

## ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© А. С. Григорян, П. В. Кругляков

ООО «Транс Технологии», Санкт-Петербург;  
электронный адрес: [anait@alkorbio.ru](mailto:anait@alkorbio.ru)

В течение уже нескольких десятилетий эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК) используются в качестве модельного объекта для изучения эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК). Обоснованность использования такого объекта до сих пор остается недоказанной. В то же время в научной литературе к настоящему времени накопилось немало данных, свидетельствующих о серьезных различиях этих клеток. Анализ литературы показал, что эти различия касаются некоторых особенностей регуляции процессов пролиферации, поддержания самообновления и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Таким образом, мЭСК могут рассматриваться в качестве модельного объекта изучения чЭСК применительно лишь к некоторым аспектам их биологии. Также в обзоре кратко рассмотрены некоторые альтернативные модельные объекты, такие как ЭСК приматов.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки мыши, эмбриональные стволовые клетки человека, применение ЭСК, маркеры ЭСК, дифференцировка ЭСК.

**Принятые сокращения:** ВКМ — внутренняя клеточная масса (бластоцисты), ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, мЭСК — эмбриональные стволовые клетки мыши, чЭСК — эмбриональные стволовые клетки человека.

К настоящему времени в различных специализированных изданиях было опубликовано около 4000 работ, посвященных биологии эмбриональных стволовых клеток мыши (мЭСК), в которых эти клетки использовались в качестве модельного объекта для изучения эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК). Такой выбор вполне объясним, так как мышь — один из классических объектов экспериментальной биологии, с использованием которого за последнее столетие было проведено около 1 млн исследований в областях клеточной биологии, генетики, эмбриологии и медицины (данные US National Library of Medicine, <http://www.nlm.nih.gov>).

Однако в какой степени и можно ли в принципе считать эмбриональные стволовые клетки мыши адекватным модельным объектом для изучения эмбриональных стволовых клеток человека? Окончательного ответа на этот вопрос пока не получено. Возможно, по большей части это связано с этическими проблемами, неизбежно возникающими при работе чЭСК. Это вынуждает отказываться от реального объекта в пользу его моделей и выбора среди них наиболее подходящей или наиболее изученной. Действительно, следует отметить, что мЭСК в настоящее время не считаются единственно приемлемой моделью процессов, происходящих с чЭСК. В пользу этого утверждения можно привести недавнюю работу, в которой стволовые клетки эпибласта мышьиного эмбриона после имплантации были названы более удобной моделью для изучения чЭСК, нежели собственно мЭСК, получаемые из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты (Tesar et al., 2007). Трудно сделать вывод, основываясь на

единичной публикации, однако сам факт постановки задачи поиска новых моделей изучения чЭСК свидетельствует об актуальности данной темы.

Современную науку в целом характеризует возрастающее значение интерпретативной деятельности исследователя, и значение для нее моделей невозможно переоценить. В этом контексте всякая модель является метафорой реального процесса и, следовательно, обладает определенной степенью отражения свойств изучаемого с ее помощью объекта. Право модели на существование определяется ее адекватностью при оценке того или иного процесса, и чем сложнее изучаемый процесс, тем более высокие требования предъявляются к его модели. В области клеточной биологии, биохимии и генетики широко распространены, например, методы изучения тех или иных процессов на иммортализованных клеточных линиях (Sinz, Kim, 2006). Большинство таких моделей узкоспециализированны и служат для изучения отдельно взятого процесса, метаболического или сигнального пути и проч. В случае с мЭСК и чЭСК речь идет о более общей модели, которая может быть эффективна не во всех случаях ее использования.

На мЭСК изучают все аспекты биологии чЭСК как на общем, так и на уровне частностей. Кажется очевидным, что на уровне феноменологии процессов пролиферации, поддержания свойств «стволовости» и дифференцировки эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) двух видов практически не отличаются друг от друга. Но в то же время вывод о синонимичности регуляции этих процессов не столь очевиден.

Цель настоящего обзора — провести сравнительный анализ накопившихся в литературе данных об ЭСК двух рассматриваемых видов, выявив их сходства и различия как на уровне внешней регуляции поведения клеток в культурах и при трансплантациях в организм реципиента, так и на уровне внутриклеточных процессов, характерных исключительно для ЭСК и служащих для поддержания их основных свойств — плюрипотентности и самообновления популяции. Такой анализ может позволить говорить о корректности экстраполяции данных, полученных в экспериментах с мЭСК, на клетки человека.

### История вопроса

В 1998 г. в журнале «Science» были опубликованы результаты работы исследователей из группы Джеймса Томсона (Thomson et al., 1998), которым удалось изолировать первую в мире самообновляющуюся линию плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток человека, полученных из невоплощенных бластоцист, хранившихся в клиниках для лечения бесплодия. Эти клетки обладали способностью к неограниченной пролиферации в культуре и к разнонаправленной дифференцировке при изменении условий культивирования. Несмотря на очевидный потенциал чЭСК в сфере регенеративной медицины в связи с их способностью дифференцироваться во все специализированные типы клеток эмбриона и взрослого организма, это открытие привело к возникновению споров, связанных с правомерностью использования эмбрионов человека в исследовательских и — в перспективе — в клинических целях. Некоторые европейские страны, в том числе Германия, Австрия и Ирландия, ввели запрет на определенные виды исследований эмбриональных клеток человека; в других государствах, таких как США, были наложены строгие ограничения на государственное финансирование научных проектов, связанных с такого рода исследованиями. На 2005 г. в связи с этими ограничениями в мире существовало всего 155 линий чЭСК (Weiss, 2005).

Этические проблемы исследований чЭСК касаются как их получения, так и методов характеристики, поддержания в культурах *in vitro*, направленной дифференцировки и последующей трансплантации в организм реципиента. Противники исследований ЭСК, полученных из ВКМ человека, настаивают на использовании в лабораторных экспериментах клеток, обладающих близкими с чЭСК свойствами. Для получения таких клеток используют несколько методических подходов.

1. Репрограммирование ядра дифференцированной соматической клетки посредством ее слияния с ЭСК. До сегодняшнего дня, однако, не разработано метода полного селективного удаления из полученной клетки всех хромосом ЭСК (Cowan et al., 2005).

2. Получение ЭСК из «подобных бластоцисте структур». Этот метод включает в себя перенос ядра соматической клетки в зиготу *in vitro* и последующее выделение из развивающейся бластоцистоподобной структуры плюрипотентных клеток (Hurlbut, 2005). При этом осуществляют искусственное подавление экспрессии некоторых генов, например гена *Cdx2*, отвечающего за дифференцировку чЭСК в клетки трофобласты (Niwa et al., 2005) для ограничения потенциальной способности стволовых клеток формировать полноценный эмбрион *in vivo* (Meisner, Jaenisch, 2006).

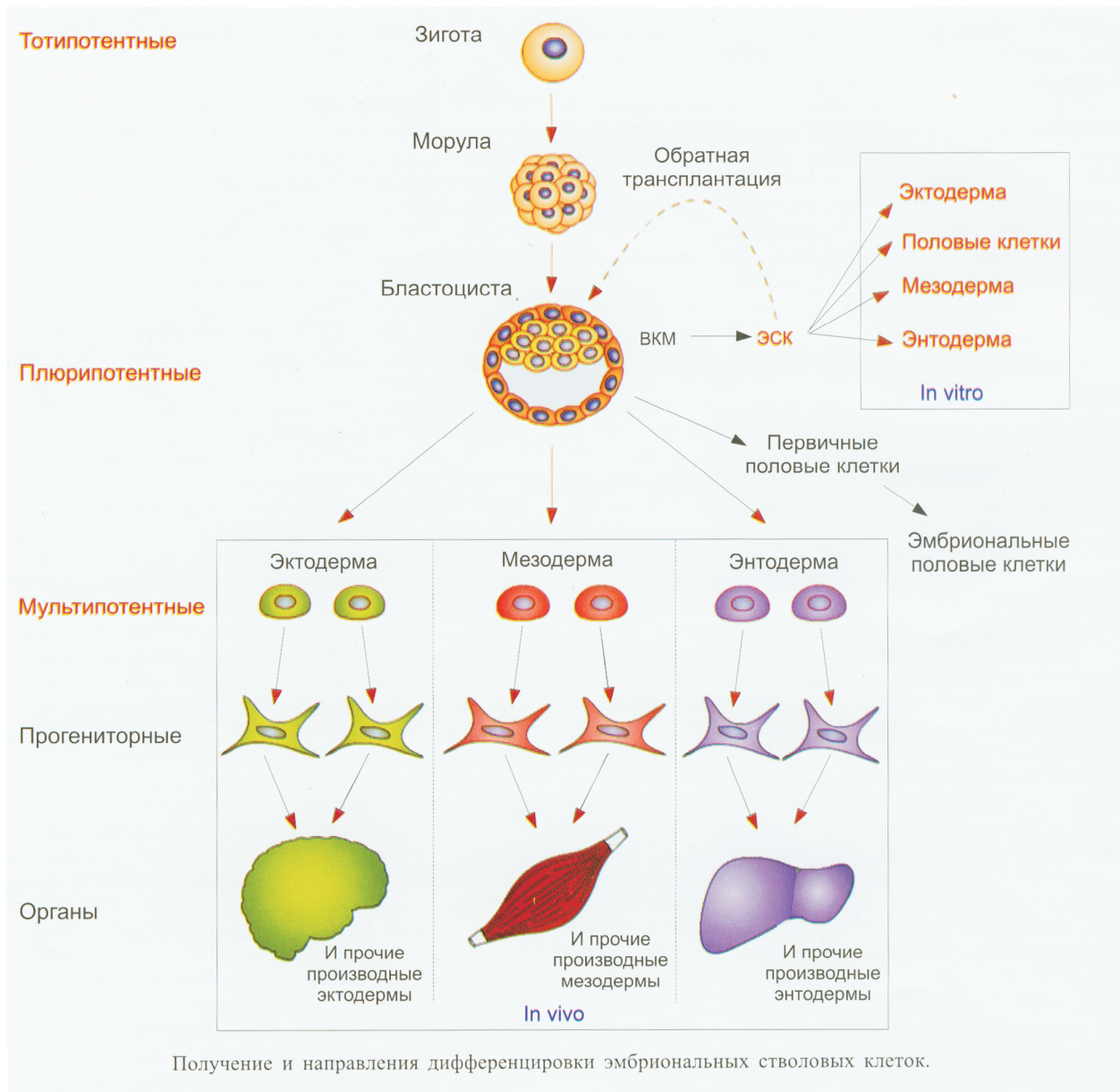
3. Получение линий чЭСК из отдельных бластомеров, выделенных из бластоцисты. Используемые в этом методе бластоцисты являются продуктом экстракорпорального оплодотворения (Klimanskaya et al., 2006). Данный метод получения и культивирования чЭСК также с успехом применялся в нашей стране (Крылова и др., 2003, 2005).

4. Получение чЭСК-подобных клеток посредством индукции дедифференцировки соматических клеток с помощью реактивации экспрессии генов, отвечающих за плюрипотентность. К таким генам в случае клеток человека относятся группы Oct-4, Sox-2, Nanog и Lin-28 (Yu et al., 2007) либо Oct-4, Sox-2, c-Myb и Klf-4 (Takahashi, Yamanaka, 2007). Несмотря на отмеченные авторами работ сходства таких индуцированных чЭСК-подобных клеток и истинных чЭСК, нельзя говорить об их полной идентичности. Получение индуцированных чЭСК-подобных клеток требует ретровирусной либо лентивирусной трансфекции соматических клеток, что резко ограничивает возможность их применения в клинических целях в связи с потенциальной онкогенностью трансфицированных культур (Hanna et al., 2007).

Как видно из краткого описания методов, различные типы чЭСК-подобных клеток не могут считаться полностью адекватными моделями для исследований чЭСК, а «чЭСК», полученные альтернативными методами, имеют серьезные ограничения в области их практического (клинического) применения. В связи с этим большое количество исследований чЭСК проводятся на клетках животных, в частности на ЭСК, полученных из ВКМ бластоцисты мыши. Данные, полученные в таких работах, затем экстраполируются на процессы, происходящие в эмбриональных стволовых клетках человека. Следует отметить, что ЭСК мыши были получены гораздо раньше, чем ЭСК человека (Evans, Kaufman, 1981). При этом авторы руководствовались еще более ранней методикой, с помощью которой в 1966 г. были выделены ЭСК из бластоцист кроликов (Cole et al., 1966). В 2007 г. Мартин Эванс (Martin Evans) был удостоен Нобелевской премии в сфере медицины и физиологии за неоценимый вклад в разработку моделей заболеваний человека с помощью специфических генетических модификаций мЭСК (Deb, Sarda, 2008).

Таким образом, биология ЭСК некоторых видов млекопитающих, главным образом мыши, изучена гораздо глубже, нежели биология ЭСК человека. В то же время большинство работ, в которых сравниваются ЭСК двух этих видов, касаются частных моментов — в основном сравнения транскриптомов и протеомов. Очевидно, что транскрипция гена и присутствие в клетке матричной РНК того или иного белка не всегда означают наличие в клетке данного белка и его активность (Wei et al., 2005). То же можно сказать и об анализе белкового профиля этих клеток (Van Hoof et al., 2006) — не обладая исчерпывающей информацией о функциях белка и его роли во внутриклеточных сигнальных системах, можно говорить только о фактических сходствах и различиях двух типов ЭСК, но не о существенных сходствах работы внутриклеточных систем.

На данный момент огромный массив фактических данных, накопившихся в такого рода «скрининговых» работах, все еще не может быть полностью интерпретирован в связи с недостатком информации о конкретных генах и их продуктах. Вместе с тем не существует и работ, в которых были бы проведены попытки последовательного сравнения мЭСК с чЭСК на основании тех данных, которые могут быть вполне однозначно интерпретированы и



Получение и направления дифференцировки эмбриональных стволовых клеток.

на основании которых можно хотя бы в первом приближении решить вопрос о правомерности экстраполяции результатов экспериментов с мЭСК на биологию чЭСК.

### Культуры мЭСК и чЭСК

Под изоляцией ЭСК понимают перенос клеток внутренней клеточной массы эмбриона на стадии бластоцисты в культуру *in vitro* (см. рисунок). Следует особо отметить, что поведение клеток ВКМ *in vivo* и ЭСК *in vitro* существенно различается. Главной характеристикой ЭСК считается их плюрипотентность, т. е. способность дифференцироваться во все известные типы клеток эмбриона и взрослого организма, а все клетки в культуре считаются идентичными. Этого нельзя сказать о клетках ВКМ, отдельные субпопуляции которых дифференцируются в строго определенных направлениях за счет присутствия морфогенов. Основную роль в ВКМ играют белки из семейства BMP (bone morphogenetic proteins), Wnt (wingless

and integration site growth factor) и Shh (sonic hedgehog). Важную морфогенетическую роль играют особенности пространственного взаиморасположения клеток в бластоцисте и их взаимодействие с окружающей трофэктодермой (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Vuehr, Smith, 2003).

Что касается мЭСК, то стабильные популяции, способные к неограниченной пролиферации в культурах, были получены только для двух линий мышей — 129 (129/Ola и 129/Sv) и C57BL/6. Стандартные протоколы их выделения и культивирования были сформулированы в 1996—1997 гг. и с тех пор практически не изменились (McWhir et al., 1996; Brook, Gardner, 1997). Следует отметить, что при длительном культивировании мЭСК других линий были продемонстрированы их генетическая нестабильность и снижение со временем доли эуплоидных клеток в культуре (Миталипов и др., 1994). Причины, по которым не удается получить стабильные популяции ЭСК от прочих линий мышей, кроме двух указанных, и некоторых других видов животных, остаются на протяжении многих лет невыясненными. Клетки, выделенные из ВКМ



мышцы, обладают высокой клоногенной способностью (Brook, Gardner, 1997). Обладают ли такой способностью отдельные клетки, выделенные из ВКМ бластоцист человека, остается неизвестным, так как для получения чЭСК используется цельная интактная ВКМ (Avery et al., 2006).

В культуре мЭСК требуют либо фидерного слоя (конфлюэнтной монослойной культуры эмбриональных мышечных фибробластов с заблокированной облучением либо химическими агентами митотической активностью), либо присутствия в среде культивирования фактора LIF (leukemia inhibitory factor). LIF — растворимый гликопротеин из цитокинового семейства IL-6, который приводит к активации в клетках сигнального пути через рецептор gp130 и факторы JAK/STAT-1/3, затем запускающие сигнальный каскад через MAP-киназы (Burdon et al., 1999a, 1999b). Родственные LIF цитокины, включая IL-6, IL-11, OSM (oncostatin-M), CNTF (ciliary neurotrophic factor) и CT-1 (cardiotrophin-1), также способствуют поддержанию культур мЭСК *in vitro* (Niwa et al., 1998). Их присутствие способствует самообновлению мЭСК, экспрессии маркеров плюрипотентности (главным образом Oct4) и блокированию спонтанной дифференцировки (Buehr et al., 2002). В отсутствие цитокинов из семейства IL-6 и фидера, а также при искусственном блокировании активности сигнальной молекулы STAT3 мЭСК претерпевают спонтанную разнонаправленную дифференцировку (Voicuf et al., 1997).

Свойства мЭСК позволяют широко использовать эти клетки в решении фундаментальных вопросов биологии развития, генетики и биотехнологии. В настоящее время они считаются удобной моделью для изучения таких процессов, как инактивация X-хромосомы, а также тестирования эффектов биологически активных и потенциально токсичных субстанций *in vitro* (Keller, 1995; Thomson et al., 1998; Heard et al., 1999). мЭСК используются также для получения трансгенных животных, незаменимых в исследованиях наследственных генетических заболеваний человека (Clarke, 1994).

Некоторые авторы считают, что мЭСК могут служить объектом моделирования процессов дифференцировки чЭСК и что условия их культивирования, обеспечивающие образование из мЭСК специализированных клеток, могут быть перенесены на чЭСК (Sukoyan et al., 2002). В то же время нельзя не отметить различий в транскриптомах этих клеток, а также и в их поведении в культурах.

Экспрессия внутриклеточных и поверхностных маркеров мЭСК и чЭСК. ЭСК мышцы и человека различаются экспрессией поверхностных антигенов (табл. 1). Так, стадийноспецифический эмбриональный антиген-1 (stage-specific embryonic antigen-1, SSEA-1) экспрессируется мЭСК, и его экспрессия постепенно снижается по мере дифференцировки клеток, в то время как для чЭСК было показано обратное: SSEA-1 вовсе не экспрессируется ими до их коммитации к дифференцировке, а его экспрессия наблюдается в уже предифференцированных клетках. Для каждого типа клеток показаны как уникальные маркеры (например, поверхностные маркеры SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 и GCTM2 экспрессируются исключительно чЭСК человека; Voiani, Scholer, 2005), так и общие, среди которых — маркеры плюрипотентности Oct-4 (Niwa, 2000), Nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Hart et al., 2004), Sox-2 (Yuan et al., 1995; Avilion et al., 2003) и Utf-1 (Sato et al., 2003), экспрессирующиеся как ЭСК человека, так и мышцы и харак-

теризующиеся в пределах двух этих видов высокой консервативностью.

Сравнительный анализ протеомов и экспрессии как поверхностных, так и внутриклеточных маркеров чЭСК и мЭСК показал, что наборы белков, присутствующих в ЭСК двух видов, существенно различаются.

Факторы, определяющие уникальные свойства ЭСК. Сравнение транскриптомов, т. е. наборов экспрессируемых генов мЭСК и чЭСК, позволяет предположить, что пути поддержания уникальных «стволовых» свойств в ЭСК двух видов различны. В 2004 г. был проведен сравнительный анализ экспрессии около 400 генов в ЭСК мышцы и человека. Примерно четверть из проанализированных генов имели серьезные различия в экспрессии (Ginis et al., 2004). Более поздние исследования продемонстрировали, что в мышечных и человеческих ЭСК существенно (т. е. даже не в разы, а на порядки) различаются уровни экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в передачу внутриклеточных сигналов от таких факторов, как LIF, TGF- $\beta$ , Wnt и FGF2, не считая генов метаболических белков, белков внеклеточного матрикса и цитоскелета (Wei et al., 2005). На основании этих данных авторы заключили, что ЭСК человека и мышцы принципиально различны на уровне регуляции таких процессов, как пролиферация, апоптоз, самообновление популяции и поддержание такого уникального свойства эмбриональных клеток, как плюрипотентность.

В связи с этим следует несколько подробнее остановиться на работе факторов плюрипотентности в ЭСК, к которым относятся упомянутые ранее Oct-4, Sox-2 и Nanog. Эти белки связываются как с транскрипционно активными, так и с неактивными генами в ЭСК мышцы и человека. Активные гены включают в себя сами Oct4, Sox2 и Nanog и такие гены, как *Rif1*, необходимый для работы фермента теломеразы и поддержания постоянной длины теломеров хромосом в ЭСК (Adams, McLaren, 2004; Rodda et al., 2005), *Jarid2* и *Smarca1*, считающиеся важными регуляторами эмбрионального развития (Schoor et al., 1993; Jung et al., 2005), но их роль в поддержании плюрипотентности неясна. Интересно отметить, что большинство неактивных генов, с которыми взаимодействуют Sox2, Nanog и Oct4, связано со спецификой направлений дифференцировки ЭСК (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2005).

Sox-2, Nanog и Oct-4, по-видимому, являются прямыми регуляторами активностей всей иерархии транскрипционных факторов, последовательно активирующихся в процессе дифференцировки не только в производные трех зародышевых листков, но и во внезародышевые ткани. В то же время каждый из этих белков взаимодействует с промоторными участками генов остальных факторов плюрипотентности, включая фактор FoxD3, активирующий экспрессию гена *Nanog* (Pan et al., 2006).

Сравнение генов-мишеней *Nanog* и *Oct4* показывает существенные различия в контроле свойств ЭСК у двух рассматриваемых видов. Например, два гена, ответственных за дифференцировку ЭСК в нейрональном и кардиомиоцитарном направлениях, *HAND1* и *MYST3*, находятся под контролем *Nanog* и *Oct4* исключительно в чЭСК, в то время как ген *Esrrb* (estrogen-related receptor b) обнаруживается только в мЭСК. Следует отметить, что, хотя ген *Hand1* не имеет сайта связывания *Ocz-4* и *Nanog* в мЭСК, при подавлении экспрессии *Esrrb* и *Rif1* с помощью РНК-интерференции в данных клетках наблюдается по-

Таблица 1

Сравнение экспрессии некоторых маркеров ЭСК мыши и ЭСК человека  
(по: Wobus et al., 2005; Van Hoof et al., 2006; Прыжова и др., 2004, с дополнениями;  
также относительно чЭСК см.: Никольский и др., 2007)

Маркеры	ЭСК мыши	ЭСК человека	Литературный источник
SSEA-1	+	–	Solter, Knowles, 1978; Крылова и др., 2003
SSEA-3/4	–	+	Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000; Xu et al., 2001; Henderson et al., 2002
TRA-1-60/81	–	+	То же
TRA-2-54	–	+	Henderson et al., 2002
GCTM-2	–	+	Pera et al., 2000; Reubinoff et al., 2000
TG 343	?	+	Henderson et al., 2002
TG 30	?	+	Pera et al., 2000
CD 9	+	+	То же
CD 133/prominin	+	+	Carpenter et al., 2004; Kania et al., 2005
Щелочная фосфатаза	+	+	Wobus et al., 1984; Thomson et al., 1998
Ost-4	+	+	Thomson et al., 1998; Pesce et al., 1999
Nanog	+	+	Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003
Sox-2	+	+	Avilion et al., 2003; Ginis et al., 2004
FGF4	+	–	Ginis et al., 2004
LIF-R	+	+/-	Richards et al., 2004

#### Некоторые другие характеристики

Активность теломеразы	+	+	Thomson et al., 1998; Armstrong et al., 2000
Регуляция самообновления популяции	Наличие фидерных клеток, либо присутствие в среде фактора LIF	Обязательное наличие фидерных клеток (инактивированных эмбриональных фибробластов мыши или человека), наличие в среде сыворотки и фактора bFGF	Niwa et al., 1998; Thomson et al., 1998; Xu et al., 2001; Chambers et al., 2003; Ying et al., 2003
Морфология в культуре	Округлые многослойные колонии	Монослойные колонии с неровными краями	Thomson et al., 1998
Формирование эмбрионидных теллец в суспензии	Эмбрионидные теллец как простые (без полости в центре), так и с полостью	Эмбрионидные теллец с полостью в центре	Itskovitz-Eldor et al., 2000; Jaenisch, 2000
Формирование тератом in vivo	+	+	Wobus et al., 1984; Thomson et al., 1998

вышение его экспрессии (Loh et al., 2005). Анализ генов-мишеней регуляторов плюрипотентности выявляет следующую картину: для Ost-4 в мЭСК и чЭСК из всех идентифицированных генов-мишеней только 9.1 % являются общими, а для Nanog — только 13 % (Loh et al., 2005; Avery et al., 2006).

Возможно, отсутствие большого количества ортологичных генов-мишеней в ЭСК мыши по сравнению с ЭСК человека связано с фундаментальными различиями регу-

ляторных транскрипционных систем у разных видов. С высокой вероятностью такой результат может быть обусловлен и различиями экспериментальных методов, применяемых в разных лабораториях. Проблема этих различий до сих пор остается крайне актуальной, и ее решение должно послужить ответом на вопрос о том, в какой степени возможно экстраполировать данные, полученные в работах по анализу транскриптомов ЭСК животных, на ЭСК человека.

Например, данные по экспрессии генов ЭСК мыши и человека, полученные разными научными группами с применением различных методов — микрочиповой технологии (microarray), SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) и протеомного анализа (proteomic analysis), — существенно разнятся, что осложняется гетерогенностью экспрессии генов среди различных линий ЭСК в пределах одного вида. Тем не менее авторы этих работ сходятся в том, что компоненты сигнального пути, запускаемые фактором LIF (STAT3, LIFR, gp130), гораздо активнее экспрессируются в мЭСК, в то время как факторы плюрипотентности Oct-3/4 и Sox-2 характеризуются повышенной экспрессией в ЭСК человека, хотя в низких концентрациях обнаруживаются и в мЭСК (подробнее о приведенных методах см. в обзоре: Wobus, Boheler, 2005).

Работы, в которых проводились эксперименты по избирательной супрессии или, напротив, гиперактивации *Nanog* и *Oct4* параллельно с анализом экспрессии генома, демонстрируют, какие из мишеней этих факторов важны для поддержания плюрипотентности и самообновления популяций ЭСК. Так, подтвердив роль фактора *Esrrb* в ЭСК мыши, исследователи обнаружили два новых маркера недифференцированных клеток: *Tcl1* (T-cell lymphoma-1) и *Tbx3* (T-box protein 3) (Ivanova et al., 2006). Интересно, что, как и фактор *Nanog*, *Esrrb* необходим для развития плаценты и пролиферации первичных половых клеток *in vivo* (Mitsunaga et al., 2004), а *Tcl1* повышает уровень пролиферации ЭСК (Mitsui et al., 2003) и защищает их от апоптотической гибели (Niwa et al., 2005; Mesrobian, Misteli, 2006). Какие факторы, находящиеся под контролем Oct-4, *Nanog* и Sox-2, отвечают за аналогичные процессы в ЭСК человека, остается невыясненным.

мЭСК и чЭСК — различия потребностей в морфогенетических и ростовых факторах. ЭСК человека обладают более длительным по сравнению с ЭСК мыши периодом удвоения популяции: примерно 30—35 ч против 12—15 ч (Amit et al., 2000). Они тоже требуют фидера для поддержания своих свойств, в то же время ни LIF, ни цитокины из семейства IL-6 не предотвращают потерю экспрессии ими маркеров плюрипотентности: белков Oct-4 и *Nanog*. Лишь в сочетании с морфогенетическим фактором BMP-4 LIF обеспечивает самообновление популяции ЭСК, их способность к разнонаправленной дифференцировке, колонизации тканей зародыша при трансплантации в бластоцисту и свойство давать начало линии первичных половых клеток. BMP-4 индуцирует в чЭСК экспрессию так называемых генов-ингибиторов дифференцировки, или *Id*-генов (от «inhibitor of differentiation»), через сигнальный каскад, опосредованный белками Smad (Humphrey et al., 2004; Wobus, Boheler, 2005). В отсутствие фидера и сыворотки чЭСК могут поддерживаться в культуре только при одновременном присутствии в среде культивирования трех факторов — LIF, FGF2 и TGFβ, но, по-видимому, присутствие LIF все же не является критичным (Amit et al., 2004). Также известно, что в отличие от мЭСК процессы самообновления и сохранения плюрипотентности в ЭСК человека зависят от наличия в среде культивирования морфогенетических факторов *activin/Nodal* (Brons et al., 2007).

В связи с этими различиями интересно также проследить, как различаются внутриклеточные сигнальные каскады, запускаемые в мЭСК и чЭСК одними и теми же высококонсервативными факторами.

Сравнение сигнальных каскадов, активируемых морфогенетическими факторами, в

ЭСК и чЭСК (на примере фактора Wnt). ЭСК мыши и человека по-разному реагируют на присутствие в среде культивирования таких факторов, как LIF, TGFβ, S1P, BMP-4 и Wnt (Avery et al., 2006). Мы остановимся подробнее на факторе Wnt, так как в этом отношении он наиболее хорошо изучен. Сигнальный путь, активируемый фактором Wnt, отвечает за многие процессы, связанные с эмбриональным развитием млекопитающих, включая эмбриональную индукцию, определение поляризации клеток и пр. (Boyer et al., 2005).

Лиганды из семейства Wnt связываются с рецептором Frizzled, в результате чего активируется белок Dishevelled, который приводит к отщеплению киназы гликоген-синтазы-3β (GSK-3β) от комплекса APC (Axin/adomatous polyposis coli complex) и ее инактивации, что предотвращает убиквитинзависимую деградацию β-катенина — важного транскрипционного фактора, активирующего экспрессию генов, ответственных за пролиферацию и самообновление нескольких типов стволовых клеток (Austin et al., 1997; Reya et al., 2003).

Wnt также играет роль в дифференцировке мЭСК, хотя относительно этой его функции существуют некоторые противоречия. Например, обработка мЭСК ретиноевой кислотой приводит к нейрональной дифференцировке мЭСК, которая может быть ингибирована стабильной экспрессией фактора Wnt1 либо искусственной гиперпродукцией антагониста фактора Wnt — белка Sfrp2 (Austin et al., 1997). С этими данными согласуется тот факт, что дифференцировочный потенциал мЭСК может модулироваться изменением концентрации β-катенина (Kielman et al., 2002). В то же время обработка мЭСК фармакологическими ингибиторами GSK-3β по какой-то причине усиливает нейрональную дифференцировку (Ding et al., 2003), что другими авторами было показано также для мЭСК с повышенной экспрессией Wnt-1 (Tang et al., 2002a, 2002b). Здесь присутствует явное противоречие, до сих пор окончательно не разрешенное.

Компоненты основного сигнального пути, запускаемого фактором Wnt, обнаружены также в чЭСК, однако уровни экспрессии этих факторов очень сильно варьируют (Walsh, Andrews, 2003; Brandenberger et al., 2004; Sato et al., 2004). Более того, в чЭСК практически отсутствуют транскрипты лигандов из семейства Wnt, а их антагонисты и ингибиторы, напротив, присутствуют, однако их концентрации очень сильно разнятся между разными линиями чЭСК (Brandenberger et al., 2004).

В 2004 г. было высказано предположение о том, что Wnt поддерживает самообновление популяции чЭСК, так же как и мЭСК (Sato et al., 2004). Однако позднее в ходе экспериментов по ингибированию киназы GSK-3β хлоридом лития, т. е. моделированию запуска Wnt-сигналинга, выяснилось, что чЭСК, напротив, претерпевают в результате этого разнонаправленную дифференцировку (Avery et al., 2006), что также было показано для сходных с чЭСК клеток эмбриональной карциномы человека. Возможно, в чЭСК киназа GSK-3β связана с другими сигнальными каскадами, нежели в мЭСК.

Таким образом, Wnt-сигналинг в мЭСК ответствен, по-видимому, в основном за самообновление и поддержание плюрипотентности популяции, а в чЭСК — за стимуляцию пролиферации и дифференцировку. В отличие от мЭСК, в которых β-катенин активен в недифференцированной популяции, в чЭСК активность β-катенина минимальна до начала их дифференцировки (Dravid et al., 2005).

## Некоторые направления дифференцировки ЭСК мыши и человека

Направление дифференцировки <sup>a</sup>	ЭСК мыши	ЭСК человека	Литературный источник
Клетки трофобласта	Считается, что ЭСК мыши практически не способны дифференцироваться в трофобласт либо дифференцируются в него крайне неэффективно при делеции гена <i>oct4</i>	+	Xu et al., 2002; Rao, Orkin, 2006
Адиipoциты	+	+	Dani et al., 1997; Kang et al., 2007
Остеобласты и остеоциты	+	+	Schuldiner et al., 2000; Buttery et al., 2001
Хондробласты и хондроциты	+	+	Thomson et al., 1998; Kramer et al., 2000
Гладкомышечные клетки	+	+	Drab et al., 1997; Yamashita et al., 2000; Xie et al., 2007
Клетки поперечнополосатой мускулатуры	+	+	Rohwedel et al., 1994; Schuldiner et al., 2000
Кардиомиоциты	+	+	Doetschman et al., 1985; Maltsev et al., 1993; Maltsev et al., 1994; Metzger et al., 1996; Itskovitz-Eldor et al., 2000; Kehat et al., 2001
Гемопоэтические клетки	+	+	Doetschman et al., 1985; Wiles, Keller, 1991; Nakano et al., 1996; Nishikawa et al., 1998; Itskovitz-Eldor et al., 2000
Клетки-предшественницы лимфоидного, миелоидного, эритроидного и гранулоцитарно-макрофагального ряда	+	+	Potochnik et al., 1994; Odorico et al., 2001; Kaufman, Thomson, 2002
Эндотелиальные клетки	+	+	Risau et al., 1998; Yamashita et al., 2000; Kappas, Bautch, 2007
Дендритные клетки	+	+	Fairchild et al., 2000; Sluvkin et al., 2006
Тучные клетки	+	Не показано	Tsai et al., 2000
Дофаминергические нейроны	+	+	Kawasaki et al., 2000; Lee et al., 2000; Carpenter et al., 2001; Rolletschek et al., 2001
Серотонинергические нейроны	+	Не показано	Lee et al., 2000
ГАВА-ергические нейроны	+	+	Bain et al., 1995; Strubing et al., 2005; Carpenter et al., 2001
Холинергические нейроны	+	Не показано	Fraichard et al., 1995
Глутаматергические нейроны	+	+	Strubing et al., 1995; Finley et al., 1996; Carpenter et al., 2001
Глицинергические нейроны	Не показано	+	Carpenter et al., 2001
Моторные нейроны	+	+	Wichterle et al., 2002; Lee et al., 2007
Олигодендроциты	+	+	Angelov et al., 1998; Brustle et al., 1999; Liu et al., 2000; Tropepe et al., 2001; Billon et al., 2002; Shin et al., 2005
Астроциты	+	+	Fraichard et al., 1995; Andressen et al., 2001; Carpenter et al., 2001; Rolletschek et al., 2001; Tang et al., 2002
Гепатоциты	+	+	Hamazaki et al., 2001; Jones et al., 2002; Rambhatla et al., 2003; Kania et al., 2004
Инсулинпродуцирующие клетки	+	+	Assady et al., 2001; Lumalsky et al., 2001; Hori et al., 2002; Blyszczuk et al., 2003; Segev et al., 2001
Кератиноциты	+	+	Bagutti et al., 1996; Ji et al., 2006; Haase et al., 2007
Первичные половые клетки	+	+	Aflatoonian, Moore, 2006

<sup>a</sup> В 2007 г. было проведено сравнение дифференцировочных потенций 17 линий чЭСК. Было показано, что различные линии обнаруживают различную склонность к дифференцировке в те или иные специализированные типы клеток в ходе спонтанной дифференцировки в составе эмбрионных телец (Osafune et al., 2007).



## Дифференцировка ЭСК

ЭСК, трансплантированные во взрослый организм, образуют в процессе разнонаправленной дифференцировки тератомы и тератокарциномы — соответственно доброкачественные и злокачественные опухоли, состоящие из производных трех зародышевых листков (эктодермы, энтодермы и мезодермы). Это было показано в нескольких экспериментах по эктопической трансплантации как мЭСК, так и чЭСК в организм животных с индуцированным иммунодефицитом. Было продемонстрировано образование тератом и тератокарцином при трансплантации чЭСК подкожно, внутримышечно и в область семенных желез nude-мышей, а также при трансплантации мЭСК в сердечную мышцу как nude-, так и мышцей с функциональной иммунной системой (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Odorico et al., 2001; Wernig et al., 2004; Nussbaum et al., 2007).

По причине тератогенности ЭСК обоснованной кажется идея трансплантации предифференцированных в предшественники той или иной ткани клеток, полученных *in vitro* из ЭСК. Однако до настоящего времени считается невозможным получить популяцию как мЭСК, так и чЭСК, более чем на 80 % состоящую из предифференцированных клеток (Deb, Sarda, 2008), которые можно было бы без всякого риска использовать для трансплантации, что указывает на потенциальную опасность применения ЭСК в целях клеточной терапии. Присутствие единственной недифференцированной клетки в культуре, предназначенной для трансплантации в организм реципиента, представляет потенциальный риск развития тератомы.

Единственная работа, в которой была продемонстрирована 100%-ная дифференцировка чЭСК в определенный тип специализированных клеток, описывает дифференцировку чЭСК в эктодермальные клетки под действием BMP-4 и  $\beta$ -меркаптоэтанола с использованием весьма сложной схемы культивирования на различных средах. Полученные дифференцированные клетки было возможно культивировать до 16-го пассажа (около 60 удвоений популяции), после чего они гибли апоптозом. В течение всего времени культивирования не было отмечено нарушений кариотипа, а при трансплантации в организм SCID-мышей эти клетки не образовывали тератом (Aberdam et al., 2008). Несмотря на то что это на данный момент первый и единственный успех подобного рода, этот результат весьма обнадеживает.

Протоколов дифференцировки как мЭСК, так и чЭСК в различных направлениях существует к настоящему времени довольно много, и можно составить представление об условиях, требующихся для получения той или иной специализированной популяции в культуре (табл. 2). Для дифференцировки ЭСК двух рассматриваемых видов в определенных направлениях при этом обычно требуются схожие условия.

Например, для стимуляции дифференцировки мЭСК и чЭСК в кардиомиоцитарном направлении разными авторами используются сходные условия культивирования без фидера в среде с присутствием  $\beta$ -меркаптоэтанола и аскорбиновой кислоты (Guo et al., 2006; Sartiani et al., 2007), а для стимуляции дифференцировки мЭСК и чЭСК в гемопоэтические стволовые клетки используются эритропоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), IL-1 $\alpha$  и IL-3 (Valtieri et al., 1989; Wiles, Keller, 1991).

Было показано, что дифференцировка мЭСК, а именно снижение экспрессии генов, ответственных за плюрипотентность, начинается через 12 ч после ее индукции (Sene et al., 2007). В указанной работе был проведен анализ экспрессии генов в ходе спонтанной дифференцировки клеток в составе эмбрионидных телец — специфических для ЭСК, похожих на бластоцисты структур, которые эти клетки образуют в суспензиях, когда в силу условий культивирования невозможна их адгезия к пластике, т. е. в отсутствие фидерного слоя и фактора LIF (Wobus, Boheler, 2005). При этом для мЭСК было выяснено, что при их спонтанной дифференцировке снижается экспрессия 24 генов, в числе которых такие известные маркеры ЭСК, как *Oct4/Pou5f1* (Loh et al., 2005), *Cripto/Tdgf1* (Strizzi et al., 2005) и *Rex1* (Thomson, Gudas, 2002), и повышается экспрессия 12 генов, функции большинства из которых неизвестны, однако показана их гомология с генами человека. Интересно было бы выяснить подобную зависимость для различных линий чЭСК, так как динамика дифференцировки ЭСК во времени крайне важна для возможного применения этих клеток в терапевтических целях — трансплантация в организм реципиента недифференцированных клеток может привести к появлению опухоли, но, с другой стороны, трансплантация терминально дифференцированных клеток, имеющих ограниченный срок жизни, может оказаться бессмысленной.

## Заключение

Исходя из анализа накопленных к настоящему времени данных нельзя утверждать, что ЭСК мышцы могут быть использованы как универсальная модель для изучения ЭСК человека. Процессы, изучаемые на мЭСК, можно разделить на три большие группы: 1) процессы поддержания плюрипотентности; 2) процессы, ответственные за пролиферацию клеток; 3) процессы, ответственные за дифференцировку ЭСК в предшественники различных специализированных клеток.

Возвращаясь к мысли, высказанной во введении, можно сказать, что в феноменологическом смысле мЭСК и чЭСК сходны, это можно утверждать и для эмбриональных стволовых клеток всех остальных биологических видов, просто исходя из общности функций этих клеток. В то же время между мЭСК и чЭСК существует немало различий на уровне молекулярных сигнальных путей, определяющих все аспекты биологии этих клеток. Попытки прогнозирования поведения чЭСК в культурах и при трансплантации их в организм реципиента, основываясь на данных, полученных в работах с мЭСК, могут неизбежно приводить к досадным ошибкам и обнаружению все новых несоответствий работы гомологичных факторов в ЭСК двух этих видов. В то же время это не касается в такой степени процессов дифференцировки, так как для большинства ее направлений было продемонстрировано, что мЭСК и чЭСК требуют сходных индуцирующих условий культивирования.

История активного изучения ЭСК насчитывает по крайней мере два последних десятилетия. За это время линии плюрипотентных эмбриональных клеток были изолированы из бластоцист нескольких видов одомашненных животных (Prelle et al., 1999) и модельных объектов, таких как курица (Pain et al., 1996; Chang et al., 1997), хомяк (Doetschman et al., 1988), кролик (Graves, Moreadith, 1993; Schoonjans et al., 1996) и крыса (Iannaccone et al.,



1994; Brenin et al., 1997; Vassileva et al., 2000; Buehr et al., 2002). Тем не менее только для ЭСК мыши и курицы было показано, что при трансплантации в бластоцисту они способны в дальнейшем давать начало линии первичных половых клеток. С точки зрения исследователей ЭСК человека, наиболее важной является получение линий ЭСК приматов: макаки-резуса (Thomson et al., 1995; Pau, Wolf, 2004), обыкновенной мартышки (Thomson et al., 1996) и яванской макаки (Suemori et al., 2001).

ЭСК обезьян характеризуются высокой активностью теломеразы и щелочной фосфатазы и экспрессией маркеров, характерных для ЭСК человека (Oct-4, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81), сохраняют в процессе культивирования нормальный кариотип и плюрипотентность (Thomson et al., 1995; Kawasaki et al., 2002). Эти характеристики позволяют предположить, что ЭСК приматов могут оказаться более адекватной моделью изучения ЭСК человека, нежели ЭСК мыши.

Авторы выражают благодарность В. С. Сергееву за создание иллюстрации к обзору.

#### Список литературы

- Крылова Т. А., Зенин В. В., Михайлова Н. А., Пинаев Г. П., Никольский Н. Н., Полянская Г. Г. 2005. Постоянные линии эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 47 (2): 121—129.
- Крылова Т. А., Зенин В. В., Мусорина Н. С., Баранов В. С., Бичева Н. К., Корсаков В. С., Никольский Н. Н., Пинаев Г. П., Полянская Г. Г. 2003. Получение и характеристика постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология. 45 (12): 1172—1178.
- Миталипов Ш. М., Миталипова М. М., Иванов В. И. 1994. Влияние длительности культивирования на плюрипотентность эмбриональных стволовых (ES) клеток мыши *in vitro* и *in vivo*. Онтогенез. 25 (6): 19—26.
- Никольский Н. Н., Габай И. А., Сомова Н. В. 2007. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы. Цитология. 49 (7): 529—537.
- Прыжова М. В., Лагарькова М. А., Лякишева А. В., Ревазова Е. С., Гнучев Н. В., Киселев С. Л. 2004. Получение линий эмбриональных стволовых клеток человека, их анализ и характеристика по специфическим маркерам. Информ. бюл. «Клеточные культуры». 19: 22—25.
- Aberdam A., Barak E., Rouleau M., de la Forest S., Berrih-Akinnin S., Suter D. M., Krause K.-H., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Aberdam D. 2008. A pure population of ectodermal cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 26: 440—444.
- Adams I. R., McLaren A. 2004. Identification and characterization of mRif1: a mouse telomere-associated protein highly expressed in germ cells and embryo-derived pluripotent stem cells. *Development*. 131: 733—744.
- Aflatoonian B., Moore H. 2006. Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction*. 132: 699—707.
- Amit M., Carpenter M. K., Inokuma M. S., Chiu C. P., Harris C. P., Waknitz M. A., Itskovitz-Eldor J., Thomson J. A. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Development*. 127: 271—278.
- Amit M., Shariki C., Margulez V., Itskovitz-Eldor J. 2004. Feeder-layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70: 837—845.
- Andressen C., Stoeker E., Klinz F. J., Lenka N., Hescheler J., Fleischmann B., Arnold S., Addicks K. 2001. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells*. 19: 419—424.
- Angelov D. N., Arnold S., Andressen C., Grabsch H., Puschmann M., Hescheler J., Addicks K. 1998. Temporospatial relationships between macroglia and microglia during *in vitro* differentiation of murine stem cells. *Development*. 125: 42—51.
- Armstrong L., Lako M., Lincoln J., Cairns P. M., Hole N. 2000. mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech. Development*. 97: 109—116.
- Assady S., Maor G., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Skorecki K. L., Tzukerman M. 2001. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 50: 1691—1697.
- 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.
- Avery S., Inniss K., Moore H. 2006. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*. 15: 729—740.
- Avilion A. A., Nicolis S. K., Pevny L. H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Development*. 17: 126—140.
- Bagutti C., Wobus A. M., Fassler R., Watt F. M. 1996. Differentiation of embryonic stem cells into keratinocytes: comparison of wildtype and beta 1 integrin-deficient cells. *Development*. 123: 184—196.
- Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J. E., Gottlieb D. I. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Development*. 121: 342—357.
- Billon N., Jolicœur C., Tokumoto Y., Vennstrom B., Raff M. 2002. Normal timing of oligodendrocyte development depends on thyroid hormone receptor alpha 1 (TRα1). *EMBO J.* 21: 6452—6460.
- Blyszczuk P., Czyz J., Kanina G., Wagner M., Roll U., St Onge L., Wobus A. M. 2003. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 100: 998—1003.
- Boeuf H., Hauss C., Graeve F. D., Baran N., Kedinger C. 1997. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 138: 1207—1217.
- Boiani M., Scholer H. R. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Mol. Cell Biol.* 25: 872—884.
- Boyer L. A., Lee T. I., Cole M. F., Johnstone S. E., Levine S. S., Zucker J. P., Guenther M. G., Kumar R. M., Murray H. L., Jenner R. G. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 122: 947—956.
- Brandenberger R., Wei H., Zhang S., Lei S., Murage J., Fisk G. J., Li Y., Xu C., Fang R., Guegler K., Rao M. S., Mandalam R., Lebkowski J., Stanton L. W. 2004. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nature Biotechnol.* 22: 707—716.
- Brenin D., Look J., Bader M., Hubner N., Levan G., Iannaccone P. 1997. Rat embryonic stem cells: a progress report. *Transplant. Proc.* 29: 1761—1765.
- Brons I. G., Smithers L. E., Trotter M. W., Rugg-Gunn P., Sun B., Chuva de Sousa Lopes S. M., Howlett S. K., Clarkson A., Ahrlund-Richter L., Pedersen R. A., Vallier L. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 448: 191—195.
- Brook F. A., Gardner R. L. 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 94: 5709—5712.
- Brustle O., Jones K. N., Learish R. D., Karram K., Choudhary K., Wiestler O. D., Duncan I. D., McKay R. D. 1999. Embryonic stem cell derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*. 285: 754—756.
- Buehr M., Nichols J., Stenhouse F., Mountford P., Greenhalgh C. J., Kantachuversiri S., Brooker G., Mullins J. J., Smith A. G. 2002. Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. *Biol. Reprod.* 68: 222—229.
- Buehr M., Smith A. 2003. Genesis of embryonic stem cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 358: 1397—1402.

- Burdon T., Chambers I., Stracey C., Niwa H., Smith A. 1999a. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*. 165 : 131—143.
- Burdon T., Stracey C., Chambers I., Nichols J., Smith A. 1999b. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Develop. Biol.* 210 : 30—43.
- Buttery L. D., Bourne S., Xynos J. D., Wood H., Hughes F. J., Hughes S. P., Episkopou V., Polak J. M. 2001. Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng.* 7 : 89—99.
- Carpenter M. K., Inokuma M. S., Denham J., Mujtaba T., Chiu C. P., Rao M. S. 2001. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp. Neurol.* 172 : 383—397.
- Carpenter M. K., Rosler E. S., Fisk G. J., Brandenberger R., Ares X., Miura T., Lucero M., Rao M. S. 2004. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Develop. Dyn.* 229 : 243—258.
- 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.
- Chang I. K., Jeong D. K., Hong Y. H., Park T. S., Moon Y. K., Ohno T., Han J. Y. 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 21 : 495—499.
- Clarke A. R. 1994. Murine genetic models of human disease. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 4 : 453—460.
- Cole R. J., Edwards R. G., Paul J. 1966. Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. *Develop. Biol.* 13 : 385—407.
- Cowan C. A., Atienza J., Melton D. A., Eggan K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 309 : 1369—1373.
- Dani C., Smith A. G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villa-geois P., Darimont C., Ailhaud G. 1997. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*. *J. Cell Sci.* 110 : 1279—1285.
- Deb K. D., Sarda K. 2008. Human embryonic stem cells: pre-clinical perspectives. *J. Trans. Med.* 29 : 6—7.
- Ding S., Wu T. Y., Brinker A., Peters E. C., Hur W., Gray N. S., Schulz P. G. 2003. Synthesis small molecules that control stem cell fate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 100 : 7632—7637.
- Doetschman T. C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. 1985. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87 : 27—45.
- Haetschman T. C., Williams P., Maeda N. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Develop. Biol.* 127 : 224—227.
- Drab M., Haller H., Bychkov R., Erdmann B., Lindschau C., Haase H., Morano I., Luft F. C., Wobus A. M. 1997. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP *in vitro* differentiation model. *FASEB J.* 11 : 905—915.
- Dravid G., Ye Z., Hammond H., Chen G., Pyle A., Donovan P., Yu X., Cheng L. 2005. Defining the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the survival, proliferation and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 23 : 1489—1501.
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292 : 154—156.
- Fairchild P. J., Brook F. A., Gardner R. L., Graca L., Strong V., Tone Y., Tone M., Nolan K. F., Waldmann H. 2000. Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr. Biol.* 10 : 1515—1518.
- Finley M. F., Kulkarni N., Huettner J. E. 1996. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J. Neurosci.* 16 : 1056—1065.
- Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., Dehay C., Savatier P., Samarut J. 1995. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* 108 : 3181—3188.
- Ginis I., Luo Y., Miura T. 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Develop. Biol.* 269 : 360—380.
- Graves K. H., Moreadith R. W. 1993. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 36 : 424—433.
- Guo X.-M., Zhao Y.-S., Chang H.-X., Wang C.-Y., E L.-L., Zhang X.-A., Duan C.-M., Dong L.-Z., Jiang H., Li J., Song Y., Yang X. 2006. Creation of engineered cardiac tissue *in vitro* from mouse embryonic stem cells. *Circulation*. 113 : 2229—2237.
- Haase I., Knaup R., Wartenberg M., Sauer H., Hescheler J., Mahrle G. 2007. *In vitro* differentiation of murine embryonic stem cells into keratinocyte-like cells. *Eur. J. Cell Biol.* 86 : 801—805.
- Hamazaki T., Iiboshi Y., Oka M., Rapst P. J., Meacham A. M., Zon L. I., Terada N. 2001. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett.* 497 : 15—19.
- Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., Sun C.-W., Meissner A., Cassady J. P., Beard C., Brambrink T., Wu L.-C., Townes T. M., Jaenisch R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 318 : 1920—1923.
- Hart A. H., Hartley L., Ibrahim M., Rabb L. 2004. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Develop. Dyn.* 230 : 187—198.
- Hayes B., Fagerlie S. R., Ramakrishnan A., Baran S., Harkkey M., Graf L., Bar M., Bendoraite A., Tewari M., Torok-Storb B. 2008. Derivation, characterization, and *in vitro* differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells*. 26 : 465—473.
- Heard E., Montgelard F., Arnaud D., Chureau C., Vourc'h C., Avner P. 1999. Human XIST yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 96 : 6841—6846.
- Henderson J. K., Draper J. S., Baillie H. S., Fishel S., Thomson J. A., Moore H., Andrews P. W. 2002. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable & characterization expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*. 20 : 329—337.
- Hori Y., Rulifson I. C., Tsai B. C., Heit J. J., Cahoy J. D., Kim S. K. 2002. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 16 105—16 110.
- Humphrey R. K., Beattie G. M., Lopez A. D., Bucay N., King C. C., Firpo M. T., Rose-John S., Hayer A. 2004. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is Stat3 independent. *Stem Cells*. 22 : 522—530.
- Hurlbut W. B. 2005. Altered nuclear transfer as a morally acceptable means for the procurement of human embryonic stem cells. *Nat. Cathol. Bioeth.* 5 : 145—151.
- Iannaccone P. M., Taborn G. U., Garton R. L., Caplice M. D., Brenin D. R. 1994. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Develop. Biol.* 163 : 288—292.
- Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6 : 88—95.
- Ivanova N., Dobrin R., Lu R., Kotenko I., Levorse J., Decoste C., Schaefer X., Lun Y., Lemischka I. R. 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 442 : 533—538.
- Jaenisch R. 2000. Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 7419—7426.
- Ji L., Allen-Hoffmann B. L., de Pablo J. J., Palecek S. P. 2006. Generation and differentiation of human embryonic stem cell-derived keratinocyte precursors. *Tissue Eng.* 12 : 665—679.
- Jones E. A., Tosh D., Wilson D. L., Lindsay S., Forrester L. M. 2002. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* 272 : 15—22.
- Jung J., Mysliwiec M. R., Lee Y. 2005. Roles of JUMONJI in mouse embryonic development. *Develop. Dyn.* 232 : 21—32.
- Kang X., Xie Y., Powell H. M., James Lee L., Belury M. A., Lanutti J. J., Kniss D. A. 2007. Adipogenesis of murine embryonic



stem cells in a three-dimensional culture system using electrospun polymer Scaffolds. *Biomaterials*. 28 : 450—458.

Kania G., Blyszczuk P., Jochheim A., Ott M., Wobus A. M. 2004. Generation of glycogen and albumin producing hepatocyte-like cells from embryonic stem cells. *Biol. Chem.* 385 : 943—953.

Kania G., Corbeil D., Tarasov K. V., Blyszczuk P., Hutmacher W. B., Boheler K. R., Wobus A. M. 2005. The somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells*. 23 : 791—804.

Kaufman D. S., Thomson J. A. 2002. Human ES cells: haematopoiesis and transplantation strategies. *J. Anat.* 200 : 243—248.

Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S., Kaneko S., Kuwana Y., Nakanishi S., Nishikawa S. I., Sasai Y. 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 28 : 31—40.

Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K., Watanabe K., Ura-no F., Ichinose H., Haruta M., Takahashi M., Yoshikawa K., Nishikawa S. I., Nakatsuji N., Sasai Y. 2002. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 1580—1585.

Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 108 : 407—414.

Keller G. M. 1995. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 : 862—869.

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. *Nature Genet.* 32 : 594—605.

Klimanskaya I., Chung Y., Becker S., Lu S. J., Lanza R. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 444 : 481—485.

Kramer J., Hegert C., Guan K., Wobus A. M., Muller P. K., Rohwedel J. 2000. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech. Develop.* 92 : 193—205.

Lee H., Shamy G. A., Elkabetz Y., Shofield C. M., Harrison N. L., Panagiotakos G., Socci N. D., Tabar V., Studer L. 2007. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells*. 25 : 1931—1939.

Lee S. H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J. M., McKay R. D. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.* 18 : 675—679.

Liu S., Qu Y., Stewart T. J., Howard M. J., Chakraborty S., Holekamp T. F., McDonald J. W. 2000. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 6126—6131.

Loh Y. H., Wu Q., Chew J.-L., Vega V. B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K.-Y., Sung K. W., Lee C. W. H., Zhao X.-D., Chiu K.-P., Lipovich L., Kuznetsov V. A., Robson P., Stanton L. W., Wei C.-L., Ruan Y., Lim B., Ng H.-H. 2005. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genet.* 38 : 431—440.

Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R., McKay R. 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 292 : 1389—1394.

Maltsev V. A., Rohwedel J., Hescheler J., Wobus A. M. 1993. Embryonic stem cells differentiate *in vitro* cardiomyocytes representing sinusoidal, atrial and ventricular cell types. *Mech. Develop.* 44 : 41—50.

Maltsev V. A., Wobus A. M., Rohwedel J., Bader M., Hescheler J. 1994. Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ. Res.* 75 : 233—244.

McWhir J., Schnieke A. E., Ansell R., Wallace H., Colman A., Scott A. R., Kind A. J. 1996. Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryonic with a non-permissive genetic background. *Nature Genet.* 14 : 223—226.

Meissner A., Jaenisch R. 2006. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature*. 439 : 212—215.

Meshorer E., Misteli T. 2006. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 : 540—546.

Metzger J. M., Lin W. I., Samuelson L. C. 1996. Vital staining of cardiac myocytes during embryonic stem cell cardiogenesis *in vitro*. *Circ. Res.* 78 : 547—552.

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. *Nature*. 421 : 631—642.

Mitsunaga K., Araki K., Mizusaki H., Morohashi K., Haruna K., Nakagata N., Giguere V., Yamamura K., Abe K. 2004. Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR- $\beta$  results in reduction of germ cell number in mouse embryos. *Mech. Develop.* 121 : 237—246.

Nakano T., Kodama H., Honjo T. 1996. *In vitro* development of primitive and definitive erythrocyte from different precursors. *Science*. 272 : 722—724.

Nishikawa S. I., Nishikawa S., Hirashima M., Matsuyoshi N., Kodama H. 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1 + VE-cadherin + cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*. 125 : 1747—1757.

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. G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature 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 trophectoderm differentiation. *Cell*. 123 : 917—929.

Nussbaum J., Minami E., Laflamme M. A., Virag J. A., Ware C. B., Masino A., Muskheli V., Pabon L., Reinecke H., Murray C. E. 2007. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 21 : 1345—1357.

Odorico J. S., Kaufman D. S., Thomson J. A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 19 : 193—204.

Osafune K., Caron L., Borowiak M., Martinez R. J., Fitz-Gerald C. S., Sato Y., Cowan C. A., Chien K. R., Melton D. A. 2007. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature Biotechnol.* 3 : 313—315.

Pain B., Clark M. E., Shen M., Nakazawa H., Sakurai M., Samarut J., Etches R. J. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*. 122 : 2339—2348.

Pan G., Lin J., Zhou Y., Zheng H., Pei D. 2006. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.* 20 : 1094—2002.

Pau K. Y., Wolf D. P. 2004. Derivation and characterization of monkey embryonic stem cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2 : 41—52.

Pera M. F., Reubinoff B., Trounson A. 2000. Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 113 : 5—10.

Pesce M., Anastassiadis K., Scholer H. R. 1999. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*. 165 : 144—152.

Potocnik A. J., Nielsen P. J., Eichmann K. 1994. *In vitro* generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO J.* 13 : 5274—5283.

Prelle K., Vassiliev I. M., Vassilieva S. G., Wolf E., Wobus A. M. 1999. Establishment of pluripotent cell lines from verte-



rate species: present status and future prospects. *Cells Tissues Organs*. 165 : 220—236.

Rambhatla L., Chiu C. P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M. K. 2003. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*. 12 : 1—11.

Rao S., Orkin S. H. 2006. Unraveling the transcriptional network controlling ES cell pluripotency. *Genome Biol*. 7 : 230—234.

Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C. Y., Trounson A., Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnol*. 18 : 399—404.

Reya T., Duncan A. W., Ailles L., Domen J., Scherer D. C., Willert K., Hintz L., Nusse R., Weissman I. L. 2003. A role for Wnt signaling in self-renewal of hematopoietic stem cells. *Nature*. 423 : 409—414.

Richards M., Tan S. P., Tan J. H., Chan W. K., Bongso A. 2004. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells*. 22 : 51—64.

Risau W., Sariola H., Zervos H. G., Sasse J., Eklblom P., Kessler R., Doetschman T. 1988. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*. 102 : 471—478.

Rodda D. J., Chew J.-L., Lim H.-L., Loh Y.-H., Wang B., Robson P. 2005. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem*. 26 : 24 731—24 737.

Rohwedel L., Maltsev V., Bober E., Arnold H. H., Hescheler J., Wobus A. M. 1994. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis *in vivo*: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Development*. Biol. 164 : 87—101.

Rolletschek A., Chang H., Guan K., Czyz J., Meyer M., Wobus A. M. 2001. Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech. Development*. 105 : 93—104.

Sartiani L., Bettiol E., Stillitano F., Mugelli A., Cerbai E., Jaconi M. E. 2007. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells*. 25 : 1136—1144.

Sato N., Meijer L., Skaltsounis 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. *Nature Med*. 10 : 55—63.

Sato N., Sanjuan I. M., Heke M. 2003. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Development*. Biol. 260 : 404—413.

Schoonjans L., Albright G. M., Li J. L., Collen D., Moreadith R. W. 1996. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol. Reprod. Development*. 45 : 439—443.

Schoor M., Schuster-Gossler K., Gossler A. 1993. The Etl-1 gene encodes a nuclear protein differentially expressed during early mouse development. *Development*. Dyn. 197 : 227—237.

Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., Melton D. A., Benvenisty N. 2000. From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 11 307—11 312.

Segev H., Fishman B., Ziskind A., Shulman M., Itskovitz-Eldor J. 2004. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*. 22 : 265—274.

Sene K. H., Porter C. J., Palidwor G., Perez-Iratxeta C., Muro E. M., Campbell P. A., Rudnicki M. A., Andrade-Navarro M. A. 2007. Gene function in early mouse embryonic stem cell differentiation. *BMG Genomics*. 8 : 85—106.

Shin S., Dalton S., Stice S. L. 2005. Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Development*. 14 : 266—269.

Sinz M. W., Kim S. 2006. Stem cells, immortalized cells and primary cells in ADMET assays. *Drug Discovery Today: Technologies*. 3 : 79—85.

Slukvin I. I., Vodyanik M. A., Thomson J. A., Gumenyuk M. E. 2006. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. *J. Immunol*. 176 : 2924—2932.

Solter D., Knowles B. B. 1978. Monoclonal antibody defining a stagespecific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 75 : 5565—5569.

Strizzi L., Bianco C., Normanno N., Salomon D. 2005. Crip1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis. *Oncogene*. 24 : 5731—5741.

Strubing C., Ahnert-Hilger Shan J., Wiedenmann B., Hescheler J., Wobus A. M. 1995. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech. Development*. 53 : 275—287.

Suemori H., Tada T., Torii R., Hosoi Y., Kobayashi K., Imahie H., Kondo Y., Iritani A., Nakatsuji N. 2001. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Development*. Dyn. 222 : 273—279.

Sukoyan M. A., Kerkis A. Y., Mello M. R. B., Kerkis I. E., Vintin J. A., Pereira L. V. 2002. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 35 : 535—542.

Takahashi K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cell lines from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126 : 663—676.

Tang F., Shang K., Wang X., Gu J. 2002a. Differentiation of embryonic stem cell to astrocytes visualized by green fluorescent protein. *Cell Mol. Neurobiol*. 22 : 95—101.

Tang K., Yang Y., Gao X., Wang C., Liu L., Kitani H., Atsumi T., Jung N. 2002b. Wnt-1 promotes neuronal differentiation and inhibits gliogenesis in P19 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 293 : 167—173.

Tesar P. J., Chenoweth J. G., Brook F. A., Davies T. J., Evans E. P., Mack D. L., Gardner R. L., McKay R. D. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 448 : 196—199.

Thompson J. R., Gudas L. J. 2002. Retinoic acid induces parietal endoderm but not primitive endoderm and visceral endoderm differentiation in F9 teratocarcinoma stem cells with a targeted deletion of the Rex-1 (Zfp-42) gene. *Mol. Cell Endocrinol*. 195 : 119—133.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282 : 1145—1147.

Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., Hearn J. P. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 92 : 7844—7848.

Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Hearn J. P. 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod*. 55 : 254—259.

Tropepe V., Hitoshi S., Sirard C., Mak T. W., Rossant J., van der Kooy D. 2001. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*. 30 : 65—78.

Tsai M., Wedemeyer J., Ganiatsas S., Tam S., Yamazaki L. I., Galli S. J. 2000. *In vivo* immunological function of mast cells derived from embryonic stem cells: an approach for the rapid analysis of even embryonic lethal mutations in adult mice *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 9186—9190.

Valtieri M., Gabbianelli M., Pelosi E., Bassano E., Petti S., Russo G., Testa U., Peschle C. 1989. Erythropoietin alone induces erythroid bursts formation by human embryonic but not adult BFU-E in unicellular serum-free culture. *Blood*. 74 : 460—470.

Van Hoof D., Passier R., Oostwaard D. W.-V., Pinkse M. W. H., Heck A. J. R., Mummery C. L., Krijgsveld J. 2006. A quest for human and mouse embryonic stem cell-specific proteins. *Mol. Cell Proteomics*. 5 : 1261—1273.

Vassilieva S., Guan K., Pich U., Wobus A. M. 2000. Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Exp. Cell Res*. 258 : 361—373.

Walsh J., Andrews P. W. 2003. Expression of Wnt and Notch pathway genes in a pluripotent human embryonic carcinoma cell line and embryonic stem cell. *Appl. Immunol*. 111 : 197—210.

- Wei C. L., Miura T., Robson P., Lim S.-K., Xu X.-Q., Lee M. Y.-C., Gupta S., Stanton L., Luo Y., Schmitt J., Thies S., Wang W., Khrebtukova 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.
- Weiss R. 2005. The dawn of the new era. *National Geographic*. 2005 : 61—87.
- Wernig M., Benninger F., Schmandt T., Rade M., Tucker K. L., Bussow H., Beck H., Brustle O. 2004. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons *in vivo*. *J. Neurosci.* 24 : 5258—5268.
- Wichterle H., Lieberam I., Porter J. A., Jessell T. M. 2002. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 110 : 385—397.
- Wiles M. V., Keller G. 1991. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*. 111 : 259—267.
- Wobus A. M., Boheler K. R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 85 : 635—678.
- Wobus A. M., Holzhausen H., Jakel P., Schoneich J. 1984. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp. Cell Res.* 152 : 212—219.
- Xie C. Q., Zhang J., Villacorta L., Cui T., Huang H., Chen Y. E. 2007. A highly efficient method to differentiate smooth muscle cells from human embryonic stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 : 311—312.
- Xu C., Inokuma M. S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J. D., Carpenter M. K. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.* 19 : 971—974.
- Xu R. H., Chen X., Li D. S., Li R., Addicks G. C., Glennon C., Zwaka T. P., Thomson J. A. 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature Biotechnol.* 20 : 1261—1264.
- Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K., Nishikawa S. 2000. Fik1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 408 : 92—96.
- Ying Q. L., 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.
- Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Niles J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318 : 1917—1920.
- Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. 1995. Developmental specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Develop.* 9 : 2635—2646.

Поступила 29 IX 2008

#### MURINE EMBRYONIC STEM CELLS AS A MODEL OBJECT FOR HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS RESEARCH

A. S. Grigorian, P. V. Kruglyakov

«Trans Technologies» LTD, St. Petersburg;  
e-mail: anait@alkorbio.ru

During several last decades mouse embryonic stem cell (mESC) were used as a model object for the research of human embryonic stem cells (hESC). The validity of such approach is still not finally proved. At the same time there is a large amount of literary data available, which gives evidences of many substantial differences between these two cell types. The analysis of the literature has shown that there are differences concerning the regulation of proliferation, self-renewal maintenance, and the regulation of differentiation of ESC. Thus, mESC can be considered as a model object for hESC studies only in some aspects of their biology. The alternative model objects, such as primate ESC, are also briefly discussed in this review.

Key words: murine embryonic stem cells, human embryonic stem cells, ESC applications, ESC markers, ESC differentiation.