

На правах рукописи



ШУТОВА Мария Владимировна

**Эпигенетическая характеристика  
индуцированных плюрипотентных стволовых  
клеток человека.**

Специальность 03.02.07- генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2011

Работа выполнена в лаборатории Генетических основ клеточных технологий Учреждения Российской академии наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Киселев Сергей Львович**  
Учреждение Российской академии наук  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,  
г. Москва

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Томилин Алексей Николаевич**  
Учреждение Российской академии наук  
Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

кандидат биологических наук  
**Воротеляк Екатерина Андреевна**  
Учреждение Российской академии наук Институт  
биологии развития РАН, г. Москва

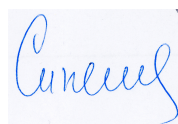
**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук  
Институт Цитологии и Генетики  
Сибирского Отделения РАН, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ декабря 2011 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании объединенного диссертационного совета Д 002.214.01 при Учреждении Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3. Факс: 8(499)1328962, электронный адрес: [aspirantura@vigg.ru](mailto:aspirantura@vigg.ru), адрес в Интернете: [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ ноября 2011 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Синельщикова Т.А.

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** В процессе индивидуального развития многоклеточного организма млекопитающих, клетки эмбриона проходят через множество стадий, постепенно теряя способность к дифференцировке: от тотипотентной зиготы через стадию плюрипотентных клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты, к мультипотентным региональным стволовым клеткам и, наконец, к терминально дифференцированным клеткам. На молекулярном уровне процесс дифференцировки клеток и обретение ими определенного фенотипа сопровождается изменением экспрессии генов, и эпигенетическими изменениями, такими как: статуса метилирования генома, модификацией гистоновых белков и т.д. При нормальном развитии этот процесс необратим. Первые попытки провести дедифференцировки клеток *in vitro* были предприняты еще в середине прошлого века. Оказалось, что при переносе ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит с низкой эффективностью происходит восстановление потенциала дифференцировки соматической клетки, что может приводить к полноценному развитию эмбриона. Эти исследования доказали принципиальную возможность репрограммирования генома соматической клетки до плюрипотентного состояния *in vitro*, более того, из них стало очевидно, что в клетках содержатся все необходимые факторы для репрограммирования. Однако, еще некоторое время набор этих факторов, необходимых для дедифференцировки клеток оставался неизвестным. Впервые прямое репрограммирование соматических клеток с помощью набора определенных факторов было осуществлено в 2006 году японскими исследователям Такаши и Яманака. Оказалось, что вполне достаточно экспрессии четырех генов, кодирующих транскрипционные факторы Oct3/4, Sox2, KLF4, и c-Myc для того чтобы фибробласты кожи мыши перешли в плюрипотентное состояние. Полученные клетки были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками, iPS клетками (induced pluripotent stem cells). По своим свойствам они оказались практически идентичны – их природным аналогам, получаемым из ВКМ бластоцисты - эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК). Как и ЭСК, iPS клетки в отсутствии сигналов дифференцировки и в присутствии факторов, обеспечивающих самоподдержание, продолжают симметрично делиться в течении неограниченного времени. В то же время, сменив условия культивирования, можно получить контролируемую дифференцировку ЭСК и iPS клеток в клетки-производные трех зародышевых листков. iPS клетки можно получить для каждого человека персонально, исследовать молекулярные механизмы возникновения патологии, и попытаться подобрать лекарственные средства для устранения причин

патологии или, более того, устранить генетическую причину заболевания и использовать клетки для трансплантации. Все это открывает новые возможности для персонализированной медицины. Однако, до сих пор остается нерешенным целый ряд вопросов фундаментального характера: как именно происходит репрограммирование, какие процессы обеспечивают возвращение клетки в плюрипотентное состояние, и насколько похожи «искусственные» плюрипотентные клетки iPS на их «природные» аналоги — ЭСК? Настоящая диссертационная работа посвящена актуальным вопросам репрограммирования генома соматической клетки до плюрипотентного состояния.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы явилась разработка модели репрограммирования и поиска наиболее оптимальных для репрограммирования соматических клеток, анализ эпигенома репрограммированных клеток, а также сравнение iPS клеток с генетически идентичными им ЭСК человека. В работе были поставлены следующие экспериментальные задачи:

- разработать протоколы по получению клеток с индуцированной плюрипотентностью из соматических клеток;
- провести генетическую и эпигенетическую характеристику полученных iPS клонов;
- создать модельную систему для изучения процессов репрограммирования;

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Настоящая работа вносит существенный вклад в современные представления о репрограммировании клеток человека. Впервые проведено репрограммирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Показано, что полученные клоны близки к эмбриональным стволовым клеткам человека по своим морфологическим, функциональным, и молекулярным характеристикам, в том числе на эпигенетическом уровне. Подтверждена ключевая роль гена Oct4 в приобретении и поддержании плюрипотентного состояния. Впервые продемонстрировано, что уровень полногеномного метилирования плюрипотентных клеток выше, чем соматических. Создана модельная система для изучения точности процесса репрограммирования в изогенных условиях. Проведена ее проверка при репрограммировании нейрональных клеток человека.

Практическая ценность работы заключается в разработке протокола репрограммирования легко доступных клеток эндотелия пуповины, доказательстве высокого сходства индуцированных плюрипотентных клеток, полученных из эндотелия и ЭСК. Это дает возможность дальнейшего их применения для персонализированной регенеративной медицины. Созданная модельная система позволит оптимизировать протоколы получения индуцированных плюрипотентных клеток из различных тканей взрослого организма.

**Участие автора в получении результатов исследования.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Биоинформатический анализ был проведен совместно с к.б.н. Васиной Е.М., анализ кариотипа - совместно с к.б.н. Богомазовой А.Н., эксперимент по образованию тератом - совместно с д.б.н. Лагарьковой М.А.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на V съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009), 7й и 9й ежегодной международной конференции общества исследователей стволовых клеток (International Society for Stem Cell Research) (Барселона, 2009; Торонто, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ. Из них статей – 5, тезисов докладов и материалов конференций – 8.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на \_\_\_\_\_ страницах, \_\_\_\_\_ содержит рисунков и \_\_\_\_\_ таблиц, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результаты и обсуждения, Выводов и Списка литературы, включающего \_\_\_\_\_ источников.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **1. Репрограммирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES).**

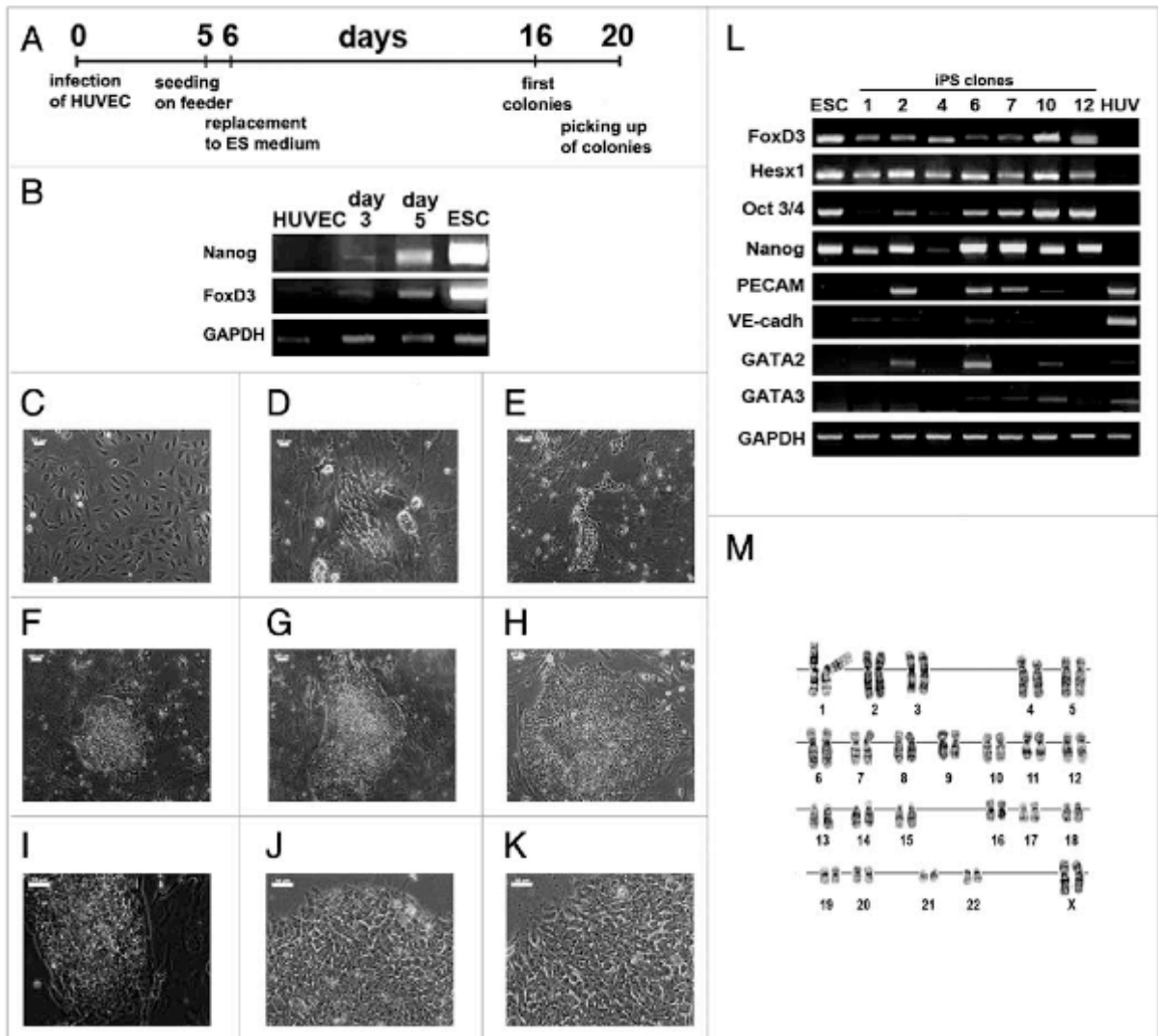
Предыдущие опыты по репрограммированию различных типов клеток мыши и человека доказали, что тип клеток влияет на эффективность и кинетику этого процесса. К тому же, выбор типа клеток важен для возможного будущего использования репрограммированных клеток в биомедицинских целях. Доступность выбранного типа клеток, а также их возраст могут быть ключевыми факторами при репрограммировании. Например, клетки кожи человека часто используют для репрграммирования из-за их доступности и простоты манипуляций, несмотря на то, что они подвергаются ультрафиолетовому излучению и могут накапливать мутации, которые ограничивают их терапевтическое применение. Наряду с этим, культивирование клеток *in vitro*, добавление разнообразных факторов роста, необходимых для увеличения стартового количества клеток, также могут вызывать изменения на эпигенетическом и генетическом уровнях. Таким образом, выбор экспериментального типа клеток влияет как на генетическую «чистоту» получаемых клеток, так и на прохождение всего процесса репрограммирования.

Для индукции плюрипотентного состояния в человеческих соматических клетках были выбраны клетки эндотелия пупочной вены человека (HUVES). Их легко выделить в достаточном для репрограммирования количестве, и они практически не требуют манипуляций в культуре. Также, эти клетки еще не подверглись действию факторов внешней среды, что уменьшает количество приобретенных повреждений ДНК. Данные по репрограммированию клеток эндотелия в литературе отсутствовали.

Для репрограммирования были использованы ретровирусы, несущие гены транскрипционных факторов. С помощью клеток Phoenix по стандартному протоколу были получены ретровирусы, несущие в своем составе гены *Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4* и *c-Myc*. Диплоидные клетки HUVEC, полученные из пупочной вены новорожденной были инфицированы вирусами. Гомогенность и идентичность HUVEC была определена с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием антител к антигенам CD31 и CD144. Антитела к CD90 были использованы для того, чтобы обнаружить контаминацию фибробластами, которая могла произойти при выделении клеток HUVEC. Проведенный анализ показал чистоту популяции выделенных клеток, и доказал их принадлежность к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека, HUVEC.

Протокол получения iPS клеток описан в разделе «Материалы и методы» и схематично приведен на рис. 1А. На третий и пятый день после инфекции часть репрограммируемых клеток была отобрана для анализа индукции экспрессии эндогенных *Nanog* и *FoxD3* (рис. 1В). Эти ТФ в норме не экспрессируются в клетках HUVEC. Их экспрессия была обнаружена уже на третий день после вирусной инфекции. Оба ТФ являются генами-мишенями *Oct4*, таким образом начало процесса репрограммирования в клетках HUVEC происходит уже на третий день после инфекции. Клетки велись на среде для HUVEC в течении пяти дней, и потом пересаживались на инактивированные митомицином мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ). На шестой день после инфекции среда менялась на среду для ЭСК. Примерно на 12 день после инфекции появились первые колонии, морфологически отличающиеся от фидерного слоя фибробластов или эндотелиальных клеток (рис. 1С-К). На 16 день колонии приобрели морфологию, близкую к ЭСК человека, что становится явно видно примерно на 20 день (рис. 1F и G). На 21 день по морфологическому сходству с ЭСК с фидерного слоя были отобраны одиночные колонии. Они механически разбивались на маленькие кусочки без обработки ферментом, и пересевались на инактивированные МЭФ или матригель с добавлением соответствующей среды. Часть колоний изначально была неотличима от клеток ЭСК человека (клоны 10 и 12, рис. 1I-К), а часть (например, «несовершенный» клон 6) приобрели ЭСК-подобную морфологию только через шесть пассажей на фидере. При этом, клон 6 разделился на два субклона - с морфологией похожей, и непохожей на ЭСК. Из литературных данных известно, что первоначальный отбор следует совершать именно исходя из ЭСК-подобной морфологии трансформированных клеток, т.к. после анализа полученных клонов оказывается, что клоны, морфологически неотличимые от ЭСК, обладают самыми близкими к ЭСК характеристиками, и, таким образом, являются наиболее совершенными.

Все отобранные клоны с первого пассажа параллельно велись на матригеле в среде mTeSR1, а также в фидерных условиях. Всего из  $3 \times 10^5$  HUVEC было выделено 12 клонов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток эндотелия (endo-iPS).



**Рисунок 1.** Получение и характеристика линий endo-iPS клеток человека. (A) Схема получения iPS клеток. Колонии iPS отбирались на основании морфологической схожести с ЭСК. (B) ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов *Nanog* и *FoxD3* после вирусной инфекции. В указанные дни клетки отбирались для выделения РНК для анализа на эндогенную экспрессию ТФ. (С-К) Морфологические изменения в течении прямого репрограммирования. Показаны характерные колонии: (C) клетки HUVEC сразу после вирусной инфекции; (D и E) первые колонии репрограммированных клеток появились на 16 день, после переноса на фидер большинство HUVEC погибло или стало неотличимыми от фидерных клеток; (F и G) ЭСК-подобные колонии перед пересевом на 20 день; (H) после посева некоторые колонии все еще морфологически отличались от ЭСК; (I) другие оказывались неотличимы от ЭСК (например, клон 10 на фидере). (J и K) Пример морфологии колонии iPS клона (клон 12, пассаж 2), и линии ЭСК (hESM01), растущих на матригеле. (L) ОТ-ПЦР анализ на экспрессию генов плюрипотентных (*FoxD3*, *Nanog*, *Oct3/4*, *Hesx1*) и эндотелиально-специфичных (*PECAM*, *VE-cadh*, *GATA2*, *GATA3*) маркеров в клонах iPS, ЭСК (как позитивный контроль), и HUVEC (негативный контроль). В качестве контроля количества матрицы был использован ген домашнего хозяйства *GAPDH*. (M) Анализ кариотипа растущего на матригеле endo-iPS клона 12, 20 пассаж.

Таким образом, эффективность процесса репрограммирования в нашем случае оказалась довольно низка, около 0,03%. При создании endo-iPS клонов для повышения эффективности не были использованы малые молекулы, которые могут модулировать эпигенетическое состояние генов и гистонов, а также влиять на прохождение тех или иных сигнальных путей во время репрограммирования. Такая, «чистая», методика репрограммирования с использованием только соответствующих экзогенных транскрипционных факторов и условий культивирования позволяет говорить о том, что в полученных endo-iPS клонах эпигеном остается интактен, и не подвержен никаким воздействиям кроме самого процесса репрограммирования.

Динамика репрограммирования (как появление первых клонов на 16 день, так и полное репрограммирование на 21) была аналогична опубликованным данным по репрограммированию фибробластов.

### **1. 1. Характеристика endo-iPS клеток.**

Хотя морфологически все отобранные колонии endo-iPS были похожи на ЭСК, ОТ-ПЦР анализ показал, что в разных линиях endo-iPS клеток уровень экспрессии плюрипотентных и эндотелиальных маркеров варьирует (рис. 2L). В некоторых клонах мы не наблюдали экспрессии генов *PECAM (CD31)* и *VE-cadherin*, в то время как клетки других клонов экспрессировали эти специфичные для эндотелия гены на разных уровнях. Иммунофлуоресцентное окрашивание показало присутствие Oct3/4 и Nanog в ядрах всех клонов репрограммированных клеток (рис. 2A-C, табл. 1). Также во всех клонах наблюдалась экспрессия характерных для ЭСК поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA1-60 (рис. 2D-E). Во всех проанализированных клонах также наблюдалась экспрессия CD30 (рис. 3A), который, по нашим данным, также характерен для плюрипотентных клеток.

Несмотря на присутствие мРНК PECAM в некоторых endo-iPS клонах, мы не смогли детектировать этот поверхностный антиген с помощью антител в этих клонах репрограммированных клеток (рис. 3B). В endo-iPSC также отсутствовала экспрессия CD105 (рис. 3C, табл. 1). Эти наблюдения показывают, что HUVES в процессе репрограммирования приобретают не только ЭСК подобную морфологию, но также начинают экспрессировать гены, характерные для плюрипотентного состояния и теряют эндотелиальные маркеры.



Expression of hESC-specific and endothelial-specific markers evaluated by RT-PCR										
Cell line gene	hESC	iPS clones								HUVEC
		1	2	4	6	7	10	12		
FoxD3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Hesx1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Oct3/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Nanog	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
CD31	—	+	+	—	+	+	+	—	—	+
VE-cadh	—	+	+	—	+	+	—	—	—	+
GATA2	—	—	+	—	+	—	+	—	—	+
GATA3	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+

Expression of hESC-specific and endothelial-specific markers evaluated by immunocytochemistry										
Cell line gene	hESC	iPS clones								HUVEC
		1	2	4	6	7	10	12		
Oct3/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Nanog	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Tra-1-60	+	—	—	—	+	—	+	+	+	—
SSEA-4	+	—	+	+	—	+	+	+	+	—
CD30	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—
CD31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
CD105	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
CD90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Таблица 1.** Экспрессия специфических маркеров endo-iPS клонами.

Важно заметить, что после прохождения процесса репрограммирования в «совершенных» iPS кломах экспрессия экзогенов прекращалась (по данным ОТ-ПЦР). Для того, чтобы подтвердить, что endo-iPS клоны были получены непосредственно из клеток

HUVEC, а не являются результатом случайной контаминации клетками ЭСК, мы провели генотипирование клеток по STR локусам. Паттерн из 18 STR полностью совпадал между endo-iPS клонами и родительской линией HUVEC, в то же время, отличаясь от линий ЭСК человека, которые мы используем в лаборатории. Таким образом было доказано, что endo-iPS линии оригинальны, и были получены из клеток HUVEC без контаминаций другими линиями ЭСК. Полученные линии endo-iPS клеток были разделены на две группы на основе экспрессии маркеров ЭСК, иммуноцитохимической и морфологической характеристик. Две линии (endo-iPS 10 и 12) были наиболее близки к ЭСК, в то время как другие не имели всех свойств полностью репрограммированных клеток (табл. 1).

## 1.2. Анализ кариотипа и уровня пролиферации линий endo-iPS.

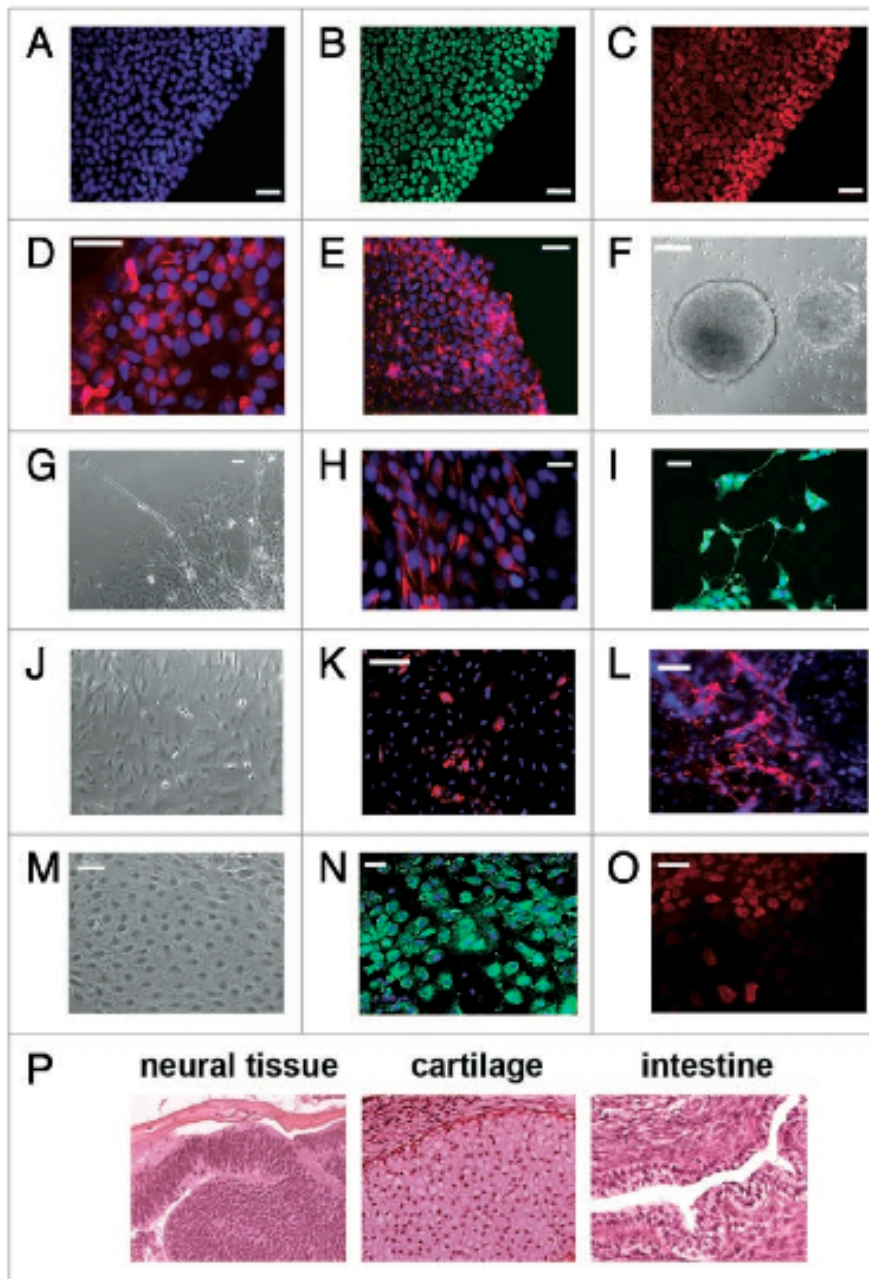
Пролиферация и стабильность кариотипа - важные требования для роста и выделения клеток iPS *in vitro*. Клоны endo-iPS 10 и 12 росли на матригеле в среде mTeSR1 с первого пассажа и показывали сходную с ЭСК кинетику роста. Популяция endo-iPS удваивалась каждые 31-34 часа, а ЭСК - раз в 30-36 часов. Эти endo-iPS клоны пассировались в той же пропорции (1:3) и с той же частотой (каждые 5-6 дней), что и ЭСК человека, и не меняли своих свойств течении как минимум 21 пассажа.

Кариотипирование endo-iPS клеток был проанализирован через 5 и через 20 недель после получения, используя стандартный протокол по окрашиванию клеток красителем Гимза после трипсинизации (GTG бэндинг). У обеих выбранных endo-iPS линий (10 и 12) был нормальный XX кариотип (рис. 1M, рис. 3D). Это говорит о том, что выбранные линии стабильны в течении пассажей, и, вероятно, полностью репрограммированы.

Таким образом мы доказали, что полученные линии endo-iPS клеток могут стабильно поддерживаться в безфидерных условиях в среде с полностью охарактеризованными компонентами, что приближает их к «золотому стандарту» плюрипотентных клеток - ЭСК.

### **1.3. Дифференцировочный потенциал endo-iPS клонов.**

Функционально плюрипотентные клетки характеризуются возможностью дифференцироваться в клетки, принадлежащие к трем зародышевым листкам. Для подтверждения плюрипотентности полученных линий endo-iPS клеток *in vitro* мы провели тест на образование эмбриоидных тел (ЭТ) из клонов 10 и 12. Через 6 дней в суспензии endo-iPS 10 и 12 сформировали сферические структуры, подобные ЭТ (рис. 2F), которые в дальнейшем образовали типичные цистоподобные структуры (рис. 3E). Иммуногистологический анализ ЭТ выявил участки, позитивные на MOC-31, cytokeratin-7, vimentin и nestin (рис. 3F-I). Характерное расположение этих антигенов внутри ЭТ позволило нам различить слой экстраэмбриональной эндодермы, внутренний цистный эпителий, нейрональные предшественники, и другие показатели первых шагов дифференцировки. Таким образом, ЭТ полученные из обоих клонов, экспрессировали маркеры трех зародышевых листков. При дальнейшей спонтанной дифференцировке и культивировании в определенных условиях, описанных в разделе «Материалы и методы», endo-iPS клетки продолжали дифференцировку в клетки, принадлежащих к трем зародышевым листкам (эндо-, мезо-, и эктодерма). Дифференцировка endo-iPS в разные клеточные типы была подтверждена иммуноцитохимическим окрашиванием на соответствующие антигены. Эктодермальные клетки были окрашены на наличие GFAP и нейрон-специфичной энолазы, мезодермальные фибробластоподобные клетки - на пролин 4-гидроксилазу (рис. 2J-I, рис. 3K и L). Эндотелиальные клетки, полученные из endo-iPS были окрашены на специфические маркеры vWF и CD31 (рис. 2J-L). Полученные дифференцированные производные были полностью функциональны. Например, клетки, положительные на CD31, были успешно сепарированы с помощью магнитных частиц, и прошли функциональный тест на формирование сосудо-подобных структур *in vitro* (рис. 3M). Эндодермальная дифференцировка была подтверждена окрашиванием на альфафетопротеин и GATA-6 (рис. 2M-O).

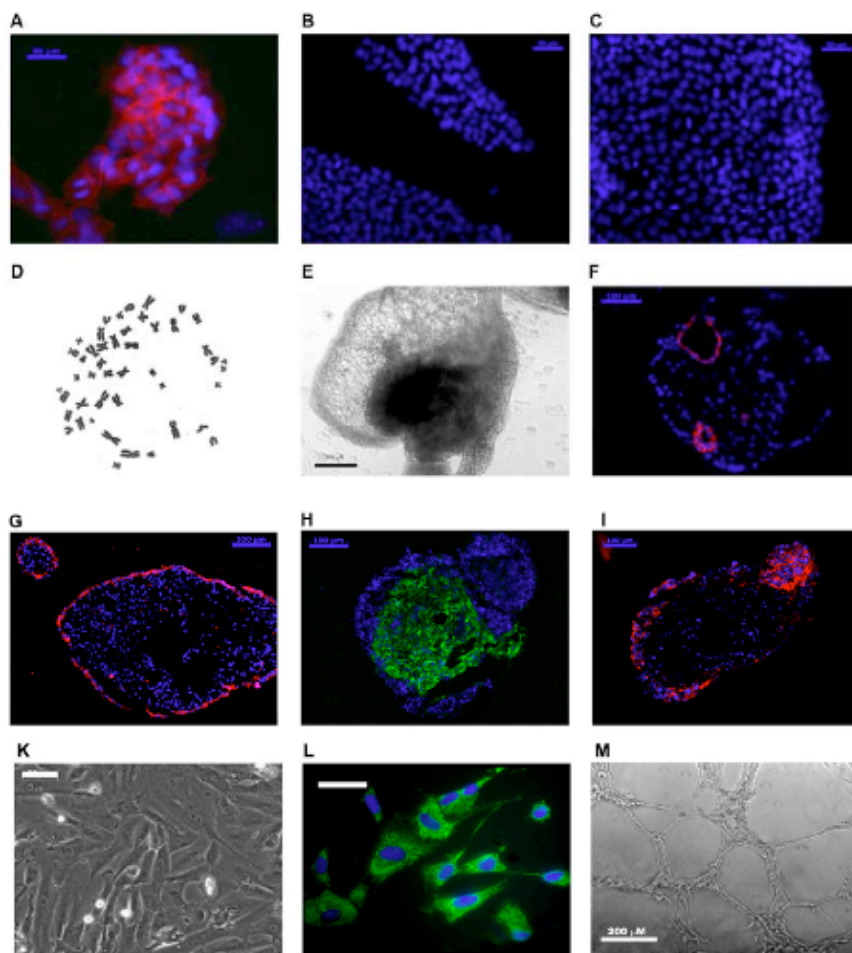


**Рисунок 2.** Иммуноцитохимическая характеристика endo-iPS и их дифференцированных производных. (А-Е) Недифференцированные endo-iPS клоны экспрессируют маркеры, характерные для ЭСК. (А) 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (синий) окрашивание показывает общее количество клеток в поле зрения. ИЦХ с антителами, специфическими для OCT3/4 (В), NANOG (С), Tra-1-81 (D), SSEA4 (Е). Показаны характерные колонии endo-iPS 10 и 12. (F) Формирование ЭТ. (G, J, М) Различные типы морфология прикрепленных ЭТ. (G-I) Эктодермальная дифференцировка (нейроны и глия). (G) На просвет, (H) окрашивание на антитела к GFAP (красные), (I) на нейрон-специфическую эналазу (зеленые). (J-L)

Дифференцировка в мезодерму (эндотелиальные клетки). (J) В проходящем свете, (K) окрашивание на vWF (кр.), (L) на CD31 (кр.). (M-O) Энтодермальная дифференцировка. (M) На просвет, (N) окрашивание на альфафетопротеин (зел.), (O) на GATA-6 (кр.). Показаны репрезентативные ЭТ, сформированные при дифференцировке линий endo-iPS-10 и endo-iPS-12. (P) Гемтоксилиновое и эозинового окрашивание тератомоподобных структур, полученных при инъекции endo-iPS-12 в иммунодефицитных мышей. Показанные срезы представляют три эмбриональных зародышевых листка: нейрональную ткань (эктодерма), хрящ (мезодерма), и кишечный эпителий (энтодерма).

Для того, чтобы подтвердить плюрипотентность endo-iPS человека *in vivo* мы использовали стандартный тест формирования тканей, принадлежащих трем зародышевым листками при введении плюрипотентных клеток человека в иммунодефицитных мышей. Опыты с иммунодефицитными (*nu/nu*) мышами, были проведены в НИИ Канцерогенеза.  $10^6$  клеток вводилось подкожно иммунодефицитным

животным. Через 8-9 недель после инъекции мы обнаружили опухоли, которые содержали дифференцированные ткани, принадлежащие к трем зародышевым листкам (рис. 2Р).



**Рисунок 3.**

Иммуноцитохимическая характеристика endo-iPS и их дифференцированных производных. (А)

Недифференцированные линии endo-iPS также экспрессируют на своей поверхности CD30 антиген. (В) Экспрессия эндотелио-специфичного маркера CD31 и (С) CD105 теряется в

процессе репрограммирования. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) окрашивание показывает общее количество клеток в поле зрения (синий). (D) Кариотип endo-iPS-10 на седьмом пассаже. (Е) Цистоподобные ЭТ на 12й день культивирования. (F-I) ИЦХ

анализ дифференцировки клона endo-iPS-12 внутри ЭТ. (F) Окрашивание на МОС-31 (кр.), (G) цитокератин 7 (кр.), (H) виментин (зел.). (I) Окрашивание на нестин того же серйного среза, что и (G) (кр.). (K) Фибробластоподобные клетки на просвет, их окрашивание на (L) пролил 4-гидроксилазу. (M) Тест на образование сосудистых структур (cord-formation assay) отсортированных эндотелиальных клеток, полученных из endo-iPS.

Таким образом, мы доказали возможность дифференцировки endo-iPS *in vivo* и *in vitro* в клетки трех зародышевых листков. Это, совместно с данными об экспрессии плюрипотентных маркеров и морфологической характеристикой, демонстрирует, что две линии (10 и 12) полученных endo-iPS клеток отвечают всем параметрам плюрипотентного состояния. Для выяснения более тонких сходств и различий между ЭСК и endo-iPS клетками мы провели анализ эпигенетических характеристик этих линий.

#### 1.4. Анализ CpG метилирования регуляторных районов генов у endo-iPS.

Одной из существенных характеристик эпигенетического состояния генома является метилирование ДНК. Литературные данные свидетельствуют о том, что в течении репрограммирования происходят глобальные изменения в метилировании ДНК и

ремоделирование хроматина. При дифференцировке ЭСК происходит замолкание плюрипотентных генов, и частично это осуществляется за счет метилирования ДНК. В то же время гены, ассоциированные с разными типами соматических клеток, деметируются в процессе дифференцировки ЭСК. На основе этих наблюдений мы предположили, что CpG островки внутри промоторов эндотелиальных генов после репрограммирования должны гиперметилироваться. Для этого был проведен полногеномный анализ метилирования ДНК с использованием Illumina HumanMethylation27 BeadChip. Он позволяет проанализировать около 27,000 значимых сайтов метилирования в промоторных регионах, а также горячие точки метилирования более 14,000 генов с точностью до одного нуклеотида. Для бисульфитной конверсии и гибридизации к BeadChip была взята геномная ДНК двух линий ЭСК, двух линий endo-iPS клеток, родительская линия HUVEC, и не связанная с ними линия PBMC (peripheral blood mononuclear cells - мононуклеарная фракция периферической крови) человека.

Для изучения изменения CpG метилирования при репрограммировании было выбрано 25 генов, специфичных для эндотелия. Промоторные элементы двух генов (*EDN2*, *NOS3*) были гиперметилированы во всех исследованных линиях клеток (рис. 4A), в то время как промоторы 10 генов (*KDR*, *MCAM*, *SERPINE1*, *EFEMP1*, *THBD*, *FLT1*, *CTGF*, *EDGI*, *EDNI*, *PROCR*) были слабо метилированы. Интересно, что в процессе репрограммирования примерно половина эндотелий-специфичных генов подвергались гиперметилированию до уровня, который наблюдается у этих генов в ЭСК человека. Гиперметилирование регуляторных районов генов часто связано с уменьшением их транскрипционной активности. Как следует из наших данных по анализу транскрипционной активности генов *PECAM (CD31)*, *ENG (CD105)*, и *CDH-5 (VE-cadherin)*, их экспрессия в репрограммированных клонах обратно коррелирует со степенью метилирования их промоторных районов (рис. 1L).

Известно, что метилирование CpG промоторных районов генов влияет на их транскрипционную активность. В частности, деметилование промоторов генов плюрипотентности (*Oct3/4*, *Nanog*) наблюдается в процессе индукции плюрипотентности в фибробластах человека. Для изучения этого феномена при репрограммировании клеток эндотелия мы проанализировали изменение уровня метилирования промоторных элементов генов, связанных с плюрипотентным состоянием. Почти 60% CpG участков внутри промоторных элементов генов плюрипотентности были гипометилированы, в то время как менее 30% - гиперметилированы (рис. 4B).. Для того, чтобы идентифицировать дифференциально метилированные гены, мы сравнили уровни метилирования индивидуальных CpG сайтов в соматических клетках (HUVEC и PBMC), двух линиях

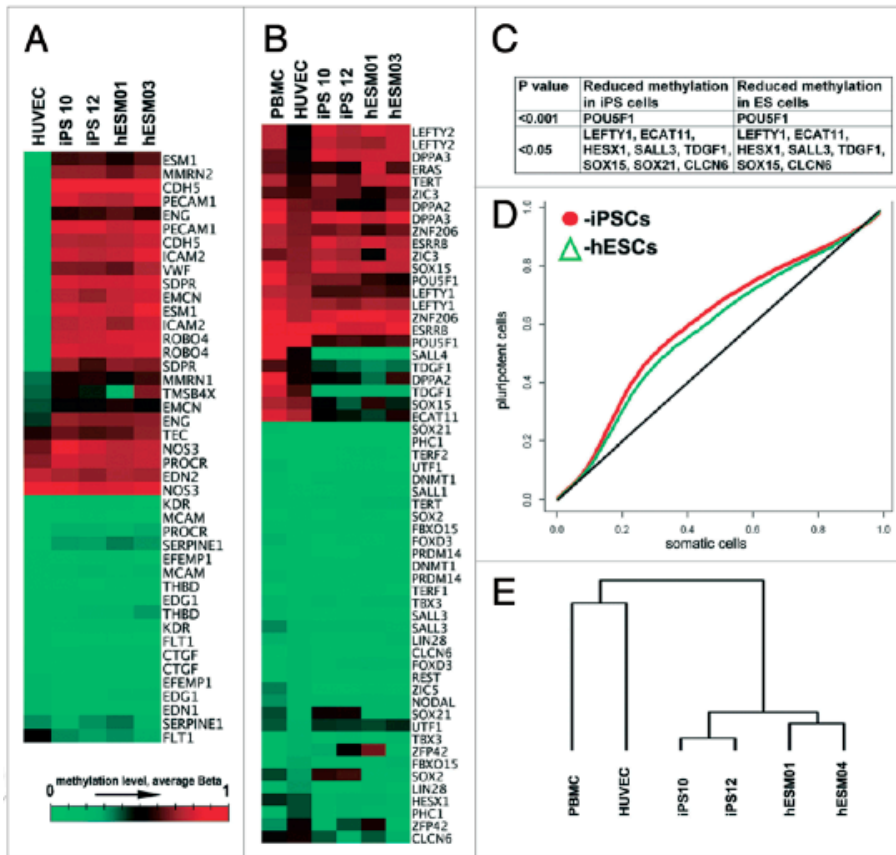


endo-iPSC, и двух линиях ЭСК человека. Мы обнаружили, что различия между соматическими или плюрипотентными клетками были статистически значимы для 9 из 33 изучаемых генов плюрипотентности ( $p < 0.05$ ) (рис. 4C). Следует отметить, что при этом анализе только CpG гена *Oct3/4 (POU5F1)* удовлетворили самому строгому критерию ( $p < 0.001$ ). Это косвенно свидетельствует о том, что наиболее важным для репрограммирования клеток до плюрипотентного состояния является гипометилирование промотора гена *Oct4* и его транскрипционная активность.

Анализ изменения метилирования CpG островков промоторных районов на уровне целого генома показал, что у всего набора анализируемых линий большинство генов (61%) гипометилированы (average Beta value  $< 0.2$ ) и только 10% - гиперметилированы (average Beta value  $> 0.8$ ). Тем не менее, уровень метилирования всего генома у обоих типов плюрипотентных клеток (ЭСК и iPS) был выше, чем у соматических клеток. При этом, уровень метилирования endo-iPS был немного выше, чем у ЭСК (рис. 4D). Проведенный иерархический кластерный анализ (рис. 4E) показал, что плюрипотентные клетки – ЭСК и iPS - кластеризуются вместе. Полученные результаты принципиальным образом меняют сложившуюся на сегодняшний момент картину метилирования ДНК в раннем эмбриональном развитии. Считается, что на стадии морулы и бластоцисты мыши ДНК гипометилирована, и метилирование нарастает по мере специализации эмбриональных тканей. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что большинство генов имеют повышенный уровень метилирования в ЭСК по сравнению с соматическими клетками. Это позволяет спекулировать о роли метилирования в развитии организма. Можно предположить, что в начале развития, на стадии ЭСК, осуществляется строгий контроль экспрессии генов через метилирование основного пула генов, контролируемых метилированием. В процессе развития часть генов, ответственных за контроль дифференцировки в ту или иную ткань, деметилируется, позволяя работать соответствующим сигнальным путям, направляющим дифференцировку. В дальнейшем, после прохождения всего процесса развития клетки, гипометилированные гены, вероятнее всего, не претерпевают *de novo* метилирования, что дает пониженный уровень метилирования на полногеномном уровне при анализе соматических клеток. Работа «открытых», гипометилированных, генов у соматических клеток может контролироваться другими способами, тем не менее, это позволяет говорить о более низком уровне контроля экспрессии генов у соматических клеток по сравнению с плюрипотентными.

Для полногеномного анализа сходства профиля метилирования промоторных районов 14000 генов линий ЭСК и iPS был использован Пирсоновский коореляционный анализ. Построенная матрица Пирсоновских коэффициентов корреляции показала что

линии iPS клеток также близки к ЭСК (коэф. 0,970-0,973) как и две независимые линии ЭСК (коэф. 0,975).



**Рисунок 4.** Полногеномный и геноспецифичный анализ метилирования CpG в промотерах соматических и плюрипотентных клеток. (А) Карта HeatMap CpG метилирования 25 широко известных эндотелио-специфических генов, (В) и 33 генов, связанных с плюрипотентностью. (С) Список плюрипотентно-специфичных генов с значительно уменьшенным в плюрипотентных клетках уровнем метилирования. (D)

Сравнение полногеномного уровня CpG метилирования между соматическими и плюрипотентными клетками. iPS клетки показаны красным, ЭСК - зеленым. Расстояние до черной линии показывает уровень CpG метилирования в iPS и ЭС клетках. (E) Классификация линий клеток на основе их паттерна метилирования. В качестве иллюстрации полногеномного иерархического кластеринга показана дендрограмма, выделяющая две группы клеток - соматические и плюрипотентные.

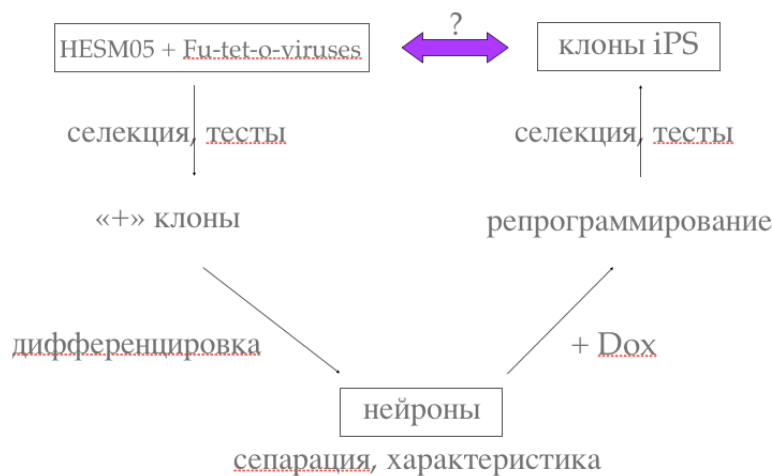
Для того, чтобы увидеть сходства между линиями endo-iPSC и ЭСК, а также различия между плюрипотентными и соматическими клетками, мы исследовали паттерн полногеномного метилирования генов с помощью дифференциального анализа. Мы обнаружили 2,226 генов, которые были дифференциально метилированы между плюрипотентными и соматическими клетками (это составило 8,4% из 26210 CpG, вошедших в анализ,  $p < 0.05$ ) (рис. 6). Используя более строгий уровень значимости ( $p < 0.001$ ), мы выделили группу из 378 дифференциально метилированных CpG (1,4% из 26210), из которых метилирование 306 CpG значительно отличалось между endo-iPS и соматическими клетками, 372 - между ЭСК и соматическими клетками, и только 46 генов были дифференциально метилированы между линиями endo-iPS и ЭСК. Разделение дифференциально метилированных CpG между соматическими/iPS клетками и соматическими/ЭСК позволило нам идентифицировать 282 локуса CpG, которые

отличались между соматическими клетками и обоими классами плюрипотентных клеток. Таким образом, наш анализ подтвердил высокий уровень сходства между линиями endo-iPS и ЭСК, и их отличия от соматических линий HUVEC и PBMC. В тоже время, необходимо отметить, что наблюдаются некоторые различия в метилировании промоторных районов небольшого количества генов между ЭСК и endo-iPS клонами, отобранными для анализа.

Таким образом, мы получили и охарактеризовали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки из эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Был разработан протокол репрограммирования этих клеток, а также было доказано, что линии endo-iPS 10 и 12 отвечают всем требованиям к плюрипотентным клеткам, и по своим свойствам, в том числе и эпигенетическим, сходны с ЭСК человека. Небольшие различия между ними существуют, но, как в большинстве подобных анализов, могут быть связаны с различной генетической природой клеток эндотелия и клеток ЭСК, которые использовались в экспериментах. Поэтому в качестве следующего этапа было интересно разработать такую схему эксперимента, которая бы позволяла получить iPS клетки, генетически идентичные той или иной линии ЭСК. Такая модельная система позволила бы проследить процессы, проходящие во время репрограммирования вне зависимости от генотипа. Сведения о проведении таких исследований в литературе отсутствуют.

## 2. Создание модельной системы для изучения процесса репрограммирования в изогенных условиях.

Следующим шагом после разработки протокола репрограммирования клеток человека и характеристики клонов iPS было получение модельной системы для изучения процесса репрограммирования. На рис. 7 отражена схема эксперимента.



**Рис. 5.** Общая схема эксперимента по созданию модельной системы для изучения процессов репрограммирования.

Как уже говорилось, «золотой стандарт» плюрипотентных клеток - это ЭСК. Но часто при сравнении разных линий iPS и ЭСК

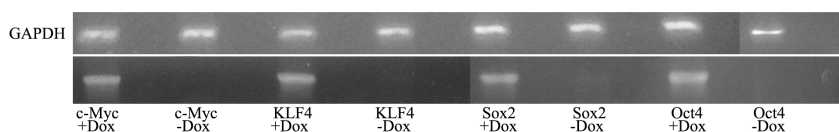
бывает невозможно отделить различия, связанные с прохождением процесса репрограммирования, от различий, продиктованных разной генетической природой этих клеток. В нашем исследовании (см. раздел 1.4) и других работах (Huangfu et al., 2008b)



было показано, что линии ЭСК настолько же различаются между собой, насколько они различны с линиями iPS. Чтобы нивелировать различия, возникающие за счет различной генетической природы линий ЭСК и iPS клеток нами было решено получить iPS клетки, которые имеют идентичный с ЭСК генотип. Свой вклад в различия между линиями iPS клеток и ЭСК могут также давать процессы интеграции в геном вирусов, которые используются для введения в клетки генов ТФ. Поэтому для получения iPS клеток мы использовали индуцибельную систему экспрессии трансгенов. Для этого на первом этапе было необходимо получить линии ЭСК человека, содержащие ТФ, необходимые для репрограммирования (*Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4*, *c-Myc*) под индуцируемыми доксициклином промотором.

### 2.1. Получение линии ЭСК человека, содержащей ТФ *Oct4*, *Sox2*, *KLF4*, *c-Myc* под индуцибельными промоторами.

На настоящий момент самой распространенной индуцибельной системой экспрессии трансгенов является Dox-система, в нашей работе мы использовали tet-on (при индукции доксициклином целевой ген начинает экспрессироваться) систему. Для создания линии ЭСК со встроенными генами ТФ, необходимыми для репрограммирования (*Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4*, *c-Myc*), геном трансактиватора (*rtTA*), и геном устойчивости к антибиотику (*Neo*) была выбрана линия hESM05, обладающая всеми свойствами ЭСК и нормальным кариотипом. Вирусы для трансфекции получали как описано в «Материалах и методах». После инфекции клеток hESM05 вирусами (MOI 5 для вирусов, содержащих *rtTA* и *Neo*, MOI 2 - для вирусов, содержащих гены ТФ) были отобраны клоны ЭСК, устойчивые к действию антибиотика G418. Полученные клоны были охарактеризованы с помощью ПЦР анализа на наличие необходимых вставок. Всего было получено 48 клонов, из них в 7 наблюдались вставки всех трансгенов. Для того, чтобы проверить работу индуцибельных трансгенов в полученных клонах hESM05, мы провели спонтанную дифференцировку этих клеток в течении 14 дней, и после этого индуцировали их работу доксициклином. Иммуноцитохимический и ОТ-ПЦР анализ до и после индукции выявил клоны, успешно экспрессирующие все четыре трансгена (*Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4*, *c-Myc*) (рис.5).



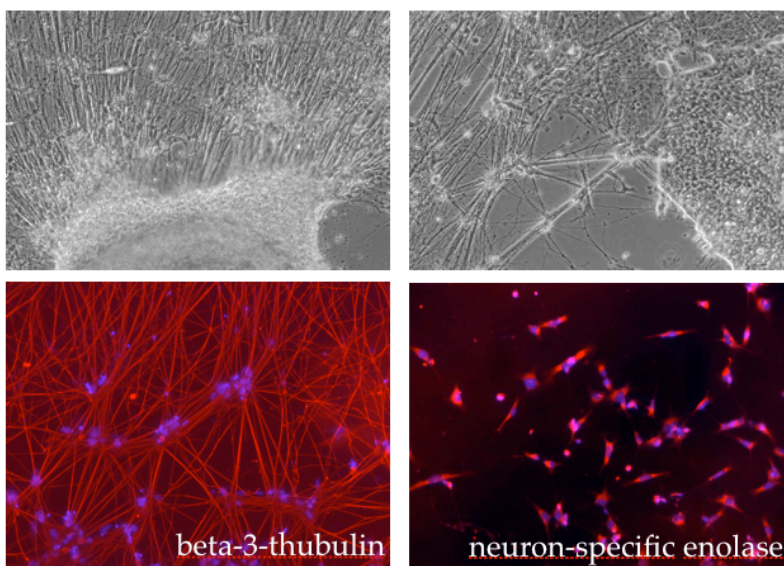
**Рис. 6.** ОТ-ПЦР анализ дифференцированных производных клона 2 линии hESM05 после индукции доксициклином.

Для дальнейшей работы была выбрана линия, названная hESM05neo2. Она имела в своем составе все экзогены, экспрессия которых появлялась после добавления в среду

доксциклина. Как и все ЭС клетки человека, клетки линии hESM05neo2 экспрессировали гены плюрипотентного состояния, также она показывала способность образовывать эмбрионидные тельца и дифференцироваться в производные трех зародышевых листков.

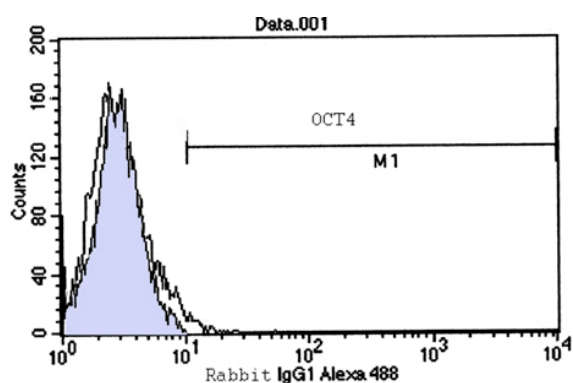
## 2.2. Дифференцировка линии hESM05neo2 в нейросферы.

В качестве направления дифференцировки были выбраны нейрональные клетки из-за быстроты и простоты такой дифференцировки. Также важно отметить, что при нейрональной дифференцировке практически отсутствуют клетки других фенотипов, что упрощает их характеристику и работу с ними. Линия hESM05neo2 была дифференцирована по нейрональному пути в соответствии протоколом, представленным в «Материалах и методах». В результате направленной дифференцировки ЭСК были получены нейросферы. Они были посажены на матригель и, через неделю дифференцировки, охарактеризованы морфологически и иммуногистохимически на наличие соответствующих маркеров (рис. 9).



**Рис. 7.** Морфологическая и иммуноцитохимическая характеристика полученных нейросфер на соответствующие маркеры.

Проведенный FACS анализ дифференцированной клеточной популяции не выявил клеток, которые экспрессировали бы ген *Oct4* (рис.8). Это говорит о том, что в изучаемой популяции клеток



все они потеряли свойство плюрипотентности и приобрели фенотип дифференцированных клеток.

**Рис. 8.** FACS анализ клеток нейросфер, полученных из hESM05neo2, на Oct 3/4. Синяя область - опыт, прозрачная - изотип контроль.

### 2.3. Использование индуцибельной системы для репрограммирования нейральных клеток.

Поскольку основные работы с использованием Dox-системы были выполнены на клетках мыши, то нами было решено дополнительно изучить влияние условий культивирования на эффективность и кинетику репрограммирования. При репрограммировании клеток с использованием лентивирусных систем конститутивно экспрессирующих ТФ в процессе приобретения соматическими клетками плюрипотентности, происходит постепенное замолкание транскрипционных факторов и активация эндогенных ТФ. В случае использования Dox-системы замолкание индуцибельного промотора происходит только в случае отмены доксициклина. Если «выключить» систему слишком рано, клетки могут недорепрограммироваться и уйти в дифференцировку, а если слишком поздно - то можно получить iPS клетки, зависимые от экспрессии экзогенных транскрипционных факторов. Например, для фибробластов мыши доксициклин необходимо убирать через 16 дней, а для кератиноцитов - через 14. Эта разница во времени может возникать из-за того, что разные типы клеток имеют разное эпигенетическое состояние и экспрессируют разный уровень генов, вовлеченных в процесс репрограммирования. Так, известно, что в большинстве нейрональных клеток наблюдается экспрессия c-Myc и KLF4, поэтому для них время работы индуцибельной системы можно уменьшить до 14 дней. Схемы проведенных экспериментов по репрограммированию приведены на рис. 9. Принципиально они отличались временем смены нейрональной культуральной среды на среду для плюрипотентных клеток, которая происходила или на нулевой день после индукции факторов репрограммирования, или на седьмой, а также присутствием или отсутствием фактора механического пересева репрограммируемых клеток.



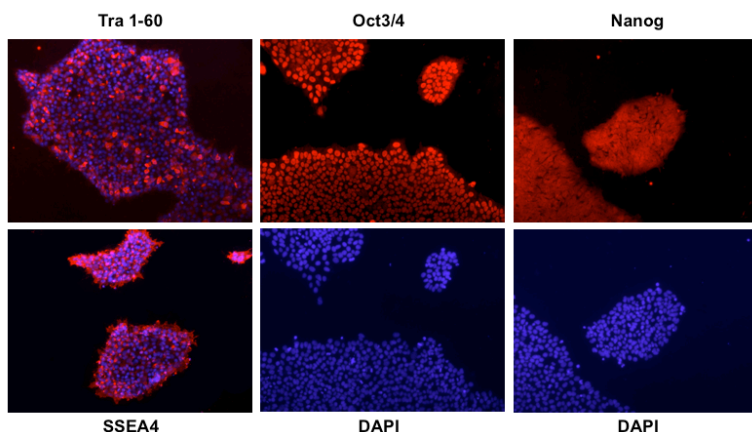
**Рисунок 9.** Схемы параллельных экспериментов по репрограммированию нейрональных клеток человека. Сверху (А) «классическая» схема репрограммирования с пересевом через 7 дней после индукции экзогенных ТФ; снизу (Б) схема репрограммирования, разработанная для Dox-системы.

Первые морфологические признаки репрограммирования нейрональных клеток человека мы наблюдали уже на 4 день при использовании схемы рис. 9Б, в то время как при использовании схемы репрограммирования, представленной на рис. 9А первые морфологически измененные клетки были обнаружены только через 8 дней. Таким образом, не только экспрессия генетических факторов репрограммирования влияет существенным образом на процесс приобретения плюрипотентности, но и условия внешней среды, которые поддерживают и обеспечивают поддержание клетками плюрипотентности. На 15 день доксициклин исключался из среды для репрограммируемых клеток и дальнейшее репрограммирование происходило исключительно за счет экспрессии эндогенных факторов. На 20 день был проведен отбор первых ЭСК-подобных клонов. Клоны отбирались вручную, всего было отобрано 72 клон с обоих параллельных экспериментов, они были названы neuro-iPS2.1(2,3,4 и т.д.). Количество клонов, полученных по двум схемам, статистически достоверно не различалось, принципиальные различия были выявлены в кинетике процесса репрограммирования: чем раньше репрограммируемые клетки оказывались в условиях культивирования плюрипотентных клеток, тем раньше появлялись ЭСК-подобные клоны. Эффективность репрограммирования, т.е. отношение количества получившихся ЭСК-подобных клонов к общему количеству нейрональных клеток, использовавшихся для репрограммирования, составила 10%. Это - более, чем в 300 раз больше, чем эффективность репрограммирования клеток HUVES. Такая высокая эффективность репрограммирования может быть объяснена тем, что мы имели дело с нейрональными клетками, полученными из стабильного клон ЭСК, содержащего в своем геноме все четыре необходимых транскрипционных факторов, причем отобранные для исследования клоны ЭСК были проверены на индуцибельную экспрессию трансгенов. В случае использования стандартной системы ретровирусной инфекции каждый вирус интегрирует с различной копийностью в разные места генома, что приводит к неравномерной экспрессии факторов репрограммирования в соматических клетках. Вместе с тем необходимо отметить, что даже в случае использования индуцибельной системы эффективность репрограммирования не составляет 100%. Это говорит о том, что помимо условий окружающей среды (способов культивирования клеток) и экспрессии транскрипционных факторов репрограммирования, на эффективность репрограммирования оказывают влияние еще не определенные до конца клеточные факторы. Важно отметить, что в этом эксперименте, в отличие от репрограммирования HUVES, практически все трансформированные клетки морфологически были полностью репрограммированы, т.е. с момента формирования похожи на ЭСК. Вероятно, что это

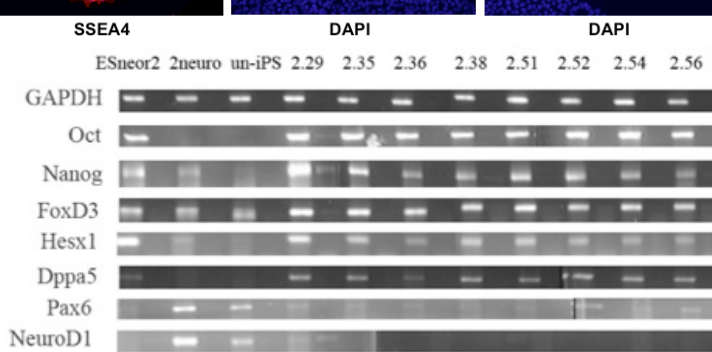
также связано с унифицированным и стабильным действием экзогенных ТФ на все репрограммируемые клетки.

#### 2.4. Характеристика *neuro-iPS2.0*.

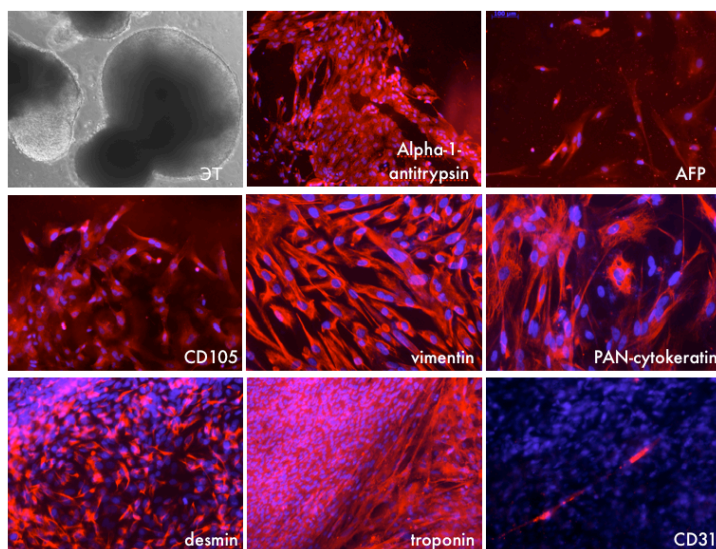
Полученные клоны были охарактеризованы на молекулярном уровне на экспрессию маркеров плюрипотентного состояния (рис. 10, 11).



**Рис. 10.** Иммуноцитохимический анализ клонов *neuroiPS2.0* на маркеры плюрипотентного состояния. Красным показано свечение соответствующих маркеров, синим - окраска ядер на DAPI.



**Рис. 11.** ОТ-ПЦР анализ клона ESsneor2, полученных из него нейрональных клеток (2neuro), недорепрограммированных клонов (un-iPS), а также клонов *neuroiPS2.0*. Анализ проводился на маркеры плюрипотентного состояния Oct3/4, Nanog, FoxD3, Hesx1, Dppa5, Sall1, а также нейрональные маркеры Pax6, NeuroD1.



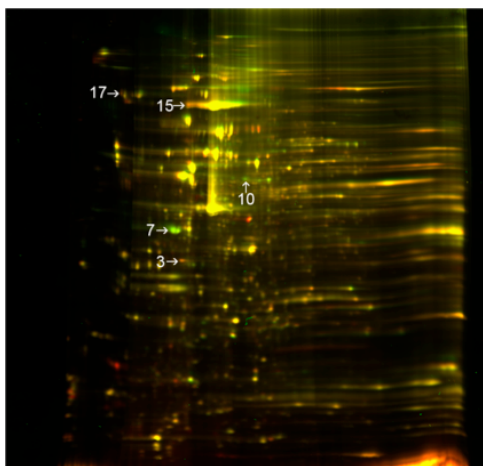
**Рис. 12.** Иммуноцитохимический анализ дифференцировки *neuroiPS2.0* клонов в сторону эктодермы (vimentin, PAN-cytokeratin), мезодермы (CD105, desmin, troponin, CD31), и энтодермы (AFP - Alpha Fetoprotein, Alpha-1-antitrypsin) через стадию эмбрионных тел (ЭТ). Свечение соответствующих маркеров обозначено красным, окрашивающий ядра DAPI - синим.

Проведенный анализ показал экспрессию во всех клонах маркеров плюрипотентного состояния, и почти полный сайленсинг тканеспецифичных маркеров. В качестве функционального теста на плюрипотентное состояние *neuroiPS2.0* клонов была проведена *in vitro* дифференцировка трех репрезентативных клонов через стадию

эмбрионидных телец (рис. 12). Также в результате спонтанной дифференцировки были получены сокращающиеся кардиомиоциты.

В качестве следующего шага мы решили сравнить эпигенетические характеристики полученных iPS клеток и изогенных им ЭСК человека. Для этого было проведено бисульфитное секвенирование регуляторного района (-565; -299) промотора гена *Nanog* в ЭСК, полученных из них нейрональных клетках, и двух iPS клонях – производных этих нейрональных клеток. Метилирование восьми CpG островков, находящихся в изучаемом регуляторном районе было повышено (около 69% заметилованных CpG) у нейрональных клеток, и понижено (16% заметилованных CpG) у ЭСК. В изученных iPS клонях 2.52 и 2.56 было обнаружено расхождение по уровню метилирования изучаемого региона: клон 2.56 оказался по этому признаку ближе к соматическим клеткам (59% заметилованных CpG), а клон 2.52 – к плюрипотентным (23% заметилованных CpG). Это говорит о том, что в процессе репрограммирования разные клоны могут оказываться «дальше» или «ближе» к ЭСК. Интересно отметить, что, по результатам общепринятых морфологических, молекулярных, и функциональных тестов на плюрипотентность, оба клоня были аналогичны друг другу и ЭСК. Поэтому можно утверждать, что эпигенетическая характеристика абсолютно необходима для понимания внутренних процессов, происходящих в получаемых iPS клетках, и их характеристики. Причем, для анализа iPS клеток можно применять как данные, полученные на уровне изучения полного эпигенома, так и данные о регуляции работы отдельного гена. Важно, что анализ регуляции всего одного гена плюрипотентности позволяет судить о «совершенстве» iPS клоня.

Для дальнейшего сравнения полученных iPS клонов с изогенными ЭСК мы провели их протеомный анализ в НИИ ФХМ РАМН (рис.13).



**Рис. 13.** Протеомный анализ клеток iPS (отмечены зеленым) и ЭСК (отмечены красным). Стрелками обозначены белки, которые присутствуют только в одном типе клеток. Цифры соответствуют следующим белкам: 3 - Annexin V A [Homo sapiens]; 7 - protein phosphatase inhibitor 2 [Homo sapiens]; 10 - cytokeratin 8 [Homo sapiens]; 15 - unnamed protein product [Homo sapiens]; 17 - basonuclin [Homo sapiens].



Оказалось, что эти клетки различаются всего по пяти белкам (Annexin V A, protein phosphatase inhibitor 2, cytokeratin 8, unnamed protein product, basonuclin), специфических функций которых в плюрипотентных клетках показано не было. Это говорит о крайней близости изогенных линий iPS и ЭСК, что подтверждает успешность полученной модельной системы. Таким образом, мы создали и проверили работу модельной системы, позволяющей с высокой эффективностью провести репрограммирование разнообразных типов клеток человека, сравнить репрограммированные клоны с изогенными им ЭСК и дифференцированными производными. Эта технология позволяет как проанализировать процессы, происходящие во время репрограммирования, и оценить вклад используемых для репрограммирования дифференцированных клеток в генетическое и эпигенетическое состояние получаемых iPS клеток, так и еще на один шаг приблизиться к возможному использованию iPS клеток в биомедицине путем лучшего понимания природы этих клеток, и возможного совершенствования протоколов по их получению.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С первого эксперимента по прямому репрограммированию прошло около пяти лет. За это время было проведено множество работ, посвященных повышению эффективности репрограммирования, варьированию состава ТФ и методов их введения, а также типов клеток, используемых для экспериментов. В рамках настоящей работы перед нами стояло несколько задач. В тот момент было репрограммировано всего три типа клеток человека, поэтому было необходимо провести прямое репрограммирование других типов соматических клеток человека. Мы выбрали клетки эндотелия пупочной вены человека (HUVES) из-за их легкой доступности неинвазивными методами, а также безопасности (вероятность обнаружения в их геноме спонтанных мутаций сводится к минимуму благодаря отсутствию влияния внешних мутагенов и небольшому количеству пассажей *in vitro* перед репрограммированием). Характеристика полученных endo-iPS клонов показала, что среди них два клон полностью удовлетворяли всем условиям плюрипотентности. Эпигенетическое сравнение endo-iPS клеток, ЭСК человека, и клеток HUVES выявило несколько закономерностей. Во-первых, было показано, что репрограммирование ведет к полногеномным эпигенетическим изменениям, которые в целом характеризуются гиперметилированием генов, характерных для клеток HUVES, и уменьшением уровня метилирования генов, связанных с плюрипотентным состоянием. Интересно, что общий уровень метилирования плюрипотентных клеток оказался выше, чем у соматических клеток, что заставляет пересмотреть “классическую” теорию, согласно которой повышение общего уровня метилирования приводит к дифференцировке клеток. Также,

была подтверждена ключевая роль гена Oct4 в поддержании и индукции плюрипотентности. При сравнении эпигеномов endo-iPS клеток и ЭСК было показано, что они очень близки друг к другу, и степень сходства между ними (около 0,97%) соответствует сходству между разными линиями ЭСК. Это может говорить о том, что различия между ними могут быть связаны с разницей в их геномах. Для того чтобы иметь возможность более детального изучения репрограммирования вне зависимости от генетического и эпигенетического состояния различных клеточных типов и линий мы создали модельную систему, которая бы позволяла проводить эффективное репрограммирование разнообразных типов соматических клеток человека, и сравнивать полученные iPS клетки с изогенными им ЭСК. Для этого мы получили и охарактеризовали клон линии ЭСК человека HESM05, который содержал в своем составе гены ТФ «коктейля Яманаки» под промоторами, индуцируемыми доксициклином. В рамках такой модели генетические и эпигенетические различия между плюрипотентными клетками будут следствием прохождения процессов дифференцировки-репрограммирования. Для проверки работы разработанной модельной системы мы дифференцировали полученный клон ESneo2 по нейрональному направлению. С помощью двух различных методик были получены неуго-iPS клоны, которые были охарактеризованы морфологически, на соответствующие молекулярные маркеры, а также функционально. Таким образом была экспериментально подтверждена эффективность разработанной модельной системы. В качестве эпигенетического сравнения было проведено бисульфитное секвенирование регуляторного района промотора гена *Nanog*, одного из важнейших генов плюрипотентности. Было показано, что метилирование восьми CpG островков, находящихся в изучаемом регуляторном районе было повышено у нейрональных клеток, и понижено у ЭСК, что соответствует литературным данным. Среди двух изученных неуго-iPS клонов по уровню метилирования один оказался ближе к нейрональным клеткам, а другой – к ЭСК. Это говорит о том, что в процессе репрограммирования отдельной клетки (клона) может произойти как полная, так и не полная перестройка работы генома и эпигенома, и, несмотря на одинаковые морфологические и функциональные характеристики, iPS клоны могут сильно отличаться на молекулярном уровне. Это еще раз подтверждает необходимость разработки унифицированной характеристики получаемых iPS клеток.



## **ВЫВОДЫ**

1. Впервые было проведено генетическое репрограммирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека до плюрипотентного состояния. Показано, что полученные линии полностью репрограммированных endo-iPS клонов по морфологическим, генетическим, эпигенетическим и функциональным свойствам соответствуют эмбриональным стволовым клеткам человека.
2. Был проведен полногеномный анализ изменения уровня метилирования промоторов 14 тысяч генов человека при приобретении соматическими клетками плюрипотентного состояния. В результате анализа впервые продемонстрировано репрограммирование соматических клеток на эпигенетическом уровне.
3. Впервые продемонстрировано, что *in vitro* уровень полногеномного метилирования плюрипотентных клеток выше, чем соматических.
4. В результате полногеномного анализа метилирования промоторных участков 14 тысяч генов плюрипотентных и соматических клеток была подтверждена ключевая роль гена *Oct4* в приобретении и поддержании плюрипотентного состояния.
5. Впервые создана и опробована модельная система индукции плюрипотентного состояния в дифференцированных клетках человека, позволяющая изучать генетические и эпигенетические характеристики процесса репрограммирования различных типов соматических клеток до плюрипотентного состояния.

## Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации

### Список опубликованных работ:

1. Bogomazova AN, Lagarkova MA, Tskhovrebova LV, Shutova MV, Kiselev SL. Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2. *Aging (Albany NY)*. 2011 Jun;3(6):584-96.
2. Elena S. Philonenko, Maria V. Shutova, Ilya V. Chestkov, Maria A. Lagarkova, and Sergey L. Kiselev. Current Progress and Potential Practical Application for Human Pluripotent Stem Cells. Chapter 4, *International Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 292 # 2011, pp145-188, Elsevier Inc.
3. MA Lagarkova, MV Shutova, AN Bogomazova, EM Vassina, EA Glazov, P Zhang, AA Rizvanov, IV Chestkov, SL Kiselev. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. *Cell Cycle* (2010) vol. 9 (5) pp. 937-46
4. Киселев С.Л., Шутова М.В. Репрограммирование клеток: прыжок вверх по лестнице, ведущей вниз. *Природа* №5 2010 стр 3-10
5. М.В. Шутова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев. Получение и характеристика клеток человека с индуцированной плюрипотентностью. *Acta Naturae*, 2009, vol 2 pp 104-106

### Тезисы научных конференций и симпозиумов:

1. Пятый съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва, 21-28 июня 2009 г., доклад в секции «Биология развития» на тему «Создание линий iPS клеток (стволовых клеток с индуцированной плюрипотентностью) из эндотелиальных клеток человека», диплом за лучший секционный доклад.
2. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 7th Annual Meeting July 8-11, 2009. Centre Convencions Internacional, Barcelona. Стендовый доклад на тему «Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)».
3. Всероссийская конференция «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования», 21-23 сентября 2009 года, стендовый и устный доклад на тему «Создание линий iPS клеток (стволовых клеток с индуцированной плюрипотентностью) из эндотелиальных клеток человека», диплом победителя конкурса работ в номинации «Лучшее фундаментальное исследование».
4. The international conference chromosome 2009, 31 августа — 6 сентября 2009, Новосибирск, доклад на тему «Эпигенетические изменения при индукции плюрипотентного состояния в соматических клетках человека».
5. 7th international conference molecular genetics of somatic cells, 22-25 октября 2009, Звенигород, доклад на тему «Эпигенетический статус клеток человека с индуцированной плюрипотентностью».
6. 1st international conference on frontiers of regenerative medicine and biomedical science, 13-14 мая 2010, Гуаньчжоу, Китай, доклад на тему «Epigenetics of human pluripotent stem cells».
7. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 9th Annual Meeting, June 15 - 18, 2011. Metro Toronto Convention Centre. Toronto, Ontario Canada. Стендовый доклад на тему «Comparison of genetically identical human embryonic stem cell and anduced pluripotent stem cell lines».
8. ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ “ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ-2011”, Москва, 29-30 сентября 2011 г., Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. Доклад на тему "Разработка метода получения клеток с индуцированной плюрипотентностью из эндотелиальных клеток пупочной вены человека".