

ОСНОВНІ СИГНАЛЬНІ СИСТЕМИ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ У ФУНКЦІОНУВАННІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН (огляд літератури)

М. Д. Тронько, В. М. Пушкар'юв, О. І. Ковзун, В. В. Пушкар'юв

Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, Київ 04114, Україна

Резюме. Сучасна гормональна замісна терапія ендокринних порушень не може відтворити складну взаємодію гормонів. Трансплантація клітин є більш фізіологічним підходом до лікування дисфункції ендокринних залоз. Одержані дані свідчать про ефективність застосування стовбурових клітин (stem cells, SCs) для лікування низки ендокринних захворювань і, в першу чергу, цукрового діабету 1 типу. SCs – це клітини з клонотенним потенціалом, які можуть самостійно відновлюватися та диференціюватися у різні типи клітин. Вони відповідають за регенерацію та розвиток органів і тканин. SCs надають багато можливостей для регенеративної медицини і служать перспективною модельною системою для вивчення ранніх стадій розвитку ембріона людини. З'ясовано багато молекулярних механізмів, що лежать в основі самовідновлення SCs та канцерогенезу. Основними сигнальними шляхами, залученими в SCs, є янус кінза/сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції (janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT), Notch, мітоген-активована протеїнкіназа/кінза, що регулюється позаклітинними сигналами (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, MAPK/ERK), фосфоінозитид-3 кінза/протеїнкіназа В (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (protein kinase B), PI3K/Akt), ядерний фактор капаВ (nuclear factor kappaB, NF-κB), Wnt (Wingless and Int-1), Hedgehog (Hh), трансформуючий фактор росту бета (transforming growth factor beta, TGF-β) та Hippo. Аналіз статусу та послідовності активації, пригнічення і взаємодії цих сигнальних шляхів важливий в контексті функціонування SCs. Процес диференціації плюрипотентної клітини *in vitro* має низьку ефективність. Багато диференційованих клітин характеризуються розрегульованими сигнальними шляхами й молекулярні маркери кожної стадії процесу диференціації ще не ідентифіковані. Розробка протоколів для диференціації плюрипотентних клітин до β-клітин, що виробляють інсулін *in vitro*, їх трансплантація та приживлення в організмі вимагають чіткого розуміння участі та перехресної взаємодії цілого ряду сигнальних систем клітини. Дослідження мережі передачі сигналів, необхідних для підтримання стовбуровості, визначили сильну кореляцію цих шляхів із сигнальними шляхами злоякісних пухлин, а також спільні клітинні властивості ембріональних SCs та клітин раку, що вже не можна відкидати як випадковість. Вивчення цих паралелей неминує вплине як на клінічні, так і на фундаментальні науки.

Ключові слова: стовбурові клітини, сигнальні шляхи.

Відомості про авторів

Тронько Микола Дмитрович – д. м. н., проф., академік НАМН України, член-кореспондент НАН України, директор ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ, ORCID: 0000-0001-7421-0981

Пушкаръов Володимир Михайлович – д. б. н., головний науковий співробітник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ, ORCID: 0000-0003-0347-7771

Ковзун Олена Ігорівна – д. б. н., проф., член-кореспондент НАМН України, заступник директора з наукових питань ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ, ORCID: 0000-0001-8164-7671

Пушкаръов Віктор Володимирович – к. б. н., старший науковий співробітник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ, ORCID: 0000-0001-5940-5510

Для цитування: Тронько МД, Пушкаръов ВМ, Ковзун ОІ, Пушкаръов ВВ. Основні сигнальні системи, що беруть участь у функціонуванні стовбурових клітин (огляд літератури). Журнал Національної академії медичних наук України. 2022;28(1); 327-354. DOI: 10.37621/JNAMSU-2022-1-3.

Стаття надійшла до редакції 28.12.2021 року

Направлена на рецензування 30.04.2022 року

Прийнята до публікації 23.06.2022 року

THE MAIN SIGNALING SYSTEMS INVOLVED IN THE FUNCTIONING OF STEM CELLS (*review of literature data*)

Mykola D. Tronko, Volodymyr M. Pushkarev, Olena I. Kovzun, Viktor V. Pushkarev

State Institution «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 69 Vyshgorodska Str., Kyiv 04114, Ukraine

Abstract. Modern hormone replacement therapy for endocrine disorders cannot reproduce the complex interactions of hormones. Cell transplantation is a more physiological approach to the treatment of endocrine gland dysfunction. The data obtained indicate the effectiveness of the stem cells (SCs) use for the treatment of endocrine diseases and, first of all, type 1 diabetes. SCs are cells with clonogenic potential that can repair themselves and differentiate into different types of cells. They are responsible for the regeneration and development of organs and tissues. SCs provide many opportunities for regenerative medicine and serve as a promising model system for studying the early stages of human embryo development. Many molecular mechanisms underlying SCs self-repair and carcinogenesis have been elucidated. The main signaling pathways involved in SCs are JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), Notch, MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF- κ B, Wnt, Hedgehog (Hh), TGF- β (transforming growth factor-beta) and Hippo, and analysis of their status and sequence of activation, suppression, and interaction is important in the context of SCs functioning. The differentiation process of a pluripotent cell *in vitro* has low efficiency. Many differentiated cells are characterized by dysregulated signaling pathways, and molecular markers for each stage of the differentiation process have not yet been identified. The development of protocols for the differentiation of pluripotent cells into β -cells that produce insulin *in vitro*, and their transplantation, and engraftment in the body requires a clear understanding of the involvement and cross-interaction of a range of cell signaling systems. Studies of the signaling network required to maintain stemness have identified a strong correlation of these pathways with cancer signaling pathways, as well as the general cellular properties of embryonic SCs and cancer cells, which cannot be dismissed as coincidence. Studying these parallels will inevitably affect both clinical and fundamental sciences.

Keywords: stem cells, signaling pathways.

Information about author

Mykola D. Tronko – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Academician of the NAMS of Ukraine, Cor. Member of the NAS of Ukraine, Director of the State Institution «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMSU», Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-7421-0981

Volodymyr M. Pushkarev – Dr. Sci (Biology), Chief Research Fellow of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology of the State Institution «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMSU», Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0003-0347-7771

Olena I. Kovzun – Dr. Sci. (Biology), Prof., Cor. Member of the NAMS of Ukraine, Deputy Director of the Institute for Scientific Affairs of the State Institution «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMSU», Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-8164-7671

Viktor V. Pushkarev – Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology of the State Institution «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMSU», Kyiv, Ukraine, ORCID: 0000-0001-5940-5510

For citation: Tronko MD, Pushkarev VM, Kovzun OI, Pushkarev VV. The main signaling systems involved in the functioning of stem cells (review of literature data). *Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine*. 2022;28(1): 327-354. DOI: 10.37621/JNAMSU-2022 -1-3.

The article was received 28.12.2021

For review, 30.04.2022

Accepted for publication 23.06.2022

Volodymyr M. Pushkarev
 ORCID: 0000-0003-0347-7771
 pushkarev.vm@gmail.com

Сучасна гормональна замісна терапія ендокринних порушень не може відтворити складну взаємодію гормонів. Трансплантація клітин є більш фізіологічним підходом до лікування дисфункції ендокринних залоз. Одержані дані свідчать про ефективність застосування SCs для лікування низки ендокринних захворювань [1] і, в першу чергу, цукрового діабету 1 типу.

Наші організми складаються приблизно з 200 різних типів соматичних клітин, які мають обмежену здатність до проліферації. *In vitro* соматичні клітини можуть подвоюватися 50-60 раз перед тим, як вступити до незворотного арешту росту – сенесценції. На відміну від них, SCs та пухлинні клітини обходять цей реплікативний бар'єр і набувають здатності до необмеженого ділення при вирощуванні в певних умовах [2].

SCs – це клітини з клоногенним потенціалом, які можуть самостійно відновлюватися та диференціюватися у різні типи клітин. Вони відповідають за регенерацію та розвиток органів і тканин. Є три типи SCs, включаючи ембріональні SCs (embryonic stem cells, ESCs), SCs сформованих органів (adult stem cells, ASCs) та індуковані плюрипотентні SCs (induced pluripotent stem cells, iPSCs). Нещодавно був відкритий ще один тип плюрипотентних SCs, які присутні в багатьох тканинах, включаючи кістковий мозок, пуповинну кров і гонади – дуже маленькі ембріоноподібні SCs (very small embryonic-like stem cells, VSELs) [3]. VSELs є найпримітивнішими стовбуровими клітинами та демонструють численні характеристики ESCs, включаючи здатність до диференціювання у всіх трьох зародкових листках [4, 5].

За ефективністю диференціації SCs можна розділити на тотипотентні (клітини стадії морули), плюрипотентні (ембріональні та індуковані стовбурові клітини), мультипотентні (гематопоетичні SCs, дорослі стовбурові клітини-попередники та мезенхімальні SCs),

олігопотентні та уніпотентні (клітини-попередники, які диференціюються в декілька або одну лінію клітин) клітини [4, 6, 7]. ESC, отримані з бластоцист, є плюрипотентними стовбуровими клітинами, які можуть диференціюватися майже у всі види клітин; таким чином, ці клітини є хорошим варіантом для генерації тканин. Використання ESC стикається з етичними та правовими проблемами, оскільки їх беруть з людських ембріонів. Щобільше, вони пов'язані з ризиком утворення тератом та аутоімунної відповіді *in vivo* [8]. iPSC є ще одним джерелом плюрипотентних SCs [9, 10], які створюються внаслідок ектопічної експресії факторів плюрипотентності, таких як OCT4, Nanog, SOX2, c-Мус та KLF4, а також зумовленої вірусними векторними або невірусними факторами перепрограмування, що може призвести до геномної нестабільності [11]. iPSC можуть індукувати Т-клітинну імунну відповідь, тому перед аутологічною трансплантацією iPSC слід оцінювати їх імуногенність [12]. ASC, отримані практично з усіх органів і тканин, менш здатні диференціюватися на численні типи клітин ніж інші два типи SCs [13]. Вони, як правило, мультипотентні, деякі з них експресують плюрипотентні маркери, тоді як інші ASC є олігопотентними або уніпотентними [14].

ASC можуть уникнути мутаційних та потенційних побічних ефектів, характерних для iPSC. До того ж імуногенність ASC є найнижчою серед трьох типів SCs [15]. До того, програма ASC долає етичні та правові проблеми, оскільки їх можна одержувати від аутологічної форми. За цими показниками ASC є найбільш вигідним вибором для клінічного застосування. Мезенхімальні стовбурові клітини (mesenchymal stem cell, MSC) мезодермального походження, які також називають мезенхімальними стромальними клітинами, – це ASC з різноспрямованим потенціалом диференціації. MSC можуть походити майже з усіх типів тканин, включаючи кістковий мозок, придатки плоду, жирову тканину, тканини зубів, тканини скелетних м'язів, тканини печінки, легенів та менструальну кров [7, 16, 17]. Вони характеризуються адгерентністю до пластику, веретеноподібною формою, експресією антигенних маркерів (CD73+ CD90+ CD105+) на їх поверхні, потенціалом диференціювання в адипоцити, остеоцити та хондроцити. Попри те, що мультипотентні SCs диференціюються лише до одного зародкового шару, було продемонстровано, що MSC можуть *in vitro* диференціюватися до немезодермальних клітин, включаючи острівцево-подібні клітини підшлункової залози, нейроно-подібні клітини та гепатоцити [7, 18]. Зараз MSC привертають значну увагу своєю ефективністю та безпекою при клітинній терапії.

Основні сигнальні системи, які беруть участь у функціонуванні стовбурових клітин.

SCs надають багато можливостей для регенеративної медицини та служать перспективною модельною системою для вивчення ранніх стадій розвитку ембріона людини. З'ясовано багато молекулярних механізмів, що лежать в основі самовідновлення SCs та канцерогенезу. Основні сигнальні шляхи, які залучені в SCs є янус кін аза/сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції (janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT), Notch, мітоген-активована протеїнкіназа/кін аза, що регулюється позаклітинними сигналами (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase regulated by extracellular signals, MAPK/ERK), фосфоінозитол-3 кін аза/протеїнкіназа B (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (protein kinase B), PI3K/Akt), ядерний фактор капаВ (nuclear factor kappaB, NF-κB), Wnt (Wingless and Int-1), Hedgehog (Hh), трансформуючий фактор росту бета (transforming growth factor beta, TGF-β) та Hippo та аналіз їх статусу та послідовності активації, пригнічення і взаємодії важливий в контексті функціонування SCs (рис.).

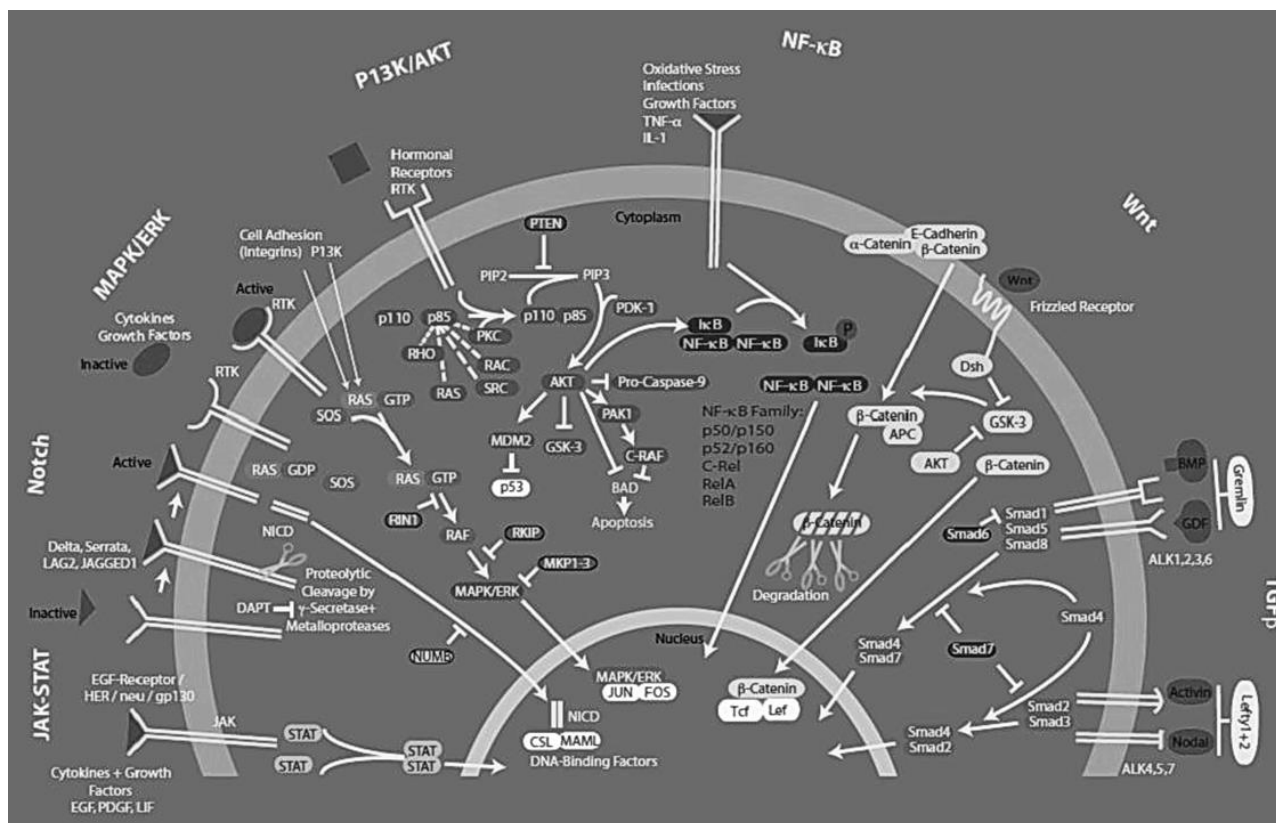


Рис. Сигнальні мережі в стовбурових і ракових клітинах. Схематичне зображення основних сигнальних шляхів, залучених до функціонування стовбурових клітин: JAK/STAT, Notch, MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF-κB, Wnt, TGF-β [2]

Fig. Signaling networks in stem and cancer cells. Schematic representation of the main signaling pathways involved in stem cells: JAK/STAT, Notch, MAPK/ERK, PI3K/AKT, NF-κB, Wnt, TGF-β [2]

Процес диференціації плюрипотентної клітини *in vitro* має низьку ефективність. Багато диференційованих клітин характеризуються розрегульованими сигнальними шляхами і молекулярні маркери кожної стадії процесу диференціації ще не ідентифіковані. Розробка протоколів для диференціації плюрипотентних клітин до β-клітин, що виробляють інсулін *in vitro*, вимагає чіткого розуміння участі та перехресної взаємодії цілого ряду сигнальних систем клітини.

Сигнальний шлях JAK/STAT.

Клітини можуть спілкуватися між собою за допомогою секреції цитокінів, невеликих (8-30 кДа) розчинних білків, які після зв'язування зі своїми рецепторами активують рецептор-асоційовані янус-кінази (JAK) фосфорилують залишки тирозину зв'язаних з лігандом рецепторів, а також латентних цитозольних транскрипційних факторів STAT (signal transducers and activators of transcription), що взаємодіють з ними (рис.). Фосфорильовані по тирозину STAT утворюють гомодимери, переміщуються до ядра і беруть участь у транскрипційній регуляції різноманітних генів. STAT також активуються у відповідь на дію ростових факторів, таких як епідермальний фактор росту (epidermal growth factor, EGF) або фактор росту тромбоцитів (platelet-derived growth factor, PDGF) [19].

Ряд факторів негативно регулюють сигналінг JAK/STAT. Тирозинфосфатази інактивують передачу сигналів шляхом безпосереднього видалення активувальних фосфатів на JAK, STAT та рецепторах цитокінів. Супресори сигналіngu цитокінів (suppressors of cytokine signaling, SOCS) зв'язуються з фосфорильованими тирозинами на JAK та їх рецепторах, що призводить до їх протеасомної деградації та запобігає активації STAT.

Білкові інгібітори активованих білків STAT (protein inhibitor of activated STAT, PIAS) зв'язуються з активованими молекулами STAT і перешкоджають їх зв'язуванню з ДНК [20].

Шлях JAK/STAT відіграє важливу роль в опосередкуванні долі клітини: апоптозі, диференціації або проліферації, у відповідь на дію ростових факторів та цитокінів.

Сигнальний шлях JAK/STAT ембріональних стовбурових клітин. JAK/STAT є одним із кількох консервативних шляхів передачі сигналу, необхідних для нормального розвитку та фізіології дорослого організму, а також для регенеративних реакцій при інфекції та травмах [21]. За останні кілька років вчені виявили вирішальну роль передачі сигналів JAK/STAT у консервативних процесах, починаючи від самовідновлення SCs для гомеостазу, до проліферації та виживання під час регенерації. Крім того, сигналінг JAK/STAT виконує важливі функції в конкуренції клітин, в тому числі й SCs, яка також є консервативним процесом.

Шлях JAK/STAT також може брати участь у підтримці плюрипотентного стану ембріональних SCs мишей (mESC). Під час культивування mESC *in vitro*, лейкоемічний інгібіторний фактор (leukemia inhibitory factor, LIF), може замінити клітинний живильний шар. LIF є членом сімейства цитокінів IL-6 (інтерлейкін-6) і зв'язується з рецептором LIF (LIFR), гетеродимеризуючись з глікопротеїном 130, (gp130), що трансдукує сигнал LIF і призводить до фосфорилування тирозину STAT3 [22].

Було ретельно проаналізовано зв'язок між сигнальним шляхом LIFR/JAK/STAT3 і основним ланцюгом асоційованих з плюрипотентністю транскрипційних факторів, що складаються з OCT4, SOX2, KLF4 і Nanog. У mESC шлях JAK/STAT3 регулює експресію KLF4, а потім транскрипцію SOX2, тоді як експресія Nanog посилюється за допомогою TBX3 (T-box transcription factor), індукованого сигнальним каскадом PI3K/Akt. Подібно до надекспресії STAT3, яка підтримує наївну плюрипотентність у mESC, екзогенна експресія KLF4 є достатньою для збереження плюрипотентності. Крім того, інгібування MAPK, яка є іншим сигнальним фактором, що активується LIFR/gp130, також посилює регуляцію TBX3 і Nanog. Це узгоджується з даними, які свідчать що шлях MAPK активується фактором росту фібробластів (FGF), і сприяє виходу ESC з плюрипотентного стану [22].

Сигналінг JAK/STAT відіграє інтегральну роль у багатьох нішах SCs і є важливим для нормального функціонування кількох популяцій SCs ссавців. Очищені ембріональні, гемопоетичні та нейронні SCs експресують високі рівні компонентів каскаду JAK/STAT, що свідчить про його необхідність для багатьох типів SCs у ссавців. Однак, сигнали, що контролюють ніші SCs ссавців, ще недостатньо вивчені. Хоча відомо, що цей шлях бере участь у контролі SCs під час кровотворення в кістковому мозку та нейрогенезу в корі, що розвивається [20].

У mESC, які вирощуються у присутності LIF і сироватки, STAT3 фосфорилується і вони залишаються плюрипотентними. Однак виключення gp130, STAT3 або LIF не впливає на плюрипотентність mESC. Крім того, у мишей, дефіцитних щодо компонентів шляху LIF/STAT3, відсутні дефекти SCs. У сукупності ці результати дозволяють припустити, що передача сигналу через STAT3 може бути достатньою, але не обов'язковою для забезпечення плюрипотентності mESC. Водночас, LIF не підтримує плюрипотентність hESC, які вирощуються за відсутності живильних клітин, а STAT1, 3 і 5 в плюрипотентних hESC не фосфорилуються [2]. За цими даними, додавання LIF до середовища живлення hESC недостатньо для підтримки плюрипотентності. Ця очевидна суперечність між ESC миші та людини свідчить про те, що шляхи, які підтримують плюрипотентність у двох видів, різні.

Notch-сигналінг

Сигналінг Notch бере участь у розвитку і підтримці гомеостазу тканин у тварин метазойського типу. Під час розвитку тканин організму шлях Notch відіграє важливу роль у опосередкуванні передачі сигналів між сусідніми клітинами. Так, Notch може пригнічувати поширення клітинної диференціації всередині тканини (латеральне гальмування) або сприяти тому, щоб сусідні клітини розвивалися в однаковому напрямку (латеральна індукція) [23].

Система Notch у ссавців складається з чотирьох трансмембранних рецепторів типу I (Notch1-4) і двох класів лігандів – DLL1/3/4 (Delta-like) та JAG 1/2 (Jagged). Активація цього шляху викликається взаємодією мембрано-асоційованих лігандів Notch – Delta, Serrata або Lag2 з їхніми Notch-рецепторами. Після зв'язування ліганду механічна сила викликає послідовне протеолітичне розщеплення у внутрішньоклітинних частинах рецептора, які здійснюються металопротеазами типу ADAM та γ -секретазою, що в кінцевому підсумку вивільняє внутрішньоклітинний домен Notch – NICD (intracellular domain of Notch) у цитоплазму (рис.). Позаклітинний фрагмент (Notch EC) залишається асоційованим з трансмембранним доменом (Notch-TM), тоді як вивільнений NICD переміщується до ядра, де він з багатьма іншими коактиваторами транскрипції утворює активувальний транскрипційний комплекс з ДНК-зв'язуючими факторами CSL (CBF1/(RBP-J κ) Suppressor of Hairless/Lag1), і MAML1-3 (Mastermind-like protein family) [24]. С-кінцевий домен PEST (peptide sequence rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)). є протеолітичною мішенню для деградації активного Notch, що необхідно для забезпечення жорсткої регуляції цього сигнального шляху [23]. Показано також, що Notch може виконувати свої функції неканонічними шляхами, взаємодіючи з іншими сигнальними каскадами, такими як Wnt/ β -катенін, NF- κ B, TGF β [23, 25].

Роль сигналіngu Notch в ембріональних стовбурових клітинах. Дослідження показали, що Notch неактивний в недиференційованих ESC і не потрібний для підтримки плюрипотентності ESC людини. Сигналінг Notch пригнічувався культивуванням клітин у присутності інгібітора γ -секретазу. Інгібування Notch не впливало на недиференційовані клітини, але суттєво зменшувало частку клітин, що диференціюються, які зазвичай з'являються в культурі ESC людини. Відповідно до цієї моделі, передача сигналів Notch посилювалась в диференційованих клітинах, що походили з колонії hESC. Крім того, клітини в присутності конститутивного сигналу Notch, винятково диференціюються в нервові клітини. Таким чином, хоча Notch, можливо, не відіграє ролі у підтримці плюрипотентності в hESC, він бере участь у вирішенні долі клітини, і порушення регулювання цього шляху було виявлено у багатьох типах пухлин людини [2].

Розуміння сигнальних шляхів, які керують гемопоетичними стовбуровими та прогеніторними клітинами (HSPC), є важливим для вивчення їх регуляції та механізмів виникнення гематологічних злоякісних пухлин. Досі неясно чи необхідний Notch для регулювання HSPC у ссавців. Сигналінг Notch у HSPC відрізняється *in vitro* та *in vivo*, а також на різних стадіях диференціювання. Відомо, що клітини ніші кісткового мозку активують передачу сигналів Notch у HSPC, підвищуючи їх здатність до самовідновлення та регенерації. Адекватний рівень сигналіngu Notch видається необхідним для уникнення розвитку злоякісних новоутворень крові. Дослідження показують, що передача сигналів Notch може відігравати певну роль у гомеостатичному та регенеративному гемопоезі, але необхідна подальша робота, щоб зрозуміти, як каскад регулюється різними парами лігандів і рецепторів та молекулярними механізмами, які ініціюються [26]. Постійне кровотворення ссавців вимагає безперервного створення зрілих клітин крові, які походять із гемопоетичних стовбурових і прогеніторних клітин, розташованих у постнатальному кістковому мозку (КМ). Мікросередовище КМ є надзвичайно складним і багато досліджень були присвячені визначенню ніші, яка підтримує гомеостаз HSPC і гемопоетичний потенціал. Сигнальний шлях Notch необхідний для появи дефінітивної гемопоетичної стовбурової клітини (HSC) під час ембріонального розвитку, але його роль у гомеостазі HSC в КМ є ще неясною. Описана пре-тимічна ніша в КМ, де сигналінг Notch впливає на розвиток лімфоїдних і, зокрема, Т-клітин. Лімфоїдні попередники в КМ отримують сигнали Notch в основному в остеобластній ніші, яка також забезпечує важливі сигнали, що беруть участь у розвитку лімфоїдів, включаючи CXCL12, IL-7 і SCF (stem cell factor). Механізми передтимусного сигналіngu Notch у розвитку лімфоїдів в КМ включають індукцію молекул, які беруть участь у виході клітин з кістки та міграції в тимус. Ключовим результатом цієї програми сигналіngu Notch є раннє пригнічення мієлоїдної транскрипції. Хоча активність і функціонування Notch в КМ

відомі, нисхідні таргетні гени Notch у лімфопоезі КМ, особливо стосовно проліферації та виживання, ще не повністю встановлені [27].

Соматичні SCs та клітини-попередники в активному стані в ембріональних тканинах активно діляться і диференціюються в різні типи зрілих клітин, але у багатьох тканинах дорослого організму вони в основному перебувають у сплячому стані (стан спокою). Відомо, що сигналінг Notch регулює як активні стани, так і стани спокою соматичних SCs. Показано, що ефектор Notch – HES1 (hairy and enhancer of split-1) по-різному експресується в активному стані та стані спокою під час нейрогенезу та міогенезу: висока експресія у стані спокою та осциляції в активному стані. Високі рівні HES1 і пов'язане з ним пригнічення ASCL1 (Achaete-scute homolog 1) сприяють спокою нервових SCs, тоді як осциляції ASCL1, залежні від осциляцій HES1, регулюють їх активний стан. Аналогічно, у клітинах-сателітах м'язів – соматичних м'язових SCs, високий рівень HES1 і пов'язане з цим пригнічення MyoD (myoblast determination protein), схоже, сприяють їх спокою, тоді як осциляції MyoD, залежні від осциляцій HES1, активують їх проліферацію та диференціацію. Отже, динаміка експресії HES1 є ключовим регуляторним механізмом генерації та підтримки активних/неактивних станів SCs [28].

Шлях MAPK

У ссавців були виявлені чотири сигнальні шляхи MAPK. Це шляхи ERK1/2, JNK, p38MAPK і ERK5, які активуються різними факторами, що призводить до різноманітних біологічних ефектів. Ці шляхи перехресно (синергічно або антагоністично) взаємодіють один з одним [29, 30].

Шлях Ras/MAPK відіграє важливу роль у передачі сигналів від цитокінів та факторів росту через рецепторні тирозинкінази (RTK), що сприяє клітинній адгезії, проліферації, міграції та виживанню. Ключовим фактором в цьому сигнальному каскаді є Ras (Rat sarcoma virus), невелика мембранозв'язана GTP-аза, яка характеризується двома конформаційними станами: активним, пов'язаним з GTP, та неактивним, пов'язаним з GDP. Ras активується SOS (Son Of Sevenless), фактором обміну гуаніну, який зазвичай знаходиться в цитоплазмі клітини. Після активації рецептора, SOS мігрує до клітинної мембрани та каталізує реакцію обміну нуклеотидів Ras. Активованій GTP-зв'язаний Ras, своєю чергою, активує серин/треонінову кіназу Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma), яка далі активує MAPK, а саме кіназу, що регулюється позаклітинними сигналами (ERK – extracellular signal-regulated kinase). ERK1/2 транслокуються в ядро, де вони активують фактори транскрипції Jun/Fos [31-33]. Шлях MAPK також може бути активований молекулами позаклітинного матриксу та змінами у фокальній адгезії, однак більшість цих сигналів передаються через фокальну кіназу адгезії FAK (focal adhesion kinase) та PI3K [2].

Численні фактори пригнічують активність цього шляху: RKIP (raf kinase inhibitor protein) перешкоджає фосфорилуванню MAPK; RIN1 (Ras and RAB interactor) конкурують з Raf за зв'язування з GDP-зв'язаним Ras; MAPK-фосфатази MKP1-3, гальмують передачу сигналу шляхом дефосфорилування MAPK/ERK.

Шлях MAPK у стовбурових клітинах. Два шляхи, MAPK і PI3K/Akt, відіграють важливу роль у підтримці плюрипотентності, самовідновленні, перепрограмуванні та вирішенні долі SCs [34, 35], а їх контекстно-залежна перехресна взаємодія [36] сприяє регулюванню цих процесів [37].

Встановлено, що компоненти шляху SOS/Ras/Raf/MAPK, такі як RASAL2 (Ras GTPase-activating protein nGAP) та SOS1, down-регулюються більш ніж у чотири рази під час диференціації hESC. Інші компоненти, включаючи MAP4K1, MAP2K6, Raf, KRas, NRas та BRAf, пригнічувались менше. Імуногістохімічний аналіз показав, що фосфорильовані c-Raf та SOS1 присутні на клітинній мембрані, в цитоплазмі та ядрі. Для недиференційованих ESC необхідний фактор росту фібробластів (FGF), який передає сигнал через шлях Ras/ERK/MAPK. Пригнічення шляху MAPK/ERK інгібітором U0126 у присутності FGF призводило до масової загибелі та диференціації клітин. Нефізіологічні рівні FGF підтримують плюрипотентність hESC за відсутності живильного шару. У сукупності ці

результати дозволяють припустити, що сигналінг MAPK/ERK активний в недиференційованих hESC і пригнічується при диференціації [2].

Відомо, що у дорослому організмі кіназа p38α необхідна для активації HSC, а також для специфікації та дозрівання ліній гемопоетичних клітин [38]. Було виявлено, що шлях p38MAPK, контролює схильність клітин ES до кардіоміогенезу (p38 активна), або нейрогенезу (p38 неактивна). ESC з нокаутом p38α не диференціюються на ендотеліальні, серцеві, гладком'язові та клітини скелетних м'язів. Реекспресія p38MAPK у цих клітинах частково знімає дефекти мезодермальної диференціації та коригує високий рівень спонтанного нейрогенезу нокаutowаних клітин. Під час процесу диференціювання клітини ES дикого типу обробляли специфічним для p38MAPK інгібітором. Це дозволило ідентифікувати дві ранні незалежні послідовні функції p38MAPK у формуванні мезодермальних ліній. Перша корелює з регуляцією p38MAPK експресії Brachyury, важливого специфічного для мезодерми транскрипційного фактора. Отже, за допомогою генетичних та біохімічних підходів було продемонстровано, що активність p38MAPK є важливою для розвитку ESC у лінії серцевих, ендотеліальних, гладких м'язів та мезодермальних скелетних м'язів [39].

Чоловічі зародкові стовбурові клітини (mGSC) (сперматогоніальні стовбурові клітини – SSC), постійно генерують сперматозоїди. Дослідження механізмів самовідновлення mGSC виявили, що в цей процес залучено кілька факторів. Активована трансмембранна тирозинкіназа Ret може активувати кілька шляхів, включаючи сигнальні шляхи MAPK, PI3K, SFK (Src family of protein tyrosine kinases) і PLC-γ, що призводить до регуляції низхідних генів. Ліганд FGF2 може активувати рецептор FGF2 (FGFR) на поверхні mGSC. Активовані рецептор FGF2 може додатково активувати білок Ras, активуючи шлях MAPK і, таким чином, сприяти самовідновленню mGSC. Припускають, що шлях Ras/ERK1/2 відіграє вирішальну роль у підтримці самовідновлення mGSC через регуляцію ETV5 (Ets variant 5) і BCL6B (B-cell CLL/lymphoma 6 member B protein) [29, 30]. Шлях p38MAPK є консервативним в багатьох типах клітин *in vivo* і відіграє важливу роль у проліферації, диференціації, запаленні та апоптозі клітин. Показано, що шлях p38MAPK також відіграє важливу роль у підтримці здатності mGSC до самовідновлення, однак його роль у цьому процесі ще точно не визначена [29].

Сигналінг FGF має вирішальне значення для регулювання плюрипотентності SCs. Сімейство FGF складається з 22 лігандів, які взаємодіють з чотирма рецепторами FGF. Сигналінг FGF/FGFR керує основними клітинними процесами, такими як виживання клітин, проліферація, міграція, диференціація, ембріональний розвиток, органогенез, регенерація тканин і метаболізм. Передача сигналів FGF опосередковується активацією Ras/MAPK, PI3K/Akt, PLCγ, а також STAT, який перетинається та взаємодіє з іншими сигнальними шляхами, такими як сигналінг Wnt, ретиноевої кислоти (RA) та трансформуючого фактора росту TGF-β [40].

Високоєфективна диференціація ендотеліальних клітин (EC) з плюрипотентних SCs вимагає активації шляхів MAPK і PI3K, які мають важливе значення не тільки для початкового спрямування на утворення ліній судинних клітин, але і для диференціації судинних клітин-попередників до EC, напевно, через регуляцію транскрипційних факторів сімейства Ets – ERG (Ets-related gene) і FLI1 (Friend leukemia integration 1 transcription factor). Отже, виявлено нову роль шляхів MAPK – p38 і JNK у диференціації EC. Крім того, інгібування шляху ERK помітно сприяло диференціації гладком'язових клітин [41].

Фактор інгібування лейкемії (LIF) є незамінним для підтримки плюрипотентного стану mESC, але механізми, що лежать в основі ефектів шляху LIF/STAT3, ще недостатньо вивчені. Показано, що регульований LIF/STAT3 сигнальний шлях сприяє підтримці самовідновлення та плюрипотентності ESC мишей, пригнічуючи mTOR (mammalian target of rapamycin), що необхідно для ранньої диференціації. Коли LIF вилучається з культурального середовища, активність mTOR швидко зростає, що видно через фосфорилування його мішеней – рибосомної кінази S6 і фактора трансляції 4EBP1. Видалення LIF активує ERK, а

це свідчить, що ERK може брати участь або в прямому фосфорилуванні mTOR, або в фосфорилуванні негативного регулятора mTOR - білків TSC1/TSC2. Є дані, що вилучення LIF призводить до фосфорилування білка TSC2 і, отже, до активації mTOR, яка супроводжується зниженням експресії генів плюрипотентності OCT-4, Nanog, SOX2 та посиленням експресії гена *Fgf5* – маркера постімплантаційного епібласта. Разом ці дані вказують на те, що збіднені на LIF ESC миші здійснюють перехід від плюрипотентного стану, який підтримує LIF/STAT3, до FGFR/ERK-залежного праймоподібного стану з експресією маркерів ранньої диференціації, опосередкованої через активацію сигналіngu mTOR [42]. Показано, що hiPSC (human induced pluripotent stem cells) диференціювались в лінеаж ектодерми після вилучення bFGF, як важливого медіатора плюрипотентності. Кількість маркерів плюрипотентності OCT4, SOX2 і Nanog знижувалась після різкого падіння рівня активності каскаду MAPK. Примітно, що в диференційованих hiPSC спостерігалось значне посилення фосфорилування p38 і JAK/STAT3, тоді як шляхи PI3K/Akt і JNK залишалися активними у процесі диференціювання. Одержані дані також вказують на те, що серед паралогів Ras саме NRas переважно активує шлях MAPK у hiPSC.

Таким чином, шлях MAPK є основним низхідним сигнальним шляхом щодо bFGF, необхідним для підтримки плюрипотентності hiPSC. Серед шляхів MAPK активність NRas/Raf/MEK/ERK знижується під час диференціювання, тоді як p38 активується, а JNK залишається незмінною [34].

Шлях PI3K/Akt.

Подібно до шляху MAPK/ERK, шлях PI3K/Akt реагує на велику кількість поза- та внутрішньоклітинних сигналів, переданих через гормональні рецептори, RTK та внутрішньоклітинні фактори і регулює клітинну проліферацію, загибель клітин та перебудову цитоскелета. Клас I PI3K – гетеродимери, що складаються з адаптера/регуляторної субодиниці p85 та каталітичної субодиниці p110 з кіназним доменом [43, 44]. Активація PI3K класу I відбувається через взаємодію субодиниці p85 з різними активувальними білками, такими як протеїнкіназа C, Rho, Rac, мутований Ras, Src і призводить до активації каталітичної субодиниці p110. Після активації PI3K фосфорилує фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат (PIP2) у 3-положенні, перетворюючи його у фосфатидилінозитол-3,4,5-біфосфат (PIP3). Сигналіngu PI3K/Akt протидіють фосфатази PTEN (phosphatase and TENsin homologue) і SHIP1/2 (Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase), яка дефосфорилує PIP3. Одним з найважливіших посередників, що знаходяться в регуляторному ланцюгу нижче PI3K є протеїнкіназа Akt [43, 44]. Akt/PKB – це серин/треонінова кіназа, яка вперше була виявлена як онкоген у вірусі лейкемії мишей Akt8. До сімейства протеїнкінази B входять три ізоформи: Akt1, Akt2 і Akt3. Akt опосередковує різноманітні сигнальні каскади, що регулюють проліферацію, виживання, ріст клітин, транспорт і метаболізм глюкози, міграцію/інвазію клітин, стабільність геному та ангіогенез [43-45]. Вона зв'язує PIP3 з високою афінністю через свій PH (pleckstrin homology) домен і локалізується на клітинній мембрані, де вона взаємодіє та фосфорилується фосфоінозитид-кіназою 1 (PDK1 – phosphoinositide kinase 1). Активована Akt регулює низку мішеней, пов'язаних з регуляцією метаболізму, синтезом білка, виживанням/апоптозом та ін., а порушення регуляції причетне до різних захворювань людини [43, 44].

Сигналінг PI3K/Akt в ембріональних стовбурових клітинах. Вже відмічалось, що шлях PI3K/Akt відіграє важливу роль у підтримці плюрипотентності, самовідновленні та перепрограмуванні SCs [35, 46], а його перехресна взаємодія з MAPK [36] сприяє регулюванню цих процесів [37].

Показано, що сигнальний шлях PI3K є важливим для підтримки плюрипотентності в ESC миші. Експресія домінантно-негативного алеля PI3K або блокування шляху інгібітором PI3K LY294002 ініціює клітинну диференціацію. Мікроерей-аналіз hESC показав, що компоненти шляху PI3K/Akt up-регулюються в недиференційованих ESC. Щоб побачити, чи необхідна передача сигналу PI3K для підтримання плюрипотентності в hESC, колонії обробляли інгібітором PI3K LY294002. Інгібування передачі сигналів PI3K підтверджувалося

шляхом перевірки статусу фосфорилювання Akt, c-Raf та GSK-3 – всі вони демонстрували зниження рівня фосфорилювання. Кількість маркерів плюрипотентності, таких як OCT4, Nanog та SOX2, зменшувалась, що вказує на втрату плюрипотентності клітин та ініціацію диференціації. Однак, беручи до уваги, що сигнальні шляхи Wnt та NF-κB активуються нижче PI3K/Akt в регуляторному ланцюгу, втрата плюрипотентності може бути пов'язана з недостатньою активацією саме цих шляхів [2].

Активована Akt взаємодіє з різними білками в різних субклітинних компартментах здійснюючи узгоджені біологічні ефекти. Шлях PI3K/Akt позитивно регулює самооновлення ембріональних SCs, а інгібування PI3K призводило до диференціювання hESC [47]. Конвергенція шляхів Wnt і Akt може змінити детермінування лінеажу SCs [48]. Активация сигналіngu Akt посилювала експресію Nanog, який впливає на стовбуровість hESCs. Ці спостереження свідчать, що сигналінг Akt бере участь у зовнішніх механізмах, які модулюють оновлення клітин і визначення долі SCs. Інгібування сигналіngu Akt негативно модулює плюрипотентність ESC та їх самовідновлення. Експресія активної Akt1, закріпленої на плазматичній мембрані, допомагає підтримувати плюрипотентність ESC [49] і підвищує ефективність iPSC-індукції [45, 46, 50].

Специфічний для ESC ген *RAS* – *ERAS*, який кодує конститутивно активну форму GTP-ази, і його сигнальний шлях PI3K/Akt є важливими посередниками процесу соматичного перепрограмування. Виявлено, що надекспресія ERas посилює індукцію iPSC миші, тоді як нокдаун GTP-ази її пригнічує. Модуляція передачі сигналів Akt генетичними або хімічними засобами помітно впливає на ефективність перепрограмування. Примусова експресія конститутивно активного гена Akt1 підвищує ефективність перепрограмування за нокдауну ERas, а аналіз точкових мутацій показав, що ERas тісно пов'язаний з передачею сигналів Akt для посилення перепрограмування. FoxO1 (forkhead transcription factor) може функціонувати як бар'єр для індукції iPSC, а інактивація FoxO1 шляхом Akt-залежного фосфорилювання значною мірою пояснює суттєвий вплив сигналіngu Eras/Akt на перепрограмування. Ці результати розкривають значення осі сигналіngu Eras/Akt/FoxO1 у генерації iPSC, як можливу молекулярну основу для соматичного перепрограмування [45, 50].

На додаток до класичних сигнальних шляхів у цитозольному компартменті, нещодавні дослідження показали, що активована Akt1 може переміщуватись в мітохондрії [51]. Одержані дані щодо нової ролі мітохондріального сигналіngu Akt1, яка підвищує ефективність перепрограмування соматичних клітин. Роль мітохондріальної Akt1 у перепрограмуванні соматичних клітин досліджували шляхом трансдукції фібробластів чотирма факторами перепрограмування (OCT4, SOX2, KLF4, c-Мус) у поєднанні з Mito-Akt1, Mito-dnAkt1 або контрольним вірусом. Mito-Akt1 підвищувала ефективність перепрограмування, тоді як Mito-dnAkt1 його гальмувала. Ці результати свідчать про те, що передача сигналів мітохондріального Akt1 або посилює перепрограмування соматичних клітин, або підвищує ефективність трансдукції чотирьох факторів перепрограмування. Отримані iPSC утворювали ембріональні тіла *in vitro* та тератоми *in vivo*. Крім того, знижувалось метилювання промоторів OCT4 і Nanog в iPSC, утворених у присутності Mito-Akt1. Akt1 в ембріональних стовбурових клітинах (ESC) активувалась і переміщувалась в мітохондрії після стимуляції факторами росту. Для вивчення впливу мітохондріальної Akt на ESC, конститутивно активна Akt1, орієнтована на мітохондрії (Mito-Akt1), експресувалась в ESC. Профіль експресії генів показав посилення регуляції генів, які сприяють проліферації та виживанню SCs, а також зниження регуляції генів, які сприяють диференціації. Аналіз клітинного дихання вказав на подібність метаболізму в ESC та отриманих iPSC, що свідчить про порівнянну біоенергетику. Ці результати показали, що активація мітохондріальної сигналізації Akt1 є необхідною для перепрограмування соматичних клітин [45].

Шлях NF-κB.

Шлях ядерного фактора-каппа-B (NF-κB) контролює гени, що беруть участь у ключових клітинних процесах, таких як проліферація, реакція на стрес, вроджений імунітет,

запалення та пов'язаних з хронічним запаленням серйозних захворюваннях [52, 53]. Нові напрямки досліджень NF- κ B включають вивчення його ролі у стовбурових клітинах і процесах розвитку.

У хребетних сімейство факторів транскрипції NF- κ B складається з p50/p105, p52/p100, c-Rel, RelA та RelB, які регулюють транскрипцію багатьох генів-мішеней [52-54]. p105 і p100 в результаті протеолітичного процесингу утворюють p50 і p52, відповідно. На відміну від c-Rel, RelA та RelB містять C-кінцевий домен трансактивації та не піддаються процесингу. c-Rel, RelA, RelB, p50 та p52 можуть утворювати гомо- та гетеродимери, переміщуючись до ядра, де вони зв'язуються з ДНК-регуляторними к-сайтами. За відсутності сигналів димери NF- κ B локалізуються в цитоплазмі у неактивному стані внаслідок їх взаємодії з інгібіторними білками I- κ B. Шлях NF- κ B активується різними позаклітинними факторами, такими як фактор некрозу пухлини α (TNF- α), IL-1, фактори росту, бактеріальні або вірусні інфекції, окислювальний стрес та фармацевтичні сполуки. У відповідь на такі стимули I- κ B швидко фосфорилується I- κ B кіназою (IKK) по залишках серину 32 та 36. Фосфорильований I- κ B убиквітинується комплексом лігази убиквітину E3 і деградує у 26S протеасомах. Потім звільнені димери NF- κ B можуть транслокуватися в ядро та активувати транскрипцію генів-мішеней [52, 53].

Сигналінг NF- κ B в стовбурових клітинах. Мало що відомо про роль NF- κ B в ESC людини та миші. Їх експресію оцінювали в декількох лініях недиференційованих і диференційованих ESC, використовуючи мікродеррей, вестерн-блот, проточну цитометрію та масиви антитіл. Показано, що кількість компонентів сигнального шляху NF- κ B збільшувалась у недиференційованих hESC і down-регулювалась під час диференціації. Імуногістохімічне дослідження RelA показало, що він присутній лише в ядрах недиференційованих hESC. Інгібування сигналіngu NF- κ B спричиняло масивну диференціацію клітин у колоніях ESC та загибель клітин, що свідчить про важливість NF- κ B для підтримання плюрипотентності ESC [2].

В ESC людини проаналізовано експресію NF- κ B1 і RelA на рівні мРНК і білка [54]. Помічено, що мРНК NF- κ B1 і RelA у цих клітинах експресуються на надзвичайно низькому рівні. Білки NF- κ B1 і RelA в екстрактах з ESC людини не виявлялись. Активація NF- κ B може перешкоджати генерації iPSC. Генетичне та фармакологічне інгібування NF- κ B значно підвищувало ефективність перепрограмування фібробластів в iPSC [55]. Крім того, диференціювання ESC з ретиноевою кислотою (RA) протягом 10-15 днів суттєво підвищувало рівні мРНК p65 і p50. Після шести днів інкубації клітин з RA детектувалась ядерна локалізація p65. Аналогічно, в ESC мишей білок p65 не виявлявся, хоча мРНК p65 була присутня в недиференційованих ESC [56]. Диференціювання ESC мишей за присутності RA призводило до значного підвищення кількості субодиниці NF- κ B – p65. Також було показано, що репресія трансляції мРНК p65 в недиференційованих ESC мишей опосередковується експресією кластера miR-290 [54].

Сигнальний шлях Wnt

Сигнальний шлях Wnt (Wingless and Int-1) є одним із найбільш еволюційно консервативних шляхів, залучений до різноманітної клітинної, ембріологічної та фізіологічної активності від *C. elegans* до людини. Показано, що порушення канонічного шляху Wnt є причиною виникнення різних пухлин. Ця гілка шляху є необхідною і достатньою для підтримки стану плюрипотентності в ESC та в ASC принаймні двох походжень: гемопоетичних клітинах кісткового мозку та епідермальних SCs. Шлях Wnt складається з більш ніж 30 позаклітинних Wnt-лігандів, які взаємодіють з рецепторами сімейства Frizzled (Fzd) [2]. Взаємодія лігандів Wnt з 7-трансмембранними рецепторами активує білок Dishevelled (Dsh). Dsh інгібує серин/треонінову глікоген-активовану кіназу-3 (GSK-3 – glycogen-activated kinase-3), яка за відсутності сигналів Wnt фосфорилує і спрямовує комплекс β -катенін/APC (adenomatous polyposis coli) для убиквітинування та протеолітичної деградації. ARM (armadillo repeat protein) білок β -катенін (кодується геном *CTNNB1*) є основним молекулярним перемикачем канонічного сигналіngu Wnt. Зв'язування

позаклітинних лігандів Wnt з Fzd призводить до вивільнення цитоплазматичного β -катеніну з «деструктивного комплексу», що складається з супресорів пухлини, APC, аксину, казеїнкінази 1 α та GSK-3 β . Вивільнення β -катеніна з цього комплексу призводить до його стабілізації, накопичення та імпорту в ядро. У ядрі β -катенін витісняє репресори Groucho з ДНК-зв'язаних факторів транскрипції сімейства LEF/TCF (Lymphocyte Enhancer binding Factor/T-cell Factor). У присутності β -катеніну LEF/TCF діють як транскрипційні активатори генів, що стимулюють проліферацію, таких як c-Myc та циклін D1 [57, 58].

Подібно до факторів SOX, сімейства LEF/TCF мають HMG-бокс-ДНК-зв'язуючий домен, і обидві родини транскрипційних факторів переважно зв'язуються з АТ-багатими послідовностями в малій канавці ДНК [59]. Однак сайт зв'язування з ДНК факторів TCF/LEF більший, оскільки його розширений С-кінцевий фрагмент дозволяє додаткові контакти з ДНК у великій канавці. Крім того, тирозин 72, який незмінно міститься в факторах родини SOX, замінюється аланіном у факторах TCF/LEF, що сприяє змінам консенсусної ДНК-зв'язуючої послідовності [58].

Сигналінг Wnt при самовідновленні SCs. Шлях Wnt – це важливий висококонсервативний сигнальний каскад, який керує фундаментальними процесами ембріонального розвитку та стимулює самовідновлення, ріст, проліферацію SCs і жорстко регулюється. Порушення шляху пов'язані з дефектами росту та канцерогенезом [57].

Ліганди Wnt є еволюційно консервативними глікопротеїнами, які беруть участь у аутокринному та паракринному клітинному сигналіngu [60]. Передача сигналів Wnt/ β -катеніну важлива для функціонування mESC [61]. Активація сигналіngu Wnt/ β -катеніну рекомбінантним Wnt3a, або шляхом інгібування GSK3 поєднується з активацією сигналіngu JAK/STAT за допомогою LIF, що сприяє самовідновленню та інгібуванню спонтанної диференціації. Подвійне інгібування кіназ GSK3 та MEK стимулює самовідновлення та пригнічує диференціацію наївних mESC. Крім того, паракринний та аутокринний сигналінг Wnt запобігає перетворенню наївних mESC у mEpiSC(epiblast stem cells)-подібний стан [62]. Показано, що передача сигналів Wnt/ β -катеніну сприяє самовідновленню наївних hESC і є незамінною для підтримки експресії маркерів плюрипотентності. Мало того, інгібування сигналіngu Wnt/ β -катеніну в наївних hESCs індукує глобальний профіль експресії білків, схожий на праймований. Арешт сигналіngu Wnt/ β -катеніну забезпечує перехід від плюрипотентних до диференційованих статевих клітин у миші [63]. Отже, одержані результати свідчать про те, що сигналінг Wnt/ β -катеніну є позитивним регулятором наївної плюрипотентності [60].

Вихід промотор-проксимальної РНК-полімерази II (Pol2) з паузи є багатоступеневим процесом, необхідним для плюрипотентності та транскрипції генів клітинного циклу в середовищі SL (serum/LIF). β -катенін, стабілізований інгібуванням GSK3 у 2i середовищі, постачає ко-регулятори транскрипції, включаючи BRD4 (Bromodomain-containing protein 4), CDK9 (циклін-залежна кіназа), когезин і p300 в локусах плюрипотентності, що селективно підсилює ці локуси та ініціює транскрипцію, компенсаторно знижуючи залежність від вивільнення з паузи Pol2. Навпаки, гени клітинного циклу не зв'язані β -катеніном і залишаються залежними від вивільнення Pol2, що робить процес самовідновлення дуже чутливим до пригнічення BRD4/CDK9 [64].

β -катенін бере участь як в опосередкованій кадгеринами міжклітинній адгезії, так і в ко-активації транскрипції у сигнальному ланцюгу нижче Wnt. Відомо, що накопичення β -катеніну шляхом інгібування або нокауту його негативного регулятора GSK3 у поєднанні з іншими факторами підтримує плюрипотентність. Однак подвійна функція β -катеніну та залежність його ефектів від контексту ускладнюють розуміння механізмів, що лежать в основі цього явища. Функція трансактивації β -катеніну, яка пов'язана з передачею сигналів Wnt, виявилася значною мірою необов'язковою для самовідновлення наївних ESC, але необхідною для диференціації. Натомість β -катенін-опосередкована адгезія необхідна для самовідновлення, хоча, ймовірно, її основна роль полягає в стабілізації шляху LIF/STAT3, а не в підтримці міжклітинних контактів. Однак є дані, що свідчать про незалежну від E-

кадгерину цитоплазматичну активність β -катеніну в підтримці плюрипотентності [65]. β -Катенін необхідний для підтримки основного стану плюрипотентності в ESC мишей, але його точна роль є неясною. Показано незалежну від TCF3 участь β -катеніну в стримуванні генів диференціювання зародкової та соматичних ліній. β -катенін зв'язує таргетні гени з E2F6 (E2F transcription factor 6) і утворює комплекс з E2F6 і HMGA2 (high-mobility group AT-hook 2) або E2F6 і HP1 γ (heterochromatin protein 1 γ). Ці комплекси допомагають β -катеніну стримувати та точно налаштовувати потенціал розвитку статевих клітин і клітин нервової системи [66].

Водночас, показано, що транскрипційно неактивні ізоформи β -катеніну, усічені з C-кінця (Δ C β -cat), можуть інгібувати диференціацію mESC у відсутності LIF, за умов пригнічення GSK3, як їх повнорозмірний аналог. Однак цей фенотип порушується при мовчанні TCF1/LEF1 (lymphoid enhancer factor). Це свідчить про те, що ізоформи Δ C β -cat не є повністю транскрипційно неактивними і їх ядерна функція може залежати від факторів TCF/LEF [67].

Також є дані, що активність сигнального шляху Wnt/ β -катенін забезпечує нормальне метилювання ДНК mESC. Активність шляху поступово приглушується під час пасажів у культурі, що призводить до втрати метилювання ДНК у багатьох контрольних ділянках імпринтингу (ICR), втрати рекрутингу репресорів хроматину та активації ретротранспозонів, що призводить до порушення диференціації mESC. Відповідно, стійкий сигналінг Wnt/ β -катеніну підтримує нормальне метилювання ICR, гомеостаз mESC і є ключовим регулятором стабільності геному [68].

Сигналінг Wnt забезпечує критичні короткотривалі (аутокринні та паракринні) сигнали для оновлення та регенерації тканин у нішах SCs різних органів із залежними від контексту ефектами [69]. Подібним чином, активація Wnt через інгібування GSK3 або шляхом постачання білків Wnt [62] полегшує самовідновлення SCs миші *in vitro*. Крім того, Wnt3 збільшує ефективність та швидкість переходу від ембріональних фібробластів миші (MEF) до iPSC за відсутності c-Myc. Стабілізація білка Wnt3a за допомогою фосфоліпідів і холестерину підтримує самовідновлення органів і ембріонів [70].

Наступні дослідження показали, що в генерації iPSC мишей потреба у Wnt є двофазною. Сигналінг Wnt повинен бути вимкнений на ранніх стадіях, але на пізніх стадіях він необхідний для завершення набуття плюрипотентності [71]. Наразі немає єдиної думки щодо ролі сигналінгу Wnt у культурах плюрипотентних клітин людини, оскільки деякі дані вказують на те, що він сприяє їх підтримці та самовідновленню, тоді як інші свідчать про сприяння мезодермальній диференціації [72]. Частково це можна пояснити тим, що чутливість до Wnt плюрипотентних SCs людини критично залежить від умов культивування та ступеня плюрипотентності (наївна проти праймованої) [73].

Шлях Wnt має три гілки, серед яких саме канонічна гілка залучена до генезу пухлин, а також до підтримання стану плюрипотентності (стовбуровості) у SCs. Показано, що передача сигналів Wnt відіграє вирішальну роль у підтримці самовідновлення як в ESC, так і в ASC ссавців [2]. У поєднанні з деякими факторами росту, білки Wnt можуть сприяти самооновленню кількох типів SCs, таких як SCs молочної залози, кишківника та ESC. Дослідження з використанням різних підходів до інгібування сигнального шляху Wnt показали, що передача сигналів Wnt є ключовою для нормальної функції HSC у миші. Крім того, деякі дані показують, що обробка рекомбінантним білком Wnt3a або надмірна експресія активованого β -катеніну підвищує здатність мишачих HSC *ex vivo* до самовідновлення [74].

Судячи з експресії маркерів плюрипотентності, таких як OCT3/4, Nanog та Rex1, пригнічення GSK-3 підтримує недиференційований стан ESC людини протягом декількох пасажів. ESC у присутності інгібітора GSK-3 зберігали потенціал диференціації та утворювали ембріодні тіла або тератоми, що містили похідні всіх трьох зародкових шарів. Після видалення інгібітора або після тривалого пасажування клітини диференціювались. Цікаво, що інгібування GSK-3 та подальша активація сигналінгу Wnt призводили також до

активації гілки SMAD2/3 шляху TGF- β , що свідчить про перехресну взаємодію між цими двома шляхами [2]. Щодо ASC, було показано, що канонічна гілка шляху Wnt необхідна для підтримки плюрипотентності гемопоетичних SCs та SCs шкіри. В епітеліальній тканині шкіри гомеостаз підтримується ASC. Епітеліальні клітини шкіри утворюють щільний шар завдяки утворенню щільних з'єднань, адгезійних з'єднань і десмосом. У цих диференційованих клітинах переважна більшість β -катеніну розташована на клітинній мембрані, де він взаємодіє з E-кадгеріном та α -катеніном у місцях адгезійних з'єднань. У ASC шкіри, а також у стовбурових клітинах волосяних фолікулів, кількість β -катеніну збільшується в цитоплазмі та ядрі, де він функціонує в процесі самовідновлення та детермінації лінеажу. Делеція β -катеніну у мишей погіршує морфогенез волосяних фолікулів та втрату ніші SCs фолікула. Крім того, стабілізація β -катеніну стимулює SCs волосяних фолікулів до проліферації та регенерації та пов'язується з пухлинами клітин волосяного стрижня [75].

Сигнал сімейства лігандів Wnt передається внутрішньоклітинно шляхом стабілізації β -катеніну в цитоплазмі та в ядрі, де він викликає транскрипційну активність сімейства факторів транскрипції TCF/LEF. В PSC вісь Wnt/ β -катенін-TCF/LEF виконує кілька непов'язаних, а іноді й протилежних клітинних функцій, таких як самооновлення, формування стовбуровості, лінеажу та регуляція клітинного циклу. Крім того, жорсткий контроль сигнального шляху Wnt покращує перепрограмування соматичних клітин до індукованої плюрипотентності. Останні дослідження підкреслюють плейотропні функції сигнального шляху Wnt у стані плюрипотентності [76].

Отже, сигналінг Wnt необхідний для підтримання плюрипотентності в ESC, а мутації у факторах цього шляху пов'язані з різноманітними епітеліальними карциномами людини.

Шлях трансформуючого фактору росту- β (TGF- β).

Цей шлях був вперше виявлений у пухлинах як антипроліферативний сигнальний каскад, важливий для підтримки гомеостазу тканин, який утримує проліферацію клітин під контролем. Сигнали, що гальмують ріст, існують як розчинні фактори в позаклітинному матриксі або на поверхні сусідніх клітин і направляють клітину у зворотну зупинку росту, яка називається сенесценцією. Шлях TGF- β відіграє ключову роль у цьому процесі. Еволюційно консервативний шлях TGF- β з 42 лігандами є одним із найскладніших шляхів у багатоклітинних організмах (рис.) [2].

Шлях TGF- β має три основні гілки: SMAD1/5/8, SMAD2/3 і TGF- β 1/2/3. Надсімейство TGF- β включає: TGF- β , активіни, Nodal, фактори росту та диференціації (growth differentiating factor – GDF) і морфогенетичні білки кісток (bone morphogenetic protein – BMP). У багатоклітинних організмах було ідентифіковано понад 60 членів сімейства TGF- β , при цьому щонайменше половина білків закодована в геномі людини. Сигнал TGF- β ініціюється зв'язуванням димерів лігандів, гетеромерного комплексу I типу (ALK1-7) і трансмембранних серин/треонін-кіназних рецепторів II типу. Активовані рецептори фосфорилують кіназний домен рецепторів I типу, а потім фосфорилують внутрішньоклітинні білки SMAD [77].

Є три функціональні класи, що містять вісім білків SMAD: рецептор-регульовані SMAD (R-SMAD), що включають SMAD1/2/3/5/8, ко-медіатор SMAD4 (Co-SMAD) та інгібіторні SMAD6/7 (I-SMAD). Усі білки SMAD мають спільні домени Mad Homology – MH1 та MH2. Домен MH1 містить β -шпилькову структуру, яка опосередковує зв'язування з ДНК, а домен MH2 опосередковує олігомеризацію SMAD і встановлює специфічність сигналу, забезпечуючи належну взаємодію рецепторів I типу зі специфічними партнерами по зв'язуванню з ДНК [78]. Передача сигналів TGF- β /активін/Nodal відбувається через ALK 4, 5 і 7 і SMAD2/3 [77]. Сигнальний шлях TGF- β складається з двох основних гілок – ліганди кісткового морфогенного білка BMP і ліганди GDF зв'язують рецептори I типу ALK1, ALK2, ALK 3 і ALK6, що веде до фосфорилування та активації SMAD1 і SMAD5. Такі ліганди, як активін та Nodal зв'язують рецептори ALK4, ALK5 та ALK7 і спричиняють фосфорилування та активацію SMAD2 та SMAD3. Фосфорильовані SMAD утворюють зі SMAD4 комплекси вищого порядку, які транслюються в ядро і регулюють транскрипцію широкого спектра

генів. Сигналінг TGF- β може інгібуватися автономно і неавтономно. Автономними інгібіторами є SMAD6 та SMAD7. SMAD6 негативно регулює сигналінг TGF- β шляхом пригнічення SMAD1/5, тоді як SMAD7 інгібує обидві сигнальні гілки TGF- β , блокуючи взаємодію SMAD зі SMAD4. Клітинними неавтономними інгібіторами TGF- β є Lefty-1/2, Cerberus, Follistatin, Chordin та Drm/Gremlin. Lefty 1 та 2 інгібують передачу сигналів TGF- β через SMAD2/3 шляхом зв'язування з Nodal або запобігаючи складанню рецепторного комплексу активін/Nodal. В ESC людини Gremlin інгібує BMP, GDF і блокує передачу сигналу TGF- β через гілку ALK2/3/6-SMAD1/5/8 [2].

Відомо, що інгібування передачі сигналів Activin/Nodal викликає диференціацію hESC. З іншого боку, передача сигналів Activin/Nodal через рецептори TGF- β та його ефектор SMAD2/3 ініціює остаточну диференціацію ентодерми в ESC людини та миші [77].

Сигналінг TGF- β у стовбурових клітинах. Відомо, що шлях TGF- β відіграє вирішальну роль під час ембріонального розвитку. Його компоненти еволюційно консервативні та відіграють ключову роль у визначенні долі клітини, як нейронна індукція та специфікація мезодерми у Xenopus, а також утворення мезодерми та примітивної смуги у миші. Багато доказів свідчать про те, що сигналінг TGF- β також бере участь у підтримці недиференційованого стану в hESC. По-перше, кількість транскриптів лігандів TGF- β - GDF-3, BMP2 та TGF- β 1, а також мембранно-зв'язаних компонентів Lefty, Cripto, Cerberus та TMEFF (transmembrane protein with epidermal growth factor and two follistatin motifs) збільшена у недиференційованих hESC. По-друге, SMAD2 та SMAD3 фосфорильовані по С-кінцю і локалізовані в ядрі, що вказує на активність гілки сигналізу TGF- β – активін/Nodal [2]. Після диференціації рівень фосфорилування SMAD2/3 знижувався. Крім того, інгібування фосфорилування SMAD2/3 інгібітором рецептора активіну SB-431542 ініціювало диференціацію [77]. У сукупності ці результати свідчать про те, що гілка TGF- β -сигналізу активін/Nodal необхідна для підтримки плюрипотентності. Водночас, сигналінг TGF- β через BMP, схоже, відіграє протилежну роль. У недиференційованих ESC фосфорилування SMAD1/5 практично не виявляється, але зростає при диференціації. Відповідно обробка клітин BMP4 ініціювала диференціювання до трофобласту. Ці результати узгоджуються з дослідженнями, в яких видаляли компоненти шляху TGF- β та вивчали наслідки у ранньому розвитку мишей. Об'ємні дослідження на Xenopus та мишах встановили, що сигнальний шлях TGF- β є головним регулятором під час розвитку ембріона. Інші роботи продемонстрували важливість цього шляху для підтримки плюрипотентності та самовідновлення ESC людини [2].

Сигналінг TGF- β /активін/Nodal має важливе значення для підтримки плюрипотентності hESC і самовідновлення, тоді як FGF2 є фактором компетентності. Інгібування сигналізу активін/Nodal фолістатином або інгібітором SB-431542 викликає диференціацію hESC. Плюрипотентність підтримується транскрипційною мережею OCT4-SOX2-Nanog, яка утворює петлю позитивного зворотного зв'язку, що активує гени плюрипотентності та інгібує експресію генів, пов'язаних з диференціацією. Активіну А достатньо для підтримки самовідновлення та плюрипотентності. Він індукує експресію OCT4, Nanog та SOX2, а це свідчить про те, що фактори транскрипції, пов'язані з плюрипотентністю у hESCs можуть бути мішенню сигналізу TGF- β /активін/Nodal. Інгібування активін/Nodal призводить до більшого зниження експресії Nanog, ніж OCT4 і SOX2 в hESC і, таким чином, викликає диференціацію в бік нейроектодерми. Конститутивна експресія Nanog є достатньою для підтримки плюрипотентності hESC за відсутності передачі сигналів активін/Nodal [77]. Nanog розглядається як безпосередня мішень сигналізу TGF- β /активін/Nodal. Це додатково підтверджується даними, за якими SMAD2/3 може безпосередньо зв'язуватися з проксимальним промотором Nanog, активуючи його експресію і пригнічуючи аутокринний сигналінг BMP [79]. Nanog і SMAD2/3 можуть зв'язуватися з регуляторними елементами генів ентодерми разом з іншими репресорами транскрипції, інгібуючи диференціацію [79]. Так, Nanog і SMAD2/3 інгібують експресію SIP1 (smad-interacting protein 1), блокуючи диференціацію нейроектодерми. Як і SIP1, SNON (SKIL),

потужний ко-репресор SMAD2/3, експресується в hESC, але його експресія швидко знижується в процесі диференціації. У плюрипотентному стані транскрипція SNON активується комплексом OCT4/SOX2/Nanog і він селективно рекрутується SMAD2, а потім SMAD2/SNON разом зв'язується з мезентодермальними генами пригнічуючи експресію. Останні дані показують, що гени *c-Jun* N-кінцевої кінази (*JNK*)/*JUN* займають специфічні для ESC енхансери, спільні з OCT4, Nanog, SMAD2/3 і, зокрема, пригнічують вихід із плюрипотентного стану, перешкоджаючи виведенню з дії енхансерів ESC та інгібуючи реконфігурацію зв'язування SMAD2/3 з хроматином від специфічних для ESC до специфічних для ентодерми енхансерів [80]. Загалом, SMAD2/3 необхідні для самовідновлення та підтримки плюрипотентності. Вони мають мішенню Nanog позитивно регулюючи транскрипційну мережу OCT4/SOX2/Nanog, а також взаємодіють з репресорами, такими як SIP1, SNON і Jun, інгібуючи гени, асоційовані з диференціацією первинного зародкового листка [77].

Однак високо активований сигнал активін/Nodal призводить до дефінітивної диференціації ентодерми. Високі концентрації активіну А індують ефективну диференціацію hESC: 50–100 нг/мл активіну А стимулює диференціацію ентодерми, тоді як 5 нг/мл активіну А сприяє підтримці плюрипотентності hESCs. SMAD2/3 безпосередньо зв'язуються зі специфікаторами ентодермальної лінії, такими як SOX17, FOXA2, GATA6 (GATA-binding factor 6) і GSC (Goosecoid), індуючи диференціацію ентодерми [79]. Крім того, плюрипотентні фактори OCT4, SOX2 і Nanog контролюють експресію EOMES (Eomesodermin, T-box brain protein 2 (Tbr2)) на початку специфікації ентодерми, а SMAD2/3 далі взаємодіють з EOMES, ініціюючи експресію ентодермальної мережі транскрипції. Сигналінг активін/Nodal також взаємодіє з іншими сигнальними шляхами, головним чином, BMP і Wnt, що синергетично сприяє диференціації ентодерми [77, 81].

Сигналінг активіну та Wnt необхідні та достатні для диференціювання ембріональних SCs людини (hESC) у мезентодерму (ME). Під час диференціації ME, спричиненої активіном та Wnt, активін/Smad2 індукуює зменшення репресивної модифікації гістону H3K27me₃, сприяючи залежній від протеасом деградації субодиниці енхансера репресивного комплексу PRC2 (zeste 2 polycomb (EZH2)-repressive complex 2). В результаті рекрутування білка FOXH1 на відкритих ділянках хроматину інтегруються сигнали активін/Smad2 і Wnt/β-катенін активуючи експресію генів ME, включаючи HAS2 і ALDH3A2. Поступово зниження модифікації H3K27me₃ збагачує відкритим хроматином ділянки навколо регуляторних регіонів. Нокдаун HAS2 або ALDH3A2 значно послаблює диференціацію ME. Ці дані демонструють шлях від позаклітинних сигналів до опосередкованої епігенетичною модифікацією активації генів під час диференціації ME [82].

Вища активність Wnt/β-катеніну, стимульована високими дозами Wnt3a або інгібіторами GSK-3, необхідна для максимального індукування диференціації ентодерми разом з активіном А. Сигналінг PI3K/Akt, стимульований FGF, безпосередньо модулює низхідний щодо Wnt шлях, підтримуючи hESC в недиференційованому стані. PI3K/Akt також може інгібувати фосфорилювання SMAD3, що спричиняє блокування його транслокації в ядро. Крім того, інгібувannya активності PI3K викликає зниження рівня mPDK і білка Nanog, а активація сигналіngu PI3K/Akt є достатньою для підтримки плюрипотентності ESC приматів [49]. Припускають, що сигналінг PI3K/Akt є важливим перемикачем сигналів активін/Nodal щодо підтримки плюрипотентності або диференціації. Підтвердженням цього є спостереження, що PI3K керує активіном А/SMAD2/3, сприяючи плюрипотентності або диференціації hESC, за високої або низької активності PI3K, відповідно [48]. Показано, що PI3K/Akt інгібуює Raf/MEK/ERK і канонічний шлях передачі сигналів Wnt, дозволяючи SMAD2/3 активувати асоційовані з плюрипотентністю таргетні гени, такі як Nanog. За відсутності сигналіngu PI3K/Akt, ERK активує канонічні сигнальні шляхи Wnt, і тоді ефектори Wnt, такі як β-катенін і SNAIL, дозволяють SMAD2/3 активувати гени, пов'язані з диференціацією [48]. Варто відзначити, що інгібувannya MEK/ERK запобігає диференціації та сприяє самовідновленню hESC, хоча більшість даних вказує, що сигналінг MEK/ERK

позитивно впливає на самовідновлення hESC. На даний час одержано більше деталей щодо молекулярних механізмів дії PI3K. Остання протидіє сигналінгу активін/Nodal при дефінітивній диференціації ентодерми за допомогою активованого mTORC2. Активація mTORC2 індукуює фосфорилування SMAD2/3 за залишками T220/T179, яке не залежить від активності Akt, CDK або ERK. Фосфорильовані SMAD2/3 рекрутують убіквітин-лігазу E3 – NEDD4L, яка викликає деградацію SMAD2/3 і блокує диференціацію ентодерми [83].

Таким чином, передача сигналів активін/Nodal через SMAD2/3, з одного боку, бере участь у контролі дивергентних транскрипційних мереж шляхом взаємодії з різними партнерами для регулювання плюрипотентності або диференціації hESC. З іншого боку, передача сигналів Activin/Nodal антагонізує зі шляхом PI3K/Akt щодо підтримки плюрипотентності та диференціації. Висока активність PI3K і низька активність активіну в hESCs сприяє зв'язуванню SMAD2/3 та активації експресії генів плюрипотентних факторів транскрипції.

Накопичені дані свідчать, що сигналінг TGF- β /активін/Nodal та його ефектори SMAD2/3 необхідні не тільки для самовідновлення hESC, але також необхідні для диференціації зародкових листків. Однак механізм, за яким SMAD2/3 координує різних партнерів для визначення різних рішень щодо долі клітин, систематично не досліджено.

Сигналінг Hedgehog.

У хребетних до сімейства Hedgehog (Hh) відносяться 3 гени: *sonic hedgehog* (Shh), *desert hedgehog* (Dhh), та *Indian hedgehog* (Ihh), які є універсальними сигнальними молекулами, що беруть участь у широкому спектрі біологічних подій, включаючи диференціацію, проліферацію, виживання клітин, формування плану тіла хребетних і старіння. Ці молекули відіграють важливу роль від ембріогенезу до стадій дорослого організму і такі зміни, як аномальна експресія або мутації генів Hh та їх низхідних факторів, викликають різноманітні генетичні порушення розвитку. Сімейство Hh містить багато сигнальних медіаторів і функцій через складні механізми та вивчення всієї системи сигналінгу є важливим завданням [84, 85].

Три гени Hh, ідентифіковані у мишей і людини, подібним чином процесуються та секретуються з клітин і активують спільні сигнальні шляхи в клітинах-реципієнтах. Після синтезу поліпептиди Hh розщеплюються в специфічному сайті (між 197/198 АК), а амінокінцеві частини функціонують як сигнальні молекули. С-кінцевий домен поліпептиду Hh каталізує внутрішньомолекулярну реакцію перенесення холестерину, в результаті чого утворюється N-кінцевий Hh сигнальний домен (HhN), модифікований С-кінцевим холестерином. Це викликає асоціацію HhN з мембранами, що полегшує кінцевий етап модифікації – додавання фрагмента пальмітинової кислоти до N-кінцевої частини ацилтрансферазою *Skinny hedgehog*, що призводить до утворення подвійно модифікованого сигнального домену Hh (HhNp). Після додавання холестерину і пальмітату білки секретуються з клітин-продуцентів за допомогою Dispatched – мембранного білка-транспортера і зв'язуються з мембранним білком Patched (Ptch), який дванадцять раз проходить через мембрану. Сигнал приймається іншим мембранним білком, Smo (G-protein-coupled receptor smoothened), а потім трансдукується в ядро транскрипційним фактором Gli (glioma-associated oncogene family members). Стабільність і активність Gli модифікується кінезин-подібним білком KIF7 (Kinesin-like protein 7) і SuFu (scaffold protein suppressor of fused) [84, 85].

За відсутності ліганду Hh Ptch1 інгібує активацію Smo, але у присутності Hh, ця репресивна дія послабляється. На додаток до Ptch1, Hh взаємодіє з Ptch2 і білками клітинної поверхні GAS (growth arrest specific), CDO (cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes) і «братом» CDO (BOC), які функціонують як ко-рецептори. Ця взаємодія має вирішальне значення для поширення сигналу та встановлення градієнта Hh. Нижче Smo у регуляторному ланцюгу Zn-finger-транскрипційні фактори GLI опосередковують трансдукцію сигналу Hh в процесі, який вважається канонічним сигналінгом. За відсутності лігандів Hh фосфорильований GLI1 розпізнається комплексом убіквітин-лігази Skp1-Cullin1-

TrCP (SCF-TrCP) і деградує у системі протеасом, тоді як GLI2 і GLI3 піддаються обмеженому протеолітичному процесу, що веде до розщеплення та видалення С-кінцевого активаторного домену GLI, і далі призводить до перетворення GLI3 і меншою мірою GLI2 в репресори транскрипції (GLI3R і GLI2R) [86]. Активатори транскрипції GLI (GLIA), насамперед GLI2A, утворюються лише у відповідь на стимуляцію Hh. Таким чином, сигналінг Hh функціонує через модуляцію балансу між GLIA та GLIR. Потім GLIA ініціює експресію таргетних генів Hh, таких як *Gli1*, білковий продукт якого функціонує лише як активатор транскрипції й, таким чином, посилює передачу сигналів Hh. Експресія *Smo* і *Ptch1* на базовому рівні, так само, як і експресія GLI2 і GLI3, не залежить від активності шляху. Однак продукція *Ptch1* посилюється зі збільшенням рівня Hh, утворюючи таким чином петлю негативного зворотного зв'язку в канонічному сигнальному шляху. Недавній аналіз цис-регуляторних модулів Hh-регульованих генів показав, що клітини інтерпретують рівні сигналінгу Hh через диференційну афінність сайтів зв'язування GLI в таргетних генах, тоді як тканинна специфічність досягається шляхом участі ко-активаторів [84].

Сигналінг Hedgehog у стовбурових клітинах. Шлях Hedgehog (Hh) регулює проліферацію та формування клітин під час ембріонального розвитку та бере участь у регенерації, підтримці гомеостазу та SCs у дорослих тканинах [85]. Хоча Shh відіграє важливу роль на різних стадіях розвитку, він також експресується та відіграє важливу роль на постнатальних етапах [84, 85], зокрема в нейронних SCs мозку. У мозку дорослої людини безперервний нейрогенез відбувається у двох областях: шлуночкової субвентрикулярній зоні (V-SVZ) і субгранулярній зоні (SGZ) зубчастої звивини. Після становлення цих регіонів, стовбурові клітини, як у стані спокою, так і транзит-ампліфікуючі SCs реагують на Shh і починають розповсюджуватися. Shh необхідний для підтримки SCs і мігрувальних новоутворених нейронів. Аналіз індукованих тамоксифеном мутантів гена *Smo* показує, що як проліферація, так і нейрогенез нервових SCs порушені. Таким чином, Shh необхідний для підтримки, проліферації, диференціації та міграції дорослих нервових SCs.

У мозку дорослих ссавців нові нейрони генеруються з недовготривалих транзит-ампліфікуючих клітин (ТАС), що походять від самовідновлюваних нервових SCs, які знаходяться значною мірою у стані спокою (NSC) і розташовані переважно в субвентрикулярній зоні (SVZ) бічних шлуночків та в субгранулярній зоні (SGZ) зубчастої звивини гіпокампа (DG) [86]. Популяції SCs у більшості тканин дорослих також складаються з рідкісних довгоживучих SCs у стані спокою, які підтримують пул SCs, а також утворюють ТАС, які є попередниками, що тимчасово розширюють популяцію клітин за потреби. У самооновлюваних тканинах, таких як передній мозок і шкіра дорослої людини, ТАС виробляються безперервно, тоді як у більшості інших органів SCs у стані спокою, як правило, відповідають на природну загибель клітин в органі або на його пошкодження.

Shh є найбільш широко експресованим Hh хребетних і його паракринна активність щодо сусідніх клітин є найпоширенішим способом трансдукції сигналу, хоча Hh також може передавати сигнал аутокринним способом. Була розроблена індукційна Shh-експресуюча лінія hPSC (iSHN) для ініціації індукційного градієнта Shh в органідах. Для створення так званого організатора Shh, 1000 клітин iSHN культивували незалежно, формуючи мініатюрний клітинний агрегат, після чого додавали більшу кількість клітин дикого типу, які зливалися з агрегатом iSHN [88, 89]. Введення сигнального центру в органіди переднього мозку визначає позиційну ідентичність нервової тканини залежно від відстані. Одержана система для індукції градієнта білка Shh за розвитку органідів переднього мозку, забезпечує впорядковану самоорганізацію вздовж дорзо-вентральної та передньо-задньої позиційної осей. Органіди переднього мозку з Shh-патерном створюють основні підрозділи переднього мозку [84].

Вивчення ролі *Gli1* у підтримці HSC показало, що відсутність *Gli1* призводила до збільшення частки довгоживучих HSC та покращення приживлення після трансплантації. Отже, втрата проліферації спричиняла порушення мієлоїдної диференціації та неповноцінний стресовий гемопоєз [90].

Таким чином, нещодавно виявлені функції Hh щодо модуляції поведінки тканинспецифічних дорослих SCs і клітин-попередників під час гомеостазу, регенерації та захворювання. Сигналінг Hh, який реалізується через кілька різних шляхів, контролює різноманітні клітинні процеси, включаючи підтримку пластичності і є ключовим фактором у регуляції гомеостазу і відновлення тканин дорослої людини.

Сигналінг Нірро.

Шлях Нірро спочатку був ідентифікований за допомогою генетичного скринінгу пухлинних супресорів, що контролюють ріст тканин у дрізофіли. Ідентифікація компонентів цього шляху та їх функцій у ссавців встановила роль Нірро в розвитку органів, регенерації тканин, підтримці SCs і канцерогенезі. Шлях еволюційно консервативний. Попри інтенсивні дослідження основних механізмів, що лежать в основі стовбуровості клітин, залишається невідомим ключовий сигнальний шлях, який організовує мережу, що забезпечує підтримку стовбуровості та гомеостаз тканин. Дослідження ролі шляху Нірро в біохімічних процесах SCs пролило світло на це явище [91].

Шлях Нірро є каскадом кіназ, що включає ко-активатори транскрипції та ДНК-зв'язуючі білки. Ортологами факторів дрізофіли у ссавців є Mammalian sterile 20-like ½ (MST1/2, також відомий як STK4/3), SAV1 (Salvador), LATS1/2 (large tumor suppressor homolog ½), MOB1A/B (MOB kinase activator 1A/B) і YAP (yes-associated protein)/коактиватор транскрипції з мотивом зв'язування PDZ (TAZ). Найвідоміша роль шляху Нірро полягає в тому, щоб організувати розвиток органів і контролювати гомеостаз тканин за допомогою модуляції проліферації клітин, апоптозу, міграції та диференціації [92]. Нірро також регулює самооновлення і розповсюдження SCs, а також регенерацію тканин. Шлях Нірро отримує широкий спектр сигналів, включаючи позаклітинну механічну силу, гормональні сигнали та внутрішній фізичний механізм клітини, контролюючи полярність клітини та організацію цитоскелета, а також взаємодію з білками позаклітинного матриксу. Численні білки беруть участь в ініціації сигналіngu Нірро, в тому числі протеїнкінази, включаючи протеїнкіназу A (PKA), кінази PAR-1/MARK, Src і Тао [93]. У сигнальній мережі беруть участь позаклітинний розчинний фактор амфірегулін (amphiregulin), матриксний протеоглікан Agrin, інтегрини, а також білки з'єднання клітин Echinoid та комплекс кадгерін/катенін. Крім того, в сигнальну мережу інтегровані білки полярності клітин Crumbs, комплекси Scribble, рецептор, пов'язаний з G-білком (GPCR), сигнальні шляхи Wnt/β-катеніну, а також цитоскелетний Spectrin, міозин II і F-актин [91].

Коли клітини отримують висхідні позаклітинні активаційні сигнали, рецептор сигналу MST1/2 фосфорилує LATS1/2 і MOB1 канонічним чином за допомогою кофактора SAV1. SAV1 – це білок, що містить домен WW, необхідний для інтеграції висхідних сигналів. Потім активований LATS1/2, своєю чергою, ініціює фосфорилування основних ко-активаторів YAP/TAZ по численних залишках. Фосфорилування YAP по S127 (відповідає S89 на TAZ) сприяє його зв'язуванню з білками 14-3-3, що призводить до утримання його в цитоплазмі. Фосфорилування YAP/TAZ по S381 і S311, відповідно, створює сайт зв'язування для кazeїнкінази 1 (CK1) і подальше фосфорилування за допомогою CK1δ/ε мотиву DSGxS. Тоді SCFβTrCP, комплекс лігази SKP-CULLIN-F-box (SCF), специфічно розпізнає фосфодегрон DpSGxPS YAP і TAZ, що призводить до убіквітинування та деградації YAP/TAZ. Білок YAP також розкладається за допомогою аутофагії. Нефосфорильований комплекс YAP/TAZ переміщується в ядро, активуючи транскрипцію. Домен WW є структурним модулем, який опосередковує білок-білкові взаємодії шляхом розпізнавання пептидних мотивів багатих проліном (PRM) і фосфорильованих сайтів серин/треонін-пролін. Домени WW YAP і TAZ фізично взаємодіють з мотивами PPXY (пролін/пролін/будь-яка амінокислота/тирозин) у багатьох білках, включаючи транскрипційні фактори [93, 94].

MST1/2 у сигнальному каскаді Нірро може активуватися без висхідних кіназ. Процес фосфорилування посилюється димеризацією MST1/2. Активний MST1/2 фосфорилує SAV1 і MOB1A/B, що допомагає MST1/2 мобілізувати та фосфорилувати гідрофобні мотиви

LATS1/2 (T1079 для LATS1 і T1041 для LATS2). Іншим ключовим компонентом цієї дії є NF2 (Merlin), який безпосередньо взаємодіє з LATS1/2 і сприяє їх фосфорилуванню. LATS1/2 згодом зазнають автофосфорилування та ініціюють фосфорилування YAP і TAZ, що призводить до їх функціональної інактивації. Крім того, паралельно з MST1/2, дві групи MAP4K, MAP4K1/2/3/5 і MAP4K4/6/7 безпосередньо фосфорилують гідрофобні мотиви LATS1/2 і призводять до активації LATS1/2 та, як наслідок, інактивації YAP/TAZ [91, 95].

YAP і TAZ не можуть фізично зв'язувати хромосомну ДНК і тому діють як ко-активатори з факторами транскрипції, контролюючи велику кількість таргетних генів. Обидва білки регулюють експресію генів, головним чином, зв'язуючи TEAD1-4 (transcriptional enhancer factor domain). Взаємодія між YAP/TAZ і TEAD стимулює експресію численних генів, пов'язаних з проліферацією, виживанням та міграцією клітин. Продуктами генів є регулятор клітинного циклу циклін E, інгібітор апоптозу Diap1, фактор росту сполучної тканини (connective tissue growth factor, CTGF), Cyr61 (cysteine-rich 61), FGF1 і bantam мікроРНК [91].

Вплив на розмір органу та регуляцію гомеостазу тканин є найбільш відомими ознаками дії Hippo. Зазвичай вважається, що механічна сила або напруга можуть визначати ріст тканини та стримувати активацію YAP/TAZ, коли орган досягає належного розміру. Розміри органів обмежені або індукуються деякими розчинними факторами через аутокринний/паракринний механізм залежно від концентрації. Сигнальний шлях Hippo, особливо YAP, бере участь у регенерації органів. Наприклад, печінка ефективно відновлюється після пошкодження через посилення проліферації гепатоцитів. Транскрипційна активність YAP/TEAD підвищується під час регенерації печінки, в той час, як MST1/2 і LATS1/2 down-регулюються до завершення відновлення тканин. Після закінчення регенеративних процесів, активність YAP пригнічується, а гальмування MST1/2 та LATS1/2 автоматично знімається [96].

YAP/TAZ в клітинах-попередниках. Клітини-попередники відіграють важливу роль у гомеостазі та регенерації тканин. Високу активність YAP/TAZ спостерігали в SCs та клітинах-попередниках багатьох тканин. Активація YAP, яка зазвичай призводить до експансії клітин-попередників, гальмує диференціацію клітин таргетних тканин, таких як кишківник, печінка, шкіра та нервова система. У кишкових криптах YAP локалізований в ядрі, сприяючи експресію таргетних генів в базальних клітинах-попередниках і в кишкових SCs. У ембріонах курей YAP та його транскрипційні мішені CTGF та Cyr61, які стимулюють проліферацію клітин, спостерігаються у великій кількості під час раннього розвитку шлунка [97]. Крім того, YAP є важливим фактором і високо експресується в ядрах одношарових базальних епідермальних попередників, сприяючи їх експансії, проліферації та інгібуванню кінцевої диференціації через транскрипційну мішень Cyr61.

Здатність YAP/TAZ посилювати проліферацію та експансію клітин-попередників свідчить про їх вирішальну роль у розвитку органів, гомеостазі тканин та регенерації, спричиненої травмою. Механізмом негативного контролю YAP/TAZ є його фосфорилування з наступною деградацією в 14-3-3/SCF β TrCP/убіквітин/протеасомній системі [91].

TAZ/YAP у плюрипотентності SCs. Шлях Hippo є регулятором плюрипотентних SCs *in vitro*. TAZ/YAP беруть участь у диференціації ESC, отриманих з ICM (internal cell mass) бластоцисти. YAP високо експресується в ESC при самовідновленні. Зниження рівня мРНК та білка YAP корелює зі значним зниженням кількості плюрипотентних маркерів і з прогресом диференціації ESC. Крім того, YAP секвеструється і, таким чином, інактивується в цитоплазмі під час диференціації ESC, і, отже, значна кількість основних генів, необхідних для підтримки та функціонування SCs, включаючи Nanog, OCT3/4 і SOX2, пригнічується. Надмірна експресія YAP пригнічує диференціацію ESC і підтримує властивості SCs навіть в умовах культивування, що ведуть до диференціації, тоді як нокдаун YAP/TAZ є достатнім, щоб призвести до порушення фенотипу ESC [98]. Крім того, обмеження експресії YAP і TEAD2 або інгібування функції TEAD викликає диференціацію в бік лінеажу ентодерми. На відміну від цього, делеція MST1/2 в ESCs викликає проліферацію клітин і порушує процес

диференціації. У ссавців YAP і TEAD2 активують експресію головних регуляторів транскрипції ESC – OCT4 і Nanog. Крім того, ядерна активність TAZ/YAP необхідна для інтеграції сигналів факторів росту з цими основними регуляторами транскрипції, необхідними для підтримки плюрипотентного стану ESC. ESC людини потребують сигналів, індукованих FGF і членами родини TGF- β . TGF- β стимулює дію рецепторів з серин/треонін-кіназною активністю, які фосфорилують і активують клас транскрипційних факторів SMAD2/3. Білки TAZ/YAP утворюють комплекси з фосфорильованими SMAD2/3. У ядрі комплекси TAZ/YAP-SMAD2/3 зв'язують фактори транскрипції TEAD і разом з основним регулятором SCs OCT4 опосередковують підтримку плюрипотентного стану. Механічно цей комплекс поєднується з факторами, які утворюють комплекс ремоделювання та деацетилювання нуклеосом (nucleosome remodeling deacetylase, NuRD) і буферують експресію генів плюрипотентності, пригнічуючи гени, які визначають мезоентодермальну диференціацію. Після специфікації мезоентодерми комплекс TAZ/YAP-TEAD-OCT4 відокремлюється від SMAD, дозволяючи останньому активувати фактор транскрипції FOXH1 і стимулювати диференціацію. Аналогічно, ESC миші також потребують визначених рівнів YAP для підтримки свого плюрипотентного стану. Нокдаун YAP в ESC миші призводить до зупинки експресії OCT4 і SOX2 і, як наслідок, до диференціації [91].

YAP може індукувати експресію асоційованих з плюрипотентністю генів, які сприяють самооновленню ESC. Припускають, що YAP не є необхідним для самовідновлення, але потрібний для диференціації ESC. Нокдаун або нокаут YAP не змінює самовідновлення ESC, але погіршує їх диференціацію. TAZ і TEAD також необхідні для самовідновлення ESC [99]. Делеція LATS2 в ESC порушує стан плюрипотентності та здатність до диференціації. Розбіжність між цими дослідженнями, ймовірно, пов'язана з наявністю невідомих факторів, які впливають на шлях Ніппо в різних клітинних лініях, а також через варіації в культурі клітин та експериментах.

YAP в індукованих плюрипотентних стовбурових клітинах (iPSC). Роль YAP у контролі плюрипотентності спостерігається в індукованих плюрипотентних стовбурових клітинах (iPSC), що було встановлено за допомогою ектопічної експресії генів OCT3/4, SOX2, KLF4 і c-Мус, дуже схожої на таку в ESC за фенотипом і потенціалом диференціації. YAP активується під час процесу перепрограмування ембріональних фібробластів людини в iPSC, а додавання YAP до вихідних чотирьох факторів підвищує ефективність перепрограмування в ембріональних фібробластах миші, що ще більше підтверджує позитивну роль YAP у підтримці стовбуровості клітин [100]. Як і в ESC людини, взаємодія між YAP і TEAD формує обставини транскрипції важливі для підтримки плюрипотентності. Ектопічна експресія ядерно-локалізованого мутантного YAP сприяє самооновленню ESC миші та підвищує ефективність перепрограмування iPSC. В iPSC людини нокдаун LATS2 підвищував ефективність перепрограмування iPSC. До того, повідомлялось про успіх у перепрограмуванні iPSC, отриманих з первинних епітеліальних клітин амніотичної людини (HuAECs) шляхом введення OSY (OCT3/4, SOX2 і YAP) для активації сигнального шляху Ніппо-YAP [91, 100].

Отже, підтримка плюрипотентності та визначення напряму диференціації SCs залежить від функціонування надскладної мережі сигнальних систем, які взаємодіють між собою на різних рівнях. Потрібно зауважити, що дослідження мережі передачі сигналів, необхідних для підтримання стовбуровості, визначили сильну кореляцію цих шляхів із сигнальними шляхами злоякісних пухлин, а також спільні клітинні властивості ембріональних SCs та клітин раку, що вже не можна відкидати як випадковість. Вивчення цих паралелей неминуче вплине як на клінічні, так і на фундаментальні науки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ/ REFERENCES

1. Tronko MD, Kovzun OI, Pushkarev VM. [Application of stem cells in endocrinology: problems and prospects]. *Endokrynologia*. 2021;26(4):376-95. Ukrainian. doi: 10.31793/1680-1466.2021.26-4.376.
2. Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*. 2007 Jan;3(1):7-17. doi: 10.1007/s12015-007-0004-8.
3. El-Helw M, Chelvarajan L, Abo-Aly M, Soliman M, Milburn G, Conger AL, et al. Identification of human very small embryonic like stem cells (VSELS) in human heart tissue among young and old individuals. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Feb;16(1):181-5. doi: 10.1007/s12015-019-09923-1.
4. Ahamad N, Singh BB. Calcium channels and their role in regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2021 Apr 26;13(4):260-80. doi: 10.4252/wjsc.v13.i4.260.
5. Bhartiya D, Shaikh A, Anand S, Patel H, Kapoor S, Sriraman K, et al. Endogenous, very small embryonic-like stem cells: critical review, therapeutic potential and a look ahead. *Hum Reprod Update*. 2016 Dec;23(1):41-76. doi: 10.1093/humupd/dmw030.
6. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnol Adv*. 2018 Jul-Aug;36(4):1111-26. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.
7. Qi Y, Ma J, Li S, Liu W. Applicability of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with type 2 diabetes. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Aug 28;10(1):274. doi: 10.1186/s13287-019-1362-2.
8. Lilly MA, Davis MF, Fabie JE, Terhune EB, Gallicano GI. Current stem cell based therapies in diabetes. *Am J Stem Cells*. 2016 Oct 20;5(3):87-98.
9. Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *Int J Cell Biol*. 2016;2016:6940283. doi: 10.1155/2016/6940283.
10. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
11. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009 May 8;324(5928):797-801. doi: 10.1126/science.1172482.
12. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 May 13;474(7350):212-5. doi: 10.1038/nature10135.
13. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo- and adipodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:793823. doi: 10.1100/2012/793823.
14. Visvader JE, Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol*. 2016 Apr;18(4):349-55. doi: 10.1038/ncb3332.
15. Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jan;91(1):32-9. doi: 10.1038/icb.2012.64.
16. Najimi M, Berardis S, El-Kehdy H, Rosseels V, Evraerts J, Lombard C, et al. Human liver mesenchymal stem/progenitor cells inhibit hepatic stellate cell activation: in vitro and in vivo evaluation. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Jun 5;8(1):131. doi: 10.1186/s13287-017-0575-5.
17. Nordgren TM, Bailey KL, Heires AJ, Katafiasz D, Romberger DJ. Effects of agricultural organic dusts on human lung-resident mesenchymal stem (stromal) cell function. *Toxicol Sci*. 2018;162(2):635-44. doi: 10.1093/toxsci/kfx286.
18. Thakkar UG, Trivedi HL, Vanikar AV, Dave SD. Insulin-secreting adipose derived mesenchymal stromal cells with bone marrow-derived hematopoietic stem cells from autologous and allogenic sources for type 1 diabetes mellitus. *Cytherapy*. 2015 Jul;17(7):940-7. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.03.608.

19. *Herrera SC, Bach EA.* JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: from *Drosophila* to vertebrates. *Development*. 2019 Jan 29;146(2):dev167643. doi: 10.1242/dev.167643.
20. *Stine RR, Matunis EL.* JAK-STAT signaling in stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2013;786:247-67. doi:10.1007/978-94-007-6621-1_14.
21. *Housden BE, Perrimon N.* Spatial and temporal organization of signaling pathways. *Trends Biochem Sci*. 2014 Oct;39(10):457-64. doi: 10.1016/j.tibs.2014.07.008.
22. *Nakao S, Tsukamoto T, Ueyama T, Kawamura T.* STAT3 for cardiac regenerative medicine: involvement in stem cell biology, pathophysiology, and bioengineering. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 12;21(6):1937. doi: 10.3390/ijms21061937.
23. *Goruganthu MUL, Shanker A, Dikov MM, Carbone DP.* Specific targeting of notch ligand-receptor interactions to modulate immune responses: a review of clinical and preclinical findings. *Front Immunol*. 2020 Aug 14;11:1958. doi: 10.3389/fimmu.2020.01958.
24. *Bray SJ.* Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Nov;17(11):722-735. doi: 10.1038/nrm.2016.94.
25. *Genz B, Coleman MA, Irvine KM, Kutasovic JR, Miranda M, Gratte FD, et al.* Overexpression of miRNA-25-3p inhibits Notch1 signaling and TGF- β -induced collagen expression in hepatic stellate cells. *Sci Rep*. 2019 June 12;9:8541. doi: 10.1038/s41598-019-44865-1.
26. *Lampreia FP, Carmelo JG, Anjos-Afonso F.* Notch signaling in the regulation of hematopoietic stem cell. *Curr Stem Cell Rep*. 2017;3(3):202-9. doi: 10.1007/s40778-017-0090-8.
27. *Sottoriva K, Pajcini KV.* Notch signaling in the bone marrow lymphopoietic niche. *Front Immunol*. 2021 Jul 28;12:723055. doi: 10.3389/fimmu.2021.723055.
28. *Sueda R, Kageyama R.* Regulation of active and quiescent somatic stem cells by Notch signaling. *Dev Growth Differ*. 2020 Jan;62(1):59-66. doi: 10.1111/dgd.12626.
29. *Niu Z, Mu H, Zhu H, Wu J, Hua J.* p38 MAPK pathway is essential for self-renewal of mouse male germline stem cells (mGSCs). *Cell Prolif*. 2017 Feb;50(1):e12314. doi: 10.1111/cpr.12314.
30. *Niu Z, Zheng L, Wu S, Mu H, Ma F, Song W, et al.* Ras/ERK1/2 pathway regulates the self-renewal of dairy goat spermatogonia stem cells. *Reproduction*. 2015 May;149(5):445-52. doi: 10.1530/REP-14-0506.
31. *Guda BB, Pushkarev VV, Kovzun OI, Pushkarev VM, Tronko MD.* [Toxicity of MAPK in thyroid carcinoma. Mechanisms of suppression of signal cascade (review of literature and own data)]. *Hospital Surgery. Journal named by L.Ya. Kovalchuk*. 2019a;(3):84-96. Ukrainian.
32. *Guda BB, Pushkarev VM, Kovalenko AYe, Pushkarev VV, Kovzun OI, Tronko MD.* [Molecular genetic mechanisms of the pathogenesis of thyroid malignant tumors (review of literature and own data, part 1)]. *Endokrynologia*. 2019b;24(1):53-65. Ukrainian. doi: 10.31793/1680-1466.2019.24-1.53.
33. *Tronko ND, Pushkarev VM.* 30 years of the Chernobyl accident. Molecular genetic mechanisms of carcinogenesis of thyroid gland. *Tsitol Genet*. 2016 Nov-Dec;50(6):15-22.
34. *Haghighi F, Dahlmann J, Nakhaei-Rad S, Lang A, Kutschka I, Zenker M, et al.* bFGF-mediated pluripotency maintenance in human induced pluripotent stem cells is associated with NRAS-MAPK signaling. *Cell Commun Signal*. 2018 Dec 5;16(1):96. doi: 10.1186/s12964-018-0307-1.
35. *Wang XQ, Lo CM, Chen L, Ngan ESW, Xu A, Poon RYC.* CDK1-PDK1-PI3K/Akt signaling pathway regulates embryonic and induced pluripotency. *Cell Death Differ*. 2017 Sep 16;24:38-48. doi: 10.1038/cdd.2016.84.
36. *Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN.* Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans*. 2012 Feb;40(1):139-46. doi: 10.1042/BST20110609.

37. Fojtík P, Beckerová D, Holomková K, Šenfluk M, Rotrekl V. Both hypoxia-inducible factor 1 and MAPK signaling pathway attenuate PI3K/AKT via suppression of reactive oxygen species in human pluripotent stem cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jan 21;8:607444. doi: 10.3389/fcell.2020.607444.
38. Štefková K, Hanáčková M, Kučera J, Radaszkiewicz KA, Ambrůžová B, Kubala L, et al. MAPK p38alpha kinase influences haematopoiesis in embryonic stem cells. *Stem Cells Int.* 2019 Jun 2;2019:5128135. doi: 10.1155/2019/5128135.
39. Barruet E, Hadadeh O, Peiretti F, Renault VM, Hadjal Y, Bernot D, et al. p38 mitogen activated protein kinase controls two successive-steps during the early mesodermal commitment of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011 Jul;20(7):1233-46. doi: 10.1089/scd.2010.0213.
40. Mossahebi-Mohammadi M, Quan M, Zhang JS, Li X. FGF signaling pathway: a key regulator of stem cell pluripotency. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Feb 18;8:79. doi: 10.3389/fcell.2020.00079.
41. Harding A, Cortez-Toledo E, Magner NL, Beegle JR, Coleal-Bergum DP, Hao D, et al. Highly efficient differentiation of endothelial cells from pluripotent stem cells requires the MAPK and the PI3K pathways. *Stem Cells.* 2017 Apr;35(4):909-19. doi: 10.1002/stem.2577.
42. Cherepkova MY, Sineva GS, Pospelov VA. Leukemia inhibitory factor (LIF) withdrawal activates mTOR signaling pathway in mouse embryonic stem cells through the MEK/ERK/TSC2 pathway. *Cell Death Dis.* 2016 Jan 14;7(1):e2050. doi: 10.1038/cddis.2015.387.
43. Tronko ND, Pushkarev VM, Sokolova LK, Pushkarev VV, Kovzun OI. [Molecular mechanisms of pathogenesis of diabetes and its complications]. Kyiv: Publishing house Medkniga, 2018a. 264 p. Russian.
44. Tronko MD, Kovzun OI, Pushkarev VV, Sokolova LK, Pushkarev VM. [Reception and intracellular mechanisms of insulin action (part 1)]. *Endokrynologia.* 2018b;23(3):269-80. Russian.
45. Chen YH, Su CC, Deng W, Lock LF, Donovan PJ, Kayala MA, et al. Mitochondrial Akt signaling modulated reprogramming of somatic cells. *Sci Rep.* 2019 Jul 9;9(1):9919. doi: 10.1038/s41598-019-46359-6.
46. Yu JSL, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016 Sep 1;143:3050-60. doi: 10.1242/dev.137075.
47. Huang TS, Li L, Moalim-Nour L, Jia D, Bai J, Yao Z, et al. A regulatory network involving β -Catenin, e-Cadherin, PI3k/Akt, and slug balances self-renewal and differentiation of human pluripotent stem cells in response to Wnt signaling. *Stem Cells.* 2015 May;33(5):1419-33.
48. Singh AM, Reynolds D, Cliff T, Ohtsuka S, Mattheyses AL, Sun Y, et al. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell.* 2012 Mar 2;10(3):312-26. doi: 10.1016/j.stem.2012.01.014.
49. Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene.* 2006 May 4;25:2697-707. doi:10.1038/sj.onc.1209307.
50. Yu JS, Ramasamy TS, Murphy N, Holt MK, Czapiewski R, Wei SK, et al. PI3K/mTORC2 regulates TGF-beta/Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nat Commun.* 2015 May 22;6:7212. doi: 10.1038/ncomms8212.
51. Antico Arciuch VG, Galli S, Franco MC, Lam PY, Cadenas E, Carreras MC, et al. Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression. *PLoS One.* 2009 Oct 21;4(10):e7523. doi: 10.1371/journal.pone.0007523.

52. Pushkarev VM, Kovzun OI, Pushkarev VV, Guda BB, Tronko MD. [Chronic inflammation and cancer. Role of nuclear factor NF- κ B (review of literature and own data)]. *Journal of NAMS of Ukraine*. 2015;20(3-4):287-98. Ukrainian.
53. Pushkarev VM, Sokolova LK, Kovzun OI, Pushkarev VV, Tronko MD. [Involvement of nuclear factor NF- κ B in the pathogenesis of type 1 diabetes]. *Endokrynologia*. 2016;21(3):225-38. Ukrainian.
54. Kaltschmidt C, Greiner JFW, Kaltschmidt B. The transcription factor NF- κ B in stem cells and development. *Cells*. 2021 Jun;10(8):2042. doi: 10.3390/cells10082042.
55. Soria-Valles C, Osorio FG, Gutiérrez-Fernández A, De Los Angeles A, Bueno C, Menéndez P, et al. NF- κ B activation impairs somatic cell reprogramming in ageing. *Nat Cell Biol*. 2015 Aug;17:1004-13. doi: 10.1038/ncb3207.
56. Lüningschrör P, Stöcker B, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. miR-290 cluster modulates pluripotency by repressing canonical NF- κ B signaling. *Stem Cells*. 2012 Apr;30:655-64. doi: 10.1002/stem.1033.
57. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*. 2017 Jun 1;169(6):985-999. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.
58. Tan DS, Holzner M, Weng M, Srivastava Y, Jauch R. SOX17 in cellular reprogramming and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020 Dec;67(Pt 1):65-73. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.008.
59. Klaus M, Prokoph N, Girbig M, Wang X, Huang YH, Srivastava Y, et al. Structure and decoy-mediated inhibition of the SOX18/Prox1-DNA interaction. *Nucleic Acids Res*. 2016 May 5;44(8):3922-35. doi: 10.1093/nar/gkw130.
60. Xu Z, Robitaille AM, Berndt JD, Davidson KC, Fischer KA, Mathieu J, et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 18;113(42):E6382-90. doi: 10.1073/pnas.1613849113.
61. Lyashenko N, Winter M, Migliorini D, Biechele T, Moon RT, Hartmann C. Differential requirement for the dual functions of β -catenin in embryonic stem cell self-renewal and germ layer formation. *Nat Cell Biol*. 2011 Jun 19;13(7):753-61. doi: 10.1038/ncb2260.
62. Ten Berge D, Kurek D, Blauwkamp T, Koole W, Maas A, Eroglu E, et al. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 14;13:1070-5. doi: 10.1038/ncb2314.
63. Le Rolle M, Massa F, Siggers P, Turchi L, Loubat A, Koo BK, et al. Arrest of WNT/ β -catenin signaling enables the transition from pluripotent to differentiated germ cells in mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jul 27;118(30):e2023376118. doi: 10.1073/pnas.2023376118.
64. Zhang M, Lai Y, Krupalnik V, Guo P, Guo X, Zhou J, et al. β -Catenin safeguards the ground state of mouse pluripotency by strengthening the robustness of the transcriptional apparatus. *Sci Adv*. 2020 Jul 17;6(29):eaba1593. doi: 10.1126/sciadv.aba1593.
65. Sineva GS, Pospelov VA. β -Catenin in pluripotency: adhering to self-renewal or Wnting to differentiate? *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014;312:53-78. doi: 10.1016/B978-0-12-800178-3.00002-6.
66. Tao F, Soffers J, Hu D, Chen S, Gao X, Zhang Y, et al. β -Catenin and associated proteins regulate lineage differentiation in ground state mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Rep*. 2020 Sep 8;15(3):662-76. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.07.018.
67. Aulicino F, Pedone E, Sottile F, Lluís F, Marucci L, Cosma MP. Canonical Wnt pathway controls mESC self-renewal through inhibition of spontaneous differentiation via β -Catenin/TCF/LEF functions. *Stem Cell Rep*. 2020 Sep 8;15(3):646-61. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.07.019.
68. Theka I, Sottile F, Cammisa M, Bonnin S, Sanchez-Delgado M, Di Vicino U, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway safeguards epigenetic stability and homeostasis of mouse embryonic stem cells. *Sci Rep*. 2019 Jan 30;9(1):948. doi: 10.1038/s41598-018-37442-5.

69. Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: wnt signaling and stem cell control. *Science*. 2014 Oct 3;346(6205):1248012. doi: 10.1126/science.1248012.
70. Tüysüz N, van Bloois L, van den Brink S, Begthel H, Verstegen MM, Cruz LJ, et al. Lipid-mediated Wnt protein stabilization enables serum-free culture of human organ stem cells. *Nat Commun*. 2017 Mar 6;8:14578. doi: 10.1038/ncomms14578.
71. Lluís F, Aulicino F, Theka I, Ombrato L, Cosma MP. Temporal perturbation of the Wnt signaling pathway in the control of cell reprogramming is modulated by TCF1. *Stem Cell Rep*. 2014 May 8;2(5):707-20. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.001.
72. Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling. *Genes Dev*. 2014 Jul 15;28(14):1517-32. doi: 10.1101/gad.244772.114.
73. Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Mar;17(3):155-69. doi: 10.1038/nrm.2015.28.
74. Duinhouwer LE, Tüysüz N, Rombouts EW, Ter Borg MN, Mastrobattista E, Spanholtz J, et al. Wnt3a protein reduces growth factor-driven expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells in serum-free cultures. *PLoS One*. 2015 Mar 25;10(3):e0119086. doi: 10.1371/journal.pone.0119086.
75. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: Turning over new leaves. *Cell*. 2007 Feb 9;128(3):445-58. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.014.
76. De Jaime-Soguero A, Aulicino F, Ertaylan G, Griego A, Cerrato A, Tallam A, et al. Wnt/Tcf1 pathway restricts embryonic stem cell cycle through activation of the Ink4/Arf locus. *PLoS Genet*. 2017 Mar 27;13(3):e1006682. doi: 10.1371/journal.pgen.1006682.
77. Yang J, Jiang W. The role of SMAD2/3 in human embryonic stem cells. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Jul 21;8:653. doi: 10.3389/fcell.2020.00653.
78. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013 Jan-Feb;2(1):47-63. doi: 10.1002/wdev.86.
79. Brown S, Teo A, Pauklin S, Hannan N, Cho CH, Lim B, et al. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem Cells*. 2011 Aug;29(8):1176-85. doi: 10.1002/stem.666.
80. Li QV, Dixon G, Verma N, Rosen BP, Gordillo M, Luo R, et al. Genome-scale screens identify JNK-JUN signaling as a barrier for pluripotency exit and endoderm differentiation. *Nat Genet*. 2019 Jun;51(6):999-1010. doi: 10.1038/s41588-019-0408-9.
81. Loh KM, Ang LT, Zhang J, Kumar V, Ang J, Auyeong JQ, et al. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. *Cell Stem Cell*. 2014 Feb 6;14(2):237-52. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.007.
82. Xu X, Wang L, Liu B, Xie W, Chen YG. Activin/Smad2 and Wnt/ β -catenin up-regulate HAS2 and ALDH3A2 to facilitate mesendoderm differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2018 Nov 30;293(48):18444-53. doi: 10.1074/jbc.RA118.003688.
83. Yu JS, Ramasamy TS, Murphy N, Holt MK, Czapiewski R, Wei SK, et al. PI3K/mTORC2 regulates TGF-beta/Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nat Commun*. 2015 May 22;6:7212. doi: 10.1038/ncomms8212.
84. Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development*. 2014 Sep;141(18):3445-57. doi: 10.1242/dev.083691.
85. Sasai N, Toriyama M, Kondo T. Hedgehog signal and genetic disorders. *Front Genet*. 2019 Nov 8;10:1103. doi: 10.3389/fgene.2019.01103.
86. Bufalieri F, Lospinosa Severini L, Caimano M, Infante P, Di Marcotullio L. DUBs activating the Hedgehog signaling pathway: a promising therapeutic target in cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 10;12(6):1518. doi: 10.3390/cancers12061518.

87. Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):698-708. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.012.
88. Brady MV, Vaccarino FM. Role of SHH in patterning human pluripotent cells towards ventral forebrain fates. *Cells*. 2021 Apr;10(4):914. doi: 10.3390/cells10040914.
89. Cederquist GY, Asciolla JJ, Tchieu J, Walsh RM, Cornacchia D, Resh MD, et al. Specification of positional identity in forebrain organoids. *Nat Biotechnol*. 2019 Apr;37(4):436-44. doi: 10.1038/s41587-019-0085-3.
90. Roo JJD, Staal FJT. Cell signaling pathway reporters in adult hematopoietic stem cells. *Cells*. 2020 Oct 9;9(10):2264. doi: 10.3390/cells9102264.
91. Chen YA, Lu CY, Cheng TY, Pan SH, Chen HF, Chang NS. WW domain-containing proteins YAP and TAZ in the Hippo pathway as key regulators in stemness maintenance, tissue homeostasis, and tumorigenesis. *Front Oncol*. 2019 Feb 11;9:60. doi: 10.3389/fonc.2019.00060.
92. Wang Y, Yu A, Yu F-X. The Hippo pathway in tissue homeostasis and regeneration. *Protein Cell*. 2017 May;8(5):349-359. doi: 10.1007/s13238-017-0371-0.
93. Wu Y, Griffn EE. Regulation of cell polarity by PAR-1/MARK kinase. *Curr Top Dev Biol*. 2017;123:365-97. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.11.001.
94. Nguyen TH, Kugler JM. Ubiquitin-dependent regulation of the mammalian hippo pathway: therapeutic implications for cancer. *Cancers*. 2018 Apr 17;10(4):121. doi: 10.3390/cancers10040121.
95. Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun*. 2015 Oct 5;6:8357. doi: 10.1038/ncomms9357.
96. Su T, Bondar T, Zhou X, Zhang C, He H, Medzhitov R. Two-signal requirement for growth-promoting function of Yap in hepatocytes. *Elife*. 2015 Feb 10;4:e02948. doi: 10.7554/eLife.02948.
97. McKey J, Martire D, de Santa Barbara P, Faure S. LIX1 regulates YAP1 activity and controls the proliferation and differentiation of stomach mesenchymal progenitors. *BMC Biol*. 2016 Apr 28;14:34. doi: 10.1186/s12915-016-0257-2.
98. Beyer TA, Weiss A, Khomchuk Y, Huang K, Ogunjimi AA, Varelas X, et al. Switch enhancers interpret TGF-beta and Hippo signaling to control cell fate in human embryonic stem cells. *Cell Rep*. 2013 Dec 26;5(6):1611-24. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.021.
99. Aylon Y, Sarver A, Tovy A, Ainbinder E, Oren M. Lats2 is critical for the pluripotency and proper differentiation of stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Apr;21(4):624-33. doi: 10.1038/cdd.2013.188.
100. Zhao Y, Fei X, Guo J, Zou G, Pan W, Zhang J, et al. Induction of reprogramming of human amniotic epithelial cells into iPS cells by overexpression of Yap, Oct4, and Sox2 through the activation of the Hippo-Yap pathway. *Exp Ther Med*. 2017 Jul;14(1):199-206. doi: 10.3892/etm.2017.4512.