

**ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ОБРАТИМА: СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ
НАУЧИЛИСЬ ПРЕВРАЩАТЬ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ**

Л.С. Бочарова

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Пушино, Московская область (495) 632-78-69

В августе 2006 года в журнале Cell появилась статья К. Takahashi и S. Yamanaka из Института передовых медицинских технологий университета г. Киото (Япония), которая положила начало новой стадии в разработке технологий клеточной терапии (54). Было показано, что если соматические клетки трансфецировать набором определенных генов, то они полностью дедифференцируются и возвращаются в плюрипотентное состояние. Плюрипотентность – это отличительное свойство клеток ИСМ, которые еще не сделали ни одного шага по пути специализации. В эмбриогенезе клетки ИСМ являются прародителями всех тканей (67). Получаемые из ИСМ эмбриональные стволовые клетки (ESC) тоже плюрипотентны, но они созданы искусственно и существует только *in vitro* как перевиваемые клеточные линии. Теперь появился еще один источник плюрипотентных клеток – трансформированные *in vitro* специализированные соматические клетки.

То, что дифференцировка обратима, впервые было доказано в экспериментах с клонированием. Суть клонирования состоит в пересадке ядра соматической клетки в цитоплазму яйцеклетки, собственное ядро которой предварительно удаляют. Полученные путем такой микрохирургической манипуляции аналоги зиготы способны развиваться, хотя весь путь до рождения нормально проходят, в лучшем случае, несколько процентов прооперированных клеток (19,24,27). В дальнейшем выяснилось, что пересаживать ядро соматической клетки в чужую цитоплазму для репрограммирования не обязательно, достаточно слить дифференцированную и ES клетки. Под влиянием факторов, продуцируемых ES клеткой, в полученной тетраплоидной клеточной химере специализированные гены соматической клетки выключаются (11). Оказалось, что

вызвать дедифференцировку взрослых клеток можно и еще проще: достаточно подействовать на них экстрактами ES клеток или карцином (53,56). Очевидно, что в цитоплазме зрелых яйцеклеток, зигот, ES и опухолевых клеток присутствуют некие действующие вещества, вызывающие смену программы экспрессии генов в ядре дифференцированной клетки, но определить, какие именно факторы необходимы и достаточны для этого, пока не удавалось. И вот в лаборатории Yamanaka без пересадок ядер и других сложных манипуляций сумели превратить фибробласты в подобные эмбриональным стволовым плюрипотентные клетки, подняв уровень экспрессии всего 4-х генов (54). Трансформированные клетки получили название индуцированных плюрипотентных стволовых. Статья стала настоящей научной сенсацией. Всего через полгода iPS клетки были получены в нескольких лабораториях, а в июне 2007 года на V ежегодном съезде Международной Ассоциации Исследователей Стволовых Клеток в Австралии iPS клетки стали самой “горячей” темой для обсуждения. Число работающих в этой сфере исследователей стремительно растет. Особо привлекательной работу с iPS клетками делает её относительная методическая простота: для получения таких клеток используются общепринятые методы молекулярной биологии и культивирования, тогда как клонирование – это каждый раз штучная микрохирургическая операция на грани с искусством. Посвященные изучению iPS клеток многочисленные публикации в самых авторитетных журналах (Cell, Nature, Stem Cells, Science) уже позволили прояснить многие вопросы и привели к кардинальной смене приоритетов в бурно развивающейся области клеточной терапии. Эмоциональные комментаторы сравнивают произошедшие в этой сфере перемены с тектоническим сдвигом (23,70). И произошло это меньше чем за два года после первого сообщения о получении iPS клеток.

СВОЙСТВА iPS КЛЕТОК И ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ИХ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Суть способа получения iPS клеток состоит в трансфекции соматических клеток с помощью вирусных векторов дополнительными копиями «генов плюрипотентности». К настоящему времени уже установлены пути генетической и эпигенетической регуляции плюрипотентного состояния ES клеток *in vitro* и клеток внутренней клеточной массы бластоцист (ICM) *in vivo* (7,28,30,35,49,52,67). Заслуга S.Yamanaka и его сотрудников в том, что они первыми сумели определить тот минимальный набор генов, повышенная экспрессия которых достаточна для репрограммирования ядра соматической клетки. Оказалось, что и для выключения программы экспрессии генов, работавшей в специализированной клетке, и для активации того набора генов, который активен только у плюрипотентных клеток, достаточно добиться повышенной экспрессии всего 4-х генов- ***Oct4***, ***Sox2***, ***c-Myc***, ***Klf4*** (55). Правда, это гены регуляторов транскрипции, и под управлением каждого работают большие блоки, до сотен, структурных генов. Дальнейшие исследования показали, что в наборе индукторов плюрипотентности строго обязательными компонентами являются только два гена – ***Oct4*** и ***Sox2***, а еще два можно варьировать (26,31,54,72,73). Принципиально важно то, что репрограммирование ядра соматической клетки индуцирующие гены обеспечивает только в сочетании, а не какой-либо из них в отдельности.

В процессе превращения фибробластов в iPS клетки изменяются все их базисные характеристики: паттерн экспрессируемых генов, состояние хроматина, набор доминантных белков, поверхностные антигены, скорость пролиферации и способность к образованию колоний в культуре, морфология (таблица). По всем этим параметрам iPS клетки отличаются от фибробластов и фенотипически становятся подобны ES клеткам (9,31,55,73). Происходит это не сразу после трансфекции, а постепенно, в ходе последовательных делений, в среднем где-то к 15 – 20 дню. Морфологические различия родительских и iPS клеток настолько ярко выражены, что клетки, у которых трансфекция прошла успешно можно отобрать по внешним признакам. Как и ES, iPS - это мелкие, округлые, плоские клетки с высоким ядерно/плазменным отношением (с узкой

цитоплазмой) и четко выраженным ядрышком, образующие компактные колонии. При пересеве отобранных колоний iPS клетки активно размножаются, что позволяет получать из порции порядка 5×10^5 донорских клеток несколько перевиваемых линий плюрипотентных клеток общего с донором генетического происхождения (31,41,55,73). Все стволовые клетки могут существовать в двух состояниях: при делении они либо воспроизводят себя, либо, в результате так называемого асимметричного деления, одна из дочерних клеток вступает в процесс дифференцировки. iPS клетки активно пролиферируют, и их можно длительное время поддерживать *in vitro* в режиме самовоспроизведения (self-renewal). Это позволяет легко выращивать нужное количество клеток. При этом, как и в случае ES клеток, удержать iPS клетки от спонтанной дифференцировки можно только в определенных условиях, так как спонтанная дифференцировка в разнообразных направлениях это базисное свойство плюрипотентных клеток. Дифференцировку мышинных iPS, как и ES клеток, в культуре блокирует Lif (leukocyte inhibitory factor) (67). Подавление дифференцировки таких клеток - обязательное условие их размножения *in vitro*. В природе, в ходе нормального эмбриогенеза, клетки подобные ES существуют всего несколько дней (у мышей 1,5 суток, у людей до 3 суток), а далее они превращаются в клетки других типов. Выдерживающие 50 и более пассажей в режиме самовоспроизведения ES клетки и до 30 пассажей iPS клетки получены и поддерживаются в виде линий искусственно искусственно (30,67).

Плюрипотентность – способность стволовых клеток превращаться во взрослые клетки всех типов, которые присутствуют в тканях организма. Это естественное свойство клеток ИСМ бластоцисты и отличительная черта ES клеток. Для доказательства плюрипотентности применяется система последовательных тестов, которая была разработана для ESC. Первый из них – проверка возможности вызвать разнонаправленную дифференцировку клеток *in vitro*. Уже в первых работах было показано, что вызвать дифференцировку iPS клеток в кардиомиоциты (маркеры TnTc, MEF2C, MYL2A, MYHCB, NKX2.5) и нервные клетки (маркеры β -tubulin, AADC, LMX1B,

тирозингидролаза, холинацетилтрансфераза) можно с помощью тех же индукторов, что и из ESC (54,55,63). Уже получены из iPS клетки лимфоидного ряда (18).

Спонтанная дифференцировка ESC *in vitro* приводит к образованию эмбриоидных тел, трехмерных структур, в которых в случайном соотношении представлены ткани, производные всех трех зародышевых листков. Эмбриоидное тело похоже на зародыш, при формировании которого был утерян план развития (24,67). Этим ESC отличаются от любых других стволовых клеток. Те при дифференцировке *in vitro* также способны формировать трехмерные структуры из разных клеток, но коммитированных в каком-то одном определенном направлении развития. В культурах iPS клеток при их спонтанной дифференцировке образуются структуры аналогичные эмбриоидным телам. В них экспрессируются маркеры клеток эктодермального (β tubulin, GFAP), мезодермального (SMA, desmin,) и энтодермального (AFP) происхождения. Методом ПЦР выявлена экспрессия эктодермальных (*MAP2, PAX6*), энтодермальных (*box A2, cytokeratin 8, 18, SOX17*) и мезодермальных (*MSX1, BRACHYURY*) генов. (9,31,41,50,55,63,73).

Плюрипотентность ESC и iPS клеток проявляется не только в искусственной системе культивирования *in vitro*, но и *in vivo*. Трансплантированные животным ESC образуют тератомы, опухоли, состоящие из неупорядоченного скопления различных тканей (67). Подкожная пересадка iPS клеток также приводит к появлению тератом у мышей (6,9,17,31,41,50,,55,63,73). Но и в тератомах, и в эмбриоидных телах представлены лишь некоторые ткани, и, строго говоря, их образование не доказывает способности iPS клеток давать в потомстве все типы клеток организма, а говорит только том, что из них могут развиваться производные трех зародышевых листков.

Следующий уровень доказательства плюрипотентности клеток – это проверка их способности участвовать в нормальном эмбриогенезе. При подсадке плюрипотентных ESC в мышиный зародыш на стадии бластоцисты рождаются химерные животные, в тканях которых присутствуют потомки донорских клеток. Нагляднее всего химеризм проявляется по пестрой окраске, когда линии мышей-доноров клеток и мышей-источников зародышей подбирают таким образом, что цвет шерсти у них не совпадает. И

в этом отношении iPS и ES клетки ведут себя одинаково: у химерных мышей производные пересаженных клеток участвуют в формировании практически всех тканей (5,17,55,7,71). Важно, что у химерных животных iPS клетки превращаются не только в разнообразные соматические клетки, но и участвуют в формировании половых закладок. Химерные мыши с iPS клетками, (и самцы, и самки) нормально развиваются и дают потомство, в котором происходит расщепление на исходные линии (32.39,55).

Таблица

Основные характеристики ES, iPS и соматических дифференцированных клеток

СВОЙСТВА	ES клетки	iPS клетки	соматические клетки
способность дифференцироваться	плюрипотентны	плюрипотентны	отсутствует
формирование эмбриодных тел in vitro	+	+	-
образование тератом in vivo	+	+	-
пролиферация in vitro без изменения свойств	десятки пассажей	десятки пассажей	ограниченная
активность теломеразы	+	+	-
скорость пролиферации	высокая	высокая	низкая
формирование in vitro колоний	+	+	-
образование химер при введении в бластоцисту	+	+	-
способность поддерживать эмбриогенез при полной замене клеток ICM	+	+	-
активность генов-маркеров плюрипотентности OCT4, SOX2, Nanog	+	+	-

экспрессия тканеспецифичных генов	-	-	+
уровень метилирования CpG последовательностей ДНК промоторов генов плюрипотентности	низкий	низкий	высокий
экспрессия поверхностных антигенов ES клеток	+	+	-
активность щелочной фосфатазы	+	+	-
типичная для ES клеток морфология	+	+	-

Наконец, золотым стандартом в системе доказательств плюрипотентности клеток считается возможность рождения животных, полностью образованных из таких клеток. Для мышей разработана методика получения тетраплоидных (4n) эмбрионов, у которых нормально формируется трофобласт, оболочка бластоцисты, а клетки ICM погибают. Когда на их место подсаживают ESC, развиваются животные с генотипом донорских клеток (67). Такая проверка проведена для полученных из фибробластов, и не только, iPS клеток. Помещенные внутрь тетраплоидного трофобласта iPS клетки обеспечивают нормальное развитие эмбрионов мышей до стадий близких к рождению (4,41,55,63,73).

Таким образом, уже можно считать доказанным, что iPS клетки мышей по своим базовым характеристикам аналогичны плюрипотентным ESC. Это не означает, что их свойства совпадают полностью, детальный сравнительный анализ еще впереди. Важно другое - найден еще один способ получения линий стволовых клеток с неограниченным потенциалом пролиферации и дифференцировки, несущих генотип донора соматических клеток, и этот способ не обременен сложностями этического характера, связанными с использованием эмбрионов и клонированием.

iPS КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Работы по дедифференцировке соматических клеток и превращению их в iPS начинались на мышах. В немалой степени это было определено тем, мышинные плюрипотентные

ESC на данный момент изучены лучше, чем человеческие, которые были получены только в 1998 году (58,67). Но, как и многие другие исследования стволовых клеток, в конечном счете, эти работы ориентированы на получение клеточного продукта пригодного для клинического применения. А вот можно ли добиться репрограммирования соматических клеток человека теми же способами, которые оказались столь успешными для мышей, было неясно. Дело в том, что ESC человека по ряду параметров отличаются от мышиных. В частности у них не полностью совпадают генетические пути поддержания плюрипотентного состояния (10,44,67). Еще летом 2007 года обсуждалась сама возможность получения iPS клеток человека (5,12, 45,66), а уже в ноябре, в один и тот же день, были опубликованы две работы, в которых эта задача была решена. Успеха в создании iPS клеток человека добились команда японских исследователей из Университета г. Киото под руководством S. Yamanaka, родоначальника этого направления (55) и лаборатория J. Thomson из университета штата Висконсин, США (73). Это тот самый J. Thomson, первым в 1998 году вырастивший ESC человека (58). За прошедшие после первых сообщений полгода iPS клетки человека были получены еще в ряде лабораторий (31,41).

Для превращения фибробластов человека в iPS клетки был применен тот же метод, что и в случае мышиных. Более того, Yamanaka с сотрудниками, успешно, чего совсем не ожидали, использовали для трансдукции тот же набор генов – *Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4* (26). Успех японских исследователей повторили группы Daley и Lowry в США, применившие этот же набор индукторов (31,41). В работе Thomson iPS клетки из фибробластов человека были получены с помощью несколько отличной композиции генов – *Oct4, Sox2, Nanog u Lin28* (73), но эффективность репрограммирования во всех случаях была сопоставима. Чем iPS клетки человека отличаются от мышиных, так это тем, что процесс трансформации занимает у них больше времени, порядка 30 дней. Поскольку скорость пролиферации ESC человека ниже, чем мышиных (67), это не стало неожиданностью.

Соответствие iPS клеток человека критериям плюрипотентности было подтверждено во всех работах (31,41,55,73). Так же, как iPS клетки мышей, человеческие трансформированные фибробласты меняют форму и размеры, образуют при культивировании колонии, из которых формируются пересеваемые линии. Меняется эпигенетический статус iPS клеток: паттерн экспрессируемых генов, состояние хроматина, в том числе уровень метилирования, набор поверхностных антигенов, активируется теломераза. Показана возможность направленной дифференцировки iPS

клеток человека в культуре ткани в сокращающиеся кардиоциты и нервные клетки под влиянием тех же факторов, которые индуцируют их образование из ES клеток. Более широкий набор тканей, являющихся производными всех трех зародышевых листков, формируется в эмбрионных телах при спонтанной дифференцировке iPS клеток *in vitro* и в тератомах, образующихся в случае трансплантации iPS клеток иммунодефицитным мышам. Не сделано, и по понятным причинам не будет сделано никогда, проверки iPS, и ESC человека тоже, на способность формировать химеры. Это значит, что на данный момент способов получить исчерпывающие доказательства возможности формирования ими всех, в том числе и половых клеток нет. Поэтому при получении iPS клеток человека особое значение имеет сравнение их характеристик с ESC и ICM клетками бластоцист. Так, доказано, что по ключевым маркерам иммунофенотип iPS и ES клеток человека совпадает, индуцированные клетки тоже экспрессируют поверхностные антигены SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 и Tra-1-81 (41,55). Теперь, когда появилась возможность проведения анализа экспрессии сотен и тысяч генов одновременно, показано, что степень сходства паттерна работающих генов двух типов плюрипотентных клеток весьма велика, хотя полного совпадения нет (31,32, 41,63,73).

КАКИЕ КЛЕТКИ МОЖНО ВЕРНУТЬ В ПЛЮРИПОТЕНТНОЕ СОСТОЯНИЕ

Фибробласты были первыми клетками, которые путем трансдукции генов удалось вернуть из дифференцированного состояния в плюрипотентное. Выбор пал на эти клетки потому, что именно фибробласты наиболее широко использовали в качестве доноров ядер в экспериментах с клонированием (26), и сама возможность их репрограммирования сомнений не вызывала. В то же время опыт получения iPS клеток показал - трансфекция заканчивается репрограммированием только в очень небольшом числе случаев, в среднем в соотношении модифицированных и исходных клеток от 1:1000 до 1: 10000 (31,34,55,63). Технических сложностей это не создает, поскольку исходные клетки высевают, как минимум, сотнями тысяч; в культурах образуются десятки, а то и сотни колоний iPS клеток, которые разительно отличаются от фибробластов; из отобранных

колоний можно получить несколько устойчивых линий iPS клеток (31,41,55,63,73). Но вопрос: - действительно ли прародителями iPS клеток являются именно полностью дифференцированные клетки, или они происходят от встречающихся в популяции редких стволовых или прогениторных клеток, - встал с самого начала (12,54,63,71).

Фетальные ткани содержат больше стволовых и прогениторных клеток, чем соответствующие зрелые ткани, а в своей первой работе Yamanaka с сотрудниками как раз использовали первичную культуру фетальных фибробластов мыши (54). Позднее, работая с человеческим материалом, авторы расширили набор трансфецируемых клеток, включив в него неонатальные фибробласты крайней плоти, а также дермальные фибробласты и веретеновидные синовиоциты из суставной жидкости взрослых доноров. И во всех случаях сумели получить линии iPS клеток, хотя эффективность процедуры варьировала (55). Правда, при этом не только меняли тип исходных клеток, но и все время усовершенствовали процедуру получения iPS клеток. Результат команды Yamanaka много раз воспроизведен, уже созданы линии iPS клеток не только мышей, но и человека на основе и первичных культур фибробластов, и доступных в клеточных банках культур (фетальных, неонатальных и взрослых фибробластов кожи и легочного эпителия), а также из ES клеток человека, дифференцированных в фибробласты (31,39, 41,55,73). Таким образом, метод индуцированной избыточной экспрессии “генов плюрипотентности” позволяет преобразовывать в iPS клетки не только фетальные, но и зрелые фибробласты. Значит, можно получать и выращивать iPS клетки с генотипом конкретных взрослых доноров. Собственно, это уже сделано, причем не только командой, руководимой Yamanaka (31,41,55) .

С самого начала ставился также вопрос о том, можно ли превращать в iPS клетки разных типов, или это уникальное свойство фибробластов? Ответ на него дан в этом году. Yamanaka и его сотрудники получили и детально охарактеризовали iPS клетки, происходящие из печени и выстилки желудка мышей (4), а в Массачусеттском технологическом Институте под руководством R. Jaenisch смогли превратить в iPS клетки как фетальные, так и полностью дифференцированные мышинные В лимфоциты (17). И в

том, и в другом случае полученные iPS клетки отвечали всем критериям плюрипотентности (таблица), включая рождение химер и развитие эмбрионов из этих клеток. Эти работы доказывают, что метод индукции плюрипотентности через повышение экспрессии определенных факторов регуляции транскрипции достаточно универсален и работает не только с фибробластами, а с клетками различных фенотипов.

По данным Aoі и соавторов в процессе трансформации активность щелочной фосфатазы, маркера плюрипотентности, появляется в клетках, продуцирующих альбумин. Они получили iPS клетки и в очищенной фракции гепатоцитов, где стволовые/прогениторные элементы вообще отсутствовали (4). Аналогичный тест был проведен и при создании iPS клеток из лимфоцитов. В ходе репрограммирования была выявлена реорганизация геномного локуса иммуноглобулинов, что доказывает принадлежность предшественников iPS клеток именно к зрелым В лимфоцитам (17). Эти результаты однозначно говорят о способности возвращаться к исходной точке дифференцировки под влиянием повышенной экспрессии “генов плюрипотентности” не только фетальных, но и терминально дифференцированных соматических клеток.

Но оказалось, что есть и определенные отличия в том, как происходит репрограммирование клеток разного происхождения. Сравнивая iPS клетки, полученные из зрелых фибробластов, печени и эпителия выстилки желудка с использованием одних и тех же векторов и способов селекции, Aoі и соавторы установили, что фибробластные iPS клетки в меньшей степени совпадают с ESC по набору и интенсивности экспрессии генов, чем печеночные и эпителиальные. У последних выше уровень экспрессии маркерных для ESC генов. Так, гены E-кадгерина и β -катенина, белков участвующих в контактных межклеточных взаимодействиях, работают одинаково активно в ESC, печеночных и эпителиальных клетках, но не в происходящих из фибробластов iPS клетках (4). Фенотипически это соответствует приближению таких iPS клеток к характерному для ESC клеток эпителиальному типу (67). Более того, активность экспрессии ключевых эндогенных генов-регуляторов плюрипотентности *Oct4*, *Sox2* и *Fbx15* у печеночных и эпителиальных iPS и ES клеток сопоставима, а уровень метилирования хроматина их

промоторов гораздо ниже у печеночных и эпителиальных iPS клеток, чем у производных фибробластов, и ближе к свойственному ESC (4). А уже не вызывает сомнений, что деметилирование хроматина – один из ключевых процессов при репрограммировании соматических клеток (21,30,31,36,50,63,71). Авторы отмечают также более высокую частоту образования химер при подсадке в бластоцисты печеночных и эпителиальных iPS клеток, причем у таких химер они не наблюдали образования опухолей, часто встречающихся у химерных мышей с участием фибробластных iPS клеток (4,39,55).

Повышенная экспрессия предложенного Yamanaka набора трансфецированных генов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* оказалась достаточным условием для превращения в iPS клетки всех уже опробованных фетальных предшественников (разнообразных фибробластов, гепатоцитов, эпителиальных клеток выстилки желудка, лимфоцитов). Не так однозначно складывается ситуация, когда речь идет о трансформации соответствующих им терминально дифференцированных клеток. По данным Hanna и соавторов для индукции дедифференцировки зрелых В-лимфоцитов, только успешной трансфекции этих генов мало, но трансформации их в iPS клетки можно добиться дополнительными воздействиями (17). Взяв в качестве прародителей CD19+ клетки селезенки и лимфатических узлов взрослых мышей, они в сочетании трансфекцию “генов плюрипотентности” либо с подавлением активности ключевого для В лимфоцитов транскрипционного фактора Pax5, либо со стимуляцией экспрессии C/EBP α (белок, связывающийся с геном миелоидного транскрипционного фактора), который в норме играет ведущую роль в специализации лимфоцитов в гранулоциты. И в том, и в другом случае получены полноценные iPS клетки и их перевиваемые линии, причем эффективность трансформации В лимфоцитов, по оценке авторов, была гораздо выше, чем в случае использования фибробластов, соответственно 1:30 против 1:1000 (17,55,63).

Необходимость в дополнительных стимулах для успешной трансформации взрослых соматических клеток в плюрипотентные может определяться и особенностями протокола эксперимента, т.е. не только типом, а и состоянием клеток. В этом отношении показателен разброс результатов по превращению в iPS клетки зрелых человеческих

фибробластов. Takahashi и соавторы добились успеха, работая с первичными культурами взрослых фибробластов и применив трансфекцию генов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*, эффективность которой для аналогичных мышечных клеток уже была ими продемонстрирована (54,55). Группе исследователей под руководством G. Daley, имевшей дело с культурами из клеточных банков, пришлось усложнить схему. В их условиях скорость пролиферации зрелых фибробластов была ниже, старели эти культуры быстрее, чем фетальные, а их трансфекция теми же векторами не приводила к образованию колоний сходных с ES клеток, что является признаком дедифференцировки. Авторы смогли получить линии iPS клеток из фибробластов взрослых людей, когда кроме четырех индукторов плюрипотентности дополнительно ввели в клетки гены каталитической единицы теломеразы и блокаторов апоптоза. Они считают, что дополнительная, по сравнению со стандартной схемой, трансфекция способствовала прежде всего повышению жизнеспособности исходных клеток (41). Thomson с сотрудниками также использовали поддерживаемые культуры взрослых фибробластов человека, но их набор четырех трансфицируемых генов только наполовину совпадает с предложенным Yamanaka, использованным также в работе Park и соавторов (73). Им для получения iPS клеток из взрослых фибробластов ни к каким дополнительным воздействиям прибегать не пришлось. Более того, эффективность превращения фетальных и полностью дифференцированных фибробластов в iPS клетки у них различалась всего в два раза, что во много раз меньше, чем в экспериментах Yamanaka (39,55). Thomson с сотрудниками показали также, что iPS производные фетальных и зрелых клеток одного типа по свойствам могут отличаться. Если у iPS клеток из фетальных фибробластов человека спонтанная дифференцировка в тератомах всех клонов протекает однотипно, то тератомы, образованные iPS клонами зрелых фибробластов примерно в 50% случаев не содержат нервных клеток, создавая впечатление ограниченности их потенциала дифференцировки (73). Такая многовариантность реакции однотипных клеток с несомненностью говорит о том, что процесс трансформации дифференцированных клеток в iPS в результате искусственно индуцированной избыточной активности “генов

плюрипотентности” — это не разовое переключение программ экспрессии, а процесс. За неполные два года, прошедшие с момента открытия возможности возврата соматических клеток к исходной точке дифференцировки уже удалось немало понять в механизмах индукции iPS клеток (обзоры 26,29,30,71).

МЕХАНИЗМ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

После того как удалось клонировать млекопитающих, стало ясно, что состояние генома соматических клеток, складывающееся в процессе дифференцировки, не закрепляется необратимо. Пересаженное в цитоплазму неоплодотворенной яйцеклетки ядро дифференцированной клетки меняется таким образом, что становится способным, как ядро зиготы, обеспечить полное эмбриональное развитие. Репрограммирование ядра при клонировании происходит под влиянием каких-то, так до конца и не идентифицированных факторов. Но оказывается, не только цитоплазма яйцеклетки обладает способностью менять эпигенетическое состояние ядер терминально дифференцированных клеток. Слияние ES и соматической клетки с образованием тетраплоидной клеточной химеры приводит к выключению генов, определяющих специализацию дифференцированной клетки, и к переключению ее ядра на программу плюрипотентной клетки (11,53). Более того, репрограммирования генома соматических клеток можно добиться, действуя на них экстрактами ES клеток или карцином (56). Японская команда S. Yamanaka изменила подход к изучению проблемы механизмов дифференцировки и ее обратимости. От попыток выявить конкретные эффекторы, влияющие на выбор эпигенетической программы, они перешли к использованию воздействий, определяющих этот выбор. Программная статья Yamanaka была опубликована в первом номере нового журнала Cell Stem Cells в июле 2007 года (60). Основой их подхода стали достижения в изучении молекулярных механизмов плюрипотентности ES клеток (обзоры 26,28,49,52,67). Установлено, что сохранение

ESC в режиме самовоспроизведения, т.е. в недифференцированном состоянии, поддерживается набором факторов, регулирующих транскрипцию (*Oct4*, *Sox2*, *NANOG*, *Stat 3* и др.). Действие факторов жестко скоординировано и обеспечивает функционирование сложной сети сигнальных каскадов (25,28,30,49,52). По отдельности эти регуляторы транскрипции работают в различных тканях, как в эмбриогенезе, так и во взрослом организме, но совместно, оркестром – только в ранних эмбрионах до имплантации в матку и недифференцированных ES клетках. Основная идея Yamanaka – поднять уровень активности этих факторов в соматической клетке за счет трансфекции экзогенных матриц.

Выбор был сделан из 24 претендентов, причастность которых к регуляции транскрипции в плюрипотентных клетках установлена (10,28,30,71). В окончательный набор 4-х генов, трансфекция которых меняет фенотип клеток, вошли гены *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*. Индуцировать дедифференцировку соматических клеток они способны только в сочетании (54). Но оказалось, что это не единственная эффективная комбинация векторов. Thomson и его сотрудники из 18 генов отобрали сочетание *Oct4*, *Sox2*, *NANOG*, *Lin28*, которое оказалось не менее эффективным (73). Далее было показано, что строго обязательным для индукции плюрипотентности является введение дополнительных копий генов *Oct* и *Sox2*, а увеличение продукции *c-Myc*, *Klf4*, *NANOG* и *Lin28* за счет экзогенных матриц повышает ее эффективность (38,41,63). Отобранные комбинации трансфецируемых генов оказались успешными индукторами плюрипотентности соматических клеток и мышей, и человека. Очевидно, *Oct4* и *Sox2* – это те регуляторы транскрипции, которые не только блокируют дифференцировку ESC, но и могут обеспечить отмену, выключение той программы дифференцировки, которая уже была реализована в соматической клетке. Значит ли это, что выбор плюрипотентность или дифференцировка определяется просто уровнем экспрессии генов *Oct4* и *Sox2* и, соответственно, активностью контролируемых ими сигнальных систем? Детальный анализ кинетики превращения соматических клеток в iPS показал, что процесс намного сложнее (9,50).

Прежде всего, превращение дифференцированных клеток в плюрипотентные – это не одномоментное событие, а процесс, всегда развивающийся в нескольких последовательных поколениях клеток. Это принципиальное отличие индукции iPS клеток от трансплантации ядер в ооциты при клонировании, когда репрограммирование заканчивается еще до первого деления реконструированной зиготы. Время появления колоний клеток подобных ES от двух до четырех недель после трансдукции иницирующих генов, и для взрослых клеток оно больше, чем для фетальных. Следующей по важности факт, выявленный при анализе механизма индукции плюрипотентности, состоит в том, что экзогенные гены, введенные с помощью вирусных векторов, активно экспрессируются несколько дней, когда происходит отключение программ специализированных клеток. В дальнейшем активность “чужих” генов постепенно затухает (9,41,50,55). Одновременно, в ходе последовательных клеточных делений градуально меняется активность собственного генома трансформирующихся клеток. Эти изменения завершаются формированием нового устойчивого эпигенетического состояния, когда они делаются подобными ESC (рис.1). У iPS клеток регуляторы плюрипотентности Oct4, Sox2, NANOG, Stat 3 синтезируются уже на собственных матрицах и с такой же интенсивностью, что и ES клетками (9,17,31,41,50,63).

Признаки плюрипотентности появляются постепенно, один за другим, и какое-то время существуют промежуточные формы, в которых сочетаются признаки исходных специализированных и недифференцированных клеток (обзоры 23,28,63). Например, такой маркер ES клеток, как активность щелочной фосфатазы появляется в еще синтезирующих альбумин печеночных клетках (4), а в фибробластах начиная с третьего дня (63). Экспрессия поверхностного антигена SSEA 1, специфичного для ранних эмбриональных и ES клеток, начинается позже. А вот NANOG позитивные клетки, т.е. признаки реактивации эндогенных транскрипционных регуляторов плюрипотентности, удается выявить уже после того, как морфология клеток меняется, и они становятся похожими на ES клетки. Наконец, на завершающих стадиях трансформации

дифференцированных клеток в плюрипотентные начинает работать теломераза и восстанавливается активность молчащей X хромосомы (4,9,17,31,32,39,41,50,63,73).

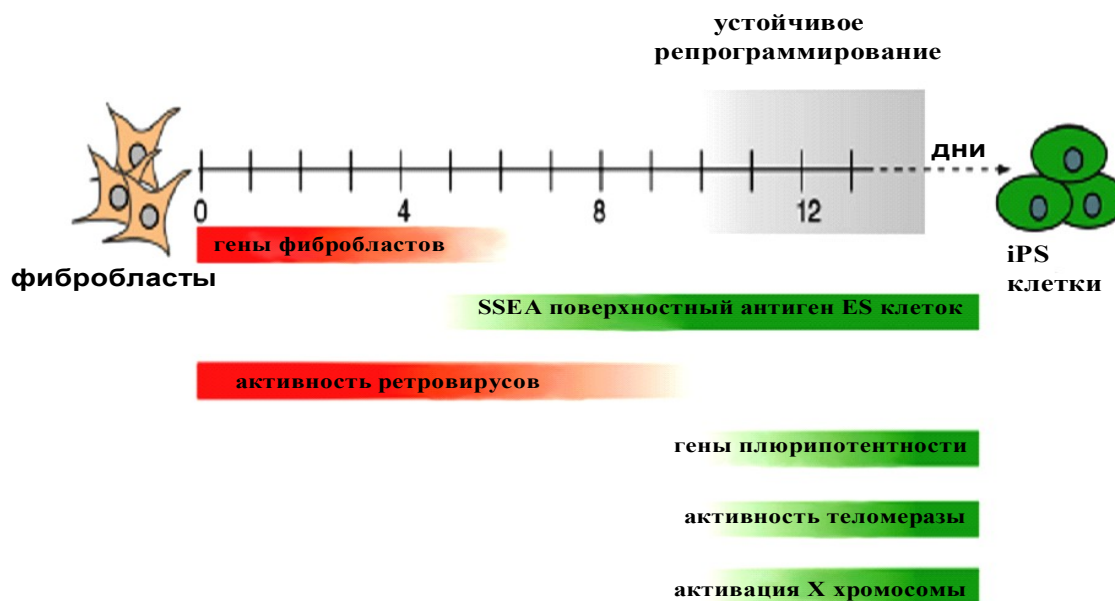


Рис. 1 Кинетика экспрессии маркеров и ключевых активностей в процессе репрограммирования фетальных фибробластов в iPS клетки. По данным Stadtfeld et al. 2008, Brambrink et al. 2008 (9,50)

Несомненно, дальнейшее изучение промежуточных состояний между соматическими и iPS клетками многое даст для понимания механизмов дифференцировки.

На эффективность трансформации влияет продолжительность активности дополнительных копий “генов плюрипотентности”: большее количество колоний iPS клеток образуется в том случае, если векторы активны дольше минимально необходимых 12-14 дней (39,63). Но есть и такое последствие гиперэкспрессии вирусных векторов, как нарушение способности iPS клеток к дифференцировке. Thomson первым обратил внимание на то, что отсутствие в образованных iPS клетками тератомах нейронального компонента коррелирует с повышенной активностью трансфицированных генов *NANOG*

и *Oct4* (73). Поскольку именно находящиеся под контролем этих факторов гены обеспечивают воспроизведение состояния плюрипотентности, их гиперэкспрессия закономерно противодействует дифференцировке. Неожиданно другое – это противодействие по-разному проявляется в отношении клеток, которые дифференцируются в разных направлениях. Позднее Brambrink с соавторами прямо показали необходимость для последующей нормальной дифференцировки iPS клеток выключения на завершающих этапах трансформации введенных генов регуляторов транскрипции (9). Именно в неполном репрограммировании и сохранении повышенной активности таких генов причина того, что в своей первой работе Yamanaka и Takahashi не удалось получить жизнеспособных химер (54). Подавление активности ретровирусных векторов “генов плюрипотентности” связывают с метилированием их ДНК, а активация метилтрансфераз происходит только на завершающей стадии репрограммирования клеток (50,46,63). Таким образом, гиперэкспрессия регуляторов транскрипции с экзогенных матриц, которая поддерживается в нескольких поколениях трансформирующихся клеток, является критическим условием появления iPS клеток, но если вовремя не происходит их отключение, то у таких клеток способность к дифференцировке падает.

По ходу преобразования соматических клеток состояние их собственного генома серьезно изменяется. Никаких мутаций при этом не наблюдается, iPS клеток сохраняют нормальный кариотип, а все изменения хроматина относятся к категории эпигенетических (31,39,41,55,63). Значит, оснований рассматривать превращение дифференцированных клеток в плюрипотентные, как патологический процесс, нет. Из эпигенетических изменений хроматина в процессе такой трансформации наиболее выражены и, соответственно, лучше изучены изменения метилирования ДНК. В абсолютном большинстве клеток 70-80% CpG нуклеотидных пар в геноме метилировано; исключения составляют ранние эмбрионы, у которых хроматин к моменту имплантации почти полностью деметилирован, и получаемые из ICM ES клетки (обзоры 7,35,40,49,52). Трансформация фибробластов и других соматических клеток в iPS на первом этапе требует выключения программ специфической экспрессии генов и систем

внутриклеточной сигнализации, которые были сформированы в процессе их дифференцировки. Действительно, показано, что индукция плюрипотентности связана с изменением гиперметилированного состояния ДНК, свойственного соматическим клеткам, на гипометилированное, отличающее ES клетки (7,9,14,31,47,49). В процессе трансформации соматических клеток также выявлены изменения метилирования гистона H3 (7). Возврат клеток в недифференцированное состояние сопровождается инактивацией метилтрансфераз ДНК, но iPS, как и ESC, отличаются от соматических устойчивостью к гипометилированию (7,9,14,63). Важнейшим событием процесса дедифференцировки клеток является деметилирование CpG островков в промотерах их собственных “генов плюрипотентности” **Oct4**, **Sox2**, **Nanog**, что приводит к их активации. В исходных клетках эти гены блокированы, а в iPS активно экспрессируются, на том же уровне, что ES клетками (4,9,17,31,32,41,50,54,55,63,73). Каждый из этих регуляторов транскрипции контролирует промотеры до 1000 генов, а около 350 генов взаимодействуют со всеми тремя факторами. Эти гены обеспечивают не только функции “домашнего хозяйства”, но и самовоспроизведение плюрипотентных клеток. Когда же начинается спонтанная или индуцированная дифференцировка iPS клеток, их эпигенетический статус вновь меняется: создается новое соотношение активных и заблокированных генов, возрастает уровень метилирования хроматина (7,10,26,50,52).

Индукция плюрипотентности включает в себя не только смену паттерна работающих генов, но и такое глобальное событие, как изменение состояния X хромосомы в целом. В медицинской школе Гарвардского Университета Н. Hochedlinger и его коллеги получили из фибробластов самок мышей женские iPS клетки, которые в химерах способны развиваться в нормальные яйцеклетки. У фибробластов, как у всех соматических клеток одна из X хромосом выключена. Индукция дедифференцировки сопровождается реактивацией этой молчащей хромосомы, а потом, точно также как в эмбриогенезе, одна из двух работающих X хромосом блокируется (9,32). Эти результаты в очередной раз продемонстрировали, что найденная схема индукции плюрипотентности действительно возвращает клетки в состояние самых начальных стадий

дифференцировки, и в процессе дифференцировки iPS клетки повторяют процессы, свойственные клеткам ICM бластоцисты. В значительной степени эпигенетический статус iPS клеток определяется характером метилирования повторяющихся CpG последовательностей в промотерах: у ключевых для регуляции плюрипотентности генов они деметилированы, а у генов, обеспечивающих специализированные функции - наоборот (4,17,31,41,55,63,71,73). В целом, iPS, как и ES клеткам, свойственна также более высокая степень деконденсации хроматина, его динамичность, определяемая лабильными связями со структурными белками ядра (7,10,14,32,35,40,49,52).

С точки зрения поиска возможностей влияния на эпигенетическое состояние хроматина чрезвычайно интересна работа Ruau и соавторов, вышедшая в 2008 году. В ней показано, что можно индуцировать “гены плюрипотентности”, не прибегая к вирусной трансфекции (46). Подействовав модифицирующими хроматин соединениями на культуру мышинных нейросфер, немецкие авторы получили активацию молчащих генов *Oct 4*, *Nanog* и *Klf4*. А так как гены *Sox 2* и *c-Myc* экспрессируются в нейросферах конститутивно, то в результате модификации продуцируется весь набор факторов, обеспечивающих превращение соматических клеток в iPS. При этом в нейросферах снижается экспрессия маркеров нейральных стволовых и прогениторных клеток нестина и β -тубулина, но начинают активно синтезироваться маркеры гемопоэтических стволовых клеток CD34 и CD133. Пересаженные модифицированные нейральные клетки, в небольшом количестве, интегрируются в костный мозг и проявляют гемопоэтическую активность (48). Для мягкой модификации хроматина, не приводившей к потере клетками жизнеспособности, были использованы trichostatin A и 5-Aza--2'-deoxycytidine, влияющие на ацетилирование гистонов и метилирование ДНК соответственно. Индуцированное ацетилирование гистонов H4 и деметилирование CpG пар ДНК промотеров приводило к изменению активности примерно 20% всех генов. В отличие от трансфекции генов в этом случае модификация экспрессии происходит быстро, в течение нескольких часов (46). Конечно, полная и устойчивая дедифференцировка соматических клеток способом химической модификации хроматина пока не достигнута, что доказывает, в частности

отсутствие тератом при трансплантации модифицированных клеток (46), но эпигенетические изменения, меняющие их специализацию, налицо.

Уровень метилирования ДНК и ацетилирования гистонов имеет важнейшее значение для сохранения дифференцированного состояния не только взрослых соматических клеток, но клеток, только начавших дифференцироваться, на начальных этапах эмбрионального развития. Показано, что тот же 5-азациитидин, стимулируя деметилирование ДНК, обращает вспять дифференцировку разнообразных клеток эмбрионидных тел. Под его воздействием возобновляется экспрессия маркеров ES клеток SSEA-1 и щелочной фосфатазы, вновь активируются гены *Oct4*, *Nanog* и *Sox2*, форма клеток снова делается типичной для ESC, возвращается зависимость от LIF (57). Более того, химическая индукция деметилирования ДНК в клетках трофобласта, а это первые дифференцированные клетки, появляющиеся в эмбриогенезе, возвращает их в плюрипотентное состояние (19). Таким образом, процесс дедифференцировки, выключения генов, обеспечивающих специализированные функции, реализуется через эпигенетические изменения состояния хроматина независимо от того, на начальной или конечной стадии дифференцировки клетки находятся.

Немногочисленные пока публикации по индукции признаков плюрипотентности через изменения состояния хроматина без трансфекции дополнительных генов заставляют по-новому посмотреть на проблему трансдифференцировки стволовых клеток, ставшую предметом ожесточенных, но не слишком плодотворных дискуссий. Суть явления трансдифференцировки состоит в появлении в популяции культивируемых или трансплантированных стволовых клеток элементов отличной от основной массы клеток специализации: гемопоэтических среди мышечных или нервных, мышечных среди гемопоэтических, нервных среди мезенхимальных и т.п. Существует два объяснения этого феномена. Согласно первому, в его основе лежит слияние клеток разных типов, когда образованные тетраплоидные клеточные химеры несут маркеры обеих исходных клеток. Клеточные химеры действительно иногда возникают, но крайне редко (20,61). Сторонники другой точки зрения предполагают возможность истинной

трансдифференцировки, смены программы специализации клеток, и связывают ее с эпигенетической модификацией генома, но доказательств этого долго не было (20,37,43,44,61). Приведенные выше работы показывают, как изменение уровня метилирования промоторов ключевых генов приводит к смене программ дифференцировки (19,46,44,47,48,61). Нет сомнений, что подобные процессы могут происходить и естественным путем, а не только под влиянием внешних индукторов.

Подводя итог обсуждению механизмов индукции плюрипотентности, хотелось бы отметить, что исследование их только началось. Требующих ответа вопросов гораздо больше тех, на которые ответы уже найдены, но вызывает восхищение, как много сделано за такой короткий срок.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ПРОТИВ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ: ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА КЛЕТОК ДЛЯ РЕПАРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Успехи клеточной терапии в экспериментах на животных породили нетерпеливые ожидания скорого появления этих методов в клинике, где они дали бы возможность справиться с плохо поддающимися лечению заболеваниями. Но введение методов клеточной терапии в клинику тормозится, прежде всего, из-за отсутствия надежных способов получения клеток для трансплантации. Поэтому создание в 1998 году линий ES клеток человека (58) было признано одним из крупнейших достижений биологии конца XX века. Такие клетки потенциально обладают способностью к неограниченной пролиферации и могут дифференцироваться в любые клетки взрослого организма. Теоретически возможно вырастить из ESC все нужные для пересадок клетки в необходимом количестве. До недавнего времени именно ES клетки рассматривали в качестве бесспорного фаворита при выборе источника клеточных трансплантатов (1,21,67). На изучение ES клеток приходится львиная доля как материальных ресурсов, так и усилий специалистов, затрачиваемых в сфере разработки клеточных технологий для

регенеративной медицины. С появлением метода индукции плюрипотентности возникла реальная альтернатива ESC в виде iPS клеток, и развернулось активное обсуждение преимуществ и недостатков тех и других в качестве потенциального источника получения клеточного материала для клинического применения (6,12,15,23,45,66).

Технологии создания iPS клеток имеет неоспоримое преимущество перед получением ES клеток в том, что она не связана с использованием эмбрионов и эмбриональных тканей, и не существует никаких серьезных этических барьеров для ее применения. Доказано, что iPS клетки действительно являются плюрипотентными и по потенциам развития равноценны существующим в эмбриогенезе всего несколько дней клеткам ICM бластоцисты и ES клеткам, также созданным *in vitro* искусственно (26,67,71). Эффективность получения линий плюрипотентных клеток из клеток соматических существенно, на порядок – два, выше, чем линий ES клеток из эмбрионов. Методы получения iPS клеток проще и дешевле. Пролиферативная способность iPS и ES клеток примерно одинакова, требования к условиям культивирования те же. Дифференцировка iPS клеток человека достигается теми же воздействиями, что и ES клеток.

Использование культур плюрипотентных клеток создает захватывающую перспективу коррекции тяжелых хронических и даже врожденных заболеваний. В эксперименте показано, что с помощью трансплантации специализированных клеток, полученных при направленной дифференцировке ES клеток, можно добиться устойчивого улучшения состояния животных, у которых смоделированы такие заболевания человека, как диабет 1 типа, миастения, паркинсонизм, болезнь Альцгеймера и др. Несколько крупных биотехнологических фирм вышли на стадию клинических испытаний клеточных препаратов на основе ES клеток. Например, фирмой GERON создана методика дифференцировки дофаминэргических нейронов из ES клеток человека, и проверка эффективности лечения больных паркинсонизмом такими клетками уже вышла на третью стадию клинических испытаний. Хотя iPS клетки стали доступны совсем недавно, с их применением уже получены первые положительные результаты. Так, группа исследователей под руководством R. Jaenisch осуществила проверку возможности

коррекции нейропатологии с использованием iPS клеток. Стимулировав дифференцировку, они получили из iPS клеток нейроны, которые были трансплантированы в мозг мышам, где они мигрировали в разные структуры и там встраивались. Было показано, что пересаженные нейроны функционально активны (65). После этого из iPS клеток уже прицельно вырастили дофаминэргические нейроны, с избирательной гибелью которых связывают развитие болезни Паркинсона. Пересадка этих нервных клеток в мозг взрослых крыс с моделью паркинсонизма приводила к снижению проявлений симптомов заболевания (65).

Уже есть пример успешной коррекции с помощью iPS клеток врожденной генетической аномалии. Есть модель серповидно-клеточной анемии человека, когда при замене нормального гена β -глобина на дефектные человеческие $\text{A}\gamma$ и βs гены у мышей развивается анемия, и животные быстро погибают. Ранее было показано, что сочетание генной и клеточной терапии с использованием производных ES клеток позволяет скорректировать эту форму патологии (69). Теперь то же сделано на основе iPS клеток (17). Из кожных фибробластов мышей с анемией были получены iPS клетки с аномалией гена β -глобина. iPS клетки с аномалией трансфецировали нормальным геном человеческого глобина βA . Из модифицированных iPS клеток вырастили гемопоэтические клетки. После трансплантации модифицированных гемопоэтических клеток облученным мышам с анемией у них нормализовались все гематологические и физиологические показатели. Представлены доказательства того, что пул миелоидных клеток восстанавливался за счет пересаженных геномодифицированных гемопоэтических клеток (17). Эта демонстрация терапевтического потенциала iPS клеток тем более убедительна, что обе работы по преодолению серповидной анемии, с использованием и ES, и iPS клеток, вышли из “одних рук”, они выполнены под руководством R. Jaenisch.

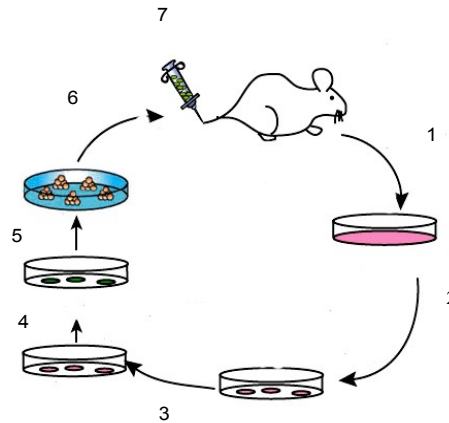


Рисунок 2. Схема эксперимента Hanna, Wernig и соавторов (17) по коррекции серповидно-клеточной анемии с помощью аутологичной трансплантации производных iPS клеток.

1 – получение культуры фибробластов мыши с аномальными генами человеческих глобинов; **2** – трансфекция генов–индукторов плюрипотентности; **3** – отбор и размножение iPS клонов; **4** – трансфекция нормального гена для коррекции мутации β-глобина в iPS клетках; **5** – дифференцировка iPS клеток в эмбриодные тела; **6** – селекция гемопоэтических клеток; **7** – трансплантация аутологичных гемопоэтических клеток, несущих нормальный ген β-глобина, летально облученным мышам с анемией.

Появление технологии индукции плюрипотентности кардинально изменило подход к решению задачи получения аутологичных, персонифицированных стволовых клеток. До этого в качестве единственного источника полностью иммуносовместимых плюрипотентных стволовых клеток рассматривались линии ESC из клонированных эмбрионов. Идея так называемого “терапевтического” клонирования человека пропагандируется чрезвычайно агрессивно, но реализовать ее пока не удастся. Едва ли “терапевтическое” клонирование когда-нибудь станет практической медицинской технологией: эффективность клонирования эмбрионов приматов составляет десятые доли процента, т.е. для получения одной клонированной бластоцисты нужно “убить” сотни донорских яйцеклеток, а чтобы создать линию ES клеток приходится разрушить десятки

бластоцист (12,13,21,67,71). Моральная цена подобной процедуры недопустимо высока, да и материальная стоимость в сотни тысяч долларов, тоже.

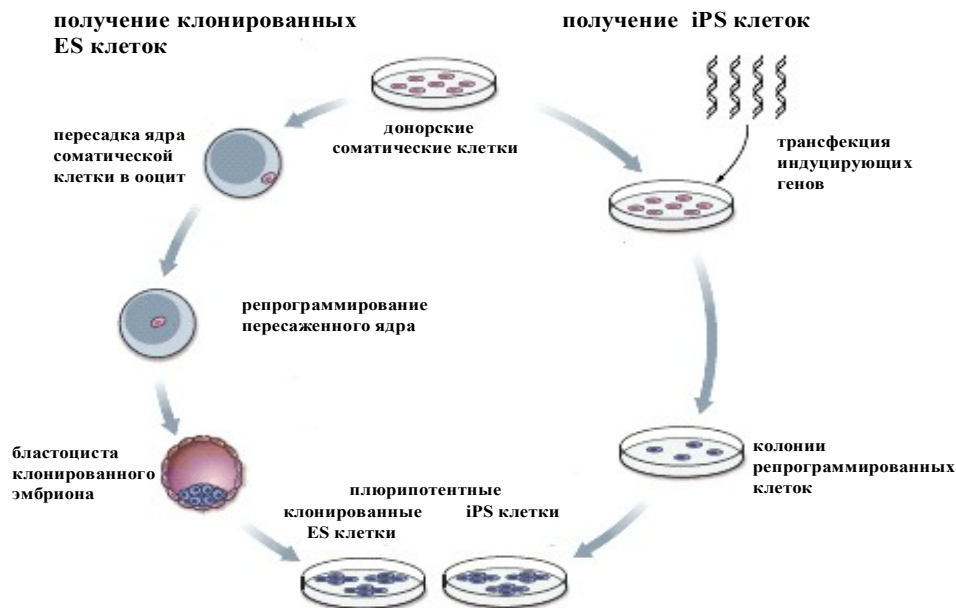


Рисунок 3. Получение персонифицированных линий плюрипотентных клеток методами терапевтического клонирования и дедифференцировки соматических клеток

Если рассматривать в качестве основополагающего условия успешной клеточной терапии отсутствие иммунологического конфликта трансплантированных клеток и реципиента, а это на данный момент доминирующая точка зрения, то именно получение iPS клеток делает достижение этой цели реальным. Принципиальные решения, как получить, вырастить, дифференцировать в заданном направлении аутологичные iPS клетки взрослых доноров и даже провести в случае необходимости генную терапию, уже найдены. К тому же метод получения iPS клеток проще, быстрее, во много раз дешевле, а значит и доступнее, чем создание линий ES клеток. Кажется бы клеточная терапия iPS клетками уже стоит у порога клиник, но... Но кроме массы методических проблем еще предстоит решить принципиально важную задачу: как избежать риска образования

пересаживаемыми клетками опухолей. И разработчики технологии, и их оппоненты единодушны в том, что до решения этой задачи любые попытки использовать iPS клетки для лечения людей абсолютно недопустимы (6,12,23,26,32,41,45,50,55,63,66,71).

Риск онкотрансформации существует при пересадке любых стволовых клеток, в том числе и производных ESC (1,40,67), но при работе с iPS клетками он гораздо выше. Дело не в возможности образования тератом. Грамотному клеточному биологу никогда не придет в голову идея трансплантации плюрипотентных клеток с целью достижения клинического эффекта. Все дело в том, что опасность таится в самой основе метода получения iPS клеток: в состав квартетов индуцирующих плюрипотентность генов входят протоонкогены (26,54,71,73). Есть определенная вероятность того, что дополнительное встраивание онкогенов в геном спровоцирует трансформацию потомков iPS клеток (региональных стволовых и прогениторных клеток) в раковые стволовые клетки (2,29). Речь идет, прежде всего, о *c-Myc*. Этот фактор регуляции транскрипции связан с такими функциями клетки, как рост, пролиферация и дифференцировка (2,26,30,71). Связывание *c-Myc* способствует созданию открытой конформации хроматина соматических клеток, усиливая в частности ацетилирование гистонов, и тем самым поднимает вероятность репрограммирования (2,26,29,30,32). Но *c-Myc* может также стимулировать онкотрансформацию, поэтому его гиперпродукция вызывает опасения (2). Именно с повышенной активностью гена *c-Myc* связывают образование у 20% химерных мышей, полученных с использованием iPS клеток фибробластного происхождения, солидных опухолей, преимущественно ганглионейробластом (39). В то же время у химер, созданных из печеночных iPS клеток, не отмечено ни одного случая рака, несмотря на то, что набор генов для трансдукции использовался тот же (4). Ничего не сообщается о появлении опухолей у химер с iPS клетками лимфоцитарного происхождения (17). Скорее всего, однозначной связи между повышенной экспрессией *c-Myc* в процессе дедифференцировки и раковым перерождением потомков iPS клеток нет. Для исключения таких нарушений регуляции активности генома, которые могли бы привести к превращению нормальных

стволовых клеток в раковые видимо более важно своевременное выключение избыточных, экзогенных генов *c-Myc* (9,39,50,63,73).

Насколько вообще гиперэкспрессия *c-Myc* обязательна для успешного превращения соматических клеток в плюрипотентные? Было показано, что репрограммирование происходит и при исключении *c-Myc* из набора индукторов, правда медленнее и с меньшей эффективностью (34,38,42,64). Влияние *c-Myc* на репрограммирование разных соматических клеток отличается: без дополнительной активации этого протоонкогена из фибробластов образуется на 90% меньше колоний iPS клеток, чем с ним, а колоний iPS из гепатоцитов – всего на 20-40% (4,42,64). Из клеток, которые уже сумели вернуть в плюрипотентное состояние, только фибробластам свойственна и высокая зависимость от *c-Myc* при трансформации, и длительная повышенная экспрессия этого онкогена их iPS производными, и образование опухолей у химер. По всей вероятности такие различия определяются особенностями функционирования сетей регуляции специфичной экспрессии у разных соматических клеток. Установлено, что роль протоонкогенов *Klf4* и *Lin28* в индукции плюрипотентности тоже модуляторная, а вот без дополнительных генов *Oct4* и *Sox2* она невозможна (26,30,52,71). Таким образом, уже намечается стратегия снижения риска опухолевой трансформации iPS клеток. Получение iPS клеток, предназначенных для клинического применения, предполагает выбор в качестве исходных таких соматических клеток, репрограммирование которых в наименьшей степени зависят от онкогенов. В то же время, использование протоонкогенов в сочетании с *Oct4* и *Sox2* при получении iPS клеток для исследовательских целей оправдано, так как повышает эффективность процедуры. Возможно, *c-Myc* целесообразнее все-таки исключить из протокола индукции плюрипотентности, так как кроме потенциальной онкогенности есть данные о его способности стимулировать апоптоз и дифференцировку ES клеток (51).

Еще один потенциальный источник опасности превращения iPS клеток в опухолевые стволовые заключается в онкогенном действии вирусных векторов, которые используются для трансфекции генов. Ведется активная работа по оптимизации методов трансфекции

для получения iPS клеток (9,17,31,54). Разработчики технологии iPS клеток единодушны в своих заявлениях, что осуществление трансфекция индуцирующих генов без применения вирусных векторов – это только вопрос времени (6,12,23,70). Можно рассчитывать и на то, что дальнейший прогресс в понимании эпигенетических механизмов регуляции дифференцировки и дедифференцировки позволит вообще отказаться от использования трансфекции дополнительных генов для индукции плюрипотентности, а использовать способы влияния на уровень метилирования и других модификаций хроматина, о чем подробнее говорилось выше. Для снижения риска появления опухолей при пересадках есть и такой подход как сортировка клеток. Поскольку наибольшим потенциалом раковой трансформации обладают малодифференцированные клетки (27,62,68), то нужно освобождать трансплантаты от них. Технически эта задача решается, например, с помощью проточной цитометрии с сортировкой клеток по флуоресцентным маркерам. Этот принцип был успешно использован при пересадке полученных из iPS нервных клеток. Освободив трансплантат от единичных недифференцированных iPS клеток фибробластного происхождения, Wernig, Zhao и их соавторы обеспечили эффективную защиту: в их опытах по коррекции паркинсонизма не зарегистрировано образования опухолей (65). Одним словом, риск онкотрансформации iPS клеток есть, как есть он и при использовании ES клеток, но уже намечены пути преодоления такого опасного перерождения. Нужно время, чтобы собрать достаточное количество данных о том, какие условия провоцируют онкотрансформацию iPS клеток, какими способами можно наиболее эффективно этому противодействовать и как надежно контролировать. История изучения iPS клеток в десять раз короче, чем ES клеток, и могут открыться еще многие их потенциально опасные свойства. Но на данный момент у ES клеток нет однозначных преимуществ перед iPS, в том числе и с точки зрения опасности онкотрансформации. Так, показано, что длительное культивирование ES клеток приводит не только к эпигенетическим изменениям хроматина, но и к возникновению хромосомных аномалий (1,40,44,67), у iPS клеток нарушений кариотипа пока никто не наблюдал (4,9,17,31,39,41,54,55,63,73).

Технология получения iPS клеток быстро совершенствуются, что можно проиллюстрировать на примере смены методов селекции. В начале селекцию плюрипотентных клеток, появившихся среди фибробластов проводили по таким признакам как устойчивость к неомицину или экспрессия зеленого флюоресцентного белка. Это требовало дополнительной индукции соответствующих признаков, и от такого способа быстро отказались (8,34,55). Затем для отбора iPS клеток в качестве маркеров были выбраны Fbx15 и Nanog, которые активны в ES клетках. Эти признаки оказались достаточно удобными и не требовали какой-либо дополнительной модификации клеток. Но возникла разноречивость в оценках эффективности образования iPS клеток из-за того, что процесс трансформации захватывает несколько поколений клеток, и маркеры плюрипотентности появляются постепенно (9,50). Самым же простым оказался морфологический критерий. Колонии клеток типичной для ESC формы легко отличить от клеток-прародителей, и при отборе нет нужды прибегать к каким-либо потенциально вредным воздействиям. Поскольку изменения морфологии происходят задолго до окончания трансформации, то фактически отбираются предшественники iPS клеток (9,50). В процессе дальнейшего культивирования этой обогащенной фракции резко повышается доля полностью репрограммированных iPS клеток, так как промежуточные формы склонны к апоптозу (8,17,31,34,42). Способ эффективной селекции iPS клеток, который не сопряжен с риском их повреждения и не требует дополнительных воздействий, найден.

Когда ведется обсуждение перспектив клинического применения iPS клеток, в качестве аргумента против высказывается и такое замечание: - у этих клеток может быть ограниченная, по сравнению с ESC, способность к дифференцировке (15,45). В качестве обоснования такого мнения ссылаются на работу Yu , Vodyanik, Thomson, где показано отсутствие нервных клеток в тератомах, образованных iPS клетками, которые получены из кожных фибробластов взрослых людей (73). В этой связи необходимо еще раз напомнить, что индукция плюрипотентности включает в себя ряд последовательных процессов: выключение программы экспрессии генов исходных специализированных клеток, реактивация “генов плюрипотентности”, поддержание самовоспроизведения iPS клеток.

Рождение репродуктивных химер и нормальное развитие плодов при полном замещении ИСМ бластоцисты iPS клетками доказывает их истинную плюрипотентность (табл.). Сбой в реализации *in vivo* или *in vitro* какой-то конкретной программы дифференцировки iPS клеток, скорее всего, отражает нарушение эпигенетической регуляции именно этой программы. Собственно в той же работе Thomson и его сотрудники продемонстрировали, что нарушение дифференцировки iPS клеток в нейрональном направлении коррелирует с задержкой отключения дополнительных копий гена *c-Myc* (73).

Могут ли линии iPS клеток отличаться потенциалом дифференцировки? Скорее всего, могут, но это не является сколько-нибудь серьезным препятствием для их использования. Хотя всячески подчеркивается, что главное преимущество ES клеток в их способности дифференцироваться в специализированные клетки всех возможных типов, на практике линии ES клеток человека заметно отличаются набором клеток, которые удается из них получить (1,3,16,36). Только клетки ИСМ бластоцист являются стандартом истинной плюрипотентности, а тот факт, что карты активности генов iPS и ES клеток никогда не совпадают полностью (3,17,33,41,50,55), ничего не говорит о потенциале дифференцировки. К тому же спонтанная дифференцировка iPS, и ES клеток начинается уже в колониях (33, 60), еще до образования эмбриодных тел, что естественно приводит к различиям между конкретными образцами по паттерну экспрессируемых генов. Другой вопрос, насколько вообще есть практическая необходимость в полнопрограммной дифференцировке любых плюрипотентных клеток при получении материала для трансплантации. Конкретному больному для проведения клеточной терапии нужны клетки определенного типа, а совсем не весь их возможный набор.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ ВОКРУГ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ iPS КЛЕТОК

Создание метода превращения соматических клеток в плюрипотентные отнюдь не было нечаянной экспериментальной находкой. Это ответ на кризис, сложившийся в области получения и сохранения линий ES клеток человека (1,16), и скандальную

историю с попыткой терапевтического клонирования человека и получения персонифицированных линий ES клеток, предпринятой Woo Suk Hwang в Южной Корее (13). Разработали эту технологию крупные специалисты по стволовым клеткам. Так, Shinya Yamanaka много работал с ES клетками, изучая молекулярные механизмы плюрипотентности и опухолевой трансформации. James Thomson в 1998 году первым вырастил ES клетки человека, а в 2007 одновременно с Yamanaka получил человеческие iPS клетки из фибробластов (58,73). Rudolf Jaenisch и Konrad Hochedlinger имеют уникальный опыт клонирования и генно-клеточной терапии наследственных заболеваний (21,22,69). С самого начала работы по созданию iPS клеток получили признание профессионалов. Показателен комментарий I. Wilmut, “отца” знаменитой клонированной овечки Долли. Он заявил, что с появлением технологии индукции плюрипотентности больше не видит смысла в продолжении работ по терапевтическому клонированию (60, 66). В исследование iPS клеток активно включились крупнейшие центры изучения стволовых клеток Гарвардского университета, Массачусетского технологического Института, Калифорнийского университета, Института передовых медицинских технологий университета Киото в Японии и многие другие.

Совместными усилиями интернациональной команды исследователей технология получения iPS клеток доведена до уровня практического применения. Конечно, пока речь не идет об их использовании с целью получения трансплантатов в репаративной медицине. О задачах, которые еще предстоит для этого решить, подробно говорилось выше. Уже сейчас полученные от пациентов со сложными хроническими и врожденными заболеваниями iPS клетки, дифференцированные в заданном направлении, становятся уникальным объектом для изучения молекулярных и клеточных механизмов разных форм патологии. Например, группа К. Eggan в Гарварде начала работу по получению линий iPS клеток больных латеральным амиотрофическим склерозом, а L. Goldstein, руководитель программы изучения стволовых клеток калифорнийского Университета в Сан Диего, сообщил, что они собирают коллекцию кожных биопсий пациентов с болезнью Альцгеймера, чтобы создать клеточную модель этого заболевания (23). Такие клеточные

модели имеют много преимуществ по сравнению с традиционными, прежде всего то, что это человеческие клетки. К тому же есть немало заболеваний, адекватных моделей которых на животных вообще не удастся создать. Использование клеточных моделей патологических состояний на основе iPS клеток в корне меняет технологию скрининга фармакологических препаратов, делая ее более быстрой, более точной и существенно более дешевой. В недалекой перспективе можно будет проводить индивидуальный подбор терапевтических средств, тестируя их эффективность *in vitro* на специализированных клетках, выращенных из iPS клеток пациента (23,70).

Реакция со стороны биотехнологических компаний на перспективу появления на рынке клеточных препаратов на основе iPS клеток варьирует от горячей поддержки до полного отрицания возможности практического применения таких клеток. Например, научный руководитель компании Advanced Cell Technology, которая имеет большой опыт работы с ES клетками, R. Lanza заявил, что они уже подключились к разработке способов индукции плюрипотентности без использования вирусных векторов, и считают перспективным создание банков линий iPS клеток основных иммунофенотипов человека (23). А по утверждению представителя Geron corporation Н. Окама производные iPS клеток никогда не будут использованы для трансплантации в клинике потому, что их источник – это соматические клетки, которые в процессе старения или повреждения могут иметь какие-то геномные нарушения (23). В то же время идея создания линий ES клеток из клонированных бластоцист человека фирмой Geron поддерживается, хотя в качестве источника ядер при этом используются те же взрослые соматические клетки (60). Дело здесь скорее не столько в более критичном отношении к потенциальным недостаткам iPS клеток, сколько в том, что Geron ориентирован на разработку технологий на основе ES клеток и вложил в них очень большие деньги. Коммерческая, а не научная подоплека противостояния явственно проглядывается в высказываниях президента фирмы Geron Т. Окама. По его словам, поскольку фирма владеет собственными патентами и лицензиями на получение, направленную дифференцировку и применение ES клеток человека, то ее права распространяются на использование любых

плюрипотентных, в том числе и iPS клеток, хотя они и не собираются ими заниматься (23). Разыгрывается настоящая война обладателей патентных прав на применение iPS клеток. Можно понять претензии на владение такими правами со стороны Yamanaka и его коллег, оформление которых контролирует японское Министерство образования, науки и технологии. Для распространения технологий получения и применения iPS клеток важно, будут ли японские патенты иметь запретительный характер или нет (15). Но когда это пытаются сделать объединение исследователей, выпускников высших учебных заведений штата Висконсин (WARF), известное своей агрессивной политикой по вопросу патентования технологий использования ES клеток человека (15), ничего кроме стремления получить свою долю прибыли от чужих достижений, не просматривается. Такова невеселая судьба разработок, имеющих серьезные коммерческие перспективы, в нашем меркантильном мире, даже если их реализация обещают решение серьезных гуманитарных проблем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление метода превращения соматических клеток в плюрипотентные путем индукции повышенной экспрессии определенных генов перевело проблему обратимости дифференцировки из категории лабораторных артефактов в разряд феноменов, которые могут иметь место в естественных условиях. Эксперименты с клонированием и дедифференцировкой с помощью экстрактов ES клеток дали нам доказательства того, что состояние хроматина, паттерн экспрессируемых генов, разных специализированных клеток не закреплен жестко, в определенных условиях он может быть изменен. Но *in vivo* никогда не возникают подобные условия. Совсем другая ситуация с iPS клетками. В этом случае клетки удастся вернуть к начальной точке дифференцировки без всяких пересадок. Ядро меняет свое состояние, находясь в “родной” цитоплазме. Все изменения происходят на уровне эпигенетической регуляции, прежде всего изменений уровня метилирования хроматина, а это уже естественно регулируемый процесс.

Относительная простота получения iPS клеток позволила в короткий срок многое прояснить в механизме индукции плюрипотентности. С самого начала, с первых работ было ясно, что превращение терминально дифференцированных соматических клеток в плюрипотентные – это процесс, постепенно развивающийся в ряде последовательных поколений клеток. Скорее всего, и выключение отдельных специализированных программ взрослых клеток, и активация детерминирующих плюрипотентность генов происходит во время деления клеток, подобно тому, как осуществляется репрограммирование в процессе дифференцировки. Именно постепенностью репрограммирования индукция плюрипотентности отличается от клонирования, когда полное переключение программ осуществляется в зиготе, еще до первого деления дробления. Такие серьезные различия в кинетике процесса могут быть обусловлены двумя причинами. Во-первых, наличие в цитоплазме ооцитов каких-то дополнительных факторов может резко ускорить процесс смены программ. Во-вторых, цитоплазма соматических клеток содержит специфические для них белки, и, кроме выключения соответствующих генов, нужно время на то, чтобы освободиться от них. Для понимания процесса постепенного превращения терминально дифференцированных клеток в клетки полностью дедифференцированные много даст изучение промежуточных форм.

Уже ясно, и это чрезвычайно важно, что индукция плюрипотентности не связана с какими-либо мутационными процессами, а реализуется исключительно на уровне эпигенетической регуляции состояния хроматина. Гиперэкспрессия внешних “генов плюрипотентности” необходима именно в качестве индуктора, и где-то в середине процесса репрограммирования они отключаются, не встраиваясь в геном клетки (9,50). Не выявлено также закономерного встраивания вирусных векторов, которые используют для трансфекции (55). Следует отметить, что и в случае клонирования именно “правильное” метилирование хроматина определяет успешность развития реконструированного эмбриона и до, и после имплантации (21). Среди вопросов первой важности, которые стоят перед исследователями iPS клеток, я бы отметила два. Почему так мало клеток

проходят весь путь трансформации и возвращаются в исходную точку дифференцировки? Зависит ли это от успешности трансфекции, от жизнеспособности промежуточных форм, или не все клетки изначально могут быть репрограммированы? Уже известно, что вернуть в плюрипотентное состояние можно как фетальные, так и взрослые соматические клетки разных типов (26,71), но в некоторых случаях для этого стандартный квартет индуцирующих генов приходится усиливать дополнительными факторами (17). Возможно, разная эффективность индукции зависит от наличия каких-то соматических мутаций, и только не имеющие их клетки способны превратиться в iPS. Второй вопрос - всегда ли смена специализации клеток осуществляется по схеме: терминальная дифференцировка - полная дедифференцировка - новая дифференцировка через все промежуточные формы? Возможна ли трансдифференцировка, превращение зрелых клеток одного типа непосредственно в специализированные клетки другого типа, или трансформация происходит через возврат к прогениторным или региональным стволовым клеткам и их репрограммирование? Ответы на эти вопросы во многом помогут понять, как регулируются процессы обновления тканей в организме.

С точки зрения возможности применения iPS клеток в медицинской практике следует отметить, что по своим базисным характеристикам они, несомненно, могут быть отнесены к категории плюрипотентных. Это третий член в семействе клеток с уникальными свойствами, и, как и ES клетки, искусственно созданы в лабораториях. По сравнению с ESC iPS клетки имеют целый ряд серьезных преимуществ: их получение, том числе и создание персонафицированных линий для конкретных пациентов, не имеет никаких ограничений этического плана; методы получения проще, быстрее, эффективнее и значительно дешевле. Уже сейчас линии iPS клеток человека начинают использовать в качестве клеточных моделей хронических и врожденных заболеваний для изучения их молекулярных и клеточных механизмов и скрининга лекарственных препаратов. Переход на такие модели обещает значительный прогресс в этой сфере исследований и их существенное удешевление. История изучения iPS клеток насчитывает всего неполных два года (ES клеток человека 10 лет, мышинных 25), и, естественно, нужно время, чтобы

снять вопросы, которые на данный момент блокируют их использование в регенеративной медицине. Прежде всего, это оценка реальной вероятности онкотрансформации производных iPS клеток и исключение из методов получения таких клеток факторов, провоцирующих появление опухолей при их трансплантации. Пока фактических данных о связи пересадок производных iPS клеток с появлением опухолей практически нет, и опасения носят больше умозрительный характер. Проблема эта активно разрабатывается. В ближайшее время можно ждать появления сравнительных исследований свойств iPS клеток, полученных из разных тканей, может быть даже от одного донора. Серьезной задачей является разработка методов тестирования полноты дедифференцировки iPS клеток. Перед тем, как инициировать их дифференцировку в заданном направлении, надо быть уверенным в том, что процесс возвращения в плюрипотентное состояние завершился, а спонтанная дифференцировка еще не началась. Наконец, предстоит выяснить, насколько стабильны линии iPS клеток при длительном культивировании. Пример ES клеток показывает, насколько серьезные проблемы могут при этом возникать. То, какие серьезные силы, прежде всего ведущие специалисты университетской академической науки, задействованы в разработках технологий получения и применения iPS клеток, позволяет надеяться, что ответы на самые острые вопросы будут получены скоро.

Такая еще короткая история создания iPS клеток – это хрестоматийный пример того, как много может сделать современное научное сообщество, объединившись вокруг плодотворной идеи, которая имеет большую значимость для развития фундаментальной науки, серьезные перспективы практического применения и может быть реализована на базе уже вошедших в практику исследований методов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никольский Н.Н., Габай И.А., Сомова Н.В. Эмбриональные стволовые клетки человека.

- Проблемы и перспективы. **Обзор.** Цитология. 2007; **49**: 259-236
2. Adhikary S., Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. **Review.** Nature Rev. Molecular Cell Biology. 2005; **6**: 635-645
 3. Allegrucci C., Young L.E. Differences between human embryonic stem cell lines. Human Reproduct. 2007; **13**: 103-120
 4. Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science Express 2008; published on line 14 February
 5. Baker M. Mouse skin cells made pluripotent by genetic modification can give rise to all types of tissue. Nature Reports Stem Cells. Published online: 7 June 2007
 6. Bang A.G., Carpenter M.K. Reconstructing pluripotency. Science. 2008; **380**: 58-59
 7. Bibikova M., Laurent L.C., Ren B. et al. Unraveling Epigenetic Regulation in Embryonic Stem Cells. **Review.** Cell Stem Cells. 2008; **2**: 123-134
 8. Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., Ramalho-Santos, M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. Cell Stem Cell. 2007; **1**; 245–247
 9. Brambrink T., Foreman R., Welstead G. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell. Stem Cells. 2008; **2**: 151-159
 10. Buszczak M., Spradling A. Searching Chromatin for Stem Cell Identity. Cell. 2006; **125**: 233-236
 11. Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., Eggan, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science. 2005; **309**; 1369–1373
 12. Cyranoski D. Race to mimic human embryonic stem cells. Nature. 2007; **450**: 462-463
 13. Cyranoski D. Verdict: Hwang’s human stem cells were all fakes. Nature. 2006; **439**: 122-123
 14. Fourse S.D., Shen Y. et al. Promoter CpG Methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. Cell Stem Cell. 2008; **2**: 160–169

15. Gottweis H., Minger S. iPS and the politics of promises. *Nature Biotechnology*. 2008; **26**: 271-272
16. Guhr A., Kurtz A., Friedgen K., Oser P.L. Current state of human embryonic stem cell research: an overview of cell lines and their use in experimental work. *Stem Cells*. 2006; **24**: 2187-2191
17. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P. et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 2008; **133**: 250-264
18. [Hanna J., Wernig M., Markoulaki S. et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; **318**: 1920-23](#)
19. Hattori N., Nishino K. et al. Epigenetic control of mouse *Oct-4* gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 17063-17069
20. Hawley R.G., Sobieski D.A. Somatic stem cell plasticity: To be or not to be... *Stem Cells*. 2002; **20**: 195-197
21. Hochedlinger, K., Jaenisch, R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. **Review**. *New Engl. J. Med.* 2003; **349**: 275–286
22. Hochedlinger, K., and Jaenisch, R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*. 2002; **415**: 1035–1038
23. Holden C., Vogel G. A seismic shift for stem cell research. *Science*. 2008; **319**: 560-550
24. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 2000; **6**: 88–95
25. Ivanova N., Dobrin R., Lu R. et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. **Review**. *Nature*. 2006; **442**: 533-538
26. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Review**. *Cell*. 2008; **132**: 567–582
27. Jones P., Baylin S. The epigenomics of cancer. **Review**. *Cell*. 2007; **128**: 683-692

28. Kim J., Chu J., Shen X., Wang J., Orkin S.H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*. 2008; **132**: 1049–1061
29. Knoepfler P.S. Why Myc? An Unexpected ingredient in the stem cell cocktail. **Minireview**. *Cell Stem Cell*. 2008; **2**: 18-21
30. Levitzky M., Yamanaka S., Reprogramming somatic cells toward pluripotency by defined factors. **Review**. *Current Opinion Biotechnology*. 2007; **18**: 467-473
31. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *PNAS*. 2008; **105**: 2883–2888
32. Maherali, N., Sridharan, R. Xie, W. et al. Global epigenetic remodeling in directly reprogrammed fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2007; **1**: 55–70
33. Masaki, H., Ishikawa T. et al. Heterogeneity of pluripotent marker gene expression in colonies generated in human iPS cell induction culture, *Stem Cell Res*. 2008; doi:10.1016/j.scr.
34. Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol*. 2007; **25**: 1177–1181
35. Meshorer E., Mistoli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. **Review**. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2006; **7**: 540-546
36. Mikkola M., Olsson C., Palgi J. et al. Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. *BMC Developmental Biology*. 2006; **6**: 40
37. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN et al. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature Medicine*. 2002; **8**: 268-273
38. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human. *Nature Biotechnology*. 2008; **26**: 101-106
39. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007; **448**: 313–317
40. Panneteier M., Feil R. Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential. **Review**. *Trends Biotechnol*. 2007; **25**: 556-562

41. Park I.H., Zhao R., West J. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; **451**: 141-147
42. Pera M.F., Hasegawa K. Simpler and suffer cell reprogramming. *Nature Biotechnology*. 2008; **26**: 59-60
43. Phinney D.G., Prockop D.J. Mesenchymal stem/multi-potent stromal cells (MSCs): the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. *Stem Cells*. 2007; **25**: 2896-2902
44. Preston S.L., Alison M.R., et al. The new stem cell biology: something for everyone. **Review**. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2003; **56**: 86-96
45. Rossat H. Stem cells: The magic brew. *Nature* 2007; **448**: 260-262
46. Ruau D., Ensenat-Waser R., Timo C. Dinger TC. et al. Pluripotency associated genes are reactivated by chromatin modifying agents in neurosphere cells. *Stem Cells Express*. 2008; first published online January 17
47. Shaun D. Fouse,1 Yin Shen,1 yet al. Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell*. 2008; **2**: 160-169
48. Schmittwolf C, Kirchhof N, Jauch A et al. In vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents. *EMBO J*. 2005; **24**: 554-566.
49. Spivakov M., Fisher A.G. Epigenetic signatures of stem cells. **Review**. *Nature Rev. Genetics*. 2007; **8**: 263-271
50. Stadtfeld M., Nimet Maherali N., David T. Breault D.T., Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*. 2008; **2**: 230-240
51. 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**: 5564-5576
52. Surani M.A., Hayashi K., Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. **Review**. *Cell*. 2007; **128**: 747-762

53. Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. and Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biol.* 2001; **11**: 1553–1558
54. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; **126**: 663–76
55. [Takahashi K., Yamanaka S., Tanabe K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; **131**: 861-72](#)
56. Taranger C.K., Noer A., Sorensen A.L. et al. Induction of dedifferentiation, genome wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2005; **16**: 5719-5735
57. Tsuji-Takayama K., Inoue T. et al. [Demethylating agent, 5-azacytidine, reverses differentiation of embryonic stem cells.](#) *Bioch. Bioph. Res. Com.* 2004; **323**: 86-90
58. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; **282**: 1145–1147
59. Ullmann U., In't Veld P., et al. Epithelial–mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Mol. Human Reproduction.* 2007;**13**: 21–32
60. Vogel G., Holden C. Field Leaps Forward With New Stem Cell Advances. *Science.* 2007; **318**: 1224-1225
61. Wagers A.J., Weissman I.L. Plasticity of adult stem cells. **Review.** *Cell.* 2004; **116**: 639–648
62. Wang Y. Armstrong S.A. Cancer: Inappropriate Expression of Stem Cell Programs? *Cell Stem Cell.* 2008; **2**: 297-299
63. Wernig M., Meissner, A., Foreman, R. et al. In vitro reprogrammed fibroblasts have a similar developmental potential as ES cells and an ES cell-like epigenetic state. *Nature.* 2007; **448**: 318-325
64. Wernig M., Alexander Meissner A., Cassady J.P., Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell. Stem Cells.* 2008; **2**: 10-13
65. Wernig M., Zhao J-P., Pruszak J. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *PNAS.* 2008; **105**: 5856-5861

66. Wilmut I. The first direct reprogramming of adult human fibroblasts. *Cell Stem Cells*. 2007; **1**: 593-594
67. Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell Therapy. **Review**. *Physiol. Rev.* 2005; **85**: 635-678
68. Wong D.J., Liu H. et al. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells, *Cell Stem Cell*. 2008; **2**: 333-344
69. Wu L.C., Sun C.W., Ryan T.M., et al. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood*. 2006; **108**: 1183-1188
70. Zaehres H., Schuler H.R. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*. 2007; **131**: 864-865
71. Yamanaka, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. **Review**. *Cell Stem Cell*. 2007; **1**: 39-49.
72. Yang, X., Smith, S.L., et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 2007; **39**: 295-302.
73. [Yu J., Vodyanik M.A., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; **318**: 1917-1920](#)