

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.155

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ОРГАНИЗАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ
РАЗВИТИЯ ЭНДОКРИННЫХ ТКАНЕЙ *in vivo* И *in vitro*

© 2021 г. Д. В. Голиусова^{1, *}, Н. В. Клементьева², А. В. Панова^{1, 2},
Н. Г. Мокрышева², С. Л. Киселев^{1, **}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, 117036 Россия

*e-mail: daria.goliusova@mail.ru

**e-mail: sl_kiselev@yahoo.com

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 13.06.2020 г.

Принята к публикации 16.06.2020 г.

Эндокринные клетки могут успешно функционировать при гетеротопической трансплантации в организм млекопитающего, что делает их перспективным инструментом регенеративной медицины. Однако на сегодняшний день клеточная терапия эндокринных заболеваний ограничена невозможностью эффективно и стабильно получать эндокринные клетки в лабораторных условиях. В данном обзоре рассматриваются современные представления о молекулярно-генетических механизмах эмбрионального развития эндокринных тканей мыши и человека, а также ключевые генетические факторы, регулирующие дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) в эндокринном направлении *in vitro*, на примере паратиреоидных клеток. Приведенные данные позволяют предложить альтернативный подход к дифференцировке ПСК в паратиреоидном направлении, основанный на генетическом программировании клеток путем индукции эндогенной экспрессии ключевых факторов дифференцировки.

Ключевые слова: гены, генетика развития, эндокринные ткани, дефинитивная энтодерма, паратиреоидные клетки, дифференцировка *in vitro*.

DOI: 10.31857/S0016675821030085

Ежегодно доля пациентов с эндокринными патологиями, вызванными нарушением секреции и метаболизма различных гормонов, увеличивается во всем мире. Одним из перспективных подходов к лечению гормональных заболеваний является применение регенеративной медицины. Это обусловлено рядом особенностей секреторных клеток эндокринной системы, позволяющих использовать их как контролируемые биореакторы гормонов *in vivo*. В первую очередь в связи с тем, что в организме существует как glandularная, так и диффузная эндокринная система, экскреция гормонов в зрелых эндокринных клетках в основном не зависит от их местоположения в организме. Кроме того, для функционирования трансплантата из эндокринных клеток не требуется его иннервация. По этим причинам эндокринные клетки могут быть трансплантированы гетеротопически в легко доступные в организме человека места, например подкожно или в мышцу, независимо от расположения самой железы. Такой подход успешно используется уже несколько десятилетий для изучения эндокринных

заболеваний у мышей, когда гормон-продуцирующие клетки трансплантируют животным под капсулу почки. В случае других типов клеток (кардиомиоцитов, гепатоцитов, нейронов и др.) гетеротопическая трансплантация затруднена или невозможна.

В настоящее время большой интерес представляет разработка способов *in vitro* дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, таких как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), в гормон-продуцирующие клетки эндокринного ряда для заместительной клеточной терапии различных эндокринных патологий и длительной коррекции гормонального дисбаланса у пациентов с эндокринными нарушениями. Применение аутологических эндокринных клеток, полученных из ПСК пациентов *in vitro*, является перспективным подходом, поскольку трансплантация таких клеток, во-первых, освобождает пациентов от постоянных инъекций дорогостоящих лекарственных препаратов, особенно с учетом длительности течения эндокринных заболеваний

и значительного снижения общего качества жизни, и, во-вторых, безопасна ввиду отсутствия реакции хозяина против трансплантата и отторжения ткани. Однако до сих пор не существует эффективных и хорошо воспроизводимых протоколов дифференцировки ПСК человека в эндокринном направлении, в частности в зрелые островковые клетки поджелудочной железы и клетки паращитовидных желез. Во многом это обусловлено ограничениями эмпирического подбора условий дифференцировки с помощью ростовых факторов и/или химических молекул, активирующих и/или ингибирующих требуемые сигнальные пути в соответствии с данными о формировании эндокринных желез *in vivo*. Действие подобранных факторов *in vitro* в большинстве случаев плеiotропно, а использование реагентов от различных производителей или животного происхождения приводит к слабой воспроизводимости результатов. Поскольку основной задачей дифференцировки клеток *in vitro* является повторение и реализация генетической программы эмбрионального развития, возможен и альтернативный подход к дифференцировке путем прямого генетического программирования ПСК на основе имеющихся знаний по эмбриологии эндокринных желез. Генетическое программирование ПСК позволяет специфически активировать работу конкретных генов, а не целых регуляторных сетей. Целевые гены могут быть индуцированы с помощью таких методов, как оверэкспрессия или CRISPR/Cas9 Synergistic Activation Mediator (SAM). Технология CRISPR/Cas9 SAM позволяет целенаправленно активировать промотор интересующего гена, иницилируя таким образом его транскрипцию [1]. В 2018 г. с помощью повышенной экспрессии транскрипционных факторов поджелудочной железы удалось трансдифференцировать α -клетки в β -клетки *in vivo* [2]. Разработка подхода, который позволит программировать дифференцировку ПСК в требуемом направлении, предполагает использование знаний о транскрипционных факторах, регулирующих эмбриональное развитие каждой из тканей. В связи с этим понимание генетических аспектов организации и регуляции раннего развития эндокринных тканей необходимо для разработки протоколов генетически программируемой дифференцировки ПСК в эндокринном направлении.

МОРФОГЕНЕЗ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ ЭНТОДЕРМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Эндокринные железы закладываются в первые месяцы эмбрионального развития из клеток definitivoной (зародышевой) энтодермы (ДЭ). Дефинитивная энтодерма формируется из клеток эпибласта на 3-й нед. развития и дает начало кишечной трубке зародыша, от которой отпочковываются все органы энтодермального происхождения [3]. В на-

чале 3-й нед. развития в заднем отделе зародыша на поверхности эпибласта появляется так называемая первичная полоска, или борозда, вдоль которой начинают мигрировать клетки эпибласта. Двигаясь вперед, клетки претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход, теряют флюорипотентность, приобретают вытянутую форму и проскальзывают под первичную полоску. Такие клеточные движения называют ингрессией, а миграцию клеток в подлежащие слои — инвагинацией. Часть инвагинирующих клеток замещает клетки подлежащего слоя (гипобласта) и дает начало ДЭ зародыша. Клетки, мигрирующие в область между эпибластом и сформированной ДЭ, образуют мезодерму. Клетки, остающиеся в эпибласте, формируют эктодерму. К концу 3-й нед. развития в трехслойном зародышевом диске одновременно начинаются процессы формирования нервной трубки из эктодермы и кишечной трубки из ДЭ путем сворачивания клеточных пластов по передне-задней оси зародыша. К концу 4-й нед. кишечная трубка представляет собой замкнутую первичную кишку, разделенную градиентами морфогенов на четыре части вдоль антерио-постериорной (передне-задней) оси: 1) переднюю (антериорную) часть передней кишки, 2) заднюю (постериорную) часть передней кишки, 3) среднюю кишку и 4) заднюю кишку. Энтодерма первичной кишки образует эпителиальную выстилку кишечного тракта и дает начало секреторным клеткам различных желез. Клетки среднего и заднего отделов первичной кишки формируют клетки-предшественники всех отделов кишечного тракта. Клетки заднего отдела передней кишки дают начало поджелудочной железе и печени. Клетки переднего отдела передней кишки формируют глоточный аппарат, состоящий из четырех пар глоточных мешков, разделенных четырьмя парами глоточных дуг. В результате сегментации и дальнейшего развития глоточного аппарата формируются структуры головы и шеи, в частности щитовидная, паращитовидные железы и тимус [4]. В область глоточных дуг активно мигрируют эктодермальные клетки нервного гребня, которые участвуют в формировании мезенхимы и сегментации энтодермы глоточных мешков, а также в развитии тимуса, паращитовидных желез и дифференцировке парафолликулярных клеток (С-клеток) щитовидной железы [5].

Раньше всех среди эндокринных желез человека начинает формироваться щитовидная железа. Она закладывается примерно на 24-й день эмбрионального развития в виде выпячивания из энтодермальных и мезодермальных клеток на дне глотки [6]. Клетки начинают мигрировать в заднем направлении, и к концу 7-й нед. зачаток щитовидной железы достигает своего окончательного положения в глотке. Клетки нижней части четвертой пары глоточных мешков дают начало предшественникам С-клеток

щитовидной железы, секретирующих кальцитонин. К концу 3-го мес. в щитовидной железе обнаруживаются первые фолликулы, содержащие коллоид — источник тироксина и трийодтиронина, синтезируемый фолликулярными клетками [7]. Паращитовидные железы формируются в период с 5-й по 15-ю нед. эмбрионального развития из эпителия третьей и четвертой пары глоточных мешков. Нижняя пара паращитовидных желез формируется из общего зачатка с тимусом, верхняя пара — из общего зачатка с щитовидной железой. На 7-й нед. развития оба зачатка теряют связь со стенкой глотки и мигрируют вниз в заднем направлении, при этом зачатки паращитовидных желез занимают свое окончательное положение на дорсальной поверхности щитовидной железы [8]. Поджелудочная железа закладывается в конце 1-го мес. развития примерно на 26-й день в виде двух отростков зачатка двенадцатиперстной кишки, сформированных клетками заднего отдела передней кишки [9]. Эндокринная часть поджелудочной железы формируется на 3-м мес. развития из паренхиматозной панкреатической ткани, рассеянной по железе. Секреция инсулина начинается примерно на 5-м мес. развития [10].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ДЕФИНИТИВНОЙ ЭНТОДЕРМЫ *in vivo*

Формирование и дифференцировка клеток ДЭ обеспечиваются взаимодействием компонентов регуляторной сети, контролирующей пространственно-временную регуляцию экспрессии ключевых энтодермальных генов в развивающемся зародыше. С началом гастрюляции в клетках эпибласта детектируется экспрессия эволюционно консервативных транскрипционных факторов BRACHYURY, SOX17 и FOXA2. Среди них BRACHYURY играет важную роль в спецификации клеток мезодермы, SOX17 и FOXA2 — в спецификации клеток ДЭ [11, 12]. Эволюционно формирование энтодермы и мезодермы взаимосвязано, тем не менее вопрос о существовании бипотентных “мезендодермальных” предшественников в эмбриональном развитии млекопитающих до сих пор остается спорным [13, 14]. Экспрессия факторов BRACHYURY, SOX17 и FOXA2 регулируется концентрацией цитокина NODAL, который является ключевым участником TGF β /Activin/Nodal-опосредованного сигнального пути, определяющего судьбу энтодермальных и мезодермальных предшественников [15, 16]. Фактор NODAL секретируется клетками наружной внезародышевой энтодермы и обеспечивает индукцию “мезендодермальных” генов через фосфорилирование цитоплазматических белков семейства SMAD (SMAD2, SMAD3, SMAD4), которые активируют работу различных транскрипционных факторов, в частности фак-

тор FOXH1 [17, 18]. Судьба “мезендодермальных” предшественников определяется градиентом концентрации NODAL, формируемым взаимным антагонизмом регуляторных сетей NODAL и FGF/BMP [19, 20]. Высокий уровень NODAL вызывает индукцию фактора SOX17 и дифференцировку клеток в энтодермальном направлении, а ингибирование NODAL факторами семейств FGF и BMP приводит к индукции мезодермальной дифференцировки [21]. Спецификацию и дифференцировку энтодермальных предшественников поддерживает также ауторегуляторная петля экспрессии фактора NODAL [22, 23]. В настоящее время считается, что преобладающая роль в индукции клеток ДЭ принадлежит фактору SOX17. На моделях нокаутных мышей было показано, что при нарушении гена *Sox17* у эмбрионов не формируется ДЭ, поскольку клетки эпибласта теряют способность к миграции во время гастрюляции. Возникающие дефекты приводят к остановке развития и внутриутробной гибели на стадии E10.5 [24]. Нарушения *Foxa2* не приводят к эмбриональной летали, однако наблюдаются дефекты передней части первичной кишки, общая задержка роста и неспособность формировать срединные структуры [25, 26].

Вслед за гастрюляцией из плоского клеточного пласта ДЭ формируется объемная, слепо замкнутая кишечная трубка, в которой происходит установление передне-задней и спинно-брюшной полярностей. На данном этапе клетки ДЭ еще не коммитированы и обладают высокой степенью пластичности [27]. Ключевую роль в специализации энтодермы играют реципрокные эпителиально-мезенхимальные взаимодействия между клеткам ДЭ и мезодермы по всей длине кишечной трубки. Спецификация ДЭ вдоль передне-задней оси зародыша обеспечивается градиентом концентрации морфогенов семейств WNT, BMP, FGF, а также их антагонистов: SFRP-1, -2, -3, -5, CRESENTIN, DKK1 (антагонисты WNT) и CHORDIN, NOGGIN (антагонисты BMP). В области высоких концентраций WNT, BMP и FGF формируется задний отдел кишки зародыша, в области низких концентраций — передний [28, 29]. Основным маркером передней кишки является экспрессия транскрипционного фактора SOX2, задней кишки — экспрессия транскрипционного фактора CDX2 [30]. В регионализации экспрессии различных транскрипционных факторов по длине первичной кишки важную роль играет ретиноевая кислота (РК) — производное витамина А, синтезируемое клетками мезодермы [31]. Градиент концентраций РК распределяется вдоль передне-задней оси всего зародыша, от будущей глотки, в которой практически или полностью отсутствует РК, до области средней и задней кишки, в которой детектируется высокая концентрация РК [32]. У мышей с нарушением синтеза РК не происходит

компартиментализации передней кишки [33]. На более поздних стадиях развития при закладке зачатков органов в области глоточного аппарата концентрация РК контролирует положение границ формирующихся органов. Так, повышение концентрации РК в передней части глоточных дуг индуцирует закладку более отдаленных структур [34]. Значительную роль в реципрокных эпителиально-мезенхимальных взаимодействиях играет высококонсервативный морфоген SHH, секретлируемый клетками энтодермы по всей длине кишечной трубки [35]. SHH активирует в мезенхимальных клетках экспрессию фактора BMP-4 и гомеобокс-содержащих транскрипционных факторов, кодируемых консервативными *Hox*-генами, которые контролируют регионализацию первичной кишки. В частности, *Hoxa3* и *Hoxb4* специфически экспрессируются в передней кишке, *Hoxc5* и *Hoxa13* – в области средней и задней кишки [36].

Установление дорсо-вентральной (спинно-брюшной) полярности передней кишки предшествует формированию глоточного аппарата и сегрегации легочных почек, пищевода и трахеи из клеток вентральной ДЭ первичной кишки. Дорсо-вентральная полярность передней кишки устанавливается в ответ на действие сигналов WNT, BMP и FGF от клеток подлежащей мезодермы. Факторы WNT2, WNT2B активируют экспрессию транскрипционных факторов NKX2.1, NKX2.5 и PAX1 в вентральной части передней кишки [37]. Экспрессия *Nkx2.1* в вентральной области поддерживается в результате BMP4-опосредованного ингибирования экспрессии транскрипционного фактора *Sox2*, маркирующего дорсальные структуры передней кишки. Также клетки мезодермы экспрессируют фактор NOGGIN, являющийся антагонистом BMP4, в результате чего в подлежащих энтодермальных клетках не блокируется экспрессия *Sox2* и происходит дальнейшее разделение структур на спинные и брюшные отделы. Кроме того, секреция WNT клетками дорсальной мезодермы ингибирует экспрессию транскрипционного фактора *Nkx2.1* в спинной части передней кишки. Дифференциальная экспрессия и взаимное ингибирование NKX2.1 и SOX2 также участвуют в формировании спинно-брюшной полярности кишки [38–40].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ *in vivo*

Паращитовидные железы формируются из энтодермы глоточных мешков зародыша. Наиболее важным фактором в формировании всего глоточного аппарата является консервативный транскрипционный фактор TBX1. Нарушения гена *Tbx1* могут приводить к развитию синдрома делеции 22-й

хромосомы (синдром Ди Джорджи) [41]. Нокаутные по *Tbx1* мыши не имеют тимуса и паращитовидных желез и погибают после рождения в результате дефектов развития сердца, скелета и мускулатуры лица [42, 43]. Показано, что экспрессия *Tbx1* в глоточном аппарате регулируется фактором SHH, однако механизм такой регуляции остается неизвестным [44]. Экспрессия *Tbx1* в энтодерме активирует экспрессию факторов WNT11R и FGF8A в подлежащих клетках мезодермы, которые, в свою очередь, способствуют морфогенезу энтодермы глоточных мешков [45]. Закладка зачатков паращитовидных желез контролируется факторами семейства FGF (FGF8, FRS2 α), BMP (BMP4), SHH, а также *Hox*-генами [46, 47]. Клетки переднего дорсального эпителия 3-го глоточного мешка, экспрессирующие факторы FGF8 и PAX1, дают начало общему зачатку тимуса и нижней пары паращитовидных желез, который подразделяется на паратиреоидный и тимусный домены. Такое разделение обеспечивается реципрокным взаимодействием сигнальных путей SHH, BMP2/4 и FGF8/10, индуцирующих формирование паращитовидных желез и тимуса [48]. Основным маркером тимусного домена является транскрипционный фактор FOXN1. В паратиреоидном домене экспрессируется транскрипционный фактор GCM2, который является исключительным маркером как предшественников, так и зрелых паратиреоидных клеток и необходим для их дифференцировки и выживания [49, 50]. Потеря GCM2 приводит к апоптозу паратиреоидных предшественников [51]. Мутации *Gcm2* являются одной из причин развития семейных форм изолированного гипопаратиреоза и гиперпаратиреоза [52, 53]. В некоторых работах продемонстрировано изменение уровня экспрессии *Gcm2* в аденомах паращитовидных желез [54].

Раннюю дифференцировку паратиреоидных клеток направляет SHH. У *Shh*⁻/*Shh*⁻ мышей не формируется зачаток паращитовидных желез и полностью отсутствует экспрессия *Gcm2* [55]. Кандидатным фактором, опосредующим влияние SHH на органогенез третьего и четвертого глоточных мешков, является TBX1 [56, 57]. Предполагается, что регуляторный путь *Shh-Tbx1-Gcm2* отвечает за первичную детерминацию паратиреоидной судьбы клеток. Кроме того, TBX1 взаимодействует с транскрипционным фактором FOXI3, участвующим в развитии глоточного аппарата и формировании тимуса и паращитовидных желез из энтодермы третьей пары глоточных мешков. *Foxi3* экспрессируется в энтодерме глоточных мешков и эктодерме глоточного аппарата мыши примерно в то же время, что и *Tbx1* [58]. Инактивация *Foxi3* в TBX1-домене глоточных мешков приводит к аплазии тимуса и паращитовидных желез [59]. *Foxi3*⁻/*Foxi3*⁻ мыши нежизнеспособны и погибают внутриутробно или вскоре после рождения в

результате нарушения формирования и сегментации глоточного аппарата и, как следствие, развития тяжелых дефектов строения черепа и лица [60]. Формирование общего зачатка тимуса и нижней пары паращитовидных желез контролируется регуляторной сетью консервативных транскрипционных факторов *HOXA3*, *PBX1*, *EYA1*, *SIX1/SIX4*, *PAX1/PAX9*, нарушение которых приводит к гипоплазии или аплазии тимуса и паращитовидных желез. У *Hoxa3^{-/-}/Hoxa3^{-/-}* мышей полностью отсутствует зачаток паращитовидных желез и тимуса [61]. У *Pbx1^{-/-}/Pbx1^{-/-}* мышей наблюдается гипоплазия паращитовидных желез и тимуса и снижение экспрессии *Tbx1* и *Gcm2* [62]. У *Eya1^{-/-}/Eya1^{-/-}* мышей нет тимуса и паращитовидных желез. У гомозиготных мышей с нокаутом гена *Six1* отсутствует только тимус, поскольку экспрессия *Gcm2* иницируется, но при этом не поддерживается далее в ходе развития [63]. Экспрессия транскрипционного фактора *PAX1* в третьем глоточном мешке зависит от экспрессии *Eya1* и *Six1*. У *Pax1^{-/-}/Pax1^{-/-}* мышей снижен уровень экспрессии *Gcm2* и наблюдается гипоплазия паращитовидных желез [61]. Отделение общего зачатка паращитовидных желез и тимуса от стенок глоточного мешка происходит в результате апоптоза клеток под действием FGF, BMP4 и других сигналов, поступающих из подлежащей мезенхимы [64–66].

Важную роль в сегрегации и миграции паратиреоидных предшественников играет транскрипционный фактор MAFB. У гетерозиготных по *MafB* мышей паращитовидные железы ошибочно располагаются между тимусом и щитовидной железой, а у гомозигот по *MafB* паратиреоидные клетки не мигрируют и остаются связанными с тимусом [67]. Экспрессия *MafB* и дальнейшая дифференцировка и созревание паратиреоидных клеток регулируются взаимосвязанным каскадом факторов GATA3 и GCM2 [68]. Наиболее ранним фактором является GATA3, за ним следует GCM2 и после MAFB. Нокаут *Gata3* у мышей приводит к нарушению формирования паращитовидных желез и значительным дефектам развития; у гетерозиготных по *Gata3* мышей паращитовидные железы формируются, но наблюдается их частичная дисфункция [69]. GCM2 иницирует экспрессию основных маркеров зрелых паратиреоидных клеток, таких как паратиреоидный гормон (ПТГ, PTH) PTH и кальций-чувствительный рецептор (CASR) [70]. Показано, что мутации генов *Gcm2*, *Gata3* и *Tbx1* у мыши и человека приводят к развитию гипопаратиреоидизма [71, 72]. Экспрессия *Gata3*, *Gcm2* и *MafB* в паратиреоидных клетках наблюдается и после завершения морфогенеза [67, 73]. В постнатальном периоде данные факторы физически взаимодействуют друг с другом, вызывая синергичную активацию промотора гена *Pth* в зрелых паратиреоидных клетках [74].

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПСК В ПАРАТИРЕОИДНОМ НАПРАВЛЕНИИ *in vitro*

Дифференцировка ПСК в паратиреоидном направлении *in vitro*, в соответствии с развитием *in vivo*, предполагает поэтапное получение клеток ДЭ, их дифференцировку в клетки антериорной части передней кишки, далее в клетки вентрального отдела и затем в предшественники паратиреоидных клеток (пре-ПТК) с последующим размножением и созреванием.

Протоколы получения клеток ДЭ в настоящее время хорошо отработаны. Большинство из них основаны на активации сигнальных путей WNT и TGF β с помощью Activin A, выполняющего роль эмбрионального фактора NODAL, и ингибиторов GSK3 β (CHIR99021 и др.) соответственно [75]. Уже доступны коммерческие наборы для эффективной дифференцировки ПСК в клетки ДЭ, такие как STEMdiff Definitive Endoderm Kit (StemCell Technologies), PSC Definitive Endoderm Induction Kit (Thermo Fisher Scientific), StemXVivo Endoderm Kit (R&D Systems) и др. В качестве основных маркеров дифференцировки в полученных клетках ДЭ оценивают экспрессию генов *Sox17*, *Foxa2*, *Cxcr4*, *c-Kit*, *EpCAM*, *Mixl1* (рис. 1). В настоящее время существуют стратегии по отбору ИПСК с наибольшим энтодермальным дифференцировочным потенциалом в связи с клональными различиями ИПСК человека в предрасположенности к дифференцировке *in vitro* [76, 77]. Кроме того, недавно с помощью полногеномного CRISPR-скрининга было обнаружено, что ингибирование сигнального пути JNK-JUN, опосредованно влияющего на выход ПСК из плюрипотентного состояния, значительно повышает эффективность получения ДЭ и ее производных [78]. На сегодняшний день также разработан ряд протоколов по получению клеток вентрального отдела энтодермы передней кишки [79–81]. Тем не менее эффективность такой дифференцировки варьирует среди линий ИПСК в зависимости от генетических и эпигенетических особенностей, а также способа репрограммирования [82].

Что касается дальнейшей дифференцировки коммитированных энтодермальных клеток в паратиреоидном направлении, в настоящее время отсутствуют эффективные и воспроизводимые способы получения паратиреоидных клеток из ПСК человека. Опубликовано несколько протоколов получения паратиреоидных клеток, основанных на индукции экспрессии генов *Gcm2*, *Casr* и *Pth* в коммитированных энтодермальных клетках с помощью факторов Activin A, FGF8 и SHH. Первый опубликованный протокол паратиреоидной дифференцировки основан на получении ПТГ-секретирующих клеток через стадию ДЭ из ЭСК человека с помощью одного фактора Activin A

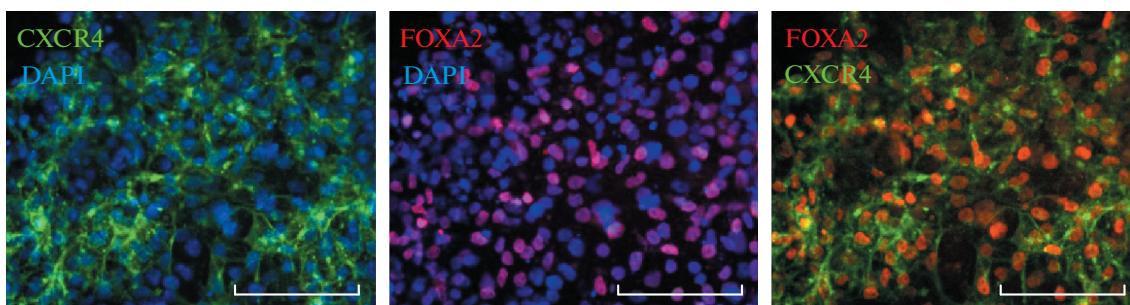


Рис. 1. Пример успешной дифференцировки ИПСК человека в клетки ДЭ. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток ДЭ на энтодермальные маркеры CXCR4 (зеленый канал) и FOXA2 (красный канал). Визуализация ядер с помощью красителя DAPI (синий канал). Масштабная линейка – 100 мкм.

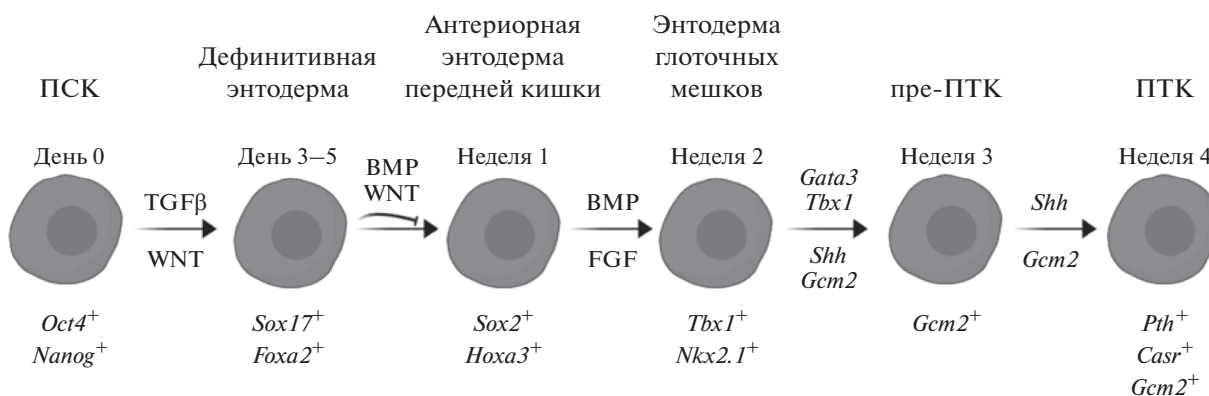


Рис. 2. Основные этапы дифференцировки ПСК человека в паратиреоидном направлении путем индукции экспрессии генов *Gata3*, *Tbx1*, *Shh* и *Gcm2* в коммитированных энтодермальных клетках. Внизу указаны основные гены-маркеры соответствующих стадий дифференцировки. ПСК – плюрипотентные стволовые клетки, пре-ПТК – предшественники паратиреоидных клеток, ПТК – паратиреоидные клетки.

в присутствии низких концентраций эмбриональной телячьей сыворотки [83]. В дальнейшем протокол был модифицирован той же группой авторов путем добавления фактора SHH, и оценена индукция экспрессии *Pth* в дифференцированных клетках [84]. Основными недостатками предложенного подхода являются плохая воспроизводимость протокола и использование ЭСК, культивируемых на фидере. В 2011 г. другая группа показала, что ингибирование BMP и TGF-β-сигнальных путей при дифференцировке ПСК в энтодермальном направлении увеличивает эффективность дифференцировки в клетки anteriorной энтодермы передней кишки, которые могут служить источником клеток паратиреоидного ряда. Однако предложенная схема с использованием дополнительных факторов SHH и/или FGF8 для индукции паратиреоидной дифференцировки обеспечивала лишь незначительное повышение экспрессии *Gcm2* по сравнению с контролем [85].

Таким образом, на сегодняшний день актуальной задачей является разработка воспроизводимых и эффективных методов получения ПТГ-секретиру-

ющих клеток из ПСК *in vitro*. Для получения клеток паратиреоидного ряда может быть применен подход с использованием технологии CRISPR/Cas9 SAM, предполагающий специфическую контролируемую активацию ключевых регуляторных генов паратиреоидной дифференцировки в коммитированных энтодермальных клетках-предшественниках (рис. 2). Поскольку получение клеток ДЭ и более поздних стадий развития переднего отдела первичной кишки в настоящее время не представляет значительных трудностей, основными мишенями генетически программируемой паратиреоидной дифференцировки могут стать гены *Gata3*, *Shh*, *Tbx1* и *Gcm2*, являющиеся ключевыми индукторами паратиреоидной дифференцировки *in vivo*.

Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 19-015-00209-А.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang Y., Yin C., Zhang T. et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs // *Sci. Reports*. 2015. V. 5. № 1. Article number 16277. <https://doi.org/10.1038/srep16277>
2. Xiao X., Guo P., Shiota C. et al. Endogenous reprogramming of alpha cells into beta cells, induced by viral gene therapy, reverses autoimmune diabetes // *Cell Stem Cell*. 2018. V. 22. № 1. P. 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.020>
3. Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K., Campbell K. The endoderm: a divergent cell lineage with many commonalities // *Development*. 2019. V. 146. № 11. dev150920. <https://doi.org/10.1242/dev.150920>
4. Barresi M.G.F., Gilbert S.F. *Developmental Biology*. 12th ed. Oxford: Univ. Press, 2019. 888 p.
5. Adams M.S., Bronner-Fraser M. Review: The role of neural crest cells in the endocrine system // *Endocrine Pathol.* 2009. V. 20. № 2. P. 92–100. <https://doi.org/10.1007/s12022-009-9070-6>
6. De Felice M., Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms // *Endocrine Rev.* 2004. V. 25. № 5. P. 722–746. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0028>
7. Nilsson M., Fagman H. Development of the thyroid gland // *Development*. 2017. V. 144. № 12. P. 2123–2140. <https://doi.org/10.1242/dev.145615>
8. Sadler T.W. *Langman's Medical Embryology*. 14th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2018. 456 p.
9. Pan F.C., Brissova M. Pancreas development in humans // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*. 2014. V. 21. № 2. P. 77–82. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000047>
10. Jennings R.E., Berry A.A., Strutt J.P. et al. Human pancreas development // *Development*. 2015. V. 142. № 18. P. 3126–3137. <https://doi.org/10.1242/dev.120063>
11. Wilkinson D.G., Bhatt S., Herrmann B.G. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation // *Nature*. 1990. V. 343. № 6259. P. 657–659. <https://doi.org/10.1038/343657a0>
12. Viotti M., Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K. SOX17 links gut endoderm morphogenesis and germ layer segregation // *Nat. Cell Biol.* 2014. V. 16. № 12. P. 1146–1156. <https://doi.org/10.1038/ncb3070>
13. Lickert H., Kutsch S., Kanzler B. et al. Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm // *Developmental Cell*. 2002. V. 3. № 2. P. 171–181. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00206-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00206-x)
14. Tada S., Era T., Furusawa C. et al. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture // *Development*. 2005. V. 132. № 19. P. 4363–4374. <https://doi.org/10.1242/dev.02005>
15. David N.B., Rosa F.M. Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signaling // *Development*. 2001. V. 128. № 20. P. 3937–3947.
16. Lowe L.A., Yamada S., Kuehn M.R. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo // *Development*. 2001. V. 128. № 10. P. 1831–1843.
17. Shen M.M. Nodal signaling: developmental roles and regulation // *Development*. 2007. V. 134. № 6. P. 1023–1034. <https://doi.org/10.1242/dev.000166>
18. Charney R.M., Forouzmard E., Cho J.S. et al. Foxh1 occupies cis-regulatory modules prior to dynamic transcription factor interactions controlling the mesendoderm gene program // *Developmental Cell*. 2017. V. 40. № 6. P. 595–607. E4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.017>
19. Yang Y.-P., Anderson R.M., Klingensmith J. BMP antagonism protects Nodal signaling in the gastrula to promote the tissue interactions underlying mammalian forebrain and craniofacial patterning // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 15. P. 3030–3042. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq208>
20. Loh K.M., Ang L.T., Zhang J. et al. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 14. № 2. P. 237–252. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.007>
21. Vincent S.D., Dunn N.R., Hayashi S. et al. Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals // *Genes & Development*. 2003. V. 17. № 13. P. 1646–1662. <https://doi.org/10.1101/gad.1100503>
22. Lenhart K.F., Holtzman N.G., Williams J.R. et al. Integration of nodal and BMP signals in the heart requires FoxH1 to create left-right differences in cell migration rates that direct cardiac asymmetry // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 1. P. e1003109. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003109>
23. Kiecker C., Bates T., Bell E. Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos // *Cell. Mol. Life Sci.: CMLS*. 2016. V. 73. № 5. P. 923–947. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2092-y>
24. Kanai-Azuma M., Kanai Y., Gad J.M. et al. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice // *Development*. 2002. V. 129. № 10. P. 2367–2379.
25. Viotti M., Niu L., Shi S.-H. et al. Role of the gut endoderm in relaying left-right patterning in mice // *PLoS Biol.* 2012. V. 10. № 3. P. e1001276. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001276>
26. McKnight K.D., Hou J., Hoodless P.A. Foxh1 and Foxa2 are not required for formation of the midgut and hindgut definitive endoderm // *Developmental Biol.* 2010. V. 337. № 2. P. 471–481. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.040>
27. Davenport C., Diekmann U., Budde I. et al. Anterior-posterior patterning of definitive endoderm generated from human embryonic stem cells depends on the differential signaling of retinoic acid, Wnt-, and BMP-sig-

- nalng // *Stem Cells*. 2016. V. 34. № 11. P. 2635–2647. <https://doi.org/10.1002/stem.2428>
28. Zorn A.M., Wells J.M. Vertebrate endoderm development and organ formation // *Annual Rev. Cell and Developmental Biol.* 2009. V. 25. P. 221–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113344>
 29. Gordillo M., Evans T., Gouon-Evans V. Orchestrating liver development // *Development*. 2015. V. 142. № 12. P. 2094–2108. <https://doi.org/10.1242/dev.114215>
 30. Sherwood R.I., Chen T.-Y.A., Melton D.A. Transcriptional dynamics of endodermal organ formation // *Developmental Dynamics: An Official Publ. Am. Association of Anatomists*. 2009. V. 238. № 1. P. 29–42. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21810>
 31. Mark M., Ghyselinck N.B., Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development // *Nucl. Receptor Signaling*. 2009. V. 7. P. e002. <https://doi.org/10.1621/nrs.07002>
 32. Bayha E., Jørgensen M.C., Serup P. et al. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 6. P. e5845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005845>
 33. Wang Z., Dollé P., Cardoso W.V. et al. Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives // *Developmental Biol.* 2006. V. 297. № 2. P. 433–445. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.019>
 34. Wendling O., Dennefeld C., Chambon P. et al. Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches // *Development*. 2000. V. 127. № 8. P. 1553–1562.
 35. Roberts D.J., Johnson R.L., Burke A.C. et al. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut // *Development*. 1995. V. 121. № 10. P. 3163–3174.
 36. Faure S., de Santa Barbara P. Molecular embryology of the foregut // *J. Pediatric Gastroenterol. and Nutrition*. 2011. V. 52. P. S2–S3. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182105a1a>
 37. Goss A.M., Tian Y., Tsukiyama T. et al. Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut // *Developmental Cell*. 2009. V. 17. № 2. P. 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.005>
 38. Domyan E.T., Ferretti E., Throckmorton K. et al. Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2 // *Development*. 2011. V. 138. № 5. P. 971–981. <https://doi.org/10.1242/dev.053694>
 39. Billmyre K.K., Hutson M., Klingensmith J. One shall become two: separation of the esophagus and trachea from the common foregut tube // *Developmental Dynamics: An Official Publ. Am. Association of Anatomists*. 2015. V. 244. № 3. P. 277–288. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24219>
 40. Minoo P., Su G., Drum H. et al. Defects in tracheo-esophageal and lung morphogenesis in Nkx2.1(–/–) mouse embryos // *Developmental Biol.* 1999. V. 209. № 1. P. 60–71. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9234>
 41. Lindsay E.A., Vitelli F., Su H. et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice // *Nature*. 2001. V. 410. № 6824. P. 97–101. <https://doi.org/10.1038/35065105>
 42. Kelly R.G., Jerome-Majewska L.A., Papaioannou V.E. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomeric myogenesis // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 22. P. 2829–2840. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh304>
 43. Zhang Z., Huynh T., Baldini A. Mesodermal expression of Tbx1 is necessary and sufficient for pharyngeal arch and cardiac outflow tract development // *Development*. 2006. V. 133. № 18. P. 3587–3595. <https://doi.org/10.1242/dev.02539>
 44. Garg V., Yamagishi C., Hu T. et al. Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by Sonic Hedgehog during pharyngeal arch development // *Developmental Biol.* 2001. V. 235. № 1. P. 62–73. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0283>
 45. Choe C.P., Crump J.G. Tbx1 controls the morphogenesis of pharyngeal pouch epithelia through mesodermal Wnt11r and Fgf8a // *Development*. 2014. V. 141. № 18. P. 3583–3593. <https://doi.org/10.1242/dev.111740>
 46. Kameda Y., Ito M., Nishimaki T. et al. FRS2alpha is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus // *Developmental Dynamics: An Official Publ. Am. Association of Anatomists*. 2009. V. 238. № 3. P. 503–513. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21867>
 47. Grevellec A., Tucker A.S. The pharyngeal pouches and clefts: development, evolution, structure and derivatives // *Seminars in Cell & Developmental Biol.* 2010. V. 21. № 3. P. 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2010.01.022>
 48. Gordon J., Manley N.R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis // *Development*. 2011. V. 138. № 18. P. 3865–3878. <https://doi.org/10.1242/dev.059998>
 49. Gordon J., Bennett A.R., Blackburn C.C. et al. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch // *Mechanisms of Development*. 2001. V. 103. № 1–2. P. 141–143. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00333-1](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00333-1)
 50. Kebebew E., Peng M., Wong M.G. et al. GCM2 gene, a master regulator of parathyroid gland development, expression, and regulation in hyperparathyroidism // *Surgery*. 2004. V. 136. № 6. P. 1261–1266. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2004.06.056>
 51. Manley N.R. Embryology of the parathyroid glands // *Hypoparathyroidism*. Springer-Verlag Italia, 2015. P. 11–18. https://doi.org/10.1007/978-88-470-5376-2_2
 52. Maret A., Ding C., Kornfield S.L. et al. Analysis of the GCM2 gene in isolated hypoparathyroidism: a molecular and biochemical study // *The J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*. 2008. V. 93. № 4. P. 1426–1432. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1783>

53. Guan B., Welch J.M., Sapp J.C. et al. GCM2-activating mutations in familial isolated hyperparathyroidism // *The Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 99. № 5. P. 1034–1044.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.018>
54. Correa P., Akerström G., Westin G. Underexpression of Gcm2, a master regulatory gene of parathyroid gland development, in adenomas of primary hyperparathyroidism // *Clin. Endocrinol.* 2002. V. 57. № 4. P. 501–505.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2002.01627.x>
55. Grevellec A., Graham A., Tucker A.S. Shh signalling restricts the expression of Gcm2 and controls the position of the developing parathyroids // *Developmental Biol.* 2011. V. 353. № 2. P. 194–205.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.02.012>
56. Yamagishi H. Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer // *Genes & Development.* 2003. V. 17. № 2. P. 269–281.
<https://doi.org/10.1101/gad.1048903>
57. Bain V.E., Gordon J., O'Neil J.D. et al. Tissue-specific roles for sonic hedgehog signaling in establishing thymus and parathyroid organ fate // *Development.* 2016. V. 143. № 21. P. 4027–4037.
<https://doi.org/10.1242/dev.141903>
58. Ohyama T., Groves A.K. Expression of mouse Foxi class genes in early craniofacial development // *Developmental Dynamics.* 2004. V. 231. № 3. P. 640–646.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20160>
59. Hasten E., Morrow B.E. Tbx1 and Foxi3 genetically interact in the pharyngeal pouch endoderm in a mouse model for 22q11.2 deletion syndrome // *PLoS Genet.* 2019. V. 15. № 8. P. e1008301.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008301>
60. Edlund R.K., Ohyama T., Kantarci H. et al. Foxi transcription factors promote pharyngeal arch development by regulating formation of FGF signaling centers // *Developmental Biol.* 2014. V. 390. № 1. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.03.004>
61. Su D., Ellis S., Napier A. et al. Hoxa3 and Pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis // *Developmental Biol.* 2001. V. 236. № 2. P. 316–329.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0342>
62. Manley N.R., Selleri L., Brendolan A. et al. Abnormalities of caudal pharyngeal pouch development in Pbx1 knockout mice mimic loss of Hox3 paralogs // *Developmental Biol.* 2004. V. 276. № 2. P. 301–312.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.030>
63. Zou D., Silvius D., Davenport J. et al. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1 // *Developmental Biol.* 2006. V. 293. № 2. P. 499–512.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.12.015>
64. Gordon J., Wilson V.A., Blair N.F. et al. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium // *Nat. Immunology.* 2004. V. 5. № 5. P. 546–553.
<https://doi.org/10.1038/ni1064>
65. Gardiner J.R., Jackson A.L., Gordon J. et al. Localised inhibition of FGF signalling in the third pharyngeal pouch is required for normal thymus and parathyroid organogenesis // *Development.* 2012. V. 139. № 18. P. 3456–3466.
<https://doi.org/10.1242/dev.079400>
66. Gordon J., Patel S.R., Mishina Y. et al. Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis // *Developmental Biol.* 2010. V. 339. № 1. P. 141–154.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.026>
67. Kamitani-Kawamoto A., Hamada M., Moriguchi T. et al. MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development // *J. Bone and Mineral Research: The Official J. Am. Society for Bone and Mineral Research.* 2011. V. 10. № 26. P. 2463–2472.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.458>
68. Naveh-Many T., Silver J. Transcription factors that determine parathyroid development power PTH expression // *Kidney Internat.* 2018. V. 93. № 1. P. 7–9.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.08.026>
69. Grigorieva I.V., Mirczuk S., Gaynor K.U. et al. Gata3-deficient mice develop parathyroid abnormalities due to dysregulation of the parathyroid-specific transcription factor Gcm2 // *J. Clin. Investigation.* 2010. V. 120. № 6. P. 2144–2155.
<https://doi.org/10.1172/JCI42021>
70. Peissig K., Condie B.G., Manley N.R. Embryology of the parathyroid glands // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2018. V. 47. № 4. P. 733–742.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.07.002>
71. Van Esch H., Groenen P., Nesbit M.A. et al. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome // *Nature.* 2000. V. 406. № 6794. P. 419–422.
<https://doi.org/10.1038/35019088>
72. Grigorieva I.V., Thakker R.V. Transcription factors in parathyroid development: lessons from hypoparathyroid disorders // *Annals N.Y. Acad. Sci.* 2011. V. 1237. № 1. P. 24–38.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06221.x>
73. Ordóñez N.G. Value of GATA3 immunostaining in tumor diagnosis: a review // *Adv. Anatomic Pathol.* 2013. V. 20. № 5. P. 352–360.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182a28a68>
74. Han S.-I., Tsunekage Y., Kataoka K. Gata3 cooperates with Gcm2 and MafB to activate parathyroid hormone gene expression by interacting with SP1 // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015. V. 411. P. 113–120.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.04.018>
75. Yiangou L., Ross A.D.B., Goh K.J. et al. Human pluripotent stem cell-derived endoderm for modeling development and clinical applications // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 22. № 4. P. 485–499.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.016>
76. Cahan P., Daley G.Q. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 6. P. 357–368.
<https://doi.org/10.1038/nrm3584>
77. Siller R., Naumovska E., Mathapati S. et al. Development of a rapid screen for the endodermal differentiation potential of human pluripotent stem cell lines //

- Sci. Reports. 2016. V. 6. Article number 37178.
<https://doi.org/10.1038/srep37178>
78. Li Q.V., Dixon G., Verma N. et al. Genome-scale screens identify JNK-JUN signaling as a barrier for pluripotency exit and endoderm differentiation // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. P. 999–1010.
<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0408-9>
79. Mou H., Zhao R., Sherwood R. et al. Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 10. № 5. P. 385–397.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.018>
80. Wong A.P., Bear C.E., Chin S. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. № 9. P. 876–882.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2328>
81. Kearns N.A., Genga R.M., Ziller M. et al. Generation of organized anterior foregut epithelia from pluripotent stem cells using small molecules // *Stem Cell Res.* 2013. V. 11. № 3. P. 1003–1012.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.06.007>
82. Huang S.X., Islam M.N., O'Neill J. et al. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. № 1. P. 84–91.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2754>
83. Bingham E.L., Cheng S.-P., Woods Ignatoski K.M. et al. Differentiation of human embryonic stem cells to a parathyroid-like phenotype // *Stem Cells and Development.* 2009. V. 18. № 7. P. 1071–1080.
<https://doi.org/10.1089/scd.2008.0337>
84. Woods Ignatoski K.M., Bingham E.L., Frome L.K. et al. Differentiation of precursors into parathyroid-like cells for treatment of hypoparathyroidism // *Surgery.* 2010. V. 148. № 6. P. 1186–1189. Discussion 1189–1190.
<https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.09.021>
85. Green M.D., Chen A., Nostro M.-C. et al. Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 3. P. 267–272.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1788>

The Role of Genetic Factors in Organization and Regulation of Endocrine Tissues Development *in vivo* and *in vitro*

D. V. Goliusova^{a,*}, N. V. Klementieva^b, A. V. Panova^{a,b}, N. G. Mokrysheva^b, and S. L. Kiselev^{a,**}

^aVavilov Institute of General Genetic, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bEndocrinology Research Centre, Moscow, 117036 Russia

*e-mail: daria.goliusova@mail.ru

**e-mail: sl_kiselev@yahoo.com

Endocrine cells can be fully functional after heterotopic transplantation into mammals that makes them a powerful tool for regenerative medicine. However, the shortage of reliable and efficient approaches to obtain endocrine cells *in vitro* limits the possibility of cell-based therapy of endocrine disorders. Here, we discuss current data on genetic and molecular mechanisms of mouse and human endocrine tissues embryonic development, as well as key genetic factors which regulate differentiation of pluripotent stem cells (PSC) in endodermal lineage *in vitro* into endocrine parathyroid cells. Data presented allow us to suggest an alternative approach for parathyroid differentiation of PSC based on genetic programming by induction of key endogenous differentiation factors expression.

Keywords: genes, developmental genetics, endocrine tissues, definitive endoderm, parathyroid cells, differentiation *in vitro*.