

УДК 57.085.23

Получение и характеристика клеток человека с индуцированной плюрипотентностью

М.В. Шутова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

*E-mail: kiselev@vigg.ru

РЕФЕРАТ Клеточная биология – одно из интенсивно развивающихся направлений современной биологии. Особый интерес для клеточной биологии представляют те стадии раннего эмбрионального развития организма, во время которых большинство клеток обладают свойством плюрипотентности. Клетки внутренней клеточной массы бластоцисты могут быть культивированы *in vitro* и получили название эмбриональных стволовых клеток. Эти клетки обладают способностью к дифференцировке в любые типы клеток и тканей. Однако еще больший интерес для практического использования представляет возвращение (репрограммирование) клеток взрослого организма в плюрипотентное состояние. В проведенном нами исследовании из эндотелиальных клеток пупочной вены человека с помощью генетического репрограммирования были впервые получены клетки с индуцированной плюрипотентностью. Мы показали, что морфологически, молекулярно и функционально полученные клетки аналогичны эмбриональным стволовым клеткам человека. Нами было впервые продемонстрировано, что при репрограммировании в клетках человека с индуцированной плюрипотентностью происходит существенное изменение состояния хроматина X хромосомы, инактивированной в женских клетках эндотелия, в сторону ее активации, что свидетельствует о репрограммировании клеток эндотелия и на эпигенетическом уровне.

Ключевые слова: плюрипотентность, репрограммирование клеток, реактивация X хромосомы.

Список сокращений: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), клетки с индуцированной плюрипотентностью (иПК).

В процессе индивидуального развития многоклеточный организм млекопитающих проходит путь развития от одной единственной клетки, зиготы, до сложного набора взаимообеспечивающих типов тканей. Тотипотентная клетка зиготы и терминально дифференцированная клетка несут один и тот же набор генетической информации, однако эта информация реализуется по разным программам. Клеточные программы дифференцировки реализуются на генетическом и эпигенетическом уровнях. Зигота, реализуя определенную программу, делится, и на определенном этапе клетки начинают специализироваться. На стадии бластоцисты (примерно 3,5-й день у мыши, 5,5-й день у человека) уже есть 2 типа клеток, а сама бластоциста представляет собой будущий эмбрион, но который еще не имел физического контакта с материнским организмом. Из внутренних клеток будет дальше развиваться организм и все его ткани, а внешний слой клеток – трофобластоциста – будет обеспечивать взаи-

модействие с материнским организмом. Клетки внутренней массы бластоцисты, культивируемые в лабораторных условиях, получили название эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Подобранные такие условия культивирования ЭСК, что *in vitro* (вне организма) программа дальнейшего развития ЭСК не реализуется, они сохраняют свойство плюрипотентности неограниченное время [1], но, сменив условия культивирования, можно получить контролируемую дифференцировку ЭСК во все ткани трех зародышевых листков [2]. Однако в плане практического использования этих клеток в терапевтических целях остается нерешенной задача иммунологической совместимости полученных тканей с реципиентом. Идеальным решением представляется репрограммирование индивидуальных соматических клеток до плюрипотентного состояния. Для этого были разработаны технологии переноса ядра соматической клетки в яйцеклетку или слияния соматической клетки с плюрипотентной [3–5]. Однако в 2006 г. С. Яманакой [6] был предло-

жен подход генетического репрограммирования соматической клетки до плюрипотентного состояния. Для индукции плюрипотентности были использованы гены, кодирующие транскрипционные факторы, необходимые для раннего эмбрионального развития и поддержания плюрипотентности *Oct3/4* и *Sox2*, противоапоптозный транскрипционный фактор *Klf4* и транскрипционный фактор, поддерживающий клеточную пролиферацию с-Мус. Эти клетки получили название стволовых клеток с индуцированной плюрипотентностью (иПК). За последние 3 года технология была значительно усовершенствована и уже не требует обязательной генетической модификации [7–9]. Однако спектр типов клеток человека, которые были успешно репрограммированы, остается очень ограниченным [10, 11].

Клетки, которые могут служить источником иПК, должны удовлетворять ряду условий. Во-первых, должны быть «чувствительны» к полному репрограммированию. Во-вторых, должны быть доступны. В-третьих, не должны иметь накопленных повреждений ДНК, как, например, повреждения от УФ или других факторов внешней среды, в клетках кожи. И наконец, чтобы минимизировать возможные повреждения ДНК в процессе манипуляций с клетками *in vitro*, изначальное количество клеток должно быть значительным, а репрограммирование эффективным. Исходя из перечисленных выше критериев, нами была поставлена задача выбора оптимального клеточного типа и генетического репрограммирования выбранных клеток с целью оптимизации их дальнейшего практического применения.

Для репрограммирования нами были выбраны клетки эндотелия пупочной вены человека. Они легко доступны, не накопили повреждений ДНК, могут быть получены в больших количествах без предварительного культивирования, хорошо пролиферируют в культуре только в присутствии факторов, поддерживающих их рост и, в связи с развитием сети банков хранения пуповинной крови, могут храниться длительное время. Данные о репрограммировании клеток эндотелия в литературе отсутствуют. Репрограммирование было проведено с использованием генетических конструкций, ранее опробованных в экспериментах [6]. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) были трансдуцированы ретровирусными

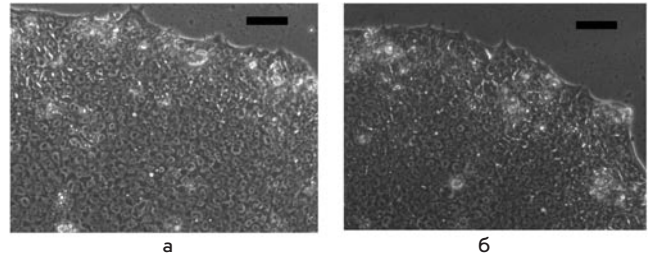


Рис. 1. Морфология полученных из эндотелия иПК человека, растущих в бесфидерных условиях: а – фотография колонии иПК в световом поле; б – фотография колонии ЭСК человека. Масштабная линейка – 100 мкм

векторами, которые содержали кДНК следующих генов: *Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4* и *cMyc*. Множественность инфекции составляла 5 вирусных частиц. Через 6 дней после инфекции культуральная среда для эндотелиальных клеток была заменена на среду для ЭСК. Необходимо отметить, что эндотелиальные клетки не пролиферируют в среде для ЭСК, это значительным образом облегчило отбор иПК. Через три недели после вирусной инфекции были отобраны клоны, которые морфологически были идентичны ЭСК человека (рис. 1).

По пролиферативным и молекулярным характеристикам (рис. 2а, б) полученные иПК не отличались от ЭСК человека. С помощью фингерпринтинга мы убедились, что линии иПК произошли именно из клеток эндотелия пупочной вены человека, взятых для репрограммирования, а не являются результатом контаминации линиями ЭСК человека. Копийность интегрированных провирусов, определенная с помощью геномной гибридизации с соответствующими зондами, варьировала в полученных линиях иПК от двух до трех копий каждого вируса на геном. Полученные линии иПК человека обладали свойством плюрипотентности, формировали эмбриоидные тельца (рис. 2в) и дифференцировались в производные трех зародышевых листков. Проведенное кариотипирование показало, что репрограммированные клетки имеют нормальный кариотип и сохраняют его в процессе куль-

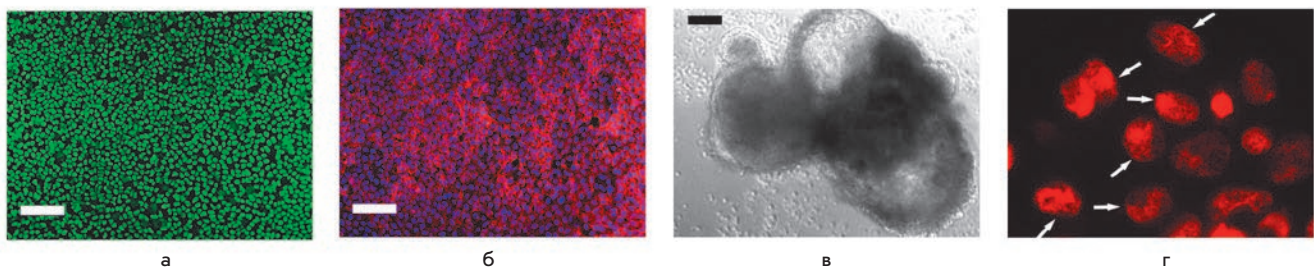


Рис. 2. Анализ свойств иПК человека, полученных из эндотелия пупочной вены: а, б – иммуногистохимический анализ иПК, окраска антителами на специфические маркеры плюрипотентности *Oct-4* (А) и *SSEA-4* (Б). Специфические сигналы окрашены зеленым (а) и красным (б), ядра в (б) окрашены синим (DAPI); в – эмбриоидные тельца, образованные иПК при культивировании в суспензии. Масштабная линейка – 100 мкм; г – интерфазные ядра иПК, окрашенные маркером активного хроматина H3me2K4 (красный). Белые стрелки указывают позицию хромосомной территории, которую занимает частично реактивированная X хромосома

тивирования как минимум на протяжении 22 пассажей. Культивирование линий иПК проводилось в бесфидерных условиях в среде mTeSR1c определенным (defined) составом. Таким образом, нами впервые были получены иПК из клеток эндотелия человека в отсутствие компонентов животного происхождения. Разработанный подход позволяет получать линии иПК, пригодные для клинического использования.

В процессе репрограммирования не только претерпевает изменения генетическая программа клетки, но и должны происходить значительные изменения в эпигенетическом состоянии соматической клетки. В процессе раннего эмбрионального развития в клетках женского организма происходит инактивация одной из X хромосом, при этом на стадии ЭСК обе X хромосомы могут быть активны. Следовательно, можно ожидать, что в процессе репрограммирования произойдут функциональные изменения, приводящие к реактивации неактивной в клетках эндотелия X хромосомы. Нами был проведен иммуноцитохимический анализ X хромосом в полученных иПК с помощью антител к активному (H3me2K4) и неактивному (H3me3K27) хроматину. Полученные результаты показали, что в иПК, на инактивированной X хромосоме, появляется маркер активного хроматина (H3me2K4) (рис. 2г), в то же время

этот маркер отсутствует на инактивированной X хромосоме в клетках эндотелия. Таким образом, нами впервые показано, что в клетках человека при генетическом репрограммировании происходит реактивация неактивной X хромосомы. Из полученных нами результатов следует, что эндотелиальные клетки человека могут быть эффективно и полностью репрограммированы до плюрипотентного состояния, что подтверждается морфологическими, молекулярными и функциональными тестами.

Несомненно, что для практического использования иПК необходимо проведение дальнейших исследований, в частности для подтверждения репрограммирования на уровне всего генома, а также подтверждения безопасности иПК в отношении опухолевой трансформации. Данное направление является одним из самых перспективных в области клеточных технологий, но при этом не следует забывать, что иПК являются лишь искусственным аналогом ЭСК, и для выяснения их прикладной значимости необходимы исследования обеих групп плюрипотентных клеток человека. ●

Исследование поддержано программой президиума РАН «Биологическое разнообразие», грантом РФФИ 09-04-12199 офн-м и ООО «ЛКТ» (Москва).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. // Science. 1998. 282(5391): 1145–1147.
2. Lagarkova M.A., Volchkov P.Y., Philonenko E.S., Kiselev S.L. // Cell Cycle. 2008. 7: 2929–2935.
3. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., et al. // Science. 1998. 282: 2095–2098.
4. Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. // Curr. Biol. 2001. 11: 1553–1558.
5. Matveeva N.M., Shilov A.G., Kaftanovskaya E.M., et al. // Mol. Reprod. Dev. 1998. 50: 128–138.
6. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. 126: 663–676.
7. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., et al. // Nat. Biotechnol. 2008. 26: 1276–1284.
8. Zhou H., Wu S., Joo J., Zhu S., Han D., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., et al. // Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. Cell Stem Cell. doi:10.1016/j.stem.2009.04.005
9. Stadtfeld M., Maherali N., Breault D.T., Hochedlinger K. // Cell Stem Cell. 2008. 2: 230–240.
10. Maherali N., Hochedlinger K. // Cell Stem Cell. 2008. 3: 595–605.
11. Loh Y.H., Agarwal S., Park I.H., et al. // Blood. Prepublished online Mar 18, 2009.