

УДК 577.21:576.364:615-085:576.367

Молекулярные механизмы индуцированной плюрипотентности

И. А. Мучкаева*, Э. Б. Дашинимаев, В. В. Терских, Ю. В. Суханов, А. В. Васильев
 Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26
 *E-mail: izomerizaciya@list.ru
 Поступила в редакцию 02.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Обзор посвящен исследованиям в области репрограммирования соматических клеток. Рассмотрены молекулярные механизмы получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) с использованием лентивирусной трансфекции для введения в клетки транскрипционных факторов. Большое внимание уделено получению иПСК без генетических модификаций генома с помощью мРНК транскрипционных факторов и малых молекул. Обсуждается прямое репрограммирование соматических клеток, минуя стадию индукции плюрипотентности. Рассмотрены различия между эмбриональными стволовыми клетками и иПСК и проблема эпигенетической памяти. В заключении обсуждается возможность применения иПСК в регенеративной медицине.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА репрограммирование, эмбриональные стволовые клетки; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка, трансформация, плюрипотентность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; Chd1 (chromodomain helicase DNA binding protein) – ДНК-связывающий белок с геликазным хромодоменом; BAF (rg/Brahma-associated factor) – фактор транскрипции, ассоциированный с rg-Brahma; миРНК, miR – микроРНК; TERRA (telomeric-repeat-containing RNA) – РНК, содержащая теломерные повторы; Cdkn (cyclin-dependent kinase inhibitor) – ингибитор циклин-зависимых протеинкиназ; VPA – вальпроевая кислота, 2-пропилвалериановая кислота; siRNA (small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК; KMOS – набор факторов транскрипции Klf4, c-Мус, Oct4, Sox2; KOS – набор факторов транскрипции Klf4, Oct4, Sox2; LNOS – набор факторов транскрипции – Lin28, Nanog, Oct4, Sox2; GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) – киназа 3 гликогенсинтазы; АФК – активные формы кислорода; VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста сосудистого эндотелия.

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки способны к самообновлению и к генерации всех клеточных типов трех зародышевых листков. До недавнего времени источником плюрипотентных стволовых клеток служили культуры, полученные из клеток внутренней массы бластоцисты: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) [1, 2]. Однако сам метод получения ЭСК был связан со многими практическими и этическими проблемами, которые исключали возможность клинического применения ЭСК. В связи с этим мировое научное сообщество продолжало заниматься активным поиском приемлемого метода получения клеток, подобных ЭСК по характеристикам. Определенные успехи были достигнуты в 1997 г., когда Wilmut и соавт. репрограммировали соматические клетки молочной железы, посредством переноса их ядер в ооциты второго деления мейоза (somatic cell nuclear transfer, SCNT) овцы [3–6]. В 2001 г. Tada и соавт. достигли подобного результата путем слияния тимоцитов мыши с ЭСК [7]. Однако техническую сложность и низкую

воспроизводимость этих методов устранить не удалось. Все попытки применения данных методик для клеток приматов оказались тщетными.

Основываясь на накопленных данных, исследователи Takahashi и Yamanaka в 2006 г. предположили, что неоплодотворенная яйцеклетка и ЭСК содержат факторы, определяющие плюрипотентность [8]. В своих работах, выполненных на фибробластах мыши [8], а затем и на клетках человека [9], они описали способ введения генов, играющих большую роль в раннем развитии, при помощи лентивирусных конструкций. Удалось показать, что эктопическая экспрессия генов всего четырех транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус (позже названных «каноническим» набором генов KMOS, или «коктейлем Яманаки») достаточна для репрограммирования фибробластов до плюрипотентного состояния. Полученные таким образом клетки были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК, induced pluripotent stem cells), а явление репрограммирования до плюрипотентного состояния –

индуцированной плюрипотентностью. иПСК сходны с ЭСК по многим характеристикам, включая профили экспрессии генов, морфологию, теломеразную активность, характер метилирования ДНК и модификации гистонов. Кроме того, иПСК способны генерировать клетки тканей трех зародышевых листков *in vitro*, они формируют зрелые тератомы после инъекции мышам с иммунодефицитом. На основе иПСК удалось получить химерных животных, среди потомков которых были и полученные из репрограммированных клеток [10, 11]. К сегодняшнему дню опубликовано большое количество работ, в которых сообщается о получении иПСК человека при помощи различных методов [12]. Для потенциального клинического применения разработаны способы репрограммирования клеток, более эффективные и безопасные, чем трансфекция вирусных векторов [13]. Получены иПСК от пациентов с различными наследственными заболеваниями [13, 14]. Существуют две обширные области исследований, связанных с репрограммированием клеток: фундаментальные исследования клеточной пластичности, генетических механизмов, лежащих в основе раннего развития организма и неоплазий; и технологии репрограммирования соматических клеток с целью проведения заместительной клеточной терапии [15]. Клеточные технологии с использованием иПСК способны предоставлять пациент-специфические линии клеток, в том числе от носителей наследственных заболеваний. Такие линии можно использовать при моделировании различных заболеваний и испытании новых лекарственных средств.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ИНДУКЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Ауторегуляторная петля. Баланс между Klf4, с-Мус. Влияние локуса *Ink4/Arf*

В настоящее время имеется много данных в пользу того, что плюрипотентность регулируется тремя транскрипционными факторами – Oct4, Sox2 и Nanog [16]. Показано [17, 18], что факторы Oct4, Sox2 и Nanog совместно активируют промоторы и собственных генов, и генов друг друга, образуя тем самым ауторегуляторную петлю. Существуют данные, указывающие на то, что ауторегуляторная петля усиливает стабильность экспрессии генов плюрипотентности [19, 20]. Рассматриваемые три фактора способны также запускать и регулировать каскады генов (до нескольких сотен) как транскрипционно активных, так и неактивных. Экспрессия генов *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* является основой транскрипционной сети, которая обеспечивает плюрипотентность ЭСК, усиливая транскрипцию генов плюрипотентности и,

в то же время, подавляя активность генов, связанных с дифференцировкой и развитием [21–23].

В своих пионерских работах Takahashi и Yamanaka, начав с анализа 24 генов, в конечном итоге выяснили, что для перехода клеток в плюрипотентное состояние достаточно четырех генов – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Если первые два относятся к мастер-генам плюрипотентности, то выбор последних двух генов обусловлен иными причинами. Транскрипционный фактор с-Мус, как известно, увеличивает темпы пролиферации [24], что критически важно для успешного репрограммирования [25]. Вместе с тем гиперэкспрессия этого гена сказывается на повышении уровня белка p53. В некоторых работах показано, что экспрессия *Klf4*, с одной стороны, вызывает повышение уровня белка p21 (ингибитора циклин-зависимых киназ) [23], что приводит к угнетению пролиферации, а с другой стороны, понижает уровень p53 в клетке, что положительно сказывается на уменьшении риска апоптоза [26]. Таким образом, можно предположить, что с-Мус и *Klf4* действуют разнонаправленно и взаимно дополняют друг друга. Следовательно, для успеха репрограммирования важен баланс экспрессии этих двух генов [27].

Одной из важных характеристик плюрипотентных стволовых клеток является ингибирование локуса *Ink4/Arf*, который содержит гены *Cdkn2a* и *Cdkn2b*, кодирующие три сильных опухолевых супрессора – p16 (*Ink4a*), p19 (*Arf*), p15 (*Ink4b*). В клетках мыши именно ген *Arf* активирует p53 и p21, в то время как в клетках человека эти функции в основном берет на себя ген *Ink4a*. Показано [28], что в иПСК, как и в ЭСК, локус *Ink4/Arf* полностью подавлен при помощи эпигенетических меток домена «бивалента» (появление репрессирующих H3K27me3 модификаций гистонов), однако он может вновь активироваться при дифференцировке клеток. Oct4, Sox2, Klf4 совместно подавляют данный локус, что способствует усиленной генерации иПСК, увеличивая как кинетику репрограммирования, так и количество колоний иПСК. Также стоит отметить, что некоторые исследователи напрямую связывают активацию локуса *Ink4/Arf* с общим старением организма. Следовательно, сложнее репрограммировать клетки от пожилого донора, нежели от молодого. Подавление локуса *Ink4/Arf* в этом случае может значительно увеличить эффективность и скорость репрограммирования [25].

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в плюрипотентных стволовых клетках

ЭСК обладают несколькими эпигенетическими характеристиками, которые отличают их от дифференцированных клеток. Например, ключевые гены плю-

рипотентности *Oct4* и *Nanog* деметилированы в ЭСК и могут активно транскрибироваться, в то время как дифференцировка приводит к подавлению этих генов посредством метилирования ДНК *de novo*. Интересно, что метки метилирования удаляются в течение процесса репрограммирования. Это позволяет реактивировать эндогенную транскрипцию этих генов [29].

Помимо метилирования ДНК, ЭСК и дифференцированные клетки различаются также паттернами модификации гистонов. Например, подавление генов, ответственных за развитие и дифференцировку ЭСК, регулируется при помощи сочетаний активирующей (H3K4me3) и репрессирующей (H3K27me3) модификаций гистонов. Регуляция транскрипции осуществляется при помощи белков группы Polycomb, которые подавляют экспрессию генов в результате связывания с гистонами, содержащими H3K27me3. Такой механизм рассматривается как инструмент транскрипционной гибкости ЭСК, обусловленной стабильной репрессией генов, связанных с развитием, без необратимой их инактивации. Принимая во внимание, что «бивалентные» домены имеются практически только в ЭСК и являются важной характеристикой плюрипотентного статуса, можно предположить, что восстановление «бивалентных» доменов представляет собой ключевой этап и в репрограммировании соматических клеток и iPSC. В ряде работ показано, что хроматин полностью репрограммированных iPSC содержит бивалентные гистоны, идентичные гистонам в ЭСК [10, 30].

На сегодняшний день нет ни одной работы, которая раскрывала бы полную картину взаимосвязи транскрипционных факторов, модификаций хроматина и каскадов генов плюрипотентности в процессе репрограммирования клеток. Тем не менее опубликовано много данных, посвященных анализу экспрессии транскрипционных факторов в ЭСК человека и мыши [31], а также в iPSC [32], которые могут быть основой для построения модели репрограммирования. Исходя из имеющихся данных, можно полагать, что *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* составляют центральное звено процесса репрограммирования, во время которого происходит восстановление нуклеосом, сборка деацетилаз, активация белков Polycomb и ремоделирование хроматина. В работах по слиянию ЭСК и лимфоцитов Pereira и соавт. в 2010 г. показали, что компоненты комплекса Polycomb играют важную функциональную роль в эпигенетическом ремоделировании. Дефектные по белкам группы Polycomb ЭСК утрачивали способность ремоделировать геном соматических клеток [33].

Механизм, лежащий в основе подавления экспрессии генов дифференцировки в плюрипотентных клетках, включает связывание факторов плюрипо-

тентности (одного или нескольких) с промоторами целевых генов [34]. Связыванию факторов репрограммирования с их генами-мишенями могут способствовать комплексы, ремоделирующие нуклеосомы, такие, как Chd1 (chromodomain helicase DNA binding protein 1) [35] и VAF (rg/Brahma-associated factors – АТР-зависимый комплекс, перестраивающий структуру хроматина) [36]. Эти комплексы усиливают эффективность и кинетику репрограммирования. Вероятно, их регуляторная роль заключается в реактивации и поддержании экспрессии эндогенных генов плюрипотентности в отсутствие экзогенных факторов. Данное предположение основано на том, что в конце процесса репрограммирования эндогенные сигналы плюрипотентности, а также теломераза и репрессированная X-хромосома женских клеток реактивируются, в то время как работа ретровирусных генов затухает, хотя четкого разделения и взаимосвязи этих процессов нет [37].

Роль микроРНК в поддержании плюрипотентности

Во многих работах по репрограммированию соматических клеток до плюрипотентного состояния наблюдали значительное увеличение эффективности репрограммирования при добавлении гена *Lin28* в набор репрограммирующих факторов [38]. Основной вклад *Lin28* в этот процесс связывают с его участием в процессинге микроРНК (миРНК). Предполагается, что в ЭСК *Lin28* ингибирует процессинг миРНК *let7* [39], известного супрессора опухолевого роста. Он участвует в подавлении активности с-Myc. Кроме того, показано, что ключевые факторы репрограммирования *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* могут запускать семейство miR-290, члены которого в норме экспрессируются в ЭСК, принимая участие в регуляции пролиферации и самоподдержании этих клеток. Во время репрограммирования miR-290 активируется и в результате ремоделирования хроматина с помощью с-Myc [40]. Одна из мишеней транскрипционных факторов плюрипотентности *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *Rex1* – промотор кластера миРНК miR-302–367. Его продукты могут опосредованно индуцировать сигнальные пути TGF- β /Nodal/Activin (этот сигнальный путь играет существенную роль в поддержании плюрипотентного статуса ЭСК и в подавлении их дифференцировки), ингибируя некоторые регуляторы этого пути, что, в свою очередь, положительно сказывается на поддержании клеток в недифференцированном состоянии.

Влияние старения и иммортализации клеток на репрограммирование

Представляют интерес исследования, посвященные взаимосвязи репрограммирования с процессами

клеточного старения и иммортализации. В ранних работах неоднократно указывалось на то, что в соматических клетках в процессе репрограммирования росла теломеразная активность и значительно удлинялись теломерные участки ДНК. Репрограммированные клетки, таким образом, приобретали иммортальность, характерную для ЭСК [8, 9, 41]. Yehezkel и соавт. [42] детально изучили длину теломер, метилирование субтеломерных областей и экспрессию РНК-компонента теломеразы (TERRA, telomeric-repeat-containing RNA) в iPСК. Помимо подтверждения известных данных об активации теломеразы и удлинении теломер в iPСК, было показано, что в процессе последующей дифференцировки происходило значительное снижение экспрессии теломеразы в исследуемых клетках и сильное укорачивание теломерных областей. Результаты данной работы подтвердили важную роль теломеразы и состояния теломер в поддержании плюрипотентного статуса. Субтеломерные участки в iPСК были гиперметилированы по сравнению с исходными клетками, а уровень TERRA сравнительно увеличен. Предполагается, что регуляция экспрессии РНК-компонента теломеразы также может участвовать в процессах репрограммирования наряду с регуляцией экспрессии каталитического компонента теломеразы (TERT, Telomerase reverse transcriptase) [42].

Существенную роль экспрессии TERRA в процессах репрограммирования подтверждают результаты работы [43], в которой изучали клетки больных врожденным дискератозом (dyskeratosis congenital) – генетическим заболеванием, связанным с дисфункцией теломер из-за их преждевременного укорачивания. Вопреки ожиданиям оказалось, что клетки, репрограммированные при помощи *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, также удлиняют теломерные участки и восстанавливают теломеразную активность. Механизм восстановления теломеразной активности авторы связали с восстановлением экспрессии TERRA [43].

В работе Utikal и соавт. показано, что приобретение иммортального статуса является критически важным и лимитирующим фактором на пути репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния, что может также указывать на сходство механизмов репрограммирования и трансформации [25].

СЛОЖНОСТЬ, СТУПЕНЧАТОСТЬ И СТОХАСТИЧНОСТЬ ПРОЦЕССА ИНДУКЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Одну из проблем репрограммирования клеток с помощью введения транскрипционных факторов представляет низкая эффективность репрограммирования. В ранней методике трансфекции с использованием KMOS репрограммированию подверга-

лись порядка 0.01–0.1% трансфицированных клеток, что существенно ниже, чем при использовании методик клеточного слияния или ядерного переноса. Предложено несколько гипотез, объясняющих столь низкий выход репрограммированных клеток:

1) Образование iPСК требует специфически узких интервалов уровня экспрессии транскрипционных факторов. При одновременной трансфекции нескольких генов в составе лентивирусной конструкции распределение экспрессии этих генов по клеткам имеет вероятностный характер (из-за разного числа копий вируса в клетке и из-за случайной интеграции в геном). Это может быть причиной того, что только малая часть трансфицированных клеток получает «правильный» набор уровней экспрессии репрограммирующих факторов. Известно, что плюрипотентный статус ЭСК весьма чувствителен к уровням экспрессии генов плюрипотентности, например, 50%-ное изменение в уровне экспрессии *Oct4* уже приводит к дифференцировке ЭСК [44].

2) Популяции репрограммируемых соматических клеток гетерогенны сами по себе и содержат некоторое количество клеток, более подверженных репрограммированию, чем другие. Например, во время трансфекции часть клеток (скорее всего делящихся) содержит относительно деконденсированный хроматин, способствующий репрограммированию.

3) Необычно высокий уровень экспрессии экзогенных репрограммирующих факторов активирует гены, ассоциированные со стрессом и подавляющие пролиферацию. Например, в трансфицированных фибробластах возрастала экспрессия генов *Cdkn1a* и *Cdkn2a*, ингибиторов циклин-зависимых киназ, вовлеченных в различные пути дифференцировки и подавления пролиферации [45]. Этот факт связывают с введением транскрипционных факторов, так как известно, что экспрессия *Cdkn1a* запускается фактором *Klf4*, а *Cdkn2a* активируется вследствие aberrантной экспрессии *c-Myc* [46]. Таким образом, в трансфицированных клетках включаются внутренние механизмы «самосохранения», которые служат супрессорами неконтролируемой пролиферации, что в результате выражается в низком процентном содержании клеток, которым выпадает шанс преодолеть барьер супрессии пролиферации и достигнуть плюрипотентного состояния.

4) Недостаточное количество репрограммирующих факторов. При использовании методик репрограммирования при помощи клеточного слияния и переносе ядерного материала соматическая клетка или ее ядро подвергаются воздействию всех компонентов сети транскрипции плюрипотентности. Данные компоненты действуют на всех уровнях, тогда как при репрограммировании с использованием лен-

тивиральной трансфекции на клетки действует лишь ограниченное число факторов. Эти факторы могут реактивировать каскады транскрипции лишь с самого начала, что ставит процесс репрограммирования в более уязвимое положение, а также в зависимость от случайных вариаций.

На основании этих гипотез можно сделать вывод, что репрограммирование, индуцированное трансфекцией транскрипционных факторов, является низкоэффективным и ступенчатым, крайне зависящим от стохастических процессов. Важность случайных вариаций при образовании иПСК подтверждается данными о том, что получающиеся репрограммированные клетки довольно гетерогенны по общему профилю экспрессии генов плюрипотентности, эпигенетическому профилю и морфологии. Показано, что иПСК, образующиеся из одних и тех же родительских клеток, реактивируют экспрессию эндогенного *Oct4* в разное время в течение всего процесса репрограммирования, что указывает на ступенчатость эпигенетических перестроек и репрограммирования в целом [27]. Однако при сравнении рассматриваемого метода репрограммирования с ранее предложенными методиками переноса ядер и клеточных слияний нельзя не учитывать тот факт, что метод Takahashi и Yamanaka обладает рядом несомненных преимуществ, таких, как относительная дешевизна и простота методики репрограммирования. Стоит также отметить и универсальность подхода, так как удалось репрограммировать клетки человека, что было невозможно ранее.

НОВЫЕ СПОСОБЫ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДО ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ

Первоначальный метод трансфекции репрограммирующих транскрипционных факторов с использованием лентивирусных векторов обладает рядом существенных недостатков, препятствующих его применению в клинической практике. Интеграция вируса в геном хозяина (до 20 вставок за репрограммирование) увеличивает риск опухолеобразования, так как внедрение вируса в геном клетки-мишени может случайно активировать либо инактивировать гены хозяина, повышая тем самым риск мутагенеза. Проблемой является и продолжительная сверхэкспрессия трансгенов также из-за возможного неполного подавления трансгенов во время репрограммирования и при последующей дифференцировке. Присутствие даже нескольких плюрипотентных стволовых клеток в трансплантируемой ткани может стать причиной развития опухоли [47].

Одна из стратегий решения данных проблем состоит в уменьшении количества вводимых вирус-

ных векторов, что достигается конструированием полицистронных вирусных векторов, несущих сразу несколько нужных генов. Созданы конструкции [47, 48], кодирующие четыре основных гена репрограммирования КМОС. Используя одну лентивирусную конструкцию, содержащую эти гены, удалось снизить число вирусных интеграций в геном (до 3–5 вставок на клетку) и, что немаловажно, обеспечить равномерную экспрессию всех четырех генов в одной клетке. Посредством интеграции полицистронного лентивирусного вектора, кодирующего три гена – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* (KOS), – удалось репрограммировать мышечные фибробласты с последующим вырезанием вектора из генома. Используемый подход увеличивает привлекательность метода за счет полного удаления вирусного материала из репрограммированных клеток [49]. Подобный метод применили в работе [50], в которой использовали специальный piggyBag-транспозон, содержащий КМОС, с последующей его элиминацией для получения свободных от вектора и трансгенов иПСК, полученных из эмбриональных фибробластов мыши. Существуют работы, в которых подобную технологию применили и для клеток человека [51]. Значительным недостатком подобного подхода является сложно контролируемый процесс удаления множества транспозонов после репрограммирования, не гарантирующий стопроцентного результата.

Следующим подходом к решению проблемы вирусной интеграции в геном стал метод получения иПСК с использованием плазмидной трансфекции основных факторов плюрипотентности (КМОС или LNOS – *Lin28*, *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*), основанной на временной экспрессии введенных генов. В целом ряде работ сообщается об успешном применении этого метода для получения иПСК из различных клеточных культур, включая гепатоциты и клетки линии HEK293 [52–55]. В процессе усовершенствования метода удалось трансфицировать клетки единственной плазмидной конструкцией, кодирующей канонический набор генов КМОС. Эта конструкция удалялась из клеток после репрограммирования [54]. Необходимо отметить, что к недостаткам использования плазмидных конструкций (в сравнении с методами, основанными на вирусных векторах) относится крайне низкая эффективность репрограммирования, поскольку при помощи данного метода получили в основном иПСК из эмбриональных клеток мыши и клеточных линий, известных своей лабильностью. Однако удалось увеличить эффективность репрограммирования фибробластов человека до 1%, используя эписомные плазмидные векторы *riP/EBNA1*, кодирующие сразу шесть генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Lin28* и *Nanog* [56].

Другой неустраняемый недостаток методов, в которых используются плазмидные векторы, – вероятность остаточного присутствия ДНК-векторов в клетках-мишенях после репрограммирования, а следовательно, и существование теоретической возможности вставочного мутагенеза [56]. В поисках подходов, которые бы исключали вероятность встраивания чужеродной ДНК в геном хозяина, разработано несколько методов. Удалось генерировать иПСК человека при помощи трансгенного вируса Сендай, чей репродуктивный цикл основан исключительно на РНК, не содержит фазы обратной транскрипции ДНК (как у лентивирусных векторов) и интеграции в геном хозяина [57]. К преимуществам данного метода можно отнести относительно высокую интродукцию генов в клетки и ткани различного типа, к недостаткам – сложность работы с вирусом Сендай и обязательная очистка репрограммируемых клеток от реплицирующегося вируса [57].

Еще один подход репрограммирования без использования ДНК-векторов основан на доставке непосредственно в клетки белков – факторов репрограммирования. Для образования белков, которые могли бы проникать через плазматическую мембрану соматических клеток, разработан особый комплекс рекомбинантных белков, состоящих из белоктрансдуцирующей субъединицы полиаргинина, связанной со всеми четырьмя основными факторами репрограммирования – KMO5 [58]. Этот подход относительно прост, при его использовании снижается риск изменения клеток-мишеней под влиянием экзогенных генетических последовательностей [58]. Однако в более поздней работе, где объектом служили уже человеческие клетки [59], отмечена низкая эффективность данного метода. Эффективность репрограммирования с помощью белков KMO5, сцепленных с CPP (cell penetrating peptide – пептидом, содержащим большую долю основных аминокислот и способного проходить через клеточную мембрану), была равна 0.001%, что на два порядка ниже, чем в методах с вирусной интеграцией.

Следующий многообещающий способ репрограммирования соматических клеток без использования ДНК-векторов – трансфекция синтезированной *in vitro* мРНК транскрипционных факторов. Используя мРНК генов LNOS [60], исследователи смогли репрограммировать неонатальные фибробласты человека до плюрипотентного состояния. Несмотря на достигнутый результат, также отмечалась низкая эффективность репрограммирования (0.0005%). Эту проблему авторы объясняют высокой цитотоксичностью больших доз мРНК [60]. Однако преодолеть существующие трудности смогли при помощи син-

тетической мРНК генов KMO5 и *Lin28*, сконструированной из модифицированных рибонуклеотидов [61]. В комплексе с использованием ингибитора интерферонов V18R и культивированием в условиях с низким содержанием кислорода этот метод позволил добиться низкой цитотоксичности трансфекции. Благодаря таким модификациям эффективность репрограммирования возросла на два порядка и достигла 4.4% по сравнению с 0.04%, которые удается получить с использованием вирусной трансфекции. В дальнейшем была проделана масштабная работа по репрограммированию широкого спектра соматических клеток (в том числе клеток человека) и анализу полученных иПСК [61].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ

Одним из подходов к репрограммированию соматических клеток человека является применение низкомолекулярных соединений, так называемых малых молекул репрограммирования. В комбинации с ранее разработанными методами эти молекулы способны либо функционально заменить те или иные факторы репрограммирования, либо способствовать повышению эффективности процесса. Так, например, использовали VIX-01294 (VIX) – ингибитор гистонметилтрансферазы G9a. Применение этого агента в дополнение к трансфекции наборами *Klf4*, *c-Myc* и *Sox2*, а также *Klf4* и *Oct4* в составе лентивирусных векторов, значительно увеличивало (в 6–10 раз) выход репрограммированных клеток [45]. Подобный эффект связывают со специфическим действием VIX, который способствует деконденсации хроматина и соответственно может функционально заменить транскрипционный фактор *c-Myc* [45]. Другое соединение, значительно увеличивающее эффективность репрограммирования – 2-пропилвалериановая кислота (вальпроевая кислота, VPA) [62]. Она специфически ингибирует ДНК-метилтрансферазы и гистондеацетилазу. Согласно [38] использование этой малой молекулы в дополнение к стандартному набору KMO5 увеличивает эффективность репрограммирования на 1–2 порядка и также позволяет обойтись без онкогена *c-Myc*. С использованием аналогичной стратегии ингибирования ДНК-метилтрансфераз показано [29] положительное влияние 5-азациитидина (5-azaC) на выход репрограммированных клеток. Эффективность репрограммирования увеличивается также при введении малых интерферирующих РНК (siRNA), которые ингибируют транскрипты генов, связанных с коммитированием [29]. Описано положительное влияние CHIR99021, специфического ингибитора GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), на эффективность ре-

программирования эмбриональных фибробластов мышцы. При использовании CHIR99021 удалось значительно повысить выход колоний iPСК. В ряде экспериментов использование этого реагента позволило уменьшить набор репрограммирующих факторов до двух – *Klf4* и *Oct4* [63].

Малые молекулы, такие, как ингибиторы аргининовой метилтрансферазы AMI-5 и A-83-01 и ингибитор трансформирующего фактора роста β , способствуют процессу репрограммирования [64]. Индуцировав фибробласты мышцы одним только *Oct4*, при добавлении этих двух малых соединений, удалось получить iPСК, которые экспрессировали типичные маркеры плюрипотентности, обладали способностью дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков и давать начало жизнеспособным химерным мышам. Активность AMI-5 сопоставима с действием сразу трех компонентов: CHIR99021, Parnate и VPA. AMI-5 ингибирует активность PRMT 1/3/4/6, входит в состав семейства белков, которые катализируют моноили диметилирование остатков аргинина. Однако до сих пор не установлено, как именно AMI-5 усиливает индуцированное *Oct4* репрограммирование клеток.

Любопытные результаты получены при изучении влияния витамина С на генерацию iPСК [65]. Оказалось, что обработка репрограммируемых клеток витамином С в комбинации с активацией генов *Klf4*, *c-Myc* и *Oct4* вызывает значительное снижение уровня p53 и p21, а также концентрации активных форм кислорода (АФК). Предполагается, что это усиливает эффективность репрограммирования, так как при трансфекции вирусными векторами обычно наблюдается повышение уровня АФК. На генерацию iPСК из взрослых и эмбриональных фибробластов человека положительно воздействует бутират натрия [51]. Роль данного соединения связывают с усилением экспрессии ДНК-деметилазы и H3-ацетилирования, что в конечном итоге способствует экспрессии эндогенных факторов плюрипотентности, в том числе *Oct4* и *Dppa2* (developmental pluripotency associated 2). В одной из последних работ [66], связанных с изучением роли малых молекул в процессах репрограммирования и поддержания плюрипотентного статуса, проведен скрининг различных низкомолекулярных соединений. По результатам исследования удалось подобрать «коктейль» из трех молекул – PD98059 (mitogen-activated protein kinase inhibitor), CHIR99021 (glycogen synthase kinase inhibitor) и Y27632 (Rho kinase inhibitor), который существенно влиял на способность человеческих ЭСК оставаться в недифференцированном состоянии при различных условиях культивирования.

ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

К направлениям, требующим особого внимания, можно отнести изучение возможности так называемого прямого репрограммирования. Эта стратегия предполагает использование различных методов для трансдифференцировки одного специализированного типа клеток в другой, минуя стадию образования плюрипотентных стволовых клеток. В случае разработки метода такого прямого репрограммирования, клеточные технологии могли бы использоваться в клинической практике.

Среди подобных исследований можно выделить работу [67], в которой при помощи аденовирусной трансфекции генов трех транскрипционных факторов – *Ngn3* (*Neurog3*), *Pdx1* и *Mafa* – репрограммировали зрелые экзокринные клетки поджелудочной железы мышцы в β -подобные клетки *in vivo*. По морфологии, ультраструктуре, экспрессии основных маркеров и главным функциям (синтез инсулина) индуцированные β -клетки не отличались от интактных [67]. Опубликованы результаты изучения влияния транскрипционного фактора *Oct4* на пластичность кератиноцитов мышцы. При помощи плазмидной трансфекции гена *Oct4* удалось получить измененную культуру клеток, которые при определенных условиях культивирования могли дифференцироваться в нейрональное направление [68]. Эта область исследования получила новый виток развития в 2010 г., когда показали [69], что кратковременной экспрессии гена *Oct4* достаточно для изменения направления дифференцировки кератиноцитов человека, в том числе в нейрональном и мезенхимальном направлениях.

Стоит также отметить работу, авторам которой удалось вызвать прямое репрограммирование эмбриональных и неонатальных фибробластов мышцы *in vitro* [70]. Применив вначале комбинацию из 19 генов, специфичных для нервных тканей и нейрогенеза, они сумели подобрать три гена, осуществляющих трансдифференцировку клеток в нейрональное направление. Ретровирусами, несущими гены *Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l*, инфицировали культуры фибробластов и наблюдали образование функциональных нейронов со сложной морфологией. Оказалось также, что одного гена *Ascl1* достаточно для формирования таких характеристик нервных клеток, как экспрессия некоторых специфичных для нейронов потенциал-зависимых белков, необходимых для генерации потенциала действия. Однако для облегчения нейрональной конверсии клеток и их полного созревания необходима совместная экспрессия дополнительных факторов [70]. Сообщается также о сходном результате, полученном с использованием фибробластов

человека [71]: фенотип клеток удалось изменить в сторону дофаминергических нейронов при дополнительном введении в клетки генов *Lmx1a* и *FoxA2*. В качестве альтернативного источника для генерации клеток с характеристиками дофаминергических нейронов предложено использовать астроциты [72].

Несмотря на кажущуюся сложность трансдифференцировки клеток – производных одного зародышевого листка, в клетки – производные другого зародышевого листка, существуют работы, посвященные проблеме пластичности клеток, в которых доказана такая возможность *in vitro* и даже *in vivo* [73–75].

Soda и соавт. [73] удалось осуществить трансдифференцировку клеток глиобластомы в эндотелиальные клетки. Показано, что клетки глиобластомы могут трансдифференцироваться в эндотелий сосудов и давать начало функциональным кровеносным сосудам, нечувствительным к ингибированию рецептора VEGF. Результаты данного исследования указывают на существование иного механизма устойчивости клеток глиобластомы к анти-VEGF-терапии. Сообщается о репрограммировании терминально дифференцированных гепатоцитов в нейрональном направлении [74].

Опубликованы результаты успешного прямого репрограммирования фибробластов мыши и человека в нейрональном направлении дифференцировки [75]. Полученные клетки, в которых индуцировали экспрессию генов *Ascl1* (*Mash1*), *Nurr1* и *Lmx1a*, очень походили на дофаминергические нейроны мозга по продукции специфических белков и выбросу дофамина, а также по пейсмейкерной активности. Большие надежды возлагаются на получение функциональных дофаминергических нейронов непосредственно из одного типа клеток в другой с целью терапии болезни Паркинсона и ряда других нейродегенеративных заболеваний.

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ИПСК И ЭСК. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ «ПАМЯТЬ» ИПСК

Несмотря на то что ИПСК весьма схожи с ЭСК по многим характеристикам, между клетками этих типов существуют и значительные различия, в том числе в уровнях контроля экспрессии генов плюрипотентности и в формировании жизнеспособных организмов при трансплантации этих клеток в развивающуюся бластоцисту для получения химерных мышечей. Подтверждено, что уровни метилирования CpG-островков схожи в ЭСК и ИПСК [76]. При помощи полногеномного анализа CpG-островков, локализованных в функциональных регионах более 14000 генов, выявили разницу в уровнях метилирования 46 генов. Общее CpG-метилирование промоторных участков в плюрипотентных клетках выше, чем в со-

матических. Сравнили две линии ЭСК и ИПСК, полученных из генетически идентичного с ЭСК материала [77]. В тестах на получение химерных животных жизнеспособные мыши были успешно получены из двух линий ЭСК, в то время как из ИПСК не удалось получить ни одного животного. При внимательном сравнении профилей транскриптов РНК показали, что транскрипция импринтированного кластера генов *Dlk1-Dio3* в ИПСК значительно ниже, чем в линиях ЭСК. Обнаружено, что участок хромосомы 12, содержащий гены, важные для развития плода, был «выключен» в линии ИПСК. Проверили также более 60 линий ИПСК-подобных клеток, и в большинстве случаев наблюдали сходный результат. Важно отметить, что в ряде линий ИПСК этот кластер генов был активирован. Впоследствии из этих линий удалось получить живых химерных мышечей. Таким образом, состояние данного импринтированного кластера позволяет ввести еще одну характеристику «полноценности» репрограммирования ИПСК [77]. ИПСК можно дифференцировать в клетки-предшественницы дефинитивной эндодермы для разработки подходов к клеточной терапии пораженных тканей эндодермального происхождения, несмотря на существование некоторых различий между ними на молекулярном уровне [78].

Предполагается, что ЭСК и ИПСК человека, помимо потенциального применения для нужд регенеративной медицины, можно использовать для моделирования наследственных болезней человека. В то же время еще до применения этих клеток в качестве модели того или иного заболевания необходимо оценить наличие в них хромосомных перестроек, которые ограничивают применение репрограммированных клеток. Выявлены значительные различия в хромосомных характеристиках ИПСК и ЭСК [79]. Получены ИПСК из клеток кожи трех больных, страдающих синдромом ломкой X-хромосомы (*fragile X syndrome*, FX), при котором наблюдается задержка умственного развития. В отличие от ЭСК больных синдромом FX, в некоторых типах дифференцированных клеток этих же больных экспрессия гена *FMR1* была снижена вследствие аномальных дупликаций триплетных повторов. Показано, что ИПСК также содержат мутантный ген *FMR1*, который не изменяется в течение репрограммирования, несмотря на плюрипотентный статус [80]. Благодаря данному исследованию стало очевидным, что ИПСК не всегда подходят для моделирования заболеваний, связанных с эпигенетическими изменениями, в том числе и с импринтингом. В похожей работе [81] проанализировали паттерны метилирования ДНК в геномах 15 клеточных линий – четырех линиях ЭСК, пяти линиях ИПСК человека и тканей, из которых эти ИПСК получены, а также

в дифференцированных клетках, полученных от упомянутых двух видов стволовых клеток. Выявлены значительные различия между иПСК и ЭСК; паттерны метилирования вблизи концов и центров хромосом в иПСК остаются такими же, как и в дифференцированных клетках, из которых они были получены. Очевидно, что репрограммирование является иным способом приобретения плюрипотентного статуса, нежели получение клеток из эмбриона. Основываясь на этих данных, можно заключить, что возможны ограничения в образовании некоторых типов клеток из репрограммированных клеток. Тот факт, что репрограммированные стволовые клетки имеют эпигенетическую «память», согласуется с опубликованными не так давно результатами сравнения иПСК, ЭСК и плюрипотентных клеток мыши, полученных методом ядерного переноса [82]. Показано, что иПСК содержат остаточные эпигенетические метки, которые, тем не менее, могут элиминироваться при длительном культивировании либо при использовании специфических агентов, перестраивающих структуру хроматина. Установлено также, что плюрипотентные стволовые клетки, полученные при переносе ядра, репрограммируют эпигенетический профиль эффективнее, чем иПСК.

иПСК не только обладают эпигенетической «памятью», их важной сравнительной характеристикой является наличие дупликаций или делеций генов, связанных с геномной нестабильностью. Используя метод генотипирования единичных нуклеотидных замов, сравнили 69 линий ЭСК, 37 линий иПСК между собой, а также с линейными и первичными культурами клеток человека [83]. Результаты этой тщательно выполненной работы говорят о том, что плюрипотентные клетки в целом, и иПСК в большей степени, склонны к накоплению дупликаций в областях генома, содержащих гены плюрипотентности и онкогены, а также делеций в области генов-супрессоров опухолевого роста.

Многие исследователи связывают различия между иПСК и ЭСК с самим методом репрограммирования и наличием вирусных вставок в геном. Сравнили транскрипционные профили ЭСК человека и иПСК методами, исключающими использование вирусных конструкций [84], и показали, что транскрипционные профили ЭСК и иПСК были в целом сходными, однако имелись различия, которые нельзя объяснить интеграцией вируса в геном.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ иПСК В КЛИНИКЕ

Трансплантация аллогенных органов связана с рядом проблем, таких, как ограниченная приживляемость тканей и необходимость применения иммуносупрессоров. Считается, что при помощи репрограммирова-

ния собственных клеток больного можно преодолеть эти проблемы, благодаря генетической идентичности пересаживаемых реципиенту клеток. Другое несомненное преимущество предлагаемой техники перед существующими трансплантационными методами – потенциальная возможность исследования и исправления патологических мутаций в клетках *in vitro*. Так, на мышинной модели осуществлена успешная коррекция серповидно-клеточной анемии при помощи иПСК [85]. В работе наблюдали образование нормальных эритроцитов из кроветворных клеток-предшественников, полученных из полностью репрограммированных клеток кожи.

Изучение и лечение многих заболеваний, таких, как сахарный диабет типа 1, болезни Паркинсона и Альцгеймера, патологии печени и др., проблематичны как из-за труднодоступности поврежденного органа и, как следствие, сложностей при поиске донорской ткани, так и из-за отсутствия способов длительного культивирования клеток соответствующих типов. При моделировании подобных заболеваний можно получать аутологичные иПСК, направлять их дифференцировку в культуре в клетки нужного типа для получения адекватных тест-систем скрининга лекарственных средств. Эти тест-системы также могут быть использованы при исследовании заболеваний, сопровождающихся патологической гибелью мотонейронов, например при амиотрофическом боковом склерозе или спинальной мышечной атрофии. Одной из проблем, связанных с изучением дегенеративных патологий, является недостаток клеточных материалов от пациентов с поздними стадиями развития заболевания. Так как иПСК, вероятно, должны *in vitro* пройти те же этапы дифференцировки, как и клетки реципиента до их «заболевания» *in vivo*, данная технология может позволить изучить ранние стадии конкретной болезни. В данной области ведутся интенсивные работы, и в некоторых лабораториях уже получены иПСК от больных, страдающих болезнью Гентингтона, серповидно-клеточной анемией, мышечной дистрофией, синдромом Дауна и др. [13, 14, 86, 87].

Выявлены существенные различия между одними и теми же типами клеток, дифференцированными из ЭСК и иПСК [88]. Изучение образования тератом у мышей линий C57BL/6 и 129/SvJ показало, что нарушение экспрессии генов в некоторых клетках, дифференцированных из иПСК, может вызвать зависимый от Т-клеток иммунный ответ у изогенного реципиента. Таким образом, существующие в настоящее время технологии репрограммирования еще далеки от клинического применения. Одна из первоочередных задач – разработка методов, позволяющих свести к минимуму эпигенетические различия между иПСК и ЭСК.

ПОДХОДЫ К КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ИПСК

Использование онкогенов для получения ИПСК является одной из главных проблем, которая стоит на пути к терапевтическому применению этих клеток. Онкоген *c-Myc* гиперэкспрессирован примерно в 70% опухолей человека, поэтому чрезмерная экспрессия введенного трансгена создает опасность применения ИПСК [89]. Для решения этой проблемы исследовали ИПСК, полученные от человека и мыши. У химерных мышей, полученных из ИПСК без введения *c-Myc*, не возникали опухоли после рождения, тогда как у ~15% животных, полученных от ИПСК с экзогенным *c-Myc*, развивались онкологические заболевания [90]. *Oct4*, *Sox2* и *Klf4* тоже потенциально связаны с возникновением опухолей разного типа, поэтому все больше исследователей стараются избежать трансдукции этих онкогенов [54, 56, 61, 91]. Для достижения необходимого результата в некоторых случаях подбирают такие клетки-мишени, которые эндогенно экспрессируют необходимый фактор на достаточном уровне, избавляя от необходимости вводить его. Например, в нейральных стволовых клетках сильно экспрессируется эндогенный ген *Sox2*, и в ряде работ удалось репрограммировать эти клетки, вводя в них только *Oct4* и *Klf4* [45, 92] или даже один *Oct4* [92, 93]. Перспективными для репрограммирования могут считаться менингиоциты и кератиноциты, благодаря относительно высокому уровню экспрессии *Sox2* [94], *c-Myc* и *Klf4* [95, 96] соответственно. Также известно, что ИПСК легче получить из клеток амниотической жидкости ввиду их относительно слабой дифференцировки [97, 98]. Образование ИПСК из клеток амниотической жидкости происходит по крайней мере

в 2 раза быстрее, чем из фибробластов, а эффективность репрограммирования на порядок выше. Один из подходов к репрограммированию состоит в замене онкогенов малыми молекулами [38, 45]. Важную проблему представляет тератогенность ИПСК, так как при их дифференцировке в специализированные клетки, предназначенные для трансплантации, может сохраниться некоторое количество недифференцированных ИПСК, представляющих опасность для реципиента [99]. Продолжаются поиски методов селекции, гарантирующих отделение ИПСК от дифференцированных клеток. Изучение хромосомного состава ЭСК и ИПСК выявило кариотипическую нестабильность линий плюрипотентных клеток [100], что указывает на необходимость тщательного цитогенетического анализа ИПСК, а также исходных клеточных линий.

Сходства и различия между ЭСК и ИПСК активно изучаются на молекулярном и функциональном уровнях. Результаты этих работ могут повлиять на терапевтическую пригодность ИПСК. Данная область исследований требует анализа геномного и эпигеномного статуса ИПСК человека, как и разработка и оптимизация протоколов дифференцировки, а также выработка надежных критериев функциональности специализированных клеток, полученных из ИПСК. ●

Работа поддержана ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2007–2012 годы» (Государственный контракт № 16.512.11.2106, шифр 2011-1.2-512-050-068).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. // Nature. 1997. V. 385. № 6619. P. 810–813.
- Wakayama T., Perry A., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. // Nature. 1998. V. 394. № 6691. P. 369–374.
- Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmot I. // Nature. 1996. V. 380. № 6569. P. 64–66.
- Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L., Nelson M., Sanger W.G., Gokhale S., Wolf D.P., Mitalipov S.M. // Nature. 2007. V. 450. № 7169. P. 497–502.
- Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. // Curr. Biol. 2001. V. 11. № 19. P. 1553–1558.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. // Nature. 2007. V. 448. № 7151. P. 318–324.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. // Nature. 2007. V. 448. № 7151. P. 313–317.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. // Science. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Park I.H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M.W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G.Q. // Cell. 2008. V. 134. № 5. P. 877–886.
- Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G.W., Cook E.G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., et al. // Cell. 2009. V. 136. № 5. P. 964–977.
- Ho R., Chronis C., Plath K. // J. Cell Physiol. 2011. V. 226. № 4. P. 868–878.
- Niwa H. // Development. 2007. V. 134. № 4. P. 635–646.
- Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. № 4. P. 431–440.

18. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., et al. // *Cell*. 2005. V. 122. № 6. P. 947–956.
19. Rosenfeld N., Elowitz M.B., Alon U. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 323. № 5. P. 785–793.
20. Alon U. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 6. P. 450–461.
21. Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., Walter T., Stojkovic P., Przyborski S., Herbert M., Murdoch A., Strachan T., Lako M. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. № 8. P. 1035–1043.
22. Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S.Y., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 6. P. 2475–2485.
23. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., Loh Y.H., Wang B., Ng H.H., Robson P. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 26. P. 24731–24737.
24. Seoane J., Le H.V., Massagué J. // *Nature*. 2002. V. 419. № 6908. P. 729–734.
25. Utikal J., Polo J.M., Stadtfeld M., Maherali N., Kulalert W., Walsh R.M., Khalil A., Rheinwald J.G., Hochedlinger K. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1145–1148.
26. Rowland B.D., Bernards R., Peeper D.S. // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. № 11. P. 1074–1082.
27. Scheper W., Copray S. // *Stem Cell Rev.* 2009. V. 5. № 3. P. 204–223.
28. Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Cañamero M., Blasco M.A., Serrano M. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1136–1139.
29. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., Ku M., Wernig M., Schorderet P., Bernstein B.E., Jaenisch R., Lander E.S., Meissner A. // *Nature*. 2008. V. 454. № 7205. P. 49–55.
30. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., et al. // *Cell*. 2006. V. 125. № 2. P. 315–326.
31. Kurnarso G., Chia N.Y., Jeyakani J., Hwang C., Lu X., Chan Y.S., Ng H.H., Bourque G. // *Stem Cells. Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 7. P. 631–634.
32. Sridharan R., Tchieu J., Mason M.J., Yachechko R., Kuoy E., Horvath S., Zhou Q., Plath K. // *Cell*. 2009. V. 136. № 2. P. 364–377.
33. Pereira C.F., Piccolo F.M., Tsubouchi T., Sauer S., Ryan N.K., Bruno L., Landeira D., Santos J., Banito A., Gil J., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. № 6. P. 547–556.
34. Kim J., Chu J., Shen X., Wang J., Orkin S.H. // *Cell*. 2008. V. 132. № 6. P. 1049–1061.
35. Gaspar-Maia A., Alajem A., Polesso F., Sridharan R., Mason M.J., Heidersbach A., Ramalho-Santos J., McManus M.T., Plath K., Meshorer E., et al. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7257. P. 863–868.
36. Singhal N., Graumann J., Wu G., Arauz Zo-Bravo M.J., Han D.W., Greber B., Gentile L., Mann M., Schöler H.R. // *Cell*. 2010. V. 141. № 6. P. 943–955.
37. Stadtfeld M., Maherali N., Breault D.T., Hochedlinger K. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. № 3. P. 230–240.
38. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 7. P. 795–797.
39. Viswanathan S.R., Daley G.Q., Gregory R.I. // *Science*. 2008. V. 320. № 5872. P. 97–100.
40. Ralston A., Rossant J. // *Reproduction*. 2010. V. 139. № 1. P. 35–44.
41. Mathew R., Jia W., Sharma A., Zhao Y., Clarke L.E., Cheng X., Wang H., Salli U., Vrana K.E., Robertson G.P., et al. // *FASEB J.* 2010. V. 24. № 8. P. 2702–2715.
42. Yehezkel S., Rebibo-Sabbah A., Segev Y., Tzukerman M., Shaked R., Huber I., Gepstein L., Skorecki K., Selig S. // *Epigenetics*. 2011. V. 6. № 1. P. 63–75.
43. Agarwal S., Loh Y.H., McLoughlin E.M., Huang J., Park I.H., Miller J.D., Huo H., Okuka M., Dos Reis R.M., Loewer S., et al. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7286. P. 292–296.
44. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. // *Nature Genet.* 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.
45. Shi Y., Do J.T., Desponts C., Hahm H.S., Schöler H.R., Ding S. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. № 6. P. 525–528.
46. Wernig M., Meissner A., Cassady J.P., Jaenisch R. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. № 1. P. 10–12.
47. Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 1. P. 157–162.
48. Sommer C.A., Stadtfeld M., Murphy G.J., Hochedlinger K., Kotton D.N., Mostoslavsky G. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 3. P. 543–549.
49. Chang C.W., Lai Y.S., Pawlik K.M., Liu K., Sun C.W., Li C., Schoeb T.R., Townes T.M. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 5. P. 1042–1049.
50. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hämmäläinen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., et al. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7239. P. 766–770.
51. Mali P., Chou B., Yen J., Ye Z., Zou J., Dowey S., Brodsky R.A., Ohm J.E., Yu W., Baylin S.B., et al. // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 4. P. 713–720.
52. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. // *Science*. 2008. V. 322. P. 949–953.
53. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. // *Science*. 2008. V. 322. № 5903. P. 945–949.
54. Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7239. P. 771–775.
55. Jia F., Wilson K.D., Sun N., Gupta D.M., Huang M., Li Z., Panetta N.J., Chen Z.Y., Robbins R.C., Kay M.A., et al. // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 3. P. 197–199.
56. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. // *Science*. 2009. V. 324. № 5928. P. 797–801.
57. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009. V. 85. № 8. P. 348–362.
58. Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., et al. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 5. P. 381–384.
59. Kim D., Kim C.H., Moon J.I., Chung Y.G., Chang M.Y., Han B.S., Ko S., Yang E., Cha K.Y., Lanza R., Kim K.S. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 6. P. 472–476.
60. Yakubov E., Rechavi G., Rozenblatt S., Givol D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 394. № 1. P. 189–193.
61. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. № 5. P. 618–630.
62. Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Demyntseva E.V., Shilov A.A., Pokushalov E.A., Zaidman A.M., Aleksandrova M.A., Plotnikov E.Y., et al. // *Stem Cells Dev.* 2011. V. 20. № 6. P. 1099–1112.
63. Li W., Zhou H., Abujarour R., Zhu S., Young Joo J., Lin T., Hao E., Schöler H.R., Hayek A., Ding S. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 12. P. 2992–3000.
64. Yuan X., Wan H., Zhao X., Zhu S., Zhou Q., Ding S. // *Stem Cells*. 2011. V. 29. № 3. P. 549–553.
65. Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. № 1. P. 71–79.
66. Tsutsui H., Valamehr B., Hindoyan A., Qiao R., Ding X., Guo S., Witte O.N., Liu X., Ho C.M., Wu H. // *Nat. Commun.* 2011. V. 2. P. 167.
67. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. // *Nature*. 2008. V. 455. № 7213. P. 627–632.

68. Grinnell K.L., Yang B., Eckert R.L., Bickenbach J.R. // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. № 12. P. 372–380.
69. Racila D., Winter M., Said M., Tomanek-Chalkley A., Wiechert S., Eckert R.L., Bickenbach J.R. // *Gene Ther.* 2010. V. 18. № 3. P. 294–303.
70. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M. // *Nature.* 2010. V. 463. № 7284. P. 1035–1041.
71. Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O., Wood J., Nelander J., Dufour A., Björklund A., Lindvall O., Jakobsson J., Parmar M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 25. P. 10343–10348.
72. Addis R.C., Hsu F.C., Wright R.L., Dichter M.A., Coulter D.A., Gearhart J.D. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. e28719. P. 1–8.
73. Soda Y., Marumoto T., Friedmann-Morvinski D., Soda M., Liu F., Michiue H., Pastorino S., Yang M., Hoffman R.M., Kesari S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 11. P. 4274–4280.
74. Marro S., Pang Z.P., Yang N., Tsai M.C., Qu K., Chang H.Y., Südhof T.C., Wernig M. // *Cell Stem Cell.* 2011. V. 9. № 4. P. 374–382.
75. Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretzkova E., Lazarevic D., Taverna S., Leo D., Sotnikova T.D., Menegon A., Roncaglia P., Colciago G., et al. // *Nature.* 2011. V. 476. № 7359. P. 224–227.
76. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 5. P. 937–946.
77. Stadtfeld M., Apostolou E., Akutsu H., Fukuda A., Follett P., Natesan S., Kono T., Shioda T., Hochedlinger K. // *Nature.* 2010. V. 465. № 7295. P. 175–181.
78. Christodoulou C., Longmire T.A., Shen S.S., Bourdon A., Sommer C.A., Gadue P., Spira A., Gouon-Evans V., Murphy G.J., Mostoslavsky G., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 6. P. 2313–2325.
79. Urbach A., Bar-Nur O., Daley G.Q., Benvenisty N. // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. № 5. P. 407–411.
80. Mitalipov S., Wolf D. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2009. V. 114. P. 185–199.
81. Lister R., Pelizzola M., Kida Y.S., Hawkins R.D., Nery J.R., Hon G., Antosiewicz-Bourget J., O'Malley R., Castanon R., Klugman S., et al. // *Nature.* 2011. V. 471. № 7336. P. 68–73.
82. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.I. // *Nature.* 2010. V. 467. № 7313. P. 285–290.
83. Laurent L.C., Ulitsky I., Slavin I., Tran H., Schork A., Morey R., Lynch C., Harness J.V., Lee S., Barrero M.J., et al. // *Cell Stem Cell.* 2011. V. 8. № 1. P. 106–118.
84. Marchetto M.C., Yeo G.W., Kainohana O., Marsala M., Gage F.H., Muotri A.R. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 9. P. e7076.
85. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., Sun C.W., Meissner A., Cassady J.P., Beard C., Brambrink T., Wu L.C., Townes T.M., et al. // *Science.* 2007. V. 318. № 5858. P. 1920–1923.
86. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., et al. // *Science.* 2008. V. 321. № 5893. P. 1218–1221.
87. Raya A., Rodríguez-Pizà I., Guenechea G., Vassena R., Navarro S., Barrero M.J., Consiglio A., Castellà M., Ríó P., Sleep E., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. № 7251. P. 53–59.
88. Zhao T., Zhang Z.N., Rong Z., Xu Y. // *Nature.* 2011. V. 474. № 7350. P. 212–215.
89. Dang C.V., O'Donnell K.A., Zeller K.I., Nguyen T., Osthus R.C., Li F. // *Semin. Cancer Biol.* 2006. V. 16. № 4. P. 253–264.
90. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochizuki Y., Takizawa N., Yamana S. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 1. P. 101–106.
91. Maekawa M., Yamaguchi K., Nakamura T., Shibukawa R., Kodanaka I., Ichisaka T., Kawamura Y., Mochizuki H., Goshima N., Yamana S. // *Nature.* 2011. V. 474. № 7350. P. 225–229.
92. Kim J.B., Zaehres H., Araúzo-Bravo M.J., Schöler H.R. // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 10. P. 1464–1470.
93. Kim J.B., Sebastiano V., Wu G., Arauzo-Bravo M.J., Sasse P., Gentile L., Ko K., Ruau D., Ehrlich M., van den Boom D., et al. // *Cell.* 2009. V. 136. № 3. P. 411–419.
94. Qin D., Gan Y., Shao K., Wang H., Li W., Wang T., He W., Xu J., Zhang Y., Kou Z., et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 48. P. 33730–33735.
95. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 11. № 3. P. 340–345.
96. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilić J., Pekarik V., Tiscornia G., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1276–1284.
97. Zhao H.X., Li Y., Jin H.F., Xie L., Liu C., Jiang F., Luo Y.N., Yin G.W., Li Y., Wang J., et al. // *Differentiation.* 2010. V. 80. № 2–03. P. 123–129.
98. Galende E., Karakikes I., Edelmann L., Desnick R.J., Kerenyi T., Khoueiry G., Lafferty J., McGinn J.T., Brodman M., Fuster V., et al. // *Cell Reprogram.* 2010. V. 12. № 2. P. 117–125.
99. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Broccoli V., Constantine-Paton M., Isacson O., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 15. P. 5856–5861.
100. Минина Ю.М., Жданова Н.С., Шилов А.Г., Толкунова Е.Н., Лисковых М.А., Томилин А.Н. // *Цитология.* 2010. Т. 52. № 5. С. 420–425.