

ДИСКУСИИ В НАУКАТА
DISCUSSIONS IN SCIENCE

**ИНДУЦИРАНЕ НА ПЛУРИПОТЕНТНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ
ЧРЕЗ ГЕНЕТИЧНО РЕПРОГРАМИРАНЕ НА СОМАТИЧНИ КЛЕТКИ**

Г. Милчев

ИМБ – БАН – София

**INDUCTION OF PLURIPOTENT STEM CELLS
BY GENETIC REPROGRAMMING OF SOMATIC CELLS**

G. Milchev

IMB – Bulgarian Academy of Sciences – Sofia

Резюме:	<p>Плурипотентни клетки се получават при култивиране на ембрионални клетки от морула и бластоцист (ембрионални стволови клетки, ESC), от епибласт (EpiSC), от примордиални полови клетки (EGC). Стриктните критерии за плурипотентни клетки са: диференциация <i>in vitro</i> в клетки, които представляват трите зародишни слоя, експресия на определени транскрипционни фактори и сигнални молекули (Nanog, Okt4, Sox2, TCF3 и др.), образуване на тератоми, получаване на химерни мишки със “собствени” и “чужди” соматични и полови клетки. Известни са три различни метода за експериментално индуциране на плурипотентност в соматични клетки: 1) въвеждане на ядро от соматична клетка в овоцит, 2) сливане (фузия) на соматична клетка с ембрионална стволова клетка, 3) директно репрограмиране на соматичната клетка чрез ектопична експресия на няколко транскрипционни фактора. Индуцирането на плурипотентни клетки от миши фибробласти и човешки дермални фибробласти чрез ектопична експресия на Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4 е описано в детайли.</p>
Ключови думи:	ембрионални стволови клетки, индуцирани плурипотентни стволови клетки, Okt4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog, TCF3, Stat3
Адрес за кореспонденция:	<i>Ст. н. с. II ст. д-р Георги Милчев, бул. Скобелев № 54, 1606 София, тел. 953-0983, e-mail: gmilchev@bio21.bas.bg</i>
Summary:	<p>Pluripotent cells arise from <i>ex vivo</i> cultures of early embryonic cells (morula, inner cell mass, epiblast, primordial germ cells). They are designated as ESC, EpiSC, EGC, respectively. Stringent criteria for pluripotent cells are: <i>in vitro</i> differentiation into cells that represent all three germ layers, active transcriptional regulatory network (Nanog, Okt4, Sox2, TCF3 and others), teratoma formation. Chimera formation with subsequent germ line transmission and tetraploid complementation assay are applied for mouse cells only. Three distinct methods of experimentally induced pluripotency in somatic cells include: nuclear transfer, cell fusion, and direct reprogramming by ectopic expression of several transcription regulators. Induction of pluripotent cells from mouse fibroblasts and human dermal fibroblasts by ectopic expression of Oct4, Sox2, c-Myc, and Klf4 is described in details.</p>
Key words:	emlryonal stem cells, induced pluripotent stem cells, Okt4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog, TCF3, Stat3
Address for correspondence:	<i>Georgi Milchev, M. D., 54 Skobelev Blvd., Bg – 1606 Sofia, tel. +359 2 953-0983, e-mail: gmilchev@bio21.bas.bg</i>

ВЪВЕДЕНИЕ

Особеното качество на ембрионалните стволови (ЕС) клетки е тяхната плурипотентност. От ЕС клетки се получават трите зародишни слоя: ектодерма, ендодерма, мезодерма. Въведени в имунотолерантни мишки, стволовите клетки дават тератоми (тумори, които включват клетки от трите зародишни слоя). След въвеждане в бластоцист (4½-дневно мишо ембрио) мишите стволови клетки дават химерни мишки. Потомството на тези стволови клетки се открива в трите зародишни слоя и в половите клетки на химерата.

Разработени са няколко технологии за култивиране на ЕС клетки. Установени са условия, при които тези клетки запазват плурипотентността си *ex vivo* (в присъствие на LIF BMP, FGF, activin). Известни са и условията, при които се получава поколение от определен тип диференцирани клетки, както и някои от факторите за развитие на ектодерма, ендодерма, мезодерма, неврогенеза. От транскрипционните фактори, които регулират генната експресия в ЕС клетки, най-добре са изучени Oct4, Sox2, Nanog, и Stat3.

Успешното манипулиране на миши ЕС клетки и ембриони доближава молекулярната клетъчна биология до истината за живота. Днес, докато науката и законът не могат да решат проблемите на регенеративната терапия, в състезания на хиподрумите участват елитни коне, с регенерирани сухожилия от стволови клетки ("Stem cells for joints: NIH studies, FDA worries, horses run" http://blogs.nature.com/reports/thenishe/regenerative_merizine/). Манипулирането на плурипотентни клетки се превръща от технологичен или философски проблем в рискован бизнес.

Човешки ЕС клетки се получават от ембриони, които не са били използвани за оплождане *in vitro*. Те се култивират при специални условия. Насоченото диференциране става с определени добавки в средата. В стандартни клетъчни култури се диференцират спонтанно. Днес клетъчни линии от човешки ЕС клетки, както и среди за тяхното култивиране и насочено диференциране, се предлагат от няколко компании. Изучаването на молекулните особености на човешките ЕС клетки и промените, които настъпват при диференцирането им, дават надежда за ефикасно възстановяване на увредени органи и тъкани.

КОГА СА ВЪЗМОЖНИ ПРИСАДКИ (ТРАНСПЛАНТАТИ) ОТ СОБСТВЕНИ (АВТОЛОЖНИ) КЛЕТКИ

Основният проблем на регенеративната медицина е, че след трансплантация "чужда" присадка се отхвърля поради имунна несъвместимост. Това важи и за присадки от получени *in vitro* "чужди" клетки. А автоложна трансплантация е възможна, когато пациентът разполага с резерв от свои клетки, подходящи за присаждане на друго място, например при трансплантация на кожа. Другата възможност е пациентът да има свои стволови клетки [2]. Третата възможност е да се **репрограмират** налични диференцирани клетки, например кожни, от които пациентът може да се лиши. Репрограмирането изисква генетични манипулации. Първият подход за репрограмиране на диференцирани клетки бе чрез въвеждане на ядро от диференцирана клетка в овоцит, на който е унищожено собственото ядро (**somatic cell nuclear transfer**). Получените **scnt** ембриони могат в редки случаи да се изнасят до живородена овца или куче. (А защо не и човек?) Тази възможност е неприемлива по ред причини [1]. Същността на **scnt** технологията е да се позволи на фактори, които присъстват в цитоплазмата на овоцитите (и отговарят за недиференцираното им състояние), да репрограмират ядро на соматична клетка до недиференцирано състояние. При втория подход – сливане (фузия) на соматична и ЕС клетка, вероятно подобни или същите фактори в цитоплазмата на ЕС клетката репрограмират ядрото на соматичната клетка. Оказва се, че има и трети подход за получаване на плурипотентни стволови (ПС) клетки – чрез директно репрограмиране на соматични клетки с вирусни вектори.

Генетично репрограмиране на миши соматични клетки в плурипотентни стволови клетки може да се осъществи след ектопична експресия на Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4. Въвеждане и експресия на чужди или рекомбинантни гени в култивирани *in vitro* клетки е основен методичен подход в молекулярната клетъчна биология. С по-висока степен на достоверност се приемат резултатите от изследванията *in vivo* с генно модифицирани мишки. В тези експерименти значението на определен ген, респективно неговия протеин-продукт, се оценява, в мишки, които свръхекспресират гена (трансгенни) или не експресират гена (knockout мишки). Особено

важна информация дават мишки със следните модификации: 1) когато определен ген е поставен под индуцируем промотор, за да се експресира само по желание на изследователите, 2) когато генът е ограден от Р-локуси и може да бъде изрязан от срекомбиназа, 3) когато към гена е прикачен маркер за селекция.

Takahashi и Yamanaka използват мишки, в които към гена *Fbx15* (който се експресира само в стволови клетки) е прикрепена чрез хомоложна рекомбинация секвенция, кодираща устойчивост към генетичин. Фибробласти, получени от тези мишки, не експресират маркерния ген. Въвеждат в тези фибробласти набор от гени (трансгени), които кодират молекули, характерни за ЕС клетки. Използват ретровирусни вектори. Трансгените се интегрират на неопределени места (ектопично) в генома на фибробластите и се експресират "независимо". Някои от фибробластите (под 1%) стават устойчиви на генетичин, т.е. експресират *Fbx15*. А някои от получените клонове притежават молекулните маркери за стволови клетки и дават тератоми. Оказва се, че за репрограмането на миши фибробласти в ПС клетки е достатъчно да се експресират ектопично транскрипционните фактори Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4 [10]. Неочаквано ектопична експресия на фактора Nanog не е необходима. Напълно очаквано е обаче разнообразието в характеристиките на различните **индуцирани** ПС клетки. Една от причините е, че експресията на ектопично интегрирани гени се влияе от случайности.

Нов подход за индуциране на ПС клетки използва доксациклин-индуцируеми лентивирусни вектори за въвеждане на *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Мус*. Трансдуцираните с тези вектори фибробласти експресират четирите транскрипционни фактора само в присъствието на доксациклин. Този подход позволява да се направят следните изводи: Четирите фактора трябва да се експресират поне 12 дни. От маркерите за плурипотентност първо се активира алкалната фосфатаза, следвана от stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA1). Репрограмането завършва с експресията на *Nanog* и ендогенния *Oct4* [3].

Когато индуцирани по този начин ПС клетки се въведат в бластоцист, се получават, макар и рядко, химерни мишки. Диференцирани клетки от тези мишки дават в присъствие на доксациклин (когато се експресират трансгените) 25-50 пъти повече **вторично индуцирани** ПС клетки. Вторично индуцирани

ПС клетки са получени от различни тъкани на химерните мишки [13].

Ектопична експресия на Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4 в човешки соматични клетки също предизвиква репрограмането им и индуциране на ПС клетки. Технологията за индуциране на човешки ПС клетки е приблизително същата. Но за селекция на получените ПС клетки не може да се използва генетичин! Проверка чрез инжектиране в бластоцист и износване на зародиша също не е възможно.

Човешки дермални фибробласти се получават от кожна биопсия. Култивират се, както и мишите фибробласти, в стандартна среда (DMEM или DMEM/F12 с 10% FBS) върху третираны повърхности [7]. Процедурата изисква поне 4 седмици.

Същата стандартна среда се използва и за получаване и култивиране на клетките, които се използват за получаване (пакетиране) на дефектни ретровирусни частици. Пакетиращите клетки трябва да експресират съставките на вирусната обвивка. Трансфектирани с плазмиден вектор, съдържащ някой от гените за трансдуциране, тези клетки пакетират РНК копия на гена в ретровирусни частици. Плазмидният вектор, който твърде рядко се интегрира в ДНК и се експресира преходно, се е превърнал в ретровирусен. В лаборатории, където процедурата се извършва рутинно, това става за една седмица, най-добре – през четвъртата седмица от размножаването на човешките дермални фибробласти, за да се избегне замразяването на вирусните частици, при което титърът им пада. Възможно е също така вирус-продуциращи линии, в които плазмидът се е интегрирал в геномната ДНК, да се използват и в следващи експерименти [12].

Инфектирането на човешките дермални фибробласти с четирите ретровирусни вектора предизвиква трансдукция на гените за четирите транскрипционни фактора, т.е. интегрирането им в хромозомната ДНК на фибробластите. Авторите на този протокол [9] въвеждат допълнително експресионни вектори за човешка теломераза обратна транскриптаза (hTERT) и за големия антиген на SV40. Те твърдят, че това повишава добива от индуцирани ПС клетки по неизвестни причини.

На четвъртия ден след първото инфектиране човешките дермални фибробласти се промиват и пренасят в среда за култивиране на плурипотентни стволови клетки. Това е най-критичният етап, защото плурипотентността лесно се губи. Стандартният протокол предлага

култивиране на клетките върху ранни пасажи* миши ембрионални фибробласти.

Размножените фибробласти се облъчват, за да не могат да се делят. Но растат и след замразяване и размразяване. Остават живи до три седмици [11]. Колониите от индуцирани ПС клетки се появяват след три седмици. За разлика от облъчените фибробласти клетките в тези колонии са с по-голямо ядро, проминентни ядърца, малко цитоплазма. Когато нараснат до 2-3 mm (50-150 клетки), колониите се разсяват отделно (клонират). Разграничаването под микроскоп и "ръчното" им събиране представляват предизвикателство за изпълнителя. Оттук нататък предполагаемите индуцирани ПС клетки се третират като ЕС клетки [5].

Първите резултати от новата технология са свързани с получаване на линии от индуцирани ПС клетки от пациенти със следните генетични заболявания: остра комбинирана имунна недостатъчност, свързана с липса на аденозин деаминаза (ADA-SCID), болест на Gaucher тип III, синдром на Shwachman-Bodian-Diamond, мускулни дистрофии на Duchenne и Becker, болест на Parkinson, болест на Huntington, синдром на Down/тризомия 21, синдром на Lesch-Nyhan, ювенилен захарен диабет тип 1 [8]. Линиите от ПС клетки, получени от пациенти с различни генетични заболявания, предлагат адекватен модел за изучаване на тези заболявания с методи на молекулярната клетъчна биология и за тестиране на препарати за лечението им.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преди да се въведе технологията за получаване на автоложни индуцирани ПС клетки за регенерация на органи или тъкани у пациенти, предстои решаването на много проблеми, между които: 1) да се спре/заглуши ектопичната експресия на трансгените, 2) да няма чужди (миши) примеси в материала за трансплантация, 3) да се повиши ефективността и намали цената на изкуствените среди, 4) подложката, върху която се култивират клетките за трансплантация, да е от човешки (автоложни?) клетки. Вече се публикуват протоколи, които предлагат решения на последния проблем [4, 6].

Големите надежди на лекарите и изследователите идват от три съществени

особености на индуцираните ПС клетки: 1) те са **автоложни** и присадката няма да бъде отхвърлена; 2) не са ембрионални и затова не попадат под ударите на закона; 3) технологията за получаването им е достъпна и възпроизводима.

За подготовка и квалификация/преквалификация на кадри Калифорнийският Институт за регенеративна медицина (CIRM) например поощрява 10 калифорнийски института с 18 млн. долара. Но една спогодба за обмяна на опит между учени от Англия и САЩ предвижда за самолетни билети (economy class), дневни и квартирни само 10 000 долара! (http://blogs.nature.com/reports/thenishe/funding_and_resources/). Създателят на овцата Доли също се преквалифицира. ("Ian Wilmut's move from cloning: getting practical with iPSt" <http://blogs.nature.com/reports/thenishe/reprogrammingpluripotency/>).

А ние?

Библиография

1. Милчев, Г. Има ли алтернатива терапевтичното клониране. – Мед. преглед, **42**, 2006, № 3, 103-105.
2. Милчев, Г. Стволовите клетки. – Мед. преглед, **42**, 2006, № 2, 30-34.
3. Brambrink, T. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. – *Cell. Stem Cell.*, **2**, 2008, 151-159.
4. Gonzalez, R., J. F. Loring et E. Y. Snyder. Preparation of autogenic human feeder cells for growth of human embryonic stem cells. – In: *Curr. Protoc. Stem. Cell Biol.* John Wiley & Sons, Inc., 2008, Chapter 1, 1C.5.1-1C.5.15.
5. Lerou, P. H. et al. Derivation and maintenance of human embryonic stem cells from poor-quality in vitro fertilization embryos. – *Nat. Protoc.*, **3**, 2008, 923-933.
6. Meng, G. et al. A novel method for generating xeno-free human feeder cells for human embryonic stem cell culture. – *Stem. Cells Dev.*, **17**, 2008, 413-422.
7. Milchev, G. In vitro development of mouse marrow stromal cell cultures. Distinct effect on growth and differentiation of marrow progenitor cells. – *Folia Biol.*, **7**, 1993, 195-197.
8. Park, I. H. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. – *Cell*, **134**, 2008, 877-886.
9. Park, I. H. et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells. – *Nat. Protoc.*, **3**, 2008, 1180-1186.
10. Takahashi, K. et S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. – *Cell*, **126**, № 4, 2006, 663-676.
11. Tsoncheva, V., K. Kirov, C. Valkova. et G. Milchev. Evaluation of delayed apoptotic response in lethally irradiated human melanoma cell lines. – *Z. Naturforsch.*, **56C**, 2001, 660-665.
12. Valkova, C., O. Georiev, L. Karagyozov et G. Milchev. Silencing of retroviral vector transduced LacZ reporter gene by frameshift mutation. – *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 2003, 1-6.
13. Wernig, M. et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. – *Nat. Biotechnol.*, **26**, 2008, 916-924.

*След няколко пасажа ембрионалните фибробласти губят способността да поддържат култивираните върху тях стволови клетки в недиференцирано състояние.

