

## НЕЙРОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: ТРАНСГЕННЫЙ ПОДХОД

© А. В. Шахбазов,<sup>1,\*</sup> С. М. Космачева,<sup>2</sup> Н. А. Картель,<sup>1</sup> М. П. Потаннев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

и <sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, Минск, Беларусь;

\* электронный адрес: shakhbazau@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) помимо традиционных остеогенного, хондрогенного и адипогенного путей дифференцировки, по данным многих исследователей, способны и к дифференцировке в нейрональном направлении. В настоящем обзоре рассматриваются генно-инженерные подходы к данному направлению, включающие в себя экспрессию в МСК нейротрофных факторов, сигнальных молекул и прочих трансгенов с нейрогенными свойствами.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, нейрогенная дифференцировка, трансген, трансдукция.

Стволовые клетки, играющие ключевую роль в формировании и функционировании организма на различных стадиях развития, являются одним из наиболее активно изучаемых объектов современной эмбриологии, физиологии и генетики. В частности, стволовые клетки взрослого организма привлекают внимание исследователей благодаря своей уникальной роли клеточного резервуара для поддержания и восстановления функции органов и тканей. Среди плюрипотентных популяций взрослого организма наиболее исследованы мезенхимные стволовые клетки (МСК), выделяемые из костного мозга (КМ), пуповинной и периферической крови и других источников. МСК являются популяцией стволовых клеток, способных к дифференцировке в различные типы тканей — остеобласты, хондроциты, адипоциты, миообласты, гепатоциты и др. (Friedenstein et al., 1976; Freshney et al., 2007). МСК человека сохраняют способность к пролиферации и дифференцировке при культивировании *in vitro*, а также при реимплантации, что обуславливает их высокую значимость в клинической практике (Bang et al., 2005; Katritsis et al., 2005; Freshney et al., 2007).

Кроме того, есть данные о возможности получения из МСК нейрональных предшественников с последующей дифференцировкой их в клетки нервной ткани (нейроны, астроциты, олигодендроциты) (Hermann et al., 2004; Long et al., 2005; Kim et al., 2006). На основе анализа экспрессии в индуцированных МСК маркеров, специфичных для нервной ткани, электрохимических свойств клеток и секреции нейротрансмиттеров многие исследователи делают вывод о способности МСК-производных нейроноподобных клеток выполнять функции клеток нервной системы (Keene et al., 2003; Ortiz-Gonzalez et al., 2004; Long et al., 2005).

При нейрогенной дифференцировке МСК, как правило, используются комбинации химических агентов, специфических нейрогенных сред и ростовых факторов

(EGF, bFGF, NGF, BDNF, ретиноевая кислота и др.) (Long et al., 2005; Kim et al., 2006), вызывающие запуск экспрессии генов, характерных для стволовых клеток нервной ткани (НСК). В то же время некоторые авторы (Bertani et al., 2005; Chen et al., 2006) сомневаются в возможности подобного переключения стволовых клеток мезодермального происхождения и получения на их основе полноценных нервных клеток, указывая на возможность ложноположительных результатов при попытках нейрогенной дифференцировки МСК. Отмечаются, в частности, нетипичный для НСК характер роста МСК-производных нейроноподобных клеток, аберрантная локализация нейрональных маркеров, а также возможность присутствия их транскриптов на фоновом уровне в самих МСК (Deng et al., 2006). По данным микрочипового анализа 21 000 генов показано несоответствие дифференцированно экспрессированных генов в МСК-производных нейроноподобных клетках и клетках собственно нервных тканей (Bertani et al., 2005). Впрочем, анализ профиля экспрессии МСК в других протоколах нейрогенной дифференцировки показал падение уровня экспрессии генов, участвующих в осте-, хондро- и адипогенезе при повышении уровня экспрессии генов, задействованных в нейрогенезе (Yamaguchi et al., 2006; Tondreau et al., 2008).

Достоинства и недостатки культуральных методов нейрогенной индукции МСК подробно рассмотрены в ряде статей, включая обзорные (Keene et al., 2003; Hermann et al., 2004; Ortiz-Gonzalez et al., 2004; Long et al., 2005; Kim et al., 2006). В нашем обзоре мы попытались обобщить биоинженерные подходы, подразумевающие введение в МСК трансгена с нейрогенной функцией. Генно-инженерная модификация одним или несколькими трансгенами является подходом, способным обеспечить радикальное переключение и изменение характера функционирования клеток взрослого организма, ярким примером чего являются, в частности, сообщения об индукции

плюрипотентности терминально дифференцированных клеток (Takahashi et al., 2007). Экспрессия посредством векторных конструкций известных регуляторов транскрипции, нейрогенных и нейротрофных факторов может способствовать повышению потенциала нейрогенной дифференцировки МСК. Факторы, влияние которых на развитие нервной системы достаточно хорошо изучено, могут как непосредственно обеспечивать дифференцировку стволовых клеток в нейрональном направлении, так и способствовать повышению стрессоустойчивости клеток и стабилизировать их фенотип после трансплантации (Kohyama et al., 2001; Dezawa et al., 2004).

Потенциальный набор генов-кандидатов для модификации МСК человека с целью повышения их нейрогенного потенциала достаточно широк. В подходах к решению этой задачи применялись как регуляторы транскрипции, предположительно способные индуцировать трансдифференцировку МСК, такие как *noggin* или *NICD*, так и нейротрофные факторы, обеспечивающие жизнедеятельность нейронов и глии и способные запускать дифференцировку нейротрансмиттерных фенотипов.

Так, нейрогенный потенциал продукта гена *noggin*, имеющего плеiotропный эффект, видимо, обусловлен тем, что этот фактор является ингибитором сигнальных молекул семейства TGF- $\beta$ , в частности BMP-4. Ноггин участвует в формировании морфогенных градиентов и развитии нервной системы в эмбриогенезе, стимулирует нейрогенез и подавляет глиальную дифференцировку. Трансфекция МСК геном *noggin* приводила к формированию нейросфероподобных агрегатов, которые при посадке на орнитин/фибронектин преобразовывались в клетки нейрональной морфологии. При этом постмитотический маркер нейронов MAP-2 экспрессировался в 50 % клеток (Kohyama et al., 2001).

МСК, трансфицированные геном *NICD* (кодирует внутриклеточный домен Notch), могут быть преобразованы в нейроноподобные клетки при участии комбинации ростовых факторов bFGF, CNTF и фторсколина в течение 5 сут (Dezawa et al., 2004). Полученные таким образом трансгенные клетки являлись постмитотическими, демонстрировали характерные электрохимические свойства и экспрессию маркера MAP-2, а при дальнейшем воздействии нейротрофного фактора GDNF генерировали тирозиназа-позитивные клетки, способные к секреции допамина (Dezawa et al., 2004).

Ген *NT-3* (*NTF3*) кодирует нейротрофин-3, сходный по функции с фактором роста нервов (NGF) и контролирующей жизнеспособность и дифференцировку нейронов. Нейротрофин-3 участвует в обеспечении как развития нейронов в эмбриогенезе, так и функционирования взрослой нервной системы. МСК, трансдуцированные геном *NT-3* посредством аденовирусного вектора, демонстрировали повышенную экспрессию нейрональных маркеров NF и MAP-2 (в 19 % клеток против 5 % в контроле), особенно выраженную в присутствии ретиноевой кислоты (свыше 46 % клеток). Сочетание трансгена *NT-3* и ретиноевой кислоты позволило также добиться экспрессии в 22 % клеток PSD95 — маркера синаптогенеза, что может свидетельствовать о терминальной дифференцировке МСК в нейроны (Zhang et al., 2006).

Ген *BDNF* также кодирует белок семейства факторов роста нервов. BDNF необходим для поддержания жизнеспособности нейронов головного мозга, участвует в регуляции ответа на стрессовые раздражители; снижение его экспрессии играет роль в патогенезе болезней Хан-

тингтона и Альцгеймера. Ретровирусная трансдукция МСК геном *BDNF* с последующим культивированием в присутствии ретиноевой кислоты позволила получить клетки, обладающие фенотипом и профилем экспрессии, соответствующим различным типам нервной ткани. В частности, была показана экспрессия прогениторного маркера нестина, нейронального маркера NeuN, маркера олигодендроцитов O4 и маркера астроцитов GFAP; электрохимические свойства трансгенных клеток были подтверждены методом патч-кламп (Zhao et al., 2004).

Аденовирусная трансдукция МСК генами *RB* и *RB2/p130*, участвующими в контроле клеточного цикла и нейрогенезе (Lee et al., 1992; LeCouter et al., 1998), также показала их способность к стимуляции нейрогенной дифференцировки, что подтверждалось повышением экспрессии NSE (нейрон-специфичной энолазы) и нейрофиламентов. При этом ген *RB2/p130* стимулировал нейрогенез в целом, тогда как *RB* — преимущественно холинергическую дифференцировку (Jori et al., 2005).

Свойства гиперэкспрессированных в МСК нейротрофинов не ограничиваются их участием в нейрогенезе. Трансплантация животным МСК человека, трансдуцированных геном нейротрофного фактора мозга (*BDNF*), показала повышенный защитный эффект трансгенных МСК в отношении ишемических повреждений мозга (Hamada et al., 2005). Аналогичный эффект показала интродукция в МСК человека трансгена *GDNF*, но не *CNTF* либо *NT-3* (Kurozumi et al., 2005). Трансдукция МСК человека геном *PIGF*, кодирующим ростовой фактор плаценты, показала роль этого фактора в нейропротекции при церебральной ишемии (Liu et al., 2006).

Перспективным может оказаться введение в геном индуцированных в нейрональном направлении МСК трансгенов, ранее зарекомендовавших себя потенциально полезными в отношении терапии заболеваний нервной системы. Так, экспрессия в трансплантируемых стволовых клетках гена *ngn2* (кодирует нейрогенин-2) показала ключевую роль данного регулятора в стабилизации функции нейронов при терапии травм спинного мозга (Hofstetter et al., 2005). Экспрессия двух основных белков конуса роста, GAP-43 и CAP-23, может существенно стимулировать рост аксонов трансгенных нейронов, что может способствовать восстановлению спинного мозга (Bomze et al., 2001). Трансфекция генов *ngn1* и *MASH1* также может способствовать нейрогенезу (Tang, Low, 2007).

Перспективы использования вышеприведенных генно-инженерных подходов обуславливают необходимость оценки стабильности экспрессии трансгена в МСК костного мозга человека в нейрогенных условиях. Полученные нами данные по трансдукции МСК КМ человека векторами на основе рекомбинантных лентивирусов и адено-ассоциированных вирусов (Шахбазов и др., 2009), а также результаты коллег (Gordon et al., 2008) свидетельствуют о сохранении стабильной экспрессии трансгена при нейрогенной индукции МСК. Более того, трансдукция МСК каталитической субъединицей теломеразы человека hTERT позволяет, иммортализуя МСК без признаков неопластической трансформации, сохранить потенциал к нейрогенной дифференцировке на протяжении как минимум 40 удвоений популяции (Kobune et al., 2003).

Доставка трансгена в МСК может осуществляться физическими методами (например, электропорацией), химической трансфекцией с использованием различных ДНК-связывающих агентов, а также посредством векторов на основе рекомбинантных вирусов. Химические и

физические методы трансфекции МСК, как правило, обеспечивают транзитный характер экспрессии трансгена и нередко сопряжены с высокой цитотоксичностью (Aluigi et al., 2006). Для вирусной трансдукции МСК были успешно адаптированы различные рекомбинантные вирусы. Так, лентивирусные векторы обеспечивают высокую степень трансдукции и стабильную экспрессию трансгена (Van Damme et al., 2006), аденовирусы характеризуются транзитным характером экспрессии при высокой емкости упаковки (Zhang et al., 2006), а адено-ассоциированные вирусы (Kim et al., 2007) требуют для эффективной трансдукции весьма высокой множественности инфекции (МОИ). Использовались также векторы на основе бакуло-вирусов (Ho et al., 2005) и ретровирусов (Lee et al., 2001).

Развитие генно-инженерных подходов к индукции трансдифференцировки МСК позволит существенно дополнить область их клинического применения, а также улучшить фундаментальное понимание принципов функционирования потенциально полезных генов. При трансплантации в ЦНС нейротрофин-трансгенные МСК и их производные помимо восстановления поврежденной функции, возможно, смогут способствовать нейропротекции и нейрогенерации посредством паракринного высвобождения нейротрофного фактора. Разработка надежных методов нейрогенной дифференцировки позволит создавать из МСК КМ конкретного пациента популяции нейрональных предшественников и впоследствии зрелых нейронов и глиальных клеток, что в будущем может представлять интерес для заместительной терапии. Трансплантация аутологичных нейротрофин-трансгенных МСК способна существенно расширить потенциал клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний и травм нервной системы.

### Список литературы

Шахбазов А. В., Северин И. Н., Грунев В. В., Гончарова Н. В., Космачева С. М., Картель Н. А., Потанин М. П. 2009. Стабильность экспрессии лентивектора в МСК человека при ранней нейрогенной дифференцировке. Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2 : 18—21.

Aluigi M., Fogli M., Curti A., Isidori A., Baccarani M., Lomeli R. M. 2006. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24 : 454—461.

Bang O. Y., Lee J. S., Lee P. H., Lee G. 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol*. 57 : 874—882.

Bertani N., Malatesta P., Volpi G., Sonogo P., Ferris R. 2005. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J. Cell Sci*. 118 : 3925—3936.

Bomze H. M., Bulsara K. R., Iskandar B. J., Caroni P., Skene J. H. 2001. Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat. Neurosci*. 4 : 38—43.

Chen Y., Teng F. Y., Tang B. L. 2006. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. *Cell Mol. Life Sci*. 63 : 1649—1657.

Deng J., Petersen B. E., Steindler D. A., Jorgensen M. L., Laywell E. D. 2006. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*. 24 : 1054—1064.

Dezawa M., Kanno H., Hoshino M. 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Invest*. 113 : 1701—1710.

Freshney R. I., Stacey G. N., Auerbach J. M. (Eds). 2007. Culture of human stem cells. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc. 256 p.

Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol*. 4 : 267—274.

Gordon D., Glover C. P., Merrison A. M., Uney J. B., Scolding N. J. 2008. Enhanced green fluorescent protein-expressing human mesenchymal stem cells retain neural marker expression. *J. Neuroimmunol*. 193 : 59—67.

Hamada H., Kobune M., Nakamura K. 2005. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci*. 96 : 149—156.

Hermann A., Gastl R., Liebau S. 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci*. 117 : 4411—4422.

Ho Y. C., Chung Y. C., Hwang S. M. 2005. Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *J. Gene Med*. 7 : 860—868.

Hofstetter C. P., Holmstrom N. A., Lilja J. A. 2005. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat. Neurosci*. 8 : 346—353.

Jori F. P., Melone M. A., Napolitano M. A. 2005. *RB* and *RB2/p130* genes demonstrate both specific and overlapping functions during the early steps of *in vitro* neural differentiation of marrow stromal stem cells. *Cell Death Differ*. 12 : 65—77.

Katritsis D. G., Sotiropoulou P. A., Karvouni E. 2005. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Cather. Cardiovasc. Interv*. 65 : 321—329.

Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Jiang Y. 2003. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell Transplant*. 12 : 201—213.

Kim S., Honmou O., Kato K. 2006. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res*. 1123 : 27—33.

Kim S. J., Lee W. I., Heo H. 2007. Stable gene expression by self-complementary adeno-associated viruses in human MSCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 360 : 573—579.

Kobune M., Kawano Y., Ito Y., Niitsu Y., Hamada H. 2003. Tetramerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp. Hematol*. 31 : 715—722.

Kohyama J., Abe H., Shimazaki T. 2001. Brain from bone: efficient «meta-differentiation» of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with *Noggin* or a demethylating agent. *Differentiation*. 68 : 235—244.

Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T. 2005. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther*. 11 : 96—104.

LeCouter J. E., Kablar B., Whyte P. F. 1998. Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related *p130* gene. *Development*. 125 : 4669—4679.

Lee E. Y., Chang C. Y., Hu N. 1992. Mice deficient for *Rb* are nonviable and show defects in neurogenesis and hematopoiesis. *Nature*. 359 : 288—294.

Lee K., Majumdar M. K., Buyaner D. 2001. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol. Ther*. 3 : 857—866.

Liu H., Honmou O., Harada K. 2006. Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Brain*. 129 : 2734—2745.

Long X., Olszewski M., Huang W. 2005. Neural cell differentiation *in vitro* from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Develop*. 14 : 65—69.

Ortiz-Gonzalez X. R., Keene C. D., Verfaillie C. M. 2004. Neural induction of adult bone marrow and umbilical cord stem cells. *Curr. Neurovasc. Res*. 1 : 207—213.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131 : 861—872.

Tang B. L., Low C. B. 2007. Genetic manipulation of neural stem cells for transplantation into the injured spinal cord. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27 : 75—85.

Tondreau T., Dejeneffe M., Meuleman N. 2008. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *BMC Genomics.* 9 : 166.

Van Damme A., Thorrez L., Ma L. 2006. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells.* 24 : 896—907.

Yamaguchi S., Kuroda S., Kobayashi H. 2006. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stro-

mal cells (BMSC) — a preliminary study using microarray analysis. *Brain Res.* 1087 : 15—27.

Zhang W., Zeng Y. S., Zhang X. B. 2006. Combination of adenoviral vector-mediated neurotrophin-3 gene transfer and retinoic acid promotes adult bone marrow cells to differentiate into neuronal phenotypes. *Neurosci. Lett.* 408 : 98—103.

Zhao L. X., Zhang J., Cao F. 2004. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. *Exp. Neurol.* 190 : 396—406.

Поступила 6 VII 2009

#### NEUROGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS: A TRANSGENIC APPROACH

A. V. Shakhbazau,<sup>1</sup> \* S. M. Kosmacheva,<sup>2</sup> N. A. Kartel,<sup>1</sup> M. P. Potapnev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Cytology of Natl. Acad. Sci. of Belarus Minsk, Belarus,

<sup>2</sup> Republic Centre for Haematology and Transfusiology, Minsk, Belarus;

\* e-mail: shakhbazau@gmail.com

Mesenchymal stem cells (MSC), alongside with «traditional» osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation potentials, are considered by many researches as capable of giving rise to neurogenic lineage as well. We overview transgenic approaches to the study of neurogenic differentiation of MSC, including expression of neurotrophic factors, signalling molecules and other transgenes with neurogenic properties.

Key words: mesenchymal stem cells, neurogenic differentiation, transgene, transduction.