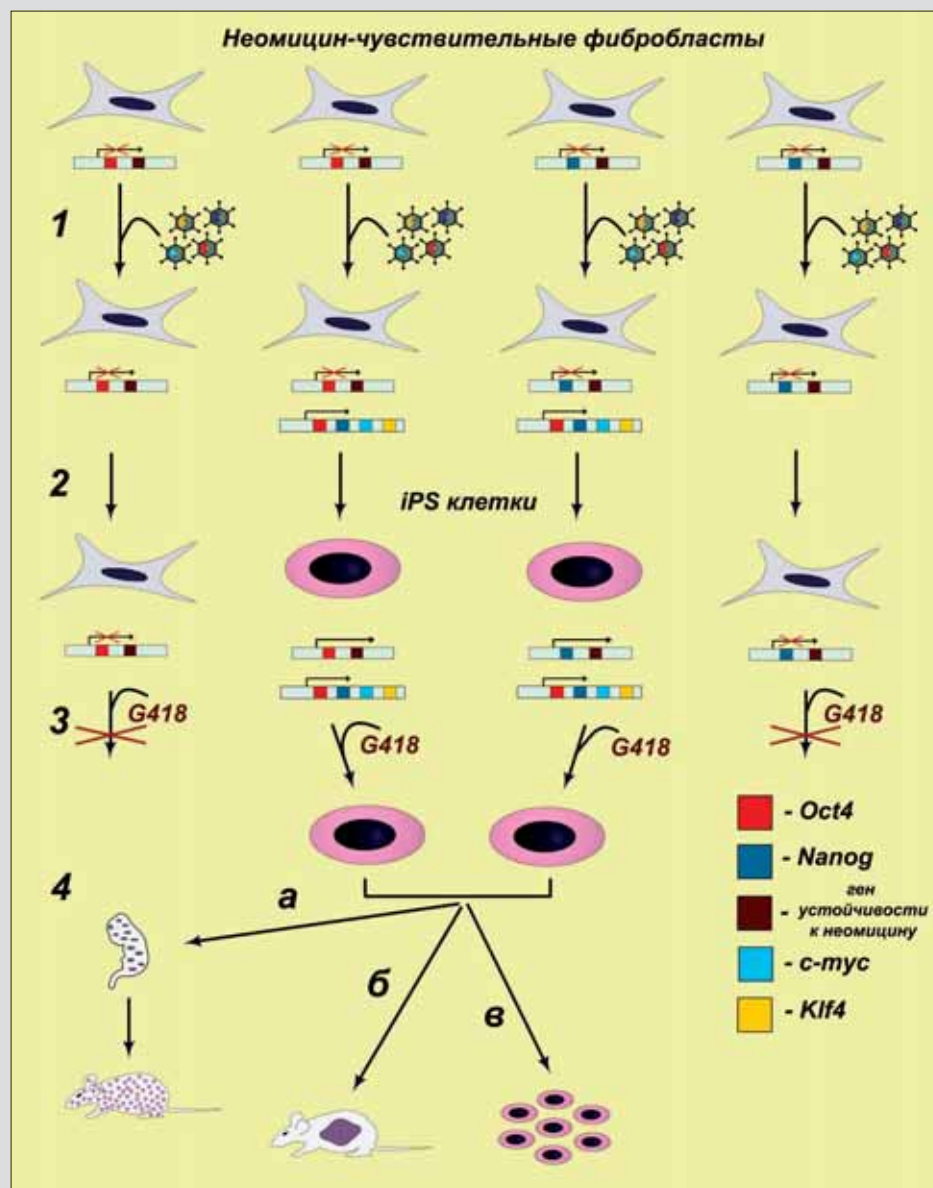


Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются важным и актуальным объектом исследований в области клеточных технологий и тканевой инженерии, изучение которого осит весомый вклад в детализацию механизмов дифференцировки и детерминации стволовых клеток в целом. последние несколько лет исследуется явление репрограм-

мирования, благодаря которому можно получить мультипотентные стволовые клетки из дифференцированных звеньев их дочерних дифферонов. Значительные предпосылки для этого направления сформировались благодаря достижениям в изучении регуляции работы генов, в частности, определению ряда ведущих транскрипционных факторов.



В исследовании использовались полученные путем гомологичной рекомбинации мышиные фибробласты, в которых в области генов Nanog или Oct-4 был встроен ген белка, обуславливающего устойчивость к неомицину и его аналогам. В данных клетках гены Nanog или Oct-4 не экспрессируются. Так как синтез матричной РНК для Oct-4/Nanog и белка, обуславливающего резистентность к неомицину, осуществляется совместно, фибробласты остаются чувствительными к G418.

1. Трансфицирование исследуемых клеток вектором, содержащим гены Oct-4, nanog, c-myc и Klf4.
2. Экспрессия факторов вектора, приводящая к запуску процесса «репрограммирования» фибробластов, в течение которого активируется экспрессия собственных генов Oct-4/Nanog и, следовательно, гена устойчивости к неомицину. Полученные клетки относятся к индуцированным плюрипотентным клеткам и характеризуются устойчивостью к G418.
3. Добавление в культуру G418 для отбора клеток с экспрессирующимся эндогенным Oct-4/Nanog.
4. Проведение стандартных тестов на плюрипотентность:
 - а) индукция образования тератомы при подкожном введении,
 - б) генерация химер при инъекции в бластоцисту

Выявлены гены Oct4 [1, 2], Sox-2 [3] и Nanog [4–6], имеющие высокий уровень экспрессии в ЭСК и играющие ключевую роль в регулировании активности структурных генов, особенно на ранних этапах дифференцировки клеток. Полагают, что данные транскрипционные факторы реализуют своё действие совместно, блокируя участки ДНК, ответственные за дифференцировку ЭСК, и активируя гены, определяющие пролиферацию и плюрипотентность [7]. По мере дифференцировки ЭСК уровень активности оси Oct4 – Sox-2 – Nanog снижается.

Рядом авторов описан KLF4 (Kruppel-like factor 4), который также вовлечен в репрограммирование дифференцированных клеток в плюрипотентные стволовые клетки. Показано, что данный транскрипционный фактор может функционировать как активатор – при взаимодействии с коактиваторами (p300 и CBP-related protein) – и как репрессор определённых генов – при связывании с корепрессорами (например, HDAC3) [8].

В он-лайн версии журнала Nature в июне 2007 года были опубликованы материалы исследования M. Wernig и R. Jaenisch с соавт., в котором из фибробластов получали индуцированные iPS клетки, соответствующие по своим свойствам и потенциям ЭСК. Авторы использовали эмбриональные и взрослые мышинные фибробласты, в которых в локусы ДНК, соответствующие Oct4 и Nanog генам, чувствительным к аналогу неомицина G418 и, следовательно, находящимся в соматических клетках в «молчащем» состоянии, был встроен ген GFP и ген, продукт экспрессии которого определяет резистентность к неомицину [9]. Исследователи трансфицировали фибробласты ретровирусными векторами четырёх факторов (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) с добавлением G418 на 3, 6, 9-й дни эксперимента, чтобы определить повышение активности эндогенных Oct4 и Nanog. На 20-й день с помощью G418 были отобраны 2 линии колоний, резистентных к аналогу неомицина (Oct4-позитивные, Oct4 iPS, и Nanog-позитивные, Nanog iPS), при этом из меньшего количества Oct4-позитивных культур выход колоний, морфологически соответствующих ЭСК, был выше, что свидетельствует о большей роли экспрессии Oct4 как критерия плюрипотентности. Методом ПЦР с обратной транскрипцией

было показано, что уровень экспрессии суммарных (эндогенных + векторных) Oct4 и Nanog генов в репрограммированных клетках был близок к таковому в ЭСК. Характерно, что по ходу эксперимента наибольшая активность внесённых векторных генов сменялась преобладанием эндогенных генов [9].

Методами ПЦР и иммунопреципитации хроматина (chromatin immunoprecipitation) с использованием антител к триметилированным гистонам H3K4 и H3K27 была доказана идентичность конфигурации хроматина у ЭСК и репрограммированных клеток. Кроме того, посредством ингибирования ДНК-метилтрансферазы исследователи показали устойчивость полученных клеток к тотальному деметилированию ДНК, что является особенностью ЭСК и утрачено дифференцированными клетками [9].

Для определения мультипотентности iPS репрограммированные клетки инъецировали в диплоидную и тетраплоидную бластоцисты, а также мышам подкожно. В результате исследователи получили жизнеспособные химеры и подкожные тератомы с полидифференционным клеточным составом. 9 из 16 эмбрионов, полученных от двух химер, были позитивны на вирусный Oct4, при этом 5 содержали ген GFP, внедрённый в Oct4. Эти данные свидетельствуют об участии репрограммированных клеток в развитии тканей эмбриона и являются косвенным доказательством соответствия их ЭСК. Кроме того, полученные клетки группировались и смешивались с ЭСК в культуре, в отличие от нативных фибробластов [9].

Идея описанного исследования не уникальна – ранее была опубликована статья K. Takahashi и S. Yamanaka (2006), в которой описан предшествующий опыт по репрограммированию фибробластов. Однако в работе 2006 года полученные iPS клетки в меньшей степени соответствовали ЭСК, так как генерировали нежизнеспособные химеры, отличались по экспрессии ряда генов и вызывали вопросы относительно стабильности плюрипотентного состояния [9].

Таким образом, получение мультипотентных стволовых клеток из их дифференцированных производных открывает значительные перспективы в решении вопроса о выборе источника аутогенного камбиального материала, высоко востребованного в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rosner M., Vigano M., Ozato K. et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990; 345: 686–92.
2. Scholer H. R., Dressler G.R., Balling R. et al. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *J. Embo*. 1990; 9: 2185–95.
3. Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003; 17: 126–40.
4. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113: 643–55.
5. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H. et al. The homeoprotein Nanog is required for

6. Silva J., Chambers I., Pollard S. et al. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*. 2006; 441: 997–1000.
7. Boyer L.A., Lee T.J., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947–56.
8. Evans P., Zhang W., Chen X. et al. Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 33994–4002.
9. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448: 318–24.
10. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al.

In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature. 2007; 448: 318–24