LUDZKIE ZARODKOWE KOMÓRKI MACIERZYSTE – REGULACJA PLURIPOTENCJI I RÓŻNICOWANIA*

HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS – REGULATION OF PLURIPOTENCY AND DIFFERENTIATION

Anna WITKOWSKA[1], Maria Anna CIEMERYCH[2], Aneta SUWIŃSKA[1]

[1]Zakład Embriologii oraz [2]Zakład Cytologii, Instytut Zoologii.
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste – ES (ang. *Embryonic Stem*) są to komórki uzyskane z przedimplantacyjnych zarodków w stadium blastocysty. W odpowiednich warunkach można je hodować *in vitro*. Ze względu na swoje unikalne właściwości: nieograniczoną zdolność do samoodnowy oraz pluripotencję, czyli możliwość różnicowania we wszystkie tkanki obecne w organizmie, wzbudzają one duże nadzieje na ich zastosowanie nie tylko w badaniach naukowych, ale także w terapiach różnego rodzaju schorzeń. Artykuł ten ma na celu opisanie mechanizmów pozwalających na zachowanie pluripotencji, samoodnawianie, ale także różnicowanie ludzkich zarodkowych komórek macierzystych. Opisuje on również alternatywne, niewymagające uśmiercania ludzkich zarodków i niewzbudzające zastrzeżeń natury etycznej źródła pozyskiwania pluripotentnych komórek. Szczególną uwagę poświęcono pracom, które pozwoliły na ustalenie optymalnych metod hodowli tych komórek.

Słowa kluczowe: ludzkie zarodkowe komórki macierzyste, pluripotencja, Oct3/4, Nanog.

Summary: Embryonic stem (ES) cells derived from preimplantation embryos at the blastocyst stage are unique in their unlimited self-renewal ability and pluripotency allowing their differentiation into any cell type. For these reasons ES cells are considered as a perfect material for basic research on their differentiation capacities, and also for the studies devoted to the development of novel therapies. This article focuses at the mechanisms regulating ES cells pluripotency, self-renewal, and also influencing their differentiation. It also describes alternative methods of the derivation of pluripotent stem cell lines, which do not require embryo destruction and thus do not raise ethical issues. A special attention is paid to the development of ES cell culture.

Key words: human embryonic stem cells, pluripotency, Oct3/4, Nanog.

*Artykuł powstał podczas realizacji projektu badawczego finansowanego ze środków na naukę MNiSW NN301 4051 33.

1. WSTĘP

W okresie przedimplantacyjnym zarodek ssaków ma postać blastocysty – pęcherzyka złożonego z dwóch warstw komórek – zewnętrznej zwanej trofektodermą, i wewnętrznej zawierającej grupę niezróżnicowanych komórek, tworzących tzw. węzeł zarodkowy – ICM (ang. *Inner Cell Mass*). Komórki węzła zarodkowego mają zdolność różnicowania w każdą tkankę organizmu, a więc są pluripotentne. Stosując odpowiednie techniki z komórek tych można uzyskać tzw. zarodkowe komórki macierzyste – ES (ang. *Embryonic Stem*), które hodowane *in vitro* w odpowiednich warunkach zachowują niezróżnicowany charakter i pozostają pluripotentne. Ze względu na swoje niemal nieograniczone możliwości komórki ES wzbudzają duże nadzieje na zastosowanie nie tylko w badaniach naukowych, ale także w terapiach chorób degeneracyjnych. Warunkiem ich wykorzystania do celów terapeutycznych jest jednak rozwiązanie dwóch problemów. Po pierwsze, należy dokładnie poznać mechanizmy zarówno regulujące zachowanie przez nie stanu pluripotencji, jak i odpowiedzialne za ich różnicowanie. Po drugie, trzeba ustalić warunki hodowli pozwalające na wyeliminowanie składników pochodzenia zwierzęcego rutynowo stosowanych do wzbogacania podłoży hodowlanych, które stwarzają ryzyko kontaminacji zwierzęcymi patogenami. Opracowanie specjalnych pożywek hodowlanych zawierających oprócz soli wyłącznie składniki otrzymywane syntetycznie, które zapewniałyby efektywny wzrost kolonii zarodkowych komórek macierzystych, nadal sprawia wiele trudności.

Niniejszy artykuł ma na celu scharakteryzowanie najważniejszych ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za utrzymywanie pluripotencji, samoodnawianie, a także różnicowanie ludzkich zarodkowych komórek macierzystych. Jego celem jest także omówienie obecnie stosowanych metod hodowli tych komórek.

2. HISTORIA UZYSKANIA LUDZKICH ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Próby uzyskania komórek pluripotentnych rozpoczęły się w latach 70. ubiegłego wieku. W tym czasie zainteresowanie naukowców wzbudziły linie komórek wyprowadzone z guzów rozwijających się w gonadach myszy szczepów 129 i LT/Sv. Były to tak zwane komórki raka zarodkowego – EC (ang. *Embryonic Carcinoma*). Miały one zdolność nieprzerwanej proliferacji i różnicowania w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych, ale jednocześnie charakteryzował je nieprawidłowy kariotyp [4]. Po wszczepieniu komórek EC do organizmu (np. pod skórę) myszy, o nie w pełni funkcjonalnym układzie odpornościowym, tworzyły one guzy określane mianem potworniaków lub też teratom (od gr. *teratos* – potwór) zbudowane z wielu tkanek pochodzenia ekto-, endo- i mezodermalnego. Komórki te charakteryzował jednak niestabilny kariotyp, co powodowało, że nie mogły być one traktowane jako idealne źródło materiału do badań np. nad ich różnicowaniem.

W 1981 roku Evans i Kaufman oraz niezależnie od nich Martin, wyizolowali z blastocyst myszy linie pluripotentnych zarodkowych komórek macierzystych o prawidłowym kariotypie [18, 45]. W 1995 roku z blastocyst małp gatunku *Rhesus* uzyskano komórki, które przypominały raczej ludzkie komórki raka zarodkowego niż mysie komórki ES. Tworzyły one kolonie płaskie i mniej zwarte w porównaniu z mysimi komórkami ES, syntetyzowały również markery powierzchniowe charakterystyczne dla ludzkich komórek EC [78, 87]. W 1998 roku, Thomson i jego współpracownicy wyizolowali z ludzkich blastocyst pierwsze linie ludzkich zarodkowych komórek macierzystych – hES (ang. *human Embryonic Stem*) [77]. Równocześnie otrzymano komórki hES z innego źródła – pierwotnych komórek płciowych – hEG (ang. *human Embryonic Germ*) uzyskanych z listew płciowych oraz krezek 5–9-tygodniowych ludzkich płodów pochodzących z aborcji wykonanych z przyczyn zdrowotnych [68]. Pod względem morfologii, ekspresji markerów pluripotencji oraz potencjału różnicowania nie różniły się one od komórek wyprowadzonych z węzłów zarodkowych blastocyst.

Pozyskanie komórek hES wymaga zniszczenia całego zarodka, co stwarza problemy natury etycznej. Z tego względu podejmowane są poszukiwania alternatywnych źródeł komórek pluripotentnych. Dotychczas linie komórek hES udało się wyprowadzić nie tylko z pierwotnych komórek płciowych i z blastocyst, ale również z zarodków w stadium moruli [72]. W 2006 roku Klimanskaya ze współpracownikami uzyskali 2 stabilne linie komórek hES z pojedynczych blastomerów wyizolowanych z 8–10-komórkowych zarodków, które po tej procedurze mogły kontynuować dalszy rozwój [31]. W tym samym roku okazało się, że możliwe jest uzyskanie ludzkich komórek ES o pełnym potencjale rozwojowym z zarodków, które na skutek anomalii chromosomowych nie kontynuowały podziałów bruzdkowania i mogły być zatem uznane za „martwe" [95]. Kolejnym źródłem pluripotentnych komórek okazały się blastocysty rozwijające się *in vitro* z niezapłodnionych ludzkich oocytów pobudzonych do rozwoju partenogenetycznego, a więc bez udziału plemnika [43, 61]. Prowadzone są także badania mające na celu uzyskanie pluri- lub multipotentnych komórek z tkanek dorosłego organizmu (prace przeglądowe w tym numerze PBK dotyczące komórek mezenchymalnych czy komórek VSEL). Niezwykle istotnym osiągnięciem naukowym okazały się udane próby uzyskiwania komórek o właściwościach zarodkowych komórek macierzystych ze zróżnicowanych komórek somatycznych. Określono je mianem indukowanych komórek pluripotentnych – iPS (ang. *induced Pluripotent Stem*). Przez wprowadzenie do zróżnicowanych ludzkich komórek somatycznych retrowirusów kodujących geny odpowiedzialne za utrzymanie stanu pluripotencji, takich jak: *Oct3/4, Sox2* oraz *Nanog* i *Lin28* lub genów czynników transkrypcyjnych biorących udział między innymi w procesach onkogenezy (*Klf4* i *c-Myc*) udało się je przeprogramować przywracając stan niezróżnicowania i pluripotencji [42, 74, 75, 93]. Uzyskiwanie komórek w ten właśnie sposób nie wymagałoby uśmiercania ludzkich zarodków, a dodatkowo przeprogramowane komórki byłyby identyczne z komórkami pacjenta, nie wywoływałyby więc reakcji jego układu immunologicznego. Niewątpliwie komórki iPS dają nadzieję na szybki rozwój badań nad wykorzystaniem komórek pluripotentnych w medycynie. Jednak,

podobnie jak w przypadku komórek pochodzenia zarodkowego, konieczne jest precyzyjne zdefiniowanie parametrów niezbędnych do efektywnego ich uzyskiwania, hodowli *in vitro* oraz różnicowania w wybrane typy tkanek (w tym numerze PBK praca przeglądowa Archacka i wsp.[2010; str 187).

3. PROCEDURA UZYSKIWANIA KOMÓREK hES

Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste otrzymywane są przede wszystkim z zarodków, które osiągnęły stadium blastocysty. Klasyczna metoda ich uzyskiwania opiera się na kilkudniowej hodowli blastocyst na warstwie odżywczej mysich zarodkowych fibroblastów – MEF (ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*). W tym czasie węzeł zarodkowy blastocysty rozrasta się, a gdy osiągnie odpowiednie rozmiary jego komórki pobierane są pipetą, przenoszone na nowe podłoże i wielokrotnie pasażowane, aż do momentu otrzymania kolonii o morfologii charakterystycznej dla komórek ES (patrz rozdz. 4). Inna metoda otrzymywania ludzkich komórek ES polega na hodowli wyizolowanych, pozbawionych otaczających je komórek trofektodermy, węzłów zarodkowych blastocysty. Do izolacji ICM można wykorzystać laser [76, 80] lub metodę immunochirurgiczną [71]. Ta druga technika polega na inkubacji blastocyst w roztworze surowicy zwierzęcia immunizowanego komórkami myszy (jeżeli izolujemy mysie ICM) lub człowieka (jeżeli izolujemy ludzkie ICM), a następnie umieszczeniu ich w roztworze dopełniacza ulegającego aktywacji pod wpływem białek związanych z zewnętrznymi komórkami trofektodermy. W efekcie dochodzi do lizy tych komórek. Zniszczenie trofektodermy nie powoduje uszkodzenia leżącego wewnątrz blastocysty węzła zarodkowego, który może zostać przeniesiony na warstwę komórek odżywczych, hodowany, a następnie dezagregowany mechanicznie lub enzymatycznie z użyciem trypsyny, kolagenazy IV lub dispazy.

Poważny problem stanowi bardzo duża wrażliwość komórek hES na dezagregację zarówno metodą enzymatyczną, jak i mechaniczną. Znaczny odsetek komórek ulega wówczas apoptozie, zwłaszcza gdy podejmowane są próby rozdzielania kolonii na pojedyncze komórki. Z kolei umieszczanie w hodowli dużych agregatów komórek sprzyja różnicowaniu tych znajdujących się na obrzeżach. Optymalny wzrost komórek hES otrzymywano wówczas, gdy na nowe podłoże przenoszono grupy złożone z około 10 komórek [60, 84]. Jednak nawet przy zastosowaniu takiej procedury efektywność wzrostu kolonii wynosiła tylko ok. 1%. Watanabe ze współpracownikami przebadali szereg potencjalnych czynników ochronnych, a wśród nich: czynniki wzrostu oraz inhibitory proteaz i kinaz, których zastosowanie mogłoby zapobiec zaindukowanej dezagregacją apoptozie [84]. Wykazali, że dodanie do hodowli inhibitora kinazy Rho (inhibitor ROCK) znacznie poprawia przeżywalność i zwiększa efektywność wzrostu nowych kolonii, nawet gdy w wyniku dezagregacji do hodowli trafiają pojedyncze komórki hES. Li i współpracownicy wykazali, że zastosowanie inhibitora kinazy Rho pozwala zmniejszyć odsetek ulegających apoptozie komórek hES poddanych procedurze krioprezerwacji, standardowej metodzie służącej do

przechowywania i transportowania komórek. Przeżywalność zamrożonych kolonii hES po pasażowaniu osiąga niecałe 10% [61, 64]. Zastosowanie inhibitora Rho przed umieszczeniem komórek w temperaturze –80ºC pozwalało na zwiększenie odsetka przeżywających komórek do ok. 90% [40].

4. CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK hES – MORFOLOGIA, MARKERY PLURIPOTENCJI

W odróżnieniu od mysich komórek ES, które rosną w postaci okrągłych, zbitych skupisk, ludzkie komórki ES tworzą płaskie, luźno upakowane, 2–4-warstwowe kolonie o wyraźnych granicach [22]. Zarówno mysie, jak i ludzkie komórki ES charakteryzuje duży stosunek objętości jądra do objętości cytoplazmy oraz obecność wyraźnych jąderek w jądrach komórkowych [15]. Jednak cykl komórkowy ludzkich komórek ES jest ponad dwa razy dłuższy niż mysich i trwa 30–35 godzin [1].

Morfologia kolonii, a także pojedynczych komórek hES, nie pozwala na odróżnienie komórek pluripotentnych od tych, które rozpoczęły różnicowanie. Identyfikacja możliwa jest natomiast metodami immunocytologicznymi. Określono bowiem zestaw markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych najbardziej charakterystycznych i specyficznych dla ludzkich komórek niezróżnicowanych i pluripotentnych. Zaliczamy do nich takie białka jak antygeny powierzchniowe SSEA-3 i SSEA-4 (ang. *Stage Specific Embryonic Antigen*) oraz glikoproteiny TRA-1-60 i TRA-1-81 (ang. *Tumor Rejection Antigen*) [11, 25, 68]. W odróżnieniu od komórek mysich, ludzkie komórki ES nie syntetyzują białka SSEA-1. Pojawia się ono na komórkach hES, kiedy te rozpoczynają proces różnicowania [20, 60]. Ludzkie komórki ES, podobnie jak mysie, charakteryzuje także wysoka aktywność alkalicznej fosfatazy AP (ang. *Alkaline Phosphatase*) oraz telomerazy [11, 77].

Za kluczowe dla utrzymania pluripotencji komórek ES uważane są trzy czynniki transkrypcyjne: Oct3/4, Nanog i Sox2 [7, 54, 55, 64, 77]. Podczas normalnego rozwoju ich ekspresja rozpoczyna się na etapie bruzdkowania (gdy zygota dzieli się na coraz mniejsze komórki), a następnie ulega ograniczeniu do komórek węzła zarodkowego blastocysty i jej pochodnych [24]. W komórkach hES poziom ekspresji tych genów jest wysoki [60, 64]. Co istotne, kontrolują one ekspresję wielu białek zaangażowanych w regulację ścieżek sygnałowych, czynników transkrypcyjnych i enzymów wewnątrzkomórkowych. Geny *Oct3/4* i *Sox2* są istotne dla syntezy czynników transkrypcyjnych, takich jak: UTF-1, REX-1/Zfp-42 oraz transkryptazy TERT (ang. *Telomerase Reverse Transcriptase*) i czynników TERF1 i TERF2 (ang. *TElomeric Repeat binding Factor 1 and 2*) [21, 47, 67, 85]. Jednocześnie oddziałują one na swoje promotory i wraz z czynnikiem transkrypcyjnym FoxD3, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, utrzymują swoją ekspresję na poziomie warunkującym stan pluripotencji i samoodnowy [33, 41, 53, 54]. Oprócz genów kodujących markery pluripotencji w komórkach hES transkrybowanych jest wiele innych, przy czym ich „zestaw" jest różny w różnych liniach komórek oraz zależy

od warunków hodowli [6, 69]. Stwarza to dodatkowe trudności w określeniu czynników unikatowych dla komórek hES.

5. OPTYMALIZACJA WARUNKÓW HODOWLI

Standardowa procedura uzyskiwania ludzkich komórek ES opiera się na hodowli blastocyst na warstwie odżywczej mysich zarodkowych fibroblastów (MEF), w pożywce wzbogaconej płodową surowicą bydlęcą – FBS (ang. *Foetal Bovine Serum*). MEF wykorzystywane w hodowli komórek ES inaktywowane są mitomycyną C lub przez poddanie ich działaniu promieniowania gamma. Traktowanie komórek mitomycyną C hamuje syntezę DNA w wyniku alkilacji, fragmentacji nici DNA i tworzenia wiązań krzyżowych pomiędzy poszczególnymi jego fragmentami. W efekcie fibroblasty tracą zdolność do podziałów i stanowią idealne podłoże do hodowli innych, dzielących się komórek. Ważnym krokiem na drodze do optymalizacji warunków hodowli było opracowanie przez Price'a w 1998 roku substytutu surowicy SR (ang. *Serum Replacement*) zawierającego między innymi insulinę, transferynę oraz albuminę, które pozwoliły na wyeliminowanie FBS [57]. Użycie w hodowli substytutu surowicy nie eliminuje jednak potrzeby zastosowania warstwy komórek odżywczych lub pożywki „uwarunkowanej" obecnością tych komórek – CM (ang. *Conditioned Medium*) [89]. Jak dotąd nie udało się opracować syntetycznej pożywki, która zapewniałaby podziały niezróżnicowanych i pluripotentnych komórek hES, hodowanych zarówno na warstwie ludzkich komórek odżywczych, jak i bez warstwy odżywczej. Zastosowanie w hodowli ludzkiej surowicy również nie dawało jednoznacznych, zadowalających efektów [32, 44, 58].

Warunki hodowli ludzkich komórek ES nie różnią się zatem znacząco od tych stosowanych podczas uzyskiwania i hodowli komórek mysich. Z czasem wykazano, że komórki mysie nie muszą być hodowane na warstwie fibroblastów. Wystarczająco dobre warunki zapewnia hodowla na szalkach pokrytych żelatyną pod warunkiem, że pożywka hodowlana wzbogacona jest, podobnie jak w przypadku hodowli na MEF, hamującym różnicowanie czynnikiem przeciwbiałaczkowym LIF (ang. *Leukaemia Inhibitory Factor*) [70, 86]. Okazało się jednak, że w przypadku komórek ludzkich dodanie egzogennego LIF nie jest wystarczające do utrzymania ich w stanie niezróżnicowanym [27]. Różnicowaniu komórek hES hodowanych bez udziału komórek odżywczych można przeciwdziałać wzbogacając pożywkę w zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*), Aktywinę A i białko Noggin [1, 32, 91].

Opracowując warunki hodowli komórek hES podjęto także próby zastąpienia mysich fibroblastów komórkami ludzkimi. Wśród testowanych komórek znalazły się izolowane z jajowodów komórki nabłonkowe, komórki mięśniowe i fibroblasty izolowane ze skóry [62, 63]. Jednak komórki te nie zapewniały optymalnych warunków dla utrzymania stanu pluripotencji hodowanych na nich komórek hES. Hodowla przedłużona do 30 dni była możliwa w zasadzie tylko na podłożu z ludzkich

komórek zrębu szpiku kostnego [13], a długotrwały wzrost komórek hES osiągnięto dopiero przy zastosowaniu inaktywowanych fibroblastów z napletków ludzkich noworodków [2, 26, 28]. Komórki hES hodowane na takiej warstwie odżywczej wykazywały niezróżnicowany charakter nawet po ponad 57-krotnym pasażowaniu. Istotną zaletą badanych fibroblastów jest możliwość ich wielokrotnego pasażowania (ponad 25 razy) bez utraty ich zdolności do zapewnienia odpowiednich warunków do wzrostu komórek ES. Zapewnia to odpowiednio dużo czasu na dokładne przebadanie fibroblastów i wykluczenie prawdopodobieństwa ich kontaminacji patogenami, takimi jak np. retrowirusy czy wirusy zapalenia wątroby i inne [2, 26]. Ludzkie komórki ES udało się także hodować przez ponad rok na podłożu z komórek ludzkiego endometrium – hUEC (ang. *human Uterine Endometrial Cells*) [34]. Podobnie jak omówione powyżej fibroblasty, komórki hUEC pomimo wielokrotnego pasażowania zachowują właściwości niezbędne do ich wykorzystania w hodowli komórek ES. Muszą jednak być pobrane w odpowiedniej fazie, tzn. kiedy dochodzi do intensywnej proliferacji komórek endometrium. Genbacev i wsp. uzyskali ludzkie komórki ES wykorzystując do ich hodowli fibroblasty wyizolowane z łożysk w 6.–9. tygodniu ciąży [19]. Natomiast Chen i współpracownicy wykazali, że fibroblasty uzyskane drogą różnicowania ludzkich komórek ES *in vitro* także mogą być z powodzeniem wykorzystane jako warstwa odżywcza [12].

Poszukiwania odpowiedniego rodzaju ludzkich komórek, które mogłyby być wykorzystane jako komórki odżywcze, przebiegały równolegle z próbami hodowli komórek hES na innych podłożach, do których mogłyby one przylegać i tworzyć kolonie. Jedną z komercyjnie dostępnych substancji jest Matrigel, czyli ekstrakt z błony podstawnej mysiego mięsaka. Zawiera on m.in. lamininę, kolagen IV oraz inne składniki macierzy międzykomórkowej i czynniki wzrostu [30, 83]. Xu i współpracownikom udało się z powodzeniem hodować na nim cztery linie komórek hES [89]. Zachowały one niezróżnicowany charakter w czasie, kiedy komórki ukończyły około 130 podziałów komórkowych. Alternatywą dla Matrigelu może być zastosowanie wybranych białek budujących macierz międzykomórkową, takich jak np. laminina lub fibronektyna [3, 40, 69, 89].

Udoskonalenie warunków hodowli, które pozwalałyby na całkowite pominięcie komórek odżywczych lub pożywki uwarunkowanej przez te komórki, wymaga wnikliwych badań określających, jakie czynniki wydzielane przez te komórki są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórek ES. Eiselleova i współpracownicy porównywali mysie i ludzkie fibroblasty i wykazali, że ludzkie fibroblasty izolowane z napletków noworodków produkowały więcej bFGF i białka Gremlin, inhibitora ścieżki BMP, jednak znacząco mniej Aktywiny A [17]. Czynnik bFGF już wcześniej okazał się niezbędny w hodowli komórek hES [1, 22, 91], ale to Aktywina A jest prawdopodobnie najbardziej krytycznym czynnikiem warunkującym utrzymanie pluripotencji przez hES [17, 29, 82, 88]. Wydzielanie Aktywiny A przez ludzkie, ale nie mysie fibroblasty znacząco zmniejszało się po inaktywacji mitomycyną C lub promieniowaniem gamma. Może to tłumaczyć fakt, że ludzkie komórki ES różnicują spontanicznie z większą częstością na ludzkich niż na mysich fibroblastach [17].

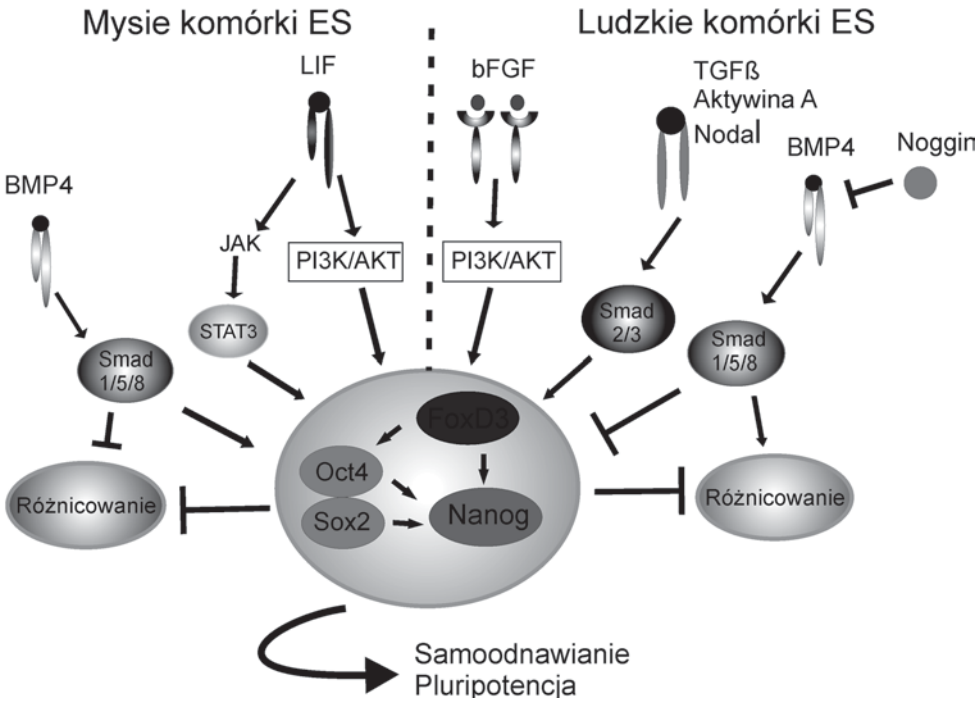
Wydaje się zatem, że ludzkie komórki ES mogą być hodowane w różnych warunkach. Nadal jednak trwają prace mające na celu opracowanie warunków najbardziej optymalnych, zapewniających zachowanie niezróżnicowanego charakteru tych komórek i ich zdolności do ciągłej samoodnowy. Niezwykle istotne jest zatem poznanie i zdefiniowanie ścieżek sygnałowych oraz kluczowych czynników odpowiedzialnych za stan pluripotencji komórek hES.

6. ŚCIEŻKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW ZAANGAŻOWANE W UTRZYMANIE STANU PLURIPOTENCJI

Kluczową rolę w regulacji procesów samoodnowy i zachowania pluripotencji mysich komórek ES odgrywają ścieżki sygnałowe, w które zaangażowany jest LIF i czynnik transkrypcyjny STAT3 (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) [46, 48, 49] oraz BMP (ang. *Bone Morphogenetic Protein*) i Id3 (ang. *Inhibitor of differentiation 3*) [92]. Istotną rolę odgrywa również szlak przekazywania sygnału, w którym biorą udział kinazy 3-fosfatydyloinozytolu – PI3K (ang. *Phosphoinositide-3-kinase*) i kinaza AKT [52] oraz szlak kinaz z rodziny Src [5]. Niektóre z tych kaskad sygnałowych oraz czynniki transkrypcyjne, takie jak: Oct3/4, Nanog i Sox2, kontrolują również samoodnawianie ludzkich komórek ES (ryc. 1) [94]. Wydaje się jednak, że między ludzkimi i mysimi komórkami ES istnieją znaczące różnice. Wykazano bowiem, że dla utrzymania unikalnych właściwości komórek hES konieczne jest współdziałanie ścieżek sygnałowych aktywowanych m.in. przez bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*), TGFβ/Aktywina/Nodal, szlaku MAP kinaz ERK1 i ERK2 (ang. *Extracellular signal-Regulated Kinase*) oraz ścieżki zależnej od WNT i β-kateniny [29, 88].

6.1. Ścieżki przekazywania sygnałów LIF-LIFR-gp130-STAT3 i ras-raf-MEK-ERK

Oddziaływanie LIF na komórkę ES warunkowane jest przez jego połączenie z błonowym kompleksem receptorowym zbudowanym z dwóch podjednostek – receptora LIF (LIFR) oraz glikoproteiny gp130. W przypadku mysich komórek ES kompleks ten aktywuje dwa szlaki przekazywania sygnałów. Pierwszy prowadzi do aktywacji kinazy tyrozynowej Jak, która fosforyluje czynnik STAT3. Prowadzi to do jego dimeryzacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie STAT3 działa jako czynnik transkrypcyjny. Drugi to szlak MAP kinaz ERK1 i ERK2 (Ras/Raf/MEK/ERK). Ufosforylowane przez MEK1, a więc aktywne kinazy ERK1 i ERK2 zmieniają swoją lokalizację z cytoplazmatycznej na jądrową. W jądrze komórkowym regulują aktywność czynników transkrypcyjnych, takich jak: Elk, Ets, Myc i SRF (ang. *Serum Response Factor*), indukujących różnicowanie mysich komórek ES [10, 49]. Aktywacja szlaku MAP kinazy prowadzi zatem do różnicowania komórek ES myszy. W przeciwieństwie do komórek mysich, w ludzkich komórkach ES



RYCINA 1. Najważniejsze czynniki wpływające na stan niezróżnicowania i pluripotencji mysich i ludzkich komórek ES. Oct3/4, Sox2, Nanog i FoxD3 to jedne z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji i samoodnawiania się komórek ES. Ich ekspresja regulowana jest przez czynniki transkrypcyjne, których pojawienie się zależy od działania sygnałów zewnętrznych. W przypadku mysich komórek ES najważniejsze są dwa białka: LIF i BMP4. Przyłączenie LIF do jego receptora na komórce ES prowadzi do aktywacji dwóch kinaz: kinazy JAK, która fosforyluje i prowadzi do dimeryzacji czynnika STAT3, oraz kinazy PI3K aktywującej białko AKT. Przyłączenie białka BMP4 powoduje z kolei fosforylację białek Smad 1/5/8. Aktywne białka STAT3 i Smad 1/5/8 ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję genów kodujących czynniki pluripotencji i tym samym przeciwdziałają różnicowaniu. W zachowanie pluripotencji i utrzymywanie niezróżnicowanego stanu ludzkich komórek ES zaangażowane są: bFGF, który aktywuje kinazę PI3K fosforylującą AKT, oraz białka TGFβ, Aktywina A i Nodal aktywujące białka Smad2/3. AKT wpływa hamująco na kinazę GSK-3β, a Smad2/3 wpływają na ekspresję genu *Nanog*. Aktywacja ścieżki sygnałowej, w której uczestniczy BMP4 prowadzi do różnicowania ludzkich komórek ES. Jej zablokowanie przez białko Noggin pozwala na utrzymanie przez nie stanu pluripotencji (wg [94](rycina adaptowana za zgodą wydawnictwa John Wiley & Sons, Inc: J Cell Biochem [94] copyright 2008)

FIGURE 1. The most important factors affecting the undifferentiated state and pluripotency of mouse and human ES cells. Oct3/4, Sox2, Nanog and FoxD3 are central factors responsible for maintenance of pluripotency and self-renewal of ES cells. Their expression is regulated by transcription factors, of which the appearance depends on the effect of external signals. In case of mouse ES cells LIF and BMP4 are the most significant proteins. LIF binding to LIF receptor on ES cell leads to the activation of two kinases: Jak kinase that phosphorylates and leads to the dimerization of STAT3, and PI3K kinase that activates AKT. BMP4 binding results in phosphorylation of Smad 1/5/8. STAT3 and Smad 1/5/8 are translocated to the nucleus and regulate the expression of genes coding pluripotency facors thus preventing differentiation. The maintenance of pluripotency and undifferentiated state of human ES cells depends on: bFGF that activates PI3K kinase phosphorylating AKT and TGFβ, Activin A and Nodal that activate Smad 2/3. AKT inhibits GSK-3β kinase and Smad 2/3 affects the expression of Nanog gene. Activation of BMP4 signaling pathway results in the differentiation of human ES cells. Inhibition of this pathway by Noggin allows for the maintenance of the pluripotency (reprinted with permission of John Wiley & Sons, Inc: J Cell Biochem [94] copyright 2008)

aktywny szlak MAP kinaz ERK1 i ERK2 jest niezbędny do tego, aby mogły one proliferować i aby się nie różnicowały [38]. Traktowanie mysich komórek ES inhibitorami kinazy MEK1 przeciwdziałało różnicowaniu. Te same inhibitory indukowały jednak różnicowanie komórek hES, któremu towarzyszył spadek ekspresji markerów pluripotencji, takich jak: TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4, Oct3/4 i Nanog [38]. Li i współpracownicy wykazali także, że w ludzkich komórkach ES ścieżka sygnałowa PI3K/AKT współdziała z kaskadą MAP kinaz ERK1/ERK2. W mysich komórkach ES fosforylacja i aktywacja PI3K indukowana jest przez podjednostkę gp130 receptora dla LIF. W przypadku ludzkich komórek ES aktywacja tej ścieżki zachodzi pod wpływem bFGF [38]. Kinazy PI3K aktywują wiele związków stanowiących przekaźniki wewnątrzkomórkowe, w tym kinazę AKT, która z kolei fosforyluje i hamuje aktywność kinazy GSK-3β (ang. *Glycogen Synthase Kinase-3β*). GSK-3β ma hamujący wpływ na ścieżkę WNT, której aktywność okazała się istotna dla utrzymania przez komórki hES stanu niezróżnicowania i pluripotencji, co zostało opisane poniżej [52].

Ponieważ LIF jest niezbędny do tego, aby mysie komórki ES zachowywały w hodowli *in vitro* niezróżnicowany charakter, hodowlę tych komórek rutynowo prowadzi się w wykorzystując albo pożywki wzbogacone w LIF albo fibroblasty syntetyzujące ten czynnik [59]. Ludzkie komórki ES różnicują pomimo obecności czynnika LIF w pożywce hodowlanej. Jest więc pewne, że chociaż syntetyzują one obie podjednostki receptora LIF: LIFRβ i gp130, to wykorzystują one inny mechanizm samoodnawiania niż komórki mysie [14, 27].

6.2. Ścieżka przekazywania sygnałów WNT

Wykazano, że w ludzkich komórkach ES zwiększona jest ekspresja genów kodujących główne białka szlaku WNT (ang. *Wingless typed*), takie jak: β-katenina, kinaza syntazy glikogenu – GSK-3β czy podjednostka receptora WNT – Frizzled [23, 85]. Aktywacja szlaku przekazywania sygnału za pośrednictwem WNT zależy od przyłączenia do znajdującego się na powierzchni komórki receptora Frizzled białka WNT. Powoduje to inaktywację kinazy GSK-3β, która odpowiedzialna jest za fosforylację β-kateniny. Fosforylacja β-kateniny prowadzi do jej ubikwitynacji i degradacji [50]. Zahamowanie działania GSK-3β powoduje akumulację β-kateniny w jądrze komórkowym, gdzie oddziałuje ona z czynnikami transkrypcyjnymi aktywującymi transkrypcję genów kodujących między innymi Oct3/4, Nanog i Rex1. Ponieważ czynniki te są kluczowe dla zachowania pluripotencji, szlak WNT wpływa na utrzymanie ludzkich komórek ES w stanie niezróżnicowanym. Zahamowanie funkcji GSK-3β możliwe jest także przy użyciu specyficznych inhibitorów, między innymi BIO (ang. *6-Bromoindirubin-3'-oxime*). Egzogenne podanie inhibitora BIO skutkuje utrzymywaniem charakterystycznej morfologii komórek hES oraz zachowaniem ekspresji markerów pluripotencji, takich jak Oct3/4 [66]. Z pracy Dravida i współpracowników wynika, że gdy komórki hES nie są hodowane na warstwie komórek odżywczych, aktywacja szlaku WNT nie jest wystarczająca do zablokowania ich różnicowania [15]. Dodanie do pożywki białka Wnt3a powodowało co

prawda zwiększenie proliferacji i przeżywalności komórek, ale stopniowo traciły one zdolność do formowania niezróżnicowanych kolonii. Wyniki te zostały potwierdzone, gdy zastosowano antagonistę WNT, który uniemożliwiał oddziaływanie WNT z jego receptorem i gdy okazało się, że nie spowodowało to utraty markerów pluripotencji w hodowanych ludzkich komórkach ES [15, 66, 88]. Aktywny szlak WNT stymuluje więc proliferację ludzkich komórek ES, ale przy braku wspomagających komórek odżywczych nie zapobiega ich różnicowaniu.

6.3. Ścieżka przekazywania sygnałów bFGF

Działanie ścieżki sygnałowej zależnej od bFGF związane jest z regulacją proliferacji, różnicowania oraz apoptozy komórek. Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste syntetyzują znaczne ilości bFGF oraz mają na swojej powierzchni receptory tego czynnika: FGFR – 1, 3 i 4 [67, 85]. Związanie bFGF z FGFR-1 prowadzi do fosforylacji, a przez to aktywacji wielu kinaz, w tym kinaz MAP – ERK1/ERK2 [38]. W komórkach hES bFGF powoduje zwiększoną ekspresję białek ścieżki TGFβ/Aktywina/Nodal, czyli szlaku przekazywania sygnału istotnego dla zachowania pluripotencji [22]. Przypuszczalnie szlak sygnalizacyjny bFGF hamuje także transport ufosforylowanych białek z rodziny Smad do jądra komórkowego. Białka Smad są czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez ścieżkę BMP4, które indukują różnicowanie komórek hES [36, 91]. Jest także możliwe, że bFGF wydzielany przez komórki ES do pożywki, w której są one hodowane, działa na nie autokrynnie. Pomimo że ludzkie komórki ES syntetyzują bFGF, wydaje się, że obecność egzogennego bFGF sprzyja zachowaniu niezróżnicowanego charakteru [8, 16].

6.4. Ścieżka TGFβ/Aktywina/Nodal i BMP

Do rodziny transformujących czynników wzrostu biorących istotny udział w samoodnawianiu komórek hES należą BMP4, transformujący czynnik wzrostu TGFβ-1 (ang. *Transforming Growth Factor β1*), Aktywina A oraz Nodal. W przeciwieństwie do mysich komórek ES, w których aktywacja ścieżki białka z rodziny BMP blokuje proces różnicowania [92], w komórkach hES jej aktywacja prowadzi do gwałtownego spadku ekspresji genów *Nanog* i *Oct3/4*, powodując różnicowanie tych komórek w komórki trofoblastu [90]. Zablokowanie aktywności ścieżki BMP4 przez stosowanie jej inhibitorów, takich jak np. białko Noggin czy Gremlin, pobudza samoodnowę komórek hES [90, 91]. Początkowo wydawało się, że białka TGFβ-1 i Aktywina A współdziałają z bFGF w utrzymaniu pluripotencji komórek hES [3, 29, 82]. Jednak badania Xiao i współpracowników wykazały, że kluczową rolę pełni Aktywina A, a jej aktywność jest wystarczająca do tego, aby komórki hES hodowane bez warstwy odżywczej nie różnicowały [88]. Aktywina A wiążąc się ze swoim receptorem fosforyluje i tym samym aktywuje białka Smad2/3. Białka te transportowane są do jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję markerów pluripotencji, takich jak: Oct3/4 i Nanog oraz białek Nodal, WNT, bFGF i FGF8. Jak już wspomniano, Aktywina A hamuje aktywność ścieżki BMP hamując fosforylację jej białek efektorowych – Smad 1/5/8 [29]. Aktywacja białek

Smad2/3 przez Aktywinę A pobudza ekspresję genu *Nanog* i hamuje w ten sposób różnicowanie w kierunku neuroektodermy. Z kolei białko Nanog wiążąc się ze Smad2/3 moduluje ich aktywność jako czynników transkrypcyjnych i blokuje różnicowanie w kierunku endodermy. Interakcje te zapewniają ludzkim zarodkowym komórkom macierzystym zdolność ciągłego samoodnawiania się [73, 82].

7. MECHANIZMY EPIGENETYCZNE WARUNKUJĄCE SAMOODNOWĘ I RÓŻNICOWANIE KOMÓREK ES

Swoje unikalne właściwości komórki ES zawdzięczają nie tylko czynnikom transkrypcyjnym, takim jak: Oct3/4, Nanog i Sox2 czy opisanym powyżej białkom ścieżek sygnalizacyjnych. W regulacji samoodnowy, pluripotencji i różnicowania tych komórek biorą udział również specyficzne mechanizmy epigenetyczne, czyli takie, które mogą wpływać na funkcję genów przez prowadzącą do wyciszenia ekspresji genów metylację cytozyn DNA oraz posttranslacyjne modyfikacje białek histonowych, takie jak: metylacja, acetylacja, fosforylacja czy ubikwitynacja. Modyfikacje te powodują albo wyciszenie albo aktywację ekspresji genów zlokalizowanych w obszarach DNA związanego z modyfikowanymi histonami.

Regiony promotorowe genów będących markerami pluripotencji np. *Oct3/4* i *Nanog* charakteryzuje acetylacja związanych z tymi sekwencjami histonów H3 i H4. Modyfikacja ta prowadzi do aktywacji transkrypcji tych genów w komórkach ES, co wpływa na utrzymywanie ich w niezróżnicowanym stanie. Ten typ modyfikacji jest charakterystyczny również dla innych komórek, w tym zróżnicowanych komórek somatycznych [51]. W komórkach ES funkcjonuje także specyficzny tylko dla nich mechanizm epigenetyczny, prowadzący do wyciszenia ekspresji genów odpowiedzialnych za różnicowanie. W regionach promotorowych genów pełniących istotne funkcje w determinacji losu komórek w zarodku np. *Cdx2* i *Gata4* oraz *Msx1*, *Nkx2-2*, *Pax3* i *Sox1* występują dwie, mające przeciwstawne działanie, modyfikacje histonu H3: trimetylacja na lizynie 4 prowadząca do aktywacji transkrypcji i trimetylacja na lizynie 27, która powoduje hamowanie transkrypcji [35]. Unikalność tego mechanizmu polega na tym, że jednoczesna metylacja tych dwóch reszt lizynowych histonu H3 powoduje, że geny związane z różnicowaniem są transkrypcyjnie nieaktywne, ale utrzymywane w „stanie gotowości" i aktywowane dopiero w momencie różnicowania. Rolę metylotransferazy lizyny 27 histonu H3 pełnią białka z grupy Polycomb PcG (ang. *Polycomb Group*). Przypuszcza się, że czynniki transkrypcyjne zaangażowane w utrzymywanie pluripotencji: Oct3/4, Nanog i Sox2 mogą wpływać na represję niektórych ze wspomnianych markerów różnicowania przez współdziałanie z białkami PcG.

8. PODSUMOWANIE

Ludzkie komórki ES stanowią obiecujący model dla badań różnicowania komórek zachodzącego podczas wczesnych etapów rozwoju zarodkowego, analiz mechanizmów powstawania wad rozwojowych i chorób oraz stwarzają szansę na opracowanie

nowych terapii. Ciągle jednak wiedza na temat hodowli, biologii i sposobów efektywnej kontroli różnicowania komórek hES jest niewystarczająca, aby móc rozważać bezpieczne wykorzystanie ich unikatowych właściwości. Poznanie dokładnych zależności pomiędzy działaniem czynników transkrypcyjnych, modyfikacji epigenetycznych i ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za utrzymywanie niezróżnicowanego stanu i pluripotencji ludzkich komórek ES pozwoli na stworzenie optymalnych warunków do izolacji i hodowli tych komórek, a w efekcie do ich praktycznego wykorzystania. Istotnym problemem badań, w których wykorzystuje się ludzkie komórki ES, jak i opracowywanych terapii są względy etyczne, związane z techniką ich uzyskiwania. Dlatego jednocześnie kontynuowane są badania nad komórkami ES pochodzenia zwierzęcego, zwłaszcza tymi uzyskanymi od organizmów blisko spokrewnionych z człowiekiem. Poza małpami *Rhesus*, z zarodków których do 2004 roku wyizolowano 10 linii komórek ES, podejmowano próby uzyskania komórek pochodzenia zarodkowego małp z gatunku *Cynomolgous* [56]. Otrzymano także zarodkowe komórki macierzyste, charakteryzujące się podobną morfologią i warunkami hodowli jak ludzkie komórki ES z zarodków marmozety zwyczajnej [65, 79]. W 2008 roku pojawiły się liczne doniesienia o wyizolowaniu szczurzych zarodkowych komórek macierzystych [9, 37, 39, 81]. Ponieważ szczury, podobnie jak myszy, wykorzystywane są w badaniach dotyczących wielu ludzkich chorób, dlatego komórki te z pewnością pozwolą na poznanie genetycznych podstaw niektórych schorzeń. Rozszerzenie badań nad komórkami macierzystymi o komórki uzyskane z zarodków innych gatunków ssaków daje możliwość stworzenia bardziej ogólnego obrazu właściwości i sposobów uzyskiwania tych komórek, a przez to mechanizmów rządzących wczesnym rozwojem zarodkowym ssaków.

9. LITERATURA

[1] AMIT M, CARPENTER MK, INOKUMA MS, CHIU CP, HARRIS CP, WAKNITZ MA, ITSKOVITZ-ELDOR J, THOMSON JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; **227**: 271–278.

[2] AMIT M, MARGULETS V, SEGEV H, SHARIKI K, LAEVSKY I, COLEMAN R, ITSKOVITZ-ELDOR J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2003; **68**: 2150–2156.

[3] AMIT M, SHARIKI C, MARGULETS V, ITSKOVITZ-ELDOR J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004; **70**: 837–845.

[4] ANDREWS PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; **357**: 405–417.

[5] ANNEREN C, COWAN CA, MELTON DA. The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal. *J Biol Chem* 2004; **279**: 31590–31598.

[6] BHATTACHARYA B, MIURA T, BRANDENBERGER R, MEJIDO J, LUO Y, YANG AX, JOSHI BH, GINIS I, THIES RS, AMIT M, LYONS I, CONDIE BG, ITSKOVITZ-ELDOR J, RAO MS, PURI RK. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* 2004; **103**: 2956–2964.

[7] BOYER LA, LEE TI, COLE MF, JOHNSTONE SE, LEVINE SS, ZUCKER JP, GUENTHER MG, KUMAR RM, MURRAY HL, JENNER RG, GIFFORD DK, MELTON DA, JAENISCH R, YOUNG RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; **122**: 947–956.

[8] BRANDENBERGER R, WEI H, ZHANG S, LEI S, MURAGE J, FISK GJ, LI Y, XU C, FANG R, GUEGLER K, RAO MS, MANDALAM R, LEBKOWSKI J, STANTON LW. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 707–716.
[9] BUEHR M, MEEK S, BLAIR K, YANG J, URE J, SILVA J, MCLAY R, HALL J, YING QL, SMITH A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; **135**: 1287–1298.
[10] BURDON T, STRACEY C, CHAMBERS I, NICHOLS J, SMITH A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 1999; **210**: 30–43.
[11] CARPENTER MK, ROSLER E, RAO MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2003; **5**: 79–88.
[12] CHEN HF, CHUANG CY, SHIEH YK, CHANG HW, HO HN, KUO HC. Novel autogenic feeders derived from human embryonic stem cells (hESCs) support an undifferentiated status of hESCs in xeno-free culture conditions. *Hum Reprod* 2009; **24**: 1114–1125.
[13] CHENG L, HAMMOND H, YE Z, ZHAN X, DRAVID G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 2003; **21**: 131–142.
[14] DAHERON L, OPITZ SL, ZAEHRES H, LENSCH MW, ANDREWS PW, ITSKOVITZ-ELDOR J, DALEY GQ. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; **22**: 770–778.
[15] DRAVID G, YE Z, HAMMOND H, CHEN G, PYLE A, DONOVAN P, YU X, CHENG L. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; **23**: 1489–1501.
[16] DVORAK P, DVORAKOVA D, KOSKOVA S, VODINSKA M, NAJVIRTOVA M, KREKAC D, HAMPL A. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; **23**: 1200–1211.
[17] EISELLEOVA L, PETERKOVA I, NERADIL J, SLANINOVA I, HAMPL A, DVORAK P. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* 2008; **52**: 353–363.
[18] EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; **292**: 154–156.
[19] GENBACEV O, KRTOLICA A, ZDRAVKOVIC T, BRUNETTE E, POWELL S, NATH A, CACERES E, MCMASTER M, MCDONAGH S, LI Y, MANDALAM R, LEBKOWSKI J, FISHER SJ. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril* 2005; **83**: 1517–1529.
[20] GEPSTEIN L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002; **91**: 866–876.
[21] GINIS I, LUO Y, MIURA T, THIES S, BRANDENBERGER R, GERECHT-NIR S, AMIT M, HOKE A, CARPENTER MK, ITSKOVITZ-ELDOR J, RAO MS. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004; **269**: 360–380.
[22] GREBER B, LEHRACH H, ADJAYE J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 2007; **25**: 455–464.
[23] HAO J, LI TG, QI X, ZHAO DF, ZHAO GQ. WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2006; **290**: 81–91.
[24] HART AH, HARTLEY L, IBRAHIM M, ROBB L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting *Nanog* genes in mouse and human. *Dev Dyn* 2004; **230**: 187–198.
[25] HENDERSON JK, DRAPER JS, BAILLIE HS, FISHEL S, THOMSON JA, MOORE H, ANDREWS PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002; **20**: 329–337.
[26] HOVATTA O, MIKKOLA M, GERTOW K, STROMBERG AM, INZUNZA J, HREINSSON J, ROZELL B, BLENNOW E, ANDANG M, AHRLUND-RICHTER L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003; **18**: 1404–1409.
[27] HUMPHREY RK, BEATTIE GM, LOPEZ AD, BUCAY N, KING CC, FIRPO MT, ROSE-JOHN S, HAYEK A. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells* 2004; **22**: 522–530.

[28] INZUNZA J, GERTOW K, STROMBERG MA, MATILAINEN E, BLENNOW E, SKOTTMAN H, WOLBANK S, AHRLUND-RICHTER L, HOVATTA O. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 2005; **23**: 544–549.

[29] JAMES D, LEVINE AJ, BESSER D, HEMMATI-BRIVANLOU A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 2005; **132**: 1273–1282.

[30] KLEINMAN HK, MCGARVEY ML, LIOTTA LA, ROBEY PG, TRYGGVASON K, MARTIN GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982; **21**: 6188–6193.

[31] KLIMANSKAYA I, CHUNG Y, BECKER S, LU SJ, LANZA R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006; **444**: 481–485.

[32] KOIVISTO H, HYVARINEN M, STROMBERG AM, INZUNZA J, MATILAINEN E, MIKKOLA M, HOVATTA O, TEERIJOKI H. Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod Biomed Online* 2004; **9**: 330–337.

[33] KURODA T, TADA M, KUBOTA H, KIMURA H, HATANO SY, SUEMORI H, NAKATSUJI N, TADA T. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of *Nanog* gene expression. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 2475–2485.

[34] LEE JB, LEE JE, PARK JH, KIM SJ, KIM MK, ROH SI, YOON HS. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol Reprod* 2005; **72**: 42–49.

[35] LEE TI, JENNER RG, BOYER LA, GUENTHER MG, LEVINE SS, KUMAR RM, CHEVALIER B, JOHNSTONE SE, COLE MF, ISONO K, KOSEKI H, FUCHIKAMI T, ABE K, MURRAY HL, ZUCKER JP, YUAN B, BELL GW, HERBOLSHEIMER E, HANNETT NM, SUN K, ODOM DT, OTTE AP, VOLKERT TL, BARTEL DP, MELTON DA, GIFFORD DK, JAENISCH R, YOUNG RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006; **125**: 301–313.

[36] LEVENSTEIN ME, LUDWIG TE, XU RH, LLANAS RA, VANDENHEUVEL-KRAMER K, MANNING D, THOMSON JA. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; **24**: 568–574.

[37] LI C, YANG Y, GU J, MA Y, JIN Y. Derivation and transcriptional profiling analysis of pluripotent stem cell lines from rat blastocysts. *Cell Res* 2008; in press:

[38] LI J, WANG G, WANG C, ZHAO Y, ZHANG H, TAN Z, SONG Z, DING M, DENG H. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 2007; **75**: 299–307.

[39] LI P, TONG C, MEHRIAN-SHAI R, JIA L, WU N, YAN Y, MAXSON RE, SCHULZE EN, SONG H, HSIEH CL, PERA MF, YING QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; **135**: 1299–1310.

[40] LI Y, POWELL S, BRUNETTE E, LEBKOWSKI J, MANDALAM R. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol Bioeng* 2005; **91**: 688–698.

[41] LOH YH, WU Q, CHEW JL, VEGA VB, ZHANG W, CHEN X, BOURQUE G, GEORGE J, LEONG B, LIU J, WONG KY, SUNG KW, LEE CW, ZHAO XD, CHIU KP, LIPOVICH L, KUZNETSOV VA, ROBSON P, STANTON LW, WEI CL, RUAN Y, LIM B, NG HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; **38**: 431–440.

[42] LOWRY WE, RICHTER L, YACHECHKO R, PYLE AD, TCHIEU J, SRIDHARAN R, CLARK AT, PLATH K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 2883–2888.

[43] MAI Q, YU Y, LI T, WANG L, CHEN MJ, HUANG SZ, ZHOU C, ZHOU Q. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res* 2007; **17**: 1008–1019.

[44] MANNELLO F, TONTI GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 2007; **25**: 1603–1609.

[45] MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7634–7638.

[46] MATSUDA T, NAKAMURA T, NAKAO K, ARAI T, KATSUKI M, HEIKE T, YOKOTA T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 1999; **18**: 4261–4269.
[47] NISHIMOTO M, FUKUSHIMA A, OKUDA A, MURAMATSU M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5453–5465.
[48] NIWA H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 2007; **134**: 635–646.
[49] NIWA H, BURDON T, CHAMBERS I, SMITH A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; **12**: 2048–2060.
[50] NOVAK A, DEDHAR S. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 523–537.
[51] O'NEILL LP, VERMILYEA MD, TURNER BM. Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nat Genet* 2006; **38**: 835–841.
[52] PALING NR, WHEADON H, BONE HK, WELHAM MJ. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 48063–48070.
[53] PAN G, LI J, ZHOU Y, ZHENG H, PEI D. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *Faseb J* 2006; **20**: 1730–1732.
[54] PAN G, THOMSON JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 2007; **17**: 42–49.
[55] PAN GJ, CHANG ZY, SCHOLER HR, PEI D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002; **12**: 321–329.
[56] PAU KY, WOLF DP. Derivation and characterization of monkey embryonic stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; **2**: 41.
[57] PRICE P, GOLDSBOROUGH M, TILKINS M. Embryonic stem cell serum replacement. International Patent Application WO98/30679 1998;
[58] RAJALA K, HAKALA H, PANULA S, AIVIO S, PIHLAJAMAKI H, SUURONEN R, HOVATTA O, SKOTTMAN H. Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum Reprod* 2007; **22**: 1231–1238.
[59] RATHJEN J, RATHJEN PD. Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev* 2001; **11**: 587–594.
[60] REUBINOFF BE, PERA MF, FONG CY, TROUNSON A, BONGSO A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro. Nat Biotechnol* 2000; **18**: 399–404.
[61] REVAZOVA ES, TUROVETS NA, KOCHETKOVA OD, KINDAROVA LB, KUZMICHEV LN, JANUS JD, PRYZHKOVA MV. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells* 2007; **9**: 432–449.
[62] RICHARDS M, FONG CY, CHAN WK, WONG PC, BONGSO A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 933–936.
[63] RICHARDS M, TAN S, FONG CY, BISWAS A, CHAN WK, BONGSO A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2003; **21**: 546–556.
[64] RICHARDS M, TAN SP, TAN JH, CHAN WK, BONGSO A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 2004; **22**: 51–64.
[65] SASAKI E, HANAZAWA K, KURITA R, AKATSUKA A, YOSHIZAKI T, ISHII H, TANIOKA Y, OHNISHI Y, SUEMIZU H, SUGAWARA A, TAMAOKI N, IZAWA K, NAKAZAKI Y, HAMADA H, SUEMORI H, ASANO S, NAKATSUJI N, OKANO H, TANI K. Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 2005; **23**: 1304–1313.
[66] SATO N, MEIJER L, SKALTSOUNIS L, GREENGARD P, BRIVANLOU AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; **10**: 55–63.
[67] SATO N, SANJUAN IM, HEKE M, UCHIDA M, NAEF F, BRIVANLOU AH. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol* 2003; **260**: 404–413.
[68] SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, WANG S, BUGG EM, LITTLEFIELD JW, DONOVAN PJ, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, GEARHART JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13726–13731.

[69] SKOTTMAN H, STROMBERG AM, MATILAINEN E, INZUNZA J, HOVATTA O, LAHESMAA R. Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum-free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage. *Stem Cells* 2006; **24**: 151–167.
[70] SMITH AG, HEATH JK, DONALDSON DD, WONG GG, MOREAU J, STAHL M, ROGERS D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; **336**: 688–690.
[71] SOLTER D, KNOWLES BB. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 5099–5102.
[72] STRELCHENKO N, VERLINSKY O, KUKHARENKO V, VERLINSKY Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004; **9**: 623–629.
[73] SUZUKI A, RAYA A, KAWAKAMI Y, MORITA M, MATSUI T, NAKASHIMA K, GAGE FH, RODRIGUEZ-ESTEBAN C, IZPISUA BELMONTE JC. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 10294–10299.
[74] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861–872.
[75] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676.
[76] TANAKA N, TAKEUCHI T, NERI QV, SILLS ES, PALERMO GD. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. *J Transl Med* 2006; **4**: 20.
[77] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145–1147.
[78] THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CP, BECKER RA, HEARN JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7844–7848.
[79] THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CP, HEARN JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 1996; **55**: 254–259.
[80] TURETSKY T, AIZENMAN E, GIL Y, WEINBERG N, SHUFARO Y, REVEL A, LAUFER N, SIMON A, ABELIOVICH D, REUBINOFF BE. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2008; **23**: 46–53.
[81] UEDA S, KAWAMATA M, TERATANI T, SHIMIZU T, TAMAI Y, OGAWA H, HAYASHI K, TSUDA H, OCHIYA T. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. *PLoS ONE* 2008; **3**: e2800.
[82] VALLIER L, ALEXANDER M, PEDERSEN RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2005; **118**: 4495–4509.
[83] VUKICEVIC S, KLEINMAN HK, LUYTEN FP, ROBERTS AB, ROCHE NS, REDDI AH. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 1992; **202**: 1–8.
[84] WATANABE K, UENO M, KAMIYA D, NISHIYAMA A, MATSUMURA M, WATAYA T, TAKAHASHI JB, NISHIKAWA S, NISHIKAWA S, MUGURUMA K, SASAI Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 681–686.
[85] WEI CL, MIURA T, ROBSON P, LIM SK, XU XQ, LEE MY, GUPTA S, STANTON L, LUO Y, SCHMITT J, THIES S, WANG W, KHREBTUKOVA I, ZHOU D, LIU ET, RUAN YJ, RAO M, LIM B. Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. *Stem Cells* 2005; **23**: 166–185.
[86] WILLIAMS RL, HILTON DJ, PEASE S, WILLSON TA, STEWART CL, GEARING DP, WAGNER EF, METCALF D, NICOLA NA, GOUGH NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; **336**: 684–687.
[87] WOLF DP, KUO HC, PAU KY, LESTER L. Progress with nonhuman primate embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004; **71**: 1766–1771.
[88] XIAO L, YUAN X, SHARKIS SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 1476–1486.

[89] XU C, INOKUMA MS, DENHAM J, GOLDS K, KUNDU P, GOLD JD, CARPENTER MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; **19**: 971–974.
[90] XU RH, CHEN X, LI DS, LI R, ADDICKS GC, GLENNON C, ZWAKA TP, THOMSON JA. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 1261–1264.
[91] XU RH, PECK RM, LI DS, FENG X, LUDWIG T, THOMSON JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2005; **2**: 185–190.
[92] YING QL, NICHOLS J, CHAMBERS I, SMITH A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003; **115**: 281–292.
[93] YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, FRANE JL, TIAN S, NIE J, JONSDOTTIR GA, RUOTTI V, STEWART R, SLUKVIN, II, THOMSON JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; **318**: 1917–1920.
[94] ZHANG H, WANG ZZ. Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation. *J Cell Biochem* 2008; **103**: 709–718.
[95] ZHANG X, STOJKOVIC P, PRZYBORSKI S, COOKE M, ARMSTRONG L, LAKO M, STOJKOVIC M. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells* 2006; **24**: 2669–2676.

Dr Aneta Suwińska
Zakład Embriologii, Instytut Zoologii,
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: asuwinska@biol.uw.edu.pl