 2005).

В процессе развития метилирование ДНК обеспечивается благодаря скоординированным действиям ферментов семейства ДНК-метилтрансфераз: Dnmt1 и *de novo* ДНК-метилтрансфераз – Dnmt3a и Dnmt3b. Известно, что у человека дефицит DNMT3 приводит к значительному деметилированию центромерных минорных сателлитных повторов, у таких индивидуумов наблюдается редкое генетическое заболевание – синдром ICF (*Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies*) (Okano et al., 1999; Xu et al., 1999).

Изменение профилей метилирования промоторных областей некоторых генов в плюрипотентных клеточных линиях различного происхождения показало, что специфические условия культивирования *in vitro* способны индуцировать изменения в метилировании импринтированных генов, однако не во всех линиях ЭСК человека и приматов и в основном на поздних пассажах (Fujimoto et al., 2005; Rugg-Gun et al., 2005; Sun et al., 2006). Моноаллельная экспрессия импринтированных генов *H19*, *KCNQ1*, *PEG10* и *NDNL1* была обнаружена в линиях ЭСК человека SHhES1 и HUES-7 как на ранних, так и на поздних пассажах, соответствующий статус метилирования импринтированных генов *KCNQ1*, *IGF2*, *SCL22A18*, *NESP55* и *SNRPN* тоже выявлен на ранних и поздних пассажах в линиях H9, H7, HUES-3 и HSF6. При продолжительном культивировании линии H9 было зафиксировано изменение в дифференциально метилированной области гена *H19* без потери гаметических импринтов (Rugg-Gun et al., 2005; Sun et al., 2006). Интересно, что в генетически аномальной линии ЭСК человека BG01V сохранялся нормальный профиль метилирования импринтированных генов *H19*, *SNRPN* и *DLK1/MEG3* (Plaia et al., 2005). В исследовании экспрессии де-

сяти импринтированных генов (*SNRPN*, *IPW*, *KCNQ10T1*, *PEG3*, *IGF2*, *MEST*, *H19*, *NESP55*, *MEG3*, *SCL22A18*) в 59 линиях ЭСК человека было установлено, что в 80% случаев обнаруживается моноаллельная экспрессия указанных генов, а в остальных 20% образцов – экспрессия с другого родительского аллеля или биаллельная экспрессия (Adewumi et al., 2007). Эти данные в целом свидетельствуют о сохранении высокой стабильности статуса метилирования импринтированных генов в линиях ЭСК человека.

С другой стороны, при изучении статуса метилирования и характера экспрессии импринтированных генов в линиях ЭСК приматов была выявлена биаллельная экспрессия генов *IGF2* и *H19* во всех изученных линиях, в то время как гены *SNRPN* и *NDN* сохраняли нормальную экспрессию только отцовского аллеля. Напротив, в бластоцистах макаков резусов, из которых были получены линии ЭСК, детектировали нормальную экспрессию отцовского аллеля гена *IGF2* и материнского аллеля гена *H19*. На основании полученных данных можно предположить, что изменения в статусе метилирования генов *IGF2* и *H19* в ЭСК приматов происходили на начальных этапах получения линий (Mitalipov et al., 2006, 2007).

Как уже было отмечено, изменение в метилировании ДНК неимпринтированных генных локусов во многих случаях ассоциируется с развитием различных видов злокачественных опухолей, поэтому изучение стабильности профиля метилирования онкогенов и генов-супрессоров онкогенеза в разных линиях ЭСК имеет большое значение для понимания эволюции этих линий в процессе длительного поддержания *in vitro* (Burbee et al., 2001). Гиперметилирование ДНК в промоторных областях генов-онкосупрессоров *RASSF1* и *PTPN6* было выявлено при продолжительном культивировании линий ЭСК человека BG01, BG02, BG03, HUES-2, HUES-3, H7, H9, SA001 и SA002, тогда как метилирование промотора гена *TNFRSF10C* обнаружено только в двух из перечисленных линиях – HUES-2 и SA002 (Maitra et al., 2005).

Существование значительной вариабельности уровня экспрессии ДНК-метилтрансферазы DNMT3B в различных линиях ЭСК человека было неоднократно продемонстрировано (Sperger et al., 2003; Bhattacharia et al., 2004; Brandenberger et al., 2004; Rao et al., 2004; Skottman et al., 2005). Возможно, различия в уровне экспрессии и активности этого фермента могут быть основной причиной вариабельности в статусе метилирования и эпигенетической стабильности различных линий плюрипотентных клеток. Известно, что в целом геном ЭСК находится в гипометилированном состоянии, так называемом “статусе транскрипци-

онной готовности” (transcriptional ready state), при этом регуляция экспрессии многих генов, специфических для различных типов клеток, происходит в основном на посттранскрипционном уровне (Ohm et al., 2007).

Как известно, для компенсации избыточной экспрессии генов, расположенных на X-хромосоме, в процессе дифференцировки происходит инактивация одной из X-хромосом в клетках с женским генотипом вследствие метилирования ДНК, гистоновой модификации и экспрессии некодирующей мРНК гена *XIST*. В ряде работ было установлено, что в различных линиях ЭСК с женским генотипом экспрессия *XIST*, свидетельствующая об инактивации X-хромосомы, значительно варьирует и в недифференцированных, и в дифференцированных клетках (Sperger et al., 2003; Hoffman et al., 2005; Adewumi et al., 2007). Примечательно, что на ранних пассажах в недифференцированных клетках эуплоидной линии ЭСК человека H7 была обнаружена мРНК гена *XIST*, которая исчезала на поздних пассажах, а в анеуплоидной сублинии этой же линии не детектировали экспрессию *XIST* даже в дифференцированных клетках (Enver et al., 2005). Причины такой гетерогенности в различных линиях ЭСК неизвестны. Предположительно это может быть связано со статусом инактивации X-хромосомы в клетках внутренней клеточной массы эмбрионов, из которых получены линии, или является следствием влияния условий культивирования *in vitro*.

Таким образом, эпигенетические модификации, обнаруженные в различных линиях ЭСК человека и приматов, происходят в процессе адаптации к условиям культивирования на разных пассажах в индивидуальных клетках одной линии. Эти изменения, как и генетические аберрации, могут вносить вклад в создание нестабильности генома и способствовать переходу клеток в трансформированное состояние.

Многочисленные постоянные линии плюрипотентных стволовых клеток человека и приматов, полученные из различных источников и с помощью различных методов, демонстрируют значительное сходство основных биологических свойств, однако имеют и индивидуальные различия, причины которых пока остаются неясными. За десять лет интенсивных исследований стабильности различных линий ЭСК было установлено, что независимо от происхождения линий в процессе их длительного культивирования *in vitro* происходит накопление хромосомных и генных мутаций, возникают эпигенетические модификации, которые могут приводить к онкогенной трансформации клеточной линии. Вместе с тем накоплены экспериментальные данные и разра-

ботаны технологические подходы, позволяющие проводить оценку потенциала к самообновлению и дифференцировке плюрипотентных клеточных линий. Общеизвестно, что для поддержания стабильности линий необходим постоянный мониторинг кариотипа и эпигенетического профиля линий, выявление генных мутаций, ассоциированных с канцерогенезом.

Несомненно, корректные исследования фундаментальных механизмов, регулирующих пролиферацию и специализацию плюрипотентных клеток в различные клеточные типы, требует валидации основных клеточных параметров в модельных линиях. Это справедливо и в случае использования ЭСК в качестве тест-систем для изучения эффективности и токсичности новых фармакологических препаратов.

В контексте клинического применения линий плюрипотентных стволовых клеток сохранение генетической и эпигенетической стабильности имеет первостепенное значение для создания безопасных и эффективных клеточных технологий. В связи с высоким риском канцерогенеза пока остается под вопросом перспективность клинического использования линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, несмотря на относительно простой способ получения линий, специфичных для пациента. В настоящий момент также трудно говорить о реальных перспективах применения в ближайшем будущем линий ЭСК, полученных с помощью технологии переноса соматического ядра в ооцит. Тем не менее в свете данных, приведенных в обзоре, совершенно очевидно, что одной из основных задач при создании и использовании постоянных линий плюрипотентных стволовых клеток является установление закономерностей эволюции клеточных линий с различными генотипами и разработка технологий, обеспечивающих их стабильность при длительном поддержании в культуре *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Красникова Н.Ю., Ларионова А.В. и др. Анализ экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и первичных половых клеток, в линиях эмбриональных стволовых клеток человека и мыши // ДАН. 2006. Т. 406. № 6. С. 835–839.
- Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative // Nat. Biotech. 2007. V. 25. P. 803–816.
- Allegrucci C., Young L.E. Differences between human embryonic stem cell lines // Hum. Repr. Update. 2007. V. 13. № 2. P. 103–120.
- Andrews P.W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells // Philos. Trans. R. Soc. L. B. Biol. Sci. 2002. V. 357. P. 405–417.

- 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.
- Becker K.A., Stein J.L., Lian J.B. et al.* Establishment of histone gene regulation and cell cycle checkpoint control in human embryonic stem cells // *Ibid.* 2007. V. 210. P. 517–526.
- Bhattacharia B., Miura T., Brandenberger R. et al.* Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature // *Blood*. 2004. V. 103. № 8. P. 2956–2961.
- Bigdeli N., Andersson M., Strehl R. et al.* Adaptation of human embryonic stem cells to feeder-free and matrix-free culture conditions directly on plastic surfaces // *J. Biotechnol.* 2008. V. 133. № 1. P. 146–153.
- Brandenberger R., Khrebtukova I., Thies R.S. et al.* MPSS profiling of human embryonic stem cells // *BMC Devel. Biol.* 2004. V. 4. P. 1–16.
- Brimble S.N., Zeng X., Weiler D.A. et al.* Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001 // *Stem Cells Devel.* 2004. V. 13. P. 585–597.
- Burbee D.G., Forgacs E., Zochbauer-Muller S. et al.* Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression // *J. Natl. Cancer Inst.* 2001. V. 93. P. 691–699.
- Burdon T., Smith A., Savatier P.* Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells // *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. P. 432–438.
- Buzzard J.J., Gough N.M., Crook J.M., Colman A.* Karyotype of human ES cells during extended culture // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 381–382.
- Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L. et al.* Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer // *Nature*. 2007. V. 450. P. 497–505.
- Caisander G., Park H., Frej K. et al.* Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged *in vitro* culture // *Chromosome Res.* 2006. V. 14. P. 131–137.
- Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B. et al.* Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates // *Science*. 2002. V. 295. P. 819.
- Clark A.T., Rodrigues R.T., Bodnar M.S. et al.* Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma // *Stem Cells*. 2004. V. 22. P. 169–179.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 50. P. 1353–1356.
- Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K.* Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // *Science*. 2005. V. 309. P. 1369–1373.
- Cui H., Onyango P., Brandenburg S. et al.* Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2 // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 6442–6446.
- Dighe V., Clepper L., Pedersen D. et al.* Heterozygous embryonic stem cell lines derived from nonhuman primate parthenotes // *Stem Cells*. 2008. P. 26. P. 756–766.
- Draper J.S., Smith K., Gokhale P. et al.* Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 53–54.
- Enver T., Soneji S., Joshi C. et al.* Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. P. 3129–3140.
- Fang D., Leishear K., Nguyen T.K. et al.* Defining the conditions for the generation of melocytes from human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1668–1677.
- Feinberg A.P., Tycko B.* The history of cancer epigenetics // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. V. 4. P. 143–153.
- Fluckiger A.C., Marcy G., Marchand M. et al.* Cell cycle features of primate embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 547–556.
- French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. et al.* Development of human cloned blastocysts following somatic nuclear transfer (SCNT) with adult fibroblast // *Ibid.* 2008. V. 26. P. 485–493.
- Fujimoto A., Mitalipov S.M., Clepper L.L., Wolf D.P.* Development of a monkey model for the study of primate genomic imprinting // *Mol. Hum. Reprod.* 2005. V. 11. P. 413–422.
- Gerami-Naini B., Dovzhenk O.V., Durning M. et al.* Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells // *Endocrinology*. 2004. V. 145. P. 1517–1524.
- Gordeeva O.F.* Pluripotent cells in embryogenesis and in teratoma formation // *Stem cells and cancer* / Ed. Parsons D.W. N.Y.: Nova Sci. Publ. Ink., 2007. P. 62–85.
- Gurp R.J. van, Oosterhuis J.W., Kalscheuer V. et al.* Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors // *J. Natl. Cancer Inst.* 1994. V. 86. P. 1070–1075.
- Hanson C., Caisander G.* Human embryonic stem cells and chromosome stability // *Apmis*. 2005. V. 113. P. 751–755.
- Heins N., Englund M.C., Sjoblom C. et al.* Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2004. V. 22. P. 367–376.
- Hernandez L., Kozlov S., Piras G., Stewart C.L.* Paternal and maternal genomes confer opposite effects on proliferation, cell-cycle length, senescence, and tumor formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 13344–13349.
- Herszfeld D., Wolvetang E., Langton-Bunker E. et al.* CD30 is a survival factor and a biomarker for transformed human pluripotent stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 351–357.
- Hoffman L.M., Hall L., Batten J.L. et al.* X-inactivation status varies in human embryonic stem cell lines // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 1468–1478.
- Hovatta O., Mikkola M., Gertow K. et al.* A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells // *Hum. Reprod.* 2003. V. 18. P. 1404–1409.
- Hsiao L.L., Dangond F., Yoshida T. et al.* A compendium of gene expression in normal human tissues // *Physiol Genomics*. 2001. V. 7. P. 97–104.

- Inzunza J., Sahlen S., Holmberg K. et al.* Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation // *Mol. Hum. Reprod.* 2004. V. 10. P. 461–466.
- Jaenisch R., Bird A.* Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. P. 245–254.
- Kim S.J., Lee J.E., Park J.H. et al.* Efficient derivation of new human embryonic stem cell lines // *Mol. Cells.* 2005. V. 19. P. 46–53.
- Klimanskaya I., Chung Y., Becker S. et al.* Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres // *Nature.* 2006. V. 444. № 7118. P. 481–485.
- Lakshminath U., Pelacho B., Sudo K. et al.* Efficient transfection of embryonic and adult stem cells // *Stem Cells.* 2004. V. 22. P. 531–543.
- Lin T., Chao C., Saito S. et al.* p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. P. 165–171.
- Lin G., OuYang Q., Zhou X. et al.* A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following *in vitro* fertilization procedure // *Cell Res.* 2007. V. 17. № 12. P. 999–1007.
- Maherali N., Sridharan R., Xie W. et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodelling and widespread tissue contribution // *Cell Stem Cell.* 2007. V. 1. P. 55–70.
- Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al.* Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. P. 1099–1103.
- Mitalipov S., Kuo H.C., Byrne J. et al.* Isolation and characterization of novel rhesus monkey embryonic stem cell lines // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 2177–2186.
- Mitalipov S., Clepper L., Sritanaudomchai H. et al.* Methylation status of imprinting centers for H19/IGF2 and SNURF/SNRPN in primate embryonic stem cells // *Ibid.* 2007. V. 25. P. 581–588.
- Mitalipova M.M., Rao R.R., Hoyer D.M. et al.* Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 19–20.
- Miura T., Luo Y., Khrebtukova I. et al.* Monitoring early differentiation events in human embryonic stem cells by massively parallel signature sequencing and expressed sequence tag scan // *Stem Cells Devel.* 2004. V. 13. P. 694–715.
- Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H.M. et al.* Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation // *Stem Cells.* 2005. V. 24. P. 1095–1103.
- Nakagawa H., Chadwick R.B., Peltomaki P. et al.* Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 591–596.
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K. et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts // *Nat. Biotech.* 2008. V. 26. P. 101–106.
- Nakatsuji N., Suemori H.* Embryonic stem cell lines of non-human primates // *Sci. W. J.* 2002. V. 2. P. 1762–1773.
- Nicholls R.D., Knepper J.L.* Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001. V. 2. P. 153–175.
- Nonomura N., Miki T., Nishimura K. et al.* Altered imprinting of the H19 and insulin-like growth factor II genes in testicular tumors // *J. Urol.* 1997. V. 157. P. 1977–1979.
- Ohm J.E., McGarvey K.M., Yu X. et al.* A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 237–242.
- Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development // *Cell.* 1999. V. 99. № 3. P. 247–257.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S.* Generation of germ-line competent induced pluripotent stem cells // *Nature.* 2007. V. 448. P. 313–317.
- Onyango P., Jiang S., Uejima H. et al.* Monoallelic expression and methylation of imprinted genes in human and mouse embryonic germ cell lineages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 10599–10604.
- Plaia T.W., Josephson R., Liu Y. et al.* Characterization of a new NIH registered variant human embryonic stem cell line BG01V: a tool for human embryonic stem cell research // *Stem Cells.* 2005. V. 24. P. 531–546.
- Przyborski S.A.* Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice // *Ibid.* 2005. V. 2. P. 1242–1250.
- Rajesh D., Chinnasamy N.M., Mitalipov S.M. et al.* Differential requirements for hematopoietic commitment between human and rhesus embryonic stem cells // *Ibid.* 2007. V. 25. P. 490–499.
- Rao R.R., Calhoun J.D., Qin X. et al.* Comparative transcriptional profiling of two human embryonic stem cell lines // *Biotech. Bioengin.* 2004. V. 88. № 3. P. 273–286.
- Revazova E.S., Turovets N.A., Kochetkova O.D. et al.* Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts // *Cloning Stem Cells.* 2007. V. 9. № 3. P. 432–449.
- Rosler E.S., Fisk G.J., Ares X. et al.* Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions // *Devel. Dyn.* 2004. V. 229. P. 259–274.
- Rugg-Gunn P.J., Ferguson-Smith A.C., Pedersen R.A.* Epigenetic status of human embryonic stem cells // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. P. 585–587.
- Saretzki G., Armstrong L., Leake A. et al.* Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells // *Stem Cells.* 2004. V. 22. P. 962–971.
- Saretzki G., Walter T., Atkinson S. et al.* Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells // *Ibid.* 2008. V. 26. P. 455–464.
- Savatier P., Huang S., Szekely L. et al.* Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts // *Oncogene.* 1994. V. 9. P. 809–818.

- Savatier P., Lapillonne H., Grunsven van 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 // *Ibid.* 1996. V. 12. P. 309–322.
- Schwanke K., Wunderlich S., Reppel M. et al.* Generation and characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem cells // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 1423–1432.
- Secombe J., Pierce S.B., Eisenman R.N.* Myc: a weapon of mass destruction // *Cell.* 2004. V. 117. P. 153–156.
- Shablott M.J., Axelman J., Wang S. et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 13726–13731.
- Shin S., Mitalipova M., Noggle S. et al.* Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 125–138.
- Skotheim R.I., Monni O., Mousses S. et al.* New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 2359–2364.
- Skottman H., Mikkola M., Lundin K. et al.* Gene expression signatures of seven individual human embryonic stem cell lines // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 1343–1356.
- Soejima H., Wagstaff J.* Imprinting centers, chromatin structure, and disease // *J. Cell Biochem.* 2005. V. 95. P. 226–233.
- Sperger J.M., Chen X., Draper J.S. et al.* Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 13350–13355.
- Strelchenko N., Verlinsky O., Kukharensko V., Verlinsky Y.* Morula-derived human embryonic stem cells // *Reprod. Biomed. Online.* 2004. V. 9. № 6. P. 623–629.
- Suemori H., Tada T., Torii R. et al.* Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI // *Devel. Dyn.* 2001. V. 222. P. 273–279.
- Sun B.W., Yang A.C., Feng Y. et al.* Temporal and parental-specific expression of imprinted genes in a newly derived Chinese human embryonic stem cell line and embryoid bodies // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. P. 65–75.
- Szabo P.E., Mann J.R.* Biallelic expression of imprinted genes in the mouse germ line: implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting // *Genes Devel.* 1995. V. 9. P. 1857–1868.
- Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* 2006. V. 126. P. 663–676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki V. et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Ibid.* 2007. V. 131. P. 861–872.
- Takai D., Gonzales F.A., Tsai Y.C. et al.* Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 2619–2626.
- Taylor R.A., Cowin P.A., Cunha G.R. et al.* Formation of human prostate tissue from embryonic stem cells // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. P. 179–181.
- Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G. et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 7844–7848.
- 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.
- Thomson A., Wojtacha D., Hewitt Z. et al.* Human embryonic stem cells passaged using enzymatic methods retain a normal karyotype and express CD30 // *Cloning Stem Cells.* 2008. V. 10. № 1. P. 89–106.
- Ulaner G.A., Vu T.H., Li T. et al.* Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. P. 535–549.
- 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.
- Vrana K.E., Hipp J.D., Goss A.M. et al.* Nonhuman primate parthenogenetic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. Suppl. 1. P. 11911–11916.
- Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M. et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei // *Nature.* 1998. V. 394. P. 369–374.
- Wakayama S., Ohta H., Kishigami S. et al.* Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell lines from different mouse strains and tissues // *Biol. Reprod.* 2005. V. 72. P. 932–936.
- Weksberg R., Smith A.C., Squire J., Sadowski P.* Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. P. 61–68.
- Westermann F., Schwab M.* Genetic parameters of neuroblastomas // *Cancer Lett.* 2002. V. 184. P. 127–147.
- Xu G.L., Bestor T.H., Bourc'his D. et al.* Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene // *Nature.* 1999. V. 402. P. 187–191.
- Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 10. P. 971–974.
- Xu C., Jiang J., Sottile V. et al.* Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth // *Stem Cells.* 2004. V. 22. P. 972–980.
- Xu C., Rosler E., Jiang J. et al.* Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium // *Ibid.* 2005. V. 23. P. 315–323.
- Yu J., Vodyanik M., Smuga-Otoo K. et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // *Science.* 2007. V. 318. P. 1917–1920.
- Zeng X.* Human embryonic stem cells: mechanisms to escape replicative senescence? // *Stem Cell Rev.* 2007. V. 3. P. 270–279.

## Pluripotent Stem Cells: Maintenance of Genetic and Epigenetic Stability and Prospects of Cell Technologies

O. F. Gordeeva<sup>a</sup> and Sh. M. Mitalipov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: olgagordeeva@yandex.ru*

<sup>b</sup> *Oregon National Primate Research Center, Oregon Health and Science University, 505 N.W. 185th Avenue, Beaverton, OR 97006-3448 United States  
e-mail: mitalipo@ohsu.edu*

**Abstract**—Permanent lines of pluripotent stem cells can be obtained from humans and monkeys using different techniques and from different sources—inner cell mass of the blastocyst, primary germ cells, parthenogenetic oocytes, and mature spermatogonia—as well as by transgenic modification of various adult somatic cells. Despite different origin, all pluripotent lines demonstrate considerable similarity of the major biological properties: active self-renewal and differentiation into various somatic and germ cells in vitro and in vivo, similar gene expression profiles, and similar cell cycle structure. Ten years of intense studies on the stability of different human and monkey embryonic stem cells demonstrated that, irrespective of their origin, long-term in vitro cultures lead to the accumulation of chromosomal and gene mutations as well as epigenetic changes that can cause oncogenic transformation of cells. This review summarizes the research data on the genetic and epigenetic stability of different lines of pluripotent stem cells after long-term in vitro culture. These data were used to analyze possible factors of the genome and epigenome instability in pluripotent lines. The prospects of using pluripotent stem cells of different origin in cell therapy and pharmacological studies were considered.

*Key words:* embryonic stem cells, cloning, pluripotent stem cells, chromosomal abnormalities, epigenetic changes, differentiation, DNA methylation, cell cycle, carcinogenesis, cell therapy, primates.