

УДК 577.21

# Дифференцировка плюрипотентных клеток человека в мезодермальные и эктодермальные производные не зависит от типа репрограммированных изогенных соматических клеток

Е. С. Филоненко<sup>1\*</sup>, М. В. Шутова<sup>1\*</sup>, Е. А. Хомякова<sup>1,2</sup>, Е. М. Васина<sup>1</sup>, О. С. Лебедева<sup>2</sup>, С. Л. Киселев<sup>1,2,3</sup>, М. А. Лагарькова<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>2</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1А

<sup>3</sup>Казанский федеральный университет, 420000, Казань, ул. Кремлевская, 18

\*Эти авторы внесли равный вклад в работу.

\*E-mail: lagar@vigg.ru

Поступила в редакцию 22.04.2016

Принята к печати 01.06.2016

**РЕФЕРАТ** Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) обладают способностью к неограниченной пролиферации и дифференцировке во все типы соматических клеток. Это делает их универсальным источником клеток для исследований и клинического применения. Однако процесс репрограммирования клеток того или иного типа, отбор клонов, проведение генетических манипуляций могут влиять на свойства как иПСК, так и получаемых из них дифференцированных производных. Для оценки этого влияния использована изогенная система линий иПСК, полученных методом репрограммирования из трех типов соматических клеток, дифференцированных из эмбриональных стволовых клеток человека. Показано, что технологические манипуляции *in vitro*, такие, как сортировка клеток и отбор клонов, не приводят к эффекту «бутылочного горлышка», а изогенные иПСК, полученные из различных соматических клеток, не отличаются по способности к дифференцировке в гемопоэтическом и нейральном направлениях. Таким образом, для использования иПСК в научных или практических целях не принципиально, из клеток какого типа получены полностью репрограммированные клетки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гемопоэз, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, метилирование, нейроны, транскрипция, эмбриональные стволовые клетки человека.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ПСК — плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол.

## ВВЕДЕНИЕ

Изменение эпигенетического состояния клетки с помощью тех или иных внешних условий кардинальным образом влияет на программу специализированной соматической клетки [1, 2]. При этом наиболее часто используемые интеграционные вирусные или неинтеграционные способы репрограммирования до плюрипотентного состояния не влияют существенно на геном соматических клеток, подвергающихся репрограммированию [3]. Практическое

использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в медицинских или исследовательских целях подразумевает применение дифференцированных производных плюрипотентных клеток. Протоколы направленной дифференцировки основаны, главным образом, на изменении эпигенетического состояния плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) при воздействии на них условий, которые имитируют процессы, происходящие во время индивидуального развития организма.

Таким образом, изначальное эпигенетическое состояние и вариабельность отдельных линий iPСК, даже полученных из одного источника, могут оказывать значительное влияние на конечный результат дифференцировки. Например, для выбора линии iPСК, наиболее подходящей для трансплантации полученного из нее пигментного эпителия сетчатки глаза, проанализировано 25 линий клеток [4], что требует очень много времени и материалов. С целью изучения вклада процесса репрограммирования и эпигенома соматической клетки в конечное состояние iPСК, а также оптимизации выбора линий репрограммированных клеток нами ранее была разработана система изогенных линий плюрипотентных и соматических клеток. Изогенная система клеточных линий позволила показать, что при полном функциональном репрограммировании в клонах iPСК не остается следов их тканеспецифического происхождения. Однако в репрограммированных клетках присутствовали индивидуальные, специфичные для каждого клона iPСК «эпигенетические следы», говорящие о том, что приобретение клетками плюрипотентности произошло не обычным путем, а через прохождение клеткой состояния, отличного от зародышевого пути [5]. Появление этих индивидуальных, не связанных с репрограммированием особенностей может быть вызвано технологическими манипуляциями *in vitro*, такими, как клонирование, сортировка клеток и др. Несомненно, направленное влияние таких манипуляций на геном может отрицательно сказаться на дальнейшем применении iPСК. Так, широко обсуждается возможность создания банков репрограммированных линий клеток – как персональных, так и универсальных линий iPСК, которые будут совместимы с большим количеством реципиентов [6]. При этом открытым остается вопрос, донорские клетки какого типа (фибробласты кожи, клетки крови, волосяной луковицы и т.д.) необходимо применять для репрограммирования. По результатам наших и других исследований можно сделать вывод о функциональной идентичности изогенных iPСК, полученных из соматических клеток различного типа [5, 7]. Однако, учитывая, что в дальнейшем их придется дифференцировать в специализированные типы клеток *in vitro*, необходимо знать, насколько будет различаться их способность к дифференцировке.

В представленной работе изучали влияние генетических манипуляций, отбора клонов и разделения клеток *in vitro* на молекулярно-генетические свойства iPСК. С этой целью использовали линии изогенных соматических клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК), и их репрограммированные в iPСК производные. Сравнивали способность к дифференцировке изо-

генных линий iPСК, репрограммированных из соматических клеток трех типов, в нейрональном и гемопоэтическом направлениях.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии

В работе использовали линии клеток hESM01, hESM01n5 (далее n5), фибробласты, нейроны, клетки пигментного эпителия сетчатки, дифференцированные из hESM01n5 (F,N,R соответственно), и линии iPСК iF, iN, iR, полученные путем генетического репрограммирования линий F, N, R соответственно [5].

В экспериментах по гемопоэтической дифференцировке использовали линии ЭСК HUES 9 [8], H9 [9], линии iPСК endo-iPS12 [10] и IPSRG2L [11]. Линии endo-iPSS5 и endo-iPSS9 получены репрограммированием клеток HUVEC с помощью вируса Сендай. Линии iPСК культивировали согласно [5].

### Среды для гемопоэтической дифференцировки

Среда 1 для эмбрионидных телец (ЭТ1): Stemline II (Sigma), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», 5000 Ед/мл пенициллина и 5000 Ед/мл стрептомицина), VEGF (Prepro Tech) 100 нг/мл, BMP-4 (Prepro Tech) 50 нг/мл, FGF (Prepro Tech) 20 нг/мл.

Среда 2 для эмбрионидных телец (ЭТ2): Stemline II (Sigma), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», 5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 ЕД/мл стрептомицина), VEGF (Prepro Tech) 100 нг/мл, BMP-4 (Prepro Tech) 50 нг/мл, FGF (Prepro Tech) 20 нг/мл, цитокиновый коктейль CC110 (Stemcell Technologies) 100-кратный или SCF (Prepro Tech) 20 нг/мл. Гемангиобласты культивировали в полужидкой среде (СГБ): Methocult 4436 (Stemcell Technologies), FGF (Prepro Tech) 20 нг/мл, VEGF (Prepro Tech) 50 нг/мл, SCF (Prepro Tech) 20 нг/мл, FLT3-L (Prepro Tech) 20 нг/мл, TPO (Prepro Tech) 20 нг/мл, рекомбинантный НохВ4 2 мкг/мл.

### Гемопоэтическая дифференцировка ПСК

ПСК культивировали на 35-мм чашке Петри (Corning), покрытой Matrigel matrix (BD), и выращивали до 70% монослоя и обрабатывали 0.05% раствором Trypsin-EDTA до одноклеточного состояния. Трипсин инактивировали, добавляя среду DMEM («ПанЭко») с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco). Эмбрионидные тельца формировали в Aggrewell (Stemcell Technologies) в течение 24 ч в среде mTeSR1 (Stemcell Technologies) с добавлением 10 мкМ Y-27632 (Stemgent). Переносили эмбрионидные тельца в 24-луночный планшет с низкой адгезией (Costar) в объеме 1 мл на лунку в среде ЭТ1 и инкубировали в течение 48 ч. Из лунки отби-

рали 500 мкл, добавляли 500 мкл среды ЭТ2 и инкубировали в течение 48 ч. Эмбрионидные тельца обрабатывали 0.05% Trypsin-EDTA в течение 4–6 мин. Затем трипсин инактивировали, добавляя среду DMEM с 10% FBS. Клетки центрифугировали в течение 5 мин при 200 g. Клетки (200–500 тыс. в объеме не более 100 мкл среды IMDM («ПанЭко»)) вносили в лунки 6-луночного планшета с низкой адгезией (Costar) со средой СГБ, используя шприцы (Stemcell Technologies) с тупой иглой для метилцеллюлозы. Инкубировали в течение 6–8 дней. Добавляли еще 2 мл СГБ и инкубировали 2–4 дня. Для сравнения эффективности дифференцировки подсчитывали количество колоний гемангиобластов на 10 день после внесения в СГБ.

Способность гемангиобластов дифференцироваться в клетки крови проверяли путем внесения гемангиобластов в метилцеллюлозную среду Methocult 4436 (Stemcell Technologies). Результат оценивали по истечении 3 недель.

### Нейрональная дифференцировка

Нейрональную дифференцировку в нейральные предшественники и нейроны проводили согласно [11]. FACS-анализ нейральных предшественников проводили с использованием антител к CD56 PE Abcam cat # 2412540 (Sony Biotechnology) (в разведении 1 : 25) и изотипического контроля Mouse IgG1PE Abcam cat # 2600560 (1 : 166). Для флуоресцентного анализа использовали антитела к βIII-тубулину в разведении 1 : 1000 (Abcam), вторичные антитела Invitrogen Goat anti Rabbit IgG Alexa Fluor 488 в разведении 1 : 1000.

Выделение суммарной РНК из клеточных культур, ПЦР в реальном времени проводили согласно [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Отбор и селекция иПСК не вносят системных изменений в метилирование и транскрипцию генов

Работа с культурами ПСК человека и особенно генетические манипуляции с этими клетками сопряжены с селекцией и/или клонированием клеток. Ранее мы получили и описали изогенную клеточную систему, которая позволяет изучать молекулярные механизмы процессов репрограммирования и дифференцировки [5]. В процессе создания изогенной системы несколько раз проводили последовательный отбор клонов и сортировку клеток (рис. 1). В связи с этим возник вопрос, насколько манипуляции клонирования ПСК человека в культуре могут оказывать системное влияние на полногеномном уровне на экспрессию генов и метилирование ДНК, приводя к тому, что экспрессия некоторых генов и паттерны метилирования CpG изменялись просто из-за про-

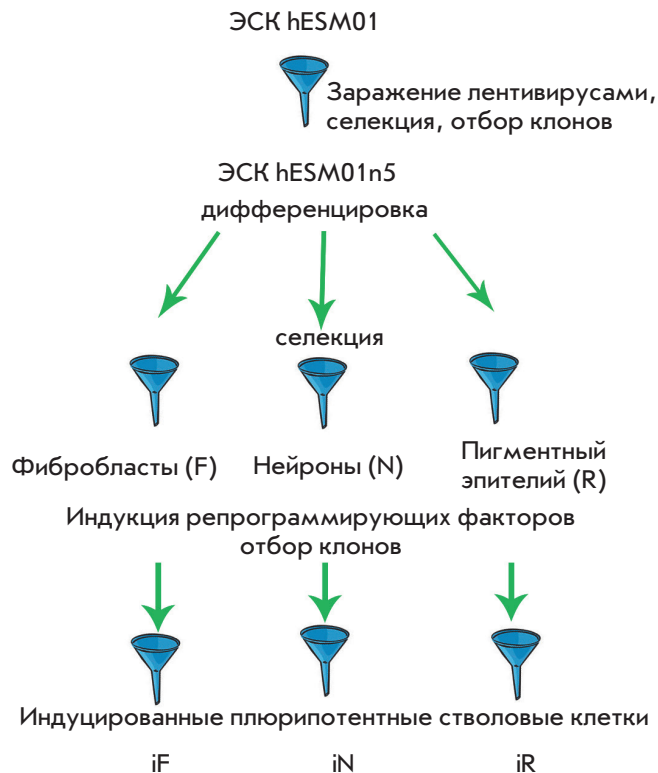


Рис. 1. Общая схема создания изогенной системы ПСК человека с изображением критических этапов прохождения клеточных популяций через «бутылочное горлышко» селекции и клонирования

хождения через «бутылочное горлышко» отбора. Селективное давление может приводить к повышенной экспрессии генов, связанных с выживанием клеток, и давать им преимущество в росте без изменения других свойств [12]. В разработанной нами системе (рис. 1) в линию ЭСК человека hESM01 были введены гены факторов репрограммирования под контролем индуцибельного промотора и выбран клон hESM01n5 (далее n5), который имел наименьший уровень «подтекания» трансгенов и сохранил свойство плюрипотентности [5]. На следующем раунде отбора использовали магнитную сортировку дифференцированных производных n5 с помощью антител к специфическим маркерам трех типов соматических клеток человека. Последний раунд прохождения через «бутылочное горлышко» произошел после индукции трансгенов и отбора клонов иПСК (рис. 1). Нами был проведен анализ профиля экспрессии генов и уровня метилирования ДНК (база данных GSE70739) в каждой линии клеток, полученных на каждом этапе разработки системы. Мы предположили, что селективное давление может приводить к последовательному изменению экспрессии и/или метилирования

**Таблица 1.** Гены, экспрессия которых последовательно возрастает или снижается в процессе дифференцировки ЭСК и последующего репрограммирования

иПСК	Увеличение экспрессии	Уменьшение экспрессии
iF	<i>CTGF, TAGLN</i>	<i>SOX15</i>
iN	<i>ACSL4, DDIT4, TIMP1, LOC730278</i>	<i>LFNG</i>
iR	<i>MT1A</i>	

генов, обеспечивать им преимущество в выживании и пролиферации. Для того чтобы идентифицировать гены и CpG, уровень экспрессии и метилирования которых постепенно повышался или понижался в ходе процедур отбора клеток, сравнивали уровни экспрессии/метилирования в иПСК, в родительских линиях соматических клеток и в изогенной линии ЭСК n5. Значимым считали поэтапное увеличение/уменьшение со значением 0.2 для метилирования CpG и изменение в 1.5 раза в случае экспрессии генов. Анализировали данные для 11 клеточных линий (две линии ЭСК, три линии соматических клеток и шесть линий иПСК), клетки которых прошли по три раунда «бутылочного горлышка». Было обнаружено, что транскрипция очень небольшого количества генов постепенно уменьшалась или увеличивалась во время манипуляций с клетками, но уровень транскрип-

ции ни одного гена не изменился во всех клеточных линиях синхронно (табл. 1). Это свидетельствует в пользу того, что использованный подход, идентичный для всех линий иПСК, не внес системных изменений в экспрессионный профиль клеток, а наблюдаемые отклонения в экспрессии были случайными. Однако анализ профиля метилирования изогенных линий ПСК и соматических клеток выявил постепенное увеличение уровня метилирования гена *Rex1* (также известного как *ZFP42*) (табл. 2). В настоящее время не существует однозначной информации о функции этого гена в раннем эмбриональном развитии. По мнению одних исследователей этот ген считается маркером плюрипотентности [13], однако, даже в его отсутствие ЭСК мыши способны к самообновлению и остаются плюрипотентными [14]. Как показано ранее, в ЭСК человека *Rex1* экспрессируется даже при 50% метилировании промотора [15]. С использованием ПЦР в реальном времени мы проанализировали уровень экспрессии *Rex1* и сопоставили его с метилированием промоторного участка (рис. 2). Уровень экспрессии *Rex1*, так же как и степень метилирования его промотора, существенно варьировали в проанализированных линиях плюрипотентных клеток. Однако мы не обнаружили корреляции между уровнем метилирования *Rex1* и его экспрессией. Например, в двух клонах iN (иПСК, полученные из нейронов) и одном клоне iR (иПСК, полученные

**Таблица 2.** Гены, уровень метилирования CpG которых последовательно возрастает или снижается в процессе дифференцировки ЭСК и последующего репрограммирования

Повышение уровня метилирования			Снижение уровня метилирования		
iF	iN	iR	iF	iN	iR
<i>IRX1</i>	<i>ZFP42</i>	<i>AJAP1</i>	<i>AJAP1</i>	<i>MSL3</i>	<i>LOC284661</i>
<i>AJAP1</i>	<i>BANK1</i>	<i>PAX8</i>	<i>CHL1</i>		<i>CD1C</i>
<i>REC8</i>	<i>ZNF454</i>	<i>ZFP42</i>	<i>MARCKS</i>		<i>RTKN</i>
<i>C19orf41</i>	<i>HIST1H1A</i>	<i>SIM1</i>	<i>ZNF311</i>		<i>RAET1L</i>
<i>CBLN4</i>	<i>LOC390595</i>	<i>DPP6</i>	<i>GCM2</i>		<i>GPNMB</i>
<i>ZNF542</i>	<i>ZNF829</i>	<i>GNA14</i>	<i>DPP6</i>		<i>CSMD1</i>
<i>ZFP28</i>	<i>ZNF626</i>	<i>ARHGAP22</i>	<i>TCERG1L</i>		<i>MGMT</i>
<i>LOC390595</i>	<i>ZNF568</i>	<i>FIGNL2</i>	<i>MGMT</i>		<i>TCERG1L</i>
<i>TMEM132C</i>	<i>ZFP28</i>	<i>TBX5</i>	<i>GALNT9</i>		<i>DNAH9</i>
<i>EBF3</i>		<i>A2BP1</i>	<i>TMEM121</i>		<i>BAHCC1</i>
<i>PTPRN2</i>		<i>CCDC102A</i>	<i>BAHCC1</i>		
<i>ZFP42</i>		<i>HS3ST4</i>	<i>SHISA6</i>		
		<i>ARHGAP23</i>	<i>C22orf34</i>		
		<i>SHISA6</i>			
		<i>TMEM200C</i>			
		<i>MYH14</i>			
		<i>AFF2</i>			



из пигментного эпителия сетчатки) уровень экспрессии *Rex1* был более чем в 3 раза выше, чем во всех остальных линиях ПСК (рис. 2). Таким образом, культивирование, репрограммирование и отбор, которые привели к гиперметилированию промоторной области *Rex1*, не влияли на экспрессию гена в линиях иПСК. Это наблюдение дополнительно подтверждает предположение о вспомогательной роли *Rex1* в поддержании клетками плюрипотентности, а также указывает на то, что экспрессия *Rex1* не зависит от статуса метилирования и крайне неоднородна в разных линиях иПСК, как отмечали ранее [12, 15]. В целом, полученные результаты говорят о том, что процедуры генетических модификаций, селекция клонов и сортировка клеток не оказывают системного влияния на полногеномном уровне на экспрессию генов и метилирование ДНК в ПСК человека. Этот вывод имеет большое практическое значение в связи с возможным применением технологий с использованием ПСК человека в регенеративной медицине.

### Сравнение способности изогенных ПСК к дифференцировке в гемопоэтическом направлении

Разработанная изогенная система анализа репрограммирования и дифференцировки ПСК человека позволила доказать, что для репрограммирования можно использовать соматические клетки любого типа, так как в установление и поддержание состояния плюрипотентности тип использованных клеток ощутимого вклада не вносит [5]. Однако, учитывая, что в дальнейшем будут использоваться дифференцированные производные ПСК, остается открытым вопрос, насколько тип соматических клеток, из которых получены иПСК, будет влиять на эффективность дифференцировки. Для оценки такого влияния было решено изучить эффективность дифференцировки изогенных иПСК человека, полученных из фибробластов (iF), нейронов (iN) и пигментного эпителия сетчатки (iR), в гемопоэтические клетки и нейроны. Для оценки эффективности гемопоэтической дифференцировки ПСК через стадию эмбрионидных телец были дифференцированы в ранние мезодермальные производные (рис. 3А). Полученные ранние мезодермальные производные обладали свойствами гемангиобласта, так как могли дифференцироваться в клетки крови (рис. 3Б) и эндотелий (данные не приведены). При внесении гемангиобластов в полужидкую метилцеллюлозную среду, содержащую гемопоэтические цитокины и факторы роста, гемангиобласты образовывали разные типы гемопоэтических колоний – эритроидные (КОЕ-Э), макрофагальные (КОЕ-М), гранулоцитарные (КОЕ-Г), смешанные гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-

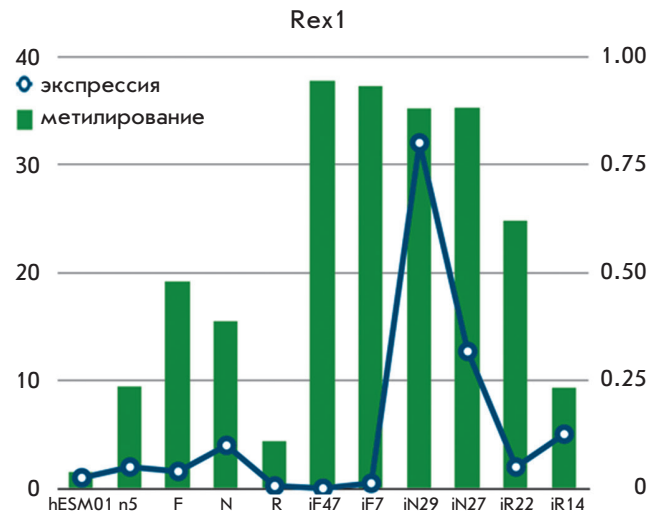


Рис. 2. Постепенное повышение (более чем на 0.2) уровня метилирования *Rex1* не коррелирует с его уровнем экспрессии. Бета-значения, основанные на данных Illumina 450K, использованы для оценки уровня метилирования ( $P < 0.01$ ,  $fdr < 0.05$ ), ПЦР в реальном времени использовали для анализа экспрессии гена (уровень экспрессии *GAPDH* использован в качестве референсного значения, линия hESM01 – для оценки базального уровня)

ГМ), а также колонии смешанного типа КОЕ-микс, что говорит о том, что гемангиобласты принадлежат к клеткам кроветворного ряда. Примеры подобных колоний приведены на рис. 3Б. Способность различных линий иПСК дифференцироваться оценивали по количеству образующихся на 10 день в СГБ колоний гемангиобластов. Проведенный подсчет показал, что способность ПСК к дифференцировке в гемопоэтическом направлении сильно варьирует между линиями, но не зависит от их происхождения. Например, самой низкой эффективностью гемопоэтической дифференцировки обладала линия hESM01 (рис. 3В), а линия n5, полученная на ее основе, характеризовалась значительно большей эффективностью гемопоэтической дифференцировки. Между собой изогенные линии иПСК практически не отличались по способности дифференцироваться, несмотря на то, что были получены из производных разных зародышевых листков. Фибробласты и клетки крови принадлежат к одному зародышевому листку, однако эффективность дифференцировки iF была сравнимой с изогенными иПСК других типов соматических клеток, полученных одновременно с ними. Остальные линии, использованные в качестве линий сравнения, проявляли различную эффективность дифференцировки. Следует отметить, что, в отличие

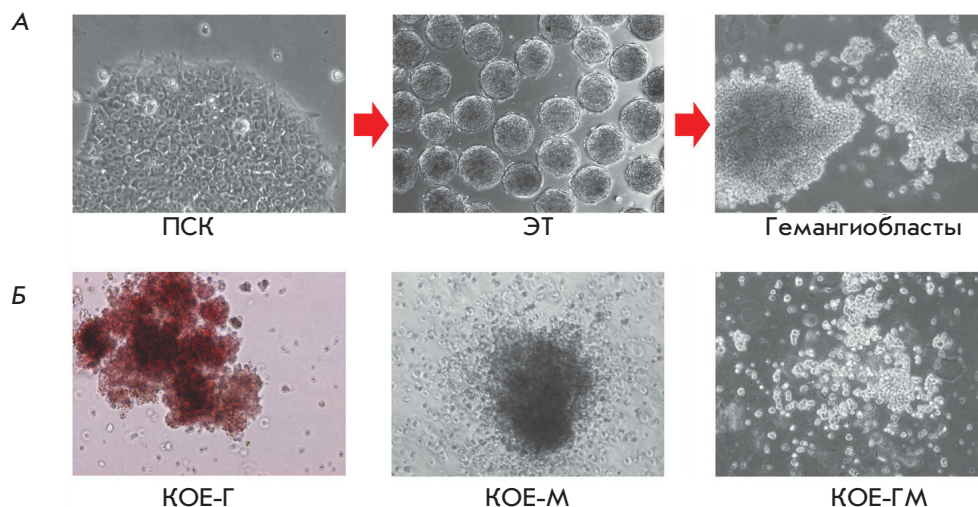
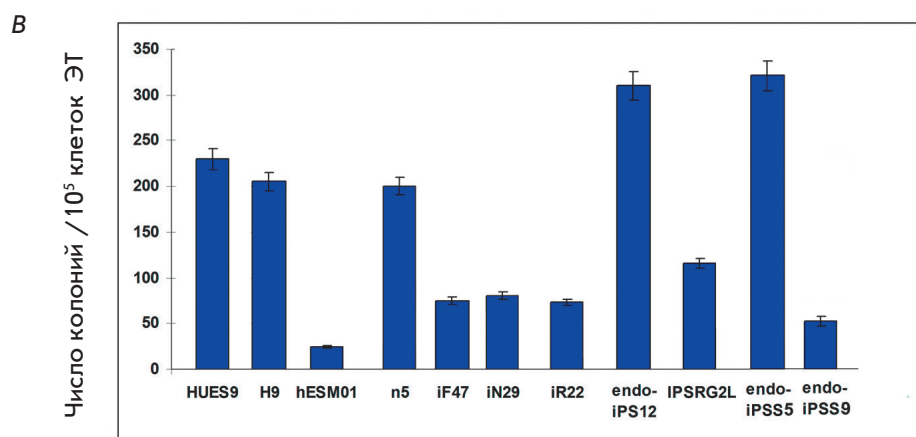


Рис. 3. Гемопоэтическая дифференцировка iPСК. А – ПСК, эмбрионидные тельца и гемангиобласты, полученные из ПСК. Показана линия n5. Б – примеры гемопоэтических колоний, образованных в метилцеллюлозе. В – сравнение числа гемопоэтических колоний, образованных в метилцеллюлозе на 10-й день из разных линий ПСК

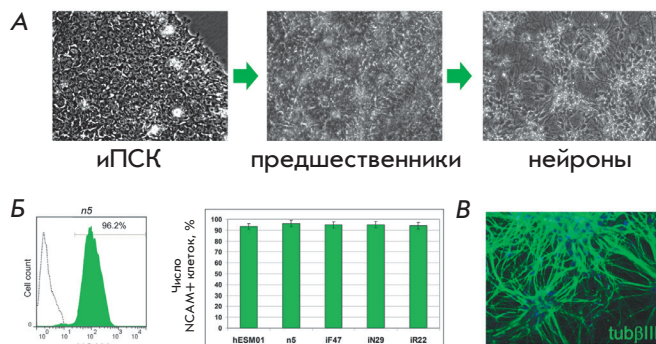


от ранее опубликованных данных, мы не наблюдали сниженной эффективности дифференцировки линий iPСК человека в гемопоэтическом направлении по сравнению с ЭСК [16]. Эти результаты указывают на то, что способность к гемопоэтической дифференцировке является внутренним свойством каждой конкретной линии ПСК и оптимальное направление дифференцировки можно выбрать, используя, например, gene cards [17]. Изогенные линии iPСК имели практически одинаковую способность к дифференцировке в гемопоэтическом направлении, так как, по-видимому, одинаковый способ и одновременность репрограммирования, а также культивирования и прочие внешние условия внесли большой вклад в сходство линий, чем было заложено различий в их тканевом происхождении.

**Сравнение способности изогенных ПСК к дифференцировке в нейрональном направлении**  
 Одно из наиболее востребованных направлений использования дифференцированных производных

ПСК – изучение функционирования нервной системы и терапия нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим актуальным становится сравнительный анализ эффективности дифференцировки изогенных ПСК в нейрональном направлении. Для этого исходную линию ЭСК и изогенные ей iPСК iN, iF, iR дифференцировали по нейрональному пути (рис. 4А). Эффективность дифференцировки оценивали по иммуноцитохимической окраске клеток и с помощью проточной цитофлуориметрии на стадии нейрональных предшественников, несущих поверхностный антиген CD56 (NCAM). Разработанный протокол позволял с высокой эффективностью получать нейрональные предшественники, более 90% клеток были положительными по NCAM (рис. 4Б). Мы не обнаружили различий в эффективности дифференцировки до стадии нейрональных предшественников между линиями ПСК различного происхождения. В ходе последующей дифференцировки были получены постмитотические нейроны (рис. 4В), которые проанализировали им-

муногистохимически на наличие  $\beta$ III-тубулина. Мы также не обнаружили статистически значимых различий между линиями ПСК в эффективности дифференцировки в постмитотические нейроны (данные не приведены). Таким образом, как и в случае с гемопоэтической дифференцировкой, тип соматических клеток, использованных для репрограммирования, не играет роли в эффективной дифференцировке ПСК по нейрональному пути. Из полученных результатов следует несколько важных практических выводов. Во-первых, при создании банка аллогенных иПСК с целью их дальнейшего применения в виде дифференцированных производных не важен тип соматических клеток, использованных для репрограммирования. От одного донора можно брать клетки кожи или крови, а от другого – нервную ткань (если она доступна). При этом полностью репрограммированные иПСК могут быть идентичными по своему потенциалу дифференцировки. Кроме того, нами показано, что ни генетические манипуляции, ни селекция клонов ПСК не оказали системного влияния на их свойства. Несомненно, экспрессия генов скорее связана с изменениями в хроматине, чем с мутациями, влияющими на работу гена. Это дополнительно подтверждают недавно опубликованные данные о высокой генетической стабильности ПСК [18]. Хотя ранее были обнаружены значительные вариации в эпигенетических маркерах ПСК человека [19, 20], данные последних исследований свидетельствуют о том, что современные методы культивирования ПСК человека позволяют сохранять эпигенетический профиль на протяжении длительного срока. Таким образом, линии ПСК и их производные уже сегодня могут представлять собой хорошо стандар-



**Рис. 4.** Эффективность дифференцировки в нейральном направлении не зависит от тканевого происхождения иПСК. А – схема дифференцировки ПСК в нейроны. иПСК дифференцируются до стадии нейральных предшественников, далее, в присутствии нейротрофических факторов – в нейроны. Б – результаты проточной цитометрии NCAM+ нейральных предшественников, полученных из изогенных ЭСК и иПСК. Слева – результаты проточной цитометрии нейральных предшественников, полученных из линии n5 (зеленый), изотип – контроль не закрашен. Справа – обобщенные результаты проточной цитометрии пяти линий в виде диаграммы. В – иммуногистохимический анализ нейронов, дифференцированных из иПСК. Зеленый – антитела к  $\beta$ III-тубулину, ядра окрашены DAPI (синий)

тизованные культуры, что открывает возможность их практического использования.

*Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 15-04-05675 и гранта Российского научного фонда № 14-15-00930.*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
2. Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D.R., Yang T.Q., Citri A., Sebastiano V., Marro S., Südhof T.C., et al. // Nature. 2011. V. 476. № 7359. P. 220–223.
3. Bhutani K., Nazor K.L., Williams R., Tran H., Dai H., Džakula Ž., Cho E.H., Pang A.W., Rao M., Cao H., et al. // Nat. Commun. 2016. V. 7. № 10536. doi: 10.1038/ncomms10536.
4. Kamao H., Mandai M., Okamoto S., Sakai N., Suga A., Sugita S., Kiryu J., Takahashi M. // Stem Cell Repts. 2014. V. 2. № 2. P. 205–218.
5. Shutova M.V., Surdina A.V., Ischenko D.S., Naumov V.A., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Alekseev D.G., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // Cell Cycle. 2016. V. 15. № 7. P. 986–997.
6. Andrews P.W., Cavagnaro J., Deans R., Feigal E., Horowitz E., Keating A., Rao M., Turner M., Wilmut I., Yamanaka S. // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. № 8. P. 724–726.
7. Kyttälä A., Moraghebi R., Valensisi C., Kettunen J., Andrus C., Pasumarthy K.K., Nakanishi M., Nishimura K., Ohtaka M., Weltner J., et al. // Stem Cell Repts. 2016. V. 6. № 2. P. 200–212.

8. Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., et al. // N. Engl. J. Med. 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.
9. 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.
10. 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.
11. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Sulдина L.A., et al. // Mol. Neurodegener. 2016. V. 11. № 27.
12. International Stem Cell Initiative, Amps K., Andrews P.W., Anyfantis G., Armstrong L., Avery S., Baharvand H., Baker J., Baker D., Munoz M.B., et al. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. № 12. P. 1132–1144.
13. Altarescu G., Renbaum P., Eldar-Geva T., Brooks B., Varsnaver I., Avitzour M., Margalioth E.J., Levy-Lahad E., Elstein D., Epsztejn-Litman S., et al. // Prenat. Diagn. 2011. V. 31. № 9. P. 853–860.

14. Masui S., Ohtsuka S., Yagi R., Takahashi K., Ko M.S., Niwa H. // *BMC Dev. Biol.* 2008. V. 8. № 45.
15. Bhatia S., Pilquill C., Roth-Albin I., Draper J.S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. e57276.
16. Feng Q., Lu S.J., Klimanskaya I., Gomes I., Kim D., Chung Y., Honig G.R., Kim K.S., Lanza R. // *Stem Cells.* 2010. V. 28. № 4. P. 704–712.
17. Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu, H., Boulting G., Smith Z.D., Ziller M., Croft G.F., Amoroso M.W., Oakley D.H., et al. // *Cell.* 2011. V. 144. P. 439–452.
18. Rouhani F.J., Nik-Zainal S., Wuster A., Li Y., Conte N., Koike-Yusa H., Kumasaka N., Vallier L., Yusa K., Bradley A. // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. № 4. e1005932.
19. Lagarkova M.A., Volchkov P.Y., Lyakisheva A.V., Philonenko E.S., Kiselev S.L. // *Cell Cycle.* 2006. V. 5. № 4. P. 416–420.
20. Allegrucci C., Wu Y.Z., Thurston A., Denning C.N., Priddle H., Mummery C.L., Ward-van Oostwaard D., Andrews P.W., Stojkovic M., Smith N., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 10. P. 1253–1268.