

УДК 611-013;57.086.835;577.218

НИЗКАЯ ЭКСПРЕССИЯ АКТИВИНА А В НУЛЛИПОТЕНТНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

© 2014 г. 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 01.03.14 г.

Окончательный вариант получен 10.03.14

Факторы семейства TGF β играют важную роль в регуляции самообновления и дифференцировки плюрипотентных стволовых и эмбриональных тератокарциномных клеток мыши и человека. Паттерны экспрессии сигнальных лигандов семейства TGF β и функциональная роль этих сигнальных путей значительно различаются в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека, однако активность и функциональная роль этих факторов в эмбриональных тератокарциномных клетках исследованы недостаточно. Сравнительный количественный ПЦР-анализ экспрессии факторов семейства TGF β в эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и эмбриональных тератокарциномных клетках мыши показал, что в эмбриональные тератокарциномные клетки экспрессируют более низкий уровень *ActivinA*, чем плюрипотентные стволовые клетки, но сходные уровни экспрессии факторов *Nodal*, *Lefty1*, *TGF β 1*, *BMP4* и *GDF3*. В нуллипотентных эмбриональных тератокарциномных клетках человека PA-1 большинство факторов семейства TGF β (*ACTIVINA*, *NODAL*, *LEFTY1*, *BMP4* и *GDF3*) экспрессируется на более низком уровне, чем в эмбриональных стволовых клетках человека. Таким образом, в нуллипотентных эмбриональных тератокарциномных клетках мыши и человека значительно снижена экспрессия *ActivinA* по сравнению с эмбриональными стволовыми клетками. Предположительно, эти различия могут быть связаны с изменением функциональной активности соответствующих сигнальных путей и дерегуляции пролиферативных и антипролиферативных механизмов в эмбриональных тератокарциномных клетках.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, тератокарцинома, плюрипотентность, *ActivinA*, сигнальные пути TGF β .

DOI: 10.7868/S0475145014040053

Баланс процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток является основой гомеостаза самообновляющихся тканей. Нарушения механизмов, контролирующих самообновление и дифференцировку в стволовых клетках, вследствие различных мутаций могут приводить к их функциональным нарушениям или онкогенной трансформации в раковые стволовые клетки (Caisander et al., 2006; Gore et al., 2011; Novatta et al., 2010; Urbach et al., 2009). Потенциально плюрипотентные стволовые клетки в эмбрионе, как и мультипотентные стволовые клетки во взрослых тканях, могут трансформироваться в опухолевые стволовые клетки при различных генетических и эпигенетических перестройках. Ранее опухолевые аналоги плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих – линии эмбриональных тератокарциномных клеток (ЭТК) – были выделены из тератом и тератокарцином у

разных млекопитающих и человека (Andrews et al., 1984; Andrews et al., 1985; Andrews, 1988; Martin et al., 1975; Zeuthen et al., 1980). По сравнению с плюрипотентными стволовыми клетками ЭТК имеют ограниченный потенциал к дифференцировке *in vitro* и при развитии в химерных эмбрионах, в то время как пролиферативный потенциал недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток и ЭТК сходен (Гордеева и др., 2009; Andrews et al., 1984; Andrews et al., 1985; Andrews, 1988; Papaioannou et al., 1978; Rossant et al., 1982). Таким образом, в ЭТК происходит дерегуляция пролиферативных и антипролиферативных сигнальных и регуляторных механизмов, нарушающая их дифференцировку.

Известно, что плюрипотентные стволовые клетки млекопитающих могут находиться в разных фазах плюрипотентного статуса – базовом и первичном статусах плюрипотентности (naïve/ground

and primed states) (Nichols et al., 2009). Так, полученные из бластоцист эмбриональные стволовые клетки мыши и человека (мЭСК и чЭСК) в процессе адаптации *in vitro* стабилизируются в разных состояниях – в базовом и первичном статусе плюрипотентности. Механизмы сигнальной регуляции клеток в базовом и первичном статусах плюрипотентности значительно различаются, так как для поддержания самообновления мЭСК и чЭСК необходимы различные системы культивирования, включающие разные наборы сигнальных факторов (Лифанцева и др., 2013; Brons et al., 2007; Eiselleova et al., 2009; Na et al., 2010; Smith et al., 1988; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2005; Xu et al., 2001). Предыдущие исследования показали, что поддержание *in vitro* недифференцированных мЭСК и чЭСК достигается с помощью различных схем регуляций ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 и BMP/Smad1/5/8 эндогенных ветвей TGF β сигналинга (Greber et al., 2007; Greber et al., 2008; Na et al., 2010; Vallier et al., 2005). Необходимость экзогенной стимуляции или ингибирования этих сигнальных путей обусловлена различиями в паттернах эндогенной экспрессии факторов семейства TGF β и FGF2 в мЭСК и чЭСК (Лифанцева и др., 2013). В то же время статусы ЭТК мыши и человека (мЭТК и чЭТК) лишь частично соответствуют статусам их нормальных клеток-прототипов – ЭСК (Гордеева и др., 2011), а системы поддержания мЭТК и чЭТК не различаются. В свете полученных данных о роли паттернов эндогенной экспрессии факторов семейства TGF β в поддержании разных статусов плюрипотентности нормальных ЭСК встает вопрос о том, какие изменения в экспрессии факторов семейства TGF β в мЭТК и чЭТК могут оказывать влияние на изменение их потенциала к дифференцировке, а также существуют ли различия в паттернах экспрессии факторов семейства TGF β в мЭТК и чЭТК, по аналогии с их нормальными клетками-аналогами. Поскольку эти вопросы практически не исследованы, был проведен сравнительный количественный анализ экспрессии факторов семейства TGF β в ЭСК и ЭТК мыши и человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. В работе были использованы линии мЭСК R1 и мЭГК EGC-10 любезно предоставленные А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). Линия чЭСК ESM01 была любезно предоставлена Г.П. Георгиевым и С.Л. Киселевым (Институт биологии гена РАН, Москва). Линии мЭТК F9 и P19, а также чЭТК PA-1 были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

ЭСК и ЭГК мыши культивировали в среде DMEM, содержащей 1 mM L-глутамин, 0.1 mM заменимых аминокислот (“HyClone”, США), 0.1 mM β -меркаптоэтанола (“Sigma”, США) и 15% заменителя фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, “Gibco”, США) и фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл, “Sigma”). Недифференцированные чЭСК ESM01 поддерживали на фидере из эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ), инактивированных митомицином С (“Sigma”), в среде такого же состава, как и для мЭСК, но с добавлением основного фактора роста фибробластов человека (bFGF, 10 нг/мл, “Invitrogen”, США) вместо LIF. Линии ЭТК мыши и человека культивировали в той же среде, что и ЭСК, но без добавления факторов роста.

Анализ генной экспрессии. Анализ экспрессии факторов семейства TGF β в плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клетках мыши и человека проводили с помощью ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Тотальную РНК выделяли из клеток, используя Trizol (“Invitrogen”) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (ThermoScientific, США). Все образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”, США) для предотвращения контаминации геномной ДНК. Для синтеза кДНК-библиотек использовали 1 мкг тотальной РНК каждого образца. Синтез кДНК библиотек проводили с использованием обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase M-MuLV и олиго (dT)₁₈ праймеров (“Fermentas”, Литва).

Количественный РВ-ПЦР анализ генной экспрессии проводили на амплификаторе “Applied Biosystems 7500” (США) с использованием набора для проведения РВ-ПЦР с красителем EvaGreen (“Синтол”, Россия) по следующему протоколу: предварительная денатурация: 94°C – 5 мин; отжиг праймеров и элонгация: 61°C – 1 мин; денатурация: 94°C – 15 с, 40 циклов. Для анализа были использованы праймеры, которые были сконструированы ранее на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank и Ensemble (табл. 1 и 2). Каждый эксперимент был проведен в трех повторах. Уровень экспрессии генов в каждом образце нормализовали к уровню экспрессии гена гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы (*Hprt/HPRT*). Для анализа относительных уровней экспрессии генов использовали программу ABI Relative Quantification Study software (Applied Biosystems, США). При анализе относительных уровней экспрессии генов семейства факторов TGF β в каждом типе клеток уровень экспрессии гена *Hprt/HPRT* принимали за одну относительную единицу, а уровень экспрессии всех остальных генов в образце рассчитывали по

Таблица 1. Структура праймеров для РВ-ПЦР-анализа генной экспрессии в мЭСК, мЭГК и мЭТК

Ген	№ Последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>ActivinA</i>	NM_002192	5'tggagcagacctcgagatcatcac3' 5'tggctcctgggtctgttagccttgg3'	160
<i>Nodal</i>	NM_013611	5'gagtggtcctaacacctgtg3' 5'atgctcagtggtctgtg3'	136
<i>Lefty1</i>	NM_010094	5'tgtgtgctctttgcttcctctg3' 5'gcagtgaacaatatgaaggacagag3'	123
<i>Tgfb1</i>	NM_011577	5'caattcctggcgttaccttgg3' 5'ccctgtattccgtctccttgg3'	120
<i>Bmp4</i>	NM_007554	5'tctggtctccgtccctgatg3' 5'cgctccgaatggcactacg3'	175
<i>Gdf3</i>	NM_008108	5'gatgagtgtgggtgtgggtag3' 5'gtccgattcaagagagcataagc3'	109
<i>Hprt</i>	NM_013556	5'cgttgggcttacctcactgttct3' 5'ggtcataacctggtcatcatcgctaact3'	150

Таблица 2. Структура праймеров, используемых для РВ-ПЦР-анализа в чЭСК и чЭТК

Ген	№ Последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>ACTIVINA</i>	NM_002192	5'aggcagaaatgaatgaacttatgg5' 5'gaggcggatgggtgactttgg5'	198
<i>NODAL</i>	NM_018055	5'tcaactgtgtcggaggcaag3' 5'tcgtggggctggtaacg3'	190
<i>LEFTY1</i>	NM_020997	5'tcattgttactgtcctgtcactg3' 5'agctttattatctggattggggatgc3'	116
<i>TGFβ1</i>	NM_000660	5'tggacatcaacgggttcactac3' 5'gcacgcagcagttctctcc3'	186
<i>BMP4</i>	NM_001202 NM_130850 NM_130851	5'tgagtgccatctccatgctgta3' 5'cggcaccacatccctactacta3'	91
<i>GDF3</i>	NM_020634	5'cttcgcttctcccagaccaag3' 5'gccaatgtcaactgttcccttct3'	128
<i>HPRT</i>	NM_000194.2	5'aagatgggtcaaggctgcaagc3' 5'gaagtattcattatagtaaggcatatcc3'	132

формуле $2^{-\Delta Ct} \pm SE$. Относительные уровни экспрессии генов семейства TGFβ в разных линиях по отношению к ЭСК рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования механизмов, вовлеченных в регуляцию нормального и патологического развития плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих, в плюрипотентных стволовых клетках и ЭТК мыши и человека был проведен анализ экспрессии генов семейства факторов TGFβ, которые являются ключевыми регуляторами баланса пролиферации и дифференцировки плюрипо-

тентных и мультипотентных стволовых клеток (Dreesen et al., 2007; Niwa, 2007; Oshimori et al., 2012). РВ-ПЦР-анализ экспрессии генов *ActivinA*, *Nodal*, *Lefty1*, *Tgfβ1*, *Bmp4* и *Gdf3* в мЭСК R1, мЭГК EGC-10 и опухолевых мЭТК F9 и P19 выявил сходства и различия в уровнях экспрессии изучаемых генов в плюрипотентных клетках (рис. 1, 2). В целом, профили экспрессии факторов *Nodal*, *Lefty1*, *Tgfβ1*, *Bmp4*, *Gdf3* для всех изучаемых клеток были сходными, за исключением выявленных значительных различий в экспрессии *ActivinA*. Ранее нами было обнаружено, что экспрессия *ActivinA* также резко снижается в дифференцирующихся эмбрионидных телах, формируемых плюрипотентными мЭСК и мЭГК (Гордеева и др., 2009; Ли-

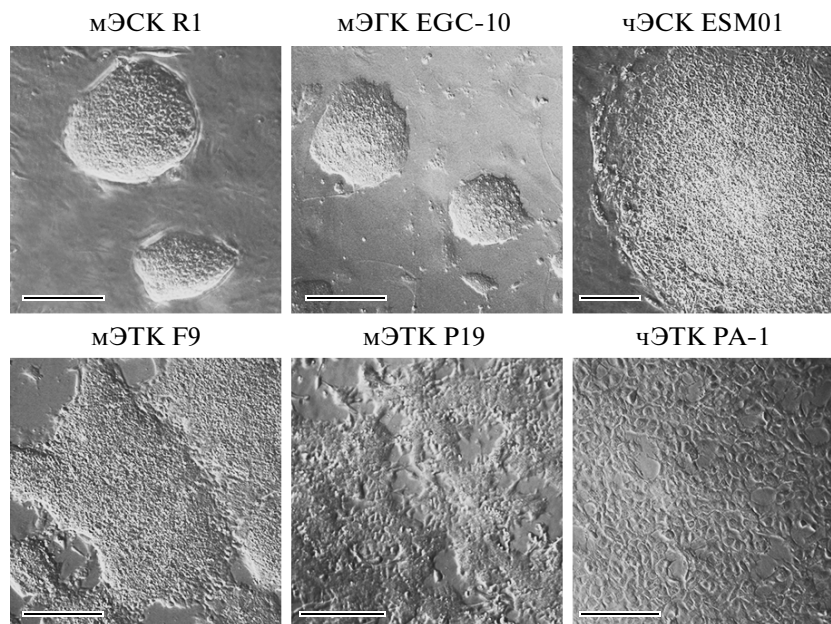


Рис. 1. Линии плюрипотентных стволовых (мЭСК R1, мЭГК EGC-10, чЭСК ESM01) и тератокарциномных клеток (мЭТК F9 и P19, чЭТК PA-1) мыши и человека.

фанцева и др., 2013). При этом изменения экспрессии сигнальных факторов и специфических транскрипционных факторов *Oct4* и *Nanog* находились в строгой корреляции друг с другом. Это свидетельствует о том, что изменение экспрессии *ActivinA* является ранним событием в ходе спонтанной дифференцировки мЭСК и мЭГК, так как наблюдается прямая корреляция между уровнями экспрессии генов *ActivinA* и *Oct4*. Напротив, в мЭТК F9 изменения уровней экспрессии *ActivinA* и *Oct4* не коррелировали, что указывает на независимость регуляции их самообновления от фактора *ActivinA*, как и фактора *LIF* (Гордеева и др., 2009). Следует отметить, что нуллипотентные мЭТК F9 экспрессировали *ActivinA* на значительно более низком уровне, чем плюрипотентные стволовые клетки, а также мЭТК P19, которые все же способны к ограниченной спонтанной дифференцировке. Учитывая значительные изменения уровней экспрессии *ActivinA* в процессе дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток мыши, а также низкие уровни экспрессии в мЭТК, можно предположить, что активность эндогенного сигналинга ветви *ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3* важна не для поддержания плюрипотентного статуса, как в плюрипотентных стволовых клетках человека (Vallier et al., 2005), а скорее для инициации ранних событий дифференцировки. С другой стороны, экспрессия *ActivinA* необходима для поддержания стволовых клеток эпибласта мыши (Vallier et al., 2009), что косвенно подтверждает роль этого фактора в регуляции баланса активностей различных ветвей

сигнальных путей факторов *TGF β* по мере вступления в дифференцировку.

Сравнительный количественный анализ экспрессии факторов семейства *TGF β* в чЭСК ESM01 и чЭТК PA-1 обнаружил существенные различия в уровнях экспрессии большинства генов (рис. 1, 3). В отличие от мЭТК, в чЭТК были выявлены более низкие уровни экспрессии генов *ACTIVINA*, *NODAL*, *LEFTY1*, *BMP4* и *GDF3* по сравнению с плюрипотентными чЭСК. В то же время в чЭТК уровень экспрессии гена *TGF β 1* был выше в 3 раза по сравнению с чЭСК. Однако такие различия в экспрессии *TGF β 1* могут и не иметь принципиального значения, т.к. ранее сходные различия (в 2.7 раза) в экспрессии этого гена были выявлены в плюрипотентных чЭСК линий SC5 и ESM01 (Лифанцева и др., 2013). На основании полученных данных можно предположить, что в чЭТК, как и в мЭТК, пониженные уровни экспрессии факторов семейства *TGF β* могут приводить к снижению активности соответствующих сигнальных путей.

Известно, что факторы *ActivinA* и *Nodal* играют важную роль в поддержании самообновления плюрипотентных чЭСК (Greber et al., 2008; Na et al., 2010; Vallier et al., 2005), однако они важны и для регуляции их дифференцировки (Greber et al., 2008; Smith et al., 2008). Было выдвинуто предположение о том, что для самообновления чЭСК необходима активность сигнальных путей *ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3* для контрбаланса сигнальных путей *BMP/Smad1/5/8*, стимулирующих дифференцировку (Greber et al., 2008; Vallier et al.,

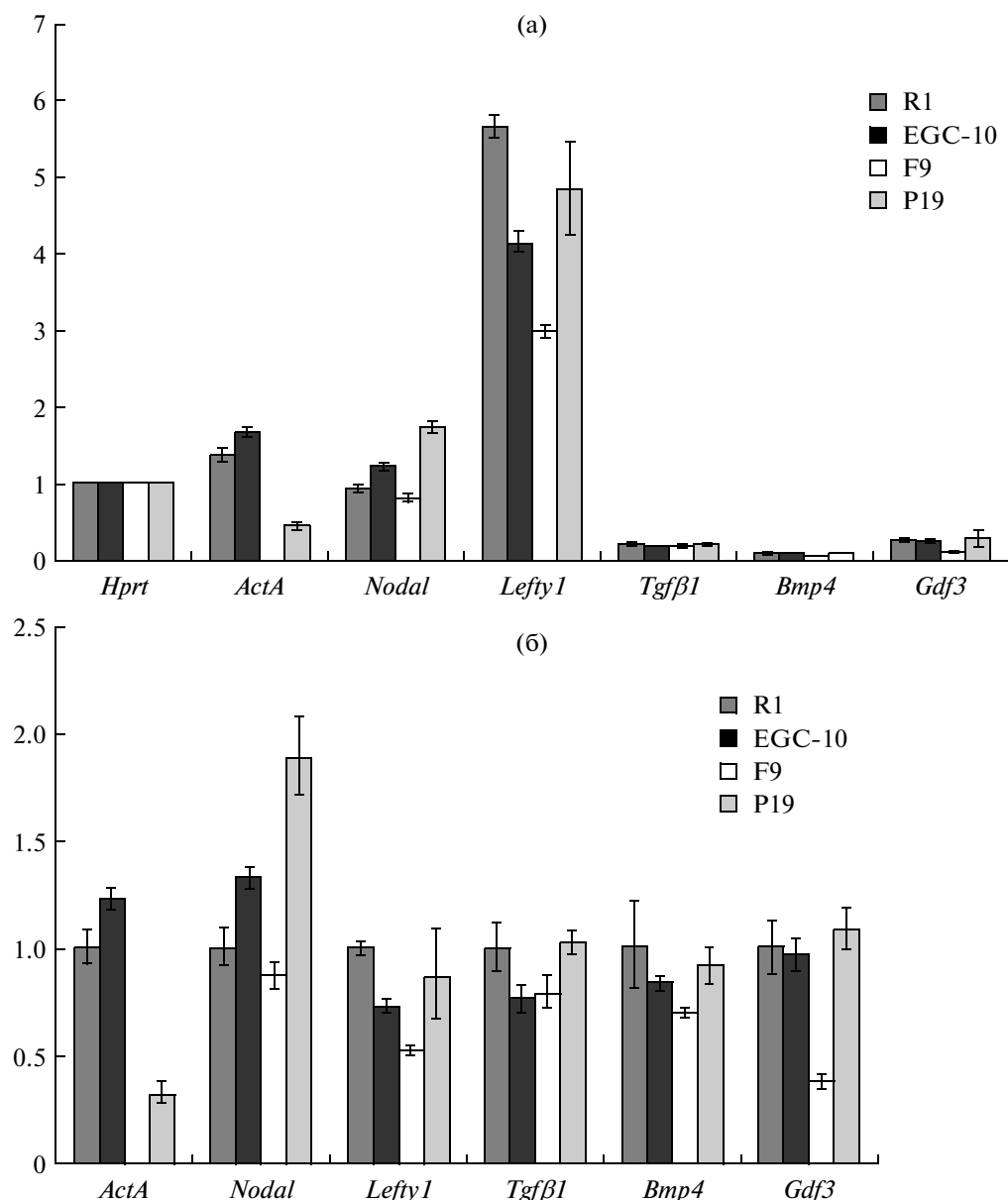


Рис. 2. Количественный РВ-ПЦР-анализ экспрессии факторов семейства $TGF\beta$ в мЭСК и мЭТК. а – Относительные уровни генной экспрессии, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt*. Уровень экспрессии в каждой линии принят за 1 относительную единицу. б – Относительные уровни экспрессии факторов семейства $TGF\beta$, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в каждой линии. Уровень экспрессии каждого гена в мЭСК R1 принят за 1 относительную единицу.

2009; Xu et al., 2002; Xu et al., 2005; Лифанцева и др., 2013). С другой стороны, выявленные в чЭТК низкие уровни экспрессии *ACTIVINA*, *NODAL* и *LEFTY1* вместе с низкими уровнями *BMP4* и *GDF3* указывают на сохранение механизмов, вовлеченных в регуляцию этого контрбаланса сигнальных ветвей, в этом типе нуллипотентных тератокарциномных клеток.

Суммируя полученные данные, можно сделать следующие заключения и предположения. Во-первых, в нуллипотентных мЭСК F9 и чЭТК PA-1

ActivinA экспрессируется на очень низком уровне, что приводит к снижению активности эндогенного сигнального пути *ActivinA/Smad2/3*. Несмотря на различную вовлеченность сигнального пути *ActivinA/Smad2/3* в регуляцию базового и первичного плюрипотентных статусов клеток мыши и человека, регуляция нуллипотентного статуса ЭТК мыши и человека, по-видимому, зависит от *ActivinA/Smad2/3*-сигналинга. Однако нельзя исключить, что функциональные механизмы этих регуляций могут отличаться. Во-вто-

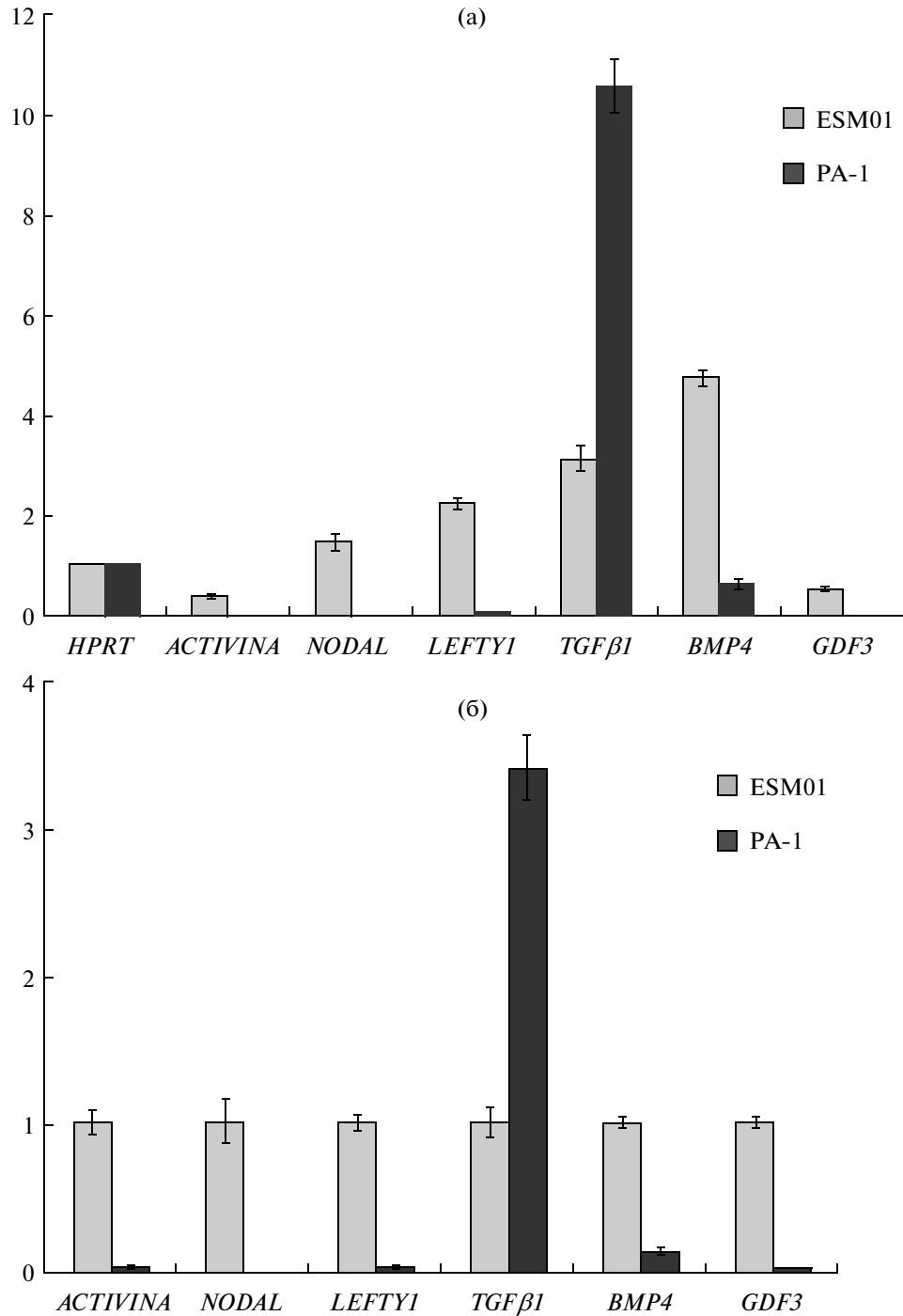


Рис. 3. Сравнительный количественный РВ-ПЦР-анализ экспрессии факторов семейства $TGF\beta$ в чЭСК и чЭТК. а – Относительные уровни генной экспрессии, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt*. Уровень экспрессии в каждой линии принят за 1 относительную единицу. б – Относительные уровни экспрессии факторов семейства $TGF\beta$, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в каждой линии. Уровень экспрессии каждого гена в чЭСК ESM01 принят за 1 относительную единицу.

рых, очевидно, что самообновление чЭТК, как и мЭТК, не зависит от стимуляции сигнального пути, инициируемого факторами ActivinA. Таким образом, роль этого сигнального пути в регуляции самообновления чЭСК и чЭТК принципи-

ально различаются. Однако предположение о роли сигнальных путей факторов семейства $TGF\beta$ в регуляции плюрипотентного и нуллипотентного статусов в клетках мыши и человека нуждается в дальнейшем исследовании.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а). Автор благодарит Н.В. Лифанцеву за техническую помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Никонова Т.М. Регуляция *in vitro* и *in vivo* дифференцировки эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и тератокарциномных клеток мыши факторами семейства TGF β // Онтогенез. 2009. V. 40. P. 403–418.
- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В. Паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека связаны с регуляцией базового и первичного статусов плюрипотентности // Онтогенез. 2011. V. 42. P. 403–424.
- Лифанцева Н.В., Кольцова А.М., Полянская Г.Г., Гордеева О.Ф. Экспрессия факторов семейства TGF β и фактора роста фибробластов FGF2 в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека, поддерживаемых в разных системах культивирования // Онтогенез. 2013. V. 44. P. 381–388.
- Andrews P.W., Damjanov I., Simon D. et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation *in vitro* and *in vivo* // Lab. Invest. 1984. V. 50. P. 147–162.
- Andrews P.W., Damjanov I., Simon D. et al. A pluripotent human stem-cell clone isolated from the TERA-2 teratocarcinoma line lacks antigens SSEA-3 and SSEA-4 *in vitro*, but expresses these antigens when grown as a xenograft tumor // Differentiation. 1985. V. 29. P. 127–135.
- Andrews P.W. Human teratocarcinomas // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 948. P. 17–36.
- Brons I.G.M., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007. V. 448. P. 191–195.
- 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.
- Dreesen O., Brivanlou A.H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells // Stem Cell Rev. 2007. V. 3. P. 7–17.
- Eiselleova L., Matulka K., Kriz V. et al. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells // Stem Cells. 2009. V. 27. P. 1847–1857.
- Gore A., Li Z., Fung H. et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells // Nature. 2011. V. 471. P. 63–67.
- Greber B., Lehrach H., Adjaye J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 455–464.
- Greber B., Lehrach H., Adjaye J. Control of early fate decisions in human ES cells by distinct states of TGF β pathway activity // Stem Cells Dev. 2008. V. 17. P. 1065–1077.
- Hovatta O., Jaconi M., Tökönen V. et al. A teratocarcinoma-like human embryonic stem cell (hESC) line and four hESC lines reveal potentially oncogenic genomic changes // PLoS ONE. 2010. V. 5. P. e10263.
- Martin G.R., Evans M.J. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1975. V. 72. P. 1441–1445.
- Na J., Furue M.K., Andrews P.W. Inhibition of ERK1/2 prevents neural and mesendodermal differentiation and promotes human embryonic stem cell self-renewal // Stem Cell Res. 2010. V. 5. P. 157–169.
- Nichols J., Smith A. Naive and primed pluripotent states // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. P. 487–492.
- Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? // Development. 2007. V. 134. P. 635–646.
- Oshimori N., Fuchs E. The harmonies played by TGF- β in stem cell biology // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. P. 751–764.
- Papaioannou V.E., Gardner R.L., McBurney M.W. et al. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis // J. Embryol. Exp. Morphol. 1978. V. 44. P. 93–104.
- Rossant J., McBurney M.W. The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection // J. Embryol. Exp. Morphol. 1982. V. 70. P. 99–112.
- Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides // Nature. 1988. V. 336. P. 688–690.
- Smith J.R., Vallier L., Lupo G. et al. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm // Dev. Biol. 2008. V. 313. P. 107–117.
- Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // Nature. 2007. V. 448. P. 196–199.
- Urbach A. and Benvenisty N. Studying early lethality of 45, XO (Turner's syndrome) embryos using human embryonic stem cells // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. e4175.
- Vallier L., Alexander M. and Pedersen R.A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells // J. Cell. Sci. 2005. V. 118. P. 4495–4509.
- Vallier L., Touboul T., Chng Z. et al. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. e6082.
- Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 971–974.
- Xu R., Chen X., Li D.S. et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 1261–1264.
- Xu R., 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.
- Zeuthen J., Nørgaard J.O., Avner P. et al. Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line // Int. J. Cancer. 1980. V. 25. P. 19–32.

Low Expression of Activin A in Mouse and Human Embryonic Teratocarcinoma Cells**O. F. Gordeeva**

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: olgagordeeva@yandex.ru*

Received March 1, 2014; in final form, March 10, 2014

Abstract—TGF β family factors play an important role in regulating the balance of self-renewal and differentiation of mouse and human pluripotent stem and embryonic teratocarcinoma cells. The expression patterns of TGF β family signaling ligands and functional roles of these signaling pathways differ significantly in mouse and human embryonic stem cells, but the activity and functional role of these factors in mouse and human embryonic teratocarcinoma cells were not sufficiently investigated. Comparative quantitative real-time PCR analysis of the expression of TGF β family factors in mouse embryonic stem, embryonic germ, and embryonic teratocarcinoma cells showed that embryonic teratocarcinoma cells express lower *ActivinA* than pluripotent stem cells but similar levels of factors *Nodal*, *Lefty1*, *TGF β 1*, *BMP4*, and *GDF3*. In human nullipotent embryonic teratocarcinoma PA-1 cells, most factors of the TGF β family (*ACTIVINA*, *NODAL*, *LEFTY1*, *BMP4*, and *GDF3*) are expressed at lower levels than in human embryonic stem cells. Thus, in mouse and human nullipotent teratocarcinoma cells, the expression of *ActivinA* is significantly reduced compared with embryonic stem cells. Presumably, these differences may be associated with changes in the functional activity of the respective signaling pathways and deregulation of proliferative and antiproliferative mechanisms in embryonic teratocarcinoma cells.

Keywords: embryonic stem cells, teratocarcinoma, pluripotency, ActivinA, TGF β signaling pathways