

## ПЕРВИЧНЫЕ ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА. ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ, МИГРАЦИЯ

© В. Г. Кожухарь

*Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия;  
электронный адрес: V.Kojukhar@yandex.ru*

В последние годы получен большой фактический материал по экспрессии генов на разных этапах дифференцировки первичных половых клеток. Процессы обособления полового зачатка осуществляются у разных представителей животного мира неодинаково — по типу преформации или эпигенеза. В обзоре обсуждаются механизмы начальной дифференцировки первичных половых клеток (ППК) млекопитающих и человека. Проводится анализ данных по идентификации ППК от момента их первоначального выявления в эпибласте до периода завершения миграции к зачаткам гонад. Обсуждены данные по маркерам ППК на разных этапах их развития, механизмы миграции ППК к половым валикам, а также хемокины, направляющие эту миграцию.

**Ключевые слова:** первичные половые клетки, маркеры, миграция, хемокины, эпибласт.

Изучение первичных половых клеток (ППК) вышло в последние годы на новый методический уровень, что позволило получить огромный объем информации. Прежде всего это данные по экспрессии генов, объясняющие многие недоступные ранее механизмы специализации, миграции и дальнейшей дифференцировки ППК, которые в различной связи отражены в обзорах последних лет (Wylie, 1999; Anderson et al., 2001; McLaren, 2001, 2003; Zhao, Garbers, 2002; Extavour, Akam, 2003; Allegrucci et al., 2005; Kunwar et al., 2006; Seydoux, Braun, 2006; Bowles, Koopman, 2007, 2010; Surani et al., 2007; Mardanpour et al., 2008; Raz, Mahabaleshwar, 2009; Saitou, 2009).

В настоящей работе более подробно рассматривается судьба ППК от момента их обособления до завершения миграции к зачаткам гонад.

### Происхождение и идентификация предшественников ППК

Дискуссия о происхождении первичных половых клеток началась более 100 лет назад. Существовали две основные теории. Одну из них сформулировал Вальдейер (Waldeyer, 1870), который считал возможным развитие половых клеток из эпителия эмбриональной гонады, в связи с чем назвал данный эпителий зачатковым (герминативным). Другую теорию выдвинул Нуссбаум (Nussbaum, 1880): это теория «зародышевого пути», согласно которой происходит раннее обособление половых клеток (в процессе первых делений дробления) и имеет место непрерывность их линии в ряду поколений. Вся совокупность соматических клеток, по Нуссбауму, представляет собой «смертную оболочку» потенциально бессмертной половой плазмы. Теория «зародышевого пути» получила развитие в работах Вейсмана (Weismann, 1885, 1892), ко-

торый создал теорию «зародышевой плазмы». По Вейсману, в процессе дифференцировки клеток зародыша из клеточного ядра в цитоплазму выходят особые структуры, ответственные за формирование всех органов и тканей организма. Эти структуры Вейсман назвал детерминантами, а всю совокупность детерминантов — зародышевой плазмой. Зигота содержит всю зародышевую плазму, которая в дальнейшем переходит в те бластомеры, из которых образуются половые клетки (т. е. последние содержат полный набор детерминантов). Все остальные бластомеры в процессе дробления постепенно теряют различные детерминанты в зависимости от программы их развития.

В настоящее время взгляды Вальдейера (Waldeyer, 1870) представляют лишь исторический интерес, равно как и понятие «зачаткового» эпителия. Ряд положений теории «зародышевого пути» был отвергнут (понятия детерминантов и зародышевой плазмы в трактовке Вейсмана), хотя ее важнейшая идея о раннем обособлении полового зачатка нашла экспериментальное подтверждение в многочисленных последующих исследованиях.

Выделение линии половых клеток и ее сегрегация от соматических для всех многоклеточных организмов является важнейшим событием, так как определяет сохранение и передачу новым поколениям генетической, а также эпигенетической информации. Для всех Metazoa характерны два основных варианта этого процесса. В первом случае (преформация) будущие половые клетки развиваются из материала так называемой половой (зародышевой) плазмы, определяемой в зиготе или на ранних стадиях дробления. Во втором случае (эпигенез) происходит индукция полипотентных клеток и реализация в них программы линии половых клеток (Extavour, Akam, 2003; Seydoux, Braun, 2006).

При развитии клеток половой линии по пути преформации половой зачаток (гонобласт) формируется бласто-

мерами, содержащими зародышевую плазму. Наличие зародышевой плазмы — частный случай ооплазматической сегрегации. В процессе раннего эмбриогенеза половая плазма распределяется между теми бластомерами, которые непосредственно превратятся в ППК (в этом случае происходит раннее обособление ППК на начальных стадиях дробления, что характерно для некоторых червей, низших ракообразных, насекомых, бесхвостых амфибий).

Половая плазма у ряда животных содержит различные даже при световой микроскопии особые структуры — детерминанты половых клеток (половые детерминанты), которые, по современным представлениям, являются естественными маркерами зародышевой плазмы, а не факторами, детерминирующими развитие половых клеток (Eddy, 1975; Айзенштадт, 1984; Houston, King, 2000; Seydoux, Braun, 2006). Так, у низших ракообразных уже в зиготе появляются специфические гранулы — эктосомы. При первом делении дробления эктосомы оказываются в том бластомере, который дает начало линии половых клеток. У насекомых половыми детерминантами являются полярные гранулы, обнаруживаемые в зиготе или в бластомерах на ранних стадиях дробления. У бесхвостых амфибий в качестве половых детерминантов рассматриваются участки зиготы, лишённые крупных желточных гранул и содержащие так называемые плотные тельца.

Все перечисленные структуры при электронно-микроскопическом изучении представляют собой скопления тонкофибрилярного или гранулярно-фибрилярного материала, окруженные митохондриями и не ограниченные мембраной. Этот материал имеет ядерное происхождение: как правило, он обнаруживается внутри ядерных пор и поблизости от них в цитоплазме. Существуют и автордиографические доказательства его ядерного происхождения. Выявляемые на электронно-микроскопическом уровне скопления описанных структур получили название митохондриального облачка, хроматоидных телец или перинуклеарных телец. В их составе постоянно содержатся кислые ядерные белки и периодически, рибонуклеопротеиды. Таким образом, эктосомы, полярные гранулы и т. п. представляют собой большие скопления перинуклеарных телец, различимые при световой микроскопии.

Было показано, что локализованные в перинуклеарных тельцах продукты участвуют в детерминации клеток половой линии, а гены, кодирующие эти продукты, эволюционно консервативны у представителей Metazoa — от губок до млекопитающих. Так, в составе перинуклеарных телец обнаружен белковый продукт (РНК-хеликаза) — транскрипт гена *Vasa* или его гомологов (*Vasa* — один из ключевых генов, детерминирующих развитие линии половых клеток, в том числе у человека). Присутствие РНК-хеликазы в перинуклеарных тельцах было выявлено у представителей нематод, планарий, насекомых и позвоночных (Houston, King, 2000; Matova, Cooley, 2001; Mochizuki et al., 2001; Seydoux, Braun, 2006).

Во втором случае, когда линия половых клеток развивается по пути эпигенеза, в зиготе и бластомерах отсутствуют половые детерминанты, и ППК обособляются на сравнительно более поздних стадиях (у млекопитающих и человека — в первой фазе гастрюляции). Вступление плюрипотентных клеток зародыша на путь развития половой линии обеспечивается специфическими сигнальными молекулами, вызывающими необходимое программирование клеток (Tanaka, Matsui, 2002; Extavour, Akam, 2003; Seydoux, Braun, 2006; Hayashi et al., 2007). Данный способ

возникновения клеток половой линии характерен для млекопитающих и человека и рассматривается как преобладающий среди многоклеточных животных (Extavour, Akam, 2003).

У ранних зародышей млекопитающих и человека не выявлено половых детерминантов, т. е. естественных маркеров половой плазмы. Клетки эмбриобласта (внутренней клеточной массы) на стадии бластоцисты и даже клетки эпибласта в первой фазе гастрюляции у зародышей млекопитающих являются полипотентными, что было доказано экспериментально. Линия ППК рассматривается как клон, происходящий из клеточного материала эпибласта (первичной эктодермы) зародыша в первой фазе гастрюляции. Эпибласт служит источником как линии первичных половых клеток, так и материала всех зародышевых листков, а также внезародышевой мезодермы. У зародыша мыши возраста (E) 5.5—6.5 сут развития (E5.5—6.5) в ряде клеток проксимального эпибласта включается программа линии половых клеток (Lawson, Hage, 1994; Saitou et al., 2002). Появляется группа клеток-предшественников ППК.

В качестве пускового механизма начала дифференцировки предшественников ППК из полипотентных клеток эпибласта рассматривается воздействие сигнальных молекул BMP4 (bone morphogenetic protein4) и BMP8b, которые продуцируются клетками соседней внезародышевой эктодермы, а также BMP2, вырабатывающегося в гипобласте — внезародышевой эктодерме (Lawson, Hage, 1994; Saitou et al., 2002). Морфогенетические белки BMP — члены суперсемейства трансформирующего фактора роста бета-TGF. Их воздействие на плюрипотентные клетки эпибласта (будущие предшественники ППК) вызывает активацию факторов Smad — 1, 4, 5, 8, которые являются внутриклеточными сигнальными молекулами для BMP и в свою очередь стимулируют экспрессию генов, вызывающих дифференцировку первичных половых клеток (Kierszenbaum, Tres, 2001; Ying, Zhao, 2001; Hayashi et al., 2002; Chu et al., 2004; Massague et al., 2005).

Считалось, что в составе эпибласта нет клеток, избирательно детерминированных на развитие предшественников ППК. Лишь те клетки, которые подверглись воздействию сигнальных молекул BMP, дифференцируются по пути половой линии (Tam, Zhou, 1996). Однако было показано (Surani et al., 2004; Okamura et al., 2005), что в эпибласте только клетки его проксимального отдела восприимчивы к действию сигнальных молекул BMP4. Это связано с тем, что лишь в данных клетках имеет место специфическая выработка фактора Smad-5. Поэтому только из клеток проксимального эпибласта начинается формирование предшественников ППК.

Клетки проксимального эпибласта проявляют восприимчивость к действию сигнальных молекул BMP в течение короткого периода (со стадии E5.5 до E6.25). Эта восприимчивость проявляется в результате действия транскрипта гена *Wnt3* (Ohinata et al., 2009).

Кроме того, было показано, что и при формировании ППК человека морфогенетические белки BMP выступают в роли индуцирующих факторов. При выращивании *in vitro* эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека (идентичные плюрипотентным клеткам эпибласта) подвергались воздействию BMP4 в присутствии Kit-лиганда (SF, Steel-фактор, фактор стволовых клеток, фактор тучных клеток), что вызывало превращение ЭСК в клетки с генной экспрессией по типу ППК (Kee et al., 2006; West et

al., 2010). Таким образом, и у человека ВМР играют роль сигнальных факторов в первичной дифференцировке ППК. Сходные данные были получены на обезьянах при воздействии сигнальными молекулами ВМР на ЭСК *in vitro* (Teramura et al., 2007).

В предшественниках ППК происходит избирательная репрессия генов семейства *Hox*, включая *Hoxb1* и *Hoxa1*. Данные гены ответственны за формирование зародышевых листков, прежде всего зародышевой мезодермы, на ранних стадиях эмбриогенеза, т. е. в конечном итоге за формирование соматических тканей. Гены *Hox* активно экспрессируются в клетках эпибласта, окружающих формирующиеся ППК и дифференцирующихся по соматическому пути (Saitou et al., 2002; Yabuta et al., 2006). При подавлении генов *Hox* соответственно подавляется соматическая программа развития. Таким образом, изначально плюрипотентные клетки эпибласта начинают реализовать разные программы: одни сохраняют плюрипотентность и превращаются в ППК, другие теряют плюрипотентность и развиваются как соматические клетки. В последние годы была доказана роль транскрипционных репрессоров Blimp1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), известного также как Prdm1 (potent transcriptional regulator with PR-domain) и Blimp14 в формировании ППК на самых ранних этапах (Chang, Calame, 2002; Ohinata et al., 2005; Kurimoto et al., 2008). Blimp1 обладает дозозависимым действием, он необходим для репрессии генов, отвечающих за дифференцировку по соматическому пути, прежде всего за дифференцировку мезодермы, — генов *Hox*, а также генов, регулирующих клеточный цикл и метилирование ДНК (Nakamura, Seydoux, 2008).

В то же время Blimp1 не только не оказывает репрессорного воздействия на многие гены, избирательно активирующиеся в ППК, но участвует в их активации. Прежде всего речь идет о специфических генах ППК (см. ниже) и о ключевых генах плюрипотентности *Sox2* и *Nanog* (Avilion et al., 2003; Takahashi, Yamanaka, 2006; Saitou, 2009), экспрессия которых подавляется в клетках эпибласта, реализующих соматическую программу, но сохраняется в ППК (Yabuta et al., 2006). Необходимость Blimp1 для развития ППК доказывается и тем фактом, что у мышей *Blimp1<sup>+</sup> /Blimp1<sup>-</sup>* значительно уменьшается количество ППК (Ohinata et al., 2005; Vincent et al., 2005; Robertson et al., 2007).

В свою очередь для нормальной экспрессии *Blimp1* требуется присутствие РНК-связывающего белка LIN28, который подавляет созревание *Blimp1*-ингибирующей микроРНК (West et al., 2009).

Blimp14 не участвует в репрессии генов соматической программы, но он необходим для реактивации гена плюрипотентности *Sox2* и для дальнейшего эпигенетического репрограммирования ППК (Yamaji et al., 2008).

Вследствие перечисленных факторов Blimp1 и Blimp14 могут рассматриваться в качестве маркеров предшественников ППК на самых начальных стадиях их формирования (Ohinata et al., 2005; Vincent et al., 2005; Hayashi et al., 2007). Первоначально 6 клеток-предшественников ППК в количестве идентифицируются по экспрессии *Blimp1*. В дальнейшем на стадии E6.75 число Blimp1-позитивных клеток возрастает до 20 (Ohinata et al., 2005).

Уже на стадии E6.0 при нахождении предшественников ППК мыши в составе заднего конца первичной полоски эпибласта в них проявляется экспрессия гена *Fragilis* (Saitou et al., 2002). Данный ген (известный также как *Ifitm3*) экспрессируется еще до начала выделения ком-

пактного кластера первоначального клона ППК. Формирующиеся первичные половые клетки можно идентифицировать по высокому уровню интерферонзависимого трансмембранного белка *Fragilis* (Saitou et al., 2002; Tanaka, Matsui, 2002; Tanaka et al., 2005). Транскрипт гена *Fragilis* обеспечивает нормальную межклеточную адгезию ППК, что необходимо для их дальнейшего развития (Tres et al., 2004). Однако, хотя *Fragilis* считается важнейшим маркером предшественников ППК, он не оказывает существенного влияния на дальнейшую экспрессию специфических генов клеток половой линии (Lange et al., 2008).

Ряд авторов (Okamura et al., 2003; Matsui, 2010) рассматривает в качестве важного фактора начальной дифференцировки ППК из клеток-предшественников экспрессию адгезивных молекул E-кадгерина. Культивирование предшественников ППК с моноклональными антителами ECCD-1, блокирующими образование E-кадгерина, вызывает остановку дальнейшего развития ППК из предшественников. Считается, что E-кадгерин может либо способствовать взаимодействию клеток с сигнальными молекулами (Carmeliet et al., 1999), либо непосредственно передавать сигналы между клетками-предшественниками в кластере (Matsui, 2010).

### Первичные половые клетки и их миграция

К началу второй фазы гастрюляции у мышей (E7.25) число клеток в клоне увеличивается до 40—45, сами клетки перемещаются в область заднего отдела первичной полоски (материал будущей внезародышевой мезодермы) и формирующегося аллантоиса. На этой стадии клетки половой линии начинают экспрессию ряда специфических маркеров и могут рассматриваться уже не как предшественники ППК, а как первичные половые клетки. В дальнейшем клон данных клеток у зародыша мыши обособляется, и в процессе второй фазы гастрюляции ППК попадают во внезародышевую мезодерму и обнаруживаются около основания зачатка аллантоиса позади от первичной полоски. Далее ППК перемещаются во внезародышевую энтодерму формирующегося желточного мешка и энтодерму вентральной части задней кишки. Перечисленные этапы миграции ППК носят в некоторой степени пассивный характер, т. е. обусловлены перемещением клеточных масс зародыша во время гастрюляции. Впоследствии первичные половые клетки начинают активную миграцию к мезонефросу и зачаткам гонад.

У зародышей человека ППК также обособляются в эпибласте, а их локализация во внезародышевых структурах (энтодерме и мезодерме желточного мешка) вторична. ППК появляются еще до полного развития зародышевых листков, не принадлежат ни к одному из них, а являются потомками эмбриональных плюрипотентных клеток, лишь присутствуя в данный момент в составе того или иного зародышевого листка.

У человека первичные половые клетки морфологическими методами впервые обнаруживаются у эмбриона 14—15 сут развития (начало второй фазы гастрюляции) в краниальной зоне зародышевого щитка в области первичного узелка, а также в стенке желточного пузырька (Семенова-Тян-Шанская, 1971; Семенова-Тян-Шанская, Кнорре, 1972). В результате перемещений клеточного материала во время второй фазы гастрюляции ППК переносятся в задние отделы зародышевого щитка, а оттуда в



материал мезодермы. Те ППК, которые находились в стенке желточного пузырька, к 20-м сут эмбриогенеза оказываются в составе кровяных островков желточного мешка, но большая часть — в составе внезародышевой энтодермы желточного мешка в области, граничащей с местом выхода аллантоиса. К сожалению, этот факт дал предпосылку для ошибочной трактовки происхождения ППК человека из внезародышевой энтодермы, которая до сих пор встречается в литературе. В действительности стенка желточного мешка является лишь местом локализации ППК, где они в большом количестве могут быть обнаружены перед началом их миграции к зачаткам гонад (половым валикам).

Трудность раннего выявления первичных половых клеток у млекопитающих и человека была связана с достоверностью их идентификации, так как на ранних стадиях невозможно определить ППК с помощью только морфологических методов. Структурные особенности ППК человека описаны главным образом начиная с периода их миграции из энтодермы желточного мешка к закладкам гонад. ППК человека идентифицируют по совокупности неспецифических морфологических и гистохимических признаков (Chiquoine, 1954; Fukuda, 1976). Это крупные клетки (12—20 мкм в диаметре) округлой или неправильно округлой формы, имеющие центрально расположенное светлое ядро с хорошо заметными крупными ядрышками в количестве 1—2. В цитоплазме ППК выявляются высокая активность неспецифической щелочной фосфатазы (главный гистохимический маркер ППК), а также ШИК-позитивные гранулы гликогена.

Электронно-микроскопически в ядрах ППК обнаружены многочисленные ядерные поры, тонкодисперсный хроматин и крупные ядрышки с развитым гранулярным компонентом. Цитоплазма имеет низкую электронную плотность; из органелл присутствуют умеренно развитая гранулярная эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, много свободных рибосом, полисом, сферические митохондрии с пластинчатыми кристами, центриоли, лизосомоподобные везикулы и элементы цитоскелета. Помимо органелл в цитоплазме обнаруживаются липидные капли, пиноцитозные пузырьки и многочисленные гранулы гликогена. Клеточная мембрана формирует единичные микроворсинки, а также ламеллоподии с филоподиями. Описаны межклеточные контакты по типу плотных соединений, которые мигрирующие ППК образуют с клетками целомического эпителия и другими соматическими клетками (Fukuda, 1976; Takeva, 1997).

Особенности структуры ППК млекопитающих изучены детальнее, в том числе с применением иммуноцитохимических методов. Так, в гранулярной эндоплазматической сети ППК крыс выявлен иммунореактивный ламинин (главный гликопротеид базальных мембран), секреция которого ППК может играть важную роль в их адгезивных взаимодействиях, в том числе во время миграции (El Ouali et al., 1991). У эмбрионов крыс начиная с 13-х сут развития в ППК, мигрирующих в это время к зачаткам гонад, с помощью иммуноцитохимической методики была выявлена продукция альбумина и трансферрина (Gelly et al., 1994). Трансферрин в данном случае можно рассматривать как маркер линии половых клеток, так как впоследствии он будет накапливаться в сперматогониях и сперматоцитах первого порядка и участвовать в регуляции сперматогенеза.

В последние годы при изучении экспрессии генов в клетках половой линии были обнаружены многие специ-

фические маркеры ППК. Еще до начала миграции к зачаткам гонад (E7.2) в ППК проявляется экспрессия гена *Stella* (*Dppa3*), которая продолжается и во время миграции вплоть до половых валиков. Челночный ядерно-цитоплазматический белок *Stella* рассматривается как специфический для линии половых клеток (Sato et al., 2002; Bortvin et al., 2003).

Одновременно с началом экспрессии *Stella* в ППК включается экспрессия гена неспецифической щелочной фосфатазы *Thap* (tissue nonspecific alkaline phosphatase), о чем уже упоминалось, так как щелочная фосфатаза — главный гистохимический маркер ППК (Chiquoine, 1954; Ginsburg et al., 1990). Несмотря на то что *Stella* и *Thap* считаются главными маркерами ППК, их роль в дальнейшем развитии клеток половой линии не установлена (Bortvin et al., 2004; Bowles, Koopman, 2010).

Другим маркером ППК на ранних стадиях является зеленый флуоресцирующий белок GFP (green fluorescent protein) и его промотор — маркер плюрипотентности *Oct-4* (octamer-binding protein-4) (Yeom et al., 1996; Anderson et al., 2000; Molyneaux et al., 2001). Ген *Oct-4* отвечает за плюрипотентность и является универсальным маркером полипотентных клеток. *Oct-4* экспрессируется в делящихся клетках эмбрионов до стадии морулы, однако начиная со стадии бластулы его экспрессия прекращается в дифференцирующихся клетках трофобласта, теряющих плюрипотентность. В то же время экспрессия *Oct-4* сохраняется в полипотентных клетках эмбриобласта (внутренней клеточной массы) (Pesce, Scholer, 2001). Ко времени нахождения ППК в энтодерме желточного мешка экспрессия *Oct-4* имеет место практически только в данных клетках и является их вполне достоверным маркером (Ovitt, Scholer, 1998). В дальнейшем экспрессия *Oct-4* сохраняется в половых клетках эмбриональных яичников вплоть до стадии оогоний включительно, тогда как в яичках экспрессия данного гена проявляется в сперматогониях вплоть до взрослого возраста (Epifano, Dean, 2002). GFP впервые обнаруживается в ППК, находящихся в составе первичной полоски в эпибласте, и сохраняется во время их активной миграции.

Наряду с геном *Oct-4* в ППК продолжается экспрессия и двух других важных генов плюрипотентности — *Nanog* и *Sox-2*. Экспрессия *Oct-4* и *Nanog* сохраняется в предшественниках ППК и после того, как она подавляется в соседних клетках, развивающихся по соматической программе (со стадии E6.75). Экспрессия *Sox-2* — третьего члена группы генов плюрипотентности — начинается со стадии E6.25 и формирует вместе с *Oct-4* и *Nanog* триаду, воссоздающую плюрипотентность клеток половой линии (Yabuta et al., 2006).

К числу маркеров ППК на ранних стадиях также относится тирозинкиназный рецептор *C-kit* (*Kit*), экспрессия гена которого начинается в ППК мыши со стадии E7.25 (Matsui et al., 1990). Его следует отметить как фактор, играющий особую роль в судьбе половых клеток. *C-kit* принадлежит к семейству факторов роста с выраженной тирозинкиназной активностью. Он имеет 3 домена — внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный. *C-kit* участвует в определении направления миграции ППК к половым валикам, взаимодействуя с лигандом, который является аттрактантом для половых клеток (см. ниже). Кроме того, в дальнейшем он играет большую роль во время миграции ППК, предотвращая их гибель путем апоптоза, а также контролируя их размножение (De Felici, Pesce, 1994; Wylie, 1999; Runi-

an et al., 2006; Gu et al., 2009; Mithraprabhu, Loveland, 2009).

Ряд авторов (Durcova-Hills et al., 1999; McLaren, 2003) рассматривает в качестве маркера первичных половых клеток поверхностный антиген Ssea-1 (stage specific embryonic antigen-1). Данный антиген впервые выявляется на клетках зародыша мыши стадии 8 бластомеров и рассматривается как один из маркеров плюрипотентности.

Следует отметить, что экспрессия многих ключевых генов, определяющих начальную дифференцировку ППК, находится в свою очередь под влиянием транскрипта гена *Dazl* (deleted in azoospermia-like). *Dazl* — член семейства генов, которые кодируют РНК-связывающие белки DAZ, взаимодействующие с другими РНК-связывающими белками и регулирующие трансляцию (Reynolds et al., 2005). Хотя механизм, с помощью которого *Dazl* влияет на дифференцировку ППК, не установлен, показано, что дефекты *Dazl* вызывают нарушения экспрессии *Oct-4*, *Sox2*, *Nanog*, *Stella* и *Mhv* (mouse homologue vasa), являющихся маркерами ППК (Lin, Page, 2005; Reynolds et al., 2005; Haston et al., 2009; Kerr, Cheng, 2010). Вследствие этого *Dazl* также рассматривается в качестве маркера ППК на ранних стадиях (Clark et al., 2004; Geijsen et al., 2004).

Имеются данные о важной роли РНК-связывающего белка *Nanos3* в эпигенетическом репрограммировании ППК во время и по завершении их миграции (Tsuda et al., 2003; Yamaji et al., 2010). Гены *Nanos* консервативны в эволюции животного мира. Экспрессия *Nanos3* начинается у мыши со стадии E7.25. Транскрипт представляет собой РНК-связывающий белок, образует соединение с GFP и рассматривается как специфический фактор для линии половых клеток (Yabuta et al., 2006). Он обеспечивает выживание и пролиферацию ППК, начиная со стадии E8.0 и вплоть до E14.5 в женской гонаде (начало вступления половых клеток в мейоз). В мужской гонаде экспрессия *Nanos3* проявляется на высоком уровне до стадии E16.5, далее происходит снижение уровня экспрессии, однако она продолжается вплоть до периода половозрелости включительно, сохраняясь в недифференцированных сперматогониях — сперматогенных стволовых клетках (SSC) (Yamaji et al., 2010).

Важнейшим фактором включения программы апоптоза в ППК являются белки семейства *Bax* (BCL2-associated X). *Nanos3* подавляет экспрессию *Bax*, что способствует выживанию мигрирующих ППК и гоноцитов, находящихся в эмбриональных гонадах, а в дальнейшем и половых клеток половозрелых особей. Однако было показано, что существует и *Bax*-независимый путь апоптоза для половых клеток, так как выключение экспрессии *Bax* не предотвращает в полном объеме апоптоз половых клеток в гонаде (Stallock et al., 2003; Alton, Taketo, 2007). В качестве предполагаемого кандидата на роль фактора *Bax*-независимого пути апоптоза рассматривается *Bak*, который принадлежит к семейству *Bcl-2* и имеет много общего с *Bax* в структуре, функциях и характере экспрессии в мигрирующих ППК. *Nanos3* подавляет не только экспрессию *Bax*, но также и *Bak*, вследствие чего он рассматривается в качестве одного из главных факторов выживания ППК (Suzuki et al., 2008).

Таким образом, во время активной миграции ППК основными маркерами последних являются щелочная фосфатаза (Tnap), *Stella*, *Oct-4*, GFP, *Nanog*, *Sox-2*, C-kit, *Dazl*, *Nanos3*, а также поверхностный антиген Ssea1. У ППК человека во время миграции начинается экспрес-

сия специфического гена *Vasa*, продолжающаяся и после завершения миграции (Castrillon et al., 2000; Zeeman et al., 2002). Более того, транскрипт *Vasa* рассматривается как высокоспецифический маркер не только для клеток половой линии в норме, но и для опухолей, развивающихся из половых клеток (Zeeman et al., 2002).

### Механизмы активной миграции ППК к зачаткам гонад

Активная миграция ППК к зачаткам гонад (половым валикам) начинается у зародыша мыши со стадии E7.5, у зародыша человека — с 25-х суток развития. Миграция осуществляется двумя способами: 1) активным движением ППК по мезенхиме — так называемая интерстициальная миграция; 2) переносом ППК с кровотоком. Преобладание того или иного способа миграции варьирует у различных видов млекопитающих. Это зависит от абсолютных размеров зародыша в данный период и от расстояния от места локализации ППК (у основания аллантоиса) до половых валиков (Wartenberg, 1983). У зародышей мыши расстояние колеблется от 10 до 50 мкм, а у зародышей крупного рогатого скота оно составляет более 1 мм. В первом случае миграция происходит только по интерстициальному типу, во втором — существенную роль играет перемещение ППК с кровотоком.

У эмбрионов человека активная миграция ППК осуществляется главным образом по интерстициальному типу. Первичные половые клетки мигрируют из желточной энтодермы в закладки гонад через мезенхиму желточного мешка, задней кишки и дорсальной брыжейки. У большинства изученных видов млекопитающих мигрирующие ППК проходят через те же структуры (стенка желточного мешка, задняя кишка, дорсальная брыжейка, половые валики). Однако у некоторых животных имеют место видовые особенности в пути миграции к закладкам гонад (Mahabir, Holtz, 1999). Во всех случаях ППК движутся активно, образуя филоподии.

У млекопитающих перемещение ППК с кровотоком менее выражено, чем интерстициальная миграция. При изучении зародышей человека было показано, что когда ППК покидают стенку желточного мешка на стадии развития 25—27 сут, некоторые из них попадают в кровоток, пассивно разносятся с кровью по телу зародыша, но затем выходят путем диапедеза из сосудов в области первичных почек и зачатков гонад и продолжают миграцию по интерстициальному типу (Семенова-Гян-Шанская, 1971).

ППК перемещаются с помощью контактного ориентирования. Было обнаружено, что у зародышей человека возраста 27—30 сут развития ППК во время миграции образуют тонковолокнистый слой толщиной 30 нм, связывающий саму половую клетку с участками специфических макромолекул внеклеточного матрикса (в том числе с фибронектином) и играющий важную роль в процессах миграции и рекогносцировки. В описанном фибриллярном слое на поверхности ППК имеются специфические молекулы, необходимые для субстратной адгезии (Pereda, Motta, 1991). В процессе миграции происходят постоянные изменения адгезивных свойств ППК при их взаимодействии с определенными участками связывания в составе внеклеточного гликопротеинового матрикса. Адгезивные свойства ППК изменяются по отношению к коллагену IV типа, фибронектину и ламинину в зависимости от стадии развития зародыша во время и по завер-

шении миграции (Garsia-Castro et al., 1997). Отмечается особенно высокая степень адгезии по отношению к ламинину.

Показана роль галактозилтрансферазы, которая на поверхности ППК функционирует как рецептор, участвующий в распознавании лиганда в составе межклеточного матрикса. Таким лигандом является ламинин. Взаимодействие галактозилтрансферазы с ламинином вызывает временную адгезию ППК к матриксу и определяет трассу миграции (Vandyopadhyay et al., 2004).

Имеются данные (Gomperts et al., 1994) о том, что в ходе миграции первичных половых клеток между ними существует механическое взаимодействие с помощью отростков, которые формируют своеобразную сеть. Эта сеть агрегирует ППК в группы, тем самым способствуя их накоплению в области полового валика. Интересно отметить, что первые порции ППК мигрируют к закладкам гонад обособленно друг от друга. Следующие порции первичных половых клеток также независимо одна от другой перемещаются из области задней кишки к дорсальной брыжейке, но при подходе к половым валикам начинают при посредстве отростков формировать описанную сеть, с помощью которой проходят завершающий этап миграции и задерживаются в эмбриональных гонадах.

Установлена роль факторов клеточной адгезии и других факторов, отвечающих за межклеточные взаимодействия во время миграции ППК к половым валикам. Так, поверхностные рецепторы семейства интегринов вовлечены в процесс миграции ППК. Экспериментально было доказано, что у мышей с мутацией по гену бета1-интегрин имеет место нормальная дифференцировка ППК в эпителии, но нарушаются их миграция и заселение ими зачатков гонад, так как бета1-интегрин отвечает за взаимодействие ППК с межклеточным матриксом (Anderson et al., 1999; Eriřano, Dean, 2002). При агрегации половых клеток в составе эмбриональной гонады играют роль Е-кадгерин и Р-кадгерин, которые продуцируются как в ППК, так и в клетках целомического эпителия гонады — предшественниках клеток Сертоли (Lin, De Philip, 1996; Di Carlo, De Felici, 2000).

В основе направленной миграции первичных половых клеток к зачаткам гонад лежит положительный хемотаксис. Аттрактивные вещества определяют направление интерстициальной миграции, а также способствуют задержанию ППК, находящихся в кровотоке, в капиллярах около зачатков гонад с последующим их выходом из капилляров и продолжением миграции к половым валикам. В качестве главного аттрактивного фактора для мигрирующих ППК эмбриона мыши рассматривается Kit-лиганд Kitl (Mahakali Zama et al., 2005).

В ППК начиная со стадии E7.25 включается экспрессия *C-kit* (Kit-рецептора), который взаимодействует с лигандом Kitl. В результате этого взаимодействия запускается каскад реакций, приводящих к реорганизации актина в ППК и стимуляции миграционной активности последних (Farini et al., 2007). Экспрессия *Kitl* последовательно включается в соматических клетках в области средней линии тела зародыша по ходу задней кишки, далее в дорсальной части тела зародыша, и наконец, в клетках мезонефроса и целомического эпителия половых валиков. Имеет место волна экспрессии *Kitl*, которая определяет направление и трассу миграции ППК через мезенхимную заднюю кишку и дорсальной части тела зародыша к мезонефросу и зачаткам гонад: на стадии E7.5 ППК находятся в области энтодермы желточного мешка и энтодермы,

формирующей в дальнейшем заднюю кишку; до стадии E9.0—E9.5 ППК располагаются в составе задней кишки, а после стадии E9.5 начинают мигрировать в дорсальном направлении, покидают заднюю кишку и далее двигаются латерально в направлении мезонефросов и половых валиков (Runyan et al., 2006; Gu et al., 2009). После стадии E10.5 экспрессия *Kitl* в области средней линии дорсальной части тела зародыша прекращается, а в половых валиках сохраняется, удерживая там половые клетки.

Похожие данные получены и на зародышах человека (Hoyer et al., 2005). С помощью иммуногистохимической методики было показано присутствие *Kitl* в соматических клетках (фибробласты, клетки мезотелия дорсальной брыжейки и даже вегетативные нервные волокна) по трассе миграции ППК к зачаткам гонад. В то же время в самих ППК выявлялся комплекс Kit—Kitl, что косвенно подтверждает взаимодействие Kit, который вырабатывается в ППК с лигандом, определяющим трассу миграции.

Помимо описанного выше механизма миграция ППК направляется взаимодействием двух видов консервативных в эволюции молекул: хемокином SDF1 (stromal cell-derived factor 1), который продуцируется в соматических клетках половых валиков, и его рецептором CXCR4, экспрессируемым в половых клетках (Molyneaux et al., 2003). Взаимодействие SDF1 и CXCR4 играет роль в хемотаксисе не только ППК, но и клеток многих других типов: лимфоцитов, моноцитов, нейронов мозжечка и гиппокамп, клеток боковой линии тела у рыб, а также раковых клеток в метастазах (Bleul et al., 1996; Muller et al., 2001; David et al., 2002; Lu et al., 2002; Zeelenberg et al., 2003).

Направленная миграция ППК под контролем SDF1-CXCR4 описана у насекомых, рыб, амфибий и птиц (Knaut et al., 2003; Takeuchi et al., 2010). Данный механизм консервативен, однако у млекопитающих имеет место ряд особенностей. Так, у рыб миграция ППК контролируется взаимодействием SDF1 и CXCR4 с самого начала и до конца (Knaut et al., 2003), а у мыши — только на завершающих этапах, в процессе заселения гонадами половых валиков. Дело в том, что у мыши экспрессия лиганда SDF1 происходит в соматических клетках не по всему пути миграции ППК, а только в клетках эпителия половых валиков. Действие SDF1 осуществляется паракринно, и в его зону попадают только ППК, находящиеся в непосредственной близости от зачатков гонад. Таким образом, SDF1 оказывает аттрактивное действие прежде всего на поздних этапах миграции (Ara et al., 2003; Molyneaux et al., 2003; Stebler et al., 2004). В большей степени SDF1 влияет на пролиферацию и особенно на выживание гонацитов в зачатках гонад (Molyneaux et al., 2001, 2003).

В активной направленной миграции ППК играют роль и факторы роста фибробластов (FGF), взаимодействующие с рецепторами, экспрессируемыми в половых клетках. Так, ППК мыши на поздних стадиях миграции (E10.5) экспрессируют *Fgfr1-IIIc* и *Fgfr2-IIIb* — рецепторы факторов роста соответственно FGF2 и FGF7. Взаимодействие этих лигандов с рецепторами активирует АТФ-киназный путь в ППК, что повышает их подвижность и стимулирует межклеточные взаимодействия (FGF2), а также приводит к увеличению численности ППК (FGF7) (Takeuchi et al., 2005).

Надо особо отметить, что все факторы, определяющие активную миграцию ППК, будь то аттрактанты (Kitl и SDF1) или вещества, влияющие на подвижность половых клеток (FGF), предохраняют ППК от апоптотической



гибели и способствуют выживанию и увеличению их численности.

Есть данные (Dudley et al., 2007) о роли BMP4 в миграции ППК. Изучалось влияние BMP4 и антагониста BMP — Noggin — на миграцию ППК мыши *in vitro*. Исследовать данное влияние *in vivo* не представляется возможным, так как BMP играют важную роль не только в дифференцировке предшественников ППК, но и во многих процессах раннего гистогенеза, вследствие чего дефекты BMP или их рецепторов вызывают гибель эмбрионов. Было показано, что мигрирующие ППК не обладают выраженной восприимчивостью к сигнальным молекулам BMP4, поскольку в них не активируются факторы Smad (см. выше). Напротив, соматические клетки, расположенные на трассе миграции ППК, восприимчивы к BMP4, так как в них активируются факторы Smad, которые в свою очередь стимулируют экспрессию Kitl. Таким образом, BMP4 опосредованно влияет на миграцию ППК через экспрессию аттрактивного фактора Kitl, определяющего трассу миграции, пролиферацию и выживание ППК.

Перед началом и в процессе активной миграции ППК человека и млекопитающих делятся митозом, и к моменту заселения гонад их численность существенно возрастает. Так, у зародыша мыши во время миграции и в первые 2—3 сут нахождения в зачатках гонад ППК активно пролиферируют и осуществляют 8 репликативных циклов. Вследствие этого количество ППК возрастает более чем в 50 раз. Начинают миграцию у 8-суточного зародыша мыши примерно 50 ППК, в эпителии и мезенхиме задней кишки у 9-суточного зародыша их насчитывается уже 170—350, а в составе половых валиков 12-суточного эмбриона мыши — более 2.5 тыс. гоноцитов (De Felici, Pesce, 1994).

Во время миграции большинство ППК находится в пролонгированной фазе G<sub>2</sub> митотического цикла (Seki et al., 2007; Nakamura, Seydoux, 2008), судя по экспрессии циклина В1, который в высоких дозах аккумулируется в цитоплазме клеток в поздней фазе G<sub>2</sub> клеточного цикла и может служить маркером для данной фазы. Экспериментально было доказано, что в мигрирующих ППК либо прекращается синтез мРНК, либо он существенно снижен (Seki et al., 2007).

Мигрирующие ППК, оставшиеся вне зачатков гонад, подвергаются апоптозу и погибают. Это связано прежде всего с тем, что микроокружение ППК, оказавшихся вне эмбриональной гонады, прекращает выработку Kit-лиганда. Взаимодействие последнего с Kit-рецептором (который вырабатывается в половых клетках) необходимо для пролиферации и выживания ППК, а также их прикрепления к соматическим клеткам. Падение выработки Kit-лиганда включает программу апоптоза в ППК, находящихся в эктопических местах. Взаимодействие C-kit с Kit-лигандом подавляет экспрессию гена *Vax*, транскрипт которого является ключевым фактором программы включения апоптоза (Stallock et al., 2003; Runian et al., 2006). В эктопических местах в отсутствие взаимодействия Kit—Kitl включается экспрессия *Vax*, которая в свою очередь запускает программу апоптоза в ППК, следствием чего является их гибель (Stallock et al., 2003). В то же самое время экспрессия Kitl в соматических клетках эмбриональной гонады продолжается, что предотвращает находящиеся там гоноциты от гибели апоптозом.

Помимо Kitl на выживание ППК влияет SDF1 (см. выше). ППК, оказавшиеся в эктопических местах, находятся вне зоны действия данного фактора (эта зона нахо-

дится в эмбриональных гонадах, где SDF1 продуцируется соматическими клетками и действует паракринно) и погибают (Molyneaux et al., 2001, 2003).

### Список литературы

- Айзенштадт Т. Б. 1984. Цитология оогенеза. М.: Наука. 247 с.
- Семенова-Тян-Шанская А. Г. 1971. Первичные половые клетки зародышей высших позвоночных и человека ранних стадий развития. *Арх. анат.* 60 (6): 106—116.
- Семенова-Тян-Шанская А. Г., Кнопере А. Г. 1972. Половой зачаток (гонобласт), его происхождение и эволюция. *Арх. анат.* 63 (8): 29—48.
- Allegrucci C., Thurston A., Lucas E., Young L. 2005. Epigenetics and the germline. *Reproduction.* 129: 137—149.
- Alton M., Taketo T. 2007. Switch from BAX-dependent to BAX-independent germ cell loss during the development of fetal mouse ovaries. *J. Cell. Sci.* 120: 417—424.
- Anderson R., Copeland T. K., Scholer H., Heasman J., Wylie C. 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech. Develop.* 91: 61—68.
- Anderson R., Fassler R., Georges-Labouesse E., Hynes R. O., Bader B. L., Kreidberg J. A., Schaible K., Heasman J., Wylie C. 1999. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development.* 126: 1655—1664.
- Anderson R., Heasman J., Wylie C. 2001. Early events in the mammalian germ line. *Int. Rev. Cytol.* 203: 215—230.
- Ara T., Nakamura Y., Egawa T., Sugiyama T., Abe K., Kishimoto T., Matsui Y., Nagasawa T. 2003. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *PNAS.* 100: 5319—5323.
- 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 Develop.* 17: 126—140.
- Bandyopadhyay S., Banerjee S., Pal A. K., Goswami S. K., Chakravarty B., Kabir S. N. 2004. Primordial germ cell migration in the rat: preliminary evidence for a role of galactosyltransferase. *Biol. Reprod.* 71: 1822—1827.
- Bleul C. C., Fuhlbrigge R. C., Casasnovas J. M., Aiuti A., Springer T. A. 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184: 1101—1109.
- Bortvin A., Eggan K., Skaletsky H., Akutsu H., Berry D. L., Yanagimachi R., Page D. C., Jaenisch R. 2003. Incomplete reactivation of Oct-4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development.* 130: 1673—1680.
- Bortvin A., Goodheart M., Liao M., Page D. C. 2004. Dppa3/Pgc7/stella is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *BMC Dev. Biol.* 4: 000—000.
- Bowles J., Koopman P. 2007. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development.* 134: 3401—3411.
- Bowles J., Koopman P. 2010. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction.* 139: 943—958.
- Carmeliet P., Lampugnani M., Moons L., Breviaro F., Compernelle V., Bono F., Balconi G., Spagnuolo R., Oosthuysen B., Dewerchin M., Zanetti A., Angellilo A., Mattot V., Nuyens D., Lutgens E., Clotman F., Ruiter M. C., Groot A. G., Poelmann R., Lupu F., Herbert J.-M., Collen D., Dejana E. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 98: 147—157.
- Castrillon D. H., Quade B. J., Wang T. Y., Quigley C., Crum C. P. 2000. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *PNAS.* 97: 9585—9590.
- Chang D. H., Calame K. L. 2002. The dynamic expression pattern of B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1) during mouse embryonic development. *Mech. Develop.* 117: 305—309.

- Chiquoine A. D. 1954. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* 118 : 135—146.
- Chu G. C., Dunn N. R., Anderson D. C., Oxburgh L., Robertson E. J. 2004. Differential requirements for Smad4 in TGF $\beta$ -dependent patterning of the early mouse embryo. *Development.* 131 : 3501—3512.
- Clark A. T., Bodnar M. S., Fox M., Rodrigues R. T., Abeyata M. J., Firpo M. T., Reijo Pera R. A. 2004. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum. Mol. Genet.* 13 : 727—739.
- David N. B., Sapede D., Saint-Etienne L., Thisse C., Thisse B., Dambly-Chaudiere C., Rosa F. M., Ghysen A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 16 297—16 302.
- De Felici M., Pesce M. 1994. Interactions between migratory primordial germ cells and cellular substrates in the mouse. In: *Germline development.* Ciba Symp. 182 : 140—150.
- Di Carlo A., De Felici M. 2000. A role of E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Develop. Biol.* 226 : 209—219.
- Dudley B. M., Runian C., Takeuchi Y., Schaible K., Molyneux K. 2007. BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. *Mech. Develop.* 124 : 68—77.
- Durcova-Hills G., Tokunaga T., Kurosaka S., Yamaguchi M., Takahashi S., Imai H. 1999. Immunomagnetic isolation of primordial germ cells and the establishment of embryonic germ cell lines in the mouse. *Cloning.* 1 : 217—224.
- Eddy E. M. 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43 : 229—280.
- El Ouali H., Leheup B. P., Gelly J. L., Grignon G. 1991. Laminin ultrastructural immunolocalization in rat testis during ontogenesis. *Histochemistry.* 95 : 241—246.
- Epifano O., Dean J. 2002. Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol. Metab.* 13 : 169—173.
- Extavour C. G., Akam M. 2003. Mechanisms of germ cells specification across the metazoans: Epigenesis and preformation. *Development.* 130 : 5869—5884.
- Farini D., La Sala G., Tedesco M., De Felici M. 2007. Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Develop. Biol.* 306 : 572—583.
- Fukuda T. 1976. Ultrastructure of primordial germ cells in human embryo. *Virch. Arch. Cell Pathol.* 20 : 85—89.
- Garsia-Castro M., Anderson R., Heasman J., Wylie C. 1997. Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *J. Cell Biol.* 138 : 471—480.
- Geijsen N., Horoschak M., Kim K., Gribnau J., Eggan K., Daley G. Q. 2004. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic germ cells. *Nature.* 427 : 148—154.
- Gelly J.-L., Richoux J.P., Grignon G. 1994. Immunolocalization of albumin and transferrin in germ cells and Sertoli cells during rat gonadal morphogenesis and postnatal development of the testis. *Cell Tissue Res.* 276 : 347—351.
- Ginsburg V., Snow M. H., McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 110 : 521—528.
- Gomperts M., Garsia-Castro M., Wylie, Heasman J. 1994. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development.* 120 : 135—141.
- Gu Y., Runyan C., Shoemaker A., Surani A., Wylie C. 2009. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development.* 136 : 1295—1303.
- Haston K. M., Tung J. Y., Reijo Pera R. A. 2009. Dazl functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells *in vivo* and *in vitro*. *PLoS ONE.* 4 : e5654.
- Hayashi K., Kobayashi T., Umino T., Goitsuka R., Matsui Y., Kitamura D. 2002. SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast. *Mech. Develop.* 118 : 99—109.
- Hayashi K., de Sousa Lopes S. M., Surani M. A. 2007. Germ cell specification in mice. *Science.* 316 : 394—396.
- Houston D. W., King M. L. 2000. Germ plasma and molecular determinants of germ cell fate. *Curr. Top. Develop. Biol.* 50 : 155—181.
- Hoyer P. E., Byskov A. G., Mollgard K. 2005. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 234 : 1—10.
- Kee K., Gonsalves J. M., Clark A. T., Reijo Pera R. A. 2006. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Develop.* 15 : 831—837.
- Kerr C. L., Cheng L. 2010. The Dazzle in germ cell differentiation. *J. Mol. Cell Biol.* 2 : 26—29.
- Kierszenbaum A., Tres L. 2001. Primordial germ cell-somatic cell partnership: a balancing cell signaling act. *Mol. Repr. Develop.* 60 : 277—280.
- Knaut H., Werz C., Geisler R., The Tubingen 2000 Screen Consortium, Nusslein-Volhard C. 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature.* 421 : 279—282.
- Kunwar P. S., Siekhaus D. E., Lehmann R. 2006. *In vivo* migration: a germ cell perspective. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 22 : 237—265.
- Kurimoto K., Yabuta Y., Ohinata Y., Shigeta M., Yamanaka K., Saitou M. 2008. Complex genome-wide transcription dynamics by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Develop.* 22 : 1617—1635.
- Lange U. C., Adams D. J., Lee C., Barton S., Schneider R., Bradley A., Surani M. A. 2008. Normal germ line establishment in mice carrying a deletion of the Ifitm/Fragilis gene family cluster. *Mol. Cell. Biol.* 28 : 4688—4696.
- Lawson K. A., Hage W. J. 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found. Symp.* 182 : 68—84; discussion: 84—91.
- Lin L., DePhilip R. 1996. Sex-dependent expression of placental (P) cadherin during mouse gonadogenesis. *Anat. Res.* 246 : 535—544.
- Lin Y., Page D. C. 2005. Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Develop. Biol.* 288 : 309—316.
- Lu M., Grove E. A., Miller R. J. 2002. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 7090—7095.
- Mahabir E., Holtz W. 1999. Migration of primordial germ cells during embryonic development in pigs. *Reprod. Domest. Anim.* 34 : 35.
- Mahakali Zama A., Hudson F. P., Bedell M. A. 2005. Analysis of hypomorphic KitlSl mutants suggests different requirements for KITL in proliferation and migration of mouse primordial germ cells. *Biol. Reprod.* 73 : 639—647.
- Mardanpour P., Guan K., Nolte J., Lee J. H., Hasenfuss G., Engel W., Nayernia K. 2008. Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *J. Anat.* 213 : 26—29.
- Massague J., Seoane J., Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Develop.* 19 : 2783—2810.
- Matova N., Cooley L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Develop. Biol.* 231 : 291—320.
- Matsui Y. 2010. The molecular mechanisms regulating germ cell development and potential. *J. Androl.* 31 : 61—65.
- Matsui Y., Zsebo K. M., Hogan B. L. 1990. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature.* 347 : 667—669.
- McLaren A. 2001. Mammalian germ cells: birth, sex, and immortality. *Cell Struct. Funct.* 26 : 119—122.
- McLaren A. 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Develop. Biol.* 262 : 1—15.
- Mithraprabhu S., Loveland K. L. 2009. Control of KIT signaling in male germ cells: what can we learn from other systems? *Reproduction.* 138 : 743—757.
- Mochizuki K., Nishimiya-Fujisawa C., Fujisawa T. 2001. Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and



- their germline expression in Hydra. *Develop. Genes Evol.* 211 : 299—308.
- Molyneaux K. A., Stallock J., Schaible K., Wylie C. 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Develop. Biol.* 240 : 488—498.
- Molyneaux K. A., Zinszner H., Kunwar P. S., Schaible K., Stebler J., Sunshine M. J., O'Brien W., Raz E., Littman D., Wylie C., Lehmann R. 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development.* 130 : 4279—4286.
- Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Carton D., Buchanan M. E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S. N., Barrera J. L., Mohar A., Verastegui E., Zlotnik A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410 : 50—56.
- Nakamura A., Seydoux G. 2008. Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development.* 135 : 3817—3827.
- Nussbaum M. 1880. Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich. *Arch. Mikr. Anat.* 18 : 1—121.
- Ohinata Y., Ohta H., Shigeta M., Yamanaka K., Wakayama T., Saitou M. 2009. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell.* 137 : 571—584.
- Ohinata Y., Payer B., O'Carroll D., Ancelin K., Ono Y., Sano M., Barton S. C., Obukhanych T., Nussenzweig M., Tarakhovskiy A., Saitou M., Surani M. A. 2005. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature.* 436 : 207—213.
- Okamura D., Hayashi K., Matsui Y. 2005. Mouse epiblasts change responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation through functions of extraembryonic ectoderm. *Mol. Reprod. Develop.* 70 : 20—29.
- Okamura D., Kimura T., Nakano T., Matsui Y. 2003. Cadherin-mediated cell interaction regulates germ cell determination in mice. *Development.* 130 : 6423—6430.
- Ovitt C. E., Scholer H. R. 1998. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 4 : 1021—1031.
- Pereda J., Motta P. M. 1991. An unique fibrillar coat on the surface of migrating human primordial germ cells. *Arch. Histol. Cytol.* 54 : 419—425.
- Pesce M., Scholer H. 2001. Oct-4 : Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells.* 19 : 271—278.
- Raz E., Mahabaleshwar H. 2009. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fish-eye view. *Development.* 136 : 1223—1229.
- Reynolds N., Collier B., Maratou K., Bingham V., Speed R. M., Taggart M., Semple C. A., Gray N. K., Cooke H. J. 2005. Dazl binds *in vivo* to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells. *Hum. Mol. Genet.* 14 : 3899—3909.
- Robertson E. J., Charatsi I., Joyner C. J., Koonce C. H., Morgan M., Islam A., Paterson C., Lejsek E., Arnold S. J., Kallies A. et al. 2007. Blimp1 regulates development of the posterior forelimb, caudal pharyngeal arches, heart and sensory vibrissae in mice. *Development.* 134 : 4335—4345.
- Runyan C., Schaible K., Molyneaux K., Wang Z., Levin L., Wylie C. 2006. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development.* 133 : 4861—4869.
- Saitou M. 2009. Specification of the germ cell lineage in mice. *Front. Biosci.* 14 : 1068—1087.
- Saitou M., Barton S. C., Surani M. A. 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature.* 418 : 293—300.
- Sato M., Kimura T., Kurokawa K., Fujita Y., Abe K., Masuhara M., Yasunaga T., Ryo A., Yamamoto M., Nakano T. 2002. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech. Develop.* 113 : 91—94.
- Seki Y., Yamaji M., Yabuta Y., Sano M., Shigeta M., Matsui Y., Saga Y., Tachibana M., Shinkai Y., Saitou M. 2007. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development.* 134 : 2627—2638.
- Seydoux G., Braun R. E. 2006. Cell pathway to totipotency: lesson from germ cells. *Cell.* 127 : 891—904.
- Stallock J., Molyneaux K., Schaible K., Knudson C. M., Wylie C. 2003. The proapoptotic gene *Bax* is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development.* 130 : 6589—6597.
- Stebler J., Spieler D., Slanchev K., Molyneaux K. A., Richter U., Cojocaru V., Tarabykin V., Wylie C., Kessel M., Raz E. 2004. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Develop. Biol.* 272 : 351—361.
- Surani M. A., Ancelin K., Hajkova P., Lange U. C., Payer B., Western P., Saitou M. 2004. Mechanism of mouse germ cell specification: a genetic program regulating epigenetic reprogramming. *Gold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69 : 1—9.
- Surani M. A., Hayashi K., Hajkova P. 2007. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell.* 128 : 747—762.
- Suzuki H., Tsuda M., Kiso M., Saga Y. 2008. Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. *Develop. Biol.* 318 : 133—142.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126 : 663—676.
- Takeuchi T., Tanigawa Y., Minamide R., Ikenishi K., Komiya T. 2010. Analysis of SDF-1/CXCR4 signaling in primordial germ cell migration and survival or differentiation in *Xenopus laevis*. *Mech. Develop.* 127 : 146—158.
- Takeuchi Y., Molyneaux K., Runian C., Schaible K., Wylie C. 2005. The roles of FGF signaling in germ cell migration in the mouse. *Development.* 132 : 5399—5409.
- Takeva Z. 1997. The primary germ cells and formation of indifferent gonad in man. *Докл. Бълг. АН.* 50 : 97—98.
- Tam P. P., Zhou S. X. 1996. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Develop. Biol.* 178 : 124—132.
- Tanaka S. S., Matsui Y. 2002. Developmentally regulated expression of mil-1 and mil-2, mouse interferon-induced transmembrane protein like genes, during formation and differentiation of primordial germ cells. *Mech. Develop.* 119 (Suppl. 1) : S261—S267.
- Tanaka S. S., Yamaguchi Y. L., Tsoi B., Lickert H., Tam P. P. 2005. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Develop. Cell.* 9 : 745—756.
- Teramura T., Takehara T., Kawata N., Fujinami N., Mitani T., Takenoshita M., Matsumoto K., Saeki K., Iritani A., Sagawa N., Hosoi Y. 2007. Primate embryonic stem cells proceed to early gametogenesis *in vitro*. *Cloning Stem Cells.* 9 : 144—156.
- Tres L. L., Rosselot C., Kierszenbaum A. L. 2004. Primordial germ cells: what does it take to be alive? *Mol. Reprod. Develop.* 68 : 1—4.
- Tsuda M., Sasaoka Y., Kiso M., Abe K., Haraguchi S., Kobayashi S., Saga Y. 2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science.* 301 : 1239—1241.
- Vincent S. D., Dunn N. R., Sciammas R., Shapiro-Shalef M., Davis M. M., Calame K., Bikoff E. K., Robertson E. J. 2005. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development.* 132 : 1315—1325.
- Waldeyer W. 1870. *Eierstock und Ei.* Leipzig: Engelmann Verl.
- Wartenberg H. 1983. Germ cell migration induced and guided by somatic cell interaction. *Bibl. Anat.* 24 : 93—110.
- Weismann A. 1885. *Die Kontinuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung.* Jena: G. Fischer Verl.
- Weismann A. 1892. *Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung.* Jena: G. Fischer Verl.
- West F. D., Roche-Rios M. I., Abraham S., Rao R. R., Natrajan M. S., Bacanamwo M., Stice S. L. 2010. KIT ligand and bo-

ne morphogenetic protein signaling enhances human embryonic stem cell to germ-like cell differentiation. *Hum. Reprod.* 25 : 168—178.

West J. A., Viswanathan S. R., Yabuuchi A., Cunniff K., Takeuchi A., Park I. H., Sero J. E., Zhu H., Perez-Atayde A., Frazier A. L., Surani M. A., Daley G. Q. 2009. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*. 460 : 909—913.

Wylie C. 1999. Germ cells. *Cell*. 96 : 165—174.

Yabuta Y., Kurimoto K., Ohinata Y., Seki Y., Saitou M. 2006. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol. Reprod.* 75 : 705—716.

Yamaji M., Seki Y., Kurimoto K., Yabuta Y., Yuasa M., Shigeta M., Yamanaka K., Ohinata Y., Saitou M. 2008. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40 : 1016—1022.

Yamaji M., Tanaka T., Shigeta M., Chuma S., Saga Y., Saitou M. 2010. Functional reconstruction of Nanos3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals dis-

tinct subcellular localizations of Nanos3. *Reproduction*. 139 : 381—393.

Yeom Y. I., Fuhrmann G., Ovitt C. E., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hubner K., Scholer H. R. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*. 122 : 881—894.

Ying Y., Zhao G.-Q. 2001. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in mouse. *Develop. Biol.* 232 : 484—492.

Zeelenberg I. S., Ruuls-Van Stalle L., Roos E. 2003. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 63 : 3833—3839.

Zeeman A.-M., Stoop H., Boter M., Gillis Ad J. M., Castrillon D. H., Oosterhuis J. W., Looijenga L. H. J. 2002. VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. *Lab. Invest.* 82 : 159—166.

Zhao G.-Q., Garbers D. L. 2002. Male germ cell specification and differentiation. *Develop. Cell.* 2 : 537—547.

Поступила 18 XI 2010

#### THE MAMMALIAN AND THE HUMAN PRIMARY GERM CELLS. DIFFERENTIATION, IDENTIFICATION, MIGRATION

V. G. Kozhukhar

State Academy of Pediatrics, St. Petersburg;  
e-mail: V. Kojukhar@yandex.ru

Last years many new facts on gene expression at the different stages of PGC development were obtained. The process of germline segregation in different species realizes in different manner — as preformation or epigenesis. In the review the mechanisms of the mammalian and the human initial germ cell lineage specification are discussed. Analysis of data on the identification of PGC from the moment of initial detection in epiblast up to completion of migration to gonadal anlagen was performed. Information on the PGC markers of the different stages of development, the mechanisms of PGC migration towards genital ridges and the chemokines that direct migration is discussed.

Key words: primary germ cells, markers, migration, chemokines epiblast.