ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 5, с. 306–322

ОБЗОРЫ

УДК 591.3

ТРАНСФОРМАЦИЯ СОСТОЯНИЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В ХОДЕ МОРФОГЕНЕЗА ЭПИБЛАСТА МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. В. К. Абдыев[a], *, Е. В. Алпеева[a], Е. Н. Калистратова[b], Е. А. Воротеляк[a], А. В. Васильев[a, b]

[a] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова 26, Москва, 119334 Россия*

[b] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия*

**E-mail: mailtovepa@gmail.com*

Поступила в редакцию 27.07.2022 г.
После доработки 01.06.2023 г.
Принята к публикации 19.07.2023 г.

Плюрипотентный статус клетки *in vivo* имеет пространственно-временную регуляцию в рамках эмбриогенеза и обусловлен процессами самообновления, бесконечной пролиферации и дифференцировки во все типы клеток организма. Статус плюрипотентности был охарактеризован при исследовании клеток тератокарциномы, а затем это понятие было применено к эмбриональным клеткам преимплантационного эмбриона мыши. Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) мыши и человека образуются в преимплантационный период и присутствуют у эмбриона до начала гаструляции. Одно из основных событий раннего развития млекопитающих – разделение внутренней клеточной массы бластоцисты (ВКМ) на гипобласт и эпибласт, который дает начало собственно эмбриону. В ходе морфогенетических процессов, связанных с формированием эпибласта, состояния плюрипотентности его клеток трансформируются. Таким образом, клетки ВКМ бластоцисты эпигенетическим и транскрипционным паттернами отличаются от своих дочерних клеток пери/постимплантационного эпибласта. С началом гаструляционных движений созревание клеток эпибласта завершается их дифференцировкой в клетки трех зародышевых листков. В данном обзоре рассмотрены исторические аспекты изучения плюрипотентности клеток, различные источники ПСК, механизмы и сигнальные пути, поддерживающие самообновление и плюрипотентность клеток в культурах ПСК. Кроме того, мы обобщили данные о морфогенетических процессах, которые влияют на образование наивных клеток ВКМ *in vivo* и последующее созревание клеток эпибласта мыши и человека, связанное с трансформацией их состояний плюрипотентности.

Ключевые слова: эмбриогенез млекопитающих, морфогенез, ВКМ бластоцисты, эпибласт, BMP, FGF, WNT сигнальные пути, плюрипотентные стволовые клетки, ИПСК, ЭСК, наивные ПСК, праймированные ПСК, репрограммирование

DOI: 10.31857/S0475145023050026, **EDN:** KJFGAE

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентность – это способность клеток дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и первичные половые клетки (ППК). В ходе онтогенеза *in vivo* плюрипотентность является временным и трансформирующимся состоянием. В связи с этим плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), полученные на разных догаструляционных стадиях развития из эмбриона человека и мыши, имеют разные свойства и разные состояния плюрипотентности. Существуют так называемые наивные, розеткоподобные, формативные и праймированные ПСК, которые отличаются эпигенетическим статусом, и, как следствие, профилем экспрессии, а также способностью дифференцироваться в различные типы клеток организма. Кроме того, разные условия культивирования ПСК дают возможность переводить их из наивного в промежуточные и праймированное состояния или репрограммировать в обратном направлении. Так, основными признаками наивной плюрипотентности, в отличие от праймированной, является транскрипция гена *Oct4* с использованием дистального энхансера, сохранение неинактивированного состояния второй Х хромосомы в женских клетках, глобальное деметилирование ДНК, способность образовывать химеры. В искусственных условиях, воспроизводящих условия организма, возможно поддержание различных состояний плюрипотентности ПСК, а также репрограммирование более дифференцированных праймированных ПСК в наивные путем модулирования в них

сигнальных путей WNT и FGF2 при помощи генетических конструкций, малых молекул, РНК и другими способами. Основным отличием условий поддержания плюрипотентного состояния ПСК мыши и человека является независимость ПСК человека от активатора сигнального белка STAT3 фактора LIF (лейкемия ингибирующий фактор), необходимого для культивирования ПСК мыши.

Поиск молекулярных механизмов и сигнальных путей, модулирование которых можно использовать для поддержания ПСК, а также репрограммирования соматических клеток взрослого организма с получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в культуре – чрезвычайно актуальная область исследований. Дело в том, что ПСК человека являются важной моделью для изучения дифференцировки клеток. Лимитированный доступ к эмбриональному материалу человека затрудняет исследование эмбриогенеза и отклонений, происходящих на ранних стадиях эмбрионального развития. Поэтому использование ПСК человека в качестве объекта дает возможность модулирования и изучения раннего развития человека *in vitro*.

Мы проанализировали информацию о механизмах динамично изменяющихся в развитии состояний плюрипотентности, а также о потенциале ПСК эмбриона человека и мыши дифференцироваться в зародышевые и внезародышевые производные. В настоящем обзоре будут рассмотрены источники и способы получения ПСК человека, динамика состояний плюрипотентости в развитии мыши и человека, а кроме того, её связь с морфогенетическими процессами, характерными для раннего эмбриогенеза млекопитающих.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Явления бесконечной пролиферации и симметричного деления в культуре, а также способность дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков эмбриона свойственны двум основным типам клеток: плюрипотентным раковым клеткам тератокарцином и ПСК (Chambers, Smith, 2004). Тератома – это образование, которое содержит клетки трех зародышевых листков разной степени дифференцированности в виде формирующейся неупорядоченным образом опухолевой массы, которая может быть доброкачественной (Andrews, 2002; Chambers, Smith, 2004; Damjanov, 1993; Damjanov, Andrews, 2016). Злокачественная тератома, тератокарцинома, содержит недифференцированные эмбриональные карциномные стволовые клетки и образует при трансплантации реципиенту злокачественную опухоль. Экспериментальные работы с тератомой были начаты Стивенсом и Литтлом (Stevens, Little, 1954) на самцах мышей линии 129. В их исследованиях тератомы спонтанно возникали в семенниках примерно 1% самцов мышей линии 129. Также они могли быть вызваны трансплантацией гонады эмбрионов мыши 11–13 суток развития (данной и некоторых других линий) в семенники взрослых мышей (Stevens, 1970a, 1970b; Stevens, 1964). В норме на 11–13 сутки развития происходит заселение ППК в зачаток гонады, и пролиферация ППК в индифферентной гонаде. Далее, на 13 сутки, детерминируется пол мыши, начинается мейотическое деление ППК, и они становятся гаплоидными. Таким образом, предшественниками возникших тератом в семенниках мыши были ППК на стадии митотического деления, имеющие свойства стволовых клеток. Позднее было показано, что в результате дисбаланса между процессами пролиферации и дифференцировки (Pierce, 1980, 1983), начиная с 11 суток развития мышей, среди ППК происходит накопление стволовых клеток злокачественной тератокарциномы. Поэтому в экспериментах Стивенса и Литтла при пересадке гонады реципиентным животным у них могли образовываться злокачественные тератокарциномы.

Клетки тератокарциномы мыши культивировались *in vitro* на фидере из фибробластов и были названы эмбриональными карциномными клетками (ЭКК) (Finch, Ephrussi, 1967). ЭКК имели плюрипотентный статус. Различные подходы и методы, разработанные для оптимизации условий культивирования плюрипотентных ЭКК, были впоследствии применены для работы с клетками преимплантационного эмбриона, поскольку предполагалось, что эти клетки схожи друг с другом. При инъекции плюрипотентных ЭКК в бластоцисту мыши они не приживались в реципиенте и/или образовывали опухоль в пре/постнатальных эмбрионах (Papaioannou et al., 1978). Позднее были проведены эксперименты по пересадке в бластоцисты плюрипотентных клеток XY линий с нормальным кариотипом, выделенных из преимплантационного эмбриона. Оказалось, что клетки преимплантационного эмбриона, считавшиеся ранее тератокарциномными, в определенном окружении могут вести себя как нормальные эмбриональные клетки. Они были способны внедряться в эмбриональные ткани мыши-реципиента, а также дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков, в том числе в клетки половой линии, минуя образование тератомы и/или тератокациномы (Bradley et al., 1984). В итоге стало понятно, что такие квази-карциномные клетки являлись клетками внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты и эпибласта (Chambers, Smith, 2004).

ИСТОЧНИКИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ПСК можно разделить на три категории в зависимости от источников и методов получения. Первая категория – это ПСК, выделенные из эмбриона: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) из ВКМ бластоцисты преимплантационного эмбриона мыши и человека (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998) и стволовые клетки из постимплантационного эпибласта (ЭпиСК) мыши на стадии E5.75 (Brons, et al., 2007; Tesar et al., 2007). Вторая категория – ПСК, полученные методом переноса соматического ядра в энуклеированный ооцит (Wilmut et al., 1997). Третья категория – ПСК, полученные методом репрограммирования соматических клеток с помощью ключевых факторов плюрипотентности (Takahashi, Yamanaka, 2006).

Эмбриональные стволовые клетки мыши

Развитие эмбриона млекопитающих можно разделить на два основных периода: пре- и постимплантационный. В преимплантационный период при дроблении зиготы бластомеры "выбирают" направление своего дальнейшего развития в двух точках бифуркации. Первая точка соответствует стадии 8 бластомеров, и в ней происходит разделение бластомеров на внутренние и наружные клетки (Nichols, Gardner, 1984). В результате клеточной сегрегации из внутренних клеток образуются клетки ВКМ бластоцисты, а из наружных – трофэктодерма (Ducibella, Anderson, 1975; Lim, Plachta, 2021). Вторая точка бифуркации соответствует разделению ВКМ на гипобласт (так называемую "первичную энтодерму" у мыши) и эпибласт. Эпибласт – это кластер эпителиальных зародышевых клеток, который дает начало собственно эмбриону (Gardner, Rossant, 1979; Muhr, Ackerman, 2022). ВКМ бластоцисты является источником ЭСК (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Первые ЭСК, полученные от мыши, поддерживали в среде, кондиционированной клетками тератокарциномы (Johnson, Ziomek, 1981), или культивировали совместно с облученными эмбриональными фибробластами мыши (МЭФ) в обогащенной культуральной среде (Evans, Kaufman, 1981; Wobus et al., 1984). Позже было показано, что поддержание плюрипотентности *in vitro* зависит от фактора LIF (Gough et al., 1989; Smith et al., 1988). LIF принадлежит к семейству цитокинов интерлейкина-6 и связывается с гетеродимерным рецептором, состоящим из LIF-рецептора и gp130 (Niwa et al., 2009). Данный фактор действует на 3 основных внутриклеточных сигнальных пути: путь JAK-STAT3, который отвечает за самообновление, путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)-Akt, ответственный за пролиферацию и поддержание плюрипотентности, и путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), который при активации приводит к пролиферации и дифференцировке ЭСК мыши (Ohtsuka et al., 2015). Посредством фосфорилирования транскрипционного фактора STAT3 через сигнальный путь JAK-STAT (Ohtsuka et al., 2015) активируется экспрессия "генов плюрипотентности", таких как *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* и *Sall4*, и стимулируется самообновление ЭСК мыши *in vitro* (Ho et al., 2009; Nichols et al., 1998; Raz et al., 1999). Активация экспрессии этих генов происходит за счет совместного связывания транскрипционных факторов Stat3 и Brg1 с их промоторами, при этом *Klf4* и *Sall4* являются прямыми мишенями Stat3 (Bourillot et al., 2009). Активация PI3K-Akt фактором LIF повышает экспрессию генов *Nanog*, *Esrrb*, *Tbx3* и *Tcl1* (Storm et al., 2009), ответственных за самообновление ЭСК мыши (Storm et al., 2007, 2009). Ген *Zscan4*, который регулируется PI3K (Storm et al., 2009), экспрессируется в эмбрионе на стадии 2 бластомеров (Falco et al., 2007). В то же время гетерогенная популяция ЭСК мыши *in vitro* сохраняет экспрессию данного гена в 5% клеток (Zalzman et al., 2010). Функция Zscan4 заключается в регуляции механизма альтернативной элонгация теломер на ранних стадиях развития эмбриона до начала теломеразной активности (Blasco, 2007). Альтернативная элонгация теломер в бластомерах на стадии 2-клеточного эмбриона и ЭСК мыши работает посредством гомологичной рекомбинации теломерных последовательностей (Blasco, 2007), тогда как гиперметилирование и гетерохроматизация теломерных/субтеломерных регионов препятствуют этому процессу в терминально дифференцированных клетках (Schoeftner, Blasco, 2009). Zscan4 способствует деметилированию теломерных/субтеломерных регионов путем инициации деградации основных компонентов комплекса метилирования Uhrf1 и Dnmt1, в результате обеспечивая пролиферацию, поддержание плюрипотентности и стабильность генома (Dan et al., 2017; Le et al., 2021). Нокдаун *Zscan4* приводит к изменению кариотипа, снижению клеточной пролиферации и апоптозу через 7–8 пассажей (Zalzman et al., 2010). Таким образом, LIF активация двух сигнальных путей JAK-STAT3 и PI3K-Akt в ЭСК мыши способствует самообновлению, пролиферации и поддержанию статуса плюрипотентности. Кроме того, стимуляция LIF активирует MAPK посредством Shp2-mediated Grb/Sos сигнального пути, через который одновременно активируется JAK-STAT3 сигналинг (Ohtsuka et al., 2015).

Известно, что MAPK сигнальный путь обеспечивает дифференцировку клеток в нейрональном направлении (Stavridis et al., 2007), а его активность в ЭСК мыши ингибируется малой молекулой MEK ингибитора PD098059 (Burdon et al., 1999; Ohtsuka et al., 2015). Для длительного самообновления ЭСК мыши *in vitro* необходима акти-

вация WNT/β-catenin сигнального пути и его мишеней *Nanog*, *Esrrb*, *Klf2*, и *Tfcp2l1* (Ohtsuka et al., 2015; Qiu et al., 2015). CHIR, ингибируя GSK3, стабилизирует активность и высвобождение β-catenin, который входит в ядро и индуцирует экспрессию "генов плюрипотентности" *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* (Martello et al., 2012) путем супрессии TCF3 (Qiu et al., 2015). Мишени WNT/β-catenin сигнального пути, *Klf2* и *Tfcp2l1,* повышают свою экспрессию и стимулируют экспрессию *Nanog* для инициации самообновления клеток (Qiu et al., 2015; Ye et al., 2013). Суммируя, можно сказать, что для культивирования ЭСК мыши необходимы ингибирование MAPK (PD098059), активация канонического WNT/β-catenin сигнального пути ингибитором GSK3 (CHIR) и стимуляция клеток фактором LIF.

Стволовые клетки эпибласта (ЭпиСК) мыши

В 2007 г. были впервые выделены плюрипотентные стволовые клетки пост-имплантационного эпибласта мыши (ЭпиСК) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Было показано, что ЭпиСК экспрессируют основные регуляторные транскрипционные факторы плюрипотентности (Oct4, Nanog) и сохраняют способность дифференцироваться в соматические терминальные типы клеток и ПЗК (Tesar et al., 2007). В отличие от ЭСК мыши ЭпиСК поддерживались в LIF независимых и Activin A/nodal и FGF2 (Li, Belmonte, 2017) зависимых условиях *in vitro.* Они формировали плоские монослойные колонии, состоящие из клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (Brons et al., 2007). Кроме того, было обнаружено отличие профилей тотальной экспрессии генов у ЭпиСК и ЭСК мыши (Kojima et al., 2014). Это связано с инактивацией дистального и активацией проксимального энхансера *Oct4* в ЭпиСК (Tesar et al., 2007). По сравнению с ЭСК мыши ЭпиСК более интенсивно экспрессировали гены *Otx2*, *Eomes*, *Foxa2*, *brachyury T*, *Gata6*, *Sox17* и *Cer1* (Tesar et al., 2007). Метилом ЭпиСК мыши отличается от метилома ЭСК гиперметилированностью в регионах промоторов (Veillard et al., 2014). Известно, что геном ЭСК мыши гипометилирован, и их направленная дифференцировка активирует *de novo* метилирование посредством катализаторов Dnmt3b/a/l (*de novo* methyltransferase 3) (Okano et al., 1999). Было показано, что в клетках ЭпиСК увеличивается уровень экспрессии *de novo* метилтрансфераз *Dnmt3a1* и *Dnmt3b* и уменьшается уровень экспрессии деметилаз *Tet1* и *Tet2* (Veillard et al., 2014). ЭпиСК были способны формировать тератомы при трансплантации в различные органы иммунодефицитной мыши (Brons et al., 2007; Sugimoto et al., 2015; Tesar et al., 2007). Попытки получить химерных мышей подсадкой клеток ЭпиСК в морулу и бластоцисту не привели к успеху. Точно так же клетки постимплантационного эпибласта мыши при подсадке были не способны давать химерных мышей (Tesar et al., 2007). Однако оказалось, что принудительная экспрессия антиапоптотического гена *Bcl2* в ЭпиСК, инъецируемых в премиплантационный эмбрион, способствует интеграции этих клеток в эмбрион и формированию первичной химеры (Morata Tarifa et al., 2020). Данная модификация ЭпиСК способствовала устранению межстадийных различий клеток эпибласта (Masaki et al., 2016). Таким образом, клетки эпибласта, выделенные из постимплантационного эмбриона мыши, способны прижиться в преимплантационном эмбрионе и дать вклад в формирование химерного эмбриона. Было показано, что если инъецировать клетки ЭпиСК в постимплантационный эмбрион, то трансплантированные клетки ЭпиСК приживаются внутри него и дифференцируются в производные трех зародышевых листков и ПЗК (Huang et al., 2012).

Эмбриональные стволовые клетки человека

Первые линии ЭСК человека были получены в 1998 г. из ВКМ бластоцисты в тех же условиях, что и условия культивирования ЭСК мыши (Thomson et al., 1998). Однако было показано, что LIF, ключевой фактор самообновления ЭСК мыши (Hanna et al., 2010), не обеспечивает достаточного уровня сигнала для поддержания плюрипотентности ЭСК человека. Оказалось, что для них более важную роль играют сигналы FGF и TGFβ/Activin (Vallier et al., 2005). Несмотря на то, что ЭСК человека и мыши были получены из преимплантационных эмбрионов, находящихся на одной и той же стадии развития, было замечено, что они отличаются по многим показателям. В число этих показателей входят морфология (плоские или куполообразные колонии), зависимость от факторов роста (bFGF и TGFβ/Activin/Nodal или сигнальный путь LIF/STAT3), геномная стабильность, эпигенетическое состояние Х-хромосомы и т.д. (Bayerl et al., 2021).

Плюрипотентные стволовые клетки, полученные путем переноса в ооцит соматического ядра

Очевидно, что исследования ЭСК человека имеют практические и этические ограничения. Кроме того, тератогенность ЭСК лимитирует их применение в регенеративной медицине. В связи с этим проблема альтернативного источника ПСК со свойствами, характерными для ЭСК, сохраняет свою актуальность. Потребность в получении любых типов клеток взрослого человека, которые были бы специфичны для каждого конкретного пациента, стала движущей силой разработки но-

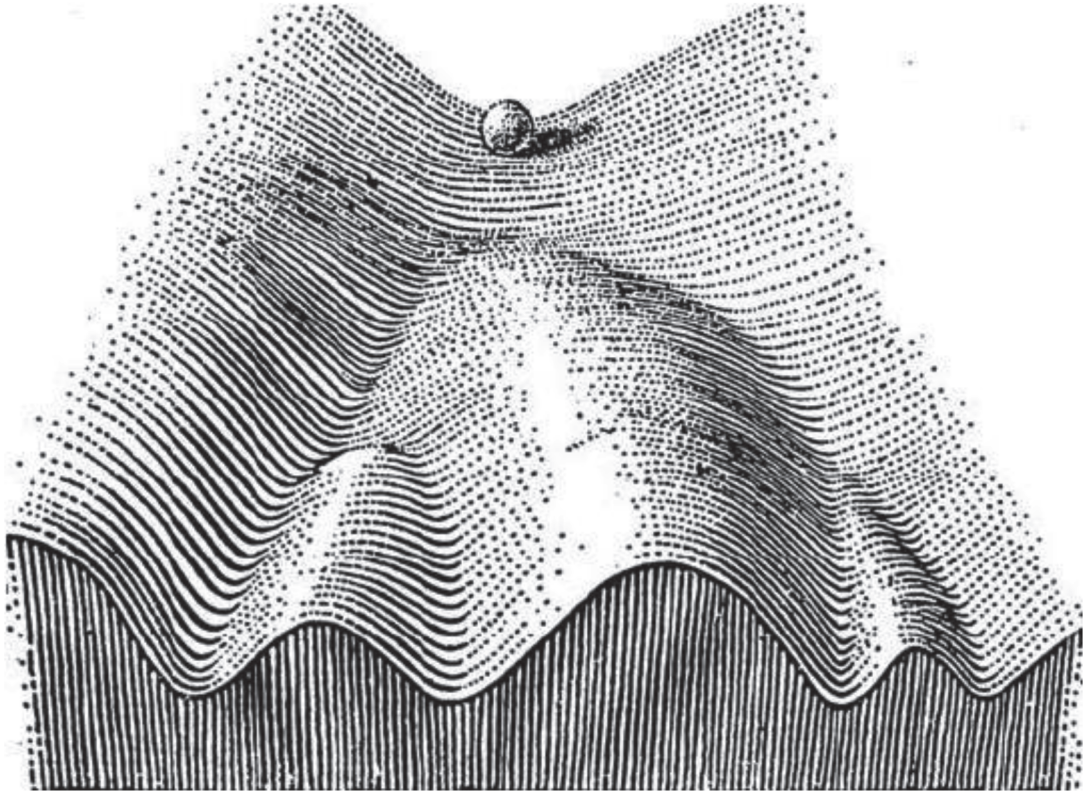

Рис. 1. Рисунок, иллюстрирующий концепцию эпигенетического ландшафта, предложенную К.Х. Уоддингтоном (из Waddington, 1957).

вых способов получения ПСК. В 1997 г. появился новый метод получения ПСК путем переноса соматических ядер в энуклеированные ооциты второго деления мейоза (Wilmut et al., 1997), впоследствии названный клонированием (Gurdon, 2006).

Работа, благодаря которой стало возможно данное направление получения ПСК, была выполнена Гёрдоном еще в 1962 г. (Gurdon, 1962b). Проведенные ранее эксперименты указывали на то, что ядро дифференцированной клетки может отличаться от ядер клеток эмбриона, и эти изменения могут быть необратимыми. Возник вопрос, является ли конечная дифференцировка клеток во время эмбриогенеза результатом делеции генетического материала, что приводит к разнообразию клеток с различными наборами генов, или же за нее ответственны регуляторные механизмы, которые не подразумевают существенного изменения генетического материала. Концепция "эпигенетического ландшафта" К.Х. Уоддингтона (Reiner, 1941; Waddington, 1957) была предложена для наглядного объяснения процессов дифференцировки клеток из тотипотентного состояния зиготы. Клетка в тотипотентном состоянии характеризуется способностью дать начало целому организму или клетке любого типа этого организма. Уоддингтон предложил проиллюстрировать судьбу клеток траекториями движения шаров, скатывающихся под уклон по неровной местности (с холмами и оврагами) (рис. 1). Его концепции подразумевает ограниченный набор устойчивых путей развития клеток и целостного организма в рамках конкретного генотипа. Однако Гёрдон с помощью переноса соматического ядра *Xenopus laevis* в энуклеированный активированный ооцит получил половозрелых взрослых лягушек. Этим он показал, что дифференцировавшуюся клетку (скатившийся вниз шарик) можно вернуть в исходное состояние. Стало понятно, что соматическое ядро, обладая полным набором генов, при пересадке в энуклеированный ооцит "сбрасывает" эпигенетические и транскрипционные установки терминальной дифференцировки и восстанавливает профиль экспрессии тотипотентной клетки (т.е. дедифференцируется). В ходе клонирования соматическая клетка дробится, у нее активируется зародышевый геном (Liu et al., 2018). Однако низкая эффективность клонирования является недостатком данного метода. Кроме того, было показано, что процесс деметилования и *de novo* метилирования генома клона функционирует нестабильно и вызывает нарушение экспрессии генов, ответственных за нормальное развитие (Gao et al., 2018; Wang et al., 2020). Несмотря на нарушения на стадии бластоцисты, можно вы-

делить клетки ВКМ клонов и культивировать их *in vitro*. Изучение выделенных ЭСК клонов позволит выявить проблемы с эпигенетической регуляцией и исправить недостатки метода клонирования.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Описанные выше эксперименты (Gurdon, 1962a; Wilmut et al., 1997) привели к революции в сфере репрограммирования зрелой соматической клетки – открытию возможности репрограммирования путем активации факторов плюрипотентности. Исследователи Такахаши и Яманака показали, что эктопическая экспрессия четырех факторов транскрипции Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (которые были названы "коктейлем Яманаки") достаточна для репрограммирования фибробластов мыши (Takahashi, Yamanaka, 2006) и человека (Takahashi et al., 2007) из соматического терминально дифференцированного в плюрипотентное состояние и их трансформации в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Один из четырех факторов, c-Myc, не является обязательным для индукции плюрипотентного состояния, и для репрограммирования достаточно трех других. Однако эффективность репрограммирования с тремя факторами, Oct4, Sox2 и Klf4, гораздо ниже (Wernig et al., 2008). Известно, что повышенный уровень экспрессии протоонкогена c-Myc приводит к увеличению пролиферации клеток, поскольку c-Myc участвует в регуляции клеточного цикла (Seoane et al., 2002). Таким образом, в коктейле Яманаки факторы Klf4 и c-Myc используются для достижения антиапоптотического эффекта и снятия ареста клеточного цикла в G1/S фазе (Честков и др., 2014). Кроме того, Klf4 является фактором плюрипотентности, который в сочетании с EpCAM индуцирует формирование ИПСК из эмбриональных мышиных фибробластов (Kuan et al., 2017). Честков с соавторами трактовали воздействие эктопической экспрессии этих двух факторов на репрограммируемую клетку как перевод к неустойчивому эпигенетическому состоянию (клетка поднимается на вершину эпигенетического ландшафта) и неопределенному фенотипу. Далее экспрессия основного транскрипционного фактора плюрипотентности Oct4 вместе с Sox2 (составляющего с Oct4 гетеродимерный комплекс) (Rodda et al., 2005), стимулирует переход клетки в более устойчивое плюрипотентное состояние (Честков и др., 2014).

Первые ИПСК человека были получены при помощи трансдукции лентивирусными конструкциями, несущими *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *c-MYC*. Этот метод обладает рядом существенных недостатков. Случайная и нецелевая интеграция вируса в геном соматической клетки может привести к сдвигу рамки считывания и, таким образом, активировать либо подавить экспрессию генов хозяина, что увеличивает риск мутагенеза (Li et al., 2014). С другой стороны, неполное подавление трансгена после репрограммирования при последующей дифференцировке клеток также может стать причиной развития опухоли (Stadtfeld, Hochedlinger, 2010). С целью увеличения эффективности и безопасности репрограммирования были предложены новые стратегии, включающие использование полицистронных векторов (Carey et al., 2009), плазмидных трансфекций (Stadtfeld et al., 2010; Okita, Yamanaka, 2011), аденовирусных векторов (Stadtfeld, Hochedlinger, 2010) и безвекторной доставки рекомбинантных белков (Zhou et al., 2009). Эти новые способы индукции плюрипотентного состояния у соматических клеток проанализированы во многих обзорах (Мучкаева и др., 2012; Banito, Gil, 2010; Hirschi et al., 2014; Tabar, Studer, 2014; Bartoccetti et al., 2020; Khoo et al., 2020; Liu et al., 2020; Neavin et al., 2021; Shelby et al., 2022).

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ ЭПИБЛАСТА И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ *IN VIVO*

Как было отмечено выше, дифференцировку клеток эмбриона млекопитающего можно наглядно изобразить с помощью карты эпигенетического ландшафта, иллюстрирующего концепцию К.Х. Уоддингтона (Waddington, 1952). Тотипотентная клетка постепенно преобразовывается в терминально дифференцированную клетку со специфическими свойствами. На стадии ранней морулы механо-генетические процессы приводят к разделению бластомеров на трофобласт и массу внутренних плюрипотентных клеток. Внутренние клетки компактной морулы способны дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков и во внезародышевые клетки как трофэктодермы (Okae et al., 2018), так и амниона (Shao et al., 2017). Они сохраняются в раннем эмбриогенезе млекопитающих до закладки первичной полоски. Таким образом, плюрипотентность этих клеток ограничивается свойствами и особенностями, которые возникают и исчезают в ходе эмбриогенеза. Трансформацию плюрипотентности *in vivo* можно разделить на 2 основных этапа: преимплантационный и постимплантационный (рис. 2).

В преимплантационных бластомерах 8-клеточного эмбриона мыши эскпрессируется E-кадгерин, который равномерно распределяется в их цитоплазме. Фосфорилирование E-кадгерина приводит к структурированию клеточных контактов на базолатеральной стороне бластомеров и инициирует компактизацию 8 бластомеров на E2.75 (Toyooka, 2020). Бластомеры на этой стадии образуют филоподии, которые формируют с соседними клетками контакты, опосредованные E-кадгерином.

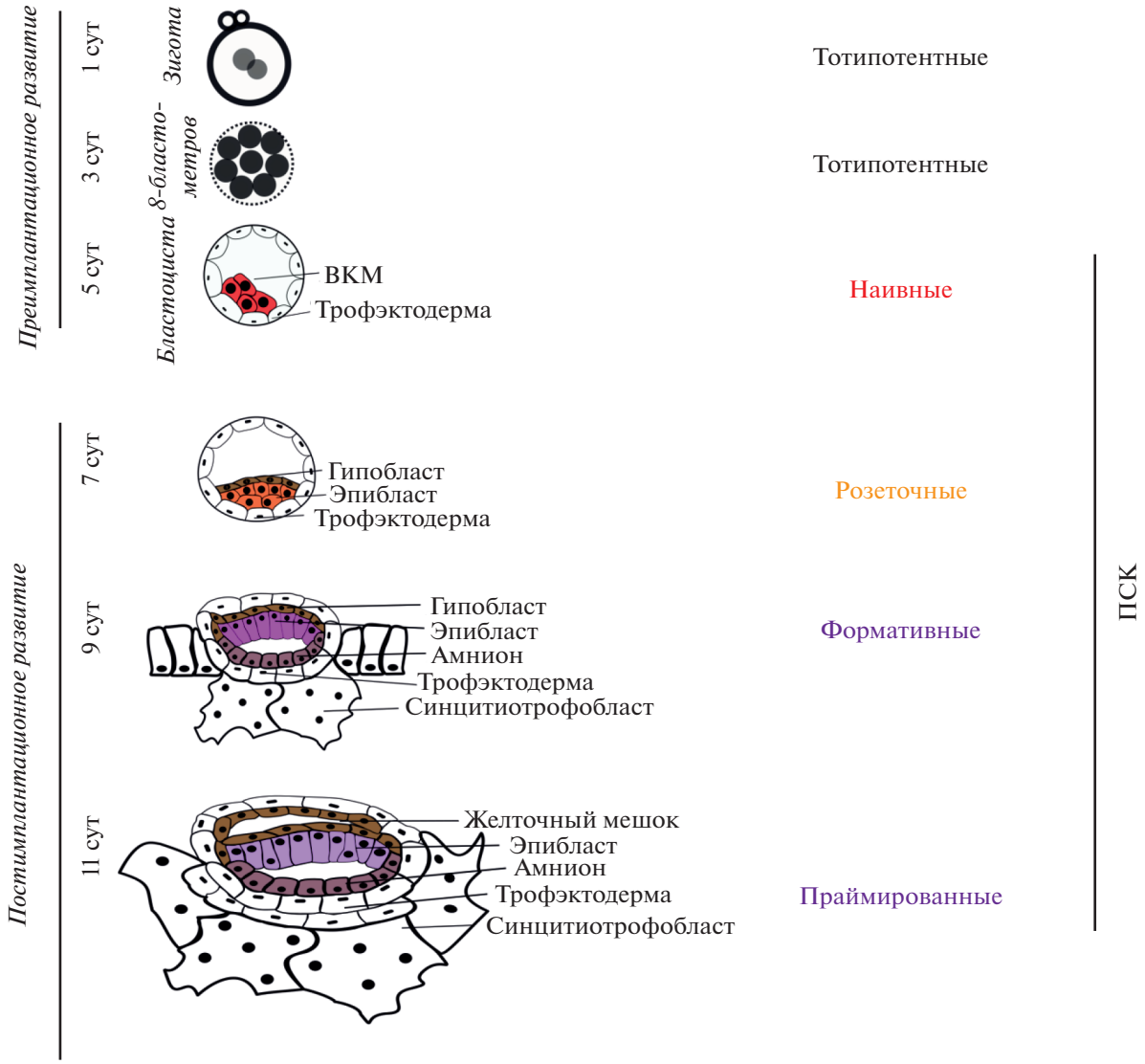

Рис. 2. Схема, обобщающая данные о различных состояниях плюрипотентности клеток в раннем эмбриогенезе человека.

Наличие и активность PAR3-PAR6-aPKC комплекса в бластомерах в этот момент определяет поляризацию наружных бластомеров (Pauken, Capco, 1999). Наряду с асимметричным наследованием дочерними клетками кератинов, поляризация и расположение клеток в эмбрионе являются ключевыми факторами, обуславливающими разделения бластомеров на трофэктодерму и будущие клетки ВКМ бластоцисты. Кератины являются единственными промежуточными филаментами, которые экспрессируются в преимплантационном эмбрионе (Oshima et al., 1983). Показано, что клеточная сегрегация на стадии 8 бластомеров у млекопитающих происходит за счет асимметричного наследования кератинов при клеточном делении и дальнейшего их сохранения в субапикальной области дочерних наружных клеток. Кератины 8 и 18 появляются в единичных вегетативных бластомерах стадии 8 клеток и являются маркерами трофэктодермы (Lim et al., 2020). При этом предрасположенность к дифференцировке в трофэктодерму из вегетативного бластомера появляется еще на стадии 4 бластомеров. Клеточное разнообразие 8-клеточного эмбриона определяется ремоделирующим комплексом хроматина BAF (BAF chromatin-remodeling complex), который экспрессируется на высоком уровне в одном из двух вегетативных бластомеров. Высокий уровень его экспрессии сохраняется в кератин-положительных бластомерах на стадии 8 бластомеров. Внутренние бластомеры остаются аполярными до тех пор, пока клеточные контакты E-кадгерин независимы (Korotkevich et al., 2017).

Сигнальные пути, поддерживающие плюрипотентность клеток

Сигнальный путь FGF4/MAPK посредством эффектора ERK1/2 вызывает дифференцировку бластомеров во внезародышевые клетки, трофэктодерму и первичную энтодерму (гипобласт) (Yamanaka et al., 2010), а также играет важную роль в самообновлении и поддержании плюрипотентности постимплантационного эпибласта и ЭпиСК мыши (Brons et al., 2007; Mossahebi-Mohammadi et al., 2020; Tesar et al., 2007). Было показано, что на E3.5 клетки преимплантационного эпибласта мыши экспрессировали рецептор FGFR1, связывание с которым FGF4 приводило к созреванию эпибласта (Kang et al., 2017; Molotkov et al., 2017). FGF2, известный как активатор ERK1/2 и индуктор дифференцировки в зародышевые листки (Kunath et al., 2007), вызывает долгосрочное ингибирование ERK1/2 в ЭСК и бластоцисте мыши путем FGF2-индуцируемой некогерентной положительной обратной связи (Gharibi et al., 2020), где FGF2 подавляет активность и экспрессию рецептора тирозин киназы Ret (Pachnis et al., 1993) и приводит к долгосрочному ингибированию ERK1/2 (Gharibi et al., 2020). В данном контексте FGF2 повышает экспрессию маркеров наивности, супрессирует *de novo* ДНК метилтрансферазы и способствует подавлению метилирования генома (Gharibi et al., 2020). При первой и второй клеточной сегрегациях в периимплантационном эмбрионе мыши модуляция FGF/MAPK/ERK1/2 сигнального пути является частью процессов созревания эпибласта и сохранения плюрипотентности.

Активность канонического WNT/β-catenin сигнального пути приводит к образованию передне-задней оси зародыша мыши, мезодермы и инициации гаструляции *in vivo* (Haegel et al., 1995; Huelsken et al., 2000; Mohamed et al., 2004). Кроме того, она поддерживает плюрипотентность и самообновление ЭСК человека и мыши *in vitro* (Lyashenko et al., 2011; Sato et al., 2003; Sokol, 2011). Известно, что на всех стадиях развития преимплантационного эмбриона мыши все участники канонического WNT/β-catenin сигнального пути экспрессируются, но сам путь остается неактивным (Harwood et al., 2008). Канонический путь *Wnt3a* эскпрессируется со стадии 2-бластомерного эмбриона, *Wnt4* – со стадии 4/8-бластомерного эмбриона мыши (Lloyd et al., 2003), в то время как β-catenin детектируется, начиная со стадии 2 бластомеров на внутренней поверхности клеточной мембраны (Mohamed et al., 2004), и участвует в формировании клеточных контактов (Kemler, 1993). Активный (нефосфорилированный) β-catenin впервые начинает накапливаться в цитоплазме единичных клеток заднего постимплантационного эпибласта на стадии E6.5 развитии мыши (Mohamed et al., 2004). Эмбрион мыши с нокаутом β-catenin развивается до стадии гаструляции, и на стадии E5.5 наблюдается блок образования зародышевых осей и отсутствие мезодермы (Huelsken et al., 2000).

Вероятно, в преимплантационном развитии мыши WNT использует неканонические пути, такие как Wnt/Ca^{+2} (Harwood et al., 2008) и эффекторные молекулы CAMK2A/TAK1/NLK, которые ингибируют связывание β-catenin-TCF/LEF с ДНК путем фосфорилирования TCF/LEF (Ishitani et al., 1999, 2003). Эти данные говорят о том, что *in vivo* канонический WNT/β-catenin сигнальный путь не участвует в поддержании плюрипотентности и самообновлении клеток ВКМ бластоцисты и пере/пост-имплантационного эпибласта мыши. Тогда остается вопрос, почему активация канонического WNT/β-catenin сигнального пути посредством стабилизации β-catenin является важным компонентом при получении наивных ПСК *in vitro*?

Секвенирование единичных клеток преимплантационного эмбриона мыши (Tang et al., 2010) показало, что в них эспрессировались компоненты BMP сигнального пути: лиганды BMP (BMP4, BMP6), рецепторы (ALK2, ALK3 (BMPR1A), ALK6 (BMPR1B)), Smad1/5/8 белки (Reyes de Mochel et al., 2015). Данные результаты говорят об активности и участии BMP сигналинга в преимплантационном развитии эмбриона. Исследование нокаута лигандов и рецепторов BMP показало их важность в гаструляции, потому что при их нокауте не образуется мезодерма (Mishina et al., 1995). Нокаут внутриклеточных трансдукторов (*Smad1/5*) приводил к остановке развития эмбриона (Arnold et al., 2006). Преимплантационные бластоцисты мыши, дефицитные по рецептору BMP 1 (BMPr1a/ALK3) или 2 типа (BMPRII/BMPR2), были нормального размера, но отличались низкой пролиферативной активностью. При этом количество клеток постимплатнационного эпибласта на E7.0 и их пролиферативная активность снижались по сравнению с диким типом, что означает вовлеченность BMP сигналинга в процессы клеточной пролиферации (Mishina et al., 1995). В гомозиготных *Bmpr* мутантных эмбрионах не формировалась первичная полоска. Это приводило к отсутствию мезодермы, однако клетки эпибласта в культуре сохраняли способность дифференцироваться в мезодермальные производные (Mishina et al., 1995). Активность сигнального пути BMP наблюдается во всех клетках, начиная с 4-бластомерного эмбриона мыши, однако она пространственно ограничивается на стадии поздней бластоцисты с накоплением наибольшего количества фосфорилированных белков Smad1/5/8 в клетках ВКМ (Reyes de Mochel et al., 2015). При этом мРНК *Bmp4* обнаруживалась исключительно в клетках ВКМ бластоцисты (Coucouvanis, Martin, 1999). В результате ассиметричного деления 8 бластомеров на 16 наружные и

внутренние бластомеры экспрессировали *Bmpr1a*, в то время как только внутренние бластомеры экспрессировали *Bmp4* и *Bmp7*, продукты которых являются мишенью для данного рецептора (Graham et al., 2014). Дифференциальная экспрессия *Bmpr2* на стадии 16 бластомеров наблюдалась в наружных клетках (Graham et al., 2014). Дозозависимая реакция на Noggin в 16-бластомерном эмбрионе мыши показала, что при продолжительном культивировании *in vitro* снижается количество клеток первичной энтодермы (гипобласта) (Graham et al., 2014). С другой стороны, нокдаун *Bmp4* и *Bmp7* в 2-бластомерном эмбрионе мыши приводил к значительному снижению количества клеток трофэктодермы и первичной энтодермы бластоцисты на E3,5 (Graham et al., 2014). Оказалось, что снижение количества внезародышевых клеток было связано с удлинением клеточного цикла при ингибировании антагонистами BMP, такими как Noggin (Reyes de Mochel et al., 2015) и Dorsomorphin (Graham et al., 2014). Работы по ингибированию BMP сигналинга показали, что малая молекула антагонист BMP LND193189 замедляет дробление бластомеров. При экспозиции целого эмбриона с антагонистом BMP Noggin или при экспрессии доминантного негативного рецептора BMPR1a/ALK3 снижается скорость клеточной пролиферации, но гибель клеток не наблюдается (Reyes de Mochel et al., 2015). Тотипотентный статус ЭСК мыши в культуре был получен путем активации сигнального пути BMP4 через Smad1/5 и ингибирования FGF, WNT, TGF-b (Meharwade et al., 2022). Известно, что культура ЭСК гетерогенна (Hayashi et al., 2008; Toyooka et al., 2008), соответственно, было показано, что маркер тотипотентности MERVL экспрессировался в единичных клетках (Meharwade et al., 2022). Индукция ЭСК мыши ростовым фактором BMP4 не только увеличивала процент тотипотентных клеток, но и усиливала активность сигнальных путей FGF, WNT, TGF-b (Meharwade et al., 2022), которые вовлечены в направлении различных состояний плюрипотентности и детерминацию процесса развития (клеточной дифференцировки).

Созревание эпибласта мыши. Различные состояния плюрипотентности клеток эпибласта

В преимплантационной бластоцисте у млекопитающих клетки ВКМ определяют как наивные ПСК. Еще до имплантации из них образуется эпибласт, который с развитием приобретает различные состояния плюрипотентности и сохраняет статус плюрипотентности до формирования первичной полоски. Выделяют три типа плюрипотентного эпибласта: розеткоподобный, формативный и праймированный (Гордеев и др., 2021) (рис. 2). Аналогичные состояния плюрипотентности ПСК были получены в культуре (Kinoshita et al., 2021; Neagu et al., 2020). Розеткоподобный эпибласт появляется в момент имплантации. При этом эпигенетический паттерн клеток эпибласта перестраивается в сторону большей восприимчивости к сигналам дифференцировки через формативное состояние. В итоге образуются праймированные клетки. При имплантации (на стадии E4.9) эпибласт мыши приобретает розеткоподобную форму, и на стадии E5.1 инициируется люминогенез, в результате которого формируется проамниотическая полость (Christodoulou et al., 2018; Neagu et al., 2020).

Иными словами, морфогенетическая трансформация постимплантационного эмбриона мыши (E5.5) (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014), которая связана с утратой наивности клетками ВКМ в период периимплантации (E4.5–E4.75) (Shahbazi et al., 2017), осуществляется за счет поляризации клеток эпибласта (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Molè et al., 2021) и люминогенеза (Christodoulou et al., 2018).

Розеткоподобная форма эпибласта мыши на стадии E4.5 связана с экспрессией основного ламинина базальной мембраны, который синтезируется клетками трофэктодермы и первичной энтодермы (гипобласта) вокруг зародышевой ткани (Wallingford et al., 2013; Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Murray, Edgar, 2000). Культивирование ВКМ мыши, микрохирургически выделенной на стадии E3.5, в нише матригеля в качестве внеклеточного матрикса показало, что наличие базальной мембраны достаточно для поляризации и созревания клеток эпибласта и формирования проамниотической полости (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Molè et al., 2021). Важным участником реорганизации эпибласта в розеткоподобную структуру является экспрессируемый клетками эпибласта в области базальной мембраны рецептор B1-интегрин, который активирует поляризацию клеток и люминогенез на стадии E4.75 (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014). В его отсутствие поляризация клеток эпибласта не происходит (Molè et al., 2021). Рецептор B1-интегрин, кроме того, способствует повышению жизнеспособности клеток эпибласта мыши (Molè et al., 2021). Для поляризации клеток эпибласта также необходимо взаимодействие E-кадгерина и F-актина и сокращение актомиозина, подстилающего апексы клеток. Процесс поляризации инициируется в 12–13 клетках периимплантационного эпибласта, экспрессирующих aPKC (атипичная протеин киназа C), и структура розетки формируется за счет деления этих клеток (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014).

При культивировании бластоцисты мыши на стадии E4.5 в условиях поддержания наивности ЭСК (2iLIF), в клетках эпибласта сохранялась активность белка Nanog (Shahbazi et al., 2017). Его

активность подавляется при морфогенетической трансформации (поляризации клеток эпибласта и люминогенезе) *in vivo*. При этом в данных условияхингибировалась экспрессия белка Podx1 (Shahbazi et al., 2017), который в естественных условиях локализуется в клетках эпибласта апикально и секретируется при образовании люмена – будущей проамниотической полости (Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014). В экспериментах по культивированию ЭСК мыши в условиях 2iLIF и 3D с матригелем, клетки экспрессировали Nanog и Rex1, розеткоподобная структура эпибласта сохранялась, ноне формировался люмен, в то время как в отсутствие ингибиторов он образовывался (Shahbazi et al., 2017). Таким образом, для формирования розеткоподобного эпибласта и морфогенетической перестройки в клетках ВКМ должна подавляться экспрессия *Nanog*, и они должны утрачивать наивное состояние плюрипотентости.

Хотя ЭСК мыши, культивируемые в условиях 3D с матригелем, экспрессируют *Otx2* и формируют розетку и люмен, они всегда образуют сфероид, тогда как в интактных эмбрионах мыши зародышевая ткань принимает куполообразную форму (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). Дело в том, что на стадии E5.5 полярные клетки трофэктодермы "заставляют" розеткоподобный эпибласт принять куполообразную форму посредством механического воздействия (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). В этот момент клетки эпибласта приобретают формативное состояние плюрипотентности (Smith, 2017).

На стадии E5.5 у эмбриона мыши наиболее интересные события происходят на границе зародышевого эпибласта и внезародышевой эктодермы. В этом регионе апикобазальная ось полярности эпибласта меняет ориентацию с параллельной на перпендикулярную относительно проксимодистальной оси эмбриона. Это приводит к удлинению полости эпибласта в сторону внезародышевой эктодермы на стадиях E5.5–E5.75. Наконец, на стадии E5.75 происходит объединение двух полостей – полости эпибласта и полости внезародышевой эктодермы – и образование проамниотической полости (Christodoulou et al., 2018). На клеточном уровне основным механизмом этого морфогенеза является интеркаляция клеток (Christodoulou et al., 2018).

Эпибласт мыши, микрохирургически выделенный на стадии E5.5, культивировали на фибронектине в условиях стимуляции FGF2 и Nodal (Activin A) и ингибирования WNT сигнальных путей (Kinoshita et al., 2021; Wang et al., 2021). В данных условиях его клетки экспрессировали *Otx2*, *Oct4*, *Sox2*, а также на низком уровне *Nanog* (Kinoshita et al., 2021; Wang et al., 2021). Было отмечено, что энхансерная активность менялась – она переходила с дистального энхансера *Oct4*, который работал у наивных клеток эпибласта, на проксимальный (Wang et al., 2021). Явными характеристиками этих клеток были инактивация одной X хромосомы, схожесть транскриптомного профиля с таковым клеток эпибласта на E5.5–6.5, активация *de novo* метилирования, экспрессия *Fgf5* (Wang et al., 2021) и способность формировать химеры (Kinoshita et al., 2021). Полученная таким образом устойчивая линия *in vitro* была определена как формативные ПСК и, соответственно, ее аналогом *in vivo* являются клетки формативного эпибласта на стадии E5.5. Данные клетки на стадии E5.75 обладают свойством дифференцироваться в ППК (Hoogland, Marks, 2021; Kinoshita et al., 2021; Kinoshita, Smith, 2018; Yeh et al., 2021), которые *in vivo* на стадии E6.25 закладываются на дорсальной стороне эмбриона мыши над прилегающей внезародышевой эктодермой (Tanaka et al., 2005; Kurimoto et al., 2008; Saitou, Yamaji, 2012; Абдыев и др., 2019). Было показано, что направленная дифференцировка ИПСК человека со свойствами формативных ПСК, экспрессирующих маркеры постимплантационного эпибласта *OTX2* и *SOX11*, в ППК-подобные клетки привела к появлению среди них высокого процента $SSEA1^+$ клеток (Abdyyev et al., 2020). Высокий выход ППК-подобных клеток в этой работе согласуется с результатами исследования Киношита и соавторов, в котором они дифференцировали формативные ПСК в ППК-подобные клетки и использовали SSEA1 и CD61 как поверхностные маркеры ППК (Kinoshita et al., 2021).

Эпибласт прегаструлы мыши на стадии E5.25–E6.5 претерпевает постепенную трансформацию состояний плюрипотентности (Cheng et al., 2019) с образованием висцеральной энтодермы и последующей закладкой передне-задней оси эмбриона (Tam et al., 2006). Висцеральная энтодерма заднего конца тела экспрессиует *Wnt3* на стадии E5.5 и индуцирует разделение клеток задней части эпибласта (Rivera-Pérez, Magnuson, 2005) на субпопуляции, одна из которых экпсперссирует только *Wnt3* (начиная со стадии E5.25), а другая – *Wnt3* в совокупности с *Brachyury T* (Cheng et al., 2019). Передняя висцеральная энтодерма экспрессирует антогонисты Nodal (*Cerl* и *Lefty*) (Yamamoto et al., 2004), WNT (*Dkk1*) и TGFβ (*Shisa2*) (Cheng et al., 2019), ингибируя сигнальные пути заднего конца тела (Nodal, WNT и BMP) в переднем эпибласте, в котором экспрессируется "ген плюрипотентности" *Dppa4*. Изучение паттернов экспрессии лигандов и рецепторов эмбриона мыши показало, что экпрессирующиеся уникальные лиганды областей висцеральной энтодермы соответствуют рецепторам прилегающих к ним кластеров эпибласта (передней, транзиторной, задней частей эпибласта). Анализ их взаимодействий выявил 19 пар лиганд-рецептор передней висцеральной энтодермы и переднего эпибласта и 24 – задней висцеральной энтодермы и эпибласта – с различ-

ными комбинациями пар лигандов и рецепторов между соответствующими клеточными кластерами (Cheng et al., 2019). Таким образом, эпибласт разделяется на клеточные кластеры, при этом формативное состояние плюрипотентности "смещается" в передние клетки эпибласта, а клетки заднего эпибласта приобретают праймированное состояние, определяющееся экспрессией *Dnmt3a*, *Utf1* и *Oct4* (Cheng et al., 2019).

Созревание эпибласта человека. Розеткоподный эпибласт

Оказалось, что у человека фенотипическое разделение клеток эпибласта и гипобласта эмбриона происходит позже, чем у мыши (Deglincerti et al., 2016). Тем не менее уже на 6 сутки развития транскриптомный профиль этих клеток отчетливо сегрегируется (Blakeley et al., 2015). На данной стадии в условиях искусственной имплантации были выявлены клетки ВКМ (презумптивные клетки эпибласта), экспрессирующие OCT4+/NANOG+/GATA6–, гипобласта, экспрессирующие OCT4+/GATA6+/NANOG–, и трофэктодермы, экспрессирующие CDX2+/GATA3+. При этом ВКМ бластоцисты человека состоит из двух типов клеток, расположенных неупорядоченным образом (Deglincerti et al., 2016). На 7 сутки развития полярные клетки трофэктодермы приобретают способность связываться с субстратом, и форма эмбриона становится вытянутой. На 8 сутки происходит выделение четких клеточных типов, таких как OCT4+/GATA6– клетки эпибласта и OCT4-/GATA6+ клетки гипобласта (Deglincerti et al., 2016).

На 7.5 сутки развивается зародышевый диск, состоящий из колбовидных эпителиальных клеток эпибласта и клеток амниона, между которыми формируется щель (Hertig et al., 1956); также происходит дальнейшее формирование проамниотической полости. Имеются данные о том, что на 6–7 сутки развития GATA6– клетки эпибласта экспрессировали KLF17, а маркер люминогенеза PODXL, характерный для 9–10 суток, отсутствовал (Shahbazi et al., 2017). При культивировании в условиях поддержания наивных ЭСК 5iLAF (Theunissen et al., 2014) эмбрионы человека не образовывали полость и продолжали экспрессировать KLF17, NANOG и маркер наивности CD130 (Shahbazi et al., 2017). Имитация люминогенеза *in vitro* показала, что условия наивности для ЭСК человека препятствуют образованию люмена, тогда как развитие плюрипотентности в сторону праймированности способствует образованию розетки (Shahbazi et al., 2017) и люминогенезу (Shahbazi et al., 2016; Taniguchi et al., 2015). Исследование Уэберлинг и Зерника-Гётз продемонстрировало, что полярные клетки трофэктодермы генерируют механическую силу, которая растягивает клетки эпибласта и способствует образованию дискоидальной формы эмбриона человека (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). Сила растяжения является основной движущей силой данного морфогенеза, что доказано экспериментально: приложение аналогичной силы к эмбриону мыши *in vitro* приводит к формированию дискоидального зародыша, а не куполообразного (Weberling, Zernicka-Goetz, 2021). На основе результатов данной работы было выполнено математическое моделирование, которое показало возможность формирования розеткоподобного эпибласта у человека (Dokmegang, 2022). Таким образом, можно сделать вывод, что в периимплантационном периоде (6–7 сутки) морфогенетические процессы организуют клетки ВКМ человека в дискоидальную структуру эпибласта. В результате этого клетки эпибласта поляризуются и, вероятно, на короткое время образуют розеткоподобную структуру.

Процесс люминогенеза в ходе образования проамниотической полости сопровождается переходом наивных ПСК человека в праймированное состояние (Schindler et al., 2021) и морфологической поляризацией клеток эпибласта и ПСК (Shahbazi et al., 2016). На 7.5 сутки развития эмбриона человека наблюдается образование люмена, а на 8 – дифференцировка плоских эпителиальных клеток амниона (Shao et al., 2017). На 10 сутки развития эмбриона человека в условиях искусственной имплантации образуется проамниотическая полость, а OCT4-положительные клетки эпибласта начинают экспрессировать CD24 (Deglincerti et al., 2016), который демаркирует праймированные клетки эпибласта и ЭСК человека и мыши (Shakiba et al., 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что изучение плюрипотентности началось еще в середине XX века, ученые смогли вплотную подойти к получению и характеристике ПСК мыши и человека только в конце прошлого столетия. Совсем недавно были открыты и описаны основные факторы, которые влияют на поддержание и трансформацию плюрипотентности у млекопитающих. За счет этого удалось начать работы по репрограммированию соматических дифференцированных клеток, а также выявить основные черты и свойства ПСК, полученных на разных стадиях эмбриогенеза. Данный прорыв в изучении связи между морфогенетическими процессами и дифференцировкой клеток в раннем эмбриогенезе мыши и человека стал возможен благодаря появлению методов выделения и культивирования ПСК.

Одним из важных открытий стало участие BMP4 как ключевого морфогена в трансформации тотипотентного бластомера и смене состояний плюрипотентности в развитии. Его воздействие на ЭСК мыши в культуре увеличивает процент тоти-

потентных клеток и стабилизирует тотипотентный статус при условии ингибирования активности сигнальных путей FGF, WNT, TGFβ. Активация перечисленных сигнальных путей приводит к обратному результату – развитию состояний плюрипотентности и созреванию эпибласта. Соответственно, можно сделать вывод, что активность BMP сигналинга приводит к утрате тотипотентности и приобретению бластомерами плюрипотентного клеточного статуса с последующим усилением активности сигнальных путей FGF, WNT, TGFβ. Несмотря на то, что *in vivo Wnt3a* экспрессируется у эмбриона мыши на стадии 2 бластомеров, канонический WNT сигнальный путь остается неактивным до формирования основных осей эмбриона. Однако в культуре, без активации канонического WNT/β-catenin сигнального пути, удержать наивное плюрипотентное состояние и самообновление ЭСК мыши и человека невозможно. FGF2 выступает положительным регулятором наивности в клетках ВКМ, не давая ПСК дифференцироваться. В то же время FGF2 известен как индуктор дифференцировки в зародышевые листки.

Различие между ранним эмбриогенезом мыши и человека заключается в том, что у мыши границы плюрипотентных состояний лучше выражены и привязаны к стадиям эмбриогенеза (пре/постимплантационный эпибласт), которые имеют точные временные рамки. Также у мыши внезародышевые типы клеток (трофэктодерма и гипобласт) образуются до имплантации и четко разграничиваются на кластеры. В то же время у человека клетки гипобласта и плюрипотентные клетки ВКМ смешаны друг с другом. Кластеризация этих клеток у человека происходит только после имплантации. Клетки трофэктодермы участвуют в генерации силы натяжения, которая приводит к образованию дискоидальной формы зародыша человека, тогда как цилиндрическая форма зародыша мыши образуется под действием силы давления.

Интересным, но еще не полностью доказанным фактом является формирование у эмбриона человека розеткоподобной структуры эпибласта. Ее наличие было смоделировано, однако короткий период ее существования, вероятно, сложно зафиксировать. Кроме того, работа с эмбрионами человека ограничена по этическим соображениям. Это не позволяет провести достаточное количество исследований на ранних сроках развития. Поэтому, на наш взгляд, эта стадия развития эпибласта человека на сегодняшний день практически не описана.

Поскольку эмбрион человека на догаструляционных стадиях развития практически недоступен, единственная модель, позволяющая исследовать дифференцировку его клеток, это культура ПСК. Возможность исследования ПСК в культуре позволила смоделировать механизмы образования и созревания плюрипотентных клеток ВКМ и эпибласта, а также развитие бластоцистоподобных структур (Yanagida et al., 2021; Yu et al., 2021 Heidari Khoei et al., 2023). Эти модели стали основой для изучения раннего эмбриогенеза как мыши, так и человека. Данные исследования показали наличие различных состояний плюрипотентности ПСК, что говорит о плавной трансформации плюрипотентности клеток эпибласта в процессе его морфогенетических изменений *in vivo*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021 и в рамках Государственного задания ИБР РАН № 088-2021-0016.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.К. Абдыев написал текст, подбирал литературу, интерпретировал, делал заключение и подготовил иллюстрации. Е.В. Алпеева подбирала литературу, написала введение, редактировала текст. Е.А. Воротеляк редактировала текст. А.В. Васильев редактировал текст, направлял критические вопросы, и вносил заключительные правки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абдыев В.К. и др. Современные технологии получения первичных половых клеток человека *in vitro* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 3. С. 330–342.

Гордеев М.Н., Бахмет Е.И., Томилин А.Н. Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре // Онтогенез. 2021. Т. 52. № 6. С. 429–440.

Мучкаева И.А. и др. Молекулярные механизмы индуцированной плюрипотентности // 2012. Т. 1. № 12. С. 32–43.

Честков И.В. и др. Молекулярные барьеры в процессах генетического репрограммирования и трансформации клеток // 2014. С. 1592–1604.

Abdyyev V.K. et al. In vitro derived female hPGCLCs are unable to complete meiosis in embryoid bodies // Exp. Cell Res. 2020. V. 397. № 2. P. 112358.

Andrews P.W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells // Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci. 2002. V. 357. № 1420. P. 405–417.

Arnold S.J. et al. Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo // Dev. Biol. 2006. V. 296. № 1. P. 104–118.

Banito A., Gil J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology // EMBO Rep. 2010. V. 11. № 5. P. 353–9.

Bartoccetti M. и др. Regulatory Dynamics of Tet1 and Oct4 Resolve Stages of Global DNA Demethylation and Transcriptomic Changes in Reprogramming // Cell Rep. 2020. V. 30. № 7.

Bayerl J. et al. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 9. P. 1549-1565.e12.

Bedzhov I., Zernicka-Goetz M. Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation // Cell. 2014. V. 156. P. 1032–1044.

Blakeley P. et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq // Dev. 2015. V. 142. № 18. P. 3151–3165.

Blasco M.A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 84. 2007. V. 8. № 4. P. 299–309.

Bourillot P.Y. et al. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog // Stem Cells. 2009. V. 27. № 8. P. 1760–1771.

Bradley A. et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines // Nat. 1984 3095965. 1984. V. 309. № 5965. P. 255–256.

Brons I.G.M. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nat. 2007 4487150. 2007a. V. 448. № 7150. P. 191–195.

Brons I.G.M. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007b. V. 448. № 7150. P. 191–195.

Burdon T. et al. Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells // Dev. Biol. 1999. V. 210. № 1. P. 30–43.

Carey B.W. et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 1. P. 157–162.

Chambers I., Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells // Oncogene. 2004. V. 23. № 43 REV. ISS. 6. P. 7150–7160.

Cheng S. et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Cellular Heterogeneity of Pluripotency Transition and X Chromosome Dynamics during Early Mouse Development // Cell Rep. 2019. V. 26. № 10. P. 2593–2607.e3.

Christodoulou N. et al. Sequential formation and resolution of multiple rosettes drive embryo remodelling after implantation // Nat. Cell Biol. 2018. 2011. 2018. V. 20. № 11. P. 1278–1289.

Coucouvanis E., Martin G.R. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo // Development. 1999. V. 126. № 3. P. 535–546.

Damjanov I. Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis // Int. J. Dev. Biol. 1993. V. 37. № 1. P. 39–46.

Damjanov I., Andrews P.W. Pluripotent human stem cells: Standing on the shoulders of giants // Int. J. Dev. Biol. 2016. V. 60. № 10-11–12. P. 321–325.

Dan J. et al. Zscan4 Inhibits Maintenance DNA Methylation to Facilitate Telomere Elongation in Mouse Embryonic Stem Cells // Cell Rep. 2017. V. 20. № 8. P. 1936–1949.

Deglincerti A. et al. Self-organization of the in vitro attached human embryo // Nat. 2016 5337602. 2016. V. 533. № 7602. P. 251–254.

Dokmegang J. Modeling Epiblast Shape in Implanting Mammalian Embryos // Methods Mol. Biol. 2022. V. 2490. P. 281–296.

Ducibella T., Anderson E. Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst // Dev. Biol. 1975. V. 47. № 1. P. 45–58.

Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nat. 1981 2925819. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.

Falco G. et al. Zscan4: A novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells // Dev. Biol. 2007. V. 307. № 2. P. 539–550.

Finch B.W., Ephrussi B. Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines // Proc. Natl. Acad. Sci. 1967. V. 57. № 3. P. 615–621.

Gao R. et al. Inhibition of Aberrant DNA Re-methylation Improves Post-implantation Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos // Cell Stem Cell. 2018. V. 23. № 3. P. 426–435.e5.

Gardner R.L., Rossant J. Investigation of the fate of 4–5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection // Development. 1979. V. 52. № 1. P. 141–152.

Gharibi B. et al. A FGF2-mediated incoherent feedforward loop induces Erk inhibition and promotes naïve pluripotency // bioRxiv. 2020. P. 2020.11.11.378869.

Gough N.M. et al. LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells // Reprod. Fertil. Dev. 1989. V. 1. № 4. P. 281–288.

Graham S.J.L. et al. BMP signalling regulates the pre-implantation development of extra-embryonic cell lineages in the mouse embryo // Nat. Commun. 2014 51. 2014. V. 5. № 1. P. 1–11.

Gurdon J.B. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells // Dev. Biol. 1962a. V. 4. № 2. P. 256–273.

Gurdon J.B. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles // Development. 1962b. V. 10. № 4. P. 622–640.

Gurdon J.B. From Nuclear Transfer to Nuclear Reprogramming: The Reversal of Cell Differentiation // 2006. V. 22. P. 1–22. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.090805.140144

Haegel H. et al. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation // Development. 1995. V. 121. № 11. P. 3529–3537.

Hanna J. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // Proc. Natl. Acad. Sci. 2010. V. 107. № 20. P. 9222–9227.

Harwood B.N. et al. Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos // Dev. Dyn. 2008. V. 237. № 4. P. 1099–1111.

Hayashi K. et al. Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States // Cell Stem Cell. 2008. V. 3. № 4. P. 391–401.

Heidari Khoei H. et al. Generating human blastoids modeling blastocyst-stage embryos and implantation // Nat. Protoc. 2023.

Hertig A.T., Rock J., Adams E.C. A description of 34 human ova within the first 17 days of development // Am. J. Anat. 1956. V. 98. № 3. P. 435–493.

Hirschi K.K., Li S., Roy K. Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2014. V. 16. № 1. P. 277–294.

Ho L. et al. An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is an essential component of the core pluripotency transcriptional network // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 13. P. 5187–5191.

Hoogland S.H.A., Marks H. Developments in pluripotency: a new formative state // Cell Res. 2021. V. 31. № 5. P. 493–494.

Huang Y. et al. In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation // Cell Rep. 2012. V. 2. № 6. P. 1571–1578.

Huelsken J. et al. Requirement for β-Catenin in Anterior-Posterior Axis Formation in Mice // J. Cell Biol. 2000. V. 148. № 3. P. 567–578.

Ishitani T. et al. The TAK1–NLK–MAPK-related pathway antagonizes signalling between β-catenin and transcription factor TCF // Nat. 1999 3996738. 1999. V. 399. № 6738. P. 798–802.

Ishitani T., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K. Regulation of Lymphoid Enhancer Factor 1/T-Cell Factor by Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Nemo-Like Kinase-Dependent Phosphorylation in Wnt/β-Catenin Signaling // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23. № 4. P. 1379–1389.

Johnson M.H., Ziomek C.A. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula // Cell. 1981. V. 24. № 1. P. 71–80.

Kang M., Garg V., Hadjantonakis A.K. Lineage Establishment and Progression within the Inner Cell Mass of the Mouse Blastocyst Requires FGFR1 and FGFR2 // Dev. Cell. 2017. V. 41. № 5. P. 496–510.e5.

Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion // Trends Genet. 1993. V. 9. № 9. P. 317–321.

Khoo T.S. et al. Retention of Somatic Memory Associated with Cell Identity, Age and Metabolism in Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Reprogramming // Stem Cell Rev. Reports. 2020. V. 16. № 2. P. 251–261.

Kinoshita M. et al. Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 3. P. 453–471.e8.

Kinoshita M., Smith A. Pluripotency Deconstructed // Dev. Growth Differ. 2018. V. 60. № 1. P. 44–52.

Kojima Y. et al. The Transcriptional and Functional Properties of Mouse Epiblast Stem Cells Resemble the Anterior Primitive Streak // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 1. P. 107–120.

Korotkevich E. et al. The Apical Domain Is Required and Sufficient for the First Lineage Segregation in the Mouse Embryo // Dev. Cell. 2017. V. 40. № 3. P. 235–247.e7.

Kuan I. et al. EpEX/EpCAM and Oct4 or Klf4 alone are sufficient to generate induced pluripotent stem cells through STAT3 and HIF2α OPEN // 2017.

Kunath T. et al. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment // Development. 2007. V. 134. № 16. P. 2895–2902.

Kurimoto K. et al. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice // Genes Dev. 2008. V. 22. № 12. P. 1617–1635.

Le R. et al. Dcaf11 activates Zscan4-mediated alternative telomere lengthening in early embryos and embryonic stem cells // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 4. P. 732–747.e9.

Li M. et al. A cut above the rest: Targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 8. P. 4594–4599.

Li M., Belmonte J.C.I. Ground rules of the pluripotency gene regulatory network // Nat. Rev. Genet. 2017 183. 2017. V. 18. № 3. P. 180–191.

Lim H.Y.G. et al. Keratins are asymmetrically inherited fate determinants in the mammalian embryo // Nat. 2020 5857825. 2020. V. 585. № 7825. P. 404–409.

Lim H.Y.G., Plachta N. Cytoskeletal control of early mammalian development // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2021 228. 2021. V. 22. № 8. P. 548–562.

Liu G. et al. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications // Stem Cell Rev. Reports. 2020. V. 16. № 1.

Liu Z. et al. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer // Cell. 2018. V. 172. № 4. P. 881–887.e7.

Lloyd S., Fleming T.P., Collins J.E. Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development // Gene Expr. Patterns. 2003. V. 3. № 3. P. 309–312.

Lyashenko N. et al. Differential requirement for the dual functions of β-catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation // Nat. Cell Biol. 2011 137. 2011. V. 13. № 7. P. 753–761.

Martello G. et al. Esrrb Is a Pivotal Target of the Gsk3/Tcf3 Axis Regulating Embryonic Stem Cell Self-Renewal // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. № 4. P. 491–504.

Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.

Masaki H. et al. Inhibition of Apoptosis Overcomes Stage-Related Compatibility Barriers to Chimera Formation in Mouse Embryos // Cell Stem Cell. 2016. V. 19. № 5. P. 587–592.

Meharwade T. et al. Cross-activation of the FGF, TGF-β and WNT pathways constrains BMP4-mediated induction of the Totipotent state in mouse embryonic stem cells // bioRxiv. 2022. P. 2022.04.15.488509.

Mishina Y. et al. Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. // Genes Dev. 1995. V. 9. № 24. P. 3027–3037.

Mohamed O.A., Clarke H.J., Dufort D. β-catenin signaling marks the prospective site of primitive streak formation in the mouse embryo // Dev. Dyn. 2004. V. 231. № 2. P. 416–424.

Molè M.A. et al. Integrin β1 coordinates survival and morphogenesis of the embryonic lineage upon implantation and pluripotency transition // Cell Rep. 2021. V. 34. № 10. P. 108834.

Molotkov A. et al. Distinct Requirements for FGFR1 and FGFR2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency // Dev. Cell. 2017. V. 41. № 5. P. 511–526.e4.

Morata Tarifa C. et al. Chimeras for the twenty-first century // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. № 3. P. 283–291.

Mossahebi-Mohammadi M. et al. FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency // Front. Cell Dev. Biol. 2020. V. 8. P. 79.

Muhr J., Ackerman K.M. Embryology, Gastrulation. StatPearls Publishing. 2022.

Murray P., Edgar D. Regulation of Programmed Cell Death by Basement Membranes in Embryonic Development // J. Cell Biol. 2000. V. 150. № 5. P. 1215–1221.

Neagu A. et al. In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states // Nat. Cell Biol. 2020 225. 2020. V. 22. № 5. P. 534–545.

Neavin D. et al. Single cell eQTL analysis identifies cell type-specific genetic control of gene expression in fibroblasts and reprogrammed induced pluripotent stem cells // Genome Biol. 2021. V. 22. № 1. P. 1–19.

Nichols J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo dependes on the POU transcription factor Oct4 // Cell. 1998. V. 95. № 3. P. 379–391.

Nichols J., Gardner R.L. Heterogeneous differentiation of external cells in individual isolated early mouse inner cell masses in culture // Development. 1984. V. 80. № 1. P. 225–240.

Niwa H. et al. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells // Nat. 2009 4607251. 2009. V. 460. № 7251. P. 118–122.

Ohtsuka S., Nakai-Futatsugi Y., Niwa H. LIF signal in mouse embryonic stem cells // JAK-STAT. 2015. V. 4. № 2. P. 1–9.

Okae H. et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells // Cell Stem Cell. 2018. V. 22. № 1. P. 50- 63.e6.

Okano M. et al. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development // Cell. 1999. V. 99. № 3. P. 247–257.

Okita K., Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2011. V. 366. № 1575. P. 2198–207.

Oshima R.G. et al. Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos // Dev. Biol. 1983. V. 99. № 2. P. 447–455.

Pachnis V., Mankoo B., Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis // Development. 1993. V. 119. № 4.

Papaioannou V.E., Gardner R.L., McBurney M.W. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis // J. Embryol. Exp. Morphol. 1978. V. 44.

Pauken C.M., Capco D.G. Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: Roles for PKC and ?-catenin // Mol. Reprod. Dev. 1999. V. 54. № 2. P. 135–144.

Pierce G.B. Teratocarcinoma // Cancer Markers. Totowa, NJ: Humana Press, 1980. P. 1–36.

Pierce G.B. The cancer cell and its control by the embryo. Rous-Whipple Award lecture. // Am. J. Pathol. 1983. V. 113. № 1. P. 117.

Qiu D. et al. Klf2 and Tfcp2l1, Two Wnt/β-Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency // Stem Cell Reports. 2015. V. 5. № 3. P. 314–322.

Raz R. et al. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 6. P. 2846–2851.

Reiner J.M. Organisers and Genes. By C.H. Waddington. 1940. Cambridge: at The University Press; N.Y.: The Macmillan Company // Philos. Sci. 1941. V. 8. № 3.

Reyes de Mochel N.S. et al. BMP signaling is required for cell cleavage in preimplantation-mouse embryos // Dev. Biol. 2015. V. 397. № 1. P. 45–55.

Rivera-Pérez J.A., Magnuson T. Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3 // Dev. Biol. 2005. V. 288. № 2. P. 363–371.

Rodda D.J. et al. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2 // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 26.

Saitou M., Yamaji M. Primordial Germ Cells in Mice // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. V. 4. № 11. P. a008375–a008375.

Sato N. et al. 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 101. 2003. V. 10. № 1. P. 55–63.

Schindler M. et al. Agarose microgel culture delineates lumenogenesis in naive and primed human pluripotent stem cells // Stem Cell Reports. 2021. V. 16. № 5. P. 1347–1362.

Schoeftner S., Blasco M.A. A "higher order" of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs // EMBO J. 2009. V. 28. № 16. P. 2323–2336.

Seoane J., Le H. Van, Massagué J. Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage // Nature. 2002. V. 419. № 6908. P. 729–734.

Shahbazi M.N. et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues // Nat. Cell Biol. 2016 186. 2016. V. 18. № 6. P. 700–708.

Shahbazi M.N. et al. Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos // Nat. 2017 5527684. 2017. V. 552. № 7684. P. 239–243.

Shakiba N. et al. CD24 tracks divergent pluripotent states in mouse and human cells // Nat. Commun. 2015 61. 2015. V. 6. № 1. P. 1–11.

Shao Y. et al. A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development // Nat. Commun. 2017 81. 2017. V. 8. № 1. P. 1–15.

Shelby H., Shelby T., Wernig M. Somatic Lineage Reprogramming // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2022. V. 14. № 10. P. a040808.

Smith A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum // Development. 2017. V. 144. № 3. P. 365–373.

Smith A.G. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides // Nature. 1988. V. 336. № 6200. P. 688–690.

Sokol S.Y. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling // Development. 2011. V. 138. № 20. P. 4341–4350.

Stadtfeld M. et al. A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells // Nat. Methods. 2010. V. 7. № 1. P. 53-55.

Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications // Genes Dev. 2010. V. 24. № 20. P. 2239–2263.

Stavridis M.P. et al. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification // Development. 2007. V. 134. № 16. P. 2889–2894.

Stevens L.C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos // Dev. Biol. 1970a. V. 21. № 3. P. 364–382.

Stevens L.C. Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice of Strains 129, A/He, and Their F1 Hybrids // JNCI J. Natl. Cancer Inst. 1970b. V. 44. № 4. P. 923–929.

Stevens L.C. Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice // Proc. Natl. Acad. Sci. United States. 1964. V. 52. P. 654–661.

Stevens L.C., Little C.C. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice // Proc. Natl. Acad. Sci. 1954. V. 40. № 11. P. 1080–1087.

Storm M.P. et al. Regulation of nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 9. P. 6265–6273.

Storm M.P. et al. Characterization of the Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Transcriptome in Murine Embryonic Stem Cells: Identification of Novel Regulators of Pluripotency // Stem Cells. 2009. V. 27. № 4. P. 764–775.

Sugimoto M. et al. A Simple and Robust Method for Establishing Homogeneous Mouse Epiblast Stem Cell Lines by Wnt Inhibition // Stem Cell Reports. 2015. V. 4. № 4. P. 744–757.

Tabar V., Studer L. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. № 2. P. 82–92.

Takahashi K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.

Tam P.P., Loebel D.A., Tanaka S.S. Building the mouse gastrula: signals, asymmetry and lineages // Curr. Opin. Genet. Dev. 2006. V. 16. № 4. P. 419–425.

Tanaka S.S. et al. IFITM/mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion // Dev. Cell. 2005. V. 9. № 6. P. 745–756.

Tang F. et al. Tracing the Derivation of Embryonic Stem Cells from the Inner Cell Mass by Single-Cell RNA-Seq Analysis // Cell Stem Cell. 2010. V. 6. № 5. P. 468–478.

Taniguchi K. et al. Lumen Formation Is an Intrinsic Property of Isolated Human Pluripotent Stem Cells // Stem Cell Reports. 2015. V. 5. № 6. P. 954–962.

Tesar P.J. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // Nat. 2007 4487150. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.

Theunissen T.W. et al. Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency // Cell Stem Cell. 2014. V. 15. № 4. P. 471–487.

Thomson J.A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts // Science (80-.) . 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.

Toyooka Y. et al. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture // Development. 2008. V. 135. № 5. P. 909–918.

Toyooka Y. Trophoblast lineage specification in the mammalian preimplantation embryo // Reprod. Med. Biol. 2020. V. 19. № 3. P. 209–221.

Vallier L., Alexander M., Pedersen R.A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells // J. Cell Sci. 2005. V. 118. № 19. P. 4495–4509.

Veillard A.-C. et al. Stable Methylation at Promoters Distinguishes Epiblast Stem Cells from Embryonic Stem Cells and the In Vivo Epiblasts // Stem Cells Dev. 2014. V. 23. № 17. P. 2014–2029.

Waddington C.H. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. // Strateg. genes A Discuss. some some Asp. Theor. Biol. With an Append. by H. Kacser. 1957. V. 8. № 3.

Wallingford M.C., Angelo J.R., Mager J. Morphogenetic analysis of peri-implantation development // Dev. Dyn. 2013. V. 242. № 9. P. 1110–1120.

Wang X. et al. Epigenetic Reprogramming During Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Future Directions // Front. Genet. 2020. V. 11. № March. P. 1–13.

Wang X. et al. Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation // Cell Res. 2021. V. 31. № 5. P. 526–541.

Weberling A., Zernicka-Goetz M. Trophectoderm mechanics direct epiblast shape upon embryo implantation // Cell Rep. 2021. V. 34. № 3. P. 108655.

Wernig M. et al. c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts // Cell Stem Cell. 2008. V. 2. № 1. P. 10–12.

Wilmut I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nat. 1997 3856619. 1997. V. 385. № 6619. P. 810–813.

Wobus A.M. et al. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo // Exp. Cell Res. 1984. V. 152. № 1. P. 212–219.

Yamamoto M. et al. Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo // Nat. 2004 4286981. 2004. V. 428. № 6981. P. 387–392.

Yamanaka Y., Lanner F., Rossant J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst // Development. 2010. V. 137. № 5. P. 715–724.

Yanagida A. et al. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation // Cell Stem Cell. 2021. V. 28. № 6. P. 1016–1022.e4.

Ye S. et al. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1 // EMBO J. 2013. V. 32. № 19. P. 2548–2560.

Yeh C.Y. et al. Capturing Pluripotency and Beyond // Cells. 2021. V. 10. P. 3558. 2021. V. 10. № 12. P. 3558.

Yu L. et al. Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells // Nat. 2021 5917851. 2021. V. 591. № 7851. P. 620–626.

Zalzman M. et al. Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells // Nat. 2010 4647290. 2010. V. 464. № 7290. P. 858–863.

Zhou H. et al. Cell Stem Cell Brief Report Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins // Stem Cell. V. 4. P. 381–384.

Transformation of Pluripotency States during Morphogenesis of Mouse and Human Epiblast

V. K. Abdyev[1, *], E. V. Alpeeva[1], E. N. Kalistratova[2], E. A. Vorotelyak[1], and A. V. Vasiliev[1, 2]

[1]Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[2]Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

**e-mail: mailtovepa@gmail.com*

The pluripotent status of a cell *in vivo* is spatio-temporally regulated within embryogenesis and is determined by the processes of self-renewal, endless proliferation and differentiation into all cell types of the body. Previously, the pluripotency was characterized using teratocarcinoma cells. Then this term was applied to the embryonic cells of the preimplantation mouse embryo. Preimplantationally formed mouse and human pluripotent stem cells (PSCs) appear to exist until gastrulation. One of the main events in the early mammalian development is the differentiation of the inner cell mass of the blastocyst (ICM) into a hypoblast and an epiblast, which develops into the embryo itself. Continuous and dynamic transformation of pluripotency states in development coincides with the morphogenetic processes, which are involved in the formation and maturation of the epiblast. Thus, blastocyst ICM cells differ in epigenetic and transcription patterns from their daughter cells forming the peri/post-implantation epiblast. With the onset of gastrulation movements, the maturation of epiblast cells ends with their differentiation into cells of three germ layers. This review considers the historical aspects of the study of cell pluripotency, various sources of PSCs, mechanisms and signaling pathways that support self-renewal and pluripotency in PSC cultures. In addition, we summarize and conceptualize data on morphogenetic processes that are involved in the formation of naive ICM cells *in vivo* and the subsequent maturation of mouse and human epiblast cells associated with the transformation of their pluripotency states.

Keywords: mammalian embryogenesis, morphogenesis, blastocyst ICM, epiblast, BMP, FGF, WNT signaling pathways, pluripotent stem cells, iPSCs, ESCs, naive PSCs, primed PSCs, reprogramming