






Тронько М.Д. , Пушкаръов В.М. , Ковзун О.І. , Соколова Л.К. , Пушкаръов В.В.   
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», м. Київ, Україна

## Епігенетика, клітинний цикл та метаболізм стовбурових клітин. Формування інсулін-продукуючих клітин

For citation: Міжнародний ендокринологічний журнал. 2022;18(3):169-179. doi: 10.22141/2224-0721.18.3.2022.1165

**Резюме.** Диференціація стовбурових клітин (SC) вимагає низки перебудов хроматину для встановлення клітинної ідентичності. Посттрансляційні модифікації гістонів зазвичай регулюють динаміку гетерохроматину. Гістони піддаються різним модифікаціям, таким як ацетилювання, метилювання, фосфорилювання та убіквітинування, і таким чином сприяють регуляції стану хроматину та транскрипційній активності. Хімічно стабільний патерн метильованих гістонів сприяє клітинній пам'яті щодо зовнішніх стимулів, підтримуючи рівні транскрипції адаптивних генів навіть після усунення сигналів навколишнього середовища. Модифікації хроматину відіграють важливу роль у дозріванні клітин острівців підшлункової залози, встановленні схеми секреції, яка стимулює регуляцію секреції інсуліну. МікроРНК, клас ендегенних малих некодуючих РНК в еукаріотів, є важливими регуляторами експресії генів на рівні посттранскрипційних механізмів. МікроРНК регулюють секрецію інсуліну, розвиток підшлункової залози та диференціювання β-клітин. Плюрипотентні SC характеризуються високою швидкістю проліферації, здатністю до самовідновлення та потенціалом диференціації у різні типи клітин. Ця швидка проліферація зумовлена модифікованим клітинним циклом, який дозволяє клітинам швидко переходити від синтезу ДНК до поділу клітини за рахунок скорочення часу проміжних (G1 і G2) фаз. Канонічний сигнальний шлях WNT/β-катеніну характеризується як основний драйвер росту та проліферації клітин. Під час G1 сигналінг WNT індукує перехід до S-фази. Порівняно з їхніми соматичними аналогами плюрипотентні SC демонструють високу швидкість гліколізу, подібну до аеробного гліколізу в ракових клітинах, — явище, відоме як ефект Варбурга, яке є важливим для підтримки властивостей SC. У стовбурових клітинах позаклітинне надходження Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму опосередковується головним чином депо-керованими Ca<sup>2+</sup>-каналами. Показано, що позаклітинний кальцій сприяє проліферації SC, а отже, може брати участь в трансплантаційній терапії.

**Ключові слова:** стовбурові клітини; епігенетичні модифікації; клітинний цикл; метаболізм; іони кальцію; інсулін-продукуючі клітини

### Епігенетика стовбурових клітин

Диференціація ембріональних стовбурових клітин (embryonic stem cells — ESC) потребує низки перебудов хроматину для встановлення клітинної ідентичності. Ситуація значно ускладнюється, коли індукується диференціація від соматичної клітини до плюрипотентних стовбурових клітин (SC) і далі до бажаного типу клітин шляхом маніпулювання певними генами [1, 2]. Посттрансляційні модифікації гістонів зазвичай регулюють динаміку гетерохроматину. Гістони за-

знають різних модифікацій, таких як ацетилювання, метилювання, фосфорилювання та убіквітинування, і таким чином сприяють регуляції стану хроматину та транскрипційній активності [3]. Хімічно стабільний патерн метильованих гістонів сприяє клітинній пам'яті щодо зовнішніх стимулів, підтримуючи рівні транскрипції адаптивних генів навіть після усунення сигналів довкілля. Найважливішими репресивними модифікаціями транскрипції є метилювання гістону 3 за залишками лізину 9 та 27 (H3K9me та H3K27me)

 © 2022. The Authors. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для кореспонденції: Пушкаръов Володимир Михайлович, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: [pushkarev.vm@gmail.com](mailto:pushkarev.vm@gmail.com)

For correspondence: Volodymyr Pushkarev, State Institution "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Vyshgorodska st., 69, Kyiv, 04114, Ukraine; e-mail: [pushkarev.vm@gmail.com](mailto:pushkarev.vm@gmail.com)

Full list of authors information is available at the end of the article.

[4]. У ссавців еухроматична гістон-лізінова N-метилтрансфераза 2 (EHMT2/G9a, Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 (EHMT2), також відома як G9a) та G9a-зв'язана метилтрансфераза (GLP/Eu-HMTase 1, Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1, також відома, як G9a-like protein (GLP)) переважно регулюють моно- та диметилування H3K9 і мають важливе значення для ембріогенезу [5]. SETDB1 (SET domain bifurcated histonelysine methyltransferase), лізинметилтрансфераза 1A (KMT1A/SUV39H1 (suppressor of variegation 3–9 homolog 1)) та лізинметилтрансфераза 1B (KMT1B/SUV39H2) каталізують триметилування H3K9 (H3K9me3), H3K9me2/3 і розпізнаються гетерохроматиновим білком 1 (HP1), який завдяки автоолігомеризації та взаємодії з іншими репресивними модифікаціями забезпечує компактизацію, розширення та успадкування гетерохроматину [6]. Репресивна платформа, утворена H3K9me2/3-гістоном і HP1 метилтрансферазами, сприяє метилуванню ДНК і підтриманню низького рівня ацетилювання гістонів [7]. Ділянки H3K9me3-маркованого гетерохроматину можуть мати фізично конденсовану структуру, яка слугує для пригнічення генів, кодує білок у факультативному гетерохроматині [4]. Зокрема, конкретні гени диференційованих клітин, отримані з ентодерми, показали втрату H3K9me3 у лінеажі печінки та підшлункової залози [7]. PRC2 (polycomb repressive complex 2) депонує метильні групи на H3K27, які можуть блокувати ініціювання транскрипції. Показано, що PRC2 є важливим для функціональної регуляції β-клітин у підшлунковій залозі та для їх дедиференціації. Можливо, метаболічні зміни, що індукують появу цукрового діабету (ЦД) 2-го типу, впливають на регуляцію, що здійснюється PRC2 в структурі хроматину [8].

Ефект H3K9- та H3K27-НМТ компенсується родиною деметилаз, що містять домен Jumonji (JMJC), при цьому родина JMJD2/KDM4 (histone lysine demethylase subfamily 4) демонструє активність щодо залишків H3K9me2/me3 (а також метильованого H3K36), а білки JMJD1/KD проявляють активність щодо H3K9me2/1 [9, 10]. Білки KDM6A/UTX (Lysine-specific demethylase 6A, також відома як Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome) та DM6B/JMJD3 можуть функціонувати через свій каталітичний домен як деметилази гістонів за залишками H3K27. Обидва білки продемонстрували важливу роль у клітинній диференціації [11, 12].

Модифікації хроматину можуть відіграти важливу роль у повному дозріванні клітин острівців підшлункової залози і, відповідно до функціональної взаємодії, встановити схему секреції, яка стимулює регуляцію секреції інсуліну у здорових осіб. МікроРНК, клас ендегенних малих некодуєчих РНК в еукаріотів, є важливими регуляторами експресії генів на рівні посттранскрипційних механізмів. МікроРНК регулюють секрецію інсуліну, розвиток підшлункової залози та диференціювання β-клітин. Однак функція мікроРНК у формуванні інсулін-продукуєчих клітин з дорослих SC вивчена недостатньо [13]. Метилування ДНК відіграє вирішальну роль у розвитку β-клітин та

регуляції генів. У декількох роботах висвітлено важливу роль ключових епігенетичних модифікаторів, таких як ДНК-метилтрансфераза 1 (DNMT1), під час розвитку підшлункової залози, а також показано, як порушення їх регуляції може призвести до прогресування ЦД. Наприклад, миші з DNMT3A-КО β-клітинами демонструють аберантну експресію основних метаболічних генів, необхідних для розвитку, таких як гексокіназа 1 (HK1) та лактатдегідрогеназа А (LDHA), що призводить до дефекту стимульованої глюкозою секреції інсуліну в постнатальній фазі. Стан метилування ДНК промоторів генів, що регулюють специфікацію підшлункової залози, таких як *INS*, також важливий для регулювання маси та функцій β-клітин під час старіння. Інактивація специфічної для β-клітин ДНК метилтрансферази DNMT1 призводить до втрати маси β-клітин та супутньої трансдиференціації в α-клітини [11].

Взаємоперетворення між тісно пов'язаними ембріональними станами допомогли зрозуміти механізми епігенетичного контролю ембріогенезу. Іншим, більш радикальним перетворенням клітин є перепрограмування соматичних клітин на індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC) або за допомогою перенесення ядер соматичних клітин (SCNT — Somatic cell nuclear transfer) [14]. Обидва методи перепрограмування залучають глобальну реконфігурацію патерна експресії генів, викликану епігенетичним ремодельованням [15], і ці методи виявили потужні епігенетичні бар'єри, які стримують конверсію клітин. Хроматин інтенсивно реорганізується під час перепрограмування [16], оскільки взаємодії енансер — промотор і активні та репресивні послідовності встановлюють нові контакти та змінюють порядок транскрипційної програми [17, 18]. Під час перепрограмування соматичних клітин ектопічні трансгени плюрипотентності OCT4, SOX2, KLF4 і c-Мус повторно з'єднують таргетні енансери з промоторами для зміни схеми транскрипції [19]. Та більш важливо, що під час цього процесу реорганізація хроматину відбувається до або незалежно від змін експресії генів. Зміни доступності хроматину часто передують змінам експресії генів, здебільшого на декілька днів [20, 21].

Загалом соматичні клітини зазвичай мають вищий рівень репресивних ознак, кількість яких зменшується під час перепрограмування до плюрипотентності. Вітамін С покращує перепрограмування соматичних клітин до плюрипотентності шляхом модуляції білків, які містять домени TET і JMJ [22], що призводить до деметилування ДНК і H3K36me2/3. Інші репресивні епігенетичні ознаки були ідентифіковані як основні бар'єри для перепрограмування [23], зокрема репресивна модифікація гістонів H3K9me3, яка перерозподіляється під час перепрограмування iPSC. Метилтрансферази є низхідними мішенями BMP і є детермінантою для генерації iPSC, регулюючи стани метилування в центральних локусах плюрипотентності [24]. Втрата H3K9 метилтрансферази — SETDB1 (SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1) або її кофактора TRIM28 (Tripartite motif-containing 28)

призводить до посилення перепрограмування [25], хоча в кінцевому підсумку це може бути шкідливим, оскільки викликає спонтанну диференціацію отриманих iPSC [26]. Інші ферменти, що модифікують H3K9me3, також порушують перетворення соматичних клітин в iPSC, включаючи SUV39H1/2 і EHMT2 (G9a), а також H3K79me3 метилтрансферазу DOT1L (Disruptor of telomeric silencing 1-like). Однак регуляція репресивних гістонів є більш тонкою, ніж просто репресивні механізми, що перешкоджають перепрограмуванню. Перепрограмування є багатофазною програмою, і однією з найперших фаз є широкомасштабне пригнічення програми експресії соматичних генів [20, 21, 27]. Епігенетичні регулятори під час перепрограмування мають контекстно-специфічні та часоспецифічні ефекти. Наприклад, нокдаун корепресорів Ncor1/Ncor2 (nuclear receptor co-repressor 1/2, також відомий як thyroid-hormone- and retinoic-acid-receptor-associated co-repressor 1 (TRAC-1)) перешкоджає раннім стадіям перепрограмування через знижену супресію соматичних генів, але сприяє пізнім стадіям через зниження репресії генів, пов'язаних з плюрипотентністю [28]. Подібну картину спостерігали для гістонової деметилази H3K27 — KDM6B (JMJD3) [29] і H3K27me3 метилтрансферази EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) [30]. Інші епігенетичні регулятори можуть бути сприятливими в обох фазах, хоча й використовують різні механізми для досягнення цього ефекту. Наприклад, убіквітіназа RYBP (RING1 and YY1-binding protein) H2AK119 (histone H2A on lysine 119) взаємодіє з комплексом PRC1 для пригнічення соматичної програми через гістон-деметилазу KDM2B, але кооперується з OCT4, активуючи плюрипотентну програму [31]. Епігенетичні регулятори можуть бути чимось на кшталт двостороннього меча для перепрограмування соматичних клітин [31, 32].

Отже, епігенетична регуляція є однією з ключових подій у перепрограмуванні та диференціації стовбурових клітин.

## Особливості клітинного циклу стовбурових клітин

Плюрипотентні SC (PSC) характеризуються високою швидкістю проліферації, здатністю до самовідновлення та потенціалом диференціації у всі три зародкових листки. Ця швидка проліферація зумовлена сильно модифікованим клітинним циклом, який дозволяє клітинам швидко переходити від синтезу ДНК до поділу клітини за рахунок скорочення часу проміжних (gap — G1 і G2) фаз (рис. 1). Наприклад, у ранніх клітинах ембріона *Xenopus* клітинний цикл триває всього 30 хв. Соматичні клітини зазвичай мають тривалість клітинного циклу близько 24 годин, при цьому значний час проводять у фазі G1, яка триває близько 11 годин. Однак ESC, отримані з ICM ембріона людини, що розвивається, мають клітинний цикл приблизно 16 годин із лише тригодинною фазою G1 [33, 34].

PSC мають скорочену фазу G1 і коротку тривалість клітинного циклу. Здатність до самовідновлення регулюється циклінами D і цикліном E, а також їх каталі-

тичними партнерами CDK2, CDK4 і CDK6. PSC більш чутливі до сигналів диференціювання у фазі G1 унаслідок пермісивності середовища хроматину, тоді як у фазах S, G2 та M вони несприйнятливі до цих сигналів. Як тільки клітини диференціюються в напрямку ембріональних зародкових листків і виходять з плюрипотентного стану, тривалість їх фази G1 і клітинного циклу збільшується. Спонтанній диференціації можуть сприяти інгібітори клітинного циклу, такі як p15, p16 або p21. З іншого боку, ефективність перепрограмування можна підвищити за рахунок надмірної експресії цикліну B1/CDK1, цикліну D/CDK4/6 і цикліну E/A/CDK2 або зменшити через надмірну експресію інгібіторів клітинного циклу — p15, p16 і p21 (за Jirawatnotai et al., 2020).

Ранні дослідження з використанням mESC визначили, що багато ключових регуляторів клітинного циклу, що регулюють цикл соматичних клітин, були змінені або відсутні в mESC. Аналіз цього модифікованого циклу SC був складним через міцний зв'язок між швидкою проліферацією та плюрипотентністю, оскільки порушення клітинного циклу або факторів плюрипотентності призводять до диференціації [33, 35].

Клітинний цикл характеризується складною взаємодією циклінів, циклінзалежних кіназ (Cdk), інгібіторів циклінзалежної кінази (Cdkn), білків-кишень (rocket) родини ретинобластоми та багатьох додаткових факторів. Ця складна мережа забезпечує організовану систему, за допомогою якої клітина може рости та ділитися на дві дочірні клітини [36]. Залежно від типу клітини час, необхідний проліферуючим клітинам для поділу, зазнає змін, і в основному це здійснюється завдяки модуляції регуляторів клітинного циклу. Найважливішим механізмом контролю клітинного циклу, який відсутній у mESC, є добре охарактеризована точка рестрикції, присутня в кінці фази G1 [37]. Ця контрольна точка служить для перевірки того, що внутрішньоклітинне і позаклітинне середовище є сприятливим для прогресування клітинного циклу і, зрештою, для виживання отриманого клітинного потомства. Якщо будь-яке середовище несприятливе, клітини не будуть продовжувати S-фазу, зупиняючи реплікацію та поділ ДНК.

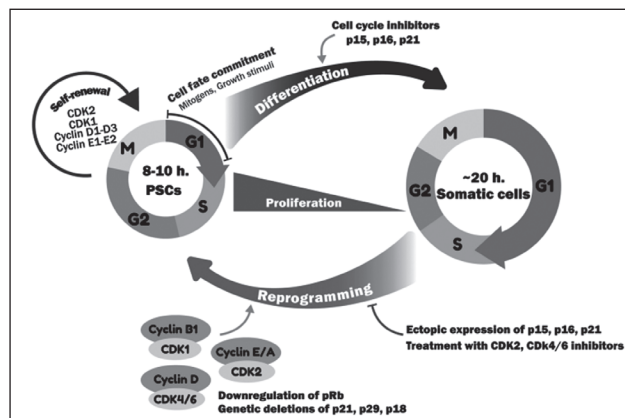
Канонічний цикл соматичних клітин складається зі стадії синтезу ДНК (S-фаза) і стадії клітинного поділу (M-фаза), що перемежуються двома проміжними фазами — G1 (між фазою M і фазою S) і G2 (між фазою S і фазою M) (рис. 1) [37]. Клітинний цикл у першу чергу регулюється дією комплексів циклін/Cdk, що виявляють осциляційну активність, яка контролює важливі регулятори клітинного циклу, що сприяють переходу від однієї фази до іншої. Циклін D разом зі своїми партнерами Cdk — Cdk4/6 проявляє високу активність у фазі G1, тоді як циклін E з Cdk2 активний під час пізньої фази G1 та фази S. Циклін A з Cdk2 переважно активний у фазі S і G2, тоді як циклін B з Cdk1 регулює фази G2 і M. Упорядкована поява та зникнення цих регуляторних білків необхідні для того, щоб синтез ДНК передував поділу клітини для контролю точного розміру і цілісності генома. Таким

чином, осциляційна активність споріднених, але різних комплексів циклін/Cdk керує клітинним циклом, спрямовуючи його в одному напрямку за допомогою механізму, що включає активацію та деструкцію окремих мішеней, які регулюють характерні аспекти кожної фази клітинного циклу [37].

Навпаки, клітини ембріональних SC миші демонструють клітинний цикл, у якому фаза G1 сильно скорочена, що дозволяє клітині швидко переходити від поділу клітини (фаза M) до синтезу ДНК (фаза S) (рис. 1). Крім того, типова осциляційна активність комплексів циклін/Cdk, яка спостерігається в циклі соматичних клітин, відсутня, хоча клітини mES все ще проходять цикл [38]. Під час скороченої фази G1, що спостерігається в mESC, циклін D1 і D3 експресується на низьких рівнях, при цьому Cdk6 є переважним партнером. Навпаки, активність цикліну E/Cdk2 і цикліну A/Cdk2 є настільки високою протягом усього клітинного циклу ESC, що вона вважається незалежною від клітинного циклу. Єдиним винятком є мітотичний циклін B, його активність разом з Cdk1 досягає піку під час фази G2/M і є низькою протягом інших фаз клітинного циклу mESC [39].

Ключовим регулятором фази G1 є білок ретинобластоми (RB) [34], який контролює точку звороту (чек-пойнт), тим самим запобігаючи входженню у фазу S. Цей контроль здійснюється шляхом зміни статусу фосфорилювання RB. Коли клітина входить в G1, RB знаходиться в активному (нефосфорилюваному) стані і блокує транскрипцію ключових генів фази G1/S, гальмуючи проходження через точку контролю. Фосфорилювання RB у фазі G1 знижує його інгібуючу активність, дозволяючи клітинам подолати чек-пойнт і увійти у фазу S. RB зв'язується з транскрипційним фактором E2F, контролюючи експресію регуляторів клітинного циклу фази G1/S, таких як циклін E, циклін A і Cdk2. Сімейство факторів E2F, яке складається з восьми членів, поділено на дві підкатегорії — активатори та репресори. На ранній фазі G1 активний RB (нефосфорилюваний) утворює комплекс з E2F-репресором і зв'язується з промоторами таргетних генів, залучаючи гістондеацетилази для пригнічення їх транскрипції. RB також безпосередньо пригнічує активність E2F-активатора шляхом зв'язування та запобігання утворенню активного комплексу [35].

Важливо відзначити, що фактори плюрипотентності OCT-3/4 інтегрують стовбуровість з клітинним циклом, пришвидшуючи останній. OCT-3/4 відіграють важливу роль у підтримці різних фаз клітинного циклу в ESC — у кооперації з SOX-2 регулюють активність циклін D/Cdk через мікроРНК-302, забезпечуючи скорочення фази G1. OCT-3/4 пригнічують активність основного інгібітора циклу p21 безпосередньо, впливаючи на його експресію, і опосередковано, інгібуючи активатор експресії p21 — p53. OCT-3/4 позитивно регулює експресію E2F3а, який посилює експресію цикліну A та Cdk1. OCT-3/4 також позитивно регулюють циклін F, який сприяє міграції цикліну B у ядро клітини, тим самим стимулюючи G2/M перехід [35].



**Рисунок 1. Роль регуляторів клітинного циклу у визначенні долі плюрипотентних стовбурових клітин**

### Клітинний цикл і диференціація плюрипотентних стовбурових клітин

У mESC RB перебуває у постійно гіперфосфорилюваній (неактивній) формі через високу активність комплексів циклін/Cdk, які фосфорилюють RB, у поєднанні зі зниженням рівня фосфатаз, таких як протеїнфосфатаза PP-1 [36]. Оскільки RB неактивний, не відбувається репресії активатора E2F, а репресори E2F не утворюють супресивного комплексу з RB. Це призводить до високого рівня експресії Cyclin E/Cyclin A і Cdk2, що, у свою чергу, додатково пригнічує активність RB. Втрата репресивної активності RB призводить до інактивації контрольної точки G1/S, що дозволяє клітинам mES швидко вступати в S-фазу майже відразу після поділу клітини. У hPSC активність CDK є циклічною, і інгібітори CDK експресуються, хоча й на нижчих рівнях, ніж у соматичних клітинах. Через це RB не фосфорилюється конститутивно, що призводить до функціонування точки рестрикції [33].

Інший рівень регуляції активності циклін/Cdk здійснюється через дію інгібіторів циклінзалежних кіназ (Cdkn). Існує два основних класи Cdkn, родина CIP/KIP, яка складається з p21 (CIP1), p27 (KIP1) і p57 (KIP2), та INK4/Arf (інгібітори CDK4), яка складається з p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) і p19 (INK4D/Arf). Родина CIP/KIP має більш широку інгібуючу активність і може зв'язуватися як з циклінами, так і з CDK. Вони можуть регулювати активність цикліну D, цикліну E та цикліну A. З іншого боку, родина INK4 специфічно інгібує активність CDK4 і CDK6, перешкоджаючи їх зв'язуванню з цикліном D. Важливо, що клітини mES не експресують жодного Cdkn, що сприяє високій активності циклін/Cdk [33]. Справді, комплекс циклін D3/CDK6 в mESC є захищеним від дії p16, хоча механізм досі чітко не зрозумілий. Комбінований ефект високої активності комплексів циклінів E/A з CDK2, неактивного RB і відсутності Cdkn встановлює швидкий клітинний цикл, типовий для mESC [35].

Зі стартом диференціювання mESC комплекси циклін/Cdk починають проявляти осциляційну поведінку, вмикається контрольна точка RB і експресія Cdkn

(рис. 1). Ці зміни в сукупності забезпечують поступове збільшення тривалості G1 і всього клітинного циклу. Порядком, у якому регулятори клітинного циклу починають проявляти змінену експресію під час цього процесу, досі не з'ясований. Для збільшення тривалості G1 необхідна активація або Cdkn, або RB, оскільки обидва ці гальмівні регулятори послаблюють активність циклін/Cdk [35, 40, 41]. Коротка тривалість клітинного циклу плюрипотентних SC пояснюється різко скороченою фазою G1. Накопичені дані вказують на те, що тривалість G1 має вирішальне значення для рішення клітини про самовідновлення або диференціацію [33, 42]. Наприклад, подовження фази G1 у нервових стовбурових клітинах необхідне для їх диференціації в нейрони [43]. У шлуночковій зоні кори мишей, що розвивається, тривалість клітинного циклу збільшується з 8 до 18 годин. Таке різке збільшення довжини клітинного циклу є результатом швидкого розширення фази G1, яка подовжується з 3 до 13 годин [44]. Дослідження показують, що рішення щодо диференціювання клітин ініціюється у фазі G1. Доля SC залежала від того, коли був отриманий сигнал диференціації протягом клітинного циклу, а PSC найбільш сприйнятливий до сигналів диференціювання під час G1 [43].

Якщо сигнал для диференціювання отримано на початку G1, клітина диференціюється в напрямку мезоентодермальної лінії. Однак якщо сигнал надходить в кінці G1, клітина диференціюється в бік ектодермальної лінії [40, 45]. Інше дослідження продемонструвало, що mPSC і мишачі NSC з подовженою фазою G1 були більш схильні до асиметричного поділу в умовах диференціювання, тоді як клітини зі скороченою G1 ділились симетрично [43]. Ці знакові дослідження не тільки показали важливість клітинного циклу в прийнятті рішень щодо долі клітини, але й продемонстрували, що самі по собі зміни тривалості G1 можуть впливати на диференціацію.

## Потенційна роль WNT у регулюванні фази G1 PSC

Канонічний сигнальний шлях WNT/ $\beta$ -катеніну характеризується як основний драйвер росту та проліферації клітин [46]. Під час G1 передача сигналів WNT індукує перехід до S-фази шляхом активної транскрипції c-Myc, сприяючи проходженню через точку звороту. C-Myc посилює експресію цикліну D1 і пригнічує експресію інгібіторів CDK4 — p21 і p27. Циклін D1 зв'язується і активує CDK4, який фосфорилує та інактивує RB, сприяючи проходженню через чек-пойнт. Таким чином, WNT сприяє фазовому переходу G1/S. Однак, беручи до уваги відсутність або знижену експресію інгібіторів CDK в PSC, а також відмінності в активності CDK, здається малоймовірним, що WNT-опосередкований контроль клітинного циклу в PSC буде функціонувати так, як у соматичних клітинах [34].

На відміну від соматичних клітин активний сигналінг WNT в mESC, можливо, пригнічує проліферацію та перехід G1 до S. Ці результати здаються суперечливими, оскільки попередні дослідження продемонстрували, що сигналінг WNT необхідний для підтримки са-

мовідновлення та плюрипотентності. Було показано, що опосередкований WNT транскрипційний фактор TCF1 сприяє транскрипції ключових факторів плюрипотентності (OCT4, Nanog і SOX2). Крім того, TCF1 індукував експресію інгібіторів CDK (INK4) після застосування інгібітора GSK3 [47]. Білки INK4 специфічно інгібують CDK фази G1, включаючи CDK4. Ці дані свідчать про те, що активна передача сигналів Wnt інгібує фазовий перехід G1 в S в mESC, на відміну від соматичних клітин. Дійсно, активована передача сигналів Wnt збільшувала частку клітин у фазі G1 і зменшувала кількість клітин S-фази. Однак це не сприяло диференціації чи зменшенню експресії маркерів плюрипотентності [34].

Пере програмування соматичних клітин до стану плюрипотентності насправді є складним процесом, і цей процес не залежить від єдиного молекулярного шляху. Останні результати однозначно свідчать про те, що молекулярні шляхи для досягнення плюрипотентності можуть бути різноманітними, залежно від епігенетичного стану клітин-донорів та екзогенних факторів транскрипції [48].

Тому модуляція епігеномів шляхом хімічного втручання та запровадження різних комбінацій факторів транскрипції у різних типах клітин-донорів, а також у різних видів може ще більше покращити наше розуміння механізмів пере програмування.

Різні скринінги щодо збільшення та втрати функцій (gain- and loss-of-function screenings) призвели до відкриття специфічних генів та молекулярних шляхів, які гальмують або посилюють процес пере програмування [49, 50]. Наприклад, специфічні епігенетичні модифікації, включаючи метилювання ДНК, H3K9 та H3K79 та/або активність відповідних ферментів (наприклад, DNMT, HDAC, LSD1 та DOT1L), можуть виступати бар'єрами у процесі пере програмування. Тому примусове усунення цих епігенетичних бар'єрів шляхом генетичної інактивації або шляхом гальмування хімічними сполуками може посилити або покращити процес пере програмування [49, 50]. Навпаки, примусова експресія модуляторів хроматину, таких як Dppa2 (Developmental Pluripotency Associated 2) та Dppa4, може скинути епігеном соматичних клітин до плюрипотентної конфігурації, яка посилює ефективність і кінетику пере програмування. Крім того, інші фактори транскрипції, включаючи ESRRB, GLIS1, NR5A2, PRDM14, RARG, SALL4, TBX3, FOXA2, FOXF1, FOXH1, LHX1 (LIM homeobox 1), можуть суттєво посилити пере програмування при надекспресії разом з OCT4, SOX2, KFL4 та c-Myc [49–52].

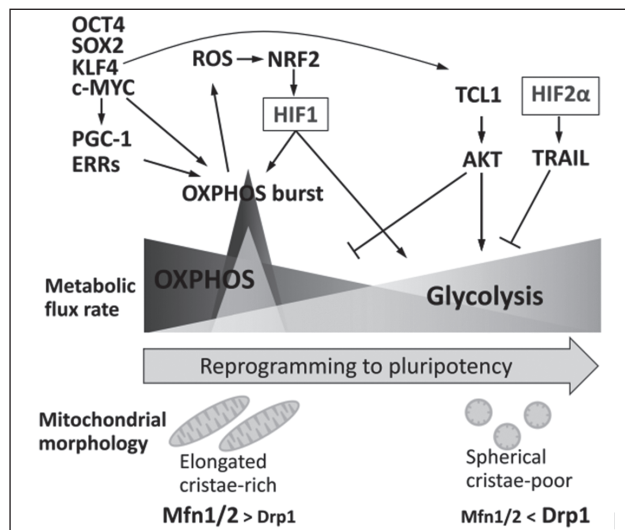
Хоча iPSC можуть бути застосовні для регенеративної медицини, моделювання захворювань та скринінгу ліків, деякі проблеми, пов'язані з використанням iPSC, такі як низька ефективність пере програмування та ризик канцерогенезу, все ще не розв'язані. Крім того, тонкі молекулярні механізми, які беруть участь у пере програмуванні соматичних клітин до стану плюрипотентності, ще не з'ясовані. Порівняно зі своїми соматичними аналогами плюрипотентні стовбурові клітини, включаючи ембріональні стовбу-

рові клітини та iPSC, демонструють високу швидкість гліколізу, подібну до аеробного гліколізу в ракових клітинах, — явище, відоме як ефект Варбурга, яке є важливим для підтримки властивостей стовбурових клітин (рис. 2). Цей унікальний гліколітичний метаболізм в iPSC може забезпечити енергію та стимулювати пентозофосфатний шлях, який є необхідним для швидкої проліферації клітин. Під час перепрограмування соматичні клітини зазнають метаболічного зсуву від окисного фосфорилування (ОФ) до гліколізу, викликаного тимчасовою надактивністю ОФ, що призводить до ініціації та прогресування перепрограмування до iPSC. Метаболічні проміжні продукти та мітохондрії також беруть участь в епігенетичній модифікації, необхідній для процесу перепрограмування iPSC. Серед ключових регуляторних молекул, які беруть участь у метаболічних зрушеннях, фактор, індукований гіпоксією (HIF1), контролює транскрипцію багатьох таргетних генів, ініціює метаболічні зміни на ранній стадії і підтримує гліколітичний метаболізм у пізній фазі перепрограмування [53].

## Роль іонів кальцію у функціонуванні стовбурових клітин

Недавні дослідження показали, що позаклітинний кальцій ( $\text{Ca}^{2+}$ ) сприяє проліферації SC, а отже, може брати участь у трансплантаційній терапії. Сигналінг  $\text{Ca}^{2+}$  є високоадаптивним внутрішньоклітинним сигналом, що включає кілька компонентів, таких як рецептори клітинної поверхні,  $\text{Ca}^{2+}$ -канали/насоси/обмінники,  $\text{Ca}^{2+}$ -буфери та  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсори, які разом необхідні для належного функціонування стовбурових клітин і таким чином модулюють їхню проліферативну та регенеративну здатність [54].

Кальцієві канали і сигналінг  $\text{Ca}^{2+}$  у стовбурових клітинах пов'язані з кількома компонентами. У типовому процесі передачі сигналів  $\text{Ca}^{2+}$  зміни у внутрішньоклітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$  ініціюють декілька протидіючих процесів, які можуть бути «увімкненими» або «вимкненими», залежно від того, зростає чи зменшується внутрішньоклітинна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$ . У фізіологічному стані або в стані спокою концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі підтримується в діапазоні від 100 до 300 нмоль/л, що сприяє «вимкненню» процесів. Однак при стимуляції клітини різними факторами, такими як гормональні та механічні сили, концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі збільшується до 50–100 мкмоль/л, що свідчить про «увімкнення» процесів. Зв'язування агоніста активує рецептор на клітинній мембрані, який генерує низхідні сигнали, активуючи каскад трансдукції сигналів фосфоліпази C (PLC)/IP3, який починається з відкриття внутрішньоклітинних рецепторів, рецепторів IP3 (IP3R) для транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму.  $\text{Ca}^{2+}$ , внутрішньоклітинний рівень якого зростає, зв'язується з різними цитоплазматичними білками, такими як кальмодулін, протеїнкіназа C (PKC), 4,5-бісфосфат (PIP2), кальциневрин та інші, що беруть участь у сигнальних шляхах  $\text{Ca}^{2+}$ . Клітини використовують два важливих джерела  $\text{Ca}^{2+}$  для генерації внутрішньоклітинних сигналів. Перший — це внутрішній резервуар, з якого ви-



**Рисунок 2. Метаболічний зсув і пов'язані з ним фактори під час перепрограмування до плюрипотентності. DRP1 — динамін-споріднений білок 1; ERR — ядерні рецептори, пов'язані з естрогенами; HIF — фактор, індукований гіпоксією; Mfn — мітофузин; NRF2 — nuclear factor erythroid 2-related factor 2; OXPHOS — окисне фосфорилування; PGC-1 — peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1; ROS — активні форми кисню; TRAIL — TNF-related apoptosis-inducing ligand (за Ishida et al., 2020)**

вільняється  $\text{Ca}^{2+}$ , а другий — зовнішні джерела, у тому числі надходження позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  в клітини через різні канали плазматичної мембрани [55, 56].

У стовбурових клітинах позаклітинне надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму опосередковується головним чином депо-керованими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels — SOCC), а не потенціал-керованими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами (voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels — VGCC) або  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінниками. Крім того, вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ER (ендоплазматичний ретикулум) опосередковується IP3R, а не RyR, і у зворотному напрямку  $\text{Ca}^{2+}$  переміщується за допомогою сарко-ER  $\text{Ca}^{2+}$  АТФ-ази, яка у плюрипотентних стовбурових клітинах миші знаходиться на мембранах ER [57]. У SC людини викид  $\text{Ca}^{2+}$  також опосередковується IP3R, а надходження  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматичну мембрану в основному опосередковується SOCC. Показано, що не VGCC, а саме депо-керований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  (store-operated calcium entry — SOCE) є провідним регулятором проліферації стовбурових клітин. Однак молекулярна ідентичність каналу SOCE досі не з'ясована. Клітини, активовані певними стимулами, використовують різні канали  $\text{Ca}^{2+}$ , такі як VGCC, SOCE через TRPC (transient receptor potential channel)/Orai, і пуринергічні рецептори, які необхідні для дифузії  $\text{Ca}^{2+}$ . Є дані щодо важливої ролі VGCC у розвитку тканин, наприклад у розвитку хряща, а інактивація або інгібування VGCC у стовбурових клітинах призводило до порушення хондрогенезу. Отже, VGCC можуть відігравати вирішальну роль у диференціації. Крім того, члени надродина каналів TRP беруть участь у хондрогенній диференціації MSC шляхом активації шляху SOX9 [54, 55].

SC експресують VGCC L-типу, а зниження експресії Cav1.1 пригнічує імунну реакцію [58]. Блокування VGCC дигідропіридинами пригнічує проліферацію імунних клітин, тому DHP, як і циклоспорин, часто використовуються при трансплантації. Показано також, що VGCC L-типу мезенхімальних SC, що походять зі шкіри, беруть участь в автокринній, опосередкованій IL-6, міграції клітин. Є дані, що 15 % недиференційованих стовбурових клітин кісткового мозку (BMSC) людини експресують функціональні VGCC L-типу. Більше того, блокада L-типу VGCC ніфедипіном пригнічує проліферацію BMSC шурів шляхом зниження експресії кісткового морфогенетичного білка (bone morphogenetic protein — BMP) 2, який є важливим індуктором диференціювання остеобластів. Крім того,  $Ca^{2+}$  також відіграє важливу роль у формуванні остеокластів. Остеокласти, що генеруються HSC, мають різні типи  $Ca^{2+}$ -каналів і рецепторів [59].

Показано, що мобілізація  $Ca^{2+}$  відіграє вирішальну роль у самовідновленні та проліферації стовбурових клітин шляхом активації або інгібування різних  $Ca^{2+}$ -каналів. Попередні дослідження клітинного циклу клітин-попередників і недиференційованих клітин показали, що тимчасові осциляції  $Ca^{2+}$ , підтримувані кальцієвими депо, збільшують рівні регуляторів клітинного циклу, таких як цикліни A і E, і мають вирішальне значення під час G1/S переходу. Канали IP3R і L-типу у диференційованих клітинах і ріанодин-чутливі депо в нейронних клітинах-попередниках підтримують зміни концентрації  $Ca^{2+}$ . Це свідчить про те, що осциляції  $Ca^{2+}$  беруть участь у прогресуванні клітинного циклу та проліферації. Крім того, проліферація mESC стимулюється епідермальним фактором росту через фосфорилування коннексину 43 (бере участь у надходженні  $Ca^{2+}$  і транслокації PKC) і активацію шляхів низхідних p44/42 і p38 мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK). Крім того, рецептори гамма-аміномасляної кислоти A можуть модулювати проліферацію mESC, регулюючи внутрішньоклітинний  $Ca^{2+}$ . Експансія ESC також регулюється такими лігандами, як ATP і лізофосфатидна кислота, які активують шлях PLC/PKC/IP3, ініціюючи вивільнення  $Ca^{2+}$  [54, 57].

Попередні дослідження показали, що SOCC важливі для надходження  $Ca^{2+}$  в mESC. Блокатори SOCC гальмують проліферацію mESC, що свідчить про важливість SOCE для проліферації ESC. Аналогічно застосування інгібіторів SOCE зменшує експансію HSC кісткового мозку мишей, кісткового мозку людини та мононуклеарних клітин пуповинної крові [60]. Більше того, інгібітори знижують експресію маркерів плюрипотентності (SOX2, KLF4 і Nanog). Це свідчить, що SOCE пов'язаний із здатністю mESC до самовідновлення. Показано також, що позаклітинний  $Ca^{2+}$  сприяє проліферації та міграції MSC [61].

## Участь $Ca^{2+}$ у диференціації SC

Стовбурові клітини можуть генерувати будь-які тканинні клітини шляхом модулювання процесу диференціювання. Попередні дослідження показали, що  $Ca^{2+}$  безпосередньо стимулює каталітичну активність

протеїн-аргінін-метилтрансферази-1 і посилює метилювання, яке сприяє диференціюванню еритроїдів [62].  $Ca^{2+}$  провокує сигнальний каскад у мезенхімальних стромальних клітинах кісткового мозку людини та сприяє остеогенній диференціації MSC. Крім того, фізичні стимули активують канали  $Ca^{2+}$ , що призводить до підвищення його внутрішньоклітинної концентрації і далі до хондрогенного диференціювання MSC [55]. Калієві канали, активовані  $Ca^{2+}$ , також відіграють важливу роль у диференціації MSC [63]. Аналогічно  $Na^+$ / $Ca^{2+}$ -обмінник в mESCs має вирішальне значення під час диференціювання ESC у кардіоміоцити. L-VGCC беруть участь у підтримці внутрішньоклітинного гомеостазу  $Ca^{2+}$  в диференційованих клітинах.  $Ca^{2+}$  також відіграє значну роль у процесі диференціювання нейронів [54].

Ці дослідження свідчать про вирішальну роль  $Ca^{2+}$ -сигналіngu і  $Ca^{2+}$ -каналів у клітинній диференціації.

## Адгезія, міграція та хомінг

Цитозольний  $Ca^{2+}$ , як вторинний месенджер, регулює різні клітинні функції, включаючи міграцію клітин. Темпоральний цитозольний  $Ca^{2+}$  опосередковується такими рецепторами, як пов'язані з G-білком рецептори P2Y і P2X, пов'язані з ліганд-керованими іонними каналами. Рецептори P2X опосередковують позаклітинне надходження  $Ca^{2+}$ , тоді як рецептори P2Y ініціюють вивільнення внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  з ER і знижують рівень  $Ca^{2+}$  в ER, що активує SOCE. Ці рецептори виконують важливу роль у процесі міграції через ATP-залежну регуляцію [64]. MSC знаходяться в сполучній тканині, яка оточує інші тканини та органи. Під час травми та пошкодження SC мігрують до пошкоджених тканин, диференціюються в необхідні типи клітин і відіграють вирішальну роль у відновленні, морфогенезі та гомеостазі нормальної тканини. Процес хомінгу розпочинається із взаємодії між SC та ендотелієм судин у тканинах-мішенях. Міграція адгезивних SC, складний і висококоординований процес, має декілька етапів (поляризація, випинання, формування адгезії та втягування) і керується різними білками, такими як інтегрин, тензин, паксилін, актин та міозин. Ці білки контролюються кількома сигнальними молекулами, такими як Rho GTPаза, Rho-кіназа, кіназа фокальної адгезії (FAK), c-Jun N-термінальна кіназа (JNK), PKC та ERK [64]. Також показано, що вплив електромагнітних полів збільшує рівень внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , який, у свою чергу, ініціює сигналінг, пов'язаний з міграційними процесами (FAK/Rho GTPаза). Посилення міграції MSC до пошкоджених тканин або при захворюваннях може бути новим способом підвищення ефективності застосування SC у клініці [54].

## Старіння SC

Було показано, що підтримка рівня  $Ca^{2+}$  в цитозолі була важливою для модуляції функції стовбурових клітин у старіючих SC. Збільшення позаклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  індукуює зміни у морфології стовбурових

клітин, які набувають форму веретена, та підтримує експресію поверхневих маркерів стовбурових клітин у старих SC, отриманих з кісткового мозку. Аналогічно виживання SC і проліферація старих MSC залежали від рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі. Надходження  $\text{Ca}^{2+}$  посилювало прогресування клітинного циклу, а потенціал SC зростав у клітинах, інкубованих з більш високим вмістом зовнішнього  $\text{Ca}^{2+}$ . Більше того, блокування надходження  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою інгібітора TRPC (transient receptor potential canonical channels) — SKF 96365 знижувало виживання SC та їх проліферацію, але додавання інгібітора IP3R — 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate) істотно не впливало на проліферацію клітин, а лише модулювало їхню життєздатність. Оцінка каналів входу  $\text{Ca}^{2+}$  показала, що TRPC1/ORAI1/ORAI3 та їх регулятор STIM1 (Stromal interaction molecule 1) мають важливе значення для проліферації та життєздатності SC, оскільки мовчання генів ORAI1/ORAI3/TRPC1/STIM1 значно пригнічує виживаність стовбурових клітин. MSC, виділені від старих мишей, інкубовані з вищими рівнями  $\text{Ca}^{2+}$ , змогли відновити спричинену віком втрату функції. Разом ці результати свідчать про те, що надходження  $\text{Ca}^{2+}$  має важливе значення для запобігання втраті функції старих SC, а додавання  $\text{Ca}^{2+}$  не тільки відновлює їх проліферативний потенціал, але й дозволяє їм розвиватися в молоді лінії стовбурових клітин, які можуть мати важливе значення для регенеративної медицини [65, 66].

## Висновки

Диференціація стовбурових клітин (SC) потребує низки перебудов хроматину для встановлення клітинної ідентичності. Посттрансляційні модифікації гістонів регулюють динаміку гетерохроматину, сприяють регуляції стану хроматину та транскрипційній активності і відіграють важливу роль у дозріванні клітин острівців підшлункової залози, встановленні схеми секреції, яка стимулює регуляцію секреції інсуліну.

Плюрипотентні SC характеризуються високою швидкістю проліферації, зумовленою модифікованим клітинним циклом, який дозволяє клітинам швидко переходити від синтезу ДНК до поділу клітини.

Порівняно зі своїми соматичними аналогами плюрипотентні SC демонструють високу швидкість гліколізу, подібну до аеробного гліколізу в ракових клітинах, що є важливим для підтримки властивостей SC.

У стовбурових клітинах позаклітинне надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму опосередковується головним чином депо-керованими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами. Показано, що позаклітинний кальцій сприяє проліферації SC, а отже, може брати участь в трансплантаційній терапії.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

**Внесок авторів у роботу над статтею.** Тронько М.Д. — ідея роботи й консультація під час редагування статті; Пушкаръов В.М., Ковзун О.І., Соколова Л.К., Пушкаръов В.В. — аналіз літературних джерел, написання тексту, підготовка до друку.

**Фінансування.** Стаття підготовлена в рамках бюджетного фінансування НАМН України за планом науково-дослідних робіт ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України».

## References

1. Krentz NAJ, Gloyn AL. Insights into pancreatic islet cell dysfunction from type 2 diabetes mellitus genetics. *Nat Rev Endocrinol.* 2020 Apr;16(4):202-212. doi: 10.1038/s41574-020-0325-0.
2. Kampmann M. CRISPR-based functional genomics for neurological disease. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(9):465-80. doi: 10.1038/s41582-020-0373-z.
3. Astro V, Adamo A. Epigenetic Control of Endocrine Pancreas Differentiation in vitro: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:141. doi: 10.3389/fcell.2018.00141.
4. Nicetto D, Donahue G, Jain T, et al. H3K9me3-heterochromatin loss at protein-coding genes enables developmental lineage specification. *Science.* 2019;363(6424):294-7. doi: 10.1126/science.aau0583.
5. Thienpont B, Aronsen JM, Robinson EL, et al. The H3K9 dimethyltransferases EHMT1/2 protect against pathological cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 2017;127(1):335-48. doi: 10.1172/JCI88353.
6. Strom AR, Emelyanov AV, Mir M, Fyodorov DV, Darzacq X, Karpen GH. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature.* 2017 Jul 13;547(7662):241-245. doi: 10.1038/nature22989.
7. Ninova M, Fejes Tóth K, Aravin AA. The control of gene expression and cell identity by H3K9 trimethylation. *Development.* 2019;146(19):dev181180. doi: 10.1242/dev.181180.
8. Lu TT, Heyne S, Dror E, Casas E, Leonhardt L, Boenke T, et al. The Polycomb-Dependent Epigenome Controls  $\beta$  Cell Dysfunction, Dedifferentiation, and Diabetes. *Cell Metab.* 2018;27(6):1294-308.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2018.04.013.
9. Lee DH, Kim GW, Jeon YH, Yoo J, Lee SW, Kwon SH. Advances in histone demethylase KDM4 as cancer therapeutic targets. *FASEB J.* 2020;34(3):3461-84. doi: 10.1096/fj.201902584R.
10. Rosales W, Lizcano F. The Histone Demethylase JM-JD2A Modulates the Induction of Hypertrophy Markers in iP-SC-Derived Cardiomyocytes. *Front Genet.* 2018;9:14. doi: 10.3389/fgene.2018.00014.
11. Arroyave F, Montañó D, Lizcano F. Diabetes Mellitus Is a Chronic Disease that Can Benefit from Therapy with Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8685. doi: 10.3390/ijms21228685.
12. Zhang T, Huang K, Zhu Y, et al. Vitamin C-dependent lysine demethylase 6 (KDM6)-mediated demethylation promotes a chromatin state that supports the endothelial-to-hematopoietic transition. *J Biol Chem.* 2019;294(37):13657-13670. doi: 10.1074/jbc.RA119.009757.
13. Coskun E, Ercin M, Gezginci-Oktayoglu S. The Role of Epigenetic Regulation and Pluripotency-Related MicroRNAs in Differentiation of Pancreatic Stem Cells to Beta Cells. *J Cell Biochem.* 2018;119(1):455-467. doi: 10.1002/jcb.26203.
14. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
15. Liu X, Ouyang JF, Rossello FJ, et al. Reprogramming roadmap reveals route to human induced trophoblast stem cells. *Nature.*



- 2020 Oct;586(7827):101–107. doi: 10.1038/s41586-020-2734-6.
16. Wang Y, Bi Y, Gao S. Epigenetic regulation of somatic cell reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2017;46:156–163. doi: 10.1016/j.gde.2017.07.002.
  17. Di Stefano M, Stadhouders R, Farabella I, et al. Transcriptional activation during cell reprogramming correlates with the formation of 3D open chromatin hubs. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2564. doi: 10.1038/s41467-020-16396-1.
  18. Lu L, Liu X, Huang WK, et al. Robust Hi-C Maps of Enhancer-Promoter Interactions Reveal the Function of Non-coding Genome in Neural Development and Diseases. *Mol Cell.* 2020 Aug 6;79(3):521–534.e15. doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.007.
  19. Stadhouders R, Vidal E, Serra F, et al. Transcription factors orchestrate dynamic interplay between genome topology and gene regulation during cell reprogramming. *Nat Genet.* 2018 Feb;50(2):238–249. doi: 10.1038/s41588-017-0030-7.
  20. Li D, Liu J, Yang X, et al. Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2017 Dec 7;21(6):819–833.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.10.012.
  21. Sun L, Fu X, Ma G, Hutchins AP. Chromatin and Epigenetic Rearrangements in Embryonic Stem Cell Fate Transitions. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Feb 18;9:637309. doi: 10.3389/fcell.2021.637309.
  22. Chen J, Guo L, Zhang L, et al. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1504–9. doi: 10.1038/ng.2807.
  23. Arabacı DH, Terzioğlu G, Bayırbaşı B, Önder TT. Going up the hill: chromatin-based barriers to epigenetic reprogramming. *FEBS J.* 2021 Aug;288(16):4798–4811. doi: 10.1111/febs.15628.
  24. Chen J, Liu H, Liu J, et al. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet.* 2013 Jan;45(1):34–42. doi: 10.1038/ng.2491.
  25. Miles DC, de Vries NA, Gisler S, et al. TRIM28 is an Epigenetic Barrier to Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Stem Cells.* 2017 Jan;35(1):147–157. doi: 10.1002/stem.2453.
  26. Klimczak M, Czerwińska P, Mazurek S, et al. TRIM28 epigenetic corepressor is indispensable for stable induced pluripotent stem cell formation. *Stem Cell Res.* 2017 Aug;23:163–172. doi: 10.1016/j.scr.2017.07.012.
  27. Chronis C, Fiziev P, Papp B, et al. Cooperative Binding of Transcription Factors Orchestrates Reprogramming. *Cell.* 2017 Jan 26;168(3):442–459.e20. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.016.
  28. Zhuang Q, Li W, Benda C, et al. NCoR/SMRT co-repressors cooperate with c-MYC to create an epigenetic barrier to somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol.* 2018 Apr;20(4):400–412. doi: 10.1038/s41556-018-0047-x.
  29. Huang Y, Zhang H, Wang L, et al. JMJD3 acts in tandem with KLF4 to facilitate reprogramming to pluripotency. *Nat Commun.* 2020 Oct 8;11(1):5061. doi: 10.1038/s41467-020-18900-z.
  30. Rao RA, Dhele N, Cheemadan S, et al. Ezh2 mediated H3K27me3 activity facilitates somatic transition during human pluripotent reprogramming. *Sci Rep.* 2015 Feb 4;5:8229. doi: 10.1038/srep08229.
  31. Li H, Lai P, Jia J, et al. RNA Helicase DDX5 Inhibits Reprogramming to Pluripotency by miRNA-Based Repression of RYBP and its PRC1-Dependent and -Independent Functions. *Cell Stem Cell.* 2017 Apr 6;20(4):462–477.e6. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.002.
  32. Sun ZY, Yu TY, Jiang FX, Wang W. Functional maturation of immature  $\beta$  cells: A roadblock for stem cell therapy for type 1 diabetes. *World J Stem Cells.* 2021 Mar 26;13(3):193–207. doi: 10.4252/wjsc.v13.i3.193.
  33. Boward B, Wu T, Dalton S. Concise Review: Control of Cell Fate through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells.* 2016;34(6):1427–36. doi: 10.1002/stem.2345.
  34. Rasmussen ML, Ortolano NA, Romero-Morales AI, Gama V. Wnt Signaling and Its Impact on Mitochondrial and Cell Cycle Dynamics in Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel).* 2018;9(2):109. doi: 10.3390/genes9020109.
  35. Zaveri L, Dhawan J. Cycling to Meet Fate: Connecting Pluripotency to the Cell Cycle. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:57. doi: 10.3389/fcell.2018.00057.
  36. Kolupaeva V, Janssens V. PP1 and PP2A phosphatases-cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. *FEBS J.* 2013;280(2):627–43. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08511.x.
  37. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(8):518–28. doi: 10.1038/nrm3629.
  38. Soufi A, Dalton S. Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development.* 2016;143(23):4301–4311. doi: 10.1242/dev.142075.
  39. Ter Huurne M, Chappell J, Dalton S, Stunnenberg HG. Distinct Cell-Cycle Control in Two Different States of Mouse Pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2017;21(4):449–55.e4. doi: 10.1016/j.stem.2017.09.004.
  40. Pauklin S, Vallier L. The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell.* 2013;155(1):135–47. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.031. Erratum in: *Cell.* 2014;156(6):1338.
  41. Pauklin S, Madrigal P, Bertero A, Vallier L. Initiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by Cyclin D. *Genes Dev.* 2016;30(4):421–433. doi: 10.1101/gad.271452.115.
  42. Liu L, Michowski W, Inuzuka H, et al. G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2017;19(3):177–188. doi: 10.1038/ncb3474.
  43. Roccio M, Schmitter D, Knobloch M, Okawa Y, Sage D, Lutolf MP. Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development.* 2013;140(2):459–470. doi: 10.1242/dev.086215.
  44. Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(11):E1045–54. doi: 10.1073/pnas.1219563110.
  45. Pauklin S, Vallier L. The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell.* 2013;155(1):135–47. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.031.
  46. Davidson G. The cell cycle and Wnt. *Cell Cycle.* 2010 May;9(9):1667–8. doi: 10.4161/cc.9.9.11595.
  47. De Jaime-Soguero A, Aulicino F, Ertaylan G, et al. Wnt/Tcf1 pathway restricts embryonic stem cell cycle through activation of the Ink4/Arf locus. *PLoS Genet.* 2017;13(3):e1006682. doi: 10.1371/journal.pgen.1006682.
  48. Kim KP, Han DW, Kim J, Schöler HR. Biological importance of OCT transcription factors in reprogramming and development. *Exp Mol Med.* 2021;53(6):1018–1028. doi: 10.1038/s12276-021-00637-4.
  49. Ebrahimi A, Sevinç K, Gürhan Sevinç G, et al. Bromo-

domain inhibition of the coactivators CBP/EP300 facilitate cellular reprogramming. *Nat Chem Biol.* 2019 May;15(5):519-528. doi: 10.1038/s41589-019-0264-z.

50. Kim KP, Choi J, Yoon J, et al. Permissive epigenomes endow reprogramming competence to transcriptional regulators. *Nat Chem Biol.* 2021 Jan;17(1):47-56. doi: 10.1038/s41589-020-0618-6.

51. Kim KP, Wu Y, Yoon J, et al. Reprogramming competence of OCT factors is determined by transactivation domains. *Sci Adv.* 2020;6(36):eaaz7364. doi: 10.1126/sciadv.aaz7364.

52. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat Commun.* 2014;5:3678. doi: 10.1038/ncomms4678.

53. Ishida T, Nakao S, Ueyama T, Harada Y, Kawamura T. Metabolic remodeling during somatic cell reprogramming to induced pluripotent stem cells: involvement of hypoxia-inducible factor 1. *Inflamm Regen.* 2020 May 12;40:8. doi: 10.1186/s41232-020-00117-8.

54. Ahamad N, Singh BB. Calcium channels and their role in regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2021;13(4):260-280. doi: 10.4252/wjsc.v13.i4.260.

55. Uzieliene I, Bernotas P, Mobasher A, Bernotiene E. The Role of Physical Stimuli on Calcium Channels in Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 1;19(10):2998. doi: 10.3390/ijms19102998.

56. Uzieliene I, Bernotas P, Mobasher A, Bernotiene E. The Role of Physical Stimuli on Calcium Channels in Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):2998. doi: 10.3390/ijms19102998.

57. Hao B, Webb SE, Miller AL, Yue J. The role of Ca(2+) signaling on the self-renewal and neural differentiation of embryonic stem cells (ESCs). *Cell Calcium.* 2016;59(2-3):67-74. doi: 10.1016/j.ceca.2016.01.004.

58. Davenport B, Li Y, Heizer JW, Schmitz C, Perraud AL. Signature Channels of Excitability no More: L-Type Channels in Immune Cells. *Front Immunol.* 2015;6:375. doi: 10.3389/fimmu.2015.00375.

59. Tan YZ, Fei DD, He XN, et al. L-type voltage-gated calcium channels in stem cells and tissue engineering. *Cell Prolif.* 2019;52(4):e12623. doi: 10.1111/cpr.12623.

60. Uslu M, Albayrak E, Kocabaş F. Temporal modulation of calcium sensing in hematopoietic stem cells is crucial for proper stem

cell expansion and engraftment. *J Cell Physiol.* 2020;235(12):9644-9666. doi: 10.1002/jcp.29777.

61. Lee MN, Hwang HS, Oh SH, et al. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med.* 2018;50(11):1-16. doi: 10.1038/s12276-018-0170-6.

62. Liu MY, Hua WK, Chiou YY, et al. Calcium-dependent methylation by PRMT1 promotes erythroid differentiation through the p38α MAPK pathway. *FEBS Lett.* 2020;594(2):301-316. doi: 10.1002/1873-3468.13614.

63. Pchelintseva E, Djamgoz MBA. Mesenchymal stem cell differentiation: Control by calcium-activated potassium channels. *J Cell Physiol.* 2018;233(5):3755-3768. doi: 10.1002/jcp.26120.

64. Jiang LH, Mousawi F, Yang X, Roger S. ATP-induced Ca2+-signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(20):3697-3710. doi: 10.1007/s00018-017-2545-6.

65. Ahamad N, Sun Y, Nascimento Da Conceicao V, et al. Differential activation of Ca2+ influx channels modulate stem cell potency, their proliferation/viability and tissue regeneration. *NPJ Regen Med.* 2021;6(1):67. doi: 10.1038/s41536-021-00180-w.

66. Ahamad N, Sun Y, Singh BB. Increasing cytosolic Ca2+ levels restore cell proliferation and stem cell potency in aged MSCs. *Stem Cell Res.* 2021;56:102560. doi: 10.1016/j.scr.2021.102560.

67. Jirawatnotai S, Dalton S, Wattanapanitch M. Role of cyclins and cyclin-dependent kinases in pluripotent stem cells and their potential as a therapeutic target. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;107:63-71. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.05.001.

Отримано/Received 05.02.2022

Рецензовано/Revised 04.04.2022

Прийнято до друку/Accepted 02.05.2022 ■

#### Information about authors

Tronko Mykola, Dr. Sci. (Medicine), Prof., Cor. Member of the NAN of Ukraine, Acad. of the NAMS of Ukraine, Head of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, Director of the Institute, State Institution "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-7421-0981>

Pushkarev Volodymyr, Dr. Sci. (Biology), Senior Scientist, Chief Research Fellow of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, State Institution "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0003-0347-7771>

Kovzun Olena, Dr. Sci. (Biology), Prof., Cor. Member of the NAMS of Ukraine, Deputy Director of the Institute for Scientific Affairs, State Institution "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-8164-7671>

Sokolova Lyubov, Dr. Sci. (Medicine), Senior Research Fellow, Head of Diabetology Department, State Institution "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0003-0011-0106>

Pushkarev Viktor, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, State Institution "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-5940-5510>.

**Conflicts of interests.** Authors declare the absence of any conflicts of interests and own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of the manuscript.

**Personal contribution.** Tronko M.D. — idea of work and consultations when editing an article; Pushkarev V.M., Kovzun O.I., Sokolova L.K., Pushkarev V.V. — analysis of literary sources and text writing, preparation for publishing.

**Information about funding.** The article was prepared within the framework of budgetary funding of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine according to the plan of research work of the State Institution "V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine".

M.D. Tronko, V.M. Pushkarev, E.I. Kovzun, L.K. Sokolova, V.V. Pushkarev  
V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

### Epigenetics, cell cycle and stem cell metabolism. Formation of insulin-producing cells

**Abstract.** Stem cell (SC) differentiation requires a series of chromatin rearrangements to establish cell identity. Posttranslational modifications of histones usually regulate the dynamics of heterochromatin. Histones are subjected to various modifications, such as acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitination, and thus contribute to regulation of chromatin status and transcriptional activity. The chemically stable pattern of methylated histones promotes cellular memory relative to external stimuli, maintaining transcription levels of adaptive genes even after elimination of environmental signals. Chromatin modifications play an important role in the maturation of pancreatic islet cells, the establishment of a secretion pattern that stimulates the regulation of insulin secretion. MicroRNAs, a class of endogenous small noncoding RNAs in eukaryotes, are important regulators of gene expression at the level of posttranscriptional mechanisms. MicroRNAs regulate insulin secretion, pancreatic development, and  $\beta$ -cell differentiation. Pluripotent SCs are charac-

terized by a high rate of proliferation, the ability to self-repair and the potential for differentiation in different cell types. This rapid proliferation is due to a modified cell cycle that allows cells to rapidly transition from DNA synthesis to cell division by reducing the time of gap (G1 and G2) phases. The canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway is characterized as a major driver of cell growth and proliferation. At G1, WNT signaling induces a transition to the S-phase. Compared to their somatic counterparts, pluripotent SCs exhibit a high rate of glycolysis similar to aerobic glycolysis in cancer cells, a phenomenon known as the Warburg effect, which is important for maintaining SC properties. In stem cells, the extracellular influx of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cytoplasm is mediated mainly by depot-controlled  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Extracellular calcium has been shown to promote SC proliferation and thus may be involved in transplant therapy.

**Keywords:** stem cells; epigenetic modifications; cell cycle; metabolism; calcium ions; insulin-producing cells