

УДК 576.5

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ

© 2013 г. С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия,
e-mail: sl_kiselev@yahoo.com

Поступила в редакцию 22 мая 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ, ТИПЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ВОЗМОЖНОСТИ

Стволовые клетки – это особый тип клеток, которые имеют способность к самообновлению и в то же время могут давать при делении иные специализированные клетки. Важно отметить, что стволовые клетки могут существовать как внутри организма, так и вне его. Стволовые клетки являются уникальной моделью и одновременно инструментом для того, чтобы изучать механизмы раннего развития, клеточной дифференцировки, поддержания и регенерации тканей. Уникальные способности стволовых клеток к длительной пролиферации и к дифференцировке делают их перспективным инструментом для клеточной терапии, а учитывая результаты последних исследований по вовлеченности стволовых клеток в процесс опухолеобразования – одновременно и мишенью воздействия на организм.

Первое упоминание термина «стволовая клетка» принадлежит великому немецкому естествоиспытателю и философу Эрнсту Геккелю. Это ему мы также обязаны такими словами, как питекантроп, экология и филогенез. Именно построение филогенетических схем привело его к мысли, что есть стволовая клетка – предшественник одноклеточных организмов, из которых потом развились многоклеточные. В 1877 г. в своем труде «Антропология» Э. Геккель провел параллели между эволюцией (филогенезом) и эмбриологией (онтогенезом), предположив, что оплодотворенная яйцеклетка и является

стволовой клеткой. На самом деле мы видим, что яйцеклетки или более поздние клетки внутренней клеточной массы не совсем однозначно соответствуют критерию стволовой клетки, они не способны к самообновлению *in vivo*. Тем не менее по своей способности дифференцироваться во все эмбриональные и экстраэмбриональные ткани они являются *тотипотентными*, как зигота, или *плюрипотентными*, как клетки внутренней клеточной массы, которые дают начало всем тканям взрослого организма. Строго говоря, имея в виду эти клетки *in vivo*, мы не должны использовать словосочетание *тоти-* или *плюрипотентные стволовые клетки*. Однако, учитывая то, что *плюрипотентные клетки* могут быть выведены в искусственно поддерживаемую клеточную культуру, называемую *эмбриональными стволовыми клетками*, они представляют классический пример стволовых клеток. Дальнейшее развитие термин «стволовая клетка» получил в работах Валентина Хакера, работавшего над теорией бессмертной зародышевой плазмы Августа Вейсмана (Ramalhos-Santos, Willenbring, 2007). В 1892 г. Хакер опубликовал исследование, в котором описывал несимметричное деление, при котором клетка, определенная им как стволовая, дает начало двум другим типам клеток, среди которых одна сохраняет свойства клетки зародышевого пути, а вторая становится предшественником мезодермальных соматических клеток. Примерно в это же время исследователи в области развития и регенерации системы кроветворения поставили вопрос о существовании единственного предшественника кроветворной системы.

Исследования, проводимые А. Папенхаймом (1896 г.), а позднее российским ученым А. Максимовым (1909 г.), подтвердили унитарную теорию кроветворения, которая была экспериментально доказана американскими учеными Дж. Тиллом и Э. МакКаллохом в начале 60-х годов прошлого века. Стволовая кроветворная клетка является *мультипотентной* и обеспечивает все разнообразие специализированных клеток кровеносной системы. При построении условной иерархической лестницы потенциалов стволовых клеток принято считать, что наибольшими возможностями обладает *тотипотентная* клетка, на ступеньку ниже находится *плюрипотентная* клетка, еще ниже находятся *мультипотентные* стволовые клетки взрослого организма. В отличие от клеток-основательниц они не способны дать начало всем типам клеток организма, а служат для поддержания и регенерации той или иной ткани, поэтому зачастую их называют региональными (регионарными) стволовыми клетками. В настоящий момент хорошо описаны мультипотентные стволовые клетки крови, мезенхимальные стволовые клетки различных тканей, нейрональные стволовые клетки и целый ряд других. Необходимо отметить, что в пределах одной гистологической структуры во взрослом организме могут находиться мультипотентные стволовые клетки различных типов,

дающие начало различным дифференцированным производным.

В 1960 г. Дж. Тилл и Э. МакКаллох исследовали костный мозг в попытке найти клетки, ответственные за регенерацию крови. Эксперименты проводились на мышах, облученных летальной дозой радиации: введенные клетки костного мозга здоровых животных полностью восстанавливали гематопозз реципиентных мышей. Гематопозэтические стволовые клетки (ГСК) функционально определяются по способности восстанавливать кроветворение у облученных или генетически дефектных мышей введением кроветворных клеток здорового донора в серии предельных разведений и отвечают за формирование всех типов клеток крови. В костном мозге одновременно существуют несколько типов ГСК, которые отличаются по способности к самоподдержанию и способности к восстановлению кроветворения.

Для ГСК взрослого организма было показано, что они обладают хотя и высоким, но ограниченным пролиферативным потенциалом и что кроветворение поддерживается за счет последовательного созревания ГСК. Существует вид ГСК, способный надолго заселять костный мозг при введении в облученное животное (long-term repopulating cells), т. е. эти ГСК могут продуцировать все типы клеток крови и помимо этого способны долговременно поддерживать в необходимом количестве свою собственную клеточную популяцию. Всего одной такой клетки достаточно для поддержания кроветворения у реципиентной мыши в течение длительного времени. Для клеток человека в качестве основного маркера таких ГСК используют молекулу адгезии CD34. Другой вид ГСК (short-term repopulating cells) способен полностью репопулировать облученный организм, однако этот эффект кратковременен, и через 4–6 недель стволовые клетки перестают самовозобновляться и кроветворные способности истощаются. Недавно описан совсем малочисленный тип покоящихся ГСК, всего около 1000 клеток. Для покоя и пролиферации ГСК важны межклеточные контакты и взаимодействия с внеклеточным матриксом стромы костного мозга, в котором концентрируются цитокины, вырабатываемые клетками различных типов. Наиболее хорошо изучено влияние GM-CSF и IL-3. Установлено,

Тотипотентная клетка дает начало эмбриональным, экстраэмбриональным и трофобластическим тканям. Примером является зигота.

Плюрипотентные стволовые клетки дают начало эмбриональным и экстраэмбриональным тканям. Примерами являются клетки внутренней клеточной массы бластоцисты, эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Мультипотентные (регионарные) стволовые клетки дают начало нескольким типам клеток внутри одного зародышевого листка. Примерами являются стволовые клетки крови, стромальные стволовые клетки, нейрональные стволовые клетки, стволовые клетки волоса и т.д.

В организме *in vivo* **мультипотентные стволовые** клетки имеют ограниченный потенциал самовозобновления.

что в регуляции самовозобновления клеток крови участвуют Notch-, Shh- и Wnt-сигнальные пути. В костном мозге локализуются не только ГСК, там же находятся стромальные клетки, которые обеспечивают специальные условия для стволовых клеток крови. Большой вклад в исследования двух соседствующих популяций стволовых клеток внесли российские исследователи А.Я. Фриденштейн и И.Л. Чертков, ставшие основоположниками изучения стромальных (мезенхимальных) мультипотентных стволовых клеток костного мозга. В конце 1960-х годов в своих экспериментах они показали в костном мозге наряду с существованием кроветворных стволовых клеток наличие мультипотентных стволовых клеток стромы, которые могли дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты и собственно стромальные клетки, поддерживающие гемопоэз. Стволовые клетки мезенхимального ряда обнаружены в других тканях, наиболее известным источником является жировая ткань. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани хотя и имеют меньший потенциал дифференцировки и не могут поддерживать гемопоэз, но, тем не менее, обладают способностью дифференцироваться в хондрогенном и адипогенном направлениях. Следует отметить, что далеко не все типы клеток, которые *in vitro* имеют свойства стволовых, а именно: могут самообновляться, воспроизводя себя и дифференцируясь в другие типы клеток, сохраняют эти свойства *in vivo*. При характеристике клеток вне организма приходится полагаться в основном на клеточные маркеры, иммунологические, генетические, реже – функциональные. Это зачастую приводит к лабораторным артефактам, когда ожидаемое кажется действительным и потенции клеток преувеличиваются. Наиболее ярким примером такого артефакта является безграничный потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Ряд исследователей приписывали им возможность не только дифференцироваться в разнообразные типы клеток, таких как инсулин-продуцирующие, гепатоциты, нейроны и т. д. *in vitro*, но и во все ткани организма *in vivo*. Однако такие фантастические открытия не всегда подтверждаются работами других коллективов, а тщательное расследование экспериментов

позволяет установить даже фальсификацию результатов. Так, спустя несколько лет были опровергнуты нашумевшие научные работы о безграничном потенциале клеток костного мозга. Скорее всего, мультипотентные стволовые клетки взрослого организма в нормальных физиологических условиях имеют потенциал дифференцировки только в пределах собственного зародышевого листка, хотя с помощью воздействия специальных факторов *in vitro* это можно существенно изменить.

Удивительно, но наряду со стволовыми клетками костного мозга, представленными 2 типами, у взрослого человека есть стволовые клетки мозга. Всем известно выражение, что нервные клетки не восстанавливаются. Однако еще в середине 60-х годов прошлого века Джо-зеф Альтман доказал, что клетки мозга восстанавливаются и, как было показано позднее на примере обучения канареек новым песням, в мозге у птиц формируются новые нейроны и устойчивые нейрональные связи. Каким образом происходит восстановление клеток взрослого мозга и откуда берутся новые зрелые нейроны? Очевидно, что имеется запас клеток-предшественников, стволовых клеток, которые дают начало как нейронам, так и сопутствующим глиальным клеткам. В присутствии определенных ростовых факторов из тканей гиппокампа были выделены клетки, которые в суспензии формировали сфероиды, причем эти сфероиды могли быть разрушены до отдельных клеток, которые опять формировали сфероиды, т. е. клетки обладали способностью к самообновлению. Если перевести клетки сфероидов в другие условия культивирования и посадить их на поверхность, то начинается дифференцировка, которая приводит к появлению клеток, имеющих морфологию и маркеры, соответствующие нейронам, астроцитам и олигодендроцитам. В гетерогенной популяции нейросфер был определен маркерный белок промежуточных нейрофиламентов – нестин. Нестин оказался великолепным маркером нейрональных стволовых клеток. Используя трансгенных мышей, у которых флуоресцентные белки находились под контролем промотора гена нестина, а также ряд других трансгенных животных, Г.Н. Ениколопов совсем недавно доказал, что выражение «нервные клетки не восстанавливаются» отчасти верно (Encinas *et*

al., 2011). В своем исследовании он продемонстрировал, что нейроны восстанавливаются, но восстановление зрелых нейронов происходит за счет потери нейрональных стволовых клеток. По предложенной им модели «расходных нейрональных стволовых клеток» в гиппокампе находятся покоящиеся нейрональные предшественники (quiescent neuronal progenitors, QNP) (рис. 1), которые проходят примерно 3 несимметричных митотических деления, в результате которых образуются симметрично делящиеся, дважды размножающиеся нейрональные предшественники (amplifying neuronal progenitors), которые формируют нейробласты, далее – незрелые, а потом и зрелые нейроны. Последние две стадии сопровождаются апоптозом делящихся клеток, лишь единицы становятся зрелыми нейронами. Исходные покоящиеся нейроны (QNP), совершив несколько циклов деления, выходили из него, приобретая морфологию предшественников астроцитов и далее становясь постмитотическими астроцитами. В завершение всего сложного многоступенчатого процесса один нейрональный предшественник (QNP) приводит к образованию одного астроцита и одного–двух нейронов. Таким образом, во взрослом организме происходит восстановление зрелых нейронов и нейрональные связи могут быть восстановлены, однако потенциал восстановления ограничен изначальным количеством покоящихся нейрональных предшественников. Предложенная модель отчасти согласуется с наличием среди ГСК двух типов репопулирующих клеток.

Описан еще целый ряд региональных стволовых клеток млекопитающих, но пока они еще мало изучены и их потенциал еще не так

значим, как потенциал стволовых клеток взрослого организма.

ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Соматические клетки многоклеточного организма от его зарождения (оплодотворенная яйцеклетка) до момента биологической смерти претерпевают множество делений. С каждым из делений клетка движется вниз по лестнице онтогенеза, приобретая все больше черт терминальной дифференцировки и постепенно теряя потенциал к превращению в разные типы клеток. Это билет в один конец: в норме любая дифференцированная клетка не возвращается назад, не становится клеткой предшественника или стволовой клеткой. Зигота и бластомеры ранней морулы обладают способностью дифференцироваться во все эмбриональные типы клеток и в клетки трофобластической оболочки. Эта способность называется *тотипотентностью*. *Плюрипотентные клетки* внутренней клеточной массы бластоцисты (ВКМ, inner cell mass, ICM) могут дифференцироваться во все эмбриональные и экстраэмбриональные ткани. Клетки ВКМ бластоцисты, культивируемые в лабораторных условиях, получили название *эмбриональные стволовые клетки* (ЭСК, ESCs). Можно подобрать такие условия культивирования, что программа дальнейшего развития ЭСК *in vitro* не реализуется, они сохраняют свойство плюрипотентности неограниченное время. Самым замечательным свойством ЭСК является то, что, несмотря на длительное существование

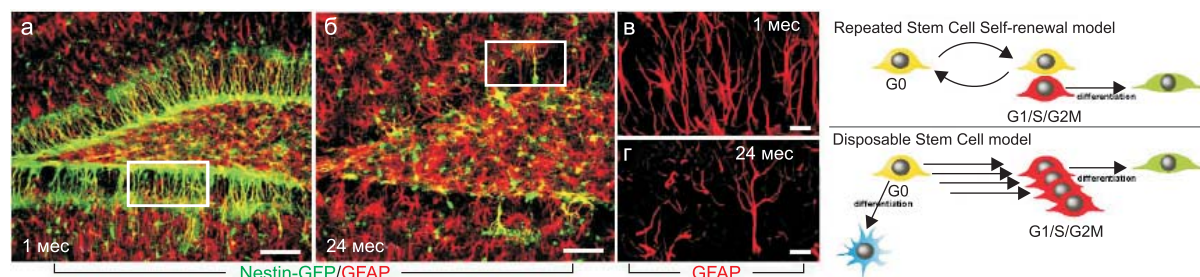


Рис. 1. Покоящиеся нейрональные предшественники и их постепенное исчезновение из района гиппокампа. Модель расходных нейрональных стволовых клеток (Encinas *et al.*, 2011. P. 566–579).

в культуре *in vitro* (более 300 пассажей), они сохраняют свойство группы клеток ВКМ, из которой они произошли, а именно: они способны полностью выполнить программу эмбрионального и онтогенетического развития, если помещены обратно в ранний эмбрион. В химерной мышце производные ЭСК могут присутствовать во всех тканях, включая клетки зародышевого пути. Возможность культивировать клетки *in vitro*, производить с ними генетические манипуляции, а потом получить из них целый организм делает ЭСК не только уникальным объектом для изучения фундаментальных аспектов биологии развития, но и эффективным биотехнологическим инструментом (Philonenko *et al.*, 2011).

Эти удивительные свойства ЭСК были использованы для разработки технологии генетического нокаута. Эта технология позволяет манипулировать генами на уровне целого организма, выяснять биологическую функцию гена *in vivo*, а также создавать модельные системы для изучения молекулярной генетики заболеваний человека. В 2007 г. за разработку технологии генетического нокаута с использованием ЭСК была вручена Нобелевская премия. Сегодняшние технологии редактирования генома с помощью нуклеаз типа цинковых пальцев (zinc finger nucleases, ZFN) или TALEN позволяют эффективно вносить генетические изменения уже на стадии оплодотворенной яйцеклетки. В апреле 2013 г. было опубликовано сообщение, что в знаменитом Рослинском институте (Шотландия), где была клонирована овечка Долли, получен Пиг26 – поросенок с измененным геномом и не подверженный африканской свинной лихорадке (<http://www.independent.co.uk/news/science/pig-26-can-this-little-piggy-win-over-the-enemies-of-gm-8574119.html>). При использовании технологии редактирования генома на стадии зиготы в геном домашней свиньи была внесена определенная мутация, которая делает африканских сородичей, не скрещивающихся с домашней свиньей, устойчивыми к лихорадке.

В 1998 г. группа Джеймса Томсона получила линии ЭСК человека, тем самым открыв новые возможности не только для изучения эмбрионального развития человека, но и для направленного гистогенеза *in vitro*. Для получения стабильных линий ЭСК человека используют невоплощенные после искусственного опло-

дотворения (экстракорпоральное оплодотворение, ЭКО) бластоцисты человека. Обычно после такой процедуры количество бластоцист больше, чем необходимо реципиенту. По грубым оценкам только в России остаются невоплощенными после ЭКО несколько десятков тысяч бластоцист, которые могли бы быть использованы с согласия доноров для научных целей. Эмбриональные стволовые клетки человека имеют характерные поверхностные иммунологические маркеры, например SSEA-3, SSEA-4 – антигенные детерминанты гликолипидов и TRA-1-60, TRA-1-81 – разные эпитопы одного протеогликана клеточной поверхности, а также CD90. В отличие от ЭСК мыши ЭСК человека не экспрессируют SSEA-1. Также в ЭСК высока активность эндогенной щелочной фосфатазы и теломеразы. И иммунологические маркеры, характерные для ЭСК, и высокая теломеразная активность присущи также трансформированным клеткам. Для полной характеристики линий ЭСК человека обязателен анализ кариотипа. Нормальный набор хромосом и отсутствие хромосомных аномалий – это признаки нормального кариотипа, который, однако, в процессе культивирования клеток может быть нарушен. По данным Amps с соавт. (2011), 70 % линий плюрипотентных стволовых клеток человека сохраняют неизменный кариотип на длительных сроках культивирования. В остальных случаях наблюдаются разнообразные хромосомные перестройки. Необходимо отметить, что *in vivo* на доимплантационной стадии развития очень высок уровень миксоплоидии и частота встречаемости анеуплоидных клеток в эмбрионе достигает 30–65 %. *In vivo* большая часть таких аномалий либо оказывается несовместимой с дальнейшей жизнью эмбриона, либо аномальные клетки подвергаются апоптозу в ходе дальнейшего развития эмбриона. Таким образом, определенная нестабильность генотипа ЭСК является их внутренним свойством, возможно, обусловленным влиянием окружающей среды. В то же время в целом ряде работ подчеркивается способность ЭСК сохранять стабильный кариотип. Сохранение стабильного кариотипа в ходе длительного культивирования было даже названо уникальным свойством, присущим только ЭСК, в отличие от других известных культур клеток, например от фибробластов человека,

способных пройти только около 30 делений *in vitro*, сохраняя нормальный кариотип.

Наиболее полное исследование генетической стабильности линий ЭСК человека было проведено консорциумом International Stem Cell Initiative, который собрал для анализа около 140 линий плюрипотентных стволовых клеток человека из 39 ведущих лабораторий мира, включая и линии ЭСК человека, которые были получены в России (Amps *et al.*, 2011). Совокупно в этом исследовании были задействованы линии ЭСК человека, полученные для многих этнических групп. Для анализа были отобраны линии на ранних и поздних пассажах, разница составляла 30 и более пассажей. Для того чтобы определить, насколько генетически стабильны линии ЭСК человека, проводился цитогенетический анализ этих линий. SNP анализ и анализ метилирования ДНК. Проведенные исследования показали, что более 70 % линий, включенных в исследование, были генетически стабильны при культивировании *in vitro*. Оставшиеся линии (30 %) имели различную вариабельность, которую нельзя было однозначно отнести к условиям культивирования конкретной лаборатории. Не исключено, что вариабельность может быть связана с деталями ЭКО или особенностями генотипов линий. Тем не менее в некоторых линиях ЭСК человека по мере культивирования наблюдалось накопление определенных изменений в определенном участке хромосомы 20. Проведенный детальный анализ перестроек хромосомы 20 позволил определить антиапоптотический ген *BCL2L1* как кандидатный на амплификацию в ходе культивирования. На самом деле такому глубокому и строгому анализу не подвергались никакие первичные (нетрансформированные) долговременные культуры клеток человека. Не исключено, что любые первичные культуры клеток человека, например популярные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга или жира, при относительно долгом культивировании также накапливают генетические изменения, дающие им преимущество в выживании при пролиферации *in vitro*.

Так как сохранение способности клеток к неограниченному делению *in vitro* без трансформации и потери свойства плюрипотентности является искусственно поддерживаемым состо-

янием, механизмы поддержания плюрипотентности являлись предметом изучения со времен первого получения ЭСК мыши. Первые линии ЭСК мыши и человека были получены и поддерживались на фидерном слое из инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов. В дальнейшем было показано, что линии ЭСК могут быть получены в бесфидерных условиях, в среде, содержащей различные комбинации ростовых факторов и сигнальных молекул. Исследования ряда лет были направлены на выявление влияния каждого из этих факторов на поддержание плюрипотентности ЭСК мыши и человека. Было обнаружено, что для ЭСК человека LIF не является необходимой сигнальной молекулой поддержания плюрипотентности, а для ЭСК мыши является. Обратная ситуация наблюдалась для фактора роста фибробластов (FGF). Таким образом, несмотря на то что ЭСК человека и мыши были получены из эмбриологически сходных структур, основные сигнальные пути у них различаются, вероятно, вследствие различий в процессах эмбрионального развития. Новым шагом к пониманию свойства плюрипотентности явилось получение стволовых клеток мыши на стадии эпибласта – mEpiSC. Для mEpiSC так же, как и для ЭСК человека, главными позитивными регуляторами плюрипотентного состояния являются TGF-beta, Activin, FGF2, ERK1/2, Wnt, IGF. Эти два принципиально разных состояния плюрипотентности были определены как «naïve», характерное для ЭСК мыши, и «primed», характерное для mEpiSC и ЭСК человека. По всей вероятности, ЭСК человека могут являться аналогом более поздней стадии развития эмбриона, чем ЭСК мыши. Однако этот факт не влияет на способность ЭСК человека дифференцироваться в производные 3 зародышевых листков и поддерживать плюрипотентное состояние *in vitro* (Philonenko *et al.*, 2011).

Каскады сигнальных путей поддержания плюрипотентности направлены как на блокирование путей дифференцировки, так и на поддержание и активацию транскрипционных факторов плюрипотентности. Выявлены основные транскрипционные факторы поддержания плюрипотентности, которые являются общими для человека и мыши, – это POU5F1 (или Oct3/4), Sox2, Nanog, Klf4, Zfp42/Rex1 и

ряд других. Эти транскрипционные факторы связаны с регуляторными районами транскрибируемых и неактивных генов, часть из которых связана с поддержанием самообновления и плюрипотентности ЭСК, другие контролируют основные программы дифференцировки в экстраэмбриональные и эмбриональные типы тканей. Первая тройка транскрипционных факторов плюрипотентности связана с 10 % всех промоторов в геноме человека, при этом половина регуляторных районов, с которыми связан Oct3/4, также связана с Sox2, и 90 % этих районов занято транскрипционным фактором Nanog. Гены, с регуляторными районами которых связано сразу несколько транскрипционных факторов, активны в ЭСК, в то время как с регуляторными районами генов, ответственных за дифференцировку и, следовательно, репрессированных в ЭСК, связаны только одиночные транскрипционные факторы.

Когда мы говорим о начальных стадиях развития и специализации клеток, то невозможно обойти вклад эпигенетики в эти процессы. Термин «эпигенетика» произошел от слова «эпигенезис», которое обозначало отображение генома клетки во время развития, дающее определенный фенотип клетки (Waddington, 1942). Сейчас под эпигенетическими механизмами понимаются наследуемые изменения в функционировании генов, не связанные с изменением последовательности ДНК. Эпигенетические модификации генома – это метилирование ДНК, метилирование и ацетилирование гистонов, организация негистоновых белков хроматина, а также регуляторные некодирующие РНК. Эпигенетические модификации обратимы. Эпигенетические модификации генома служат для закрепления определенного статуса хроматина, «открытого» или «закрытого». Модификации гистонов и метилирование ДНК тесно связаны. Метилирование ДНК может приводить к последующей модификации гистонов, и наоборот модификация гистонов может приводить к метилированию ДНК (Jaenisch, Bird, 2003).

Принято считать, что метилирование ДНК служит для того, чтобы маркировать неактивную область генома. Модификации гистонов могут как активировать, так и репрессировать транскрипцию генов. В процессе эмбрионального развития, гаметогенеза и при тканеспецифи-

ческой дифференцировке геном подвергается изменению метилирования ДНК и модификаций гистонов. Скорость обмена гистонов в ЭСК мыши высока – от нескольких секунд до минуты. Возможно, такая высокая скорость замены гистонов позволяет ЭСК быстро вступить на путь дифференцировки. Клетки постепенно приобретают определенный паттерн метилирования в процессе дифференцировки. Снижение активности генов, определяющих плюрипотентность (Oct3/4, Nanog) в дифференцирующихся клетках, сопровождается гиперметилированием их промоторных областей. Если метилтрансферазы в дифференцирующихся клетках не работают (например, Dnmt1-/-), то это приводит к вступлению клеток на путь апоптоза. При этом эти клетки эффективно поддерживают недифференцированное состояние, что говорит о том, что гипометилирование может являться одним из механизмов поддержания самообновления. В то же время далеко не все гены, ассоциированные с плюрипотентностью, гипометилированы одинаково во всех линиях ЭСК человека. Регуляторные участки ключевых генов, таких как Oct3/4, Nanog, гипометилированы сходным образом в линиях ЭСК. Интересно, что при общей открытой организации хроматина плюрипотент-

Эмбриональные стволовые клетки получают в результате культивирования внутренней клеточной массы бластоцисты. Для получения эмбриональных стволовых клеток человека используют бластоцисты, не востребуемые в результате экстракорпорального оплодотворения и предназначенные для уничтожения.

Эмбриональные стволовые клетки вне организма способны неограниченно долго пролиферировать и сохранять свойство плюрипотентности, не претерпевают опухолевой трансформации, а также способны дифференцироваться в разнообразные специализированные клетки и ткани *in vitro* и *in vivo*.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем **репрограммирования** любых соматических клеток взрослого организма генами транскрипционных факторов плюрипотентного состояния или их аналогами. В результате репрограммирования получаются клетки, практически идентичные по свойствам **эмбриональным стволовым** клеткам.

ных стволовых клеток уровень метилирования промоторных участков более чем 20 тыс. генов, а также других последовательностей генома значительно выше в плюрипотентных стволовых клетках человека, чем в соматических клетках (Lagarkova *et al.*, 2010). Остается непонятным, каким образом большая часть гиперметилованных промоторов в ЭСК переходит в гипометилированное состояние в дифференцированных клетках, так как к настоящему моменту нет устоявшегося представления о ферментах, которые могут удалять метильную группу.

Несомненно, такие плюрипотентные стволовые клетки человека, как ЭСК, представляют большой интерес как модельная система изучения процессов развития и дифференцировки. Возможность неограниченного деления в культуре и способность к дифференцировке ЭСК являются весьма привлекательными для использования этих стволовых клеток в целях получения специализированных клеток и тканей, пригодных для терапевтических целей. Однако возникает проблема иммунологической совместимости ЭСК и реципиентов. Отчасти эта проблема может быть решена созданием банка линий ЭСК с определенными параметрами комплекса гистосовместимости. Несколько сотен линий ЭСК (300–400) с подобранными сочетаниями вариантов комплекса гистосовместимости достаточно, чтобы они были иммунологически совместимы с 70 % представителей европеоидной расы. В то же время получение полностью иммунологически совместимых плюрипотентных стволовых клеток человека является весьма привлекательным для их дальнейшего использования в практике.

Исследования по переносу ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит (somatic cell nuclear transfer, SCNT) или слияние соматической клетки с плюрипотентной продемонстрировали, что геном соматической клетки может быть переведен в эмбриональное состояние, т. е. однонаправленная программа развития может быть изменена, а клетка репрограммирована (Jaenisch, Young, 2008). Репрограммирование возможно не только до плюрипотентного состояния. Например, в 1987 г. Вайнтраубу с коллегами с помощью введения в фибробласты генетической конструкции, экспрессирующей транскрипционный фактор гладкомышечной

дифференцировки, удалось репрограммировать эти клетки в мышцы. Соответственно, зная, какие генетические факторы определяют плюрипотентность, можно репрограммировать соматическую клетку.

С помощью подбора различных сочетаний 24 транскрипционных факторов, участвующих в приобретении и поддержании плюрипотентного состояния, были определены всего 4 фактора Oct3/4, Sox2, Klf4 и C-Мус (известные теперь как коктейль Яманаки), экспрессия которых в соматической клетке приводила к ее переходу в плюрипотентное состояние. Этот процесс получил название «генетическое репрограммирование», т. е. репрограммирование путем прямого воздействия на генетический материал взрослой клетки (в отличие от SCNT и слияния клеток) (рис. 2). За создание технологий репрограммирования с помощью энуклеированного ооцита и определенного набора генов в 2012 г. была вручена Нобелевская премия по физиологии и медицине двум ученым – Дж. Гёрдону и Ш. Яманаке. Клетки, репрограммированные с помощью генов до плюрипотентного состояния, получили название индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPSCs), иПСК. При репрограммировании с течением времени реактивируются эндогенные транскрипционные факторы Oct3/4, Nanog и Sox2, которые активируют автономные механизмы поддержания плюрипотентности, не зависящие от введенных трансгенов. иПСК обладают основными свойствами ЭСК и являются их аналогом, полученным искусственным путем. При генетическом репрограммировании приобретение соматическими клетками плюрипотентного состояния происходит с довольно низкой эффективностью. В первой работе 2006 г. К. Такахаши и Ш. Яманаки (Takahashi, Yamanaka, 2006) эффективность получения клеток иПСК из эмбриональных фибробластов мыши с использованием ретровирусов для доставки транскрипционных факторов составила всего 0,02 %. В дальнейших работах по репрограммированию соматических клеток человека, мыши и крысы (Stadtfeld, Hochedlinger, 2010) максимальная эффективность составила 0,5 %. Две различные модели: «элитная и «стохастическая» были предложены для объяснения

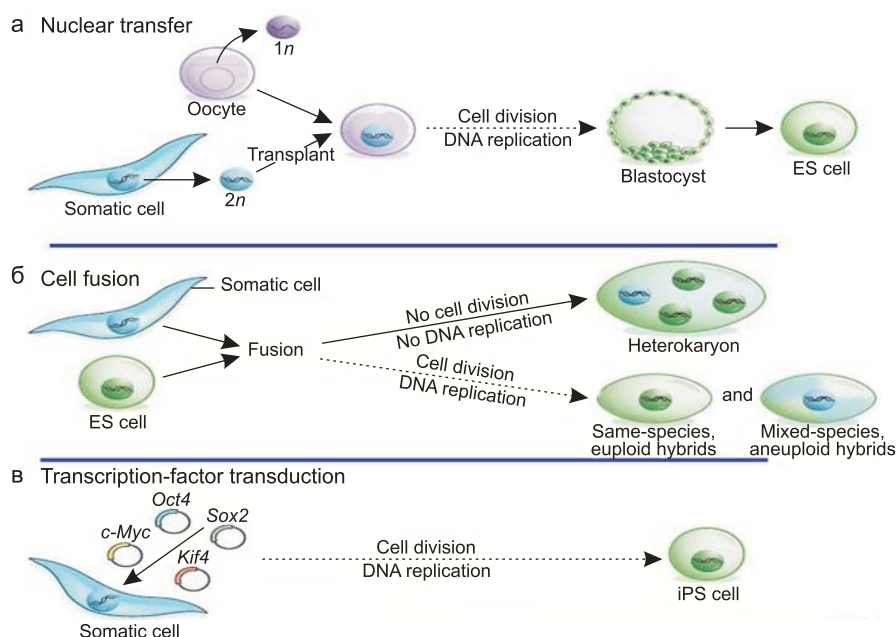


Рис. 2. Существующие технологии репрограммирования генома соматической клетки до плюрипотентного состояния: перенос ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит (а), слияние соматической и эмбриональной стволовой клетки (б), прямое генетическое репрограммирование (в) (Yamanaka, Blau, 2010. P. 704–712).

того, что не все клетки подвергаются репрограммированию. «Элитная» модель предполагает присутствие в популяции части клеток, которые с большей вероятностью вступают на путь приобретения плюрипотентности, чем остальные. «Стохастическая» модель постулирует одинаковую вероятность перехода всех клеток популяции в репрограммированное состояние. На самом деле это весьма упрощенный взгляд на процесс репрограммирования. Можно рассматривать процесс репрограммирования как бег с препятствиями (рис. 3). «Бегуны», т. е. клетки той или иной специализации, возраста, пассажа располагаются на разных дорожках, и им предстоит преодолеть ряд барьеров, таких, как эффективность экспрессии в каждой клетке репрограммирующего фактора или их сочетания, состояние хроматина, способность к пролиферации или апоптозу и т. д. Совсем недавно было показано, что гены эмбрионального развития физически недостижимы для экзогенных транскрипционных факторов из-за своеобразной упаковки хроматина. Скорее всего, на повороте «олимпийского забега» происходит переход от стохастического сценария репрограммирования к элитарному, но даже среди

элиты не все приходят к финишу (Philonenko *et al.*, 2011). Удивительно, что финишная прямая может растягиваться для некоторых клонов репрограммируемых клеток очень надолго, требуется до нескольких месяцев культивирования, пока иПСК не достигнут некоего «золотого стандарта» плюрипотентных стволовых клеток. В случае иПСК мыши «золотым стандартом» может служить тест на тетраплоидную комплементацию. На стадии двухклеточного эмбриона производится электрослияние клеток, развитие тетраплоидного эмбриона продолжается дальше *in vitro* до стадии бластоцисты. Если такую бластоцисту имплантировать, то трофобластическая оболочка обеспечит имплантацию, но развития эмбриона не произойдет. Если во внутреннюю полость тетраплоидной бластоцисты ввести диплоидные плюрипотентные клетки, например иПСК, то они сформируют все ткани эмбриона и организма. С иПСК человека такая проверка невозможна, необходимы другие значимые критерии репрограммирования. Самое значимое на начальном этапе – это переход клеток от роста в монослое или суспензии к росту отдельными морфологически четкими колониями. На физиологическом и молекулярном уровнях репро-

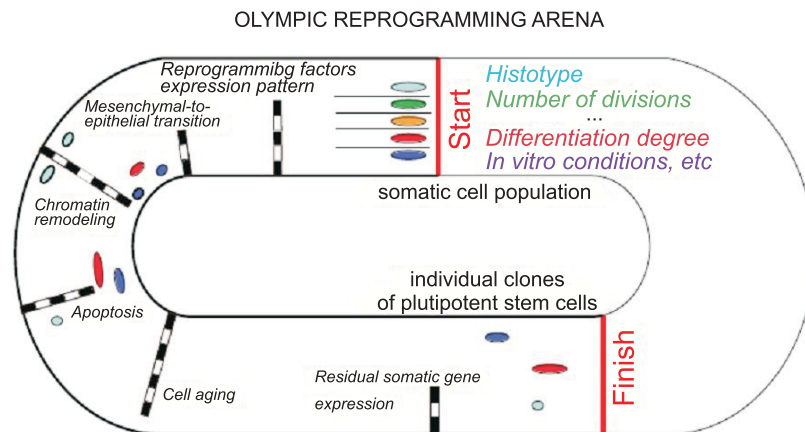


Рис. 3. Процесс репрограммирования клеток можно представить как «бег с препятствиями», где «бегуны» (клетки, обладающие различными свойствами), расположившись на своих дорожках, должны преодолеть ряд барьеров, таких, как различная экспрессия в разных клетках самих факторов репрограммирования, провести ремоделирование хроматина, преодолеть апоптоз и т. д. (Philonenko *et al.*, 2011. P. 153–196).

граммирование сопровождается потерей ранее установленных щелевых контактов и установлением новых, характерных для плюрипотентных клеток. Замолкают гены, характерные для соматических клеток, активизируется работа эндогенных генов плюрипотентности, прекращается работа внесенных извне (экзогенных) факторов плюрипотентности. Происходит ремоделирование хроматина, он становится менее компактным, деметируются регуляторные районы генов плюрипотентности, нарастает общий уровень метилирования ДНК.

Полностью репрограммированные клетки способны дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков, а при введении их иммунодефицитным животным – формировать разнообразные ткани. Наиболее широко используется вирусная доставка факторов репрограммирования в соматические клетки, хотя ее негативные стороны очевидны: это неконтролируемая интеграция трансгенов и их возможное влияние на геном.

На смену интеграционному подходу пришел ряд систем репрограммирования, в которых не используются молекулы ДНК. В первую очередь, это репрограммирование с помощью *in vitro* синтезированных мРНК транскрипционных факторов или рекомбинантных белков, а также вируса Сендая, который существует только в форме РНК. Некоторые транскрипционные факторы можно заменить на химические сое-

динения, способствующие ремоделированию хроматина. Сегодня очевидно, что практически любой тип соматических клеток можно репрограммировать до плюрипотентного состояния с помощью различных сочетаний транскрипционных факторов, молекул и технологий. А насколько при этом иПСК будут соответствовать тому, к чему мы стремились, – ЭСК? Между ЭСК и иПСК действительно существует ряд различий. Оказалось, что есть гены, которые по-разному экспрессируются в индуцированных и эмбриональных стволовых клетках. Экспрессия части генов была характерна для того типа клеток, из которого иПСК клетки были получены. Этот феномен был назван «соматической памятью». Было показано, что эффект «соматической памяти» значительно уменьшается с течением пассажей, однако полностью не исчезает. Также были показаны различия в экспрессии miRNA. Следует отметить, что, говоря о иПСК человека, очень сложно сравнивать линии клеток с индивидуальными характеристиками генома, полученные из разных типов клеток, с различной интеграцией трансгенов и в разных лабораторных условиях. Остается открытым вопрос о влиянии репрограммирования на целостность генома. В целом ряде работ было показано, что в процессе репрограммирования в геноме накапливаются одиночные замены и происходит амплификация повторов. Однако последние исследования показывают, что вклад

самого репрограммирования сильно преуменьшен. Когда были проанализированы геномы иПСК и конкретно геномы тех участков кожи, из которых были получены иПСК (и, соответственно, из фибробластов, полученных из этих участков), то оказалось, что между участками существует разница в количестве повторов (copy number variations), которая потом и обнаруживается в отдельных клонах иПСК. Примерно 30 % наших клеток мозаичны, и это надо учитывать, если с помощью технологии репрограммирования мы будем делать тот или иной тип клеток или моделировать заболевание. Отдельно хочется отметить такое глобальное явление репрограммирования на эпигенетическом уровне, как реактивация инактивированной в женских клетках X-хромосомы. Если с плюрипотентными клетками мыши все достаточно ясно и две активные X-хромосомы в плюрипотентных клетках могут считаться одним из «золотых стандартов» плюрипотентности, то в плюрипотентных стволовых клетках человека ситуация не столь однозначна. В основном, за редким исключением, реактивации X-хромосомы не происходит.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПЛУРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Практическое использование каждого из двух типов плюрипотентных стволовых клеток имеет свои недостатки и достоинства. ЭСК – наиболее охарактеризованный тип плюрипотентных клеток, биология которых изучена в большой степени, однако использование ЭСК в клинике связано с ожидаемым иммунным ответом. Использование иПСК снимает проблемы иммунологической совместимости, однако недостаточно охарактеризованные особенности иПСК также препятствуют использованию их в клинических целях.

На сегодняшний день для наиболее изученных плюрипотентных стволовых клеток человека – ЭСК – разработаны протоколы получения более полусотни специализированных типов клеток (Philonenko *et al.*, 2011). В последние годы было опубликовано множество протоколов диффе-

Репrogramмирование соматических клеток сопровождается глобальным ремоделированием хроматина и изменением транскрипционной активности генов.

Эффективность **репрограммирования** составляет доли процента, и хотя репрограммирование не вносит значительных изменений в геном, полученные **индуцированные плюрипотентные стволовые** клетки имеют геном, сходный с конкретным участком ткани, клетки которой использовались для репрограммирования.

Кроме наследования генома **индуцированные плюрипотентные стволовые** клетки могут унаследовать транскрипционную активность генов того типа клеток, из которых они были получены, – «соматическую память».

ренцировки плюрипотентных клеток в клетки – производные трех зародышевых листков – эктодермы (нейроны, астроциты, олигодендроциты, клетки пигментного эпителия и др.), мезодермы (кардиомиоциты, фибробласты, хрящ, кость, клетки крови и др.), энтодермы (клетки, продуцирующие инсулин, гепатоциты). Ряд специализированных клеточных типов, полученных из ЭСК человека, показал свою эффективность при испытаниях *in vivo* на животных. В 2009–2010 гг. в США было разрешено проведение нескольких первых клинических испытаний производных ЭСК человека, а в 2013 г. в Японии начались клинические испытания иПСК человека.

Основными проблемами на пути использования производных плюрипотентных клеток являются, во-первых, разработка самих протоколов направленной дифференцировки, а во-вторых, их пересадка (трансплантация, введение) пациентам. Остановимся только на биологических проблемах, но таких, которые диктуются современными подходами и требованиями. Во-первых, протоколы культивирования и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток должны быть основаны на полностью определенных (defined) условиях культивирования клеток. Во-вторых, даже для доклинических исследований необходимо разработать технологии массового культивирования клеток и высокоэффективного получения их дифференцированных производных. В-третьих, необходимо иметь возможность селекции

желаемого клеточного типа для минимизации негативных последствий от контаминации другими низкодифференцированными клеточными типами или другими функциональными типами клеток. Сегодня практически не существует протоколов, удовлетворяющих всем этим требованиям. Технология получения иПСК является относительно новой, и основные протоколы направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток были разработаны для ЭСК как наиболее охарактеризованного источника.

В итоге каждый из протоколов дифференцировки сводится к тому, что изменяются условия искусственного поддержания плюрипотентного состояния, вследствие чего клетки вступают на путь спонтанной дифференцировки. Варьируя условия культивирования (использование сыворотки, рекомбинантных ростовых факторов или факторов, выделяемых фидерными клетками), можно увеличить выход клеток необходимого пути дифференцировки. Детектировать направление дифференцировки возможно, оценивая экспрессию генов, характерных для данного пути развития.

В качестве примера рассмотрим дифференцировку по мезодермальному направлению. Предполагается, что гематопэтические и эндотелиальные клетки происходят от общего мезодермального предшественника – гемангиобласта, который коэкспрессирует Flk-1 и Brachyury. В искусственных условиях возможно получить гемангиобласты при дифференцировке через стадию эмбрионидных телец с последующим помещением клеток в полужидкие среды с ростовыми факторами. При дальнейшей дифференцировке клеток по мезодермальному пути формируется ряд клеток-предшественников, из которых можно получить кардиомиоциты, эндотелий и гематопэтические клетки. Направленная дифференцировка позволяет увеличить выход целевой популяции клеток. При разработке метода дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в эндотелий мы использовали для селекции антиген CD31. Необходимо отметить, что при использовании разработанного протокола дифференцировка ЭСК человека в клетки эндотелия сопровождалась не только экспрессией генов специфических транскрипционных факторов (GATA-2, GATA-3 и гена eNOS), но и деметилизацией

регуляторных районов этих генов, что подтверждает эпигенетическую составляющую направленного процесса и его фиксацию. Клетки формировали сетчатую структуру, такую же, как и зрелые человеческие эндотелиальные клетки из пупочной вены, что свидетельствует об их функциональности.

Другое направление дифференцировки гемангиобластов – это дифференцировка по пути гематопэза. Нет необходимости обсуждать практическую значимость этого направления дифференцировки – она огромна. К настоящему моменту существуют несколько основных методов дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток по гемопэтическому пути, и все их можно разделить на 2 группы: кокультивирование стволовых клеток со стромальными, поддерживающими кроветворение, клетками и дифференцировка через стадию эмбрионидного тельца. Существующие протоколы являются многоступенчатыми, трудновоспроизводимыми и почти всегда содержат стадии, в которых используются неохарактеризованные компоненты животного происхождения (сыворотки, клеточные линии), в то же время был получен большой спектр специализированных клеток иммунной системы, в частности дендритные клетки, Т-клетки, эритроциты. Последние кажутся наиболее перспективными для клинических испытаний, так как они не несут генетического материала и таким образом минимизирован риск злокачественной трансформации.

Одним из наиболее изученных является процесс дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в нейроны и астроциты. Впервые такая дифференцировка была описана в 2001 г. С тех пор опубликовано несколько эффективных протоколов дифференцировки функциональных нейрональных клеток, в том числе определенной специализации, например дофаминергических. Производные эндодермы получить труднее всего. В недавно опубликованных сообщениях о дифференцировке ЭСК человека в инсулин-секретирующие клетки и гепатоциты было показано, что по белковым маркерам и набору транскрибирующихся генов они совпадают со зрелыми инсулин-секретирующими клетками или гепатоцитами. Однако факторы, определяющие дифференцировку в эндодерму, плохо охарактеризованы, и известно

мало маркеров ранней энтодермальной дифференцировки.

В заключение остановимся на последних наиболее ярких примерах использования технологии репрограммирования и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для разработки терапевтических подходов, связанных с инфекционными заболеваниями и онкоиммунологией. Одна из проблем – низкая иммуногенность опухолевых клеток или отсутствие распознавания патогена. Причем это может быть на уровне индивидуального ответа организма. Необходимо усилить этот ответ, сделать вакцину *ex vivo*. Для этого из периферической крови пациента можно выделить единичные Т-клетки, которые распознают необходимый антиген, или «обучить» их распознавать *ex vivo*. Что это значит на молекулярном уровне? То, что Т-клеточный рецептор, распознающий антиген, будет закодирован в геноме этой Т-клетки. Дифференцированные клетки имеют ограниченную возможность к пролиферации, а для их терапии нужно много. Можно репрограммировать их в иПСК, так как они могут пролиферировать неограниченно долго, годами, а геном сохраняется в том же виде, как и у исходной Т-клетки, с необходимой перестройкой Т-клеточного рецептора. Теперь дело за малым: дифференцировать пациент-специфические и антиген-направленные иПСК в цитотоксические или хелперные Т-клетки – и индивидуальная вакцина против определенного типа опухоли или патогена готова. Такие работы уже ведутся на экспериментальных животных (Vizcardo *et al.*, 2013).

ЛИТЕРАТУРА

- Amps K., Andrews P.W., Baker J. *et al.* Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. No. 12. P. 1132–1144.
- Encinas J., Michurina T.V., Peunova N. *et al.* Division-coupled astocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus // *Cell Stem. Cell.* 2011. V. 8. No. 5. P. 566–579.
- Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrate the intrinsic and environmental signals // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. Suppl. P. 245–254.
- Jaenisch R., Young R. Stem cells, the the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // *Cell.* 2008. V. 132. No. 4. P. 567–582.
- Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N. *et al.* Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. No. 5. P. 937–946.
- Philonenko E.S., Shutova M.V., Chestkov I.V. *et al.* Current progress and potential practical application of human pluripotent stem cells // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2011. V. 292. P. 153–196.
- Romalhos-Santos M., Willenbring H. On the origin of the term «stem cell» // *Cell Stem. Cell.* 2007. V. 1. P. 35–39.
- Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms and applications // *Genes Dev.* 2010. V. 24. No. 20. P. 2239–2263.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* 2006. V. 126. P. 663–676.
- Vizcardo R., Masuda K., Yamada D. *et al.* Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8⁺ T cells // *Cell Stem. Cell.* 2013. V. 12. P. 31–36.
- Waddington C.H. *Science and Ethics.* London: G. Allen and Unwin Ltd, 1942. 144 p.
- Yamanaka S., Blau H.M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches // *Nature.* 2010. V. 45. P. 704–712.