



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 Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

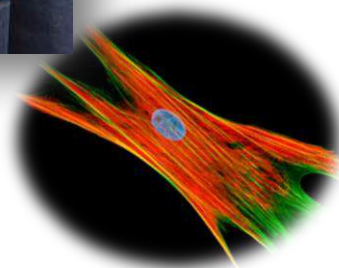
¹ Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

² CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

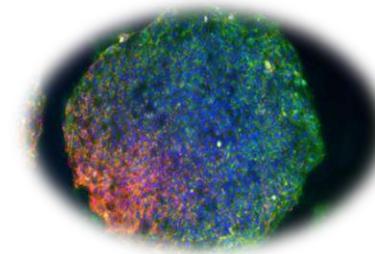
*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024

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



Факторы репрограммирования:
Oct3/4, Sox2, c-Мус, 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)

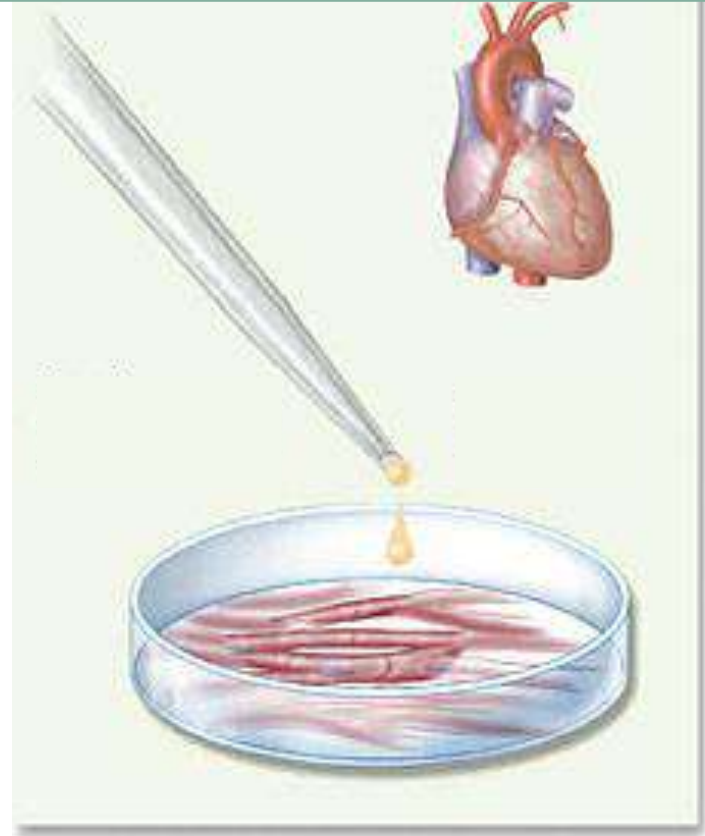
Классификация стволовых клеток (по Вейгерсу и Вейсману)

Дифференцирующий потенциал	Уровень онтогенеза		Типы
Тотипотентные		Зигота	Оплодотворенная яйцеклетка
Плюрипотентные		Бластоциста	Эмбриональные СК
			Индуцированные 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

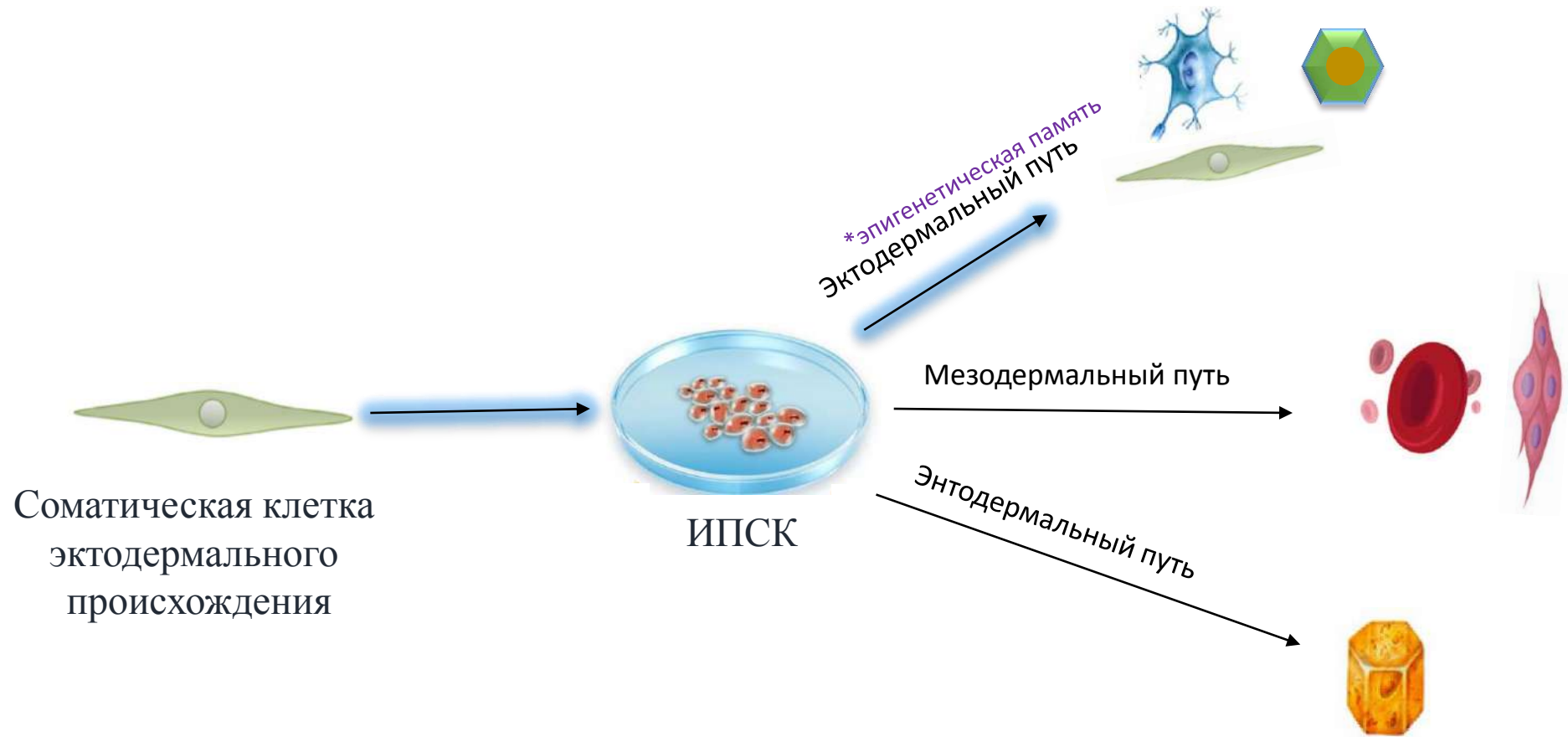
Мезодерма

Энтодерма

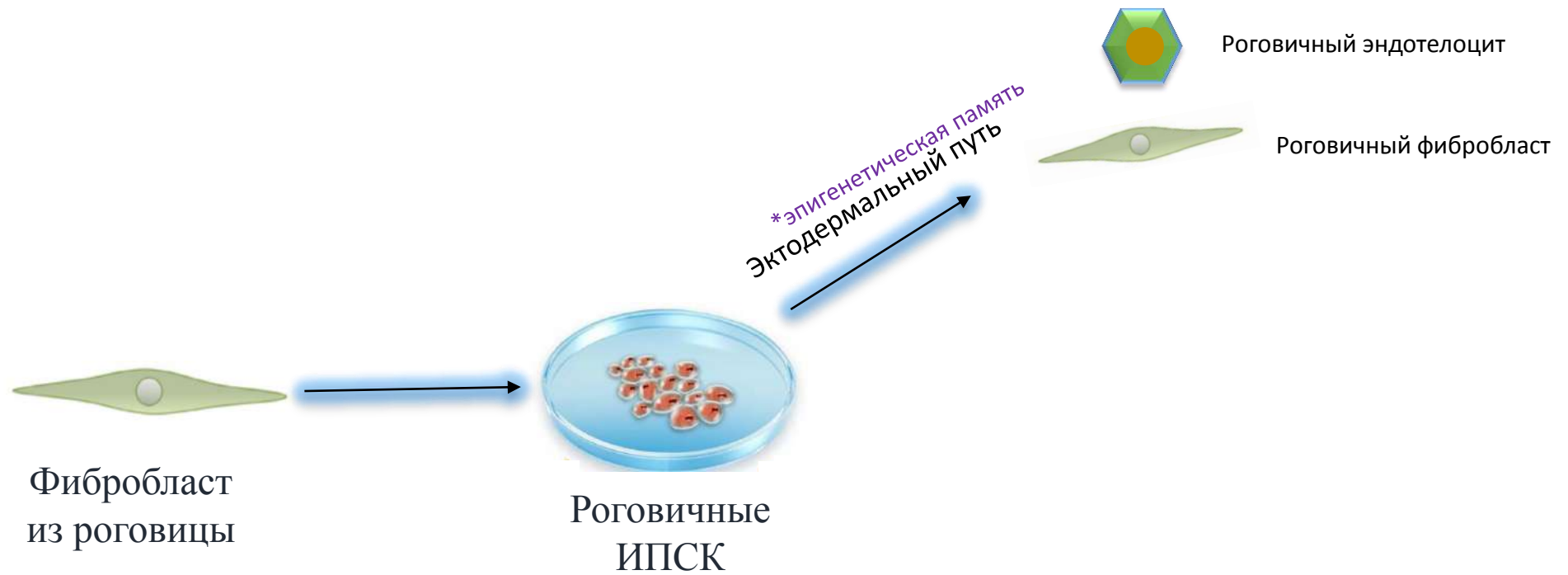


Генерация тканей и клеток для трансплантации

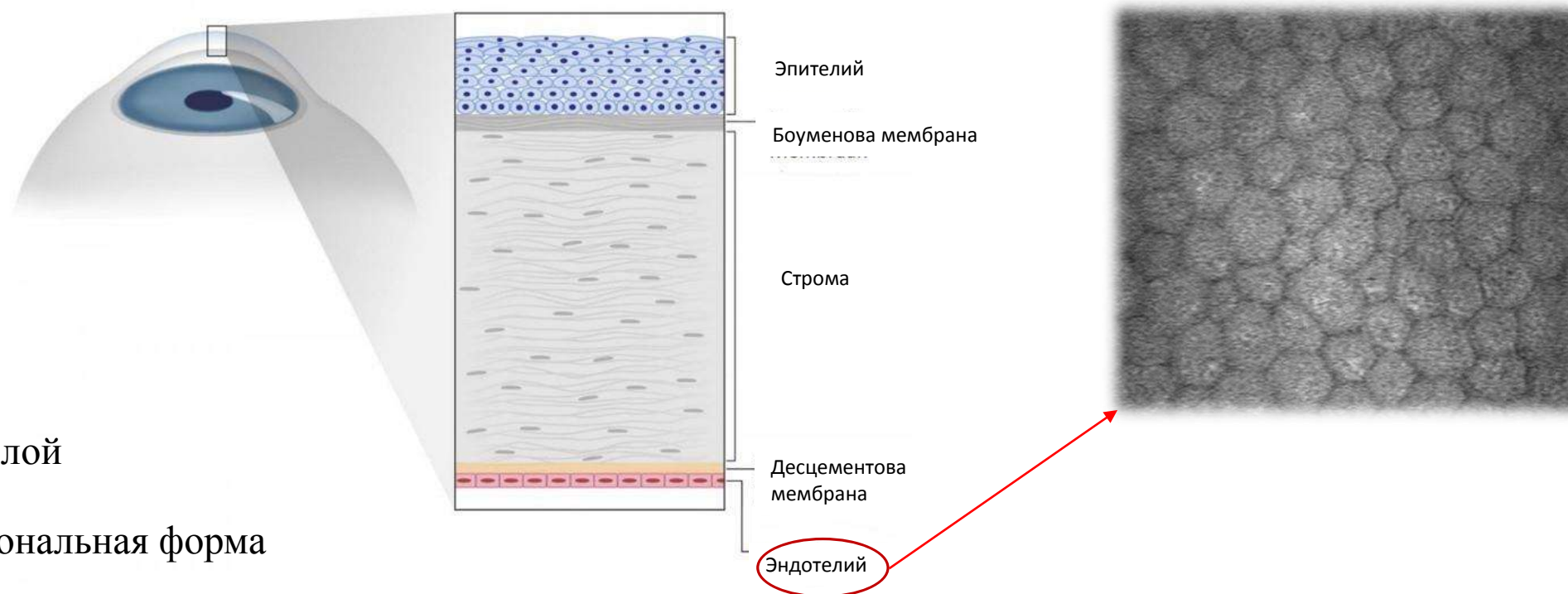
Феномен «эпигенетической памяти»



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 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

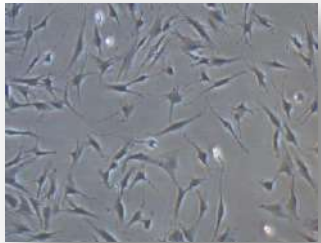
- Впервые были выведены плюрипотентные стволовые клетки, репрограммированные из кератоцитов роговицы человека.
- Молекулярными и цитохимическими методами показано, что полученные роговичные ИПСК обладают классическими свойствами плюрипотентности, такими как, экспрессия белков-маркеров плюрипотентных 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

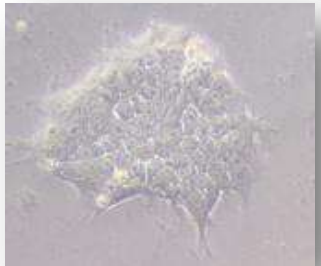
1. Из кератоцитов роговицы человека можно получить полноценные ИПСК.
2. Свойство «эпигенетической памяти» характерное для роговичных ИПСК может облегчить процесс дифференцировки в функциональные клетки роговицы.

Материалы и методы исследования

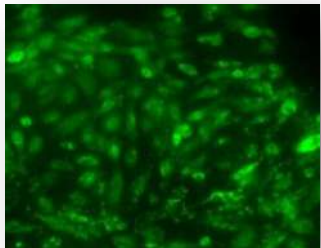
Экспериментальные этапы



1 этап: Получение первичной культуры соматических клеток



2 этап: Индуцирование плюрипотентных стволовых клеток



3 этап: Дифференциация эндотелиальных клеток роговицы

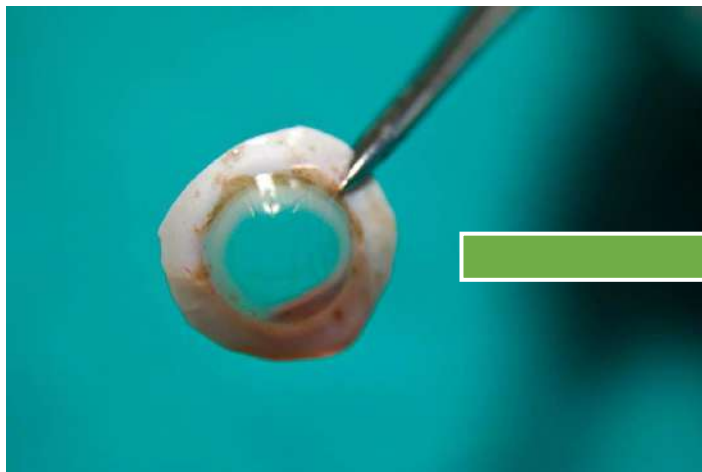
Идентификация полученных клеток

Экспериментальные методы

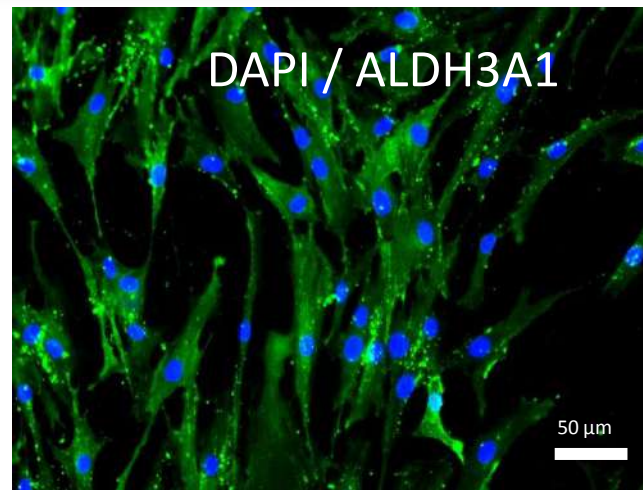
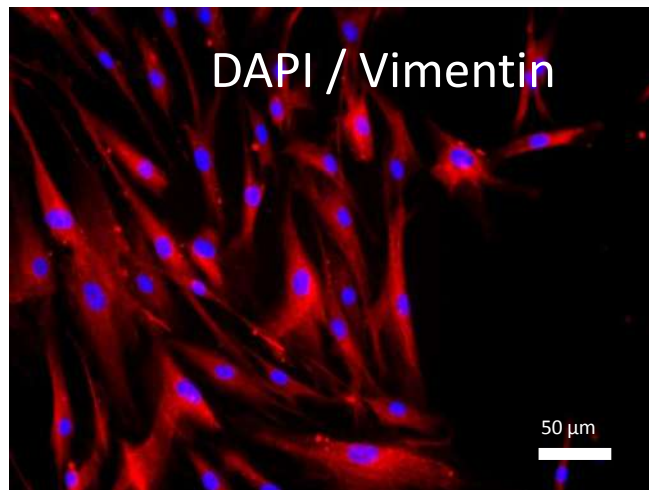
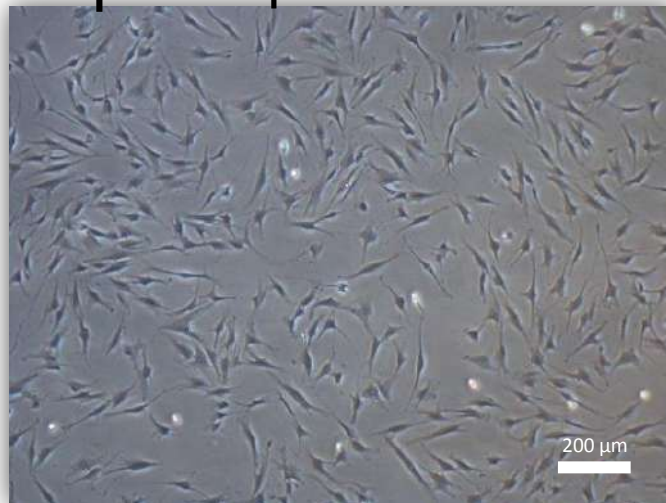
- Эписомальное репрограммирование
- Анализ ДНК (STR-метод)
- ПЦР-ОТ
- Блоттинг белков
- Иммуноцитохимия

Результаты

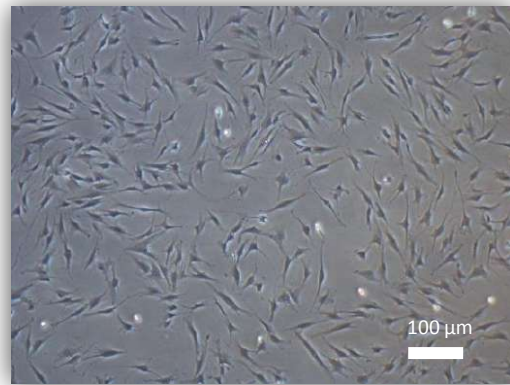
1 этап: Первичная культура соматических клеток



Кератоциты

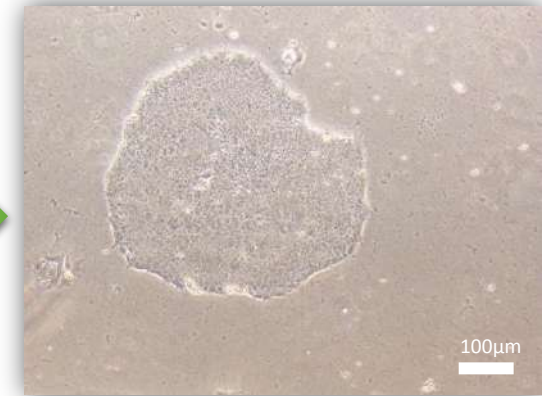


2 этап: Получение ИПС клеток



Кератоциты

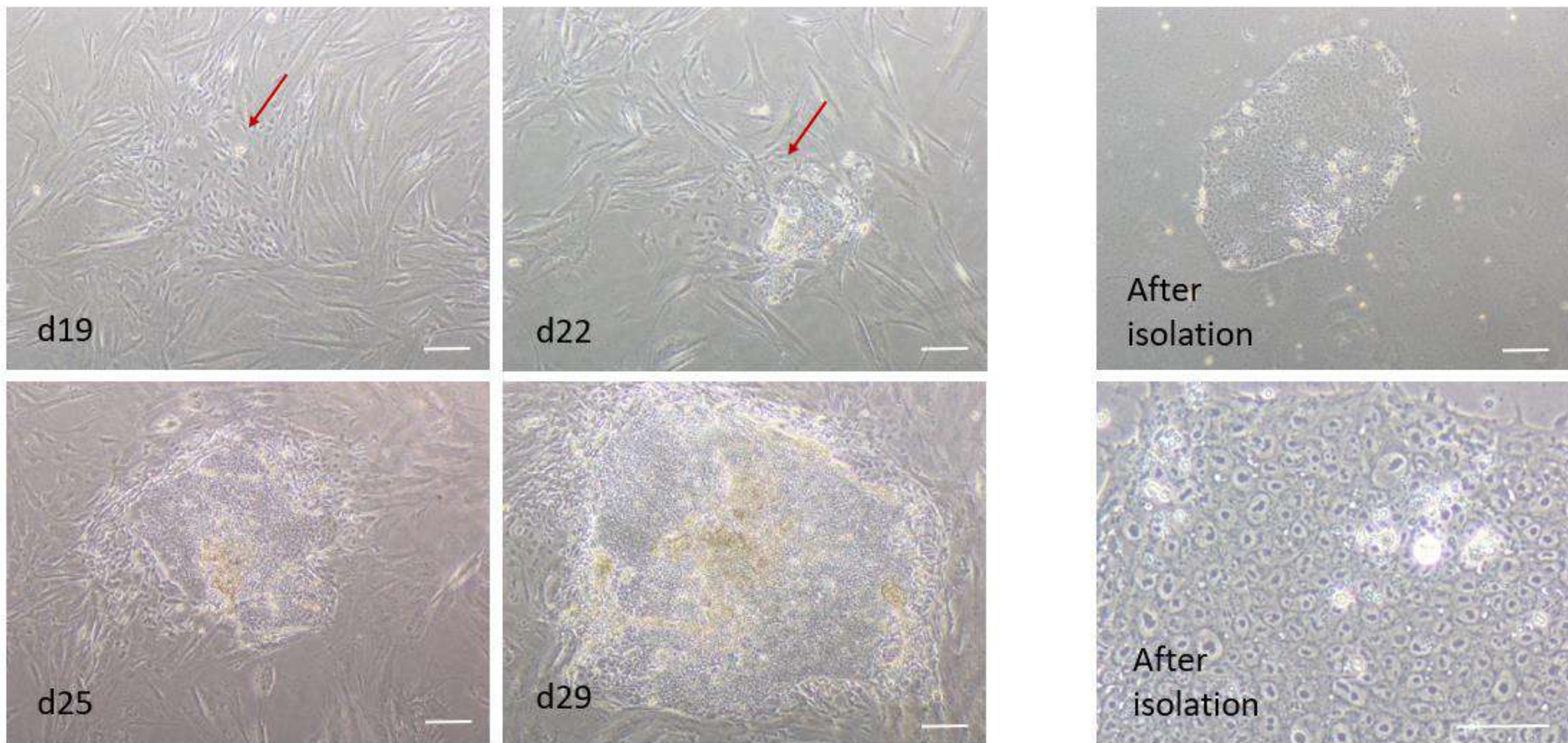
Epi5TM Episomal IPSC Reprogramming Kit
Lipofectamine 3000
(Invitrogen Life Technology)



**ИПСК из кератоцитов
(КИПСК)**

Содержание	Вектор	Ген
Epi5TM Reprogramming Vectors (Tube A)	pCE-hOCT3/4	Oct4
	pCE-hSK	Sox2, Klf4
	pCE-hUL	L-Мyc, Lin28
Epi5TM p53 & EBNA Vectors (Tube B)	pCE-mP53DD	mp53DD
	pCXB-EBNA1	EBNA1

2 этап: Процесс репрограммирования кератоцитов в ИПСК

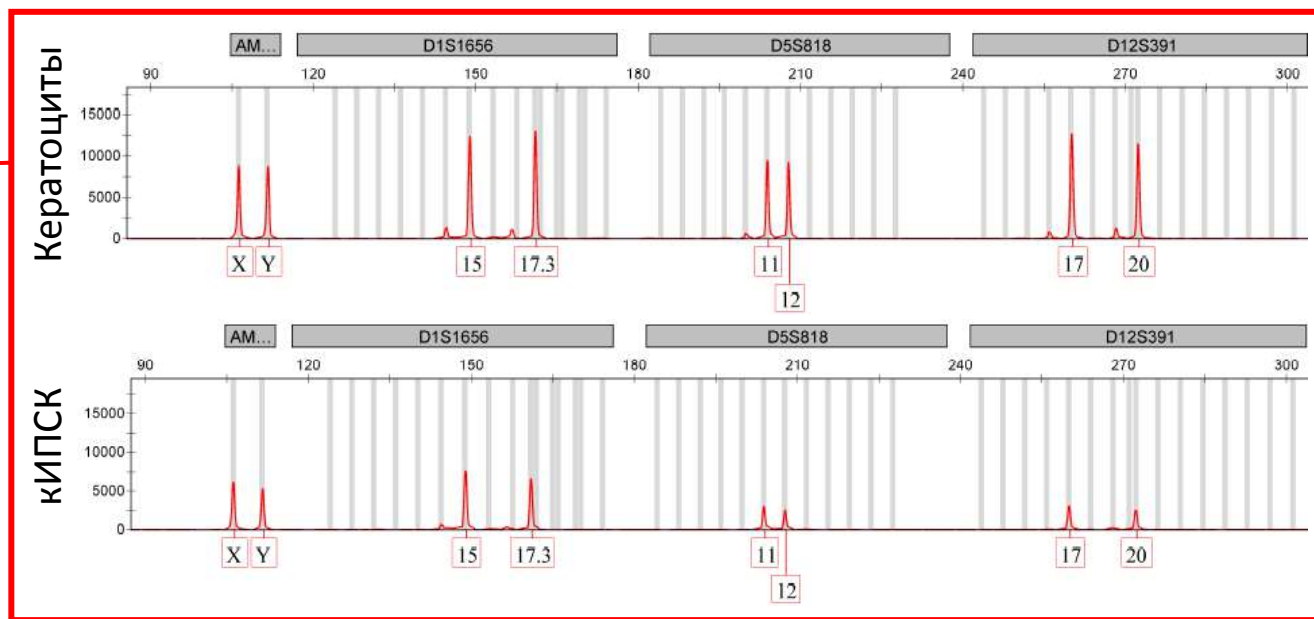


Фазово-контрастная микроскопия полученных кИПСК во время репрограммирования на 19, 22, 25, 29 дни (стрелки указывают на кИПСК). Первый пассаж после изолирования и изображение в увеличенном масштабе полученных ИПСК.

Масштаб = 100 мкм.

2 этап: Сравнение ДНК кератоцитов роговицы и кИПСК

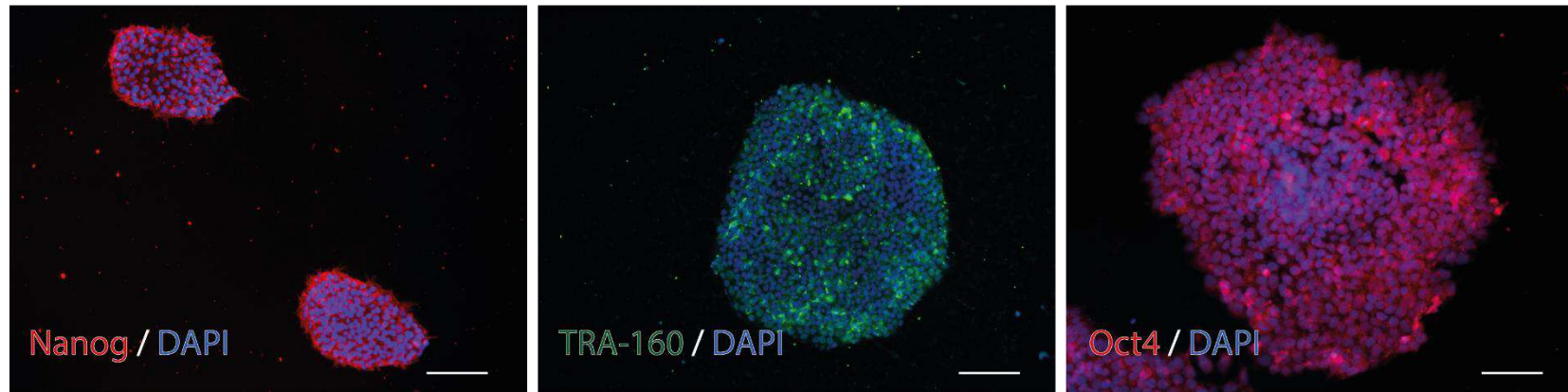
Маркер (зонд)	Аллель 1	Аллель 2
AMEL	X	Y
D1S1656	15	17.3
D5S818	11	12
D12S391	17	20
FGA	22	24
D13S317	8	8
D7S820	8	9
D16S539	11	13
VWA	17	17
TH01	7	9
TPOX	8	9
CSF1PO	9	12
D2S1338	23	24
D21S11	29	31
D18S51	15	20
D8S1179	11	13
D3S1358	14	17
D6S1043	19	19
PENTAE	11	11
D19S433	13	13.2
PENTAD	9	13



Short Tandem Repeat (STR) результаты

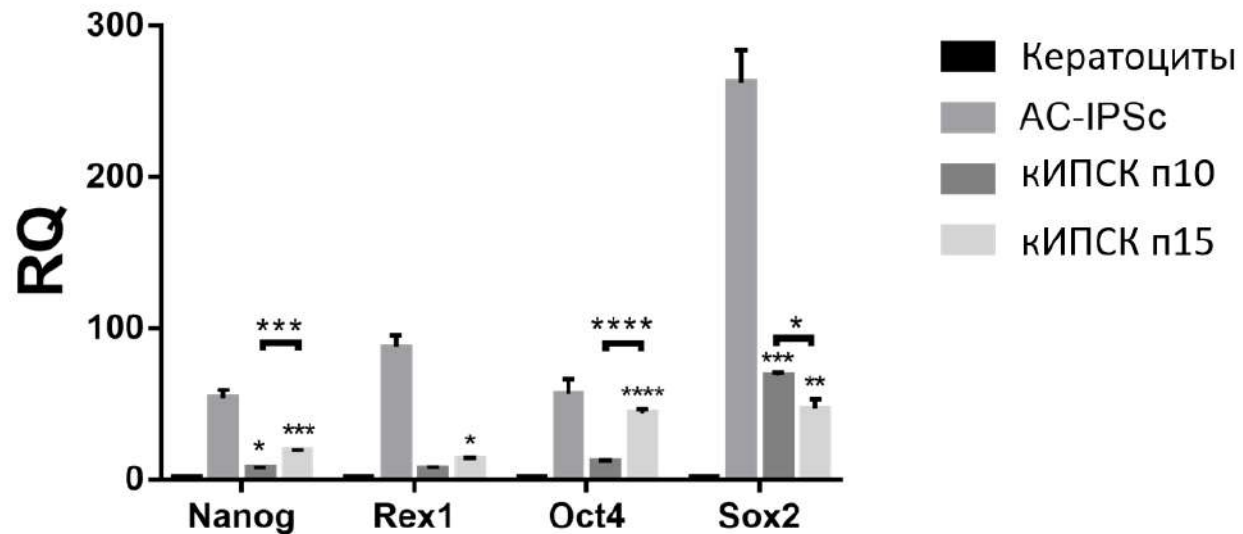
Совпадение в более чем 20 STR-локусах
ДНК между линиями кератоцитов и
кИПСК

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;

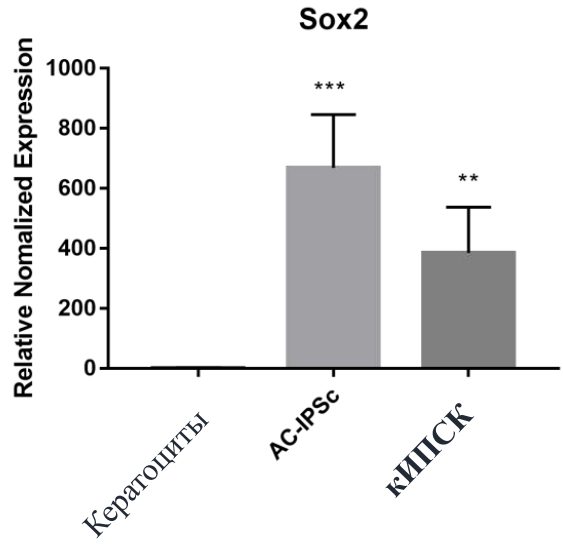
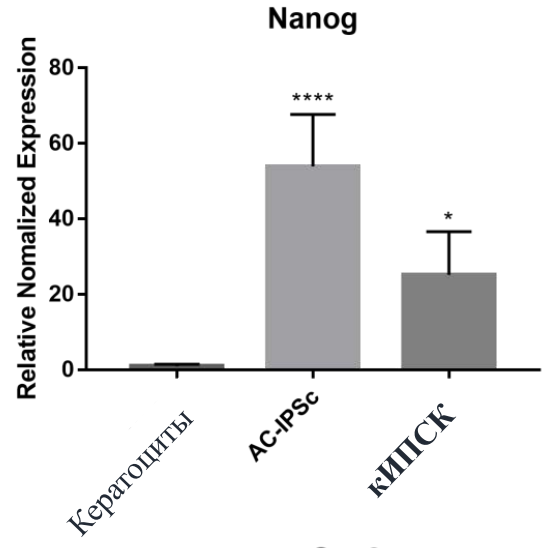
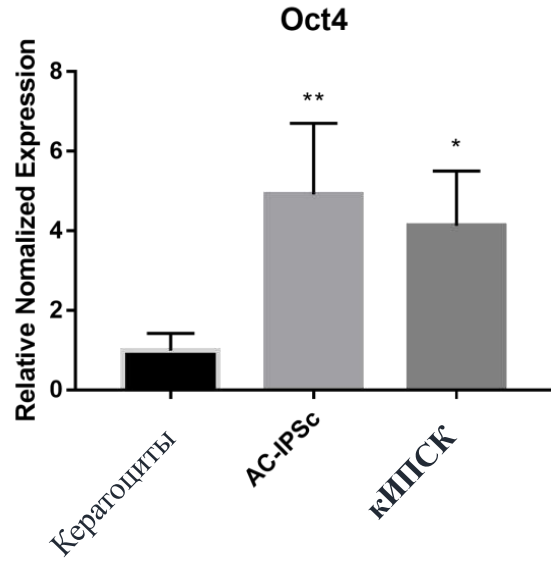
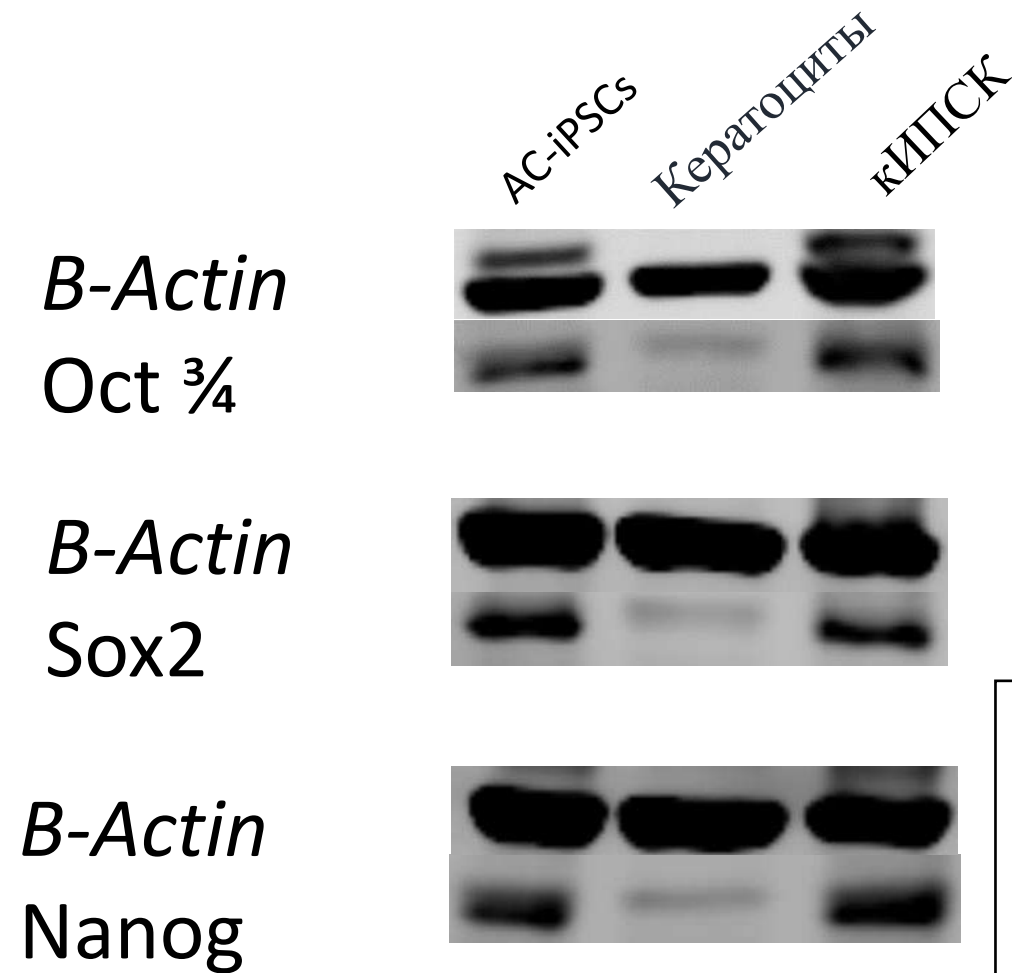
кИПСК – ИПСК из кератоцитов;

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)

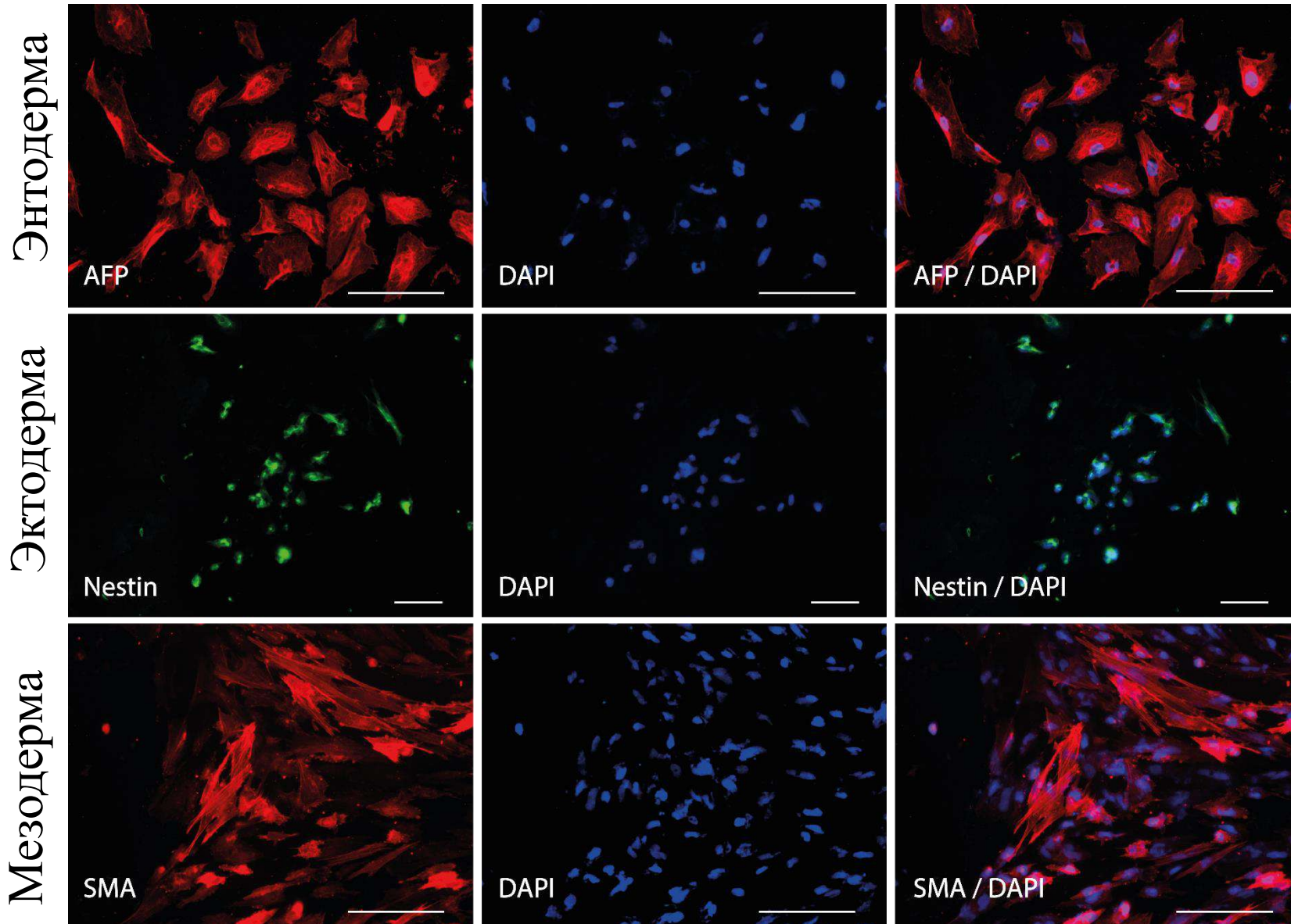
2 этап: Блоттинг белков КИПСК



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)

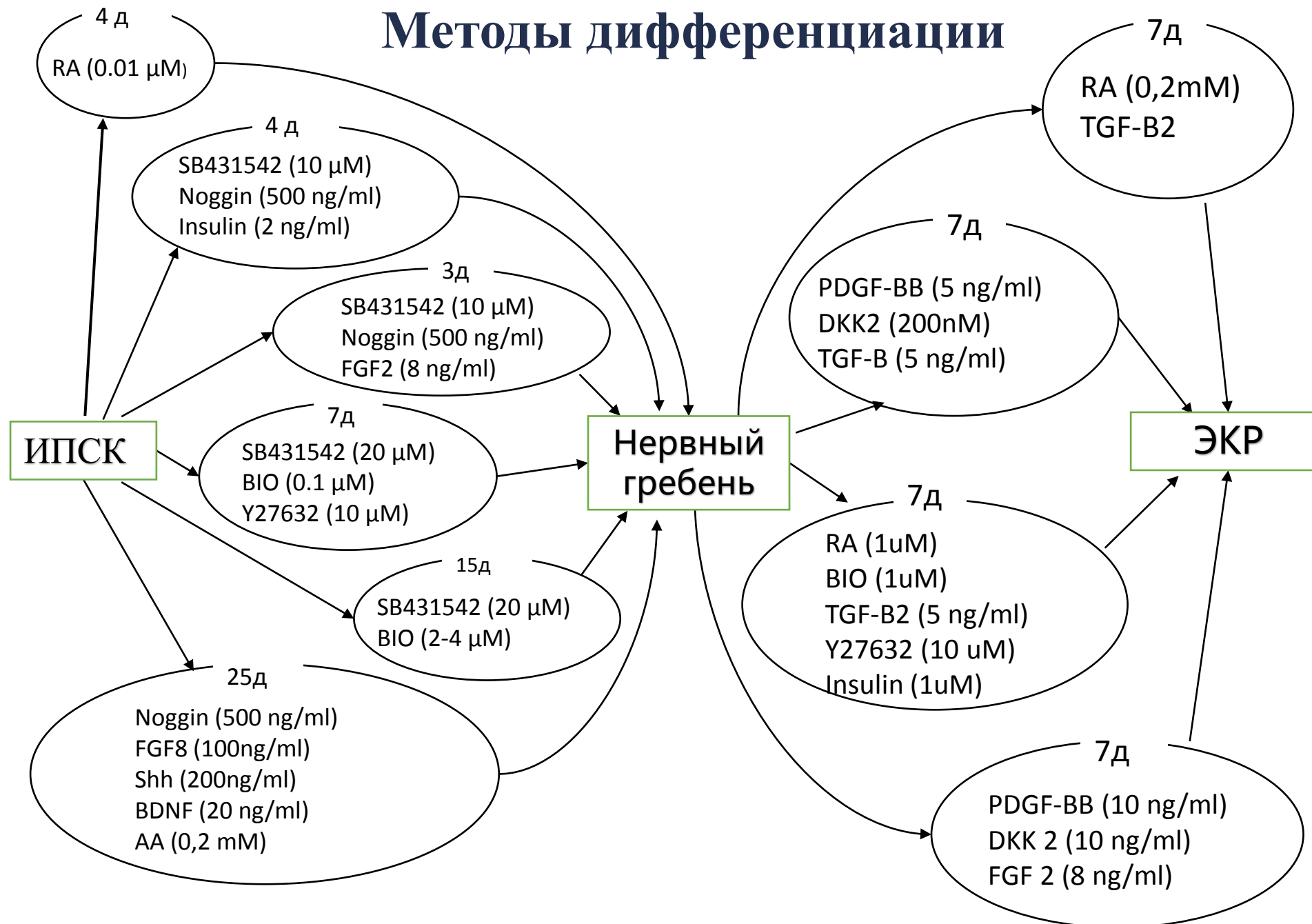
2 этап: Дифференциальный потенциал кИПСК *in vitro*



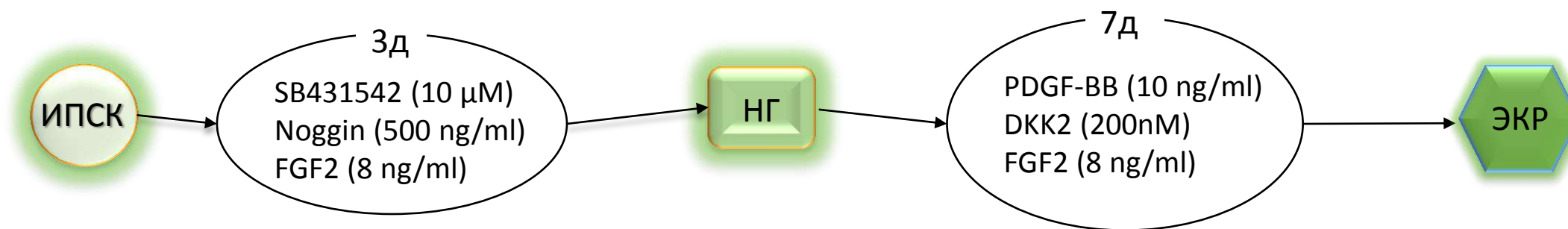
Окраска антителами клонов кИПСК маркерами трех зародышевых листков: энтодерма (AFP), мезодерма (SMA), и эктодерма (Nestin). Ядра клеток – краситель DAPI
Масштаб= 100 мкм.

Дифференциация в эндотелиоциты роговицы

Методы дифференциации



Методы дифференциации

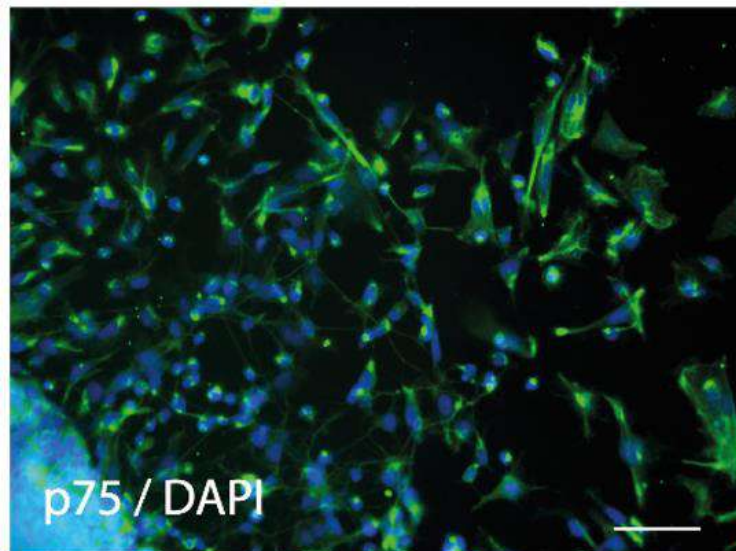


4 этап: Нервный гребень-подобные клетки

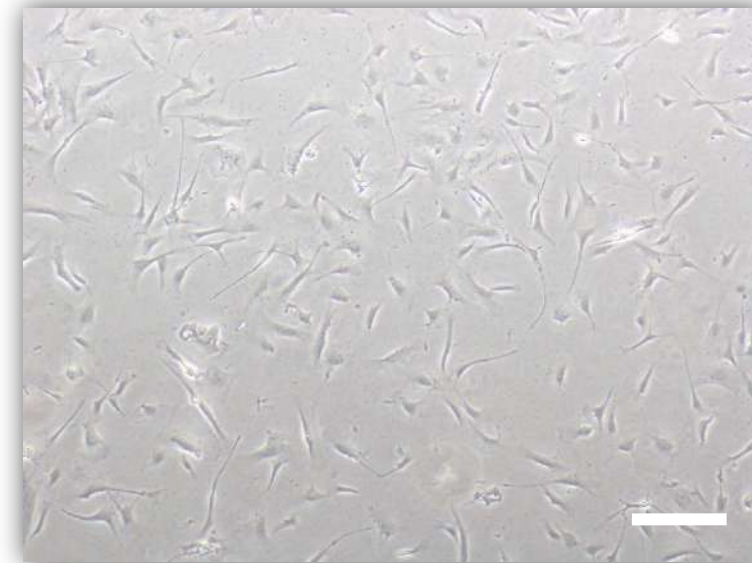
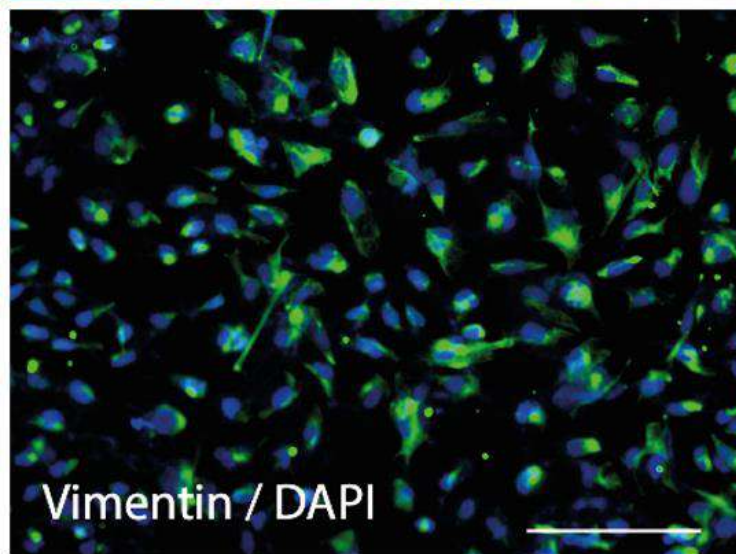
ИПСК >>

> 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.

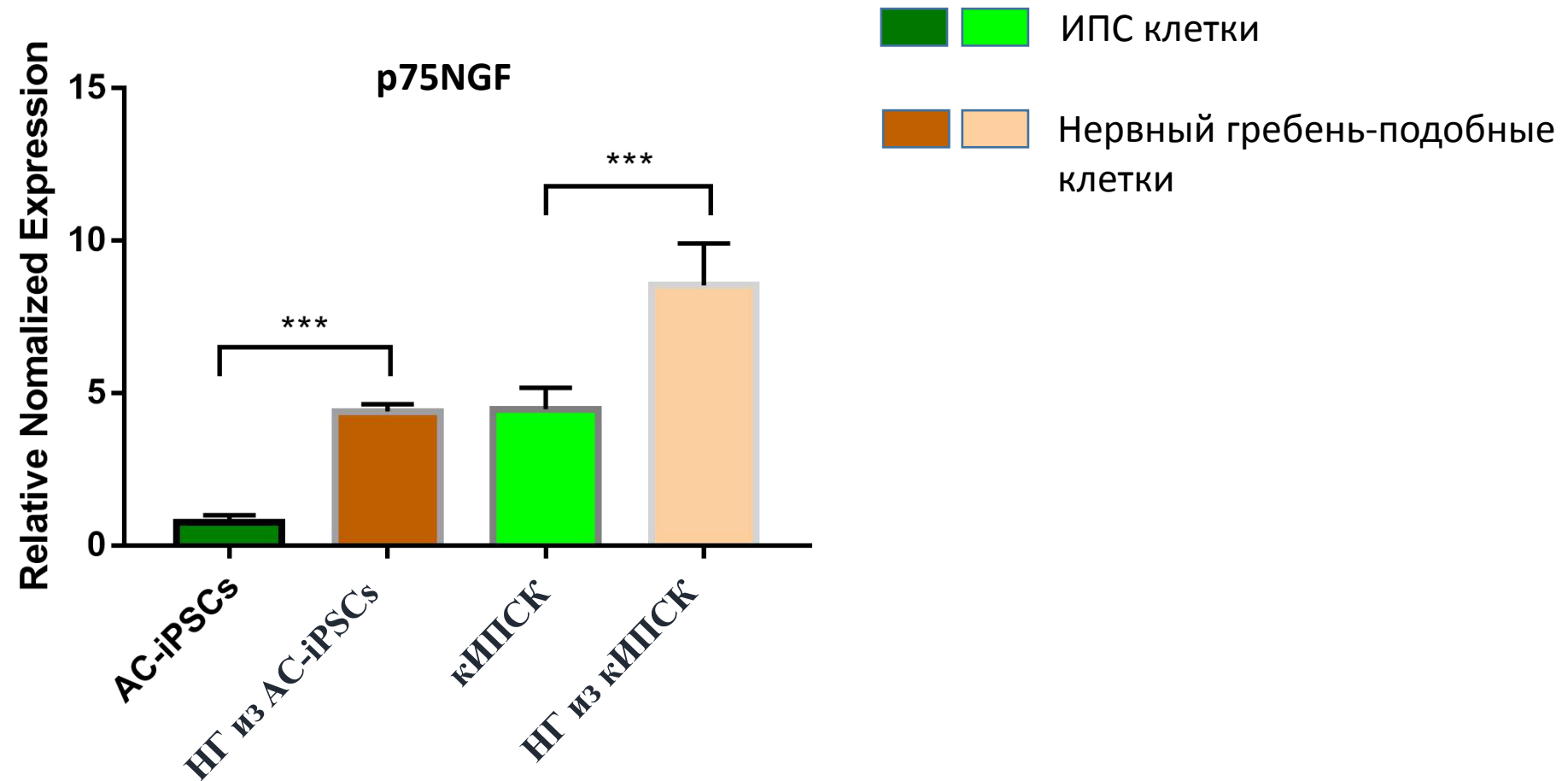
4 этап: Блоттинг белков.

Феномен «Эпигенетической памяти» в НГ-подобных клеток.

ИПСК >>

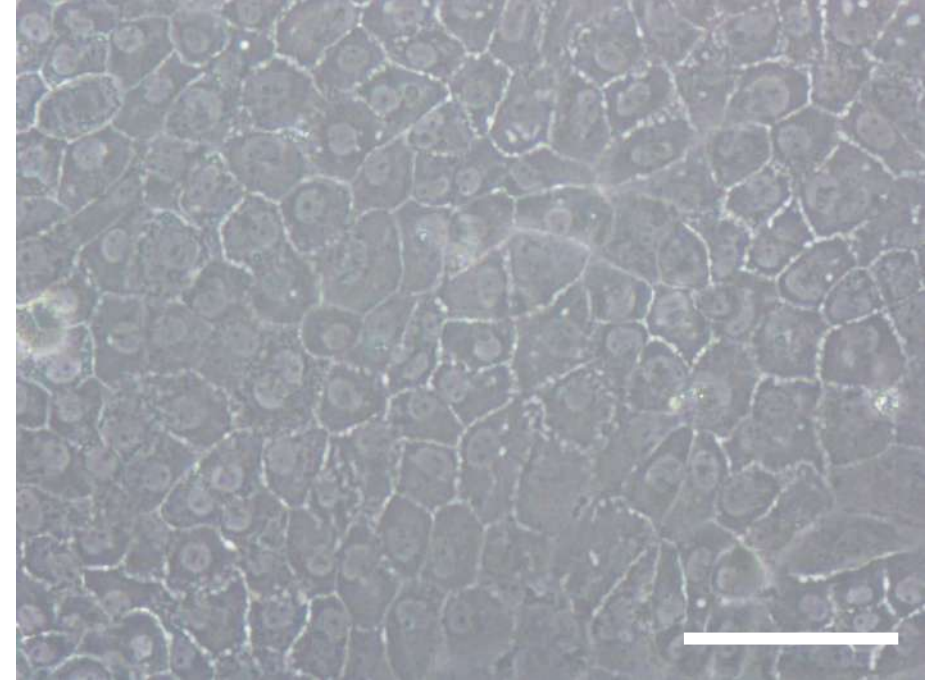
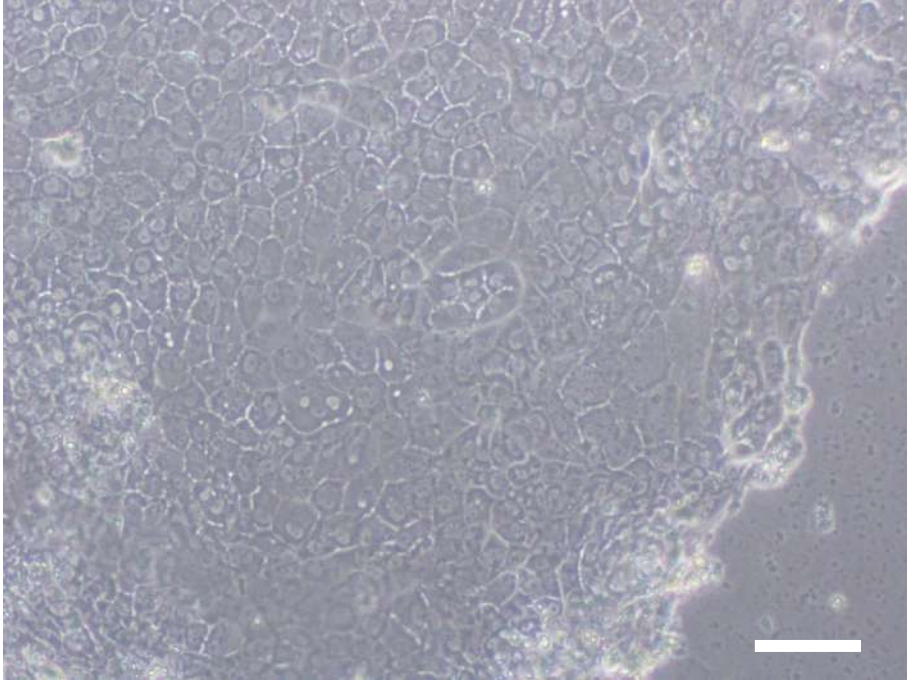
> НГ

>> ЭКР



***P<0.001

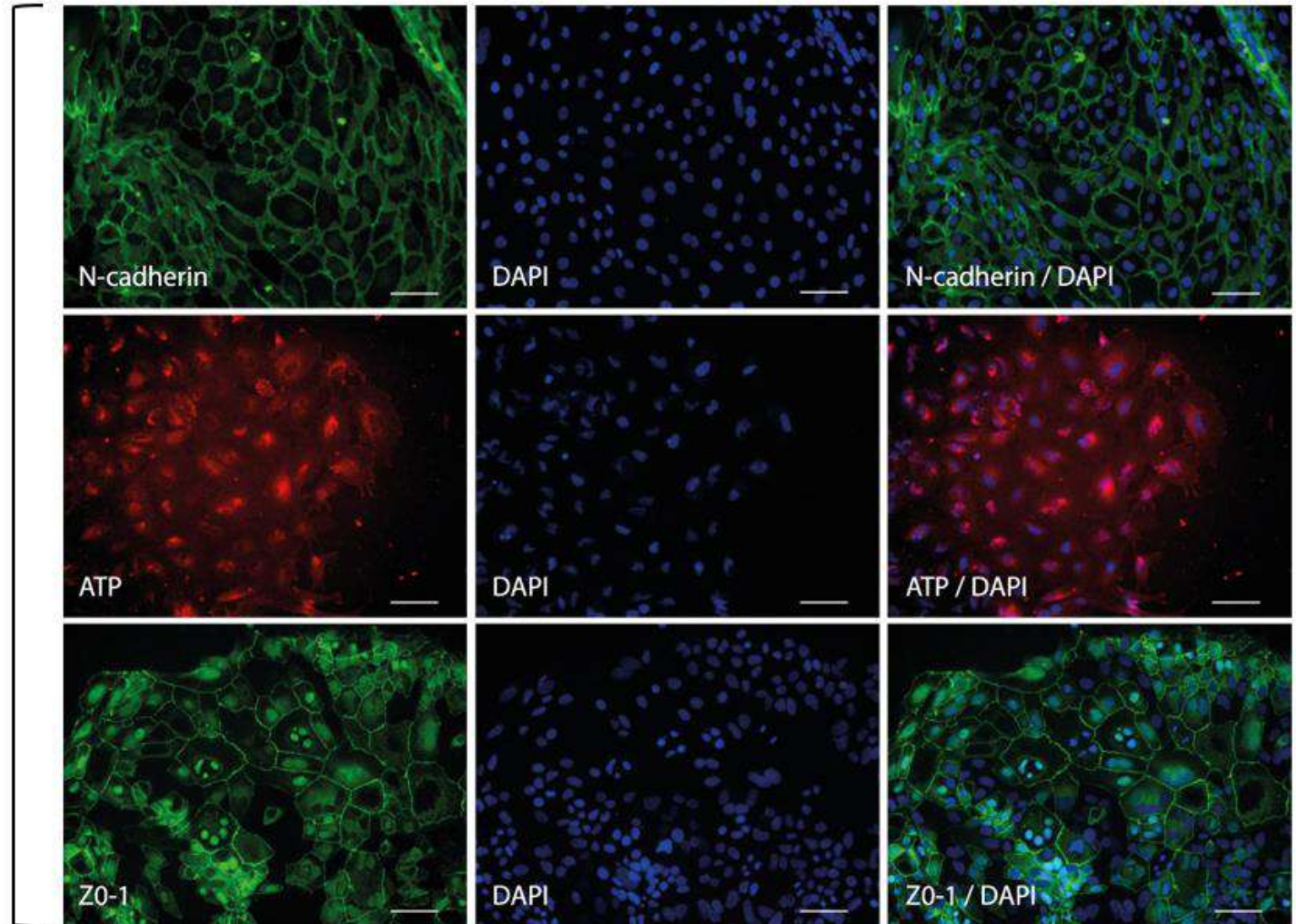
4 этап: Микроскопия эндотелия-подобных клеток



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