

УДК 576.363:578.828:577.214

# Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из фибробластов кожи плода человека

С. П. Медведев<sup>1</sup>, А. А. Малахова<sup>1</sup>, Е. В. Григорьева<sup>1</sup>, А. И. Шевченко<sup>1</sup>, Е. В. Дементьева<sup>1</sup>, И. А. Соболев<sup>1</sup>, И. Н. Лебедев<sup>2</sup>, А. Г. Шилов<sup>1</sup>, И. Ф. Жимулев<sup>3</sup>, С. М. Закиян<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup>НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, 634050, Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

<sup>4</sup>Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. ак. Тимакова, 2

\*E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Поступило в редакцию 10.04.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Получение и исследование аутологичных стволовых клеток человека являются актуальной задачей современной клеточной биологии и биомедицины. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки могут быть получены из соматических клеток человека путем сверхэкспрессии набора определенных генов. В данной работе проведено репрограммирование фибробластов кожи плода человека путем трансдукции ретровирусными векторами, несущими кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши. В результате получены клетки, обладающие характерными для эмбриональных стволовых клеток человека экспрессией белков и паттерном транскрипции генов. Показано, что полученные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться *in vitro* в производные эктодермы, мезодермы и энтодермы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, репрограммирование, ретровирусные векторы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека являются уникальной моделью для исследований во многих областях биомедицины, в т.ч. для изучения молекулярных основ плюрипотентности и репрограммирования клеток – процессов, происходящих во время раннего эмбриогенеза человека [1]. Кроме того, существуют большие перспективы использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в токсикологических и фармакологических исследованиях, а также в регенеративной медицине [2–4].

Задачей данной работы было получение стабильных линий плюрипотентных клеток из фибробластов кожи плода человека в результате трансдукции ретровирусными векторами, экспрессирующими гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши.

В качестве исходной линии клеток для получения ИПСК нами были взяты фибробласты кожи плода человека (9-я неделя беременности) линии MA N1. Фибробласты трансдуцировали ретровирусами, полученными в результате котрансфекции конструкций рМХs-*Oct4*, рМХs-*Sox2*, рМХs-*Klf4* и рМХs-*c-Myc*, несущих кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши [5], и плазмиды, экспрессирующей гликопротеин G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), в клетки упаковочной линии НЕК293 Phoenix, несущей

в геноме вирусные гены *Gag* и *Pol*. Для контроля трансдукции использовали ретровирус, полученный на основе конструкции рМХ-GFP (Cell Biolabs, США), кодирующей флуоресцирующий белок GFP. Трансдуцировали 1 млн фибробластов. Через 48 ч после трансдукции клетки пересаживали на слой фидера (митотически неактивные фибробласты мыши, обработанные митомицином С) в среде для культивирования ЭСК человека с добавлением 2-пропилвалериановой кислоты (VPA, концентрация 0.5 мМ). В течение второй недели после трансдукции появилось около 500 гранулярных колоний клеток, морфологически отличающихся от фибробластов. Однако данные колонии были отрицательны при окраске на щелочную фосфатазу (Alkaline Phosphatase, AP) (одного из маркеров плюрипотентных клеток). Вероятно, данные клетки соответствуют начальным стадиям репрограммирования [6]. В течение 15–30 сут после трансдукции продолжали отбор ЭСК-подобных клонов. Отбор проводили по морфологическому критерию. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Среди 200 клонов, которые продолжали культивировать, стали появляться AP-позитивные. Всего в результате эксперимента было получено 18 стабильных ЭСК-подобных линий, четыре из которых (hiPS-A24, hiPS-A29, hiPS-21L и hiPS-30L) были подробно охарактеризованы. Клетки дан-

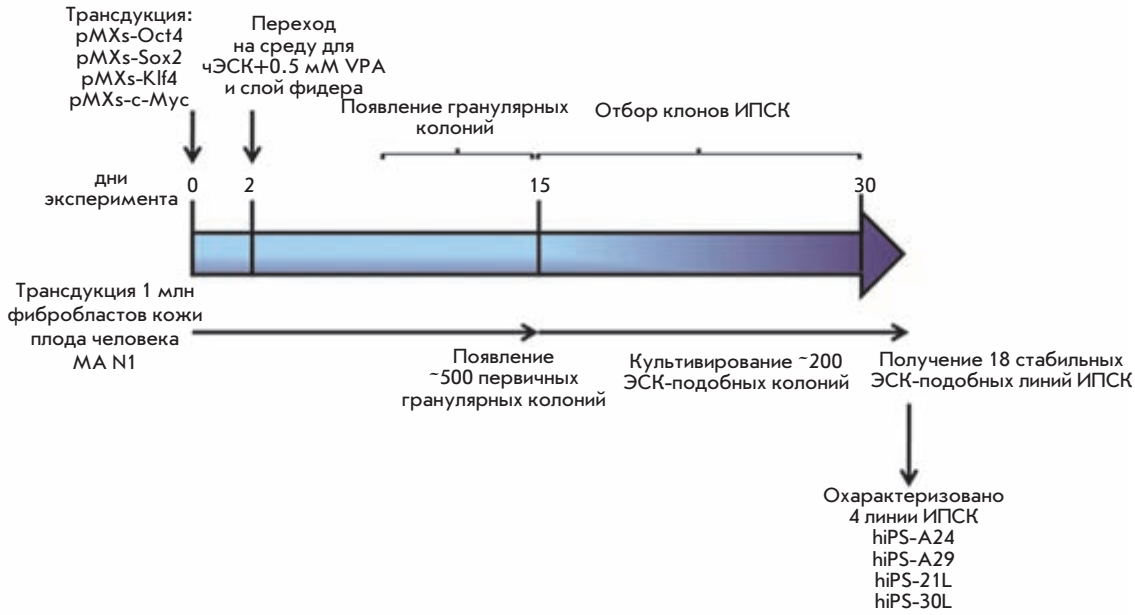


Рис. 1. Схема эксперимента по получению индуцированных плюрипотентных клеток из эмбриональных фибробластов человека.

ных клонов имеют большое ядерно-цитоплазматическое отношение, растут плотными колониями, т.е. обладают морфологическими характеристиками ЭСК человека (рис. 2А), они AP-позитивны (рис. 2Б). С помощью ПЦР было определено, что все четыре линии содержат в геноме встройки использованных ретровирусных конструкций (pMXs-Oct4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4 и pMXs-c-Myc). С помощью иммуноцитохимического метода было обнаружено, что в данных клетках экспрессируются маркеры плюрипотентных клеток: поверхностные антигены TRA-1-60, TRA-1-81 и SSEA-4, а также транскрипционные факторы NANOG и OCT4 (рис. 3). С помощью ОТ-ПЦР (обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией) была исследована транскрипция 25 генов, являющихся маркерами ЭСК человека (рис. 4А). Было обнаружено, что все четыре клон очень сходны по паттерну экспрессии генов с линией ЭСК человека HUES9, которая была взята в качестве позитивного контроля. В индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, полученных из фибробластов кожи плода,

экспрессируются такие надежные маркеры плюрипотентных клеток, как гены OCT4, NANOG, SOX2, FGF4, REX1, DNMT3B, NODAL и др. (рис. 4А). Единственное различие было обнаружено по транскрипции гена GDF3. Из четырех проанализированных линий ИПСК данный ген транскрибируется только в hiPS-21L. Из 25 маркерных генов в фибробластах MA N1 наблюдается транскрипция только генов KLF4 и c-MYC (рис. 4А). Клетки ИПСК hiPS-A24, hiPS-A29, hiPS-21L и hiPS-30L при переводе в суспензионную культуру формируют эмбриоидные тельца (рис. 4Б). ОТ-ПЦР-

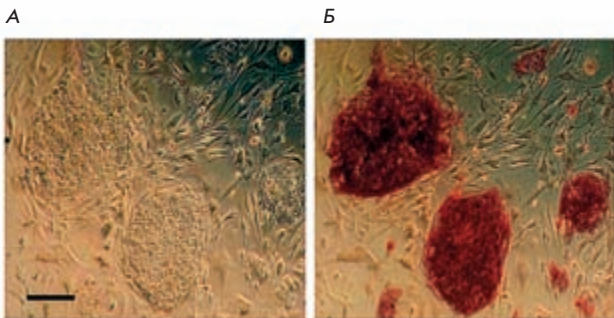


Рис. 2. А – морфология колоний ИПСК, полученных из эмбриональных фибробластов человека; Б – окраска колоний ИПСК, демонстрирующая экспрессию щелочной фосфатазы (одного из маркеров плюрипотентных клеток). Масштабная линейка – 100 мкм.

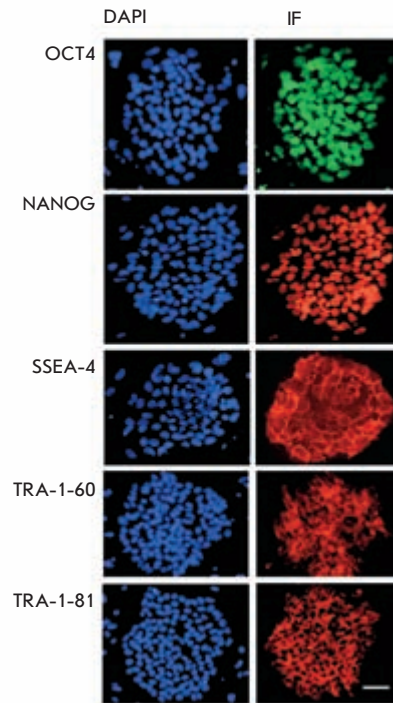
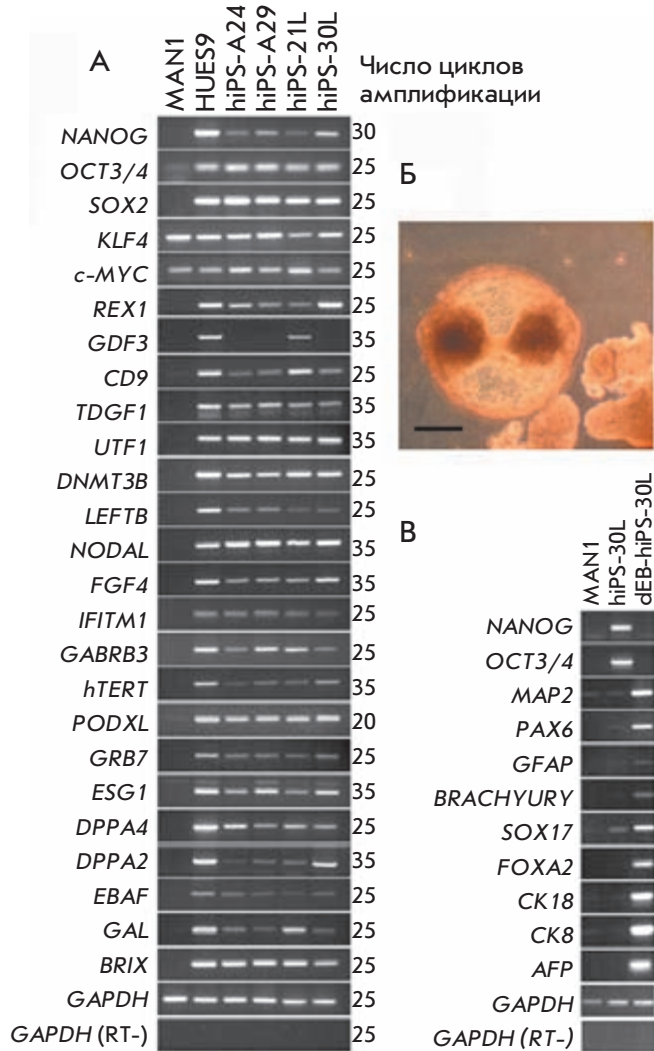
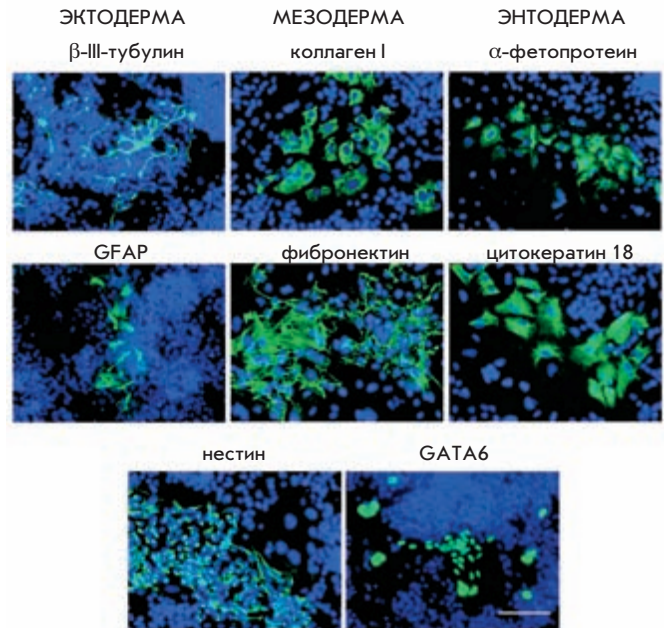


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание (IF) колоний ИПСК антителами к белкам транскрипционных факторов OCT4 (зеленый цвет) и NANOG (красный цвет), а также поверхностным антигенам: SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81 (красный цвет). Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет). Масштабная линейка – 100 мкм.



**Рис. 4.** А – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов, являющихся маркерами эмбриональных стволовых клеток человека, в эмбриональных фибробластах (MAN1), эмбриональных стволовых клетках человека (HUES9) и четырех линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: hiPS-A24, hiPS-A29, hiPS-21L и hiPS-30L; Б – эмбрионидные тельца, сформировавшиеся при переводе клона ИПСК hiPS-30L в суспензионную культуру; масштабная линейка – 100 мкм; В – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции генов, являющихся маркерами дифференцировки клеток в производные трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы), после *in vitro*-дифференцировки клеток клона hiPS-30L через образование эмбрионидных тел.

анализ клеток, получившихся после культивирования эмбрионидных тел, показал наличие маркеров производных всех трех зародышевых листков: эктодермы (MAP2, PAX6, GFAP), мезодермы (BRACHYURY) и энтодермы (SOX17, FOXA2, CK8, CK18, AFP) (рис. 4B). Иммуноцитохимический анализ клеток дезагрегированных эмбрионидных тел выявил наличие различных клеточных производных, экспрессирующих маркеры эктодермы (β-III-тубулин и GFAP), мезодермы (коллаген I и фибронектин) и энто-



**Рис. 5.** Экспрессия маркеров производных трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы) при спонтанной дифференцировке в эмбрионидных тельцах ИПСК, полученных из фибробластов кожи плода человека. Масштабная линейка – 100 мкм.

дермы (α-фетопротеин и цитокератин 18) (рис. 5). Кроме вышеперечисленных выявлены клетки, экспрессирующие маркер энтодермы и мезодермы GATA6, а также белок нестин, который является маркером производных эктодермы и мезодермы (рис. 5). Таким образом, было показано, что полученные ИПСК человека обладают широким потенциалом дифференцировки *in vitro*. Каротиотипический анализ полученных линий ИПСК показал, что они имеют нормальный набор хромосом – 46, XY.

Таким образом, было показано, что экспрессия генов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* мыши в клетках человека способна вызывать репрограммирование и образование стабильных клонов ИПСК, по своим характеристикам аналогичных ЭСК человека. Репрограммирование фибробластов с помощью ретровирусных конструкций является воспроизводимым методом, позволяющим получать в относительно короткий срок большое количество клонов плюрипотентных клеток. ●

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Yamanaka S. // Cell. 2009. V. 137. P. 13–17.
2. Park I.H., Arora N., Huo H., et al. // Cell. 2008. V. 134. P. 877–886.
3. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F., Jr., et al. // Nature. 2009. V. 457. P. 277–280.
4. Lee G., Papapetrou E.P., Kim H., et al. // Nature. 2009. V. 461. P. 402–406.
5. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
6. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. // Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.