

УДК 576+602.9:575.224:575.16

Феномен «эпигенетической памяти» индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Е. А. Васькова^{1,2,3}, А. Е. Стеклёнова^{1,2,3}, С. П. Медведев^{1,2,3}, С. М. Закиан^{1,2,3*}¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10²Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

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

Поступила в редакцию 27.05.2013

РЕФЕРАТ Современная биомедицина и фармакология требуют создания новых, более совершенных клеточных моделей заболеваний. Одним из перспективных направлений в данной области является применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), получаемых путем репрограммирования соматических клеток. Однако для полноценного использования данной технологии необходимо тщательное изучение ИПСК на молекулярном, эпигенетическом и функциональном уровнях. Современные методы анализа свидетельствуют о том, что ИПСК очень схожи с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) по профилю экспрессии белоккодирующих генов, генов микроРНК, метилированию ДНК, спектру и паттерну распределения ковалентных модификаций гистонов. Тем не менее показано, что ИПСК обладают характерными особенностями, приобретенными как в процессе репрограммирования, так и в результате сохранения ряда черт эпигеномов и транскриптомов исходных соматических клеток-предшественников. Явление сохранения черт эпигеномов и транскриптомов исходных соматических клеток получило название «эпигенетическая память». Данный обзор посвящен явлению «эпигенетической памяти» в контексте процесса репрограммирования, влиянию «памяти» на свойства ИПСК, а также возможности ее использования в клеточных технологиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА плюрипотентность, репрограммирование, эпигенетика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ДМР – дифференциально метилированные районы.

ВВЕДЕНИЕ

Любой тип клеток в организме характеризуется своим собственным индивидуальным эпигеномом: определенным спектром и паттерном посттрансляционных ковалентных модификаций гистонов, метилирования ДНК, наличием набора малых некодирующих РНК. Комбинация данных факторов формирует уникальную структуру хроматина, присущую клеткам того или иного типа.

Хроматин плюрипотентных клеток характеризуется «открытой» конфигурацией и декомпактизованным состоянием [1, 2]. Хроматин в такой конфигурации в процессе дифференцировки и специализации клеток способен быстро подвергаться различным посттрансляционным модификациям гистонов, процессам метилирования и деметилирования ДНК [3, 4]. Плюрипотентные клетки содержат также «бивалентные домены», т.е. области, обогащенные одновременно

метками и активного, и неактивного хроматина. Большинство бивалентных доменов ассоциированы с точками старта транскрипции генов, вовлеченных в развитие. Так, например, бивалентные домены найдены в генах раннего развития (*Sox1*, *Pax3*, *Msx1*, *Irx3*) мыши. В плюрипотентных клетках эти гены характеризуются низким уровнем транскрипции, тогда как в ходе дифференцировки бивалентные домены преобразуются в моновалентные, содержащие метки либо активного, либо неактивного хроматина, и соответственно наблюдается активация или репрессия генов, обуславливающая специализацию клеток конкретного типа [1].

На сегодняшний день известно два типа плюрипотентных клеток, имеющих широкий потенциал применения в биомедицине: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). ИПСК получают из соматических

тических клеток путем эктопической сверхэкспрессии генов определенного набора факторов транскрипции, таких, как *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog* и *Lin28* или микроРНК [5–8]. В области биомедицины именно внедрение ИПСК представляется наиболее стратегически выгодным, поскольку они могут быть получены из соматических клеток различного происхождения (фибробласты кожи, кератиноциты, стволовые клетки жировой ткани, клетки периферической крови и др.) в любой период жизни человека и являются аутологичными по отношению к донору соматических клеток. Поэтому детальное широко-масштабное изучение свойств ИПСК и возможностей их клинического применения представляет крайне актуальную задачу.

На сегодняшний день известно, что ИПСК по своим свойствам очень схожи с ЭСК, т.е. экспрессируют сходный спектр генов, формируют тератомы, содержащие производные всех трех зародышевых листков. ИПСК мыши обладают способностью формировать химеры и образовывать полноценный организм при тетраплоидной комплементации [9]. В то же время во множестве работ получены свидетельства того, что в результате репрограммирования линии ИПСК приобретают целый ряд генетических и эпигенетических aberrаций, включая нарушения в работе импринтированных генов, изменения в количестве копий генов, точечные мутации, aberrантный паттерн метилирования ДНК и ряд других [10–14]. При этом отличия в эпигеномах и транскриптомах ЭСК и ИПСК обусловлены не только aberrациями, приобретенными в процессе репрограммирования, но и сохранением ряда эпигенетических меток исходных соматических клеток. Подобное наследование свойств эпигеномов и транскриптомов в ИПСК от исходных соматических клеток получило название «эпигенетическая память» [15–17].

В представленном обзоре рассмотрены, главным образом, идентичность эпигеномов и транскриптомов ИПСК и исходных соматических клеток-предшественников, влияние феномена «эпигенетической памяти» на свойства ИПСК и возможности его практического использования в области биомедицины.

ФЕНОМЕН «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ» В ПРОЦЕССЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ СОСТОЯНИЮ

С помощью современных высокопроизводительных методов анализа показано, что по профилю экспрессии генов, спектру и паттерну распределения ковалентных модификаций гистонов, метилированию ДНК, экспрессии микроРНК ИПСК очень схо-

жи с ЭСК. Однако в транскриптомах и эпигеномах этих клеток существуют минимальные различия. Так, за последнее время опубликована серия работ, посвященных различиям в паттерне метилирования ДНК независимых линий ИПСК. Наиболее изучено метилирование ДНК по остаткам цитозина в CpG-динуклеотидах [18]. В геноме CpG-динуклеотиды могут локализоваться как по отдельности, так и концентрироваться в определенных районах, называемых CpG-островками. Как правило, CpG-островки находятся вблизи промоторов генов, а высокий уровень метилирования промоторов коррелирует с репрессией генов [19].

В работе К. Kim и соавт. [16] изучен паттерн метилирования ДНК в ЭСК и в ИПСК из двух различных исходных типов соматических клеток: из клеток крови и фибробластов проксимальной части хвоста мышей. Анализ проведен с применением ДНК-микрочипов. Данный подход позволил оценить метилирование ~4.6 млн CpG-динуклеотидов, что включает практически все CpG-островки и близлежащие участки, но не учитывает не-CpG-метилирование. По сравнению с ЭСК в ИПСК, полученных из клеток кожи, выявлено 3349 дифференциально метилированных районов (ДМР), тогда как в ИПСК из клеток крови – всего 516. Интересно, что биоинформатический анализ 24 наиболее выраженных ДМР показал, что данные районы ассоциированы с генами, вовлеченными в процесс гемопоэза (11 генов) и остеогенеза (3 гена). Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, что при репрограммировании ИПСК недорепрограммированными остаются те гены, которые исходно отвечали за специализацию клетки.

Показано, что в ИПСК, полученных из клеток-предшественников скелетной мускулатуры мыши, на значительном уровне сохраняется экспрессия маркеров клеток скелетной мускулатуры *Cxcr4* и *Integrin B1*, а в ИПСК из гранулоцитов – маркеров гранулоцитов (*Lysozyme* и *Gr-1*). Сравнение транскрипционного профиля двух линий ИПСК выявило 1388 дифференциально экспрессирующихся генов. При этом биоинформатический анализ 100 генов, уровень экспрессии которых различался наиболее значительно, выделяет группы генов, участвующих в формировании миофибрилл, сократительных волокон, в развитии мускулатуры, активации β-клеток и лейкоцитов [17]. Таким образом, эти результаты также говорят о том, что ИПСК обладают «эпигенетической памятью», что проявляется в сохранении ряда черт эпигеномов и транскриптомов соматических клеток исходного типа.

Сходное явление описано и для ИПСК человека. В одной из работ [20] проведен сравнительный

анализ метилирования ДНК в 5 линиях ЭСК человека, 22 линиях ИПСК и 6 исходных линиях соматических клеток. В качестве соматических клеток-предшественников использованы эмбриональные фибробласты легкого, клетки амниона, эндометрия, эпителия пупочной вены, менструальной крови, а также фибробласты кожи. Анализ метилирования был проведен с помощью ДНК-микрочипов, содержащих пробы на 24273 CpG-сайтах в пределах 13728 генов. Оказалось, что паттерн метилирования ~90% CpG-сайтов (17572 сайта) не отличается в ЭСК, ИПСК и в исходных соматических клетках, т.е., согласно этим данным, лишь 10% CpG-сайтов подвергаются модификации и обеспечивают эпигенетическую вариабельность между различными типами клеток. Сравнение плюрипотентных (ЭСК, ИПСК) и исходных соматических клеток выявило 220 ДМР, из которых 174 ДМР (79.5%) гиперметилированы в ЭСК и ИПСК. Эти районы ассоциированы, главным образом, с генами регуляции транскрипции. Интересно, что большинство гипометилированных ДМР локализируются в CpG-островках, тогда как большинство гиперметилированных ДМР находятся вне CpG-островков. Сравнение метилирования ДНК в ЭСК и ИПСК показало, что число ДМР варьирует от линии к линии. В целом при наличии ДМР, хотя бы в одной из исследуемых линий ИПСК, обнаружено 1459 ДМР в пределах 1260 генов. Стоит особо отметить, что данное число ДМР представлено совокупностью, во-первых, сайтов, аберрантно метилированных *de novo*, и, во-вторых, сайтов, унаследованных от соматических клеток исходного типа [20].

Изучено также метилирование ДНК в ЭСК человека и ИПСК, полученных из клеток неонатальной пуповинной крови (от двух независимых доноров) и кератиноцитов крайней плоти (от трех независимых доноров) [21]. С помощью ДНК-микрочипа, включающего 5.2 млн CpG-сайтов, что охватывает фактически все CpG-островки и близлежащие последовательности, как и в других работах, показано, что паттерн ДНК-метилирования в различных линиях ИПСК отличается. Причем из 370 ДМР 267 приобретены *de novo* в результате репрограммирования, а 75 унаследованы в результате «эпигенетической памяти» [21].

Описанные работы [20, 21] выполнены с использованием ДНК-микрочипов, позволяющих оценить ДНК-метилирование в масштабе генома. Однако современные методы молекулярно-генетического анализа дают возможность изучать эпигеном клетки с гораздо более высокой точностью и разрешением. В качестве примера можно привести исследование R. Lister и др. [22], в котором с помощью высокочувствительного метода MethylC-Seq проведен сравнительный анализ метилома ряда линий ИПСК, полученных с использованием

разных подходов из соматических клеток различного типа. Данный метод позволяет оценить метилирование остатков цитозина на уровне всего генома с разрешением в один нуклеотид. Исследованы ИПСК, полученные из адипоцитов путем трансдукции ретровирусами, несущими кДНК генов *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *MYC*; ИПСК, полученные путем трансдукции лентивирусами, несущими кДНК генов *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28*, фибробластов легкого IMR90; и три линии ИПСК, полученные из фибробластов крайней плоти с помощью неинтегрирующихся эписомных векторов. Оценен статус метилирования 75.7–94.5% остатков цитозина во всех исследуемых линиях. Причем в рассмотренной работе [22] оценен статус метилирования не только цитозинов в составе CpG-динуклеотидов, но также и в не-CpG-динуклеотидах (mCH, где H = A, C или T). Показано, что паттерн метилирования цитозинов в составе CpG-динуклеотидов в ЭСК и ИПСК характеризуется высоким уровнем сходства, тем не менее, выявлено 1175 ДМР. Длина индивидуальных ДМР варьировала в пределах 1–11 т.п.н. и в совокупности составила 1.68 млн п.н. Распределение ДМР по геному также неоднородно: большинство (80%) ДМР ассоциированы с CG-островками, 62% расположены возле или внутри генов и 29 и 19% выявлены в пределах 2 т.п.н. от точек старта или терминации транскрипции соответственно. Важно отметить, что, несмотря на вариабельность количества и локализации ДМР в различных линиях ИПСК, была выделена группа ДМР, совпавших во всех исследуемых линиях. Это говорит о том, что в геноме существуют «горячие точки», не подвергающиеся эпигенетическому репрограммированию. Функции и значение этих районов пока мало изучены и нуждаются в дополнительном анализе.

Анализ метилирования в не-CpG-динуклеотидах показал также, что, несмотря на значительное сходство в общем паттерне метилирования между ЭСК и ИПСК в масштабе генома, существуют различия и в не-CpG-метилировании. Всего детектировано 29 не-CpG-ДМР, имеющих ряд отличительных особенностей [22]. Во-первых, не-CpG-ДМР характеризуются значительной протяженностью. Длина более половины ДМР составляет более 1 млн п.н. и в целом общая длина 29 ДМР – 32.4 млн п.н. Кроме того, по локализации в геноме не-CpG-ДМР отличаются от локализации CpG-метилирования: основная их часть сосредоточена в районах центромер и теломер [22]. Интересно, что в работах K. Nishino и др., R. Lister и др. [20, 22] выявлены 72 промотора генов, которые подвергаются дифференциальному метилированию в обоих исследованиях.

С использованием ДНК-микрочипов сравнили профиль ДНК-метилирования в пяти образцах ме-

зехимных стромальных клеток, восьми различных линиях ИПСК, полученных из мезенхимных стромальных клеток, и трех линиях ЭСК человека и подробно проанализировали локализацию и динамику метилирования CpG в геноме [23]. В среднем по геному метилированы 17 CpG-сайтов в гене. Средний уровень метилирования всех CpG-сайтов составил 49.4, 70.6 и 70.5% в мезенхимных стромальных клетках, в ИПСК, полученных из мезенхимных стромальных клеток, и ЭСК соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе репрограммирования наблюдается тенденция к модификации полуметилированных районов в полностью метилированные. Всего 185246 CpG-сайтов оказались дифференциально метилированными, из которых 33941 подвергаются деметилированию, тогда как 151306 становятся гиперметилированными в ИПСК. По локализации в геноме все CpG-сайты классифицировали на следующие группы: CpG-сайты, расположенные в районе 1500 или 200 п.н. выше точки начала транскрипции, CpG-сайты в 5'-нетранслируемых областях, в первом экзоне, в 3'-нетранслируемых областях генов и в межгенных районах [24]. Показано, что в среднем уровень метилирования в процессе репрограммирования возрастает во всех районах, однако в области промоторов и первых экзонов уровень метилирования снижается. При этом сайты, которые подвергаются гипо- и гиперметилированию, преимущественно локализуются в межгенных районах. Проведен также анализ метилирования в контексте CpG-островков в следующих областях: 2 т.п.н. выше или ниже CpG-островка («shore region»), районы размером 2 т.п.н., фланкирующие «shore region» («shelf region»). Все остальные CpG-сайты были объединены в районы «open sea». В мезенхимных стромальных клетках средний уровень метилирования в CpG-островках был гораздо ниже (22.2%), чем в «shore region» (67.5%), в «shelf region» (42.7%) и в «open sea» (61.8%) [24]. Эти данные свидетельствуют о том, что изменения в паттерне метилирования ДНК, ассоциированные с процессом репрограммирования, происходят, главным образом, в районах, расположенных вне CpG-островков.

Между ЭСК и ИПСК выявлено 3744 ДМР, из них 3134 CpG-сайта были гипометилированы и 610 – гиперметилированы в ИПСК по сравнению с ЭСК [24]. Интересно, что гиперметилированные CpG-сайты в ЭСК локализуются преимущественно в пределах 200 п.н. от точек начала транскрипции, в первом экзоне генов и межгенных районах, тогда как в ИПСК – в 1500 п.н. выше точки начала транскрипции и в межгенных районах. Биоинформатический анализ показал, что 610 CpG-сайтов, гиперметилированных в ИПСК, ассоциированы с генами, участвующими

в процессах кератинизации и дифференцировки кератиноцитов, а также в дифференцировке эпидермальных клеток и развитии эпидермиса.

Таким образом, профиль метилирования в ИПСК и ЭСК также различается: районы с высоким уровнем метилирования в ЭСК локализованы преимущественно в проксимальных районах промоторов генов, в ИПСК – в дистальных районах промоторов, межгенных и «open sea» районах, в генах, участвующих в развитии эпидермиса.

Интересно, что выявлена закономерность распределения ДМР и на хромосомном уровне. Замечено, что в ИПСК с набором половых хромосом XX число ДМР, локализованных на X-хромосоме, значительно выше, чем в ИПСК с набором хромосом XY [20].

Таким образом, в результате репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию образуются ДМР, число которых варьирует в зависимости от исходного типа клеток, метода репрограммирования, условий культивирования и т.д. Основная часть таких ДМР возникает в результате aberrантного метилирования *de novo*, а меньшая часть является следствием «эпигенетической памяти». Стоит также отметить, что возникновение ДМР в результате «эпигенетической памяти» обусловлено не только исходным типом соматических клеток, но и индивидуальными особенностями паттерна метилирования ДНК у отдельных индивидов – доноров клеток. Известно, что индивидуальные особенности в эпигеномах клеток обнаружены даже у однозиготных близнецов [23]. Показано, что некоторая часть таких донор-специфичных эпигенетических модификаций не изменяется в процессе репрограммирования. Например, сравнительный анализ профиля метилирования ИПСК, полученных из мезенхимных стромальных клеток от пяти различных доноров, выявил 1129 дифференциально метилированных CpG-сайтов. Эти сайты связаны главным образом с генами, вовлеченными в процессинг и презентацию антигенов. Донор-специфичные ДМР локализованы в основном в телах генов, 3'-нетранслируемых и межгенных районах [24].

В сохранении ряда эпигенетических меток соматических клеток исходного типа, помимо метилирования CpG-динуклеотидов, принимают участие также и ковалентные модификации гистонов. Так, например, показано, что в ИПСК, полученных из β-клеток поджелудочной железы человека, фактор транскрипции PDX1 не подвергается репрессии в результате репрограммирования. Методом иммунопреципитации хроматина установлено, что ацетилированная форма гистона H3, ассоциированная с транскрипционно активным хроматином, сохраняется в промоторах генов, кодирующих инсулин и PDX1 [15].

Таким образом, широкопрофильные полногеномные исследования показали, что хотя ЭСК и ИПСК очень схожи между собой, но тем не менее существуют минимальные различия в паттерне метилирования ДНК, экспрессии генов и ковалентных модификациях гистонов в этих клетках. Одним из наиболее актуальных вопросов остается влияние этих различий на свойства и качество ИПСК.

ВЛИЯНИЕ «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ» НА СВОЙСТВА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Наследование ряда черт эпигеномов и транскриптомов клеток исходного типа затрагивает лишь небольшой набор генов. Степень влияния aberrантной регуляции этих генов на свойства получаемых ИПСК активно изучается. Установлено, что ДМР, унаследованные в результате «эпигенетической памяти», приводят к сдвигу спектра дифференцировки, т.е. наблюдается преимущественная дифференцировка линий ИПСК в направлении соматических клеток исходного типа. Так, например, показано, что ИПСК мыши, полученные из клеток крови и кожи, обладают различным потенциалом дифференцироваться в гемопоэтическом и остеогенном направлениях соответственно. ИПСК, полученные из клеток крови, имели большее сродство к образованию гемопоэтических колоний, тогда как ИПСК из клеток кожи сформировали большее число колоний при дифференцировке в остеогенном направлении [16]. Оценивали также потенциал дифференцировки ИПСК человека, полученных из клеток неонатальной пуповинной крови и кератиноцитов крайней плоти [21]. В эмбрионидных тельцах на 6-й день культивирования определили уровень экспрессии гена кератина-14 – раннего маркера дифференцировки. В ИПСК, полученных из кератиноцитов, экспрессия данного гена была в 9.4 раза выше, что говорит о гораздо большем потенциале дифференцировки данных клеток в сторону кератиноцитов, чем у ИПСК из клеток пуповинной крови. Это свойство справедливо и в обратном направлении: ИПСК, полученные из клеток пуповинной крови, со значимо большей эффективностью дифференцировались в гемопоэтическом направлении [21].

Наличие «эпигенетической памяти» также может приводить к серьезным последствиям при использовании ИПСК для работ *in vivo*. Так, M. Stadtfeld и др. [25] исследовали ИПСК мыши, полученные из различных соматических клеток-предшественников: гемопоэтических стволовых клеток (11 линий), предшественников клеток гранулоцитарно-макрофагального ряда (11 линий), гранулоцитов (9 линий), перитонеальных фибробластов (6 линий), фибробластов хвоста (6 линий) и кератиноцитов (6 линий). В резуль-

тате клетки большинства линий не были способны эффективно образовывать химеры и формировать полноценный организм при тетраплоидной комплементации. Сравнение ЭСК и ИПСК на уровне мРНК показало, что в большинстве клонов ИПСК, как и в исходных линиях соматических клеток, и в отличие от ЭСК, репрессированы импринтированные гены – *Gtl2* (или *Meg3*) и *Rian* локуса *Dlk1-Dio3*, расположенного у мыши в районе 12qF1. Известно, что гены данного локуса принимают участие в процессах роста и дифференцировки некоторых тканей, постнатальных неврологических и метаболических процессах [26]. Полногеномный анализ профиля экспрессии микроРНК в ЭСК и ИПСК показал, что из 336 микроРНК 21 (6.3%) по-разному экспрессируются в ЭСК и ИПСК. Причем все эти микроРНК экспрессируются с хромосомы 12qF1 и репрессированы в ИПСК. Методом иммунопреципитации хроматина показано, что в локусе *Dlk1-Dio3* в ИПСК значительно снижен уровень ацетилирования гистонов H3 и H4 и метилированной формы H3K4, ассоциированных с транскрипционно активным хроматином [25].

Стоит также отметить, что наследование эпигенетического и транскрипционного статуса исходных соматических линий наблюдается не у всех импринтированных генов. С помощью количественной ПЦР показано, что экспрессия других импринтированных генов в ИПСК носит клоносpezifичный характер [16]. Этот факт подтверждается результатами другой работы, в которой ИПСК получали из нейтральных стволовых клеток, выделенных от партеногенетического эмбриона мыши. С использованием микрочипов показано, что в этих клетках уровень экспрессии генов с отцовским импринтингом – *Peg1* (или *Mest*), *Ndn* и *Snurf*, значительно снижен по сравнению с соматическими клетками, полученными из эмбрионов после естественного оплодотворения. В результате процесса репрограммирования данные гены подвергаются реактивации [27].

Таким образом, феномен «эпигенетической памяти» оказывает значительное влияние на свойства ИПСК и может приводить к серьезным последствиям. Соответственно при использовании ИПСК в моделировании заболеваний и в области регенеративной клеточной медицины данный аспект требует дополнительного внимания.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА ЭПИГЕНОМ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Минимальные отличия в эпигеномах и транскриптомах, образующиеся в результате «эпигенетической памяти» и/или aberrантного метилирования *de novo*

в ИПСК и в ЭСК, могут приводить к довольно существенным изменениям их свойств. В связи с этим возникает вполне закономерный вопрос о том, какие факторы влияют на характер и число таких различий и возможно ли искусственно создать условия для корректировки подобных эффектов.

В первую очередь стоит отметить, что на качество ИПСК в целом и на число «эпигенетических меток» в частности влияют условия и длительность культивирования. Репрограммирование – процесс постепенный, и изменение транскриптома и эпигенома клетки также требует определенного количества раундов репликации и митотических делений и, следовательно, числа пассажей. Показано, что с увеличением числа пассажей происходит если не полное нивелирование эпигенетических различий, то значительное снижение их числа. Так, например, в 12 независимых линиях ИПСК мыши, полученных из клеток разного типа (β -клеток, фибробластов, Т-клеток, гранулоцитов), на ранних пассажах число дифференциально экспрессирующихся генов составляло от 500 до 2000 в зависимости от линии, и за 14 пассажей это число сократилось примерно до 50, а в некоторых линиях даже до нуля [17]. Исчезновение различий между линиями ИПСК коррелировало с появлением бивалентных доменов: накоплением триметилированного H3K4 (метка активного хроматина) и триметилированного H3K27 (метка неактивного хроматина), характерных для плюрипотентных клеток [17]. Изучение паттерна метилирования 7 независимых линий ИПСК человека также показало, что число ДМР в них значительно сократилось: так, на ранних пассажах число ДМР варьировало в различных линиях от 80 до 256, тогда как на 30–40 пассажах – от 30 до 70 [20]. Сокращение числа ДМР приводит к возрастанию способности клеток давать при дифференцировке производные всех трех зародышевых листков с одинаковой эффективностью. Так, например, ИПСК, полученные из кератиноцитов, в ходе дифференцировки с очень низкой эффективностью формировали колонии кроветворных клеток, что обусловлено остаточным метилированием генов, вовлеченных в гемопоез, как, например, ген *HOXD8*. В кератиноцитах и вследствие «эпигенетической памяти» в полученных из них линиях ИПСК ген *HOXD8* значительно метилирован, тогда как в процессе культивирования ИПСК уровень метилирования гена *HOXD8* снижается и параллельно увеличивается способность клеток к гемопоэтической дифференцировке. Однако такой эффект отмечен лишь для одного из двух исследуемых клонов. Таким образом, продолжительное культивирование ИПСК способно, по-видимому, влиять на определенные локусы генома, но это справедливо не для всего генома и всех линий ИПСК [21].

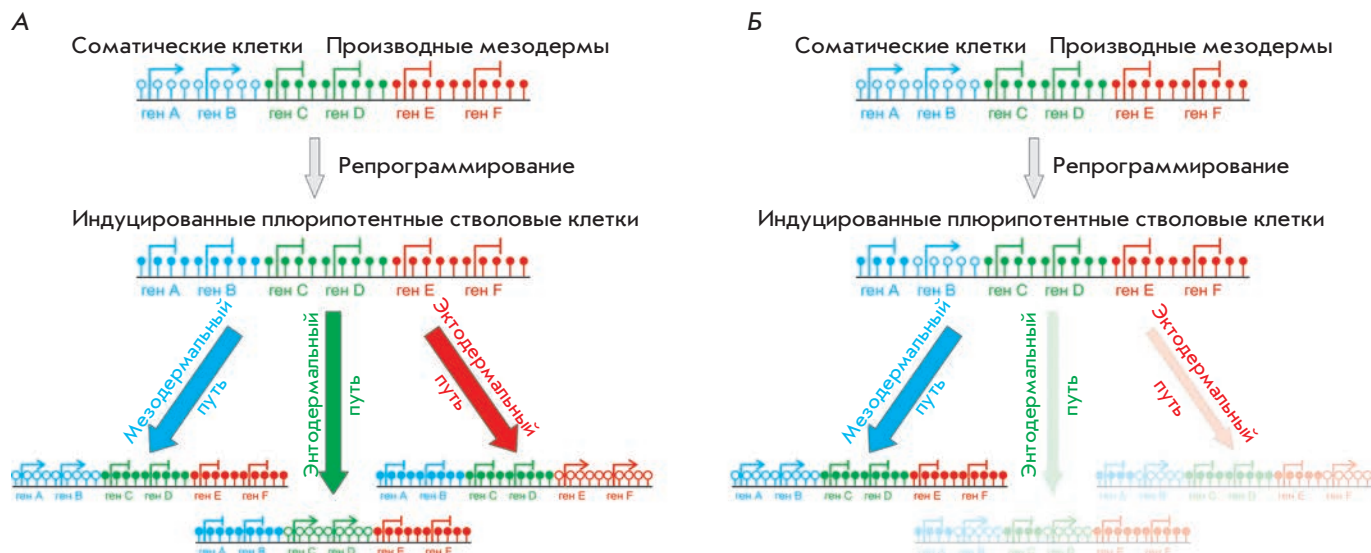
Существуют две гипотезы, объясняющие элиминирование молекулярных и функциональных различий клонов ИПСК в процессе культивирования. Один из возможных механизмов – пассивная утрата соматических маркеров, ассоциированная с процессом репликации ДНК. Альтернативным вариантом является селекция клонов в процессе культивирования, направленная на поддержание клонов с меньшим числом черт исходных клеток. Тем не менее целый ряд наблюдений свидетельствует против селекции. Так, ИПСК на ранних и более поздних пассажах имеют одинаковый уровень пролиферации и одинаковые темпы роста клонов, происходящих из одной клетки. Также число пассажей (т.е. необходимое число раундов репликации), необходимых культуре для элиминирования молекулярных и эпигенетических различий между клонами, зависит от исходного типа соматических клеток [17].

В то же время получены данные, свидетельствующие о том, что в процессе культивирования число ДМР не сокращается. Так, например, метиломный анализ линий ИПСК на ранних (~15) и на поздних пассажах (~65) не выявил изменения числа ДМР [22].

Другой возможный фактор, который может повлиять на число ДМР в ИПСК, – условия культивирования (состав сред, концентрация O_2 , CO_2 и т.д.) и/или использование дополнительных химических агентов. Так, показано, что, используя оптимальные условия, можно значительно повысить «качество» ИПСК. Например, использование при получении ИПСК мыши среды, содержащей вместо эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота заменитель сыворотки или смесь эмбриональной сыворотки и заменителя, приводило к увеличению выхода клонов, в которых реактивировался импринтированный ген *Meg3* из локуса *Dlk1-Dio3* [28].

Различные химические агенты также влияют на экспрессию генов. Например, обработка ИПСК мыши трихостатином (ингибитор гистондеацетилаз) и 5-азациитидином (ингибитор ДНК-метилаз) приводит к изменениям эпигенома [16]. Обработка вальпроевой кислотой (ингибитор гистондеацетилаз) клонов ИПСК мыши, в которых репрессирован импринтированный локус *Dlk1-Dio3*, привела в ряде линий к реактивации генов данного локуса. Такие ИПСК были способны давать вклад в развитие организма при тетраплоидной комплементации [25].

Показано, что аскорбиновая кислота (витамин С) также влияет на паттерн метилирования ДНК [29]. Так, в ИПСК, культивируемых с добавлением в среду аскорбиновой кислоты, в зависимости от ее дозы, наблюдалась реактивация импринтированного гена *Meg3* локуса *Dlk1-Dio3*. Однако аскорбиновая кис-



Феномен «эпигенетической памяти» в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках. **А** – «идеальная» картина процесса репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию, когда индуцированные плюрипотентные стволовые клетки полностью плюрипотентны, и дифференцировка во все три зародышевых листка является равновероятным событием. **Б** – в результате репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию клетки могут сохранять ряд черт эпигенома предкового типа. Такой феномен приводит к преимущественной дифференцировке ИПСК в направлении соматических клеток исходного типа

лота не приводит к масштабному деметилированию всего генома: она в состоянии только предотвратить aberrantное метилирование локуса *Dlk1-Dio3* в процессе репрограммирования, но не способна привести к деметилированию ДНК в уже стабильных клонах ИПСК [28].

В то же время способность клеток к дифференцировке в определенном направлении и профиль метилирования можно восстановить путем повторных раундов репрограммирования. Показано, что, например, ИПСК, полученные из клеток-предшественников нейрального ряда, обладали очень низкой способностью формировать колонии гемопоэтических клеток. Но когда такие колонии подвергались репрограммированию, то формирование гемопоэтических колоний «вторичными» ИПСК значительно возросло [16].

Таким образом, варьируя систему репрограммирования, условия культивирования, добавление или удаление химических агентов, длительность культивирования, можно получить ИПСК, максимально приближенные по своим свойствам к «стандарту» – ЭСК. Однако в любом варианте сохраняются минимальные отличия в транскриптомах и эпигеномах этих клеток. Является ли данный фактор преградой на пути к практическому применению ИПСК? Этот вопрос в настоящее время активно обсуждается.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕНОМЕНА «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ» В БИМЕДИЦИНЕ

Современная биомедицина и фармакология требуют создания новых, более совершенных модельных систем заболеваний. Эти модели должны соответствовать определенному набору критериев: воспроизводимости, доступности, простоте использования, однозначности трактовки получаемых результатов, способности адекватного переноса, т.е. трансляции результатов, полученных в фундаментальных исследованиях, в область практического применения в медицине [30–33].

Современный массив исследований в данной области показал, что использование ИПСК является одним из наиболее перспективных подходов. Однако при создании моделей заболеваний человека на основе ИПСК необходимо учитывать все факторы, способные повлиять на качество получаемых данных. Один из таких значимых факторов – «эпигенетическая память». Является ли этот феномен недостатком или преимуществом моделей на основе ИПСК? На сегодняшний день этот вопрос остается открытым. Чтобы попытаться ответить на него, рассмотрим проблемы современной биомедицины с точки зрения использования ИПСК.

В области заместительной клеточной терапии актуально наличие в достаточном количестве опреде-

ленного клеточного материала, пригодного для работы. Эта проблема носит множественный характер. Во-первых, это доступность исходных донорских клеток, поскольку для большого числа типов клеток затруднительным представляется получение биоптатов, например, для различных типов нейронов или эпителия внутренних органов. Во-вторых, это проблема количества материала. Количество получаемого материала ограничено даже при возможности проведения биопсии, более того, клетки, как правило, терминально дифференцированы, а значит, обладают ограниченной пролиферативной активностью. Это приводит к тому, что стандартных методов недостаточно для проведения всех необходимых манипуляций и анализов в полном объеме. Данную проблему можно решить с помощью ИПСК, получаемых из ограниченного количества биоптата. ИПСК обладают неограниченным потенциалом пролиферации, поэтому их можно неоднократно подвергать дифференцировке в клетки нужного типа, что создаст неисчерпаемый источник клеток для проведения всех необходимых анализов и манипуляций.

Кроме того, возникает проблема корректной и эффективной дифференцировки ИПСК в клетки необходимого типа. На сегодняшний день, несмотря на обильный массив знаний о сигнальных путях и факторах транскрипции, связанных с развитием по тому или иному пути, лишь для ограниченного количества типов клеточных культур разработаны протоколы направленной дифференцировки. Таким образом, даже при наличии линий ИПСК не всегда существует возможность получения конкретного, узкоспециализированного типа клеток. В решении этой проблемы можно использовать феномен «эпигенетической памяти». На основании высокопроизводительных анализов, направленных на изучение «эпигенетической памяти», мы предлагаем следую-

щую схему использования данного феномена в области заместительной клеточной терапии (*рисунок*). Известно, что в результате сохранения ряда черт эпигеномов и транскриптомов исходного типа клеток ИПСК имеют склонность дифференцироваться в направлении происхождения соматических клеток исходного типа. Соответственно для получения дифференцированных производных определенного типа клеток целесообразно использовать биоптатный материал из клеток того же происхождения. При этом необходимо учесть ряд моментов: во-первых, число клонов ИПСК для анализа должно быть не менее десяти, что позволит, при наличии вариативности между клонами, выбрать наиболее оптимальные. Во-вторых, путем сравнения совокупности данных транскриптомного и метиломного анализа с имеющимися базами данных нужно решить, произошла ли в результате репрограммирования реактивация генов, образующих так называемые «горячие точки» недорепрограммирования, выявить спектр генов, эпигенетические метки которых унаследованы от соматических клеток предкового типа. Наконец, изучение на функциональном уровне генов, подверженных влиянию «эпигенетической памяти», позволит предсказать направление дифференцировки клеток, а при использовании специальных условий направить процесс дифференцировки по определенному пути. Таким образом, на данном примере мы показываем, что недостатки ИПСК в виде неполного репрограммирования, а именно наследования ряда черт эпигеномов и транскриптомов, можно перевести в преимущества. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8264) и РФФИ (гранты № 11-04-00847-а, 12-04-00185-а и 12-04-00208-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Spivakov M., Fisher A.G. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 4. P. 263–271.
- Bibikova M., Chudin E., Wu B., Zhou L., Garcia E.W., Liu Y., Shin S., Plaia T.W., Auerbach J.M., Arking D.E., et al. // *Genome Res.* 2006. V. 16. № 9. P. 1075–1083.
- Doi A., Park I.H., Wen B., Murakami P., Aryee M.J., Irizarry R., Herb B., Ladd-Acosta C., Rho J., Loewer S., et al. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 12. P. 1350–1353.
- Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 3. P. 340–345.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // *Cell*. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- 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., et al. // *Science*. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Zhao X.Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo C.L., Ma Q.W., Wang L., et al. // *Nature*. 2009. V. 461. № 7260. P. 86–90.
- Pick M., Stelzer Y., Bar-Nur O., Mayshar Y., Eden A., Benvenisty N. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 11. P. 2686–2690.
- Hussein S.M., Batada N.N., Vuoristo S., Ching R.W., Autio R., Narva E., Ng S., Sourour M., Hamalainen R., Olsson C., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7336. P. 58–62.
- Ben-David U., Benvenisty N., Mayshar Y. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 23. P. 4603–4604.
- Martins-Taylor K., Xu R.H. // *Stem Cells*. 2011. V. 30. № 1. P. 22–27.
- Sun B., Ito M., Mendjan S., Ito Y., Brons I.G., Murrell A., Vallier L., Ferguson-Smith A.C., Pedersen R.A. // *Stem Cells*. 2011. V. 30. № 2. P. 161–168.

15. Bar-Nur O., Russ H.A., Efrat S., Benvenisty N. // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 9. № 1. P. 17–23.
16. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.L., et al. // *Nature*. 2010. V. 467. № 7313. P. 285–290.
17. Polo J.M., Liu S., Figueroa M.E., Kulalert W., Eminli S., Tan K.Y., Apostolou E., Stadtfeld M., Li Y., Shioda T., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 8. P. 848–855.
18. Adams R.L. // *Biochem J.* 1990. V. 265. № 2. P. 309–320.
19. Trowbridge J.J., Orkin S.H. // *Epigenetics*. 2010. V. 5. № 3. P. 189–193.
20. Nishino K., Toyoda M., Yamazaki-Inoue M., Fukawatase Y., Chikazawa E., Sakaguchi H., Akutsu H., Umezawa A. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 5. P. e1002085.
21. Kim K., Zhao R., Doi A., Ng K., Unternaehrer J., Cahan P., Hongguang H., Loh Y.H., Aryee M.J., Lensch M.W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 12. P. 1117–1119.
22. 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.
23. Kaminsky Z.A., Tang T., Wang S.C., Ptak C., Oh G.H., Wong A.H., Feldcamp L.A., Virtanen C., Halfvarson J., Tysk C., et al. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 2. P. 240–245.
24. Shao K., Koch C., Gupta M.K., Lin Q., Lenz M., Laufs S., Denecke B., Schmidt M., Linke M., Hennies H.C., et al. // *Mol. Ther.* 2012. V. 21. № 1. P. 240–250.
25. 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.
26. da Rocha S.T., Edwards C.A., Ito M., Ogata T., Ferguson-Smith A.C. // *Trends Genet.* 2008. V. 24. № 6. P. 306–316.
27. Kim M.J., Choi H.W., Jang H.J., Chung H.M., Arauzo-Bravo M.J., Scholer H.R., Tae Do J. // *J. Cell Sci.* 2012. V. 126. № 11. P. 2516–2524.
28. Stadtfeld M., Apostolou E., Ferrari F., Choi J., Walsh R.M., Chen T., Ooi S.S., Kim S.Y., Bestor T.H., Shioda T., et al. // *Nat. Genet.* 2012. V. 44. № 4. P. 398–405.
29. Wang T., Chen K., Zeng X., Yang J., Wu Y., Shi X., Qin B., Zeng L., Esteban M.A., Pan G., et al. // *Cell Stem Cell*. 2011. V. 9. № 6. P. 575–587.
30. Medvedev S.P., Shevchenko A.I., Zakian S.M. // *Acta Naturae*. 2010. V. 2. № 2(5). P. 18–27.
31. Cohen D.E., Melton D. // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 4. P. 243–252.
32. Grskovic M., Javaherian A., Strulovici B., Daley G.Q. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011. V. 10. № 12. P. 915–929.
33. 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.