

УДК 57.017.642:576.364

## ПРЯМАЯ КОНВЕРСИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2014 г. **И.Е. Пристяжнюк, Т.А. Шнайдер, В.С. Фишман,  
Н.М. Матвеева, О.Л. Серов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: serov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 20 октября 2014 г. Принята к публикации 7 ноября 2014 г.

Получение мультипотентных пациент-специфичных нейрональных клеток-предшественников из фибробластов человека является перспективной задачей регенеративной медицины. Недавно для ее решения был предложен инновационный подход, позволяющий осуществлять прямую конверсию фибробластов человека и мыши в индуцированные нейрональные клетки-предшественники (ИНП) за счет введения в геном одного транскрипционного фактора *Sox2*. В данной работе нами был проведен анализ генерируемых таким образом ИНП и оценена перспектива применения данной методики в медицине. Как в случае клеток мыши, так и в случае клеток человека мы обнаружили значительные изменения морфологии фибробластов, обработанных вирусом: полученные культуры ИНП мыши и человека соответствовали нейрональным предшественникам, полученным из головного мозга эмбрионов мыши. Нами было показано присутствие маркеров нейральных предшественников (НП) в культурах ИНП мыши и человека. Однако индуцированная дифференцировка ИНП мыши не приводила к формированию различных типов нейрональных клеток, в частности, эти клетки не способны были давать начало зрелым нейронам. Кроме того, в дополнение к *Sox2*, мы обрабатывали человеческие фибробласты *c-Myc* и либо *Ascl*, либо *Brn2*. Одна из полученных линий имела низкий пролиферативный потенциал, остальные активно делились, однако цитогенетический анализ показал, что они характеризовались аномальным кариотипом. Выявленные особенности как ИНП человека, так и мыши, ставят существенное ограничение на использование описанной методики получения ИНП в медицине. Таким образом, полученные культуры не являются полноценными аналогами НП. В результате чего мы предполагаем, что опубликованный протокол получения ИНП путем экзогенной экспрессии *Sox2* обладает низкой воспроизводимостью.

**Ключевые слова:** репрограммирование, трансдифференцировка, нейрональные предшественники, *Sox2*.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время человечество столкнулось с рядом заболеваний, в основе которых лежит необратимое разрушение клеток пациента. Деградация клеток может быть связана с воздействием тех или иных неблагоприятных факторов или с естественным процессом старения. Зачастую единственным путем к лечению таких заболеваний является восполнение пула погибших клеток новыми. К сожалению, способности человека к клеточной регенерации

ограничены и снижаются с возрастом (Jessberger, Gage, 2014). Особенно остро эта проблема стоит в области нейродегенеративных заболеваний, поскольку нервная система имеет крайне низкий потенциал к восстановлению (Mouhieddine *et al.*, 2014). Решению данной проблемы могло бы способствовать создание технологии получения нервных клеток из других типов клеток пациента (Mouhieddine *et al.*, 2014). Так, соединительная ткань человека обладает достаточной способностью к регенерации, а методики получения от пациента материала биопсии, содержащего

достаточное количество клеток соединительной ткани (фибробластов), хорошо отработаны в клинике (Villegas, McPhaul, 2005). Решая проблему превращения одних типов клеток в другие, в 2006 г. группа японских ученых совершила выдающийся прорыв, показав, что экзогенное введение четырех транскрипционных факторов, *Oct4*, *Sox2*, *cMyc* и *Klf4*, способно вызвать превращение фибробластов в индуцированные плюрипотентные стволовые (ИПС) клетки (Takahashi, Yamanaka, 2006). Эти клетки способны неограниченно делиться и при дифференцировке в культуре давать начало производным всех трех зародышевых листков, и в частности всем типам нейрональных клеток (Wernig *et al.*, 2007). Однако существующие протоколы дифференцировки ИПС клеток имеют ряд существенных недостатков. Во-первых, многие из них характеризуются низким выходом целевых клеток (Keller, 2005). Во-вторых, использование практически всех протоколов приводит к получению смешанной популяции клеток, содержащей наряду с целевыми другие типы клеток (Keller, 2005). В-третьих, после дифференцировки в культуре может оставаться некоторое количество плюрипотентных клеток, которые могут дать начало опухолям при трансплантации человеку (Marión *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2011). Таким образом, использование ИПС клеток в медицине на сегодняшний день лимитировано рядом вышеперечисленных факторов.

Альтернативным подходом, используемым при конверсии одного типа клеток в другой, является прямая трансдифференцировка (Heinrich *et al.*, 2010; Ieda *et al.*, 2010; Vierbuchen *et al.*, 2010; Sekiya, Suzuki, 2011). Этот процесс так же, как и получение ИПС клеток, связан с введением в клетки-мишени транскрипционных факторов, однако продуктом трансдифференцировки является популяция специализированных клеток, не способных делиться и, следовательно, не представляющих угрозу формирования новообразований (Vierbuchen *et al.*, 2010). Однако данный подход также имеет ряд ограничений: низкая эффективность трансдифференцировки и неспособность полученных клеток делиться в культуре лимитируют количество клеточного материала, а необходимость индивидуального подбора транскрипционных факторов для

каждого типа целевых клеток делает задачу их получения крайне сложной.

Недавно альтернативный подход был предложен для получения нейрональных клеток из соматических клеток мыши и человека (Vierbuchen *et al.*, 2010; Ring *et al.*, 2012). Суть этой методики заключалась в прямой конверсии специализированных клеток в нейрональные клетки-предшественники под действием одного или нескольких транскрипционных факторов. Такие клетки могли продолжительно делиться в культуре, что решило проблему получения большого количества материала, но в отличие от ИПС клеток они не обладали способностью к формированию опухолей. При дифференцировке такие клетки могли давать начало различным нейрональным производным, олигодендроцитам и глиальным клеткам, что открывает большие потенциальные возможности для использования данной технологии в регенеративной медицине неврологических болезней (Ring *et al.*, 2012). Однако для использования таких клеток в медицине необходима их детальная характеристика. В данной работе мы использовали различные подходы для прямой конверсии клеток мыши и человека в нейрональные предшественники и провели детальную характеристику полученных клеточных линий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Культуры клеток

В работе использовали следующие культуры клеток человека: фибробласты, полученные из кожи взрослого человека (TAF2), предоставленные доктором биологических наук И.Н. Лебедевым (Институт медицинской генетики СО РАМН, г. Томск); фибробласты крайней плоти человека (ФКПЧ), предоставленные Национальным центром биотехнологии республики Казахстан; линию клеток эмбриональной почки человека HEK293T (Phoenix), предоставленную профессором С.Л. Киселевым (г. Москва). В работе также использованы линия m5S эмбриональных фибробластов мыши, приобретенная из банка клеточных культур JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) (Sasaki, Kodama, 1987), и культура первичных

эмбриональных фибробластов мыши линии c57BL/6J, полученная в соответствии с протоколом, описанным ранее (Kruglova *et al.*, 2008).

### Культивирование клеток

Фибробласты, а также клетки линии HEK293T (Phoenix) культивировали в ростовой среде DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Sigma, Германия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, Великобритания), с добавлением 100 мкг/мл смеси антибиотиков 1 : 1 пенициллина и стрептомицина (GibcoBRL, Великобритания). Культивирование индуцированных нейрональных предшественников (ИНП) человека проводили в среде ReNCell++ (среда ReNcell (Millipore) с добавлением человеческих рекомбинантных ростовых факторов FGF2 и EGF в концентрации 20 нг/мл). Культивирование ИНП мыши проводили в среде Mouse NSC expansion medium (Millipore) с добавлением факторов FGF2, EGF и гепарина, поставляемых в комплекте со средой (Millipore) в соответствии с руководством производителя.

### Наработка лентивирусных векторов

Клетки HEK293T (Phoenix) высаживали в культуральный матрас в количестве  $6 \times 10^4$  клеток на  $\text{cm}^2$ , используя соответствующую среду для культивирования. На следующий день, когда плотность посаженных клеток составляла около 80 %, их трансформировали плазмидами, содержащими один из целевых генов (pLeGO-Asc11, pLeGO-cMyc, pLeGO-Brn2, pLeGO-Sox2, pLeGO-G2), и упаковочными плазмидами (pMDLg/pRRE, pRSV/Rev, pCMV-VSVG). Трансфекцию проводили с помощью липофектамина (Lipofectamine™ LTX Reagent) в соответствии с руководством производителя (Invitrogen, США). Через 12 ч после трансфекции собирали культуральную среду, содержащую наработанные вирусы, а клеткам добавляли 5 мл свежей ростовой среды. Через 24 и 36 ч после трансфекции повторно собирали культуральную среду, содержащую наработанные вирусы. Полученную культуральную среду, содержащую вирусы, фильтровали с помощью фильтра BioFilt (размер пор 0,45 мкм) и использовали для трансдукции фибробластов.

### Трансдукция фибробластов мыши лентивирусами для получения ИНП

В качестве покрытия для лунок использовали поли-L-орнитин (Invitrogen, Германия) и ламинин (Invitrogen, Германия). На подготовленные таким образом 6-ячеечные планшеты рассаживали фидер, в качестве которого использовали клеточную линию STO, предварительно обработанную митомицином С (Sigma, Германия), в концентрации 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  в течение двух часов. Фидер рассаживали в количестве 100 000 клеток на  $1 \text{ cm}^2$ . На следующий день на подготовленный фидер рассаживали ЭФМ линии C57BL в количестве 15 000 клеток на  $1 \text{ cm}^2$ . Через 24 ч проводили вирусную трансдукцию фибробластов, используя один вирус, несущий ген Sox2. На следующий день среду, содержащую вирус, удаляли и заменяли ростовой средой для ЭФМ. Через сутки ростовую среду для ЭФМ заменяли средой для культивирования нейральных стволовых клеток, которую ежедневно заменяли свежей. Через 10–14 дней проводили снятие образовавшихся колоний с помощью Cell Selector (AVISO, Германия) или с помощью стеклянных капилляров. Снятые колонии перемещали в лунки, которые предварительно (не менее чем за 2 ч) были обработаны сывороткой крови телят (Invitrogen, Германия) или желатином (0,1 %) в течение 10 мин при температуре +4 °С. Культивирование снятых колоний продолжали на среде для нейральных стволовых клеток. Пассирование культур полученных клеток проводили с интервалом 3–7 дней.

### Трансдукция фибробластов человека лентивирусами для получения ИНП

Трансформацию фибробластов человека в нейральные предшественники при помощи единственного транскрипционного фактора Sox2 проводили согласно предложенному протоколу (Ring *et al.*, 2012) с модификациями. В соответствии с этим протоколом фидер из мышинных фибробластов линии мышей ICR, обработанных митомицином С, высаживали либо на пластик, либо на покровные стекла, покрытые лизином и поли-L-орнитином, в концентрации 15 000 клеток/ $\text{cm}^2$ . На следующий день на подготовленный фидер высаживали человеческие

фибробласты в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. Трансдукцию фибробластов осуществляли лентивирусным вектором, содержащим кДНК *Sox2*. Среду с вирусом разбавляли наполовину средой DMEM+10 % эмбриональной сыворотки коров и наносили на клетки на 24 ч, после чего заменяли ее ростовой средой для фибробластов. Спустя сутки среду заменяли на ReNCell++. Через 8–10 дней на поверхности монослоя фибробластов появлялись скопления клеток, образующие сферы, которые собирали и культивировали 3–5 дней в среде ReNCell++ в чашке Петри, покрытой агарозой, препятствующей прикреплению клеток. После этого сферы рассаживали в адгезивных условиях (на культуральные чашки, покрытые ламинином и поли-L-орнитинном) в среде ReNCell++. Чередование роста клеток в виде сфер или адгезивной культуры повторяли два раза.

Трансдукцию фибробластов человека набором вирусных векторов *Sox2*, *c-Myc*, *Brn2* и *Myt1L (Ascl)* в разных сочетаниях проводили по аналогичному протоколу.

### Дифференцировка ИМП *in vitro*

Для индукции дифференцировки ИМП мыши рассаживали в количестве 50 000 клеток на 1 см<sup>2</sup> в лунки, предварительно обработанные эмбриональной сывороткой коров или 0,1 %-м раствором желатина. Первые 24 ч ИМП культивировали на среде для ИМП мыши, далее каждые 48 ч ее меняли на среду для дифференцировки.

### Цитогенетический анализ ИМП человека

Цитогенетический анализ проводили по стандартному протоколу И.Е. Пристяжнюк с соавт. (2010). За 2 ч до фиксации клеток в культуральную среду добавляли колцемид (0,1 мкг/мл). Гипотоническую обработку проводили в 0,56 %-м растворе KCl в течение 30 мин при температуре 37 °С. Клетки фиксировали в смеси метанол: уксусная кислота (3 : 1). Препараты анализировали на микроскопе «AxioPlan 2 imaging» фирмы Carl Zeiss, оснащенном CCD-камерой «Coolcube 1» (Meta systems), в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Изображение обрабатывали с помощью пакета

прикладных программ ISIS3 (*In Situ Imaging System*), компании MetaSystems GmbH.

### ОТ-ПЦР анализ

Суммарную РНК выделяли с помощью Trizol Reagent (Invitrogene, США). кДНК синтезировали с помощью Reverse Transcription System (Fermentas, Латвия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа экспрессии генов проводили ПЦР с праймерами, специфичными для этих генов (последовательности праймеров доступны по запросу). В реакционную смесь ПЦР (конечный объем 20 мкл), включающую: ПЦР буфер (65 мМ Tris-HCl, pH 8,8, 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 0,01 % Tween); 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ); 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров; 0,2 единиц активности Taq-ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия), добавляли 50–200 нг кДНК. Полученные продукты амплификации исследовали при помощи гель-электрофореза.

### Иммуноцитохимический анализ

Клетки предварительно фиксировали в течение 10 мин в растворе 3 %-го параформальдегида (Fluka, Германия) в фосфатном буфере (ФБ). После 20-минутной обработки 0,1 %-м раствором тритона X-100 (Fluka, Германия) клетки отмывали 2 раза в течение 5 мин в ФБ и проводили блокировку в течение 1 ч 1 %-м раствором альбумина (Sigma, США) в ФБ. После обработки альбумином клетки инкубировали с первыми антителами (сводная информация по антителам и их разведениям, использованным в работе, приведена в табл. 1). Для приготовления раствора первых антител необходимой концентрации их стоковый раствор разводили в 1 %-м альбумине в ФБ. Инкубирование в растворе антител проводили при комнатной температуре в течение одного часа. После двух 5-минутных отмывок в ФБ наносили раствор вторичных антител, конъюгированных с флюорохромами Alexa Fluor 546 и Alexa Fluor 680, и инкубировали препараты один час при комнатной температуре в темноте. Клетки отмывали от раствора антител два раза по 5 мин раствором фосфатного буфера

Таблица 1

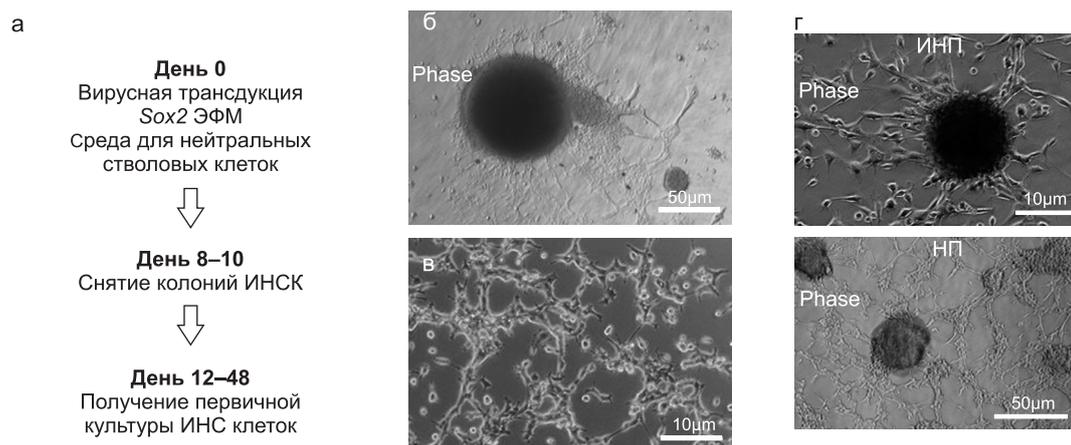
Антитела	
Первичные антитела	Разведение
Mouse Tuj1 – anti-bTubb3 (Millipore, Германия)	1 : 500
Rabbit NF200 – anti-NF-H (Sigma, США)	1 : 200 – 1 : 500
Rabbit mCollagene – anti-Col1 (Chemicon, США)	1 : 100
Rabbit Sox2 – anti-Sox2	1 : 50 – 1 : 100
Mouse Nestin – anti-Nestin (Millipore, Германия)	1 : 100 – 1 : 300
Rabbit Olig2 – anti-Olig2 (Millipore, Германия)	1 : 100 – 1 : 200
Mouse GFAP – anti-GFAP (Millipore, Германия)	1 : 50 – 1 : 100
Rabbit Nestin – anti-NESTIN (Abcam)	1 : 200
Rabbit MAP2 – anti-MAP2 (Abcam)	1 : 200
Rabbit Fibronectin – anti-Fibronectin (Abcam)	1 : 200
Вторичные антитела	
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, США)	1 : 500
Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, США)	1 : 500

и подкрашивали ядра клеток раствором DAPI (1 : 1000 в растворе фосфатного буфера) 10 мин в темноте. После этого клетки промывали 2 раза по 5 мин фосфатным буфером. Затем проводили микроскопический анализ с использованием флюоресцентного микроскопа «Axioscope 2 Plus» (Carl Zeiss, Germany).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Получение нейрональных предшественников из фибробластов мыши

Для получения нейрональных предшественников из фибробластов мыши использовали форсированную экспрессию транскрипционного фактора *Sox2* (Ring *et al.*, 2012). В качестве вектора для доставки транскрипционного фактора использовали лентивирусную систему LeGO. Все эксперименты проводили по следующей схеме (рис. 1, а): культуру эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) обрабатывали лентивирусом, содержащим транскрипционный фактор *Sox2*. Через 8 дней после вирусной трансдукции в культуре ЭФМ стали появляться колонии предполагаемых индуцированных нейрональных предшественников (ИНП) (рис. 1, б). На 8–10-й дни производили снятие колоний



**Рис. 1.** Получение ИНП.

а – схема эксперимента; б – колонии ИНП в культуре ЭФМ на 8-й день после индукции трансдифференцировки; в – первичная культура ИНП; г – нейросферы, сформированные из ИНП и НП.

**Fig. 1.** Generation of iNP cells.

а – experiment design; б – iNP colonies in MEFs on day 8 after lentiviral transduction; в – iNP cells in the first passage; д – neurospheres from iNP and NP cells.

и продолжали их культивирование до получения культуры клеток. По морфологическим характеристикам полученная культура ИНП соответствовала нейрональным предшественникам (НП), полученным из головного мозга эмбрионов мыши (данные не приведены). При культивировании на адгезивном покрытии (желатин, ламинин) морфология ИНП и НП приближалась к нейроэпителиальной (рис. 1, в, г). Кроме того, оба типа клеток формировали сферообразные скопления (рис. 1, в, г). Важно отметить, что скорость пролиферации и морфология клеток на всем протяжении культивирования (около 4 мес.) оставались относительно стабильными.

Для ИНП и НП мы провели иммуноцитохимический анализ экспрессии двух маркеров нейральных предшественников: *Nestin* (рис. 2, а) и *Sox2* (данные не показаны). Мы обнаружили, что полученная культура ИНП экспрессирует *Sox2* (рис. 2, а). Однако экспрессия этого маркера в полученной линии клеток может быть обусловлена работой экзогенного *Sox2*, введенного при помощи вирусной трансдукции. Сигнал маркера *Nestin* незначительно превышал фоновый уровень, характерный для фибробластов (данные не приведены), хотя и был близок по интенсивности к сигналу, выявляемому в нейрональных предшественниках, полученных из головного мозга эмбрионов мыши.

Помимо иммуноцитохимического анализа, мы также провели ОТ-ПЦР анализ на следующие маркеры НСК: *Ascl1*, *Glast*, *Nestin* и *Pax6* (рис. 2, б). Было установлено, что в полученной линии клеток ИНП так же, как и в линии клеток НП, экспрессируются все вышеперечисленные маркеры. При этом в контрольных клетках фибробластов линии m5S экспрессия маркеров не наблюдалась. Однако экспрессия как минимум одного из вышеперечисленных факторов, *Nestin*, детектируется методом ОТ-ПЦР в культуре первичных фибробластов, не обработанных вирусом с *Sox2* (данные не приведены). Таким образом, выявленные молекулярные характеристики не позволяют однозначно оценить полноту репрограммирования полученных клеток.

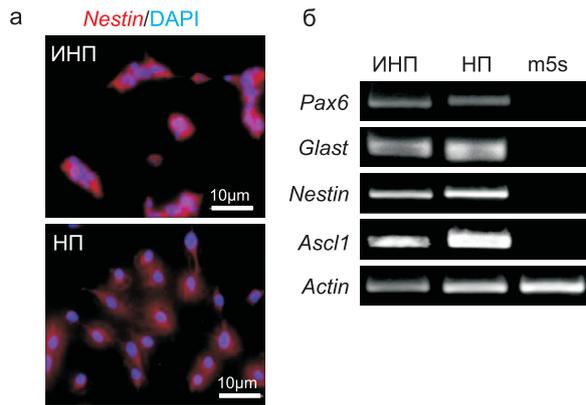
Наиболее важную информацию о полноте репрограммирования может дать тест на мультипотентность, т. е. способность полученных

ИНП дифференцироваться в три типа производных: нейроны, астроглию и олигодендроглию. Первым этапом данной работы был подбор условий для дифференцировки. Мы использовали около 30 комбинаций сред, добавок и покрытий. Определение наиболее оптимальных условий проводили по изменению морфологии клеток на сходную с морфологией нейрональных и глиальных, а также по выживаемости. Стоит отметить тот факт, что выживаемость клеток в этих экспериментах была крайне низка (10–20 % клеток). В итоге нами были отобраны несколько условий (рис. 3, а). В выбранных условиях индуцировали дифференцировку ИНП, через 7 дней клетки фиксировали и проводили иммуноцитохимический анализ на наличие экспрессии молекулярных маркеров нейронов (*Tubb3*) или глиальных клеток (*GFAP*) (рис. 3, б).

Было обнаружено, что при использовании среды, содержащей N2 Supplement, маркер астроглии *GFAP* экспрессировало подавляющее большинство клеток в культуре как ИНП, так и НП (рис. 3, б). Однако при анализе нейрональных маркеров ни при одном из условий дифференцировки в культуре ИНП *Tubb3*-позитивные клетки выявлены не были, хотя морфологически дифференцированные клетки соответствовали нейронам. Напротив, в культуре НП экспрессия гена *Tubb3* была обнаружена. Итак, в результате дифференцировки линии ИНП удалось получить только один тип клеток – астроциты. Следовательно, мультипотентность этих клеток не доказана.

### Получение нейрональных предшественников из клеток человека

Индукцию трансдифференцировки фибробластов человека проводили по схеме, используемой для фибробластов мыши (Ring *et al.*, 2012), с небольшими модификациями. Клетки, трансдуцированные вирусом, содержащим ген *Sox2*, собирали и пересаживали на неадгезивную поверхность для формирования сферообразных скоплений. На следующем этапе сферы культивировали на чашке, покрытой ламинином и поли-L-орнитином, где они распластывались и пролиферировали как монослойная культура. Две эти стадии культивирования чередовали два или три раза.

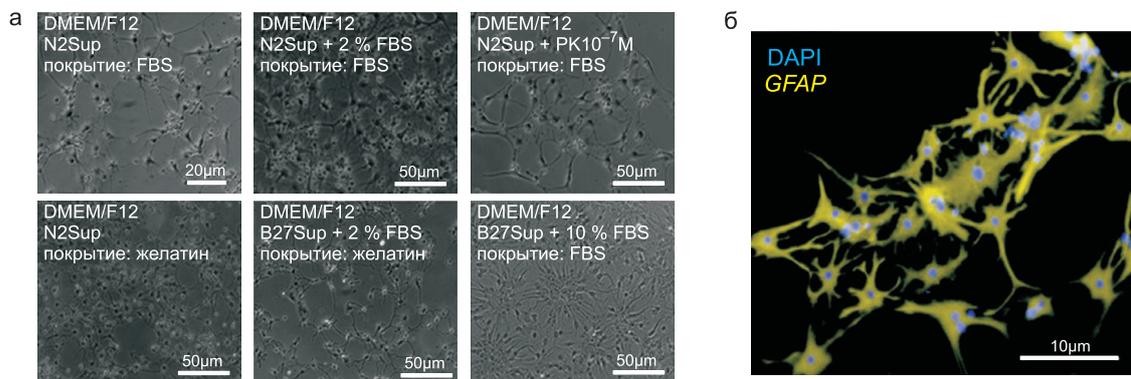


**Рис. 2.** Анализ экспрессии молекулярных маркеров НП.

а – иммуноцитохимический анализ культуры ИНП с антителами против Nestin; б – ОТ-ПЦР анализ культуры ИНП.

**Fig. 2.** Molecular marker expression in NP cells.

а – immunocytochemical analysis of iNP cell culture with antibodies against Nestin; б – RT-PCR analysis of iNP and NP cells.



**Рис. 3.** Подбор условий для дифференцировки ИНП.

а – изменчивость морфологии ИНП в зависимости от разных условий культивирования (день 5-й от начала индукции дифференцировки); б – окраска культуры ИНП на 7-й день после индукции дифференцировки антителами против GFAP.

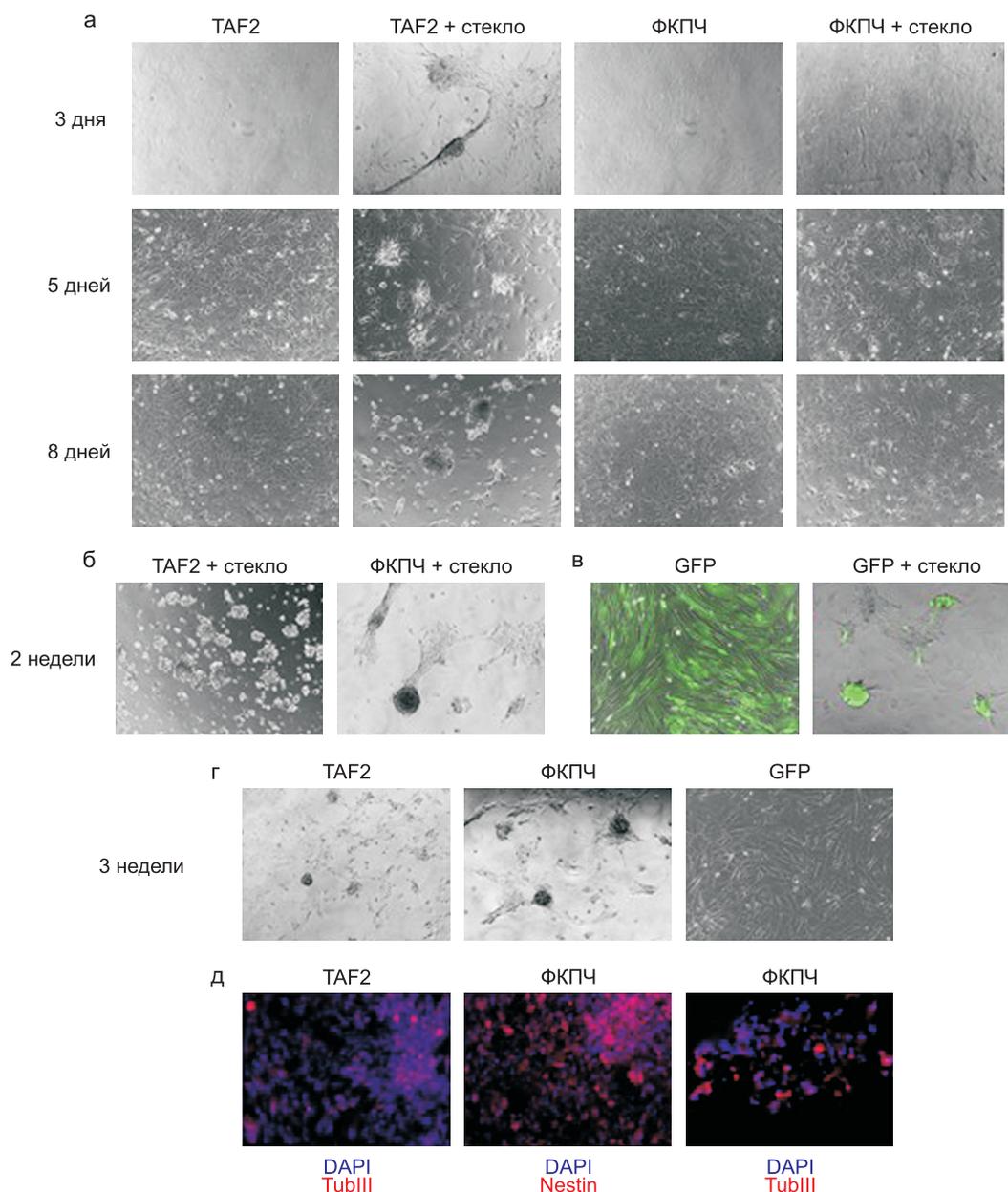
**Fig. 3.** Screening of culture conditions for iNP cells differentiation.

а – iNP cell morphology under different cell culture conditions (day 5); б – GFAP-antibody staining of iNP cells (day 7 of differentiation).

Мы провели несколько серий экспериментов по трансдукции фибробластов человека (TAF2 и ФКПЧ) вирусным вектором, несущим транскрипционный фактор *Sox2*. При этом клетки высевали либо на стекло, покрытое ламинином и поли-L-орнитином, либо на пластик с аналогичным покрытием. Для контроля эффективности заражения использовали вирусный вектор с *GFP*, которым трансдуцировали культуру фибробластов. Уже спустя трое суток в культуре TAF2 появились первые сферические скопления клеток, увеличивающиеся в количестве и размерах к 8–10-му дню (рис. 4, а). Следует отметить, что такие сферы образовывались только при культивировании на стекле. В культуре ФКПЧ сферы появились только через 2 недели (Si-ФКПЧ) (рис. 4, б). Однако сферические образования можно было наблюдать и в

контрольном эксперименте с вирусом, несущим ген *GFP* (рис. 4, в). Видимо, способность фибробластов образовывать после трансдукции сферы при культивировании на стекле не следует связывать исключительно с влиянием *Sox2*, как утверждает в статье Ринг с соавт. (Ring *et al.*, 2012). Спустя 3 недели, пройдя стадию культивирования в неадгезивных условиях и последующую стадию культивирования на адгезивной поверхности, покрытой ламинином и поли-L-орнитином, клетки существенно отличались по морфологии от контрольных фибробластов, трансдуцированных вирусом с *GFP* и культивировавшихся в сходных условиях (рис. 4, г).

В обеих полученных культурах, Si-TAF и Si-ФКПЧ, методом иммуноцитохимического анализа показано присутствие маркеров нейрональных клеток NESTIN и TUBB3 (рис. 4, д).



**Рис. 4.** Морфологические изменения в клетках фибробластов человека после трансдукции *Sox2* на 3-й, 5-й и 8-й день (а) и через 2 (б) и 3 (г) недели.

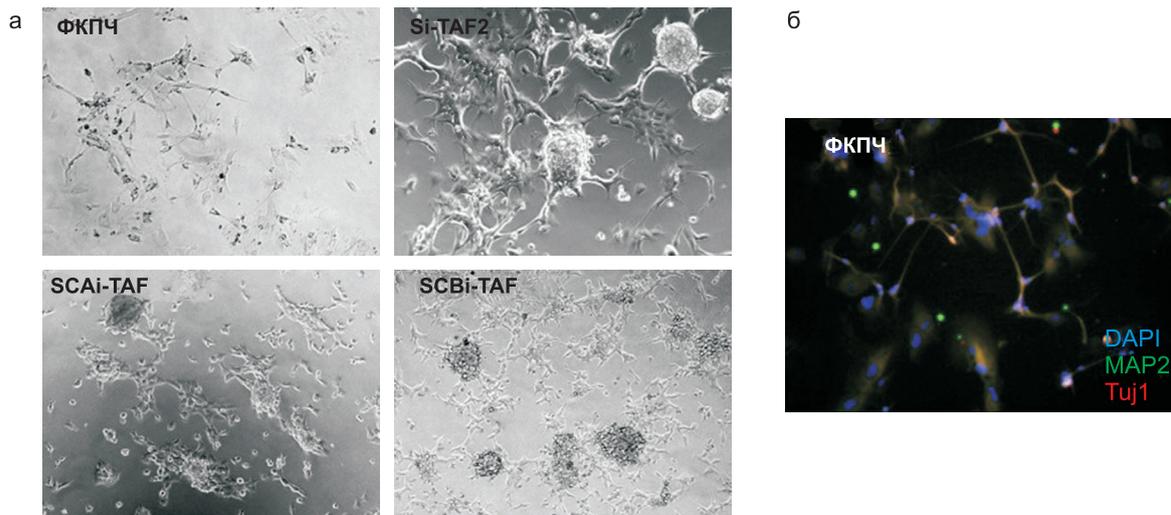
В качестве контроля представлены фотографии клеток TAF2 на 3-й день после трансдукции вирусом *GFP* (в). Иммуноцитохимический анализ 3-недельных культур клеток ФКПЧ и TAF2 с антителами против маркеров нейральных предшественников TUBB и NESTIN (д).

**Fig. 4.** Fibroblast cell morphology after *Sox2* transduction.

a – day 3, 5, and 8; б – 2 weeks; в – 3 weeks; д – TAF2 cells on day 3 after GFP transduction as a control; е – immunocytochemical analysis of 3-week cultures of HFF and TAF2 cells with antibodies against TUBB and NESTIN.

Экспрессия Nestin выявлена и методом ОТ-ПЦР. Интересно, что в отличие от эмбриональных фибробластов мыши в культуре фибробластов человека TAF2 экспрессии маркера Nestin обнаружено не было (данные ОТ-ПЦР).

Через два месяца в культуре трансдуцированных клеток ФКПЧ появились клетки, по морфологии напоминающие нейроны (рис. 5, а) и экспрессирующие MAP2 и TUBB3 (рис. 5, б). В это же время мы зафиксировали радикальное



**Рис. 5.** Морфология клеток линий.

а – ФКПЧ, Si-TAF, SCBi-TAF и SCAi-TAF; б – иммуноцитохимический анализ культуры ФКПЧ с антителами против маркеров нейронов Map2 и нейральных предшественников НСК MAP2 и TUBB.

**Fig. 5.** Morphology of cell lines.

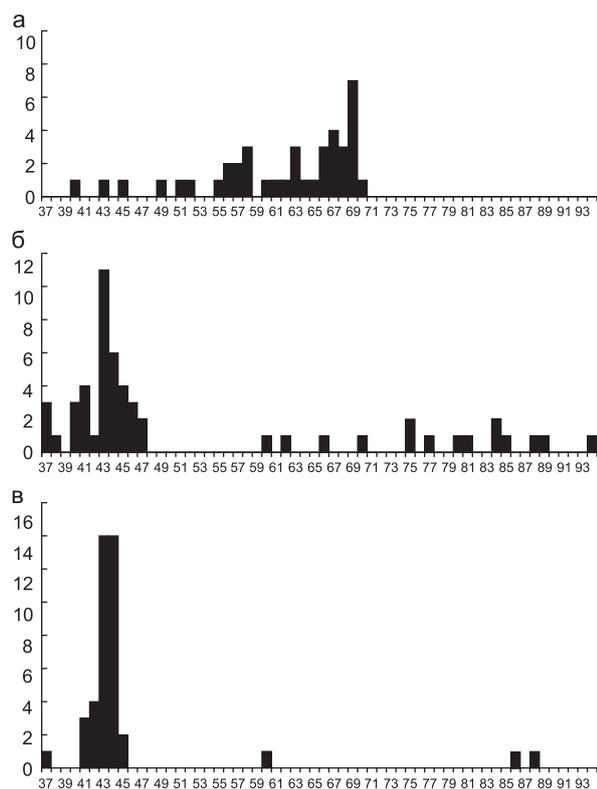
а – human foreskin fibroblasts, Si-TAF, SCBi-TAF and SCAi-TAF; б – immuno-cytochemical analysis of iNP cell culture with antibodies against MAP2 and TUBB.

снижение (вплоть до полного отсутствия) пролиферативной активности клеток этой культуры. Следует отметить, что при этом культивирование продолжалось в среде ReNCell++, не содержащей индукторов к дифференцировке. В то же время трансдуцированные *Sox2* фибробласты TAF2 (линия Si-TAF) напоминали по морфологии культуру нейральных предшественников (рис. 5, а) и интенсивно делились. Однако цитогенетический анализ данной культуры показал, что она полиплоидизировалась (рис. 6, а).

В некоторых работах (Ruggieri *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2014) было показано, что человеческие индуцированные нейрональные предшественники могут быть получены из фибробластов при трансдукции их набором из трех транскрипционных факторов: *Sox2*, *c-Myc*, а также *Brn2* или *Brn4*.

Мы трансфицировали человеческие фибробласты линии TAF2 комплексом факторов: *Sox2*, *c-Myc* и *Ascl* либо *Brn2*. Трансформацию проводили по протоколу, описанному ранее для *Sox2*. В результате спустя 2 месяца были получены две культуры: SCAi-TAF (трансфекция факторами *Sox2*, *c-Myc* и *Ascl*) и SCBi-TAF (трансфекция факторами *Sox2*, *c-Myc* и *Brn2*). По морфологии они были сходны с

культурой, полученной с одним *Sox2*. Они также имели характерную морфологию «сетки», активно образовывали сферы в ее «узлах», за исключением того, что клетки SCAi-TAF были более округлыми по форме, а SCBi-TAF – более вытянутыми и отростчатыми (рис. 5, а). На основании морфологических характеристик можно было бы ожидать и сходство по маркерным характеристикам, однако окраска клеток полученных линий антителами к маркерам нейральных предшественников (SOX2, NESTIN, TUBB3), дифференцированных нейронов (MAP2), астроглии (GFAP), олигодендроглии (OLIG2) и фибробластов (Fibronectin) показала, что уровень экспрессии этих маркеров варьирует в проанализированных культурах и не полностью соответствует паттерну, ожидаемому для культур ИНП (табл. 2). На основании полученных данных трудно сказать, являются ли полученные линии полноценными ИНП или нет. Кроме того, проведенный цитогенетический анализ линий SCBi-TAF и SCAi-TAF показал в них редуцированное число хромосом, наличие большого количества анеуплоидий и перестроенных хромосом, которые невозможно охарактеризовать без применения специфических проб (рис. 6, б, в).



**Рис. 6.** Хромосомный состав в линиях клеток: а – Si-TAF; б – SCBi-TAF; в – SCAi-TAF.

По оси X отобразено число хромосом, по оси Y – количество клеток с данным числом хромосом.

**Fig. 6.** Chromosome numbers in cell lines. a – Si-TAF; b – SCBi-TAF; c – SCAi-TAF.

X-axis: number of chromosomes; Y-axis, number of cells with the corresponding chromosome number.

Важно отметить, что как исходная культура TAF2, так и полученные из нее индуцированные плюрипотентные стволовые клетки имели нормальный кариотип без хромосомных перестроек (Неопубл. данные).

Таким образом, экзогенная сверхэкспрессия *Sox2* обеспечивала получение культуры с высоким пролиферативным потенциалом только в случае нарушения кариотипа и/или полиплоидизации исходных клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе нами была предпринята попытка получения ИНП из фибробластов мыши и человека путем экзогенной экспрессии фактора *Sox2*. Как в случае клеток мыши, так и в случае клеток человека мы обнаружили значительные изменения морфологии фибробластов, обработанных вирусом. Однако морфология контрольных (инфицированных вирусом, несущим зеленый белок) клеток в условиях, близких к условиям культивирования ИНП, также менялась, что не позволяет использовать изменение морфологии в качестве критерия появления в культуре ИНП. Нами было показано присутствие маркеров ИП в культурах ИНП, и в частности экспрессия маркерного гена *Nestin* в этих клетках. Экспрессия *Nestin* широко используется как маркер ИП (Ring *et al.*, 2012; Ruggieri *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2014). Однако мы обнаружили, что тест на экспрессию гена *Nestin* может давать ложнопозитивный результат из-за присутствия определенного уровня экспрессии этого гена в культуре эмбриональных фибробластов, как было выявлено при анализе клеток мыши. Более того, мы показали, что ИНП мыши, экспрессирующие ген *Nestin*, не обладают способностью к формированию различных типов нейрональных клеток, в частности не способны давать начало зрелым нейронам. Таким образом, полученные культуры не являются полноценными аналогами ИП.

**Таблица 2**

### Иммуноцитохимическое окрашивание клеток линий Si-TAF, SCBi-TAF и SCAi-TAF и фибробластов человека

Линии клеток	Sox2	Nestin	Tubb3	Map2	Gfap	Olig2	Fibronectin
Si-TAF	+++	++	H	+	+	H	H
SCAi-TAF	+	+++	H	+	++	–	+++
SCBi-TAF	+++	+	+	–	+	H	+
TAF2	–	–	–	–	–	H	+++

+++ интенсивно во всех клетках; ++ в части клеток и неравномерно; + наблюдается в единичных клетках; H – не определялся.

При анализе ИНП человека нами были получены четыре культуры. Несмотря на экспрессию гена *Nestin* (существенно превышающую уровень экспрессии этого гена в исходной культуре фибробластов человека), все культуры по своим характеристикам оказались далеки от нормальных ИП человека. Так, культуры Si-ФКПЧ имели низкий пролиферативный потенциал, а клетки культуры Si-TAF, SCBi-TAF и SCAi-TAF характеризовались аномальным кариотипом. И в том, и в другом случаях выявленные характеристики ставят существенное ограничение, не позволяющее использовать описанную методику получения ИНП в медицине.

Выявленные нами различия в культурах ИНП человека позволяют предположить, что опубликованные протоколы получения ИНП путем экзогенной экспрессии *Sox2* обладают низкой воспроизводимостью. Не исключено, что в ряде случаев возможно получение полноценных ИНП, сходных по своим характеристикам с ИП, однако для этого необходимы увеличение количества анализируемых линий клеток и отбор линий ИНП с высокой пролиферативной способностью и потенциалом к дифференцировке. Кроме того, полученные нами результаты показывают, что при проведении отбора линий необходим их детальный анализ, включающий кариотипирование и молекулярную характеристику количественными методами.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Интеграционного проекта СО РАН № 136, проекта РФФИ № 13-04-00441, а также грантов Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010

## ЛИТЕРАТУРА

- Присяжнюк И.Е., Матвеева Н.М., Графодатский А.С., Сердюкова Н.А., Серов О.Л. Хромосомный состав межвидовых эмбриональных стволовых гибридных клеток мыши // Цитология. 2010. Т. 52. Вып. 2. С. 136–143.
- Pristiazhniuk I.E., Matveeva N.M., Grafodatskiĭ A.S., Serdiukova N.A., Serov O.L. Analysis of chromosome sets in interspecific embryonic stem hybrid cells of mice // Tsitologiya. 2010. V. 52. No. 2. P. 136–143. (In Russian).
- Heinrich C., Blum R., Gascon S., Masserdotti G., Tripathi P., Sanchez R., Tiedt S., Schroeder T., Gotz M., Berninger B. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons // Plos Biol. 2010. V. 8. No. 5. e1000373.
- Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayaishi Y., Bruneau B.G., Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors // Cell. 2010. V. 142. No. 3. P. 375–386.
- Jessberger S., Gage F.H. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans // Trends Cell Biol. 2014. V. 24. No. 10. P. 558–563.
- Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine // Genes Dev. 2005. V. 19. P. 1129–1155.
- Kruglova A.A., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Gridina M.M., Golubitsa A.N., Serov O.L. Embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells with near-tetraploid karyotype provide high yield of chimeras // Cell Tissue Res. 2008. V. 334. P. 371–380.
- Marión R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M.A. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity // Nature. 2009. V. 460. P. 1149–1153.
- Mouhieddine T.H., Kobeissy F.H., Itani M., Nokkari A., Wang K.K.W. Stem cells in neuroinjury and neurodegenerative disorders: Challenges and future neurotherapeutic prospects // Neural Regen. Res. 2014. V. 9. P. 901–906.
- Ring K.L., Tong L.M., Balestra M.E., Javier R., Andrews-Zwilling Y., Li G., Walker D., Zhang W.R., Kreitzer A.C., Huang Y. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. No. 1. P. 100–109.
- Ruggieri M., Riboldi G., Brajkovic S., Bucchia M., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. Induced neural stem cells: Methods of reprogramming and potential therapeutic applications // Progr. Neurobiol. 2014. V. 114. P. 15–24.
- Sasaki M.S., Kodama S. Establishment and some mutational characteristics of 3T3-like near-diploid mouse cell line // J. Cellular Physiol. 1987. V. 131. P. 114–122.
- Sekiya S., Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors // Nature. 2011. V. 475. No. 7356. P. 390–393.
- 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.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // Nature. 2010. V. 463. No. 7284. P. 1035–1041.
- Villegas J., McPhaul M. Establishment and culture of human skin fibroblasts // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2005. Unit 28.3.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state // Nature. 2007. V. 448. P. 318–324.
- Zhong B., Watts K.L., Gori J.L., Wohlfahrt M.E., Enssle J., Adair J.E., Kiem H.-P. Safeguarding nonhuman primate iPS cells with suicide genes // Mol. Ther. 2011. V. 19. P. 1667–1675.
- Zou Q., Yan Q., Zhong J., Wang K., Sun H., Yi X., Lai L. Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 5250–5260.

## DIRECT CONVERSION OF SOMATIC CELLS TO NEURONAL PRECURSORS: PROBLEMS AND OUTLOOKS

I.E. Pristyazhnyuk, T.A. Shnayder, V.S. Fishman, N.M. Matveeva, O.L. Serov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: serov@bionet.nsc.ru

### Summary

The generation of multipotent patient-specific neural precursors from human fibroblasts is one of the challenges to regenerative medicine. Recently, a novel approach was offered. This method allows direct conversion of human and mouse fibroblasts into induced neuronal precursor (iNP) cells by overexpression of a single transcription factor, *Sox2*. In this study, we analyzed iNP cells produced from human and mouse fibroblasts by lentivirus transduction with *Sox2* and evaluated the medical prospects of this method. Both mouse and human fibroblasts demonstrated pronounced morphological changes after treatment with *Sox2*, and the resulting iNP cells were morphologically similar to wild-type ones derived from the mouse embryonic brain. Human and mouse iNP cells expressed NP molecular markers. However, induced differentiation of mouse iNP cells in vitro failed to produce three types of neural cells such as neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. In addition to *Sox2*, we treated human fibroblasts with *c-Myc* in combination with *Ascl* or *Brn2*. One of the obtained cell lines had a low proliferative potential, but others intensely divided. Cytogenetic analysis of these cell lines showed that they had aberrant chromosome sets. In our opinion, both mouse and human iNP cells produced by this protocol have limited application in medicine. Thus, iNP cells derived in our experiments are not equivalent to wild-type NP cells. We conclude from our results that the protocol is poorly reproducible.

**Key words:** neurogenesis, transdifferentiation, neural stem cells, patient-specific neural cells, *Sox2*.