

УДК 577.21:576.364:615.085:576.367

Репрограммирование клеток дермальной папиллы человека до плюрипотентного состояния

И. А. Мучкаева^{1,2*}, Э. Б. Дашинимаев^{1,2}, А. С. Артюхов², Е. П. Мягкова^{1,2}, Е. А. Воротеяк^{1,2}, Е. Е. Егоров³, Х. С. Вишнякова³, Ю. Е. Кравченко^{3,4}, С. П. Чумаков^{3,4}, В. В. Терских¹, А. В. Васильев¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: izomerizaciya@list.ru

Поступила в редакцию 02.08.2013

РЕФЕРАТ Клетки дермальной папиллы (ДП) – уникальные региональные стволовые клетки кожи, оказывающие индукционное влияние на формирование и цикл регенерации волосяного фолликула. Ввиду того, что клетки ДП являются мультипотентными стволовыми клетками, мы предположили, что эффективность репрограммирования клеток ДП будет выше, чем эффективность репрограммирования дермальных фибробластов. При помощи трансфекции лентивирусными конструкциями, которые содержат гены репрограммирующих факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, и добавлении вальпроевой кислоты в условиях физиологического уровня кислорода (5%) из клеток ДП человека мы получили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Эффективность репрограммирования клеток ДП составила $\approx 0.03\%$, в то время как эффективность репрограммирования дермальных фибробластов при тех же условиях составила $\approx 0.01\%$. Таким образом, мы показали, что клетки ДП можно использовать как альтернативный источник индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клетки дермальной папиллы волосяного фолликула, репрограммирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; иДПК – иПСК, полученные из культуры клеток ДП; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; клетки ДП – клетки дермальной папиллы; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки (иПСК и ЭСК); ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ЩФ – щелочная фосфатаза; DMEM/F12 – смесь модифицированной по способу Дульбекко среды Игла и субстрата Хэма F12; FBS – фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum); PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline).

ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных задач в области изучения стволовых клеток – получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), которые представляют интерес для биологии развития и медицины. Современные клеточные технологии позволяют получать различные линии иПСК, которые можно использовать при моделировании многих заболеваний и испытании новых лекарственных средств. Развитие терапии, основанной на иПСК, связывают с получением продуктов для заместительной фер-

ментной терапии, а в дальнейшем и для нужд клеточной трансплантологии.

Клетки дермальной папиллы волосяного фолликула представляют собой региональные стволовые клетки кожи и являются уникальным объектом исследования. Они играют центральную роль в морфогенезе и цикле роста волосяного фолликула. В цикле роста волоса реорганизация волосяного фолликула происходит в результате серии индукционных взаимодействий между эпителиальными и мезенхимными клетками кожи. Еще в 1967 г. Oliver показал,

что клетки ДП способны индуцировать образование волосяных фолликулов [1]. Клетки ДП волосяного покрова головы происходят из нервного гребня, клетки ДП дорсальной стороны туловища – производные дерматома сомитов, а клетки ДП вентральной стороны туловища берут начало от висцерального листка спланхнотома. Известно, что в интактных клетках ДП работают сигнальные пути WNT, BMP и FGF [2]. Активация этих сигнальных путей способствует поддержанию индукционных свойств клеток ДП в культуре. Среди маркеров клеток дермальной папиллы выделяют щелочную фосфатазу (ЩФ), версикан, CD133 (у мыши), *Noggin*, *Lef1*. Вероятнее всего, наиболее точным маркером клеток ДП является ЩФ. Наибольшая экспрессия этого фермента достигается в раннем анагене. ЩФ рассматривают как индикатор индукционной способности ДП. Версикан представляет собой протеогликан внеклеточного матрикса, который синтезируется в анагене. При пассировании клеток ДП многие белки, в том числе и упомянутые ранее, очень часто не детектируются, и индукционный потенциал клеток ДП со временем исчезает.

К началу нашего исследования мы не имели сведений о публикациях, посвященных репрограммированию клеток ДП волосяного фолликула человека. Многие авторы считают, что для успешного репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния необходимо индуцировать в них экспрессию четырех транскрипционных факторов плюрипотентности – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* [3–5]. Higgins и соавт. [6] показали, что в клетках ДП человека при культивировании начинают синтезироваться *Klf4* и *c-Myc*, которые не детектируются в интактной ДП. Другой репрограммирующий фактор, *Sox2* [7], наоборот, синтезируется в интактной ДП, но не в культуре. Однако двумя годами ранее, в 2010 г., эти авторы отвергали факт синтеза *Sox2* в клетках ДП человека [6]. Принимая во внимание эти сведения, мы считали интересным использовать клетки ДП в качестве альтернативного источника iPSC, а также проверить эффективность процесса их репрограммирования. Мы предположили, что в нерепrogramмированных клетках ДП синтезируются как минимум два (*Klf4* и *c-Myc*), а возможно, и три фактора репрограммирования (*Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*), что будет способствовать приобретению клетками плюрипотентного статуса. Для увеличения эффективности репрограммирования мы культивировали клетки при добавлении вальпроевой кислоты [8] в условиях физиологического уровня кислорода 5% [9]. Таким образом, задача нашей работы состояла в получении iPSC из клеток ДП человека, оценке эффективности репрограммирования в подобранных условиях и в многосторонней характеристике полученных iDPK.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

В работе использовали следующие культуры клеток: клетки ДП волосяного фолликула человека; эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека линии hESMK05, любезно предоставленные М.А. Лагарьковой (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН); первичную культуру эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ).

Клетки ДП человека выделяли по методике, которую применяют в нашей лаборатории [10]. Клетки культивировали в среде AmnioMAX II (Gibco) с добавлением 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»). Смену среды осуществляли каждые 3–4 дня. Клетки по достижении субконфлюентного монослоя пассировали в соотношении 1 : 3. ЭСК человека линии hESMK05, а также полученные в результате репрограммирования iPSC человека растили в среде mTeSR™ 1 (STEMCELL Technologies) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 5% O₂. iPSC пассировали либо механически с помощью пипетки с пластиковым наконечником, либо инкубацией в растворе 1 мг/мл диспазы (STEMCELL Technologies). В качестве субстрата для культивирования применяли комплекс белков внеклеточного матрикса и протеогликанов – матригель (BD Biosciences). Среду заменяли каждый день.

Получение клонов iDPK

Клетки ДП на третьем пассаже (0.5 млн в чашке Петри диаметром 30–60 мм) инфицировали в течение ночи лентивирусными векторами, несущими гены плюрипотентного состояния клеток (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*), в среде для культивирования клеток ДП при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 5% O₂. Для улучшения эффективности инфицирования добавляли 5 мкг/мл полибрена (Sigma). Смену среды производили через день при добавлении химических соединений, увеличивающих эффективность репрограммирования: 2 мМ вальпроевой кислоты (Sigma) и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma). Через 7 сут среду для репрограммирования заменяли на среду для плюрипотентных стволовых клеток mTeSR™ 1 (STEMCELL Technologies). Среду заменяли каждый день. На первых пассажах клетки пересеивали механически на митотически неактивные МЭФ до начала контактирования колоний, а затем на пластик, покрытый матригелем (BD Biosciences). Первый пересев клеток производили на чашки Петри диаметром 100 мм и отменяли упомянутые выше добавки. Через 2–3 недели после пассирования клоны iPSC отбирали по поверхностному маркеру iPSC Tra-1-60 с помощью прижизненного иммуномечения и механического отбора положительных клонов.

Тест на активность щелочной фосфатазы

Для выявления щелочной фосфатазы использовали набор NBT/BCID (Roche) согласно протоколу производителя.

Иммуноцитохимия и проточная цитофлуориметрия

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида. Клетки инкубировали с первичными антителами (таблица) в течение ночи при 4°C в PBS с 1% BSA (Helicon) или 5% FBS (BioWest), со вторичными антителами Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 или Texas Red – в течение 60 мин при комнатной температуре. Ядра окрашивали 4,6-диамидино-2-фенилидолом (DAPI) в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре (Vector Laboratories). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 (Olympus) и цифрового фотоаппарата Coolpix 8700 (Nikon). Количественную оценку клеток, экспрессирующих поверхностные антигены ПСК, проводили с помощью проточного цитофлуориметра Cell Lab Quanta™ SC

(Beckman Coulter). В каждой пробе анализировали не менее 30000 клеток в трех повторностях.

Тест на активность теломеразы

Активность теломеразы в клетках проверяли с помощью TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit (Millipore). В качестве фермента для ПЦР использовали полимеразу Encyclo («Евроген»).

Определение экспрессии генов методом ОТ-ПЦР

Суммарную РНК выделяли с помощью Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research) по предложенной фирмой инструкции с некоторыми модификациями. Обратную транскрипцию (ОТ) проводили с помощью набора для ОТ-ПЦР, используя олиго(dT)15-праймеры («Силекс»). ПЦР проводили с использованием ScreenMix-НХ («Евроген»). Праймеры подбирали из банка данных <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html> и согласно статье Ohnuki и соавт. [11]. ПЦР проводили с помощью амплификатора фирмы Bio-Rad. Продукты ПЦР разделяли электрофоретически в 2% агароз-

Список антител, использованных в работе

Антитела (антигены)	Фирма-производитель	Продуцент антител	Рабочее разведение
Oct4	Millipore (MAB4401)	Мышь	1 : 200
Sox2	Cell Signalling (#3579)	Кролик	1 : 250
Nanog	Abcam (ab80892)	Кролик	1 : 400
SSEA3	STEMCELL Technologies (#01553)	Крыса	1 : 100
SSEA4	Abcam (ab16286)	Мышь	1 : 250
Tra-1-60	Abcam (ab16288)	Мышь	1 : 100
Tra-1-81	STEMCELL Technologies (#01556)	Мышь	1 : 300
Десмин	Abcam (ab15200)	Кролик	1 : 200
Нестин	Millipore (MAB5326)	Мышь	1 : 200
Даблкортин	Abcam (ab77450)	Кролик	1 : 200
β-III-тубулин	Millipore (MAB1637)	Мышь	1 : 100
Нейронспецифичная енолаза	DakoCytomation (M087329)	Мышь	1 : 200
Виментин	Abcam (ab8978)	Мышь	1 : 200
Пан-цитокератин	Santa-Cruz (sc-81714)	Мышь	1 : 20–1 : 50
Остеопонтин	Millipore (MAB3057)	Крыса	1 : 350
Остеонектин	Millipore (AB1858)	Кролик	1 : 500
Hnf4α	Santa-Cruz (sc-8987)	Кролик	1 : 50
Фоха2	Millipore (#07-633)	Мышь	1 : 100
Альфа-фетопротеин	R&D Systems (MAB1368)	Мышь	1 : 200
Альбумин	R&D Systems (MAB1455)	Мышь	1 : 250
СК8	Millipore (04-588)	Кролик	1 : 200
СК18	Millipore (MAB3234)	Мышь	1 : 100
Alexa Fluor 488	Molecular Probes (# A-11029, A-21206, A-21208)	Коза, осел	1 : 500
Alexa Fluor 594	Molecular Probes (# A-11032)	Коза	1 : 500

ном геле в Трис-ацетатном буфере и визуализировали с помощью УФ-анализатора гелей (BioRad).

Определение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили с использованием HS-SYBR («Евроген»). Анализировали кДНК, полученную в ходе обратной транскрипции. В одну реакцию брали кДНК (из 15 нг РНК), по 10 мкМ каждого праймера. Праймеры подбирали из следующих банков праймеров: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html> и <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb>. Для построения стандартной кривой использовали растворы кДНК, разбавленные в 4, 16, 64 и 256 раз, с трехкратной повторностью. Амплификацию проводили согласно следующей программе: 95°C – 10 мин; далее 40 циклов, состоящих из двух этапов: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин, с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). На втором этапе каждого шага цикла фиксировали флуоресцентный сигнал, который использовали для построения амплификационной кривой. После 40 циклов строили кривую плавления продуктов реакции для проверки специфичности реакции и отсутствия побочных продуктов.

Получение, культивирование и анализ эмбрионидных телец (ЭТ)

ЭТ получали культивированием в среде AggreWell™ (STEMCELL Technologies) либо в среде DMEM/F12 (Gibco), содержащей 20% заменитель сыворотки KSR (Gibco), 1× NEAA (Gibco), 1× GlutaMAX (Gibco), 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»). Каждое эмбрионидное тельце формировалось в висячей капле, после чего выращивалось в Ultra Low Adhesion Plates (Corning) в суспензии без прикрепления клеток к пластику. Смену среды проводили каждый день. ЭТ фиксировали в 3% параформальдегиде, инкубировали в 15% растворе сахарозы, заключали в Tissue-Tek® OCT™ Compound (Sakura) и замораживали в парах жидкого азота. Затем делали срезы толщиной 7.5 мкм на криотоме (CM1900), которые насаивали на положительно заряженные предметные стекла. Блокировали неспецифическое связывание антител в PBS с 1% БСА. Далее препараты готовили как описано выше.

Направленная дифференцировка iPСК *in vitro*

Для дифференцировки использовали как кусочки эмбрионидных телец, так и недифференцированные клетки (кластеры, занимающие 10–20% площади культуральной чашки). Подлинность дифференцировки подтверждали иммуноцитохимически.

Для индукции остеогенной дифференцировки клетки культивировали в среде DMEM/F12 с пониженным содержанием глюкозы («ПанЭко») с добавлением 10% FBS (Gibco), 2 мМ глутамин («ПанЭко»), 0.1 мкМ дексаметазона (Sigma-Aldrich), 10 мМ β-глицерофосфата (Sigma-Aldrich), 50 мкМ аскорбат-2-фосфата, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»). Дифференцировку клеток в гепатоцитарном направлении проводили в индукционной среде, содержащей DMEM/F12 (Gibco), 10% FBS (Gibco), 2 мМ глутамин («ПанЭко»), 10 нг/мл фактора роста гепатоцитов (HGF, Invitrogen), 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF, PeproTech), 20 нг/мл костного морфогенетического белка 2-го типа (BMP2, R&D), 0.03 мМ никотинамида. В первые 2–3 сут для индукции энтодермальной программы при дифференцировке из клеток, которые росли на подложке и образовывали ЭСК-подобные колонии, в среду был добавлен активин А (R & D) в концентрации 100 нг/мл (при дифференцировке из ЭТ добавления активина А не требуется). После отмены активина А в среду добавляли 30 нг/мл фактора роста фибробластов 4-го типа (FGF4, Invitrogen). По достижении клетками 80% конфлюентности из среды удаляли FGF4 и BMP2 и в течение 5–7 сут культивировали с онкостатином М (10 нг/мл, R&D) и дексаметазоном (0.1 мкМ, Sigma-Aldrich). После пассирования в среду вносили 1× B27 (Gibco) еще на 7–10 сут. Для индукции нейральной дифференцировки в среду DMEM/F12 (Gibco), содержащую 3% FBS (Gibco), 1× NEAA (Gibco), 1× GlutaMAX (Gibco), 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»), в течение 7 сут добавляли по 20 нг/мл Noggin (Invitrogen) и фактора роста фибробластов 2-го типа (FGF2, PeproTech). Затем клетки культивировали в присутствии 1× B27 (Gibco), через 7 дней добавляли по 10 нг/мл нейротрофического фактора роста (BDNF, PeproTech) и фактора роста нервов β (NGFβ, PeproTech) и культивировали в течение еще 7–14 сут.

Кариотипирование

Для приготовления препаратов хромосом в среду для культивирования клеток добавляли колцемид (Colcemid, Gibco). После инкубации с колцемидом клетки выдерживали в гипотоническом растворе (60 мМ KCl) и фиксировали в охлажденном до –20°C фиксаторе (метанол–ледяная уксусная кислота, 3 : 1). Полученную суспензию раскапывали на предметные стекла с высоты примерно 10 см с последующим поджиганием фиксатора на стекле. Для дифференциального окрашивания хромосомные препараты обрабатывали флуоресцентными красителями DAPI и 7-аминоактиномицином D (7-AAD).

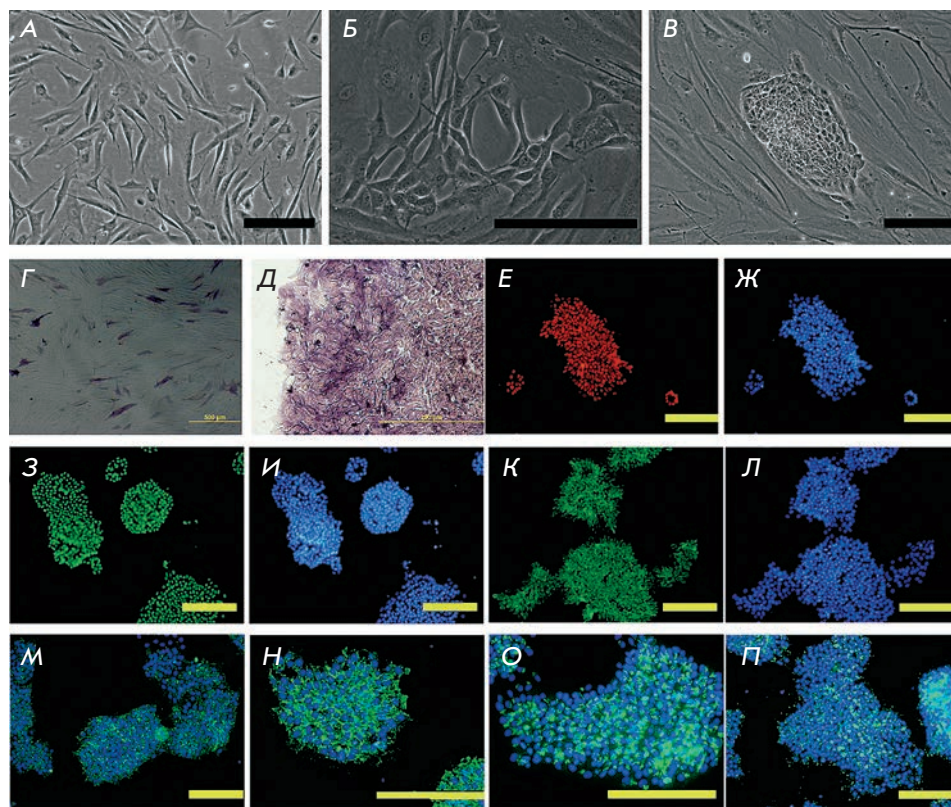


Рис. 1. Получение иДПК. А – исходная культура ДП человека; Б – репрограммированные клетки ДП на 8-е сут после инфицирования; В – репрограммированные клетки ДП на 11-е сут после инфицирования. Экспрессия щелочной фосфатазы нерепrogramмированными клетками ДП (пассаж 6) (Г) и полученными иДПК (пассаж 6) (Д). Иммунофлуоресцентное окрашивание иДПК против ядерных белков: Oct4 (Е), Sox2 (З), Nanog (К), и против поверхностных антигенов: SSEA3 (М), SSEA4 (Н), Tra-1-60 (О), Tra-1-81 (П). Ж, И, Л, М–П – ядра клеток докрашены DAPI (синий цвет). Масштабный отрезок 200 мкм (Ж, И, Л – то же поле зрения, что и Е, З и К соответственно)

Тест на тератообразование

Плюрипотентный статус индуцированных клеток проверяли с помощью стандартного *in vivo* теста на образование тератом. Около 5 млн недифференцированных клеток инъецировали подкожно мышам линии Nude с иммунодефицитом. После образования опухоли мышью умерщвляли, опухоль вырезали, фиксировали и готовили гистологические и иммуногистохимические препараты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По многим морфологическим и метаболическим критериям иПСК подобны ЭСК. В данной работе мы сравнивали полученные иПСК с линией ЭСК человека hESMK05.

Инфицирование, выделение и культивирование иПСК

Репrogramмирование на начальных этапах сопровождается изменениями размера, формы клеток, организации цитоскелета и рецепторов. Сигналом того, что в трансфицированных клетках начался процесс реprogramмирования, может служить появление клеток, визуально отличающихся от исходной культуры. Для повышения эффективности репро-

граммирования клеток мы использовали ингибитор гистоновых деацетилаз – вальпроевую кислоту [8], и инкубировали клетки в атмосфере 5% кислорода. На 8-е сут после лентивирусной трансфекции культуры клеток ДП мы наблюдали появление первых колоний морфологически измененных клеток (рис. 1В), что говорит о мезенхимно-эпителиальном переходе – одной из характеристик реprogramмирования [12]. В это время среду для реprogramмирования заменяли на mTeSR1 для поддержания недифференцированного состояния. Со временем размер колоний увеличивался и появлялись новые колонии. Практически все колонии имели ЭСК-подобную морфологию и четкие очертания. По морфологическим характеристикам полученные нами клоны практически не различались между собой. Клетки, образующие эти колонии, характеризовались высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, подобно ЭСК (рис. 1В).

Следующей нашей задачей стало отделение полностью реprogramмированных клонов от частично реprogramмированных, так как известно, что лишь небольшая часть морфологически сходных трансформированных колоний проходит весь путь реprogramмирования до плюрипотентного состояния.

При отделении репрограммированных клеток от пула нерепrogramмированных часто исходят из морфологического сходства выделяемых клонов с ПСК, в которых при дальнейшем клонировании обычно вначале определяют экспрессию щелочной фосфатазы – одного из маркеров плюрипотентного статуса клеток [13, 14]. Затем клонируют колонии, положительные по щелочной фосфатазе. Так как экспрессия щелочной фосфатазы характерна для интактных клеток ДП [15], отбор клонов по этому критерию мы посчитали необоснованным, поскольку при положительном сигнале открытым оставался бы вопрос о том, обусловлена экспрессия щелочной фосфатазы в клетках их репрограммированием или сохранностью характеристики материнских клеток. С целью упрощения работы при отделении полностью репрограммированных иПСК на 21-е сут после инфицирования репрограммирующими факторами мы провели прижизненное иммуномечение против поверхностного антигена Tra-1-60, одного из маркеров плюрипотентных клеток [16], после чего механически отобрали Tra-1-60⁺ колонии. Учитывая, что репрограммирование является многоступенчатым процессом, мы выбрали окрашивание по Tra-1-60, потому что этот маркер появляется на более поздних стадиях приобретения клетками плюрипотентного статуса. Эти колонии были перенесены на культуральный пластик, покрытый фидерным слоем митотически инактивированных МЭФ. В дальнейшем клетки пассировали на пластик, покрытый матригелем.

Подтверждение недифференцированного состояния полученных иПСК

Щелочная фосфатаза, маркер плюрипотентных и стволовых клеток, экспрессируется в интактных клетках ДП и является индикатором индукционной способности ДП. Однако со временем в культуре многие белки, характерные для интактных клеток ДП, в том числе и щелочная фосфатаза, практически не детектируются, и индукционный потенциал клеток ДП исчезает [17]. Исследователи связывают потерю собственных характеристик и приобретение признаков интерфолликулярных фибробластов отсутствием естественного для нативных клеток ДП микроокружения в культуре. На шестом пассаже (три пассажа до инфицирования *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* и три пассажа после инфицирования) мы детектировали в выделенных кломах репрограммированных клеток экспрессию щелочной фосфатазы (рис. 1Г), в то время как в исходной культуре ДП (рис. 1Д) на этом же пассаже ее экспрессировали единичные клетки. Экспрессия щелочной фосфатазы указывает в основном на то, что в клетках идет процесс репрограммирования, но не обязательно отражает полностью репро-

граммированное состояние. Мы наблюдали образование колоний, положительных по данному маркеру, которые, однако, не стали истинными иПСК. Скорее всего, они подверглись неполному репрограммированию либо после приобретения плюрипотентности быстро дифференцировались, и мы не смогли зарегистрировать данный момент.

Выделенные колонии были положительными по щелочной фосфатазе и при длительном культивировании. С помощью иммуоцитохимического окрашивания было выяснено, что исследуемые клоны репрограммированных клеток экспрессировали транскрипционные факторы плюрипотентности: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* (рис. 1Е–Л), а также поверхностные антигены SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81 (рис. 1М–П). Для дальнейшей работы мы выбрали один клон иДПК, положительный по всем перечисленным маркерам.

Однако данные иммуоцитохимического окрашивания не отображают количественной характеристики особенностей полученных иДПК. Поэтому для определения процентного содержания иПСК в культуре, экспрессирующих перечисленные выше поверхностные маркеры плюрипотентности, мы использовали метод проточной цитофлуориметрии (рис. 2А). Практически все иДПК были положительными по SSEA4 (99.28%), Tra-1-60 экспрессировали 78.36% иДПК, Tra-1-81 – 67.39% и больше половины популяции иДПК (53.94%) были положительными по SSEA3. Из приведенных данных видно, что при репрограммировании не все клетки клона начинают экспрессировать антигены плюрипотентного статуса SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81, однако, доля этих клеток велика (от 53 до 99%). Показано, что отобранные нами репрограммированные иДПК экспрессируют SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81, которые практически не детектируются в исходных клетках ДП. Так как исходные клетки не экспрессируют рассматриваемые маркеры плюрипотентности, а полученные нами иДПК положительны по ним, очевидно, что эти клетки подверглись репрограммированию.

С помощью метода наименьших квадратов мы определили среднее время удвоения популяции иДПК, оно составило 25 ч. Таким образом, полученные клоны иДПК имели сходную с ЭСК кинетику роста (среднее время удвоения популяции ЭСК – 25 ч). На пятом пассаже иДПК имели нормальный диплоидный кариотип 46, XX (рис. 2Б).

Еще одно условие репрограммирования клеток до плюрипотентного состояния – реактивация теломеразы. Известно, что в соматических клетках теломераза не активна, а при репрограммировании происходит ее реактивация. Теломераза обладает активностью обратной транскриптазы, удлиняющей теломерные участки ДНК клетки. С помощью TRAP-

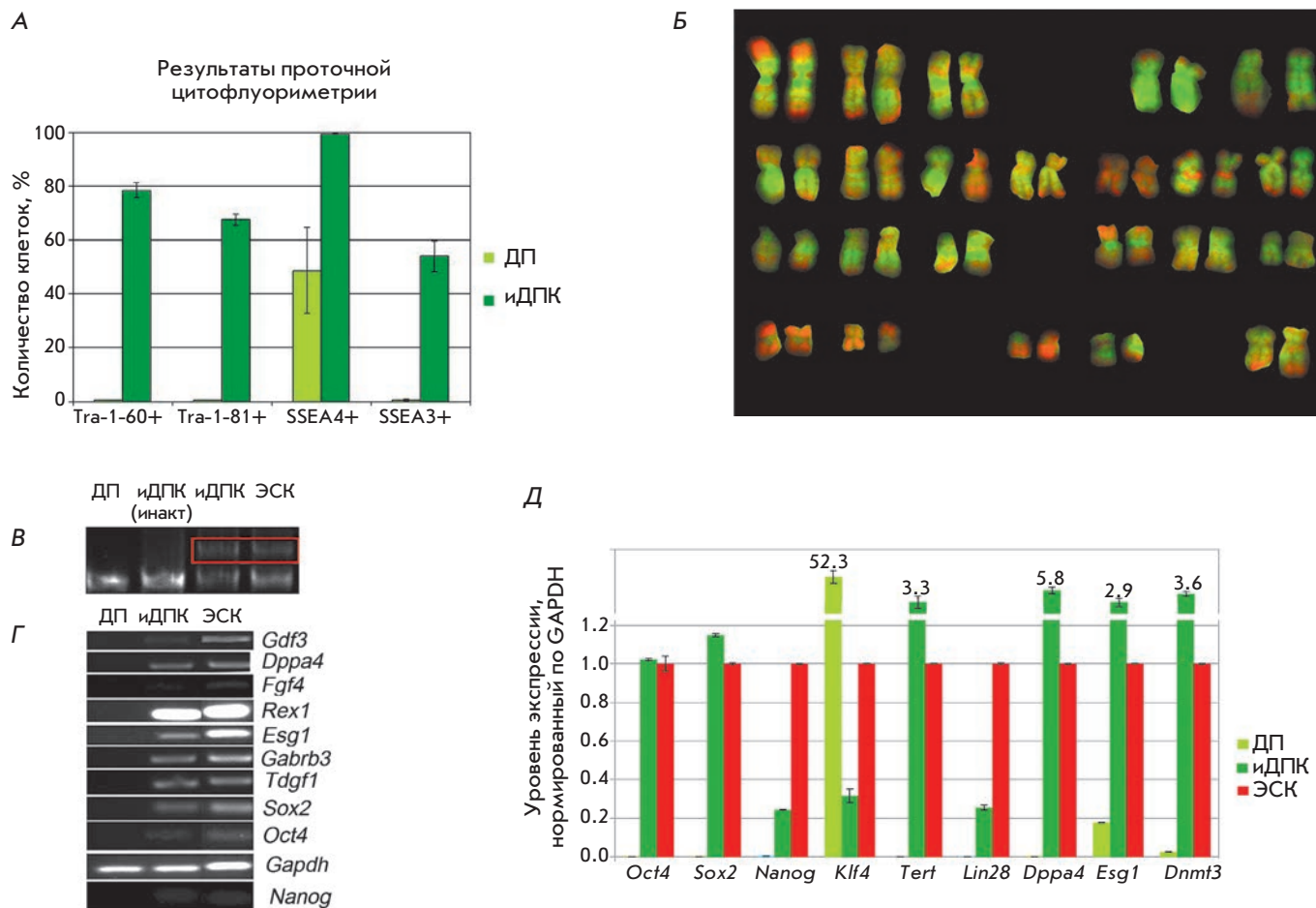


Рис. 2. Соотношение исходных (ДП) и репрограммированных (иДПК) клеток, экспрессирующих маркеры плюрипотентности Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA3, SSEA4, по результатам проточной цитофлуориметрии (А). Нормальный диплоидный кариотип иДПК (46, XX) (Б). Хромосомы окрашены DAPI (зеленый цвет) и 7-ААД (красный цвет). Реактивация теломеразы в иДПК (В). Теломераза активна в образцах на дорожках, в которых детектируются дополнительные полосы, соответствующие теломерным повторам (иДПК, ЭСК). Образцы ЭСК и иДПК, прогретые до инактивации теломеразы – иДПК(инакт), выступают в качестве контроля. В исходной культуре иДПК (иДПК) теломераза не активна. Экспрессия генов раннего развития (названия справа) по данным ОТ-ПЦР (Г). Результаты определения уровней экспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Tert*, *Klf4*, *Lin28*, *Dppa4*, *Esg1*, *Dnmf3* в клетках ДП, иДПК и ЭСК методом ПЦР в реальном времени (Д)

ПЦР-анализа мы выяснили, что в полученных нами иДПК теломераза активна (рис. 2В), что не удивительно, так как исследуемые клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом. В исходной культуре ДП этот фермент не активен. Следовательно, в иДПК произошла реактивация теломеразы в процессе репрограммирования. По активности теломеразы, полученные иДПК, были подобны ЭСК.

С помощью ОТ-ПЦР-анализа мы обнаружили в культурах иПСК транскрипты генов (*Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Tdgf1*, *Gabrb3*, *Esg1*, *Rex1*, *Fgf4*, *Dppa4*, *Gdf3*), которые работают в раннем развитии и являются маркерами ПСК (рис. 2Г). В исходной культуре ДП транскрипты этих генов не детектировались, а по-

явление положительных сигналов в иДПК указывает на их активацию при репрограммировании. Скорее всего, *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* активируют другие гены раннего развития. Ключевая роль перечисленных факторов при репрограммировании подтверждается полученными нами результатами.

Чтобы выявить индивидуальные особенности культуры, мы использовали метод ПЦР в реальном времени (рис. 2Д). Хотя уровни экспрессии практически всех исследуемых генов в иДПК и ЭСК сопоставимы и отличаются от профиля экспрессии в нерепrogramмированных клетках ДП, нам все же удалось установить некоторые особенности исследуемых клеточных культур.

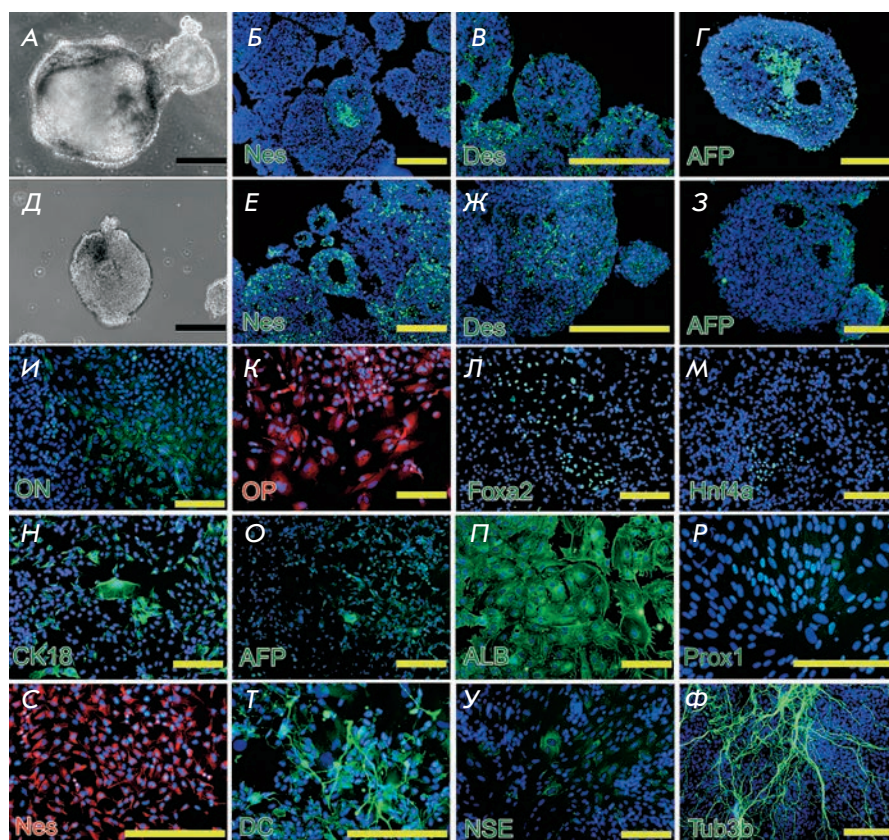


Рис. 3. Дифференцировка иДПК *in vitro*. Образование и характеристика эмбрионных тел (ЭТ) из иДПК (А–Г) и из ЭСК в качестве контроля (Д–З). Морфология ЭТ из иДПК (А) и ЭТ из ЭСК (Д). Экспрессия маркеров трех зародышевых листков: нестина (Nes), десмина (Des) и альфа-фетопротеина (AFP) в ЭТ, полученных из иДПК (Б–Г) и ЭСК (Е–З). Результаты направленной дифференцировки иДПК (И–Ф). Экспрессия маркеров остеогенной дифференцировки остеонектина (И) и остеопонтина (К). Экспрессия маркеров гепатоцитарной дифференцировки Foxa2 (Л), Hnf4α (М), цитокератина 18 (Н), альфа-фетопротеина (О) и альбумина (П). Экспрессия маркеров нейрональной дифференцировки Pгоx1 (Р), нестина (С), даблкортина (Т), нейрон-специфичной енолазы (У), β-III-тубулина (Ф). Масштабный отрезок 200 мкм

Следовательно, по проверенным характеристикам полученные нами репрограммированные клетки отвечают критериям недифференцированного статуса. Для дальнейшей характеристики полученных иДПК нам необходимо было оценить их дифференцировочный потенциал.

Определение дифференцировочного потенциала иДПК

Из иДПК мы получили эмбрионные тельца, которые в лабораторных условиях напоминают первые этапы эмбриогенеза (рис. 3А). ЭТ представляют собой самоорганизующиеся округлые агрегаты с внутренней полостью. В ЭТ из иДПК, как и в ЭТ, образованных из ЭСК (рис. 3Д–З), мы детектировали белки эктодермы (нестин), мезодермы (десмин) и энтодермы (альфа-фетопротеин) (рис. 3Б–Г).

Благодаря способности к дифференцировке в лабораторных условиях ПСК могут использоваться для изучения процессов раннего развития и направленной дифференцировки клеток в те или иные ткани. Мы подобрали условия дифференцировки иПСК в экто- (нейродифференцировка), мезо- (остеогенная дифференцировка) и в энтодермальном направлении (гепатоцитарная дифференцировка).

Остеогенная дифференцировка

Спустя 2–3 недели после индукции остеогенной дифференцировки иДПК мы выявили белки внеклеточного матрикса – остеопонтин (рис. 3К) и остеонектин (рис. 3И), которые считаются маркерами остеобластов и принимают участие в минерализации кости.

Дифференцировка в гепатоцитарном направлении

Дифференцировку в гепатоцитарном направлении проводили в течение 3–5 недель, после чего в иДПК начинали экспрессироваться ядерные факторы транскрипции Foxa2 (маркер дефинитивной энтодермы) и Hnf4α (маркер экстраэмбриональной энтодермы). Положительные по этим факторам клетки располагались группами примерно по 50–100 (рис. 3Л,М). Появлялась экспрессия альфа-фетопротеина, указывающая на коммитирование клеток в гепатобласт, и эпителиального маркера цитокератина 18 (СК18), характеризующего приобретение клетками более дифференцированного статуса (рис. 3Н,О). После дифференцировки в клетках начинается экспрессия альбумина (рис. 3П), что свойственно зрелым гепатоцитам.

Дифференцировка в нейрональном направлении

Дифференцировку в нейрональном направлении проводили в течение 3–5 недель. С помощью имму-

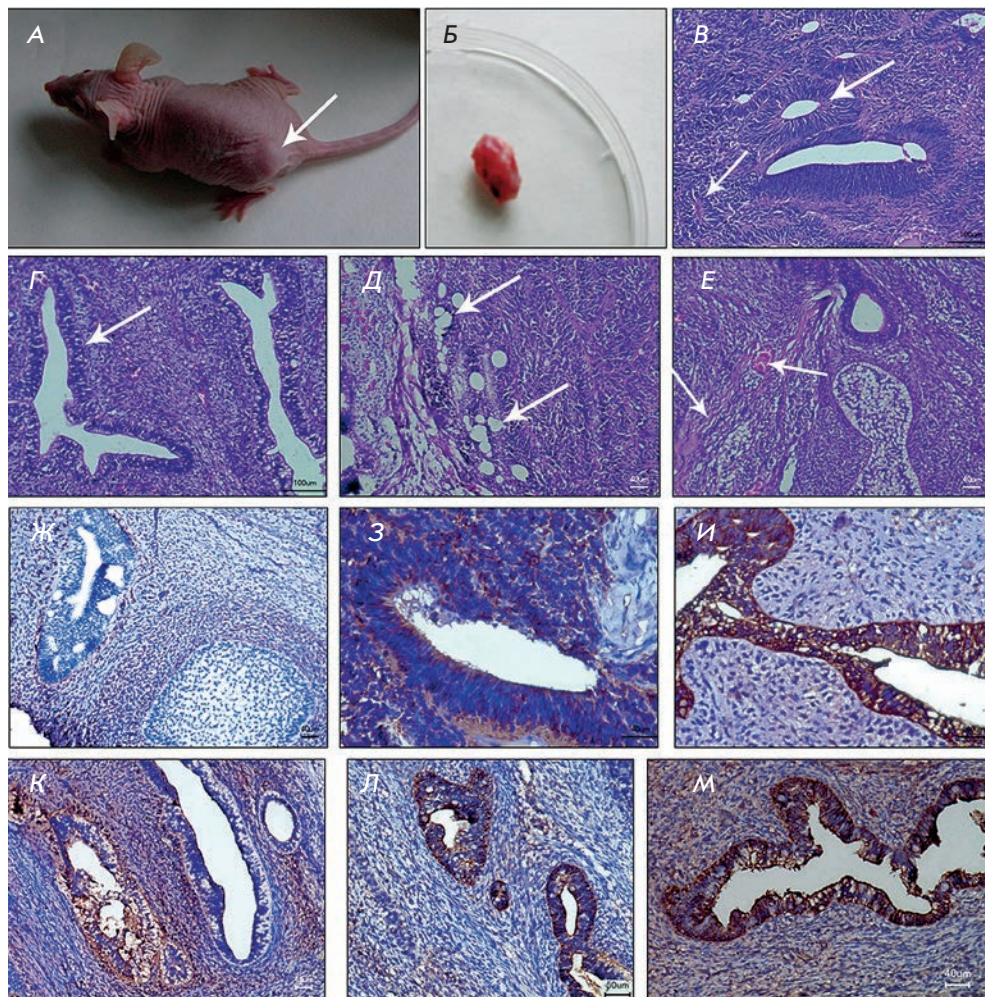


Рис. 4. Образование тератом из иДПК. Фотографии (А) реципиентной мыши спустя 6 недель после введения иДПК (стрелкой указана тератома) и (Б) вырезанной тератомы. Фотографии парафиновых срезов тератом, окрашенных гематоксилином и эозином (В–Е). В – нейроглия (нейроэпителиальные трубочки и розетки указаны стрелками); Г – железистый эпителий, Д, Е – мезенхима (в препарате Д стрелкой указаны жировые клетки, в препарате Е стрелками указаны волокна рыхлой соединительной ткани и сосуды); окраска антителами против виментина (Ж), нестина (З), пан СК (И), СК8 (К), СК18 (Л), AFP (М)

ноцитохимического окрашивания мы обнаружили, что иДПК, дифференцированные в нейрональном направлении, экспрессировали *Prox1* (рис. 3Р), который, возможно, играет фундаментальную роль в развитии ЦНС, принимая участие в регуляции экспрессии и развития постмитотических недифференцированных предшественников нейронов. Нейрональные иДПК были положительными по нестину (НСК) – маркеру нейральных стволовых клеток (рис. 3С), и даблкортину (ДС) – маркеру незрелых нейронов (рис. 3Т), а также образовывали сплетения клеток с длинными отростками, положительными по маркеру зрелых нейронов, β -III-тубулину (рис. 3Ф), и окрашивались на нейронспецифичную енолазу (NSE) (рис. 3У).

Дифференцировка иПСК *in vivo*

Один из достоверных тестов, доказывающих плюрипотентность клеток, – их способность образовывать тератому после введения бестимусным мышам. Тератома представляет собой опухоль, состоящую из не-

скольких типов тканей, обычно производных трех зародышевых листков, присутствие которых не свойственно тем органам или анатомическим областям организма, в которых развивается опухоль. Данные об эффективности образования тератом, в зависимости от места инъекции недифференцированных ПСК, весьма неоднозначны. Например, в работе Prokhorova и соавт. [18] говорится о сайт-специфичности образования тератом из одних и тех же клеток, другие же авторы не находят разницы в эффективности теста на тератомообразование при введении ПСК в разные области тела реципиента [19]. Мы выбрали наименее трудоемкий метод введения иДПК под кожу спины и задней лапки. Спустя 3–6 недель на месте инъекции недифференцированных иДПК наблюдали образование тератомы (рис. 4А,Б). По гистологическому строению опухоль представляла собой незрелую тератому, в которой обнаруживались структуры экто-, мезо- и энтодермального происхождения. На гистологических препаратах мезенхимные ткани характеризовались обилием капилляров, часть ко-

торых имела расширенные просветы, между ними располагались волокна рыхлой соединительной ткани (рис. 4Е). Кроме того, обнаружены крупные клетки с пенистой цитоплазмой (рис. 4Д), что, возможно, указывает на формирование в тератоме жировой ткани. На препаратах видны обширные участки железистого эпителия (рис. 4Г), а также участки незрелой нервной ткани, состоящие из мелких гиперхромных клеток с узким ободком цитоплазмы. Также были обнаружены структуры, напоминающие примитивные нейроэктодермальные розетки и трубочки (рис. 4В). С помощью иммуногистохимического анализа подтверждена подлинность получения тератомы из иДПК. В препаратах выявлены виментинбогатые участки, расположенные в тканях между протоками (рис. 4Ж). Нестин был обнаружен в структурах, напоминающих нейроэктодермальные розетки и трубочки (рис. 4З). Мы наблюдали большое количество железистых структур, в которых экспрессировались панцитокератин, цитокератины 8 и 18, а также альфа-фетопротейн (рис. 4И–М).

Эффективность репрограммирования в работе [6] составила $\approx 0.02\%$, тогда как в нашем исследовании $\approx 0.03\%$. Скорее всего, эта разница не значительна и связана с разными методиками, применяемыми

в разных лабораториях. Однако также возможно, что результат нашей работы свидетельствует о положительном влиянии на эффективность репрограммирования условий культивирования при низком содержании кислорода и добавлении вальпроевой кислоты (поскольку Higgins и соавт. [6] не сообщают об использовании этих компонентов в своих экспериментах). Таким образом, данные этих двух работ сопоставимы и дополняют друг друга.

Учитывая происхождение использованных клеток ДП от нервного гребня, представляет интерес дальнейшее изучение полученной линии иДПК, включающее ее эпигенетические характеристики и тенденции к спонтанной нейрональной дифференцировке *in vitro* в сравнении с линиями иПСК, полученными из других источников. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (государственный контракт № 8796 от 04.10.2012 (КАДРЫ 1.2.2), государственный контракт № 16.740.11.0637 от 02.07.2011 (КАДРЫ 1.3.1 и государственный контракт № 14.512.11.0040 от 03.04.2013 (Технологии и разработки)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oliver R.F. // J. Embryol. Exp. Morphol. 1967. V. 18. № 1. P. 43–51.
- Ohuama M., Kobayashi T., Sasaki T., Shimizu A., Amagai M. // J. Cell Sci. 2012. V. 125. P. 4114–4125.
- Шутова М.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 2. С. 104–106.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Лисковых М.А., Чуйкин И., Ранян А., Сафина Д.А., Толкунова Е.Н., Минаева Ю.М., Жданова Н.С., Дыбан П.А., Маллинс Дж., Костылева Е.И. и др. // Цитология. 2011. Т. 53. № 12. С. 927–934.
- Higgins C., Ito M., Inoue K., Richardson G., Jahoda K., Cristiano A. // Exp. Dermatol. 2010. V. 19. № 6. P. 568.
- Higgins C., Ito M., Inoue K., Richardson G., Jahoda K., Cristiano A. // J. Invest. Dermatol. 2012. V. 136. № 6. P. 1725–1727.
- Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Dementyeva 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.
- 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.
- Чермных Э.С., Радюхина Н.В., Руткевич П.Н., Шевелев А.Я., Власик Т.Н., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. // Цитология. 2010. Т. 52. № 3. С. 219–224.
- Ohnuki M., Takahashi K., Yamanaka S. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 2009. Chapter 4:Unit 4A.2. doi: 10.1002/9780470151808.sc04a02s9.
- Li R., Liang J., Ni S., Zhou T., Qing X., Li H., He W., Chen J., Li F., Zhuang Q., et al. // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 1. P. 51–63.
- 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., et al. // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. № 6. P. 472–476.
- Marchetto M.C., Yeo G.W., Kainohana O., Marsala M., Gage F.H., Muotri A.R. // PLoS One. 2009. V. 4. № 9. e7076.
- Гнедева К.Ю. Клетки дермальной папиллы из нервного гребня в морфогенезе волосяного фолликула. М.: ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, 2012.
- 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.
- Rendl M., Polak L., Fuchs E. // Genes Dev. 2008. V. 22. № 4. P. 543–557.
- Prokhorova T.A., Harkness L.M., Frandsen U., Ditzel N., Schroder H.D., Burns J.S., Kassem M. // Stem Cells Dev. 2009. V. 18. № 1. P. 47–54.
- Zhang W.Y., de Almeida P.E., Wu J.C. // Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research. StemBook, 2012. doi/10.3824/stembook.1.53.1, http://www.stembook.org.