

DOI: 10.31116/tsitol.2018.06.01

РЕГУЛЯЦИЯ СТАБИЛЬНОСТИ КАРИОТИПА В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© Т. В. Никитина,* И. Н. Лебедев

*Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, 634050;
* электронный адрес: t.nikitina@medgenetics.ru*

Открытый группой Яманака способ превращать терминально дифференцированные клетки в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) вызвал в последнее десятилетие всплеск исследований в этой области. Появились возможности для исследований, в которых полученные от пациентов ИПСК используются как мощная платформа для изучения патогенеза заболеваний человека, особенно тех, которые прежде невозможно было изучать на клеточном уровне из-за труднодоступности материала. Однако несмотря на значительный прогресс в этой области, проблема безопасности остается во многом нерешенной, и основным дискуссионным вопросом в этом плане является влияние репрограммирования на стабильность генома. Хотя функциональные последствия нестабильности не всегда значимы, присутствие генетических aberrаций в ИПСК осложняет их биомедицинское использование. Сохранение стабильного генома плюрипотентных стволовых клеток человека является ключевым фактором для большинства сфер практического применения этой технологии, таких как клеточная терапия, моделирование заболеваний и фармакологические исследования. В связи с этим представляют интерес данные об особенностях механизмов поддержания стабильности генома и специфике мутационного процесса в ИПСК, анализу которых посвящен данный обзор. Поскольку в наибольшей степени качество ИПСК снижают крупные хромосомные aberrации, акцент сделан на рассмотрении генетической целостности на хромосомном и субхромосомном уровнях организации наследственной информации. В обзоре обобщены данные об особенностях клеточного цикла и ответа на повреждение ДНК в репрограммированных клетках, влияющих на сегрегацию хромосом и возникновение в них перестроек, а также приведена информация о влиянии репликационного и окислительного стресса на стабильность генома ИПСК.

Ключевые слова: ИПСК, хромосомная стабильность.

Список сокращений: ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ПСК — плюрипотентные стволовые клетки, ПСКч — плюрипотентные стволовые клетки человека, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, CNV — вариации числа копий ДНК (copy number variation), CHK1 — чекпойнт-киназа 1 (checkpoint kinase 1), CHK2 — чекпойнт-киназа 2 (checkpoint kinase 2), DDR — ответ на повреждение ДНК (DNA damage response), DSB — двухцепочечные разрывы ДНК (DNA double-stranded break), HR — гомологичная рекомбинация, OSK — группа факторов репрограммирования, включающая в себя три фактора (OCT4, SOX2 и KLF4), OSKM — группа факторов репрограммирования, включающая в себя четыре фактора (OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC), ROS — активные формы кислорода (reactive oxygen species), SAC — контрольная точка сборки веретена деления (spindle assembly checkpoint).

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) могут быть получены из внутренней клеточной массы бластоцисты (эмбриональные стволовые клетки, ЭСК) или путем репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ИПСК). ПСК коренным образом отличаются от стволовых клеток организма *in vivo*, сохраняя генетическую идентичность и способность дифференцироваться в любой тип клеток организма человека, в культуре они приобретают способности к самообновлению и пролиферации, которых нет у плюрипотентных клеток бластоцисты. Поддержание генетической целостности в

плюрипотентных клетках принципиально важно, так как любое изменение в ДНК будет унаследовано большим числом клеток-потомков. Поэтому предполагается, что в ПСК должна быть активирована усиленная защита от повреждений ДНК. Мэйнард и соавтор. (Maynard et al., 2008) показали, что способность к репарации поврежденных ДНК, вызванных различными агентами, в ЭСК человека более эффективна, чем в соматических клетках, и обнаружили в ЭСК человека повышенный уровень экспрессии генов различных путей репарации ДНК по сравнению с соматическими клетками (Maynard et al., 2008). Анализ транскриптомных и цистромных баз данных под-

тверждает, что экспрессия генов репарации ДНК и клеточной гибели в ЭСК и ИПСК отличается от их экспрессии в фибробластах, что позволяет предположить существование взаимодействия между генными сетями плюрипотентности и генетической стабильности в плюрипотентных клетках (Boward et al., 2016). Усиленное поддержание генетической целостности фундаментально связано с эпигенетическим статусом плюрипотентности на уровне генома (Cooper et al., 2014). Уровень экспрессии генов репарации и ответа на повреждение ДНК в ИПСК выше, чем в неонатальных стромальных клетках (Liedtke et al., 2015). Сравнение способности к репарации линий ЭСК, ИПСК и плюрипотентных клеток при воздействии агентов, повреждающих ДНК, таких как ультрафиолетовое излучение, диметилсульфат и ионизирующее излучение, продемонстрировало, что в плюрипотентных клетках происходит меньше повреждений, чем в дифференцированных клетках (Luo et al., 2012).

В условиях генотоксического стресса накопление повреждений ядерной и митохондриальной ДНК в ИПСК было значительно ниже, чем в фибробластах. Примечательно, что после обработки генотоксическими агентами дифференцированные производные ИПСК демонстрировали увеличение повреждений ДНК по сравнению с аналогичными недифференцированными линиями, т. е. защита ИПСК против повреждения ДНК быстро снижается после их дифференцировки (Dannenmann et al., 2015). В линиях ИПСК, полученных из различных тканей здоровых индивидов, с помощью полногеномного секвенирования идентифицировали мутации *in vivo*, приобретенные соматическими клетками в течение жизни индивида, и мутации, появившиеся в процессе репрограммирования и культивирования ИПСК *in vitro*. Оказалось, что частота возникновения однонуклеотидных вариантов на клетку на поколение в ИПСК в 10 раз ниже, чем в соматических клетках (Rouhani et al., 2016). Все это свидетельствует о существовании более мощных механизмов поддержания стабильности генома в ИПСК, чем в дифференцированных клетках. Тем не менее в значительной части линий ИПСК выявляются генетические аномалии, в том числе крупные хромосомные aberrации (Mayshar et al., 2010; Amps et al., 2011; Martins-Taylor et al., 2011; Taarpen et al., 2011). Для практического применения технологии клеточного репрограммирования важно понимание того, является возникновение этих аномалий следствием временной нестабильности генома в процессе репрограммирования или эта нестабильность является внутренне присущим свойством ИПСК.

Проявление генетической нестабильности возможно на разных уровнях организации генома (хромосомном, субхромосомном и нуклеотидном). Наибольшее негативное влияние на применение ИПСК оказывают крупные хромосомные аномалии, так как они неизбежно связаны с нарушениями функционирования большого числа генов. ИПСК обычно диплоидны вскоре после получения и могут сохранять нормальный кариотип в течение нескольких десятков и даже сотен пассажей, однако заметная часть (в среднем 10—25 %) клеточных линий демонстрирует аномалии хромосомного набора (Amps et al., 2011; Taarpen et al., 2011). Около 60 % аномалий повторяются в различных по происхождению линиях ИПСК человека, и самыми частыми из них являются трисомия хромосомы 12 (или частичная трисомия 12q), трисомия 17 и добавочная X-хромосома. Также неоднократно отмечены случаи трисомии по хромосоме 1 (или частичные дуплика-

ции регионов этой хромосомы) и трисомия хромосомы 8. Очень частой аномалией как в ЭСК, так и в ИПСК (около 20 % линий) являются трисомии 20q (или изохромосомы 20q) с амплификацией субсегмента 20q11.21 (Mayshar et al., 2010; Martins-Taylor et al., 2011; Salomonis et al., 2016). Эти так называемые частые или рекуррентные хромосомные aberrации в ПСКч, по-видимому, обеспечивают пролиферативное преимущество таких клеток в культуре (Kilpinen et al., 2017).

В обзоре рассматриваются особенности регуляции аппарата клеточного цикла и механизмов контроля числа хромосом в ИПСК, которые влияют на поддержание их генетической стабильности.

Особенности клеточного цикла в плюрипотентных стволовых клетках человека

Отличительной чертой плюрипотентных клеток является значительно более короткий клеточный цикл, чем в коммитированных и дифференцированных клетках (Barta et al., 2013; Calder et al., 2013). Укорочение происходит благодаря сокращению G₁-фазы: плюрипотентные клетки проводят ≈ 65 % клеточного цикла в S-фазе и только около 15 % — в G₁, тогда как в дифференцированных клетках G₁-фаза занимает до 40 % времени (Becker et al., 2006). В адаптированных к культуре ЭСК большая часть клеток находится в S-фазе в любой момент времени (Yang et al., 2008). Соматические клетки, репрограммированные в ИПСК, начинают делиться быстрее и приобретают укороченный клеточный цикл (Ghule et al., 2011; Ruiz et al., 2011). Высокая скорость пролиферации, характерная для плюрипотентных клеток, может достигаться за счет воздействия на негативный регулятор клеточного цикла, такой как белок ретинобластомы Rb (Ruiz et al., 2011). Когда ПСК коммитируются к одному из трех зародышевых листков, G₁-фаза становится длиннее, что приводит к увеличению времени деления клеток. Например, если продолжительность G₁-фазы увеличивали путем ингибирования активности циклинзависимой киназы CDK2, то ПСК спонтанно переходили к дифференцировке (Neganova et al., 2009; Ruiz et al., 2011; Soufi, Dalton, 2016).

Известно, что в соматических клетках анеуплоидии обычно приводят к метаболическим отклонениям и нарушению пролиферации (Gordon et al., 2012), однако «рекуррентные» анеуплоидии, приобретенные в культуре ПСКч, оказывают противоположное влияние на клеточный цикл. Так, при сравнении парных сублиний ПСКч (когда одна из сублиний в паре имела нормальный кариотип, а другая — трисомию 12 в первой паре и двойную трисомию хромосом 12 и 17 во второй паре) было обнаружено, что среднее время репликации и среднее расстояние между репликационными вилками в линиях ПСКч с «рекуррентными» анеуплоидиями были значительно меньше, чем в их эуплоидных аналогах (Lamm et al., 2016). ИПСК с «рекуррентными» анеуплоидиями быстрее растут (Baker et al., 2007; Werbowetski-Ogilvie et al., 2009; Lamm et al., 2016) и проводят больше времени в S-фазе (Ben-David 2014), чем их диплоидные аналоги. Таким образом, многочисленные быстрые клеточные циклы ПСКч усложняют работу аппарата репликации ДНК и поддержание стабильности генома, а процесс «культурной адаптации» сопровождается заметным увеличением скорости деления клеток (Werbowetski-Ogilvie et al., 2009) и часто

вовлекает определенные изменения хромосом (Baker et al., 2007). Таким образом, быстрая пролиферация в ИПСК может быть не только причиной, но и следствием хромосомных aberrаций.

Особенности функционирования контрольных точек клеточного цикла в плюрипотентных стволовых клетках человека

Для контроля прохождения различных фаз клеточного цикла эукариотические клетки используют несколько «сверочных» точек.

Контрольная точка G_1/S предотвращает вступление клеток с повреждениями ДНК в S-фазу. Исследования ЭСКч обнаружили отсутствие контрольной точки G_1/S при воздействии репликационного стресса (Desmarais et al., 2012). Интересно, что при ингибировании CDK2 может происходить арест клеток в G_1/S , причем ингибирование происходит с помощью CHK2-фосфорилирования CDC25, а не через путь p53—p21 (Bárta et al., 2010). В другом исследовании ингибирование CDK2 с помощью siRNA останавливало 97 % ЭСКч в G_1 -фазе. Кроме этого, ингибирование CDK2 приводило к морфологическим изменениям стволовых клеток, дифференцировке их по экстраэмбриональному пути и снижению экспрессии факторов плюрипотентности, что подчеркивает важность CDK2 в регуляции клеточного цикла и поддержании плюрипотентного статуса (Neganova et al., 2009).

Контрольная точка сборки веретена деления (spindle assembly checkpoint, SAC) контролирует ошибочное прикрепление хромосом к веретену, а дефекты белков, вовлеченных в SAC, ведут к хромосомной нестабильности в дочерних клетках (Musacchio, Salmon 2007; Rao et al., 2009). В работе Мантель с соавторами (Mantel et al., 2007) было показано, что в плюрипотентных клетках прохождение контрольной точки и переход на путь апоптоза разъединены, и для ЭСК (как человека, так и мыши) характерно продолжение деления вне зависимости от результатов прохождения контрольной точки. В соответствии с этим механизмом после дифференцировки в эмбрионидные тельца наблюдается апоптоз клеток с хромосомными нарушениями. Авторы полагают, что аномалии кариотипа в культурах ЭСК связаны со спецификой их стратегии поддержания генома, включающей в себя разобщение контрольной точкой сборки веретена деления и апоптоза (Mantel et al., 2007). Интересно, что в линии ИПСК с исходным кариотипом 45,X и самопроизвольной коррекцией кариотипа к нормальному, произошедшей в процессе репрограммирования, экспрессия генов контрольной точки сборки веретена деления была в 2—8 раз ниже, чем в аналогичных некорректируемых линиях ИПСК (Luo et al., 2015).

В соматических клетках неполная ДНК-репликация активирует контрольную точку S-фазы, что приводит к продолжительной остановке митоза и дает возможность завершить репликацию и репарировать повреждения ДНК. Десмараис и соавтор. (Desmarais et al., 2012) показали, что в условиях репликационного стресса ЭСК не способны активировать CHK1, которая в свою очередь должна запустить каскад ответа на повреждение ДНК, что приводит к аресту клеточного цикла, ингибированию активации ориджинов и стабилизации репликационных вилок (Cimprich, Cortez, 2008; Meuth, 2014). Вмес-

то этого ЭСК коммитируются к апоптозу без формирования оцДНК, т. е. в ЭСК неполная репликация ДНК не вызывает активации контрольной точки S-фазы и инициации репарации (Desmarais et al., 2012). Позже эта же группа исследовала механизм активации контрольной точки S-фазы в ИПСК, полученных при помощи трансфекции мРНК. Авторы индуцировали репликационный стресс путем добавления тимидина в ИПСК и показали, что ИПСК, так же как ЭСК, не способны активировать CHK1 при обработке ингибиторами репликации ДНК и вместо этого уходят в апоптоз (Desmarais et al., 2016). Таким образом, существует дефицит контрольной точки в S-фазе, зависящий от плюрипотентного статуса.

Кроме того, в ПСК также наблюдается дефицит контрольной точки разъединения в G_2/M , которая должна задерживать вступление в митоз до тех пор, пока не произойдет разъединение хромосом (Damelin et al., 2005). Правильная конденсация хромосом требует полной репликации ДНК (Gotoh, 2007). На линиях ПСКч с «рекуррентными» анеуплоидиями было показано, что присущие им нарушения репликации ДНК приводят к появлению частично конденсированных хромосом и последующим ошибкам сегрегации. Таким образом, из-за дефицита контрольной точки G_2/M в ИПСК неконденсированные хромосомы способны образовывать митотическое веретено деления и входить в митоз (Lamm et al., 2016).

Негативный контроль клеточного цикла является одним из ключевых механизмов, направленных на поддержание стабильности генетического материала. При повреждении ДНК, происходящем в процессе репликации, клетка утрачивает способность дальнейшего продвижения по циклу до того момента, пока дефект не будет исправлен, или переходит на путь апоптоза. Реализация системы ареста клетки для проведения репарации ДНК и направления ее к апоптозу осуществляется с помощью негативных регуляторов роста, важнейшим из которых является белок p53, кодируемый геном *TP53*. Он является транскрипционным фактором и может взаимодействовать с регуляторными последовательностями других генов, участвующих в контроле клеточного цикла, пролиферации, апоптоза и репарации ДНК, действуя как важный защитный механизм предотвращения неконтролируемой пролиферации клеток в ответ на повреждение ДНК (Hong et al., 2009). Одной из рекуррентных мутаций, возникающих в культурах ПСКч, оказались делеции региона короткого плеча хромосомы 17, содержащего *TP53* (Peterson et al., 2016; Merkle et al., 2017).

Маршон и соавторы (Marion et al., 2009a) показали, что p53 предотвращает репрограммирование клеток, несущих такие типы повреждений ДНК, как двухцепочечные разрывы, укороченные теломеры и экзогенные повреждения ДНК, а также клетки с нарушениями ДНК-репарации. Репрограммирование при наличии этих повреждений прекращается вследствие активации ответа на повреждение ДНК и индукции p53-зависимого апоптоза (Marion et al., 2009a). Выключение p53 позволяет осуществить репрограммирование при наличии поврежденной ДНК, и создать ИПСК, несущие стабильные хромосомные aberrации и повреждения ДНК (Hong et al., 2009). Это объясняет, почему ИПСК, полученные от p53-дефицитных фибробластов, формируют злокачественные опухоли у мышей (Sarig et al., 2010). Таким образом, в процессе репрограммирования возрастает непереносимость клеток к различным типам повреждений ДНК,

и p53 играет критическую роль в предотвращении генерирования человеческих и мышиных плюрипотентных клеток из субоптимальных исходных клеток (Marion et al., 2009a). В свою очередь нокаут p53 повышает эффективность репрограммирования, позволяя генетически нестабильным клеткам избегать апоптоза.

Однако Расмуссен и соавторы (Rasmussen et al., 2014) установили, что в отличие от нокаута временная супрессия гена *TP53* в процессе неинтегративного репрограммирования фибробластов человека приводит к значительному повышению общего числа колоний ИПСК и экспрессии маркеров плюрипотентности, не оказывая при этом влияния на апоптоз и масштаб повреждений ДНК. Авторы показали, что это происходит благодаря зависимости от p53 супрессии p21. Стабильные линии ИПСК, полученные с временной супрессией p53, и контрольные линии без супрессии продемонстрировали сравнимую экспрессию маркеров плюрипотентности и паттерны метилирования, имели стабильные нормальные кариотипы и давали начало функционально активным нейронам. Авторы полагают, что такой результат стал возможен благодаря сочетанию применения неинтегративных плазмид, что предотвращает избыточное повреждение ДНК, и низкой фоновой экспрессии *TP53*, которой достаточно для поддержания апоптоза (Rasmussen et al., 2014).

Активация апоптоза играет посредническую роль в индукции плюрипотентности, так как две основные протеазы, вовлеченные в клеточную смерть, каспазы 3 и 8, активируются OCT4 (Li et al., 2010). Обнаружено, что сниженный порог апоптоза в ЭСКЧ опосредован смещением баланса между про- и антиапоптотическими генами, которые направляют ЭСКЧ по пути быстрого апоптоза (Liu et al., 2013). Повышенный уровень экспрессии генов апоптоза *TP53* и *BAX* был отмечен во всех первичных колониях ИПСК, прекративших развитие, а в первичных колониях с генетической нестабильностью экспрессия генов *TP53* и *BAX* была выше, а антиапоптотического гена *BCL-2* — ниже, чем в колониях со стабильным геномом. Уровень экспрессии *TP53* был повышен также в колониях клеток с сегментными хромосомными абберациями по сравнению с колониями клеток с нормальным кариотипом (Yu et al., 2015). Таким образом, в ИПСК сохранность генома достигается путем гиперчувствительности к апоптозу, причем низкий порог апоптоза опосредован постоянной экспрессией p53 и заметным повышением экспрессии проапоптотических (таргетных для p53) генов семейства *BCL-2*, что обеспечивает эффективное уничтожение клеток с генетическими повреждениями (Dannemann et al., 2015).

Элиминация абберантных клеток из клеточной популяции ПСК может происходить помимо апоптоза и другим способом — переходом на путь дифференцировки, что тоже является механизмом предотвращения наследования возникших нарушений генома. Так, показано, что в ЭСКЧ экспрессия *NANOG* снижается в результате повреждения ДНК (Song et al., 2010).

Механизмы ответа на повреждение ДНК в плюрипотентных стволовых клетках человека

Ответ на повреждение ДНК (DNA damage responses, DDR) — важная защитная система предотвращения геномной нестабильности клеток, представляющая собой

сложную сигнальную сеть, которая индуцирует контрольные точки клеточного цикла и активирует пути репарации ДНК. Каскады, связанные с протеинкиназами ATM (Ataxia telangiectasia mutated) и ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related), — это два центральных пути DDR, которые выявляют различные абберации ДНК (Ciccio, Elledge, 2010). Путь ATM выявляет двухцепочечные разрывы, а путь ATR выявляет репликационный стресс (Matsuoka et al., 2007) с последующим индуцированием специфических механизмов репарации повреждений ДНК. DDR оказывает значительное влияние на клеточное репрограммирование. Эмбриональные фиброласты мыши с низким уровнем ATR невосприимчивы к репрограммированию (Von Joest et al., 2015), тогда как в клетках с одной сверхчисленной копией эффектора ATR, чекпойнт-киназы 1 (*CHK1*), эффективность репрограммирования повышается (Ruiz et al., 2015). Путь ATM-CHK2 также крайне важен для клеточного репрограммирования, поскольку клетки с дефицитом этого пути демонстрируют сниженную эффективность репрограммирования (Marion et al., 2009a) и повышенную частоту возникновения однонуклеотидных вариантов (Lu et al., 2016). Дефекты основных компонентов механизмов репарации двухцепочечных разрывов, включающие в себя мутации *ATM*, *FA*, *LIG4*, *XLG*, *DNA-PK*, *BRCA1*, *BRCA2* и *RAD51*, являются препятствиями для репрограммирования в плюрипотентное состояние (Gonzalez et al., 2013; Tilgner et al., 2013; Felgentreff et al., 2014; Lee et al., 2016). Этим, скорее всего, объясняется тот факт, что репрограммирование раковых клеток — редкое событие, и многочисленные попытки получить линии ИПСК, моделирующие специфические опухолевые заболевания, оказались неудачными (Kim, Zaret, 2015), либо репрограммирование происходило с гораздо меньшей эффективностью, чем в нетрансформированных клетках (Kotini et al., 2017). Таким образом, активация ответа на повреждение ДНК внутренне присуща процессу клеточного репрограммирования, и при многих аномалиях, снижающих генетическую стабильность, его прохождение невозможно. Это свидетельствует о том, что в процессе репрограммирования возникают различные типы повреждения ДНК (как репликационный стресс, так и двухцепочечные разрывы) и что целостность генома весьма важна для эффективности репрограммирования.

Повышение частоты двухцепочечных разрывов ДНК в клетках человека при усиленной экспрессии репрограммирующих факторов продемонстрировано с помощью γ H2AX-окрашивания — маркера двухцепочечных разрывов (Ji et al., 2014). Появление геномных аббераций в ИПСК позволяет предполагать, что повреждения ДНК, имевшие место в процессе репрограммирования, не были полностью исправлены. Это подтверждается тем, что частота субхромосомных аномалий в ИПСК ассоциирована с частотой двухцепочечных разрывов ДНК (Bai et al., 2014). Интересно, что хотя распределение вариаций числа копий ДНК (CNV), появившихся в процессе репрограммирования, различалось в линиях с мутациями ATM, однако CNV, появившиеся на поздних пассажах в процессе культивирования, распределились сходно в АТ-ИПСК и в ИПСК дикого типа (Lu et al., 2016). Это позволяет предположить, что чувствительность к нарушениям репарации максимальна именно в процессе репрограммирования. Тем не менее частота фокусов γ H2AX и 53BP1 оказалась повышена не только в процессе репрограммирования фибробластов, но и в процессе длительно-

го культивирования ИПСК по сравнению с исходными фибробластами (Simara et al., 2017).

Репликационным стрессом (РС) называется неэффективная репликация ДНК, вызванная остановкой и коллапсом репликационных вилок (Burrell et al., 2013). В результате репликационного стресса происходит постоянное формирование одноцепочечной ДНК, которая распознается ATR-киназой в S-фазе (Lecona, Fernandez-Capetillo, 2014), после чего ATR и связанная с ним CHK1 снижают уровень циклинзависимой киназы 1 (CDK1) и предотвращают входение в митоз (Flynn, Zou, 2011). CDK1 — ключевой компонент регуляции клеточного цикла, в особенности митоза. Неганова и соавторы (Neganova et al., 2014) при исследовании эффекта снижения регуляции CDK1 обнаружили кроме ожидаемого митотического дефицита еще большой спектр дополнительных нарушений, связанных с поддержанием плюрипотентности (снижение экспрессии маркеров плюрипотентности и повышение экспрессии маркеров дифференцировки), способностью к репарации двухцепочечных разрывов и коммитированием к апоптозу. ИПСК со сниженным уровнем экспрессии CDK1 накапливают после облучения большее число двухцепочечных разрывов, так как не способны активировать экспрессию чекпойнт-киназы 2 (CHK2) и арест клеточного цикла в G₂/M. Сниженная регуляция CDK1 ведет к накоплению клеток с аномальным числом митотических органелл, множественными хромосомными аномалиями и полиплоидией (Neganova et al., 2014).

В ИПСК обнаруживаются аберрации, специфические для репликационного стресса, такие как делеции и амплификации (Pasi et al., 2011), а геномные структурные вариации в ИПСК заметно обогащены фрагильными сайтами (Mayshar et al., 2010; Hussein et al., 2011; Pasi et al., 2011). Кроме того, в репрограммированных клетках наблюдается пан-нуклеарный паттерн фосфорилирования гистона H2AX, что также является маркером репликационного стресса (Syljuasen et al., 2005; Marion et al., 2009a).

Хотя причины репликационного стресса репрограммированных клеток еще не вполне понятны, они включают в себя недостаточный уровень дезоксирибонуклеотидов (Bester et al., 2011), сниженные уровни репликационных факторов (Flach et al., 2014) или мутации факторов репарации ДНК (Chlon et al., 2016; Okamura et al., 2016). Один из механизмов, лежащих в основе репликационно-индуцированной хромосомной нестабильности, — это формирование анафазных мостов из-за недореплицированных или неразшедшихся участков, которые сдерживают сегрегацию хромосом вследствие формирования физических связей между сестринскими хроматидами (Ozgeri-Galai et al., 2012). «Рекуррентные» анеуплоидии в ИПСК ведут к ускорению пролиферации и повышению чувствительности к ингибиторам репликации (Ben-David, 2014). Это позволяет предположить, что ИПСК, особенно с несбалансированными кариотипами, могут быть особенно уязвимы перед репликационным стрессом.

Согласно современным представлениям о биологии рака, каскад индуцированной онкогенами геномной нестабильности запускается гиперрепликацией, которая провоцирует возникновение РС (Halazonetis et al., 2008). Приобретение в процессе репрограммирования специфического для ИПСК быстрого клеточного цикла требует ускоренной пролиферации (Ruiz et al., 2011), что также приводит к усилению РС. Руиз и соавторы с помощью измерения экспрессии γ H2AX (непрямой маркер РС) и скорости репликационных вилок (прямой маркер РС) регист-

рировали повышенный уровень РС после индукции тремя факторами — OCT4, SOX2 и KLF4 (OSK), а использование с-MYC еще больше повышало уровень РС (Ruiz et al., 2015). Сходным образом, число de novo возникших CNV оказалось значительно выше при использовании четырех факторов репрограммирования (OSKM) по сравнению с использованием трех факторов (OSK) (Pasi et al., 2011). С учетом этих фактов можно заключить, что процесс репрограммирования, особенно с использованием с-MYC, индуцирует РС, который вносит значительный вклад в генерацию геномной нестабильности в ИПСК.

Так как экспрессия факторов репрограммирования и увеличение скорости деления клеток вызывают репликационный стресс и возрастание частоты повреждений генома в ИПСК, одна из исследовательских групп разработала стратегию снижения стресса. С этой целью был использован двойной подход: генетический — повышение уровня белка чекпойнт-киназы 1 (CHK1) для восстановления повреждений ДНК — и химический, основанный на добавлении нуклеозидов в процессе репрограммирования, что уменьшает груз повреждений ДНК и геномных перестроек в ИПСК. Снижение репликационного стресса в процессе репрограммирования — генетически или химически — дает стратегию минимизации генетической нестабильности ИПСК человека и возможность получения плюрипотентных стволовых клеток с меньшим уровнем повреждения генома (Ruiz et al., 2015).

Сигнальный путь WNT, который важен для эмбрионального развития и поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии, имеет, как оказалось, существенное значение и для процесса репрограммирования: обнаружено, что несоответствующая эктопическая активация WNT-сигналинга индуцирует хромосомную нестабильность ИПСК. Это подчеркивает рискованность активации WNT и ее тесную связь со злокачественной трансформацией (Ross et al., 2014).

Наиболее цитотоксическими среди различных типов повреждений ДНК являются двухцепочечные разрывы, которые могут возникать вследствие воздействия радиации, репликационного стресса, активных форм кислорода (ROS) и других повреждающих агентов. Существует два основных пути репарации двухцепочечных разрывов — негомологичное соединение концов (nonhomologous end joining, NHEJ) и гомологичная рекомбинация (homologous recombination, HR). Так как NHEJ вовлекает прямое лигирование концов разрыва, оно менее точно и склонно к ошибкам, а HR, основанная на использовании в качестве мишени сестринских хроматид либо гомологичных хромосом, отличается большей точностью репарации ДНК (Ciccica, Elledge, 2010). Таким образом, выбор пути репарации двухцепочечных разрывов влияет на целостность генома. Показано, что в отличие от дифференцированных клеток преобладающим путем репарации двухцепочечных разрывов в ЭСКч является гомологичная рекомбинация (Adams et al., 2010; Tichy et al., 2010), благодаря чему ПСК поддерживают более низкую частоту мутаций по сравнению с соматическими клетками.

Это обстоятельство представляется важным фактором, объясняющим феномен нестабильности кольцевых хромосом в ИПСК. Данное явление было описано Бернштейном и соавторами (Bershteyn et al., 2014), которые обнаружили самопроизвольную коррекцию кариотипа с потерей кольцевой хромосомы и замещением ее нормальным гомологом, которая произошла в четырех из шести

клонов ИПСК с t(17) и в семи из девяти клонов ИПСК с t(13), т. е. в подавляющем большинстве полученных клонов ИПСК. Авторы объясняют нестабильность кольцевых хромосом сочетанием следующих факторов: нарушение спаривания кольцевых хромосом со своим гомологом и формирование анафазных мостов в митозе; большое количество быстрых клеточных делений, которому подвергаются клетки в процессе репрограммирования; меньшая эффективность системы митотических контрольных точек в ИПСК. Однако нам представляется, что нестабильность кольцевых хромосом в значительной степени обусловлена именно особенностями репарации двухцепочечных разрывов в ИПСК с преимущественным использованием HR. В зависимости от способа разрешения хроматидных перекрестов HR может с высокой частотой приводить к обмену сестринскими хроматидами. Именно для кольцевых хромосом сестринские хроматидные обмены будут приводить к резкому повышению митотической нестабильности через формирование дигцентрических или сцепленных колец (Pristyazhnyuk, Menzegov, 2018), что в конечном счете, как было продемонстрировано нами, вызовет возникновение несбалансированных продуктов, фрагментацию или отставание кольцевых хромосом в анафазе (Кашеварова и др., 2017).

Еще одной особенностью ПСКЧ являются более сильная зависимость степени конденсации хромосом от репликационного стресса и влияние анеуплоидии на конденсацию хромосом. Анализ, проведенный на трех анеуплоидных, восьми диплоидных линиях ПСКЧ (ЭСК и ИПСК) и четырех соматических линиях (различного тканевого происхождения), выявил значительно более частые нарушения конденсации в ПСКЧ по сравнению с соматическими клетками. В соматических клеточных линиях (как с нормальным кариотипом, так и с трисомиями хромосом 5 и 21) нарушения конденсации были очень редки независимо от кариотипа. В диплоидных линиях ПСКЧ эти нарушения оказались более частыми, а в линиях с «рекуррентными» трисомиями (хромосом 12 и 17) их частота возрастала драматически. В условиях индуцированного афидоколином (ингибитором ДНК-полимераз α и σ) репликационного стресса чувствительность к стрессу зависела от типа клеток: диплоидные и трисомные линии соматических клеток не различались по частоте частично конденсированных метафазных пластинок (17%), тогда как линии ПСКЧ оказались чувствительными к репликационному стрессу (60 и 80% частично конденсированных метафазных пластинок в диплоидных и анеуплоидных линиях ПСКЧ соответственно) (Lamm et al., 2016). Репликационный стресс и частичная конденсация хромосом в метафазе приводят к таким ошибкам сегрегации, как анафазные мосты и хромосомные отставания (Downes et al., 1994; Burtell et al., 2013). Эти типы нарушения расхождения хромосом чаще встречались в ПСКЧ, чем в соматических клетках, при этом в анеуплоидных линиях ПСКЧ они встречались значительно чаще, чем в диплоидных линиях (Lamm et al., 2016). Если эти особенности анеуплоидных ПСК являются причиной возникновения хромосомных aberrаций, можно ожидать, что линии с аномалиями кариотипа будут более склонны к появлению новых анеуплоидий, так как эти факторы продолжают действовать. И действительно, кариотипирование шести диплоидных линий ПСКЧ выявило хромосомные aberrации в 2,9% метафазных пластинок, тогда как в трех анеуплоидных по хромосомам 12 и 17 линиях ПСКЧ дополнительные aberrации присутствовали в 34% метафазных пластин

тинок (Lamm et al., 2016). В других исследованиях также отмечалось, что ПСКЧ с трисомиями хромосом 12 и 17 часто несут дополнительные aberrации и становятся более анеуплоидными с течением времени (Baker et al., 2007; Amps et al., 2011). При длительном культивировании ИПСК, полученных из соматических клеток с уже имеющимися мутациями, происходило накопление дополнительных хромосомных аномалий по сравнению с контрольными линиями (Yu et al., 2015).

Насколько уже имеющиеся в исходных клетках числовые аномалии хромосом влияют на возможность репрограммирования и способность ПСК поддерживать целостность генома? ЭСК были получены от эмбрионов с аномальными кариотипами, включая триплоидии, моносомии X, трисомии по хромосомам 5, 12—14, 16, 17, 21, 22 и X (Biancotti, Benvenisty, 2011). При длительном культивировании линий ЭСК с трисомией 21 было продемонстрировано стабильное сохранение трех копий хромосомы 21 как на ранних, так и на поздних пассажах, линии не приобретали других аномалий кариотипа, что говорит об их генетической стабильности при культивировании (Biancotti et al., 2010). Линии ИПСК с анеуплоидиями были получены из лимфоцитов, амниотических или эпителиальных клеток с моносомией X, трисомиями 8, 13 и 21. Эти линии демонстрировали все маркеры плюрипотентности, включая способность к дифференцировке в три типа зародышевых листков, и сохраняли стабильный кариотип (Park et al., 2008; Li et al., 2012; Lee et al., 2017). Однако в некоторых исследованиях было зарегистрировано явление нормализации кариотипа ИПСК в части клонов. Так, спонтанная потеря лишней копии хромосомы 21 произошла в 1 из 4 клонов ИПСК с трисомией 21 (Maclean et al., 2012) и во всех трех клонах с трисомией хромосомы 18 (Li et al., 2017). В 1 из 4 линий ИПСК, полученных из фибробластов ворсин хориона с кариотипом 45,X, было обнаружено восстановление нормального кариотипа 46,XX путем возникновения однородительской дисомии по X-хромосоме. Клетки с дисомией X-хромосомы подвергались корректной X-инактивации, т. е. репрограммирование в ИПСК привело к коррекции кариотипа не только на геномном, но и на эпигеномном уровне. Интересно, что коррекция кариотипа воспроизводилась в данной клеточной линии как при ретровирусном, так и при эписомном репрограммировании, т. е. не зависела от интеграции вектора (Luo et al., 2015).

Хотя сверхчисленные маркерные хромосомы относительно стабильны в культуре фибробластов, репрограммирование таких клеток привело к появлению как изогенных линий ИПСК без маркера, так и линий с мозаичными кариотипами, содержащими маркерную хромосому в 10—60% клеток, что было заметно ниже, чем в родительских фибробластах. После дифференцировки в нейральном направлении частота маркерных хромосом изменилась и составила около 35% независимо от частоты в исходной линии ИПСК (Tcw et al., 2017). Клональное происхождение линий ИПСК позволяет предположить, что в линиях с нормальным кариотипом потеря маркерных хромосом произошла в процессе репрограммирования, а в мозаичных — в процессе культивирования ИПСК. Потеря сверхчисленных маркерных хромосом в части клеток может быть связана с нарушением их сегрегации в митозе. Митотическая стабильность маркерных элементов зависит от их формы и наличия теломер, как показано на иммортализованных клеточных линиях (Husein et al., 2014).

На мышцах было показано, что генетическая нестабильность по целым хромосомам не является барьером для репрограммирования: ИПСК были получены от линий с дефицитом генов митотической контрольной точки (*BubR1*) и разъединения ДНК (*RanBP2*), вследствие чего эти линии отличались значительной склонностью к ошибкам сегрегации хромосом. Однако в то время как линии с дефицитом *RanBP2* давали кариотипически нормальные клоны с низким уровнем хромосомной нестабильности, линии с дефицитом *BubR1* давали почти исключительно анеуплоидные ИПСК клоны с высокой нестабильностью. Эти результаты демонстрируют, что в процессе репрограммирования анеуплоидные клетки могут подвергаться положительной или отрицательной селекции в зависимости от конкретного генетического нарушения и что генный дефект, вызывающий хромосомную нестабильность и анеуплоидизацию соматических клеток, может пройти «спящим» через репрограммирование. Интересно, что полученные линии ИПСК с хромосомной нестабильностью оказались способны к дифференцировке во все три типа зародышевых листков (Nanada et al., 2012).

Хромосомная нестабильность часто связана с аномалиями числа и структуры центросом — органелл, которые организуют микротрубочки в веретено деления и руководят разделением удвоенных хромосом в процессе клеточного деления. Одной из таких аномалий является многополярное веретено, часто встречающееся в опухолевых клетках и связанное с наличием сверхчисленных центросом. При анализе 12 различных по происхождению линий ЭСК человека было показано, что на ранних пассажах мультицентросомные митозы составляют 10—24 %, тогда как в дифференцированных клеточных линиях, в том числе полученных от ЭСК, эта частота варьирует от 2 до 5 % (Holubcová et al., 2011). Это дает основание предположить, что именно плюрипотентный статус клетки связан с повышенной частотой аномалий числа центросом. Оказалось, что в ЭСК уровень белка Aurora A и уровень активности CDK2 выше по сравнению с соматическими клетками. Таким образом, и Aurora A, и CDK2, вероятно, вносят вклад в дисрегуляцию числа центросом, действуя через различные механизмы — сбой митоза в случае Aurora A и сверхамплификация центросом в клеточном цикле в случае CDK2 (Holubcová et al., 2011). Кроме того, аномальное число центросом связано с изменением уровней экспрессии компонентов контрольной точки сборки веретена деления — *BUB1*, *CENPE* и *MAD2* (Brevini et al., 2012). Ключевую роль в центросомном цикле играет Polo-like kinase 4 (*PLK4*), которая функционирует в процессе удвоения центриолей (Holland et al., 2010). Интересно, что обнаружена сильная генетическая ассоциация между генотипом матери по полиморфизму в гене *PLK4* и высокой частотой ошибок сегрегации хромосом в эмбриогенезе человека (McCoey et al., 2015).

Окислительный стресс и нестабильность генома индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Дыхательная цепь митохондрий продуцирует активные формы кислорода (reactive oxygen species — ROS), которые оказывают повреждающее воздействие на ДНК. На стадии бластоцисты, до имплантации, клетки внутрен-

ней клеточной массы не подвергаются воздействию избытка кислорода и в таком гипоксическом окружении не могут продуцировать достаточно АТФ путем митохондриального окислительного фосфорилирования, поэтому используют в основном анаэробный метаболический путь. ЭСК имеют небольшое число морфологически незрелых митохондрий, их энергетический метаболизм основан, скорее, на гликолизе, а не на окислительном фосфорилировании (Xu et al., 2013), поэтому они продуцируют меньше АТФ и ROS, а активность их антиоксидантных ферментов ниже. В числе других особенностей ИПСК воспроизводят энергетический метаболизм ЭСК. В процессе репрограммирования морфология митохондрий возвращается к незрелой, продукция АТФ снижается, а выработка лактата заметно повышается, т. е. ИПСК переходят на анаэробный гликолиз (Prigione et al., 2010; Folmes et al., 2011). Сниженный уровень ROS в плюрипотентных клетках позволяет предположить, что они меньше страдают от повреждений, индуцированных свободными радикалами, но это означает также и то, что они менее подготовлены, чтобы справиться с воздействием избытка ROS, если он возникает.

Однако в процессе репрограммирования прогрессивно снижающаяся активность митохондрий не может справиться с возрастающей потребностью в энергии, вызванной ускоренной пролиферацией, что повышает продукцию ROS. Действительно, в нескольких исследованиях был обнаружен повышенный уровень окислительного стресса и повреждений ДНК, что подчеркивает метаболический дисбаланс в процессе репрограммирования (Banito et al., 2009; Esteban et al., 2010). Повышенные уровни ROS в результате усиленной экспрессии факторов репрограммирования и вредное влияние окислительного стресса на эффективность репрограммирования и целостность генома ИПСК отмечены в ряде исследований (Esteban et al., 2010; Stadtfeld et al., 2012; Ji et al., 2014). Интересно, что гипоксические условия культивирования (3—5 % O₂) снижают окислительный стресс и накопление мутаций ДНК, предотвращают дифференцировку и способствуют повышению выживания многих типов клеток (Busuttil et al., 2003; Ezashi et al., 2005). Показано, что гипоксия также улучшает получение ИПСК, вероятнее всего, за счет ускорения метаболического переключения, необходимого для приобретения плюрипотентности (Yoshida et al., 2009; Mathieu et al., 2014).

Окислительный стресс вызовет повреждения различных клеточных структур, и ДНК особенно чувствительна к окислительным повреждениям (Neeley, Essigmann, 2006). Действие ROS может приводить к модификации индивидуальных нуклеотидных оснований, одно- и двухцепочечным разрывам (Vafa et al., 2002) и укорочению теломер (Von Zglinicki, 2002). Поэтому в плюрипотентных клетках должна существовать мощная защита против окислительного стресса. Анализ генных профилей установил, что экспрессия мРНК некоторых генов белков-антиоксидантов в ИПСК значительно повышена. Так, уровни некоторых глутатион S трансфераз (GST) повышены в ИПСК по сравнению с их соматическими предшественниками (Dannenmann et al., 2015). Наиболее выдающейся является GSTA2, уровень транскрипции которой в 80 000 раз выше в ИПСК по сравнению с первичными фибробластами. В 10 000 раз выше оказался уровень экспрессии мРНК глутатионпероксидазы 2 (GPX2). Повышена экспрессия некоторых пероксиредоксинов и глутатионредуктазы, что также подтверждает антиокислитель-

ный статус ИПСК (Dannenmann et al., 2015). Уровни глутатиона, наиболее важного клеточного антиоксиданта, в 3—4 раза выше в ИПСК по сравнению с фибробластами. Примечательно, что уровень ROS в фибробластах был на порядок выше, чем в ИПСК, что указывает на эффективное предотвращение окислительного стресса в плюрипотентных клетках. Нокдаун GPX2 и истощение глутатиона ослабляло защиту против повреждений ДНК. Таким образом, ИПСК обеспечивают целостность генома с помощью усиленной антиоксидантной защиты (Dannenmann et al., 2015).

Показано, что с-МYC является основным фактором, вызывающим повышение уровня ROS в процессе трансдукции фибробластов человека. Обработка клеток мощным антиоксидантом N-ацетилцистеином снижает уровень ROS в фибробластах, трансдуцированных OSKM и с-МYC, но не OSK (Ji et al., 2014). Добавление антиоксидантов используют для снижения окислительного стресса ИПСК, например витамин С и N-ацетилцистеин уменьшают, хотя и не элиминируют частоту возникших *de novo* CNV. Что интересно, обработка антиоксидантами не оказывает эффекта на частоту возникновения точковых мутаций (Ji et al., 2014), хотя наиболее вероятной причиной точковых мутаций, как показано недавно, является окислительный стресс (Yoshihara et al., 2017).

Однако хотя избыток ROS оказывает негативное воздействие и вызывает повреждения ДНК, в то же время ROS необходим как сигнал клеточного стресса для того, чтобы индуцировать ответ клеток на повреждение ДНК. Недавно было проведено исследование состояния окислительно-восстановительного гомеостаза при генерации ИПСК от пожилых доноров. На мышцах было показано, что ИПСК от старых особей накапливают большое число структурных аномалий хромосом, так как не способны активировать апоптоз в ответ на повреждения ДНК из-за нарушенной активации пути ATM. Геномная нестабильность в ИПСК от старых доноров индуцировалась высоким уровнем экспрессии глутатионсинтетазы (glutathione synthetase, GSS) вследствие недостатка экспрессии транскрипционного фактора цинковых пальцев ZSCAN10. Его активация позволила получить нормальные ИПСК от старых доноров как для мышей, так и для человека (Skamagki et al., 2017). Таким образом, для сохранения генетической стабильности необходим баланс между ROS и антиоксидантами, а использование антиоксидантов, по некоторым данным, супрессирует соматическое репрограммирование фибробластов (Zhou et al., 2016). Роль ROS в технологии ИПСК должна быть тщательно исследована для каждого типа клеток.

Целостность теломер клеток в плюрипотентном статусе

Теломеры — это специальные структуры, состоящие из повторяющихся последовательностей ДНК, защищающих концы хромосом от деградации и концевых слияний. С каждым делением клетки теломеры укорачиваются вследствие «проблем концевой репликации». Поддержание длины теломер важно не только для сохранения стабильности генома, но также критично для процессов канцерогенеза и старения. Есть два важных различия между дифференцированными и стволовыми клетками, касающиеся теломер: длина теломер и активность теломеразы. Теломеразы (фермент, отвечающий за элонгацию тело-

мер) репрессирована в большинстве дифференцированных клеток, но экспрессируется в стволовых клетках, включая ПСК и взрослые стволовые клетки, и реактивируется в опухолевых клетках. В процессе репрограммирования теломеразы активируется путем индукции субъединицы теломеразы — обратной транскриптазы (hTERT) и теломеразного РНК-компонента (TERC) (Takahashi et al., 2007; Agarwal et al., 2010), которые, вероятно, регулируются в стволовых клетках Wnt/ β -catenin-сигналингом с KLF4 и (или) TCF4, OCT3/4 и NANOG соответственно (Agarwal et al., 2010; Wong et al., 2010; Hoffmeyer et al., 2012; Zhang et al., 2012).

В процессе репрограммирования происходит реактивация теломеразы, при этом длина и эпигенетический статус теломер в ИПСК «омолаживаются», что дает клеткам неограниченный пролиферативный потенциал (Takahashi et al., 2007; Stadtfeld et al., 2008; Marion et al., 2009b; Wang et al., 2012). Эпигенетические изменения теломерных последовательностей происходят в направлении ЭСК-подобного состояния, с модификацией гистонов для деконденсации хроматина и усиленной транскрипцией в теломерных локусах (Liu, 2017). Интересно, что повышенная частота сестринских хроматидных обменов в теломерах и элонгация теломер наблюдались даже тогда, когда для репрограммирования использовались старые клетки с укороченными теломерами (Marion et al., 2009b). Однако клетки с дефицитом теломеразы и критически укороченными теломерами не могут пройти репрограммирование, что позволяет предполагать существование минимальной длины, при которой репрограммирование еще возможно (Marion et al., 2009b). Укороченные теломеры влияют не только на эффективность репрограммирования, но и на качество ИПСК, оцениваемое с помощью тестов на плюрипотентность (Marion et al., 2009b; Huang et al., 2011), а также на их хромосомную стабильность (Terai et al., 2013).

В нормальных клетках человека критически укороченные теломеры теряют протективную функцию для концов хромосомы и распознаются как эндогенные повреждения ДНК. В результате индуцируется ответ на повреждение ДНК, включающий в себя активацию ATM, ATR и эффекторных киназ CHK1 и CHK2, а также фосфорилирование p53, что запускает клеточное старение путем стимуляции экспрессии циклинзависимого ингибитора киназ p21 (Deng et al., 2008). Показано, что в клетках с критически укороченными теломерами супрессия p53 улучшает эффективность репрограммирования (Marion et al., 2009a). Таким образом, активация теломеразы при репрограммировании играет центральную роль не только в элонгации теломер и приобретении ЭСК-подобного состояния хроматина, но и в восстановлении и поддержании протективных функций теломер на концах хромосом для подавления ответа на повреждения ДНК (Shitamamoto et al., 2015), а соответствующая элонгация и поддержание длины теломер существенно влияют на генетическую целостность ИПСК.

Однако помимо удлинения теломер в репрограммировании играет роль и противоположно направленный механизм, т. е. обрезание теломер — процесс, контролируемый белками XRCC3 и Nbs1, которые продуцируют одноцепочечную С-богатую теломерную ДНК и двухцепочечную циркулярную теломерную ДНК соответственно. Длина теломер определяется балансом между элонгацией теломер с помощью теломеразы и обрезанием теломер, а репрограммирование дифференцированных клеток

индуцирует активацию обрезания теломер, которое компенсирует элонгацию теломер в ПСК. Оказалось, что чрезмерное удлинение теломер снижает их стабильность и повышает чувствительность стволовых клеток к репликационному стрессу. Таким образом, для поддержания стабильности теломер в ПСК необходим жесткий контроль длины теломер (Rivera et al., 2017).

Заключение

Таким образом, в ПСКч существуют более мощные, чем в дифференцированных клетках, механизмы поддержания стабильности генома, которые обеспечиваются повышенной экспрессией генов различных путей репарации ДНК, усиленной антиоксидантной защитой и сниженным порогом апоптоза. Скорость накопления мутаций в ПСКч оказывается также ниже, чем в соматических клетках. Тем не менее в значительной части линий ИПСК выявляются генетические аномалии, в том числе хромосомного и субхромосомного уровня, которых не было в исходных клетках. Полученные к настоящему времени данные позволяют предположить, что причиной этого может быть сочетание ускоренной пролиферации и тенденции к амплификации центросом, которые создают больше возможностей для возникновения аномалий, и уникального клеточного цикла со специфической активацией контрольных точек. Слабость контрольных точек в ПСКч позволяет продолжать клеточный цикл даже при наличии репликационных дефектов или неправильной сегрегации хромосом. Суммарно, несколько факторов могут приводить к частой регистрации генетических аномалий в ИПСК.

1. Временное повышение нестабильности генома в процессе репрограммирования. Все 4 классических фактора репрограммирования являются онкогенами. *c-MYC* и *KLF4* имеют хорошо установленную роль в опухолевом генезе, *OCT4* является важным инициатором герминативных опухолей (Suva et al., 2013) и участвует в прогрессии рака груди (Kar, Patra, 2018). *SOX2* также является онкогеном, ассоциированным с плоскоклеточными карциномами легких и пищевода и мелкоклеточными карциномами легких (Bass et al., 2009). В то же время основным барьером для клеточного репрограммирования служат важные опухолевые супрессоры *p53* и *INK4/ARF* (Li et al., 2009; Marion et al., 2009a). Высокая скорость пролиферации, характерная для плюрипотентных клеток, может достигаться путем выключения другого негативного регулятора клеточного цикла — *Rb* (Ruiz et al., 2011), мутации в котором обнаруживаются при опухолях сетчатки.

2. Преимущества в росте, приобретаемые при рекуррентных генетических аномалиях. По-видимому, абберрации возникают случайным образом, и это приводит к появлению кариотипически гетерогенных культур. Абберрации, которые дают клеткам пролиферативное преимущество, довольно быстро начинают преобладать в культуре: лишь несколько пассажей проходит между обнаружением аномалии в единичных клетках и их широким распространением (Baker et al., 2007; Mayshar et al., 2010; Peterson et al., 2016). Такие хромосомные абберрации, как полные или частичные трисомии хромосом 1, 12, 17, 20 и X, встречаются в ПСК гораздо чаще, чем другие (Mayshar et al., 2010; Amps et al., 2011; Martins-Taylor et al., 2011; Peterson et al., 2016), и они же выявляются в клетках герминативных опухолей *in vivo* (Baker et al.,

2007; Ben-David, Benvenisty, 2011). Спектр рекуррентных хромосомных абберраций, возникающих в ИПСК человека, разительно отличается от хромосомных аномалий, возникающих в эмбриогенезе (Lebedev, 2011), что подчеркивает ведущую роль стрессового окружения в поддержке специфических абберраций, наблюдаемых в культурах ПСКч.

3. Постзиготический полиморфизм низкого уровня, существовавший в клетках-родоначальниках и не выявляемый при использовании обычных методов, в результате клональной экспансии в ИПСК может стать дополнительным источником регистрации генетических вариантов (Abyzov et al., 2012; Young et al., 2012; Schlaeger et al., 2015). Некоторые авторы считают даже, что скорость накопления мутаций в клонах ИПСК и фибробластах не различается (Kwon et al., 2017).

4. Наконец, как особый случай проявления нестабильности можно рассматривать нормализацию кариотипа в ИПСК, полученных из исходных клеток с хромосомными аномалиями (трисомиями, моносомией X, кольцевыми или маркерными хромосомами) (Maclean et al., 2012; Bershteyn et al., 2014; Luo et al., 2015; Li et al., 2017; Tcw et al., 2017).

Существуют свидетельства того, что ПСКч с некоторыми генетическими аномалиями имеют нарушенную способность к дифференцировке (Werbowetski-Ogilvie et al., 2009; Fazeli et al., 2011) и проявляют тенденцию продуцировать недоразвившиеся тератомы, содержащие большую долю недостаточно дифференцированных или недифференцированных клеток с повышенной способностью к малигнизации (Herszfeld et al., 2006; Yang et al., 2008; Werbowetski-Ogilvie et al., 2009). Более того, ПСКч с абберрациями демонстрируют измененные профили экспрессии генов с повышенной активностью некоторых онкогенов (Yang et al., 2008; Werbowetski-Ogilvie et al., 2009; Gopalakrishna-Pillai, Iverson, 2010). Геномная нестабильность — одно из главных препятствий в клиническом использовании технологии стволовых клеток. Полностью предотвратить какие-либо изменения в геномном типе ИПСК практически невозможно, но необходимо исключить: 1) хромосомные аномалии — как числовые, так и структурные; 2) генетические дефекты, аналогичные встречающимся в опухолевых клетках, такие как активация онкогенов или инактивация опухолевых супрессоров; 3) мутации, затрагивающие кодирующие регионы генов, которые приведут к изменению последовательности белка, например новые стоп-кодоны, сдвиг рамки считывания или изменение сплайсинга; 4) «рекуррентные» аномалии, повторяющиеся в культурах ПСКч.

В настоящее время значительные усилия посвящены оптимизации процесса репрограммирования и условий культивирования для повышения генетической стабильности ИПСК и их безопасности при клиническом применении. Поддержание стабильности генома критично для большинства сфер применения ИПСК, таких как клеточная терапия, создание клеточных моделей наследственных заболеваний или исследований процессов раннего развития и дифференцировки. Понимание источников возникновения геномных аномалий необходимо для того, чтобы уменьшить их влияние в процессе репрограммирования, что позволит получать более качественные и безопасные линии ИПСК. Исходя из результатов исследований генетической стабильности ПСКч и предполагаемых механизмов, задействованных в ее поддержании, предложены возможные способы снижения геномной изменчи-

востии ИПСК: исключение с-МУС из числа факторов репрограммирования, снижение концентрации кислорода для уменьшения окислительного стресса; снижение активности CDK2; повышение уровня СНК1 и добавление нуклеозидов в процессе репрограммирования для снижения репликационного стресса. Очевидно, что понимание механизмов возникновения и, что более важно, контроля геномной нестабильности может значительно улучшить ценность ПСКч и их производных для практического применения в медицине и в качестве экспериментальных моделей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10231).

Список литературы

- Кашевара А. А., Беляева Е. О., Никонов А. М., Плотникова О. В., Гергерт И. Г., Никитина Т. В., Скрябин Н. А., Мензоров А. Г., Гридина М. М., Васильев С. А., Лопаткина М. Е., Савченко Р. Р., Чурилова А. В., Толмачева Е. Н., Серов О. Л., Назаренко Л. П., Лебедев И. Н. 2017. Спонтанная хромосомная нестабильность в клетках с кольцевой хромосомой как основа хромосомной терапии. *Мед. генет.* 16 (12) : 18—26. (Kashevarova A. A., Belyaeva E. O., Nikonov A. M., Plotnikova O. V., Gergert I. G., Nikitina T. V., Skryabin N. A., Menzorov A. G., Gridina M. M., Vasilyev S. A., Lopatkina M. E., Savchenko R. R., Churilova A. V., Tolmacheva E. N., Serov O. L., Nazarenko L. P., Lebedev I. N. 2017. Spontaneous chromosomal instability in cells with a ring chromosome as the basis for chromosomal therapy. *Med. Genet.* 16 (12) : 18—26.)
- Abyzov A., Mariani J., Palejev D., Zhang Y., Haney M. S., Tomasini L., Ferrandino A. F., Rosenberg Belmaker L. A., Szekely A., Wilson M., Kocabas A., Calixto N. E., Grigorenko E. L., Hutner A., Chawarska K., Weissman S., Urban A. E., Gerstein M., Vaccarino F. M. 2012. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature.* 492 : 438—442.
- Adams B. R., Golding S. E., Rao R. R., Valerie K. 2010. Dynamic dependence on ATR and ATM for double-strand break repair in human embryonic stem cells and neural descendants. *PLoS ONE.* 5 : e10001. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010001>.
- Agarwal S., Loh Y. H., McLoughlin E. M., Huang J., Park I. H., Miller J. D., Huo H., Okuka M., Dos Reis R. M., Loefer S., Ng H. H., Keefe D. L., Goldman F. D., Klingelhuiz A. J., Liu L., Daley G. Q. 2010. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenital patients. *Nature.* 464 : 292—296.
- Amps K., Andrews P. W., Anyfantis G., Armstrong L., Avery S., Baharvand H., Baker J., Baker D., Munoz M. B., Beil S. et al. 2011. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 29 : 1132—1144.
- Bai Q., Ramirez J.-M., Becker F., Pantesco V., Lavabre-Bertrand T., Hovatta O., Lemaître J.-M., Pellestor F., De Vos J. 2014. Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 24 : 653—662.
- Baker D. E. C., Harrison N. J., Maltby E., Smith K., Moore H. D., Shaw P. J., Heath P. R., Holden H., Andrews P. W. 2007. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 25 : 207—215.
- Banito A., Rashid S. T., Acosta J. C., Li S., Pereira C. F., Geti I., Pinho S., Silva J. C., Azuara V., Walsh M., Vallier L., Gil J. 2009. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Develop.* 23 : 2134—2139.
- Barta T., Dolezalova D., Holubcova Z., Hampl A. 2013. Cell cycle regulation in human embryonic stem cells: links to adaptation to cell culture. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 238 : 271—275.
- Barta T., Vinarsky V., Holubcova Z., Dolezalova D., Verner J., Pospisilova S., Dvorak P., Hampl A. 2010. Human embryonic stem cells are capable of executing G₁/S checkpoint activation. *Stem Cells.* 28 : 1143—1152.
- Bass A. J., Watanabe H., Mermel C. H., Yu S., Perner S., Verhaak R. G., Kim S. Y., Wardwell L., Tamayo P., Gat-Viks I. et al. 2009. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* 41 : 1238—1242.
- Becker K. A., Ghule P. N., Therrien J. A., Lian J. B., Stein J. L., van Wijnen A. J., Stein G. S. 2006. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G₁ cell cycle phase. *J. Cell. Physiol.* 209 : 883—893.
- Ben-David U. 2014. Genomic instability, driver genes and cell selection: projections from cancer to stem cells. *Biochim. biophys. acta.* 1849 : 427—435.
- Ben-David U., Benvenisty N. 2011. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Cancer.* 11 : 268—277.
- Bershteyn M., Hayashi Y., Desachy G., Hsiao E. C., Sami S., Tsang K. M., Weiss L. A., Kriegstein A. R., Yamanaka S., Wynshaw-Boris A. 2014. Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human-induced pluripotent stem cells. *Nature.* 507 : 99—103.
- Bester A. C., Roniger M., Oren Y. S., Im M. M., Sarni D., Chaoat M., Bensimon A., Zamir G., Shewach D. S., Kerem B. 2011. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell.* 145 : 435—446.
- Biancotti J. C., Benvenisty N. 2011. Aneuploid human embryonic stem cells: origins and potential for modeling chromosomal disorders. *Regen. Med.* 6 : 493—503.
- Biancotti J.-C., Narwani K., Buehler N., Mandefro B., Golan-Lev T., Yanuka O., Clark A., Hill D., Benvenisty N., Lavon N. 2010. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. *Stem Cells.* 28 : 1530—1540.
- Boward B., Wu T., Dalton S. 2016. Concise review: control of cell fate through cell cycle and pluripotency networks. *Stem Cells.* 34 : 1427—1436.
- Brevini T. A., Pennarossa G., Maffei S., Tettamanti G., Vanelli A., Isaac S., Eden A., Ledda S., de Eguileor M., Gandolfi F. 2012. Centrosome amplification and chromosomal instability in human and animal parthenogenetic cell lines. *Stem Cell Rev.* 8 : 1076—1087.
- Burrell R. A., McClelland S. E., Endesfelder D., Groth P., Weller M.-C., Shaikh N., Domingo E., Kanu N., Dewhurst S. M., Gronroos E., Chew S. K., Rowan A. J., Schenk A., Sheffer M., Howell M., Kschischo M., Behrens A., Helleday T., Bartek J., Tomlinson I. P., Swanton C. 2013. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature.* 494 : 492—496.
- Busuttill R. A., Rubio M., Dolle M. E., Campisi J., Vijg J. 2003. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell.* 2 : 287—294.
- Calder A., Roth-Albin I., Bhatia S., Pilquil C., Lee J. H., Bhatia M., Levadoux-Martin M., McNicol J., Russell J., Collins T., Draper J. S. 2013. Lengthened G₁ phase indicates differentiation status in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 22 : 279—295.
- Chlon T. M., Ruiz-Torres S., Maag L., Mayhew C. N., Wikenheiser-Brokamp K. A., Davies S. M., Mehta P., Myers K. C., Wells J. M., Wells S. I. 2016. Overcoming pluripotent stem cell dependence on the repair of endogenous DNA damage. *Stem Cell Reports.* 6 : 44—54.
- Ciccio A., Elledge S. J. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell.* 40 : 179—204.
- Cimprich K. A., Cortez D. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev.* 9 : 616—627.
- Cooper D. J., Walter C. A., McCarrey J. R. 2014. Co-regulation of pluripotency and genetic integrity at the genomic level. *Stem Cell Res.* 13 : 508—519.
- Damelin M., Sun Y. E., Sodja V. B., Bestor T. H. 2005. Decatenation checkpoint deficiency in stem and progenitor cells. *Cancer Cell.* 8 : 479—484.

- Dannenmann B., Lehle S., Hildebrand D. G., Kubler A., Grondona P., Schmid V., Holzer K., Froschl M., Essmann F., Rothfuss O., Schulze-Osthoff K. 2015. High glutathione and glutathione peroxidase-2 levels mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 4 : 886—898.
- Deng Y., Chan S. S., Chang S. 2008. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat. Rev. Cancer*. 8 : 450—458.
- Desmarais J. A., Hoffmann M. J., Bingham G., Gagou M. E., Meuth M., Andrews P. W. 2012. Human embryonic stem cells fail to activate CHK1 and commit to apoptosis in response to DNA replication stress. *Stem Cells*. 30 : 1385—1393.
- Desmarais J. A., Unger C., Damjanov I., Meuth M., Andrews P. 2016. Apoptosis and failure of checkpoint kinase 1 activation in human induced pluripotent stem cells under replication stress. *Stem Cell Res. Therapy*. 7 : 17.
- Downes C. S., Clarke D. J., Mullinger A. M., Gimenez-Abian J. F., Creighton A. M., Johnson R. T. 1994. A topoisomerase II-dependent G₂ cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature*. 372 : 467—470.
- Esteban M. A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., Chen K., Li Y., Liu X., Xu J., Zhang S., Li F., He W., Labuda K., Song Y., Peterbauer A., Wolbank S., Redl H., Zhong M., Cai D., Zeng L., Pei D. 2010. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 6 : 71—79.
- Ezashi T., Das P., Roberts R. M. 2005. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 102 : 4783—4788.
- Fazeli A., Liew C.-G., Matin M. M., Elliott S., Jeanmeure L. F. C., Wright P. C., Moore H., Andrews P. W. 2011. Altered patterns of differentiation in karyotypically abnormal human embryonic stem cells. *Int. J. Develop. Biol.* 55 : 175—180.
- Felgentreff K., Du L., Weinacht K. G., Dobbs K., Bartish M., Giliani S., Schlaeger T., DeVine A., Schambach A., Woodbine L. J., Davies G., Baxi S. N., van der Burg M., Bleesing J., Gennery A., Manis J., Pan-Hammarström Q., Notarangelo L. D. 2014. Differential role of nonhomologous end joining factors in the generation, DNA damage response, and myeloid differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 111 : 8889—8894.
- Flach J., Bakker S. T., Mohrin M., Conroy P. C., Pietras E. M., Reynaud D., Alvarez S., Diolaiti M. E., Ugarte F., Forsberg E. C., Le Beau M. M., Stohr B. A., Méndez J., Morrison C. G., Passegué E. 2014. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature*. 512 : 198—202.
- Flynn R. L., Zou L. 2011. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem. Sci.* 36 : 133—140.
- Folmes C. D. L., Nelson T. J., Martinez-Fernandez A., Arrell D. K., Lindor J. Z., Dzeja P. P., Ikeda Y., Perez-Terzic C., Terzic A. 2011. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* 14 : 264—271.
- Ghule P. N., Medina R., Lengner C. J., Mandeville M., Qiao M., Dominski Z., Lian J. B., Stein J. L., van Wijnen A. J., Stein G. S. 2011. Reprogramming the pluripotent cell cycle: restoration of an abbreviated G₁ phase in human induced pluripotent stem (iPS) cells. *J. Cell. Physiol.* 226 : 1149—1156.
- González F., Georgieva D., Vanoli F., Shi Z.-D., Stadtfeld M., Ludwig T., Jasin M., Huangfu D. 2013. Homologous recombination DNA repair genes play a critical role in reprogramming to a pluripotent state. *Cell Rep.* 3 : 651—660.
- Gopalakrishna-Pillai S., Iverson L. E. 2010. Astrocytes derived from trisomic human embryonic stem cells express markers of astrocytic cancer cells and premalignant stem-like progenitors. *BMC Med. Genomics*. 3 : 12.
- Gordon D. J., Resio B., Pellman D. 2012. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 13 : 189—203.
- Gotoh E. 2007. Visualizing the dynamics of chromosome structure formation coupled with DNA replication. *Chromosoma*. 116 : 453—462.
- Halazonetis T. D., Gorgoulis V. G., Bartek J. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 319 : 1352—1355.
- Hamada M., Malureanu L. A., Wijshake T., Zhou W., van Dersuren J. M. 2012. Reprogramming to pluripotency can conceal somatic cell chromosomal instability. *PLoS Genet.* 8 : e1002913.
- Herszfeld D., Wolvetang E., Langton-Bunker E., Chung T. L., Filipczyk A. A., Houssami S., Jamshidi P., Koh K., Laslett A. L., Michalska A., Nguyen L., Reubinoff B. E., Tellis I., Auerbach J. M., Ording C. J., Looijenga L. H., Pera M. F. 2006. CD30 is a survival factor and a biomarker for transformed human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 24 : 351—357.
- Hoffmeyer K., Raggioli A., Rudloff S., Anton R., Hierholzer A., Del Valle I., Hein K., Vogt R., Kemler R. 2012. Wnt/β-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. 336 : 1549—1554.
- Holland A. J., Lan W., Niessen S., Hoover H., Cleveland D. W. 2010. Polo-like kinase 4 kinase activity limits centrosome overduplication by autoregulating its own stability. *J. Cell Biol.* 188 : 191—198.
- Holubcová Z., Matula P., Sedláčková M., Vinarský V., Doležalová D., Bárta T., Dvořák P., Hampl A. 2011. Human embryonic stem cells suffer from centrosomal amplification. *Stem Cells*. 29 : 46—56.
- Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Kanagawa O., Nakagawa M., Okita K., Yamanaka S. 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53—p21 pathway. *Nature*. 460 : 1132—1135.
- Huang J., Wang F., Okuka M., Liu N., Ji G., Ye X., Zuo B., Li M., Liang P., Ge W. W., Tsibris J., Keefe D. L., Liu L. 2011. Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Res.* 21 : 779—792.
- Hussein S. M., Batada N. N., Vuoristo S., Ching R. W., Autio R., Narva E., Ng S., Sourovic R., Hamalainen R., Olsson C., Lundin K., Mikkola M., Trokovic R., Peitz M., Brüstle O., Bazett-Jones D. P., Alitalo K., Lahesmaa R., Nagy A., Otonkoski T. 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*. 471 : 58—62.
- Hussein S. S., Kreskowski K., Ziegler M., Klein E., Hamid A. B., Kosyakova N., Volleth M., Liehr T., Fan X., Piaszinski K. 2014. Mitotic stability of small supernumerary marker chromosomes depends on their shape and telomeres — a long term *in vitro* study. *Gene*. 552 : 246—248.
- Ji J., Sharma V., Qi S., Guarch M. E., Zhao P., Luo Z., Fan W., Wang Y., Mbabaali F., Neculai D., Esteban M. A., McPherson J. D., Batada N. N. 2014. Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2 : 44—51.
- Kar S., Patra S. K. 2018. Overexpression of OCT4 induced by modulation of histone marks plays crucial role in breast cancer progression. *Gene*. 643 : 35—45.
- Kilpinen H., Goncalves A., Leha A., Afzal V., Alasoo K., Ashford S., Bala S., Bensaddek D., Casale F. P., Culley O. J. et al. 2017. Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature*. 546 : 370—375.
- Kim J., Zaret K. S. 2015. Reprogramming of human cancer cells to pluripotency for models of cancer progression. *EMBO J.* 34 : 739—747.
- Kotini A. G., Chang C. J., Chow A., Yuan H., Ho T. C., Wang T., Vora S., Solovyov A., Husser C., Olszewska M. et al. 2017. Stage-specific human induced pluripotent stem cells map the progression of myeloid transformation to transplantable leukemia. *Cell Stem Cell*. 20 : 315—328.
- Kwon E. M., Connelly J. P., Hansen N. F., Donovan F. X., Winkler T., Davis B. W., Alkadi H., Chandrasekharappa S. C., Dunbar C. E., Mullikin J. C., Liu P. 2017. iPSCs and fibroblast subclones from the same fibroblast population contain comparable levels of sequence variations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 114 : 1964—1969.

- Lamm N., Ben-David U., Golan-Lev T., Storchová Z., Benvenisty N., Kerem B. 2016. Genomic instability in human pluripotent stem cells arises from replicative stress and chromosome condensation defects. *Cell Stem Cell*. 18 : 253—261.
- Lebedev I. 2011. Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenet. Genome Res.* 133 : 169—183.
- Lecona E., Fernandez-Capetillo O. 2014. Replication stress and cancer: it takes two to tango. *Exp. Cell Res.* 329 : 26—34.
- Lee J. Y., Kim D. K., Ko J. J., Kim K. P., Park K. S. 2016. Rad51 regulates reprogramming efficiency through DNA repair pathway. *Develop. Reprod.* 20 : 163—169.
- Lee M. Y., Zampieri B. L., Scott-McKean J. J., Johnson M. W., Costa A. C. S. 2017. Generation of integration-free induced pluripotent stem cells from urine-derived cells isolated from individuals with Down syndrome. *Stem Cells Transl. Med.* 6 : 1465—1476.
- Li F., He Z., Shen J., Huang Q., Li W., Liu X., He Y., Wolf F., Li C. Y. 2010. Apoptotic caspases regulate induction of iPSCs from human fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 7 : 508—520.
- Li H., Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Cañamero M., Blasco M. A., Serrano M. 2009. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*. 460 : 1136—1139.
- Li T., Zhao H., Han X., Yao J., Zhang L., Guo Y., Shao Z., Jin Y., Lai D. 2017. The spontaneous differentiation and chromosome loss in iPSCs of human trisomy18 syndrome. *Cell Death Dis.* 8 : e3149.
- Li W., Wang X., Fan W., Zhao P., Chan Y. C., Chen S., Zhang S., Guo X., Zhang Y., Li Y., Cai J., Qin D., Li X., Yang J., Peng T., Zychlinski D., Hoffmann D., Zhang R., Deng K., Ng K.M., Menten B., Zhong M., Wu J., Li Z., Chen Y., Schambach A., Tse H. F., Pei D., Esteban M. A. 2012. Modeling abnormal early development with induced pluripotent stem cells from aneuploid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 21 : 32—45.
- Liedtke S., Biebrnick S., Radke T. F., Stapelkamp D., Coenen C., Zaehres H., Fritz G., Kogler G. 2015. DNA damage response in neonatal and adult stromal cells compared with induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* 6 : 576—589.
- Liu J. C., Guan X., Ryan J. A., Rivera A. G., Mock C., Agrawal V., Letai A., Lerou P. H., Lahav G. 2013. High mitochondrial priming sensitizes hESCs to DNA-damage-induced apoptosis. *Cell Stem Cell*. 13 : 483—491.
- Liu L. 2017. Linking telomere regulation to stem cell pluripotency. *Trends Genet.* 33 : 16—33.
- Lu J., Li H., Bacceti A., Sasaki T., Gilbert D. M., Lerou P. H. 2016. Influence of ATM-mediated DNA damage response on genomic variation in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Develop.* 25 : 740—747.
- Luo L. Z., Gopalakrishna-Pillai S., Nay S. L., Park S. W., Bates S. E., Zeng X., Iverson L. E., O'Connor T. R. 2012. DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS ONE*. 7 : e30541.
- Luo Y., Zhu D., Du R., Gong Y., Xie C., Xu X., Fan Y., Yu B., Sun X., Chen Y. 2015. Uniparental disomy of the entire X chromosome in Turner syndrome patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Discov.* 1 : 15022.
- Maclean G. A., Menne T. F., Guo G., Sanchez D. J., Park I. H., Daley G. Q., Orkin S. H. 2012. Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through *in vitro* differentiation of isogenic human pluripotent cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 109 : 17 567—17 572.
- Mantel C., Guo Y., Lee M. R., Kim M. K., Han M. K., Shibayama H., Fukuda S., Yoder M. C., Pelus L. M., Kim K. S., Broxmeyer H. E. 2007. Checkpoint-apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability. *Blood*. 109 : 4518—4527.
- Marion R. M., Strati K., Li Y., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M. A. 2009a. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPSC cell genomic integrity. *Nature*. 460 : 1149—1153.
- Marion R. M., Strati K., Li H., Tejera A., Schoeftner S., Ortega S., Serrano M., Blasco M. A. 2009b. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4 : 141—154.
- Martins-Taylor K., Nisler B. S., Taapken S. M., Compton T., Crandall L., Montgomery K. D., Lalande M., Xu R. H. 2011. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29 : 488—491.
- Mathieu J., Zhou W., Xing Y., Sperber H., Ferreccio A., Agoston Z., Kuppasamy K. T., Moon R. T., Ruohola-Baker H. 2014. Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 14 : 592—605.
- Matsuoka S., Ballif B. A., Smogorzewska A., McDonald E. R. 3rd, Hurov K. E., Luo J., Bakalarski C. E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S. P., Elledge S. J. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316 : 1160—1166.
- Maynard S., Swistowska A. M., Lee J. W., Liu Y., Liu S.-T., Da Cruz A. B., Rao M., de Souza-Pinto N. C., Zeng X., Bohr V. A. 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*. 26 : 2266—2274.
- Mayshar Y., Ben-David U., Lavon N., Biancotti J. C., Yakir B., Clark A. T., Plath K., Lowry W. E., Benvenisty N. 2010. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 7 : 521—531.
- McCoy R. C., Demko Z., Ryan A., Banjevic M., Hill M., Sigurjonsson S., Rabinowitz M., Frazer H. B., Petrov D. A. 2015. Common variants spanning *PLK4* are associated with mitotic-origin aneuploidy in human embryos. *Science*. 348 : 235—238.
- Merkle F. T., Ghosh S., Kamitaki N., Mitchell J., Avior Y., Mello C., Kashin S., Mekhoubad S., Ilic D., Charlton M., Saphier G., Handsaker R. E., Genovese G., Bar S., Benvenisty N., McCarroll S. A., Eggan K. 2017. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature*. 545 : 229—233.
- Meuth M. 2014. Inhibitors of cell cycle checkpoints and DNA replication cause different responses in normal versus malignant urothelial cells. *Mol. Cell Oncol.* 1 : e968508.
- Musacchio A., Salmon E. D. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 379—393.
- Neeley W. L., Essigmann J. M. 2006. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem. Res. Toxicol.* 19 : 491—505.
- Neganova I., Tilgner K., Buskin A., Paraskevopoulou I., Atkinson S. P., Peberdy D., Passos J. F., Lako M. 2014. CDK1 plays an important role in the maintenance of pluripotency and genomic stability in human pluripotent stem cells. *Cell Death Dis.* 5 : e1508.
- Neganova I., Zhang X., Atkinson S., Lako M. 2009. Expression and functional analysis of G₁ to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene*. 28 : 20—30.
- Okamura K., Sakaguchi H., Sakamoto-Abutani R., Nakanishi M., Nishimura K., Yamazaki-Inoue M., Ohtaka M., Periasamy V. S., Alshatwi A. A., Higuchi A., Hanaoka K., Nakabayashi K., Takada S., Hata K., Toyoda M., Umezawa A. 2016. Distinctive features of single nucleotide alterations in induced pluripotent stem cells with different types of DNA repair deficiency disorders. *Sci. Reports*. 6 : 26342.
- Ozeri-Galai E., Bester A. C., Kerem B. 2012. The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. *Trends Genet.* 28 : 295—302.
- Park I. H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M. W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G. Q. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 134 : 877—886.
- Pasi S. E., Dereli-Oz A., Negrini S., Friedli M., Fragola G., Lombardo A., Van Houwe G., Naldini L., Casola S., Testa G., Trovati D., Pellicci P. G., Halazonetis T. D. 2011. Genomic instability in induced stem cells. *Cell Death Differ.* 18 : 745—753.
- Peterson S. E., Garitaonandia I., Loring J. F. 2016. The tumorigenic potential of pluripotent stem cells: what can we do to minimize it? *Bioessays*. 38 (Suppl. 1) : 86—95.
- Prigione A., Fauler B., Lurz R., Lehrach H., Adjaye J. 2010. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is

repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 28 : 721—733.

Pristyazhnyuk I. E., Menzorov A. G. 2018. Ring chromosomes: from formation to clinical potential. *Protoplasma*. 255 : 439—449.

Rao C. V., Yamada H. Y., Yao Y., Dai W. 2009. Enhanced genomic instabilities caused by deregulated microtubule dynamics and chromosome segregation: a perspective from genetic studies in mice. *Carcinogenesis*. 30 : 1469—1474.

Rasmussen M. A., Holst B., Tumer Z., Johnsen M. G., Zhou S., Stummann T. C., Hyttel P., Clausen C. 2014. Transient p53 suppression increases reprogramming of human fibroblasts without affecting apoptosis and DNA damage. *Stem Cell Reports*. 3 : 404—413.

Rivera T., Hagblom C., Cosconati S., Karlseder J. 2017. A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 : 30—39.

Ross J., Busch J., Van den Veyver I., Willert K. 2014. A rare human syndrome provides genetic evidence that WNT signaling is required for reprogramming of fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Cell Reports*. 9 : 1770—1780.

Rouhani F. J., Nik-Zainal S., Wuster A., Li Y., Conte N., Koike-Yusa H., Kumasaka N., Vallier L., Yusa K., Bradley A. 2016. Mutational history of a human cell lineage from somatic to induced pluripotent stem cells. *PLoS Genet*. 12 : e1005932.

Ruiz S., Lopez-Contreras A. J., Gabut M., Marion R. M., Gutierrez-Martinez P., Bua S., Ramirez O., Olalde I., Rodrigo-Perez S., Li H., Marques-Bonet T., Serrano M., Blasco M. A., Batada N. N., Fernandez-Capetillo O. 2015. Limiting replication stress during somatic cell reprogramming reduces genomic instability in induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 6 : 8036.

Ruiz S., Panopoulos A. D., Herrerias A., Bissig K. D., Lutz M., Berggren W. T., Verma I. M., Izpisua Belmonte J. C. 2011. A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. *Curr. Biol.* 21 : 45—52.

Salomonis N., Dexheimer P. J., Omberg L., Schroll R., Bush S., Huo J., Schriml L., Ho Sui S., Kedda M., Mayhew C., Shanmukhappa S. K., Wells J., Daily K., Hubler S., Wang Y., Zambidis E., Margolin A., Hide W., Hatzopoulos A. K., Malik P., Cancelas J. A., Aronow B. J., Lutzko C. 2016. Integrated genomic analysis of diverse induced pluripotent stem cells from the progenitor cell biology consortium. *Stem Cell Reports*. 7 : 110—1125.

Sarig R., Rivlin N., Brosh R., Bornstein C., Kamer I., Ezra O., Molchadsky A., Goldfinger N., Brenner O., Rotter V. 2010. Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells. *J. Exp. Med.* 207 : 2127—2140.

Schlaeger T.M., Daheron L., Brickler T. R., Entwistle S., Chan K., Cianci A., DeVine A., Ettenger A., Fitzgerald K., Godfrey M., Gupta D., McPherson J., Malwadkar P., Gupta M., Bell B., Doi A., Jung N., Li X., Lynes M. S., Brookes E., Cherry A. B., Demirbas D., Tsankov A. M., Zon L. I., Rubin L. L., Feinberg A. P., Meissner A., Cowan C. A., Daley G. Q. 2015. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat. Biotechnol.* 33 : 58—63.

Shimamoto A., Yokote K., Tahara H. 2015. Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming. *Front. Genet.* 6 : 10.

Simara P., Tesarova L., Rehakova D., Matula P., Stejskal S., Hampl A., Koutna I. 2017. DNA double-strand breaks in human induced pluripotent stem cell reprogramming and long-term *in vitro* culturing. *Stem Cell Res. Ther.* 8 : 73.

Skamagki M., Correia C., Yeung P., Baslan T., Beck S., Zhang C., Ross C. A., Dang L., Liu Z., Giunta S., Chang T. P., Wang J., Ananthanarayanan A., Bohndorf M., Bosbach B., Adjaye J., Funabiki H., Kim J., Lowe S., Collins J. J., Lu C. W., Li H., Zhao R., Kim K. 2017. ZSCAN10 expression corrects the genomic instability of iPSCs from aged donors. *Nat. Cell Biol.* 19 : 1037—1048.

Song N., Jia X. S., Jia L. L., Ma X. B., Li F., Wang E. H., Li X. 2010. Expression and role of Oct3/4, Nanog and Sox2 in regeneration of rat tracheal epithelium. *Cell Prolif.* 43 : 49—55.

Soufi A., Dalton S. 2016. Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development*. 143 : 4301—4311.

Stadtfeld M., Apostolou E., Ferrari F., Choi J., Walsh R. M., Chen T., Ooi S. S., Kim S. Y., Bestor T. H., Shioda T., Park P. J., Hochedlinger K. 2012. Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat. Genet.* 44 : 398—405. S1—2.

Stadtfeld M., Maherali N., Breault D. T., Hochedlinger K. 2008. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*. 2 : 230—240.

Suva M. L., Riggi N., Bernstein B. E. 2013. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science*. 339 : 1567—1570.

Syljuasen R. G., Sorensen C. S., Hansen L. T., Fugger K., Lundin C., Johansson F., Helleday T., Sehested M., Lukas J., Bartek J. 2005. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol. Cell. Biol.* 25 : 3553—3562.

Taapken S. M., Nisler B. S., Newton M. A., Sampsel-Barron T. L., Leonhard K. A., McIntire E. M., Montgomery K. D. 2011. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cell and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29 : 312—313.

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

Tcw J., Carvalho C. M., Yuan B., Gu S., Altheimer A. N., McCarthy S., Malhotra D., Sebat J., Siegel A. J., Rudolph U., Lupski J. R., Levy D. L., Brennand K. J. 2017. Divergent levels of marker chromosomes in an hiPSC-based model of psychosis. *Stem Cell Reports*. 8 : 519—528.

Terai M., Izumiyama-Shimomura N., Aida J., Ishikawa N., Kuroiwa M., Poon S. S. S., Arai T., Toyoda M., Akutsu H., Umezawa A., Nakamura K., Takubo K. 2013. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence *in situ* hybridization. *Tissue Cell*. 45 : 407—413.

Tichy E. D., Pillai R., Deng L., Liang L., Tischfield J., Schwemmer S. J., Babcock G. F., Stambrook P. J. 2010. Mouse embryonic stem cells, but not somatic cells, predominantly use homologous recombination to repair double-strand DNA breaks. *Stem Cells Develop.* 19 : 1699—1711.

Tilgner K., Neganova I., Moreno-Gimeno I., Al-Aama J. Y., Burks D., Yung S., Singhapol C., Saretzki G., Evans J., Gorbunova V., Gennery A., Przyborski S., Stojkovic M., Armstrong L., Jeggo P., Lako M. 2013. A human iPSC model of Ligase IV deficiency reveals an important role for NHEJ-mediated-DSB repair in the survival and genomic stability of induced pluripotent stem cells and emerging haematopoietic progenitors. *Cell Death Differ.* 20 : 1089—1100.

Vafa O., Wade M., Kern S., Beeche M., Pandita T. K., Hampton G. M., Wahl G. M. 2002. c-MYC can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell*. 9 : 1031—1044.

Von Joest M., Bua S., Li H. 2016. Genomic stability during cellular reprogramming: mission impossible? *Mut. Res.* 788 : 12—16.

Von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27 : 339—344.

Wang F., Yin Y., Ye X., Liu K., Zhu H., Wang L., Chiourea M., Okuka M., Ji G., Dan J., Zuo B., Li M., Zhang Q., Liu N., Chen L., Pan X., Gagos S., Keefe D. L., Liu L. 2012. Molecular insights into the heterogeneity of telomere reprogramming in induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* 22 : 757—768.

Werbowski-Ogilvie T. E., Bosse M., Stewart M., Schnerch A., Ramos-Mejia V., Rouleau A., Wynder T., Smith M.-J., Dingwall S., Carter T., Williams C., Harris C., Dolling J., Wynder C., Boreham D., Bhatia M. 2009. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat. Biotechnol.* 27 : 91—97.

Wong C. W., Hou P. S., Tseng S. F., Chien C. L., Wu K. J., Chen H. F., Ho H. N., Kyo S., Teng S. C. 2010. Kruppel-like trans-

ription factor 4 contributes to maintenance of telomerase activity in stem cells. *Stem Cells*. 28 : 1510—1517.

Xu X., Duan S., Yi F., Ocampo A., Liu G.-H., Izpisua Belmonte J. C. 2013. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 18 : 325—332.

Yang S., Lin G., Tan Y.-Q., Zhou D., Deng L.-Y., Cheng D.-H., Luo S.-W., Liu T.-C., Zhou X.-Y., Sun Z., Xiang Y., Chen T. J., Wen J. F., Lu G. X. 2008. Tumor progression of culture adapted human embryonic stem cells during long-term culture. *Gen. Chromos. Canc.* 47 : 665—679.

Yoshida Y., Takahashi K., Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. 2009. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 5 : 237—241.

Yoshihara M., Araki R., Kasama Y., Sunayama M., Abe M., Nishida K., Kawaji H., Hayashizaki Y., Murakawa Y. 2017. Hotspots of *de novo* point mutations in induced pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 21 : 308—315.

Young M. A., Larson D. E., Sun C. W., George D. R., Ding L., Miller C. A., Lin L., Pawlik K. M., Chen K., Fan X., Schmidt H.,

Kalicki-Veizer J., Cook L. L., Swift G. W., Demeter R. T., Wendl M. C., Sands M. S., Mardis E. R., Wilson R. K., Townes T. M., Ley T. J. 2012. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 10 : 570—582.

Yu Y., Chang L., Zhao H., Li R., Fan Y., Qiao J. 2015. Chromosome microduplication in somatic cells decreases the genetic stability of human reprogrammed somatic cells and results in pluripotent stem cells. *Sci. Reports*. 5 : 10114.

Zhang Y., Toh L., Lau P., Wang X. 2012. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in human cancer. *J. Biol. Chem.* 287 : 32 494—32 511.

Zhou G., Meng S., Li Y., Ghebremariam Y. T., Cooke J. P. 2016. Optimal ROS signaling is critical for nuclear reprogramming. *Cell Rep.* 15 : 919—925.

Поступила 27 II 2018

REGULATION OF KARYOTYPE STABILITY IN HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

T. V. Nikitina,* I. N. Lebedev

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center RAS, Tomsk, 634050;

* e-mail: t.nikitina@medgenetics.ru

The method discovered by the Yamanaka group to convert terminally differentiated cells into induced pluripotent stem cells (iPSC) has sparked an explosion of research in this field in the last decade. Opportunities have emerged for the study of human diseases in which PSC scores obtained from patients are used as a powerful platform for studying the pathogenesis of diseases, especially those that previously could not be studied at the cellular level due to the material inaccessibility. However, despite significant progress in this area, the security problem remains largely unresolved, and the main debatable issue is the impact of reprogramming on the genome stability. Although the functional consequences of instability are not always significant, the presence of genetic aberrations in iPSC complicates their biomedical use. Preserving the stable genome of iPSC is a key factor in most areas of practical application of this technology, such as cell therapy, disease modeling and pharmacological studies. In this connection, data on the features of the mechanisms of maintaining the stability of the genome and the specificity of the mutational process in iPSC are of interest, and this review is devoted to the analysis of this issue. Since the large chromosomal aberrations are most compromising quality of iPSC, the emphasis is on the consideration of genetic integrity at the chromosomal and sub-chromosomal levels. Data are presented about the features of the cell cycle and the response to DNA damage in reprogrammed cells affecting chromosome segregation and the appearance of rearrangements, as well as information on the effects of replicative and oxidative stress on the stability of the iPSC genome.

Key words: iPSC, chromosome stability.