

УДК 577.24

Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в направлении дефинитивной энтодермы как модель возникновения гетерогенности во время спецификации зародышевых листков

М. Н. Гордеев^{1,2,3}, А. С. Зиновьева^{1,2}, Е. Е. Петренко^{1,2,4}, Е. В. Ломерт⁵, Н. Д. Аксёнов⁶,
А. Н. Томилин^{2*}, Е. И. Бахмет^{1,2**}

¹Институт цитологии РАН, Группа динамики плюрипотентности, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Институт цитологии РАН, лаборатория молекулярной биологии стволовых клеток, Санкт-Петербург, 194064 Россия

³Институт эволюции, Университет Хайфы, Хайфа, 3498838 Израиль

⁴Технион – Институт Технологий Израиля, факультет биологии, Хайфа, 3200003 Израиль

⁵Институт цитологии РАН, лаборатория молекулярной медицины, Санкт-Петербург, 194064 Россия

⁶Институт цитологии РАН, отдел внутриклеточного сигналинга и транспорта, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: a.tomilin@incras.ru

**E-mail: e.bakhmet@incras.ru

Поступила в редакцию 29.08.2024

Принята к печати 23.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27510

РЕФЕРАТ Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в регенеративной медицине крайне перспективно благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке как в соматические клетки, так и в половые клетки. ЭСК соответствуют плюрипотентному эпибласту – ткани, которая дает начало трем зародышевым листкам (эктодерме, мезодерме и энтодерме) в ходе гастрюляции. Важно отметить, что ЭСК можно дифференцировать в различные клеточные типы, изменяя условия культивирования, что может быть использовано для моделирования гастрюляции *in vitro*. Классическая модель гастрюляции предполагает, что спецификация мезодермы и энтодермы обеспечивается градиентом сигналов FGF, BMP, Wnt и Nodal. Логично предположить, что каждый из этих сигналов должен направлять дифференцировку ЭСК в производные определенного зародышевого листка. Однако, по-видимому, спецификация ЭСК организована сложнее, а один и тот же сигнал может быть интерпретирован клетками по-разному. Используя культуральные среды с полностью определенным химическим составом, однородную популяцию «наивных» ЭСК в качестве исходной клеточной линии, а также репортерную систему *Foxa2-EGFP*, мы создали надежную модель развития дефинитивной энтодермы (ДЭ). Эта модель *in vitro* воспроизводит состояние «формативной» плюрипотентности как промежуточной стадии, которую проходит эпибласт сразу после имплантации *in vivo*. Несмотря на изначально однородное состояние популяции и высокую концентрацию активина во время энтодермальной дифференцировки, остается субпопуляция клеток, которая не дифференцируется в энтодерму. Разработанная нами модель может быть использована для исследования возникновения клеточной неоднородности во время гастрюляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА плюрипотентность, спецификация, дифференцировка, эмбриональные стволовые клетки, ЭСК, CRISPR/Cas9, гастрюляция, энтодерма, Foxa2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; FGF – fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов); BMP – bone morphogenic protein (костный морфогенетический белок); EGFP – enhanced green fluorescent protein (улучшенный зеленый флуоресцентный белок); ДЭ – дефинитивная энтодерма; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЛИФ – лейкемия-ингиби-

рующий фактор; ЭпиПК – эпибластоподобные стволовые клетки; ЭпиСК – эпибластные стволовые клетки; ППК – первичные половые клетки; KSR – knockout serum replacement (заменитель сыворотки); TGFβ – transforming growth factor beta (трансформирующий фактор роста бета).

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные более 40 лет назад, примечательны своей способностью к самообновлению и дифференцировке во все типы соматических клеток [1, 2]. Открытие индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в 2006 году стало настоящим прорывом в области исследования стволовых клеток. иПСК во многом соответствуют ЭСК, но их источником являются дифференцированные соматические клетки, которые приобрели плюрипотентное состояние посредством экзогенной экспрессии Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc [3, 4]. Как ЭСК, так и иПСК соответствуют клеткам эпибласта до имплантации [5, 6]. Во время развития мыши эпибласт появляется вместе с первичной энтодермой и трофэктодермой на 4.5 сутки эмбрионального развития (E4.5) [7, 8]. После имплантации из-за изменений в профиле экспрессии клетки эпибласта становятся восприимчивыми к внешним сигналам дифференцировки в экто-, мезо- и энтодерму [9]. На стадии E6.5 процесс гастрюляции, который опосредован сигналами FGF, Wnt, BMP и Activin/Nodal, приводит к формированию первичной полоски в задней части эпибласта [10–16]. Эта структура, образованная клетками, претерпевающими эпителиально-мезенхимальный переход, впоследствии дает начало мезодерме и дефинитивной энтодерме (ДЭ) [17, 18]. ДЭ появляется в дистальной части первичной полоски, где сигнал Activin/Nodal, обеспечиваемый висцеральной энтодермой, сильнее и мощнее сигнала BMP, источником которого является внезародышевая эктодерма [17, 19]. Соответственно, применение высоких доз активина способствует дифференцировке ЭСК в ДЭ *in vitro* [20, 21]. За формирование ДЭ ответственны транскрипционные факторы Foxa2, Eomes и Sox17 [22–27]. Интересно, что результаты нескольких исследований указывают на возможное участие основных маркеров ЭСК – Oct4, Sox2 и Nanog – не только в поддержании плюрипотентного состояния, но и в спецификации клеточных линий [28–32]. Было высказано предположение, что Nanog, который является мишенью для сигнального пути Activin/Nodal, может способствовать спецификации ДЭ [33–35].

Будущее регенеративной медицины связано с ЭСК и иПСК, однако, прежде чем эти клетки будут использоваться на практике, необходимо разработать безопасные, эффективные и воспроизводимые протоколы их дифференцировки *in vitro*. Уже

разработано несколько таких протоколов, имитирующих ранний эмбриогенез. Во-первых, культивирование ЭСК/иПСК в химически определенной среде N2B27 позволяет избавиться от неизвестных компонентов сыворотки; дальнейшее добавление лейкемия-ингибирующего фактора (ЛИФ), ингибитора MEK (PD0325901) и ингибитора GSK3 (CHIR99021) в среду 2i-LIF-N2B27 способствует поддержанию так называемых «наивных» ЭСК, которые являются однородной популяцией и имеют транскрипционный профиль, соответствующий профилю в эпибласте до имплантации на стадии E4.5 [5, 36]. Эти условия культивирования используются на протяжении короткого периода, поскольку длительное культивирование ЭСК в такой среде приводит к эпигенетическим и геномным изменениям [37, 38]. Последующая смена этой среды на N2B27 с добавлением bFGF, активина и заменителя сыворотки KSR на 2 дня способствует переходу «наивных» ЭСК в «формативное» плюрипотентное состояние; клетки на этой стадии обозначаются как эпибластоподобные (ЭпиПК). ЭпиПК соответствуют эпибласту эмбриона после имплантации на стадии E5.5, они способны дифференцироваться как в первичные половые клетки (ППК), так и в производные трех зародышевых листков [6, 39–42]. В нескольких недавних исследованиях описаны химически определенные среды, способствующие поддержанию стабильного «формативного» плюрипотентного состояния [43–46].

В настоящем исследовании мы использовали протокол перехода от «наивных» ЭСК к ЭпиПК с последующим добавлением высоких доз активина для запуска дифференцировки в ДЭ. Эта стратегия позволила нам эффективно и воспроизводимо получать клетки-предшественники энтодермы. Важно отметить, что использование однородной культуры клеток в качестве исходной и применение вышеупомянутой схемы культивирования максимально приближают эту дифференцировку к соответствующим процессам *in vivo*. Кроме того, в данной работе была создана линия ЭСК, благодаря которой возможно непрерывное отслеживание процесса спецификации дефинитивной энтодермы в живых клетках. Дифференцировка ЭСК в конкретном направлении представляется как следствие добавления определенного ростового фактора. Следовательно, использование однородной адгезивной культуры ЭСК и добавление подобных сигнальных молекул теоретически должны приводить к дифференцировке всех клеток в опре-

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для CRISPR/Cas9

Название	Нуклеотидная последовательность
cM_LA-Foxa2_F (AvrII)	TATcctaggGACATACCGACGCAGCTACA
cM_LA-Foxa2_R (NsiI)	TATatgcatGGATGAGTTCATAATAGGCCTGGA
cM_RA-Foxa2_F (MluI)	TATcgcgttAGAGAAGATGGCTTTCAGGCC
cM_RA-Foxa2_R (SalI)	ATAgtcgacTATTGACCCCGTCTCCACA
Foxa2_guide_F	caccgATGAACTCATCCTAAGAAGA
Foxa2_guide_R	aaacTCTTCTTAGGATGAGTTCATc
gtM_FoxA2-F3	CAGTCACGAACAAAGCGGGC
gtM-FoxA2-R2	TCAGCGCATCTCCAGTAAC

деленном направлении. Однако, вне зависимости от высокой концентрации активина, нам не удалось получить ДЭ со 100% эффективностью и, вероятно, этот эффект может быть объяснен с помощью реакционно-диффузионной модели [47].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК-конструкции, использованные в работе

Левое и правое плечи гомологии (941 и 810 п.н. соответственно) вблизи стоп-кодона гена *Foxa2* были амплифицированы с геномной ДНК мыши с использованием ДНК-полимеразы Phusion (ThermoFisher, США). Далее полученные фрагменты лигировали в вектор Oct4-T2A-EGFP (созданный А.А. Кузьминым, неопубликованные данные) по сайтам рестрикции AvrII, NsiI, MluI и SalI с заменой плечей локуса *Oct4*. Последовательности гидовой РНК (гРНК) для двойного разрыва ДНК, опосредованного CRISPR, были выбраны с помощью платформы Benchling (benchling.com) в области, близкой к стоп-кодону гена *Foxa2*. Выбранная гРНК обладала наименьшей вероятностью неспецифической активности в соответствии с методом Hsu [48]. Олигонуклеотиды для выбранных последовательностей гРНК были синтезированы в компании «Евроген» (Россия), отожджены и лигированы в вектор lentiCRISPRv2 (Addgene). Все конечные конструкции были проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Использованные олигонуклеотиды приведены в табл. 1.

Работа с клеточными культурами

Все реактивы для культивирования клеток, если не указано иное, произведены компанией ThermoFisher (Gibco, США). ЭСК мыши линии E14 Tg2a (Bay Genomics, США) культивировали при температуре 37°C и 5% CO₂. Клетки пассировали с использованием 0.05% раствора трип-

сина / 0.01% раствора EDTA в стандартных условиях на пластике, обработанном желатином в среде mES: Knockout DMEM с добавлением 15% фетальной телячьей сыворотки (Biosera, США), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 1× незаменимых аминокислот, 50 мкМ β-меркаптоэтанола (Merck, ФРГ) и 500 ед/мл экспрессированного в бактериях hLIF собственного производства.

Для получения наивных ЭСК, клетки, которые культивировали в среде, содержащей сыворотку, высевали на пластик, обработанный поли-L-орнитином (0.01%), в среду 2i-LIF-N2B27: N2B27 с добавлением 500 ед/мл hLIF, 3 мкМ CHIR99021 (Axon, США) и 1 мкМ PD0325901 (Axon) как описано ранее [39]. Для получения ЭпиПК наивные ЭСК высевали на пластик, покрытый фибронектином (Merck) (15 мкг/мл), в среде для ЭпиПК: N2B27 с добавлением 12 нг/мл bFGF (Peprotech, США), 20 нг/мл активина А (Peprotech) и 1% заменителя сыворотки KSR. Для анализа РНК клетки высевали в плотности 25 000 клеток/см². Для экспериментов по дифференцировке клетки первоначально высевали в низкой плотности 250 клеток/см² в среду ЭпиПК. Через 2 дня среду ЭпиПК заменяли на N2B27 с добавлением специфических факторов: 10 мкМ SB505124 (Tocris, Великобритания) для эктодермальной дифференцировки, 50 нг/мл BMP4 (Peprotech) для мезодермальной дифференцировки и 100 нг/мл активина А (Peprotech) для ДЭ-дифференцировки.

Получение линии ЭСК Foxa2::T2A-EGFP

Донорная конструкция Foxa2::T2A-EGFP и плазида lentiCRISPRv2, содержащая гРНК (500 нг при молярном соотношении 1:1), были котрансфицированы в ЭСК с использованием реагента FuGENE (Promega, США) в среде OptiMEM. На следующий день клетки пересевали на 10-см чашку Петри, об-

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные для ОТ-ПЦР

Название	Нуклеотидная последовательность
Nanog_F	GCTCCATAACTTCCGGGGAGG
Nanog_R	GTGCTAAAATGCGCATGGCT
Esrrb_F	GTCTGACACTTGGGGACCAG
Esrrb_R	CTACCAGGCGAGAGTGTTC
Klf4_F	TACCCCTACACTGAGTCCCG
Klf4_R	GGAAAGGAGGGTAGTTGGGC
Fgf5_F	TCCTTCACCGTCACTGTTCC
Fgf5_R	TTCACTGGGCTGGGACTTCT
Otx2_F	ACTTGCCAGAATCCAGGGTG
Otx2_R	CTTCTTCTTGGCAGGCCTCA

Таблица 3. Антитела, использованные в данном исследовании

Белок	Каталожный номер	Производитель
Oct4	sc-5279 (C-10)	Santa-Cruz
Sox2	MA1-014	ThermoFisher
Nanog	A300-397	Bethyl
Foxa2	sc-374375	Santa-Cruz
Brachyury	AF2085	R&D Systems
Sox1	ab109290	Abcam
Sox17	AF1924	R&D Systems

работанную желатином. На следующий день в культуральную среду на 2 суток добавляли 2 мкг/мл пурамицина (Merck). Далее клетки культивировали в течение 10 дней без добавления антибиотиков. Затем проводили отбор отдельных клонов и тестировали их на включение трансгена методом ПЦР с использованием праймеров gtM_FoxA2 и набора LR HS-PCR (Biolabmix, Россия). Уровень EGFP в ходе экспериментов по дифференцировке измеряли с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе CytoFLEX (Beckman Coulter), а также в ходе цейтраферной съемки на конфокальном микроскопе Yokogawa CQ1.

Приготовление метафазных пластинок

Метафазные пластинки получали как описано ранее [49]. ЭСК, находящиеся в стадии экспоненциального роста, в течение 2 ч обрабатывали раствором Колцемида (0.1 мкг/мл) в CO₂-инкубаторе (Sigma-Aldrich, США). Далее клетки собирали и инкубировали в гипотоническом 0.56% растворе KCl в течение 20 мин, затем фиксировали раствором метанола/уксусной кислоты (3:1), промывали и хранили в фиксирующем растворе при температуре -20°C. Клеточную суспензию каплями наносили на предметные стекла (Superfrost; ThermoFisher), высушивали на воздухе и выдерживали в течение

ночи при комнатной температуре. Затем метафазные пластинки окрашивали DAPI и визуализировали с помощью микроскопа EVOS fl Auto.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью реагента для экстракции РНК ExtractRNA Reagent («Евроген», Россия). кДНК синтезировали с использованием 1 мкг тотальной РНК, обратной транскриптазы M-MuLV («Евроген») и праймера oligo(dT) (ThermoFisher). Количественную ОТ-ПЦР проводили в буфере 5× qPCRMix-HS SYBR («Евроген») на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Уровень экспрессии нормировали по количеству GAPDH; для визуализации брали значения dCq. Праймеры для ОТ-ПЦР приведены в табл. 2.

Иммуноцитохимический анализ

Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде (ThermoFisher) в течение 10 мин, обрабатывали 0.1% раствором Triton X-100 в течение 15 мин, блокировали в 3% растворе БСА в течение 1 ч при комнатной температуре и окрашивали соответствующими антителами (табл. 3) в течение ночи при 4°C. Затем образцы промывали 5–6 раз раствором PBS с добавлением 0.1% Tween (PBST), окрашивали вторичными флуоресцентными антителами (Jackson

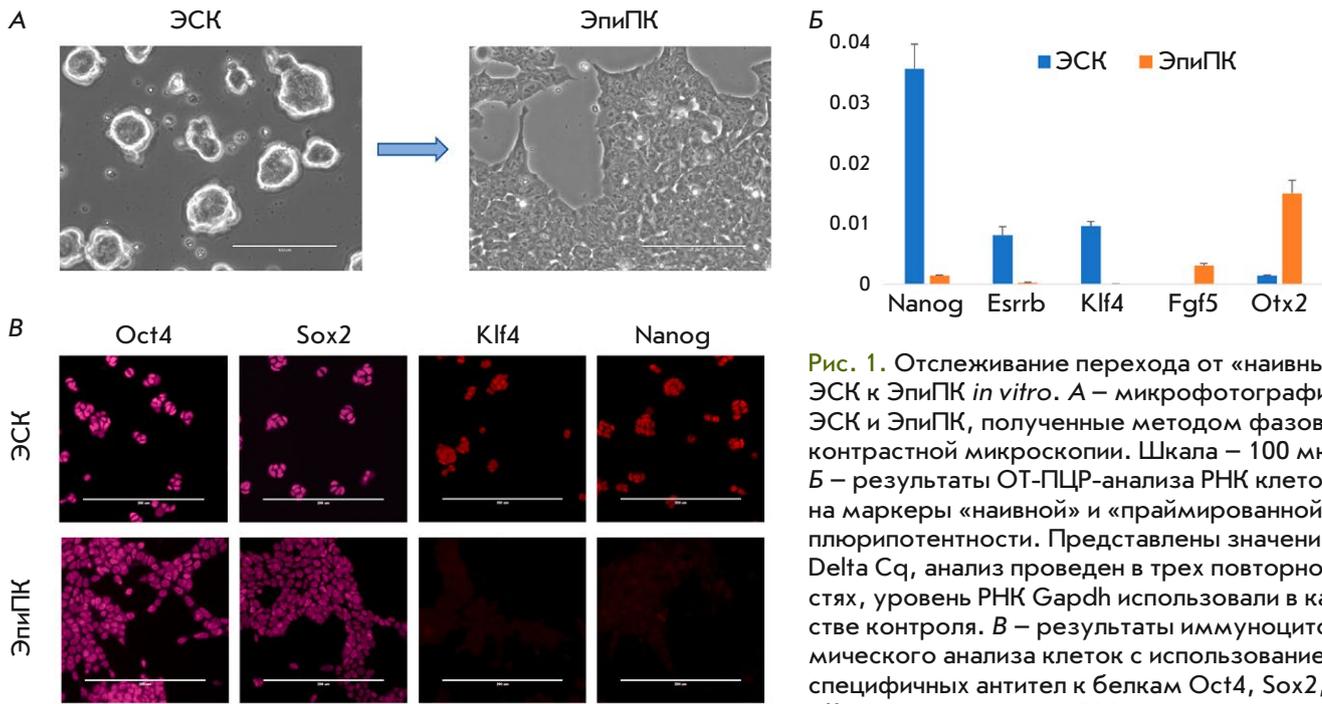


Рис. 1. Отслеживание перехода от «наивных» ЭСК к ЭпиПК *in vitro*. **А** – микрофотографии ЭСК и ЭпиПК, полученные методом фазово-контрастной микроскопии. Шкала – 100 мкм. **Б** – результаты ОТ-ПЦР-анализа РНК клеток на маркеры «наивной» и «праймированной» плюрипотентности. Представлены значения Delta Cq, анализ проведен в трех повторностях, уровень РНК *Gardh* использовали в качестве контроля. **В** – результаты иммуноцитохимического анализа клеток с использованием специфичных антител к белкам Oct4, Sox2, Klf4 и Nanog. Шкала – 200 мкм

ImmunoResearch, США) в течение 2 ч при комнатной температуре и также промывали PBST. Окрашенные клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS fl Auto (Life Technologies, ThermoFisher), оснащенного фильтрами DAPI, GFP, RFP и CY5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение метода перехода наивных ЭСК в ЭпиПК

В процессе культивирования в химически определенной среде 2i-LIF-N2B27 [36] в течение 5 дней ЭСК формировали округлые колонии, при этом признаков дифференцировки не наблюдалось (рис. 1А, левое изображение). Для перехода наивных ЭСК в ЭпиПК клетки пересевали на пластик, обработанный фибронектином, в среду ЭпиПК, и в таких условиях культивировали на протяжении 2 дней [39]. В этот период отмечались морфологические изменения – клетки расплывались и образовывали однослойные колонии (рис. 1А, правое изображение). Анализ РНК и иммуноцитохимический анализ подтвердили, что ЭСК и ЭпиПК соответствовали «наивному» и «формативному» состоянию плюрипотентности соответственно (рис. 1Б, В). Как и ожидалось, экспрессия маркеров «наивной» плюрипотентности *Nanog*, *Esrrb* и *Klf4* отмечалась в ЭСК, но снижалась в ЭпиПК. Напротив, ЭпиПК демонстрировали

экспрессию маркеров формативной плюрипотентности – *Fgf5* и *Otx2* (рис. 1Б).

Направленная дифференцировка ЭпиПК в экто-, мезо- и энтодерму

Для осуществления дифференцировки ЭпиПК в направлении трех зародышевых листков наивные ЭСК пересевали в низкой плотности в среду для ЭпиПК. Через 2 дня среду меняли на N2B27 с добавлением одного из следующих факторов: ингибитора рецептора $TGF\beta$ – SB505124 (для запуска эктодермальной дифференцировки [34, 44, 50]), рекомбинантного BMP4 (для мезодермальной дифференцировки [51–53]) или рекомбинантного активина А в высокой концентрации (100 нг/мл, для энтодермальной дифференцировки [20, 21, 43]). Иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры, специфичные для клеточных линий, подтвердило успешный запуск дифференцировки: маркер мезодермы *Brachyury* был обнаружен в клетках, обработанных BMP4, маркер нейроэктодермы *Sox1* – в клетках, обработанных ингибитором SB, фактор ДЭ *Foxa2* – в клетках, обработанных активинном (рис. 2А). Известно, что *Foxa2* также может обнаруживаться в кардиогенных клетках-предшественниках, т.е. в мезодермальной линии, поэтому спецификация энтодермы должна быть подтверждена детекцией *Sox17*. Полученные *Foxa2*⁺-клетки также окрашивались на маркер *Sox17* (рис. 2Б).

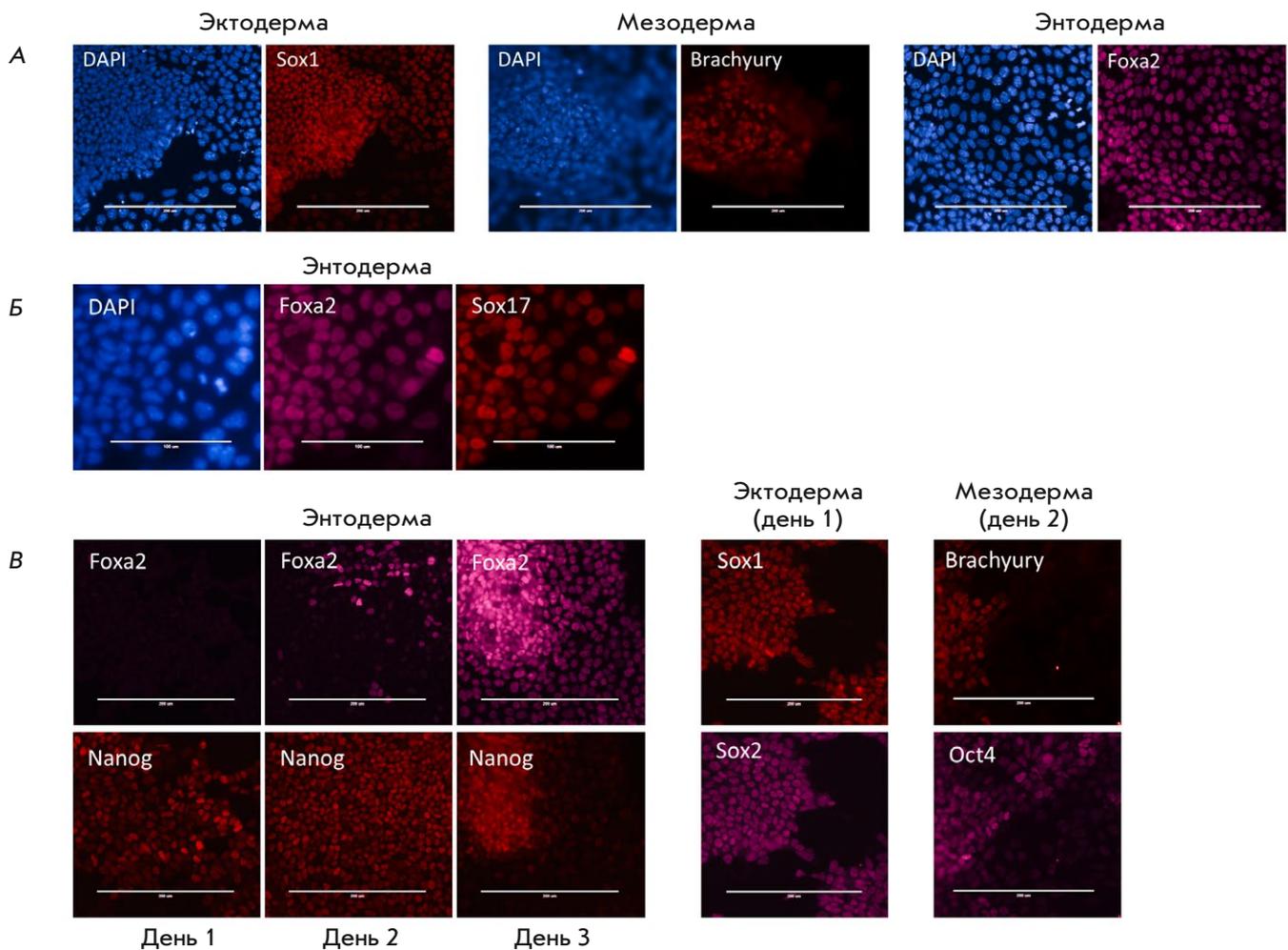


Рис. 2. ЭпиПК отвечают на внешние сигналы дифференцировки и могут развиваться в направлении трех зародышевых листков. *А* – иммуноцитохимическое окрашивание дифференцированных клеток на белки Sox1, Brachyury и Foxa2. Шкала – 200 мкм. *Б* – иммуноцитохимическое окрашивание производных энтодермы на маркеры Foxa2 и Sox17. Шкала – 100 мкм. *В* – реактивация экспрессии Nanog во время спецификации энтодермы. Oct4 колокализует с Brachyury во время спецификации мезодермы, в то время как Sox2 колокализует с Sox1 во время дифференцировки нейроэктодермы. Масштабная линейка – 200 мкм

На ранних стадиях эмбриогенеза экспрессия Nanog снижается на этапе имплантации, но затем повторно активируется в области первичной полоски [54–56]. Ранее предполагали, что Nanog необходим для надлежащей энтодермальной дифференцировки посредством регуляции Eomes [35]. Экспрессия Nanog действительно не обнаруживалась в ЭпиПК (рис. 1*В*), что напоминает снижение его экспрессии в эпибласте во время имплантации. Чтобы точно воспроизвести энтодермальную дифференцировку *in vivo*, модель *in vitro* должна характеризоваться повторной активацией экспрессии Nanog. В рамках нашей дифференцировки мы наблюдали повторную экспрессию Nanog уже на 1-й день (рис. 2*В*). Кроме того, экспрессия Nanog пред-

шествовала экспрессии Foxa2, обнаруженной на 2-й день и усиливалась к 3-му дню дифференцировки в ДЭ (рис. 2*В*). Хотя Oct4 и Sox2 функционируют совместно в самообновляющихся ЭСК, в ходе дифференцировки они действуют независимо и участвуют в спецификации мезодермы и нейроэктодермы соответственно [30, 31]. В соответствии с этими данными, мы наблюдали колокализацию Oct4 с маркером мезодермы Brachyury, а в случае Sox2 – с маркером нейроэктодермы Sox1 (рис. 2*В*).

Создание репортерной линии ЭСК Foxa2::T2A-EGFP

С целью прижизненного отслеживания дифференцировки ДЭ с помощью системы CRISPR/Cas9, пе-

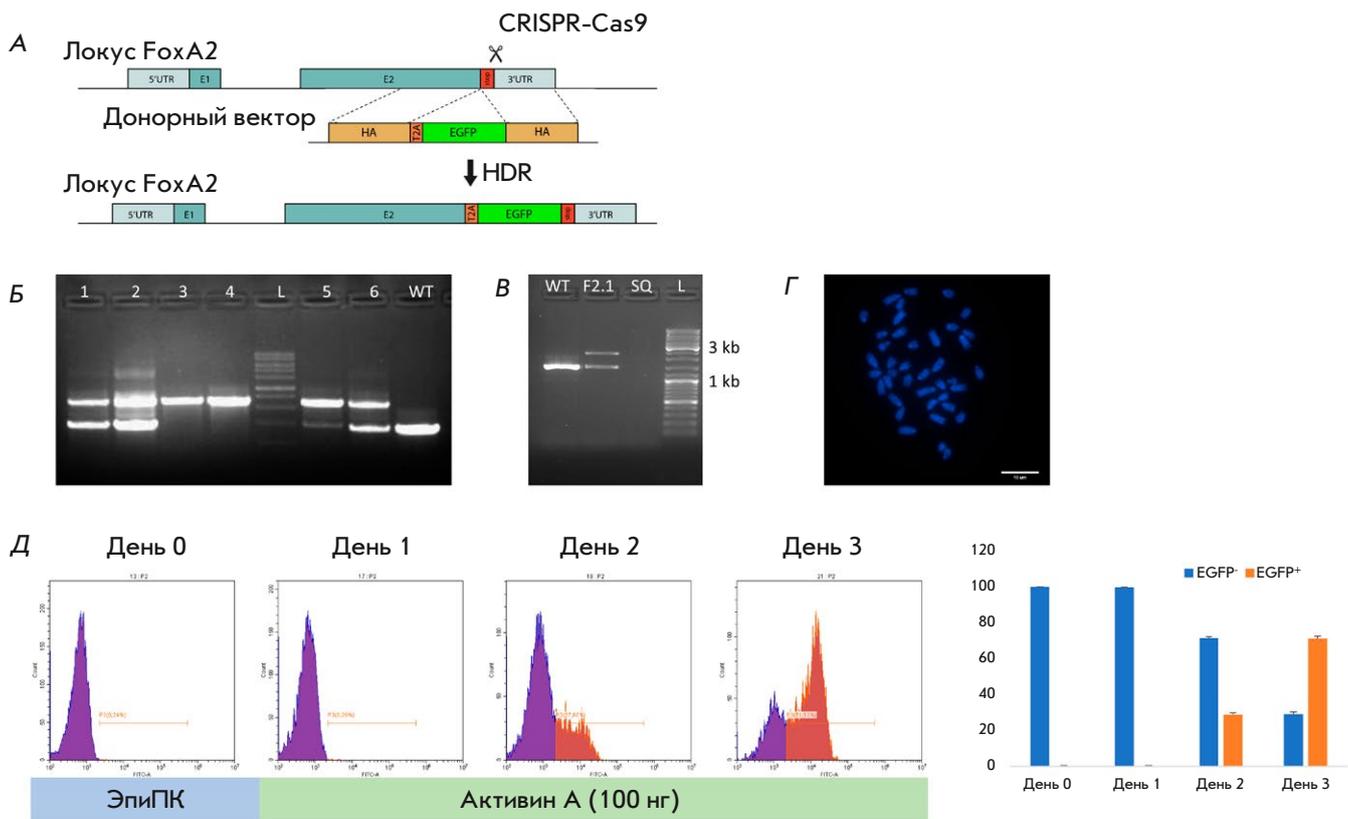


Рис. 3. Создание репортерной линии ЭСК *Foxa2*::T2A-EGFP. **А** – схематическое изображение стратегии модификации локуса *Foxa2*. E1, E2 – экзоны, HA – плечи гомологии, UTR – нетранспируемая область, stop – стоп-кодон. **Б** – проверка вставки с помощью ПЦР в отобранных клонах ЭСК. Геномную ДНК исходной клеточной линии (WT) использовали в качестве контроля. **В** – повторная проверка вставки в субклонированной клеточной линии. **Г** – нормальный кариотип (40 XY) полученной репортерной линии ЭСК F2.1. Шкала – 10 мкм. **Д** – левая панель – анализ экспрессии EGFP в линии ЭСК F2.1 во время спецификации ДЭ; правая панель – процент EGFP⁻ и EGFP⁺-клеток во время дифференцировки ДЭ; результаты представлены как среднее значение трех повторов ± SD (стандартное отклонение)

ред стоп-кодоном гена *Foxa2* была внедрена кассета T2A-EGFP (рис. 3А). Эта стратегия имеет явные преимущества в сравнении с традиционным низкоэффективным методом направленного изменения генных последовательностей «gene targeting» [57–59]. Наличие в химерной РНК *Foxa2*::T2A-EGFP-последовательности саморасщепляющегося пептида T2A приводит к трансляции двух отдельных белков (*Foxa2* и EGFP) и, таким образом, исключает влияние EGFP на функции *Foxa2*. Кроме того, уровни *Foxa2* и EGFP коррелируют, что облегчает приблизительную количественную оценку уровня *Foxa2* посредством визуализации EGFP в живых клетках.

После трансфекции целевых плазмид было отобрано несколько клонов ЭСК, в которых далее была проверена правильность вставки кассеты в локус *Foxa2* (рис. 3Б). Один из этих клонов (F2) с наличием вставки в одном аллеле был субклонирован (F2.1,

рис. 3В). Этот субклон, имеющий нормальный кариотип (рис. 3Г), использовали в дальнейших экспериментах. Используя метод проточной цитофлуориметрии, мы визуализировали флуоресцентный сигнал EGFP на разных временных отрезках дифференцировки линии ЭСК F2.1 в ДЭ (рис. 3Д). Активацию EGFP первоначально обнаружили на 2-й день дифференцировки (29% клеток), в то время как к 3-му дню энтодермальной дифференцировки количество EGFP⁺-клеток увеличилось до 71% (рис. 3Д, правая панель). Этот результат согласуется с иммуноцитохимическим анализом на наличие *Foxa2* в ходе дифференцировки в ДЭ (рис. 2В).

Возникновение гетерогенности в ответ на добавление фактора дифференцировки

Для визуализации дифференцировки в ДЭ мы применили метод непрерывной цитраферной съем-

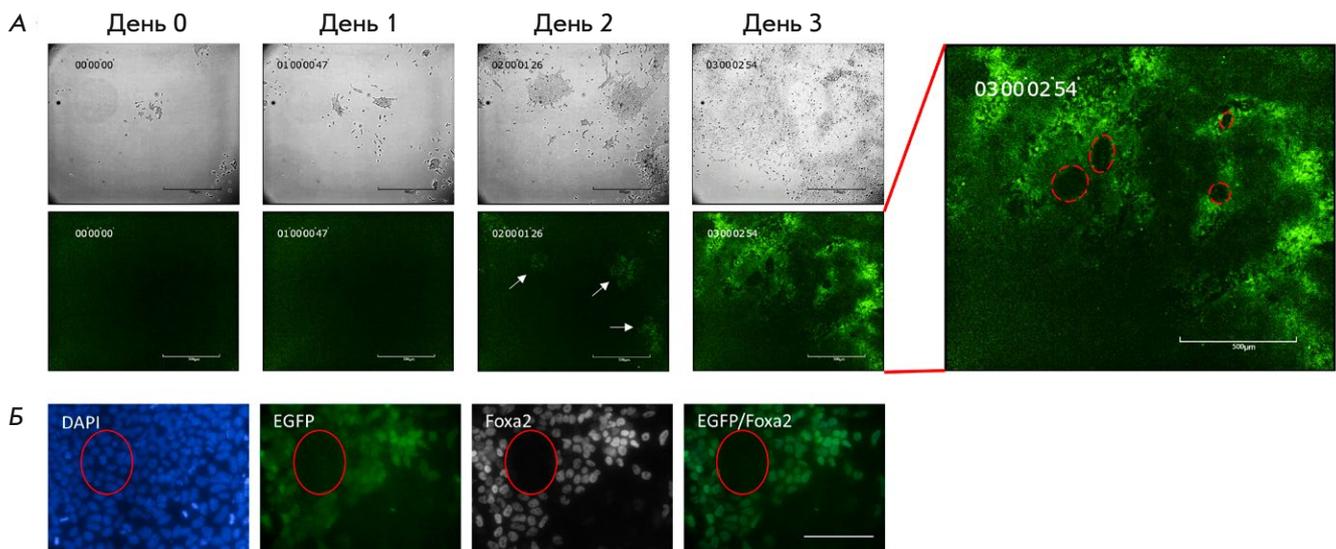


Рис. 4. Гетерогенная дифференцировка ДЭ *in vitro*. **А** – цейтраферная съемка ЭСК F2.1 во время спецификации ДЭ. Стрелки указывают на появляющиеся EGFP⁺-клетки. Шкала – 500 мкм. Таймлапс-видео можно найти в дополнительных материалах. **Б** – колокализация EGFP и Foxa2 после дифференцировки ЭСК F2.1 в ДЭ. Шкала – 100 мкм

ки (рис. 4А, видео в дополнительных материалах). В соответствии с результатами проточной цитофлуориметрии, сигнал EGFP не наблюдался в течение первых 24 ч, что, по-видимому, указывает на подготовку хроматина к последующей дифференцировке клеток. EGFP впервые обнаруживался через 38 ч после добавления активина к ЭпиПК, при этом максимальное количество EGFP⁺-клеток наблюдалось через 72 ч после обработки. Самой интересной особенностью, неоднократно отмеченной в ходе экспериментов, была гетерогенность распределения EGFP в клеточной популяции (рис. 4А, правая панель). Число EGFP⁺-клеток постепенно увеличивалось в процессе дифференцировки и достигало примерно 70%, однако далее не возрастало. Интересно, что распределение сигнала EGFP по популяции не демонстрировало каких-либо закономерностей вроде смещения к центру или краю колоний, что показано в *in vitro* дифференцировках в виде «микрпаттернов» [51, 60]. Во время иммуноцитохимической окраски дифференцированных клеток наблюдалась колокализация сигнала от антител с EGFP, что подтверждает адекватность работы полученной репортерной линии (рис. 4Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

За последнее десятилетие было разработано множество методов культивирования и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК). В настоящее время ПСК можно поддерживать в различных состояниях плюрипотентности в химически определенных условиях культивирования и, что важ-

но, они точно соответствуют клеткам эпибласта на разных стадиях эмбрионального развития [5, 6, 44]. В последние годы появилось несколько работ, посвященных эмбриогенезу *ex vivo*, включая создание бластоидов, гастролоидов и даже целых эмбрионов до стадии развития, которая соответствует 8.5 дню эмбриогенеза (E8.5) [61–68]. В то же время очень ценными остаются методы моделирования процессов направленной дифференцировки плюрипотентных клеток, которые нацелены на изучение молекулярных механизмов, контролирующих эти процессы. Полученные таким образом данные могут в дальнейшем с высокой вероятностью быть экстраполированы на эмбриональное развитие.

В настоящем исследовании мы использовали химически определенные условия культивирования для создания воспроизводимого и надежного метода дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши в дефинитивную энтодерму. Все эксперименты проводили в химически определенной бессывороточной среде (N2B27) с добавлением различных ростовых факторов. Также мы создали линию ЭСК Foxa2::T2A-EGFP и продемонстрировали удобство ее использования при моделировании спецификации ДЭ. Мы предполагаем, что сочетание химически определенных сред и репортерных клеточных линий облегчит исследование комплексных механизмов, регулирующих выбор направления дифференцировки плюрипотентными стволовыми клетками.

Опубликованы данные, ставящие под сомнение парадигму о том, что транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog действуют исключительно

как факторы, поддерживающие плюрипотентное состояние [30–32, 35]. Манипуляции с уровнем экспрессии этих факторов в ЭСК мыши обычно вызывали дифференцировку в сторону экстраэмбриональных тканей [69–71]; однако в ЭСК человека эти манипуляции способствовали дифференцировке в направлении производных зародышевых листков [35, 72]. Вероятнее всего, эти различия обусловлены пребыванием клеток в «наивном» и в «праймированном» состояниях плюрипотентности, соответственно, а не видовыми различиями. В данном исследовании получены убедительные доказательства того, что Oct4, Sox2 и Nanog временно колокализуются с известными маркерами зародышевых листков в начале дифференцировки. Более того, экспрессия Nanog активируется повторно во время спецификации энтодермы. Особый интерес для нас представляет модуляция уровня этого транскрипционного фактора в ходе энтодермальной дифференцировки, а созданная нами репортерная линия ЭСК в дальнейшем окажется ценным инструментом для изучения этого процесса.

Дифференцировку в экто- и мезодерму, а также в дефинитивную энтодерму в основном изучали на ЭСК человека, которые находятся в «праймированном» плюрипотентном состоянии и соответствуют эпибласту после имплантации [50, 52, 73, 74]. В то же время использование ЭСК мыши осложнено тем, что они находятся в «наивном» плюрипотентном состоянии и должны быть переведены в «праймированное» перед дифференцировкой в направлении трех зародышевых листков. Эти сложности разрешились с появлением эпибластных стволовых клеток мыши (ЭпиСК), которые соответствуют клеткам эпибласта после имплантации и имеют много общего с «праймированными» ЭСК человека [75, 76]. Впоследствии была показана возможность получения ЭпиСК мыши из ЭСК [39]. На пути к ЭпиСК ЭСК проходят через «формативное» плюрипотентное состояние (ЭпиПК), которое соответствует эпибласту сразу после имплантации (E5.5) [41]. Самая отличительная черта ЭпиПК заключается в их способности дифференцироваться в первичные половые клетки (ППК) [39, 77]. При этом популяция ЭпиПК является однородной, а профиль экспрессии этих клеток делает их более подходящими для моделирования эмбриогенеза, чем ЭпиСК. Кроме того, ЭпиСК соответствуют эпибласту на стадии E7.5, т. е. они уже более коммитированы для развития в определенном направлении [78]. «Формативные» ПСК уже использовались для *in vitro* моделирования эмбриогенеза мыши [40, 43–45, 51, 79] и могут рассматриваться, на наш взгляд, как золотой стандарт для изучения спецификации зародышевых листков.

Однородная популяция ЭпиПК также облегчает изучение механизмов клеточной спецификации. Стало очевидно, что этот процесс контролируется не только градиентами FGF, BMP, Wnt и Nodal. Наше исследование показывает, что при избытке активина и в отсутствие каких-либо дополнительных сигналов невозможно добиться дифференцировки всех ЭпиПК в направлении ДЭ. Таким образом, определенные стохастические процессы также могут быть вовлечены в спецификацию ЭпиПК в ДЭ.

По всей видимости, антагонизм Nodal-Lefty управляет не только становлением лево-правой асимметрии зародыша [80], но и вносит вклад в спецификацию ДЭ. Известно, что сигнальный путь Activin/Nodal активирует Lefty, который, в свою очередь, ингибирует этот путь, обеспечивая тем самым отрицательную обратную связь [81]. Этот механизм является хорошим примером реакционно-диффузионной модели [47], которая объясняет происхождение неоднородности в изначально однородных системах [82]. Мы предполагаем, что, согласно этой модели, вероятность активации Nodal при добавлении активина к ЭпиПК составляет около 70%, в то время как вероятность активации Lefty – примерно 30%. Дальнейшее развитие ДЭ будет зависеть от наличия активатора (Nodal) или ингибитора (Lefty). В целом, разработанная модель может служить отправной точкой для дальнейшего исследования механизмов возникновения неоднородности в процессе спецификации зародышевых листков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный переход ЭСК–ЭпиПК–ДЭ *in vitro* очень близок к развитию ДЭ во время эмбриогенеза. Экспрессия транскрипционного фактора Nanog снижается в ЭпиПК, но повторно активируется в клетках-предшественниках ДЭ. Несмотря на химически определенные условия дифференцировки ДЭ *in vitro*, только 70% клеток выбирают эту программу развития. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого явления, требуют дальнейшего уточнения.

Дополнительное видео. Спецификация ДЭ *in vitro*, зарегистрированная методом цейтраферной съемки. Начало съемки приходится на момент добавления активина А к ЭпиПК. Доступно на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27510>. ●

Авторы заявляют
об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 23-75-10096,
<https://rscf.ru/project/23-75-10096/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martin G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
2. Evans M.J., Kaufman M.H. // *Nature*. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
3. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
4. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
5. Boroviak T., Loos R., Bertone P., Smith A., Nichols J. // *Nat. Cell. Biol.* 2014. V. 16. № 6. P. 516–528.
6. Plusa B., Hadjantonakis A.K. // *Nat. Cell. Biol.* 2014. V. 16. № 6. P. 502–504.
7. Schrode N., Xenopoulos P., Piliszek A., Frankenberg S., Plusa B., Hadjantonakis A.K. // *Genesis*. 2013. V. 51. № 4. P. 219–233.
8. Tarkowski A.K. // *Nature*. 1959. V. 24. № 184. P. 1286–1287.
9. Tam P.P., Loebel D.A. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 5. P. 368–381.
10. Baker C.L., Pera M.F. // *Cell. Stem Cell*. 2018. V. 22. № 1. P. 25–34.
11. Arnold S.J., Robertson E.J. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 2. P. 91–103.
12. Conlon F.L., Lyons K.M., Takaesu N., Barth K.S., Kispert A., Herrmann B., Robertson E.J. // *Development*. 1994. V. 120. № 7. P. 1919–1928.
13. Mishina Y., Suzuki A., Ueno N., Behringer R.R. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. № 15. P. 3027–3037.
14. Liu P., Wakamiya M., Shea M.J., Albrecht U., Behringer R.R., Bradley A. // *Nat. Genet.* 1999. V. 22. № 4. P. 361–365.
15. Lu C.C., Robertson E.J. // *Dev. Biol.* 2004. V. 273. № 1. P. 149–159.
16. Gattiglio M., Protzek M., Schroter C. // *Biol. Open*. 2023. V. 12. № 8. bio059941.
17. Nowotschin S., Hadjantonakis A.K., Campbell K. // *Development*. 2019. V. 146. № 11. dev150920.
18. Shahbazi M.N., Zernicka-Goetz M. // *Nat. Cell Biol.* 2018. V. 20. № 8. P. 878–887.
19. Vincent S.D., Dunn N.R., Hayashi S., Norris D.P., Robertson E.J. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 13. P. 1646–1662.
20. D'Amour K.A., Agulnick A.D., Eliazer S., Kelly O.G., Kroon E., Baetge E.E. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 12. P. 1534–1541.
21. Si-Tayeb K., Noto F.K., Nagaoka M., Li J., Battle M.A., Duris C., North P.E., Dalton S., Duncan S.A. // *Hepatology*. 2010. V. 51. № 1. P. 297–305.
22. Kaestner K.H. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2010. V. 20. № 5. P. 527–532.
23. Ang S.L., Rossant J. // *Cell*. 1994. V. 78. № 4. P. 561–574.
24. Fu S., Fei Q., Jiang H., Chuai S., Shi S., Xiong W., Jiang L., Lu C., Atadja P., Li E., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 11. P. e27965.
25. Wang P., Rodriguez R.T., Wang J., Ghodasara A., Kim S.K. // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 8. № 3. P. 335–346.
26. Arnold S.J., Hofmann U.K., Bikoff E.K., Robertson E.J. // *Development*. 2008. V. 135. № 3. P. 501–511.
27. Dufort D., Schwartz L., Harpal K., Rossant J. // *Development*. 1998. V. 125. № 16. P. 3015–3025.
28. Loh K.M., Lim B., Ang L.T. // *Physiol. Rev.* 2015. V. 95. № 1. P. 245–295.
29. Malleshaiah M., Padi M., Rue P., Quackenbush J., Martinez-Arias A., Gunawardena J. // *Cell Rep.* 2016. V. 14. № 5. P. 1181–1194.
30. Thomson M., Liu S.J., Zou L.N., Smith Z., Meissner A., Ramanathan S. // *Cell*. 2011. V. 145. № 6. P. 875–889.
31. Valcourt J.R., Huang R.E., Kundu S., Venkatasubramanian D., Kingston R.E., Ramanathan S. // *Cell Repts*. 2021. V. 37. № 6. P. 109990.
32. Koch F., Scholze M., Wittler L., Schifferl D., Sudheer S., Grote P., Timmermann B., Macura K., Herrmann B.G. // *Dev Cell*. 2017. V. 42. № 5. P. 514–526.
33. Xu R.H., Sampsell-Barron T.L., Gu F., Root S., Peck R.M., Pan G., Yu J., Antosiewicz-Bourget J., Tian S., Stewart R., et al. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 2. P. 196–206.
34. Vallier L., Mendjan S., Brown S., Chng Z., Teo A., Smithers L.E., Trotter M.W., Cho C.H., Martinez A., Rugg-Gunn P., et al. // *Development*. 2009. V. 136. № 8. P. 1339–1349.
35. Teo A.K., Arnold S.J., Trotter M.W., Brown S., Ang L.T., Chng Z., Robertson E.J., Dunn N.R., Vallier L. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 3. P. 238–250.
36. Ying Q.-L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. // *Nature*. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523.
37. Choi J., Huebner A.J., Clement K., Walsh R.M., Savol A., Lin K., Gu H., Di Stefano B., Brumbaugh J., Kim S.Y., et al. // *Nature*. 2017. V. 548. № 7666. P. 219–223.
38. Yagi M., Kishigami S., Tanaka A., Semi K., Mizutani E., Wakayama S., Wakayama T., Yamamoto T., Yamada Y. // *Nature*. 2017. V. 548. № 7666. P. 224–227.
39. Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K., Aramaki S., Saitou M. // *Cell*. 2011. V. 146. № 4. P. 519–532.
40. Buecker C., Srinivasan R., Wu Z., Calo E., Acampora D., Faial T., Simeone A., Tan M., Swigut T., Wysocka J. // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 14. № 6. P. 838–853.
41. Kinoshita M., Smith A. // *Development, Growth & Differentiation*. 2018. V. 60. № 1. P. 44–52.
42. Morgani S., Nichols J., Hadjantonakis A.K. // *BMC Dev. Biol.* 2017. V. 17. № 1. P. 7.
43. Kinoshita M., Barber M., Mansfield W., Cui Y., Spindlow D., Stirparo G.G., Dietmann S., Nichols J., Smith A. // *Cell Stem Cell*. 2020. V. 28. № 3. P. 453–471.
44. Yu L., Wei Y., Sun H.X., Mahdi A.K., Pinzon Arteaga C.A., Sakurai M., Schmitz D.A., Zheng C., Ballard E.D., Li J., et al. // *Cell Stem Cell*. 2020. V. 28. № 3. P. 550–567.
45. Wang X., Xiang Y., Yu Y., Wang R., Zhang Y., Xu Q., Sun H., Zhao Z.A., Jiang X., Wang X., et al. // *Cell Res*. 2021. V. 31. № 5. P. 526–541.
46. Pera M.F., Rossant J. // *Cell Stem Cell*. 2021. V. 28. № 11. P. 1896–1906.
47. Turing A.M. // *Bull. Math. Biol.* 1990. V. 52. № 1–2. P. 153–197; discussion 119–152.
48. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 9. P. 827–832.
49. Ponomartsev S.V., Sinenko S.A., Skvortsova E.V., Liskovykh M.A., Voropaev I.N., Savina M.M., Kuzmin A.A., Kuzmina E.Y., Kondrashkina A.M., Larionov V., et al. // *Cells*. 2020. V. 9. № 4. P. 879.
50. Shi Y., Kirwan P., Livesey F.J. // *Nat. Protoc.* 2012. V. 7. № 10. P. 1836–1846.
51. Morgani S.M., Metzger J.J., Nichols J., Siggia E.D., Hadjantonakis A.K. // *Elife*. 2018. V. 7. e32839.
52. Warmflash A., Sorre B., Etoc F., Siggia E.D., Brivanlou A.H. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 8. P. 847–854.
53. Bardot E., Calderon D., Santoriello F., Han S., Cheung K., Jadhav B., Burtcher I., Artap S., Jain R., Epstein J., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14428.

54. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Tweedie S, Smith A. // *Cell*. 2003. V. 113. № 5. P. 643–655.
55. Hart A.H., Hartley L., Ibrahim M., Robb L. // *Dev. Dyn*. 2004. V. 230. № 1. P. 187–198.
56. Hoffman J.A., Wu C.I., Merrill B.J. // *Development*. 2013. V. 140. № 8. P. 1665–1675.
57. Aubert J, Stavridis M.P., Tweedie S, O'Reilly M., Vierlinger K, Li M, Ghazal P, Pratt T, Mason J.O., Roy D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. Suppl 1. P. 11836–11841.
58. Sladitschek H.L., Neveu P.A. // *Mol. Syst. Biol*. 2019. V. 15. № 12. P. e9043.
59. Fehling H.J., Lacaud G., Kubo A., Kennedy M., Robertson S., Keller G., Kouskoff V. // *Development*. 2003. V. 130. № 17. P. 4217–4227.
60. Tewary M., Ostblom J., Prochazka L., Zulueta-Coarasa T., Shakiba N., Fernandez-Gonzalez R., Zandstra P.W. // *Development*. 2017. V. 144. № 23. P. 4298–4312.
61. Aguilera-Castrejon A., Oldak B., Shani T., Ghanem N., Itzkovich C., Slomovich S., Tarazi S., Bayerl J., Chugaeva V., Ayyash M., et al. // *Nature*. 2021. V. 593. № 7857. P. 119–124.
62. Amadei G., Lau K.Y.C., De Jonghe J., Gantner C.W., Sozen B., Chan C., Zhu M., Kyprianou C., Hollfelder F., Zernicka-Goetz M. // *Dev. Cell*. 2021. V. 56. № 3. P. 366–382.e9.
63. Liu X., Tan J.P., Schroder J., Aberkane A., Ouyang J.F., Mohenska M., Lim S.M., Sun Y.B.Y., Chen J., Sun G., et al. // *Nature*. 2021. V. 591. № 7851. P. 627–632.
64. Rossant J., Tam P.P.L. // *Stem Cell Reports*. 2021. V. 16. № 5. P. 1031–1038.
65. Yu L., Wei Y., Duan J., Schmitz D.A., Sakurai M., Wang L., Wang K., Zhao S., Hon G.C., Wu J. // *Nature*. 2021. V. 591. № 7851. P. 620–626.
66. van den Brink S.C., van Oudenaarden A. // *Trends Cell Biol*. 2021. V. 31. № 9. P. 747–759.
67. Amadei G., Handford C.E., Qiu C., De Jonghe J., Greenfield H., Tran M., Martin B.K., Chen D.Y., Aguilera-Castrejon A., Hanna J.H., et al. // *Nature*. 2022. V. 610. № 7930. P. 143–153.
68. Tarazi S., Aguilera-Castrejon A., Joubran C., Ghanem N., Ashoukhi S., Roncato F., Wildschutz E., Haddad M., Oldak B., Gomez-Cesar E., et al. // *Cell*. 2022. V. 185. № 18. P. 3290–3306 e25.
69. Niwa H., Miyazaki J.-I., Smith A.G. // *Nat. Genet*. 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.
70. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., et al. // *Nat. Cell Biol*. 2007. V. 9. № 6. P. 625–635.
71. Ivanova N., Dobrin R., Lu R., Kotenko I., Levorse J., DeCoste C., Schafer X., Lun Y., Lemischka I.R. // *Nature*. 2006. V. 442. № 7102. P. 533–538.
72. Wang Z., Oron E., Nelson B., Razis S., Ivanova N. // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 10. № 4. P. 440–454.
73. Surmacz B., Fox H., Gutteridge A., Fish P., Lubitz S., Whiting P. // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 9. P. 1875–1884.
74. Tristan C.A., Ormanoglu P., Slamecka J., Malley C., Chu P.-H., Jovanovic V.M., Gedik Y., Jethmalani Y., Bonney C., Barnaeva E., et al. // *Stem Cell Repts*. 2021. V. 16. № 12. P. 3076–3092.
75. Brons I.G., Smithers L.E., Trotter M.W., Rugg-Gunn P., Sun B., Chuva de Sousa Lopes S.M., Howlett S.K., Clarkson A., Ahrlund-Richter L., Pedersen R.A., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 191–195.
76. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.
77. Nakaki F., Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K., Yabuta Y., Saitou M. // *Nature*. 2013. V. 501. № 7466. P. 222–226.
78. Kojima Y., Kaufman-Francis K., Studdert J.B., Steiner K.A., Power M.D., Loebel D.A., Jones V., Hor A., de Alencastro G., Logan G.J., et al. // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 14. № 1. P. 107–120.
79. Morgani S.M., Hadjantonakis A.K. // *Curr. Top. Dev. Biol*. 2020. V. 137. P. 391–431.
80. Nakamura T., Mine N., Nakaguchi E., Mochizuki A., Yamamoto M., Yashiro K., Meno C., Hamada H. // *Dev. Cell*. 2006. V. 11. № 4. P. 495–504.
81. Shen M.M. // *Development*. 2007. V. 134. № 6. P. 1023–1034.
82. Kondo S., Miura T. // *Science*. 2010. V. 329. № 5999. P. 1616–1620.