

АКТИВАЦИЯ ГЕНОМА ЗАРОДЫША И РЕГУЛЯЦИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ КЛЕТОК

©2015 г. Д. В. ОНИЩУК¹, А. С. ВОРОНИНА²

¹*University of Freiburg, Developmental Biology Unit, Hauptstrasse 1,
Biologie 1, Germany*

²*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Материнский период развития животных – ранние наблюдения. III. Морфогенетическая функция ядер: работы А. А. Нейфаха. IV. Midblastula Transition (MBT). V. Дегградация материнских транскриптов. VI. Активация генома зародышей. VII. Плюрипотентный период в развитии. VIII. Генетический контроль плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках. IX. Индуцированные плюрипотентные клетки (ИРС). X. Эволюция сетей ранней генной регуляции у позвоночных. XI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Развитие многоклеточных животных начинается с оплодотворенного яйца, или зиготы, и сначала регулируется продуктами материнских генов, запасенных в яйце. Через некоторое время материнские транскрипты разрушаются и начинается транскрипция генов зародыша. Постепенно контроль за развитием переходит от материнских продуктов к продуктам генов зародыша. В момент активации генома зародыши млекопитающих животных состоят, как правило, из

Принятые сокращения и специальные термины:

Maternal transcription – транскрипция генов материнского генома, происходящая в яйце до его оплодотворения. Прекращается в профазе первого мейотического деления.

ESC – Embryonic Stem Cells, эмбриональные стволовые клетки.

IPSC – induced Pluripotent Stem Cells, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (*окончание принятых сокращений см. на сл. стр.*)

Адрес для корреспонденции: Daria.Onichtchouk@biologie.uni-freiburg.de, voronina_a@mail.ru

Работа поддержана грантами немецкого научно-исследовательского сообщества (DFG) ON86/3-1 и РФФИ № 14-54-12008.

нескольких клеток (2 у мыши, 8 у коровы), а зародыши низших позвоночных (рыбы, лягушки) – из нескольких сотен активно делящихся клеток. Позиция каждой из клеток внутри зародыша определяет, к какому типу ткани (кожа, мышцы, клетки нервной системы, и т.д.) – потомство этой клетки будет принадлежать в развивающемся организме. Эксперименты по пересадке клеток внутри ранних зародышей показали, что судьба клеток в момент и некоторое время после активации генома зародыша еще не определена: каждая из этих клеток может позднее развиться в любую из тканей зародыша, в зависимости от своего непосредственного окружения. Во время последующего развития клетки теряют это свойство (называемое плюрипотентностью), переходя через несколько промежуточных фаз: к зародышевым листкам (мезодерме, эктодерме и энтодерме), тканевым предшественникам и, наконец, к дифференцированным клеткам. Генетические эксперименты последних десятилетий выявили десятки генов, определяющих судьбу клеток в развитии. Большая часть этих генов кодирует эволюционно консервативные факторы транскрипции и сигнальные молекулы, отвечающие за

(окончание принятых сокращений и специальных терминов)

Zygotic transcription – Транскрипция генов зародыша (или транскрипция генов зиготы).

ZGA – Zygotic Genome Activation – Активация генома зародыша (активация генома зиготы) – начало транскрипции генов зародыша (или зиготы). Происходит спустя некоторое время после оплодотворения.

MZT – Maternal to Zygotic Transition – Материнско-зародышевый переход: ряд событий, происходящих после оплодотворения яйца, включающий в себя ZGA (активацию генома зародыша), деградацию материнских транскриптов, потерю синхронности клеточного цикла и начало подвижности клеток. Термин MZT применим ко всем многоклеточным организмам.

MBT – Midblastula Transition – Переход средней бластулы или среднебластульный переход – частный случай MZT, когда все вышеупомянутые события: (ZGA, деградация материнских транскриптов, и потеря синхронности клеточного цикла) начинаются одновременно, спустя определенный временной промежуток после оплодотворения. В тот же момент клетки зародышей амфибий и рыб начинают активно двигаться. Термин MBT применяется к амфибиям, рыбам и мухам *Drosophila*.

Totipotency – Тотипотентность – неограниченная способность клетки дифференцироваться в любые зародышевые (embryonic) и внезародышевые (extra-embryonic) ткани. Тотипотентностью обладает зигота (у всех многоклеточных организмов), и ранние клетки зародыша млекопитающих (до стадии морулы).

Pluripotency – Плюрипотентность – способность клетки дифференцироваться в любые зародышевые (embryonic) ткани. Свойством плюрипотентности обладают все клетки ранних зародышей позвоночных животных (как минимум до гаструляции), а также ESC млекопитающих, птиц и рыб, и iPSC.

пространственную разметку зародыша. Нарушение регуляции этих генов наблюдается при различных заболеваниях человека, в том числе при раке. Помимо пространственной разметки зародыша для правильного раннего развития требуется точная временная координация программ дифференцировки клеток разных типов, протекающих одновременно в разных частях зародыша. Наши знания о механизмах, обеспечивающих такую координацию, весьма фрагментарны. В обзоре, предлагаемом вниманию читателя, пойдет речь о факторах, обеспечивающих активацию генома зародыша, координацию генетических программ развития во времени и переход от плюрипотентности к дифференцировке клеток.

В пределах этой широкой области некоторые аспекты проблемы излагаются довольно сжато. В частности, не обсуждаются различные типы плюрипотентных стволовых клеток, но, однако, даются ссылки на некоторые недавние обзоры, рассматривающие эту тему для клеток млекопитающих [1–5], а также статьи, посвященные происхождению плюрипотентных стволовых клеток у разных таксонов [6–8].

II. МАТЕРИНСКИЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ – РАННИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Уже в конце 19-го – начале 20-го столетия, большинство биологов, работавших на иглокожих, брюхоногих моллюсках, рыбах и амфибиях, знали, что развитие до стадии гастрюлы определяется информацией, содержащейся в яйцеклетке [9]. Первые попытки определить наиболее раннее влияние спермы на процессы развития были предприняты в экспериментах с межвидовой гибридизацией иглокожих (морских ежей). Один из авторов хроматиновой теории наследственности Теодор Бовери (1862–1915) суммировал исследования гибридов иглокожих в своей последней работе, опубликованной в 1918 году, уже после его смерти [10]. Бовери различал два периода в эмбриональном развитии, по-разному зависящие от функции клеточных ядер. Первый период заканчивается непосредственно перед гастрюляцией и зависит от свойств ооплазмы в большей степени, чем от хроматина яйца или спермы. В самом деле, первичное развитие безъядерных яиц морского ежа может быть индуцировано спермой морской лилии, которая относится к другому классу животных [11]. Ядерная субстанция спермы не участвует в развитии, так как хромосомы из ядер спермы морской лилии не деконденсируются и развитие продолжается до гастрюляции по материнскому типу (как в морском еже). Развитие по материнскому типу, даже в случаях, когда ядра были

предварительно удалены из яиц, происходит при гибридизации между близкими родами иглокожих (*Parechinus. sp* и *Paracentrotus. sp*). Когда безъядерные яйца морских ежей из рода *Sphaerechinus* были оплодотворены спермой более отдаленного рода морского ежа (*Parechinus* или *Paracentrotus*), хромосомы деконденсировались, зародыши развивались до гаструляции по материнскому типу, но затем развитие останавливалось и зародыши погибали. Эти и похожие эксперименты привели Бовери к заключению, что начальное развитие не зависит от функции ядер и определяется цитоплазмой яйца. Классические эксперименты Бовери на иглокожих были подтверждены Муром [12] в опытах по скрещиванию лягушек разных видов. Яйца *Rana pipens*, оплодотворенные спермой близкого вида (*Rana palustris*), развивались сначала по материнскому типу, а влияние отцовского генома становилось заметно позже в развитии. Гибриды между более далекими видами лягушек (например, яйца *Rana pipens*, оплодотворенные спермой *Rana catesbeiana*) развивались до гаструляции, но затем останавливались в развитии и погибали: программы развития, кодируемые материнским и отцовским геномом, были слишком разными и не подходили друг другу. Однако, если геном спермы *Rana catesbeiana* разрушали радиоактивным облучением, то оплодотворенные такой спермой яйца не гибли, а развивались как гаплоиды до метаморфоза и даже более поздних стадий жизненного цикла [13]. Таким образом, будучи активированы даже неспецифическим стимулом, яйца развиваются до гаструляции, и для этого не требуется ядерный материал.

III. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ ЯДЕР: РАБОТЫ А. А. НЕЙФАХА

Теория раннего развития, основанная на наблюдениях эмбриологов начала XX века, была расширена и продолжена серией работ Александра Александровича Нейфаха на костистой рыбе вьюне (*Misgurnus fossilis*) [14–18]. Если оплодотворенные яйца вьюна облучали в период от оплодотворения до конца ранней бластулы, то эмбриональное развитие продолжалось до поздней бластулы и затем останавливалось. Время остановки не зависело от момента облучения. Это показывало, что ядра не влияют на развитие в период от оплодотворения до ранней бластулы. Напротив, облучение ядер на стадиях после средней бластулы вело к более поздней остановке развития (рис. 1). Это показало, что ядерная активность, названная Нейфахом «морфогенетической функцией ядер» [15], начинается на стадии средней

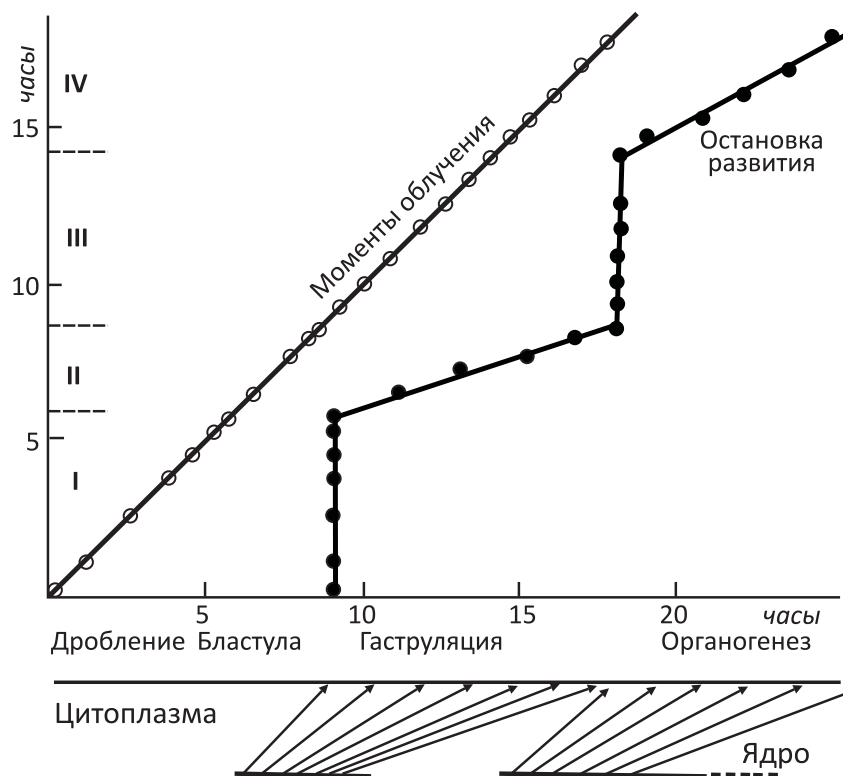


Рис. 1. Зависимость стадии остановки развития зародышей выюна от момента облучения [16].

Репродукция рисунка из оригинальной публикации А.А. Нейфаха. Доза 40кг (килорад). Ордината – стадии, на которых производилось облучение (в часах нормального развития при 21,5°). Абсцисса: для прямой «моменты облучения» – облучаемая стадия; для экспериментальной кривой «остановка развития» – стадия остановки развития, выраженная в часах нормального развития. Внизу – схема зависимости развития зародыша, («цитоплазма») от морфогенетической функции ядер («ядро»). Периоды ядерной активности (II и IV на оси Y) выделены жирной чертой. Стрелки соединяют моменты деятельности ядер со стадиями, которые в эти моменты контролируются.

Римские цифры на оси Y: периоды морфогенетической активности ядер или ее отсутствия. Во время периодов II и IV ядра морфогенетически активны, в периоды I и III – нет.

бластулы. Морфогенетическая функция ядер от средней до поздней бластулы (2,5 часа у вьюна) совпадает с периодом замедления клеточных делений за счет удлинения интерфазы и определяет весь процесс гастрюляции, продолжающийся в течении 9 часов. Начало морфогенетической функции ядер было определено у рыб, иглокожих, моллюсков и амфибий, и также была определена продолжительность раннего периода развития, когда ядерная функция у этих животных не проявляется [15, 16]. Что включает морфогенетическую функцию ядер? В 1968 году Ротт и Шевелева [19] предположили, что определенное пороговое соотношение между ядром и цитоплазмой может являться переключателем, включающим морфогенетическую функцию ядер, которая обеспечивает гастрюляцию и дальнейшее развитие. Во время ранних делений дробления общий объем клеток зародыша не изменяется: объем каждой клетки уменьшается в два раза при каждом делении дробления. Поскольку содержание ДНК в ядрах не изменяется, количественное отношение ДНК к другим клеточным компонентам непрерывно возрастает. Можно предположить, что быстрые клеточные деления возможны до тех пор, пока это соотношение не достигает определенного уровня. Если это так, то замедление клеточных делений у гаплоидных зародышей должно наступать на одно деление позже, чем у диплоидных, что и было экспериментально подтверждено [19].

Изучение молекулярных основ морфогенетической функции ядер, проведенное А.С. Спириным и сотрудниками, показало, что большая часть мРНК, синтезированных на стадии гастрюлы, неактивны и находятся в виде рибонуклеопротеидов, названных информосомами. Это привело к созданию концепции «маскирования» мРНК [20, 21]. Маскирование-демаскирование мРНК играет важную роль и в дальнейшем развитии эмбрионов. Было высказано предположение, что именно периодическое демаскирование определенных мРНК и является причиной наблюдавшейся А.А. Нейфахом периодичности морфогенетической функции ядер. Стало ясно, что кроме транскрипционного существует еще один уровень регуляции экспрессии генов в эмбриональном развитии – трансляционный. Это было подтверждено множеством работ последних десятилетий [22]. Особенно подробно изучена роль регуляции трансляции при регуляции клеточного цикла [23].

IV. MIDBLASTULA TRANSITION (MBT)

Работы А.А. Нейфаха по «морфогенетической функции ядер» вплотную подвели мировую науку к широко используемому понятию Midblastula transition (переход средней бластулы). К сожалению, в силу причин (подробнее – см. [18]), эти работы сейчас практически забыты и редко цитируются в международной литературе. Авторами концепции и термина Midblastula Transition (MBT) считаются французские ученые Синьоре и Лефрешн, сформулировавшие эту концепцию в семидесятых годах 20-го века. Концепция MBT стала популярной после обзора Джона Герхарта [24].

Термин «Midblastula Transition» (MBT) обычно применяют к зародышам амфибий, рыб и *Drosophila*: организмам, начинающим свою жизнь с серии быстрых делений. У этих животных несколько событий, таких как удлинение клеточного цикла, начало клеточных движений, деградация материнских мРНК и начало транскрипции генов зародыша (ZGA, Zygotic Gene Activation) совпадают во времени. У других животных это не так. У млекопитающих, например, активация генома зародыша происходит на двухклеточной стадии, в то время как деградация материнских РНК начинается в момент оплодотворения. Зародыши морских ежей транскрипционно активны с момента оплодотворения, и достигают максимума транскрипции на стадии 16–32 клеток. В общем, процессы, знаменующие переход управления развитием от материнских генов к генам зародыша (Maternal to Zygotic transition – MZT), сходны у всех многоклеточных организмов, вне зависимости от того, происходят ли они одновременно – тогда к зародышам применим термин MBT – или в разное время – тогда употребляется более широкое понятие MZT [25–27].

На протяжении синхронных делений дробления у аксолотля отсутствует фаза G1 клеточного цикла [28]. Во время MBT, начинающейся после 10–11 клеточных делений, появляется фаза G1, длительность которой варьирует в разных клетках [29]. Появление фазы G1 свидетельствует об истощении фактора, необходимого для входа в S фазу. Изучение MBT на бесхвостых амфибиях *Xenopus* [30, 31], костистых рыбах *Danio rerio* [32] и *Fundulus* [33] показало, что параллельно с удлинением клеточного цикла клетки зародыша (бластомеры) впервые становятся подвижными и транскрипционно активными. Время наступления MBT зависит от достижения критического соотношения ядра к цитоплазме [30, 32]. В 2013 г. Колларт с сотрудниками предложили возможный механизм наступления MBT: они показали, что во время быстрых делений дробления уровень четырех факторов репликации ДНК у *Xenopus laevis* падает

ниже необходимого для запуска репликации [34]. Репликация ДНК происходит с задержкой, что приводит к замедлению клеточного цикла, и началу транскрипции генов зародыша.

Эмбрионы *Drosophila*, как и зародыши амфибий и рыб, начинают развитие с серии очень быстрых митозов, но клеточная мембрана между делящимися ядрами не образуется. Делящиеся ядра находятся в центре яйца во время первых 9 циклов, каждый по 10 минут, и мигрируют к поверхности (кортексу) яйца во время десятого цикла. Таким образом, во время циклов 10–13 многоядерный зародыш *Drosophila* представляет собой синцитиальную бластодерму. Митотические циклы 10–13 удлиняются с 10 минут до 25 минут. Во время 14 цикла, длящегося более 60 минут, между ядрами появляются клеточные перегородки (этот процесс называется целлюляризацией), синхронность митозов пропадает и клетки начинают перемещаться.. Как в лягушках и рыбах, удлинение клеточного цикла при МВТ у *Drosophila* совпадает с началом транскрипции генов зародыша и регулируемой деградацией материнских РНК. Однако, транскрипционная активность 300 ранних генов у *Drosophila* контролируется не одним, а как минимум тремя разными механизмами [35, 36]. Из 300 ранних генов, транскрипция 127 генов зависит от временного интервала после оплодотворения, транскрипция 88 генов зависит от отношения ядро/цитозоль, а многие из оставшихся 85 ранних генов включаются уже до МВТ во время циклов 11/12 с помощью иного, дополнительного механизма [36].

Транскрипционные события при МВТ могут быть подразделены на два независимых процесса: во первых, часть материнских мРНК и белков быстро деградирует (см.ниже), во вторых, начинается синтез множества транскриптов во время процесса, называемого «Активацией генома зародыша» (ZGA) [25].

V. ДЕГРАДАЦИЯ МАТЕРИНСКИХ ТРАНСКРИПТОВ

Дестабилизация транскриптов достигается совместным действием по крайней мере двух процессов: «материнского», закодированного исключительно в материнском геноме, и «зародышевого». Различие материнских и зародышевых путей деградации было показано на мышах [37–39], *Danio rerio* [40, 41] и *C. elegans* [42]. Обычно первым этапом распада мРНК считается укорочение полиА хвоста. Однако, у амфибии *Xenopus*, в отличие от других животных, индуцированное оплодотворением деаденилирование материнских транскриптов не ведет к их распаду перед ZGA [43–45]. Деградация

материнских РНК у *Drosophila* также достигается комбинацией двух механизмов: материнского и зародышевого. Материнский механизм отвечает за дестабилизацию 20% транскриптов [46], в то время как механизм, зависящий от зародышевой транскрипции, ликвидирует еще 15% транскриптов [47]. Зависящий от трансляции материнский механизм деградации РНК у *Drosophila* включается при активации яйца. При этом запускается синтез РНК-связывающего белка Smaug на запасенных в яйце маскированных мРНК (SMG) [46]. Этот белок специфически связывается с узнающим элементом (SMG-recognition elements) на определенных мРНК, что приводит к удалению поли(А) конца и последующей деградации мРНК. Детальные механизмы зародышевой деградации РНК у *Drosophila* остаются неясными. Зародышевый активатор *Zelda* (*Zld*, см. ниже), возможно, играет роль в этом процессе, так как в *Zelda*-мутантах наблюдаются изменения в скорости деградации многих материнских мРНК [48]. У *Danio* экспрессирующаяся в зародыше микро РНК *mir430* вызывает деградацию сотен материнских мРНК [49]. Сама *mir430* включается белком Nanog, одним из специфических активаторов зародышевых генов [50]. Деградация определенного набора материнских мРНК, отличающихся от мишеней *mir430*, нарушена в зародышах *Danio rerio*, мутантных по транскрипционному фактору Pou5f3 [51].

VI. АКТИВАЦИЯ ГЕНОМА ЗАРОДЫША

Во время активации генома зародыша (ZGA) 12–15% генов *Danio rerio*, *Drosophila* и мыши начинают быстро и координированно транскрибироваться [25]. Помимо общих механизмов, зависящих от ядерно/цитоплазматического соотношения, в процессе активации генов зародыша принимают участие специфические транскрипционные факторы – белки, способные узнавать определенные последовательности ДНК и связываться с ними. У *Drosophila* самые ранние гены зародыша активируются единственным материнским транскрипционным фактором, называемым *Zld*. *Zld* связывается со специфическими ДНК – последовательностями (называемыми TAGteam) на регуляторных участках ранних генов и активирует их транскрипцию [48, 52, 53]. В течение клеточных циклов, следующих за МВТ, участки ДНК, связанные с *Zld*, координируют экспрессию ранних генов во времени и пространстве [54–56]. Считается, что *Zld* усиливает связывание разнообразных транскрипционных факторов с участками ДНК, на которых он находится, сохраняя хроматин в открытом состоянии [57, 58]. Таким образом, генная активность во

время МВТ и при дальнейших событиях раннего развития беспозвоночных координируются белком Zld.

У зародышей рыб *Danio rerio* роль глобальных активаторов генома выполняют сразу несколько транскрипционных факторов: Pou5f3 (устаревшее название – Pou5f1), группа генов SoxB1 и Nanog [50, 59]. После ZGA в разных частях зародыша под их влиянием активируются тканеспецифические гены [51, 60] (рис. 2). У *Danio rerio* транскрипция начинается после 10 клеточных делений. У мутантов *MZspg*, лишенных как материнских, так и зародышевых функций Pou5f3, экспрессия 595 генов уменьшается как минимум вдвое [51]. Участки генома, связанные с Pou5f3 и с SoxB1, расположены вблизи от генов, отвечающих за регуляцию развития, включая компоненты сигнальных путей Wnt, Nodal, BMP и FGF и транскрипционные факторы, определяющие дифференцировку эмбриональных тканей. Как и Zelda у *Drosophila*, Pou5f3 и SoxB1 преимущественно активируют самые ранние гены у *Danio rerio* [59]. В районах связывания Pou5f3 и Nanog с ДНК во время и после МВТ наблюдается обогащение метками активного хроматина, такими, как H3K4me3, и РНК-полимеразой II (RNAPolII) [59, 61] (рис. 3). RNAPolII и факторы, модифицирующие хроматин, не обладают собственной специфической ДНК-связывающей активностью. Не исключено, что они рекрутируются на POU-связывающие сайты регуляторных участков ранних генов с помощью материнских белков Pou5f3. Участки связывания активаторов зародышевого генома обогащены специфическими последовательностями ДНК (TAGteam в *Drosophila*, SOX-POU в *Danio*). Присутствие множества разных других, в том числе и тканеспецифических, транскрипционных факторов – характерная черта Zelda-связывающих участков генома в *Drosophila* [48, 53, 56, 58], участков связывания Pou5f1 (Oct4), Sox2 и Nanog в эмбриональных стволовых клетках млекопитающих [62], и участков связывания их гомологов Pou5f3, SoxB1 и Nanog у *Danio* [59] (рис. 4). Считается, что как Zelda, так и активаторы зародышевого генома позвоночных Pou5f1/3, SoxB1 и Nanog, локально изменяют структуру хроматина, облегчая другим транскрипционным факторам связывание с ним. Механизм этих изменений пока не ясен и может быть различным у позвоночных и беспозвоночных [63, 64].

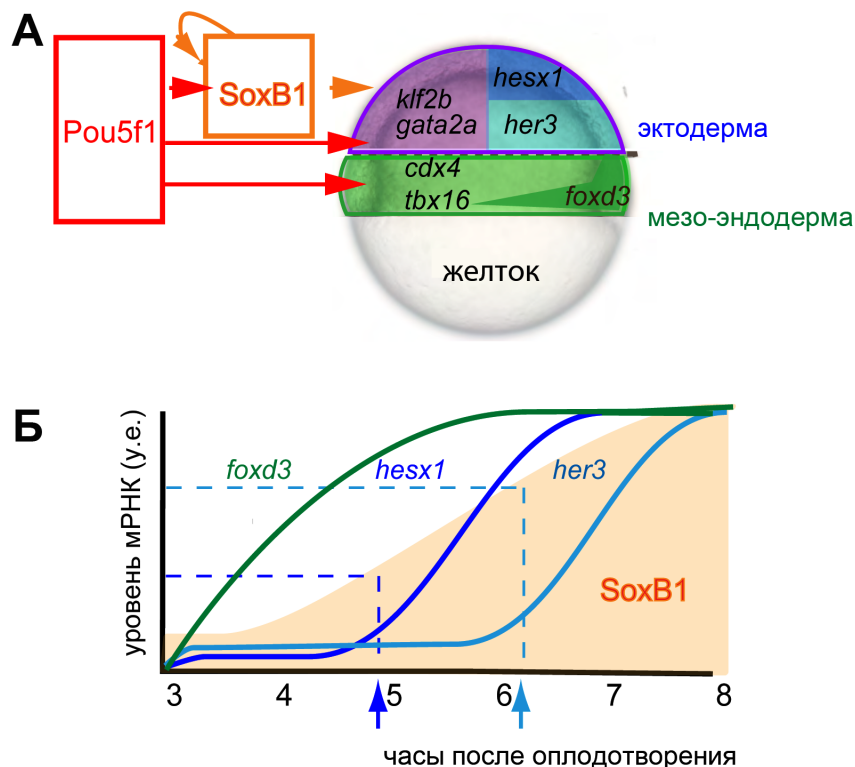


Рис. 2. Модель генно-регуляторной сети на стадии ранней гаструлы зародышей *Danio rerio* (модификация из [60], публикуется с разрешения John Wiley and Sons).

(А) Схематическое изображение зародыша *Danio rerio* на стадии ранней гаструлы. Pou5f1 (Pou5f3) присутствует во всех клетках зародыша, SoxB1 во всей эктодерме (эктодермальный домен обведен лиловым). Тканеспецифические транскрипционные репрессоры *cdx4*, *tbx16* и *foxd3*, активируемые преимущественно Pou5f3, экспрессируются в экваториальной части зародыша, мезэнтодерме (домен обозначен зеленым). Тканеспецифические транскрипционные репрессоры, активируемые Pou5f3 совместно с SoxB1: *gata2a* и *klf2b* экспрессируются в эпителиальном домене эктодермы (обозначен лиловым), *hesx1* и *her3* экспрессируются в нейрональном домене эктодермы (обозначен синим и голубым).

(Б) Экспрессия генов-мишеней Pou5f3 и SoxB1 во времени, ZGA – 3 часа после оплодотворения; вертикальная ось – количество мРНК в зародыше. Схематически изображен результат математического моделирования на основе экспериментальных измерений [51]. Для включения *foxd3* необходимо только присутствие Pou5f3 в момент ZGA. Для включения *hesx1* и *her3* дополнительно к Pou5f3 необходима пороговая концентрация SoxB1 (обозначена оранжевым контуром), различная для разных генов.

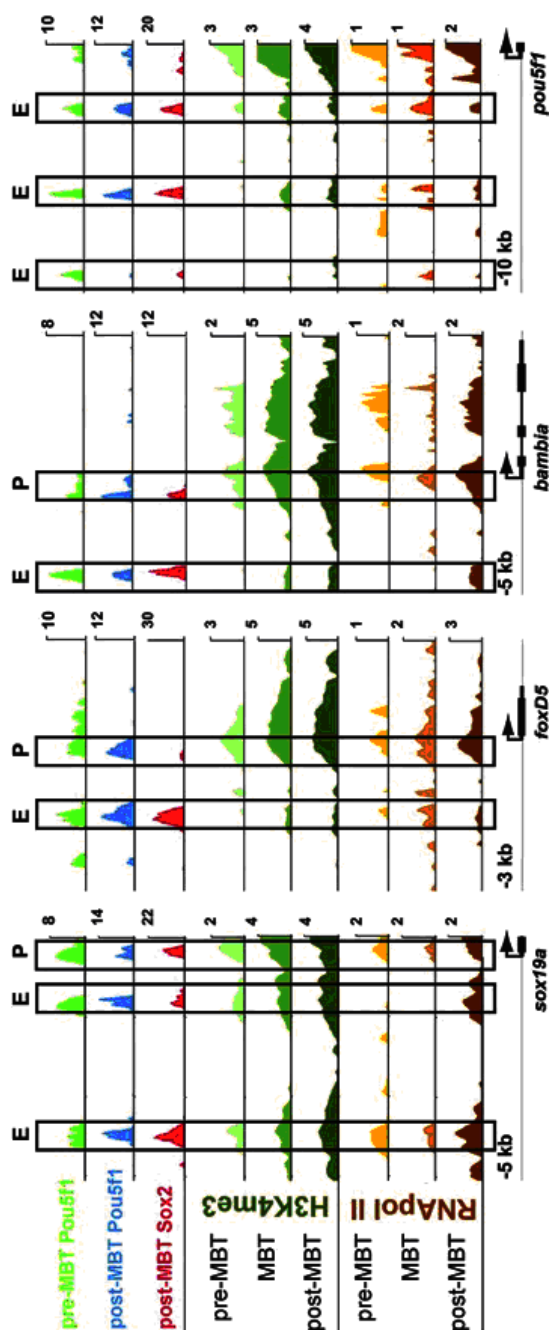


Рис. 3. Регуляторные участки ранних генов связывают Pou5f1 и Sox2 содержат метки активного хроматина ([59], публикуется с разрешения AAAS).

Связывание хроматином Pou5f1, Sox2, РНК-полимеразы II (Pol II) и H3K4me3 повышено на промоторах и энхансерах ранних генов, транскрибируемых сразу после MBT. Показаны регуляторные участки четырех ранних генов: *sox19a*, *foxD5*, *bambla*, *pou5f1* до, во время и после MBT (pre-MBT, MBT, post-MBT).

Е, энхансер; Р, промотор; абсцисса показывает расстояние (kb) от начала транскрипции, ордината – связывание в условных единицах.

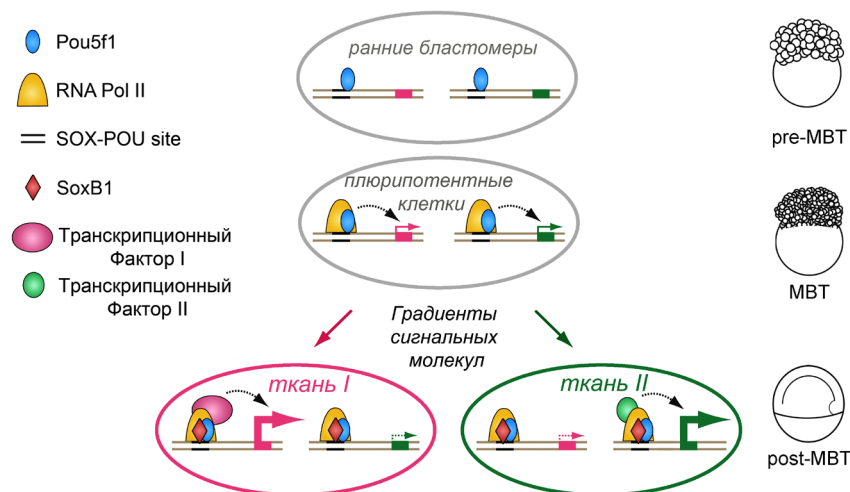


Рис. 4. Гипотетическая модель активации генома зародыша (ZGA) и последующих событий (модификация из [59], публикуется с разрешения AAAS).

Перед ZGA, Pou5f1 (голубой овал) связывается с SOX-POU последовательностями и привлекает РНК-полимеразу II (желтый полуовал), активируя гены-мишени в момент ZGA (промоторы генов-мишеней показаны цветными стрелками). После ZGA, белки SOXB1 (оранжевый ромб) и тканеспецифические транскрипционные факторы (красный и зеленый овалы) образуют комплексы на SOX-POU последовательностях, обеспечивая точное время, силу и пространственный домен включения генов-мишеней. Справа схематично изображены зародыши *Danio rerio* на стадиях перед, во время и после ZGA. Модель, как мы полагаем, применима не только к рыбам, но и к высшим позвоночным.

VII. ПЛЮРИПОТЕНТНЫЙ ПЕРИОД В РАЗВИТИИ

Тотипотентность и плюрипотентность – это временные состояния клеток в процессе развития многоклеточных организмов, которые проходят через обязательную одноклеточную стадию зиготы в своем жизненном цикле. Тотипотентность – неограниченная способность клетки дифференцироваться в любые зародышевые и внезародышевые ткани. Тотипотентностью обладает зигота у всех многоклеточных организмов, и ранние клетки зародыша млекопитающих [65]. Плюрипотентность – способность клетки дифференцироваться в любые зародышевые ткани. Свойством плюрипотентности обладают все клетки ранних зародышей позвоночных животных (как минимум до гастрюляции), Исследования по трансплантации клеток у ранних зародышей мышей, цыплят, *Danio* и лягушек показали, что

большинство клеток остаются плюрипотентными до начала морфогенетических движений во время гаструляции [66–70]. Замечательно, что абсолютное время, в течение которого эмбриональные клетки остаются плюрипотентными во время развития, сильно варьирует у зародышей разных позвоночных: от 6 часов у *Danio* до 5 или более дней у млекопитающих.

VIII. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПЛУРИПОТЕНТНОСТИ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Свойством плюрипотентности обладают также эмбриональные стволовые клетки (Embryonic Stem Cells, ESC) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced Pluripotent Stem Cells, iPSC), несущие в себе огромный потенциал для развития регенерационной медицины. Исследователям удалось получить несколько культур плюрипотентных клеток млекопитающих, способных бесконечно делиться и сохранять плюрипотентность в чашках Петри. Изначально для получения эмбриональных стволовых клеток (ESC) *in vitro* была использована внутренняя клеточная масса зародышей млекопитающих на стадии морулы [71, 72]. Другой тип плюрипотентных клеток – плюрипотентные клетки эпибласта, (Epiblast Stem Cells, EpiSCs), был получен на более поздней стадии развития [73]. Клетки ES и EpiS способны бесконечно делиться в клеточной культуре, сохраняя плюрипотентность. Изменение условий культуры ведет к их дифференцировке *in vitro* во всевозможные типы клеток, составляющих организм. При пересадке в ранние зародыши мышей на стадии бластоцисты, такие клетки смешиваются с клетками зародыша и дают начало мышам-химерам, отчасти состоящим из клеток зародыша, а отчасти – из дифференцированных потомков пересаженных ESC или EpiSC клеток. Для эмбриональных стволовых клеток характерен «открытый» хроматин и высокий уровень транскрипции [74]. Первая же попытка сравнения генов, активно транскрибирующихся в ESC человека и мыши, выявила большое различие в спектре работающих генов у этих двух млекопитающих [75, 76]. Позже было найдено, что человеческие ESC, по их биологическим характеристикам, ближе к мышинным EpiSC, чем к мышинным ESC [77–80]. Разные типы плюрипотентных клеток, ESC и EpiSCs требуют различных условий для роста в культуре и их поддержание в культуре обеспечивается различными сигнальными путями [3]. Однако, все плюрипотентные типы клеток, включая ESC

и EpiSC, экспрессируют транскрипционные факторы – гомологи рассмотренных выше активаторов зародышевого генома – играющие центральную роль в поддержании плюрипотентности: Pou5f1/Oct4, Sox2 и Nanog. Их называют «транскрипционными факторами плюрипотентности». Эти ключевые транскрипционные факторы контролируют экспрессию нескольких тысяч генов в ESC [62, 75, 81]. Участки генома, совместно занятые центральными регуляторами Oct4, Sox2 и Nanog, обычно представляют собой энхансеры, на которых присутствует транскрипционный коактиватор p300 [62,81]. Транскрипция с прилежащих генов часто зависит от по крайней мере одного из этих трех центральных факторов [5]. В ESC млекопитающих комплекс Oct4–Sox2 связывается с последовательностями ДНК, содержащими спаренные SOX-POU-связывающие специфические последовательности [62, 76, 81]. SOX-POU последовательности связываются с Nanog, Oct4, Sox2, Klf2/4 и компонентами сигнальных путей LIF, BMP [81] и Wnt [82]. Таким образом, SOX-POU модуль объединяет множество транскрипционных факторов и сигнальных путей, координируя сигналы развития, дифференцировки и плюрипотентности и обеспечивая баланс между ними. Недавние данные указывают на то, что генетическая сеть, регулируемая центральными факторами плюрипотентности – они же активаторы генома зародыша (см. выше) – в зародыше не обязательно такая же, как и в культуре клеток [83–85]. ESC были успешно получены не только из зародышей млекопитающих, хотя большинство исследований сделаны на них, но и из эмбрионов куриц [86] и костистой рыбы медака (*Oryzias latipes*) [87–89].

IX. ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ (ИРС)

Центральная роль, которую играют транскрипционные факторы в установлении и поддержании недифференцированных ESC, подтверждена известными опытами, согласно которым форсированная экспрессия смеси Oct4(Pou5f1), Sox2, Klf4, и c-Myc (OSKM) способна репрограммировать соматические клетки млекопитающих (фибробласты) в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC, [90]. Это репрограммирование стирает эпигенетические различия между дифференцированными и плюрипотентными клетками и переводит соматические клетки в статус ES-подобных клеток [91, 92]. Репрограммирование может быть индуцировано не только комбинацией Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, но

и альтернативными комбинациями, использующими Nanog, Lin28, ESRRB, NR5A2 и другие гены [3, 93, 94], не исключая даже те транскрипционные факторы, которые не экспрессируются ни в ESC, ни в зародышах соответствующих ранних стадий, но экспрессируются на более поздних стадиях эмбрионального развития [95, 96]. В данный момент невозможно предсказать заранее, какие из комбинаций транскрипционных факторов наиболее эффективно репрограммируют соматические клетки, хотя вопрос этот представляет огромный теоретический и практический интерес.

Способность к репрограммированию не является исключительным свойством клеток млекопитающих, хотя подавляющее большинство работ выполнено именно на них. Об этом, в частности, свидетельствуют данные Росселло и соавторов [97] о том, что форсированная экспрессия четырех факторов транскрипции млекопитающих: Oct4, Klf2, Sox2 и Мус (OKSM), используемых для создания индуцированных плюрипотентных клеток мышей и человека, может индуцировать репрограммированные плюрипотентные клетки у птиц, рыб и даже *Drosophila*. Таким образом, можно полагать, что некоторые свойства генно-регуляторных сетей плюрипотентности присутствовали уже у общего предка позвоночных, жившего 550 миллионов лет назад.

Х. ЭВОЛЮЦИЯ СЕТЕЙ РАННЕЙ ГЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ПОЗВОНОЧНЫХ

Недавние данные, полученные на многоклеточных организмах, подтверждают на молекулярном уровне модель развития позвоночных по принципу «песочных часов» [98–100], которая постулирует наибольшую вариабельность между разными организмами в начале и конце развития, и максимальное сходство между ними в середине эмбриогенеза, на так называемой «филотипической стадии» [101–103]. Действительно, обширные сравнительные молекулярно – генетические исследования разных видов млекопитающих указывают на высокую степень пластичности ранних генно-регуляторных сетей, определяющих плюрипотентность и активацию генома зародыша [104, 105]. Сравнение ранних генно-регуляторных сетей у зародышей мыши и цыпленка с помощью анализа экспрессии генов [106] даже привело авторов к заключению, что генно-регуляторная сеть ранней плюрипотентности возникла *de novo* при появлении в процессе эволюции млекопитающих. Однако, несмотря на высокую вариабельность ранних генно-регуляторных сетей, ряд наблюдений указывает на эволюционный консерватизм некоторых механизмов,

контролирующих плюрипотентность у позвоночных. Среди них можно заметить сходство характерных черт хроматина ESC млекопитающих и ранних зародышей *Danio* [107, 108]). Потеря функции факторов плюрипотентности Pou5f1/3, семейства SoxB1 и Nanog вызывает тяжелые и плейотропные дефекты развития у мышей, *Danio rerio* и *Xenopus*, что говорит о критической роли этих факторов для раннего развития позвоночных [60, 109–113]. Фенотипические дефекты, вызванные мутациями по Pou5f1/3 или Nanog, различаются от вида к виду, однако мутантные фенотипы одного вида позвоночных успешно компенсируются гомологами Pou5f1/3 или Nanog, эволюционно удаленных видов животных, что указывает на функциональный и эволюционный консерватизм этих факторов [51, 114–119]. Эволюционная универсальность ключевых факторов плюрипотентности в генно-регуляторных сетях позвоночных животных, несмотря на быстрый темп эволюционных изменений других компонентов этих генно-регуляторных сетей, хорошо укладывается в концепцию «ядра», предложенную Дэвидсоном и Эрвином [120]. Анализируя ранние генно-регуляторные сети, Дэвидсон и Эрвин идентифицировали класс компонентов, центральных в этих сетях, которые из-за их роли в развитии и особенной внутренней структуры являются наиболее устойчивыми к изменениям [120]. Благодаря их присутствию в раннем развитии большинства позвоночных и способности гомологов Pou5f1/3, SoxB1 и Nanog из эволюционно далеких организмов замещать друг друга, именно центральные плюрипотентные факторы Pou5f1/3, SoxB1 и Nanog следует рассматривать в качестве «ядра» ранних генно-регуляторных сетей зародышей позвоночных.

XI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы вкратце описали современное состояние знания в одной из самых быстро развивающихся областей современной биологии – науке о плюрипотентности в развитии. Произошло слияние двух исходно относительно разобщенных областей биологии: классической экспериментальной биологии раннего развития на модельных организмах, и биологии стволовых клеток, накопившей огромный материал на клеточных культурах. Использование методов молекулярной биологии и генетики сделало возможным идентифицировать группы важных для биологии стволовых клеток генов. Параллельные исследования эпигенетической регуляции привели к открытию специфических модификаций гистонов, характер-

ных для эмбриональных стволовых клеток и ранних зародышей, и места связывания важнейших транскрипционных факторов. Несмотря на эти значительные успехи, молекулярная структура, которая контролирует баланс между плюрипотентностью и дифференцировкой стволовых клеток до сих пор полностью не понята. Это связано с проблемой соотношения данных экспрессии генов с функциональной активностью кодируемых ими белков, производимых клеткой метаболитов, и меняющимся во времени фенотипом клеток, образующих развивающиеся ткани. Применение новых методов биохимии позволяет делать новые шаги в этом направлении. Так, с помощью методов, основанных на количественной масс-спектропии, была получена информация о разнообразных белковых комплексах, образуемых Pou5f1/Oct4 в ES клетках [121, 122]. Исследования продуктов метаболизма эмбриональных стволовых клеток выявило, что окислительно-восстановительный (редокс) статус клеток меняется в процессе дифференцировки, и направление и скорость клеточной дифференцировки изменяется при экспериментальной манипуляции некоторыми метаболическими путями [123]. Большим потенциалом обладают количественные биохимические методы, такие как SILAC, которые позволяют проследить временную динамику синтеза всех клеточных белков, и которые могут быть применены как к клеткам, так и к целым организмам.

Развитие животного из одной единственной клетки происходит по строгому расписанию, в котором последовательность событий контролируется во времени и пространстве. Понимание принципов этого контроля и воспроизведение их в культуре имеет решающее значение для попыток вырастить ткани, а затем и органы, из эмбриональных стволовых клеток. Поэтому ответ на один из центральных вопросов биологии – по каким законам из одной клетки развивается взрослый организм – имеет не только теоретическое, но и огромное практическое значение для будущих областей медицины, таких, как регенеративная терапия.

Благодарности

Авторы выражаем огромную благодарность Владимиру Коржу и Юлии Краус за внимательное прочтение, критику и многочисленные комментарии к этому обзору перед публикацией, позволившие нам сильно улучшить его качество.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adachi, K., Scholer, H.R. (2012) Directing reprogramming to pluripotency by transcription factors, *Current Opinion In Genetics & Development*, **22**, 416–422.
2. Chambers, I., Tomlinson, S.R. (2009) The transcriptional foundation of pluripotency, *Development*, **136**, 2311–2322.
3. Hanna, J.H., Saha, K., Jaenisch, R. (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues, *Cell*, **143**, 508–525.
4. Sternecker, J., Hoing, S., Scholer, H.R. (2012) Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway, *Stem Cells*, **30**, 15–21.
5. Young, R.A. (2011) Control of the embryonic stem cell state, *Cell*, **144**, 940–954.
6. Bosch, T.C. (2009) Hydra and the evolution of stem cells, *Bioessays*, **31**, 478–486.
7. Bosch, T.C., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., Khalturin, K. (2010) The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community, *Dev. Growth Differ.*, **52**, 15–25.
8. Tanaka, E.M., Reddien, P.W. (2011) The cellular basis for animal regeneration, *Developmental Cell*, **21**, 172–185.
9. Conklin, E.G. (1908) The mechanism of heredity, *Science*, **27**, 89–99.
10. Boveri, T. (1918) Zwei Fehlerquellen bei Merogonieversuchen und die Entwicklungsfähigkeit merogonischer und partieller-merogonischer Seeigelbastarde, *Arch. f. Entw.-Mech.*, **44**, 417–471.
11. Godlevski, E. (1906) Untersuchungen ueber die Bastardierung der Echiniden- und Crinoidenfamilie, *Archiv f. Entw. Mech.*, **20**, 579–643.
12. Moore, J. (1941) Developmental rate of hybrid frogs, *Journal of Experimental Zoology*, **86**, 405–422.
13. Rugh, R., Exner, F. (1940) Developmental effects resulting from exposure to x-rays. 11. Development of leopard frog eggs activated by bullfrog sperm, *Proc. Am. Phil. Soc.*, **83**, 607–619.
14. Neyfakh, A.A. (1959) X-ray inactivation of nuclei as method for studying their function in the early development of fishes, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **7**, 173–192.
15. Neyfakh, A.A. (1964) Radiation Investigation of Nucleo-Cytoplasmic Interrelations in Morphogenesis and Biochemical Differentiation, *Nature*, **201**, 880–884.
16. Нейфах А.А. (1961) Сравнительное радиационное исследование морфогенетической функции ядер в развитии животных, *Ж. Общ. Биол.*, **22**, 42–57.
17. Korzh, V. (2009) Before maternal-zygotic transition . There was morphogenetic function of nuclei, *Zebrafish*, **6**, 295–302.
18. Корж В. П., Минин А. А. (2010) Краткая история выюна, или зачем помнить о морфогенетической функции ядер, *Онтогенез*, **41**, 150–158.
19. Rott, N.N., Sheveleva, G.A. (1968) Changes in the rate of cell divisions in the course of early development of diploid and haploid loach embryos, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **20**, 141–150.
20. Спиринов А.С. (1966) О «маскированной» форме информационной рибонуклеиновой кислоты, *Ж. эволюционной биохимии и физиологии*, **II**, 285–292.
21. Spirin, A.S. (1969) Informosomes, *Europ. J. Biochem.*, **10**, 20–35.

22. Воронина А.С. (2002) Регуляция на уровне трансляции в раннем развитии эукариот, *Молекулярная биология*, **36**, 956–969.
23. Kronja, I., Orr-Weaver T.L. (2011) Translational regulation of the cell cycle: when, where, how and why? *Phil. Trans. R. Soc.*, **366**, 3638–3652.
24. Gerhart, J. (1980) Mechanisms regulating pattern formation in the amphibian egg and early embryo., in: Goldberg, R. (Ed.), *Biological Regulation and Development*. Plenum Press, New York, pp. 133–315.
25. Tadros, W., Lipshitz, H.D. (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts, *Development*, **136**, 3033–3042.
26. Yasuda, G.K., Schubiger, G. (1992) Temporal regulation in the early embryo: is MBT too good to be true? *Trends in genetics : TIG*, **8**, 124–127.
27. Langley, A.R., Smith, J. C., Stemple, D. L., Harvey, S.A. (2014) New insights into the maternal to zygotic transition, *Development*, **141**, 3834–3841.
28. Signoret, J., Lefresne, J. (1974) Determination, by tritiated thymidine incorporation, of the stages of cellular cycle in the axolotl germ in synchronous period of segmentation, *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **279**, 1189–1191.
29. Lefresne, J., Andéol, Y., Signoret, J. (1998) Evidence for introduction of a variable G1 phase at the midblastula transition during early development in axolotl, *Dev. Growth Differ.*, **40**, 497–508.
30. Newport, J., Kirschner, M. (1982) A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage, *Cell*, **30**, 675–686.
31. Newport, J., Kirschner, M. (1982) A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription, *Cell*, **30**, 687–696.
32. Kane, D.A., Kimmel, C.B. (1993) The zebrafish midblastula transition, *Development*, **119**, 447–456.
33. Trinkaus, J.P. (1992) The midblastula transition, the YSL transition and the onset of gastrulation in *Fundulus*, *Development, Suppl. S*, 75–80.
34. Collart, C., Allen, G.E., Bradshaw, C.R., Smith, J.C., Zegerman, P. (2013) Titration of four replication factors is essential for the *Xenopus laevis* midblastula transition, *Science*, **341**, 893–896.
35. Edgar, B.A., Schubiger, G. (1986) Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development, *Cell*, **44**, 871–877.
36. Lu, X., Li, J.M., Elemento, O., Tava-zoie, S., Wieschaus, E.F. (2009) Coupling of zygotic transcription to mitotic control at the *Drosophila* midblastula transition, *Development*, **136**, 2101–2110.
37. Piko, L., Clegg, K.B. (1982) Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos, *Developmental biology*, **89**, 362–378.
38. Alizadeh, Z., Kageyama, S., Aoki, F. (2005) Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Molecular reproduction and development*, **72**, 281–290.
39. Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A., Ko, M.S. (2004) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development, *Dev. Cell*, **6**, 117–131.
40. Ferg, M., Sanges, R., Gehrig, J., Kiss, J., Bauer, M., Lovas, A., Szabo, M., Yang, L., Straehle, U., Pankratz, M.J., Olasz, F., Stupka, E., Muller, F. (2007) The TATA-binding protein regulates maternal mRNA degradation and differential zygotic transcription in zebrafish, *The EMBO journal*, **26**, 3945–3956.

41. Aanes, H., Winata, C.L., Lin, C.H., Chen, J.P., Srinivasan, K.G., Lee, S.G., Lim, A.Y., Hajan, H.S., Collas, P., Bourque, G., Gong, Z., Korzh, V., Alestrom, P., Mathavan, S. (2011) Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition, *Genome research*, **21**, 1328–1338.
42. Baugh, L.R., Hill, A.A., Slonim, D.K., Brown, E.L., Hunter, C.P. (2003) Composition and dynamics of the *Caenorhabditis elegans* early embryonic transcriptome, *Development*, **130**, 889–900.
43. Paillard, L., Omilli, F., Legagneux, V., Bassez, T., Maniey, D., Osborne, H.B. (1998) EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos, *The EMBO journal*, **17**, 278–287.
44. Audic, Y., Omilli, F., Osborne, H.B. (1997) Postfertilization deadenylation of mRNAs in *Xenopus laevis* embryos is sufficient to cause their degradation at the blastula stage, *Molecular and cellular biology*, **17**, 209–218.
45. Voeltz, G.K., Steitz, J.A. (1998) AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development, *Molecular and cellular biology*, **18**, 7537–7545.
46. Tadros, W., Westwood, J.T., Lipshitz, H.D. (2007) Titration of four replication factors is essential for the *Xenopus laevis* midblastula transition, *Dev. Cell.*, **12**, 847–849.
47. De Renzis, S., Elemento, O., Tavaoie, S., Wieschaus, E.F. (2007) Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo, *PLoS Biology*, **5**, e117.
48. Liang, H.L., Nien, C.Y., Liu, H.Y., Metzstein, M.M., Kirov, N., Rushlow, C. (2008) The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*, *Nature*, **456**, 400–403.
49. Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., Schier, A.F. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs, *Science*, **312**, 75–79.
50. Lee, M.T., Bonneau, A.R., Takacs, C.M., Bazzini, A.A., Divito, K.R., Fleming, E.S., Giraldez, A.J. (2013) Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition, *Nature*, **503**, 360–364.
51. Onichtchouk, D., Geier, F., Polok, B., Messerschmidt, D.M., Mossner, R., Wendik, B., Song, S., Taylor, V., Timmer, J., Driever, W. (2010) Zebrafish Pou5f1-dependent transcriptional networks in temporal control of early development, *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 354.
52. Farley, E., Levine, M. (2012) HOT DNAs: a novel class of developmental enhancers, *Genes Dev.*, **26**, 873–876.
53. ten Bosch, J.R., Benavides, J.A., Cline, T.W. (2006) The TAGteam DNA motif controls the timing of *Drosophila* pre-blastoderm transcription, *Development*, **133**, 1967–1977.
54. Kanodia, J.S., Liang, H.L., Kim, Y., Lim, B., Zhan, M., Lu, H., Rushlow, C.A., Shvartsman, S.Y. (2012) Pattern formation by graded and uniform signals in the early *Drosophila* embryo, *Biophys. J.*, **102**, 427–433.
55. Nien, C.Y., Liang, H.L., Butcher, S., Sun, Y., Fu, S., Gocha, T., Kirov, N., Manak, J.R., Rushlow, C. (2011) Temporal coordination of gene networks by Zelda in the early *Drosophila* embryo, *PLoS Genetics*, **7**, e1002339.
56. Satija, R., Bradley, R.K. (2012) The TAGteam motif facilitates binding of 21 sequence-specific transcription

- factors in the *Drosophila* embryo, *Genome research*, **22**, 656–665.
57. Kvon, E.Z., Stampfel, G., Yanez-Cuna, J.O., Dickson, B.J., Stark, A. (2012) HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct cis-regulatory signature, *Genes & development*, **26**, 908–913.
 58. Nien, C.Y., Liang, H.L., Butcher, S., Sun, Y., Fu, S., Gocha, T., Kirov, N., Manak, J.R., Rushlow, C. (2011) Temporal coordination of gene networks by Zelda in the early *Drosophila* embryo, *PLoS Genetics*, **7**, e1002339.
 59. Leichsenring, M., Maes, J., Mossner, R., Driever, W., Onichtchouk, D. (2013) Pou5f1 transcription factor controls zygotic gene activation in vertebrates, *Science*, **341**, 1005–1009.
 60. Onichtchouk, D. (2012) Pou5f1/oct4 in pluripotency control: insights from zebrafish, *Genesis*, **50**, 75–85.
 61. Bogdanovic, O., Fernandez-Minan, A., Tena, J.J., de la Calle-Mustienes, E., Hidalgo, C., van Kruysbergen, I., van Heeringen, S.J., Veenstra, G.J., Gomez-Skarmeta, J.L. (2012) Dynamics of enhancer chromatin signatures mark the transition from pluripotency to cell specification during embryogenesis, *Genome research*, **22**, 2043–2053.
 62. Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., Orkin, S.H. (2008) An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells, *Cell*, **132**, 1049–1061.
 63. Foo, S.M., Sun, Y., Lim, B., Ziukaite, R., O'Brien, K., Nien, C.Y., Kirov, N., Shvartsman, S.Y., Rushlow, C.A. (2014) Zelda potentiates morphogen activity by increasing chromatin accessibility, *Curr. Biol.*, **24**, 1341–1346.
 64. Li, X.Y., Harrison, M.M., Villalta, J.E., Kaplan, T., Eisen, M.B. (2014) Establishment of regions of genomic activity during the *Drosophila* maternal to zygotic transition, *eLife*, **3**: e03737.
 65. Burton, A., Torres-Padilla, M.E. (2014) Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis, *Nature reviews. Molecular cell biology*, **15**, 723–734.
 66. Lawson, K.A., Meneses, J.J., Pedersen, R.A. (1991) Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo, *Development*, **113**, 891–911.
 67. Garcia-Martinez, V., and Schoenwolf, G.C. (1992) Positional control of mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation, *Dev. Dyn.*, **193**, 249–256.
 68. Ho, R.K., Kimmel, C.B. (1993) Commitment of cell fate in the early zebrafish embryo, *Science*, **261**, 109–111.
 69. Domingo, C., Keller, R. (2000) Cells remain competent to respond to mesoderm-inducing signals present during gastrulation in *Xenopus laevis*, *Dev. Biol.*, **225**, 226–240.
 70. Okabayashi, K., Asashima, M. (2003) Tissue generation from amphibian animal caps, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 502–507.
 71. Evans, M.J., Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, **292**, 154–156.
 72. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145–1147.
 73. Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., McKay, R.D. (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells, *Nature*, **448**, 196–199.

74. Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S., Bernstein, B.E. (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells, *Nature*, **448**, 553–560.
75. Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells, *Cell*, **122**, 947–956.
76. Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.Y., Sung, K.W., Lee, C.W., Zhao, X.D., Chiu, K.P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.L., Ruan, Y., Lim, B., Ng, H.H. (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells, *Nat. Genet.*, **38**, 431–440.
77. Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., McKay, R.D. (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells, *Nature*, **448**, 196–199.
78. Chenoweth, J.G., McKay, R.D., Tesar, P.J. (2010) Epiblast stem cells contribute new insight into pluripotency and gastrulation, *Dev. Growth Differ.*, **52**, 293–301.
79. Chenoweth, J.G., Tesar, P.J. (2010) Isolation and maintenance of mouse epiblast stem cells, *Methods in molecular biology*, **636**, 25–44.
80. Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., Rais, Y., Shipony, Z., Mukamel, Z., Krupalnik, V., Zerbib, M., Geula, S., Caspi, I., Schneir, D., Shwartz, T., Gilad, S., Amann-Zalcenstein, D., Benjamin, S., Amit, I., Tanay, A., Massarwa, R., Novershtern, N., Hanna, J.H. (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells, *Nature*, **504**, 282–286.
81. Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y.H., Yeo, H.C., Yeo, Z.X., Narang, V., Govindarajan, K.R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W.K., Clarke, N.D., Wei, C.L., Ng, H.H. (2008) Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells, *Cell*, **133**, 1106–1117.
82. Cole, M.F., Johnstone, S.E., Newman, J.J., Kagey, M.H., Young, R.A. (2008) Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells, *Genes Dev.*, **22**, 746–755.
83. Frum, T., Halbisen, M.A., Wang, C., Amiri, H., Robson, P., Ralston, A. (2013) Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst, *Developmental cell*, **25**, 610–622.
84. Le Bin, G.C., Munoz-Descalzo, S., Kurowski, A., Leitch, H., Lou, X., Mansfield, W., Etienne-Dumeau, C., Grabole, N., Mulas, C., Niwa, H., Hadjantonakis, A.K., Nichols, J. (2014) Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst, *Development*, **141**, 1001–1010.
85. Wu, G., Han, D., Gong, Y., Sebastiano, V., Gentile, L., Singhal, N., Adachi, K., Fishedick, G., Ort-

- meier, C., Sinn, M., Radstaak, M., Tomilin, A., Schöler, H.R. (2013) Establishment of totipotency does not depend on Oct4A, *Nature cell biology*, **15**, 1089–1097.
86. Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., Etches, R.J. (1996) Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities, *Development*, **122**, 2339–2348.
87. Hong, N., He, B.P., Scharl, M., Hong, Y. (2013) Medaka embryonic stem cells are capable of generating entire organs and embryo-like miniatures, *Stem cells and development*, **22**, 750–757.
88. Hong, Y., Winkler, C., Scharl, M. (1996) Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*), *Mechanisms of development*, **60**, 33–44.
89. Hong, Y., Winkler, C., Scharl, M. (1998) Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 3679–3684.
90. Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663–676.
91. Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., Hochedlinger, K. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution, *Cell Stem Cell*, **1**, 55–70.
92. Pijnappel, W.W., Esch, D., Baltissen, M.P., Wu, G., Mischerikow, N., Bergsma, A.J., van der Wal, E., Han, D.W., Bruch, H., Moritz, S., Lijnzaad, P., Altelaar, A.F., Sameith, K., Zaehres, H., Heck, A.J., Holstege, F.C., Scholer, H.R., Timmers, H.T. (2013) A central role for TFIID in the pluripotent transcription circuitry, *Nature*, **495**, 516–519.
93. Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., Huangfu, D., Akutsu, H., Liu, D.R., Rubin, L.L., Eggan, K. (2009) A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog, *Cell Stem Cell*, **5**, 491–503.
94. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I., Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, **318**, 1917–1920.
95. Montserrat, N., Nivet, E., Sancho-Martinez, I., Hishida, T., Kumar, S., Miquel, L., Cortina, C., Hishida, Y., Xia, Y., Esteban, C.R., Izpisua Belmonte, J.C. (2013) Reprogramming of human fibroblasts to pluripotency with lineage specifiers, *Cell Stem Cell*, **13**, 341–350.
96. Shu, J., Wu, C., Wu, Y., Li, Z., Shao, S., Zhao, W., Tang, X., Yang, H., Shen, L., Zuo, X., Yang, W., Shi, Y., Chi, X., Zhang, H., Gao, G., Shu, Y., Yuan, K., He, W., Tang, C., Zhao, Y., Deng, H. (2013) Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers, *Cell*, **153**, 963–975.
97. Rossello, R.A., Chen, C.C., Dai, R., Howard, J.T., Hochgeschwender, U., Jarvis, E.D. (2013) Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species, *eLife*, **2**, e00036.
98. Duboule, D. (1994) Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development Supplement*, 135–142.

99. Raff, R.A. (1996) *The Shape of Life: Genes, Development and the Evolution of Animal Form*. Univ Chicago Press.
100. Sander, K. (1976) Specification of the basic body plan in insect embryogenesis, *Adv. Insect Physiol.*, **12**, 125–238.
101. Domazet-Loso, T., Tautz, D. (2010) A phylogenetically based transcriptome age index mirrors ontogenetic divergence patterns, *Nature*, **468**, 815–818.
102. Kalinka, A.T., Tomancak, P. (2012) The evolution of early animal embryos: conservation or divergence?, *Trends Ecol. Evol.*, **27**, 385–393.
103. Piasecka, B., Lichocki, P., Moretti, S., Bergmann, S., Robinson-Rechavi, M. (2013) The hourglass and the early conservation models-co-existing patterns of developmental constraints in vertebrates, *PLoS Genetics*, **9**, e1003476.
104. Kunarso, G., Chia, N.Y., Jeyakani, J., Hwang, C., Lu, X., Chan, Y.S., Ng, H.H., Bourque, G. (2010) Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells, *Nat. Genet.*, **42**, 631–634.
105. Xie, D., Chen, C.C., Ptaszek, L.M., Xiao, S., Cao, X., Fang, F., Ng, H.H., Lewin, H.A., Cowan, C., Zhong, S. (2010) Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species, *Genome research*, **20**, 804–815.
106. Fernandez-Tresguerres, B., Canon, S., Rayon, T., Pernaute, B., Crespo, M., Torroja, C., Manzanares, M. (2010) Evolution of the mammalian embryonic pluripotency gene regulatory network, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 19955–19960.
107. Vastenhouw, N.L., Zhang, Y., Woods, I.G., Imam, F., Regev, A., Liu, X.S., Rinn, J., Schier, A.F. (2010) Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation, *Nature*, **464**, 922–926.
108. Lindeman, L.C., Andersen, I.S., Reiner, A.H., Li, N., Aanes, H., Ostrup, O., Winata, C., Mathavan, S., Muller, F., Alestrom, P., Collas, P. (2011) Prepatterning of Developmental Gene Expression by Modified Histones before Zygotic Genome Activation, *Developmental cell*, **21**, Issue 6, 993–1004.
109. Lunde, K., Belting, H.G., Driever, W. (2004) Zebrafish pou5f1/pou2, homolog of mammalian Oct4, functions in the endoderm specification cascade, *Current biology*, **14**, 48–55.
110. Okuda, Y., Ogura, E., Kondoh, H., Kamachi, Y. (2010) B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryo, *PLoS Genetics*, **6**, e1000936.
111. Reim, G., Brand, M. (2006) Maternal control of vertebrate dorsoventral axis formation and epiboly by the POU domain protein Spg/Pou2/Oct4, *Development*, **133**, 2757–2770.
112. Reim, G., Mizoguchi, T., Stainier, D.Y., Kikuchi, Y., Brand, M. (2004) The POU domain protein spg (pou2/Oct4) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein casanova, *Dev. Cell*, **6**, 91–101.
113. Xu, C., Fan, Z.P., Muller, P., Fogley, R., Dibiase, A., Trompouki, E., Unternaehrer, J., Xiong, F., Torregroza, I., Evans, T., Megason, S.G., Daley, G.Q., Schier, A.F., Young, R.A., Zon, L.I. (2012) Nanog-like Regulates Endoderm Formation through the Mxtx2-Nodal Pathway, *Developmental cell*, **22**, 625–638.
114. Morrison, G.M., Brickman, J.M. (2006) Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development, *Development*, **133**, 2011–2022.

115. Laval, F., Acloque, H., Bertocchini, F., Macleod, D.J., Boast, S., Bachelard, E., Montillet, G., Thenot, S., Sang, H.M., Stern, C.D., Samarut, J., Pain, B. (2007) The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells, *Development*, **134**, 3549–3563.
116. Dixon, J.E., Allegrucci, C., Redwood, C., Kump, K., Bian, Y., Chatfield, J., Chen, Y.H., Sottile, V., Voss, S.R., Alberio, R., Johnson, A.D. (2010) Axolotl Nanog activity in mouse embryonic stem cells demonstrates that ground state pluripotency is conserved from urodele amphibians to mammals, *Development*, **137**, 2973–2980.
117. Theunissen, T.W., Costa, Y., Radzishchanskaya, A., van Oosten, A.L., Laval, F., Pain, B., Castro, L.F., Silva, J.C. (2011) Reprogramming capacity of Nanog is functionally conserved in vertebrates and resides in a unique homeodomain, *Development*, **138**, 4853–4865.
118. Theunissen, T.W., van Oosten, A.L., Castelo-Branco, G., Hall, J., Smith, A., Silva, J.C. (2011) Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions, *Current biology*, **21**, 65–71.
119. Tapia, N., Reinhardt, P., Duemmler, A., Wu, G., Arauzo-Bravo, M.J., Esch, D., Greber, B., Cojocaru, V., Rascon, C.A., Tazaki, A., Kump, K., Voss, R., Tanaka, E.M., Scholer, H.R. (2012) Reprogramming to pluripotency is an ancient trait of vertebrate Oct4 and Pou2 proteins, *Nat. Commun.*, **3**, 1279.
120. Davidson, E.H., Erwin, D.H. (2006) Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans, *Science*, **311**, 796–800.
121. Ding, J., Xu, H., Faiola, F., Ma'ayan, A., Wang, J. (2012) Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network, *Cell research*, **22**, 155–167.
122. van den Berg, D.L., Snoek, T., Mullin, N.P., Yates, A., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., Poot, R.A. (2010). An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **6**, 369–381.
123. Yanes, O., Clark, J., Wong, D.M., Patti, G.J., Sanchez-Ruiz, A., Benton, H.P., Trauger, S.A., Despons, C., Ding, S., Siuzdak, G. (2010). Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation, *Nature chemical biology*, **6**, 411–417.