

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК. ПРОБЛЕМЫ И РЕШЕНИЯ

© Т. А. Шнайдер,¹ В. С. Фишман,^{1, 2} М. А. Лисковых,³ С. В. Понамарцев,³
О. Л. Серов,^{1, 4} А. Н. Томилин,³ Н. Аленина^{2, 3,*}

¹ Институт цитологии и генетики РАН, Новосибирск,

² Центр молекулярной медицины Макса-Дельбрюка, Берлин-Бух, Германия

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

⁴ Новосибирский государственный университет;

* электронный адрес: alenina@mdc-berlin.de

Организм взрослого млекопитающего состоит из более 200 типов различных специализированных соматических клеток, дифференцированное состояние которых остается стабильным в течение жизни организма. Долгое время считалось, что процесс дифференцировки необратим и переход между двумя типами специализированных клеток невозможен. Впервые возможность прямого превращения одного типа дифференцированных клеток в другой был показан в 80-е годы прошлого века в экспериментах по превращению фибробластов в миоциты посредством эктопической экспрессии транскрипционного фактора *MyoD*. Удивительно, но долгое время эта технология оставалась невостребованной в клеточной биологии. Интерес к ней возродился после того, как в 2006 г. благодаря исследованиям нобелевского лауреата Шинъя Яманаки было показано, что небольшой набор транскрипционных факторов (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) способен восстановить плорипотентность в соматических клетках, утраченную ими в процессе дифференцировки. Используя сходную стратегию, но тканеспецифичные транскрипционные факторы, Вербухен и соавторы в 2010 г. показали возможность прямой конверсии фибробластов в нейроны, т. е. принципиальную возможность трансдифференцировки одного типа соматической клетки в другой (Vierbuchen et al., 2010). Работы этих авторов явились грандиозным прорывом в области клеточной биологии и дали мощный толчок развитию клеточных технологий для нужд регенеративной медицины. В настоящем обзоре рассматриваются основные исторические открытия, которые предшествовали этим работам, оцениваются состояние проблемы и прогресс в развитии методов репрограммирования в настоящее время, описываются основные подходы к решению проблем репрограммирования соматических клеток в нейрональные, а также кратко рассматривается перспектива применения репрограммирования и трансдифференцировки клеток для таких важных прикладных областей, как регенеративная медицина, заместительная клеточная терапия и скрининг лекарственных препаратов.

Ключевые слова: репрограммирование, трансдифференцировка, нейроны.

Принятые сокращения: иНК — индуцированные нейрональные клетки, иНСК — индуцированные нейрональные стволовые клетки, иПСК — индуцированные плорипотентные стволовые клетки, НСК — нейрональные стволовые клетки, ТФ — транскрипционные факторы, ЭКК — эмбриональные клетки, карциномы, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, ЭПК — эмбриональные половые клетки, ЭФМ — эмбриональные фибробlastы мыши.

Развитие организма млекопитающих представляет собой сложный процесс, в результате которого программа развития, заложенная в totipotentной клетке — зиготе, реализуется в виде формирования более 200 специализированных клеточных типов взрослого организма. Специализация соматических клеток происходит благодаря процессу дифференцировки, который сопровождается потерей первоначальной totipotентности. На молекулярном уровне процесс дифференцировки клеток сопровождается глобальным изменением профиля экспрессии генов и эпигенетическими изменениями, такими как изменение статуса метилирования генома, модификация гистоновых белков и др. Морфологическая и функциональ-

ная стабильность дифференцированных клеток устанавливается и поддерживается работой комплекса транскрипционных и эпигенетических факторов. Долгое время считалось, что процесс дифференцировки необратим и переход между двумя типами специализированных клеток невозможен. Однако в 50-е годы прошлого столетия были получены доказательства пластичности генома соматических клеток, выразившейся в восстановлении клетками утраченного при дифференцировке потенциала (Gurdon 1962; Gurdon, Uehlinger, 1966).

Конверсия одного клеточного типа в другой (трансдифференцировка) или восстановление плорипотентности в соматических клетках связано с репрограммирова-

нием их геномов, т. е. с радикальным изменением профиля экспрессирующихся генов и приобретением нового, свойственного другому типу клеток. Впервые прямая конверсия между двумя типами дифференцированных клеток была показана в 80-е годы прошлого века. Оказалось, что эктопическая экспрессия транскрипционного фактора (ТФ) *MyoD* в фибробластах вызывает их превращение в миобlastы, т. е. другой клеточный тип (Davis et al., 1987). Однако долгое время данная технология оставалась невостребованной в клеточной биологии. Интерес к ней возродился вновь после того, как была оценена роль ТФ в репрограммировании геномов соматических клеток. В 2006 г. Такахashi и Яманака (Takahashi, Yamanaka, 2006) показали, что эктопическая экспрессия четырех ТФ — *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* — в фибробластах вызывает их репрограммирование и восстановление в них плорипотентности на уровне клеток внутренней массы бластиоцита. Известно, что клетки этой части эмбриона обеспечивают полное развитие дефинитивного организма. Именно клетки внутренней массы являются источником культур эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), поэтому клетки, полученные в опытах Такахashi и Яманаки (Takahashi, Yamanaka, 2006), получили название индуцированных плорипотентных стволовых клеток (иПСК). Применив сходный подход, но используя тканеспецифичные ТФ, в 2010 г. Вербухен и соавторы (Vierbuchen et al., 2010) показали возможность прямой конверсии фибробластов в нейроны.

Оба примера являются яркой иллюстрацией пластичности генома соматической клетки и показывают эффективность клеточных технологий, основанных на эктопической экспрессии ТФ в клетках-мишенях, обеспечивающей репрограммирование. Базовые события при репрограммировании генома фибробластов при индукции в них плорипотентности следующие: деметилирование и реактивация генов, экспрессия которых характерна для плорипотентных клеток, например *Oct4*, *Nanog* и *Sox2*, и наоборот, «гашение» экспрессии тканеспецифических генов, например коллагена и фибронектина: изменение модификаций гистоновых белков, восстановление укороченных концов теломер, изменение профиля репликации и пространственной организации ядра (Kiskinis, Eggan, 2010; Wang, Na, 2011). Процесс трансдифференцировки менее изучен, но точно известно, что в репрограммируемых клетках происходят активация генов, характерных для клеточного типа, в который происходит конверсия, и «гашение» экспрессии генов, специфичных для клеток-мишеней.

В настоящем обзоре мы рассмотрим основные методы репрограммирования соматических клеток в плорипотентные клетки, а также способы трансдифференцировки в нейрональные типы клеток. Отдельное внимание будет уделено проблеме значимости клеточных делений для репрограммирования, а также перспективе развития этих технологий с точки зрения фундаментальной науки и регенеративной медицины.

Методы репрограммирования геномов соматических клеток и восстановление в них плорипотентности

В настоящее время известно несколько способов репрограммирования геномов дифференцированных клеток и восстановления в них плорипотентных свойств: пере-

нос ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты (реже яйцеклетки), слияние клеток (гибридизация) с разным плорипотентным статусом и репрограммирование с помощью эктопической экспрессии ТФ в клетках-мишениях, иногда в комбинации с малыми молекулами. Рассмотрим их подробнее.

Перенос ядра соматических клеток в энуклеированные ооциты. Первые доказательства пластичности генома дифференцированных клеток были получены в экспериментах по переносу ядер соматических клеток в энуклеированный ооцит (*somatic cell nuclear transfer* — SCNT). Так, еще в середине XX в. Бриггс и Кинг показали, что реконструированный ооцит лягушки *Rana pipiens* при помощи трансплантации ядер клеток бластулы может развиться до стадии головастика (Briggs, King, 1952). Однако при использовании в качестве донора ядерного материала клеток более поздних стадий, например гаструлы, авторы наблюдали аномалии развития. Позднее метод был значительно усовершенствован группой других авторов, которые в результате наблюдали полное развитие *Xenopus laevis* из реконструированных ооцитов после трансплантации в них ядер клеток эпителия кишечника головастика (Gurdon, 1962; Gurdon, Uehlinger, 1966). Эти результаты позволили сделать вывод о том, что процесс дифференцировки клеток может быть обратимым. Более того, хотя в ходе развития соматические клетки и приобретают функциональные различия, их геном сохраняет черты, свойственные ооциту.

Следующим важным шагом в развитии этой технологии было получение клонированной овцы (Dolly) путем переноса ядер клеток молочной железы в энуклеированные ооциты (Wilmut et al., 1997). В дальнейшем этот подход был апробирован на других видах млекопитающих — мыши (Kishigami et al., 2006), крысе (Zhou et al., 2003; Popova et al., 2009), корове (Kubota, et al., 2004), козе (Guo et al., 2002), свинье (Polejaeva et al., 2000), кошке (Yin et al., 2008) и др. Особо следует отметить, что даже при использовании ядер В-лимфоцитов, была показана возможность рождения клонированных животных (Hochedlinger, Jaenisch, 2002), что говорит о возможности репрограммирования терминально дифференцированных клеток. Однако реконструированные ооциты только в редких случаях (не более 2—4 %) способны обеспечить полное развитие и рождение животного.

Репрограммирование с помощью слияния клеток разной тканевой принадлежности и разного плорипотентного статуса. Еще в 70-е годы XX в. гибридизацию клеток начали использовать для изучения репрограммирования. Так например, было обнаружено, что соматические клетки могут быть репрограммированы путем гибридизации с плорипотентными клетками. Для этих целей использовали три типа клеток — эмбриональные клетки карциномы (ЭКК), эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и эмбриональные половые клетки (ЭПК).

Первые работы по гибридизации были выполнены с использованием ЭКК. Например, гибридные клетки, полученные в результате слияния ЭКК мыши и тимоцитов, обладали свойствами ЭКК (Miller, Ruddle 1976). Аналогичные результаты были получены в опытах по слиянию тимоцитов с ЭПК, показавшие, что гибридные клетки имели свойства плорипотентного партнера (Tada et al., 1997). В более поздних работах в качестве плорипотентных клеток стали использовать ЭСК, а в качестве соматического партнера — самые разнообразные клеточные

типы: В- и Т-лимфоциты (Tada et al., 2001; Kimura et al., 2004), спленоциты (Matveeva et al., 1998), незрелые нейрональные клетки (Do, Schöler, 2004), незрелые гематопоэтические клетки (Ying et al., 2003) и фибробласты (Sullivan et al., 2006; Kruglova et al., 2008). Причем высокая репрограммирующая способность ЭСК была показана как для ЭСК мыши, так и для ЭСК человека (Cowan et al., 2005).

Интересно, что репрограммирующей способностью обладают и дифференцированные клетки, слияние которых может привести к образованию гибридов, которые приобретают свойства одного из соматических партнеров (Blau et al., 1983; Wright, 1984; Baron, Maniatis, 1986). Так например, в работе по слиянию клеток гепатомы мыши, продуцирующих сывороточный альбумин, с лейкоцитами человека было показано, что в последних происходит активация гена альбумина, поскольку в гибридных клетках была обнаружена экспрессия гена альбумина человека (Darlington et al., 1974). Таким образом, эти работы впервые продемонстрировали принципиальную возможность конверсии одного специализированного типа клеток в другой (Sanges et al., 2011).

Репрограммирование геномов соматических клеток с помощью эктопической экспрессии транскрипционных факторов. В экспериментах по переносу ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты и получению гибридов с участием как плюрипотентных, так и соматических клеток показано, что в этих клетках содержатся определенные факторы, которые способны вызывать репрограммирование соматических клеток. Первая работа, в которой было доказано, что этими детерминантами являются ТФ, была связана с прямой конверсией фибробластов в мышечные клетки. Показано, что экзогенная экспрессия гена *MyoD* — ТФ, который является важным регулятором процесса миогенеза, способна вызывать переход фибробластов в мышечные клетки (Davis et al., 1987). Как отмечалось выше, решающую роль ТФ в репрограммировании геномов соматических клеток удалось убедительно показать группе Яманака в 2006 г., показавшей, что экзогенная экспрессия всего четырех ТФ способна восстановить плюрипотентность генома соматических клеток, утраченную ими в процессе дифференцировки (Takahashi, Yamanaka, 2006). Авторы исходили из предположения о том, что факторы, которые участвуют в поддержании плюрипотентности в ЭСК, способны также восстановить плюрипотентность в фибробластах. Используя репортерную конструкцию на основе гена *Fbx15*, экспрессия которого специфична для ЭСК, они отобрали гены четырех ТФ — *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Они обнаружили, что ретровирусная трансдукция, обеспечивающая экспрессию этих ТФ, индуцирует появление в культуре фибробластов мыши клеток, которые по своим морфологическим и молекулярным свойствам соответствовали характеристикам ЭСК.

Эта революционная работа вызвала широкий резонанс в научном сообществе, и что важно, этот экспериментальный подход с различными вариациями был воспроизведен во многих лабораториях. Научное признание этого подхода выразилось во вручении проф. Яманаке Нобелевской премии по физиологии и медицине в 2012 г. Вскоре было показано, что восстановление плюрипотентности при использовании этого подхода возможно в самых разнообразных соматических клетках: в фибробластах (Takahashi et al., 2007; Zhao et al., 2008), В-лимфоци-

тах (Hanna et al., 2008), гепатоцитах (Aoi et al., 2008; Liu et al., 2010), β -клетках поджелудочной железы (Stadtfeld et al., 2008; Bar-Nur et al., 2011), кератиноцитах (Aasenet al., 2008), нейрональных стволовых клетках (Eminli et al., 2008; Kim et al., 2008, 2009b) и др. В настоящее время иПСК получены из соматических клеток разных видов млекопитающих: мыши (Shi et al., 2008; Li et al., 2011), крысы (Li et al., 2009; Liao et al., 2009), носорога (Ben-Nun et al., 2011), лошади (Breton et al., 2013), свиньи (Ezashi et al., 2009; West et al., 2011), собаки (Luo et al., 2011; Koh et al., 2013), снежного барса (Verma et al., 2012), макаки-резуса (Liu et al., 2008), дрила (Ben-Nun et al., 2011) и человека (Zhao et al., 2008; Haase et al., 2009).

Возможность экспериментального получения иПСК открыла перспективу использования их в практической медицине — заместительной клеточной терапии, хотя существует ряд нерешенных проблем, связанных с безопасностью. В первую очередь это относится к самим иПСК, в геноме которых присутствуют лентивирусные векторные последовательности вместе с интродуцированными генами ТФ. Существуют риски активации лентивирусных генов в иПСК после трансплантации и, как следствие, их неконтролируемой пролиферации. Разработка методик получения иПСК на основе векторов, не интегрирующих в геном клеток-мишеней, была радикальным решением этой проблемы. Однако хотя и описаны технологии получения иПСК с помощью векторов с транзиторной экспрессией ТФ (Okita et al., 2008), в большинстве работ по изучению процессов репрограммирования для доставки ТФ используют вирусные векторы, которые интегрируются в реципиентный геном. Следует отметить, что для безинтеграционных методик получения иПСК в качестве векторов для доставки использовали неинтегрирующие вирусы, плазмиды, РНК и рекомбинантные белки (Fusaki et al., 2009; Kaji et al., 2009; Kim et al., 2009a; Yu et al., 2009; Zhou et al., 2009; Jia et al., 2010; Warren et al., 2010). Однако использование безинтеграционных методик приводит к значительному снижению эффективности образования колоний иПСК и требует дальнейших усовершенствований разработанных методов.

Значительный прорыв в повышении эффективности репрограммирования был достигнут благодаря применению так называемых малых молекул, способных ускорять конверсию соматических клеток в плюрипотентное состояние. Основная задача в подборе малых молекул для репрограммирования состоит в идентификации структур, способных заменить хотя бы один из ТФ, необходимых для репрограммирования. Оптимизация временных рамок и комбинации малых молекул позволила не только ускорить процесс репрограммирования соматических клеток в иПСК (Huangfu et al., 2008; Shi et al., 2008), но и расширить наши знания об основных молекулярных механизмах, вовлеченных в процесс репрограммирования. Яркий успешный пример применения этой стратегии описан в недавней публикации, в которой авторы приводят протокол репрограммирования соматических клеток мыши в плюрипотентные с использованием всего семи малых молекул без применения экзогенных ТФ (Hou et al., 2013). Примечательно, что по эффективности репрограммирования этот метод не уступает протоколам с использованием ТФ, более того, имеет целый ряд преимуществ, включая значительный шаг вперед с точки зрения биологической безопасности и простоты использования, что делает репрограммирование путем добавле-

ния в среду культивирования малых молекул наиболее перспективным с точки зрения потенциального клинического применения иПСК.

Трансдифференцировка, или прямая конверсия соматических клеток в нейрональные

Получение иПСК с помощью коктейля репрограммирующих факторов послужило толчком к развитию методик прямого репрограммирования дифференцированных клеток одного типа в другой. Прямое репрограммирование (или трансдифференцировка) подразумевает отсутствие промежуточной стадии плюрипотентных клеток, т. е. прямое превращение одного типа клеток в другой. Одним из наилучших источников клеток для такого превращения являются фибробласты. Фибробласты можно легко получить от пациента любого возраста в достаточно большом количестве. Распространенность заболеваний нервной системы, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, делает актуальной разработку методов клеточной терапии с использованием нейрональных клеток. Для

этого необходима эффективная технология получения нейрональных клеток из фибробластов, т. е. создания персонализированных культур нервных клеток.

В настоящее время существует два подхода к получению пациент-специфических нейрональных клеток: дифференцировка ЭСК или иПСК в нейрональные клетки и прямое репрограммирование фибробластов в нейроны (рис. 1). Получение нейронов из иПСК основано на индукции дифференцировки ЭСК или иПСК путем добавления в среду культивирования таких реагентов, как ретиноевая кислота (RA), фактора роста фибробластов 2 (bFGF), добавочных компонентов N2, B27 и других факторов (Dhara, Stice, 2008). Использование ЭСК и иПСК позволяет получить неограниченное количество материала для дальнейшей дифференцировки. Недостаток этого подхода — сохранение недифференцированных клеток в популяции нейрональных клеток, что создает потенциальную возможность их неконтролируемого роста в трансплантате. Технология прямой трансдифференцировки позволяет миновать плюрипотентную стадию и тем самым снижает риски развития опухолей при трансплантации нейрональных клеток.

Интересно, что предположения о возможности процесса трансдифференцировки как такового появились задолго до открытия иПСК. Действительно, пластичность генома соматических клеток была показана еще несколько десятилетий назад вне контекста плюрипотентности (Davis et al., 1987; Taylor, Jones, 1979; Lassar et al., 1986). Однако важно отметить, что исследования того периода, связанные с прямой конверсией, были ограничены близкими типами клеток, производных одного зародышевого листка.

Впервые возможность репрограммирования между отдаленными типами клеток была показана в 2010 г. Группа под руководством Вербухен (Vierbuchen et al., 2010) показала, что форсированная экспрессия трех ТФ — *Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l*, задействованных в процессах нейрогенеза, способна вызвать конверсию фибробластов в нейроны. Доказательством функциональности полученных индуцированных нейрональных клеток (иНК) послужили полученные данные по экспрессии нейроспецифичных белков (β 3-тубулина, MAP2, NeuN и синапсина), способность генерировать потенциал действия, а также образовывать функциональные синапсы с кортикальными нейронами мыши. Таким образом, предложенная стратегия репрограммирования генома соматических клеток в иПСК (Takanashi, Yamanaka, 2006) оказалась пригодной для прямой дифференцировки без промежуточного плюрипотентного состояния генома. За этим открытием последовал целый ряд работ, посвященных описанию трансдифференцировки фибробластов в другие типы клеток — кардиомиоциты (Ieda et al., 2010; Efe et al., 2011), кроветворные клетки (Szabo et al., 2010), адипоциты (Zhu et al., 2012) и гепатоциты (Sekiya, Suzuki, 2011).

На сегодняшний день известно два способа трансдифференцировки фибробластов в нейроны. Один из них предполагает прямую конверсию фибробластов в зрелые функциональные нейроны (Vierbuchen et al., 2010; Xue et al., 2013) (рис. 2) разной специализации, например дофаминергические (Caiazzo et al., 2011; Pfisterer et al., 2011; Liu et al., 2012) или моторные (Son et al., 2011). Второй способ предполагает получение нейрональных стволовых клеток-предшественников и их последующую дифференцировку в нейроны (Lujan et al., 2012).

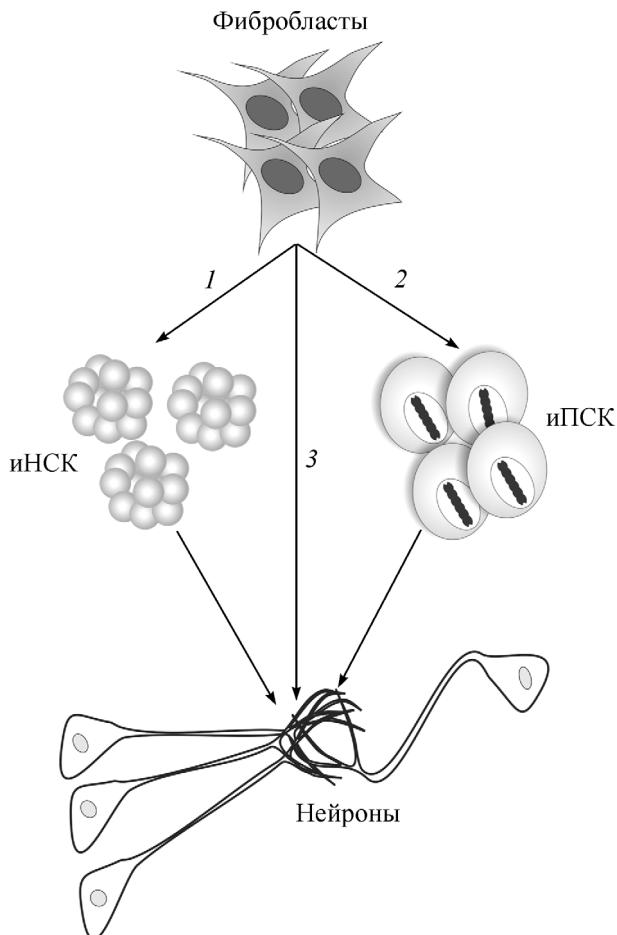


Рис. 1. Схемы (1—3) получения нейрональных клеток (НК) из фибробластов.

1 — посредством получения индуцибельных нейрональных стволовых клеток (иНСК) с их последующей дифференцировкой в нейроны и глиальные клетки; 2 — через получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) и их последующую дифференцировку в НК; 3 — посредством прямой конверсии фибробластов в нейроны (трансдифференцировка).

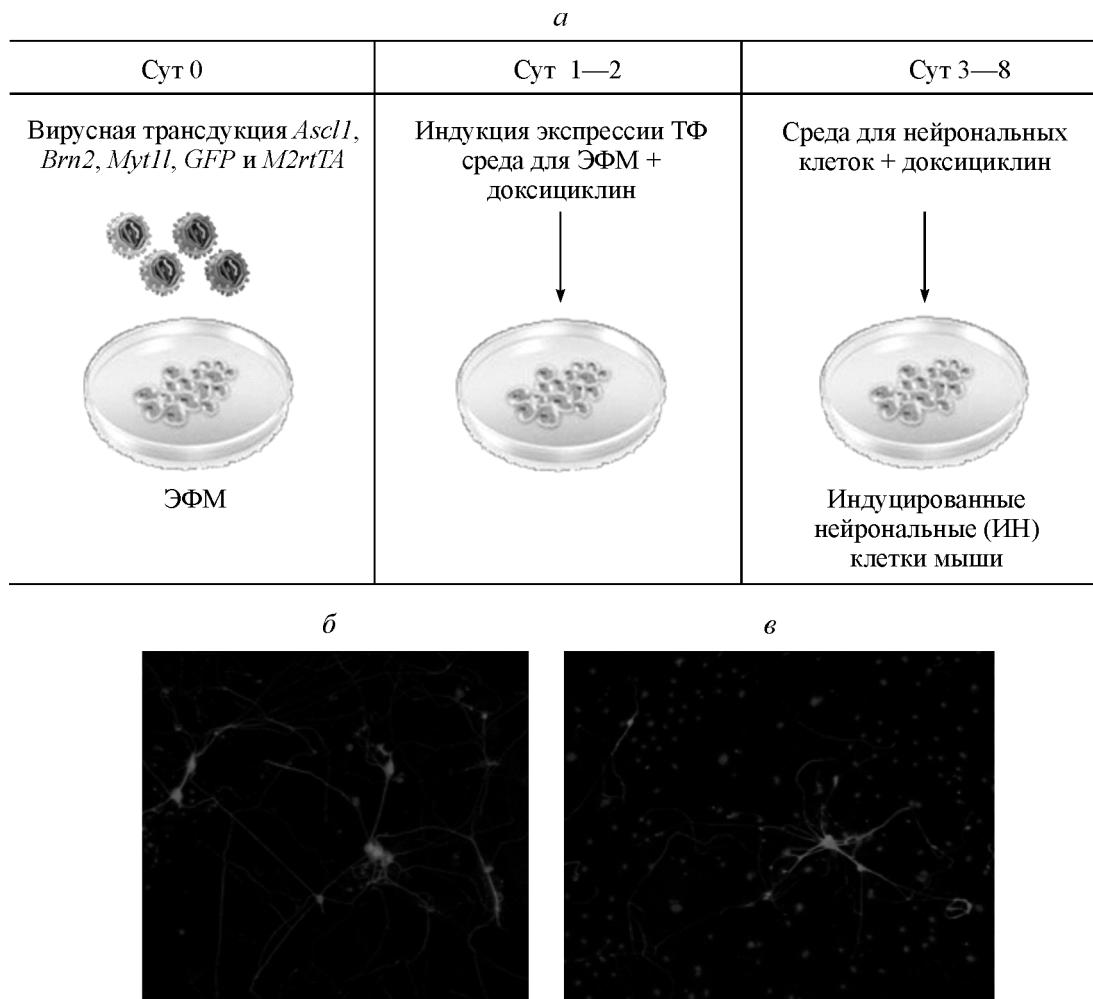


Рис. 2. Репрограммирование эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) в нейрональные клетки (НК).

а — схема получения индуцированных НК из фибробластов мыши. Для индукции трансдифференцировки фибробласти трансфицируют лентивирусами, несущими гены транскрипционных факторов (ТФ) *Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l* в сочетании с *M2rtTA* и репортерным геном *GFP*. Добавление доксициклина запускает экспрессию этих генов в присутствии молекулы трансактиватора (*M2RTta*), что совместно с ростовыми факторами, присутствующими в нейрональной культуральной среде, обеспечивает прямую конверсию фибробластов в нейроны. *б*, *в* — иммунофлуоресцентное окрашивание нейрональных клеток, полученных из фибробластов мыши. Индуцированные нейрональные клетки позитивны по типичным маркерам нейронов — β 3-тубулину (*б*) и NF-200 (*в*). Ядра окрашены красителем DAPI.

Трансдифференцировка соматических клеток в нейроны

Являясь одним из наиболее перспективных способов репрограммирования, прямая конверсия имеет решающее значение с точки зрения персонализированной медицины. После успешного проведенных экспериментов с фибробластами мыши (Vierbuchen et al., 2010) сходные методы были использованы для конверсии фибробластов человека в нейроны. Однако использование лентивирусных векторов, экспрессирующих *ASCL1*, *BRN2* и *MYT1L* в фибробlastах человека, не привело к получению функциональных нейронов (Pang et al., 2011). Эти данные подтверждены другими авторами, показавшими, что экзогенная экспрессия этих ТФ в фибробlastах человека вызывает апоптоз (Qiang et al., 2011). Однако после проведения дополнительного скрининга еще 20 генов-кандидатов обнаружили, что совместная экспрессия *ASCL1*, *BRN2*, *MYT1L* и *NeuroD1* способна вызывать трансдифференцировку фибробластов человека в нейро-

ны (Pang et al., 2011). Как выяснилось, аналогичным действием обладает и другой набор генов ТФ (*Ascl1*, *Brn2* и *Zic1*), при дополнительном введении в который *Myt1l* эффективность трансдифференцировки увеличивается (Qi-ang et al., 2011).

Эти эксперименты показали, что прямая конверсия приводит к образованию гетерогенной популяции иНК, при этом подавляющее большинство клеток имеют свойства глутаматергических нейронов, остальные типы нейронов представлены как минорные компоненты (Marro et al., 2011; Pfisterer et al., 2011; Karow et al., 2012). Поиски специфических факторов, направляющих трансдифференцировку в определенные типы нейронов, показали, что с помощью экзогенной экспрессии *Ascl1*, *Nurr1* и *Lmx1a* можно получить функциональные дофаминергические нейроны из фибробластов человека (Caiazzo et al., 2011). Полученные дофаминергические нейроны синтезировали дофамин и проявляли спонтанную электрическую активность, характерную для этого типа нейронов головного мозга. Важно отметить, что для получения это-

го типа нейронов были использованы и другие ТФ. Например, экспрессия «стандартного нейронального набора» генов ТФ (*Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l* с двумя другими — *Lmx1a* и *FoxA2*), специфических для дофаминергических нейронов, также позволила получить из фибробластов человека нейроны этого типа (Pfisterer et al., 2011). Важно подчеркнуть, что впервые в этой работе была показана функциональная интеграция трансплантированных индуцированных дофаминергических нейронов с нейронной сетью реципиентов, что проявлялось в частичной коррекции симптомов болезни Паркинсона у модельных животных (Kim et al., 2011b).

В основе высокой функциональной специализации нейронов лежат особенности их дифференцировки с вовлечением разных транскрипционных факторов, что не исключает общих нейрональных ТФ, определяющих нейрогенез. Наглядным примером этому утверждению может служить разработка технологии получения индуцированных моторных нейронов (Son et al., 2011). Авторы тестировали лентивирусные векторы, экспрессирующие 11 генов ТФ в фибробластах для конверсии их в моторные нейроны, и показали, что полученные нейроны экспрессируют помимо общих нейрональных маркеров (MAP2, β3 тубулин, синапсин и др.) и ТФ, специфические для моторных нейронов (*NeuroD1* и *Isl1*) (Son et al., 2011). Кроме того, обнаружена экспрессия гена *Chat*, кодирующего холинацетилтрансферазу. Этот факт говорит о том, что в репрограммированных клетках произошла активация ферментативного пути синтеза ацетилхолина, нейротрансмиттера, характерного для моторных нейронов (Son et al., 2011). Прямым доказательством функциональной полноценности полученных моторных нейронов являлось образование нервно-мышечных синапсов при совместном культивировании индуцированных моторных нейронов с мышечными клетками.

Как и в случае с получением нейронов из iPSC, материал, получаемый в ходе трансдифференцировки, потенциально может быть использован для заместительной терапии. Но здесь тоже встает вопрос об обеспечении биологической безопасности получаемого материала. Сейчас большинство исследователей в своих работах используют для доставки ТФ в клетки-мишени лентивирусные векторы, интегрирующие в реципиентный геном. В связи с этим применение безынтеграционных векторов для доставки ТФ становится актуальным. В качестве безынтеграционных векторов использовали векторы на основе адено-вируса (Meng et al., 2012) и плазмидные векторы (Adler et al., 2012), но, к сожалению, с низкой эффективностью.

Представляется перспективным использование в качестве индукторов трансдифференцировки микроРНК, не интегрирующие в геном клеток-мишеней. Например, показано, что две специфические нейрональные микроРНК miR-9/9* и miR-124 могут заменить *Brn2* в контексте транскрипционного набора *Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l* для трансдифференцировки фибробластов в нейроны (Yoo et al., 2011). Интересно, что форсированная экспрессия miR-9/9* и miR-124 недостаточна для полного репрограммирования фибробластов в нейроны, но способна индуцировать появление клеток с bipolarной нейрональной морфологией. В другой работе из набора транскрипционных факторов был изъят *Ascl1*, а в качестве микроРНК использована miR-124, в результате чего тоже наблюдали конверсию фибробластов в нейроны (Ambasudhan et al., 2011). Более того, позднее было показано,

что трансдифференцировка фибробластов в нейроны может быть осуществлена при использовании исключительно miR-124 (Ambasudhan et al., 2011; Xue et al., 2013). Суммируя вышеописанные подходы по использованию безынтеграционных векторов в технологиях конверсии фибробластов в нейроны, можно заключить, что в этом направлении достигнут значительный прогресс.

Успехи в прямом репрограммировании фибробластов в нейроны все же оставляют открытым один очень важный вопрос: действительно ли имеет место трансдифференцировка между клетками разных зародышевых листков? Дело в том, что в качестве исходных линий клеток для трансдифференцировки в основном используются первичные культуры фибробластов, в том числе эмбриональных, которые представляют собой гетерогенные популяции клеток, и среди них могут присутствовать производные нейрояктодермы. Убедительным доказательством того, что эпигенетический барьер между производными разных зародышевых листков в процессе трансдифференцировки преодолим, явились эксперименты по индукции прямой конверсии терминально-дифференцированных гепатоцитов в нейроны с помощью стандартного набора *Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l* (Marro et al., 2011).

Другой пример трансдифференцировки мезодермальных производных в производные нейрояктодермы был описан в экспериментах по превращению перицитов человека в нейроны под действием экзогенной экспрессии *SOX2* и *ASCL1* (Karow et al., 2012). Оба эти примера показывают, что в настоящее время существуют способы прямой конверсии клеток-производных одного зародышевого листка в клетки-производные другого листка.

Имеет смысл отметить, что значительные усилия исследователей направлены на повышения эффективности конверсии фибробластов в нейроны. На основе данных, свидетельствующих о том, что ингибирование SMAD- и GSK3-сигнальных путей малыми молекулами способствует репрограммированию соматических клеток в iPSC и нейрональной индукции плюрипотентных стволовых клеток человека, показано, что эффективность *Ascl1/Ngn2*-индуцированного преобразования фибробластов человека в нейроны может быть повышена добавлением комбинации трех малых молекул, которые ингибируют GSK3 (CHIR99021), TGFb-рецептор ALK4/5/7 (SB431542) и BMP-рецептор ALK2/3/6 (LDN193189) (Ladewig et al., 2012). В результате применения малых молекул эффективность конверсии фибробластов человека в иНК достигла более 80 % против 10, когда не использовались малые молекулы (Ladewig et al., 2012). Интересно, что культивирование в условиях гипоксии тоже вызывает увеличение эффективности генерации иНК (Davila et al., 2013).

Заслуживает внимания недавно разработанный метод трансдифференцировки, основой которого является кратковременная экспрессия *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в сочетании со специфическими активаторами пролиферации клетки. Особенностью этой стратегии является возможность конверсии клеток одного типа в другой, минуя плюрипотентную стадию. Этот подход был успешно реализован для репрограммирования фибробластов в сердечные, нейрональные и эндотелиальные клетки-предшественники с использованием 4-суточной экспрессии *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* с последующей обработкой клеток-мишеней факторами BMP4 и FGF4 (Efe et al., 2011; Kim et al., 2011a). По сравнению с конвенциональной трансдифференцировкой, в ходе которой специфичность ре-

программирования определяется эктопической экспрессией ТФ, специфических для клеток данного типа, этот метод позволяет использовать для клеток разных типов один и тот же набор ТФ — *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*.

Трансдифференцировка соматических клеток в нейрональные стволовые

Описанные выше способы прямой конверсии соматических клеток в постмитотические нейроны открывают новые возможности моделировать *in vitro* процессы нейрогенеза, хотя и на заключительной его стадии. К настоящему времени разработаны способы получения нейрональных клеток более ранних стадий из соматических. Речь идет об индуцированных нейрональных стволовых клетках (иНСК). Основой этого подхода, как отмечено выше, является транзиторная экспрессия *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в клетках-мишениях с последующим применением специфических активаторов пролиферации. Этот подход был успешно реализован для прямого репрограммирования фибробластов в иНСК посредством 4-суточной экспрессии *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в клетках-мишениях с последующей их обработкой FGF4 и культивированием в среде для нейрональных стволовых клеток (Kim et al., 2011a). Авторы наблюдали появление колоний иНСК, позитивных по маркерам *Plzf* и *Pax6*, характерных для нейрональных клеток-предшественников. Важно отметить, что при спонтанной дифференцировке *in vitro* этих иНСК были выявлены нейроны и глиальные клетки.

Сходные результаты были получены другими группами исследователей. Так, для трансдифференцировки фибробластов использовали кратковременную экзогенную экспрессию *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* и *Oct4*, причем экспрессия *Oct4* была существенно сокращена (Thier et al., 2012). Полученные иНСК формировали нейросфера и обладали морфологическими и молекулярными характеристиками нейрональных стволовых клеток, для которых характерна экспрессия *Nestin*, *Pax6* и *Olig2*. Полученные иНСК при дифференцировке *in vitro* давали начало клеткам трех типов — производных нейроэктодермы: нейронам, астроцитам и олигодендроцитам (Thier et al., 2012). Используя другой набор генов ТФ (*Brn4/Pou3f4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* и *E47/Tcf3*), получили из фибробластов мыши иНСК с характерными свойствами нейрональных клеток-предшественников (Han et al., 2012). Важно подчеркнуть, что авторы не наблюдали образования тератом после подкожных инъекций индуцированным НСК иммунодефицитным мышам. Недавно сообщили о получении иНСК из мышиных фибробластов с помощью экзогенной экспрессии *Rfx4*, *ID4*, *FoxG1*, *Lhx2* и *Sox2* (Lujan et al., 2012). Авторы показали, что всего два гена — *Sox2* и *FoxG1* — вызывают индукцию трансдифференцировки фибробластов в бипотентные нейрональные клетки-предшественники, которые при дифференцировке дают функциональные нейроны и астроциты, но не олигодендроциты. Однако дополнение пары *Sox2* и *FoxG1* введением *Brn2* было достаточным для получения мультипотентных иНСК, которые дифференцировались в нейроны, астроциты и олигодендроциты.

Важная роль другого гена ТФ, *Zic3*, в поддержании нейронального мультипотентного состояния была также недавно показана при трансдифференцировке фибробластов человека (Kumar et al., 2012). В этом исследовании было показано, что комбинация *Zic3*, *Oct4*, *Sox2* и *Klf4*

может индуцировать превращение фибробластов человека в иНСК. Еще один набор факторов (*Brn2*, *TLX*, *Sox2*, *Bmi1* и *c-Myc*) позволил получить иНСК, сходные с нативными культурами стволовых клеток головного мозга (Tian et al., 2013). Самой удивительной находкой последнего времени стали данные о том, что для получения иНСК из фибробластов можно использовать всего лишь один *Sox2* (Ring et al., 2012). Полученные клетки экспрессировали маркеры нейрональных стволовых клеток *Sox2*, *Nestin*, *Sox1* и *Zbtb16*, при этом экспрессии генов плuriпотентности (*Oct4*, *Nanog* и *Zfp42*) не было. При инъекции экспериментальным мышам полученные иНСК характеризовались высокой выживаемостью, способностью дифференцироваться и образовывать синапсы с нейронами реципиента и при этом не обладали тератогенным потенциалом. Особая ценность данной работы заключается в том, что она открывает большие возможности для получения специализированных типов нейронов, так как *Sox2* может быть использован в комбинации с другими специфическими факторами для репрограммирования.

Наконец, нельзя оставить без внимания работу, в которой впервые удалось получить иНСК безынтеграционным методом (Lu et al., 2013). В качестве вектора для доставки использовали вирус Сендей, с помощью которого *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* и *Oct4* были введены в фибробласти человека и обезьяны. Полученные иНСК экспрессировали молекулярные маркеры НСК (*SOX1*, *SOX2*, *NESTIN* и *PAX6*), а при дифференцировке *in vitro* образовывали три типа производных — нейроны, астроциты и олигодендроциты.

Необходимость клеточного деления для репрограммирования

Вопрос полноты репрограммирования и трансдифференцировки тесно связан с фундаментальной проблемой деления клеток в этом процессе. В большинстве случаев глобальные эпигенетические изменения, сравнимые по масштабу с трансдифференцировкой или репрограммированием, осуществляются совместно с прохождением клеткой S-фазы клеточного цикла и клеточным делением. Так, в экспериментах по индукции плuriпотентности была получена серия весомых доказательств необходимости клеточного деления как важного этапа репрограммирования (Hanna et al., 2009). Было показано, что многие модуляторы клеточного цикла увеличивают эффективность получения плuriпотентных клеток из фибробластов. Так, ингибирование *p53* с помощью РНК-интерференции и форсированная экспрессия *Lin28*, который действует как онкоген путем модуляции экспрессии регуляторов клеточного цикла, увеличивают эффективность репрограммирования фибробластов в иПСК. Таким образом, было установлено, что ускоренная кинетика репрограммирования прямо коррелирует с увеличением скорости деления клеток. Кроме того, было показано, что еще один ТФ, действующий как протоонкоген и повышающий пролиферативную активность клеток — *c-Myc*, влияет на эффективность образования колоний иПСК. В его отсутствие в «коктейле Яманаки», используемого для индукции плuriпотентности в соматических клетках, наблюдается значительное снижение эффективности репрограммирования (Kiskinis, Eggan, 2010). Добавление большого Т-антитела вируса SV40, который тоже стимулирует деление фибробластов, повышает эффективность

образования iPSC человека в 23—70 раз (Ma et al., 2008).

С другой стороны, в экспериментах, проводимых с использованием гибридов дифференцированной и плюрипотентной клеток, репрограммирование одного из партнеров наступает еще на стадии гетерокариона, т. е. без клеточного деления (Pomerantz et al., 2009). Однако, как было недавно показано, в отсутствие клеточного деления в таких гибридах наблюдается реактивация только части генов, а для активации остальных необходима репликация (Foshay et al., 2012). Таким образом, на стадии гетерокариона происходит инициация репрограммирования. Завершение репрограммирования и фиксация плюрипотентного состояния наступают на стадии синкариона (Serov et al., 2011). Следовательно, репликация ДНК является необходимым этапом для репрограммирования гибридных клеток (Tsubouchi et al., 2013).

Что касается роли клеточного деления в процессе трансдифференцировки, то пока мы располагаем недостаточными данными, и они зачастую противоречивы. С одной стороны, в работе по репрограммированию астроцитов в нейроны показали, что перед конверсией исходные клетки претерпевают ряд делений (Berninger et al., 2007). Кроме того, оказалось, что эффективность трансдифференцировки выше в иммортализованных клеточных линиях (Vierbuchen, Wernig, 2011). С другой стороны, при репрограммировании экзокринных клеток поджелудочной железы в β -клетки конверсия наблюдалась при отсутствии клеточного деления (Zhou et al., 2008). Оказалось, что при трансдифференцировке в нейроны подавляющее большинство гепатоцитов репрограммировалось без репликации ДНК: при добавлении 5-бромдезоксиуридина (BrdU) только около 1% β 3-тубулин-позитивных клеток было позитивно по BrdU (Marro et al., 2011). Аналогичный результат получен в работе по трансдифференцировке фибробластов в нейроны: первые клетки с незрелой нейрональной морфологией, появляющиеся на 3-и сут, не включали BrdU (Vierbuchen et al., 2010). Этот факт также указывает на то, что репликации ДНК не требуется для репрограммирования.

В связи с вышеизложенным вопросы о том, является ли клеточное деление необходимым этапом в процессе трансдифференцировки, как может происходить полногеномное ремоделирование хроматина в процессе трансдифференцировки без репликации ДНК, какова полнота репрограммирования клеток, полученных в результате трансдифференцировки и многие другие, остаются открытыми, и представляют собой широкий плацдарм для будущих исследований.

Перспективные направления развития репрограммирования соматических клеток

Трансдифференцировка соматических клеток — это новая, но стремительно развивающаяся область, которая изобилует новыми возможностями и трудными вопросами, но на которую возлагаются огромные надежды. Получаемый клеточный материал может быть использован для моделирования различных заболеваний, скрининга лекарственных препаратов, токсикологических тестов, заместительной клеточной терапии и т. д. Важно то, что в этом направлении уже сделаны первые успешные шаги. Так например, выяснилось, что использование iНК как материала для заместительной терапии при транспланта-

ции модельным животным смягчает симптомы болезни Паркинсона (Kim et al., 2011b). Кроме того, удалось получить нейроны из фибробластов пациентов с болезнями Паркинсона (Caiazzo et al., 2011) и Альцгеймера (Qiang et al., 2011). При этом было показано, что в iНК происходят те же патологические процессы, что и в нейронах *in vivo*. Поскольку по понятным причинам получать нейроны из мозга пациента не представляется возможным, получение пациент-специфических нейронов различных типов позволит существенно продвинуть изучение наследственных заболеваний и поможет в создании новых лекарств.

Еще одним важным направлением развития технологии прямой конверсии прикладного характера является трансдифференцировка *in vivo*, ставшая реальностью благодаря эктопической экспрессии ТФ *in vivo* (Zhou et al., 2008; Qian et al., 2012; Song et al., 2012). Инъекции в целевой орган (печень, сердце и головной мозг мыши) смеси вирусных векторов, несущих гены определенных транскрипционных факторов, позволили добиться трансдифференцировки экзокринных клеток поджелудочной железы в инсулинпродуцирующие β -клетки (Zhou et al., 2008), кардиальных фибробластов в кардиомиоциты (Qian et al., 2012) и астроцитов в нейроны (Torgre et al., 2013) и пролиферирующие нейробласты (Niu et al., 2013).

В заключение нельзя не сказать о важных вопросах фундаментальной биологии, ответы на которые даст всестороннее изучение процесса трансдифференцировки. Каков механизм преодоления эпигенетического барьера между клетками различных типов? Как регулируется процесс той или иной дифференцировки? За счет каких факторов поддерживается дифференцированное состояние в клетках? Необходимо ли клеточное деление для репрограммирования? Насколько велико влияние эпигенетической памяти, остающейся от клетки исходного типа? Эти и многие другие вопросы пока остаются открытыми, оставляя широкий плацдарм для дальнейшего изучения процессов трансдифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00441-а) и Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», соглашение № 8850 от 14 ноября 2012 г.).

Список литературы

- Aasen T., Raya A., Barrero M. J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilic J., Pekarik V., Tiscornia G., Edel M., Boue S., Izpisua Belmonte J. C. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26 : 1276—1284.
- Adler A. F., Grigsby C. L., Kulangara K., Wang H., Yasuda R., Leong K. W. 2012. Nonviral direct conversion of primary mouse embryonic fibroblasts to neuronal cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 1 : e32.
- Ambasudhan R., Talantova M., Coleman R., Yuan X., Zhu S., Lipton S. A., Ding S. 2011. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell.* 9 : 113—118.
- Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science.* 321 : 699—702.

- Bar-Nur O., Russ H. A., Efrat S., Benvenisty N.* 2011. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell.* 9 : 17—23.
- Baron M. H., Maniatis T.* 1986. Rapid reprogramming of globin gene expression in transient heterokaryons. *Cell.* 46 : 591—602.
- Ben-Nun I. F., Montague S. C., Houck M. L., Tran H. T., Gariotaonandia I., Leonardo T. R., Wang Y. C., Charter S. J., Laurent L. C., Ryder O. A., Loring J. F.* 2011. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat. Methods.* 8 : 829—831.
- Berninger B., Costa M. R., Koch U., Schroeder T., Sutor B., Grothe B., Gotz M.* 2007. Functional properties of neurons derived from *in vitro* reprogrammed postnatal astroglia. *J. Neurosci.* 27 : 8654—8664.
- Blau H. M., Chiu C. P., Webster C.* 1983. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell.* 32 : 1171—1180.
- Breton A., Sharma R., Diaz A. C., Parham A. G., Graham A., Neil C., Whitelaw C. B., Milne E., Donadeu F. X.* 2013. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. *Stem Cells Develop.* 22 : 611—621.
- Briggs R., King T. J.* 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 38 : 455—463.
- Caiazzo M., Dell'anno M. T., Dvoretskova E., Lazarevic D., Taverna S., Leo D., Sotnikova T. D., Menegon A., Roncaglia P., Colciago G., Russo G., Carninci P., Pezzoli G., Gainetdinov R. R., Gustincich S., Dityatev A., Broccoli V.* 2011. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature.* 476 : 224—227.
- Cowan C. A., Atienza J., Melton D. A., Eggan K.* 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* 309 : 1369—1373.
- Darlington G. J., Bernard H. P., Ruddle F. H.* 1974. Human serum albumin phenotype activation in mouse hepatoma—human leukocyte cell hybrids. *Science.* 185 : 859—862.
- David J., Chanda S., Ang C. E., Sudhof T. C., Wernig M.* 2013. Acute reduction in oxygen tension enhances the induction of neurons from human fibroblasts. *J. Neurosci. Methods.* 216 : 104—109.
- Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B.* 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 51 : 987—1000.
- Dhara S. K., Stice S. L.* 2008. Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell Biochem.* 105 : 633—640.
- Do J. T., Schöler H. R.* 2004. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells.* 22 : 941—949.
- Efe J. A., Hilcove S., Kim J., Zhou H., Ouyang K., Wang G., Chen J., Ding S.* 2011. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat. Cell Biol.* 13 : 215—222.
- Eminli S., Utikal J., Arnold K., Jaenisch R., Hochedlinger K.* 2008. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells.* 26 : 2467—2474.
- Ezashi T., Telugu B. P., Alexenko A. P., Sachdev S., Sinha S., Roberts R. M.* 2009. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106 : 10 993—10 998.
- Foshay K. M., Looney T. J., Chari S., Mao F. F., Lee J. H., Zhang L., Fernandes C. J., Baker S. W., Clift K. L., Gaetz J., Di C. G., Xiang A. P., Lahn B. T.* 2012. Embryonic stem cells induce pluripotency in somatic cell fusion through biphasic reprogramming. *Mol. Cell.* 46 : 159—170.
- Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M.* 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 85 : 348—362.
- Guo J., An Z., Li Y., Li X., Guo Z., Zhang Y.* 2002. Cloned goats (*Capra hircus*) from adult ear cells. *Sci. China C Life Sci.* 45 : 260—267.
- Gurdon J. B.* 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10 : 622—640.
- Gurdon J. B., Uehlinger V.* 1966. «Fertile» intestine nuclei. *Nature.* 210 : 1240—1241.
- Haase A., Olmer R., Schwanke K., Wunderlich S., Merkert S., Hess C., Zweigerdt R., Gruh I., Meyer J., Wagner S., Maier L. S., Han D. W., Glage S., Miller K., Fischer P., Schöler H. R., Martin U.* 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell.* 5 : 434—441.
- Han D. W., Tapia N., Hermann A., Hemmer K., Hoing S., Araujo-Bravo M. J., Zaehres H., Wu G., Frank S., Moritz S., Greber B., Yang J. H., Lee H. T., Schwamborn J. C., Storch A., Schöler H. R.* 2012. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell.* 10 : 465—472.
- Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B. W., Bernard C., Wernig M., Creyghton M. P., Steine E. J., Cassady J. P., Foreman R., Lengner C. J., Dausman J. A., Jaenisch R.* 2008. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell.* 133 : 250—264.
- Hanna J., Saha K., Pando B., Van Zon J., Lengner C. J., Creyghton M. P., Van Oudenaarden A., Jaenisch R.* 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature.* 462 : 595—601.
- Hochedlinger K., Jaenisch R.* 2002. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature.* 415 : 1035—1038.
- Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H.* 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science.* 341 : 651—654.
- Huangfu D., Osafune K., Maeir R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S., Muhlestein W., Melton D. A.* 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26 : 1269—1275.
- Ieda M., Fu J. D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B. G., Srivastava D.* 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 142 : 375—386.
- Jia F., Wilson K. D., Sun N., Gupta D. M., Huang M., Li Z., Panetta N. J., Chen Z. Y., Robbins R. C., Kay M. A., Longaker M. T., Wu J. C.* 2010. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat. Meth.* 7 : 197—199.
- Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Wolpert K.* 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature.* 458 (7239) : 771—775.
- Karow M., Sánchez R., Schichor C., Masserdotti G., Ortega F., Heinrich C., Gascón S., Khan M. A., Lie D. C., Dellavalle A., Cossu G., Goldbrunner R., Götz M., Berninger B.* 2012. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell.* 11 : 471—476.
- Kim J. B., Greber B., Araúzo-Bravo M. J., Meyer J., Park K. I., Zaehres H., Schöler H. R.* 2009b. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature.* 461 : 649—643.
- Kim D., Kim C. H., Moon J. I., Chung Y. G., Chang M. Y., Han B. S., Ko S., Yang E., Cha K. Y., Lanza R., Kim K. S.* 2009a. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 4 : 472—476.
- Kim J., Efe J. A., Zhu S., Talantova M., Yuan X., Wang S., Lippert S. A., Zhang K., Ding S.* 2011a. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108 : 7838—7843.
- Kim J., Su S. C., Wang H., Cheng A. W., Cassady J. P., Loda M. A., Lengner C. J., Chung C. Y., Dawlaty M. M., Tsai L. H., Jaenisch R.* 2011b. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 9 : 413—419.
- Kim J. B., Zaehres H., Wu G., Gentile L., Ko K., Sebastian V., Araujo-Bravo M. J., Ruau D., Han D. W., Zenke M., Schöler H. R.* 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* 454 : 646—650.

- Kimura H., Tada M., Nakatsuji N., Tada T. 2004. Histone code modifications on pluripotent nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 5710—5720.
- Kishigami S., Wakayama S., Thuan N. V., Ohta H., Mizutani E., Hikichi T., Bui H. T., Balbach S., Ogura A., Boiani M., Wakayama T. 2006. Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Protoc.* 1 : 125—138.
- Kiskinis E., Eggan K. 2010. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* 120 : 51—59.
- Koh S., Thomas R., Tsai S., Bischoff S., Lim J. H., Breen M., Olby N. J., Piedrahita J. A. 2013. Growth requirements and chromosomal instability of induced pluripotent stem cells generated from adult canine fibroblasts. *Stem Cells Develop.* 22 : 951—963.
- Kruglova A. A., Kizilova E. A., Zhelezova A. I., Gridina M. M., Golubitsa A. N., Serov O. L. 2008. Embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells with near-tetraploid karyotype provide high yield of chimeras. *Cell Tissue Res.* 334 : 371—380.
- Kubota C., Tian X. C., Yang X. 2004. Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 22 : 693—694.
- Kumar A., Declercq J., Eggermont K., Aguirre X., Prosper F., Verfaillie C. M. 2012. Zic3 induces conversion of human fibroblasts to stable neural progenitor-like cells. *J. Mol. Cell Biol.* 4 : 252—255.
- Ladewig J., Mertens J., Kesavan J., Doerr J., Poppe D., Glau F., Herms S., Wernet P., Kögl G., Müller F. J., Koch P., Brüstle O. 2012. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat. Meth.* 9 : 575—578.
- Lassar A. B., Paterson B. M., Weintraub H. 1986. Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 47 : 649—656.
- Li W., Wei W., Zhu S., Zhu J., Shi Y., Lin T., Hao E., Hayek A., Deng H., Ding S. 2009. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell.* 4 : 16—19.
- Li Y., Zhang Q., Yin X., Yang W., Du Y., Hou P., Ge J., Liu C., Zhang W., Zhang X., Wu Y., Li H., Liu K., Wu C., Song Z., Zhao Y., Shi Y., Deng H. 2011. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res.* 21 : 196—204.
- Liao J., Cui C., Chen S., Ren J., Chen J., Gao Y., Li H., Jia N., Cheng L., Xiao H., Xiao L. 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell.* 4 : 11—15.
- Liu H., Ye Z., Kim Y., Sharkis S., Jang Y. Y. 2010. Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology.* 51 : 1810—1819.
- Liu H., Zhu F., Yong J., Zhang P., Hou P., Li H., Jiang W., Cai J., Liu M., Cui K., Qu X., Xiang T., Lu D., Chi X., Gao G., Ji W., Ding M., Deng H. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 3 : 587—590.
- Liu X., Li F., Stubblefield E. A., Blanchard B., Richards T. L., Larson G. A., He Y., Huang Q., Tan A. C., Zhang D., Benke T. A., Sladek J. R., Zahniser N. R., Li C. Y. 2012. Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell Res.* 22 : 321—332.
- Lu J., Liu H., Huang C. T., Chen H., Du Z., Liu Y., Sherafat M. A., Zhang S. C. 2013. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts. *Cell Rep.* 3 : 1580—1591.
- Lujan E., Chanda S., Ahlenius H., Südhof T. C., Wernig M. 2012. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tri-potent neural precursor cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 2527—2532.
- Luo J., Suhr S. T., Chang E. A., Wang K., Ross P. J., Nelson L. L., Venta P. J., Knott J. G., Cibelli J. B. 2011. Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from canine adult somatic cells. *Stem Cells Develop.* 20 : 1669—1678.
- Mali P., Ye Z., Hommond H. H., Yu X., Lin J., Chen G., Zou J., Cheng L. 2008. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells.* 26 : 1998—2005.
- Marro S., Pang Z. P., Yang N., Tsai M. C., Qu K., Chang H. Y., Südhof T. C., Wernig M. 2011. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell.* 9 : 374—382.
- Matveeva N. M., Shilov A. G., Kaftanovskaya E. M., Maximovsky L. P., Zhelezova A. I., Golubitsa A. N., Bayborodin S. I., Fokina M. M., Serov O. L. 1998. In vitro and in vivo study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 50 : 128—138.
- Meng F., Chen S., Miao Q., Zhou K., Lao Q., Zhang X., Guo W., Jiao J. 2012. Induction of fibroblasts to neurons through adenoviral gene delivery. *Cell Res.* 22 : 436—440.
- Miller R. A., Ruddle F. H. 1976. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell.* 9 : 45—55.
- Niu W., Zang T., Zou Y., Fang S., Smith D. K., Bachoo R., Zhang C. L. 2013. In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat. Cell Biol.* 15 : 1164—1175.
- Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamakawa S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 322 : 949—953.
- Pang Z. P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D. R., Yang T. Q., Citri A., Sebastian V., Marro S., Südhof T. C., Wernig M. 2011. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature.* 476 : 220—223.
- Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O., Wood J., Nelander J., Dufour A., Björklund A., Lindvall O., Jakobsson J., Parmar M. 2011. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108 : 10 343—10 348.
- Pfisterer U., Wood J., Nihlberg K., Hallgren O., Bjermer L., Westergren-Thorsson G., Lindvall O., Parmar M. 2011. Efficient induction of functional neurons from adult human fibroblasts. *Cell Cycle.* 10 : 3311—3316.
- Polejaeva I. A., Chen S. H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D. L., Colman A., Campbell K. H. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature.* 407 : 86—90.
- Pomerantz J. H., Mukherjee S., Palermo A. T., Blau H. M. 2009. Reprogramming to a muscle fate by fusion recapitulates differentiation. *J. Cell Sci.* 122 : 1045—1053.
- Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. 2009. Efficient production of nuclear transferred rat embryos by modified methods of reconstruction. *Mol. Reprod. Develop.* 76 : 208—216.
- Qian L., Huang Y., Spencer C. I., Foley A., Vedantham V., Liu L., Conway S. J., Fu J. D., Srivastava D. 2012. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature.* 485 : 593—598.
- Qiang L., Fujita R., Yamashita T., Angulo S., Rhinn H., Rhee D., Doege C., Chau L., Aubry L., Vanti W. B., Moreno H., Abeliovich A. 2011. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell.* 146 : 359—371.
- 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. 2012. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell.* 11 : 100—109.
- Sanges D., Lluis F., Cosma M. P. 2011. Cell-fusion-mediated reprogramming: pluripotency or transdifferentiation? Implications for regenerative medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 713 : 137—159.
- Sekiya S., Suzuki A. 2011. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature.* 475 : 390—393.
- Serov O. L., Matveeva N. M., Khabarova A. A. 2011. Reprogramming mediated by cell fusion technology. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 291 : 155—190.
- Shi Y., Desponts C., Do J. T., Hahm H. S., Schöler H. R., Ding S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell.* 3 : 568—574.

- Son E. Y., Ichida J. K., Wainger B. J., Toma J. S., Rafuse V. F., Woolf C. J., Eggan K. 2011. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell.* 9 : 205—218.
- Song K., Nam Y. J., Luo X., Qi X., Tan W., Huang G. N., Acharya A., Smith C. L., Tallquist M. D., Neilson E. G., Hill J. A., Bassel-Duby R., Olson E. N. 2012. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature.* 485 : 599—604.
- Stadtfeld M., Brennand K., Hochedlinger K. 2008. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr. Biol.* 18 : 890—894.
- Sullivan S., Pells S., Hooper M., Gallagher E., Mcwhir J. 2006. Nuclear reprogramming of somatic cells by embryonic stem cells is affected by cell cycle stage. *Cloning Stem Cells.* 8 : 174—188.
- Szabo E., Rampalli S., Risueno R. M., Schnurch A., Mitchell R., Fiebig-Comyn A., Levadoux-Martin M., Bhatia M. 2010. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature.* 468 : 521—526.
- Tada M., Tada T., Lefebvre L., Barton S. C., Surani M. A. 1997. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* 16 : 6510—6520.
- Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 11 : 1553—1558.
- Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2 : 3081—3089.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126 : 663—676.
- Taylor S. M., Jones P. A. 1979. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell.* 17 : 771—779.
- Thier M., Wörsdörfer P., Lakes Y. B., Gorris R., Herms S., Opitz T., Seiferling D., Quandt T., Hoffmann P., Nöthen M. M., Brüstle O., Edenhofer F. 2012. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell.* 10 : 473—479.
- Tian C., Liu Q., Ma K., Wang Y., Chen Q., Ambroz R., Klinkebiel D. L., Li Y., Huang Y., Ding J., Wu J., Zheng J. C. 2013. Characterization of induced neural progenitors from skin fibroblasts by a novel combination of defined factors. *Sci. Rep.* 3 : 1345.
- Torper O., Pfisterer U., Wolf D. A., Pereira M., Lau S., Jakobsson J., Bjorklund A., Greathouse S., Parmar M. 2013. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 110 : 7038—7043.
- Tsubouchi T., Soza-Ried J., Brown K., Piccolo F. M., Canto I., Landeira D., Bagci H., Hochegger H., Merkenschlager M., Fisher A. G. 2013. DNA synthesis is required for reprogramming mediated by stem cell fusion. *Cell.* 152 : 873—883.
- Verma R., Holland M. K., Temple-Smith P., Verma P. J. 2012. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenol.* 77 : 220—228, e221—e222.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. P., Kokubu Y., Südhof T. C., Wernig M. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 463 : 1035—1041.
- Vierbuchen T., Wernig M. 2011. Direct lineage conversions: unnatural but useful? *Nat. Biotechnol.* 29 : 892—907.
- Wang P., Na J. 2011. Mechanism and methods to induce pluripotency. *Protein Cell.* 2 : 792—799.
- Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T., Loh Y. H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P. K., Smith Z. D., Meissner A., Daley G. Q., Brack A. S., Collins J. J., Cowan C., Schlaeger T. M., Rossi D. J. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 7 : 618—630.
- West F. D., Uhl E. W., Liu Y., Stowe H., Lu Y., Yu P., Gallegos-Cardenas A., Pratt S. L., Stice S. L. 2011. Brief report: chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs. *Stem Cells.* 29 : 1640—1643.
- Wilmut I., Schnieke A. E., Mcwhir J., Kind A. J., Campbell K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385 : 810—813.
- Wright W. E. 1984. Control of differentiation in heterokaryons and hybrids involving differentiation-defective myoblast variants. *J. Cell Biol.* 98 : 436—443.
- Xue Y., Ouyang K., Huang J., Zhou Y., Ouyang H., Li H., Wang G., Wu Q., Wei C., Bi Y., Jiang L., Cai Z., Sun H., Zhang K., Zhang Y., Chen J., Fu X. D. 2013. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell.* 152 : 82—96.
- Yin X. J., Lee H. S., Yu X. F., Kim L. H., Shin H. D., Cho S. J., Choi E. G., Kong I. K. 2008. Production of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenol.* 69 : 1001—1006.
- Ying Q. L., Nichols J., Chambers I., Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 115 : 281—292.
- Yoo A. S., Sun A. X., Li L., Shcheglovitov A., Portmann T., Li Y., Lee-Messer C., Dolmetsch R. E., Tsien R. W., Crabtree G. R. 2011. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature.* 476 : 228—231.
- Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin II, Thomson J. A. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 324 : 797—801.
- Zhao Y., Yin X., Qin H., Zhu F., Liu H., Yang W., Zhang Q., Xiang C., Hou P., Song Z., Liu Y., Yong J., Zhang P., Cai J., Liu M., Li H., Li Y., Qu X., Cui K., Zhang W., Xiang T., Wu Y., Liu C., Yu C., Yuan K., Lou J., Ding M., Deng H. 2008. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell.* 3 : 475—479.
- Zhou H., Wu S., Joo J. Y., Zhu S., Han D. W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Scholer H. R., Duan L., Ding S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 4 : 381—384.
- Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D. A. 2008. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature.* 455 : 627—632.
- Zhou Q., Renard J. P., Le Frie G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science.* 302 : 1179.
- Zhu J., Pang D., Zhou Y., Tang X., Huang Y., Xie W., Gao F., Lai L., Zhang M., Ouyang H. 2012. Direct conversion of porcine embryonic fibroblasts into adipocytes by chemical molecules. *Cell Reprogram.* 14 : 99—105.

Поступила 23 V 2014

REPROGRAMMING OF SOMATIC CELLS. PROBLEMS AND SOLUTIONS

*T. A. Schneider,¹ V. S. Fishman,^{1, 2} M. A. Liskovskykh,³ S. V. Ponamartsev,³
O. L. Serov,^{1, 4} A. N. Tomilin,³ N. Alenina^{2, 3, *}*

¹ Institute of Cytology and Genetics RAS, Novosibirsk, Russia,

² Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany,

³ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia,

⁴ Novosibirsk State University, Russia;

* e-mail: alenina@mdc-berlin.de

An adult mammal is composed of more than 200 different types of specialized somatic cells whose differentiated state remains stable over the life of the organism. For a long time it was believed that the differentiation process is irreversible, and the transition between the two types of specialized cells is impossible. The possibility of direct conversion of one differentiated cell type to another was first shown in the 80s of the last century in experiments on the conversion of fibroblasts into myoblasts by ectopic expression of the transcription factor MyoD. Surprisingly, this technology has remained unclaimed in cell biology for a long time. Interest in it revived after 200 thanks to the research of Novel Prize winner Shinya Yamanaka who has shown that a small set of transcription factors (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*) is capable of restoring pluripotency in somatic cells which they lost in the process of differentiation. In 2010, using a similar strategy and the tissue-specific transcription factors Vierbuchen and coauthors showed the possibility of direct conversion of fibroblasts into neurons, i. e. the possibility of transdifferentiation of one type of somatic cells in the other. The works of these authors were a breakthrough in the field of cell biology and gave a powerful impulse to the development of cell technologies for the needs of regenerative medicine. The present review discusses the main historical discoveries that preceded this work, evaluates the status of the problem and the progress in the development of methods for reprogramming at the moment, describes the main approaches to solving the problems of reprogramming of somatic cells into neuronal, and briefly discusses the prospect of application of reprogramming and transdifferentiation of cells for such important application areas as regenerative medicine, cell replacement therapy and drug screening.

Key words: reprogramming, transdifferentiation, neurons.