

6. Ngan K.W., Jung S.M., Lee L.Y. et al. Immunohistochemical expression of OCT4 in primary central nervous system germ cell tumours. *J. Clin. Neurosci.* 2008; 15: 149–52.

7. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Trosko J.E., Chang C.C., Kiupel M. Expression of the embryonic transcription factor Oct4 in canine neoplasms: a

potential marker for stem cell subpopulations in neoplasia. *Vet. Pathol.* 2007; 44(6): 893–900.

8. Yamaguchi S., Yamazaki Y., Ishikawa Y. et al. EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43: 217–22.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K. et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 403–15

## Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

В настоящее время активно ведутся исследования в области получения плюрипотентных соматических клеток животных и человека. Принципиально описаны два пути, посредством которых это может быть достигнуто: использование методов клонирования (например, клеточного слияния, переноса ядер соматических клеток в овоцит второго деления мейоза (somatic cell nuclear transfer, SCNT)) [1–3] и индукция репрограммирования с получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPS cells), сходных с ЭСК [4–7]. К настоящему времени уже получены iPS клетки мышей [7], а методом SCNT клонирован целый ряд животных от грызунов до приматов [1–3]. Предпринимались попытки получения плюрипотентных клеток, сходных с ЭСК человека, посредством слияния соматических и эмбриональных клеток. Однако данная методика приводила к формированию популяций тетраплоидных гибридных клеток, свойства которых не в полной мере соответствовали стандартным характеристикам ЭСК [8].

Концентрирование интересов клеточных технологов вокруг исследований, связанных с выделением совместимых плюрипотентных клеток, обусловлено возможностью использования их в моделировании и изучении заболеваний человека, открытии, тестировании и совершенствовании лекарственных препаратов, биологически активных веществ, а также для терапевтического применения при большом спектре заболеваний [5].

Одновременно 20 ноября 2007 года S. Yamanaka и J.A. Thomson в on-line версиях журналов Cell и Science, соответственно, опубликовали материалы исследований по получению iPS клеток человека. В этих работах индукцию плюрипотентности производили на разных клеточных культурах и сравнивали полученные клетки между собой и с контролем – ЭСК человека. S. Yamanaka использовал взрослые дермальные фибробласты, веретеновидные синовиоциты и неонатальные фибробласты крайней плоти, а J.A. Thomson – фетальные и неонатальные фибробласты.

Схема репрограммирования предполагает внедрение в клетки исходной культуры дифференцированных клеток генов плюрипотентности, сверхэкспрессия которых призвана вернуть дифференцированную клеточную популяцию к плюрипотентному состоянию. В качестве индукторов репрограммирования K. Takahashi и S. Yamanaka в 2006 году предложили квартет транскрипционных факторов, выявленных ими из 24 претендентов: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 [7], который и был использован ими в описываемой работе. Oct4 и Sox2 являются ключевыми факторами регуляции пролиферации и плюрипотентности стволовых клеток и характеризуются

высоким уровнем экспрессии в ЭСК, снижающимся в процессе дифференцировки [9]. Вовлечение Klf4 и c-Myc в процессы репрограммирования может быть связано с их ролью в качестве модификаторов хроматина, способствующих активации Oct4 и Sox2. В свою очередь, J.A. Thomson с коллегами на начальном этапе исследования выбирали гены, необходимые для инициации репрограммирования, из 14 кандидатов. В результате была осуществлена замена Klf4 и c-Myc, входящих в стандартный набор транскрипционных факторов «стволовости», на Nanog и Lin28. Роль Nanog, наряду с Oct4 и Sox2, общепризнанна в индукции плюрипотентности соматических клеток [9, 11], тогда как существенная значимость Lin28 в репрограммировании подтверждена не была. Однако необходимость замены c-Myc представляется вполне целесообразной. Выявлена его негативная роль, заключающаяся в индукции апоптоза ЭСК человека [12], а также стимуляции в 20% случаев опухолевой трансформации iPS клеток мышей при реактивации соответствующей области ретровирусного вектора [13]. Интересно, что в исследовании S. Yamanaka были внесены некоторые изменения в методику индукции плюрипотентности, не использованные в работе J.A. Thomson. В частности, были предприняты мероприятия для повышения эффективности использования пула ретровирусов: фибробласты предварительно трансдуцировались лентивирусными векторами, которые содержали гены мышиных рецепторов для ретровирусов – Slc7a1. Это повысило эффективность дальнейшего введения векторов с Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 на 60%. Кроме того, особенностью работы S. Yamanaka является использование с седьмого дня культивирования среды, обогащенной bFGF, который стимулирует пролиферацию ЭСК человека.

В исследованиях селекция культур iPS клеток проводилась на основании морфологического соответствия ЭСК человека (компактность колоний, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, четкая визуализация ядер). Иммунофенотип полученных клеток в обоих исследованиях соответствует фенотипу ЭСК человека – показана экспрессия SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 и Tra-1-81. Методом ПЦР с обратной транскрипцией продемонстрирован характерный для ЭСК высокий уровень экспрессии эндогенных Oct4 и NANOG. К тому же S. Yamanaka с соавт. оценили экспрессию и других генов-маркеров ЭСК человека – REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4, hTERT, указав на дополнительное соответствие полученных в работе культур.

В исследованиях было показано демитилирование цитозиндинуклеотидных последовательностей промоторных областей генов NANOG и Oct4 в подтверждение их высокой

функциональной активности, что характерно и для ЭСК человека. В контроле (исходные культуры фибробластов) данные области находились в метилированном состоянии.

Для определения потенциала к дифференцировке iPS клетки культивировали в условиях, необходимых для формирования эмбрионидных тел [14], нейронов и кардиомиоцитов. Положительные результаты были достигнуты обеими научными лабораториями, однако S. Yamanaka привел более подробный спектр иммуноцитохимических и генетических характеристик. В его исследовании клетки характеризовались позитивной реакцией на маркеры, характерные для клеток эктодермального ( $\beta$ III-tubulin, GFAP), мезодермального ( $\alpha$ -SMA, desmin,) и энтодермального (AFP) происхождения. Методом ПЦР с обратной транскрипцией выявлена экспрессия эктодермальных (MAP2, PAX6), энтодермальных (box A2, cytokeratin 8, 18, SOX17) и мезодермальных (MSX1, BRACHYURY) генов. Экспрессия маркеров нейронов ( $\beta$ III-tubulin, AADC, LMX1B, тирозингидролаза, холинацетилтрансфераза) и кардиомиоцитов (TnTc, MEFC2, MYL2A, MYHCB, NKX2.5) была обнаружена у дифференцированных производных всех колоний iPS клеток. J.A. Thomson с соавт., также отмечая способность iPS клеток к дифференцировке в различных направлениях, подробно описания результатов иммуноцитохимического и генетического анализов не привёл.

Для подтверждения полипотентного статуса в исследова-

ниях выполнялась подкожная трансплантация iPS клеток. В местах инъекций развивались «тератомы», состоящие из комплекса тканей, морфологически сходных с производными всех трех зародышевых листков. Однако J.A. Thomson указывает на неоднородность дифференцировочных потенциалов среди исследуемых культур. В частности, в «тератомах» в 50% случаев отсутствовал нейрональный компонент, также не наблюдалась экспрессия LIN28 в четверти колоний репрограммированных как фетальных, так и неонатальных фибробластов.

Несмотря на ряд различий в материалах, методиках и обоснованиях полученных данных, глобальным результатом исследований двух независимых групп ученых явилось получение iPS клеток человека, сходных по морфологическим, иммуногистохимическим и генетическим критериям с ЭСК человека. Это является первым значительным достижением в области получения аутогенных плюрипотентных клеток путем репрограммирования соматических клеток человека. По мнению редакции журнала Science получение iPS-клеток человека является вторым из наиболее значимых научных открытий 2007 года [15]. На получении и исследовании iPS-клеток сосредотачивается внимание уже нескольких ведущих лабораторий мира. К исследовательским группам, возглавляемые S. Yamanaka, R. Jaenisch и A. Thomson, присоединилась группа G. Daley, чья статья об успешном получении iPS-клеток человека вышла в декабре в on-line версии журнала Nature [16].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wakayama T., Perry A., Zuccotti M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–74.
2. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64–6.
3. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450 (7169): 497–502.
4. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448 (7151): 260–2.
5. Takahashi K., Yamanaka S., Tanabe K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131 (5): 861–72.
6. Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318 (5858): 1917–20.
7. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
8. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A. et al. Nuclear reprogramming of somatic

- cells after fusion with human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122 (5): 653–4.
9. 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.
10. Evans P.M., 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(47): 33994–4002.
11. 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.
12. Sumi T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. et al. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene* 2007; 26 (38): 5564–76.
13. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448 (7151): 313–7.
14. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti F. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 2000; 6 (2): 88–95.
15. BREAKTHROUGH OF THE YEAR: The Runners-Up. *Science* 2007; 5858: 1844–1849.
16. Park I.H., Zhao R., West J. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141–6.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: Takahashi K., Yamanaka S., Tanabe K. et al. *Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell* 2007; 131 (5): 861–72.  
Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. *Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science* 2007; 318 (5858): 1917–20