

STRESZCZENIE:

Uzyskanie stabilnych linii komórek macierzystych z zarodków (ESC) zwierząt i człowieka otwiera szereg możliwości dla nauki i medycyny regeneracyjnej. Podstawowe założenia niezbędne do ich uzyskania są uniwersalne dla wszystkich gatunków ssaków. Warunkiem niezbędnym jest utrzymanie stopnia pluripotencji właściwego dla przedimplantacyjnych zarodków. Do chwili obecnej, prawdziwe linie ESC (spełniające warunki pluripotencji, różnicowania i stabilności w hodowli) uzyskano dla niewielkiej grupy zwierząt w tym dla myszy, człowieka i szczura. Główny problem wynika z różnic międzygatunkowych, i co za tym idzie odmiennych wymagań środowiskowych. Jednak we wszystkich przypadkach wymagana jest regulacja aktywności ścieżek sygnalizacyjnych warunkujących pluripotencję i naturalne procesy różnicowania komórek, jak WNT, MAPK/ERK i JAK/STAT3. Klasyczny system uzyskiwania ESC oparty na aktywacji ścieżek sygnalizacyjnych przez LIF (dla myszy) lub FGF (dla człowieka) nie jest optymalny. Obecnie systemy opierają się na chemicznych inhibitorach, które posiadają zdolność interakcji z wyżej wymienionymi ścieżkami. Niniejsze opracowanie przybliży zagadnienia istotne dla zrozumienia natury różnych typów komórek macierzystych (nie tylko tych pochodzenia zarodkowego) oraz wyjaśnia dlaczego nie ma jednej drogi do pluripotencji, ani uniwersalnej definicji komórek macierzystych.

HISTORIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH - DEFINICJE I PIERWSZE ODKRYCIA

Rozpoczynając rozważania nad komórkami macierzystymi musimy wyjść od podstawowych definicji, zrozumienia ich różnorodności wynikającej m.in. z odmiennego pochodzenia i potencjału do różnicowania, a także z kontekstu aplikacyjnego. Ważne jest aby pamiętać, że opisano więcej niż jeden typ komórek, który można określić mianem komórek macierzystych (ang. *stem cells*, SC). Pod względem potencjału do różnicowania SC mogą występować w różnych stanach które określane mianem toti-, pluri- i multi-potencji. Totipotencja oznacza zdolność pojedynczej komórki do rozwoju w dorosły organizm, czyli różnicowania we wszystkie typy komórek, zarówno te zarodkowe, jak i poza-zarodkowe (łożysko). W miarę rozwoju zarodka, rosnącej liczby blastomerów i uruchomienia procesów związanych z tworzeniem pierwszych linii komórkowych - węzła zarodkowego (ang. *Inner Cell Mass*, ICM) i trofektoderm (ang. *Trophectoderm*, TE), utracony zostaje pierwotny nieograniczony potencjał rozwojowy. Komórki budujące ICM opisywane są jako pluripotentne – ponieważ zachowują zdolność do różnicowania wyłącznie w linie dające początek komórkom rozrodczym i somatycznym. Potencjał rozwojowy TE ograniczony zostaje do różnicowania w obrębie tej samej tkanki/linii komórkowej – są to zatem komórki multipotentne. Obecny stan wiedzy i zaawansowania badań z zakresu biologii rozwoju, embriologii, genetyki, epigenetyki i medycyny regeneracyjnej jednoznacznie wskazuje, że pod pojęciem „komórki macierzystej” ukrywa się szereg typów komórek o różnym potencjale do różnicowania. Tylko pełne poznanie natury komórek SC pozwoli na zrozumienie tego, czego obecnie (i w przyszłości) możemy oczekiwać po ich zastosowaniu w nauce i medycynie.

Pojęcie komórka macierzysta, po raz pierwszy pojawia się w literaturze naukowej pod koniec XIX wieku, kiedy to w 1868 roku niemiecki biolog Ernst Haeckel opublikował pracę pt. „*Natürliche Schöpfungsgeschichte*” (ang. *Natural History of Creation*) [1]. Haeckel wspierał teorię ewolucji Darwina i na poparcie tych tez stworzył szereg drzew filogenetycznych ukazujących ewolucję organizmów od wspólnego przodka. Drzewa te określił mianem „*stammbäume*” co w dosłownym tłumaczeniu z j. niemieckiego oznacza drzewo rodowe – macierzyste (ang. *stem*). Haeckel używał tego pojęcia do opisanego jednokomórkowego organizmu, który wyewoluował w organizmy wielokomórkowe. W książce pt. „*Anthropogenie*” z 1877 roku [2] zaproponował skok ewolucyjny od filogenetyki do embriologii (ontogenezy) i zasugerował, że zapłodniona komórka jajowa może również być nazwana komórką macierzystą, ponieważ podobnie jak w podstawowym założeniu teorii ewolucji, organizmy wielokomórkowe rozwijają się z pojedyn-

dr hab. inż. Zofia E. Madeja✉

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_415

✉ autor korespondujący: zofia.madeja@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, pluripotencja, ścieżki sygnalizacyjne,

Wykaz stosowanych skrótów: ASC – komórki macierzyste uzyskiwane z dorosłych organizmów (ang. *adult stem cells*); EGA – aktywacja genomu zarodkowego (ang. *embryonic genome activation*); EPI – epiblast; ESC – zarodkowe komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*); ICM – węzeł zarodkowy (ang. *inner cell mass*); iPS – indukowane komórki pluripotentne (ang. *induced pluripotent stem cells*); MEF – zarodkowe fibroblasty mysie (ang. *mouse embryonic fibroblasts*); PrE – endoderma pierwotna (ang. *primitive endoderm*); SCNT – transfer jądra komórki somatycznej (ang. *somatic cell nuclear transfer*); TE – trofektoderma/trofoblast (ang. *trophectoderm*)

czej komórki. Idee te zbiegły się z teorią Augusta Weismanna dotyczącą *plazmy zarodkowej* (ang. *germplasm*), kiedy to w 1885 roku zaproponował, że ta hipotetyczna substancja, zawarta w komórkach linii płciowej, odpowiada za dziedziczenie cech i przekazywana jest z pokolenia na pokolenie [3]. Weismann sugerował również, że *plazma zarodkowa* jest wcześniej w rozwoju przekazywana do wyspecjalizowanych komórek (germinalnych), które odróżniają się swoimi właściwościami od komórek somatycznych budujących organizm. Zainspirowani tymi teoriami Theodor Boveri i Valentin Häcker rozpoczęli poszukiwania zawiązków komórek germinalnych w zarodkach zwierząt. Badając zarodki nicienia *Ascaris* (rodzina *Ascarididae*) Boveri wykazał, że zważając na nietypowy rozwój tych organizmów, jedynie populacja komórek która zawiera kompletną chromatynę (bez oznak fragmentacji) da początek liniom germinalnym, które przekażą całkowitą informację (genetyczną) do kolejnych pokoleń [4]. Rozwijając teorie Haeckla, Boveri zaproponował, że komórki będące w stanie pośrednim pomiędzy zapłodnioną komórką jajową, a zdefiniowaną linią komórek germinalnych powinny nosić nazwę komórek macierzystych [5]. Badania Häcker'a stanowiły kolejny przełom, gdyż w 1892 roku wykazał on, że podczas rozwoju oczlika (*Cyclops*, skorupiak z rodziny *Cyclopidae*) pojedyncza umiejscowiona centralnie komórka (zwana komórką macierzystą) podlega asymetrycznym podziałom tworząc linię komórkową budującą mezoderme, natomiast pozostałe komórki dają początek komórkom germinalnym. Mniej więcej w tym samym czasie Artur Pappenheim, Alexander Maximow, Ernst Neumann i inni pracowali nad poznaniem rozwoju i opisaniem komórek progenitorowych dla układu krwionośnego. W 1909 roku Maximow opisując hematopoezę po raz pierwszy jednoznacznie używa pojęcia komórka macierzysta określając „niezróżnicowaną komórkę, która daje początek komórkom krwi” [6].

Pomimo upływu ponad 140 lat od tych pionierskich teorii i odkryć, wczesne rozumienie pojęcia komórki macierzystej nadal pozostaje aktualne. XIX wiek wprowadził to pojęcie zarówno do badań z zakresu biologii rozwoju, embriologii jak i medycyny. Obecnie, podobnie jak wtedy, nie ogranicza się ono jedynie do opisu niezróżnicowanych komórek zarodkowych, ale obejmuje również unikalną pulę komórek krążących w dorosłych organizmach (tzw. *Adult Stem Cells*, ASC). ASC (zwane też somatycznymi komórkami macierzystymi) umożliwiają naprawę i odnowę tkanek, ich potencjał do różnicowania ograniczony jest do linii komórkowej w której rezydują – są multipotentne i posiadają nieograniczoną zdolność do podziałów. W myśl tradycyjnego, hierarchicznego modelu różnicowania, ASC dają początek multipotentnym komórkom progenitorowym (o ograniczonej zdolności do podziałów), które finalnie inicjują powstanie komórek danej tkanki. Jednak obecnie rewiduje się ten pogląd. Badania pokazują, że być może nie istnieje zdecydowany podział na ASC i komórki progenitorowe. Sugeruje się tzw. model ciągły (ang. *continuous model*), który wskazuje, że populacja komórek tworzących ASC jest heterogenna pod względem potencjału do różnicowania, profilu molekularnego, ścieżek różnicowania, losu komórki (ang. *cell fate*) i funkcji. W nowym modelu granica pomiędzy definicją ASC i komórek progenitorowych zaczyna się zacierać,

tak jak ma to miejsce w przypadku nowego opisu hierarchii różnicowania komórek w procesie hematopoezy [7].

ODKRYWANIE POTENCJAŁU ROZWOJOWEGO KOMÓREK ZARODKOWYCH, POCZĄTEK BADAŃ NA SSAKACH

Jednym z pierwszych pytań biologii rozwoju było, czy wszystkie komórki dorosłego organizmu posiadają ten sam zestaw genów, czy obserwowane różnice wynikają z różnej informacji zawartej w poszczególnych komórkach, czy jednak istnieją inne mechanizmy regulatorowe. Na pierwsze pytanie pośrednio znaleziono odpowiedź już w 1893 roku, kiedy Hans Adolf Edward Driesch wykazał, że w wyniku mechanicznej separacji 2-komórkowego zarodka jeżowca (*Echinoidea*) uzyskamy dwa kompletne organizmy [8]. Kolejno w 1902 roku Hans Spemann powtórzył to doświadczenie na kręgowcu (salamandrze), dodatkowo wykazując, że istnieje granica (stadium rozwojowe zarodka) powyżej której dalsze klonowanie przez podział nie jest możliwe [9]. Ze względu na dystrybucję czynników cytoplazmatycznych w zapłodnionym jajku, w przypadku salamandry było to stadium 2-komórkowe. Kolejna praca Spemann'a z 1928 roku wykazała, że jądro komórkowe wczesnego zarodka salamandry jest elementem niezbędnym dla rozwoju w dorosły organizm. Od lat 50. XX wieku, wraz z doświadczeniami Roberta Briggs'a i Thomasa J. King'a rozpoczęła się era współczesnej embriologii doświadczalnej, której odkrycia doprowadziły do poznania natury zarodkowych komórek macierzystych (ang. *Embryonic Stem Cells*, ESC). W 1952 roku Briggs i King po raz pierwszy sklonowali kręgowca. Była to żaba lamparcia (*Rana pipiens*), która powstała w wyniku transplantacji jądra 8-komórkowego zarodka żaby do enukleowanego oocyty [10]. Kolejny krok milowy przyszedł wraz z badaniami Johna B. Gurdon, który w 1960 roku opublikował przełomowe badania pokazujące, że jądro komórki somatycznej pobranej z nabłonka jelita żaby szpniastej (*Xenopus laevis*) po transplantacji do enukleowanego oocyty zachowuje zdolność odtwarzania całego organizmu [11,12]. Doświadczenie to stanowiło wstęp do klonowania ssaków z wykorzystaniem jąder komórek somatycznych (ang. *Somatic Cell Nuclear Transfer*, SCNT) oraz umożliwiło odkrycie mechanizmu indukcji pluripotencji (ang. *induced pluripotency*), za który w 2012 roku John B. Gurdon i Shinya Yamanaka otrzymali nagrodę Nobla.

Lata 40-50. XX wieku to również intensyfikacja badań na zarodkach ssaków, których jednym z pionierów był Prof. Andrzej K. Tarkowski (1933-2016). W 1959 roku Tarkowski jako pierwszy wykazał, że zarodki ssaków (myszy) są zdolne do rozwoju w cały organizm z pojedynczego blastomeru 2-komórkowego zarodka [13]. Obserwacje te potwierdzono również u innych gatunków ssaków jak szczur [14] i królik [15]. Kolejne badania pokazały, że możliwy jest dalszy rozwój z izolowanych komórek 4-8 blastomerowych zarodków, jednak wraz z rosnącą liczbą blastomerów, tracą one zdolność do tworzenia linii trofoblastu, a wydajność procedury drastycznie spada [16]. Zatem używając współczesnej terminologii dochodzi do utraty pełnego potencjału rozwojowego – totipotencji. Jednocześnie komórki zarodkowe dość długo utrzymują plastyczność, czyli zdolność adaptacji do środowiska zewnętrznego oraz odbioru sy-

gnalów molekularnych z sąsiadujących komórek. Potwierdziły to doświadczenia polegające na zespoleniu dwóch kilkukomórkowych zarodków myszy, co doprowadziło do powstania chimer [17]. W 1975 roku J. Derek Bromhall z sukcesem powtórzył doświadczenia Briggs'a i Kinga, uzyskując pierwsze zarodki ssaka na drodze transferu jądra komórkowego z 2-4 blastomerowych zarodków królika do enukleowanych oocytów [18]. Jednak za sukces uznał osiągnięcie stadium moruli przez zarodki, i nie kontynuował doświadczenia w kierunku uzyskania żywego potomstwa. W 1984 roku stosując tą samą metodę Steen Willadsen uzyskał jagnię – był to pierwszy ssak uzyskany techniką transferu jąder komórkowych (ang. *nuclear transfer*). Do transferu wykorzystano jądro pojedynczej komórki 8-blastomerowego zarodka owcy. Fuzję jądra z enukleowanym oocytem wykonano za pomocą impulsu elektrycznego, który jednocześnie pobudził zarodek do dalszych podziałów [19]. Ukoronowaniem tej drogi były narodziny owcy Dolly w 1996 roku. Ian Willmut i Keith Campbell wykorzystując technikę SCNT dokonali transferu jądra komórki somatycznej (pobranej z gruczołu mlekowego dorosłej owcy) do enukleowanego oocytu. Pomimo ogromnego sukcesu metoda ta jest mało wydajna – z 277 fuzji rozwinęło się 29 zarodków, które przeniesiono do 13 matek zastępczych, jednak tylko jedna ciąża zakończyła się sukcesem [20].

W tym momencie można się zastanawiać, jakie znaczenie mają powyżej opisane doświadczenia dla zrozumienia pochodzenia i właściwości komórek SC? Otóż wszystkie te odkrycia jednoznacznie wskazują, że każda komórka zawiera niezbędną informację do odtworzenia kompletnego organizmu, jednak podczas rozwoju dochodzi do progresywnego wyciszenia tych właściwości. Istotą uzyskania i hodowli komórek macierzystych jest utrzymanie lub indukcja tego niezróżnicowanego, pierwotnego lub embrionalnego stanu.

WŁAŚCIWOŚCI I RODZAJE KOMÓREK MACIERZYSTYCH – SKĄD POCHODZĄ

Historycznie badania nad komórkami macierzystymi pochodzenia zarodkowego rozpoczęły się w latach 70. XX wieku od uzyskania linii komórek nowotworowych z zarodków mysich - tak zwanych komórek raka zarodkowego (ang. *Embryonic Carcinoma*, EC). Badania wykazały, że przedimplantacyjne zarodki myszy (w stadium zygoty lub 2-blastomerów) przeniesione pod skórę myszy (linii 129/Sv) wykazywały zdolność tworzenia potworniaków (*teratocarcinoma*). Dodatkowo w powstałych guzach stwierdzono obecność szeregu typów komórek o charakterze EC oraz znaczną populację szybko dzielących się niezróżnicowanych komórek o charakterze zarodkowym [21]. Kolejne prace pokazały, że EC miały wiele wspólnych cech z wczesnymi, przedimplantacyjnymi zarodkami. Transplantacja teratom pod powłoki brzuszne myszy skutkowałą powstaniem struktur zwanych „kulami zarodkowymi” (ang. *Embryoid Bodies*, EB), w których stwierdzono obecność komórek z linii endodermy, ektodermy i mezodermy [22]. Ponadto komórki z linii EC przeniesione do blastocyst myszy wykazywały zdolność tworzenia chimer [23]. W 1975 roku Gail Martin i Martin Evans wykazali, że linie EC mogą być wielokrotnie pasażowane *in vitro* oraz posiadają zdolność tworzenia linii komórkowych tworzących listki zarodko-

we [24]. Początkowo EC myszy stanowiły m. in. model do badań przedimplantacyjnego rozwoju ssaków, ale ponieważ linie te obciążone są mutacjami genetycznymi (często posiadają nieprawidłowy kariotyp) rozpoczęto prace nad lepszym modelem. Nie istniała wtedy jednak wiarygodna (powtarzalna) metoda gwarantująca rutynowe uzyskiwanie linii komórek zarodkowych, które charakteryzowałyby się cechami podobnymi do EC – zdolnością do nieograniczonych podziałów i różnicowania.

W 1981 roku niezależnie od siebie Martin Evans i Matthew Kaufman oraz Gail Martin uzyskali pierwsze linie ESC z zarodków myszy [24,25]. W swoich badaniach skoncentrowali się na propagacji ICM jako źródle komórek pluripotentnych. Do doświadczeń wybrano blastocysty, które hodowano w warunkach *in vitro* celem zwiększenia liczby komórek w ICM. Następnie (po usunięciu TE) dokonano enzymatycznej dezagregacji węzłów zarodkowych. Tak uzyskane komórki umieszczono na warstwie komórek odżywczych (ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEF), które zapewniają adherentne podłoże umożliwiając rozrost kolonii komórkowych oraz wydzielają czynniki wzrostu (m. in. cytokiny). MEF to inaktywowane płodowe fibroblasty uzyskiwane z 10-14 dniowych płodów myszy, co ma ograniczyć konkurencję o składniki odżywcze z rosnącymi koloniami oraz uniemożliwić „zanieczyszczenie” hodowli ESC innym typem komórek. Inaktywację przeprowadza się poprzez irradiację promieniowaniem gamma (4000 radów) lub przez podanie mitomycyny-C (10 µg/ml, inkubacja 1-2 godzin), która jest silnym inhibitorem replikacji DNA. Czynniki stymulującymi pluripotencję i jednocześnie blokującymi ścieżki różnicowania okazał się w tym przypadku czynnik przeciwbiałaczkowy (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*, LIF) oraz białka morfogenetyczne kości (ang. *Bone Morphogenetic Protein*, BMP). Tutaj należy zaznaczyć, że podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach nad uzyskaniem EC, pierwsze linie ESC wyhodowano z zarodków myszy linii 129/Sv. Protokół oparty na LIF i BMP okazał się skuteczny również dla innych szczepów myszy wywodzących się z linii 129 oraz dla myszy C57Bl6 – szczepy te określa się mianem szczepów permissywnych (ang. *permissive strains*) [26]. Jednak nawet w tym przypadku system ten charakteryzuje się ok. 30% efektywnością. W przypadku innych linii i szczepów myszy (jak CBA, NOD czy DBA) warunki hodowlane oparte na LIF i BMP okazały się niewystarczające. Myszy te określane są mianem szczepów opornych (ang. *resistant strains*) [26].

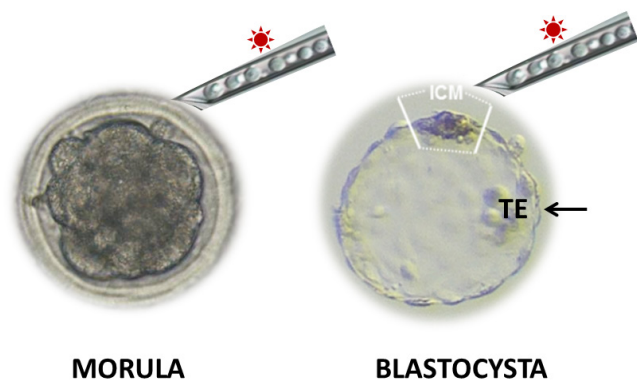
W 1995 roku J.A. Thomson wykorzystał protokół oparty na LIF do wyprowadzenia ESC z zarodków makaka królewskiego (ang. *rhesus macaque*, *Macaca mulatta*). Thomson kontynuował badania na zarodkach naczelnych i w 1998 roku uzyskał pierwsze linie ESC z zarodków człowieka. W tym samym roku Shambloott [27] wykazał, że możliwe jest uzyskanie pluripotentnych komórek z pierwotnych komórek rozrodczych (ang. *Primordial Germ Cells*, PGC) zasiedlających grzebienie płciowe (ang. *genital ridges*) 5-9 tygodniowych zarodków ludzkich. Co ciekawe, w przypadku człowieka czynnikiem determinującym pluripotencję okazał się czynnik β wzrostu fibroblastów (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF) [28]. Analogiczne warunki umożliwiają wyprowadzanie linii komórkowych z trofektodermy/trofobla-

stu myszy, czyli uzyskanie tzw. trofoblastycznych komórek macierzystych (ang. *Trophoblast Stem Cells*, TSC). Mysie TSC wymagają obecności bFGF, natomiast ludzkie TSC są zależne od LIF. Zatem pojawiło się jednoznaczne wskazanie na występowanie znaczących różnic międzygatunkowych w odniesieniu do warunków utrzymania niezróżnicowanego charakteru komórek i ich zdolności do samo-odnowy. Trudności z uzyskaniem stabilnych linii ESC dla innych gatunków zwierząt stymulowały prace mające na celu znalezienie lepszych metod sterowania pluripotencją niż klasyczny system oparty na LIF lub bFGF. Przełom pojawił się dopiero po 27 latach od uzyskania mysich ESC, kiedy to zespół Austina Smith'a uzyskał stabilną linię ESC szczura [29]. System hodowli opierał się na nowatorskim podejściu uwzględniającym zastosowanie molekularnie zdefiniowanych warunków, w których kluczową rolę odgrywają chemiczne inhibitory znajdujące swoje docelowe miejsca działania w obrębie ścieżek sygnalizacyjnych związanych z pluripotencją i z różnicowaniem komórek. Obecne systemy uzyskiwania ESC bazują na inhibicji sygnałów inicjujących różnicowanie. Dokładny opis znajduje się w dalszej części opracowania.

Według obecnie istniejących systemów klasyfikacji, komórki macierzyste możemy podzielić ze względu na potencjał do różnicowania lub ze względu na pochodzenie. W drugim przypadku wyróżniamy SC pochodzenia zarodkowego, z dorosłych organizmów (ASC) oraz indukowane pluripotencjne komórki macierzyste (ang. *induced Pluripotent Stem Cells*, iPS).

ESC, uzyskane z węzłów zarodkowych (ICM) przedimplantacyjnych zarodków. Uznaje się, że ESC zachowują pełną pluripotencję, czyli występują w tzw. stanie pierwotnym (ang. *naive state*), ponadto posiadają nieograniczoną zdolność do samo-odnawiania (ang. *self renewal*) i proliferacji. ESC powinny być stabilne w hodowli (bez oznak spontanicznego różnicowania i stabilne genomowo), jednak pod wpływem odpowiednich czynników indukujących, powinny wykazać zdolność do tworzenia wszystkich typów komórek budujących dorosły organizm. W warunkach eksperymentalnych powinny wykazywać zdolność do tworzenia chimer, czyli po wprowadzeniu (iniekcji) do zarodków w stadium moruli lub blastocysty, ESC powinny zacząć funkcjonować w obrębie ICM (Ryc. 1). Jeśli jest możliwy transfer takich zarodków do matek zastępczych, u nowo narodzonych zwierząt komórki potomne ESC powinny być obecne we wszystkich tkankach i organach (liniach komórkowych) [30]. Tego typu doświadczenia są oczywiście możliwe do wykonania na zwierzętach laboratoryjnych, w przypadku innych gatunków musimy posłużyć się metodami weryfikacji opartymi na potencjale do różnicowania, oraz na detekcji specyficznych markerów molekularnych. W założeniu aplikacyjnym ESC posiadają nieograniczony potencjał do wykorzystania w nauce i medycynie regeneracyjnej.

EpiSC (ang. *Epiblast Stem Cells*), linie komórkowe wyprawdane z epiblastu wczesnych poimplantacyjnych zarodków (w przypadku myszy około 5,5–6,5 dnia rozwoju). Epiblast powstaje na skutek uruchomienia procesów różnicowania ICM, które finalnie prowadzą do powstania listków zarodkowych. Ponieważ epiblast charakteryzuje kolejny etap rozwoju zarodka, można uznać, że EpiSC są bardziej



Rycina 1. Schemat ukazujący iniekcję ESC do zarodków bydłych w stadium moruli i blastocysty. Gwiazdka oznaczono pipety iniekcyjne zawierające komórki ESC. ICM – węzeł zarodkowy, TE – trofektoderma.

zaawansowane rozwojowo niż ESC. Linie te nadal uznawane są za pluripotencjne, choć stanowią już bardziej ukierunkowaną rozwojowo (ang. *primed*) linię komórkową. Niektórzy autorzy określają EpiSC mianem samo-odnawialnych multipotentnych komórek macierzystych [31,32], co wynika z faktu, że w znacznie mniejszym stopniu niż ESC wykazują zdolność do tworzenia chimer i niższy poziom ekspresji genów utożsamianych z ESC, jak *Oct4* [32]. EpiSC myszy wykazują podobne wymagania środowiskowe do ludzkich ESC (czyli m. in. są zależne od bFGF i ścieżki sygnalizacyjnej regulowanej Aktywiną A) [33]. EpiSC stanowią cenny model eksperymentalny do badania różnic międzygatunkowych pomiędzy ESC zwierząt (w tym myszy i człowieka).

EGC (ang. *Embryonic Germ Cells*), pochodzenia zarodkowego (w zależności od gatunku, uzyskiwane ze stadiów okołoimplantacyjnych), wywodzą się z pierwotnych komórek rozrodczych (PGC). EGC podobnie jak ESC i EpiSC są pluripotencjne, posiadają nieograniczoną zdolność do samo-odnawiania i zachowują stabilność chromosomową w kolejnych pokoleniach. Pierwsze linie EGC wyprowadzono z zarodków myszy [34], następnie podjęto próby ich uzyskania z zarodków człowieka, świni i kury [35–37]. Jednak metodyka uzyskiwania EGC wymaga nadal dopracowania, do tej pory stabilne linie EGC uzyskano jedynie z zarodków myszy [38]. Badania wskazują, że mogą one być wykorzystane do wyprowadzenia funkcjonalnych gamet (plemników i oocytów) i w przyszłości mogą posłużyć do wsparcia metod leczenia niepłodności.

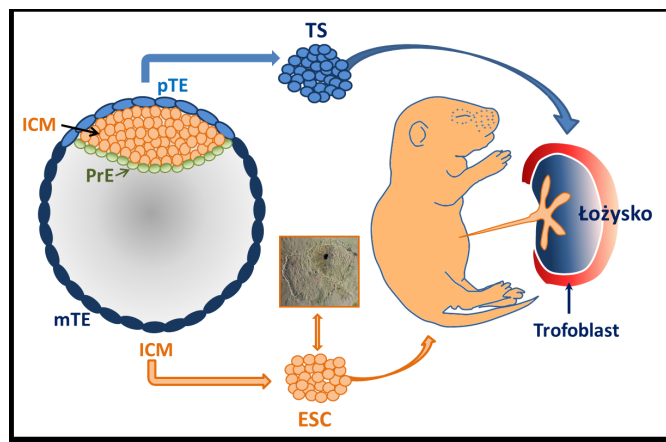
ASC, występują w różnych tkankach i organach oraz we krwi (w tym krew pępowinowa), są multipotentne (lub unipotentne) i posiadają ograniczoną zdolność do samo-odnawiania. ASC uzyskano m.in. ze szpiku kostnego (komórki mezenchymalne, ang. *Mesenchymal Stem Cells*, MSC), kości, mięśni (komórki satelitowe), tkanki tłuszczowej (ang. *Adipose Stem Cells*, AdSC), nerwowej i miazgi zęba (ang. *Dental Pulp Stem Cells*, DPS). Obecnie w tym typie komórek dopatruje się największego potencjału aplikacyjnego w medycynie regeneracyjnej, szczególnie ze względu na ich ograniczone ryzyko tworzenia teratom, co wynika z utraty nieograniczonego potencjału do różnicowania właściwego dla komórek embrjonalnych. Na szczególną uwagę zasłu-

gują MSC za względu na: duży potencjał proliferacyjny, stabilność genetyczną, zdolność do migracji w miejsce urazu, silne właściwości immunosupresyjne, co sugeruje, że mogą być stosowane zarówno w przeszczepach autologicznych jak i heterologicznych.

iPS, pochodzą z komórek somatycznych, w założeniu są pluripotentne i pod względem potencjału do różnicowania przypominają ESC. iPS po raz pierwszy wyprowadzono z mysich fibroblastów w 2006 r przez zespół S. Yamanaki [39]. Doświadczenie J. Gurdon z 1960 roku pokazało, że możliwe jest przeprogramowanie/odwrócenie wyspecjalizowanego funkcjonalnie jądra komórki somatycznej do stanu embrionalnego – pluripotentnego. W przypadku tych prac czynniki odpowiedzialne za indukcję pluripotencji znajdowały się w cytoplazmie oocytu. Kolejne dekady badań nad czynnikami warunkującymi różnicowanie komórek zarodkowych doprowadziły do odkrycia molekularnego podłoża tych procesów. Wykorzystując procedurę transfekcji wirusowej wywołano nadekspresję genów kluczowych dla tworzenia linii ICM takich jak: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc* (tzw. czynniki Yamanaki). Badania mechanizmów odpowiedzialnych za przeprogramowanie zróżnicowanej komórki somatycznej wykazały, że pierwszym etapem transformacji było wyciszenie ekspresji genów charakterystycznych dla komórki somatycznej [40]. W 2007 roku uzyskano linie iPS człowieka [41,42], a w kolejnych latach pojawiły się doniesienia o uzyskaniu iPS dla szeregu gatunków zwierząt.

DROGA DO UZYSKANIA ESC - OD ZYGOTY DO ESC

Powstanie zygoty stanowi pierwszy etap rozwoju i dotyczy wszystkich organizmów. Czas wymagany od zapłodnienia do pierwszego podziału jest gatunkowo specyficzny i wynosi 20–24 h dla zarodków człowieka [43], 6–12 h dla myszy i szczura [44,45], 20h dla owcy, 24–36 h dla bydła i do 48h dla zarodków świni [46,47]. W wyniku następujących po sobie podziałów komórkowych (bruzdkowanie) na etapie ok. 16–32 komórek, w przypadku większości gatunków ssaków (jak mysz, człowiek, bydło, owca, świnia) powstaje morula [48-50]. Na tym etapie, na skutek interakcji szeregu sygnałów indukujących różnicowanie, takich jak: aktywność ścieżek sygnalizacyjnych, regulacja ekspresji genów, re-aranżacja chromatyny, sygnały wewnątrzkomórkowe, metylacja, umiejscowienie komórek w zarodku, polarność blastomerów rozpoczyna się trwałe, funkcjonalne i morfologiczne rozejście 2 pierwszych linii komórkowych. Efektem tych procesów jest powstanie blastocysty, która posiada zewnętrzną warstwę płaskich komórek otaczających cały zarodek zwaną trofektodermą (TE) oraz wewnętrzne skupisko komórek – węzeł zarodkowy (ICM). W zarodkach myszy komórki TE pozostające w kontakcie z ICM nazwane są trofektodermą biegunową (ang. *polar*, pTE), a pozostałe komórki trofektodermą ścienną (ang. *mural*, mTE) (Ryc. 2). W przypadku szeregu innych gatunków zwierząt (w tym zwierząt gospodarskich) nie rozróżniamy trofektodermę ścienną od biegunowej. Zwyczajowo TE biegunowa nazywana jest warstwą Raubera (ang. *Rauber's Layer*). Warstwa ta otacza ICM i na wczesnym etapie rozwoju zarodka (jeszcze przed jego implantacją) zanika, czego skutkiem jest pełna ekspozycja ICM/epiblastu na środowisko zewnętrzne [51,52]. We wszystkich przypadkach jednak TE daje począ-

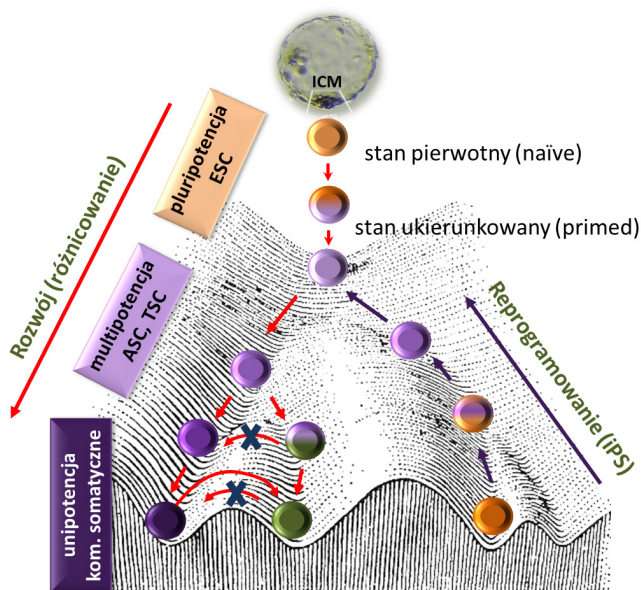


Rycina 2. Schemat ukazujący kierunek różnicowania poszczególnych linii komórkowych na przykładzie zarodka myszy w stadium blastocysty. ICM – węzeł zarodkowy, pTE – trofektoderma biegunowa (*polar*), mTE – trofektoderma ścienna (*mural*), ESC – zarodkowe komórki macierzyste, TSC – trofoblastyczne komórki macierzyste.

tek strukturom tworzącym zarodkową część łożyska. Wraz z rozwojem zarodka ICM przekształca się w epiblast, który inicjuje powstanie 3 pierwszych listków zarodkowych (ektodermy, mezodermy, endodermy) i finalnie wytwarza dorosły organizm (Ryc. 2). Na etapie powstawania epiblastu wyodrębnia się druga (po TE) poza-zarodkowa linia komórkowa. W zależności od gatunku określana jako endoderma pierwotna (ang. *Primitive Endoderm*, PrE) lub hipoblast (ang. *Hypoblast*, HP). HP/PrE jest warstwą komórek leżących na wewnętrznej powierzchni węzła zarodkowego (od strony jamy blastocysty), z której po implantacji powstanie endoderma pęcherzyka żółtkowego [53].

W trakcie zachodzenia opisanych powyżej procesów rozwojowych, w zarodku inicjowane są dynamiczne zmiany skutkujące przechodzeniem komórek ze stanu totipotencji do pluripotencji, multipotencji i finalnie unipotencji. Gradację tego zjawiska doskonale obrazuje koncept Conrada H. Waddington'a (twórcy teorii epigenetyki) z 1957 roku, w którym przedstawia on tzw. krajobraz epigenetyczny (ang. *epigenetic landscape*) aby zilustrować różne ścieżki rozwojowe jakie może przyjąć komórka podczas swojego różnicowania, w zależności od tego, jakie geny (lub inne czynniki) są włączone, a jakie wyłączone [54]. Obraz przypomina kulę (komórkę) toczącą się w dół doliny, początkowo dolina jest płaska i komórka może w każdej chwili zmienić pozycję (ścieżkę różnicowania), jednak w miarę przemieszczania, zbocza oddzielające sąsiadujące ze sobą doliny stają się coraz wyższe i nie ma już możliwości spontanicznego przekroczenia tej granicy. W tym momencie komórka nie jest już pluripotentna, podąża ściśle wyznaczonym torem różnicowania (Ryc. 3). Celem stworzenia optymalnego systemu do hodowli komórek macierzystych (w szczególności ESC) jest zatrzymanie komórki na początku tej drogi, a w przypadku iPS, powrót do stanu wyjściowego.

Mechanizmy różnicowania komórek zarodkowych myszy (kluczowe dla poznania podłoża pluripotencji) w kierunku ICM i TE zastały już całkiem dobrze poznane i szeroko opisane w literaturze [55-60]. Mysz stanowi podstawowy



Rycina 3. Schemat prezentujący koncept krajobrazu epigenetycznego Waddingtona z naniesionymi ścieżkami różnicowania komórek.

organizm do prac z zakresu biologii rozwoju ssaków, nie jest to jednak model uniwersalny - w niektórych przypadkach różni się nawet od innych gryzoni, w tym szczura, co pokazuje różne podejście do uzyskania linii ESC obydwu tych gatunków. W rozwoju przedimplantacyjnym myszy wyróżniamy zjawiska, które nie występują powszechnie u ssaków wyższych (*eutheria*), a sam okres rozwoju przedimplantacyjnego jest krótki i kończy się inwazyjną implantacją zarodka 4,5 dnia od zapłodnienia/kopulacji (ang. *days post coitum*, dpc). W odniesieniu do gatunków takich jak zwierzęta kopytne (*Ungulata*), mięsożerne (*Carnivora*) czy naczelnne (*Primates*), przedimplantacyjny rozwój myszy jest niezwykle szybki, aktywacja genomu zarodkowego (ang. *Embryonic Genome Activation*, EGA) ma miejsce już w stadium 2-komórkowym, blastocysta powstaje pomiędzy 3,25–3,75 dpc. W przypadku innych gatunków EGA osiągnięte jest w innym momencie czasowym (i stadium rozwojowym) niż u myszy. Przykładowo EGA zarodków człowieka ma miejsce w stadium 4–8 komórkowym, świni 4–5 komórkowym, a bydła i owcy 8–16 komórkowym. Dodatkowo należy też podkreślić, że u zwierząt kopytnych (bydło, świnia, owca) po osiągnięciu stadium blastocysty następuje okres intensywnego różnicowania zarodka prowadzący do jego elongacji: 20–25 cm bydło, 15–19 cm owca, 80–100 cm świnia [61–63]. Z kolei, podczas rozwoju przedimplantacyjnego konia około 6–7 dnia pojawia się kapsuła zarodkowa (dodatkowa glikoproteinowa warstwa otaczająca osłonkę przejrzystą), która zanika pomiędzy 18 a 21 dniem rozwoju umożliwiając implantację [64].

Ze względu na opisane powyżej różnice międzygatunkowe oczywistym wydaje się fakt, że nie wszystkie zjawiska i mechanizmy regulujące wczesny rozwój zarodka myszy (w tym odpowiedzialne za pluripotencję i różnicowanie komórek) mogą być w bezpośredni sposób przekładane na inne gatunki ssaków. Dlatego też prowadzone są intensywne badania nad poznaniem podobieństw i różnic, w mechani-

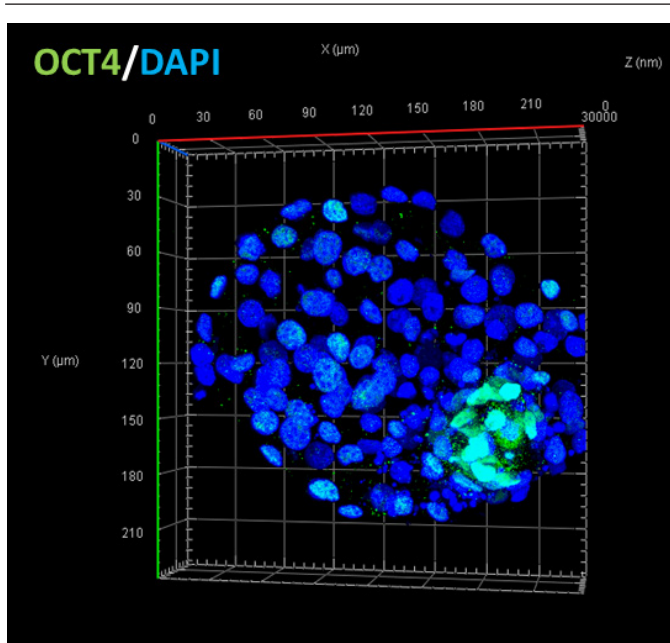
zmach sterujących różnicowaniem komórek zarodkowych innych gatunków ssaków, w tym zwierząt gospodarskich [47]. Specyfika gatunkowa jest jednym z głównych czynników sprawiających, że nie dysponujemy uniwersalnym protokołem do uzyskania ESC ssaków. Na przestrzeni lat pojawiały się doniesienia o wyprowadzeniu komórek o charakterze ESC dla wielu gatunków zwierząt (bydło, świnia, owca, koza, koń, królik, pies, kot, mandryl, orangutan, nosorożec biały, delfin a nawet koralowiec), jednak ze względu na pojawiające się ograniczenia jak: niski potencjał do różnicowania, krótka żywotność w hodowli, brak stabilności po większej liczbie pasaży, brak stabilności chromosomowej lub brak zdolności tworzenia chimer, nie są one określane mianem prawdziwych linii ESC.

ŚCIEŻKI SYGNALIZACYJNE ORAZ MARKERY PLURIPOTENCJI

Badania pokazują, że pomimo różnic w czynnikach zewnętrznych dodawanych do pożywek hodowlanych, ścieżki sygnalizacyjne sterujące pluripotencją są uniwersalnie i konserwatywnie ewolucyjnie. Przykładowo elementy szlaku sygnałowego WNT (ang. *Wingless*) zostały zidentyfikowane nawet wśród organizmów jednokomórkowych (jak ameba) oraz wśród grzybów, roślin i wszystkich grup systematycznych zwierząt. Przypuszcza się, że pojawienie się cząstek sygnałowych z grupy WNT (i podobnych) przyczyniło się m. in. do powstania pierwszych organizmów wielokomórkowych [65].

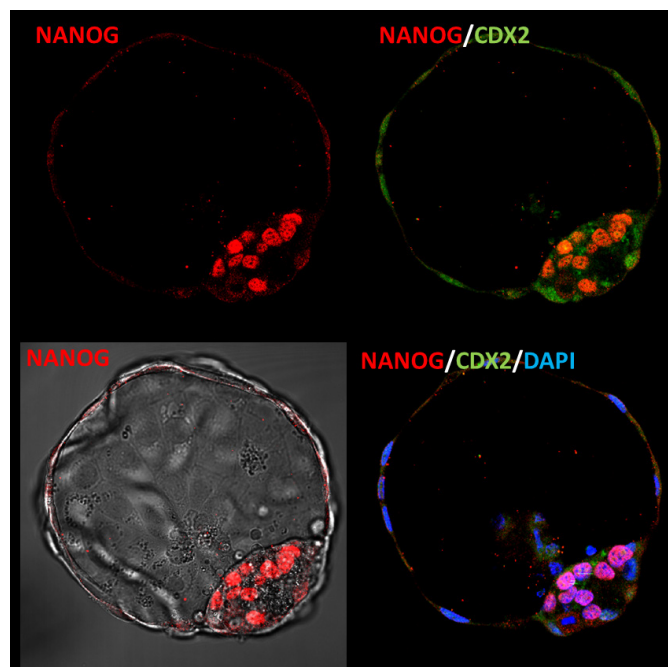
Obserwowane różnice międzygatunkowe w aktywności i regulacji ścieżek sygnałowych dotyczą czynników zewnętrznych sterujących ich aktywnością, oraz/lub czynników regulujących ekspresję określonych genów będących elementem danej ścieżki. Funkcją tych ścieżek jest przekazanie sygnału „do” i „wewnątrz” komórki. Skutkiem tej aktywności jest udział w procesach związanych z różnicowaniem komórek, lub z „blokadą” różnicowania. Dodatkowo regulują one szereg procesów istotnych dla utrzymania homeostazy komórkowej, ale również odpowiadają za indukcję apoptozy. Te same ścieżki sygnalizacyjne regulują wczesny rozwój, oraz procesy komórkowe zachodzące w dorosłym organizmie. W przypadku błędów w procesie kontroli różnicowania komórek, ich wadliwe działanie przyczynia się do indukcji procesów nowotworowych, dlatego też w przypadku potencjalnych aplikacji SC w medycynie regeneracyjnej ludzi i zwierząt należy zachować szczególną ostrożność.

Jak wspomniano, tworzenie pierwszych zarodkowych linii komórkowych wymaga aktywności szeregu ścieżek oraz ich genów efektorowych. Do kluczowych należą: WNT, MAPK/ERK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase*), JAK/STAT3 (ang. *Janus Activated Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), cAMP/PKA (ang. *cyclic Adenosine MonoPhosphate/Protein Kinase A*), TGFβ (ang. *Transforming Growth Factor β*), NOTCH, HIPPO i HEDGEHOG (3 ostatnie są nazwami własnymi zaczerpniętymi od nazw głównych białek regulatorowych danej ścieżki) [66–70]. Badania prowadzone na różnych gatunkach zwierząt (nie tylko ssaków) wskazują na uniwersalny zestaw genów regulatorowych (czynników



Rycina 4. Trójwymiarowy obraz (rekonstrukcja 3D) zarodka bydłowego w stadium blastocysty. Obrazy uzyskano techniką mikroskopii konfokalnej. Zielony sygnał wskazuje lokalizację białka OCT4 (marker ICM) i jest wynikiem zastosowania techniki barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciała pierwszorzędowego skierowanego przeciw OCT4 wraz z kompatybilnym przeciwciałem drugorzędowym znakowanym fluorescencyjnie. Niebieski sygnał pochodzi z barwienia DAPI, które specyficznie barwi chromatynę (jądra komórkowe).

transkrypcyjnych), których aktywność indukowana jest działaniem danej ścieżki. Z tego względu geny te stanowią podstawowy zestaw markerów stosowany do określenia pochodzenia danej linii komórkowej, a wiedza na temat ich aktywacji i funkcji jest podstawą indukcji pluripotencji. Do najważniejszych czynników tej grupy należą specyficzne dla węzła zarodkowego: OCT4, NANOG, SOX2, SALL4, REX1, KLF4, c-MYC, FN-1 dla endodermy pierwotnej: GATA4, GATA6, SOX7, SOX17, PDGFR α oraz dla trofektodermy: ELF5, TEAD4, KRT18, CDX2 [59,71-73]. Jak nietrudno się domyśleć czynniki specyficzne dla ICM stanowią podstawę „czynników Yamanaki”, których nadekspresja wymagana jest do uzyskania iPS. Przykładowe obrazy ukazujące lokalizację kluczowych markerów linii komórkowych w zarodku (ICM i TE) przedstawiono na przykładzie zarodków bydłowych: OCT4 (Ryc. 4) oraz NANOG i CDX2 (Ryc. 5). Mozaikowa ekspresja wyżej wymienionych czynników na wczesnym etapie rozwoju (do stadium moruli/wczesnej blastocysty) najprawdopodobniej znajduje się pod kontrolą ścieżki Grb-Ras-MAPK (inaczej zwanej MEK/ERK) [74,75]. Ścieżka MEK/ERK pełni istotną rolę w wielu procesach wewnątrzkomórkowych i podlega aktywacji przez czynniki wzrostu, jak FGF i cytokiny. MAPK aktywuje kinazę ERK i w ten sposób uruchomione zostaje różnicowanie i proliferacja w kierunku linii trofoblastu [76]. Inhibicja aktywności FGF w warunkach *in vivo* zapobiega różnicowaniu epiblastu w kierunku linii komórkowych tworzących listki zarodkowe, natomiast *in vitro* może sprzyjać utrzymaniu linii komórkowych w stanie pluripotencji. Wywołane tą drogą obniżenie aktywności kinazy ERK wzmagają efektywność wyprowadzania ESC myszy [77]. Jednak jak opisywano wcześniej, dla uzyskania stabilnych linii ESC myszy nie-



Rycina 5. Panel obrazów ukazujący pojedynczą sekcję optyczną przez zarodek bydłowy w stadium blastocysty. Obrazy uzyskano techniką mikroskopii konfokalnej. Poszczególne sygnały są wynikiem zastosowania techniki barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciw badanemu białku wraz z kompatybilnym przeciwciałem drugorzędowym znakowanym fluorescencyjnie: NANOG czerwone sygnały (marker ICM), CDX2 zielone sygnały (marker TE). Niebieski sygnał pochodzi z barwienia DAPI, które specyficznie barwi chromatynę (jądra komórkowe).

zbędna jest również obecność LIF [78]. LIF z kolei stanowi istotny element ścieżki JAK/STAT3, której aktywność prowadzi do wzmożonej ekspresji genów takich jak OCT4, NANOG i c-MYC, nie tylko u myszy ale również u bydła [79].

Kolejny kluczowy element wzajemnych interakcji warunkujących blokadę różnicowania komórek stanowi ścieżka WNT, która jak pokazały badania nad ESC myszy, człowieka, szczura, bydła, królika, świni i owcy, ma kluczowe znaczenie dla pluripotencji [47,79,80]. Na późniejszych etapach rozwoju ścieżka ta jest istotna dla tworzenia osi budowy zarodka, migracji komórek podczas gastrulacji i neurulacji. Białka zaangażowane w ścieżkę WNT regulują funkcję komórek na drodze dwóch systemów: (1) *kanonicznego* (klasycznego) warunkującego pluripotencję oraz różnicowanie komórek embrionalnych, oraz (2) *niekanonicznego*, który odpowiada za określenie polarności komórkowej, asymetryczne podziały oraz migrację komórek podczas gastrulacji. W przypadku myszy aktywność tej ścieżki może być stymulowana obecnością LIF w pożywce, jednak jak pokazały prace nad uzyskaniem ESC szczura aktywność WNT może być podtrzymana poprzez celowaną inhibicję kinazy 3 syntazy glikogenu (ang. *Glycogen Synthase Kinase 3*, GSK3). Blokada aktywności GSK3 jest niezbędna do utrzymania aktywności WNT [81]. Można zatem uznać, że do wyprowadzenia pluripotentnych linii komórkowych z zarodków niezbędne jest utrzymanie aktywności ścieżki WNT oraz blokada MAPK/ERK. Takie właśnie podejście zastosowali A. Smith i M. Buehr wyprowadzając stabilne linie ESC szczura. W doświadczeniu wykorzystano zestaw inhibitorów, później określony mia-

Tabela 1. Zestawienie właściwości poszczególnych linii komórkowych o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

ESC	iPS	ASC
z zarodków (ICM)	z komórek somatycznych	z tkanek dorosłego organizmu
allogeniczne	allo/autogeniczne	allo/autogeniczne
pluripotentne	pluripotentne	multipotentne
samo-odnawianie	samo-odnawianie	ograniczone odnawianie
wiele etapów pośrednich – długi okres hodowli <i>in vitro</i>	wiele etapów pośrednich – długi okres hodowli <i>in vitro</i>	trudne do utrzymania w długotrwałej hodowli <i>in vitro</i>
w teorii, niezmienna organizacja chromosomów w kolejnych pasażach, utrzymana aktywność telomerazy – zachowana długość telomerów	w teorii, po ustabilizowaniu linii utrzymana stabilność genomowa, odblokowana aktywność telomerazy – zachowana długość telomerów	regiony telomerowe ulegają skróceniu po kolejnych podziałach, aktywność telomerazy charakterystyczna dla komórek somatycznych
ryzyko akumulacji aneuploidii, często spotykane aberracje chromosomowe, brak stabilności genomowej	ryzyko akumulacji aneuploidii, często spotykane aberracje chromosomowe, brak stabilności genomowej	ryzyko mutacji dotyczących liczby lub struktury chromosomów wzrasta z kolejnymi pasażami
znaczne ryzyko nowotworzenia	znaczne ryzyko nowotworzenia	ograniczone ryzyko nowotworzenia
nieznana historia dawcy	w przypadkach autogenicznych „choroba” może nadal być obecna	w przypadkach autogenicznych „choroba” może nadal być obecna

nem 2i i 3i [29]. Obydwa układy inhibitorów działają w obrębie ścieżek WNT i MAPK (MEK/ERK). Zarówno system 2i jak i 3i zawiera CHIR99021 – silny inhibitor GSK3. Inhibicja GSK3 uniemożliwia powstanie tzw. kompleksu destrukcyjnego, przez co wewnątrzkomórkowa β -katenina jest stabilizowana w cytoplazmie komórki i nie podlega fosforylacji (czyli degradacji). Stworzone są zatem warunki ku temu, aby β -katenina była nadal transportowana do jądra komórkowego, gdzie wchodzi w interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi LEF1/TCF czego skutkiem jest utrzymanie ekspresji genów jak *Oct4* i *Nanog*. W rezultacie aktywność ścieżki WNT zostaje podtrzymana. W przypadku 3i dodatkowymi inhibitorami są PD184352, który wyłącza aktywność MEK/ERK oraz SU5402 blokujący aktywność receptora dla FGF. Skutkiem działania PD184352 i SU5402 jest wyciszenie ścieżki MAPK. Z kolei w układzie 2i, oprócz CHIR99021 stosowany jest niezwykle wydajny inhibitor MEK - PD032591. Przykład opisany powyżej (2i/3i) stanowi obecnie kanon strategii związanych z wprowadzaniem ESC dla gatunków dla których nie było to możliwe w oparciu o klasyczny mysz/ludzki system (zależny od LIF/FGF). System ten umożliwił uzyskanie ESC również od opornych szczepów myszy. Badania nad regulacją pluripotencji w układzie 2i pokazały, że w zarodkach hodowanych w tym systemie dochodzi do zablokowania różnicowania ICM w kierunku epiblastu. Linie ESC myszy hodowane w systemie 2i z dodatkiem LIF okazały się heterogenne i zachowały zdolność tworzenia wszystkich zarodkowych (i poza-zarodkowych) linii komórkowych w chimerach [82]. W literaturze znaleźć można szereg prac nad stosowaniem różnych inhibitorów, w różnych układach, jednak podstawa nadal pozostaje ta sama – blokuje-

my działanie ścieżek indukujących różnicowanie na rzecz tych, które warunkują pluripotencję.

CZY ISTNIEJĄ ODSTĘPSTWA OD UZNANYCH DEFINICJI TOTI- I PLURI-POTENCJI?

Wnioskując z opisanych w niniejszym opracowaniu zależności i gradacji różnych stanów „potencji komórkowej” można przyjąć, iż w zależności od miejsca pochodzenia danej linii komórkowej stopień pluripotencji będzie różny. W przypadku zarodków, komórki macierzyste można uzyskać ze wszystkich linii komórkowych (ICM, TE, PrE i epiblastu). Uznaje się jednak, że pełną pluripotencją charakteryzują się jedynie linie uzyskane z ICM (komórki pierwotne, *naïve*). EpiSC są nadal pluripotentne, jednak bardziej zaawansowane rozwojowo (*primed*). Linie wyprowadzane z TE są multipotentne i zachowują spontaniczną zdolność do różnicowania w pochodne trofoblastu. Z PrE uzyskujemy multipotentne komórki XEN, które stanowią jeden z modeli badawczych dla embriologii ssaków, sugeruje się ich potencjalny udział w pracach nad edycją genomu (również zwierząt gospodarskich) [83,84].

W myśl nowych odkryć, być może w przyszłości definicja totipotencji będzie wymagać rewizji. Stan ten można rozpatrywać na 3 różnych poziomach, genetycznym, epigenetycznym i matczynym – czyli w odniesieniu do transkryptów zgromadzonych w oocyty. Wychodząc z tego punktu widzenia zygota nie jest totipotenna pod względem transkrypcyjnym, epigenetycznym i funkcjonalnym. Pozostaje jednak totipotenna genetycznie. Taki opis pozostaje zgodny z procesami które zachodzą w zygotie, jak aktywna de-

metylacja genomu ojcowskiego i pasywna matczyne [85]. Obydwa genomy obecne w zygocie znacznie różnią się od siebie pod względem struktury chromatyny, znaczników epigenetycznych (mają różne wzory metylacji, zarówno na poziomie DNA jak i histonów), a podczas pierwszego podziału posiadają odrębne wrzeciona kariokinetyczne [86]. Kolejnym argumentem popierającym tą teorię jest fakt iż zygota nie jest aktywna transkrypcyjnie (albo jest w nieznanym stopniu), a jej transkryptom opiera się na matczym mRNA zmagazynowanym w oocyte. Podobnie wygląda sytuacja w zarodku 2-blastomerowym, choć tu pojawiają się już pierwsze różnice międzygatunkowe. Głównym powodem jest odmienny moment aktywacji genomu zarodkowego (mysz stadium 2-komórkowe, człowiek 4–8-komórkowe, świnia 4–5-komórkowe, bydło i owca 8–16 komórkowe). Przechodzenie z matczynej kontroli molekularnej na zarodkową (wyciszenie lub degradacja matczyne mRNA) jest procesem stopniowym i nie kończy się definitywnie w momencie zajścia EGA. W tym czasie chromatyna zarodkowa ze stanu nieaktywnego przechodzi w stan umożliwiający transkrypcję. Na tym etapie większość markerów pluripotencji nie jest jeszcze aktywna (albo dopiero inicjowana jest ich ekspresja), dlatego też można spekulować, iż w pełni totipotenty stan pojawi się wraz z aktywacją różnicowania w kierunku ICM i TE [87]. W tym przypadku pojawienie się OCT4 może zostać uznane za moment osiągnięcia totipotencji przez zarodek. W zarodkach myszy (i innych gatunków, w tym bydła) jest to stadium 8 blastomerów [47,75,88]. Zatem ten nowy model zakłada, że epigenetycznie totipotenty komórki są obecne w zarodku od momentu aktywacji genomu, do inicjacji różnicowania w kierunku ICM i TE.

PODSUMOWANIE

Jak widać z powyższych rozważań nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi, a nadzieje nauki i medycyny są ogromne. Potencjał aplikacyjny komórek macierzystych wydaje się nieograniczony, od embriologii, przez badania nad nowotworami, terapię genową, po tworzenie zwierzęcych modeli chorób człowieka i uzyskiwanie zwierząt transgenicznych. Przykładowo, świnia (*Sus scrofa*) uznana jest za doskonały model do badań preklinicznych/modelowania chorób człowieka oraz terapii komórkowej. Bydło (*Bos taurus*) i bawół (*Bubalus bubalis*), gatunki o dużym znaczeniu ekonomicznym stanowią cel prac nad modelowaniem genomu i uzyskiwaniem zwierząt transgenicznych. Owce (*Ovis aries*) i kozy (*Capra aegagrus hircus*) już teraz stanowią narzędzie biotechnologii poprzez indukcję ekspresji transgenów w gruczole mlekowym – takich jak rekombinowane białka ludzkie o znaczeniu terapeutycznym. Natomiast koń (*Equus caballus*) jest brany pod uwagę w badaniach nad leczeniem urazów ścięgien i więzadeł człowieka oraz nad leczeniem urazów ortopedycznych u koni. Wiele grup badawczych prowadzi prace nad wdrożeniem technologii SC w medycynie (tak człowieka jak i zwierząt), jednak zagrożenia wynikające z braku kontroli nad komórkami macierzystymi po przeniesieniu do pacjenta nadal przeważają nad zyskami (Tab. 1). Z historii odkryć i z najnowszych badań wiadomo jednak, że aby w pełni poznać mechanizmy odpowiedzialne za uzyskanie oraz hodowlę stabilnych linii ESC/ASC/iPS ssaków (oraz ich skuteczne wykorzystanie w terapii) musimy zrozumieć procesy odpowiedzialne za

różnicowanie komórek zarodkowych. Bez tej wiedzy pozbawieni będziemy podstawowych narzędzi do weryfikacji ich stabilności, oraz nie będziemy potrafili zapewnić stałych warunków hodowli, bądź środowiska niezbędnego do różnicowania w pożądaną przez nas linię komórkową.

PIŚMIENNICTWO

1. Haeckel E (1869) *Natürliche Schöpfungsgeschichte* von Dr. Ernst Haeckel, Professor in Jena. Berlin bei Georg Reimer. 1868 S. 568. *Archiv der Pharmazie* 189: 282-283
2. Haeckel E (1877) *Anthropogenie*. Leipzig
3. Weismann A (1885) *Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung*. Jena: Gustav Fischer
4. Boveri T (1887) *Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von Ascaris megalocephala*. *Anat Anz* 2: 688-693
5. Boveri T (1892) *Sitzungsber. d. Gesellschaft f. Morphologie und Physiologie* 8
6. Maximow A (1909) *Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere*. *Folia Haematol* VIII 8: 125-134
7. Zhang Y, Gao S, Xia J, Liu F (2018) *Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap*. *Trends Cell Biol* 28: 976-986
8. Driesch H (1893) *Zur Verlagerung der Blastomeren des Echinideneies*. *Anat. Anz* 8: 3 48-357
9. De Robertis EM (2006) *Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 296-302
10. Briggs R, King TJ (1952) *Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs*. *Proc Nat Acad Sci* 38: 455-463
11. Gurdon JB (1960) *The Effects of Ultraviolet Irradiation on Uncleaved Eggs of Xenopus laevis*. *Quart J Micr Sci* 101: 299-312
12. Gurdon JB (1962) *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*. *J Embryol Exp Morph* 10: 622-640
13. Tarkowski AK (1959) *Experiments on the Development of Isolated Blastomeres of Mouse Eggs*. *Nature* 184: 1286-1287
14. Nicholas JS, Hall BV (1942) *Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs*. *J Exp Zoology* 90: 441-459
15. Seidel F (1952) *Die Entwicklungspotenzen eines isolierten Blastomeres des Zweizellen Stadiums im Säugetierei*. *Naturwissenschaften* 39
16. Tarkowski AK, Wroblewska J (1967) *Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage*. *J Embryol Exp Morphol* 18: 155-180
17. Tarkowski AK (1961) *Mouse chimeras developed from fused eggs*. *Nature* 190: 857-860
18. Bromhall JD (1975) *Nuclear transplantation in the rabbit egg*. *Nature* 258: 719-722
19. Willadsen SM (1986) *Nuclear transplantation in sheep embryos*. *Nature* 320: 63-65
20. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996) *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. *Nature* 380: 64-66
21. Solter D, Skreb N, Damjanov I (1970) *Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma*. *Nature* 227: 503-504
22. Stevens LC (1960) *Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse*. *Dev Biol* 2: 285-297
23. Mintz B, Illmensee K (1975) *Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3585-3589
24. Martin GR (1981) *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-7638
25. Evans MJ, Kaufman MH (1981) *Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos*. *Nature* 292: 154-156

26. Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N (1994) Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* 38: 385-390
27. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13726-13731
28. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147
29. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135: 1287-1298
30. Poueymirou WT, Auerbach W, Friendewey D, Hickey JF, Escaravage JM, Esau L, Dore AT, Stevens S, Adams NC, Dominguez MG, Gale NW, Yancopoulos GD, DeChiara TM, Valenzuela DM (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* 25: 91-99
31. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191-195
32. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448: 196-199
33. Ghimire S, Van der Jeught M, Neupane J, Roost MS, Anckaert J, Popovic M, Van Nieuwerburgh F, Mestdagh P, Vandesompele J, Deforce D, Menten B, Chuva de Sousa Lopes S, De Sutter P, Heindryckx B (2018) Comparative analysis of naive, primed and ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells originating from the same genetic background. *Sci Rep* 8: 5884
34. Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL (1994) Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp* 182: 157-168; discussion 168-178
35. Turnpenny L, Brickwood S, Spalluto CM, Piper K, Cameron IT, Wilson DI, Hanley NA (2003) Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. *Stem Cells* 21: 598-609
36. Tsung HC, Du ZW, Rui R, Li XL, Bao LP, Wu J, Bao SM, Yao Z (2003) The culture and establishment of embryonic germ (EG) cell lines from Chinese mini swine. *Cell Res* 13: 195-202
37. Park TS, Han JY (2000) Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Reprod Dev* 56: 475-482
38. Pelosi E, Forabosco A, Schlessinger D (2011) Germ cell formation from embryonic stem cells and the use of somatic cell nuclei in oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1221: 18-26
39. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126: 663-676
40. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K (2008) Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2: 230-240
41. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872
42. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920
43. Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem AC (1998) Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 13: 1606-1612
44. Gray D, Plusa B, Piotrowska K, Na J, Tom B, Glover DM, Zernicka-Goetz M (2004) First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization. *Curr Biol* 14: 397-405
45. Miyoshi K, Kono T, Niwa K (1997) Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 56: 180-185
46. Barnes FL, Eyestone WH (1990) Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33: 141-152
47. Piliszek A, Madeja ZE (2018) Pre-implantation Development of Domestic Animals. *Curr Top Dev Biol* 128: 267-294
48. Van Soom A, Ysebaert MT, De Kruif A (1997) Relationship Between Timing of Development, Morula Morphology, and Cell Allocation to Inner Cell Mass and Trophectoderm in In Vitro-Produced Bovine Embryos. *Mol Reprod Dev* 47: 47-56
49. Johnson MH, Ziomek CA (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24: 71-80
50. Kong Q, Yang X, Zhang H, Liu S, Zhao J, Zhang J, Weng X, Jin J, Liu Z (2020) Lineage specification and pluripotency revealed by transcriptome analysis from oocyte to blastocyst in pig. *FASEB J* 34: 691-705
51. van Leeuwen J, Berg DK, Pfeffer PL (2015) Morphological and Gene Expression Changes in Cattle Embryos from Hatched Blastocyst to Early Gastrulation Stages after Transfer of In Vitro Produced Embryos. *PLoS One* 10: e0129787
52. van Leeuwen J, Rawson P, Berg DK, Wells DN, Pfeffer PL (2020) On the enigmatic disappearance of Rauber's layer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 16409-16417
53. Pfeffer PL (2018) Building Principles for Constructing a Mammalian Blastocyst Embryo. *Biology (Basel)* 7: 41
54. Waddington CH (1957) The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. George Allen & Unwin, Ltd., London
55. Saiz N, Plusa B (2013) Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction* 145: R65-R80
56. Plusa B, Hadjantonakis AK (2016) Mammalian development: Mechanics drives cell differentiation. *Nature* 536: 281-282
57. Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y (2003) Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358: 1341-1349
58. Plusa B, Hadjantonakis AK (2018) Cell Fate in Mammalian Development. *Curr Top Dev Biol* 128: 2-390
59. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123: 917-929
60. Grabarek JB, Zyzynska K, Saiz N, Piliszek A, Frankenberg S, Nichols J, Hadjantonakis AK, Plusa B (2012) Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the ICM of the early mouse embryo. *Development* 139: 129-139
61. Degrelle SA, Campion E, Caban C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard JP, Hue I (2005) Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev Biol* 288: 448-460
62. Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K (2010) Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod* 16: 135-152
63. Bazer FW, Johnson GA (2014) Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation* 87: 52-65
64. Stout TA, Meadows S, Allen WR (2005) Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Anim Reprod Sci* 87: 269-281
65. Croce JC, McClay DR (2008) Evolution of the Wnt pathways. *Methods Mol Biol* 469: 3-18
66. Kemp CR, Hendrickx MEW, Wawrzak D, Metioui M, Leyns L (2007) The roles of Wnt signaling in early mouse development and embryonic stem cells. *Funct Dev Embryol* 1: 1113-1119
67. Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki EM, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, Sasaki H (2009) The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 16: 398-410

68. Artus J, Hadjantonakis AK (2012) Troika of the Mouse Blastocyst: Lineage Segregation and Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Theor* 7: 78-91
69. Kuijk EW, van Tol LT, Van de Velde H, Wubbolts R, Welling M, Geijsen N, Roelen BA (2012) The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 139: 871-882
70. Menchero S, Rayon T, Andreu MJ, Manzanares M (2017) Signaling Pathways in Mammalian Preimplantation Development: Linking Cellular Phenotypes to Lineage Decisions. *Dev Dyn* 246: 245-261
71. Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379-391
72. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113: 643-655
73. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development* 132: 2093-2102
74. Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J (2006) Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* 10: 615-624
75. Plusa B, Piliszek A, Frankenberg S, Artus J, Hadjantonakis AK (2008) Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 135: 3081-3091
76. Lu CW, Yabuuchi A, Chen L, Viswanathan S, Kim K, Daley GQ (2008) Ras-MAPK signaling promotes trophoblast formation from embryonic stem cells and mouse embryos. *Nat Genet* 40: 921-926
77. Buehr M (2002) Rapid Loss of Oct-4 and Pluripotency in Cultured Rodent Blastocysts and Derivative Cell Lines. *Biology of Reproduction* 68: 222-229
78. Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453: 519-523
79. Madeja ZE, Hryniewicz K, Orsztynowicz M, Pawlak P, Perkowska A (2015) WNT/ β -catenin signalling affects cell lineage and pluripotency specific gene expression in bovine blastocysts – prospects for bovine ESC derivation. *Stem Cells Dev* 24: 2437-2454
80. Madeja ZE, Warzych E, Pawlak P, Lechniak D (2019) Inhibitor mediated WNT and MEK/ERK signalling affects apoptosis and the expression of quality related genes in bovine in vitro obtained blastocysts. *Biochem Biophys Res Commun* 510: 403-408
81. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10: 55-63
82. Morgani SM, Canham MA, Nichols J, Sharov AA, Migueles RP, Ko MS, Brickman JM (2013) Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell Rep* 3: 1945-1957
83. Niakan KK, Schrode N, Cho LT, Hadjantonakis AK (2013) Derivation of extraembryonic endoderm stem (XEN) cells from mouse embryos and embryonic stem cells. *Nat Protoc* 8: 1028-1041
84. Park CH, Jeoung YH, Uh KJ, Park KE, Bridge J, Powell A, Li J, Pence L, Zhang L, Liu T, Sun HX, Gu Y, Shen Y, Wu J, Izpisua Belmonte JC, Telugu BP (2021) Extraembryonic Endoderm (XEN) Cells Capable of Contributing to Embryonic Chimeras Established from Pig Embryos. *Stem Cell Rep* 16: 212-223
85. Guo F, Li X, Liang D, Li T, Zhu P, Guo H, Wu X, Wen L, Gu T-P, Hu B, Walsh Colum P, Li J, Tang F, Xu G-L (2014) Active and Passive Demethylation of Male and Female Pronuclear DNA in the Mammalian Zygote. *Cell Stem Cell* 15: 447-459
86. Reichmann J, Nijmeijer B, Hossain MJ, Eguren M, Schneider I, Politi AZ, Roberti MJ, Hufnagel L, Hiiragi T, Ellenberg J (2018) Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science* 361: 189-193
87. Hu K (2019) On Mammalian Totipotency: What Is the Molecular Underpinning for the Totipotency of Zygote? *Stem Cells Dev* 28: 897-906
88. Madeja ZE, Sosnowski J, Hryniewicz K, Warzych E, Pawlak P, Rozwadowska N, Plusa B, Lechniak D (2013) Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC Dev Biol* 13: 32

Factors necessary to secure stem cell stability

Zofia E. Madeja✉

Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences

✉corresponding author: zofia.madeja@up.poznan.pl

Key words: stem cells, pluripotency, signalling pathways

ABSTRACT:

Obtaining stable embryonic stem cells (ESC) from animals and humans opens up a wide spectrum of opportunities for science and regenerative medicine. The basic procedures necessary to obtain ESC are universal for all mammalian species. The challenge is to maintain species specific conditions required to support pluripotency characteristic for the pre-implantation embryo. To date, true ESC lines (stable in culture, pluripotent with high differentiation potential) have been obtained only for a limited number of species such as, mice, human and rats. The main obstacles arise from species specific differences, and thus different environmental requirements. However, in all cases, it is essential to maintain the activity of pluripotency related signalling pathways (WNT, MAPK/ERK and JAK/STAT3). The classical system dedicated to obtain mouse and human ESCs dependant on LIF (mice) or FGF (human) is not optimal. Currently, ESC derivation systems are based on chemical inhibitors that have the ability to interact with the above-mentioned pathways. This manuscript introduces the key factors important for understanding the nature of various types of stem cells (not only those of embryonic origin), and explains why there is no one way to obtain pluripotency, and why the definition of a stem cell is not universal.

