

KULE ZARODKOWE JAKO METODA RÓŻNICOWANIA PLURIPOTENCJALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH W MIOBLASTY

EMBRYOID BODIES AS A METHOD ALLOWING MYOGENIC DIFFERENTIATION OF PLURIPOTENT STEM CELLS

Areta Magda CZERWIŃSKA, Maria Anna CIEMERYCH

Zakład Cytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Komórki pluripotencjalne – ES i iPS, zdolne są do różnicowania w różne rodzaje komórek. *In vivo* biorą one udział w tworzeniu wszystkich tkanek i narządów budujących organizm ssaka. Stosując odpowiednie metody hodowli *in vitro* uzyskano z nich wiele rodzajów komórek, np. neurony czy kardiomiocyty. Jednak mimo intensywnych badań uzyskanie takich komórek jak mioblasty mięśni szkieletowych ciągle sprawia trudności. Jedną z metod wykorzystywanych do indukcji różnicowania komórek pluripotencjalnych jest ich hodowla w postaci kul zarodkowych – trójwymiarowych agregatów, w których spontanicznie dochodzi do powstania ekto-, endo- i mezodermy. Prezentowana praca opisuje historię wykorzystania kul zarodkowych w badaniach nad różnicowaniem komórek pluripotencjalnych. Podsumowuje także wyniki badań, w których wykorzystano kule zarodkowe w doświadczeniach mających na celu uzyskanie mioblastów mięśni szkieletowych.

Słowa kluczowe: pluripotencja, komórki macierzyste, różnicowanie, kule zarodkowe, mioblasty

Summary: Pluripotent stem cells, i.e. ES and iPS cells are able to differentiate into various cell types. This ability was tested both *in vivo* and *in vitro*. *In vivo* such cells were able to contribute to all tissues and organs building mammalian organism. *In vitro*, under controlled culture conditions, they were able to differentiate into various cell types, e.g. neurons or cardiomyocytes. However, some cell types are still difficult to be derived. Among them are skeletal myoblasts. Spontaneous differentiation of pluripotent stem cells can be induced within embryoid bodies, i.e. three-dimensional aggregates in that stem cells differentiate into ecto-, endo-, and mesoderm. Presented review summarizes the history of investigations in that embryoid bodies have been used to differentiate various types of pluripotent stem cells. It also summarizes the studies in that embryoid bodies served as a source of cells differentiating into skeletal muscle myoblasts.

Key words: pluripotency, stem cells, differentiation, embryoid bodies, myoblasts

WSTĘP

Ciężkie urazy czy choroby takie jak dystrofie mięśniowe prowadzą do zaburzeń funkcjonowania mięśni poprzecznie prążkowanych. W przypadku dystrofii powtarzające się fazy degeneracji i odbudowy uszkodzonej tkanki prowadzą do wyczerpania puli komórek prekursorowych mięśni, tzw. komórek satelitowych odpowiedzialnych za ich regenerację. Jednym z proponowanych sposobów terapii dystroficznych lub uszkodzonych mięśni jest przeszczepienie komórek, które mogłyby zastąpić brakujące komórki prekursorowe. Duże nadzieje na ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej wiąże się z komórkami pluripotencjalnymi. Zanim jednak komórki te będą mogły zostać wykorzystane w terapii, konieczne jest ich szczegółowe scharakteryzowanie oraz poznanie mechanizmów rządzących ich różnicowaniem w mioblasty. W związku z tym w wielu laboratoriach na świecie trwają prace mające na celu opracowanie bezpiecznej i wydajnej metody indukcji różnicowania komórek pluripotencjalnych w mioblasty.

PLURIPOTENCJALNE KOMÓRKI MACIERZYSZE

Pluripotencjalne komórki macierzyste to komórki, z których mogą powstać wszystkie komórki i tkanki budujące organizm, w tym komórki płciowe [10, 62, 76]. W przypadku komórek zwierzęcych stwierdzono to uzyskując chimerowe zwierzęta i wykazując, że wszystkie tkanki i narządy powstały przy udziale różnicujących komórek pluripotencjalnych. Co niezwykle istotne, ten sposób analizy komórek pluripotencjalnych pozwala także stwierdzić, czy są one w stanie różnicować w gamety [20]. Zwierzęce oraz ludzkie komórki testowano również wprowadzając je pod skórę myszy. Współcześnie tego typu badania przeprowadza się z wykorzystaniem myszy SCID (ang. *Severe Combined ImmunoDeficient*) lub nude, a więc takich których odporność immunologiczna jest obniżona. Umieszczone w organizmie komórki pluripotencjalne mogą różnicować i tworzyć guzy zwane potworniakami lub teratomami (od gr. *teratos* – potwór). Potworniaki zbudowane są z wielu różnych tkanek zarówno pochodzenia ekto-, endo-, jak i mezodermalnego [29]. Zdolność komórek do różnicowania w komórki wszystkich tkanek można również stwierdzić wykorzystując techniki pozwalające na indukcję ich różnicowania w hodowli *in vitro*.

Stosując wymienione metody wykazano, że na miano pluripotencjalnych zasługuje jedynie kilka rodzajów komórek. Są to: 1) komórki raka zarodkowego – EC (ang. *Embryonic Carcinoma*) uzyskiwane z potworniaków; 2) zarodkowe komórki macierzyste – ES (ang. *Embryonic Stem*) uzyskiwane z przedimplantacyjnych zarodków ssaków; 3) komórki EpiS (ang. *Epiblast Stem*) uzyskiwane z postimplantacyjnych zarodków ssaków, z epiblastu czyli tkanki, z której powstaje ciało zarodka

[23, 54]; 4) indukowane komórki pluriipotencjalne – iPS (ang. *induced Pluripotent Stem*) uzyskiwane z komórek somatycznych, w których doprowadzono do nadekspresji kluczowych genów regulujących pluripotencję. W przypadku pierwszych uzyskanych mysich i ludzkich komórek iPS były to geny kodujące Oct3/4, Klf4, Sox2 oraz c-Myc [1, 65, 66]. Próby izolacji innych populacji komórek, np. obecnych w organizmach dorosłych, które można byłoby hodować *in vitro* i które charakteryzowałaby zdolność do różnicowania we wszystkie tkanki budujące organizm ssaka, nie zakończyły się dotychczas sukcesem. Do grona komórek, których pluripotencja jest sugerowana, ale nie została jeszcze udowodniona, możemy zaliczyć komórki VSEL (ang. *Very Small Embryonic-Like*) [34, 51-53, 58, 81] oraz komórki MUSE (ang. *Multilineage-differentiating Stress-Enduring*) [35]. Dotychczas wykazano, że zarówno komórki VSEL jak i MUSE syntetyzują markery pluripotencji, a *in vitro* mogą różnicować w komórki ektodermalne (syntetyzujące nestynę czy neurofilament M), mezodermalne (syntetyzujące aktyninę, troponinę I i desminę) oraz endodermalne (syntetyzujące charakterystyczny dla trzustki peptyd C lub specyficzną dla komórek nabłonkowych cytokeratynę 7) [33-35]. Komórki VSEL są również w stanie różnicować *in vivo*. Na przykład ich transplantacja do uszkodzonego zawałem mięśnia sercowego prowadziła do poprawy jego funkcjonowania [16]. Jednak ani komórki VSEL, ani MUSE nie przeszły z sukcesem najbardziej kluczowych dla udowodnienia pluripotencji testów *in vivo* – nie uzyskano z nich ani zwierząt chimerowych, ani też potworniaków. W przypadku komórek VSEL prawdopodobna przyczyna niepowodzeń wiąże się ze specyficznym dla nich wzorem ekspresji genów, między innymi kodujących białka zaangażowane w regulację cyklu komórkowego [58]. Z kolei to, jakie geny są ekspresjonowane zależy w dużym stopniu od wzoru ich metylacji, który w przypadku komórek VSEL jest charakterystyczny dla pierwotnych komórek płciowych, czyli takich z których powstaną gamety, a nie dla komórek ES [58].

Komórki ES uzyskano dotychczas między innymi z zarodków myszy [25, 42], szczura [7, 38, 72], rezusa [69], marmozety zwyczajnej [55, 70] oraz człowieka [68]. Natomiast komórki iPS z komórek myszy [66], człowieka [65], rezusa [40], szczura [39], świni [26] oraz krowy [61]. Uzyskano również ptasie (przepiórcze) komórki iPS [41]. W przypadku wielu wymienionych wyżej komórek ES i iPS wykazano, że są one w stanie brać udział w tworzeniu wszystkich tkanek i narządów podczas rozwoju zarodkowego zwierząt. Co ciekawe, wykorzystując te komórki uzyskano nie tylko chimerowe myszy (np. [66]) czy szczury (np. [72]), ale także świnię [74], rezusy [63] i przepiórki [41]. Większość wymienionych komórek analizowano także w badaniach *in vivo*, w których uzyskiwano z nich potworniaki, ale także różnicowano je *in vitro*. Pluripotencja komórek ES i iPS czyni z nich doskonały model do analizy różnicowania zarówno komórek normalnych, jak i zmodyfikowanych genetycznie. Można je także wykorzystywać w badaniach patogenezy chorób czy też w analizach toksykologicznych.

RÓŻNICOWANIE KOMÓREK PLURIPOTENCJALNYCH W KULACH ZARODKOWYCH

Prowadzone *in vitro* badania komórek pluripotencjalnych wymagają zastosowania odpowiednich metod umożliwiających uzyskiwanie wybranego rodzaju komórek. Jedną z nich jest technika pozwalająca na różnicowanie komórek ES lub iPS w tzw. kulach zarodkowych. Kule zarodkowe to trójwymiarowe agregaty, w których komórki pluripotencjalne różnicują w sposób odzwierciedlający wczesne etapy rozwoju zarodkowego. Początkowo tworzą one lite struktury, w których zewnętrzne komórki przypominają warstwę endodermy pierwotnej [10]. Wnętrze kuli wypełniają natomiast komórki ektodermalne. Dłuższa hodowla takich sferycznych struktur prowadzi do dalszego różnicowania, w wyniku czego powstają komórki mezodermalne. Ich pojawienie się indukuje wykształcenie struktur przypominających pęcherzyk żółtkowy. W ścianach takich pęcherzyków, podobnie jak to się dzieje podczas rozwoju zarodkowego, powstają wysepki krwiotwórcze. Na późniejszym etapie hodowli w kulach mogą tworzyć się grupy kurczących się kardiomiocytów [18]. Pierwsze doniesienia na temat powstawania kul zarodkowych dotyczyły komórek raka zarodkowego. Badania raka zarodkowego i tworzących go komórek były możliwe jedynie dzięki dootrzewnowemu przeszczepianiu fragmentów guza pomiędzy osobnikami myszy. Komórki z przeszczepionych fragmentów raka zarodkowego tworzyły lite guzy oraz zawieszono w płynie otrzewnowym sferyczne agregaty zawierające komórki różnicujące w wiele rodzajów tkanek, wśród nich np. nabłonkową, mięśniową, nerwową. Struktury te nazwano kulami zarodkowymi [49, 60]. Po uzyskaniu po raz pierwszy linii mysich komórek raka zarodkowego, sprawdzono ich potencjał do różnicowania stosując metodę dootrzewnowych transplantacji [24, 32]. Mysie komórki EC hodowane *in vitro* bez warstwy komórek odżywczych również różnicowały tworząc kule zarodkowe [43]. Ponadto, kule zarodkowe które w początkowych etapach hodowli były swobodnie zawieszono w pożywce, mogły ulegać adhezji do podłoża. W takim przypadku migrujące z nich komórki tworzyły rozrosty, a następnie dochodziło do powstawania takich tkanek jak: nabłonkowa, nerwowa, czy chrzęstna [43]. W dalszej kolejności wykazano, że również ludzkie komórki EC są w stanie różnicować *in vitro* tworząc kule zarodkowe [19]. Obecnie technika ta wykorzystywana jest powszechnie w badaniach mysich oraz ludzkich komórek ES i iPS (np. [36, 37]).

Metoda tworzenia kul zarodkowych stała się więc sposobem na weryfikację pluripotencji badanych komórek. Aby sprawdzić, czy rzeczywiście różnicowanie w kulach zarodkowych odzwierciedla zmiany towarzyszące kolejnym etapom rozwoju zarodkowego przeanalizowano ekspresję genów charakterystycznych dla wybranych rodzajów komórek czy tkanek. Podczas analiz różnicujących w kulach zarodkowych mysich komórek ES określono ekspresję genów specyficznych dla ektodermy (*Oct-3/4*, *Fgf-5*), pierwotnej endodermy (*Gata-4*), mezodermy (*T*, *Nodal*),

pęcherzyka żółtkowego (gen kodujący α -fetoproteinę) oraz genów charakterystycznych dla komórek z bardziej zaawansowanych etapów rozwoju: np. *Flk-1* (komórki prekursorowe śródbłonna), *Nkx-2.3* (komórki prekursorowe kardiomiocytów), *Eklf* (komórki linii erytroidalnej), *Msx3* (komórki linii neuronalnej) (praca przeglądowa [29]). Wyniki tych analiz pokazały, że procesy zachodzące w ciągu pierwszych 3 dni hodowli kul zarodkowych odzwierciedlają rozwój przedgastrulacyjny zarodka myszy. Kule 3-5 dniowe odpowiadają zarodkom w czasie gastrulacji, a ich dłuższa hodowla skutkuje różnicowaniem komórek w takie, które tworzą takie tkanki jak np. wyspecjalizowane nabłonki, mięsień sercowy, neurony (praca przeglądowa [29]). W analogiczny sposób wykazano, że również ludzkie komórki ES hodowane w kulach zarodkowych różnicują w sposób odzwierciedlający wczesną embriogenezę. Podczas ich analizy wykryto ekspresję genów kodujących białka związane z różnicowaniem komórek pęcherzyka żółtkowego (α -fetoproteina), linii hematopoetycznej (ζ -globina), nerwowych (neurofilament 68Kd) oraz mięśnia sercowego (α -aktynina sercowa) i tym samym dowiedziono pluripotencji ludzkich komórek ES [30]. Podobieństwo różnicowania komórek w kulach zarodkowych i podczas rozwoju umożliwiło ich wykorzystanie w badaniach procesów zachodzących w rozwijającym się zarodku. Ponadto, realne stały się analizy funkcji genów kluczowych dla wczesnych etapów rozwoju, np. przez wyciszanie ich ekspresji, a następnie analizę fenotypu kul powstających z tak zmodyfikowanych komórek. Przykładowo, pozbawienie komórek obu funkcjonalnych alleli genu kodującego desminę zapobiega różnicowaniu komórek ES w mioblasty mięśni gładkich i szkieletowych, ale nie w mioblasty mięśnia sercowego [73]. Prowadzone są również badania wpływu nadekspresji wybranych czynników wzrostu lub czynników transkrypcyjnych na różnicowanie komórek (prace przeglądowe [11, 29]). Stosując taki model badawczy wykazano m.in. że zwiększona synteza insulinopodobnego czynnika wzrostu II (ang. *Insulin-like Growth Factor-II*, IGF-II) przyspiesza różnicowanie miogeniczne mysich komórek ES [50]. Analizowano także wpływ wybranych substancji, takich jak np. dimetylosulfotlenek czy kwas retinowy, na przebieg różnicowania komórek w kulach zarodkowych [21, 22].

WARUNKI HODOWLI KUL ZARODKOWYCH I ICH WPŁYW NA PRZEBIEG RÓŻNICOWANIA KOMÓREK PLURIPOTENCJALNYCH

Aby utrzymać komórki ES lub iPS w stanie nieodróżnicowanym, standardowo hoduje się je na warstwie komórek odżywczych. Najczęściej są to inaktywowane fibroblasty, czyli takie w których wywołano uszkodzenia w DNA i spowodowano, że stały się one niezdolne do podziałów komórkowych. Ponadto, do pożywki hodowlanej dodaje się czynnik przeciwbiałaczkowy (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*;

LIF) w przypadku komórek mysich, lub zasadowy fibroblastowy czynnik wzrostu (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*; bFGF) w przypadku komórek ludzkich [10, 76]. Tradycyjna metoda tworzenia kul zarodkowych, wykorzystana po raz pierwszy podczas badań komórek EC oraz analiz pluripotencji pierwszych linii mysich komórek ES, wymaga hodowli bez warstwy komórek odżywczych, w pożywce niezawierającej czynników niezbędnych do utrzymania pluripotencji. W takich warunkach komórki tworzą spontanicznie agregaty. W celu zwiększenia powtarzalności metody i zapewnienia odpowiednich warunków dla różnicowania w pożądanym rodzaju komórek zaproponowano wiele modyfikacji tej procedury. Jedną z nich jest hodowla w tzw. wiszących kroplach, która zapewnia tworzenie kul z określonej liczby komórek (prace przeglądowe [29, 78]). Polega ona na umieszczeniu określonej liczby komórek w kropli pożywki zawieszzonej na wieczku szalki hodowlanej, a następnie umieszczenie wieczka nad szalką wypełnioną solą fizjologiczną. Możliwe są również hodowle kul zarodkowych w zawieszynie w naczyniach obrotowych, utrudniających adhezję komórek do podłoża [8, 56]. Po kilku dniach hodowli w zawieszynie dalsze różnicowanie można prowadzić w rozrostach, które powstają po przeniesieniu kul zarodkowych na szalki pokryte żelatyną lub białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Do tak przygotowanego podłoża kule łatwo przylegają, co umożliwia migrowanie komórek i tworzenie rozrostów. Hodowla przestrzenna staje się hodowlą warstwową na płaskim podłożu, co umożliwia powstawanie oddziaływań komórek z podłożem, a nie tylko z sąsiadującymi komórkami, i wpływa na przebieg różnicowania.

Znaczący wpływ na efekt różnicowania komórek ES lub iPS ma skład pożywki hodowlanej. Standardowo do hodowli kul zarodkowych, zarówno uzyskanych z mysich jak i z ludzkich komórek, stosuje się pożywkę pozbawioną czynników niezbędnych do utrzymania pluripotencji. Zazwyczaj są to DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) lub IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) uzupełnione płodową surowicą bydlęcą (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS), pirogromianem sodu, roztworem aminokwasów, L-glutaminą, antybiotykami oraz β -merkaptanołem lub monotioglicerolem. Dodatkowo, aby indukować różnicowanie komórek, można wzbogacić środowisko hodowlane selenem, albuminą surowicy bydlęcej oraz transferyną. Taką technikę wykorzystali Wobus i wsp. w 1994 roku (praca przeglądowa [29]). Co ciekawe, na wynik różnicowania może wpływać stężenie glukozy w środowisku. Podczas gdy w pożywce o wysokim stężeniu glukozy (25 mM) komórki w kulach zarodkowych różnicują w takie rodzaje komórek jak komórki endodermalne, neurony i kardiomiocyty, niskie stężenie glukozy (5,5 mM) stymuluje przede wszystkim różnicowanie w komórki linii nerwowej, wykazujące ekspresję β -III tubuliny, nestyny i MAP2 (ang. *Microtubule-Associated Protein 2*) [45]. Należy również pamiętać, że skład surowicy wykorzystywanej w badaniach jest zmienny, co może wpływać na proces różnicowania w sposób niezależny od eksperymentatora. W związku z tym można rozważać hodowlę w pożywce bez

surowicy lub takie jej przygotowanie, które doprowadzi do degradacji hormonów i czynników wzrostu. Można to osiągnąć poprzez traktowanie surowicy węglem drzewnym pokrytym dekstranem lub też inaktywację termiczną. Można również stosować komercyjnie dostępny zamiennik surowicy – SR (ang. *Serum Replacement*). Wiadomo jednak, że jego wykorzystanie może obniżać zdolność komórek ES do różnicowania. W celu wywołania różnicowania komórek ES w kulach zarodkowych w pożądanym rodzaju komórek, do pożywki dodawane są różne suplementy. Te same związki, stosowane w różnych stężeniach, mogą być używane do uzyskiwania różnych rodzajów komórek. Na przykład do indukcji różnicowania mysich komórek ES hodowanych w kulach zarodkowych w neurony stosuje się insulinę, transferynę i selen oraz fibronektynę. Insulina, transferyna i selen wykorzystywane są także w protokole opracowanym do różnicowania ludzkich komórek ES w mioblasty, w tradycyjnej hodowli na podłożu [4, 59]. Również kwas retinowy (RA) używany jest zarówno do otrzymywania komórek nerwowych [2, 27], jak i do indukcji różnicowania w komórki mięśniowe [31]. Badania Wobus i wsp. (1994) pokazały, że dodatek RA w stężeniu 10^{-7} powoduje zmniejszenie udziału mioblastów mięśni szkieletowych wśród populacji zróżnicowanych komórek w porównaniu do komórek kontrolnych, hodowanych w pożywce bez RA. Z drugiej jednak strony, dodanie do pożywki hodowlanej RA w stężeniu 10^{-8} powoduje podwojenie, a w stężeniu 10^{-9} – potrojenie liczby uzyskanych mioblastów mięśni szkieletowych (praca przeglądowa [29]). Również moment rozpoczęcia hodowli kul zarodkowych w pożywce zawierającej RA wpływa na proporcje pomiędzy rodzajami komórek uzyskanymi w wyniku różnicowania. Jeśli pomiędzy 2 a 5 dniem hodowli kule zarodkowe umieszczono w pożywce zawierającej 10^{-8} lub 10^{-7} RA, uzyskiwano mioblasty mięśni szkieletowych oraz neurony. Natomiast, jeśli pożywkę zawierającą RA stosowano dopiero od 5 dnia hodowli, uzyskiwano zwiększenie udziału kardiomiocytów (praca przeglądowa [29]). Jak już wspomniano, w sprzyjających warunkach kule zarodkowe mogą ulegać adhezji do podłoża i tworzyć rozrosty. Rohwedel i wsp. (1994) wykazali, że w takim przypadku znaczenie ma także moment przeniesienia kul zarodkowych z hodowli w zawieszynie do hodowli na podłożu (praca przeglądowa [29]).

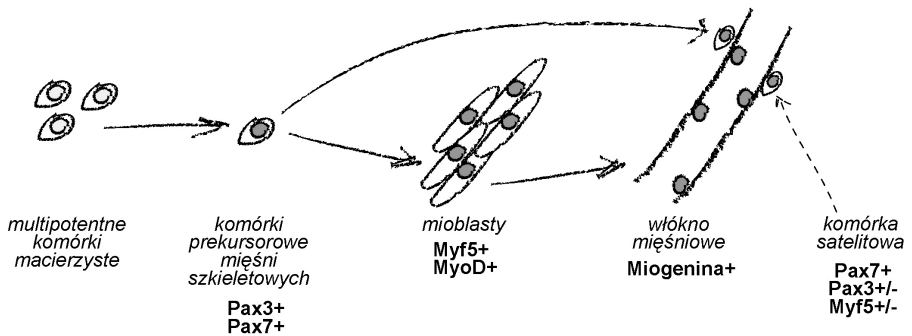
Biorąc pod uwagę ogół czynników jakie należy uwzględnić planując indukcję różnicowania komórek ES nie powinno dziwić, że ukierunkowanie tego procesu i uzyskanie pożądanego rodzaju komórek jest trudne i rzadko zachodzi wydajnie. Istotną komplikację stanowi fakt, że nie wszystkie linie komórek ES lub iPS charakteryzuje ten sam potencjał do różnicowania. Już w 1994 roku Rohwedel i wsp. wykazali, że linia komórek ES o nazwie BLC6, uzyskana z myszy szczepu 129/ter Sv, nie różnicuje w kardiomiocyty, ale za to łatwiej można z niej uzyskać mioblasty mięśni szkieletowych (praca przeglądowa [29]). Porównanie analiz ekspresji genów przeprowadzonych technikami mikromacierzy wykazały, że linie komórek ES i iPS (nawet te uzyskiwane na jednej uczelni!) różnią się od siebie znacząco [46].

Różnice te mogą wynikać z odmiennych modyfikacji epigenetycznych badanych komórek [6]. W przypadku komórek iPS na różnice w ekspresji genów może także wpływać ich „pochodzenie”, a więc to z jakiego rodzaju komórek je uzyskano [3, 5, 47, 48], a także jak wielu pasażom w hodowli *in vitro* je poddano [47]. W efekcie różne linie pluripotencjalnych komórek może charakteryzować odmienna wydajność różnicowania w komórki wybranych tkanek.

RÓŻNICOWANIE KOMÓREK PLURIPOTENCJALNYCH W MIOBLASTY

Strategię różnicowania komórek ES należy dobrać w zależności od tego, jakie komórki mają być uzyskane. Przykładowo, stosunkowo łatwo otrzymuje się komórki linii hematopoetycznej. Można je uzyskać hodując komórki ES w metylcelulozie, w której tworzą kolonie-agregaty [75]. Z drugiej strony, jednym z rodzajów komórek, które najtrudniej uzyskać są mioblasty mięśni szkieletowych. W większości opisanych doświadczeń mioblasty uzyskiwano stosując technikę kul zarodkowych. Głównym celem takich doświadczeń jest odtworzenie ciągu zdarzeń, które następują podczas miogenezy w rozwoju zarodkowym. W kulach zarodkowych można doprowadzić do uzyskania komórek o fenotypie charakterystycznym dla mezodermy przyosiowej. Komórki te charakteryzuje ekspresja receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu α (ang. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor α* , PDGFR α) i brak syntezy receptora śródbłonkowego czynnika wzrostu (Flk1) [67, 79]. W trakcie rozwoju zarodkowego z komórek o takim fenotypie powstają prekursorzy mioblastów, które następnie syntetyzują czynniki transkrypcyjne Pax3 i Pax7, a więc białka które są kluczowymi regulatorami miogenezy. Komórki prekursorowe mioblastów różnicują w mioblasty syntetyzując białka z grupy mięśniowych czynników regulatorowych (Myf5, MyoD, Miogenina, Mrf4) (ryc. 1). Następuje fuzja mioblastów, w wyniku której powstają miotuby, a w nich dochodzi do ekspresji białek strukturalnych mięśni (ciężkie i lekkie łańcuchy miozyny, kinaza kreatyninowa, desmina) [64]. Otwartym pozostaje pytanie, jak zaindukować różnicowanie komórek pluripotencjalnych, takich jak ES lub iPS, aby w sposób powtarzalny i wydajny można było uzyskać populację komórek prekursorowych mięśni, a następnie funkcjonalne miotuby. Zaprojektowanie odpowiedniej procedury umożliwiłoby nie tylko dokładne zbadanie mechanizmów rządzących tym procesem, ale także dałoby nadzieję na opracowanie terapii komórkowych uszkodzonych mięśni, a w dalszej kolejności również chorób mięśniowych, na przykład dystrofii.

Jak już wspomniano, w celu różnicowania komórek pluripotencjalnych w mioblasty często stosuje się technikę tworzenia kul zarodkowych. Ponieważ spontanicz-



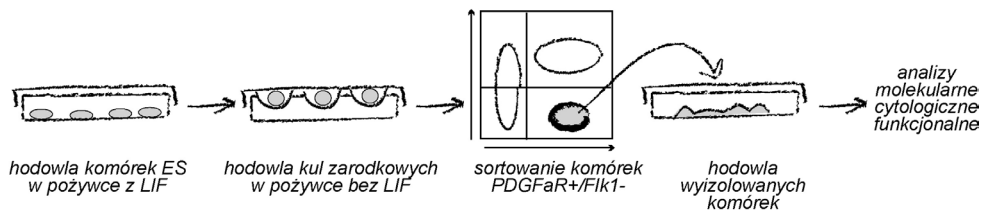
RYCINA 1. Różnicowanie komórek prekursorowych mięśni szkieletowych. Podczas rozwoju zarodkowego ssaka z mezodermalnych multipotentnych komórek macierzystych powstają komórki prekursorowe mięśni szkieletowych (Pax3+Pax7+), które następnie różnicują w mioblasty (Myf5+MyoD+). W wyniku fuzji mioblastów powstają najpierw miotuby (Miogenina+), które dojrzewają we włókna mięśniowe. Część spośród komórek prekursorowych nie różnicuje, tylko tworzy populację zdolnych do samoodnawiania komórek macierzystych mięśnia szkieletowego – komórek satelitowych (Pax7+) (Pax7+), i.e. skeletal muscle stem cells

ne różnicowanie komórek w mioblasty charakteryzuje niska wydajność, pożywkę w której hodowane są kule zarodkowe wzbogaca się różnymi suplementami. Wśród stosowanych substancji są np.: wspomniany już kwas retinowy [77], aktywina A stosowana łącznie z kwasem askorbinowym [71], czy surowica końska (ang. *Horse Serum*, HS) [9]. Wykorzystywany jest także inhibitor metylotransferaz DNA (5-aza-cytydyna [80]) który wpływa na epigenetyczną modyfikację DNA, a tym samym na ekspresję genów. Stwierdzono, że w rozrostach powstałych z kul zarodkowych traktowanych 5-aza-cytydyną, udział komórek syntetyzujących Pax7 i MyoD był większy niż w rozrostach z kul nietraktowanych tym związkiem [80]. Niestety, czynniki niespecyficznie zaburzające metylację DNA modulują różnicowanie komórek w sposób niekontrolowany i mało powtarzalny. Najbardziej obiecujące wyniki osiągnięto różnicując w kulach zarodkowych komórki ES i iPS, w których doprowadzono do nadekspresji czynników miogenicznych, takich jak Pax3, Pax7 czy MyoD [12-15, 17, 57]. Na szczególne zainteresowanie zasługuje jedna z pierwszych prób uzyskania mioblastów z mysich komórek ES, w której wykorzystano komórki konstytutywnie syntetyzujące MyoD. Wykazano wtedy, że komórki ES nadekspresyjujące *MyoD* w hodowli na podłożu różnicowały w ten sam sposób, jak komórki niemodyfikowa-

ne. Znaczy to, że te komórki w warunkach hodowli standardowych dla komórek pluripotencjalnych nie różnicowały, a w środowisku sprzyjającym różnicowaniu miogenicznemu różnicowały spontanicznie w różne tkanki, jednak nie zaobserwowano powstawania mioblastów. Sukces przyniosło dopiero utworzenie z komórek nadeksprymujących *MyoD* kul zarodkowych w pożywce promującej różnicowanie miogeniczne (z dodatkiem HS i insuliny). Z kul tych uzyskano rozrosty, w których 20-50% komórek stanowiły mioblasty [17]. Sugeruje to, że różnicowanie przebiega odpowiednio tylko jeśli z komórek uformowane zostaną kule zarodkowe. Prawdopodobnie istotną rolę odgrywają kontakty międzykomórkowe, których nie mogą zastąpić ani dodawane do pożywki związki, ani manipulacje genetyczne, takie jak nadekspresja jednego genu.

Na uwagę zasługują również prace, w których geny kodujące czynniki transkrypcyjne *Pax3* i *Pax7* wprowadzono do mysich komórek ES lub iPS pod kontrolą promotora indukowanego doksycykliną [13-15]. Kule formowano w wiszących kroplach, drugiego dnia hodowli przenoszono je do hodowli w zawieszynie i stosując doksycyklinę indukowano ekspresję *Pax3* lub *Pax7*. Analiza rozrostów tych kul wykazała, że obecność czynników transkrypcyjnych *Pax3* lub *Pax7* indukowała syntezę mięśniowych czynników regulatorowych, takich jak Myf5, MyoD, czy miogenina oraz ciężkich łańcuchów miozyny. Żadnego z tych białek nie wykryto w rozrostach z kul uzyskanych z komórek kontrolnych, a więc niezmodyfikowanych genetycznie [13-15]. Pomimo wykorzystania systemu nadekspresji *Pax3* lub *Pax7* wydajność otrzymywania komórek prekursorowych mioblastów była niska. W celu uzyskania populacji wzbogaconej w komórki prekursorowej stosuje się sortowanie techniką cytometrii przepływowej z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał [9, 13-15, 44]. Przykładowo, można wyselekcjonować komórki mezodermy przyosiowej, które ekspresją czynnik PDGFR α , a nie ekspresją Flk1 [13] lub komórki syntetyzujące na swojej powierzchni niezidentyfikowany antygen charakterystyczny dla komórek satelitowych, rozpoznawany przez przeciwciało opisane jako SM/C-2.6 [28]. Hodowla uzyskanych w ten sposób komórek pozwala na bardziej wydajne powstawanie mioblastów (ryc. 2). Równocześnie eliminowane są komórki pluripotencjalne, które po transplantacji do organizmu mogłyby powodować powstawanie potworniaków. Wadą takiego sposobu wzbogacania populacji komórek w prekursory mioblastów jest negatywny wpływ tej procedury na żywotność komórek. Tym niemniej w cytowanych pracach komórki selekcjonowane za pomocą cytometrii przepływowej z powodzeniem wykorzystywano w transplantacjach. Na przykład wszczepiano dotętniczo komórki syntetyzujące PDGFR α , a niesyntetyzujące Flk1, wyselekcjonowane spośród komórek nadeksprymujących *Pax3*. Komórki transplantowano myszom *mdx*, które stanowią model dystrofii mięśniowej, czyli nie syntetyzują dystrofiny. Mięśnie, do których wszczepiano komórki były uprzednio uszkodzone. Następnie oceniono liczbę włókien zawierających dystrofinę, czyli takich, które powstały przy udziale wszczepionych komórek. Wykazano w ten

sposób, że miesiąc po transplantacji około 16% włókien zawierało dystrofinę, co oznacza, że przeszczepione komórki wzięły udział w regeneracji mięśnia w sposób dość wydajny, choć niewystarczający dla odzyskania pełnej funkcjonalności [13].



RYCINA 2. Przykład doświadczenia prowadzącego do zróżnicowania komórek ES (lub iPS) w mioblasty. W celu utrzymania pluripotencji, komórki ES hodowane są w pożywce zawierającej LIF. W celu indukcji różnicowania komórki przenoszone są do wiszących kropelek pożywki niezawierającej LIF i tworzą kule zarodkowe. Komórki uzyskane po dezagregacji kul zarodkowych są znakowane przeciwciałami. Sortując komórki PDGFR α +/Flk1- można uzyskać populację komórek o zwiększonym potencjale różnicowania w mioblasty. Analizy molekularne, cytologiczne oraz funkcjonalne pozwalają stwierdzić, czy tak uzyskane komórki różnicują w funkcjonalne mioblasty mięśni szkieletowych **FIGURE 2. Example of an experiment leading to the differentiation of ES (or iPS) cells into skeletal myoblasts.** Stem cells are cultured in medium containing LIF to keep their pluripotent character. To induce differentiation cells are transferred into hanging drops of medium lacking LIF. Under such conditions ES or iPS cells form embryoid bodies. After embryoid bodies disaggregation PDGFR α +/Flk1- cells, characterized by the higher potential to undergo myogenic differentiation, are sorted out. Molecular, cytological, and functional analysis define if those cells are able to differentiate into functional myoblasts

PODSUMOWANIE

Żaden z zaproponowanych do tej pory protokołów różnicowania komórek pluripotencjalnych w mioblasty mięśni szkieletowych nie jest idealny. Hodowla w kulach zarodkowych doskonale sprawdza się jako metoda w badaniach dotyczących wczesnych etapów rozwoju zarodkowego. Stosując ją nie jest jednak łatwo doprowadzić do różnicowania komórek pluripotencjalnych we wszystkie rodzaje komórek. Głównym problemem podczas prób uzyskiwania mioblastów mięśni szkieletowych z komórek ES i iPS jest niska wydajność stosowanych metod. Można ją zwiększyć stosując manipulacje genetyczne – nadekspresję kluczowych czynników regulujących miogenezę. Zabieg ten ogranicza jednak możliwość wykorzystania tak zmanipulowanych komórek w terapiach. Wydaje się więc, że poszukiwania metod indukowania różnicowania miogenicznego komórek pluripotencjalnych powinny koncentrować się na znalezieniu odpowiedniego zestawu czynników, które podane we właściwym momencie hodowli doprowadziłyby do powstawania mioblastów. Wydaje się, że wykorzystanie hodowli w kulach zarodkowych jest optymalnym rozwiązaniem, kule te zapewniają

bowiem organizację przestrzenną komórek odzwierciedlającą tę charakterystyczną dla rozwijającego się zarodka. Nie jest jednak wykluczone, że w przyszłości dojdzie do opracowania metod wydajnego różnicowania komórek pluripotencjalnych hodowanych na podłożu, uzyskując większą wydajność przy mniejszym nakładzie pracy.

PODZIĘKOWANIA

Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2010-2013 jako projekt badawczy NN 302 125939 oraz z funduszy Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego poprzez projekt „Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowsza – stypendia dla doktorantów”

LITERATURA

- [1] ARCHACKA K, GRABOWSKA I, CIEMERYCH MA. Indukowane komórki pluripotenne – nadzieje, obawy i perspektywy. *Postępy Biologii Komórki* 2010; **37**: 41-62.
- [2] BAIN G, KITCHENS D, YAO M, HUETTNER JE, GOTTLIEB DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995; **168**: 342-357.
- [3] BAR-NUR O, RUSS HA, EFRAT S, BENVENISTY N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 2011; **9**: 17-23
- [4] BARBERI T, BRADBURY M, DINCER Z, PANAGIOTAKOS G, SOCCI ND, STUDER L. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 2007; **13**: 642-648.
- [5] BARRERO MJ, IZPISUA BELMONTE JC. iPS cells forgive but do not forget. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 523-525.
- [6] BOCK C, KISKINIS E, VERSTAPPEN G, GU H, BOULTING G, SMITH ZD, ZILLER M, CROFT GF, AMOROSO MW, OAKLEY DH, GNIRKE A, EGGAN K, MEISSNER A. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 2011; **144**: 439-452.
- [7] BUEHR M, MEEK S, BLAIR K, YANG J, URE J, SILVA J, MCLAY R, HALL J, YING QL, SMITH A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 2008; **135**: 1287-1298.
- [8] CAMERON CM, HU WS, KAUFMAN DS. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. *Biotechnol Bioeng* 2006; **94**: 938-948.
- [9] CHANG H, YOSHIMOTO M, UMEDA K, IWASA T, MIZUNO Y, FUKADA S, YAMAMOTO H, MOTOHASHI N, MIYAGOE-SUZUKI Y, TAKEDA S, HEIKE T, NAKAHATA T. Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *Faseb J* 2009; **23**: 1907-1919.
- [10] CIEMERYCH MA. Zarodkowe komórki macierzyste – w poszukiwaniu pluripotencji. *Postępy Biologii Komórki* 2008; **35**: 203.
- [11] CIEMERYCH MA, ARCHACKA K, GRABOWSKA I, PRZEWOZNIK M. Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. *Results Probl Cell Differ* 2011; **53**: 473-527.
- [12] CRAFT AM, KRISKY DM, WECHUCK JB, LOBENHOFER EK, JIANG Y, WOLFE DP, GLORIOSO JC. Herpes simplex virus-mediated expression of Pax3 and MyoD in embryoid bodies results in lineage-Related alterations in gene expression profiles. *Stem Cells* 2008; **26**: 3119-3129.
- [13] DARABI R, GEHLBACH K, BACHOO RM, KAMATH S, OSAWA M, KAMM KE, KYBA M, PERLINGEIRO RC. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 2008; **14**: 134-143.

- [14] DARABI R, PAN W, BOSNAKOVSKI D, BAIK J, KYBA M, PERLINGEIRO RC. Functional myogenic engraftment from mouse iPS cells. *Stem Cell Rev* 2011; **7**: 948-957
- [15] DARABI R, SANTOS FN, FILARETO A, PAN W, KOENE R, RUDNICKI MA, KYBA M, PERLINGEIRO RC. Assessment of the myogenic stem cell compartment following transplantation of pax3/pax7-induced embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells* 2011; **29**: 777-790.
- [16] DAWN B, TIWARI S, KUCIA MJ, ZUBA-SURMA EK, GUO Y, SANGANALMATH SK, ABDEL-LATIF A, HUNT G, VINCENT RJ, TAHER H, REED NJ, RATAJCZAK MZ, BOLLI R. Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Stem Cells* 2008; **26**: 1646-1655.
- [17] DEKEL I, MAGAL Y, PEARSON-WHITE S, EMERSON CP, SHANI M. Conditional conversion of ES cells to skeletal muscle by an exogenous MyoD1 gene. *New Biol* 1992; **4**: 217-224.
- [18] DOETSCHMAN TC, EISTETTER H, KATZ M, SCHMIDT W, KEMLER R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; **87**: 27-45.
- [19] DUCIBELLA T, ANDERSON D, ALBERG J, DEWOLF WC. Cell surface polarization, tight junctions, and eccentric inner cells characterize human teratocarcinoma embryoid bodies. *Dev Biol* 1982; **94**: 197-205.
- [20] ECKARDT S, MCLAUGHLIN KJ, WILLENBRING H. Mouse chimeras as a system to investigate development, cell and tissue function, disease mechanisms and organ regeneration. *Cell Cycle* 2011; **10**: 2091-2099.
- [21] EDWARDS MK, HARRIS JF, MCBURNEY MW. Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Mol Cell Biol* 1983; **3**: 2280-2286.
- [22] EDWARDS MK, MCBURNEY MW. The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Dev Biol* 1983; **98**: 187-191.
- [23] EVANS M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; **12**: 680-686.
- [24] EVANS MJ. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol* 1972; **28**: 163-176.
- [25] EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; **292**: 154-156.
- [26] EZASHI T, TELUGU BP, ALEXENKO AP, SACHDEV S, SINHA S, ROBERTS RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 10993-10998.
- [27] FRAICHARD A, CHASSANDE O, BILBAUT G, DEHAY C, SAVATIER P, SAMARUT J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 1995; **108** (Pt 10): 3181-3188.
- [28] FUKADA S, HIGUCHI S, SEGAWA M, KODA K, YAMAMOTO Y, TSUIKAWA K, KOHAMA Y, UEZUMI A, IMAMURA M, MIYAGOE-SUZUKI Y, TAKEDA S, YAMAMOTO H. Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 2004; **296**: 245-255.
- [29] GRABOWSKA I, ARCHACKA K, CZERWINSKA AM, KRUPA M, CIEMERYCH MA. Mouse and human pluripotent stem cells and the means of their myogenic differentiation. *Results Probl Cell Differ* 2012; **55**: 321-356.
- [30] ITSKOVITZ-ELDOR J, SCHULDINER M, KARSENTI D, EDEN A, YANUKA O, AMIT M, SOREQ H, BENVENISTY N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; **6**: 88-95.
- [31] KENNEDY KA, PORTER T, MEHTA V, RYAN SD, PRICE F, PESHADARY V, KARAMBOULAS C, SAVAGE J, DRYSDALE TA, LI SC, BENNETT SA, SKERJANC IS. Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. *BMC Biol* 2009; **7**: 67.
- [32] KLEINSMITH LJ, PIERCE GB, JR. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 1964; **24**: 1544-1551.
- [33] KUCIA M, HALASA M, WYSOCZYNSKI M, BASKIEWICZ-MASIUKEWICZ M, MOLDENHAWER S, ZUBA-SURMA E, CZAJKA R, WOJAKOWSKI W, MACHALINSKI B, RATAJCZAK MZ. Morphological and molecular characterization

- of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia* 2007; **21**: 297-303.
- [34] KUCIA M, RECA R, CAMPBELL FR, ZUBA-SURMA E, MAJKA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; **20**: 857-869.
- [35] KURODA Y, KITADA M, WAKAO S, NISHIKAWA K, TANIMURA Y, MAKINOSHIMA H, GODA M, AKASHI H, INUTSUKA A, NIWA A, SHIGEMOTO T, NABESHIMA Y, NAKAHATA T, NABESHIMA Y, FUJIYOSHI Y, DEZAWA M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 8639-8643.
- [36] KUROSAWA H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007; **103**: 389-398.
- [37] LEE EJ, LEE HN, KANG HJ, KIM KH, HUR J, CHO HJ, LEE J, CHUNG HM, CHO J, CHO MY, OH SK, MOON SY, PARK YB, KIM HS. Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2010; **16**: 705-715.
- [38] LI P, TONG C, MEHRAN-SHAI R, JIA L, WU N, YAN Y, MAXSON RE, SCHULZE EN, SONG H, HSIEH CL, PERA MF, YING QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008; **135**: 1299-1310.
- [39] LIAO J, CUI C, CHEN S, REN J, CHEN J, GAO Y, LI H, JIA N, CHENG L, XIAO H, XIAO L. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 11-15.
- [40] LIU H, ZHU F, YONG J, ZHANG P, HOU P, LI H, JIANG W, CAI J, LIU M, CUI K, QU X, XIANG T, LU D, CHI X, GAO G, JI W, DING M, DENG H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 587-590.
- [41] LU Y, WEST FD, JORDAN BJ, MUMAW JL, JORDAN ET, GALLEGOS-CARDENAS A, BECKSTEAD RB, STICE SL. Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Dev* 2012; **21**: 394-403.
- [42] MARTIN GR. 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* 1981; **78**: 7634-7638.
- [43] MARTIN GR, EVANS MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; **72**: 1441-1445.
- [44] MIZUNO Y, CHANG H, UMEDA K, NIWA A, IWASA T, AWAYA T, FUKADA S, YAMAMOTO H, YAMANAKA S, NAKAHATA T, HEIKE T. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *Faseb J* 2010; **24**: 2245-2253.
- [45] MOCHIZUKI H, OHNUKI Y, KUROSAWA H. Effect of glucose concentration during embryoid body (EB) formation from mouse embryonic stem cells on EB growth and cell differentiation. *J Biosci Bioeng* 2011; **111**: 92-97.
- [46] NEWMAN AM, COOPER JB. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 258-262.
- [47] NISHINO K, TOYODA M, YAMAZAKI-INOUE M, FUKAWATASE Y, CHIKAZAWA E, SAKAGUCHI H, AKUTSU H, UMEZAWA A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet* 2011; **7**: e1002085.
- [48] OHI Y, QIN H, HONG C, BLOUIN L, POLO JM, GUO T, QI Z, DOWNEY SL, MANOS PD, ROSSI DJ, YU J, HEBROK M, HOCHEDLINGER K, COSTELLO JF, SONG JS, RAMALHO-SANTOS M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPSCs. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 541-549.
- [49] PIERCE GB, DIXON FJ, JR. Testicular teratomas. II. Teratocarcinoma as an ascitic tumor. *Cancer* 1959; **12**: 584-589.
- [50] PRELLE K, WOBUS AM, KREBS O, BLUM WF, WOLF E. Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **277**: 631-638.

- [51] RATAJCZAK MZ, MACHALINSKI B, CZAJKA R, ZUBA-SURMA E, POZIOMKOWSKA-GĘSICKA Is-Z, D. Konsekwencje fizjologiczne i patologiczne występowania komórek linii zarodkowych w dorosłych tkankach. *Ginekologia Polska* 2009; **80**: 935-941.
- [52] RATAJCZAK MZ, SHIN DM, LIU R, MIERZEJEWSKA K, RATAJCZAK J, KUCIA M, ZUBA-SURMA EK. Very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELS) and their potential role in aging and organ rejuvenation - an update and comparison to other primitive small stem cells isolated from adult tissues. *Aging (Albany NY)* 2012;
- [53] RATAJCZAK MZ, ZUBA-SURMA EK, RATAJCZAK J. Komórki macierzyste - blaski i cienie. *Acta Haematologica Polonica* 2009; **40**: 289-303.
- [54] ROSSANT J. The impact of developmental biology on pluripotent stem cell research: successes and challenges. *Dev Cell* 2011; **21**: 20-23.
- [55] SASAKI E, HANAZAWA K, KURITA R, AKATSUKA A, YOSHIZAKI T, ISHII H, TANIOKA Y, OHNISHI Y, SUEMIZU H, SUGAWARA A, TAMAOKI N, IZAWA K, NAKAZAKI Y, HAMADA H, SUEMORI H, ASANO S, NAKATSUJI N, OKANO H, TANI K. Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* 2005; **23**: 1304-1313.
- [56] SCHROEDER M, NIEBRUEGGE S, WERNER A, WILLBOLD E, BURG M, RUEDIGER M, FIELD LJ, LEHMANN J, ZWEIGERDT R. Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng* 2005; **92**: 920-933.
- [57] SHANI M, FAERMAN A, EMERSON CP, PEARSON-WHITE S, DEKEL I, MAGAL Y. The consequences of a constitutive expression of MyoD1 in ES cells and mouse embryos. *Symp Soc Exp Biol* 1992; **46**: 19-36.
- [58] SHIN DM, LIU R, WU W, WAIGEL SJ, ZACHARIAS W, RATAJCZAK MZ, KUCIA M. Global Gene Expression Analysis of Very Small Embryonic-Like Stem Cells Reveals that the Ezh2-Dependent Bivalent Domain Mechanism Contributes to Their Pluripotent State. *Stem Cells Dev* 2012;
- [59] STAVROPOULOS ME, MENGARELLI I, BARBERI T. Differentiation of multipotent mesenchymal precursors and skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2009; Chapter 1: Unit 1F 8.
- [60] STEVENS LC. Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. *Dev Biol* 1960; **2**: 285-297.
- [61] SUMER H, LIU J, MALAVER-ORTEGA LF, LIM ML, KHODADADI K, VERMA PJ. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J Anim Sci* 2011; **89**: 2708-2716.
- [62] SUWINSKA A, LENKIEWICZ A. Pierwotne linie komórkowe w zarodku myszy - źródło zarodkowych komórek macierzystych. *Postępy Biologii Komórki* 2010; **37**: 3-21.
- [63] TACHIBANA M, SPARMAN M, RAMSEY C, MA H, LEE HS, PENEDO MC, MITALIPOV S. Generation of chimeric rhesus monkeys. *Cell* 2012; **148**: 285-295.
- [64] TAJBAKHSH S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med* 2009; **266**: 372-389.
- [65] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872.
- [66] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663-676.
- [67] TAKAKURA N, YOSHIDA H, OGURA Y, KATAOKA H, NISHIKAWA S, NISHIKAWA S. PDGFR α expression during mouse embryogenesis: immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistochemistry using the monoclonal anti-mouse PDGFR α antibody APA5. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 883-893.
- [68] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDROR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145-1147.
- [69] THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CP, BECKER RA, HEARN JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 7844-7848.
- [70] THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURNING M, HARRIS CP, HEARN JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 1996; **55**: 254-259.

- [71] TIAN C, LU Y, GILBERT R, KARPATI G. Differentiation of murine embryonic stem cells in skeletal muscles of mice. *Cell Transplant* 2008; **17**: 325-335
- [72] UEDA S, KAWAMATA M, TERATANI T, SHIMIZU T, TAMAI Y, OGAWA H, HAYASHI K, TSUDA H, OCHIYA T. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. *PLoS ONE* 2008; **3**: e2800.
- [73] WEITZER G, MILNER DJ, KIM JU, BRADLEY A, CAPETANAKI Y. Cytoskeletal control of myogenesis: a desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation. *Dev Biol* 1995; **172**: 422-439.
- [74] WEST FD, UHL EW, LIU Y, STOWE H, LU Y, YU P, GALLEGOS-CARDENAS A, PRATT SL, STICE SL. Brief report: chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs. *Stem Cells* 2011; **29**: 1640-1643.
- [75] WILES MV, KELLER G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 1991; **111**: 259-267.
- [76] WITKOWSKA A, CIEMERYCH MA, SUWIŃSKA A. Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste – regulacja pluripotencji i różnicowania. *Postępy Biologii Komórki* 2010; **37**: 23-40.
- [77] WOBUS A, ROHWEDDEL J, MALTSEV V, HESCHELER J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. *Roux's Arch Dev Biol* 1994; **204**: 36-45.
- [78] WOBUS AM, BOHELER KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005; **85**: 635-678.
- [79] YAMAGUCHI TP, DUMONT DJ, CONLON RA, BREITMAN ML, ROSSANT J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993; **118**: 489-498.
- [80] ZHENG JK, WANG Y, KARANDIKAR A, WANG Q, GAI H, LIU AL, PENG C, SHENG HZ. Skeletal myogenesis by human embryonic stem cells. *Cell Res* 2006; **16**: 713-722.
- [81] ZUBA-SURMA EK, KUCIA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. "Small stem cells" in adult tissues: very small embryonic-like stem cells stand up! *Cytometry A* 2009; **75**: 4-13.

Redaktor prowadzący – Grażyna Hoser

Otrzymano: 15.09.2012

Przyjęto: 02.12.2012

Areta Magda Czerwińska

Zakład Cytologii, Wydział Biologii

Uniwersytet Warszawski

ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e.mail: aretaczerwinska@biol.uw.edu.pl