



# Трансформация человеческих кератоцитов роговицы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

14.03.03 - Патологическая физиология

Научный руководитель: д.м.н. проф. Павлов В.Н

Соискатель: Биккузин Т.И.

Актуальность

# Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)



## Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Cell

Kazutoshi Takahashi<sup>1</sup> and Shinya Yamanaka<sup>1,2,\*</sup>

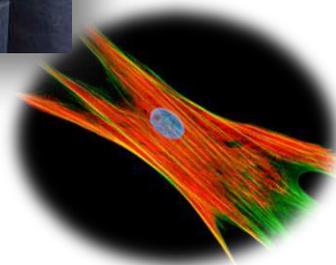
<sup>1</sup> Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>2</sup> CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

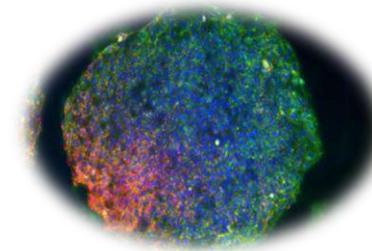
\*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024

...Dr. S. Yamanaka получил ИПС клетки в 2006 г.

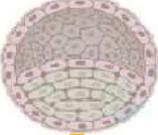
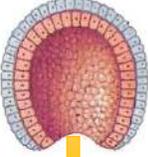


Факторы  
репрограммирования:  
*Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4*



- 1) Takahashi, K; Yamanaka, S Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 (4): 663—676. (2006)
- 2) Takahashi K. Yamanaka S. et al Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell 131: 861—872. (2007)
- 3) J.A. Thomson Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 318(5858): (2007)

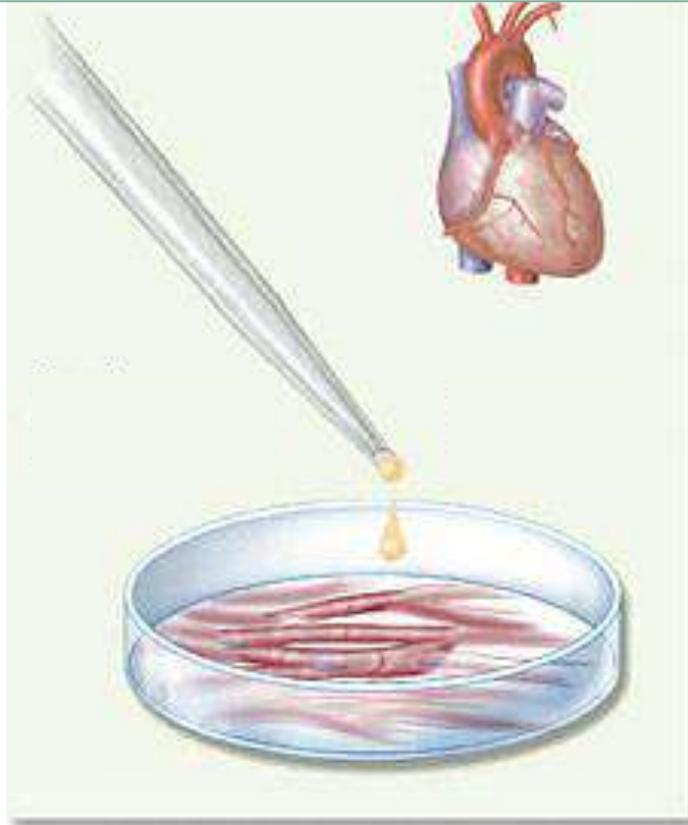
# Классификация стволовых клеток (по Вейгерсу и Вейсману)

Дифференцирующий потенциал	Уровень онтогенеза	Типы
Тотипотентные	 Зигота	Оплодотворенная яйцеклетка
Плюрипотентные	 Бластоциста	Эмбриональные СК
		Индукцированные плюрипотентные СК
Мультипотентные	 Эктодерма	Мезенхимальные СК
Унипотентные	 Постнатальный период	Лимбальные СК
		Прогиниторные клетки сетчатки, и др.

# Потенциал ИПС клеток

# Персонализированная медицина

Тестирование лекарственных веществ



Изучение клеточной дифференциации



Изучение врожденных заболеваний



Эктодерма

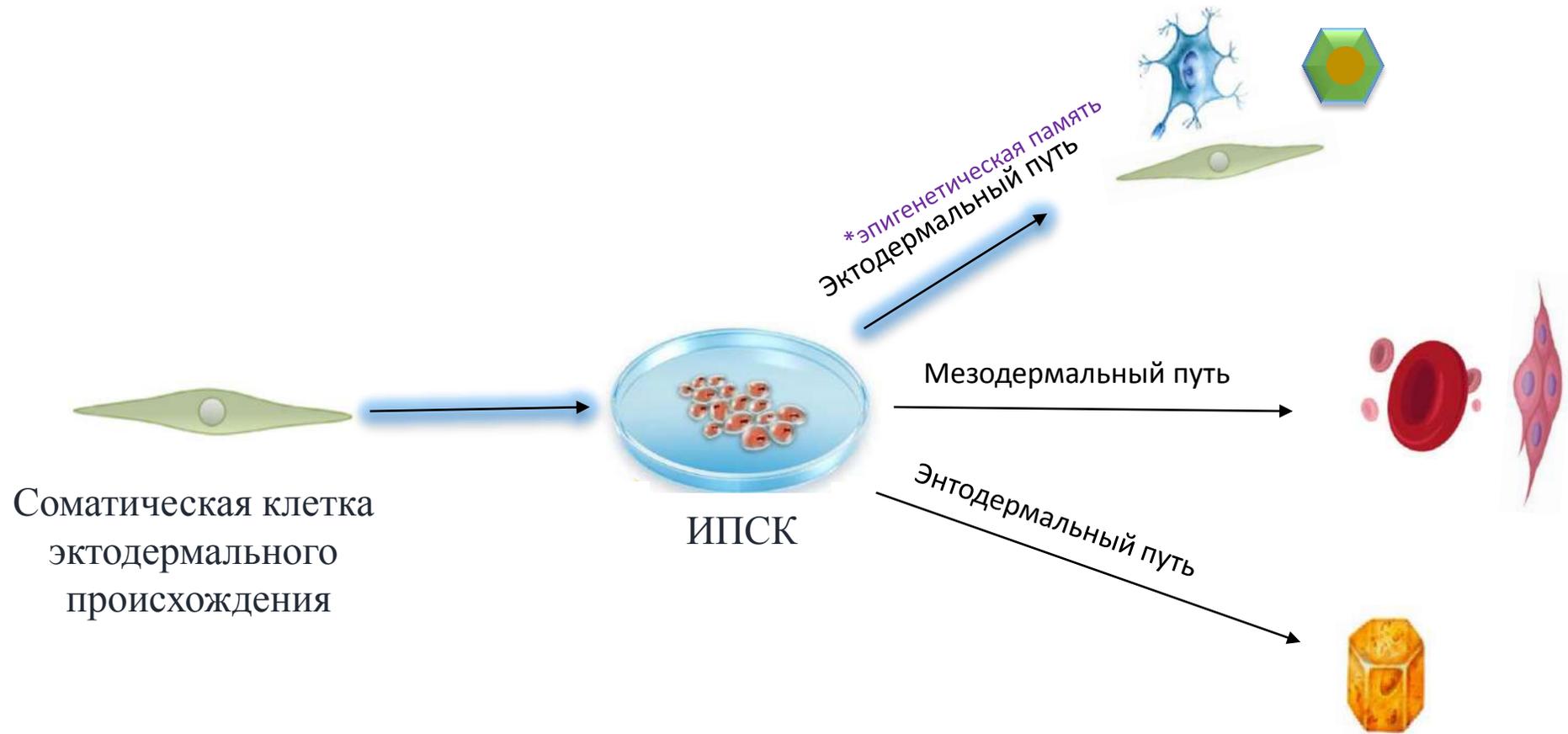
Мезодерма

Энтодерма

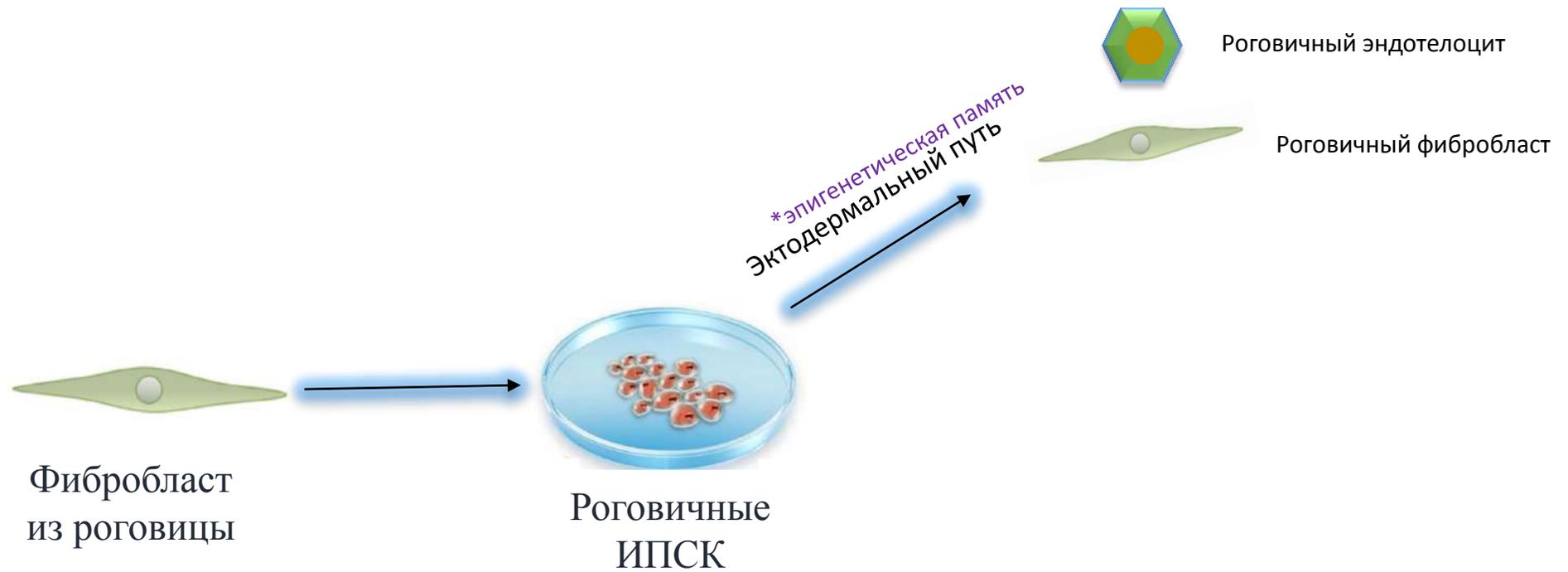


Генерация тканей и клеток для трансплантации

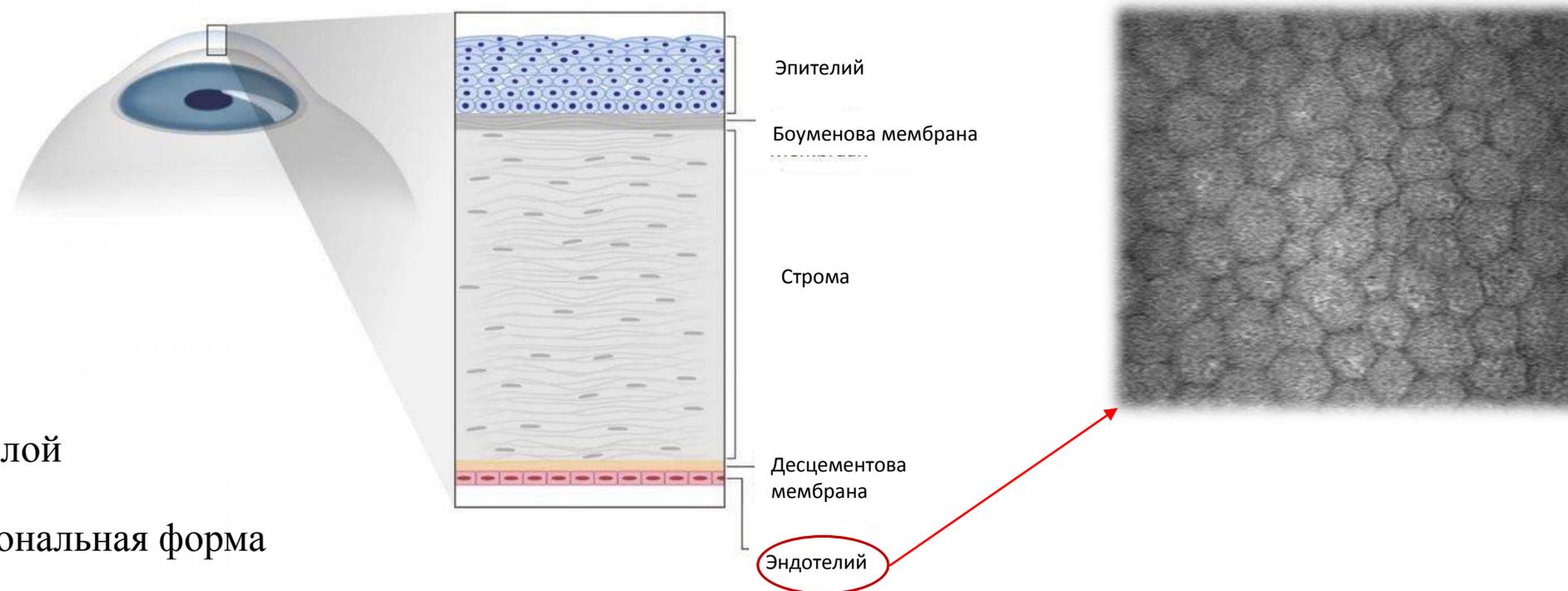
# Феномен «эпигенетической памяти»



# Феномен «эпигенетической памяти»



# Эндотелиальные клетки роговицы (ЭКР)



- Монослой
- Гексагональная форма
- Барьерная функция и Na –K- насос (поддержание прозрачности роговицы)
- Эндотелий роговицы взрослого человека не может регенерировать после травмы. Декомпенсация эндотелия роговицы происходит после потери ЭКР, превышающая критический уровень (снижение количества клеток ниже  $700 \text{ кл/мм}^2$ ).

## Цели и задачи исследования

Целью данной работы является получение роговичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для дальнейшего применения в офтальмологической трансплантологии.

Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести безвирусное эпигенетическое репрограммирование фибробластов роговицы человека в ИПСК.
2. Охарактеризовать линию ИПСК, полученных из кератоцитов.
3. Разработать воспроизводимый протокол эффективной дифференцировки кератоцито-индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (кИПСК) в невральные клетки-предшественники и клетки эндотелия роговицы.
4. Провести сравнительный анализ потенциала дифференцировки контрольной группы кожных ИПСК и роговичных ИПСК.

## Научная новизна работы

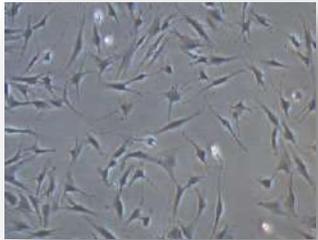
- Впервые были выведены плюрипотентные стволовые клетки, репрограммированные из кератоцитов роговицы человека.
- Молекулярными и цитохимическими методами показано, что полученные роговичные ИПСК обладают классическими свойствами плюрипотентности, такими как, экспрессия белков-маркеров плюрипотентных стволовых клеток (Oct4, Nanog, Sox2) и потенциал дифференцироваться в клетки трёх зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы).
- Было установлено, что процесс дифференцировки кИПСК в эндотелиальные клетки роговицы проходит более эффективно по сравнению с кожными ИПСК в связи с «феноменом эпигенетической памяти».

## **Положение, выносимое на защиту**

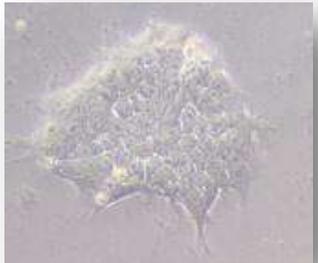
1. Из кератоцитов роговицы человека можно получить полноценные ИПСК.
2. Свойство «эпигенетической памяти» характерное для роговичных ИПСК может облегчить процесс дифференцировки в функциональные клетки роговицы.

# Материалы и методы исследования

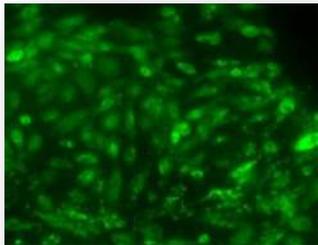
# Экспериментальные этапы



1 этап: Получение первичной культуры соматических клеток



2 этап: Индуцирование плюрипотентных стволовых клеток



3 этап: Дифференциация эндотелиальных клеток роговицы

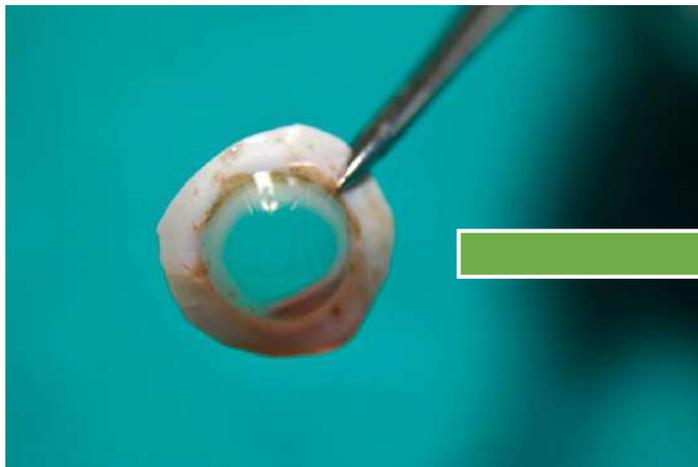
Идентификация полученных клеток

# Экспериментальные методы

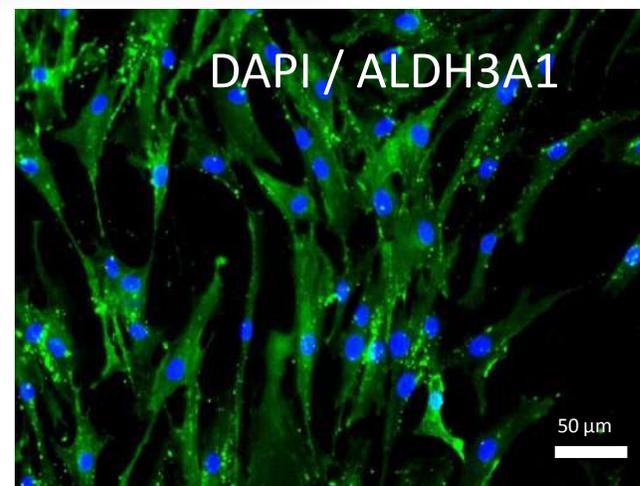
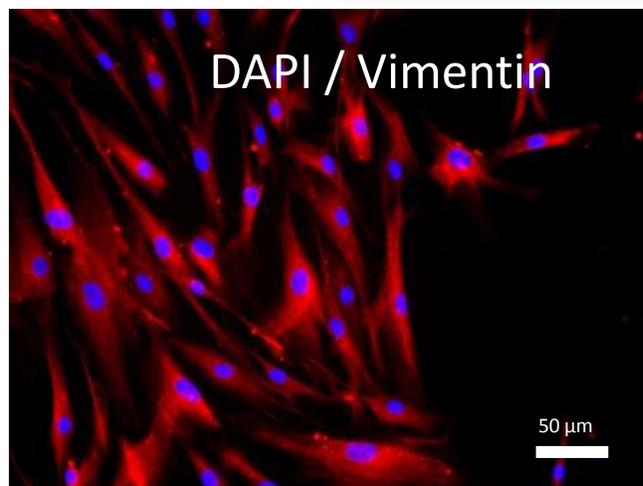
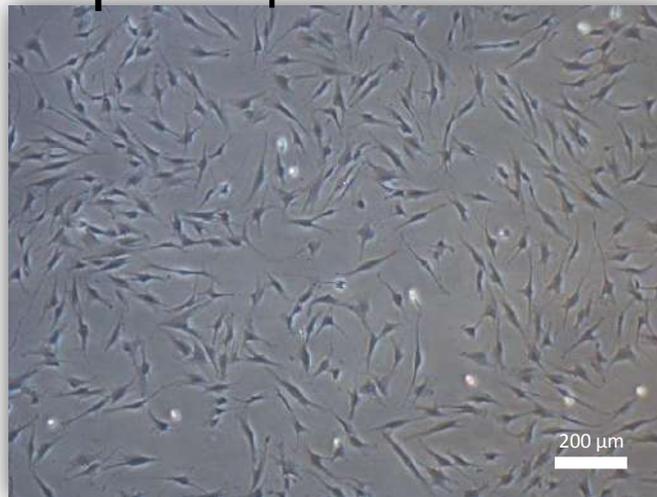
- Эписомальное репрограммирование
- Анализ ДНК (STR-метод)
- ПЦР-ОТ
- Блоттинг белков
- Иммуноцитохимия

Результаты

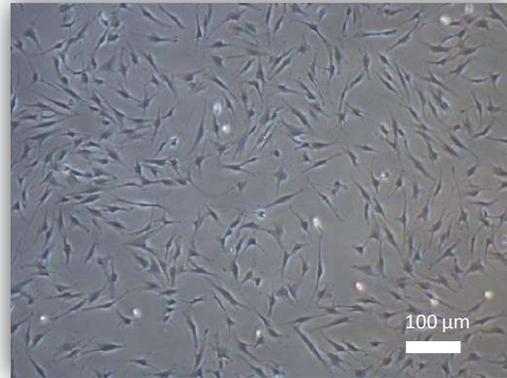
# 1 этап: Первичная культура соматических клеток



Кератоциты

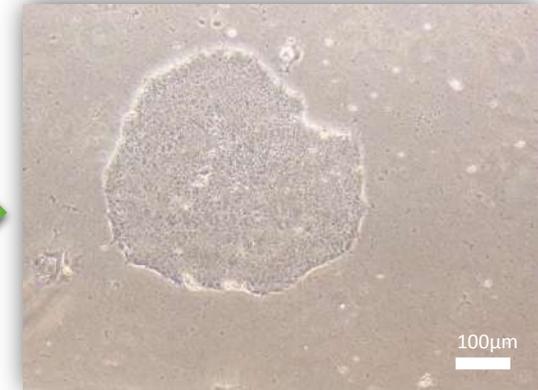


## 2 этап: Получение ИПС клеток



**Кератоциты**

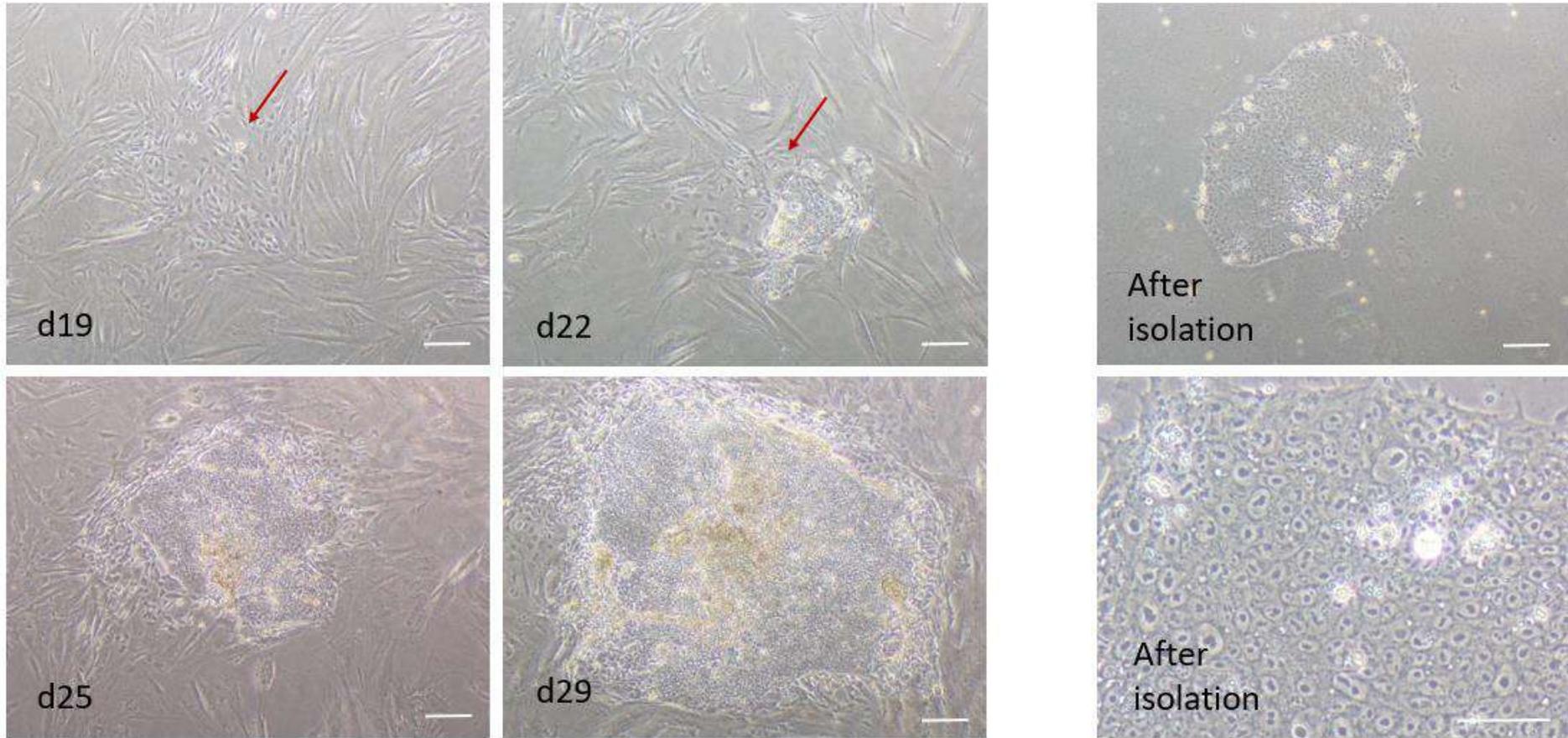
*Epi5<sup>TM</sup>* Episomal IPSC Reprogramming Kit  
Lipofectamine 3000  
(Invitrogen Life Technology)



**ИПСК из кератоцитов  
(КИПСК)**

Содержание	Вектор	Ген
<b>Epi5<sup>TM</sup> Reprogramming Vectors (Tube A)</b>	pCE-hOCT3/4	<b>Oct4</b>
	pCE-hSK	<b>Sox2, Klf4</b>
	pCE-hUL	<b>L-Мyc, Lin28</b>
<b>Epi5<sup>TM</sup> p53 &amp; EBNA Vectors (Tube B)</b>	pCE-mP53DD	mp53DD
	pCXB-EBNA1	EBNA1

## 2 этап: Процесс репрограммирования кератоцитов в ИПСК

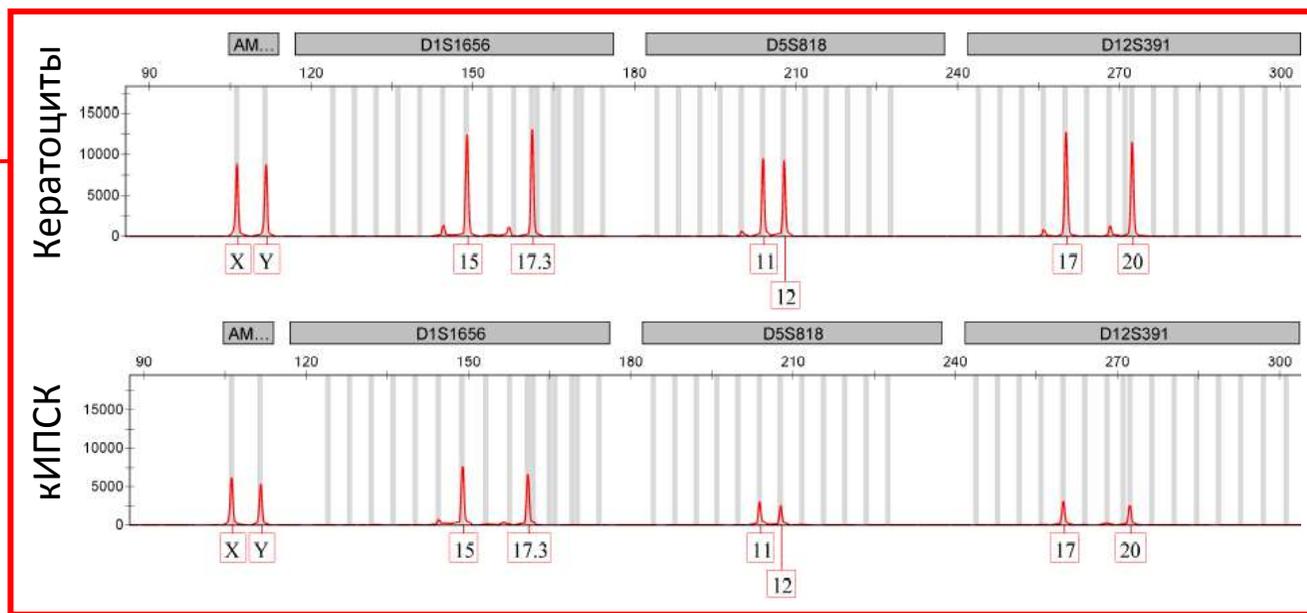


Фазово-контрастная микроскопия полученных кИПСК во время репрограммирования на 19, 22, 25, 29 дни (стрелки указывают на кИПСК). Первый пассаж после изолирования и изображение в увеличенном масштабе полученных ИПСК.

Масштаб = 100 мкм.

## 2 этап: Сравнение ДНК кератоцитов роговицы и КИПСК

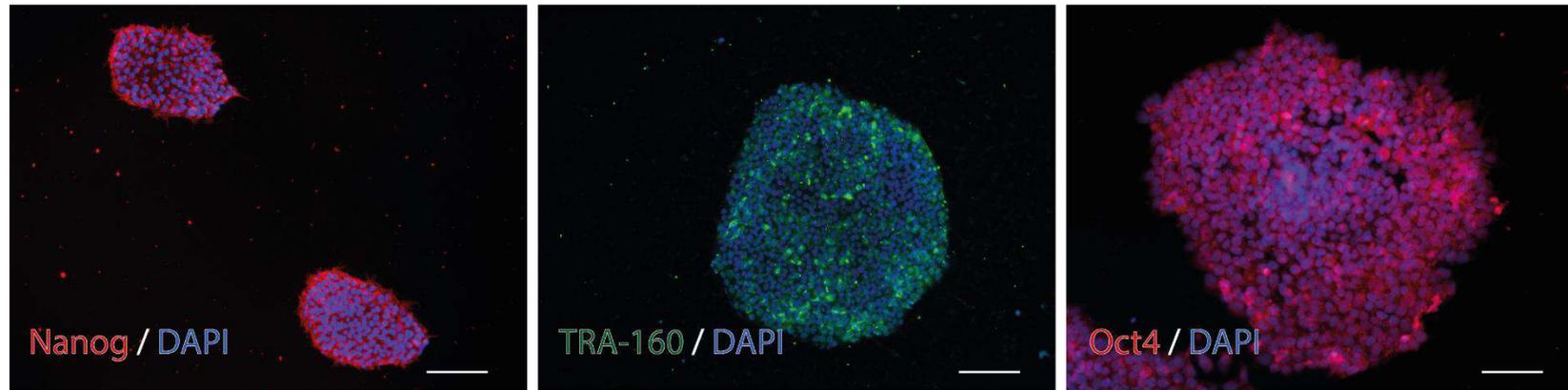
Маркер (зонд)	Аллель 1	Аллель 2
AMEL	X	Y
D1S1656	15	17.3
D5S818	11	12
D12S391	17	20
FGA	22	24
D13S317	8	8
D7S820	8	9
D16S539	11	13
VWA	17	17
TH01	7	9
TPOX	8	9
CSF1PO	9	12
D2S1338	23	24
D21S11	29	31
D18S51	15	20
D8S1179	11	13
D3S1358	14	17
D6S1043	19	19
PENTAE	11	11
D19S433	13	13.2
PENTAD	9	13



### Short Tandem Repeat (STR) результаты

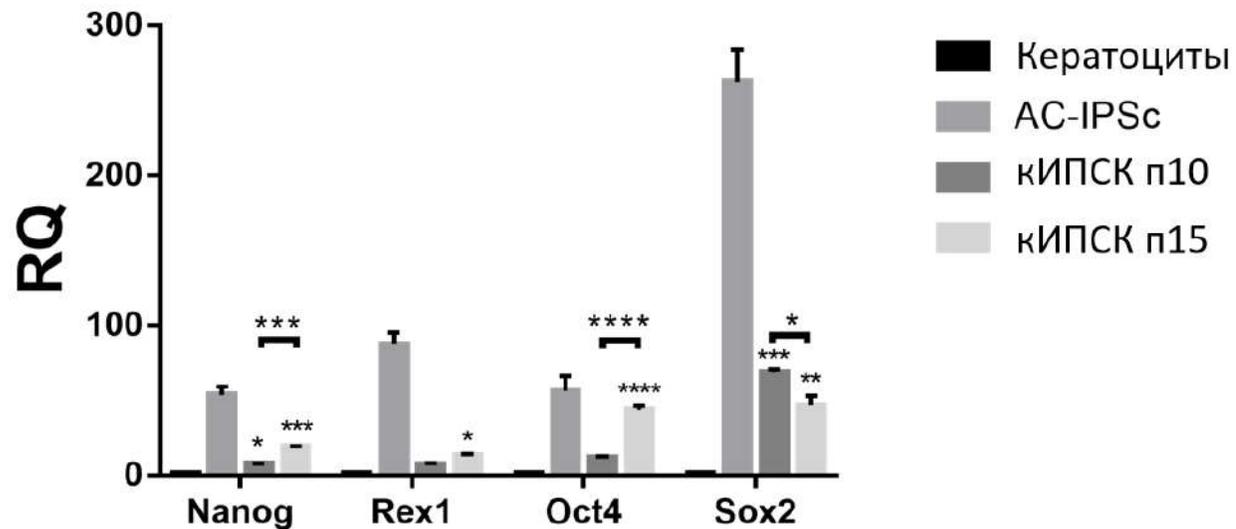
Совпадение в более чем 20 STR-локусах  
ДНК между линиями кератоцитов и  
КИПСК

## 2 этап: Иммуноцитохимия маркеров плюрипотентности



Окраска антителами клонов кИПСК на маркер плюрипотентных клеток NANOG (красный), TRA-1-60 (зеленый), Oct4 (красный). Ядра клеток – краситель DAPI Масштаб= 100 мкм.

## ПЦР-ОТ кИПСК



AC-iPSCs - образец положительного контроля кожных ИПСК;

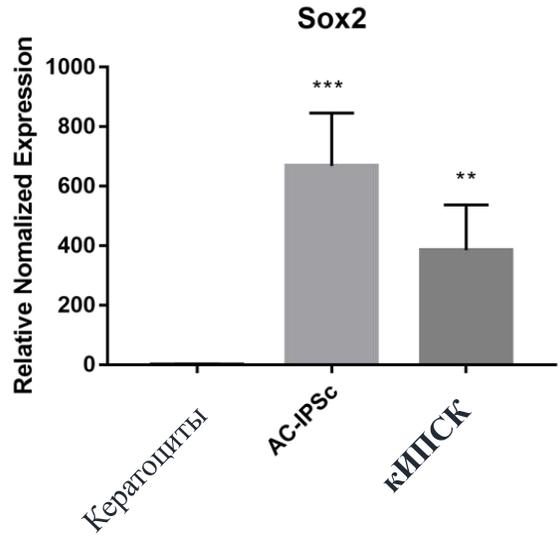
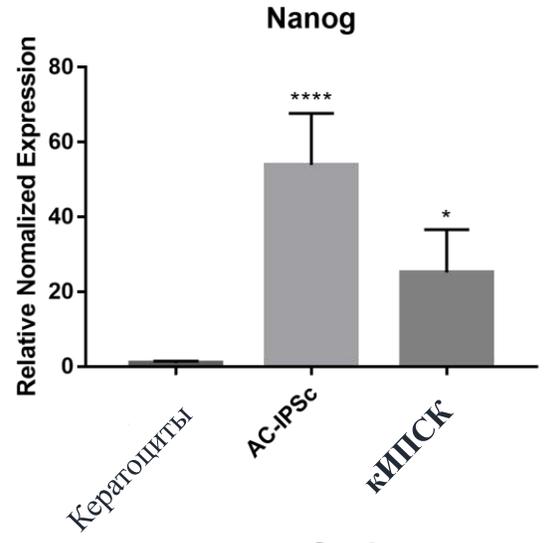
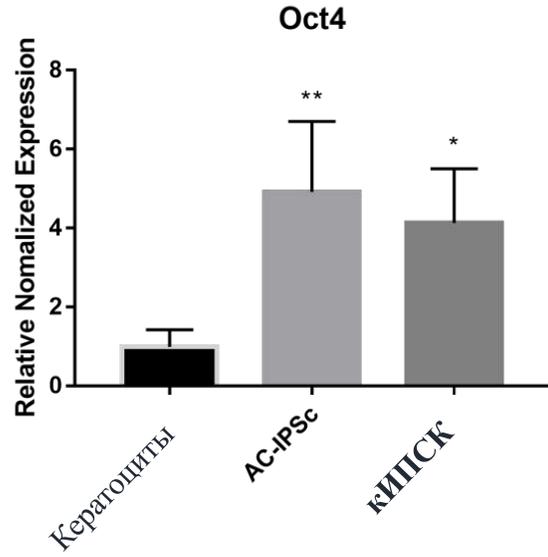
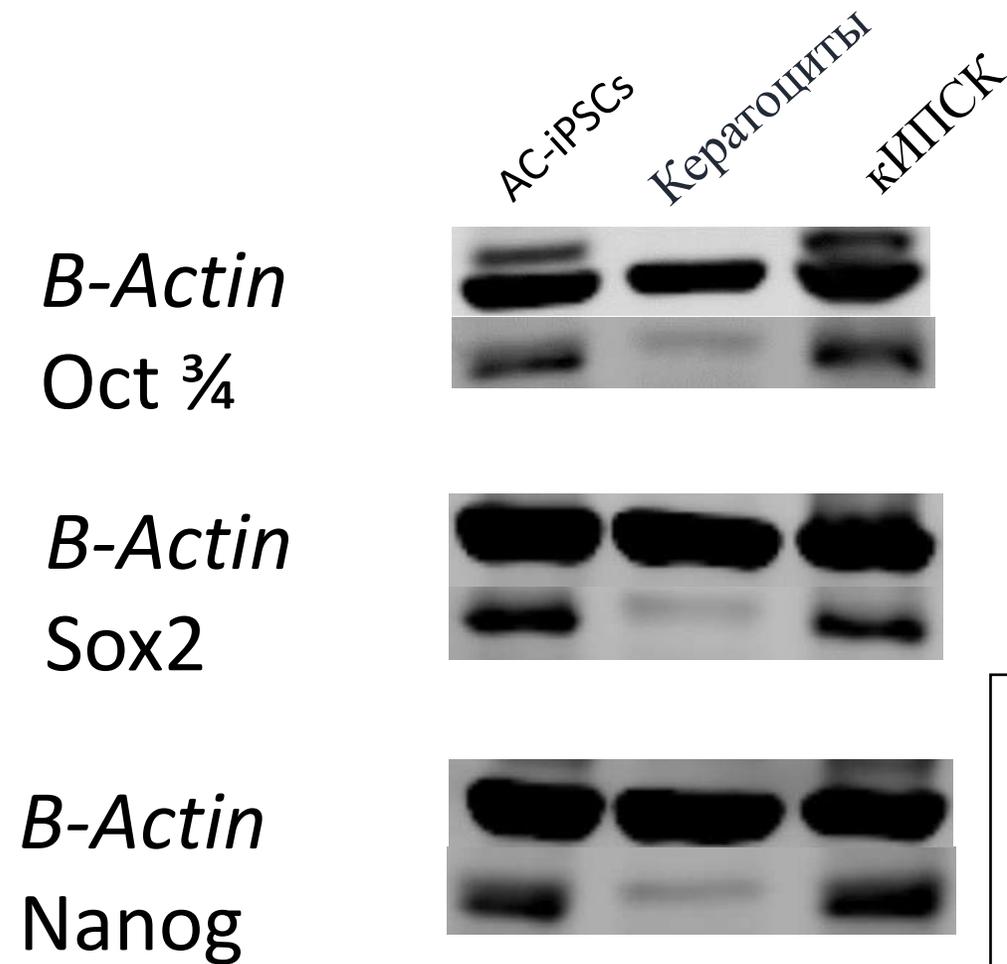
кИПСК – ИПСК из кератоцитов;

кИПСК п10 – кИПСК пассаж 10;

кИПСК п15 – кИПСК пассаж 15;

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  в сравнение с отрицательным контролем (кератоциты)

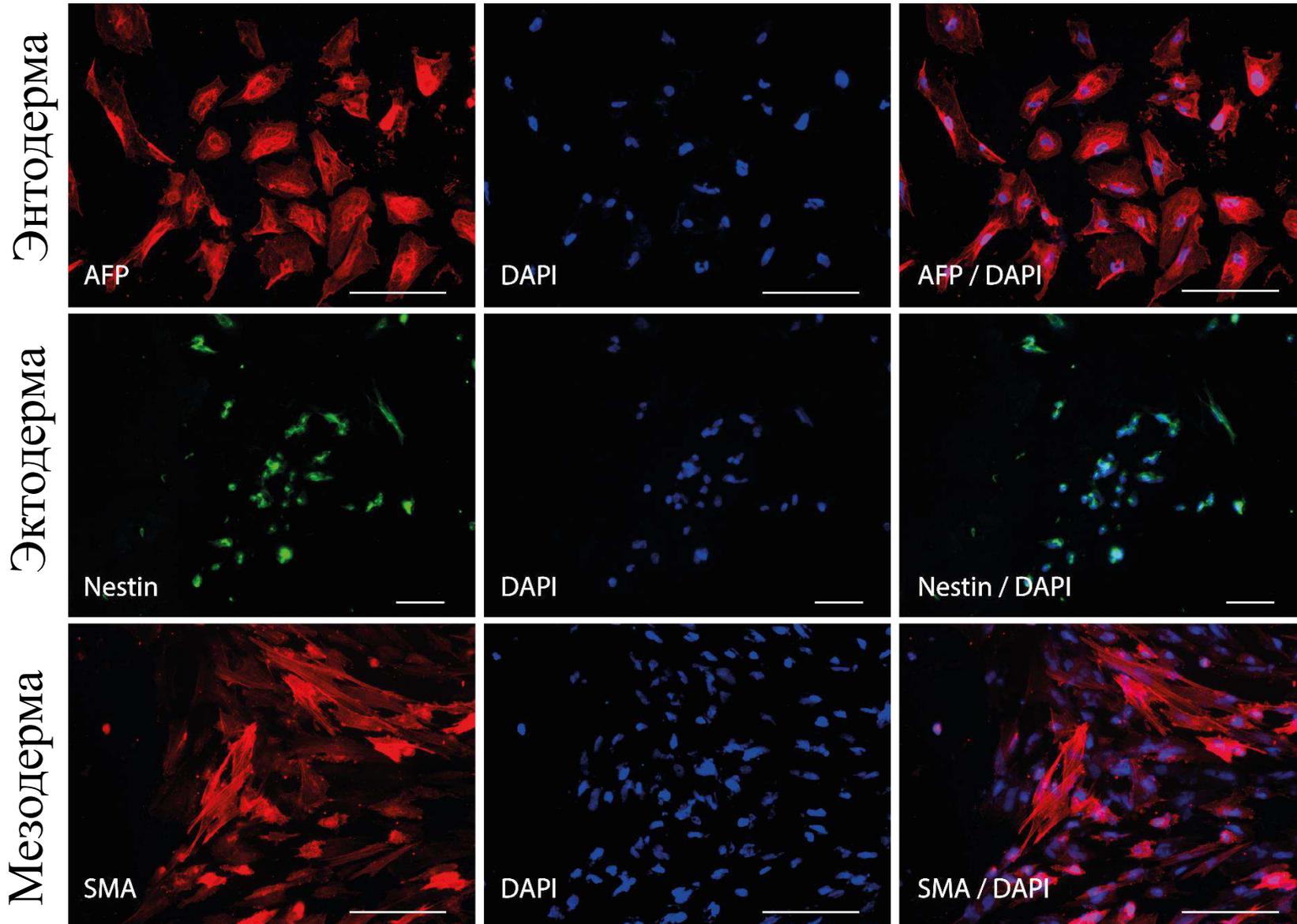
# 2 этап: Блоттинг белков КИПСК



AC-iPSCs - образец положительного контроля кожных ИПСК;  
 КИПСК – ИПСК из кератоцитов;

\*P<0.05,  
 \*\*P<0.01,  
 \*\*\*P<0.001,  
 \*\*\*\*P<0.0001 в сравнение с отрицательным контролем (кератоциты)

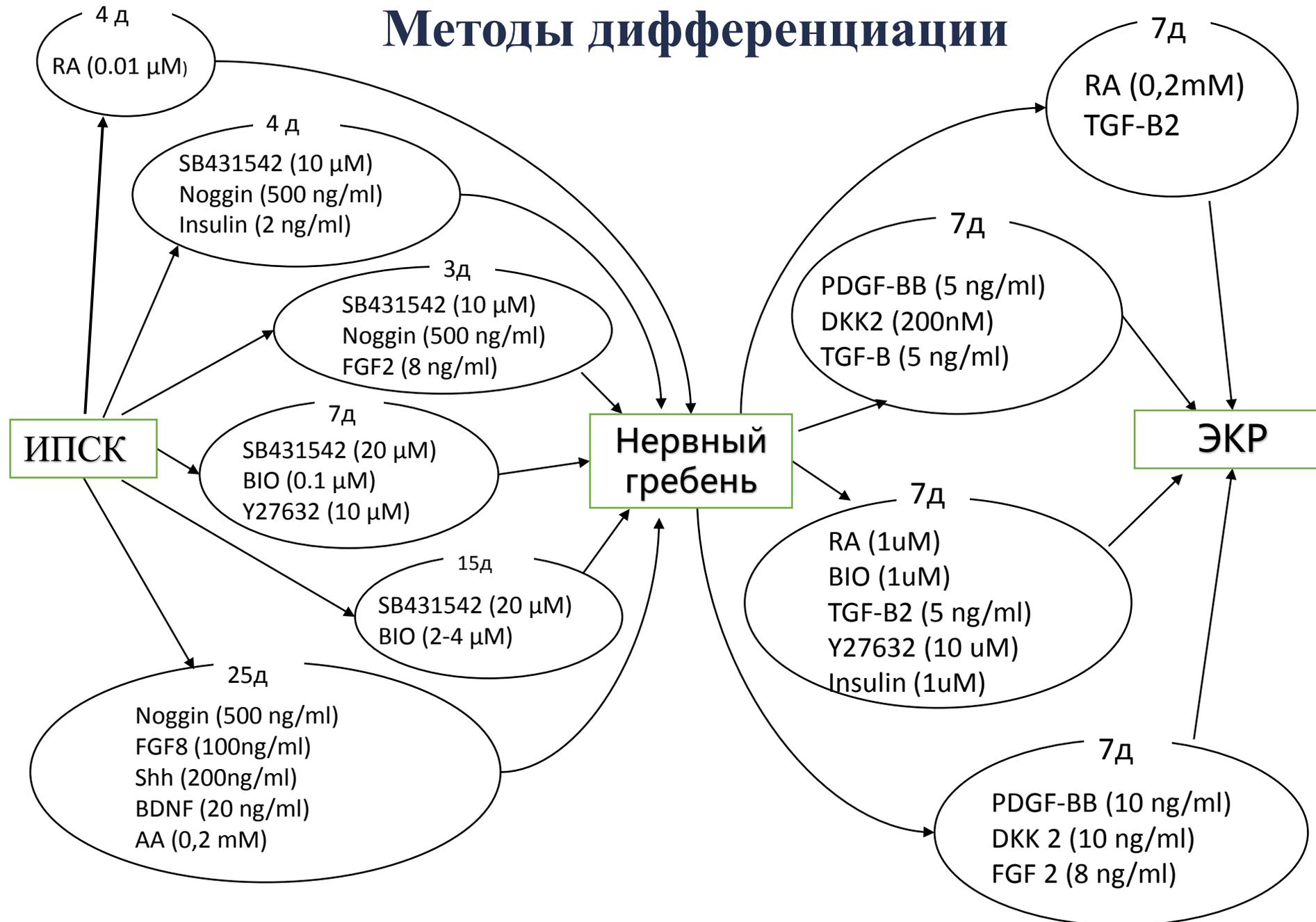
## 2 этап: Дифференциальный потенциал кИПСК *in vitro*



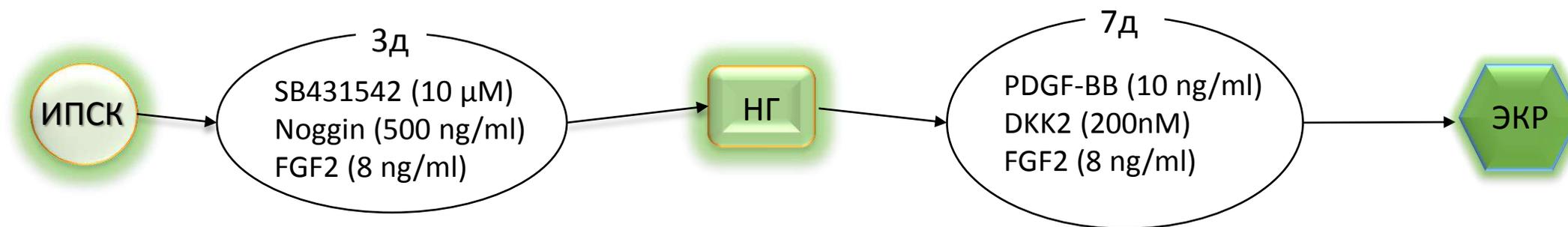
Окраска антителами клонов кИПСК маркерами трех зародышевых листков: энтодерма (AFP), мезодерма (SMA), и эктодерма (Nestin). Ядра клеток – краситель DAPI  
Масштаб= 100 мкм.

# Дифференциация в эндотелиоциты роговицы

# Методы дифференциации



# Методы дифференциации

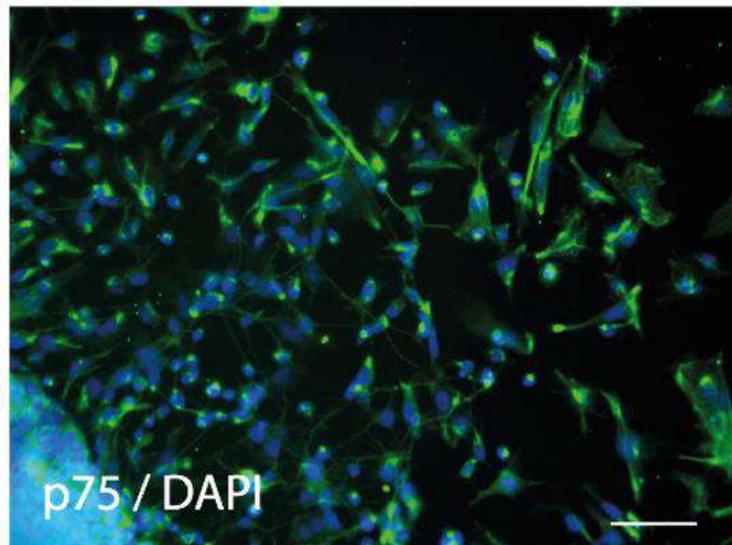


## 4 этап: Нервный гребень-подобные клетки

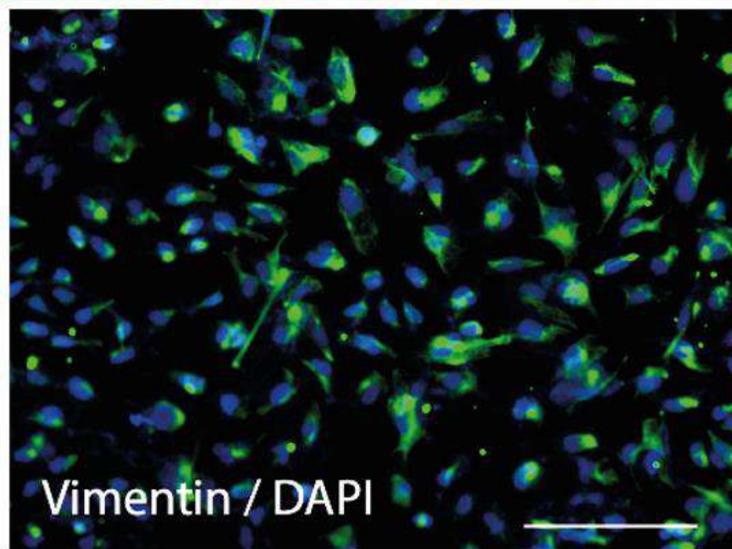
ИПСК >>

> НГ

>> ЭКР



Иммуноцитохимия НГ-подобных клеток, полученных из кИПСК, показаны маркеры p75 (зеленый) и Vimentin (зеленые). Ядра клеток – краситель DAPI. Масштаб= 100 мкм.



Морфология нервный гребень-подобных клеток полученных из кИПСК. Фазово-контрастная микроскопия Масштаб = 100 мкм.

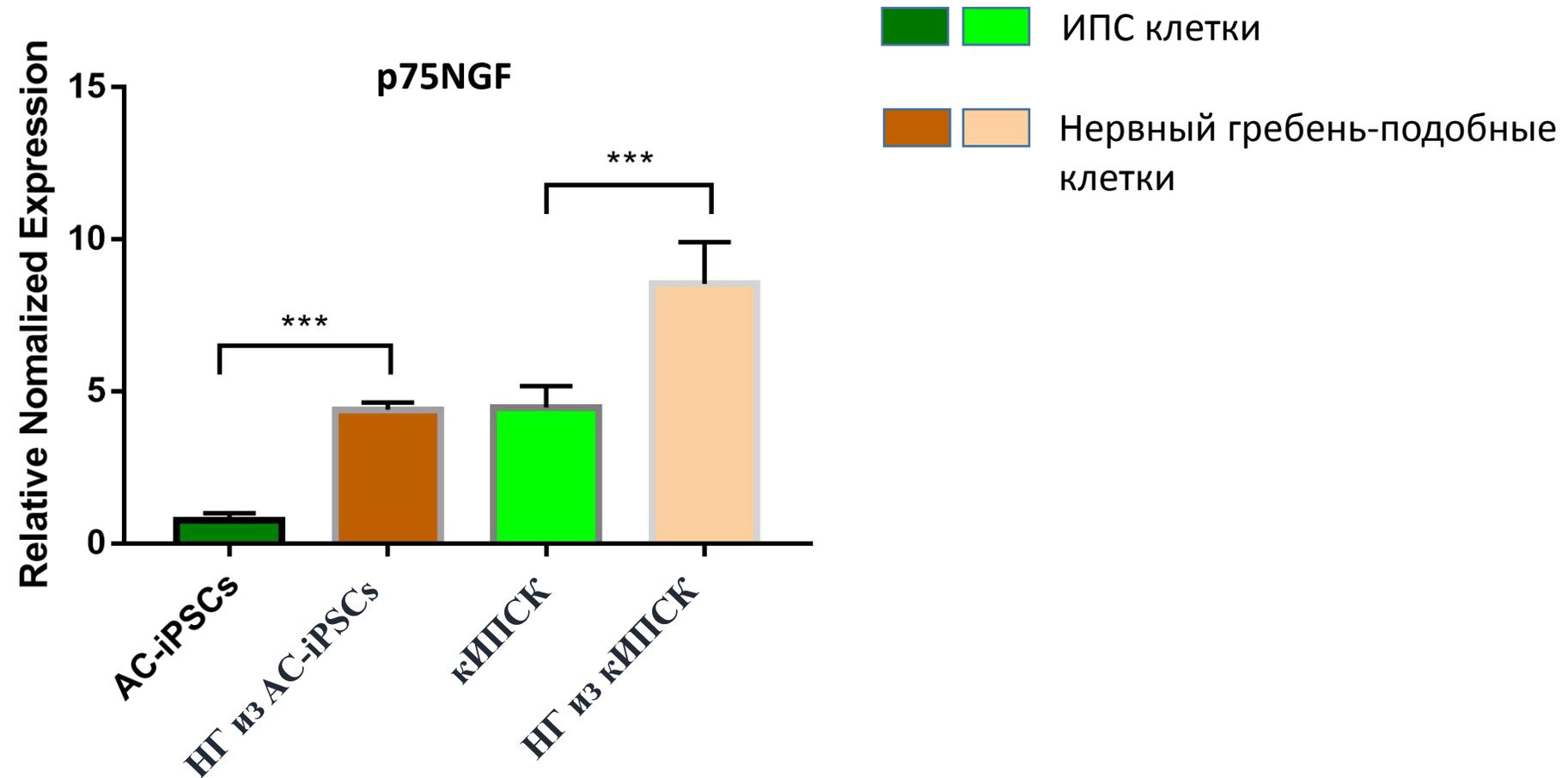
## 4 этап: Блоттинг белков.

Феномен «Эпигенетической памяти» в НГ-подобных клеток.

ИПСК >>

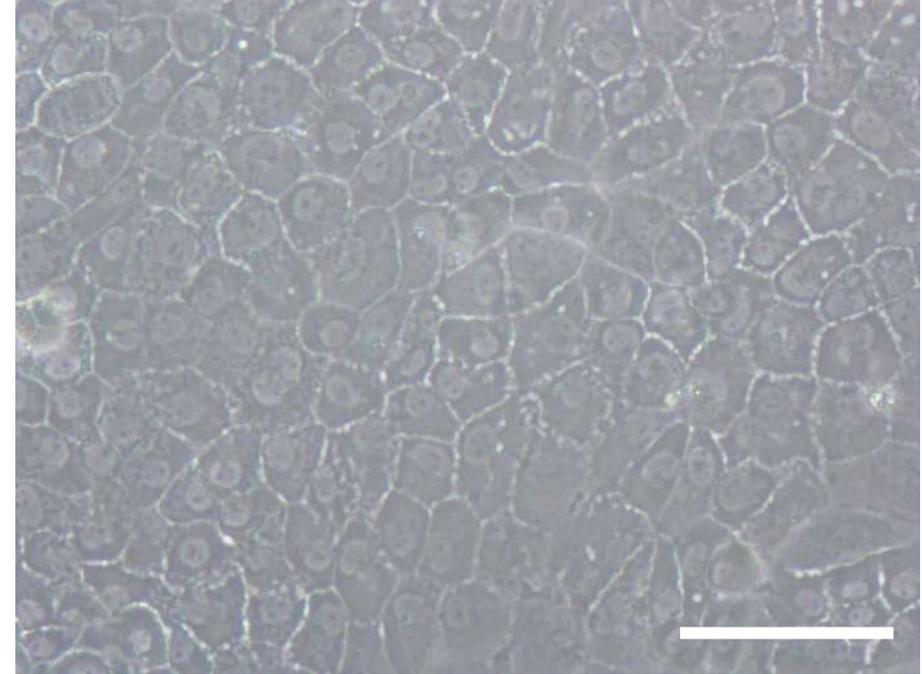
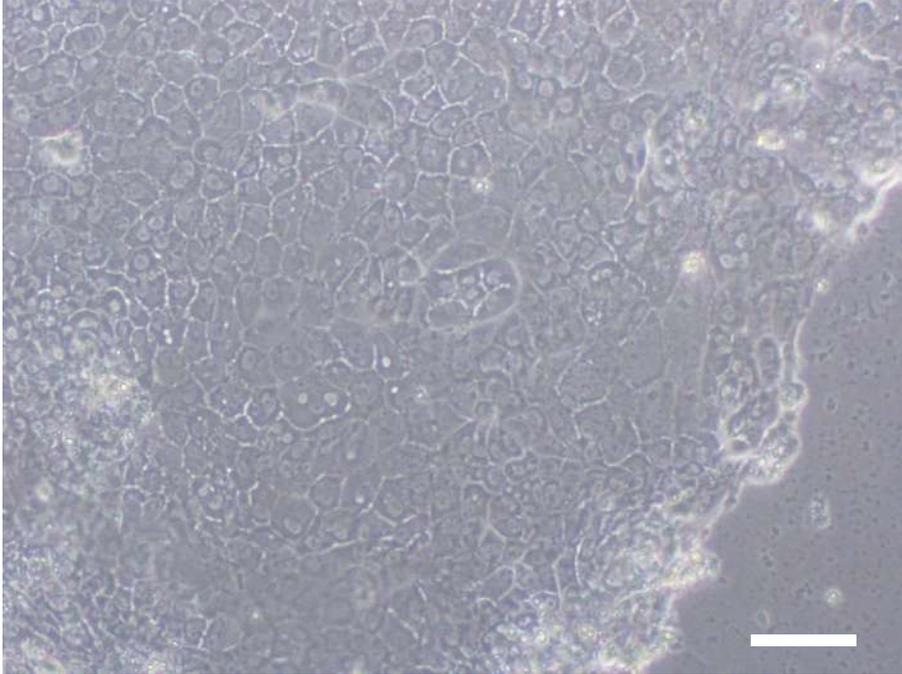
> НГ

>> ЭКР



\*\*\*P<0.001

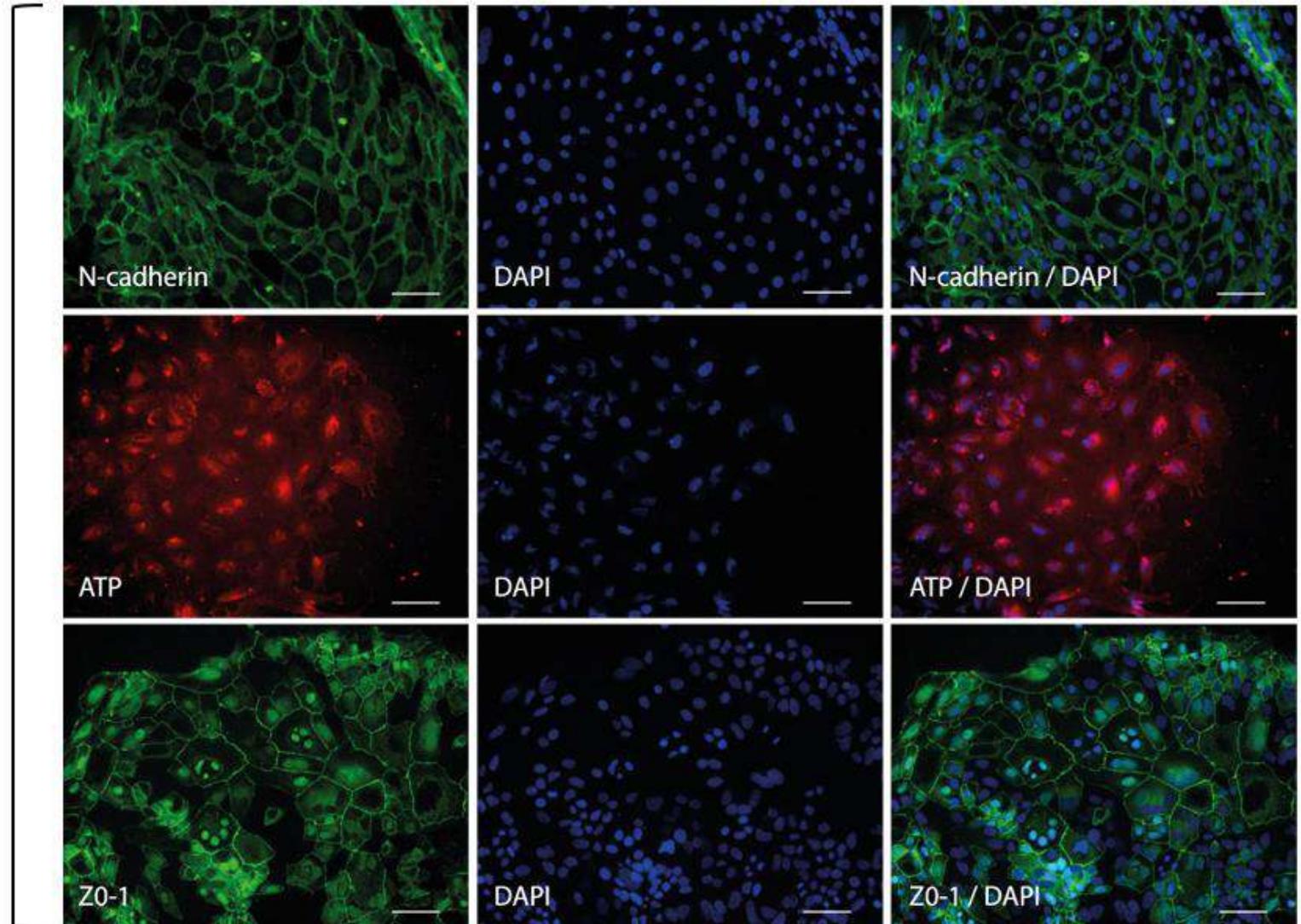
## 4 этап: Микроскопия эндотелия-подобных клеток



Морфология эндотелия подобных клеток полученных из кИПСК.  
Масштаб = 50 мкм.

## 4 этап: Иммуноцитохимия маркеров эндотелия роговицы

После 7 дневной дифференцировки в полученных клетках были обнаружены маркеры, представляющие эндотелиальные клетки роговицы, включая N-cadherin (зеленый), ATP (красный) и ZO-1 (зеленый). Ядра клеток - DAPI (синий). Масштаб = 100 мкм.



Выводы

## Выводы

1. Для репрограммирования кератоцитов в ИПСК была применена безвирусная система эписомальных векторов «Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit», которая зарекомендовала себя как эффективная методика с минимизированным трансгенным риском.

2. Было доказано на практике, что кератоциты роговицы можно индуцировать в адекватные ИПСК. Полученные кИПСК являются полноценными стволовыми клетками, имеющими все характеристики плюрипотентных стволовых клеток и способными дифференцироваться в любые из клеток трех зародышевых листков человека.

3. Было апробировано множество протоколов дифференцировки кИПСК в клетки нервного гребня и клетки эндотелия роговицы. Был выбран наиболее воспроизводимый и эффективный метод дифференцировки.

4. Сравнительный анализ потенциала дифференцировки контрольной группы кожных AC-iPSC и кИПСК показал, что клетки-предшественники роговицы, выведенные из кИПСК обладают свойством «эпигенетической памяти».

## Практические рекомендации

1. Для проведения экспериментов с ИПСК могут быть использованы методики индукции и культивирования ИПСК отработанные в настоящем исследовании.

2. Созданная линия кИПСК может быть использована в качестве источника для дифференциации клеток роговицы, которые в свою очередь могут быть использованы в клеточной терапии и трансплантологии.

3. Апробированные протоколы дифференциации могут быть использованы для получения адекватной линии эндотелиоцитов роговицы для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

感谢聆听