



**Фамилия Имя Отчество,  
номер группы**

- 1. В какие типы клеток могут дифференцироваться мезенхимальные стволовые клетки?*
- 2. В чем отличие между мультипотентностью и плюрипотентностью? Примеры клеток?*

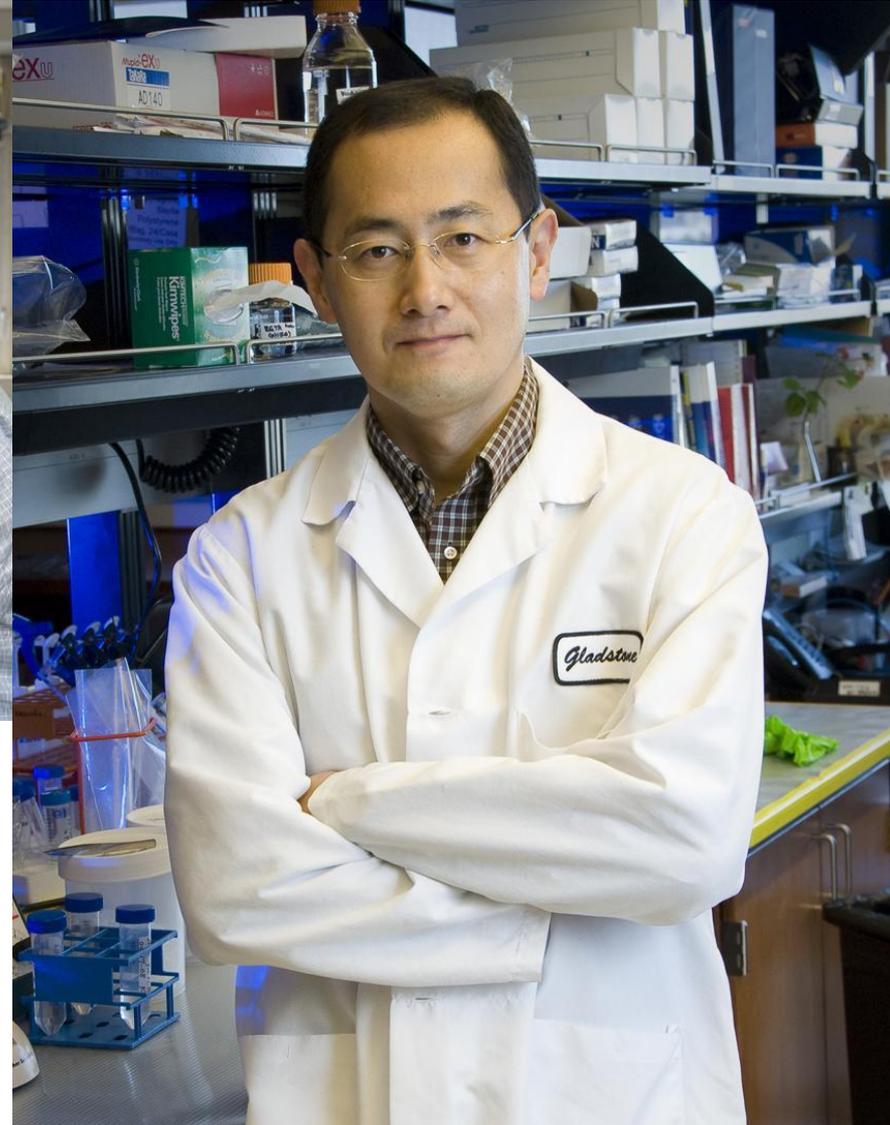
# Индуцированные плюрипотентные стволовые (ИПС) клетки

# индивидуальное развитие



← репрограммирование

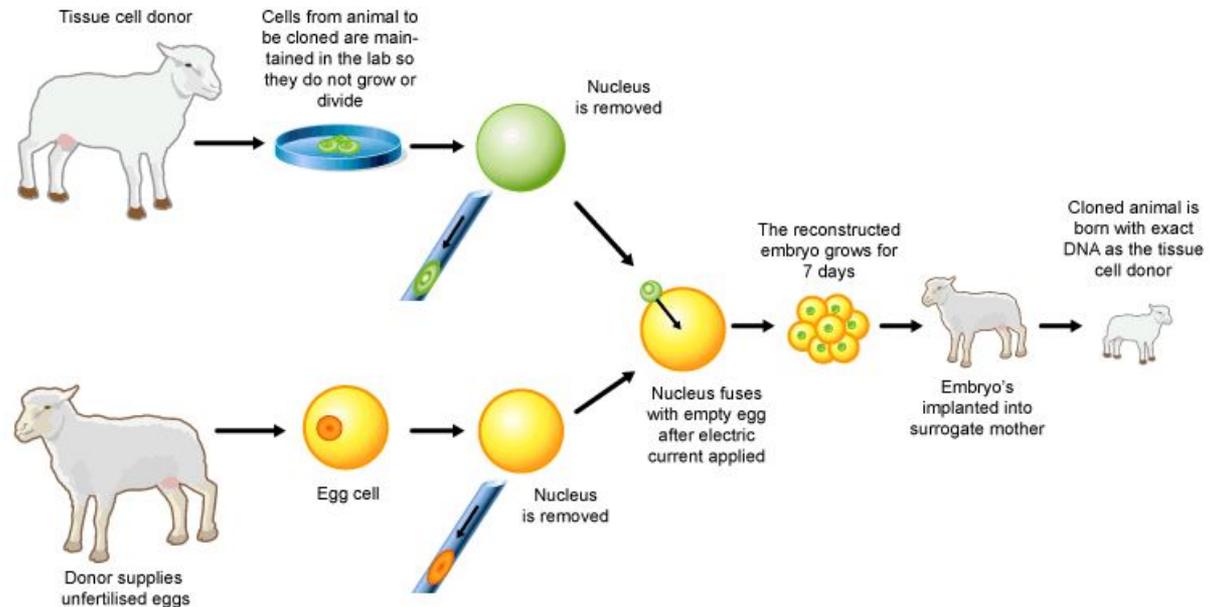
*for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent*



*за открытие возможности  
превращения клеток взрослого  
организма в эмбриональные*

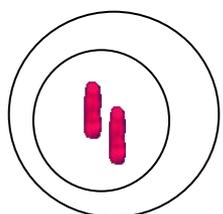
# ~~до нашей эры~~ до ИПС клеток

- Эмбриональные стволовые клетки – хороший источник плюрипотентных клеток, но этические, технические и проч. проблемы
- Клонированные ЭС (ntES) – еще лучше, но тоже много проблем



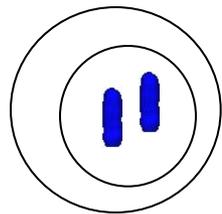


*Mus caroli*



Спленоциты

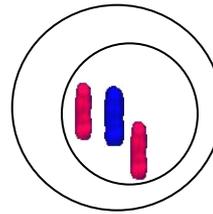
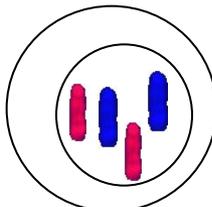
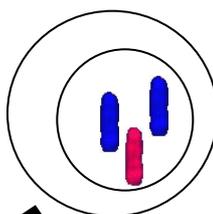
×



Эмбриональные  
стволовые клетки  
НМ-1



*Mus musculus*



Гибридные  
клоны серии НМС

Введение гибридных  
клеток под кожу BALB/c *nude*



C57BL



Бластоциста

Введение  
гибридных  
клеток в  
полость  
бластоцисты

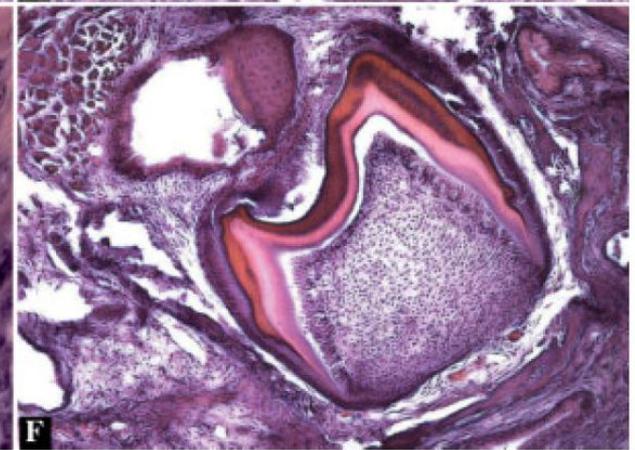
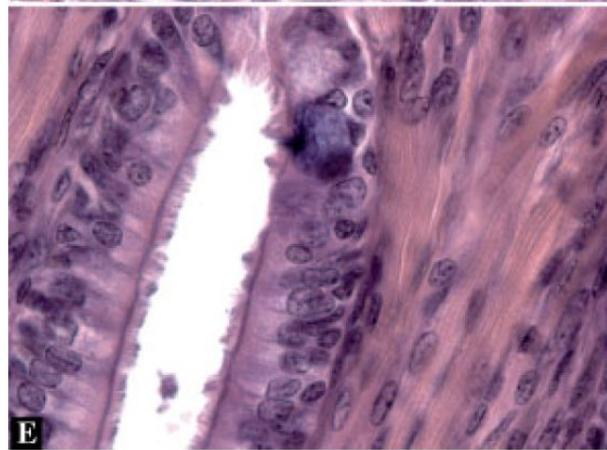
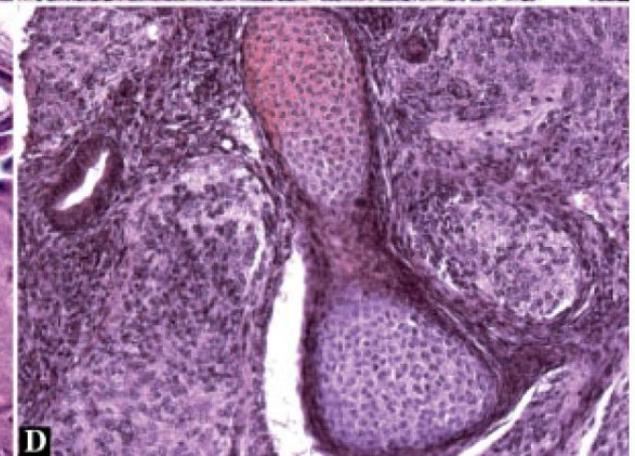
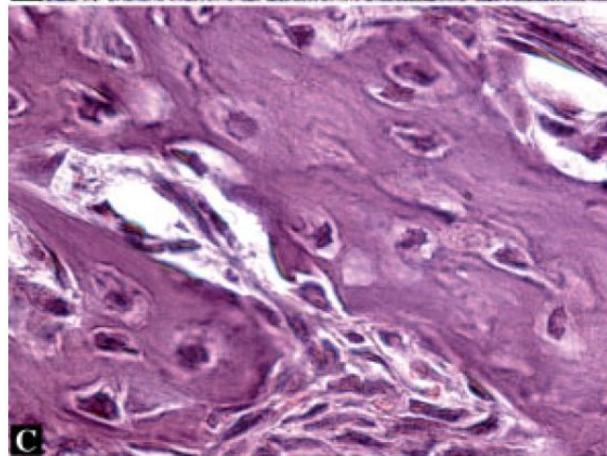
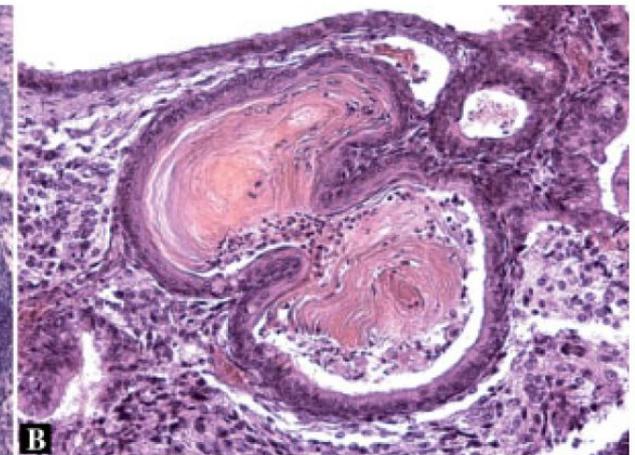
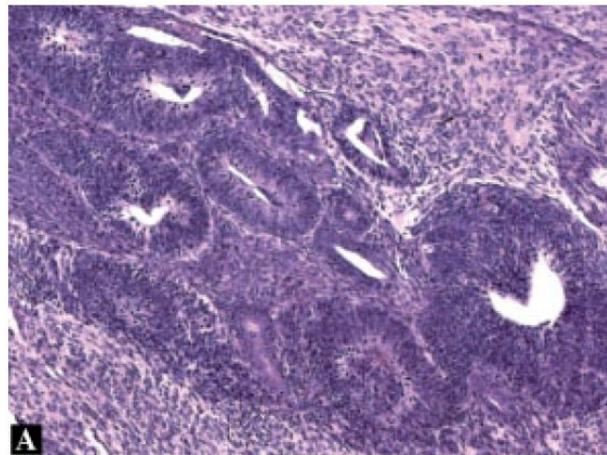
**ХИМЕРЫ**



**ТЕРАТОМЫ**



Тератомы  
полученные из  
гибридных  
клеток



# Чем соматические клетки взрослого организма отличаются от эмбриональных стволовых клеток?

## Соматические клетки

- Выполняют определенные функции в организме (эпителии – барьерная функция, мышечные клетки – движение, костные – опорная функция и т.д.)
- Имеют резко ограниченный спектр возможных дифференцировок

## Эмбриональные стволовые клетки

- Способны дифференцироваться в любую клетку взрослого организма
- Способны неограниченно долго расти в культуре
- Способны сохранять недифференцированное состояние

# Чем соматические клетки взрослого организма отличаются от эмбриональных стволовых клеток?

На самом деле, единственное ключевое отличие заключается в дифференциальной активности генов. То есть все свойства клеток задаются набором активных в данный момент генов.

Соматические клетки  
(фибробласты)

- Коллаген
- Thy1
- Fsp1
- и т.д.

Эмбриональные стволовые клетки

- Oct4
- Nanog
- Sox2
- Ras1
- и т.д.

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

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

## SUMMARY

Differentiated cells can be reprogrammed to an embryonic-like state by transfer of nuclear contents into oocytes or by fusion with embryonic stem (ES) cells. Little is known about factors that induce this reprogramming. Here, we demonstrate induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic or adult fibroblasts by introducing four factors, Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4, under ES cell culture conditions. Unexpectedly, Nanog was dispensable. These cells, which we designated iPS (induced pluripotent stem) cells, exhibit the morphology and growth properties of ES cells and express ES cell marker genes. Subcutaneous transplantation of iPS cells into nude mice resulted in tumors containing a variety of tissues from all three germ layers. Following injection into blastocysts, iPS cells contributed to mouse embryonic development. These data demonstrate that pluripotent stem cells can be directly generated from fibroblast cultures by the addition of only a few defined factors.

## INTRODUCTION

Embryonic stem (ES) cells, which are derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, have the ability to grow indefinitely while maintaining pluripotency and the ability to differentiate into cells of all three germ layers (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Human ES cells might be used to treat a host of diseases, such as Parkinson's disease, spinal cord injury, and diabetes (Thomson et al., 1998). However, there are ethical difficulties regarding the use of human embryos, as well as the problem of tissue rejection following transplantation in patients. One way to circumvent these issues is the generation of pluripotent cells directly from the patients' own cells.

Somatic cells can be reprogrammed by transferring their nuclear contents into oocytes (Wilmut et al., 1997)

or by fusion with ES cells (Cowan et al., 2005; Tada et al., 2001), indicating that unfertilized eggs and ES cells contain factors that can confer totipotency or pluripotency to somatic cells. We hypothesized that the factors that play important roles in the maintenance of ES cell identity also play pivotal roles in the induction of pluripotency in somatic cells.

Several transcription factors, including Oct3/4 (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000), Sox2 (Avilion et al., 2003), and Nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003), function in the maintenance of pluripotency in both early embryos and ES cells. Several genes that are frequently upregulated in tumors, such as *Stat3* (Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998), *E-Ras* (Takahashi et al., 2003), *c-myc* (Cartwright et al., 2005), *Klf4* (Li et al., 2005), and  $\beta$ -*catenin* (Kielman et al., 2002; Sato et al., 2004), have been shown to contribute to the long-term maintenance of the ES cell phenotype and the rapid proliferation of ES cells in culture. In addition, we have identified several other genes that are specifically expressed in ES cells (Maruyama et al., 2005; Mitsui et al., 2003).

In this study, we examined whether these factors could induce pluripotency in somatic cells. By combining four selected factors, we were able to generate pluripotent cells, which we call induced pluripotent stem (iPS) cells, directly from mouse embryonic or adult fibroblast cultures.

## RESULTS

We selected 24 genes as candidates for factors that induce pluripotency in somatic cells, based on our hypothesis that such factors also play pivotal roles in the maintenance of ES cell identity (see Table S1 in the Supplemental Data available with this article online). For  $\beta$ -catenin, c-Myc, and Stat3, we used active forms, S33Y- $\beta$ -catenin (Sadot et al., 2002), T58A-c-Myc (Chang et al., 2000), and Stat3-C (Bromberg et al., 1999), respectively. Because of the reported negative effect of Grb2 on pluripotency (Burdon et al., 1999; Cheng et al., 1998), we included its dominant-negative mutant Grb2 $\Delta$ SH2 (Miyamoto et al., 2004) as 1 of the 24 candidates.

Первая страница статьи Шиньи Яманакки в которой была показана принципиальная возможность индукции плюрипотентности в соматических клетках при помощи экзогенной экспрессии транскрипционных факторов.

Эта работа была отмечена Нобелевской премией в 2012 году.

# Если цель получить стволовые клетки из соматических, какие факторы нужно добавить?

- Транскрипционные факторы специфичные для эмбриональных стволовых клеток
- Гены, экспрессия которых повышается при формировании опухолей (так как предполагалось, что в процесс опухолевого перерождения может иметь общие черты с процессом репрограммирования)
- Гены для которых была показана роль в поддержании плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток

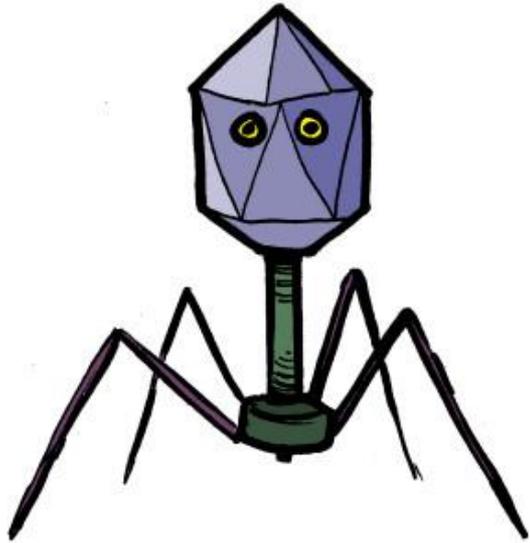
Гены-кандидаты в исследовании Яманаки:

Ecat1, Dppa5, Fbxo15, Nanog, ERas, Dnmt3l, Ecat8, Gdf3, Sox15, Dppa4, Dppa2, Fthl17, Sall4, Oct4, Sox2, Rex1, Utf1, Tcl1, Dppa3, Klf4,  $\beta$ -catenin, c-Myc, Stat3, Grb2

Важная деталь! Для введения трансгенов в работе Яманаки использовали ретровирусные векторы. Ретровирусные векторы обеспечивают стабильную экспрессию трансгена в клетках на протяжении длительного времени, необходимого для репрограммирования.

- ретровирусные векторы созданы на основе Moloney murine leukemia virus (Mo-MLV). Этот вирус заражает и мышинные и человеческие клетки.
- для создания вектора вирусные гены, gag, pol and env, заменяют генно-инженерной конструкцией, которую экспрессируют в специальной клеточной линии - упаковщике.
- в вирионы упаковывается только интересующая конструкция, т.к. она содержит сигнал упаковки.
- для того чтобы предотвратить появление потенциально опасного искусственного вируса из вектора удаляют все возможные участки гомологии с природными ретровирусами.

# Virus vs. retrovirus



**Virus**



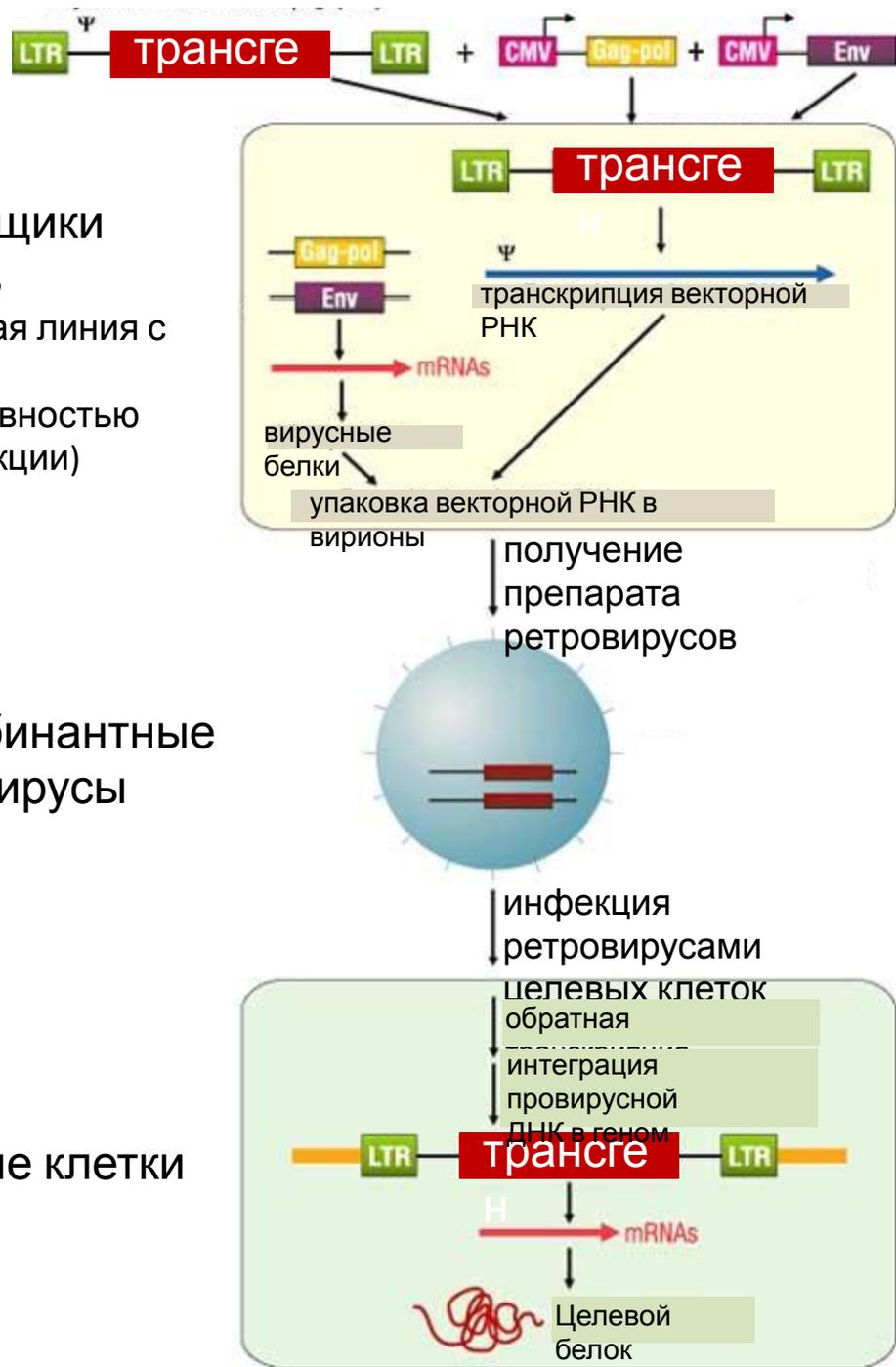
**RETROVIRUS**

# Схема получения рекомбинантных ретровирусов для введения трансгенов в культуры клеток

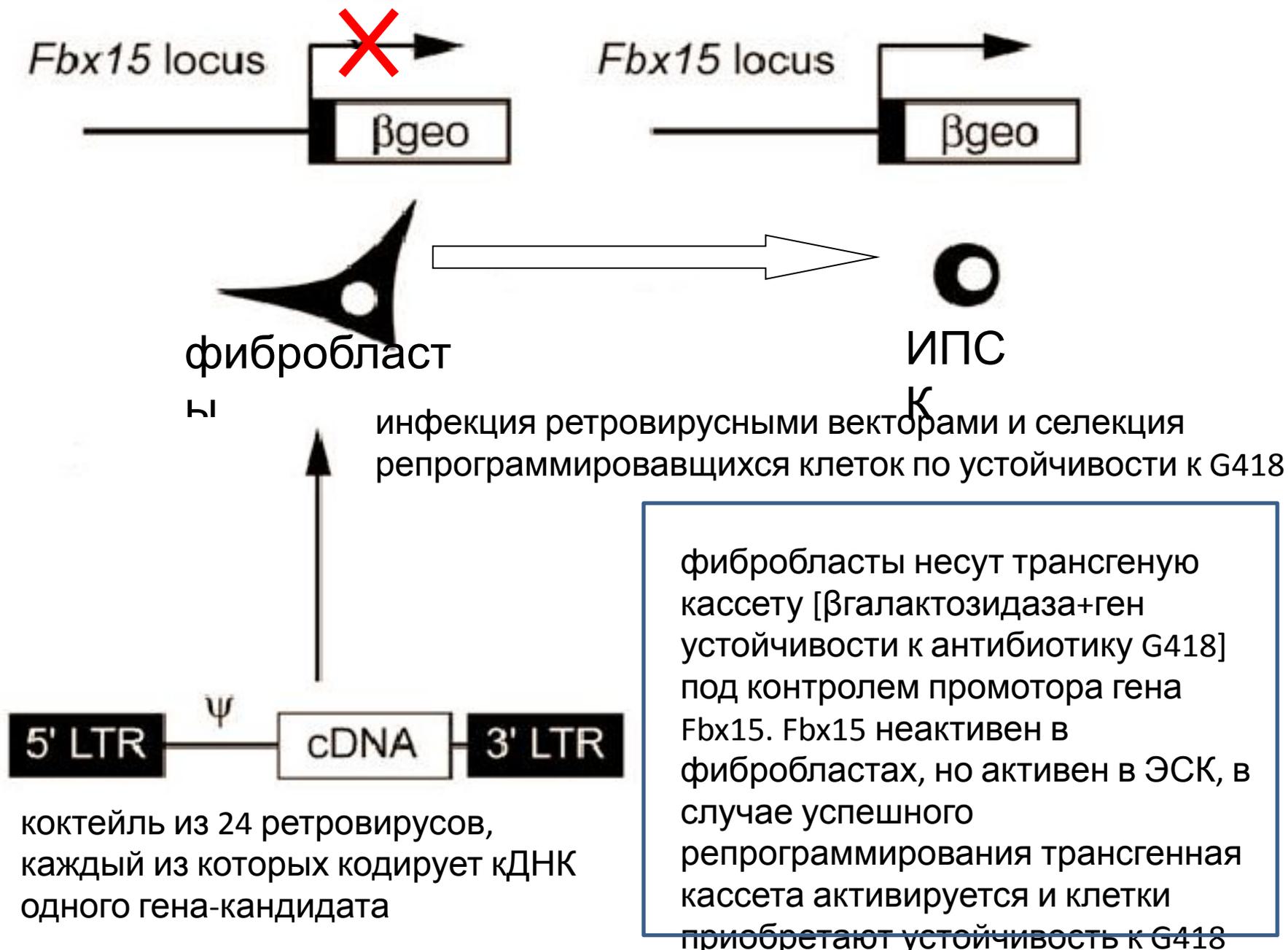
клетки упаковщики НЕК 293 (клеточная линия с высокой эффективностью трансфекции)

рекомбинантные ретровирусы

целевые клетки

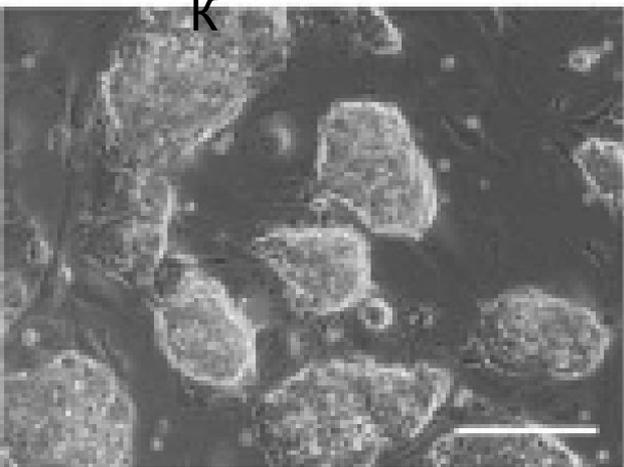


# Стратегия отбора генов - кандидатов

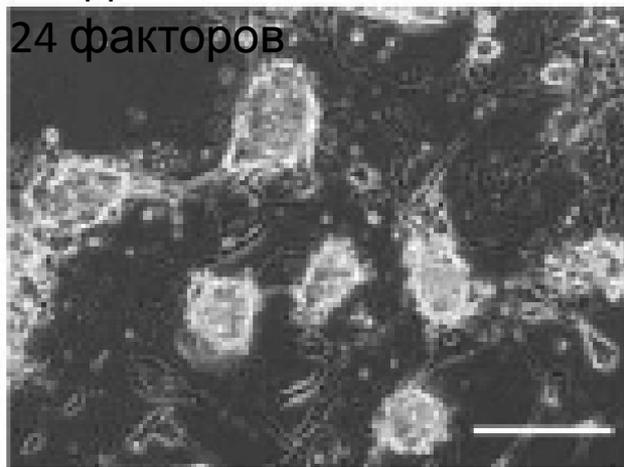


Обработка фибробластов коктейлем из 24 ретровирусов приводит к появлению колоний клеток с морфологией подобной морфологии ЭСК. Эти колонии также устойчивы к G418.

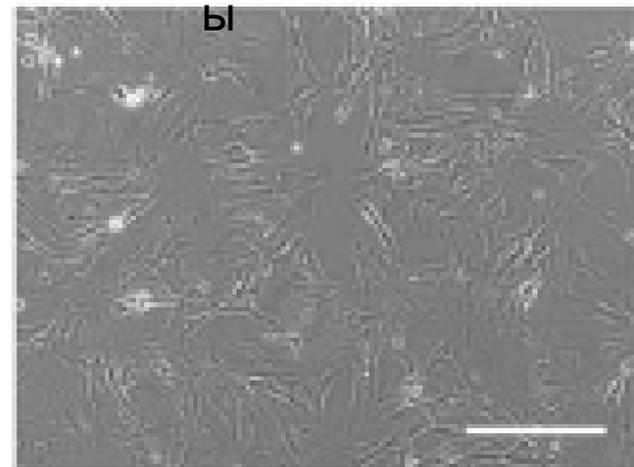
ЭС  
К



ИПСК, полученные  
введением  
24 факторов



фибробласт  
ы



# 24 гена-кандидата, все ли они важны?

Для того, чтобы из 24 факторов выявить необходимые для репрограммирования, заражали фибробласты 24 комбинациями типа [24-1].

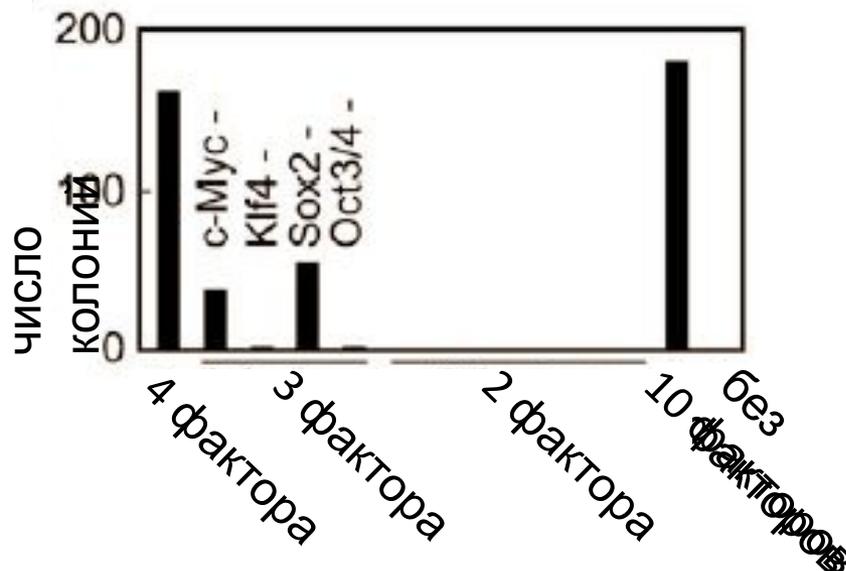


# 24 гена-кандидата, все ли они важны?

- Без Oct4 или Klf4: колоний нет
- Без Sox2: колонии формируются, но фенотип отличается
- Без c-Myc: очень низкая эффективность

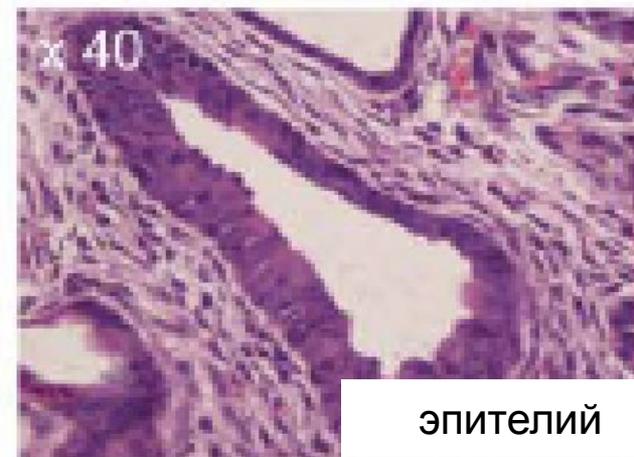
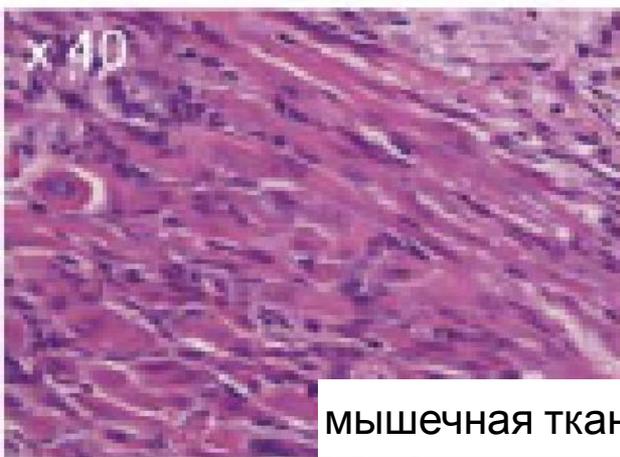
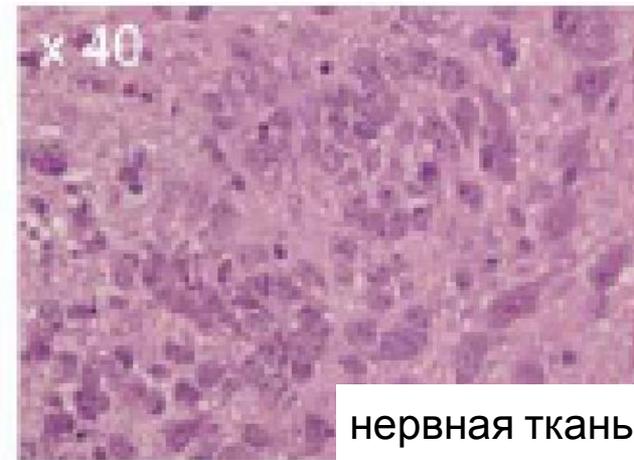
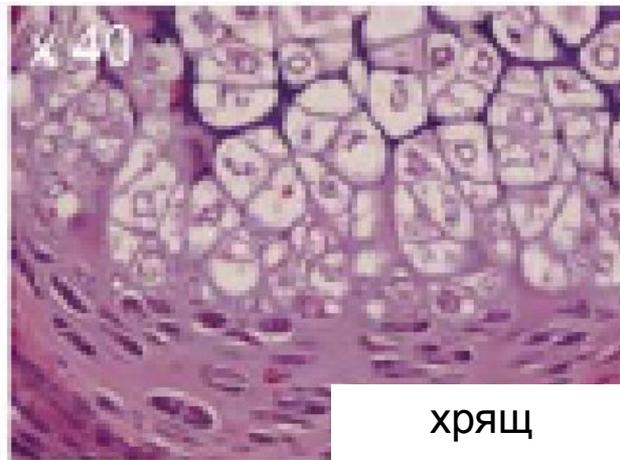
Таким образом были обнаружены 4 транскрипционных фактора экспрессия которых необходима и достаточна для индукции плюрипотентности в фибробластах

мышь.



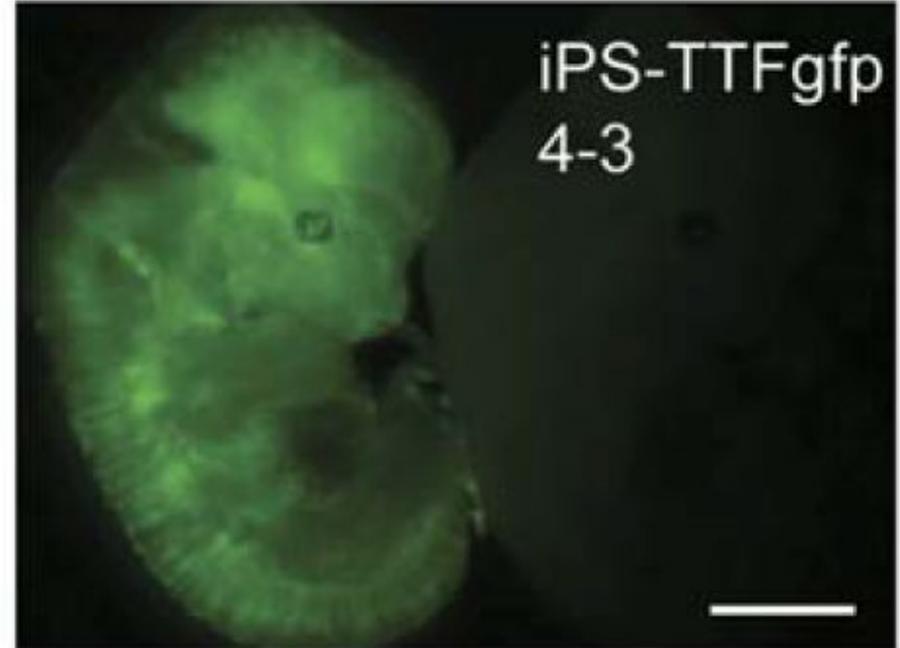
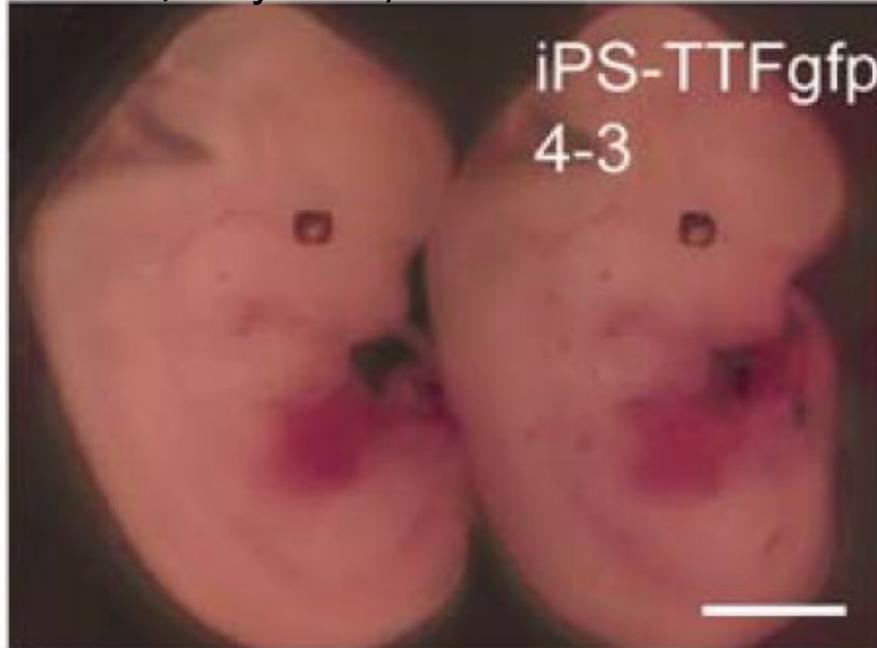
# Плюрипотентность ИПСК

ИПСК полученные в работе Яманаки (так называемые ИПСК первого поколения) успешно прошли часть тестов на плюрипотентность. Например, тератомный тест.



# Плюрипотентность ИПСК

При введении ИПСК первого поколения в реципиентную бластоцисту формировались химерные эмбрионы. Однако вклад введенных ИПСК не прослеживался позже 13,5 дня развития и не удалось получить ни одного взрослого химерного животного. Вывод: ИПСК первого поколения имели ограниченный потенциал развития (то есть их потенциал не был равен потенциалу ЭСК).



На фотографии эмбрионы 13,5 дня развития зеленые клетки – потомки ИПСК введенных в эмбрион на стадии бластоцисты

## ARTICLES

# *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state

Marius Wernig<sup>1\*</sup>, Alexander Meissner<sup>1\*</sup>, Ruth Foreman<sup>1,2\*</sup>, Tobias Brambrink<sup>1\*</sup>, Manching Ku<sup>3\*</sup>, Konrad Hochedlinger<sup>1†</sup>, Bradley E. Bernstein<sup>3,4,5</sup> & Rudolf Jaenisch<sup>1,2</sup>

Nuclear transplantation can reprogramme a somatic genome back into an embryonic epigenetic state, and the reprogrammed nucleus can create a cloned animal or produce pluripotent embryonic stem cells. One potential use of the nuclear cloning approach is the derivation of 'customized' embryonic stem (ES) cells for patient-specific cell treatment, but technical and ethical considerations impede the therapeutic application of this technology. Reprogramming of fibroblasts to a pluripotent state can be induced *in vitro* through ectopic expression of the four transcription factors Oct4 (also called Oct3/4 or Pou5f1), Sox2, c-Myc and Klf4. Here we show that DNA methylation, gene expression and chromatin state of such induced reprogrammed stem cells are similar to those of ES cells. Notably, the cells—derived from mouse fibroblasts—can form viable chimaeras, can contribute to the germ line and can generate live late-term embryos when injected into tetraploid blastocysts. Our results show that the biological potency and epigenetic state of *in-vitro*-reprogrammed induced pluripotent stem cells are indistinguishable from those of ES cells.

Epigenetic reprogramming of somatic cells into ES cells has attracted much attention because of the potential for customized transplantation therapy, as cellular derivatives of reprogrammed cells will not be rejected by the donor<sup>1,2</sup>. Thus far, somatic cell nuclear transfer and fusion of fibroblasts with ES cells have been shown to promote the epigenetic reprogramming of the donor genome to an embryonic state<sup>3–5</sup>. However, the therapeutic application of either approach has been hindered by technical complications as well as ethical objections<sup>6</sup>. Recently, a major breakthrough was reported whereby expression of the transcription factors Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4 was shown to induce fibroblasts to become pluripotent stem cells (designated as induced pluripotent stem (iPS) cells), although with a low efficiency<sup>7</sup>. The iPS cells were isolated by selection for activation of *Fbx15* (also called *Fbxo15*), which is a downstream gene of *Oct4*. This important study left a number of questions unresolved: (1) although iPS cells were pluripotent they were not identical to ES cells (for example, iPS cells injected into blastocysts generated abnormal chimaeric embryos that did not survive to term); (2) gene expression profiling revealed major differences between iPS cells and ES cells; (3) because the four transcription factors were transduced by constitutively expressed retroviral vectors it was unclear why the cells could be induced to differentiate and whether continuous vector expression was required for the maintenance of the pluripotent state; and (4) the epigenetic state of the endogenous pluripotency genes *Oct4* and *Nanog* was incompletely reprogrammed, raising questions about the stability of the pluripotent state.

Here we used activation of the endogenous *Oct4* or *Nanog* genes as a more stringent selection strategy for the isolation of reprogrammed cells. We infected fibroblasts with retroviral vectors transducing the four factors, and selected for the activation of the endogenous *Oct4* or *Nanog* genes. Positive colonies resembled ES cells and assumed an epigenetic state characteristic of ES cells. When injected into blastocysts the reprogrammed cells generated viable chimaeras and

contributed to the germ line. Our results establish that somatic cells can be reprogrammed to a pluripotent state that is similar, if not identical, to that of normal ES cells.

## Selection of fibroblasts for *Oct4* or *Nanog* activation

Using homologous recombination in ES cells we generated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and tail-tip fibroblasts (TTFs) that carried a neomycin-resistance marker inserted into either the endogenous *Oct4* (*Oct4-neo*) or *Nanog* locus (*Nanog-neo*) (Fig. 1a). These cultures were sensitive to G418, indicating that the *Oct4* and *Nanog* loci were, as expected, silenced in somatic cells. These MEFs or TTFs were infected with Oct4-, Sox2-, c-Myc- and Klf4-expressing retroviral vectors and G418 was added to the cultures 3, 6 or 9 days later. The number of drug-resistant colonies increased substantially when analysed at day 20 (Fig. 1i). Most colonies had a flat morphology (Fig. 1h, right) and between 11% and 25% of the colonies were 'ES-like' (Fig. 1h, left) when selection was applied early (Fig. 1k), a percentage that increased at later time points. At day 20, ES-like colonies were picked, dissociated and propagated in G418-containing media. They gave rise to ES-like cell lines (designated as Oct4 iPS or Nanog iPS cells, respectively) that could be propagated without drug selection, displayed homogenous Nanog, SSEA1 and alkaline phosphatase expression (Fig. 1b–g and Supplementary Figs 1 and 5), and formed undifferentiated colonies when seeded at clonal density on gelatin-coated dishes (see inset in Fig. 1b). Four out of five analysed lines had a normal karyotype (Supplementary Table 1).

Although the timing and appearance of colonies were similar between the Oct4 and Nanog selection, we noticed pronounced quantitative differences between the two selection strategies: whereas Oct4-selected MEF cultures had 3- to 10-fold fewer colonies, the fraction of ES-like colonies was 2- to 3-fold higher than in Nanog-selected cultures. Accordingly, approximately four times more Oct4-selected ES-like colonies gave rise to stable and homogenous iPS cell

<sup>1</sup>Whitehead Institute for Biomedical Research and <sup>2</sup>Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02142, USA. <sup>3</sup>Molecular Pathology Unit and Center for Cancer Research, Massachusetts General Hospital, Charlestown, Massachusetts 02129, USA. <sup>4</sup>Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, Massachusetts 02142, USA. <sup>5</sup>Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. <sup>†</sup>Present address: Center for Regenerative Medicine and Cancer Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School and Harvard Stem Cell Institute, Boston, Massachusetts 02414, USA.

\*These authors contributed equally to this work.

Спустя 11 месяцев вышла статья в Nature подтвердившая результаты работы Яманаки. Второе поколение ИПСК.

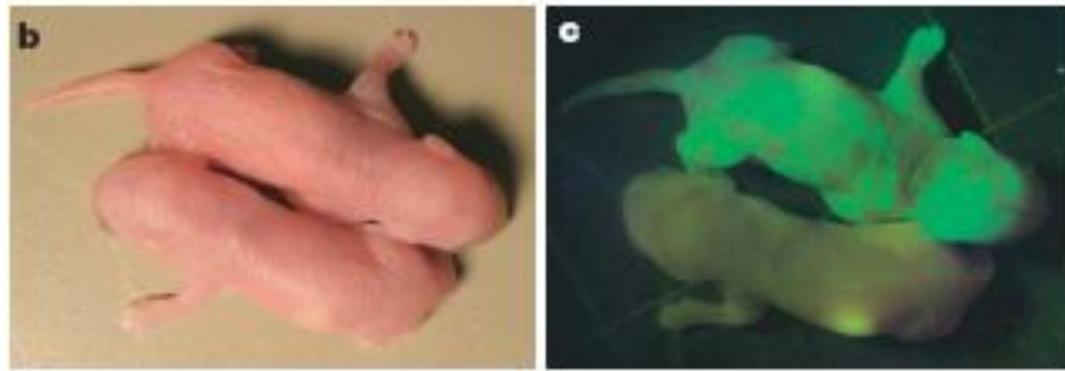
## второе поколение ИПС клеток

- основное отличие – Nanog- или Oct4-активируемый ген устойчивости для селекции репрограммированных клеток
- те же 4 гена (Oct4, Sox2, Klf4 и c-myc)
- гораздо больше похожи на ЭС клетки, чем первое поколение

# ИПС клетки способны давать химер



Взрослая химерная мышь, полученная введением ИПСК в бластоцисту. Светлые участки кожи развились из введенных клеток, темные – из клеток реципиентной бластоцисты.



Новорожденные мышата. Поскольку ИПСК были маркированы GFP, участки кожи развившиеся из введенных клеток флюоресцируют зеленым при облучении ультрафиолеом.

УФ

# Мышата полученные из ИПС клеток

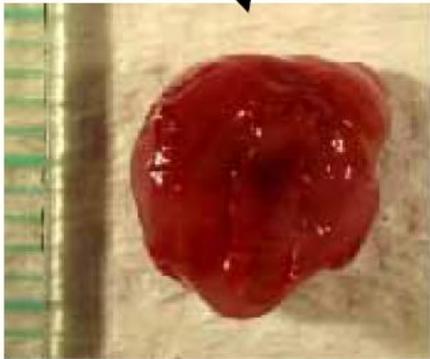


У химерных животных ИПСК способны дифференцироваться в половые клетки и таким образом проходить в следующее поколение. Помет одного химерного животного, светлые мышата получились при оплодотворении половых клеток развившихся из ИПСК.

## ИПСК могут быть не безопасны



У 10% «ИПС-мышей» (светлые мышата на предыдущем слайде) возникали опухоли вследствие активации онкогена *c-myc*



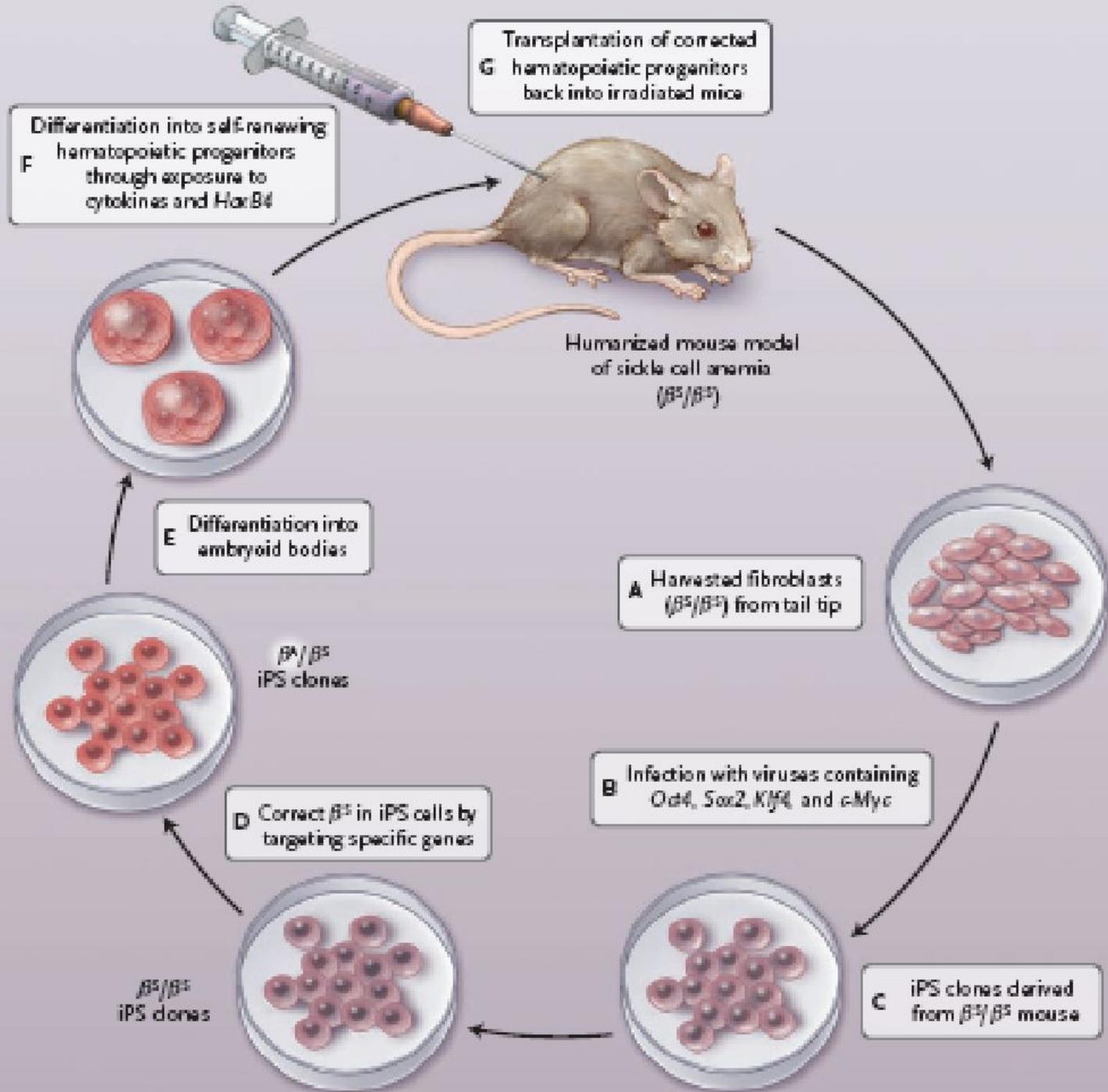
Around the same time  
(Dec 2007)

# Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin

Jacob Hanna,<sup>1</sup> Marius Wernig,<sup>1</sup> Styliani Markoulaki,<sup>1</sup> Chiao-Wang Sun,<sup>2</sup>  
Alexander Meissner,<sup>1</sup> John P. Cassady,<sup>1,3</sup> Caroline Beard,<sup>1</sup> Tobias Brambrink,<sup>1</sup>  
Li-Chen Wu,<sup>2</sup> Tim M. Townes,<sup>2\*</sup> Rudolf Jaenisch<sup>1,3\*</sup>

It has recently been demonstrated that mouse and human fibroblasts can be reprogrammed into an embryonic stem cell–like state by introducing combinations of four transcription factors. However, the therapeutic potential of such induced pluripotent stem (iPS) cells remained undefined. By using a

transgenic sickle cell mouse model, we show that red blood cells can be generated after transplantation

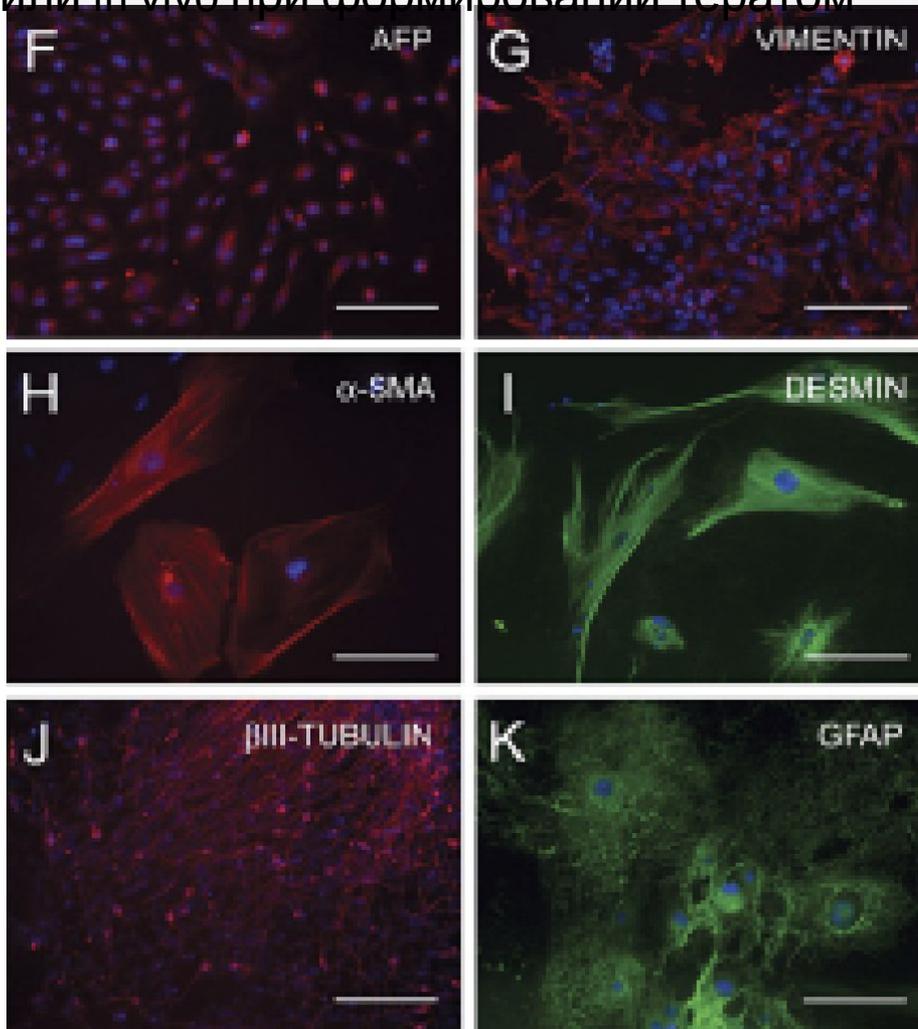


# ИПС клетки человека

- Та же технология, что и для ИПС клеток мыши
- Удалось получить ИПС клетки из фибробластов взрослого донора (36 лет)
- В целом, процесс получения ИПС клеток человека дольше колонии формируются только на 25 день (у мыши на 12 день)

# Плюрипотентность ИПСК человека

По понятным причинам, самый строгий тест на плюрипотентность – тест на химеризм, не возможно провести для ИПСК человека. Поэтому плюрипотентность проверяют *in vitro* при дифференцировке в культуре клеток или *in vivo* при формировании тератом



Иммуноцитохимическое выявление различных типов клеток возникающих при дифференцировке ИПСК человека *in vitro*

F – печеночные клетки (алфа-фетопротеин +)

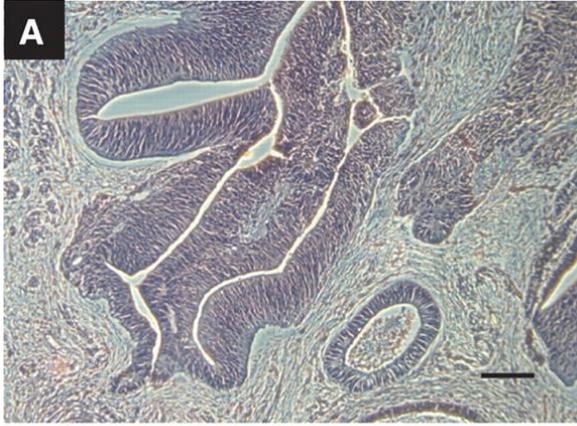
G – мезенхимные клетки (виментин +)  
H – гладкомышечные клетки ( $\alpha$ -SMA +)

I – мышечные клетки (десмин +)

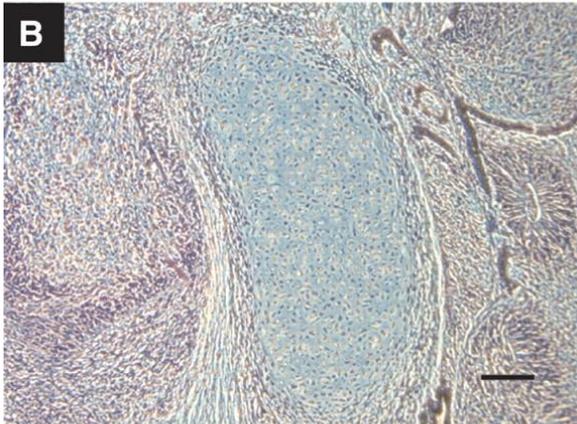
J – нейроны ( $\beta$ III-тубулин +)

K – глиальные клетки (GFAP +)

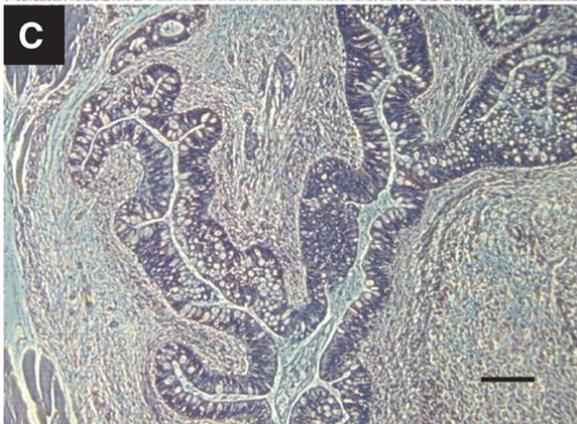
# Плюрипотентность ИПСК человека: тератомный тест



Нервная ткань (производное эктодермы)



Хрящ (производное мезодермы)



Кишечный эпителий (производное энтодермы)

# Establishment of Induced Pluripotent Stem Cells from Centenarians for Neurodegenerative Disease Research

Takuya Yagi<sup>1</sup>, Arifumi Kosakai<sup>1</sup>, Daisuke Ito<sup>1\*</sup>, Yohei Okada<sup>2,3</sup>, Wado Akamatsu<sup>2</sup>, Yoshihiro Nihei<sup>1</sup>, Akira Nabetani<sup>4</sup>, Fuyuki Ishikawa<sup>4</sup>, Yasumichi Arai<sup>5</sup>, Nobuyoshi Hirose<sup>5</sup>, Hideyuki Okano<sup>2</sup>, Norihiro Suzuki<sup>1</sup>

**1** Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan, **2** Department of Physiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan, **3** Kanrinmaru Project, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan, **4** Laboratory of Cell Cycle Regulation, Department of Gene Mechanisms, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan, **5** Division of Geriatric Medicine, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

## Abstract

Induced pluripotent stem cell (iPSC) technology can be used to model human disorders, create cell-based models of human diseases, including neurodegenerative diseases, and in establishing therapeutic strategies. To detect subtle cellular abnormalities associated with common late-onset disease in iPSCs, valid control iPSCs derived from healthy donors free of serious late-onset diseases are necessary. Here, we report the generation of iPSCs from fibroblasts obtained immediately postmortem from centenarian donors (106- and 109-years-old) who were extremely healthy until an advanced age. The iPSCs were generated using a conventional method involving OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC, and then differentiated into neuronal cells using a neurosphere method. The expression of molecules that play critical roles in late-onset neurodegenerative diseases by neurons differentiated from the centenarian-iPSCs was compared to that of neurons differentiated from iPSCs derived from familial Alzheimer's disease and familial Parkinson's disease (PARK4: triplication of the  $\alpha$  synuclein gene) patients. The results indicated that our series of iPSCs would be useful in neurodegeneration research. The iPSCs we describe, which were derived from donors with exceptional longevity who were presumed to have no serious disease risk factors, would be useful in longevity research and as valid super-controls for use in studies of various late-onset diseases.

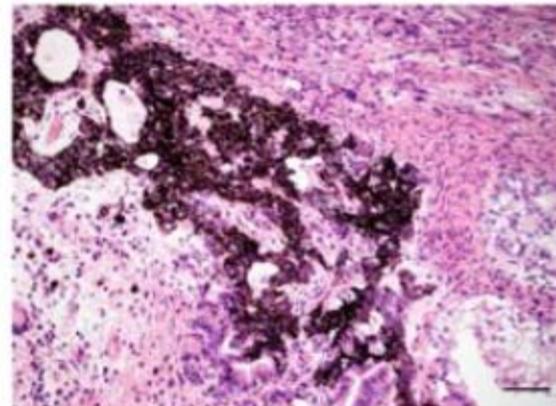
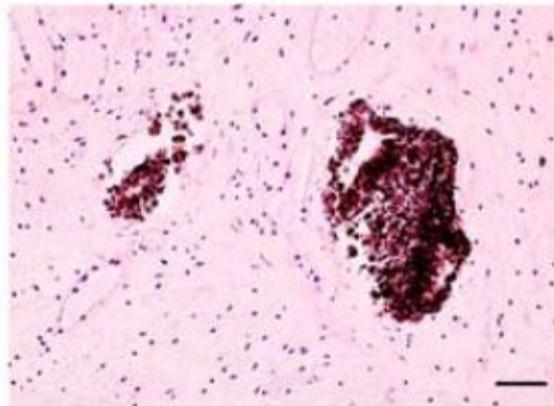
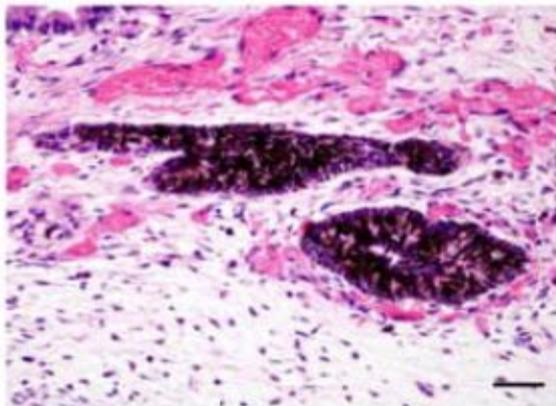


**100-1 #8**

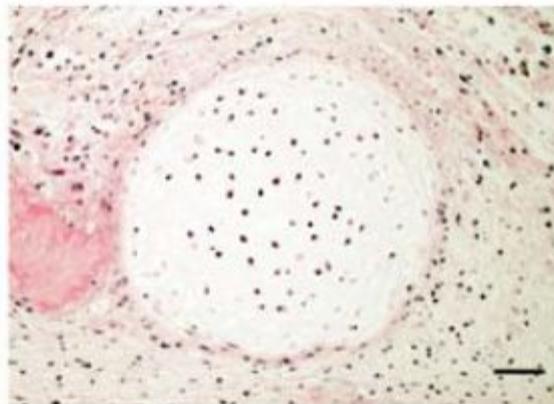
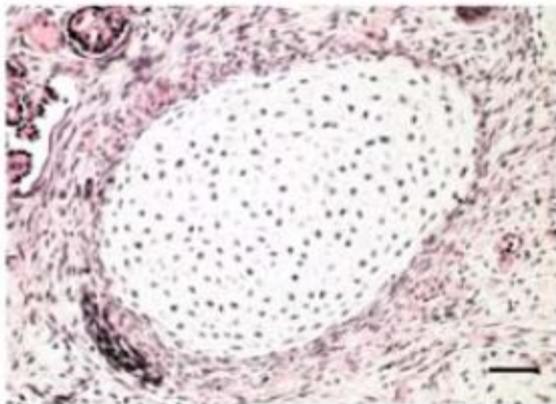
**100-1 #16**

**100-2 #1**

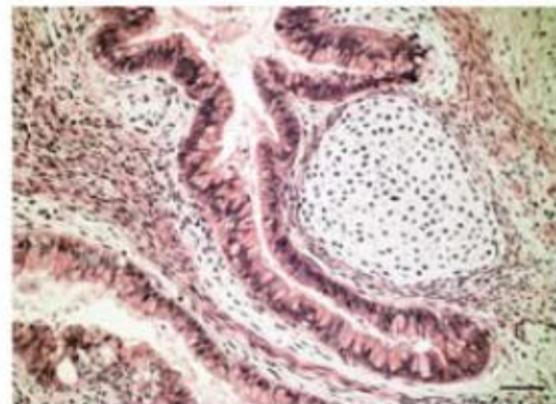
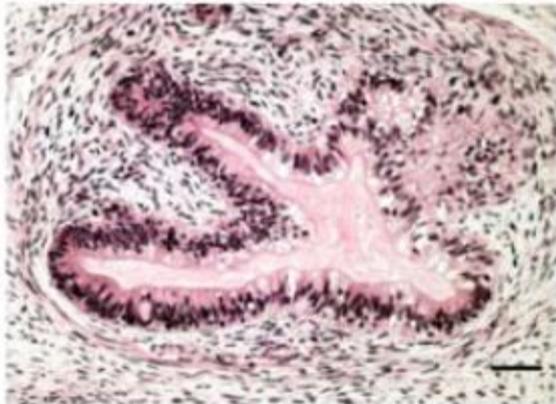
**Pigmented  
epithelium  
(ectoderm)**



**Cartilage  
(mesoderm)**

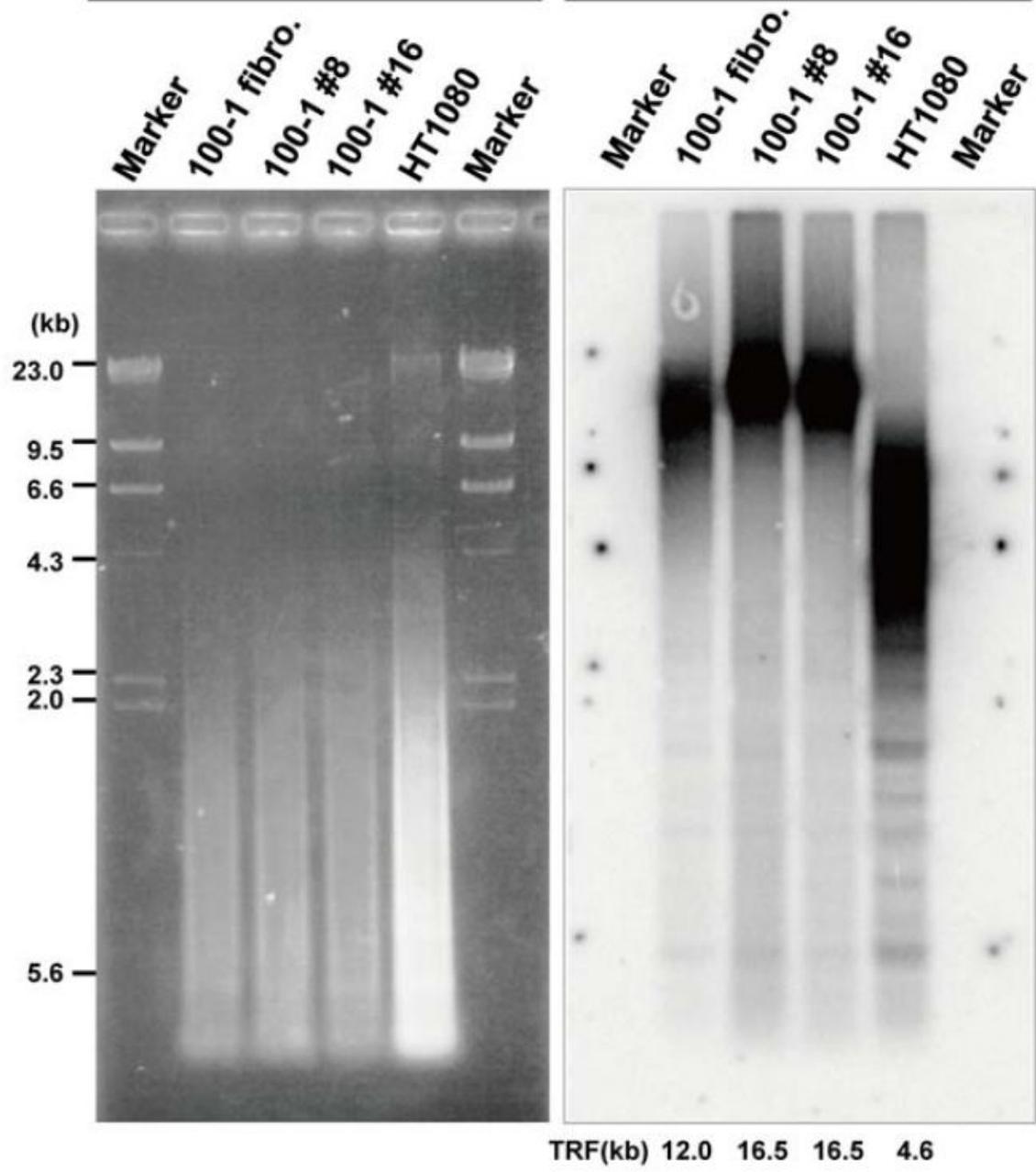


**Glandular  
structure  
(endoderm)**

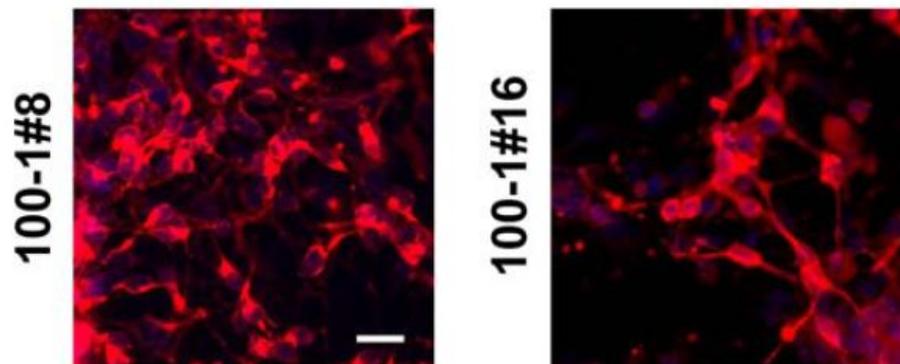


Ethidium bromide

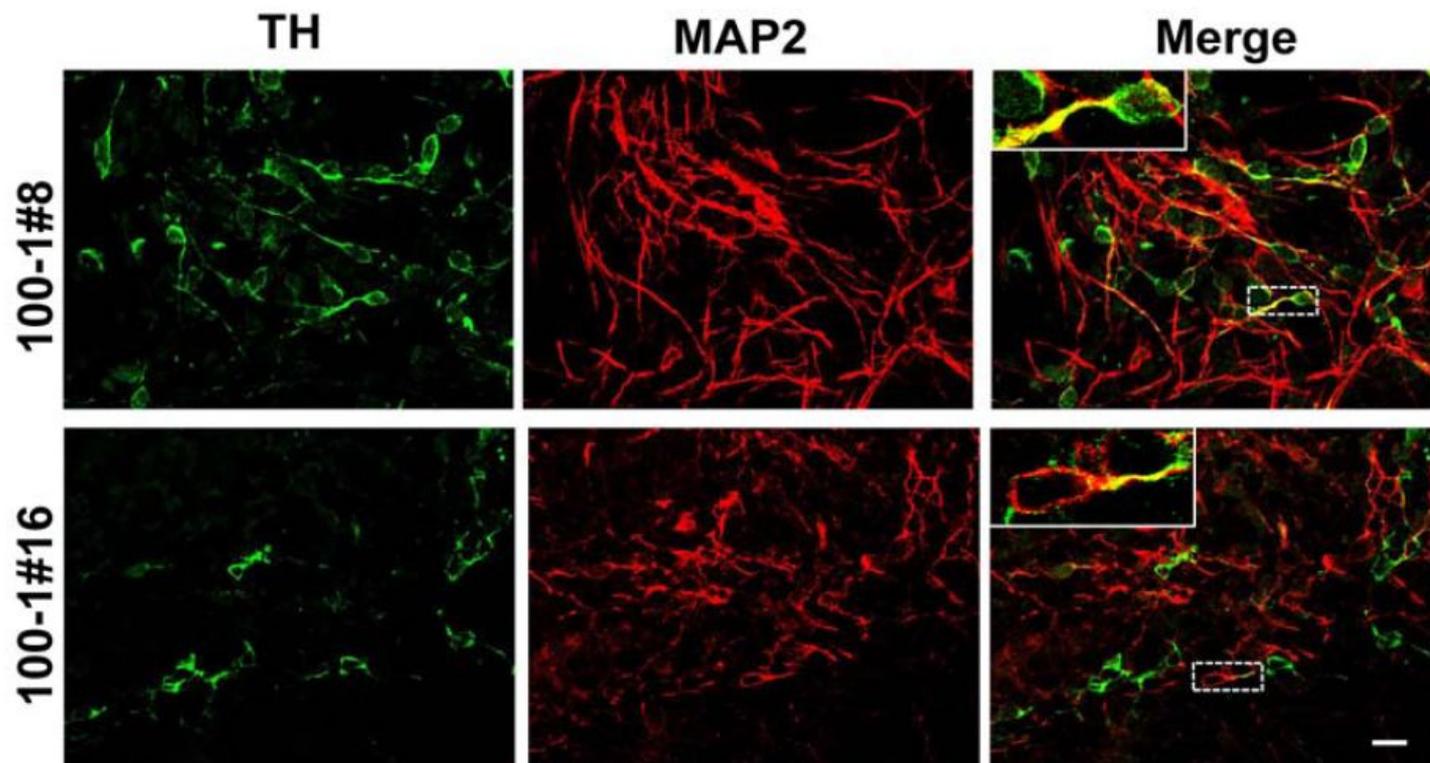
Probe: (CCCTAA)<sub>4</sub>



**A** **Tuj1 staining**

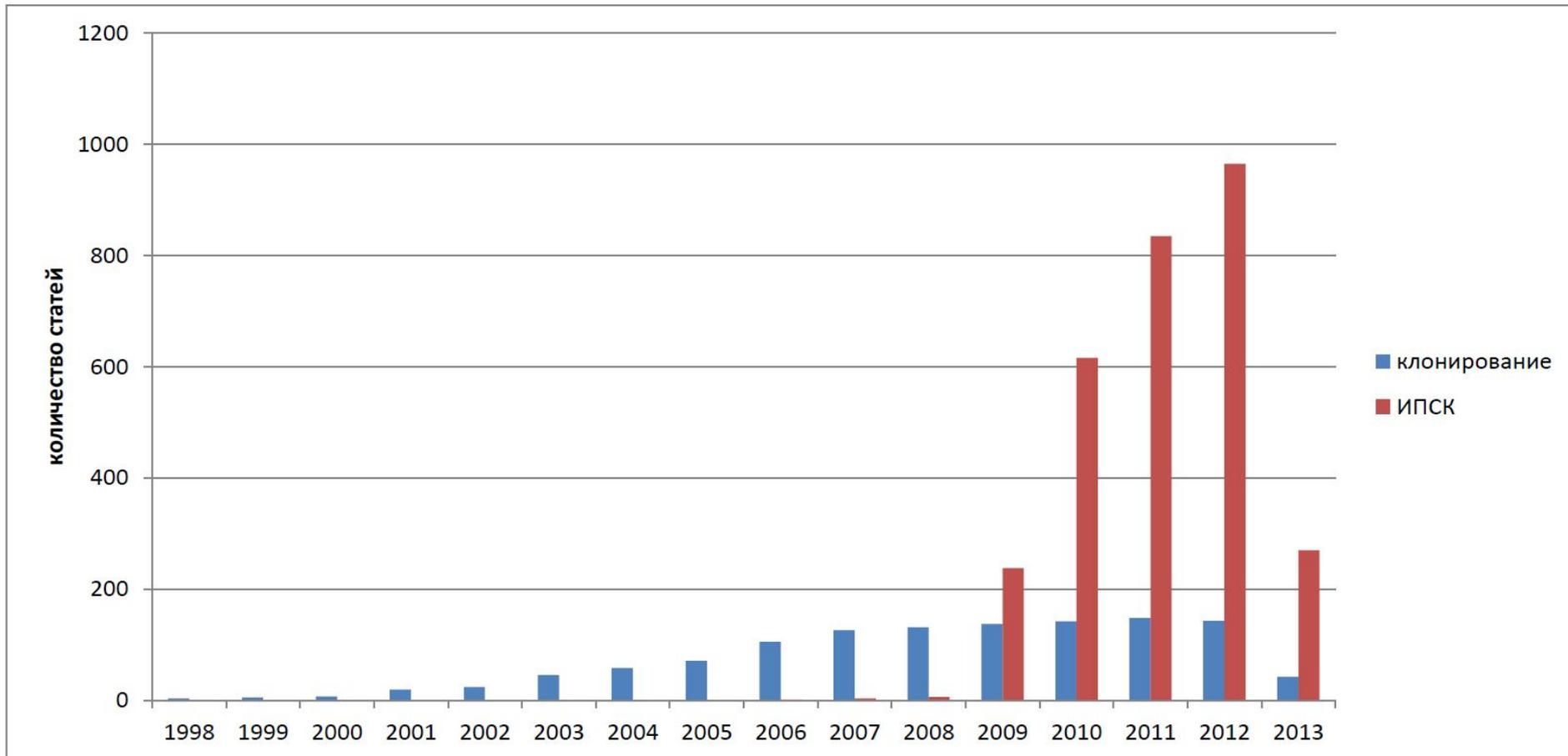


**B**



# Как сравнить перспективность разных подходов репрограммирования?

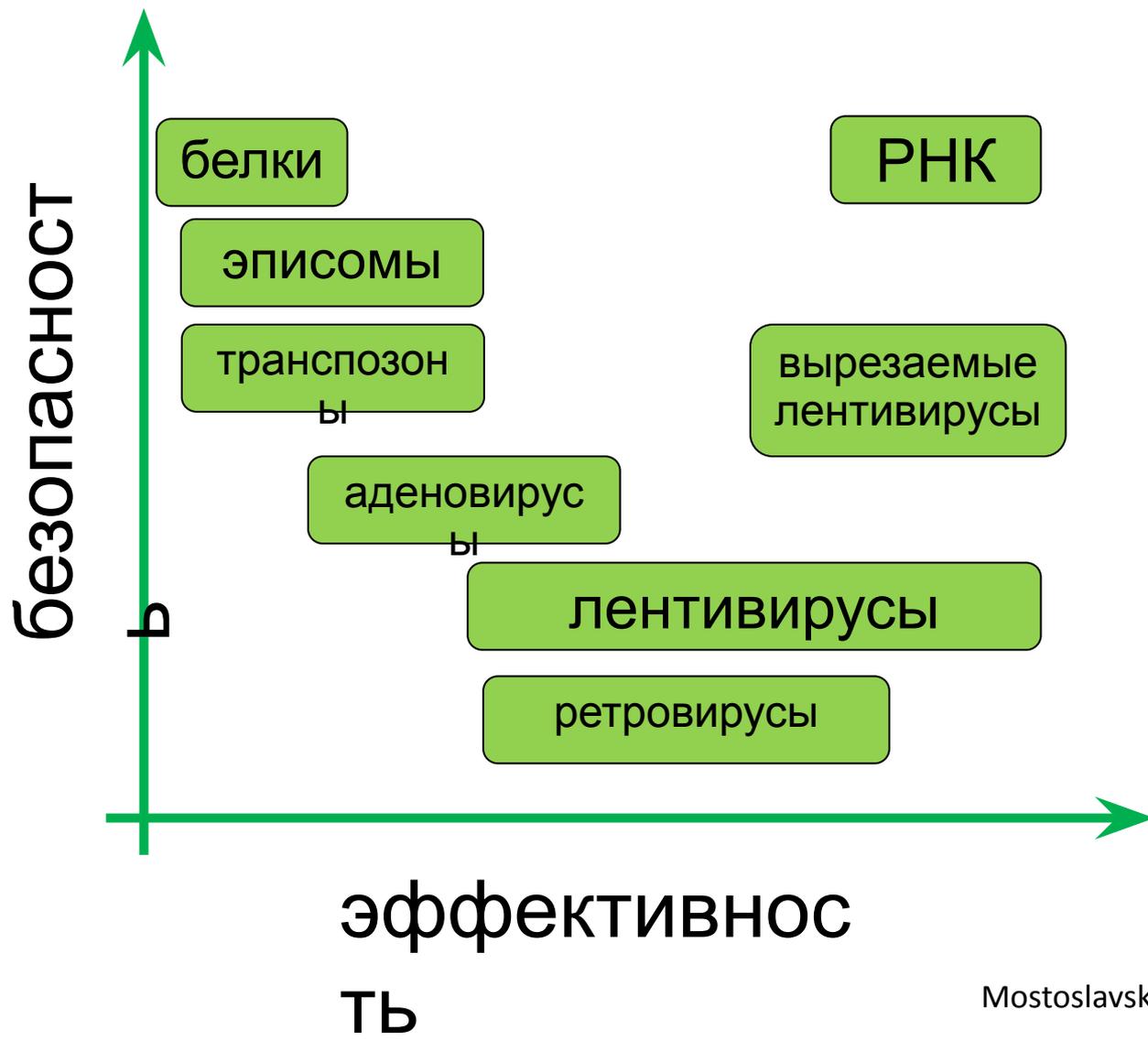
## Количество опубликованных статей (к марту 2013 года)



Таким образом, получение ИПСК очень перспективный подход репрограммирования генома, однако, имеет ряд серьезных недостатков

- применение ретровирусов при репрограммировании приводит к вставке чужеродного генетического материала в случайные сайты генома (инсерционный мутагенез)
- в репрограммирующем коктейле присутствуют онкогены (с-мус и Klf4), их эктопическая экспрессия может приводить к опухолевому перерождению клеток
- крайне низкая эффективность репрограммирования. Полностью репрограммируются лишь 0,001-1% клеток

# Сравнение разных способов получения ИПС клеток



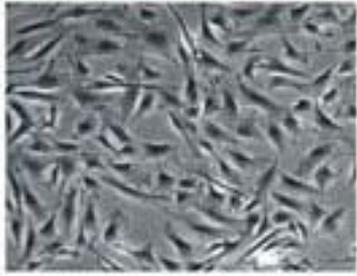
# Получение ИПСК – процесс медленный и не эффективный

Репрограммирование в системе гибридных клеток занимает примерно 1-2 суток

Репрограммирование при клонировании – часы

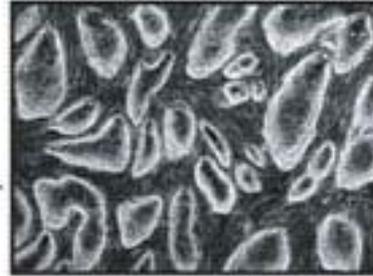
Репрограммирование при получении ИПСК мыши минимум 7-10 дней

# Lentiviral infection

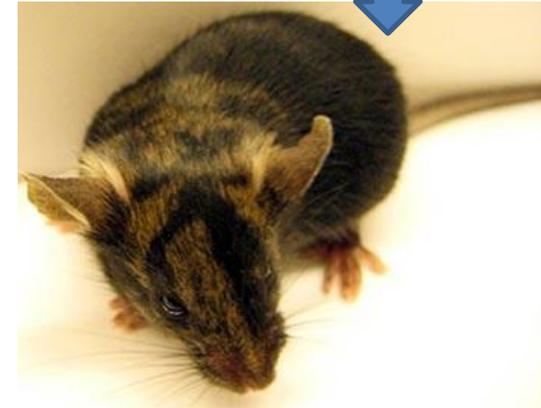


Oct4  
Sox2  
Klf4  
cMyc

+Dox



Blast injection



химер



Соматические

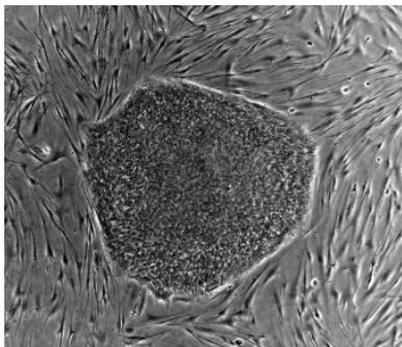
клетки



+Dox



iPS



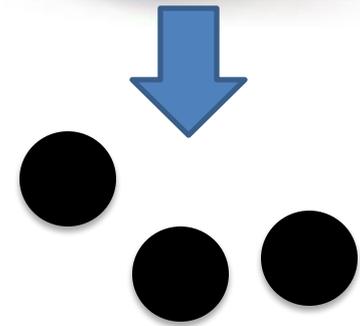
Все клетки этих мышей несут индуцибельные репрораммирующие факторы

# А можно ли репрограммировать все клетки?

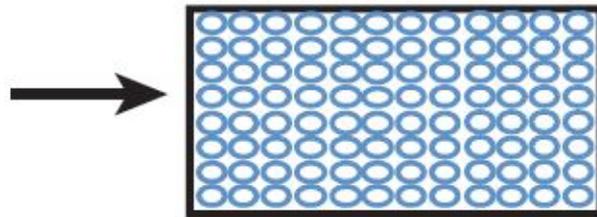


Линия мышей несущая Dox-индуцибельные Oct4, Sox2, Klf4 и c-myc

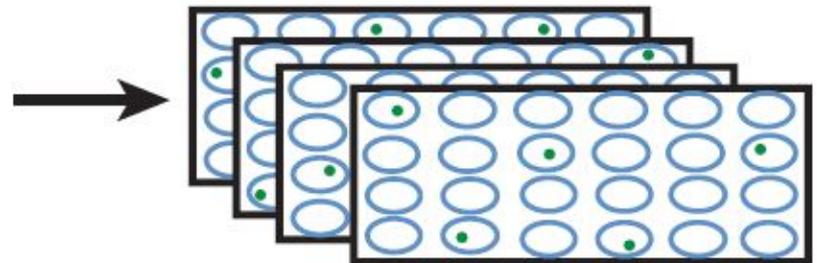
+ Gfp под промотором Nanog (т.е. репрограммированные клетки становятся «зелеными»)



Выделяем B -  
клетки



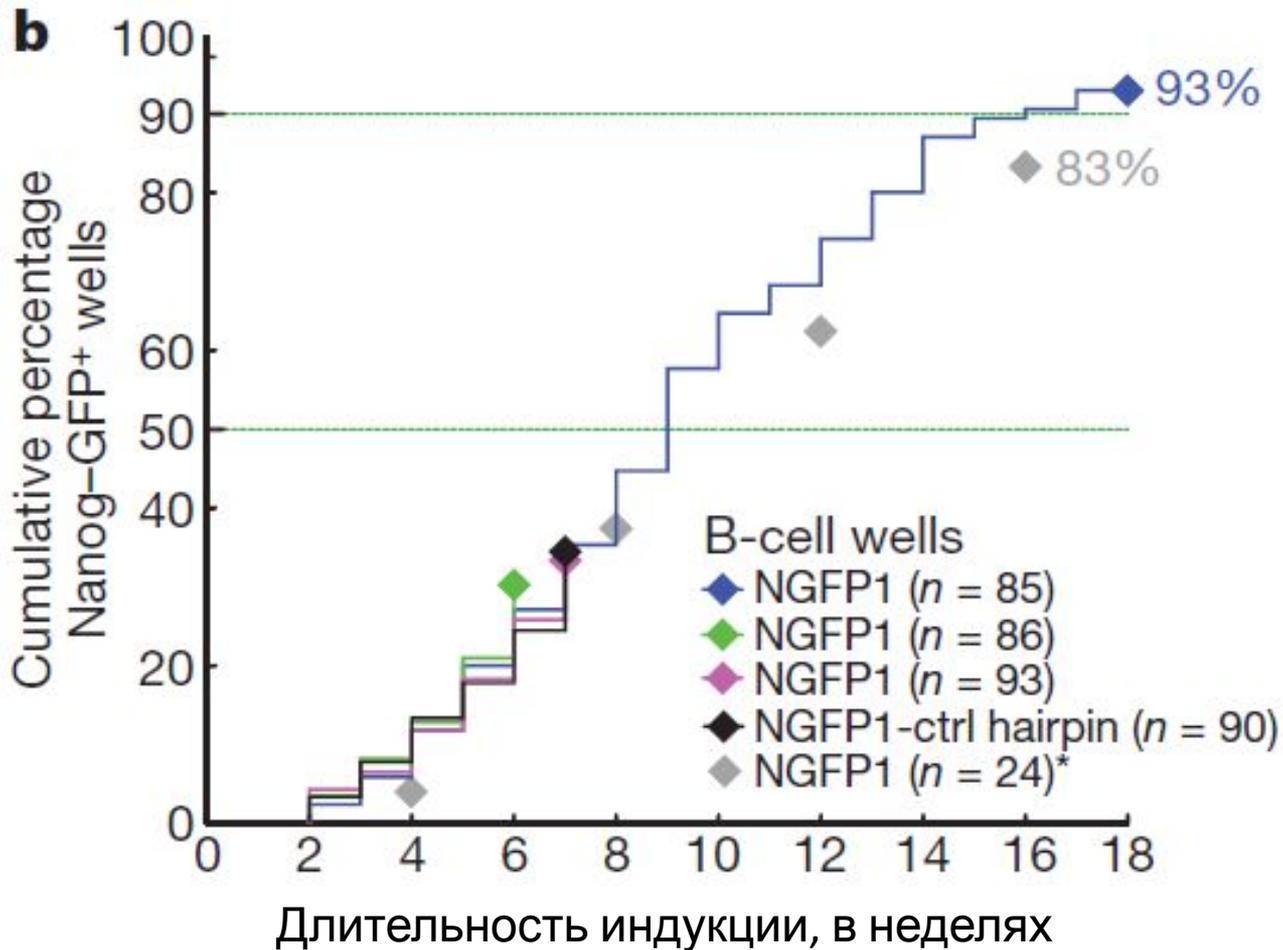
Рассаживаем  
индивидуально  
Добавляем Dox



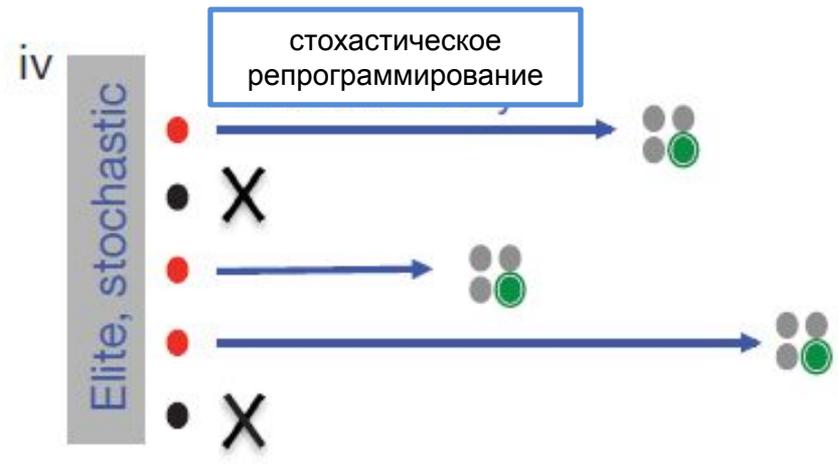
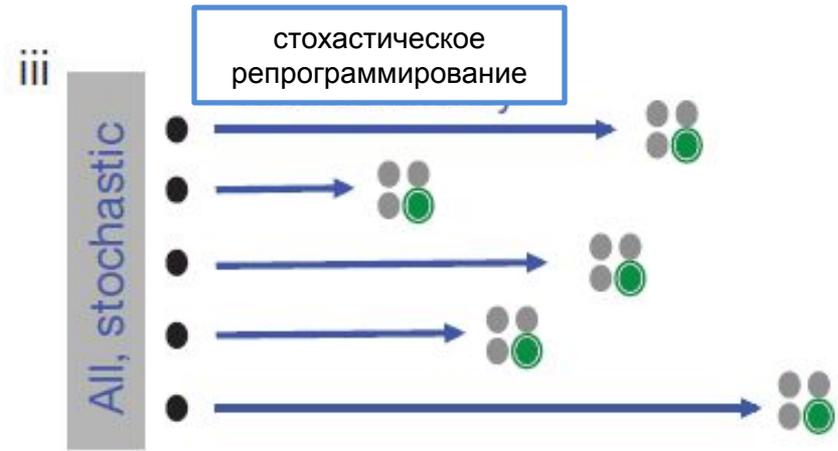
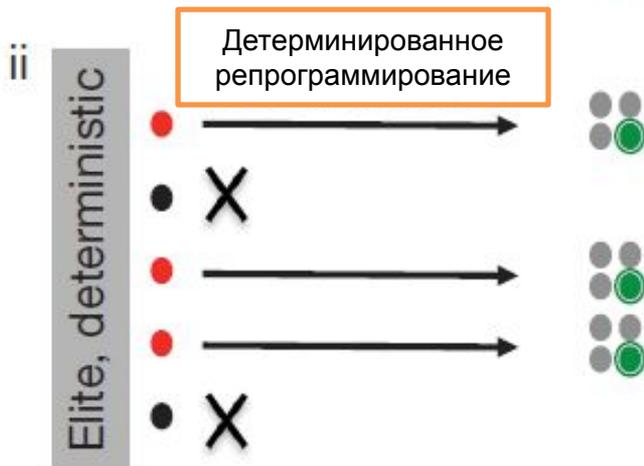
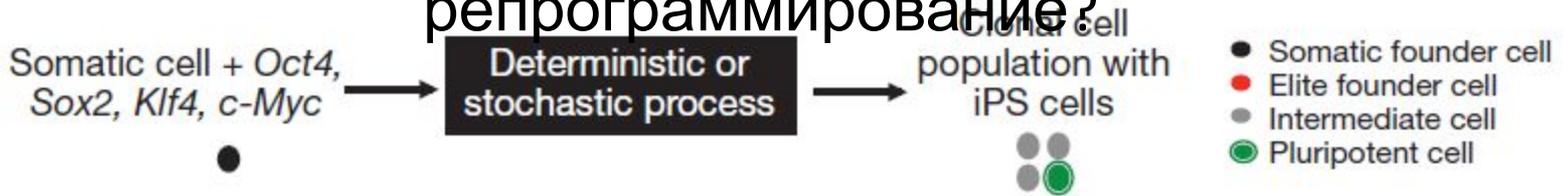
Ждем  
появления  
«зеленых»  
клеток

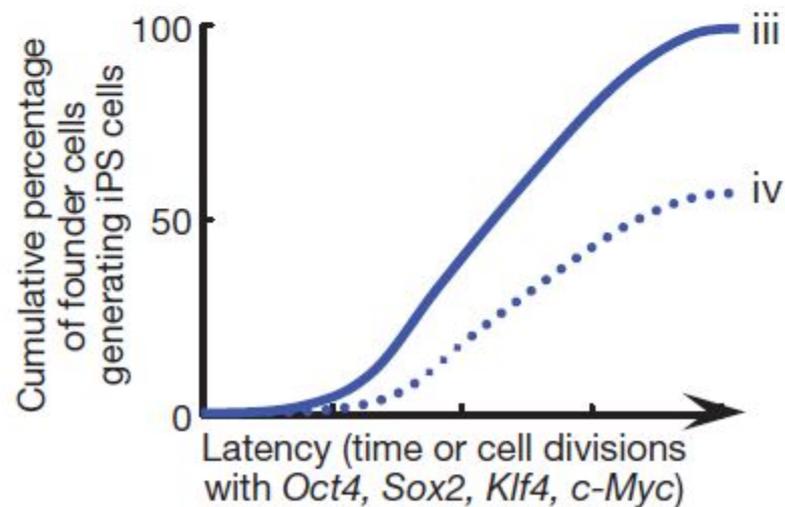
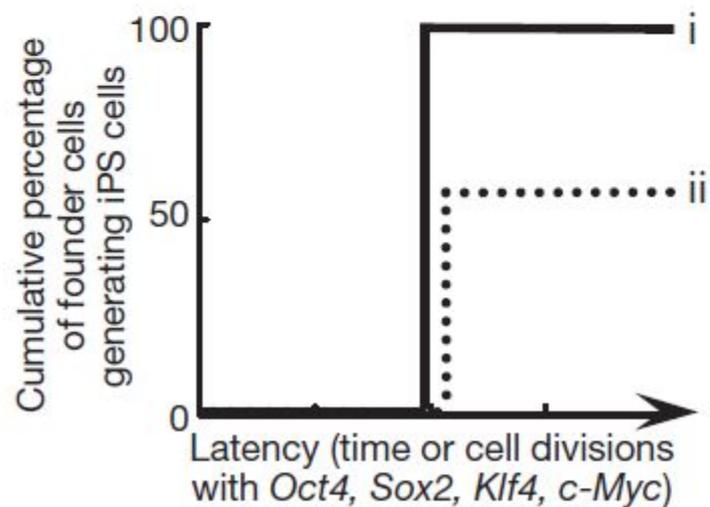
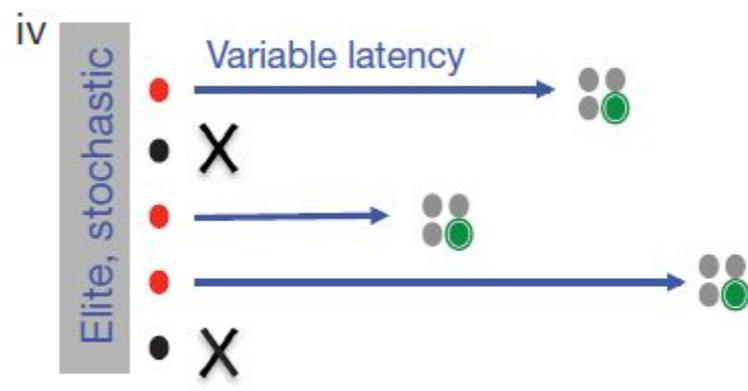
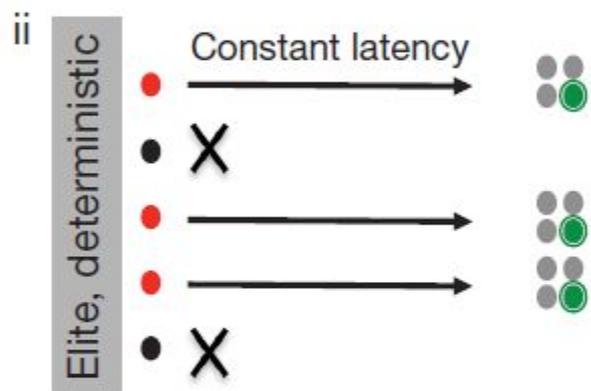
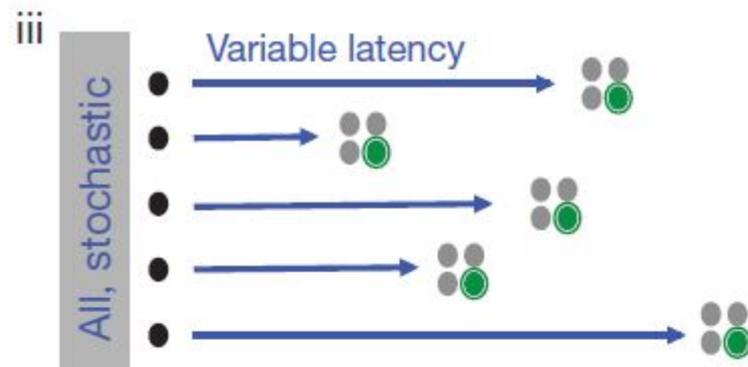
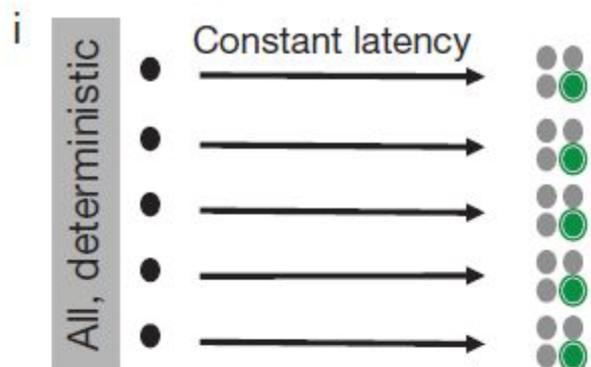
Можно репрограммировать 100% клеток, но нужно время

до 18 недель!

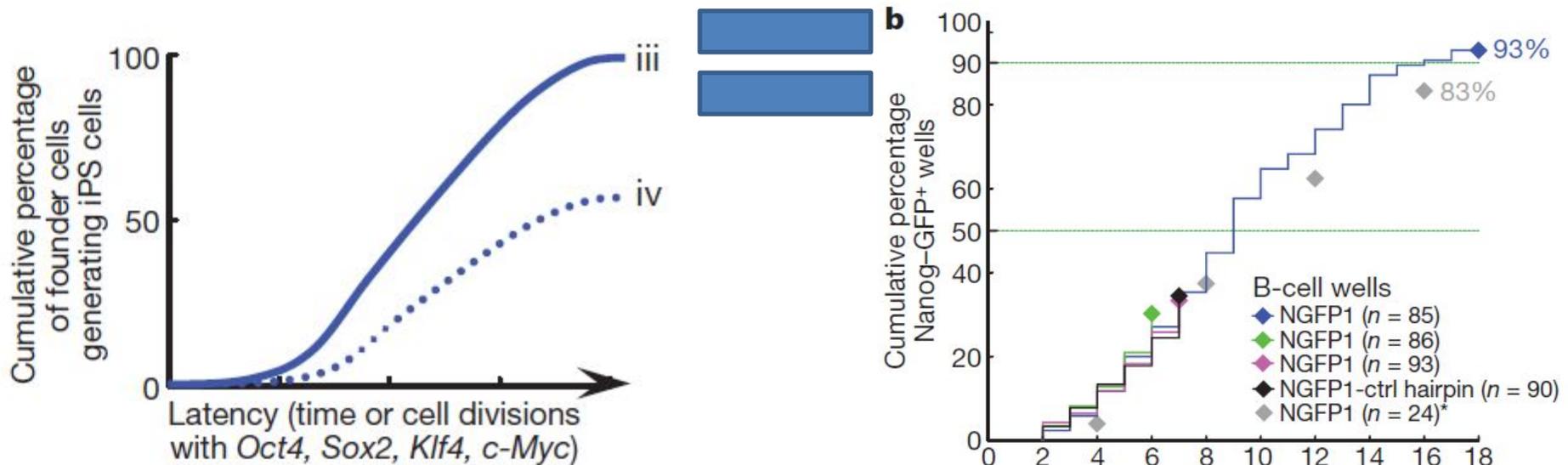


# Детерминированное или стохастическое репрограммирование?





# Репрограммирование лучше всего описывается стохастической не элитарной моделью



# Deterministic versus stochastic model of reprogramming: new evidence from cellular barcoding technique

Anastasia Yunusova, Veniamin Fishman, Gennady Vasiliev, Nariman Battulin

1. INFECTION. Infection of MEFs by DOX-inducible lentiviruses encoding reprogramming factors and barcode-bearing lentiviruses. At this step, barcode is integrated into genomic DNA; the reprogramming factors are also integrated but not expressed yet.

2. POPULATION DOUBLING. Infected cells were cultivated until they achieved one population doubling. We used live imaging to accurately count the fraction of cells that undergo cell division or cell death.

3. SPLITTING. All cells were split into four equal parts and plated on a feeder layer. At this step, daughter cells were distributed into four culture dishes with defined probability.

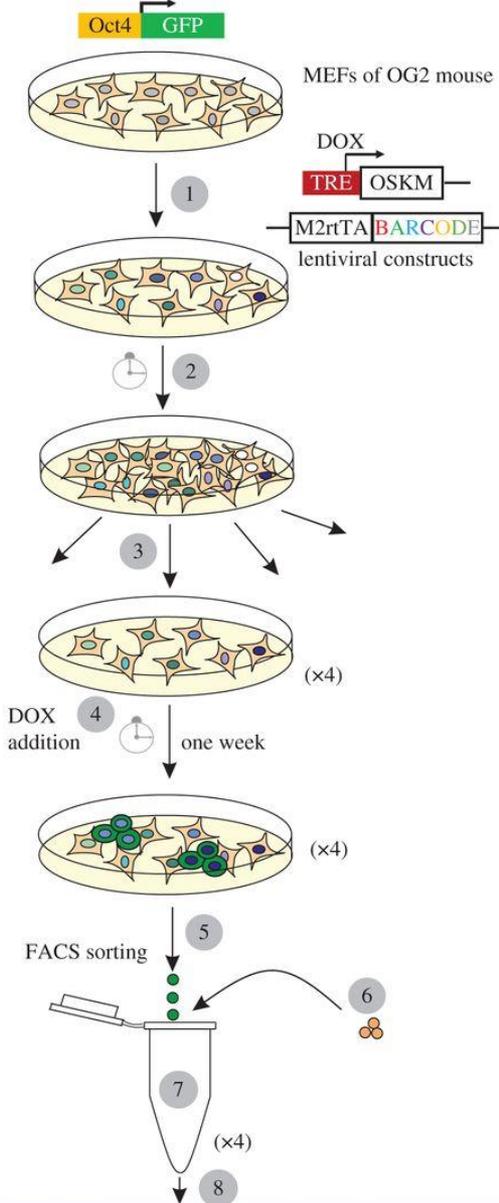
4. STARTING OF REPROGRAMMING. Expression of reprogramming factors was initiated by adding DOX to the medium. Then cells were cultured in the presence of DOX for one week.

5. SORTING. Successfully reprogrammed cells were sorted for GFP expression using fluorescence-activated cell sorting (FACS).

6. CALIBRATION. A defined number of control cells containing known barcodes was added to each sample.

7. AMPLIFICATION. Genomic DNA was extracted and barcodes were amplified using PCR with different index primers (specific for each of the four samples).

8. SEQUENCING AND ANALYSIS. The pooled samples were sequenced and analysed for the presence of shared barcodes. For details, see text and the Material and methods.



deep sequencing using Ion Torrent platform

apply filters and background thresholds

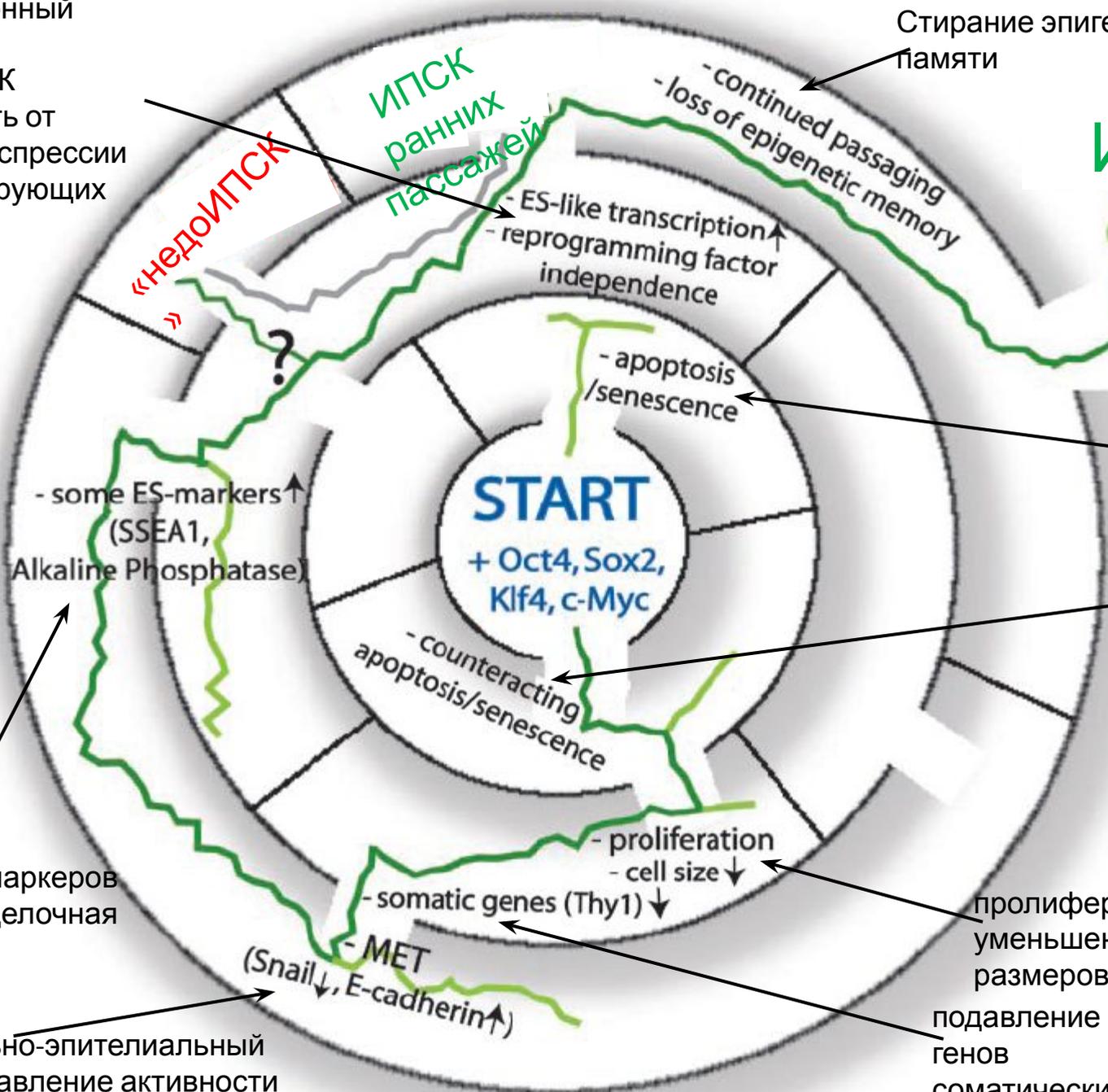
identify the barcode library of origin by signature sequence

compare barcodes shared between libraries

транскрипционный  
профиль  
подобный ЭСК  
независимость от  
экзогенной экспрессии  
репрограммирующих  
факторов

Стирание эпигенетической  
памяти

ИПСК



«недоИПСК»

ИПСК  
ранних  
пассажей

- continued passaging  
- loss of epigenetic memory

- ES-like transcription ↑  
- reprogramming factor  
independence

- apoptosis  
/senescence

**START**  
+ Oct4, Sox2,  
Klf4, c-Myc

- counteracting  
apoptosis/senescence

- proliferation  
- cell size ↓

- somatic genes (Thy1) ↓

- MET  
(Snail ↓, E-cadherin ↑)

апоптоз/старени  
е

противодействи  
апоптозу/старен  
ю

пролиферация и  
уменьшение  
размеров клеток

подавление активности  
генов

соматических клеток  
Papp, Plath 2011 c

Появление маркеров  
ЭСК (SSEA1, щелочная  
фосфатаза)

мезенхимально-эпителиальный  
переход (подавление активности  
Snail,

# Первые этапы репрограммирования

В первые 1-2 дня:

- Укорачивается клеточный цикл (фибробласты делятся раз в 22 часа, ЭС клетки раз в 11-12 часов)
- Размеры клеток уменьшаются

Лишь немногие клетки приобретают эти свойства, часто клетки уходят в апоптоз.

Блокировка апоптотического пути увеличивает выход репрограммированных клеток.

# Первые этапы репрограммирования

Через 4-8 дней:

- Некоторые из быстро делящихся маленьких клеток формируют плотные колонии. Этот этап называется мезенхимально-эпителиальный переход.
- Подавляется активность генов, характерных для фибробластов (Thy1, Snail)
- Появляется E-cadherin

Активация *бета-катенин - E-cadherin* сигнального пути увеличивает выход репрограммированных клеток.

# Поздние этапы репрограммирования

В небольшой доле клеток добравшихся до этого этапа:

- появляются поверхностные антигены, свойственные ЭС клеткам (SSEA1)
- появляется активность щелочной фосфатазы, еще одного маркера ЭС клеток

Все описанные этапы репрограммирования происходят под действием репрограммирующих факторов. Прекращение эктопической экспрессии факторов, на этой стадии, приводит к возврату в исходное состояние.

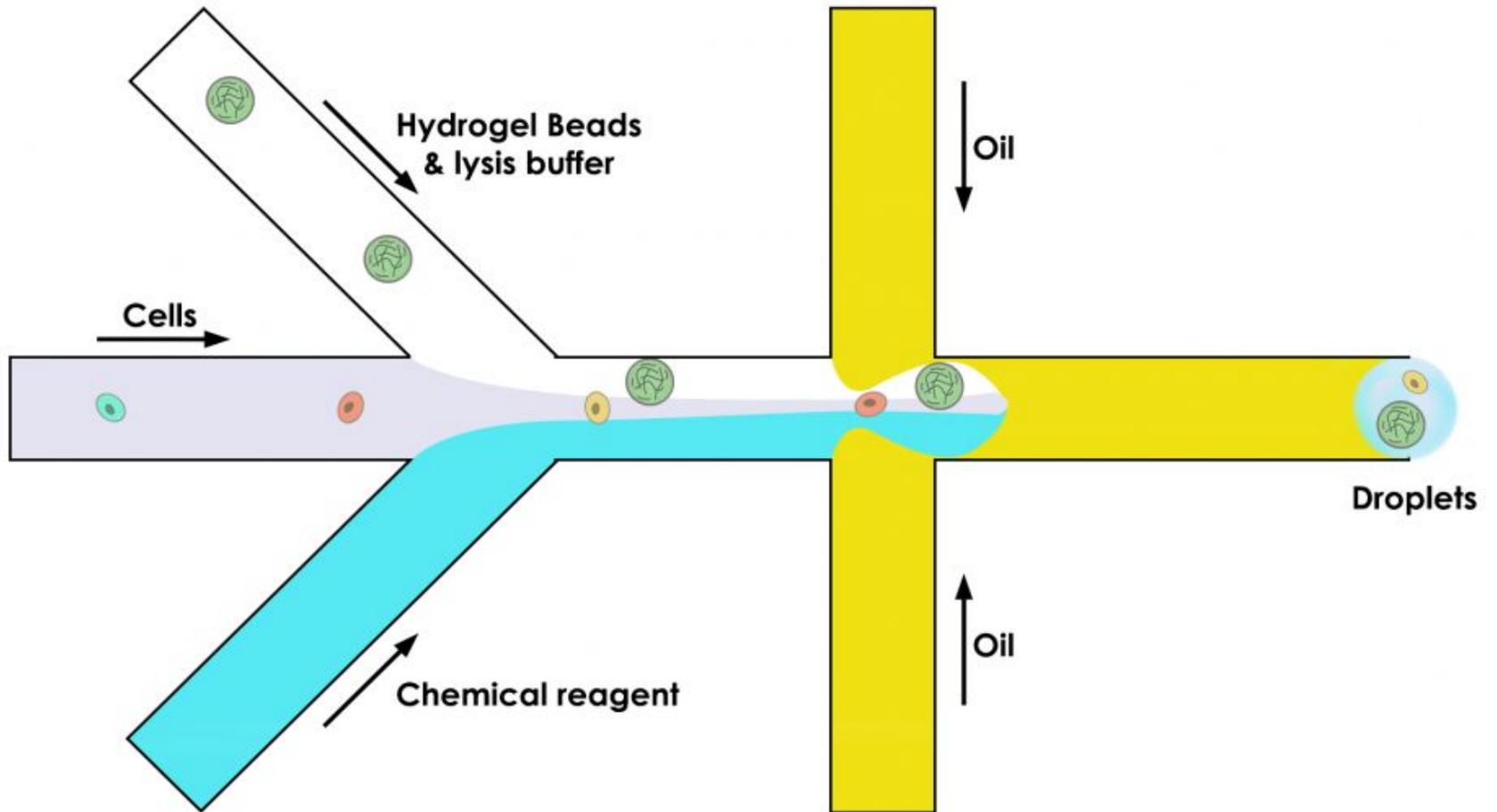
# Поздние этапы репрограммирования

В небольшой доле клеток добравшихся до этого этапа:

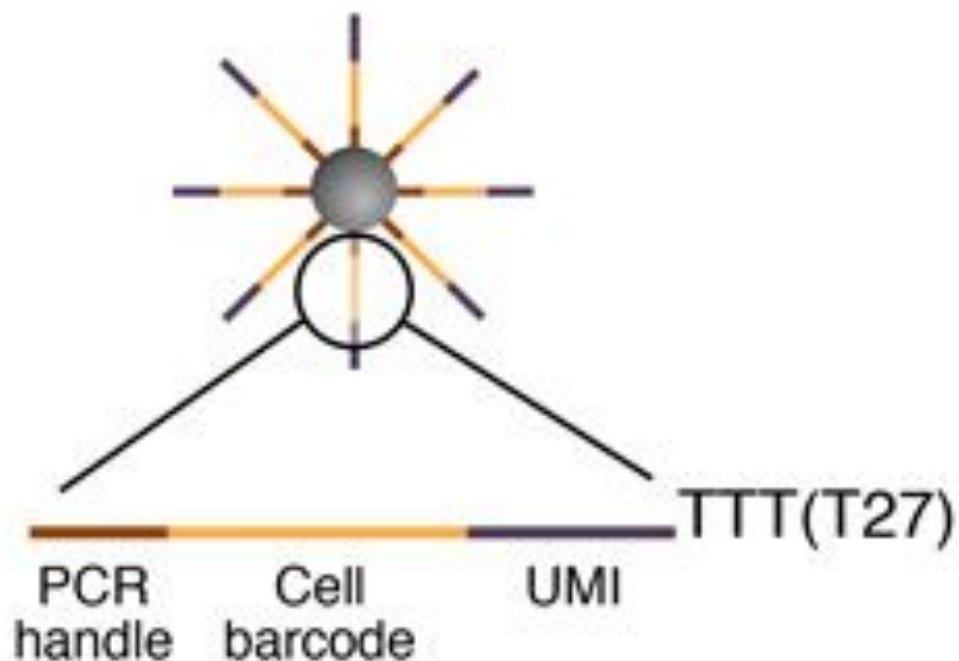
- закрепляются свойства, характерные для ЭС клеток
- Плюрипотентное состояние поддерживается вне зависимости от экзогенной экспрессии репрограммирующих факторов

Финиш!

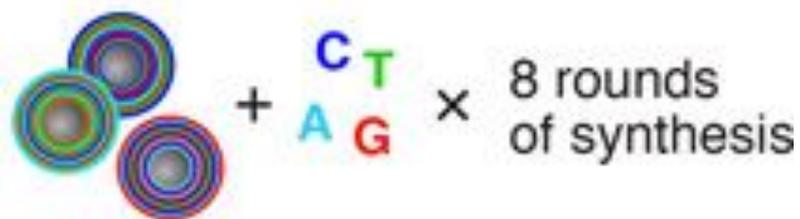
# Drop-seq



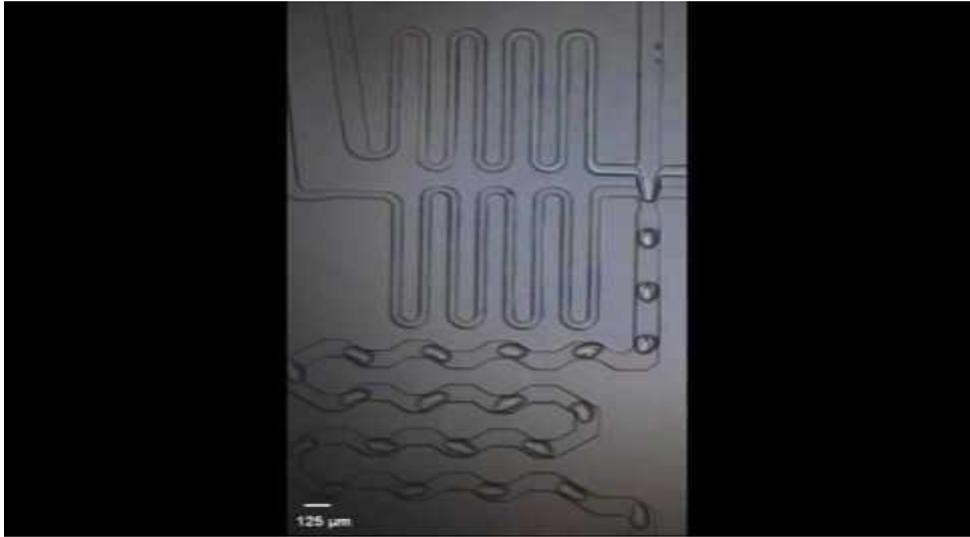
## Barcoded primer bead

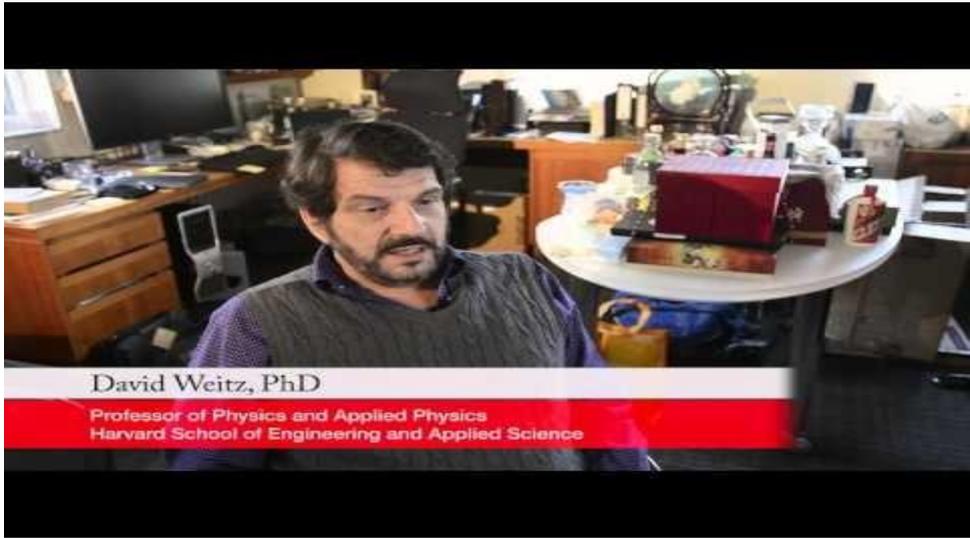


## Synthesis of UMI (8 bases)



- Millions of the same **cell barcode** per bead
- $4^8$  different **molecular barcodes** (UMIs) per bead

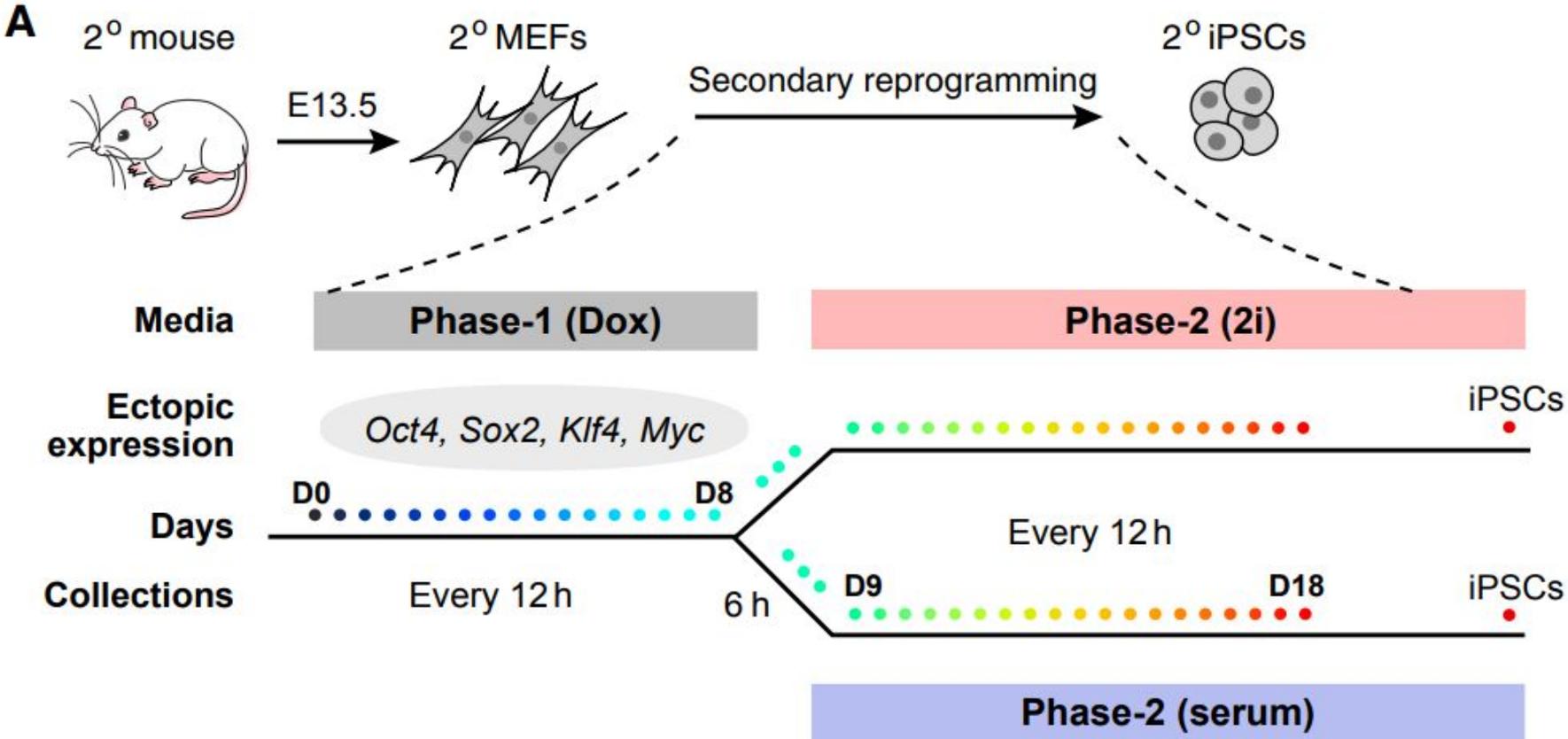




David Weitz, PhD

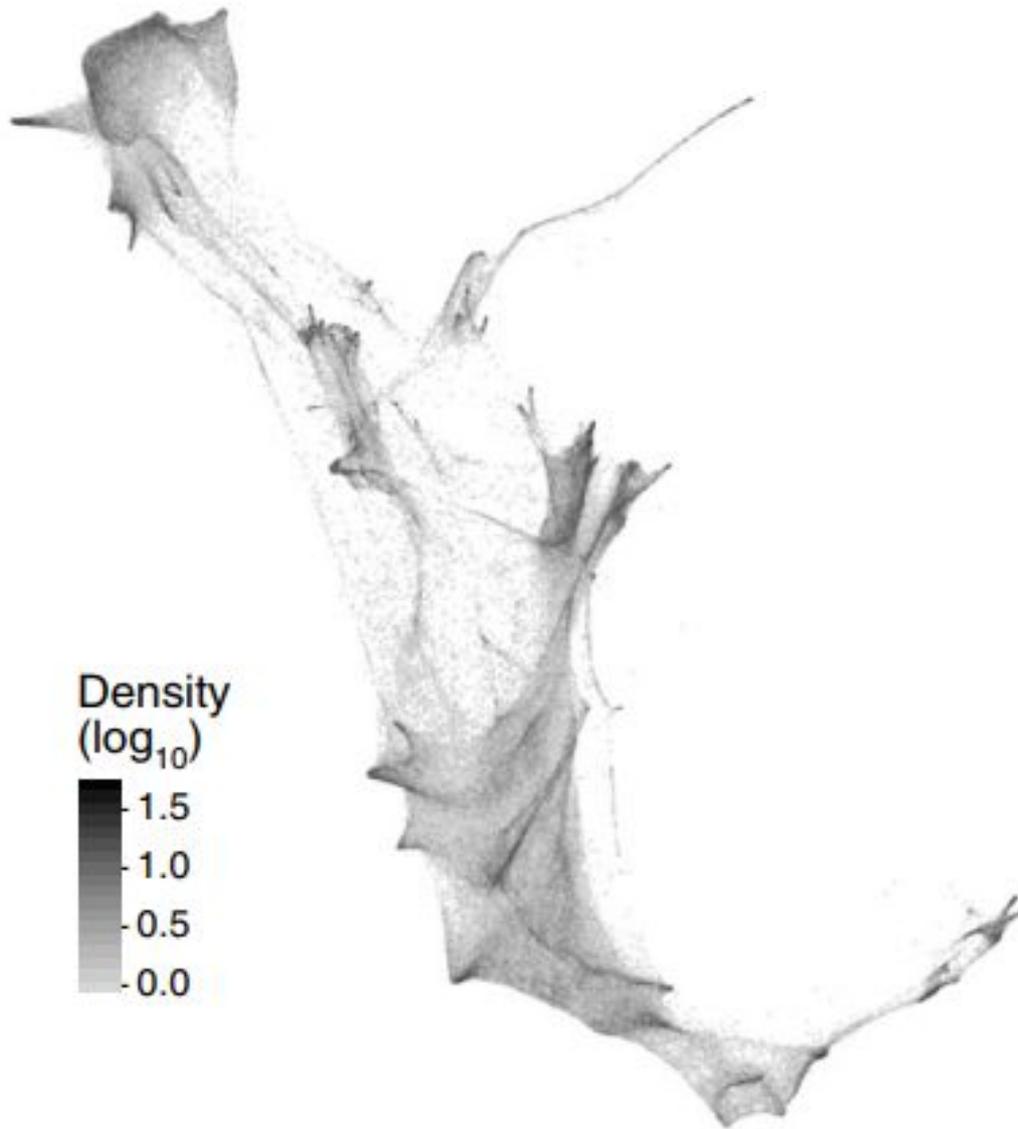
Professor of Physics and Applied Physics  
Harvard School of Engineering and Applied Science

# Optimal-Transport Analysis of Single-Cell Gene Expression Identifies Developmental Trajectories in Reprogramming

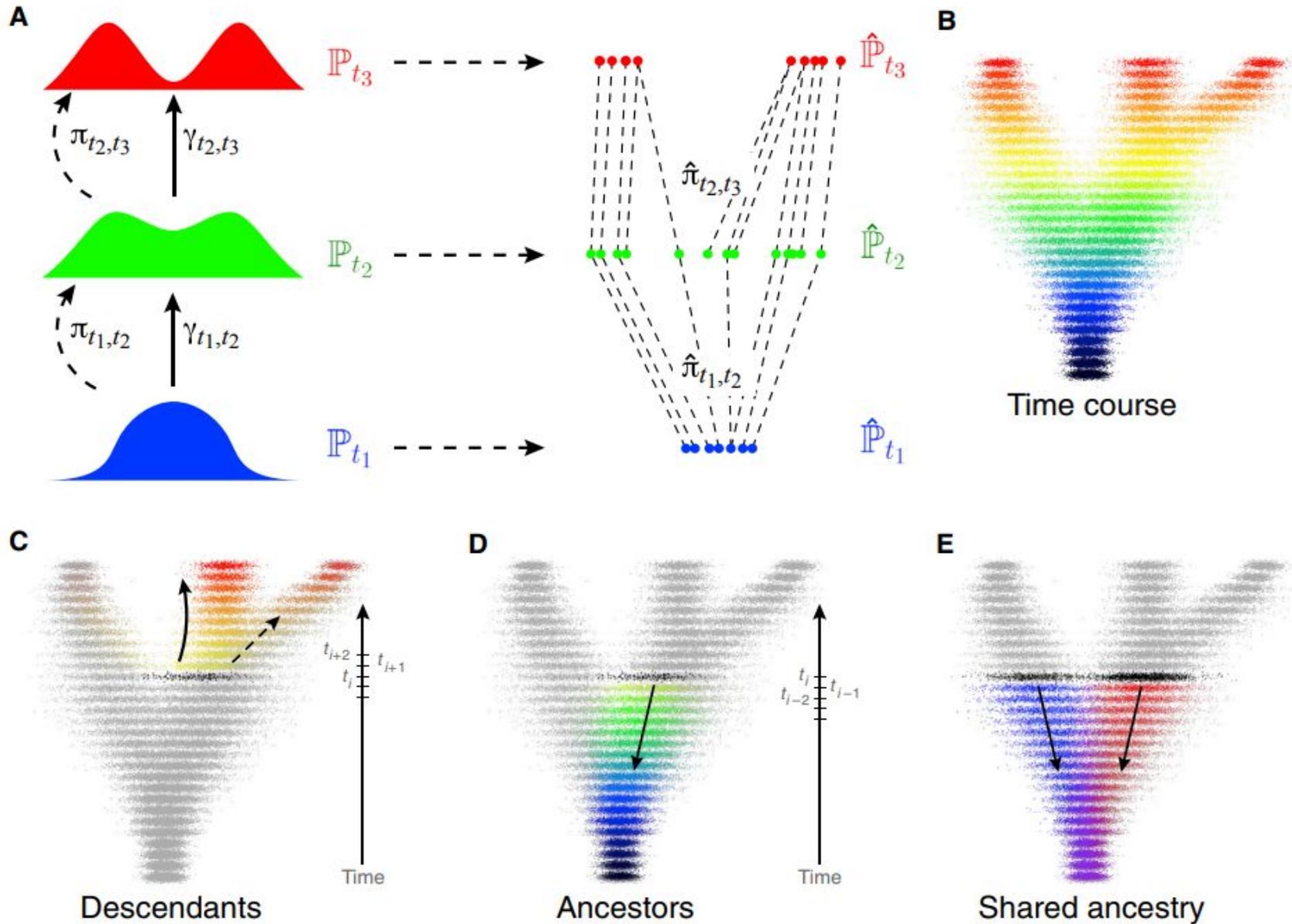


**B**

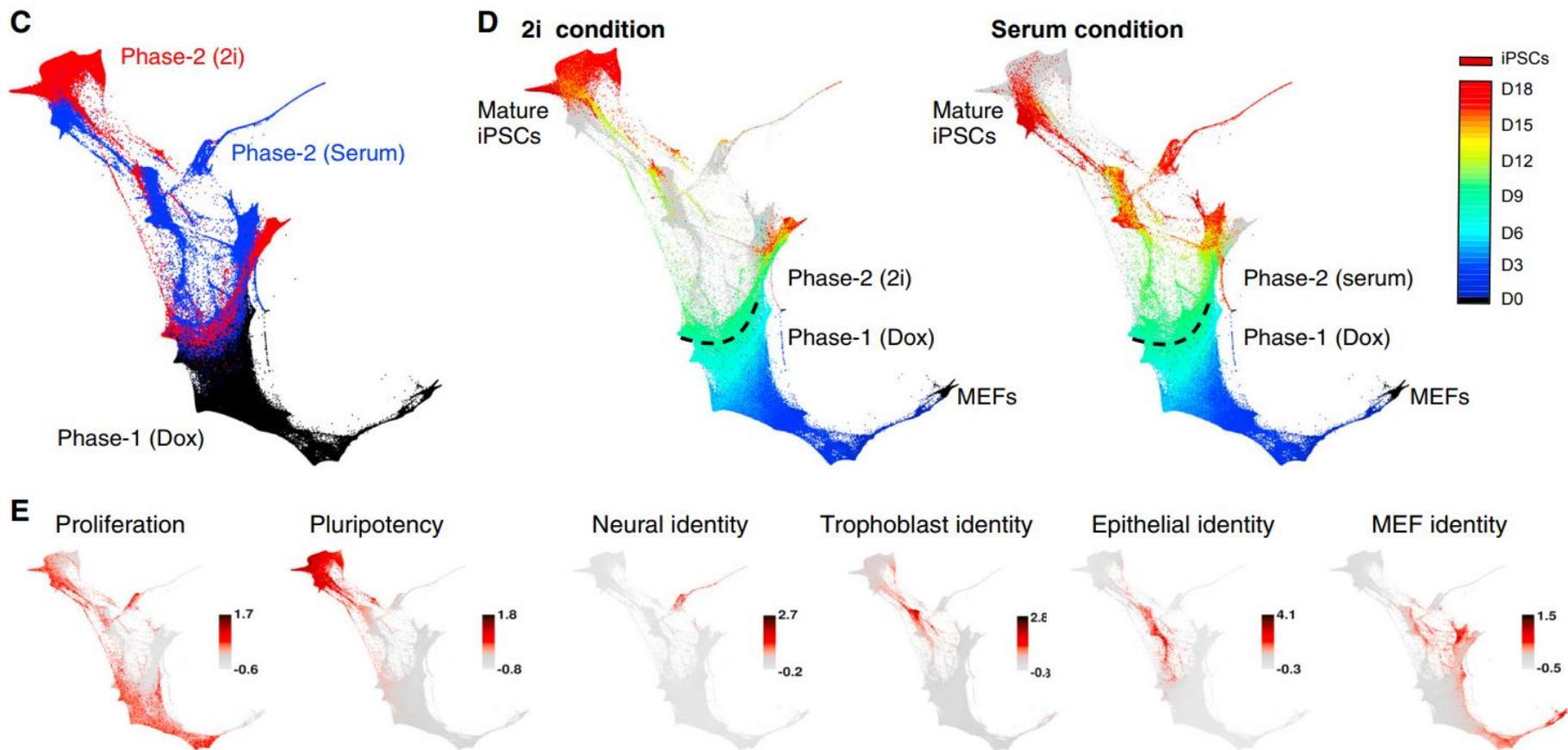
251,203 cells



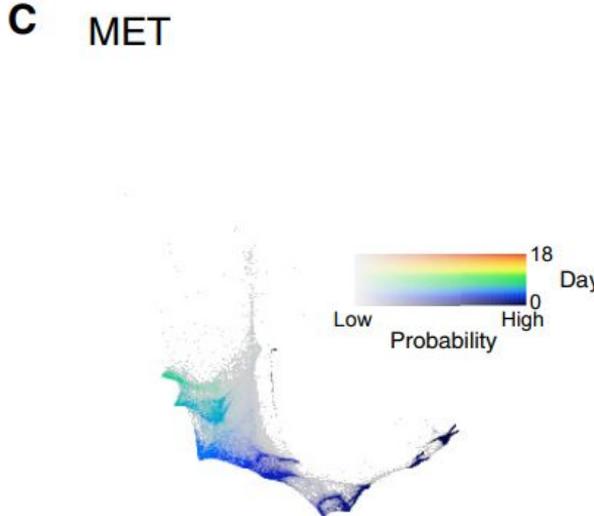
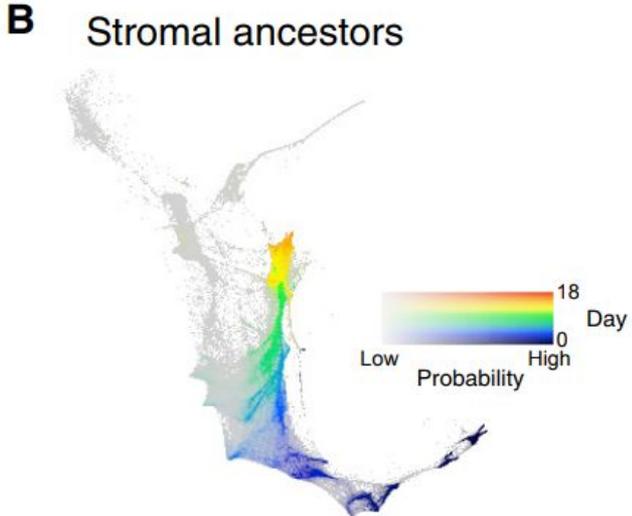
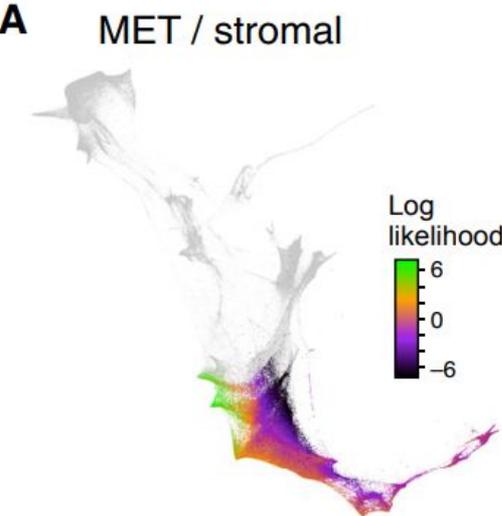
# Modeling Developmental Processes with Optimal Transport



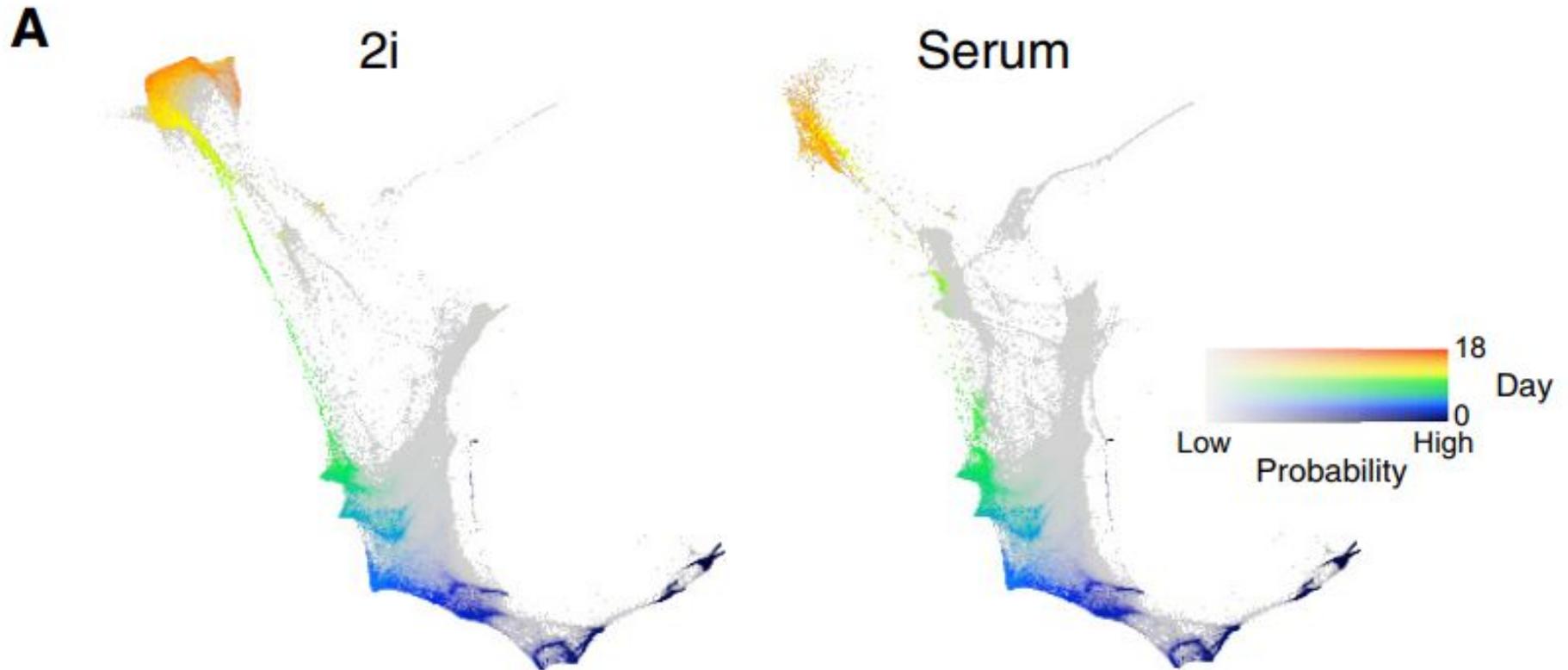
# A Single-Cell RNA-Seq Time Course of iPSC Reprogramming



# In Initial Stages of Reprogramming, Cells Progress toward Stromal or MET Fates

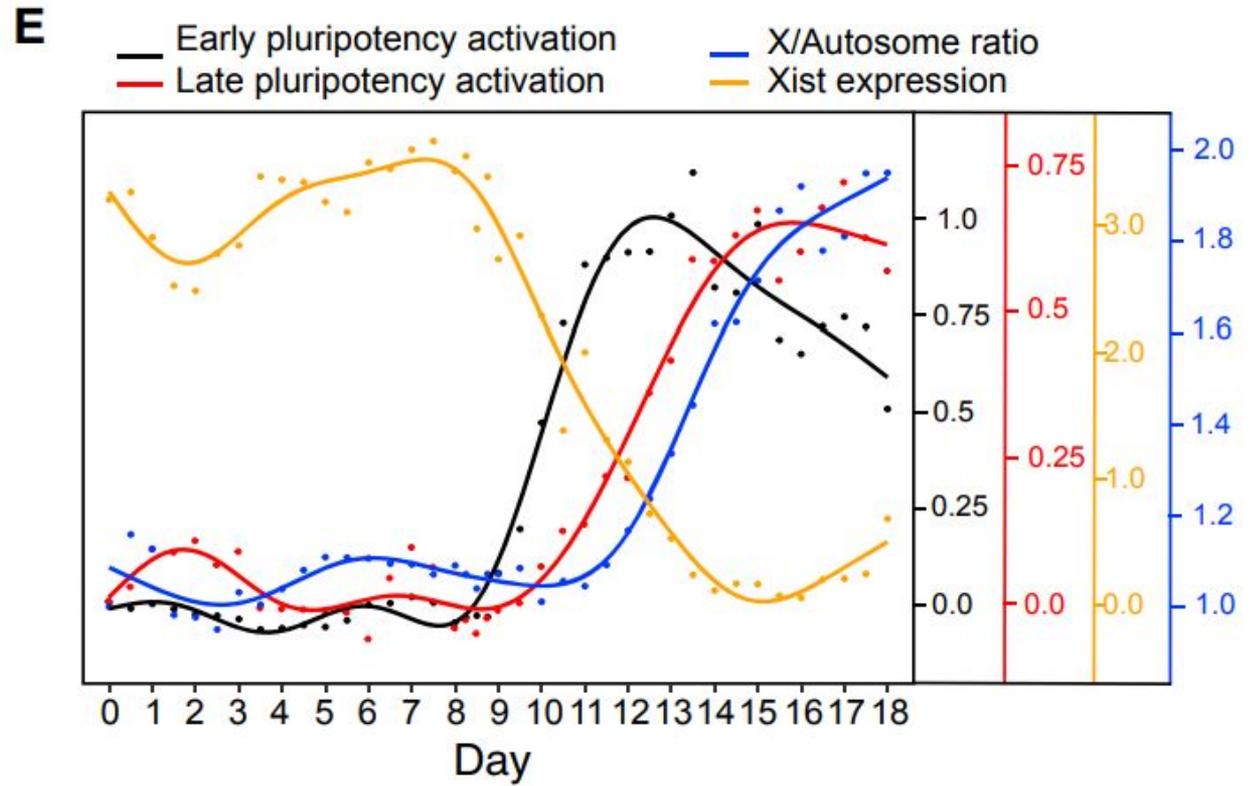
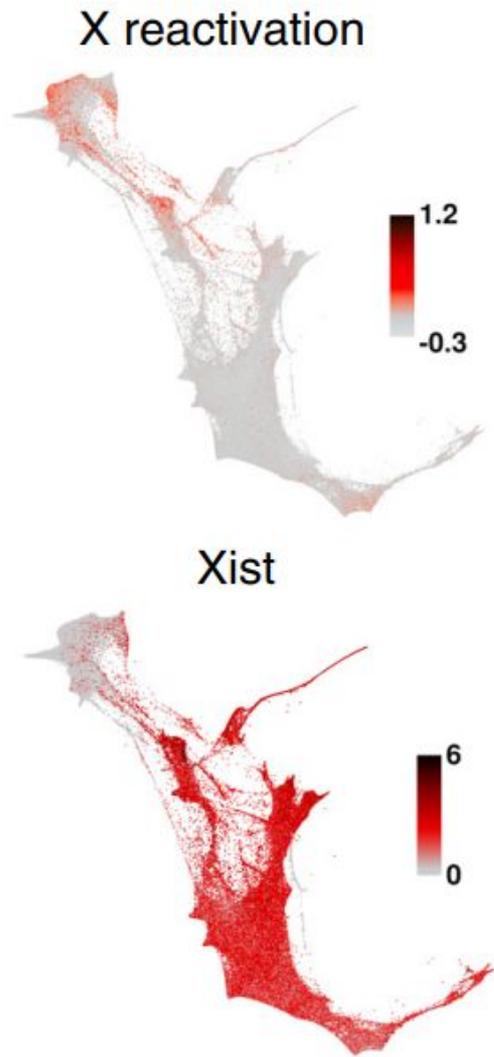


# iPSCs Emerge from Cells in the MET Region

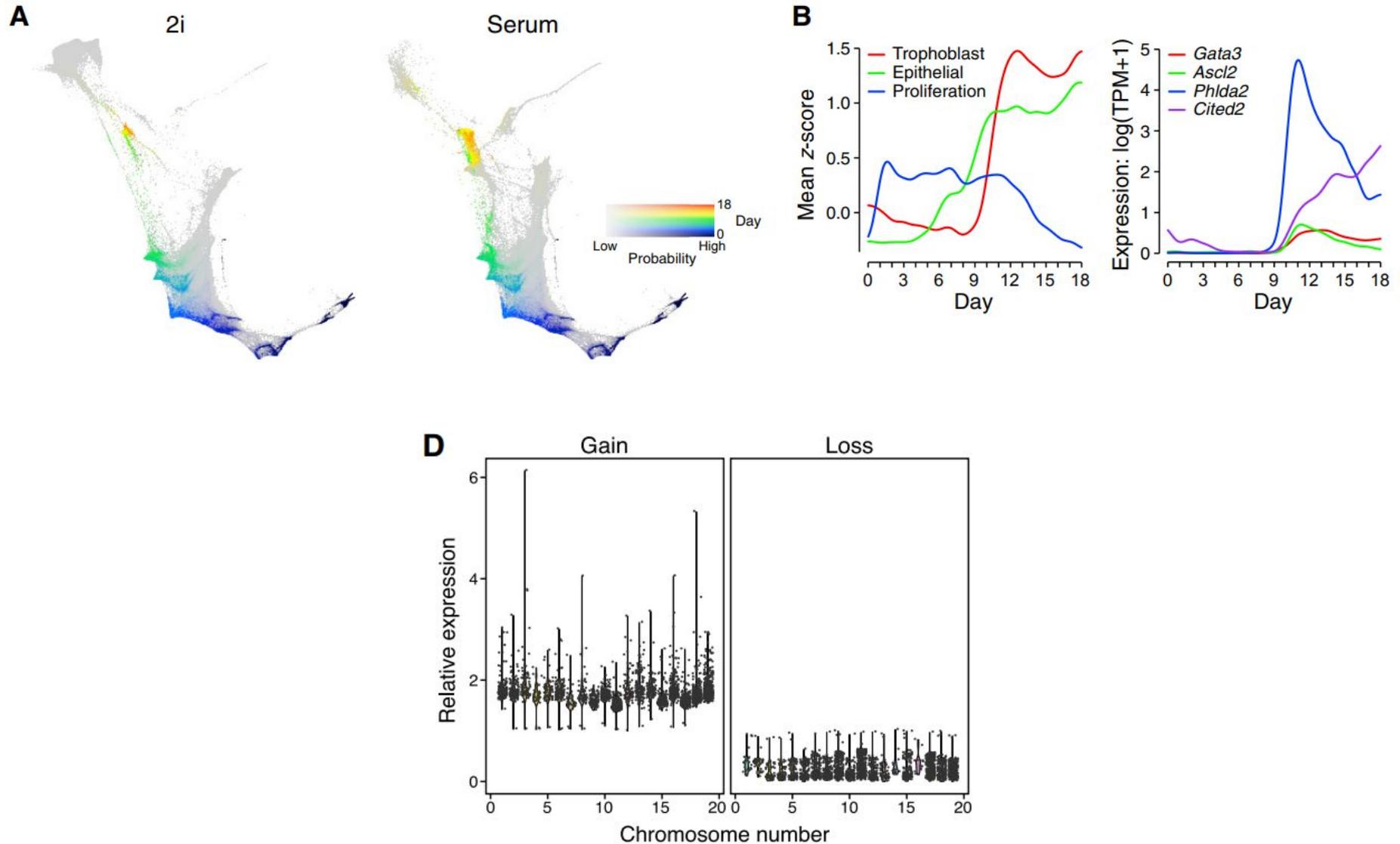


Ancestor trajectory of day 18 iPSCs in 2i (left) and serum (right) (color shows day, intensity shows probability).

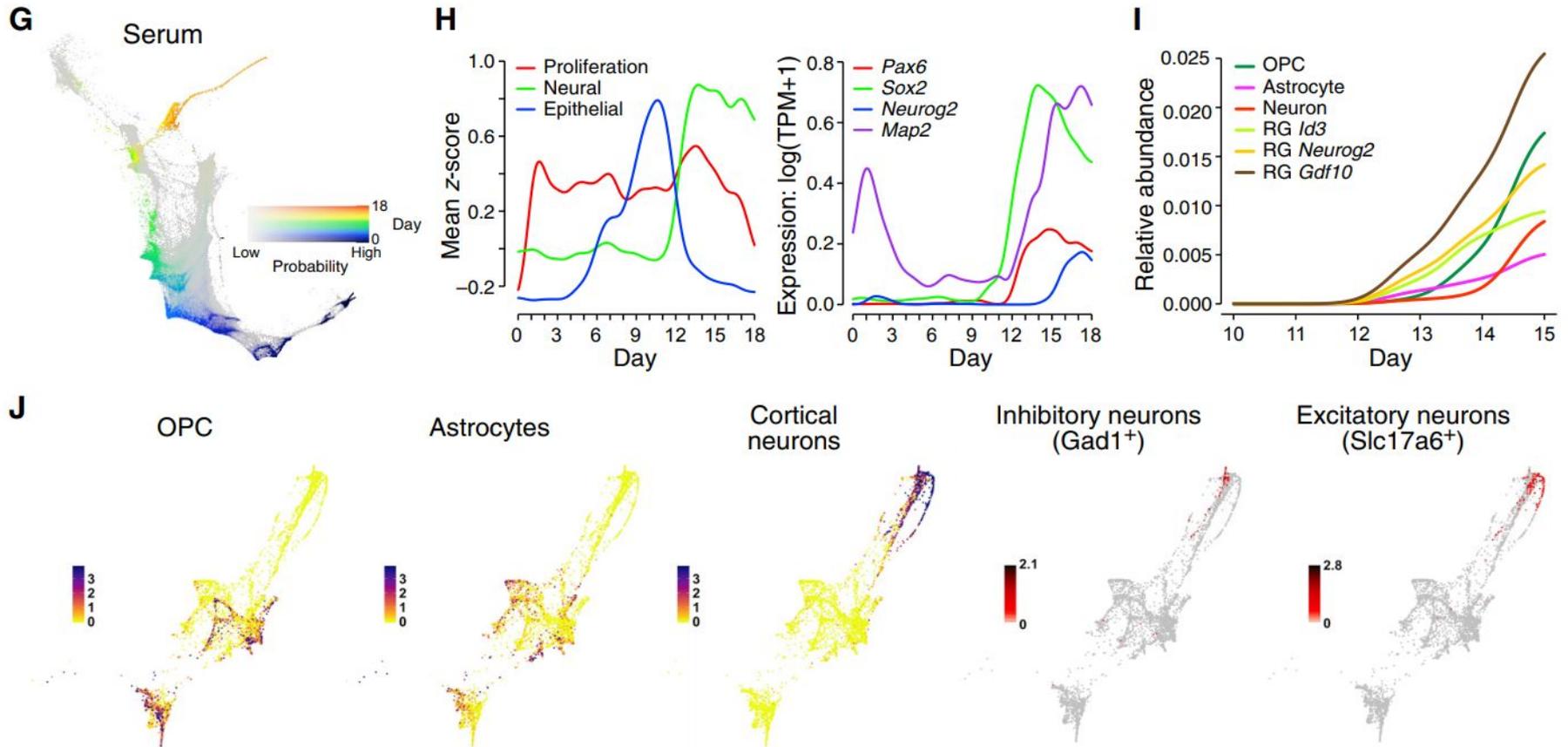
# Trends in X-inactivation, X-reactivation, and pluripotency



# Extra-Embryonic Cells Emerge during Reprogramming



# Neural-like Cells Emerge during Reprogramming

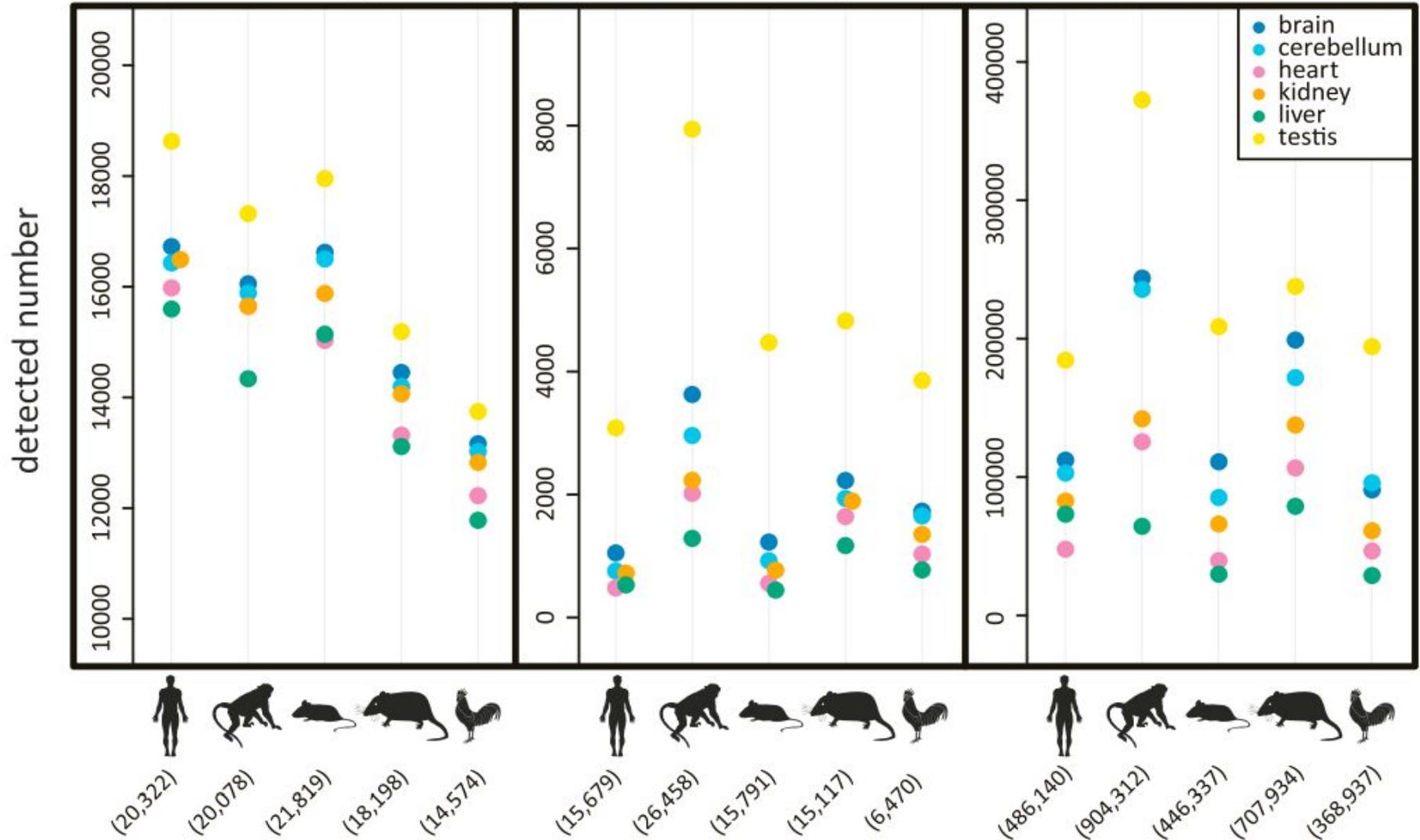


# Cellular Source and Mechanisms of High Transcriptome Complexity in the Mammalian Testis

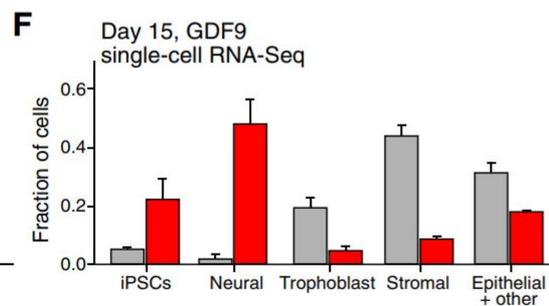
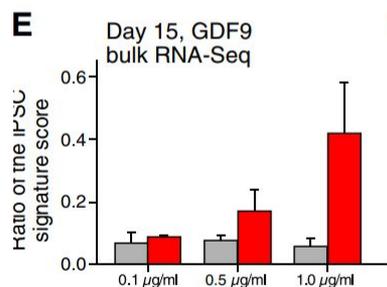
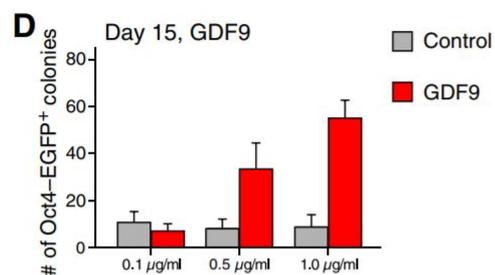
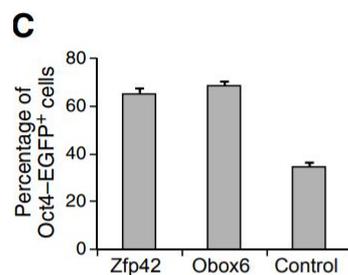
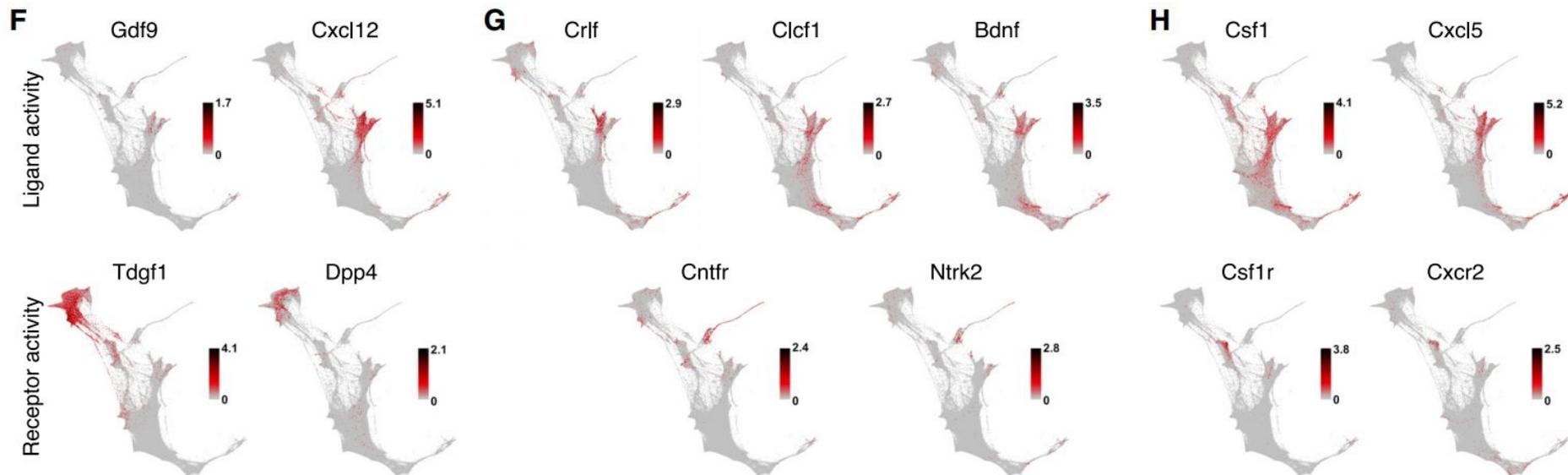
## Protein-coding genes

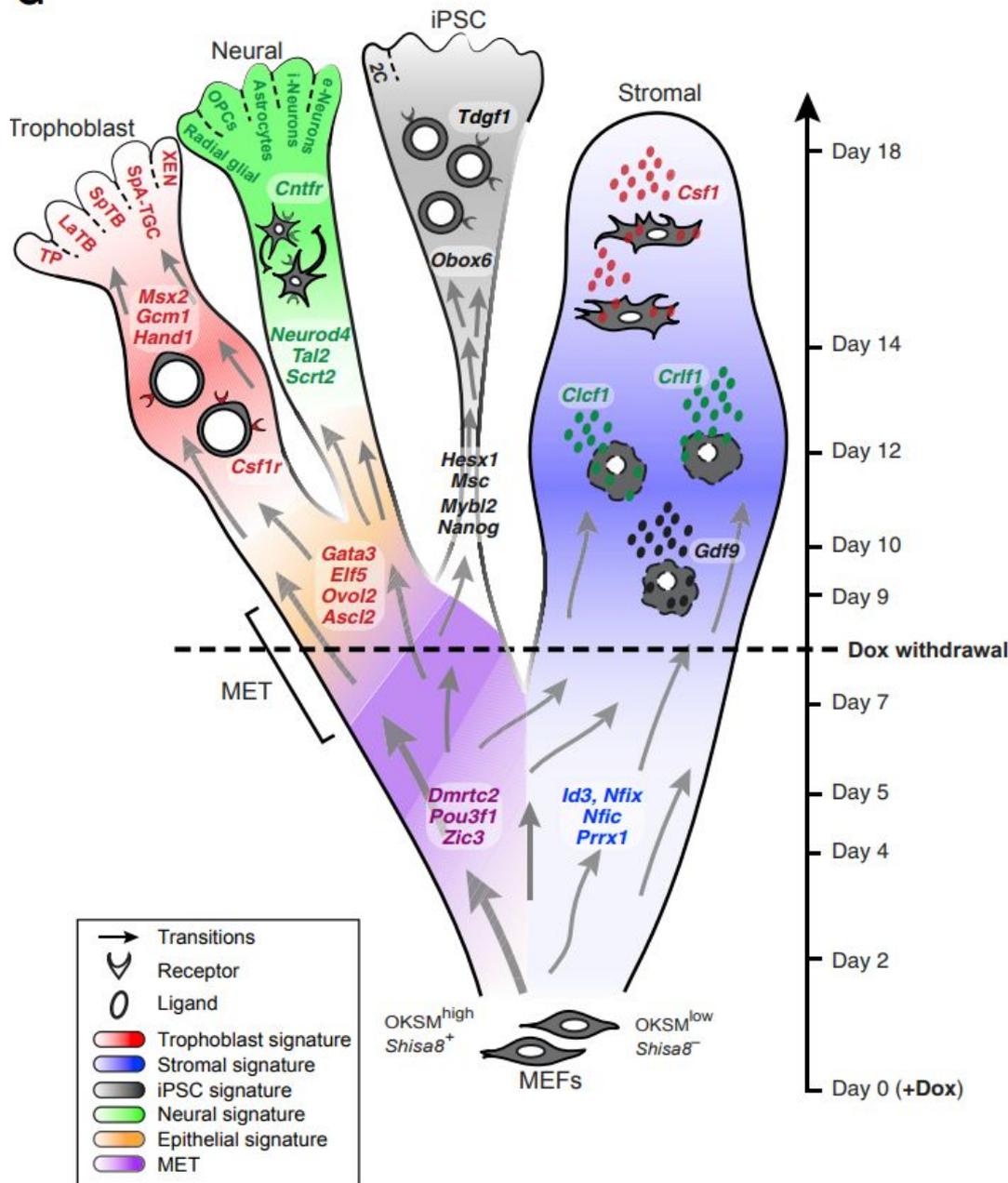
## Predicted lncRNA genes

## Intergenic elements



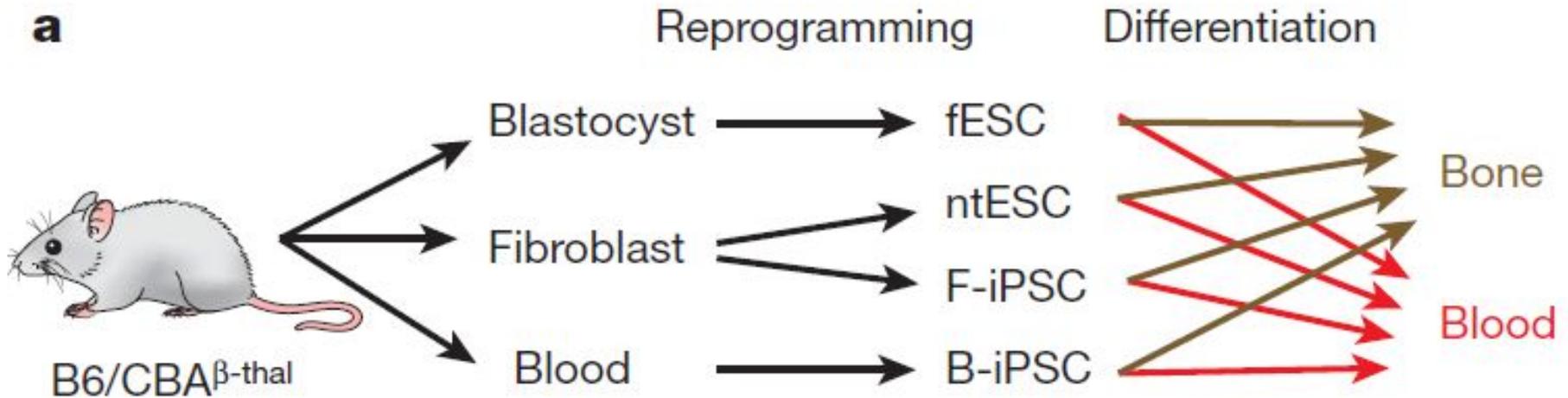
# Paracrine Signaling



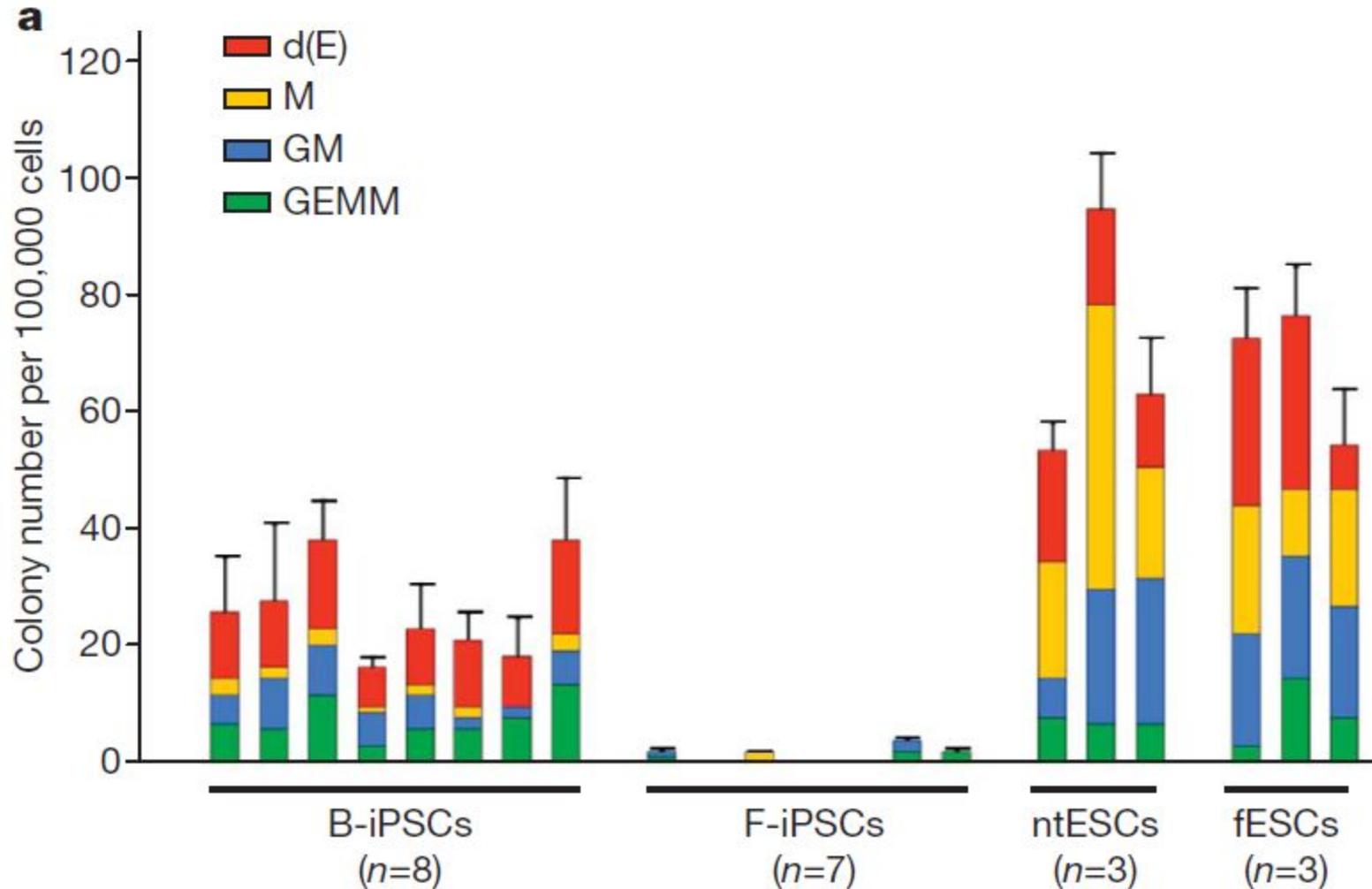
**G**

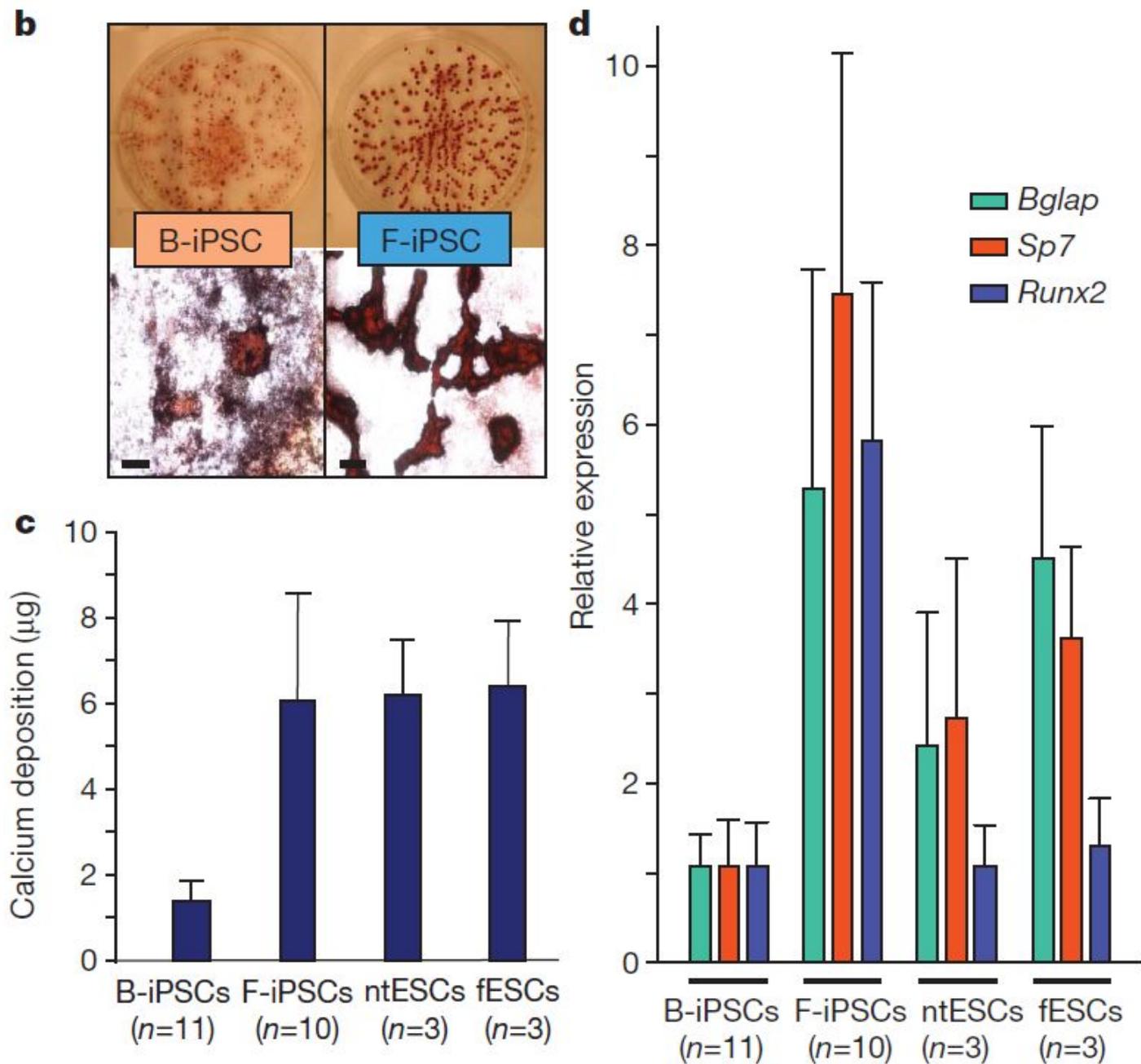
Schematic of the reprogramming landscape in serum.

# Соматическая память



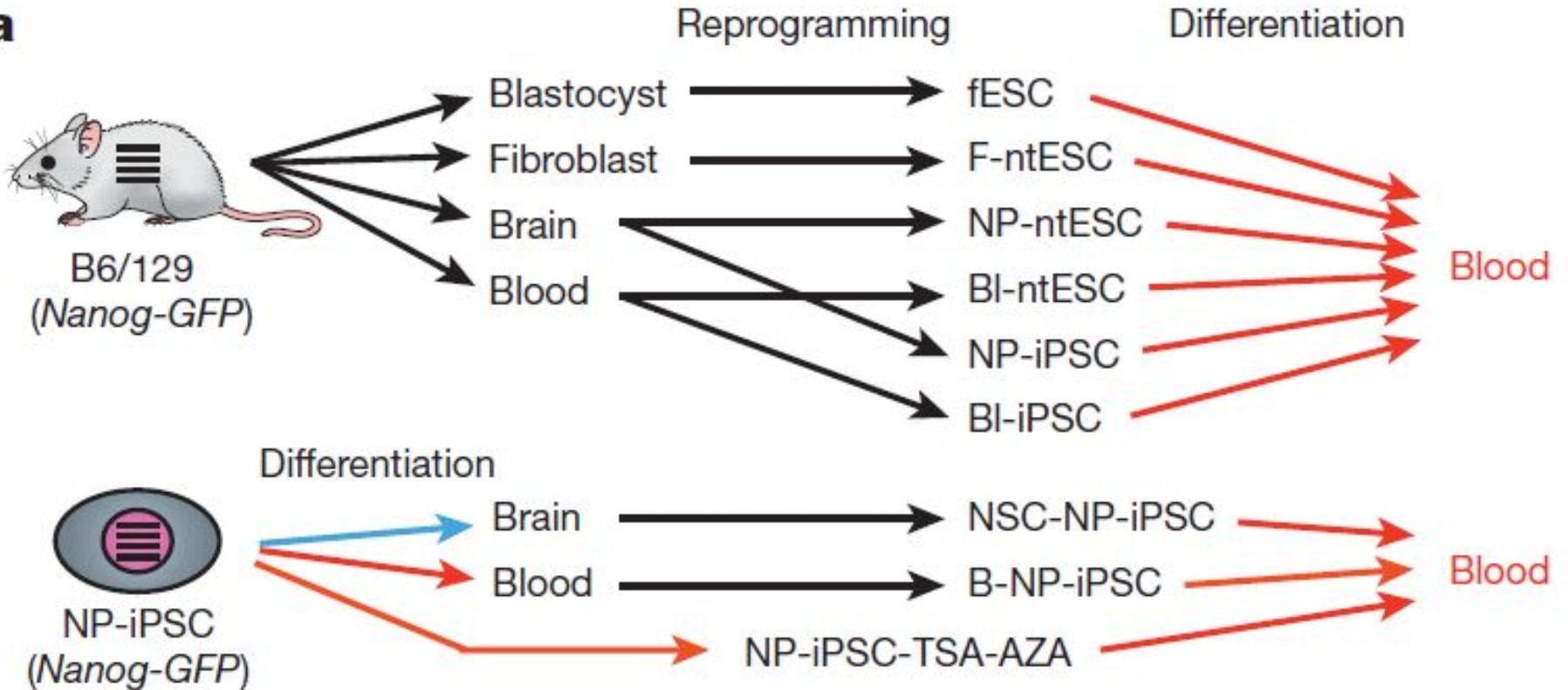
# Соматическая память





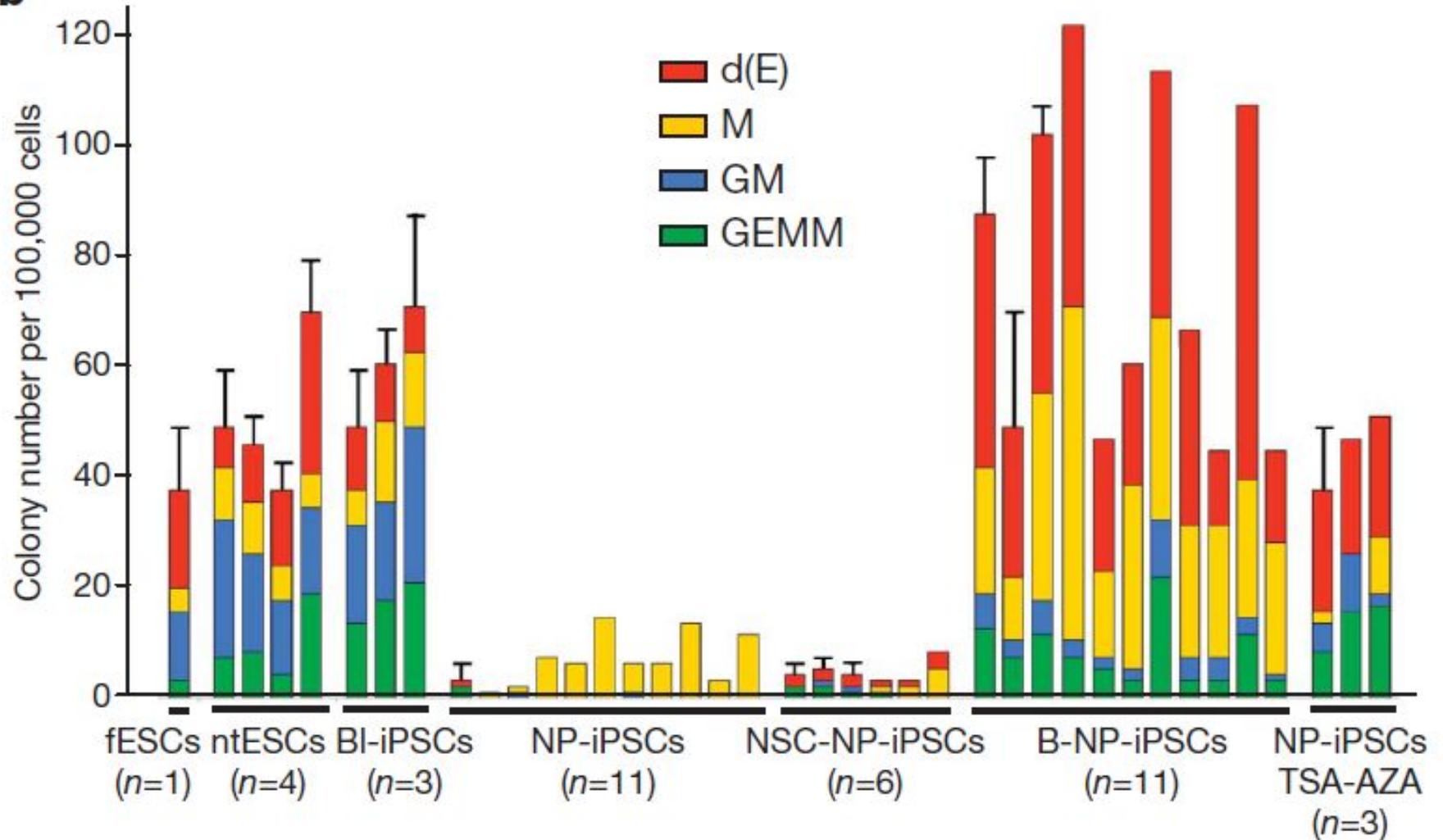
# Соматическая память

**a**



# Соматическая память

**b**



# Нарушения метилирования ДНК в iPSC

клетках

Chromosome 22

45,040,000

49,330,000

e

Genes

ADS-iPSC mCH

Normalized mCH level

IMR90-iPSC

FF-iPSC  
19.11

FF-iPSC  
19.7

FF-iPSC  
6.9

ADS-iPSC

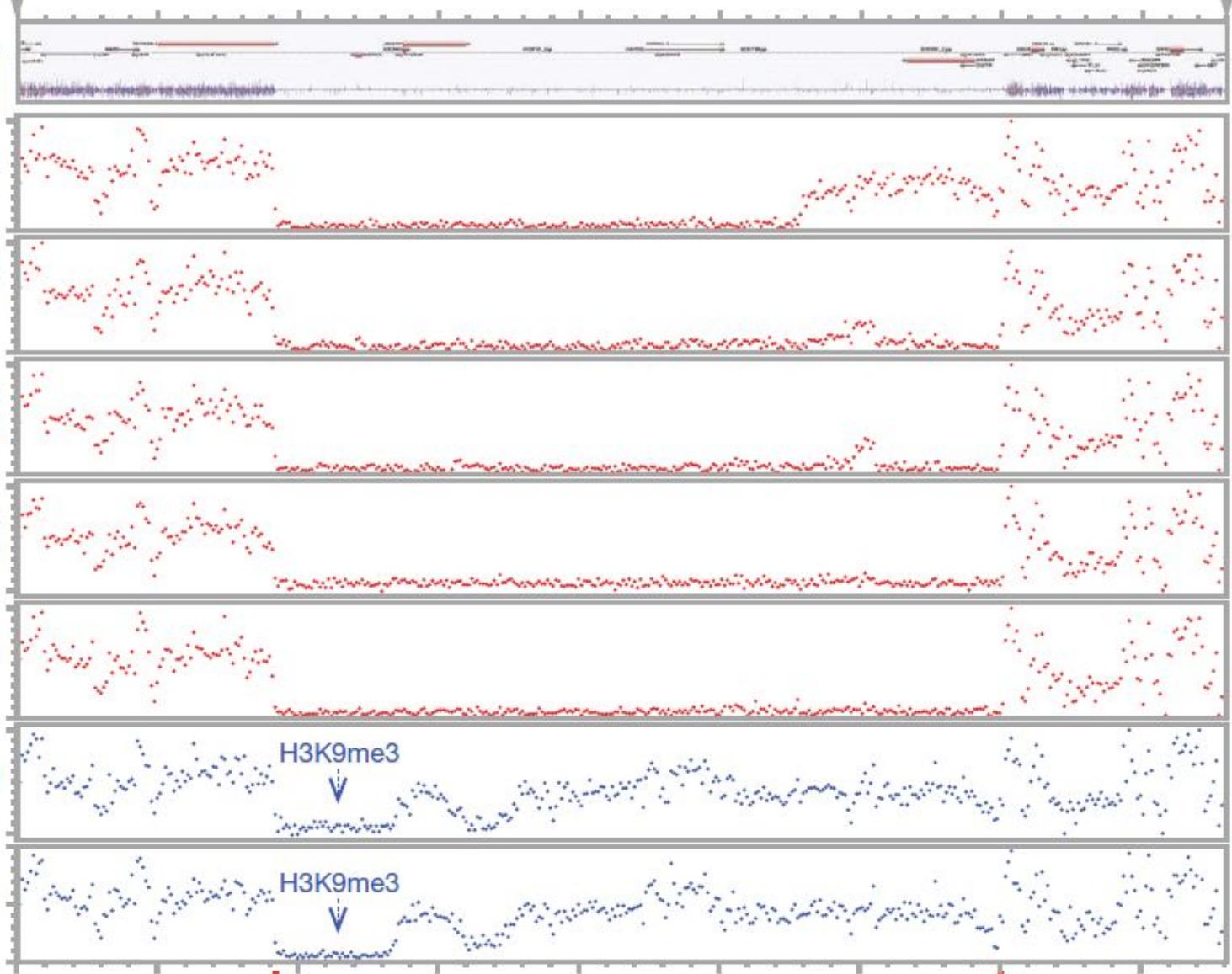
H9

H1

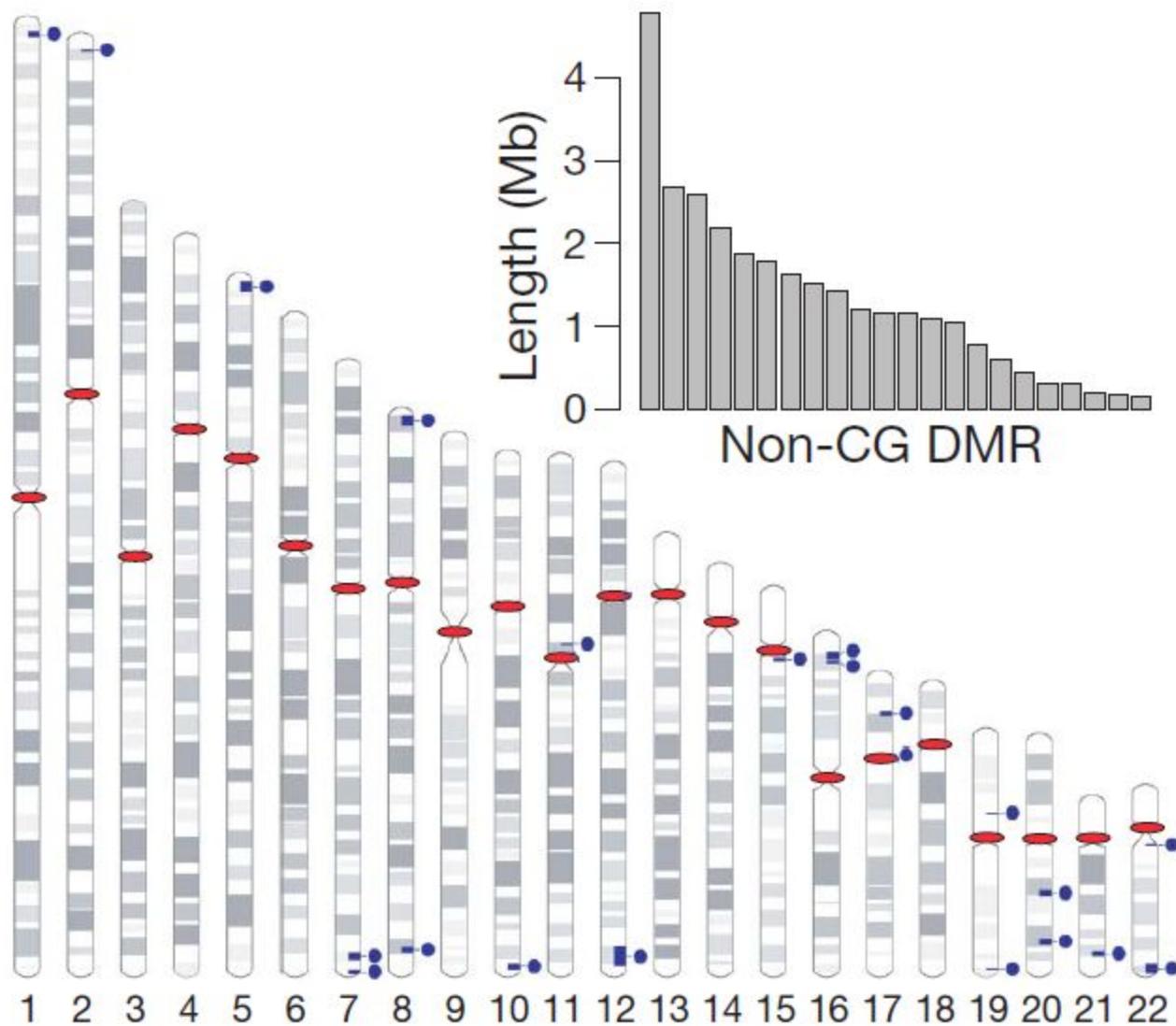
iPSC

ES cell

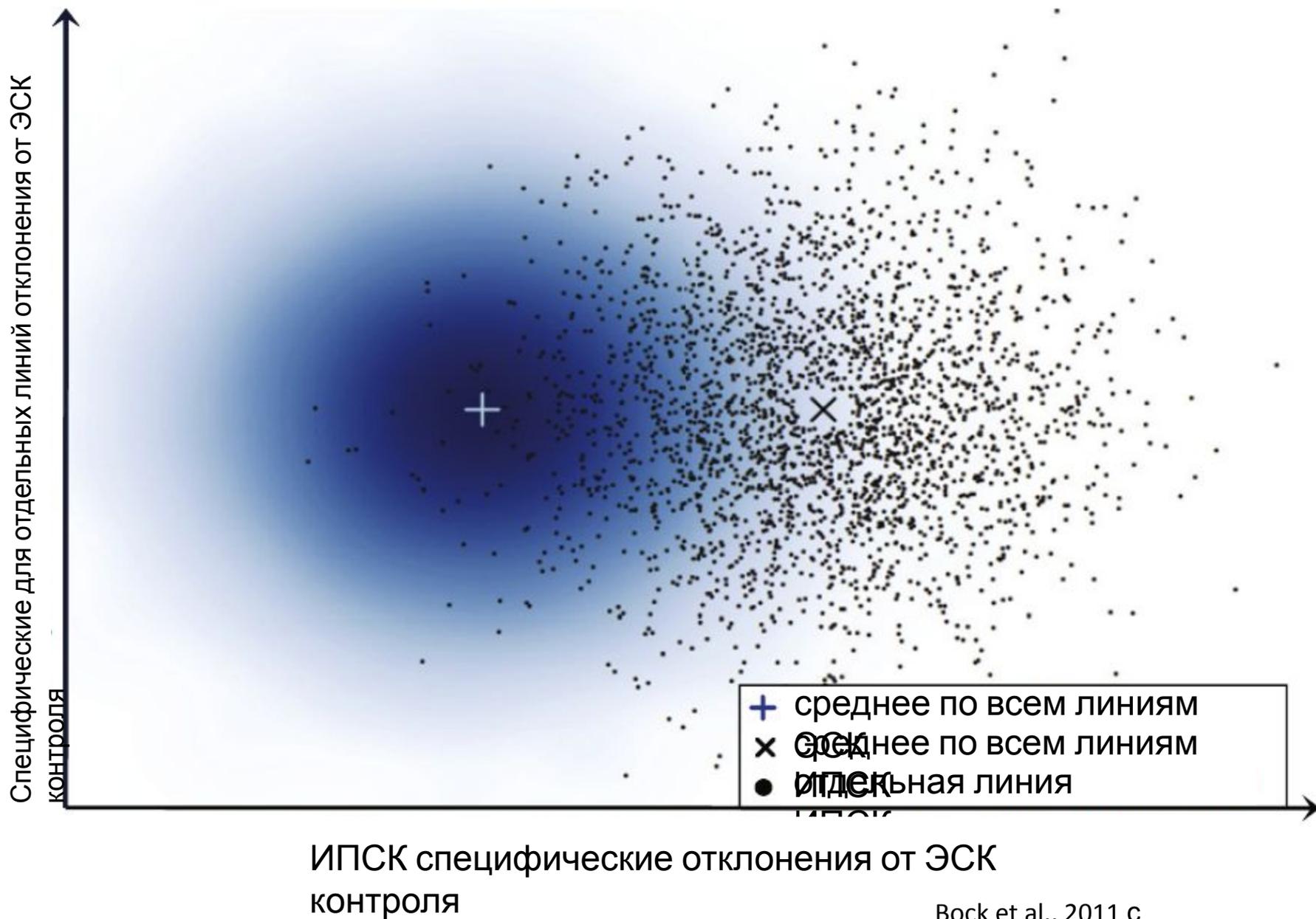
DMD



# Нарушения метилирования ДНК в iPS клетках



# Насколько ИПСК похожи на ЭСК?



# Вопросы к разделу, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

1. Что такое индуцированные плюрипотентные стволовые клетки?
2. Какие перспективы применения ИПСК в медицине вы можете предложить?
3. Какие свойства ИПСК ограничивают их пригодность для применения в медицине?
4. Какие существуют способы доставки репрограммирующих факторов в клетки?
5. Предложите схему лечения пациента страдающего от генетического заболевания (например гемофилии) с использованием ИПСК?