

ЕКСПРЕСІЯ МАРКЕРІВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТІ ЗА РЕПРОГРАМУВАННЯ ФІБРОБЛАСТІВ МИШІ З ВИКОРИСТАННЯМ СИСТЕМИ ТРАНСПОЗОНІВ

С. В. Малишева^{1,2}Н. М. Білько¹Ю. Хешлер²¹Національний університет «Києво-Могилянська академія»,
Київ, Україна²Інститут нейрофізіології Кельнського університету, Кельн,
Німеччина

E-mail: smalysheva@gmail.com

Отримано 05.11.2012

Пошук ефективного та безпечного методу одержання плюрипотентних стовбурових клітин є вкрай актуальним. У роботі ембріональні фібробласти миші репрограмовано в проліферувальні колонії з типовою морфологією індукованих плюрипотентних стовбурових клітин з використанням векторної системи *Sleeping beauty*. В одержаних клонах досліджено експресію різноманітних маркерів плюрипотентності — лужної фосфатази, генів *Oct4* та *Sox2*; оцінено рівень експресії поверхневого маркера плюрипотентності SSEA-1 в окремих клонах клітинної лінії. Показано також реактивацію експресії ендогенних факторів плюрипотентності *Nanog* та *Rex1*. Одержані дані проаналізовано та зіставлено з характеристиками вихідної лінії ембріональних фібробластів і зареєстрованої лінії плюрипотентних стовбурових клітин миші. Показано, що за допомогою системи транспозонів *Sleeping beauty* здійснюється репрограмування соматичних клітин в індуковані плюрипотентні. Отже, ця система репрограмування є новим перспективним інструментом у біотехнології одержання плюрипотентних клітин.

Ключові слова: індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, репрограмування, фактори плюрипотентності.

Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) одержують генетичним репрограмуванням зрілих соматичних клітин. Репрограмування досягається ектопічною експресією необхідних для набуття (встановлення) та підтримання плюрипотентного стану генів — *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*, *Nanog*, *Lin28*. Перші іПСК отримано з ембріональних та дорослих фібробластів миші у 2006 р. Yamanaka et al. унаслідок стабільної інтеграції в геном цих клітин факторів плюрипотентності *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* та *Klf4* за допомогою ретровірусних векторів [1]. Ці репрограмовані клітинні лінії нагадували за ключовими характеристиками лінії ембріональних стовбурових клітин (ЕСК). Через рік ця сама група вчених успішно репрограмувала в іПСК соматичні клітини людини [2]. Одержання пацієнтспецифічних стовбурових клітин, їх спрямоване диференціювання у бажаний тип автологічних клітин або генетична корекція відкривають нові можливості для клітинної терапії та регенеративної медицини [3, 4]. Адже технологія з використанням іПСК дає змогу уникнути необхідності використання отриманих з ембріонів людини стовбурових

клітин, а також обійти імунологічні проблеми, пов'язані з аlogenною трансплантацією клітинного матеріалу. Клінічне застосування одержаних за допомогою вірусних векторів іПСК пов'язане з певним ризиком злоякісної трансформації внаслідок випадкової ретровірусної інтеграції [5]. Тому постає необхідність пошуку альтернативних методів досягнення ектопічної експресії репрограмувальних факторів. Із цією метою було створено й успішно використано для репрограмування інтегративні вектори на основі лентивірусів [6] та неінтегративні — на основі аденовірусів [7] чи епісом [8], а також для доставлення ключових репрограмувальних факторів у вигляді мРНК транскриптів [9] і навіть протеїнів [10]. Проте ефективність репрограмування за допомогою неінтегративних методів істотно поступається ефективності, досягненій за допомогою вірусних векторів. Ідеальна система доставлення репрограмувальних факторів має поєднати у собі високу ефективність вірусних векторів та безпечність невірусних конструкцій. Ключем до вирішення цього питання можуть стати вектори, засновані на мобільних генетичних елементах. Транспозони

є природним засобом мобілізації дискретних сегментів ДНК у геномі. Таке переміщення опосередковано ензимом транспозазою, яка специфічно розпізнає ці сегменти за інвертованими повторами, що їх фланкують. Цю природну властивість використано для розроблення відомих на сьогодні векторних систем: Sleeping beauty, Piggybac, Tol2 та ін. [11].

Система транспозонів Sleeping beauty як вектор доставлення генів має низку переваг: ефективність трансфекції (навіть для клітин, ефективність трансфекції яких є досить низькою в разі застосування існуючих методів), високий рівень стабільної експресії трансгена, здатність до мобілізації великих конструкцій — понад 10 тис. пар основ, безпечність — мобільні елементи цієї системи не мають тенденції до вбудовування у кодуювальні послідовності.

Метою роботи було репрограмування ембріональних фібробластів миші в іПСК за допомогою системи транспозонів Sleeping beauty та дослідження основних плюрипотентних характеристик отриманих клітин. Для репрограмування використано первинну культуру ембріональних фібробластів миші. Культура клітин миші, зокрема ембріональні фібробласти, — зручний об'єкт для первинної перевірки ефективності системи репрограмування. Аби довести плюрипотентність отриманих клонів, проведено первинний скринінг на експресію основних маркерів на рівні мРНК транскриптів та протеїну. Серед окремих клонів обрано три основні для подальшого вивчення та характеристики одержаної клітинної лінії.

Матеріали і методи

Одержання та культивування ембріональних фібробластів миші

Первинну культуру ембріональних фібробластів миші отримано з ембріонів миші штаму c57Bl6N, вилучених на 13-ту добу гестації. Для одержання культури клітин використовували гомогенізовані механічно та ензиматично (за допомогою 0,05% Trypsin-EDTA) тулуби ембріонів без навколоплідних оболонок, голови та внутрішніх органів. Фібробласти культивували в середовищі DMEM із додаванням 10% -ї фетальної телячої сироватки (FBS), амінокислот (NEAA), 50 мкМ β -меркаптоетанолу, 1%-го розчину антибіотиків пеніциліну-стрептоміцину (усі реактиви одержано від Gibco Invitrogen, Німеччина). Для репрограмування використовували культуру ембріональних фібробластів нульового пасажу без попереднього заморожування.

Плазмиди системи Sleeping beauty

Систему Sleeping beauty надано її розробниками — Zoltan Ivics та Szusanna Izsvac (Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Берлін, Німеччина). Ця система складається із пари плазмід. На першій закодовано транспозазу SB100x, що забезпечує стабільну інтеграцію генів інтересу в геном. Друга містить у собі власне гени інтересу — репрограмувальну касету, фланковану інвертованими повторами для розпізнавання транспозазою SB100x. Репрограмувальна касета є мультицистронним вектором із генами Oct4, Sox2, Klf4, c-Мyc (OSKM) або Oct4, Sox2, Klf4, c-Мyc та Lin28 (OSKML) під спільним конститутивним CAG-промотором. Окремі гени у касеті розмежовано самопроцесингувальними (self-cleaving) протеїнами 2A. Таке розмежування дає змогу закодованим під єдиним промотором факторам дисоціювати на окремі протеїнові компоненти за процесингу [12]. Репрограмувальна касета також фланкована сайтами гомологічної рекомбінації LoxP для подальшого видалення інтегрованої в геном послідовності та оснащена геном тимідинкінази. Наявність цього суїцидального гена забезпечує можливість негативної селекції за допомогою генцикловіру (токсичного аналога тимідину) вільних від трансгена репрограмованих клітин [13].

Трансфекція мишачих ембріональних фібробластів (МЕФ)

Первинну культуру отриманих ембріональних фібробластів миші трансфекували плазмідами системи Sleeping beauty (без попередньої лінеаризації) за допомогою електропорації на Neon Transfection System (Invitrogen, USA). Для успішної трансфекції оптимізовано протокол, запропонований фірмою-виробником online із параметрами трансфекції для мишачих фібробластів. Для контролю ефективності трансфекції використано плазмиду системи Sleeping beauty, що експресує флуоресцентний протеїн VENUS. Ефективність трансфекції визначали проточною цитофлуориметрією на FACScan (Becton Dickinson). Кількість VENUS-позитивних клітин визначали через 48 год після трансфекції, дані аналізувати за допомогою програмного забезпечення CellQuest.

Вилучення та культивування іПСК колоній

На другу добу після трансфекції ембріональних фібробластів репрограмувальними плазмідами системи Sleeping beauty змінювали умови їх культивування. Трансфеговані

клітини пасажували на фідерний шар (мітично інактивовані фібробласти миші, резистентні до неоміцину (MEFNeoR), на якому культивують відомі лінії ЕСК миші α PIG44. Також середовище для фібробластів (DMEM із 10% FBS) замінили на середовище для мишачих ЕСК/іПСК складу: DMEM, 15% FBS, 0,1 мМ NEAA, 50 мкМ β -меркаптоетанолу (Gibco, Німеччина), 1 000 од/мкл LIF (Leukemia inhibitory factor, Millipore, Німеччина). Для поліпшення репрограмування в середовище для ЕСК/іПСК додавали 50 мМ аскорбінової кислоти (Wako, Німеччина) та 0,1 мМ вальпроєвої кислоти (Sigma, США). За появою перших колоній спостерігали за допомогою стереомікроскопа (Leica, Німеччина), окремі клони отримували за механічного відбору та пасажування індивідуальних колоній. Відбирали колонії голкою, під стереомікроскопом (Leica, Німеччина), у ламінарному боксі. Кожен клон пасажували як лінію ЕСК/іПСК за допомогою 0,05% Trypsin-EDTA, культивували в зазначеному вище середовищі (DMEM 15%), додаючи LIF (для підтримання у недиференційованому стані) на шарі фідерних клітин на 12-лунковому культуральному пластику. Із розростанням клони перевели на звичний для ЕСК/іПСК формат культуральної чашки Петрі (60 мм).

Визначення активності лужної фосфатази та імуногістохімія

Активність лужної фосфатази виявляли у фіксованих етанолом колоніях забарвленням розчину нафтолу (Naphtol AS-MX Phosphate, 200 мкг/мл Sigma, USA) у розчині 1 мг/мл Fast Red TR Salt (Sigma, США) в 0,1 М Tris/HCl, pH 9,2.

Для імуноцитохімії клітини фіксували 4% -м розчином параформальдегіду (PFA) та пермеабілізували 10 хв 0,5 М розчином хлориду амонію та 0,25% Triton X-100 в 0,1 М фосфатному буфері. З метою блокування неспецифічного зв'язування клітини обробляли протягом 60 хв 5% -м BSA. Для ідентифікації та локалізації експресії транскрипційного фактора Oct4 фіксовані клітини інкубували зі специфічним до мишачого Oct4 первинним антитілом (1:200) упродовж ночі при 4 °C та забарвлювали (1:1000) FITC-кон'югованим вторинним антитілом (Santa Cruz Biotechnology, США). Ядра клітин забарвлювали Hoechst 33342 1 мкг/мл (Invitrogen).

Визначення експресії SSEA-1

Рівень експресії SSEA-1 визначали прижиттєвим забарвленням. Колонії трипсинізували за допомогою 0,05% Trypsin-EDTA на 48-му год культивування, промивали в 0,5% BSA у фосфатному буфері. Протягом 60 хв інкубували з первинними мишачими антитілами (1:200) SSEA-1 та IgM як ізотиповим контролем. Забарвлювали вторинними FITC- та Alexafluor-555-кон'югованими антитілами (Santa Cruz Biotechnology, USA). Відсоток SSEA-1 — позитивних клітин обчислювали за допомогою проточного цитофлуориметра FACScan (Becton Dickinson) у діапазоні, що відповідав кожному з кон'югованих зі вторинними антитілами флуоресцентних барвників — FITC або Alexafluor-555. Отримані дані аналізували за допомогою програмного забезпечення CellQuest (Becton Dickinson).

Виділення РНК та зворотна транскрипція

Загальну РНК ізолювали за допомогою тризолу (Invitrogen), якість та кількість ізолюваного матеріалу оцінювали на Nanodrop (Thermo Scientific). Для одержання кДНК використовували 1 мкг РНК, реакцію здійснювали за допомогою SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen), Random Primers (Sigma, США). ПЛР-ампліфікацію проводили за допомогою GreenTaq MM, dNTP Mix (Invitrogen). Послідовності праймерів для ПЛР-ампліфікації гена інтересу наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Послідовності праймерів для реакції зворотної транскрипції

Праймер	Послідовність
hmGAPDH-F	GGCTCATGACCACAGTCCAT
hmGAPDH-R	ACCTTGCCCACAGCCTTG
hmOct4-F	CATGTGTAAGCTGCGGCCC
hmOct4-R	GCCCTTCTGGCGCCGGTTAC
hmSox2-F	ACGGCTGGAGCAACGGCAGC
hmSox2-R	GGAGTTGTAAGTGCAGGGCGC
mRex1-F	TGAAAGCCCACATCCTAACG
mRex1-R	CAAGCTATCCTCCTGCTTTGG
mNanog-F	AGGGTCTGCTACTGAGATGTCTCTG
mNanog-R	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG

Експериментальні дані обробляли статистично загальноприйнятими методами за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Office Excel для персонального комп'ютера.

Результати та обговорення

Вихідна лінія МЕФ, що її отримано від тварин дикого типу, не є генетично модифікованою. Касета з факторами репрограмування не містила жодних селективних маркерів, таких як флуоресцентний протеїн чи ген резистентності до антибіотика. Тому першими ознаками репрограмування в цьому експерименті є зміна морфології, а згодом і проліферативної активності клітин.

Перші ознаки репрограмування — колонієподібні структури на фідерному шарі інактивованих мітотично ембріональних фібробластів з'явилися на 8-му добу культивування (рис. 1).

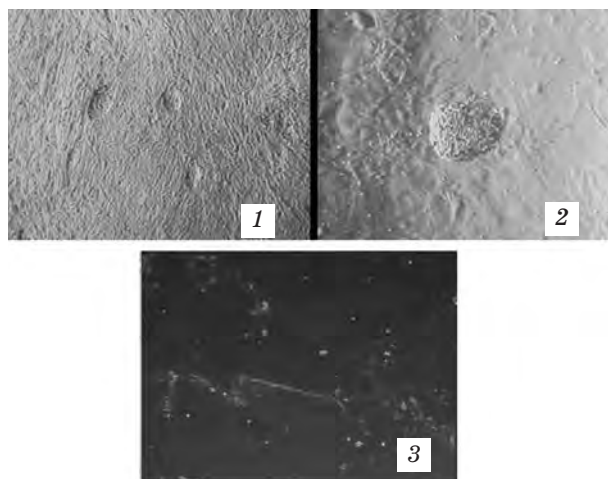


Рис. 1. Зображення колонієподібних структур, що з'являлись на 8-му добу репрограмування:
1 — колонії за збільшення $\times 4$; 2 — $\times 10$;
3 — контрольний варіант без колоній, $\times 10$

Загалом репрограмування соматичних клітин миші триває, за різними даними, від восьми діб репрограмування [14]. Колонієподібні структури не було виявлено в контрольному варіанті, в якому МЕФ трансфековано парєю плазмід системи Sleeping beauty, що кодують транспозазу та флуоресцентний протеїн VENUS. Таким чином показано, що соматичні клітини репрограмовано за допомогою трансфекції плазмід системи Sleeping beauty, що містить репрограмувальні фактори OSKM та OSKML.

Колонієподібні структури, що з'являлися з 8-ї доби репрограмування, культивували ще протягом 3–4 діб для збільшення роз-

міру та чіткішого оформлення колонії. На 11-ту добу репрограмування проводили відбір (pick-up) індивідуальних колоній. Для одержання різних клонів отриманої клітинної лінії окремі колонії відбирали механічно під мікроскопом, трипсинізували та пасажували як звичайні лінії ЕСК та іПСК. На 7-му пасажі ефективність проліферації (табл. 2) та морфологія (рис. 2) не відрізнялись від зареєстрованої лінії ЕСК — α PIG44.

Колонієподібні структури, що виникли внаслідок репрограмування ембріональних фібробластів, мали лужно-фосфатазну активність, що видно неозброєним оком на

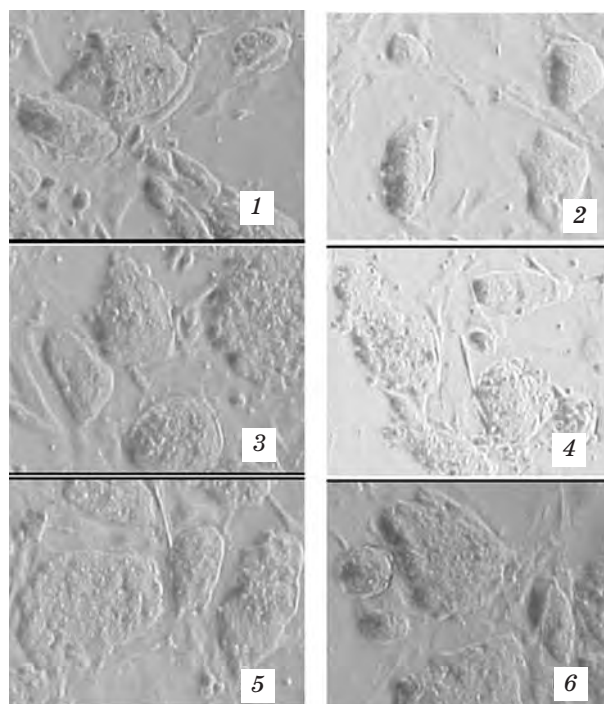


Рис. 2. Морфологія деяких клонів репрограмованих мишачих фібробластів та контрольних клітинних ліній:
1 — клон 6; 2 — клон 7; 3 — клон 9;
4 — клон 13; 5 — клон 11, 6 — α PIG44
(об'єкти $\times 10$)

Таблиця 2. Проліферативні показники деяких клонів отриманої за репрограмування клітинної лінії

Номер клона / назва клітинної лінії	Кількість пасивованих клітин на 60 мм чашку Петрі	Кількість отриманих клітин на 48-му добу культивування
Клон 6	$0,5 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6$
Клон 7	$0,5 \cdot 10^6$	$3,72 \cdot 10^6$
Клон 9	$0,5 \cdot 10^6$	$2,72 \cdot 10^6$
α PIG44	$0,5 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$

культуральній чашці (рис. 3). На мікрофотографіях видно, що активність лужної фосфатази локалізується саме в колонієподібних структурах, однак її не виявлено у клітинах фідерного шару.

Із колонієподібних структур, що виникали за репрограмування починаючи з 8-ї доби, відібрали та культивували до 10-го пасажу 23 окремих клони. Пліуріпотентність отриманих клонів оцінювали за допомогою аналізу експресії повехневого маркера пліуріпотентності — стадієспецифічного ембріонального антигена 1 (Stage-Specific Embryonic Antigen 1, SSEA-1). Цей антиген експресується на стадії ранньої бластоцисти, асоційований із пліуріпотентністю, тому дані стосовно його якісної чи кількісної експресії оцінюють, створюючи нові лінії іПСК. Оскільки SSEA-1 експресується на поверхні клітин, рівень його експресії можна оцінити кількісно, порівняти за цим показником окремі клони між собою та контрольними клітинними лініями. Результати аналізу експресії SSEA-1 наведено в табл. 3.



Рис. 3. Експресія лужної фосфатази у клонах, що утворилися за репрограмування ембріональних фібробластів миші: збільшення $\times 2,5$ та $\times 10$

Таблиця 3. Експресія SSEA-1 у клонах репрограмованих ембріональних фібробластів миші та контрольних клітинних лініях

Клон	% SSEA-1-позитивних клітин	Клон/клітинна лінія	% SSEA-1-позитивних клітин
Клон 5	91,36	Клон 13	82,09
Клон 6*	87,84	Клон 17	94,00
Клон 7	71,56	Клон 20*	59,57
Клон 8*	63,41	Клон 22	90,15
Клон 9	94,32		
Клон 10*	75,57	α PIG44*	93,07
Клон 11	90,20	МЕФ	0,66
Клон 12*	66,38		

Примітка: * — мічення Alexa fluor-555-кон'югованими вторинними антитілами, решта — кон'югованими із FITC.

Експресію SSEA-1 не виявлено у вихідної лінії МЕФ — позитивних клітин менше 1%, що спричинило неспецифічне зв'язування вторинного антигена. Серед отриманих окремих клонів кількість SSEA-1-позитивних клітин варіювала від 59,57% у клона 20 до 94,32% у клона 9. У середньому для 23 клонів цей показник становив 80,5%. У вивченої клітинної лінії α PIG44 цей показник становив 93,07%. Більше 40% досліджуваних клонів експресували SSEA-1 на рівні зареєстрованих клітинних ліній ЕСК/іПСК. Таким чином, показано реактивацію експресії цього антигена до рівня пліуріпотентної клітинної лінії, що свідчить про репрограмування фібробластів та відповідність більшості отриманих клонів одному із ключових показників пліуріпотентності.

Експресія транскрипційного фактора Oct4

Характеристика новоствореної клітинної лінії включає аналіз її численних показників як у недиференційованому стані, так і за виявлення диференційного потенціалу [1, 2, 6, 8, 10, 14, 15]. Для подальшої характеристики отриманої клітинної лінії доцільно обрати всього декілька різних клонів. З одержаної кількості культивованих клонів-кандидатів для подальшого дослідження відбирають вибірково, за морфологією, проліферативним потенціалом та деякими ключовими чи бажаними характеристиками. За цими критеріями для подальшого дослідження отриманої клітинної лінії обрали три клони — 6, 7 і 9.

Oct4 — транскрипційний фактор, експресія якого асоціюється із пліуріпотентністю [16]. Цей ген входить у стандартну четвірку репрограмувальної касети так званих «факторів Яманака». Способи репрограмування соматичних клітин без використання фактора Oct4 невідомі [15, 17–19]. Як маркерний для пліуріпотентності транскрипційний фактор, Oct4 експресується в межах ядра пліуріпотентних клітин і не експресується у соматичних клітинах, зокрема фідерного шару.

За допомогою флуоресцентно-мічених антитіл ідентифіковано експресію Oct4 на рівні протеїну. Виявлено, що цей маркер експресується у досліджуваних клонах 6, 7 та 9 так само інтенсивно, як і в зареєстрованій лінії ЕСК миші α PIG44. Показано, що цей транскрипційний фактор експресується в межах ядра, що має у пліуріпотентних клітин більш компактну форму, ніж у диференційованих соматичних, і не екс-

пресується у мишачих ембріональних фібробластах фідерного шару (рис. 4).

Експресія Oct4 є вагомим свідченням плюрипотентності отриманих клітин. Проте оскільки цей фактор міститься у репрограмувальній касеті, неможливо встановити, є ця експресія ендогенною чи ектопічною. Тому для доведення плюрипотентності одержаних клонів ми провели дослідження для виявлення інших маркерів.

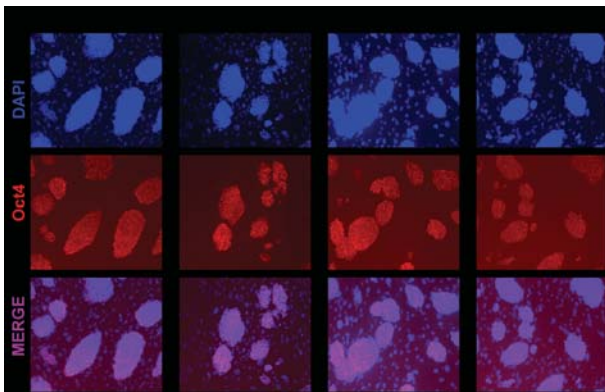


Рис. 4. Імуногістохімічне забарвлення експресії Oct4 у фіксованих колоніях (червоний колір):

ядра клітин забарвлено Hoechst 33342 (DAPI, синій колір), накладання зображень (MERGE, фіолетовий)

Експресія маркерів плюрипотентності на транскрипційному рівні

Свідченням репрограмування є не лише експресія класичних факторів плюрипотентності (відомих як «фактори Яманака»), що, як правило, містяться у репрограмувальній касеті [1, 2, 6]. Репрограмування є складним і недостатньо вивченим процесом, що супроводжується активацією ендогенних факторів, які підтримують плюрипотентність [20].

У трьох різних клонах — 6, 7 і 9 — досліджено експресію маркерів плюрипотентності Oct4, Sox2, Nanog і Rex1 на транскрипційному рівні методом RT-PCR. Згідно з отриманими результатами гени Oct4 та Sox2 експресуються однаково інтенсивно, як і ген «домашнього господарства» GAPDH, в усіх досліджуваних клонах і клітинних лініях. Проте варто зазначити, що ці гени входять до репрограмувальної касети, що, власне, індукувала репрограмування, тому за даними досліджень (як і попереднього імуногістохімічного забарвлення Oct4) неможливо встановити, чи експресуються гени із власного геному, чи з репрограмувальної екзогенної конструкції.

Оскільки репрограмування супроводжується зміною експресії генів, зокрема реактивацією експресії ендогенних факторів плюрипотентності [20], нами було досліджено експресію в отриманих клонах генів, що не входили до репрограмувальної конструкції — Nanog та Rex1. Nanog експресується виключно у недиференційованих клітинах [21]. В одержаних у цій роботі клонах виявлено реактивацію експресії Nanog, причому цей маркер експресується достатньо інтенсивно — на рівні Oct4 і Sox2 та контрольної лінії (рис. 5). Експресія іншого маркера — Rex1 в отриманих клонах порівняно із контрольними лініями дещо нижча. Однак Rex1 експресується менш інтенсивно і в контрольній лінії α PIG44 порівняно з реактивацією експресії Nanog. Низький рівень реактивації Rex1 може бути пов'язаний із неповним репрограмуванням, раннім пасажем та іншими особливостями одержаної клітинної лінії. Адже відомо, що спектр експресії генів є лінійспецифічним, тобто може варіювати в різних лініях іПСК.

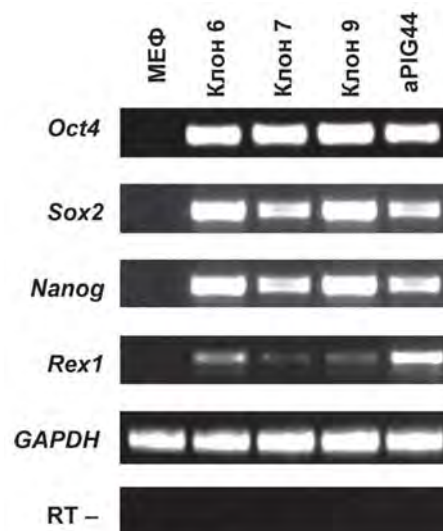


Рис. 5. Експресія маркерів плюрипотентності в отриманих клонах та відомих лініях плюрипотентних стовбурових клітин на рівні мРНК

Таким чином, показано експресію ключових факторів плюрипотентності Oct4 і Sox2 на рівні мРНК-транскриптів та, протеїну, реактивацію експресії ендогенних факторів плюрипотентності — Rex1, Nanog і SSEA-1. Рівень експресії останнього істотно варіював у різних клонах, однак у більшості досягав рівня, характерного для контрольної лінії ЕСК. Реактивація експресії ендогенних факторів плюрипотентності є свідченням

репрограмування ембріональних фібробластів на рівні експресії генів. Відповідність експресії досліджуваних показників контрольним лініям свідчить про плюрипотентність отриманих клітин. Одержані внаслідок репрограмування фібробластів клони потребують подальшого вивчення на предмет їх функціонального потенціалу. Однак згідно з отриманими результатами ці клони можна вважати потенційною лінією іПСК. З огляду на низку переваг цього методу система транспозонів *Sleeping beauty* є новим

перспективним способом одержання іПСК, що має значення для розвитку біотехнології стовбурових клітин.

Автори вдячні співробітникам Центру молекулярної медицини Макса-Дельбрука, м. Берлін (Німеччина), за люб'язно надану систему плазмід *Sleeping beauty*, а також Томо Саричу та Юргену Хешелеру (Інститут нейрофізіології університету м. Кельн, Німеччина), за надану можливість здійснення ключових етапів роботи.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Takahashi K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. — 2006. — V. 126. — P. 663–676.
2. *Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Ibid.* — 2007. — V. 131. — P. 861–872.
3. *Ebben J. D., Zorniak M., Clark P. A. et al.* Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine // *World Neurosurg.* — 2011. — V. 76. — P. 270–275.
4. *Vitalea A. M., Wolvetang E., Mackay-Sima A.* Induced pluripotent stem cells: A new technology to study human diseases // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2011. — V. 43. — P. 843–846.
5. *Ohm J. E., Mali P., van Neste L. et al.* Cancer-Related Epigenome Changes Associated with Reprogramming to Induced Pluripotent Stem Cells // *Cancer Res.* — 2010. — V. 70. — P. 7662–7673.
6. *Sommer C. A., Stadtfeld M., Murphy G. J. et al.* Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette // *Stem Cells*. — 2009. — V. 27. — P. 543–549.
7. *Zhou W., Freed C. R.* Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells // *Ibid.* — 2009. — V. 27. — P. 2667–2674.
8. *Okita K., Matsumura Y., Sato Y. et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells // *Nat. Meth.* — 2011. — V. 8. — P. 40–412.
9. *Plews J. R., Li J., Jones M. et al.* Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach // *PLoS One*. — 2010. — V. 5. — e14397. doi: 10.1371/journal.pone.0014397 ...
10. *Jin J., Kwon Y. W., Paek J. S. et al.* Analysis of differential proteomes of induced pluripotent stem cells by protein-based reprogramming of fibroblasts // *J. Proteome Res.* — 2011. — V. 10. — P. 977–989.
11. *Meir Y. J., Wu S. C.* Transposon-based vector systems for gene therapy clinical trials: challenges and considerations // *Chang Gung Med. J.* — 2011. — V. 34. — P. 565–579.
12. *Donnelly M. L., Hughes L. E., Luke G. et al.* The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences // *J. Gen. Virol.* — 2001. — V. 82. — P. 1027–1041.
13. *Naujok O., Kaldrack J., Taivankhuu T. et al.* Selective removal of undifferentiated embryonic stem cells from differentiation cultures through HSV1 thymidine kinase and ganciclovir treatment // *Stem Cell Rev.* — 2010. — V. 6. — P. 450–461.
14. *Chen J., Liu J., Chen Y. et al.* Rational optimization of reprogramming culture conditions for the generation of induced pluripotent stem cells with ultra-high efficiency and fast kinetics // *Cell Res.* — 2011. — V. 21. — P. 884–894.
15. *Khodadadi K., Sumer H., Pashaiasl M. et al.* Induction of pluripotency in adult equine fibroblasts without c-MYC // *J. Stem Cells Int.* — 2012. — V. 2012: 429160. doi: 10.1155/2012/429160.
16. *Sternecker J., Höing S., Schöler H. R.* Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway // *Stem Cells*. — 2012. — V. 30. — P. 15–21.
17. *Nemajerova A., Kim S. Y., Petrenko O. et al.* Two-factor reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells reveals partial functional redundancy of Sox2 and Klf4 // *Cell Death Differ.* — 2012. — V. 19. — P. 1268–1276.
18. *Wu T., Wang H., He J. et al.* Reprogramming of trophoblast stem cells into pluripotent stem cells // *Stem Cells*. — 2011. — V. 29. — P. 755–763.
19. *Yuan X., Wan H., Zhao X. et al.* Combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fib-

- roblasts // Ibid. — 2011. — V. 29(3) — P. 549–553.
20. Page R. L., Ambady S., Holmes W. F. et al. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes // Ibid. — 2009. — V. 11. — P. 417–426.

21. Hatano S. Y., Tada M., Kimura H. et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity // Mech. Dev. — 2005. — V. 122. — P. 67–79.

**ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ
ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ
ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ
ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ
ТРАНСПОЗОНОВ**

*С. В. Мальшева^{1,2}
Н. М. Билько¹
Ю. Хешлер²*

¹Национальный университет «Киево-Могилянская академия», Киев, Украина
²Институт нейрофизиологии
Кельнского университета, Кельн, Германия

E-mail: smalysheva@gmail.com

Поиск эффективных и безопасных методов получения плюрипотентных стволовых клеток чрезвычайно актуален. В работе эмбриональные фибробласты мыши репрограммированы в пролиферирующие колонии с типичной морфологией индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с помощью векторной системы транспозонов Sleeping beauty. В полученных клонах исследована экспрессия различных маркеров плюрипотентности — щелочной фосфатазы, генов Oct4 и Sox2; оценен уровень экспрессии поверхностного маркера плюрипотентности SSEA-1 в отдельных клонах клеточной линии. Показана также реактивация экспрессии эндогенных факторов плюрипотентности Nanog и Rex1. Полученные данные проанализированы и сопоставлены с показателями исходной линии эмбриональных фибробластов и зарегистрированной линии плюрипотентных стволовых клеток. Показано, что с помощью системы транспозонов Sleeping beauty осуществляется репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные. Таким образом, эта система репрограммирования является новым перспективным инструментом в биотехнологии получения плюрипотентных клеток.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, репрограммирование, маркеры плюрипотентности.

**EXPRESSION OF PLURIPOTENCY
MARKERS IN MURINE FIBROBLASTS
REPROGRAMMING BY TRANSPOSON
SYSTEM**

*S. V. Malysheva^{1,2}
N. M. Bilko¹
J. Hescheler²*

¹National University of «Kyiv-Mohylanska Academy», Kyiv, Ukraine
²Institute of Neurophysiology, University of Cologne, Cologne, Germany

E-mail: smalysheva@gmail.com

The search for effective and safe methods to generate induced pluripotent stem cells is especially urgent. In the paper murine embryonic fibroblasts were reprogrammed towards actively proliferating colonies with typical induced pluripotent stem cells morphology by means of Sleeping beauty transposon-based vector system. The obtained clones were checked for the expression of various pluripotency markers: alkaline phosphatase, Oct4 and Sox2 genes, SSEA-1 expression in various clones was evaluated. Also the reactivation of endogenous pluripotency factors Nanog and Rex1 was indicated. The data obtained is analyzed and compared to the established pluripotent stem cell line. It is shown that somatic cells are reprogrammed towards pluripotency by means of Sleeping beauty transposon system. Therefore, the system is a new perspective biotechnological tool to generate pluripotent cells.

Key words: induced pluripotent stem cells, reprogramming, pluripotency markers.