

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

© И. А. Чуйкин,¹ М. С. Лянгузова, В. А. Поспелов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: *chuykin79@mail.ru*

Эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК) характеризуются высокой пролиферативной активностью и способностью сохранять плюрипотентность при длительном культивировании. Большой интерес представляют особенности регуляции клеточного цикла мЭСК через различные пути передачи сигнала. В настоящем обзоре рассматривается регуляция клеточного цикла мЭСК через различные пути передачи сигнала (LIF—STAT3, PI3K—Akt и Wnt— β -катенин), а также особенности этой регуляции, обеспечивающие постоянное продвижение мЭСК по клеточному циклу, и неспособность мЭСК к блокам клеточного цикла при действии ДНК-повреждающих агентов и стрессовых факторов. Рассматриваются особенности функционирования негативных регуляторов клеточного цикла в мЭСК (ингибиторов циклин-киназных комплексов и pRb) и положительных регуляторов клеточного цикла (циклин-киназных комплексов и факторов транскрипции E2F). Вероятно, сохранение высокопролиферативного статуса мЭСК необходимо для предотвращения индукции апоптотической гибели, во всяком случае в настоящее время неизвестны агенты, способные вызвать блоки клеточного цикла без последующего запуска клеточной гибели или индукции дифференцировки. Особое внимание в обзоре уделяется роли Wnt-сигнального пути в поддержании плюрипотентного состояния мЭСК. Рассматривается вклад в регуляцию клеточного цикла мЭСК нижестоящих мишеней LIF—STAT3, PI3-киназного и Wnt— β -катенин-сигнальных путей, совместное действие которых необходимо для сохранения недифференцированного состояния мЭСК.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки мыши, пролиферация, регуляторы клеточного цикла, Wnt-сигнальный путь, β -катенин.

Принятые сокращения: ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, мЭСК — эмбриональные стволовые клетки мыши, ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход, LIF — leukaemia inhibitory factor.

Линии эмбриональных стволовых клеток мыши (мЭСК) получают из эмбрионов на стадии бластоцисты (E3—E3.5). На этой стадии развития эмбрион состоит из внутренней клеточной массы, находящейся на одной стороне полости, окруженной клетками трофобласта. Внутреннюю клеточную массу изолируют и помещают на слой из эмбриональных фибробластов мыши, обработанных агентом, блокирующим их деление (митоцин C) (Brook, Gardner, 1997). Фибробласты, образующие так называемый фидерный слой, секретируют факторы, необходимые для самообновления мЭСК. мЭСК можно культивировать как на фидерном слое фибробластов, так и на желатинизированных чашках Петри в среде, содержащей необходимые ростовые факторы. Одним из необходимых факторов является LIF (leukaemia inhibitory factor). Установлено, что сигнальный путь, активируемый LIF, необходим для сохранения недифференцированного состояния мЭСК (Chambers, Smith, 2004). Для мЭСК характерна высокая скорость размножения (время генерации 10—12 ч), которая не снижается при высокой плотности культуры. Пролиферация мЭСК не подавляется удалением ростовых факторов.

В настоящем обзоре рассматриваются пути передачи сигнала, способные обеспечивать независимую от рос-

товых факторов пролиферацию мЭСК, в том числе PI3K—Akt, mTOR и Wnt— β -катенин-сигнальный каскады.

Особое внимание уделяется Wnt— β -катенин-сигнальному пути и его возможной роли в пролиферации и дифференцировке клеток, рассматривается функционирование β -катенина в мЭСК.

Сигнальный путь LIF—STAT3

Поскольку культивирование на подложке или в среде, кондиционированной фибробластами, позволяет сохранять мЭСК в недифференцированном состоянии, было выдвинуто предположение о том, что клетки подложки продуцируют растворимые лиганды, поддерживающие плюрипотентное состояние мЭСК. Фракционирование кондиционированной среды позволило идентифицировать один из таких лигандов — им оказался LIF (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). LIF является цитокином из интерлейкинового семейства IL-6, его влияние на клетки обусловлено взаимодействием с рецепторным гетеродимерным комплексом GP130 и LIFR. В первую очередь LIF взаимодействует со своим рецептором

LIFR, затем этот комплекс привлекает GP130 и формируется тримерный комплекс (Zhang et al., 1997). В мЭСК LIFR и GP130 активируют несколько сигнальных путей, среди которых определяющим сохранение плюрипотентности мЭСК считается путь активации транскрипционного фактора STAT3, который включает в себя фосфорилирование STAT3, его димеризацию и транслокацию в ядро. Роль STAT3 в сохранении плюрипотентности мЭСК убедительно показана с использованием различных экспериментальных моделей (Niwa et al., 1998; Matsuda et al., 1999).

В эмбрионах мышей рецепторы LIFR и GP130 экспрессируются во внутренней клеточной массе, а LIF продуцируют клетки трофобласта; следовательно, можно предполагать существование паракринного механизма поддержания внутренней клеточной массы в эмбрионе (Nichols et al., 1996). Однако эмбрионы мышей, нокаутированные по LIF, выживают, хотя самки таких животных стерильны (Stewart et al., 1992). Эмбрионы, нокаутированные по LIFR, доживают до конца беременности (Li et al., 1995; Ware et al., 1995), а эмбрионы, нокаутированные по GP130, прекращают свое развитие на 12—18-е сут после оплодотворения. Таким образом, эмбриональное развитие на ранних сроках в отсутствие LIF, LIFR и GP130 не нарушается, успешно проходя стадию бластоцисты, содержащей внутреннюю клеточную массу — источник мЭСК (Yoshida et al., 1996; Nakashima et al., 1999).

Протекание беременности мышей имеет одну отличительную особенность. Развитие эмбриона мыши может быть временно остановлено на стадии бластоцисты. Эмбриональная диапауза является приспособлением мышей к условиям недостаточного питания или наличия детенышей, кормящихся материнским молоком. В таком случае эмбрион развивается до стадии бластоцисты, но затем прекращает развитие и не претерпевает имплантации до окончания диапаузы. У мышей диапауза может продолжаться несколько недель, в ходе которых бластоциста сохраняет способность возобновлять развитие при появлении эстрогенов. Искусственно диапаузу можно вызвать удалением яичников после оплодотворения (Nichols et al., 2001). Работа, в ходе которой исследовали способность эмбрионов, нокаутированных по LIFR и GP130, сохранять внутреннюю клеточную массу в ходе эмбриональной диапаузы, ясно продемонстрировала, что эмбрионы с такими генотипами не способны к возобновлению эмбрионального развития после искусственно вызванной диапаузы, не способны к имплантации и не сохраняют клетки эпибласта (Nichols et al., 2001). В результате этих исследований была выявлена скрытая, но важная функция LIF, LIFR и GP130 у мышей *in vivo* и стало ясно, почему мЭСК зависят от сигнального пути LIF—STAT3 (Nichols et al., 2001). В условиях, когда эмбриональное развитие протекает без задержки на стадии бластоцисты, внутренняя клеточная масса не нуждается в факторе LIF. Зависимость от фактора LIF наблюдается в случае, когда внутреннюю клеточную массу необходимо сохранять длительное время *in vivo* или *in vitro* при получении линий мЭСК. Самообновление ЭСК человека в отличие от мЭСК не обеспечивается путем LIF—STAT3, хотя LIF вызывает в этих клетках активацию STAT3 (Daheon et al., 2004; Sato et al., 2004).

Для будущего применения стволовых клеток в клеточной терапии важно подобрать условия работы с ЭСК, при которых все используемые компоненты будут изве-

стны. Работы в этой области ведутся на ЭСК мыши и человека. В настоящее время в большинстве лабораторий используют протокол культивирования мЭСК с добавлением в среду фактора LIF и 10—15 % эмбриональной сыворотки. В то время как сигнальные пути, активируемые LIF, более или менее установлены, мало известно о ростовых факторах сыворотки, важных для поддержания плюрипотентности, регуляции клеточного цикла и выживания мЭСК. Недавно было обнаружено, что добавление в среду факторов LIF и BMP4 позволяет культивировать мЭСК длительное время с сохранением экспрессии маркеров плюрипотентности и даже получать мЭСК из внутренней клеточной массы в среде, не содержащей сыворотки (Ying et al., 2003). Интересно, что в ходе эмбрионального развития факторы BMP4, 6, 7 индуцируют мезодермальную дифференцировку, участвуя наряду с другими факторами в образовании первичной бороздки, а при добавлении в среду к дифференцирующимся эмбриональным телам стимулируют экспрессию маркеров мезодермы (Wiles, Johansson, 1999). Однако совместно факторы LIF и BMP4 сохраняют плюрипотентность мЭСК. Авторы предполагают, что основная мишень BMP-сигналинга в мЭСК — белки семейства Id, которые представляют собой негативные регуляторы, содержащие домен HLH. Белки семейства Id секвестрируют факторы транскрипции, содержащие домен bHLH, например такие как MyoD и Mash1, и могут таким образом подавлять дифференцировку. Повышенная экспрессия Id1 в мЭСК позволяет сохранять недифференцированное состояние клеток в отсутствие сыворотки, но при наличии фактора LIF (Ying et al., 2003).

В другой работе предполагается, что для поддержания плюрипотентности мЭСК в культуре имеет значение другое действие BMP4, а именно подавление активности киназ ERK и p38; добавление ингибиторов этих киназ (PD98059 и SB203580 соответственно) имитирует эффект BMP4 и позволяет получать линии мЭСК из бластоцисты (Qi et al., 2004).

Остается открытым вопрос о том, какие гены-мишени транскрипционного фактора STAT3 являются определяющими для сохранения недифференцированного состояния мЭСК. Вероятными кандидатами являются гены *c-myc* и *pim-1*, которые вовлечены в систему регуляции клеточного цикла и находятся под контролем STAT3 в лимфоидной клеточной линии VAF-03 (Fukada et al., 1998). Недавно было установлено, что *c-myc* действительно регулируется STAT3 в мЭСК, а при дифференцировке экспрессия *c-myc* заметно подавляется за счет снижения транскрипции гена и деградации белка. Более того, показано, что экспрессия стабилизированного белка с-MycT58A сохраняет экспрессию маркеров плюрипотентности и характерную морфологию мЭСК (Cartwright et al., 2005). В последнее время появились сведения о том, что ген, кодирующий серин-треониновую киназу Pim-1, также находится под контролем STAT3 в мЭСК. Киназа Pim-1 регулирует клеточный цикл, фосфорилируя фосфатазу CDC25A, которая в свою очередь устраняет ингибирующее фосфорилирование циклинзависимой киназы CDK2 (Burdon et al., 2002).

Кроме активации STAT3 рецепторный комплекс LIFR с GP130 активирует ряд других путей, идущих, в частности, через Ras—ERK, PI3-киназу и киназу cYes (Burdon et al., 2002; Anneren et al., 2004; Paling et al., 2004).

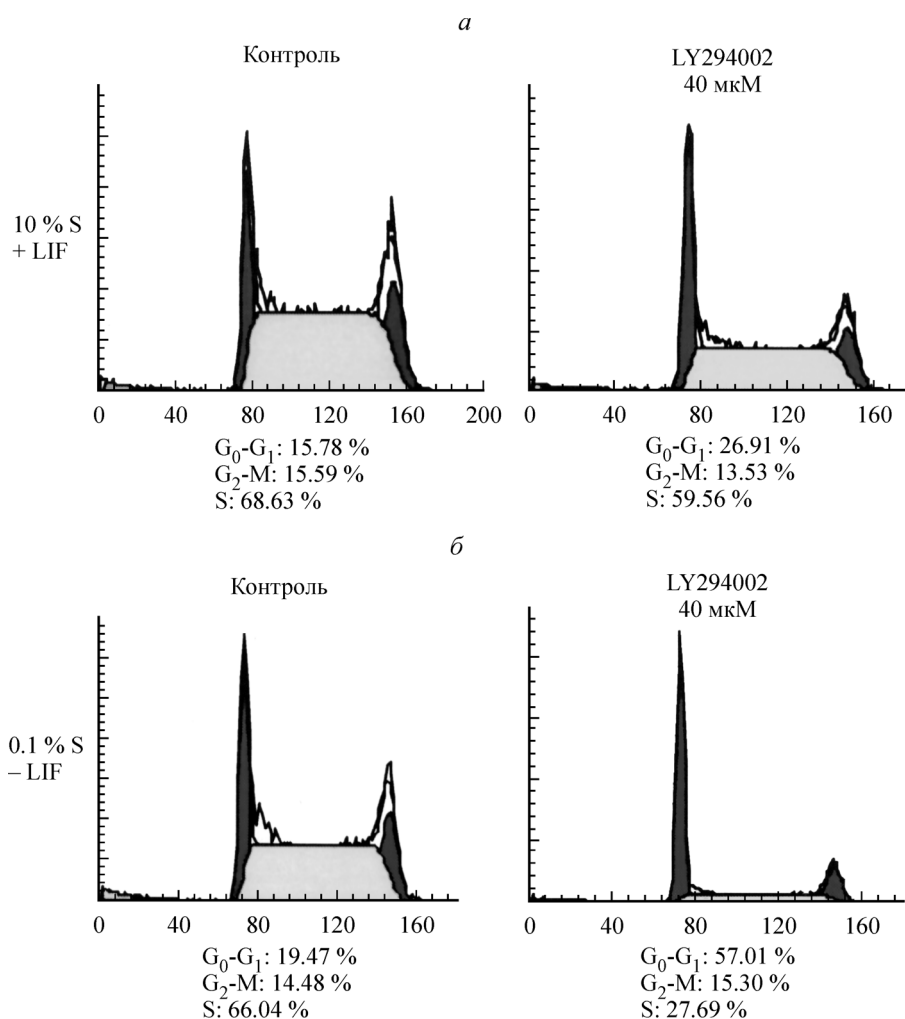


Рис. 1. Распределение эмбриональных стволовых клеток мыши (мЭСК) по фазам клеточного цикла до и после обработки клеток ингибитором PI3-киназы LY294002 в нормальных условиях культивирования, с 10 % сыворотки (S), в присутствии LIF (а) и в условиях сывороточного голодания (0.1 % S) в отсутствие LIF (б).

S — эмбриональная телячья сыворотка. Рисунок взят из работы: Лянгузова и др., 2006. Публикуется с любезного разрешения М. С. Лянгузовой.

Сигнальный путь Ras—ERK

Активация пути Ras—ERK через LIFR—GP130 в мЭСК может осуществляться через тирозиновую фосфатазу SHP2. Фосфотирозин SHP2 служит сайтом связывания адапторного белка Grb2. К Grb2 присоединяются фактор обмена гуаниловых нуклеотидов Sos и ГТФаза Ras. Ras запускает передачу сигнала по цепи MAP-киназ через киназы Raf, MEK1, 2 и ERK. Фосфорилированная киназа ERK в свою очередь фосфорилирует ряд цитоплазматических субстратов и может транслоцироваться в ядро, где мишенями ERK становятся транскрипционные факторы Elk-1, SRF и с-Мус (Burdon et al., 2002). Вообще известно, что MAP-киназный путь, активирующий киназу ERK, участвует в передаче митогенных стимулов. Так, на фибробластах NIH3T3, синхронизированных в фазе G_1 удалением сыворотки, показано, что именно активация пути через киназу ERK ростовыми факторами является первоначальным стимулом для вступления в клеточный цикл в раннем периоде G_1 (причем весь период G_1 является самой протяженной фазой клеточного цикла) (Jones, Kazlauskas, 2001). Но для мЭСК характе-

рен укороченный период G_1 , и активация ERK не является необходимым условием для их пролиферации (Burdon et al., 2002). ERK, напротив, участвует в дифференцировке мЭСК (Burdon et al., 2002). На мЭСК было показано, что удаление сайтов связывания SHP-2 в химерном рецепторе GP130 прерывает связь с путем Ras—ERK, однако позитивно сказывается на самообновлении мЭСК. Усиленная экспрессия ERK-специфической фосфатазы и применение фармакологического ингибитора MEK1—ERK-киназного каскада также усиливали самообновление мЭСК и препятствовали запуску дифференцировки (Burdon et al., 1999). По всей видимости, активация пути через киназу ERK необходима для дифференцировки, но не для сохранения недифференцированного состояния мЭСК.

PI3-киназный путь

Активация PI3-киназного пути в мЭСК может запускаться рецепторным комплексом LIFR с GP130 через адапторный белок Gab1, который взаимодействует с SHP2 (Burdon et al., 2002). Стимуляция высокими кон-

центрациями LIF приводила к накоплению в мЭСК фосфорилированной формы киназы Akt (нижестоящей мишени PI3-киназы), что является свидетельством активации PI3-киназного пути (Paling et al., 2004). Экспериментальные данные позволяют предполагать, что PI3-киназный путь играет роль в выживании и, возможно, пролиферации мЭСК, так как клетки с генотипом *pten-1-*, не экспрессирующие фосфатазу PTEN, являющуюся негативным регулятором PI3-киназного пути, обладают повышенной жизнеспособностью и высокой скоростью деления (Sun et al., 1999). Важная роль PI3-киназного пути в самообновлении мЭСК подтверждается тем, что мЭСК экспрессируют конститутивно активную изоформу белка Ras, названную Eras (embryonic ras), отличительная особенность которой заключается в способности специфически активировать PI3-киназу, а не другую мишень Ras-пути — киназу Raf-1, через которую запускается MAP-киназный путь, ведущий к киназе ERK. Авторы, описавшие белок Eras и его ген, показали, что подавление экспрессии этого гена негативно сказывается на приросте клеточной популяции и опухолевых свойствах мЭСК (Takahashi et al., 2003). По всей видимости, роль Eras в мЭСК связана именно с активацией PI3K—Akt-пути. Недавно было показано, что повышенная экспрессия миристоилированной (конститутивно активной) формы киназы Akt (myr-Akt) способствует поддержанию недифференцированного состояния мЭСК в отсутствие фактора LIF (Watanabe et al., 2006). Данные приведенных работ показывают, что PI3-киназный путь необходим для эффективного размножения мЭСК, однако остается открытым вопрос о том, для чего в первую очередь необходима активация PI3-киназного пути — для выживания или для пролиферативной активности мЭСК. Применение широко используемого ингибитора PI3-киназы LY294002 в высокой (50 мкМ) концентрации приводит не только к замедлению пролиферации и накоплению клеток в фазе G₁ клеточного цикла (Jinmanova et al., 2002), но и к массовой гибели клеток (Gross et al., 2005). Применение другого ингибитора PI3-киназы (вортманина) не оказывает существенного эффекта на распределение мЭСК по фазам клеточного цикла. Этот факт свидетельствует о том, что PI3-киназный путь если и связан с регуляцией клеточного цикла, все же не является основным в поддержании высокопролиферативного статуса мЭСК, а ингибирующее влияние LY294002 на мЭСК может быть обусловлено его побочным действием (Лянгузова и др., 2006). Кроме того, при исследовании влияния LY294002 на клеточный цикл мЭСК было обнаружено, что снижение доли S-фазных клеток значительно более выражено, если при обработке клеток ингибитором LY294002 из среды удаляли сыворотку (рис. 1).

Поскольку для мЭСК характерен укороченный клеточный цикл, интенсивность их деления должна быть скоординирована с ростом и поступлением питательных веществ. Активность киназы mTOR зависит от поступления в клетку питательных веществ, в частности аминокислот; mTOR регулирует эффективность трансляции и координирует процесс роста с продвижением по клеточному циклу. Однако активность киназы mTOR может регулироваться и через PI3-киназный путь (Fingar, Blenis, 2004). Недавно было показано, что инактивация mTOR в раннем эмбриогенезе приводит к недоразвитию внутренней клеточной массы бластоцисты, а изолировать из таких эмбрионов мЭСК не представлялось возможным (Murakami et al., 2004). По всей видимости, киназа mTOR

необходима как для сохранения внутренней клеточной массы *in vivo*, так и для поддержания мЭСК в культуре. Интересно также, что киназа mTOR может регулировать активность транскрипционного фактора STAT3 фосфорилированием по сайту Ser727. Фосфорилирование Ser727 необходимо для трансактивирующей способности и, как правило, происходит параллельно с фосфорилированием STAT3 по Tyr705 и его димеризацией. На клетках нейробластомы показано, что STAT3 может фосфорилироваться по Ser727 киназой mTOR при стимуляции клеток цитокином CNTF (Yokogami et al., 2000). Поскольку CNTF реализует свое действие через рецепторный комплекс, содержащий GP130, вполне вероятно, что LIF может вызывать mTOR-зависимое фосфорилирование STAT3 и в мЭСК.

Сигнальный путь через киназу cYes

Еще один сигнальный путь, который активируется комплексом LIFR—GP130, включает в себя киназу cYes, относящуюся к семейству Src. В мЭСК cYes активируется при стимуляции LIF, а также эмбриональной сывороткой и подавляется при дифференцировке. Активация cYes необходима для сохранения недифференцированного состояния мЭСК. Показано, что фармакологический ингибитор cYes SU6656 не влияет на передачу сигнала через другие сигнальные пути, активируемые LIF, однако снижает число недифференцированных колоний мЭСК, а кроме того, увеличивает эффективность дифференцировки, вызванной ретиноевой кислотой (Anneren et al., 2004). Мишени этого пути, важные для сохранения плюрипотентности мЭСК, в настоящее время не установлены.

В самообновлении мЭСК кооперируют многие сигнальные пути (рис. 2), причем интересно, что избыточная активность разных путей может способствовать поддержанию недифференцированного состояния мЭСК. Так, показано, что повышенная экспрессия Nanog — транскрипционного фактора, маркера ЭСК, позволяет

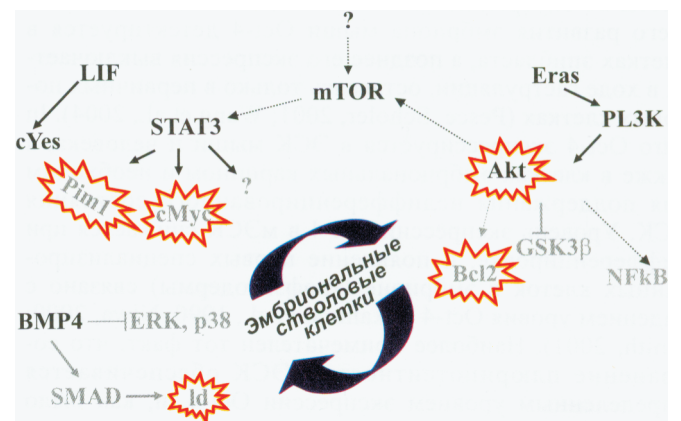


Рис. 2. Сигнальные пути, участвующие в сохранении плюрипотентности, подавлении апоптоза и пролиферации мЭСК.

Жирным шрифтом указаны те сигнальные пути, роль которых в самообновлении мЭСК охарактеризована наиболее достоверно; светлым шрифтом показаны предполагаемые нижестоящие мишени; пунктирные стрелки показывают возможные пути регуляции; в красных звездах указаны белки, повышенная экспрессия которых в мЭСК позволяет культивировать их в отсутствии факторов сыворотки или LIF (см. текст). Схема создана с привлечением данных работ: Niwa et al., 1998; Matsuda et al., 1999; Burdon et al., 2002; Paling et al., 2002; Takahashi et al., 2003; Ying et al., 2003; Anneren et al., 2004; Cartwright et al., 2004; Murakami et al., 2004; Qi et al., 2004; Yamane et al., 2005; Watanabe et al., 2006.

культивировать мЭСК независимо от LIF (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Сохранение плюрипотентности мЭСК в отсутствие фактора LIF отмечается при эктопической экспрессии компонентов LIF-пути STAT3, стабилизированного белка с-МусТ58А и Pim-1, а также при конститутивной экспрессии киназы PKB(Akt) (Matsuda et al., 1999; Cartwright et al., 2005; Watanabe et al., 2006). Конститутивная экспрессия этих белков наблюдается при канцерогенезе, а в мЭСК эти регуляторные белки кооперируют между собой, обеспечивая различные сигналы для роста, выживания и подавления дифференцировки.

Транскрипционные факторы — маркеры мЭСК

Для сохранения плюрипотентности мЭСК кроме описанных выше сигнальных путей необходима еще экспрессия ряда транскрипционных факторов, в частности Oct-4, Nanog, Rex-1 и др. (Niwa et al., 2000; Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Hay et al., 2004). Регуляция экспрессии генов ранних плюрипотентных клеток эмбриона настроена таким образом, что гены, активация которых необходима для специализации в различные клеточные линии, подавлена, а постоянно экспрессируются гены, необходимые для метаболизма, пролиферации и сохранения недифференцированного состояния (Lee et al., 2006). Специфическая регуляция транскрипции ЭСК происходит с участием особых факторов транскрипции, необходимых для сохранения плюрипотентного статуса мЭСК. Наибольшее внимание исследователей стволовых клеток в настоящее время сосредоточено на изучении функций Oct-4 и Nanog — транскрипционных факторов, которые не только важны для сохранения недифференцированного состояния, но также могут вызывать изменение программы ядер дифференцированных соматических клеток.

Фактор транскрипции Oct-4, содержащий POU-домен, начинает экспрессироваться с 2-клеточной стадии и далее присутствует в моруле на стадии бластоцисты во внутренней клеточной массе. В ходе дальнейшего развития эмбриона мыши Oct-4 детектируется в клетках эпибласта, а позднее его экспрессия выключается в ходе гаструляции, оставаясь только в первичных половых клетках (Pesce, Scholer, 2001; Wang et al., 2004). In vitro Oct-4 экспрессируется в ЭСК мыши и человека, а также в клетках эмбриональных карцином и необходим для поддержания недифференцированного состояния ЭСК. Уровень экспрессии Oct-4 в мЭСК снижается при дифференцировке, и появление первых специализированных клеток в эмбрионе (трофэктодермы) связано с падением уровня Oct-4 (Okamoto et al., 1990; Niwa, 2000; Smith, 2001). Наиболее примечателен тот факт, что сохранение плюрипотентности мЭСК обеспечивается определенным уровнем экспрессии Oct-4, и, как было ярко продемонстрировано в экспериментах с использованием линии мЭСК с индуцибельной экспрессией Oct-4, увеличение его экспрессии запускает дифференцировку в направлении первичной энтодермы, а подавление экспрессии приводит к дифференцировке в клетки трофэктодермы (Niwa et al., 2000). Функция Oct-4, вероятно всего, связана с образованием комплексов с другими факторами транскрипции, которые активируют и репрессируют гены-мишени. Активности одного лишь Oct-4 недостаточно для сохранения плюрипотентного состояния при удалении фактора LIF (Niwa et al., 2000).

Показано, что комплекс Oct-4 и Sox-2 позитивно регулирует транскрипцию ряда генов, в частности *fgf4*, *utf1* и самого *oct-4* (Yuan et al., 1995; Okumura-Nakanishi et al., 2005). Транскрипционный фактор Cdx-2, участвующий в спецификации клеток трофэктодермы, вместе с Oct-4 образует репрессорный комплекс на промоторе гена *oct-4*. Вероятно, мЭСК обладают факторами транскрипции, функция которых в обеспечении плюрипотентного состояния в настоящее время не установлена, и эти факторы могут действовать совместно с Oct-4. В пользу этого утверждения говорят данные о том, что факторы Cdx-2 и Oct-4 по-разному регулируют активность промотора гена *cdx-2*. При котрансфекции *oct-4* и *cdx-2* наблюдается репрессия промотора *cdx-2* в недифференцированных мЭСК, а после запуска дифференцировки в той же схеме эксперимента наблюдается активация промотора *cdx-2* (Niwa et al., 2005). Фактор Oct-4 может участвовать в репрограммировании ядер соматических клеток (Bortvin et al., 2003). Возможно, Oct-4 частично обуславливает туморогенные свойства мЭСК. Показано, что индукция экспрессии Oct-4 у мышей вызывает дисплазию эпителиальных тканей, нарушая процесс дифференцировки. У животных с индуцированной экспрессией Oct-4 наблюдаются усиленная пролиферация клеток-предшественников эпителия кишечника и образование опухолей кожи. Интересно, что экспрессия Oct-4 в опухолевых клетках — явление относительно редкое, а in vivo этот ген экспрессируется в строго определенных типах клеток, о которых говорилось выше (Hochedlinger et al., 2005). Вероятно, в ходе эмбрионального развития для подавления экспрессии потенциально опасного для соматических клеток Oct-4 используются эффективные эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК, модификации гистонов и взаимодействие с корепрессорами (Gidekel, Bergman, 2002; Hattori et al., 2004).

Транскрипционный фактор Sox2 — член семейства факторов транскрипции, содержащих HMG-домен, — вовлечен в регуляцию транскрипции и структуры хроматина. Он формирует комплекс с фактором Oct-4 или повсеместно экспрессируемым Oct-1 на промоторе гена *fgf4* и некоторых других генов, экспрессируется в ЭСК и также в нейрональных стволовых клетках (Chambers, Smith, 2004).

Транскрипционный фактор Foxd3 — член семейства транскрипционных факторов Forkhead, содержащих домен Winged-Helix. В бластоцистах, нокаутированных по гену этого фактора (Foxd3^{-/-}), не происходит образования первичной эктодермы и мЭСК из Foxd3^{-/-} бластоцист изолировать невозможно, хотя Oct-4, Sox-2 и Fgf4 экспрессируются. Предполагается, что функция Foxd3 обусловлена образованием комплекса с Oct-4 (Hanna et al., 2002; Chambers, Smith, 2004).

Транскрипционный фактор Nanog — транскрипционный фактор, содержащий гомеодомен. Nanog детектируется в клетках, содержащих Oct-4, однако начинает экспрессироваться на поздних этапах дробления, причем наибольшее количество его обнаруживается в клетках, расположенных в моруле. Уровень экспрессии Nanog высок на стадии ранней бластоцисты, а затем снижается, до того как начинается имплантация; исключение составляют первичные половые клетки. Было обнаружено, что повышенная экспрессия Nanog способствует сохранению недифференцированного состояния мЭСК в отсутствие фактора LIF и активации фактора STAT3, хотя транскрипция гена *nanog* не находится под

контролем STAT3. Сохранение плюрипотентности мЭСК при повышенной экспрессии Nanog в отсутствие фактора LIF требует присутствия Oct-4, так как при удалении последней клетки дифференцируются (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Есть данные о том, что в регуляции гена *nanog* участвует Oct-4 с неустановленным фактором семейства Sox (Kuroda et al., 2005).

Показано, что при слиянии клеток Nanog может способствовать репрограммированию ядер соматических клеток. При слиянии мЭСК с нейрональными стволовыми клетками повышенная экспрессия Nanog способствует активации экспрессии генов плюрипотентных клеток и многократно увеличивает образование гибридных колоний, которые демонстрируют признаки ЭСК. Повышенная экспрессия Nanog способствует также образованию гибридных колоний при слиянии ЭСК с тимоцитами и фибробластами, хотя и с меньшей эффективностью. При этом в гибридах снижается транскрипция маркеров дифференцировки и гибридные колонии приобретают способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков (Silva et al., 2006).

В ходе развития эмбриона Oct-4 предотвращает первую дифференцировку морулы в клетки трофобласта, Nanog подавляет дифференцировку в направлении эндодермы, а совместно эти факторы необходимы для сохранения плюрипотентности мЭСК. После открытия факторов Oct-4 и Nanog перед исследователями встали следующие вопросы, какие гены регулируют Oct-4 и Nanog? Есть ли гены, регулируемые Oct-4 и Nanog совместно? Обуславливают ли эти факторы привлечение эпигенетических регуляторов, формирующих специфическую структуру хроматина ЭСК? Прогресс в поиске ответов на эти вопросы был сделан в работе с применением метода иммунопреципитации хроматина и анализа фрагментов ДНК на микрочипах (Loh et al., 2006). Авторы выявили и картировали в геноме сайты связывания Nanog и Oct-4, провели исследование экспрессии генов, содержащих сайты связывания. Оказалось, что Nanog и Oct-4 регулируют гены как независимо, так и совместно. Чтобы подтвердить функциональное значение сайтов связывания Oct-4 и Nanog в промоторах генов, авторы индуцировали дифференцировку мЭСК тремя разными способами и исследовали транскрипцию 16 тыс. генов на микрочипах. Затем разделяли гены на индуцированные и репрессированные в ходе дифференцировки и проверили в них наличие сайтов связывания Oct-4 и Nanog (Loh et al., 2006). Обнаружили, что именно среди подавляемых и индуцированных при дифференцировке генов находятся те, что содержат сайты связывания Oct-4 и Nanog, и это подтверждает предположение о специфической активации или репрессии этих генов с помощью Oct-4 и Nanog (порознь или совместно) в недифференцированных клетках (Loh et al., 2006). Таким образом, были выявлены новые гены, важные для сохранения плюрипотентности ЭСК: при обработке мЭСК siRNA к мРНК генов *esrrb1* и *rif1* клетки теряют черты недифференцированного фенотипа, начиная дифференцироваться.

Особенности регуляции клеточного цикла мЭСК

Для мЭСК характерны высокая скорость деления и поддержание недифференцированного фенотипа при соблюдении условий культивирования. Уникальная черта

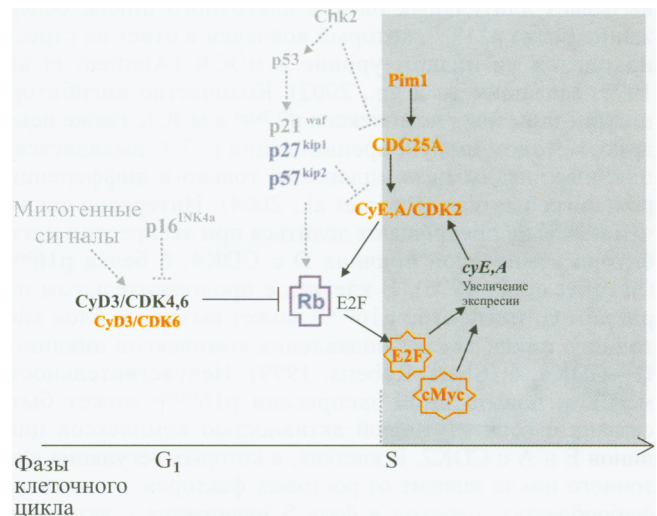


Рис. 3. Особенности регуляции клеточного цикла мЭСК.

G_1 и S — фазы клеточного цикла; Cy — циклин. Серым цветом показаны пути, предположительно неактивные или не играющие определяющей роли в клеточном цикле мЭСК, но функционирующие в большинстве нетрансформированных соматических клеток; красным цветом показаны регуляторы клеточного цикла, постоянно активные в мЭСК; синим цветом показаны негативные регуляторы клеточного цикла, экспрессируемые мЭСК. Схема составлена по данным работ: Savatier et al., 1996; Aladjem et al., 1998; Schratt et al., 2001; Малашичева и др., 2002; Stead et al., 2002; Cartwright et al., 2004; Faast et al., 2004; Hong, Stambrook, 2004.

клеточного цикла мЭСК — продолжать делиться при удалении сыворотки — может быть обусловлена короткой продолжительностью ранней фазы G_1 , в которой клетка чувствительна к митогенным стимулам (Jones, Kazlauskas, 2001). Пролиферация, не зависящая от ростовых факторов, характерна для многих опухолевых клеток, а значит, механизмы регуляции клеточного цикла трансформированных и эмбриональных клеток могут быть похожи и отличаются от аналогичных механизмов нетрансформированных соматических клеток, у которых период G_1 является наиболее протяженной частью клеточного цикла (Schratt et al., 2001; Burdon et al., 2002). В настоящее время большая масса данных свидетельствует о множестве регуляторных путей, обеспечивающих непрерывное продвижение мЭСК по клеточному циклу. Особенности регуляции клеточного цикла мЭСК показаны на рис. 3.

Установлено, что белок Rb (негативный регулятор активности транскрипционного фактора E2F) находится в мЭСК преимущественно в гиперфосфорилированном состоянии, т. е. не способен взаимодействовать с E2F и подавлять его трансактивирующую функцию (Savatier et al., 1994). Показано, что комплексы циклин A—CDK2, циклин E—CDK2, которые фосфорилируют Rb и стимулируют переход из фазы G_1 в фазу S клеточного цикла, постоянно активны в ходе всего клеточного цикла мЭСК (Stead et al., 2002). Транскрипционные факторы E2F в свою очередь активируют транскрипцию генов, необходимых для продвижения по клеточному циклу, в частности циклина E, циклина A и *e2f1*, и др. (Blais, Dynlacht, 2004). Есть данные, показывающие, что такие негативные регуляторы пролиферации, как ингибитор циклин-киназных комплексов $p21^{Waf1}$, не участвуют в контроле за событиями клеточного цикла мЭСК. Установлено, что действие агентов, повреждающих ДНК, не

вызывает длительных блоков клеточного цикла; содержание белка p21^{waf1}, который вовлечен в ответ на стресс, находится на низком уровне в мЭСК (Aladjem et al., 1998; Малашичева и др., 2002). Количество ингибитора циклин-киназных комплексов p27^{kip1} в мЭСК также невелико, методом иммунопреципитации p27^{kip1} выявляется с циклин-киназными комплексами только в дифференцированных клетках (Вружа et al., 2004). Интересно также, что мЭСК не прекращают делиться при экспрессии ингибитора комплексов циклина D с CDK4, 6 белка p16^{ink4a} (Savatier et al., 1996). В клетках с продолжительным периодом G₁ ингибитор p16^{ink4a} может вызывать блок клеточного цикла за счет подавления комплексов циклинов D—CDK4, 6 (Sherr, Roberts, 1999). Нечувствительность мЭСК к повышенной экспрессии p16^{ink4a} может быть связана с конститутивной активностью комплексов циклинов E и A с CDK2. В клетках, в которых регуляция клеточного цикла зависит от ростовых факторов, в частности фибробластах, переход в фазу S начинается с активации комплексов циклинов D с CDK4, 6, от которых зависит дальнейшая активация комплексов циклинов E и A с CDK4, 6 (Jones, Kazlauskas, 2001). Поскольку активность комплексов циклинов E и A с CDK2 остается высокой в ходе всего клеточного цикла мЭСК, ингибирование комплексов циклинов D с CDK4, 6 ингибитором p16^{ink4a} не сказывается на эффективности перехода клеток в фазу S. Интересно, что мЭСК содержат комплексы циклин D3 с CDK6, которые не ингибируются p16^{ink4a} (Faast et al., 2004).

Внутренняя клеточная масса дает начало всем клеткам эмбриона, в том числе и первичным половым клеткам, поэтому сохранение стабильности генетического материала мЭСК имеет большое значение. Частота спонтанных мутаций в мЭСК является значительно более низкой по сравнению с соматическими клетками (Servantes et al., 2002). Воздействия, приводящие к нарушению первичной структуры ДНК, вызывают апоптотическую гибель, но не продолжительные блоки клеточного цикла. Одним из механизмов реализации блока клеточного цикла в результате воздействий, повреждающих ДНК, является последовательная активация киназ ATM и Chk2. Киназа Chk2 фосфорилирует и подавляет активность позитивного регулятора клеточного цикла — фосфатазы CDC25A, а также фосфорилирует белок p53, что может приводить к блоку клеточного цикла. Фосфатаза CDC25A стимулирует переход клеток в фазу S клеточного цикла, удаляя ингибирующее фосфорилирование CDK2 по Tyr15. Киназа Chk2 инактивирует фосфатазу CDC25A фосфорилированием по Ser123 (Abraham, 2001). Было установлено, что в мЭСК киназа Chk2 находится в гиперфосфорилированном состоянии, локализуется в области centrosom и функционально неактивна (Hong, Stambrook, 2004). Ионизирующее излучение не вызывает в мЭСК снижения уровня белка CDC25A, фосфорилирования p53 по Ser23, а также накопления ингибитора циклин-киназных комплексов p21^{waf1}, что характерно для большинства соматических клеток. Эктопическая экспрессия Chk2 в мЭСК придает клеткам способность останавливаться в фазе G₁ клеточного цикла после облучения, параллельно снижая долю клеток, гибнущих апоптозом, и наряду с этим вызывает дестабилизацию CDC25A и накопление фосфорилированной по Tyr 15 (неактивной) формы CDK2 (Hong, Stambrook, 2004). Данные, полученные в этой работе, показывают, что Chk2 функционально инактивирована в мЭСК, а введение экзогенной Chk2 дает возможность не только осу-

ществить блок клеточного цикла в G₁ после ионизирующего облучения, но и спасает клетки от апоптотической гибели. По-видимому, система регуляции клеточного цикла мЭСК настроена на постоянную пролиферацию и не способна к реализации сверочных точек (checkpoints) клеточного цикла (рис. 3). В настоящее время неизвестны агенты, способные блокировать деление мЭСК, не вызывая одновременно апоптоз и(или) запуск дифференцировки. Возможно, запуск клеточной гибели является основным способом сохранения генетической стабильности мЭСК, предотвращая накопление ошибок ДНК в потомстве мЭСК. Недавно было показано, что ЭСК макаки-резуса и мЭСК имеют сходные черты регуляции клеточного цикла: короткий период G₁, постоянную экспрессию циклина E во всех фазах клеточного цикла, отсутствие блока клеточного цикла после γ -облучения и удаления ростовых факторов (Fluckiger et al., 2006).

Структура Wnt-сигнального пути позвоночных. Роль β -катенина в адгезии клеток и регуляции транскрипции

Ген *wnt-1* был впервые открыт в 1982 г. как протоонкоген, активируемый интеграцией вируса MMTV в опухоли молочной железы. Затем был идентифицирован ортолог Wnt-1 (Wingless), участвующий в установлении полярности сегментов *Drosophila melanogaster*. Стало ясно, что гены Wnt участвуют в эмбриональном развитии и канцерогенезе. Wnt-путь — это цепь сигнальных событий, которая состоит из взаимодействия лигандов Wnt с рецепторами, последующей инактивации киназы GSK3 β и активации транскрипции в ядре с участием β -катенина. Этот сигнальный путь участвует во многих процессах эмбрионального развития, определяя различные направления дифференцировки. В опухолевых клетках разного происхождения Wnt-путь оказывается deregulированным. Wnt-путь активируется при взаимодействии лигандов Wnt (у млекопитающих известно 19) с рецептором Frizzled (у млекопитающих известно 10) и корецептором LRP-5, 6, что приводит к подавлению активности киназы GSK3 β с помощью белка Disheveled. Главный участник Wnt-пути — белок β -катенин. Функция, которую он выполняет, зависит от взаимодействующих с ним белков (рис. 4); вместе с кадгеринами β -катенин участвует в образовании межклеточных контактов, в комплексе с факторами семейства LEF/TCF является коактиватором транскрипции генов в ядре, в составе цитоплазматических комплексов с белками SKI, GSK3 β , APC и Axin β -катенин фосфорилируется для последующей деградации (Wodarz, Nusse, 1998; Moon et al., 2004). Инактивация GSK3 β приводит к стабилизации β -катенина, после чего он способен перемещаться в ядро, взаимодействуя с партнером по перемещению BCL9-2. В ядре β -катенин активирует транскрипцию, взаимодействуя с факторами семейства LEF/TCF и совместно с коактиваторами транскрипции, в частности CBP/p300.

Комплексы β -катенин—TCF регулируют транскрипцию генов, участвующих в дифференцировке, миграции и эпителиально-мезенхимном переходе (ЭМП), в том числе индуцируют транскрипцию позитивных регуляторов клеточного цикла — циклина D1 и *c-myc* (He et al., 1998; Tetsu et al., 1999; Hecth et al., 2000). Именно эта способность β -катенина позволяет предполагать ряду исследователей, что активность Wnt-сигнального пути не-

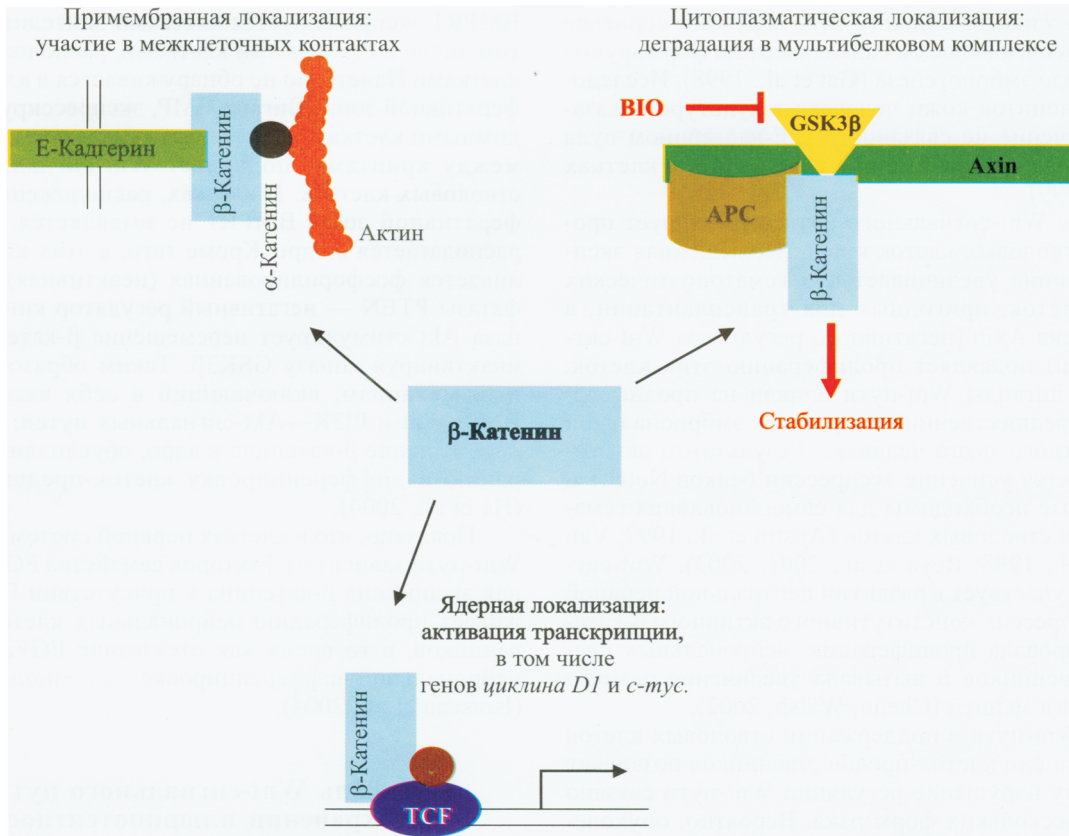


Рис. 4. Функции β -катенина в составе различных белковых комплексов в клетке.

Использованы данные работ: Wodarz, Nusse, 1998; Morin, 1999; Bienz, 2004.

обходима для пролиферации мЭСК. В отсутствие β -катенина факторы LEF/TCF взаимодействуют с корепрессором Groucho и выполняют функцию репрессоров транскрипции (Levanon et al., 1998; Roose et al., 1998; Polakis, 2000; Bienz, 2004). β -катенин участвует в межклеточных контактах, взаимодействуя с кадгеринами, кальцийзависимыми рецепторами межклеточной адгезии и с актиновым цитоскелетом через белок α -катенин. Гомолог β -катенина плакоглобин (или γ -катенин) также способен взаимодействовать с кадгеринами и α -катенином и выполнять адгезионную функцию β -катенина в его отсутствие (Haegel et al., 1995; Huelsken et al., 2000).

Адгезионная и сигнальная функция β -катенина строго скоординированы, и нарушение баланса в пользу второй может приводить к изменению фенотипа клетки. Экспрессия стабилизированного β -катенина в фибробластах NIH3T3 приводила к трансформации клеток (Whitehead et al., 1995). Дерегуляция Wnt-сигнального пути отмечается при канцерогенезе и встречается в опухолевых клетках кишечника, кожи, матки, яичников, головного мозга и в меланомах. Дерегуляция Wnt-сигнального пути в опухолевых клетках выражается в стабилизации β -катенина и повышенной транскрипционной активности комплексов TCF— β -катенин. До 80 % опухолей кишечника содержат мутации гена опухолевого супрессора APC. В ядрах клеток, не содержащих APC дикого типа, присутствуют комплексы TCF4— β -катенин, которые активируют активность TCF-зависимой репортерной конструкции (Korinek et al., 1997). Многие опухоли приобретают мутации, стабилизирующие β -катенин, и наибо-

лее часто мутации происходят в сайтах фосфорилирования сериновых и треониновых аминокислотных остатков на N-конце молекулы, что в норме является сигналом, направляющим β -катенин на деградацию (Morin, 1999; Polakis, 2000).

Роль Wnt-сигнального пути в пролиферации и дифференцировке

Многочисленные литературные источники свидетельствуют о необходимости Wnt-сигнального пути для самообновления стволовых клеток тканей и(или) делящихся клеток-предшественников тканей. Под стволовыми клетками обычно подразумевают популяции клеток, существующие в определенных участках тканей, сохраняющих свои свойства и способных к делению. Под клетками-предшественниками понимают делящиеся клетки-потомки стволовых клеток, вставшие на путь дифференцировки. Мыши, нокаутированные по TCF4, характеризуются отсутствием стволовых клеток в тонком кишечнике (Korinek et al., 1998). У мышей, экспрессирующих в тонком кишечнике стабилизированный β -катенин без N-концевого домена, содержащего сайты фосфорилирования, происходит усиленная пролиферация клеток в стенке тонкого кишечника (Wong et al., 1998).

Тканеспецифическая экспрессия стабилизированного β -катенина в коже приводила ко второй волне формирования волосяных луковиц после рождения мышей, в

то время как у животных дикого типа наружное корневое влагалище, сосочек волоса и сальная железа формируются только в ходе эмбриогенеза (Gat et al., 1998). Исследование кератиноцитов кожи человека в культуре показало, что увеличение не связанного с E-кадгеринном пула β -катенина отмечается именно в делящихся клетках (Zhu, Watt, 1999).

Активация Wnt-сигнального пути стимулирует пролиферацию стволовых клеток крови. Повышенная экспрессия β -катенина увеличивает пул гематопоэтических стволовых клеток, пригодных для трансплантации, а сверхэкспрессия Axin (негативного регулятора Wnt-сигнального пути) подавляет пролиферацию этих клеток. Растворимые лиганды Wnt-пути влияли на пролиферацию клеток-предшественников крови из эмбриональной печени и костного мозга человека. Результатом активации Wnt является усиление экспрессии белков Notch1 и HoxB4, которые необходимы для самообновления гематопоэтических стволовых клеток (Austin et al., 1997; Van Den Berg et al., 1998; Reya et al., 2001, 2003). Wnt-сигнальный путь участвует в развитии центральной нервной системы. Экспрессия конститутивного активного β -катенина стимулировала пролиферацию нейрональных клеток-предшественников и вызывала увеличение размера головного мозга мышей (Chenn, Walsh, 2002).

Участие Wnt-пути в поддержании стволовых клеток тканей и экспансии клеток-предшественников позволяет понять, почему нарушение регуляции Wnt-пути связано с развитием нескольких форм рака. Вероятно, опухолевые клетки могут образовываться при нарушении механизмов регуляции клеточного цикла и дифференцировки стволовых клеток (Reya et al., 2001; Kleber, Sommer, 2004). Поскольку мЭСК имеют черты опухолевых клеток, можно предположить, что их автономная пролиферация обеспечивается участием Wnt-сигнального пути.

Кроме участия в пролиферации Wnt— β -катениновый путь определяет направление дифференцировки клеток-предшественников. При повреждении мышц Wnt-путь вовлечен в регенерацию мышц, запуская миогенную дифференцировку (Polesskaya et al., 2003). В коже β -катенин необходим для формирования волосяного фолликула в ходе эмбриогенеза, а также определяет направление специализации стволовых клеток кожи. В отсутствие β -катенина стволовые клетки кожи не способны образовывать фолликулярные кератиноциты и дифференцируются только в клетки эпидермиса (Huelsken et al., 2001). Wnt-путь определяет специализацию клеток нервного гребня. Для исследования роли β -катенина в дифференцировке в клетках нервного гребня подавляли экспрессию β -катенина или, напротив, экспрессировали стабилизированный β -катенин. Ни подавление, ни усиление экспрессии β -катенина не влияли на пролиферацию клеток, однако приводили к реализации различных программ дифференцировки. В отсутствие β -катенина стволовые клетки нервного гребня пролиферировали и сохраняли способность к миграции, но были не способны образовывать сенсорные нейроны и меланоциты. Напротив, продолжительная активация β -катенина приводила к формированию сенсорных нейронов, но не других производных нервного гребня (Dorsky et al., 1998; Dunn et al., 2000; Hari et al., 2002; Kleber, Sommer, 2004).

Интересный пример кооперации сигналов BMP и Wnt можно наблюдать на примере пролиферации и дифференцировки стволовых клеток тонкого кишечника. Показано, что в эпителии тонкого кишечника рецептор

BMPRI экспрессируется клетками эпителия ворсинки, в том числе и стволовыми клетками, расположенными над клетками Панета, но не обнаруживается в клетках пролиферативной зоны. Лиганд BMP, экспрессируемый мезенхимными клетками, расположенными внутри ворсинки и между криптами, подавляет Wnt-сигнальный путь в стволовых клетках. В клетках, расположенных в пролиферативной зоне, BMPRI не выявляется, а β -катенин располагается в ядре. Кроме того, в этих клетках накапливается фосфорилированная (неактивная) форма фосфатазы PTEN — негативный регулятор киназы Akt. Киназа Akt стимулирует перемещение β -катенина в ядро, инактивируя киназу GSK3 β . Таким образом, комплексный механизм, включающий в себя взаимодействие BMP, Wnt и PI3K—Akt-сигнальных путей, стимулирует перемещение β -катенина в ядро, обуславливая пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников (He et al., 2004).

Показано, что в клетках нервной системы активность Wnt-пути зависит от факторов семейства FGF. Повышенная экспрессия β -катенина в присутствии FGF2 поддерживает пролиферацию нейрональных клеток-предшественников, в то время как отсутствие FGF2 приводит к нейрональной дифференцировке в адгезионной культуре (Israsena et al., 2004).

Роль Wnt-сигнального пути в сохранении плюрипотентности и в дифференцировке мЭСК

Wnt-сигнальный путь функционирует на важнейших этапах эмбрионального развития — гастрюляции, определения передне-задней оси зародыша, закладке центральной нервной системы и в других процессах. Wnt-путь необходим для дифференцировки и пролиферации клеток-предшественников разных тканей типов, в частности для сохранения делящихся клеток эпителия кишечника и стволовых клеток крови. Дерегуляция Wnt-пути является важным этапом в процессе канцерогенеза разных типов опухолей. мЭСК обладают чертами трансформированных клеток (высокой скоростью пролиферации, не зависимым от ростовых факторов делением), а с другой стороны, их можно рассматривать как популяцию клеток-предшественников, поскольку внутренняя клеточная масса (источник мЭСК) существует в организме короткое время. Данные об активности Wnt-пути в ходе ранних этапов эмбриогенеза мыши достаточно противоречивы. В ряде исследований с применением ПЦР в реальном времени, микрочипов и гибридизации *in situ* показано, что на стадии бластоцисты мыши экспрессируются лиганды Wnt3a, 4, 6, 6b, 10b и секретлируемые антагонисты Sfrp1 и Dkk1 (Lloyd et al., 2003; Kemp et al., 2005). При инъекции мРНК, кодирующей β -катенин, сшитый с GFP, на стадии дробления β -катенин—GFP локализуется в ядрах клеток эпибласта. Недавно было показано, что культивирование ЭСК с ингибитором киназы GSK3 β (BIO), предположительно активирующее Wnt-путь, способствует поддержанию плюрипотентного состояния ЭСК мыши и человека. Добавление BIO активирует TCF-зависимую репортерную конструкцию Top-Flash и сохраняет недифференцированное состояние мЭСК в отсутствие фактора LIF (Sato et al., 2004).

Однако данные других работ свидетельствуют о том, что канонический Wnt-путь, включающий в себя подав-

ление деградации β -катенина и транслокацию β -катенина в ядро, не играет роли в преимплантационном развитии и активируется позднее в ходе гастрюляции. У мышей, нокаутированных по гену, кодирующему лиганд Wnt3a, не обнаружено существенных нарушений на стадии бластоцисты, но развитие на стадии первичной бороздки прекращается (Liu et al., 1999). Эмбрионы мышей, нокаутированных по β -катенину, не имеют нарушений вплоть до начала гастрюляции. В местах адгезионных контактов внутренней клеточной массы вместо β -катенина детектируется плакоглобин, а сама внутренняя клеточная масса выглядит так же, как и у мышей дикого типа. У нокаутированных эмбрионов отмечается нарушение формирования первичной мезодермы и передне-задней оси эмбриона (Haegel et al., 1995; Huelsken et al., 2000).

Интересный подход для исследования роли β -катенина в ходе раннего эмбрионального развития был применен с использованием регулируемой экспрессии рекомбиназы CRE под контролем промотора *Zp3* (*zona pellucida* — гена, экспрессируемого в ооцитах). Для того чтобы исследовать возможный вклад ядерного β -катенина на ранних стадиях развития эмбриона мыши до имплантации, скрестили самок мышей, экспрессирующих *Zp3-cre* (рекомбиназу Cre под промотором гена *zona pellucida*), с самками, гомо- или гетерозиготными по гену *β CatEx3flox*, в котором последовательность экзона 3 фланкирована сайтами *loxP*. Белок, получающийся в результате вырезания фланкированной последовательности, является стабилизированным и, следовательно, конститутивно активным. Эмбрионы дикого типа и мутантные не отличались друг от друга и развивались до стадии бластоцисты. Особенно интересно то, что в бластоцистах β Cat Δ Ex3 β -катенин располагался в области клеточной мембраны, но не в ядре или цитоплазме. Заметные различия отмечались на постимплантационных этапах. На стадии E6.5 эмбриональная доля мутантного зародыша была уменьшена в размере и выглядела как дезорганизованная масса клеток, в некоторых из них отмечалась локализация β -катенина в цитоплазме. При скрещивании β Cat Δ Ex3 животных с мышами, имеющими в геноме Wnt-репортер *bat-gal*, было показано, что на стадии E5.5 ряд клеток эпибласта содержит транскрипционно активный β -катенин, тогда как у эмбрионов дикого типа такие клетки появляются только на стадии E6.5.

Преждевременная экспрессия маркерных генов мезодермы, *snai 1*, *brachyury* и потеря E-кадгерина на стадии E6.5 говорит о том, что клетки эпибласта претерпевают ЭМП раньше срока. В мутантных эмбрионах отсутствовала мРНК *hex*, являющегося маркером дистальной висцеральной эндодермы, участвующий в образовании передне-задней оси зародыша. При агрегации с морулами мышей линии ROSA26 (экспрессирующими β -галактозидазу) клетки мутантных эмбрионов предпочтительно заселяли висцеральную эндодерму, мезодерму и экстраэмбриональные ткани, но не отмечались в эмбриональной эктодерме. При пересадке под капсулу почки клетки мутантных эмбрионов не образовывали характерных тератом и тератокарцином, состоящих из фрагментов тканей различных типов и недифференцированных клеток. Вместо этого они образовывали трубчатые структуры, состоящие из клеток неправильной формы, некоторые из которых имели ядерную локализацию β -катенина (Kemler et al., 2004).

В другом исследовании конструкцию *zp3-cre* использовали для удаления E-кадгерина (De Vries et al., 2004). Исследовали роль β -катенин- и E-кадгеринзависимой адгезии и Wnt-сигнального пути в ходе раннего эмбрионального развития. Экспрессия Δ N β -катенина приводила к тому, что при удалении *Zona pellucida* клетки диссоциировали, но экспрессия отцовского аллеля начиная с 4—6-клеточной стадии устраняла дефект адгезии. При отсутствии функционального E-кадгерина отцовский аллель начинал экспрессироваться на стадии морулы. Хотя в отсутствие функционального E-кадгерина β -катенин обнаруживался в цитоплазме и ядре, это не приводило к какому-либо заметному изменению фенотипа клеток, которое можно было бы ожидать, учитывая ядерные коактиваторные функции β -катенина. Если ядерный β -катенин не приводил к существенному изменению фенотипа, можно предположить, что Wnt-сигналинг в ядре не функционирует на ранних стадиях развития. Воздействие ингибитора протеасом MG132 приводило к увеличению уровня β -катенина в клетках, не экспрессирующих E-кадгерин, а это означает, что механизм протеасомной деградации функционирует на ранних стадиях развития (De Vries et al., 2004).

Приведенные данные говорят в пользу того, что на ранних этапах развития, включая стадию бластоцисты, из которой получают мЭСК, β -катенин либо не локализуется в ядре, либо не выполняет ожидаемой функции (активации транскрипции β -катенин—TCF—респонсивных генов). Выше уже было сказано, что активация Wnt— β -катенинового пути с помощью ингибитора киназы GSK3 β (BIO), по некоторым данным, способствует поддержанию плюрипотентного состояния мЭСК в отсутствие фактора LIF (Sato et al., 2004). Подавление активности GSK3 β приводит к стабилизации β -катенина, его транспорту в ядро и активации транскрипции генов-мишеней, в частности регуляторов клеточного цикла *c-myc* и *циклинаD1*. Известно, что дерегуляция Wnt-пути происходит в опухолях разного происхождения (Fukuchi et al., 1998; Sparks et al., 1998; Koch et al., 1999), а кроме того, активация этого пути характерна для пролиферирующих клеток-предшественников тканей (Reya et al., 2003; He et al., 2004).

Было показано, что добавление BIO в среду культивирования ЭСК мыши и человека позволяет сохранять их недифференцированное состояние, что подтверждается как экспрессией соответствующих маркеров (*Oct-4* и *Nanog*), так и сохранением потенциала к дифференцировке в клетках, культивируемых в присутствии BIO (Sato et al., 2004). Активация Wnt-пути после воздействия BIO подтверждалась в этой работе активацией репортерной конструкции *TopFlash*, содержащей сайты связывания транскрипционных факторов LEF/TCF. На линии ЭСК человека с помощью иммунофлуоресценции показали, что обработка BIO, так же как и лигандом Wnt-пути (Wnt3a), приводит к ядерной локализации β -катенина, однако на мЭСК этого показано не было (Sato et al., 2004). Эксперименты, проведенные нами, показывают, что в недифференцированных мЭСК β -катенин располагается возле мембраны, но не в ядрах клеток. Более того, обработка мЭСК BIO не приводит к накоплению β -катенина в ядре, хотя вызывает значительные изменения морфологии колоний мЭСК (рис. 5). После обработки BIO колонии мЭСК имеют недифференцированный фенотип, округленную форму, клетки в колониях расположены более плотно друг к другу (Чуйкин и др.,

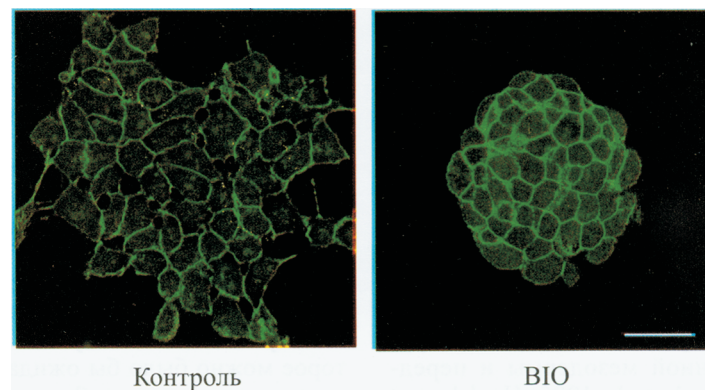


Рис. 5. Влияние ингибитора киназы GSK3 β (BIO) на локализацию β -катенина.

Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной локализации β -катенина до и после обработки мЭСК мыши 5 мкМ BIO в течение 1 сут. Масштабная линейка — 30 мкм.

2006). Вероятно, примембранная локализация β -катенина характерна для мЭСК и, по-видимому, свидетельствует о необходимости адгезионных контактов для поддержания клеток в недифференцированном состоянии. Межклеточные контакты, опосредованные E-кадгеринами, β -катенином и плакоглобином, необходимы для компактизации морулы (Ozawa et al., 1989) и, вероятно, играют важную роль в сохранении недифференцированного состояния мЭСК.

Известно, что в адгезионной культуре мЭСК предпочитают расти колониями, а при росте в суспензии клетки агрегируют, образуя эмбриоидные тела (Smith, 2001). Вероятно, межклеточные контакты влияют и на способность мЭСК дифференцироваться. Так, плотность культуры определяет эффективность дифференцировки мЭСК в нейроны (Otero et al., 2004).

Возможность, в мЭСК Wnt-сигнальный путь функционирует иначе, чем в соматических клетках. В одной из работ, исследующих профиль экспрессии генов в ЭСК мыши и человека, было показано, что в ЭСК не экспрессируется ключевой компонент деградации β -катенина — белок APC (Wei et al., 2005). Однако данные других работ не согласуются с этими результатами (Kielman et al., 2002; De Vries et al., 2004).

Считается, что ядерная локализация β -катенина в мЭСК может быть необходима для нейрональной дифференцировки, вызванной ретиноевой кислотой. Обработка Wnt3a, экспрессия стабилизированного β -катенина или доминантно-негативного E-кадгерина способствовали нейрональной дифференцировке (Otero et al., 2004).

Таким образом, данные литературы в большей степени указывают на то, что ядерная (сигнальная) функция β -катенина не важна для поддержания недифференцированного состояния мЭСК и внутренней клеточной массы бластоцисты. В ходе эмбрионального развития активация Wnt-пути необходима на более поздних этапах, например для реализации ЭМП при образовании клеток первичной мезодермы. В настоящее время остаются невыясненными механизмы, регулирующие функцию β -катенина в мЭСК, сигнальные пути, регулирующие его взаимодействие с белками межклеточной адгезии, а также направляющие β -катенин на деградацию. Также остается неясным, какие коактиваторы ядерной функции β -катенина присутствуют в мЭСК.

Заключение

В настоящее время исследование механизмов, обеспечивающих поддержание недифференцированного состояния и пролиферативную активность мЭСК, привлекает большое внимание. Установлено, что процессы активации и репрессии генов, зависящие от Oct-4, Nanog и других факторов транскрипции — маркеров плюрипотентности ЭСК, необходимы для поддержания плюрипотентности ЭСК. Таким образом, Oct-4, Nanog и ряд других факторов, взаимодействуя с корепрессорами и коактиваторами транскрипции, могут определять эпигенетический статус ЭСК, что необходимо для поддержания высокой пролиферативной активности мЭСК, конститутивной экспрессии позитивных регуляторов клеточного цикла и подавления экспрессии негативных регуляторов. Предположительно для мЭСК характерны постоянная и не регулируемая в ходе клеточного цикла активность циклин-киназных комплексов, включающих в себя киназу CDK2, а также гиперфосфорилированное состояние негативного регулятора клеточного цикла белка pRb. В свою очередь ингибитор циклин-киназных комплексов белок p21^{Waf1} экспрессируется в мЭСК на низком уровне, что может частично обуславливать отсутствие блока клеточного цикла после воздействий, нарушающих структуру ДНК.

В настоящее время нет полной ясности в том, какие сигнальные пути необходимы для поддержания недифференцированного состояния мЭСК. Достоверно установлено, что путь LIF—STAT3 *in vivo* необходим для сохранения внутренней клеточной массы в случае эмбриональной диапаузы, но при развитии эмбриона без задержки не является необходимым. Однако добавление фактора LIF необходимо для поддержания недифференцированного состояния мЭСК в культуре.

Предполагается, что кроме LIF—STAT3-пути в поддержание плюрипотентности мЭСК вовлечены PI3-киназный путь, BMP—SMAD-путь и Wnt-путь. Кроме фактора LIF для сохранения жизнеспособности мЭСК необходимо добавление в среду культивирования эмбриональной сыворотки. Показано, что при удалении сыворотки пролиферативная активность мЭСК сохраняется. В то же время установлено, что сигнальные пути, регулируемые ростовыми факторами, сопряжены с системой регуляции клеточного цикла. Возможно, эти сигнальные

пути могут оказывать сочетанное про-пролиферативное и антиапоптотическое действие. В связи с этим весьма интересно исследовать регуляцию клеточного цикла мЭСК при культивировании в среде с известным составом ростовых факторов и определить вклад этих факторов и активируемых ими сигнальных путей в регуляцию клеточного цикла мЭСК. Также весьма полезно исследовать про- и антиапоптотическое действие этих сигнальных путей. Одной из перспективных систем для этого может быть культивирование мЭСК в среде, содержащей факторы LIF и BMP.

Дальнейшие исследования необходимы для понимания функционирования в мЭСК Wnt-сигнального пути. В настоящее время остается открытым вопрос о том, необходим ли β -катенин в качестве коактиватора транскрипции для поддержания недифференцированного состояния мЭСК (в том числе для пролиферации). В то же время адгезия клеток, осуществляемая посредством E-кадгеринзависимых контактов, имеет большое значение в раннем эмбриогенезе. Может ли это означать, что в раннем эмбриогенезе наиважнейшее значение имеет адгезионная функция β -катенина? Авторы некоторых работ обращают внимание на то, что в мЭСК не экспрессируется ряд регуляторных молекул Wnt-пути. В связи с этим интересно исследовать, как в мЭСК осуществляется деградация белка β -катенина, в частности в результате фосфорилирования киназой GSK3 β . Принципиальное значение имеют идентификация и уровень экспрессии генов-мишеней Wnt-сигнального пути в мЭСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-49058) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Лянгузова М. С., Чуйкин И. А., Поспелов В. А. 2006. Фармакологические ингибиторы киназы PI3K вортманнин и LY294002 оказывают различное влияние на пролиферацию эмбриональных стволовых клеток мыши. Цитология. 48 (7) : 560—568.
- Малашичева А. Б., Кислякова Т. В., Саватьер П., Поспелов В. А. 2002. Эмбриональные стволовые клетки не вступают в арест клеточного цикла под воздействием ДНК-повреждающих факторов. Цитология. 44 (7) : 643—648.
- Чуйкин И. А., Лянгузова М. С., Поспелов В. А. 2006. Бета-катенин не локализуется в ядре недифференцированных эмбриональных стволовых клеток мыши. Докл. РАН. 411 (1) : 1—4.
- Abraham R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Develop. 15 : 2177—2196.
- Aladjem M. I., Spike B. T., Rodewald L. W., Hope T. J., Klemm M., Jaenisch R., Wahl G. M. 1998. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. Curr. Biol. 8 : 145—155.
- Anneren C., Cowan C. A., Melton D. A. 2004. The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal. J. Biol. Chem. 279 : 31 590—31 598.
- Austin T. W., Solar G. P., Ziegler F. C., Liem L., Matthews W. 1997. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. Blood. 89 : 3624—3635.
- Bierns M. 2004. β -Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. Curr. Biol. 15 : 64—66.
- Blais A., Dynlacht B. D. 2004. Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. Curr. Opin. Gen. Develop. 14 : 527—532.
- Bortvin A., Eggan K., Skaletsky H., Akutsu H., Berry D. L., Yanagimachi R., Page D. C., Jaenisch R. 2003. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. Development. 130 : 1673—1680.
- Brook F. A., Gardner R. L. 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. PNAS. 94 : 5709—5712.
- Bryja V., Pachernik J., Soucek K., Horvath V., Dvorak P., Hampl A. 2004. Increased apoptosis in differentiating p27-deficient mouse embryonic stem cells. Cell Mol. Life Sci. 61 : 1384—1400.
- Burdon T., Smith A., Savatier P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. Trends in Cell Biol. 12 : 432—438.
- Burdon T., Stracey C., Chambers I., Nichols J., Smith A. 1999. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. Develop. Biol. 210 : 30—43.
- Cartwright P., McLean C., Sheppard A., Rivett D., Jones K., Dalton S. 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development. 132 : 885—896.
- Cervantes R. B., Stringer J. R., Shao C., Tischfield J. A., Stambrook P. J. 2002. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. PNAS. 99 : 3586—3590.
- Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell. 113 : 643—655.
- Chambers I., Smith A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. Oncogene. 23 : 7150—7160.
- Chenn A., Walsh C. A. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. Science. 297 : 365—369.
- Daheron L., Opitz S. L., Zaehres H., Lensch W. M., Andrews P. W., Itskovitz-Eldor J., Daley G. Q. 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. Stem Cells. 22 : 770—778.
- De Vries W. N., Evsikov A. V., Fancher K. S., Kemler R., Solter D., Knowles B. B. 2004. Maternal β -catenin and E-cadherin in mouse development. Development. 131 : 4435—4445.
- Dorsky R. I., Moon R. T., Raible D. W. 1998. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. Nature. 396 : 370—373.
- Dunn K. J., Williams B. O., Li Y., Pavan W. J. 2000. Neural-crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development. PNAS. 97 : 10 050—10 055.
- Edme N., Downward J., Thiery J. P., Boyer B. 2002. Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways. J. Cell Sci. 115 : 2591—2601.
- Faast R., White J., Cartwright P., Crocker L., Sarcevic B., Dalton S. 2004. Cdk6-cyclin D3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16(INK4a). Oncogene. 23 : 491—502.
- Fingar D. C., Blenis J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene. 23 : 3151—3171.
- Fluckiger A., Marcy G., Marchand M., N'Égre D., Ois-Lo F., Cosset C., Mitalipov S., Wolf D., Savatier P., Dehay C. 2006. Cell cycle features of primata embryonic stem cells. Stem Cells. 24 : 547—556.
- Fukuda T., Ohtani T., Yoshida Y., Shirogane T., Nishida K., Nakajima K., Hibi M., Hirano T. 1998. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G₁ to S cell-cycle transition. EMBO J. 17 : 6670—6677.
- Fukuchi T., Sakamoto M., Tsuda H., Maruyama K., Nozawa S., Hirohashi S. 1998. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. Cancer Res. 58 : 3526—3528.
- Gat U., DasGupta R., Degenstein L., Fuchs E. 1998. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin. Cell. 95 : 605—614.
- Gidekel S., Bergman Y. 2002. A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. J. Biol. Chem. 277 : 34 521—34 530.

- Gross V. S., Hess M., Cooper G. M. 2005. Mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos require signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to suppress apoptosis. *Mol. Reprod. Develop.* 70 : 324—332.
- Haegel H., Larue L., Ohsugi M., Fedorov L., Herrenknecht K., Kemler R. 1995. Lack of b-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development.* 121 : 3529—3537.
- Hanna L. A., Foreman R. K., Tarasenko I. A., Kessler D. S., Labosky P. A. 2002. Requirement for *Foxd3* in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Develop.* 16 : 2650—2661.
- Hari L., Brault V., Kleber M., Lee H. Y., Ille F., Leimeroth R., Paratore C., Suter U., Kemler R., Sommer L. 2002. Lineage-specific requirements of b-catenin in neural crest development. *J. Cell Biol.* 159 : 867—880.
- Hattori N., Nishino K., Ko Y. G., Hattori N., Ohgane J., Tanaka S., Shiota K. 2004. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J. Biol. Chem.* 279 : 17 063—17 069.
- Hay D. C., Sutherland L., Clark J., Burdon T. 2004. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 22 : 225—235.
- He T. C., Sparks A. B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L., Morin P. J., Vogelstein B., Kinzler K. W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 281 : 1509—1512.
- He X. C., Zhang J., Tong W. G., Tawfik O., Ross J., Scoville D. H., Tian Q., Zeng X., He X., Wiedemann L. M., Mishina Y., Li L. 2004. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 36 : 1117—1121.
- Hecht A., Vlemineck K., Stemmler M. P., Van Roy F., Kemler R. 2000. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of b-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19 : 1839—1850.
- Hochedlinger K., Yamada Y., Beard K., Jaenisch R. 2005. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell.* 121 : 465—477.
- Hong Y., Stambrook P. J. 2004. Restoration of an absent G₁ arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *PNAS.* 101 : 14 443—14 448.
- Huelsken J., Vogel R., Brinkmann V., Erdmann B., Birchmeier C., Birchmeier W. 2000. Requirement for b-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J. Cell Biol.* 148 : 567—578.
- Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., Cotsarelis G., Birchmeier W. 2001. b-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell.* 105 : 533—545.
- Israsena N., Hu M., Fu W., Kan L., Kessler J. A. 2004. The presence of FGF2 signaling determines whether b-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Develop. Biol.* 268 : 220—231.
- Jirmanova L., Afanassieff M., Gobert-Gosse S., Markossian S., Savatier P. 2002. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G₁/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene.* 21 : 5515—5528.
- Jones S. M., Kazlauskas A. 2001. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett.* 490 : 110—116.
- Kemler R., Hierholzer A., Kanzler B., Kuppig S., Hansen K., Taketo M. M., de Vries W. N., Knowles B. B., Solter D. 2004. Stabilization of β -catenin in the mouse zygote leads to premature epithelial-mesenchymal transition in the epiblast. *Development.* 131 : 5817—5824.
- Kemp C., Willems E., Abdo S., Lambiv L., Leyns L. 2005. Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Develop. Dyn.* 233 : 1064—1075.
- Kielman M. F., Rindapaa M., Gaspar C., van Poppel N., Breukel C., van Leeuwen S., Taketo M. M., Roberts S., Smits R., Fodde R. 2002. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 32 : 594—605.
- Kleber M., Sommer L. 2004. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 : 681—687.
- Koch A., Denkhaus D., Albrecht S., Leuschner I., von Schweinitz D., Pietsch T. 1999. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res.* 59 : 269—273.
- Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P. J., Clevers H. 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* 19 : 379—383.
- Korinek V., Barker N., Morin P. J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K. W., Vogelstein B., Clevers H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC⁻/colon carcinoma. *Science.* 275 : 1784—1787.
- Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S. Y., Sue-mori H., Nakatsuji N., Tada T. 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell Biol.* 25 : 2475—2485.
- Lee T. I., Jenner R. G., Boyer L. A., Guenther M. G., Levine S. S., Kumar R. M., Chevalier B., Johnstone S. E., Cole M. F., Isono K., Koseki H., Fuchikami T., Abe K., Murray H. L., Zucker J. P., Yuan B., Bell G. W., Herbolsheimer E., Hannett N. M., Sun K., Odum D. T., Otte A. P., Volkert T. L., Bartel D. P., Melton D. A., Gifford D. K., Jaenisch R., Young R. A. 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* 125 : 301—313.
- Levanon D., Goldstein R. E., Bernstein Y., Tang H., Goldenberg D., Stifani S., Paroush Z., Groner Y. 1998. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *PNAS.* 95 : 11 590—11 595.
- Li M., Sendtner M., Smith A. 1995. Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature.* 378 : 724—727.
- Liu P., Wakamiya M., Shea M. J., Albrecht U., Behringer R. R., Bradley A. 1999. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat. Genet.* 22 : 361—365.
- Lloyd S., Fleming T. P., Collins J. E. 2003. Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development. *Gene Exp. Patterns.* 3 : 309—312.
- Loh Y., Wu Q., Chew J., Vega W. B., Zhang W., Cheng X., Bo-urque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K., Sung K. W., Lee C. W. H., Zhao X., Chiu K., Lipovich L., Kuznetsov V. A., Robson P., Stanton L. W., Wei C., Ruan Y., Lim B., Ng H. 2006. The Oct-4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38 : 431—440.
- Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T., Yokota T. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 18 : 4261—4269.
- Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 113 : 631—642.
- Moon R. T., Kohn A. D., De Ferrari G. V., Kaykas A. 2004. Wnt and beta-catenin signaling: disease and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5 : 689—699.
- Morin P. J. 1999. Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays.* 21 : 1021—1029.
- Muller T., Choidas A., Reichmann E., Ullrich A. 1999. Phosphorylation and free pool of β -catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J. Biol. Chem.* 274 : 10 173—10 183.
- Murakami M., Ichisaka T., Maeda M., Oshiro N., Hara K., Edenhofer F., Kiyama H., Yonezawa K., Yamanaka S. 2004. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 24 : 6710—6718.
- Nakashima K., Wiese S., Yanagisawa M., Arakawa H., Kimura N., Hisatsune T., Yoshida K., Kishimoto T., Sendtner M., Taga T. 1999. Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J. Neurosci.* 19 : 5429—5434.

- Nelson W. J., Nusse R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 303 : 1483—1487.
- Nichols J., Chambers I., Taga T., Smith A. 2001. Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development*. 128 : 2333—2339.
- Nichols J., Davidson D., Taga T., Yoshida K., Chambers I., Smith A. 1996. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech. Develop.* 57 : 123—131.
- Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Develop.* 12 : 2048—2060.
- Niwa H., Miyazaki J., Smith A. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24 : 372—376.
- Niwa H., Toyooka Y., Shimosato D., Strumpf D., Takahashi K., Yagi R., Rossant J. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell*. 123 : 917—929.
- Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., Sakai M., Muramatsu M., Hamada H. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*. 60 : 461—472.
- Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280 : 5307—5317.
- Otero J. J., Fu W., Kan L., Cuadra A. E., Kessler J. A. 2004. β -Catenin signaling is required for neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Development*. 131 : 3545—3557.
- Ozawa M., Baribault H., Kemler R. 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8 : 1711—1717.
- Paling N. R., Wheadon H., Bone H. K., Welham M. J. 2004. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 279 : 48 063—48 070.
- Pesce M., Scholer H. R. 2001. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. 19 : 271—278.
- Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Develop.* 14 : 1837—1851.
- Polesskaya A., Sealex P., Rudnicki M. A. 2003. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*. 113 : 841—852.
- Qi X., Li T., Hao J., Hu J., Wang J., Simmons H., Miura S., Mishina Y., Zhao G. 2004. BMP supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *PNAS*. 101 : 6027—6032.
- Reya T., Duncan A. W., Ailles L., Domen J., Scherer D. C., Willert K., Hintz N., Nussek R., Weissman I. L. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 423 : 409—414.
- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414 : 105—111.
- Roose J., Molenaar M., Peterson J., Hurenkamp J., Brantjes H., Moerer P., van de Wetering M., Destree O., Clevers H. 1998. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*. 395 : 608—612.
- Sato N., Meijer L., Scaltsounis L., Greengard P., Brivanlou A. H. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10 : 55—63.
- Savatier P., Huang S., Szekely L., Wiman K. G., Samarut J. 1994. Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene*. 9 : 809—818.
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsvan L. A., Rudkin B. B., Samarut J. 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*. 12 : 309—322.
- Schratt G., Weinhold B., Lundberg A. S., Schuck S., Berger J., Schwarz H., Weinberg R. A., Ruther U., Nordheim A. 2001. Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 21 : 2933—2943.
- Sherr C. J., Roberts J. M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Develop.* 13 : 1501—1512.
- Silva J., Chambers I., Pollard S., Smith A. 2006. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*. 441 : 997—1001.
- Smith A. G. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and man. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 17 : 435—462.
- Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M., Rogers D. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336 : 688—690.
- Sparks A. B., Morin P. J., Vogelstein B., Kinzler K. W. 1998. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/TCF pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58 : 1130—1134.
- Stead W., White J., Faast R., Conn S., Goldstone S., Rathjen J., Dhingra U., Rathjen P., Walker D., Dalton S. 2002. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene*. 21 : 8320—8333.
- Stewart C. L., Kaspar P., Brunet L. J., Bhatt H., Gadi I., Kontgen F., Abbondanzo S. J. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 359 : 76—79.
- Sun H., Lesche R., Li D. M., Lienthal J., Zhang H., Gao J., Gavrilova N., Mueller B., Liu X., Wu H. 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *PNAS*. 96 : 6199—6204.
- Takahashi K., Mitsui K., Yamanaka S. 2003. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 423 : 541—545.
- Tetsu O., McCormick F. 1999. b-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 398 : 422—426.
- Van Den Berg D. J., Sharma A. K., Bruno E., Hoffman R. 1998. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoieses. *Blood*. 92 : 3189—3202.
- Wang Q. T., Piotrowska K., Ciemerych M. A., Milenkovic L., Scott M. P., Davis R. W., Zernicka-Goetz M. A. 2004. Genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Develop. Cell*. 6 : 133—144.
- Ware C. B., Horowitz M. C., Ren B. R., Hunt J. S., Liggitt D., Koblar S. A., Gliniak B. C., McKenna H. J., Papayannopoulou T., Thoma B. 1995. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*. 121 : 1283—1299.
- Watanabe S., Umehara H., Murayama K., Okabe M., Kimura T., Nakano T. 2006. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*. 25 : 156—163.
- Wei C. L., Miura T., Robson P., Lim S., Xu X., Li M. Y., Gupta S., Stanton L., Luo Y., Schmitt J., Thies S., Wang W., Khrebtkova I., Zhou D., Liu E. T., Ruan Y. J., Rao M., Lim B. 2005. Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. *Stem Cells*. 23 : 166—185.
- Whitehead I., Kirk H., Kay R. 1995. Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries. *Mol. Cell Biol.* 15 : 704—710.
- Wiles M. V., Johansson B. M. 1999. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp. Cell Res.* 247 : 241—248.
- Williams R. L., Hilton D. J., Pease S., Willson T. A., Stewart C. L., Gearing D. P., Wagner E. F., Metcalf D., Nicola N. A., Gough N. M. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 336 : 684—687.
- Wodarz A., Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 14 : 59—88.

Wong M. H., Rubinfeld B., Gordon J. I. 1998. Effects of forced expression of an NH₂-terminal truncated b-catenin on mouse intestinal epithelial homeostasis. *J. Cell. Biol.* 141 : 765—777.

Yamane T., Dylla S. J., Muijtjens M., Weissman I. L. 2005. Enforced Bcl2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal. *PNAS.* 102 : 3312—3317.

Ying Q., Nichols J., Chambers I., Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 115 : 281—292.

Yokogami K., Wakisaka S., Avruch J., Reeves S. A. 2000. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr. Biol.* 10 : 47—50.

Yoshida K., Taga T., Saito M., Suematsu S., Kumanogoh A., Tanaka T., Fujiwara H., Hirata M., Yamagami T., Nakahata T., Hirabayashi T., Yoneda Y., Tanaka K., Wang W. Z., Mori C., Shio-ta K., Yoshida N., Kishimoto T. 1996. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *PNAS.* 93 : 407—411.

Zhang J. G., Owczarek C. M., Ward L. D., Howlett G. J., Fabri L. J., Roberts B. A., Nicola N. A. 1997. Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem. J.* 325 : 693—700.

Zhu A. J., Watt F. M. 1999. Beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development.* 126 : 2285—2298.

Поступила 25 XII 2006

SIGNALING PATHWAYS REGULATING PROLIFERATION OF MURINE EMBRYONIC STEM CELLS

I. A. Chuykin,¹ M. S. Lianguzova, V. A. Pospelov

Institute of Cytology RAN, St. Petersburg; ¹ e-mail: chuykin79@mail.ru

Murine embryonic stem cells (mESC) are capable of unlimited proliferation with maintenance of pluripotency during long-term cultivation. Signaling pathways regulating the cell cycle of mESC are of the great interest for further investigation. This review concerns to the cell cycle regulation of mESC through different signaling pathways (LIF—STAT3, PI3K—Akt, Wnt— β -catenin) and to the mechanisms of unlimited proliferation of mESC and their inability to undergo long-term block of proliferation in response to DNA-damaging and stress factors. The functioning of negative cell cycle regulators (cyclin-kinase inhibitors and Rb) and positive cell cycle regulators (cyclin-kinase complexes and E2F factors) are also topics of this review. It is considered that, permanent mitogenic stimuli are needed to prevent induction of apoptosis. Therefore, the agents which cause prolonged halt of proliferation without ongoing onset of differentiation or induction of apoptosis are currently unknown. The main focus is given to the role of the Wnt signaling pathway in sustaining the pluripotent state of mESC. The cell cycle regulation by downstream targets of LIF—STAT3, PI3-kinase and Wnt— β -catenin pathways is discussed in light of cooperative action of these pathways for maintenance of undifferentiated state of mESC.