

# Эмбриональные стволовые клетки, которых не существует

Мензоров Алексей

# Основные события



# «СТВОЛОВОСТЬ»

Потенциал дифференцировки	Клеточные типы	Пример стволовых клеток	Результат дифференцировки
<b>Тотипотентность</b>	все	зигота, бластомер	все
<b>Плюрипотентность</b>	все кроме трофобласта	эмбриональные стволовые клетки	клетки, производные трех зародышевых листков
<b>Мультипотентность</b>	многие	гематопэтические стволовые клетки	клетки крови, скелетной и сердечной мускулатуры, печени
<b>Олигопотентность*</b>	несколько	мезенхимальные стволовые клетки	клетки хряща, костной ткани, жировые клетки
<b>Унипотентность</b>	один	предшественники тучных клеток	тучные клетки
<b>Нуллипотентность</b>	ноль	нет деления	терминальная дифференцировка

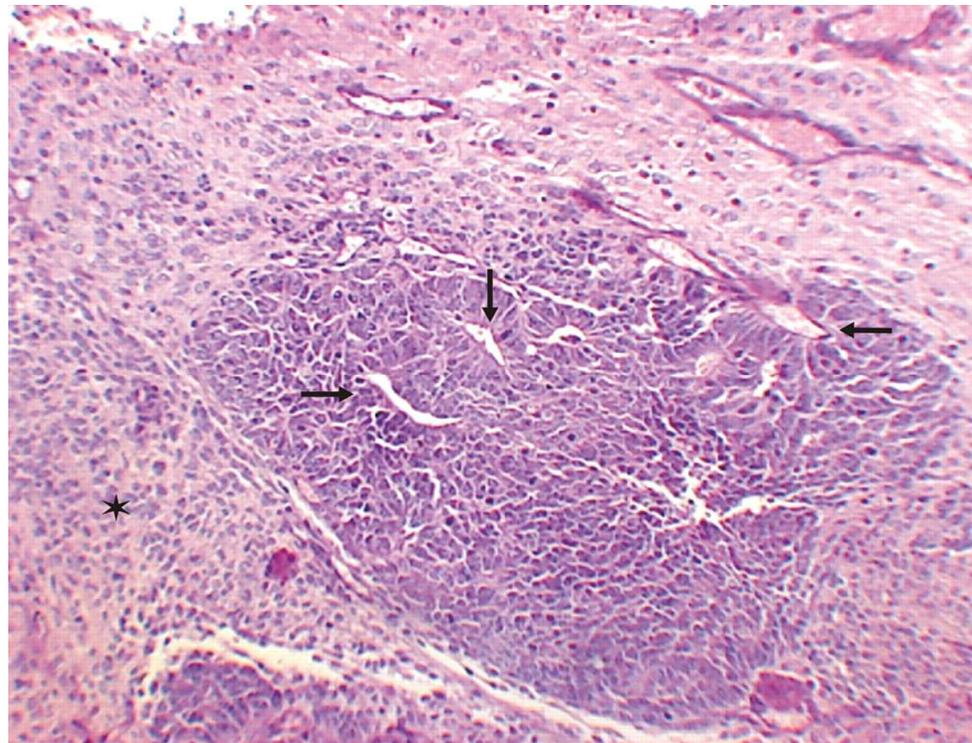
# Всё началось с тератокарцином

- 1954 Стивенс и Литл:  
«Из плюрипотентных эмбриональных клеток формируются как быстро дифференцирующиеся клетки, так и, подобные им самим, недифференцированные»

*Фактически определение ЭС клеток*

# Тератокарцинома

- Герминативная опухоль, состоящая из смеси дифференцированных и недифференцированных клеток



# Линия мышей 129

- Высокая частота спонтанных тестикулярных тератокарцином (1-3%)



# Основные свойства тератокарцином (*in vivo*)

- Перевиваемость
- Происхождение – примордиальные половые клетки эмбриональных семенников
- Одна клетка *in vivo* способна дать спектр дифференцированных тканей

# Для чего были нужны клетки ЭК?

- Система для изучения дифференцировки плюрипотентных клеток *in vitro*

# Клетки эмбриональных тератокарцином (*in vitro*)

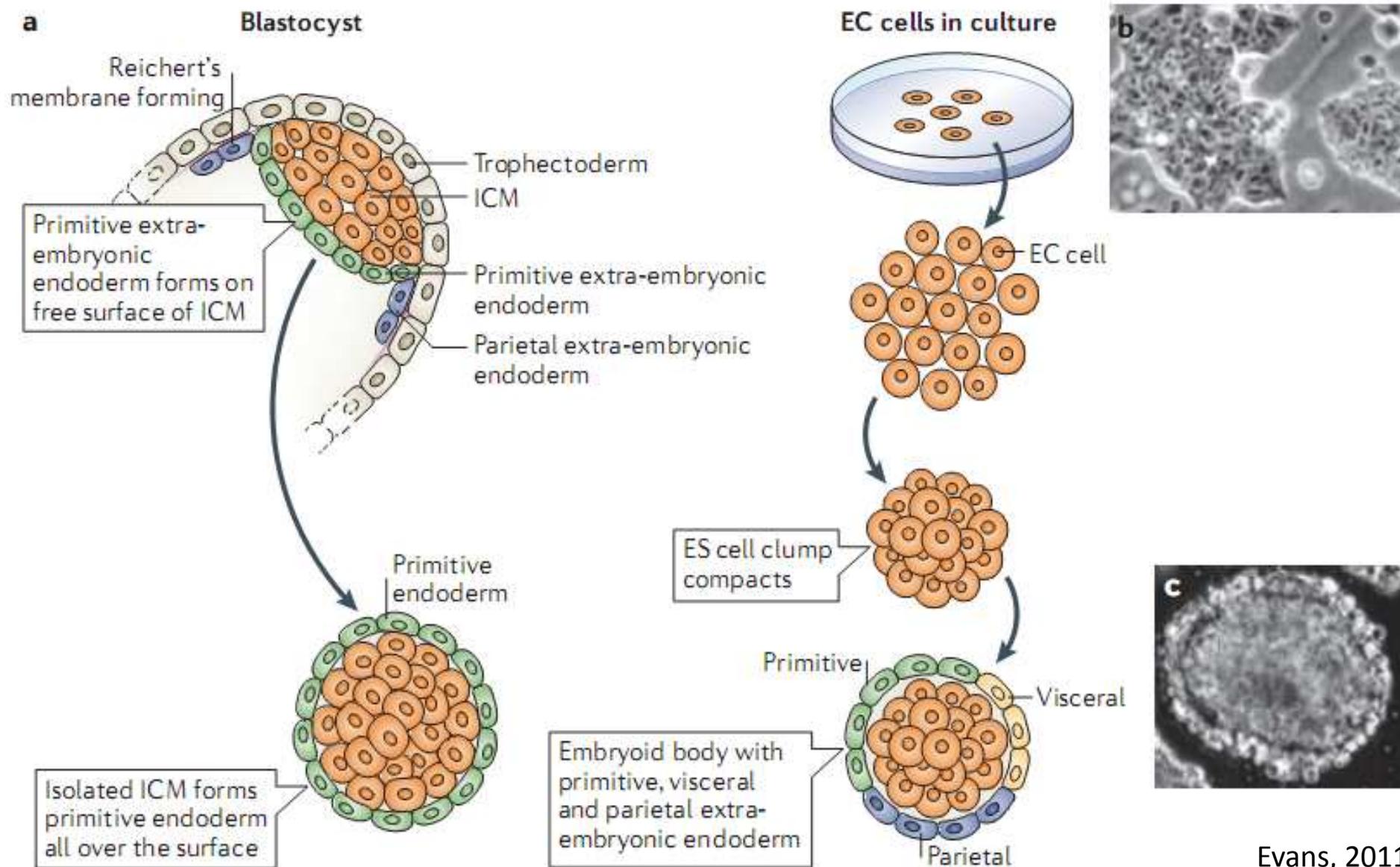
- В отличие от эмбриона – легко изучать
- Клональность, необходимо получить клон, чтобы показать, что дифференцировка проходит *in vitro*, а не *in vivo*

# Культивирование клеток ЭК

- Линия мышей **129**
- Культивирование клеток ЭК на **фидере**, облученных фибробластах цыплят



# Сходство между дифференцировкой ВКМ и кластера клеток ЭК



# Вывод

- Клетки эмбриональной карциномы ведут себя в культуре как нормальные клетки эмбриона вне контекста (1975).

# Плюрипотентность клеток ЭК

- Дифференцировка в различные типы клеток *in vitro* и *in vivo*
- Химерные мыши со вкладом клеток ЭК



Химерная мышь со вкладом гибридных клеток ЭС фенотипа\*



\* - пример химерного животного, клетки не ЭК.

# 1981

- Методы культивирования клеток ЭК
- Дифференцировка клеток ЭК
- Маркеры клеток ЭК (**SSEA1**)
- Линия мышей **129**
- Использование клеток фидера

⇒ Получение **эмбриональных стволовых клеток** мыши

# 1981

Nature. 1981 **Jul 9** 292(5819):154-6.

## **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.**

Evans MJ, Kaufman MH.

**Нобелевская премия по физиологии и медицине 2007:**  
Марио Капеччи, Оливер Смитис и сэр Мартин Эванс

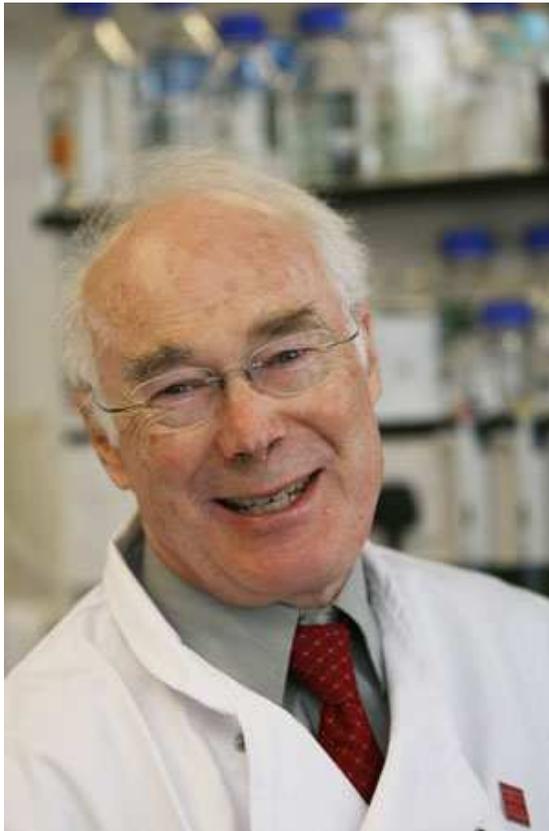
Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 **Dec** 78(12):7634-8.

## **Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.**

Martin GR.

**Термин «эмбриональные стволовые клетки»**

Не перепутайте!



**Мартин Эванс**

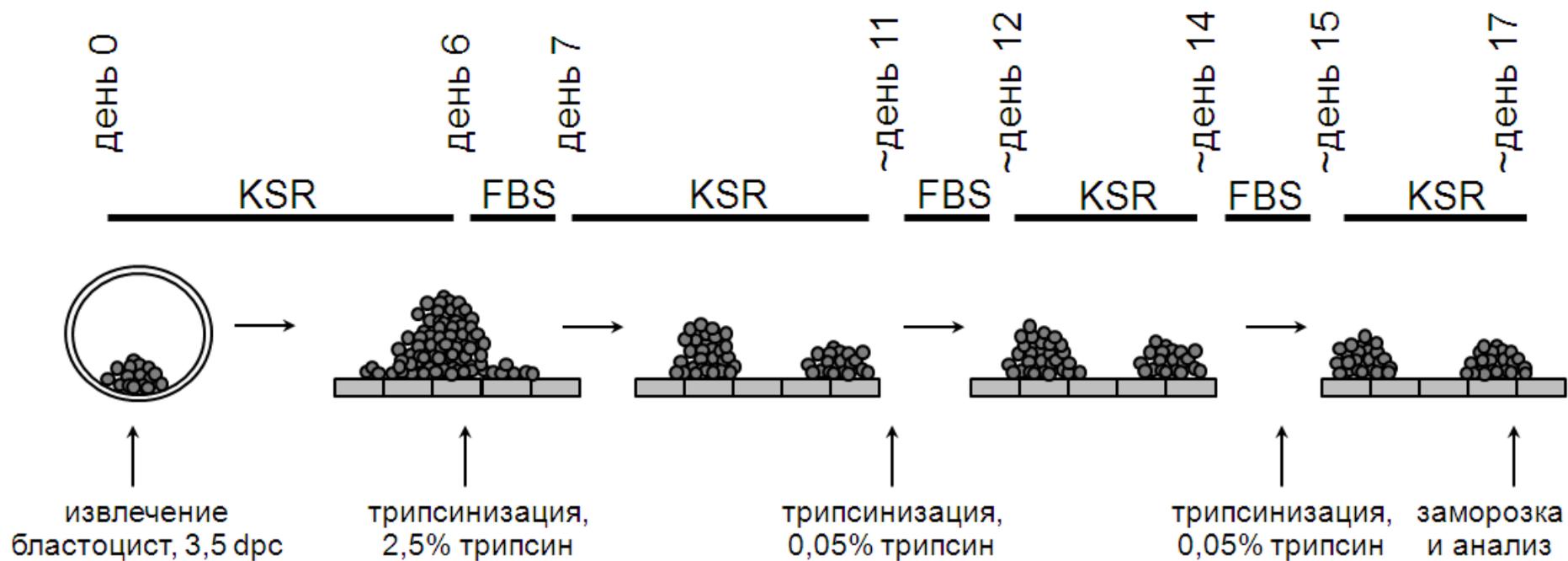


**Гэйл Мартин**

# Эмбриональные стволовые клетки МЫШИ

- Плюрипотентность
- Способность неограниченно размножаться *in vitro*
- Диплоидный хромосомный состав\*
- Клоногенность

# Протокол получения ЭС клеток



# Колонии линии ЭС клеток 4-11-45, пассаж 2



# Маркеры ЭС клеток мыши

Поверхностные антигены:

- SSEA1

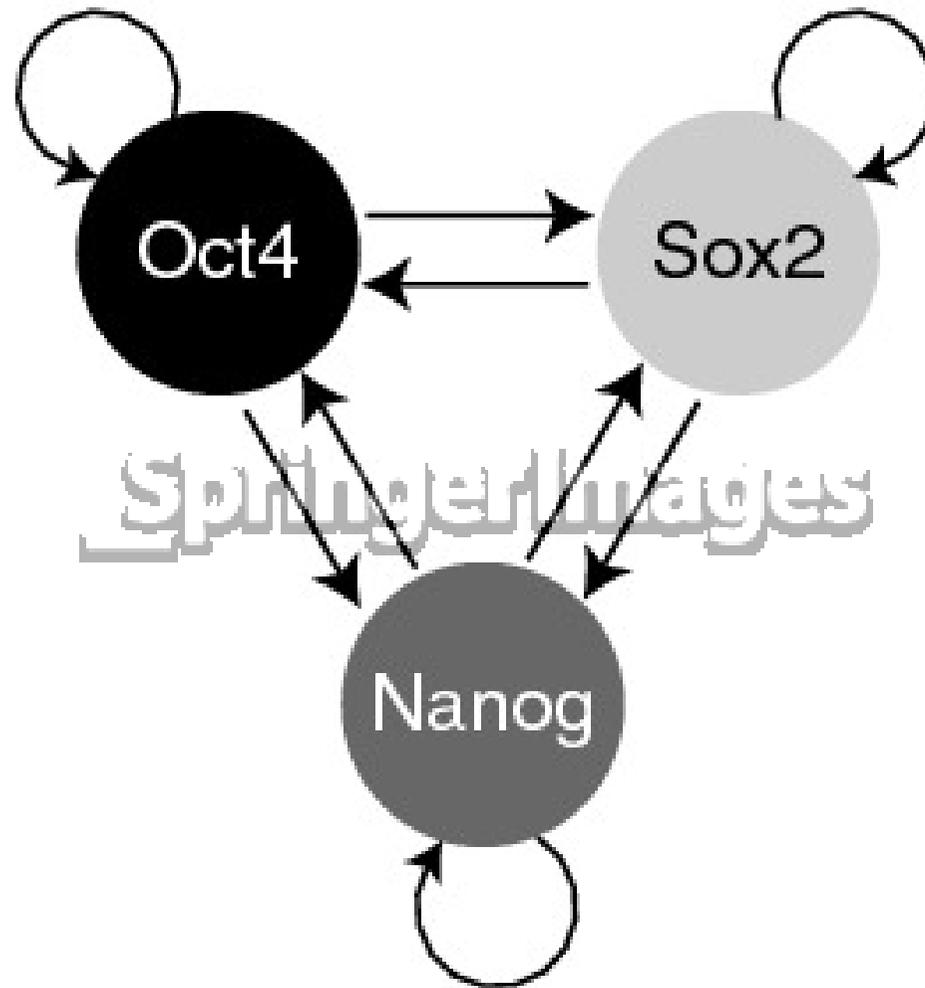
Транскрипционные факторы:

- Oct4
- Sox2
- Nanog

Другое:

- Рецептор к LIF
- Активность теломеразы

# Регуляторная сеть в ЭС клетках



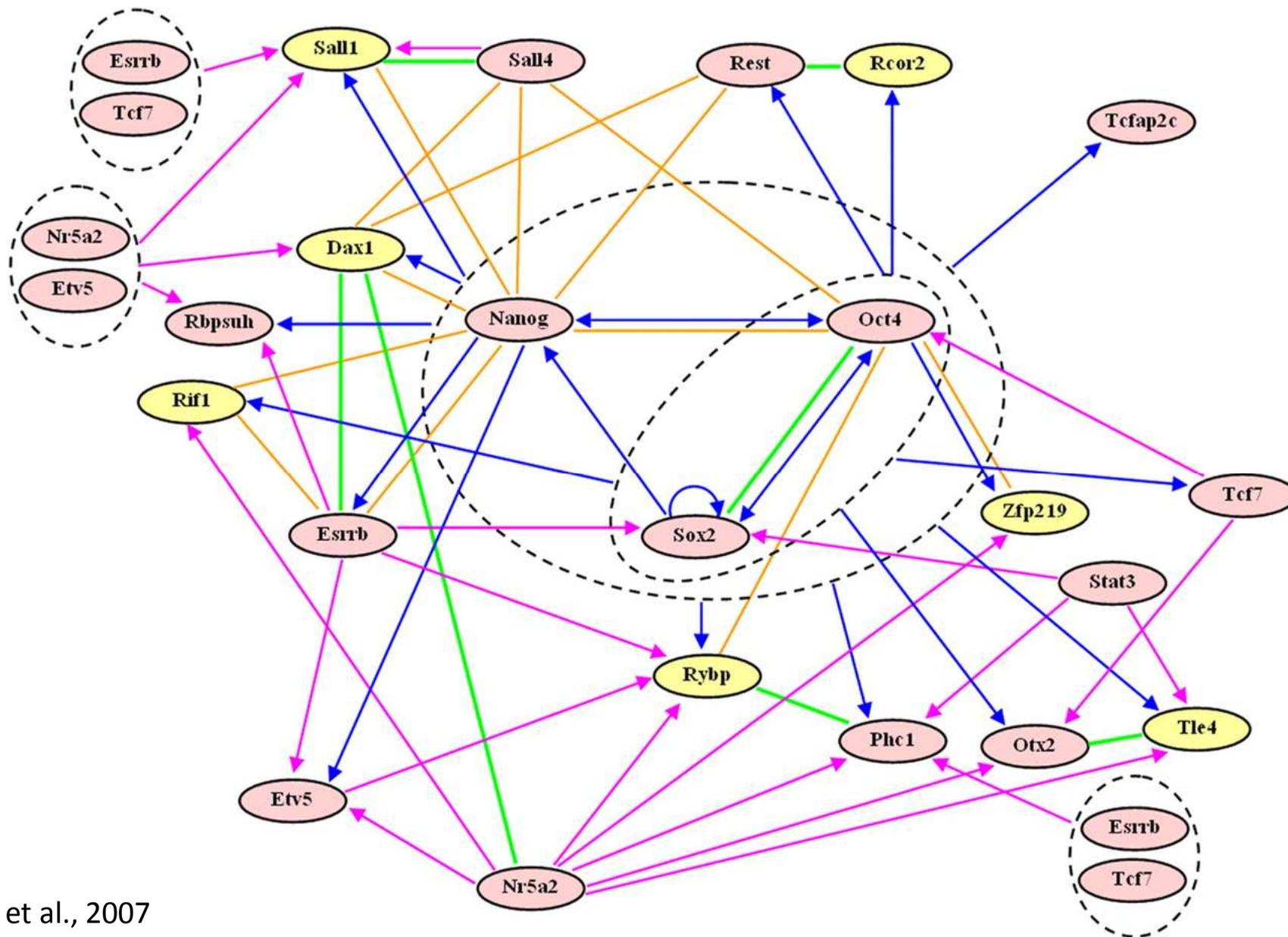
# Oct4

- Транскрипционный фактор
- Связывается с октамером 5'-ATTTGCAT-3'\*
- Экспрессия в плюрипотентных клетках и клетках зародышевого пути
- Регуляция транскрипции – сам по себе и в комплексе с другими ТФ (**Oct4-Sox2**)

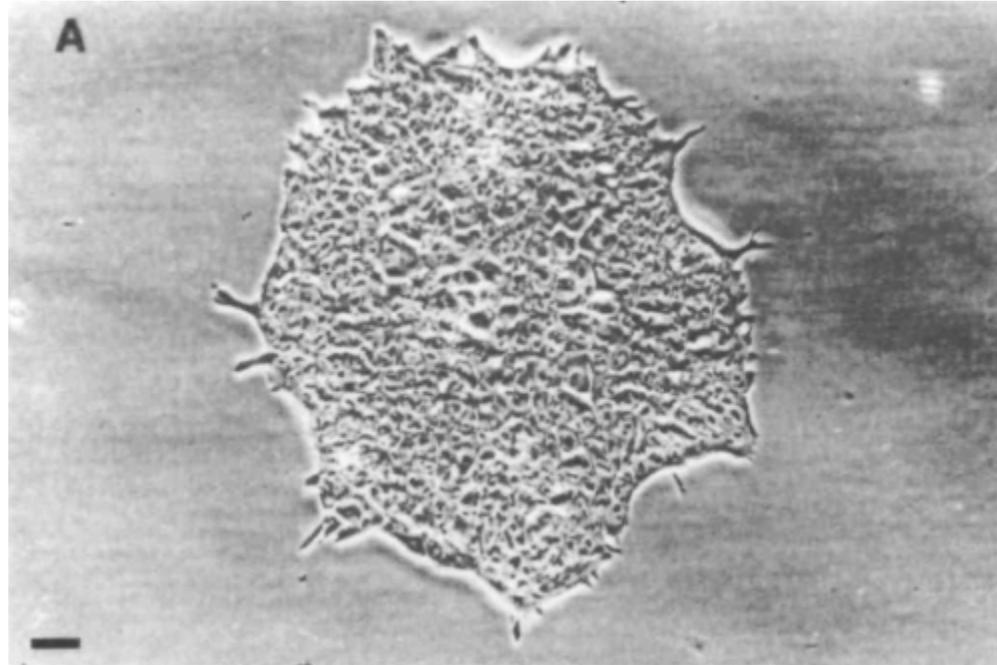
# Nanog

- **Tír na nÓg – Тир на Ног** – в кельтской мифологии «остров юных», страна вечной молодости, остров вечной молодости
- Обеспечивает самообновление ЭС клеток
- Экспрессия в плюрипотентных клетках

# Регуляторная генная сеть в мЭСК



# Необходим ли фидер?

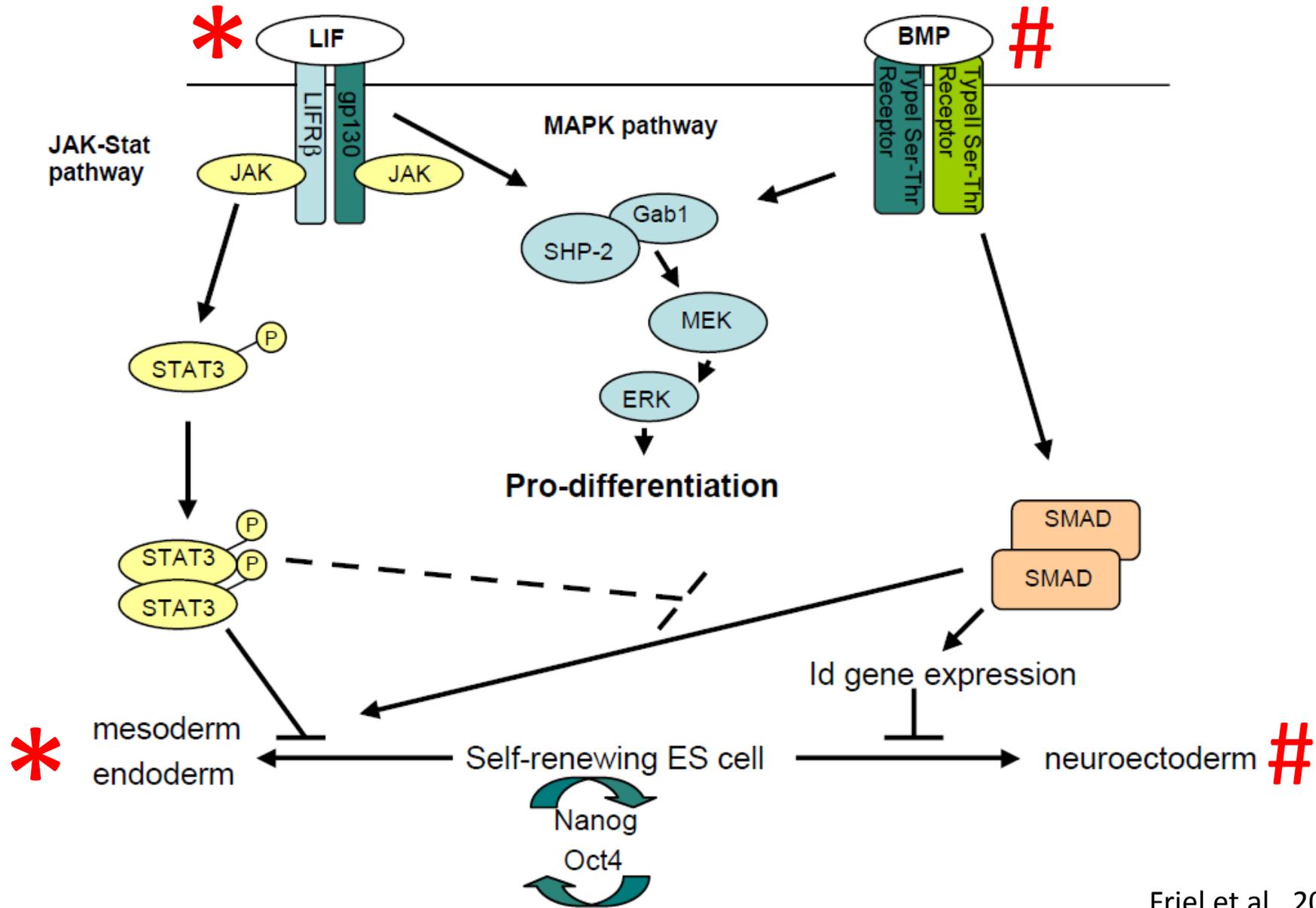


Колония ЭС клеток, полученная без использования фидерных клеток

**LIF – Leukemia inhibitory factor**, фактор ингибирующий лейкемию.  
Блокирует дифференцировку ЭС клеток

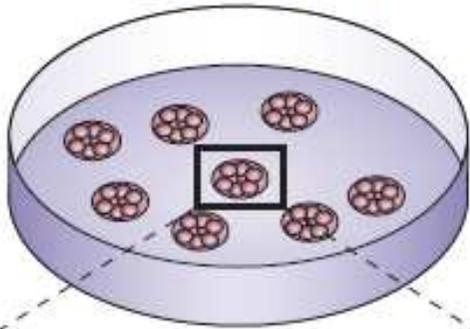
Физиологическая роль **LIF** – поддержание жизнеспособности  
ВКМ в диапаузе

# Сигнальные пути самообновления ЭСК

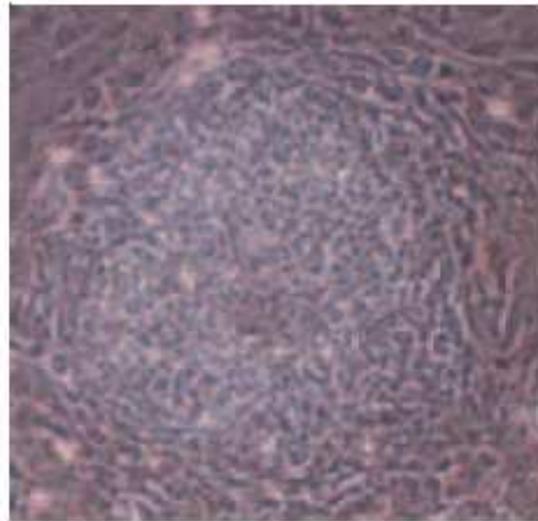
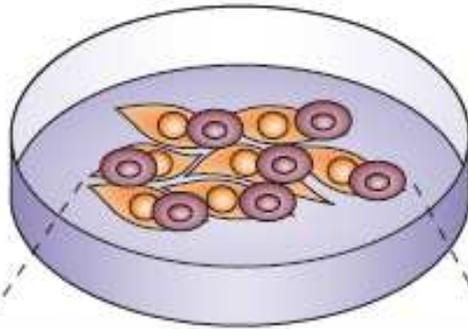


# Дифференцировка *in vitro*

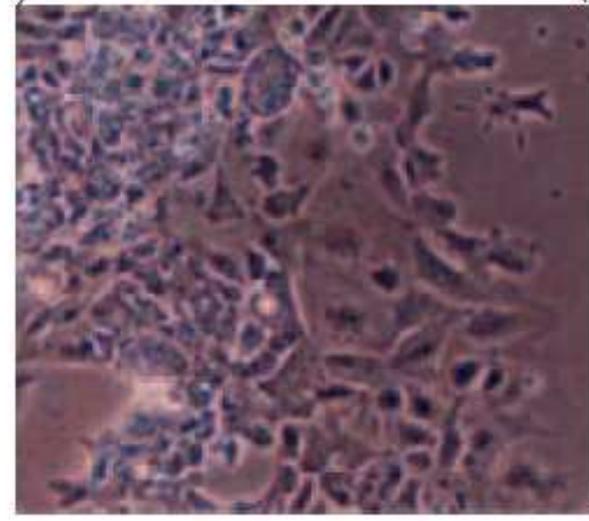
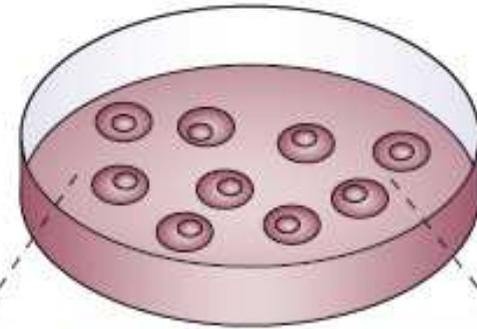
Эмбрионидные тельца



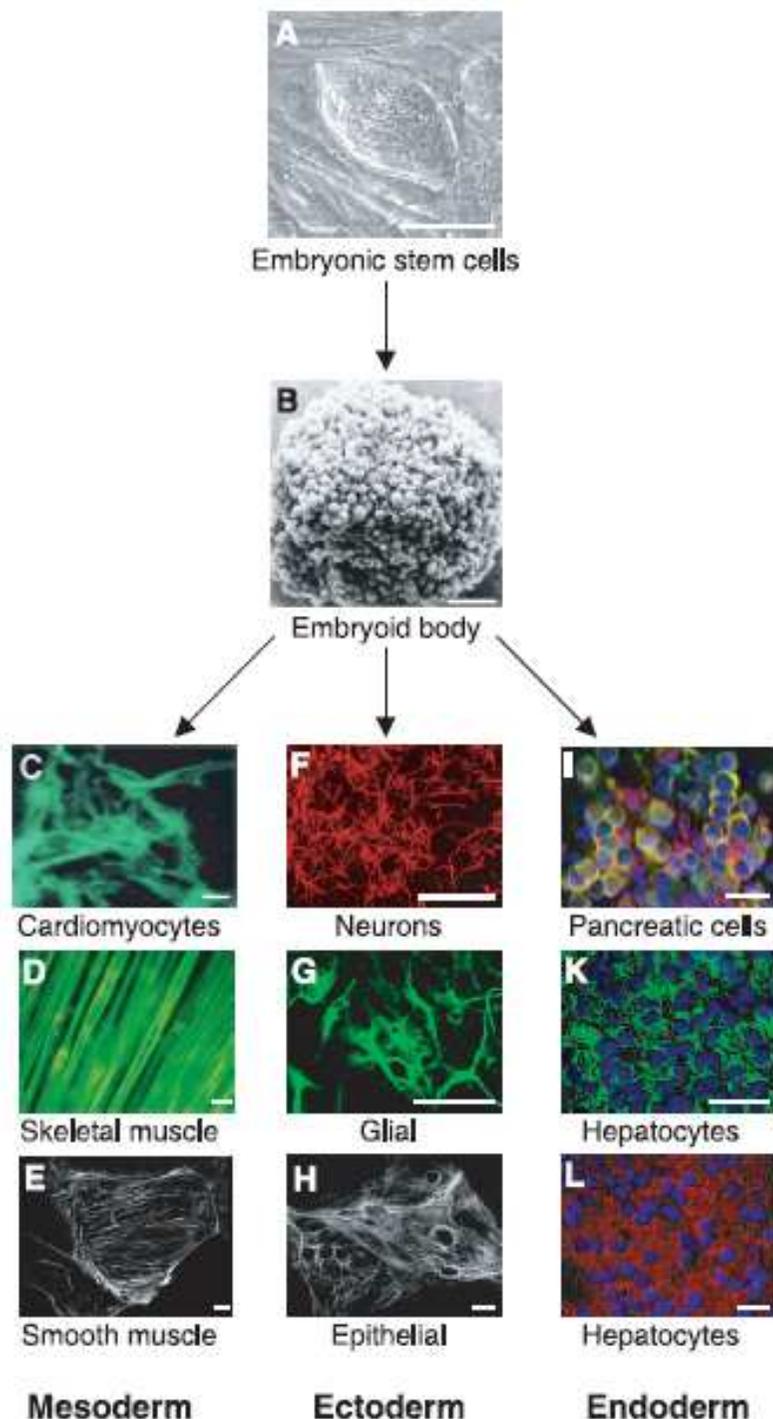
Сокультивирование



Матрикс



# Дифференцировка *in vitro*



- Формирование эмбрионидных телец:
1. Спонтанная дифференцировка
  2. Клетки 3-х зародышевых листков\*
  3. Имитация эмбрионального развития

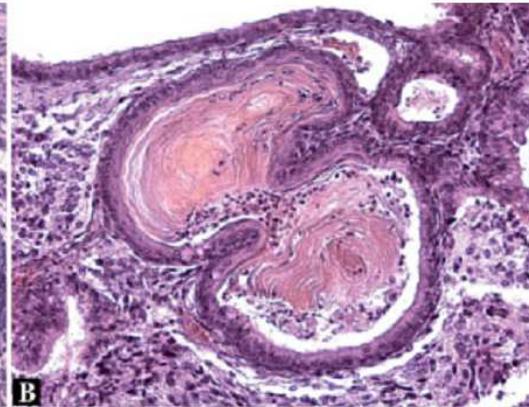
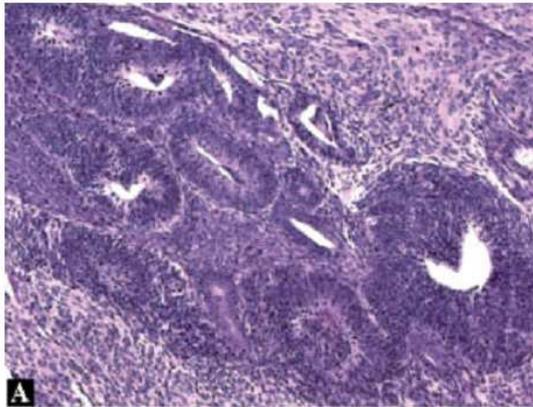
-LIF  
+RA  
+...

# Дифференцировка ЭС клеток *in vivo*

- Формирование **тератом** при инъекции ЭС клеток иммунодефицитным мышам
- Получение **химерных мышей** при инъекции ЭС клеток в бластоцисту или при агрегации с морулой
- **Тетраплоидная комплементация**

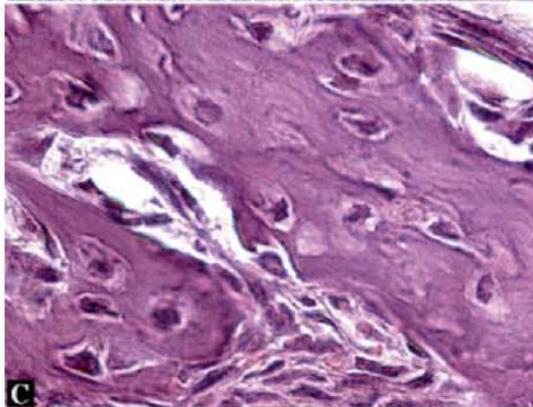
# Формирование тератом

Нейральный  
эпителий



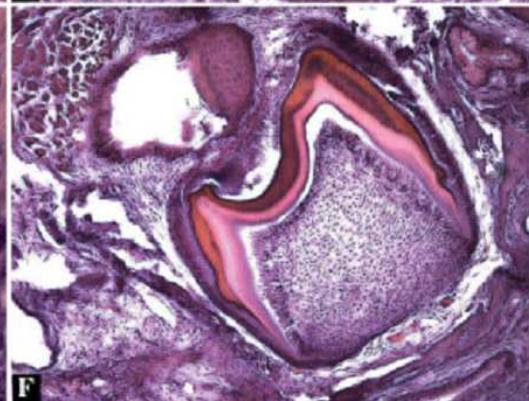
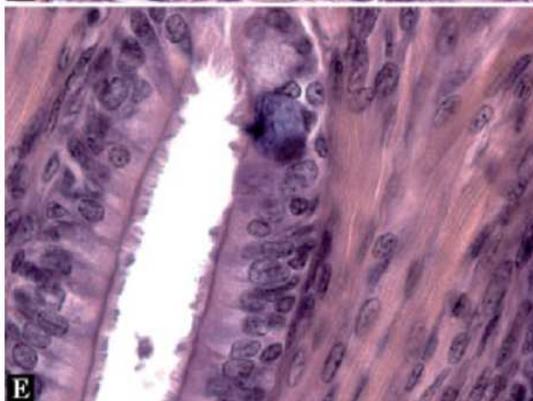
Фокус  
кератинизации

Костная ткань



Хрящ

Реснитчатый  
эпителий



Зачаток зуба

\* Тератомы получены  
из гибридных клеток

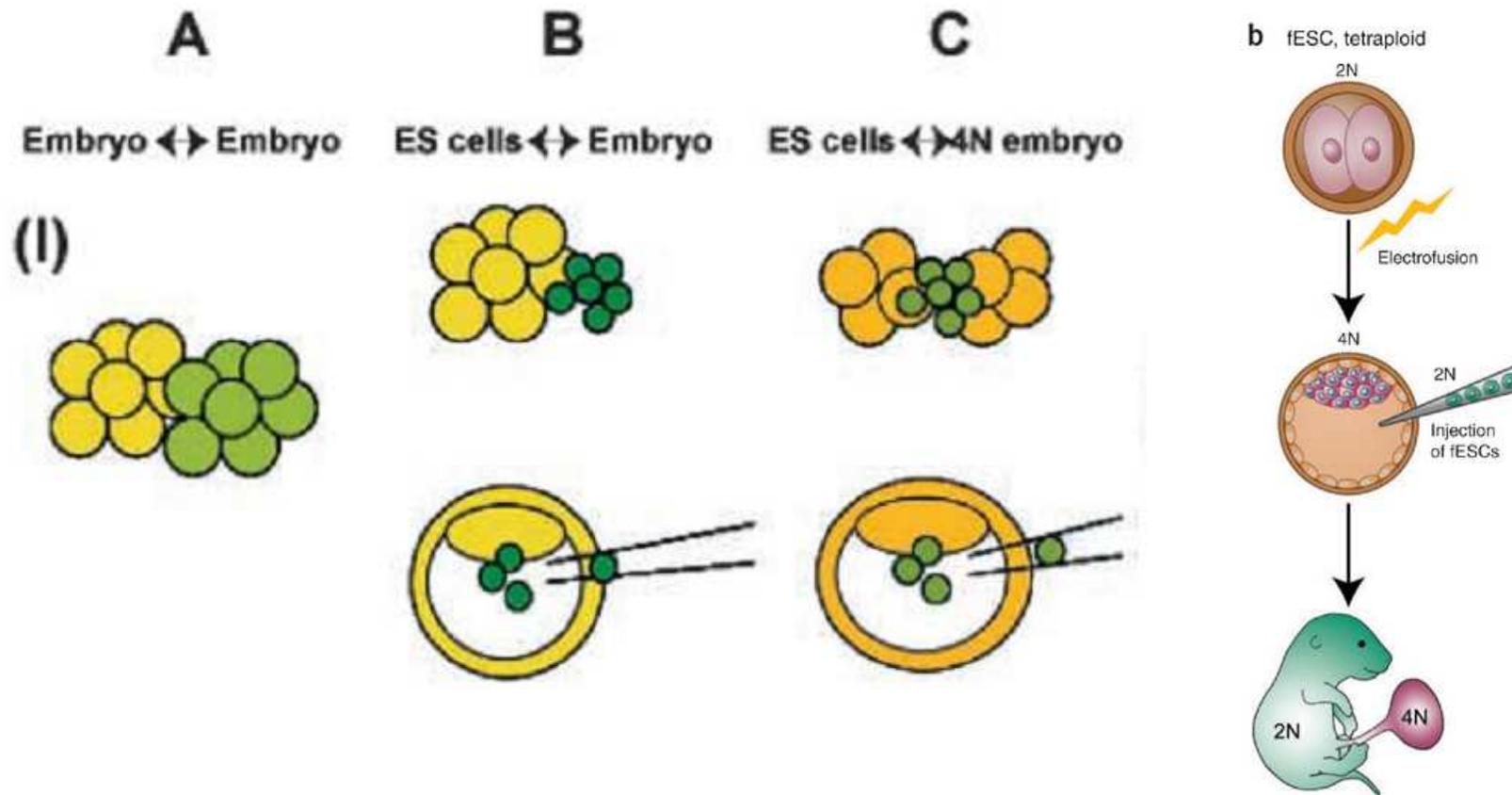
Vasilkova et al., 2007

# Химера



# Получение химерных мышей

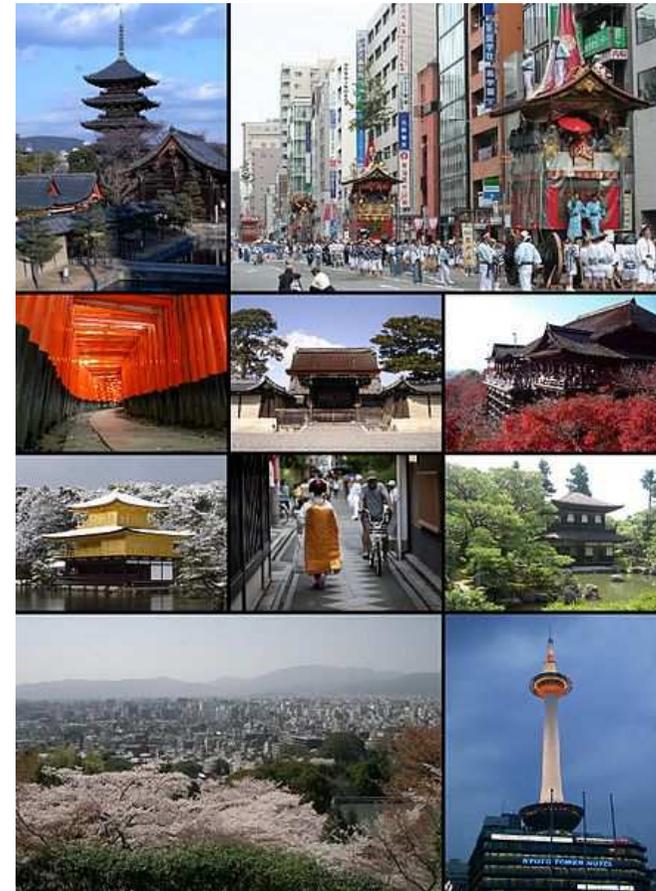
## Тетраплоидная комплементация



# Молекулярный «портрет» ЭС клеток МЫШИ



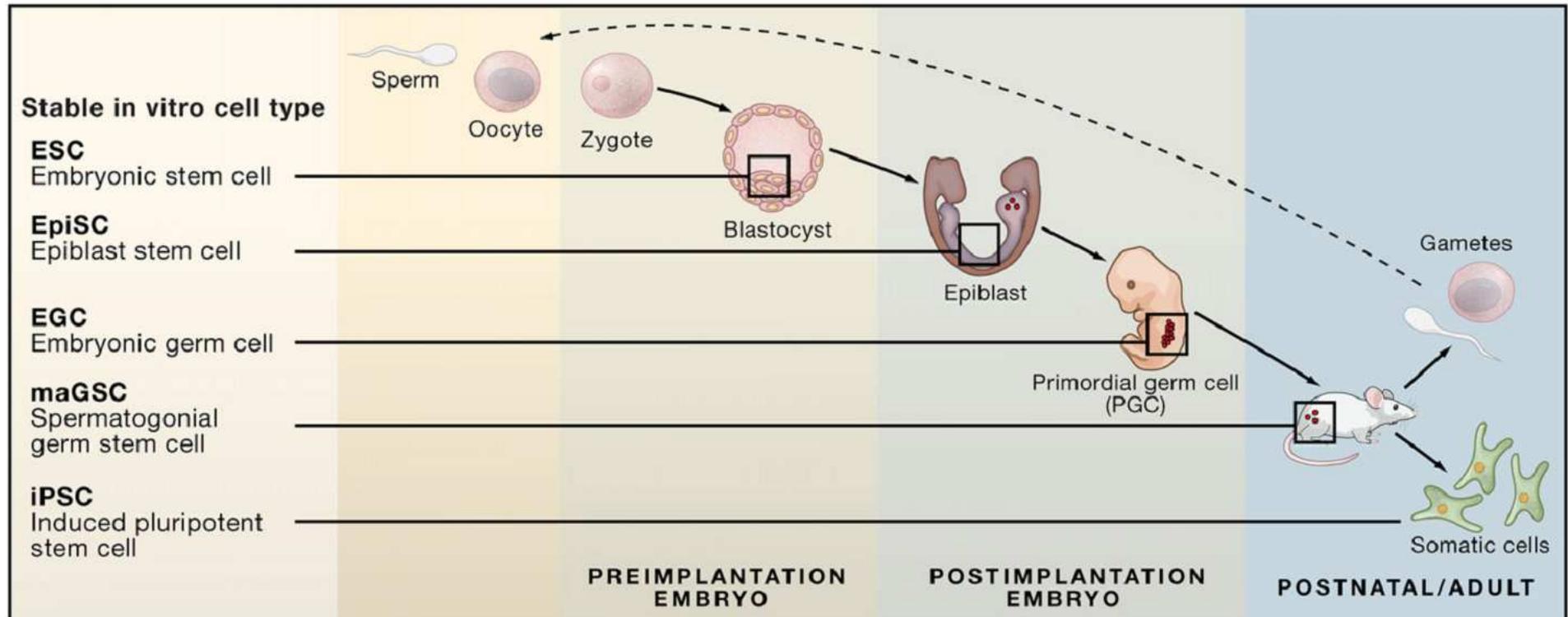
2008



Мартин Эванс

“ЭС клетки *in vitro* ~ эпибласт *in vivo*”

# Всё не так...



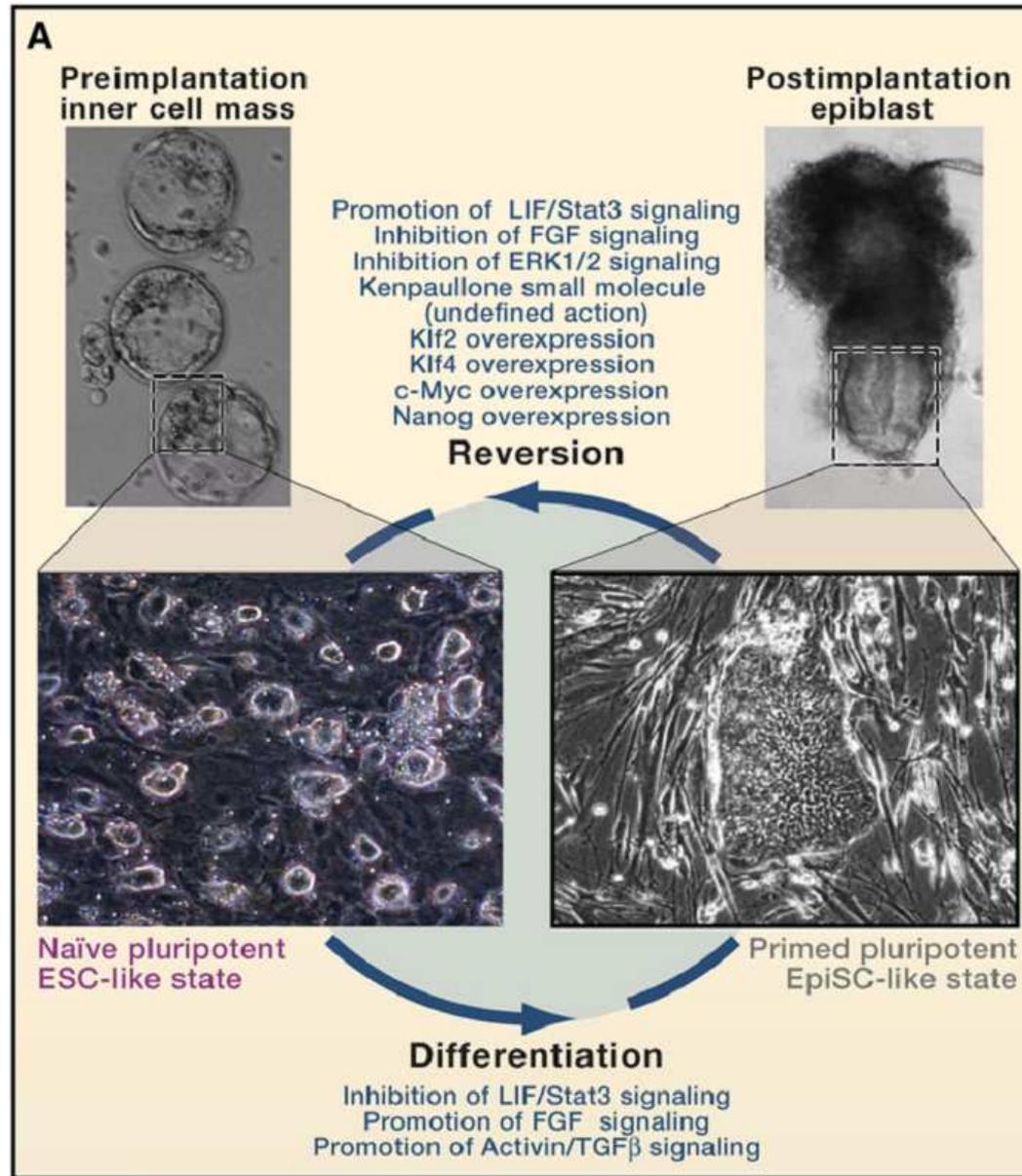
# ЭС клетки vs. эпибластные СК

Характеристика	“Naïve” стволовые клетки	“Primed” стволовые клетки
Клеточный тип	ЭСК, ЭГК, СГСК	Эпибластные стволовые клетки
Эмбрионидные тельца	Да	Да
Тератомы	Да	Да
Химеры	Да	Нет
<b>Клоногенность</b>	<b>Высокая</b>	<b>Низкая</b>
Время удвоения	10-14 ч	14-16 ч
Морфология колоний	Куполообразная	Уплощенная
SSEA1, ЩФ	+	+
Oct4, Sox2	+	+
<b>Nanog, Klf2, Klf4, Rex1, Stella</b>	<b>Высокая++</b>	<b>Низкая/нет +/-</b>
<b>XX статус</b>	<b>ХаХа</b>	<b>ХаXi</b>

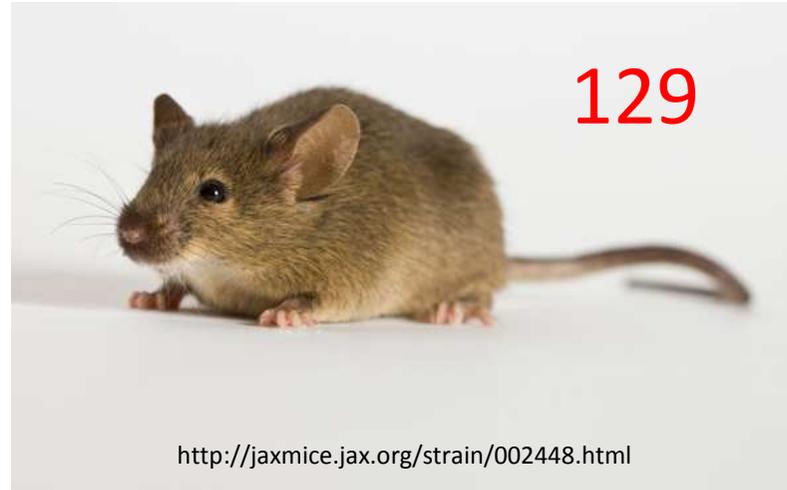
# ЭС клетки vs. эпибластные СК

Positive regulators of the state	LIF/Stat3 BMP4 WNT IGF	TGF- $\beta$ Activin FGF2 ERK1/2 WNT IGF
Negative regulators of the state	TGF- $\beta$ Activin FGF2 ERK1/2	BMP4

# Naïve и primed плюрипотентные состояния



# 129, C57BL, BALB



# Как получить naïve ЭС клетки?

- LIF + 2i

Ингибиторы протеин киназ ERK1/2 и GSK3 $\beta$   
(стимулируют сигнальный путь WNT)

- Так получены ЭС клетки из различных линий мышей и **крысиные ЭС клетки**

# Эмбриональные стволовые клетки человека

# Основные события

**Эванс и Кауфман;**  
**Мартин:**

Эмбриональные  
стволовые клетки мыши

1981

**Томсон:**

ЭС клетки человека

1998

2006

**Яманака:**  
ИПСК мыши

2012

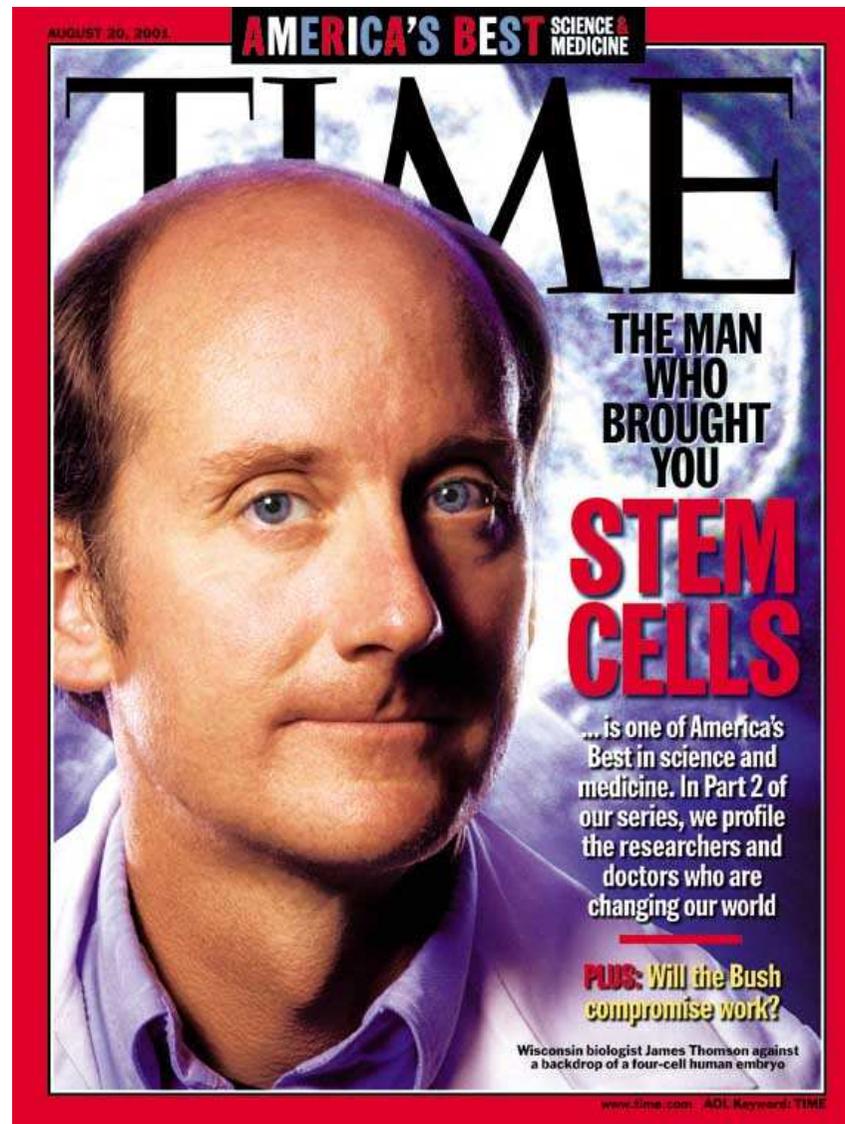
Лекция

?



*Magicicada*

# Джеймс Томсон



Science, 1998

REPORTS

**Embryonic Stem Cell Lines  
Derived from Human  
Blastocysts**

**James A. Thomson,\* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro,  
Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall,  
Jeffrey M. Jones**

# Получение ЭС клеток человека



- Иммунохирургическое выделение ВКМ

- Культивирование на инактивированных фибробластах мыши (фидерные клетки)

# Получение ЭС клеток человека, Томсон, 1998

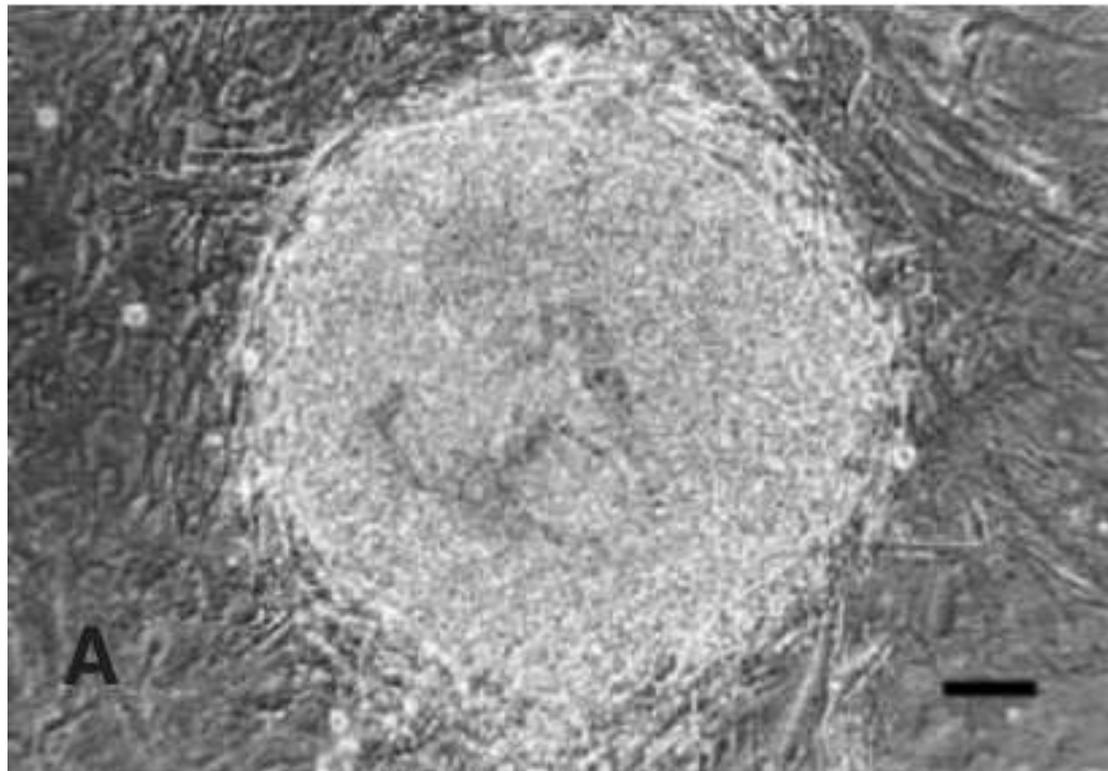
- 14 эмбрионов на стадии дробления
- Культивирование до стадии бластоцисты
- Получено 5 линий ЭС клеток

**H1, H13 и H14 – (46, XY)**

**H7 и H9 – (46, XX)**

# Получение линии ЭС клеток Н9

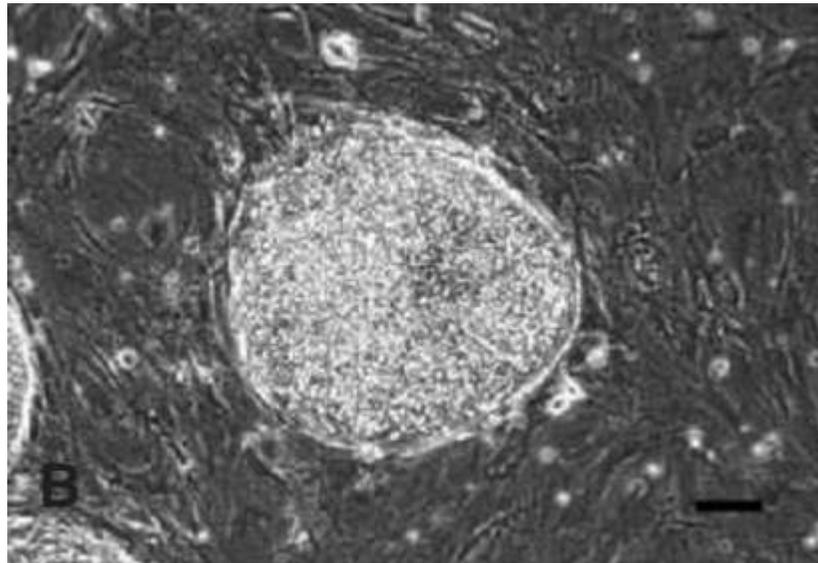
Распластанная ВКМ, День 10



100 мкм

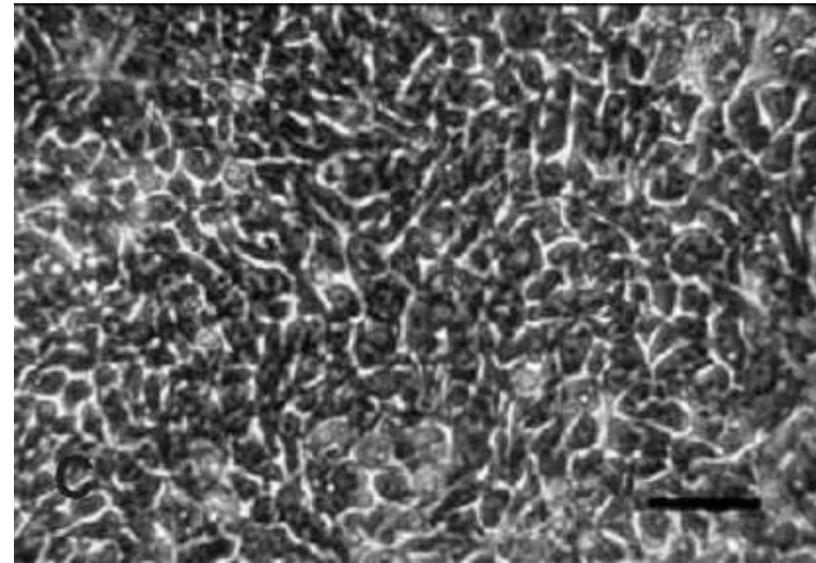
# Получение линии ЭС клеток H9

Колония клеток H9



100 мкм

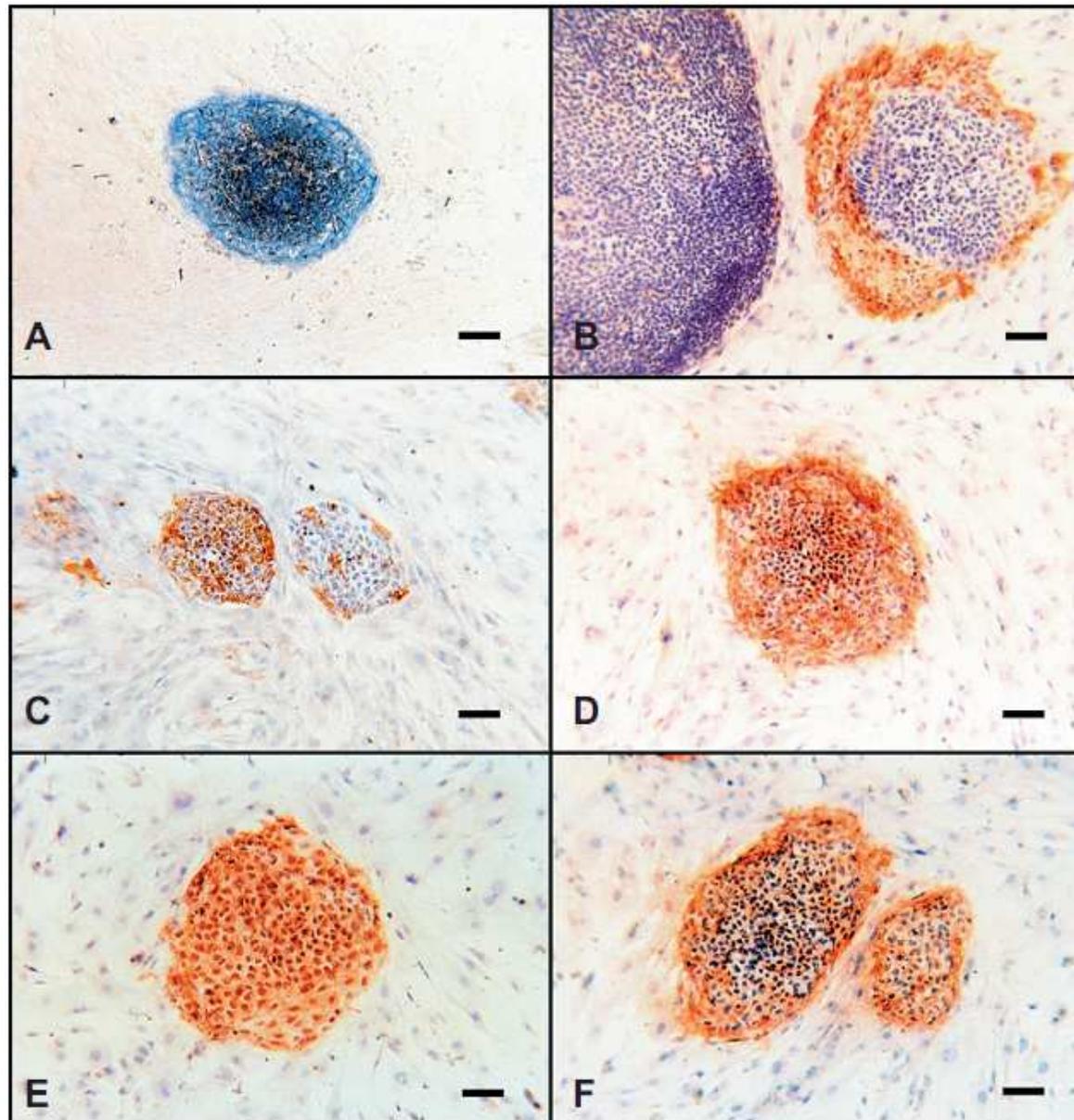
Клетки H9



50 мкм

# Поверхностные маркеры линии ЭС клеток H9

Щелочная  
фосфатаза



SSEA-1  
недифф.  
клетки - нет  
окраски

SSEA-3

SSEA-4

TRA-1-60

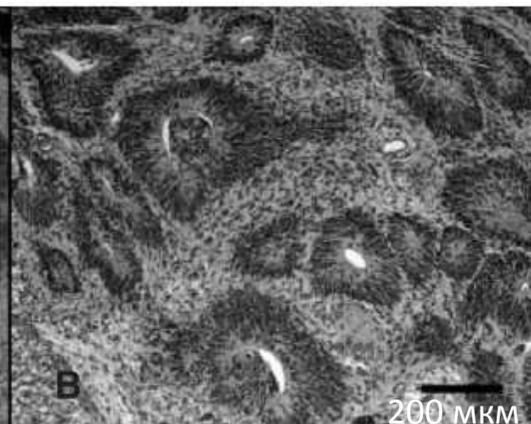
TRA-1-81

# Тератомы из ЭС клеток человека

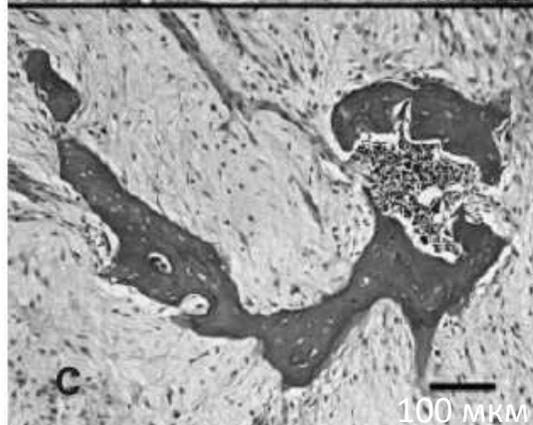
Эпителий  
ЖКТ, Н9



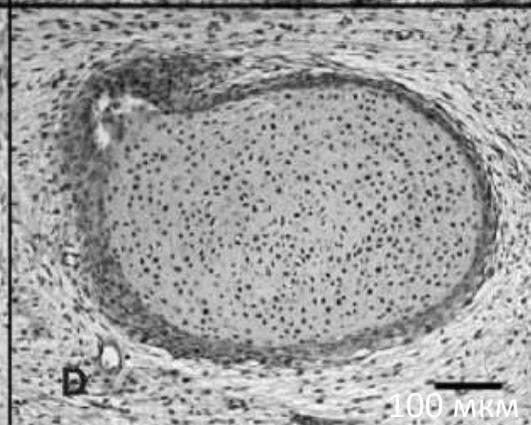
Нейральный  
эпителий, Н14



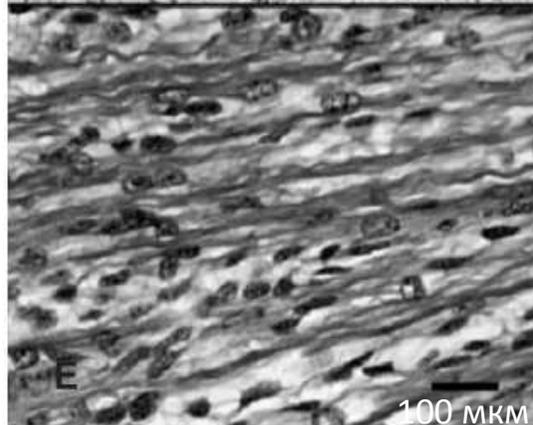
Кость, Н14



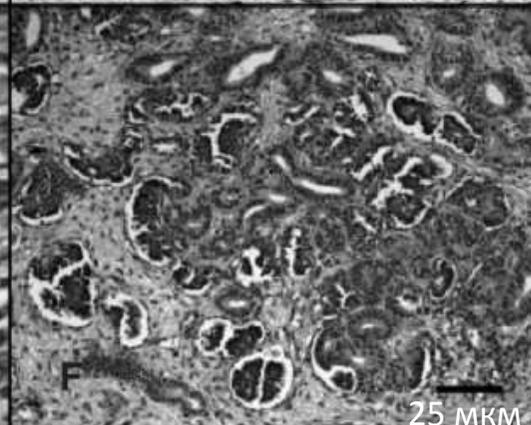
Хрящ, Н9



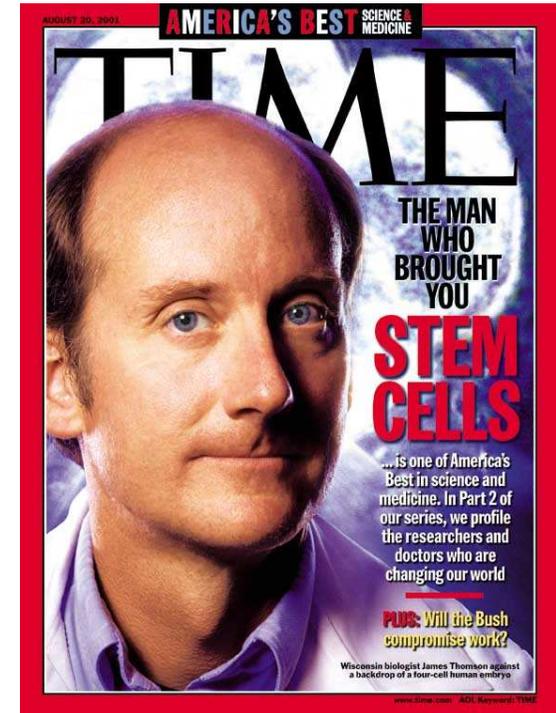
Поперечноп  
олосатая  
мышца, Н13



Клубочки  
эмбриональной  
почки, Н9



# Макака-резус – между мышью и человеком



# PNAS, 1995

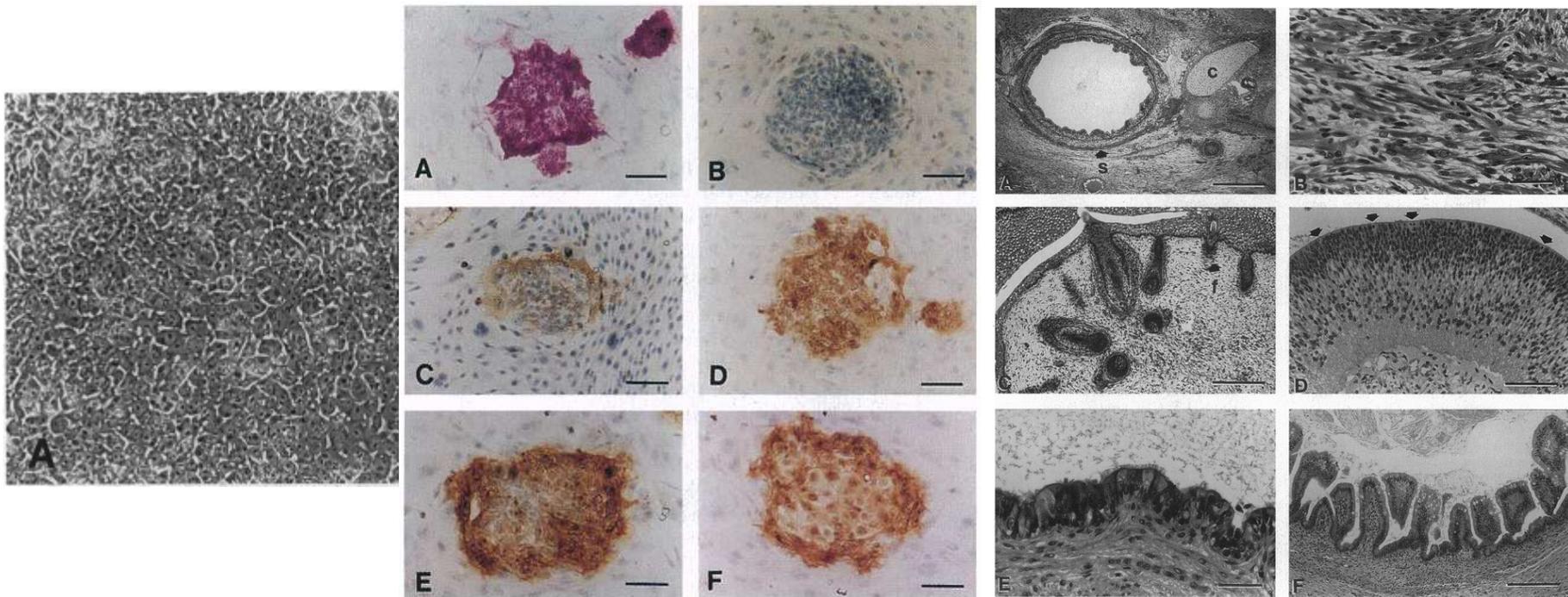
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Vol. 92, pp. 7844–7848, August 1995  
Developmental Biology

## Isolation of a primate embryonic stem cell line

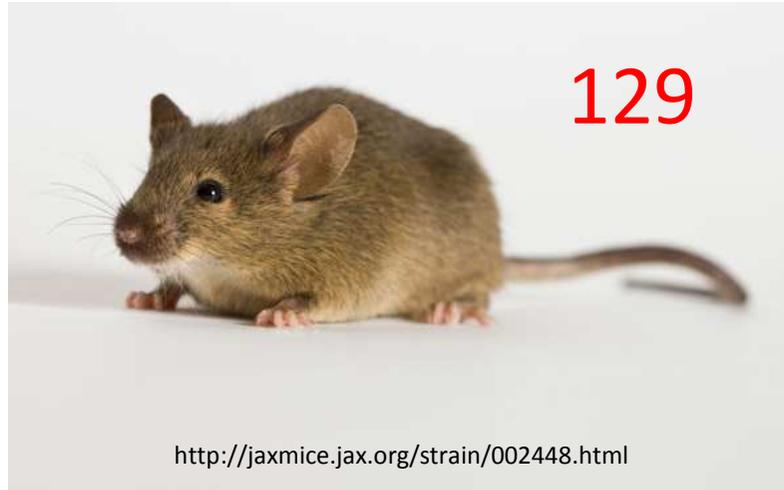
JAMES A. THOMSON\*†, JENNIFER KALISHMAN\*, THADDEUS G. GOLOS\*, MAUREEN DURNING\*, CHARLES P. HARRIS‡, ROBERT A. BECKER\*, AND JOHN P. HEARN\*§

\*The Wisconsin Regional Primate Research Center, †Department of Physiology, School of Medicine, and ‡Cytogenetics Laboratory, State Hygiene Laboratory, University of Wisconsin, 1223 Capitol Court, Madison, WI 53715-1299

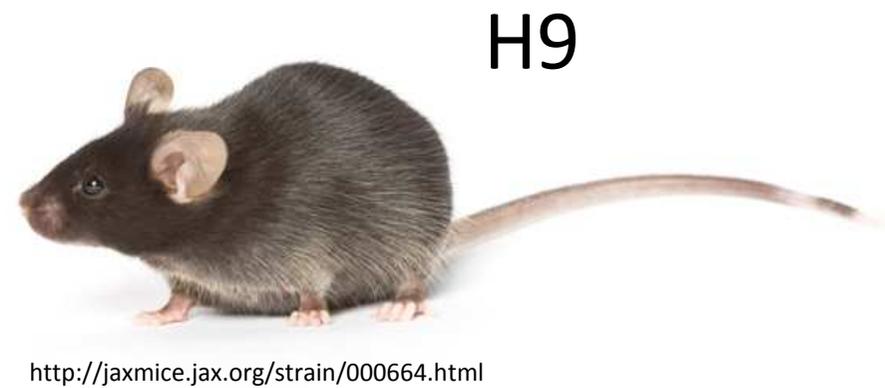
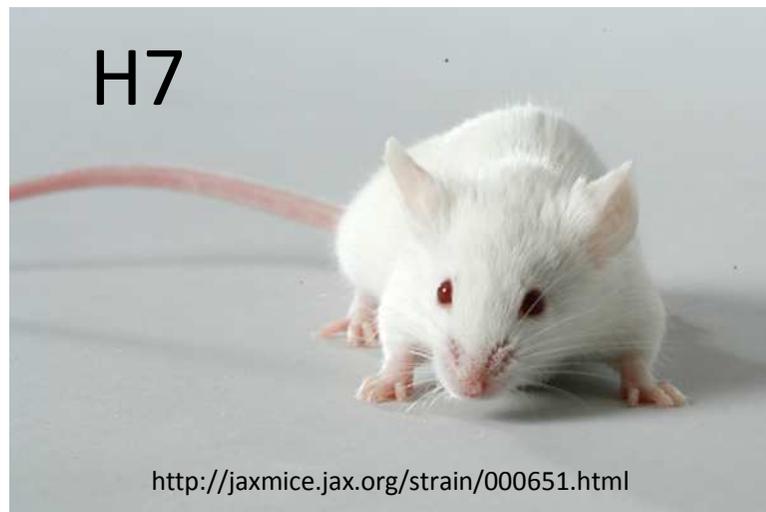
*Communicated by Neal L. First, University of Wisconsin, Madison, WI, May 4, 1995 (received for review January 23, 1995)*



# 129, C57BL, BALB



# H1, H7, H9



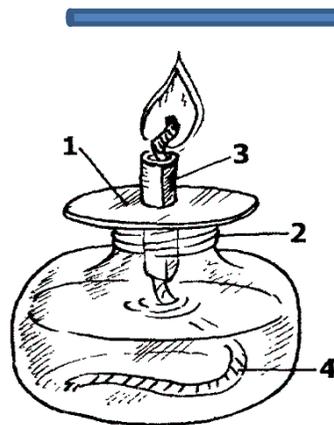
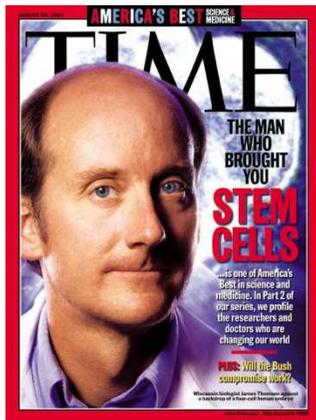
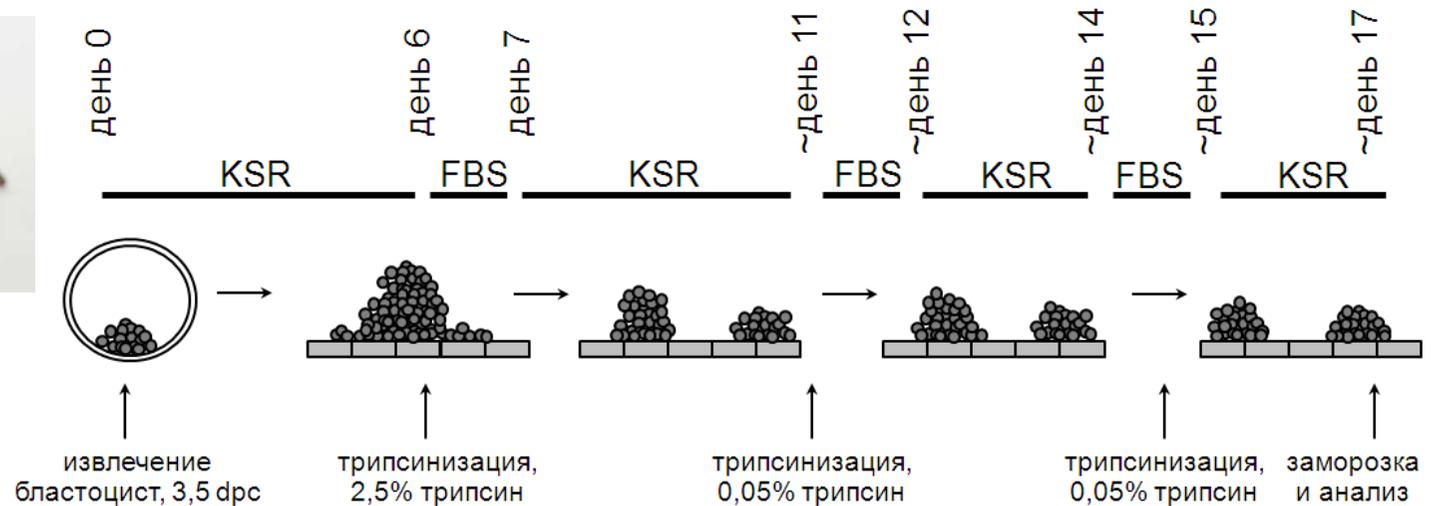
# Сравнение свойств ЭС клеток мыши и человека

	ЭС клетки мыши	ЭС клетки человека
SSEA-1	+	-
SSEA-3, SSEA-4	-	+
TRA-1-60, TRA-1-81	-	+
Щелочная фосфатаза	+	+
Oct4	+	+
Sox2	+	+
Nanog	+	+
Активность теломеразы	+	+
Самообновление	LIF, фидер, BMP4	bFGF, фидер
Рост <i>in vitro</i>	Многослойные колонии	Плоские колонии
Эмбрионидные тельца	Простые и сложные	Простые
Дифференцировка	3 + зародышевый путь	3 + трофобласт
Формирование тератом	+	+
Статус X-хромосом	XaXa	XaXa/XaXi

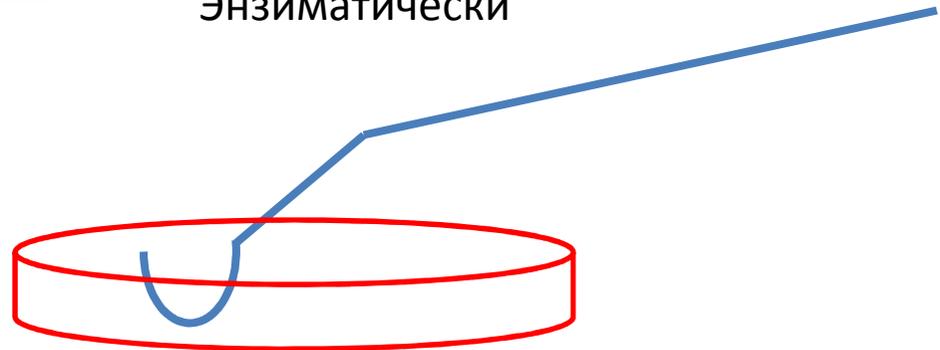
# Пассирование ЭС клеток



Энзиматически;  
Мануально

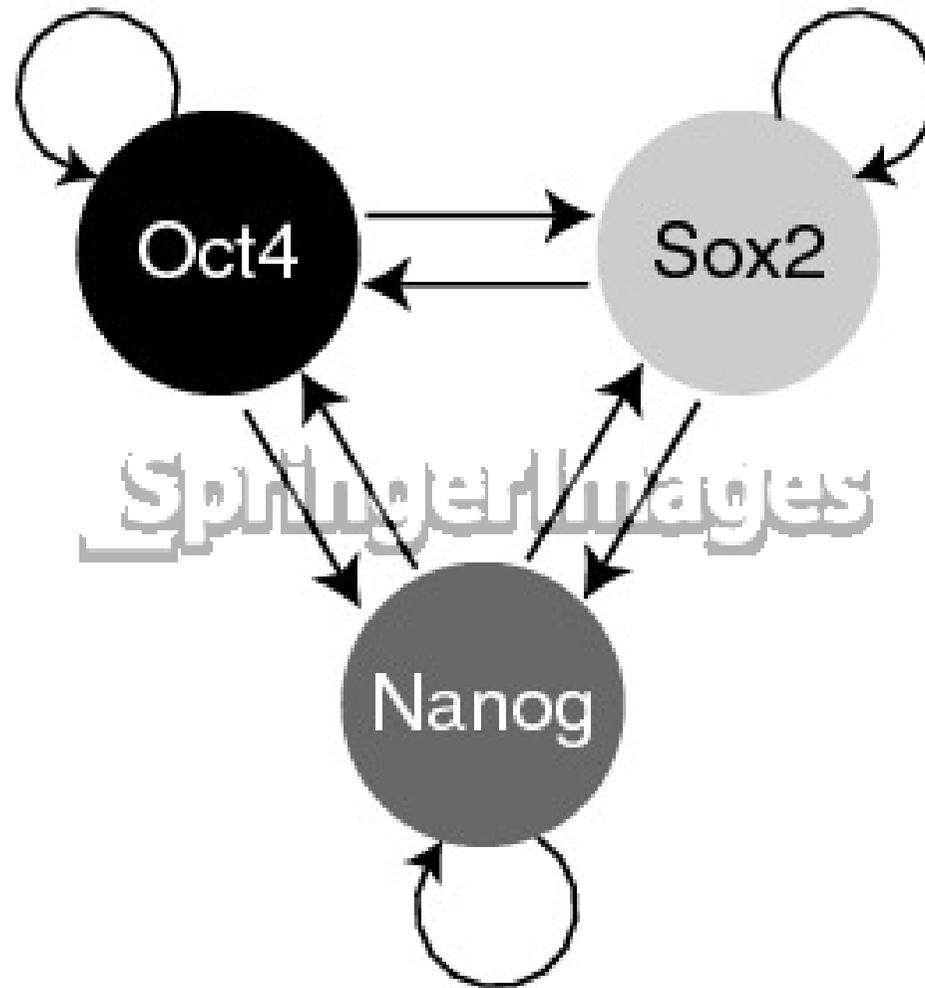


Мануально;  
Энзиматически



Bryja et al., 2006, с модификациями

# Регуляторная сеть в ЭС клетках

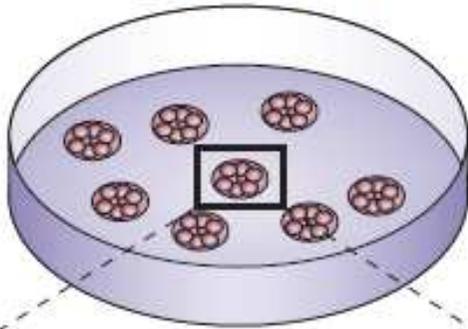


# bFGF

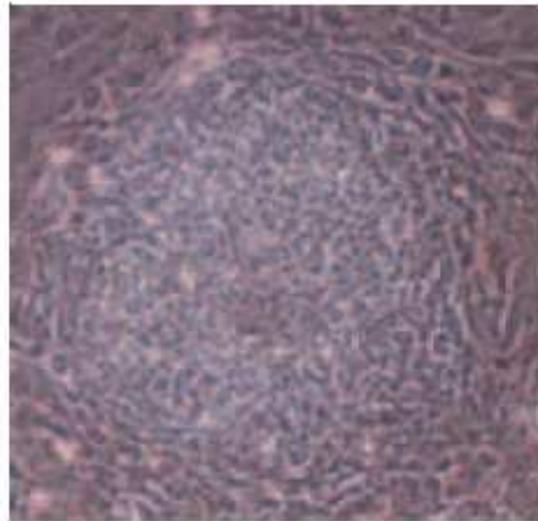
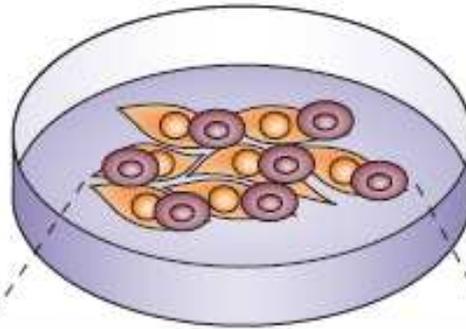
- bFGF – basic fibroblast growth factor – фактор роста фибробластов 2
- Необходим для поддержания ЭС клеток человека в недифференцированном состоянии

# Дифференцировка *in vitro*

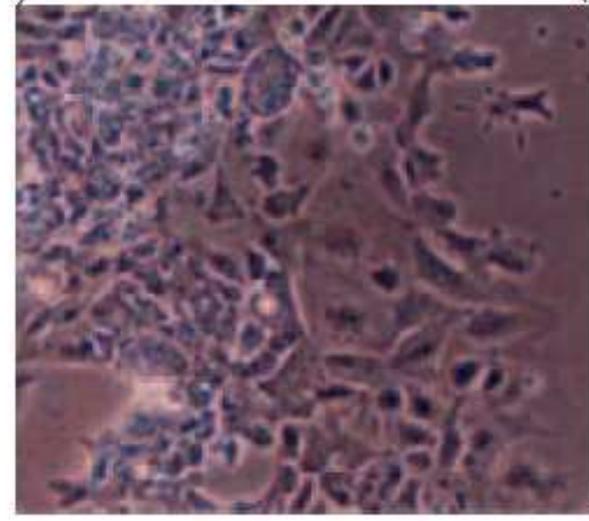
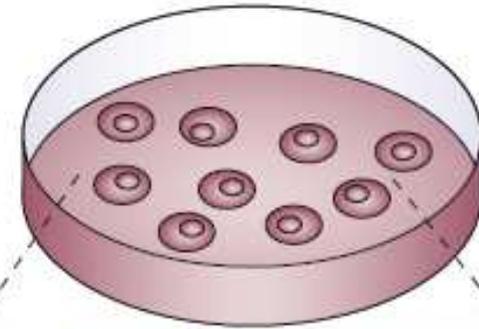
Эмбрионидные тельца



Сокультивирование



Матрикс

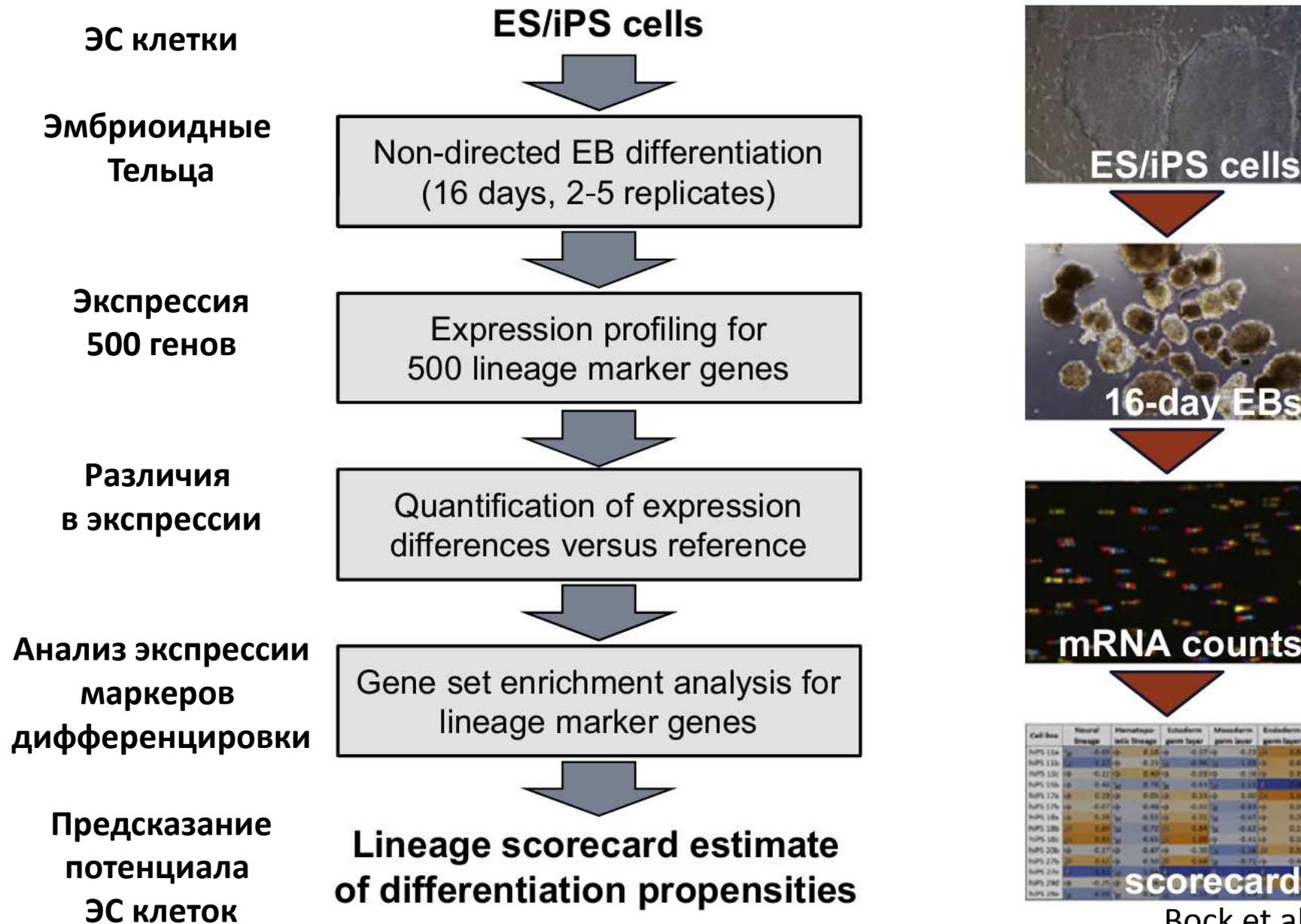


# Примеры дифференцировки ЭС клеток *in vitro*

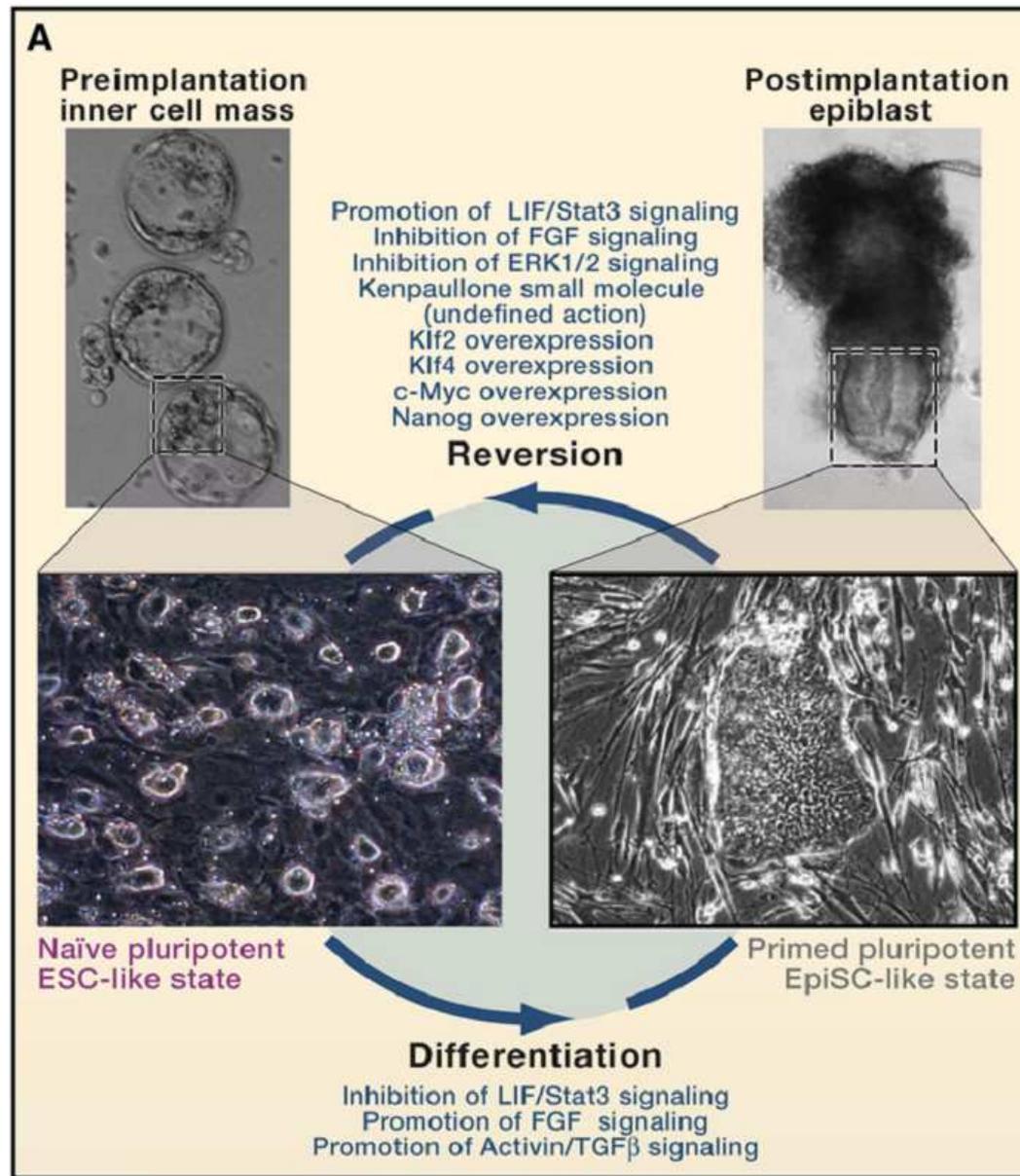
Cell Types Developed	Reference Nos.
Ectoderm, endoderm, mesoderm, and neural precursors	
Cardiomyocytes	188, 239, 240, 402
Cardiomyocytes, endodermal, hematopoietic, and neuronal cells	168
Neuronal, epithelial, pancreatic, urogenital, hematopoietic, muscle, bone, kidney, and heart cells	323
Neural epithelium, embryonic ganglia, stratified squamous epithelium, gut epithelium, cartilage, bone, smooth and striated muscle cells	362
Cells with properties of pancreatic $\beta$ -like cells	13, 324
Cardiomyocytes, pigmented and nonpigmented epithelial cells, neural cells, mesenchymal cells, erythroid, macrophage, granulocyte, and megakaryocyte cells	252
Myeloid, erythroid, megakaryocyte colony-forming cells	185
Neural precursors, glial and neuronal cells: incorporation into the brain (H1, H9, H9.2 lines)	415
Neural precursors, glial and neuronal cells: incorporation into the brain (HES-1 line)	292
Neural progenitor, dopaminergic, GABAergic, glutamatergic, glycinergic neurons, astrocytes	69
Neural progenitor, neuronal cells	322
Trophoblast	403
Hepatocytes	285

Кардиомиоциты  
 Нейральные клетки  
 «Клетки поджелудочной железы»  
 Клетки крови  
 Гепатоциты  
 ТРОФОБЛАСТ

# Оценка потенциала к дифференцировке



# Naïve и primed плюрипотентные состояния



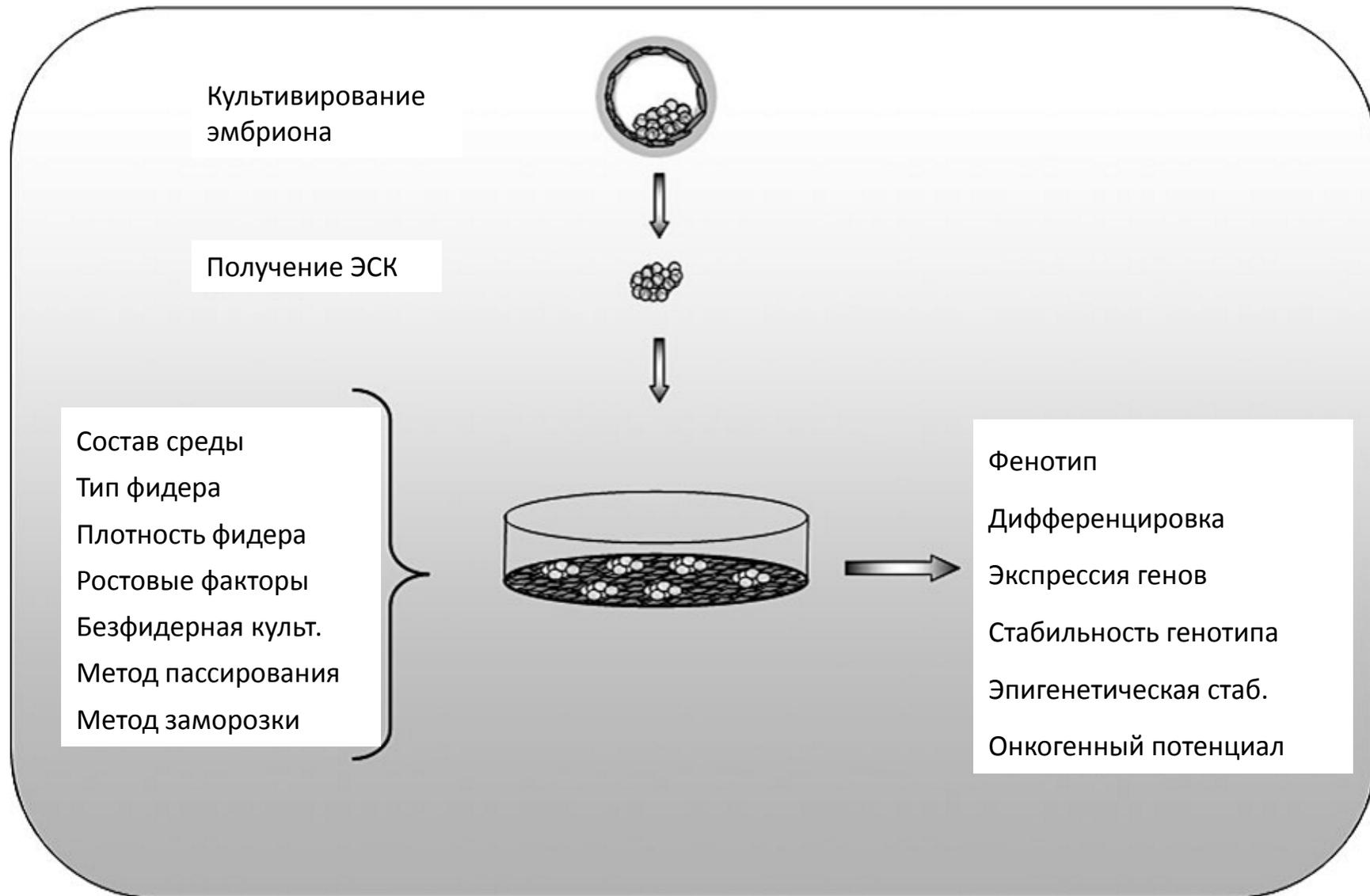
# Как получить naïve ЭС клетки?

- LIF + 2i + Форсколин

Ингибиторы протеин киназ ERK1/2 и GSK3 $\beta$   
(стимулируют сигнальный путь WNT)

- Человеческие ЭС клетки также можно перевести в «naïve» статус, но только на ограниченное число пассажей

# Долговременное культивирование *in vitro*



# Импринтинг



Конрад Лоренц и гусята

# Проблемы при долговременном культивировании *in vitro*

- Накопление эпигенетических нарушений, в том числе нарушение импринтинга
- Нарушение хромосомного состава
- Снижение потенциала к дифференцировке

# Функции каких генов нарушаются?

- Сверхэкспрессия генов в 5-ти из 7-ми дублицированных фрагментов ассоциирована с опухолевым ростом или пролиферацией
- 12 делеций содержали по крайней мере один ген, 5 из них считаются онкосуппрессорами

# Стратегия анализа ЭС клеток

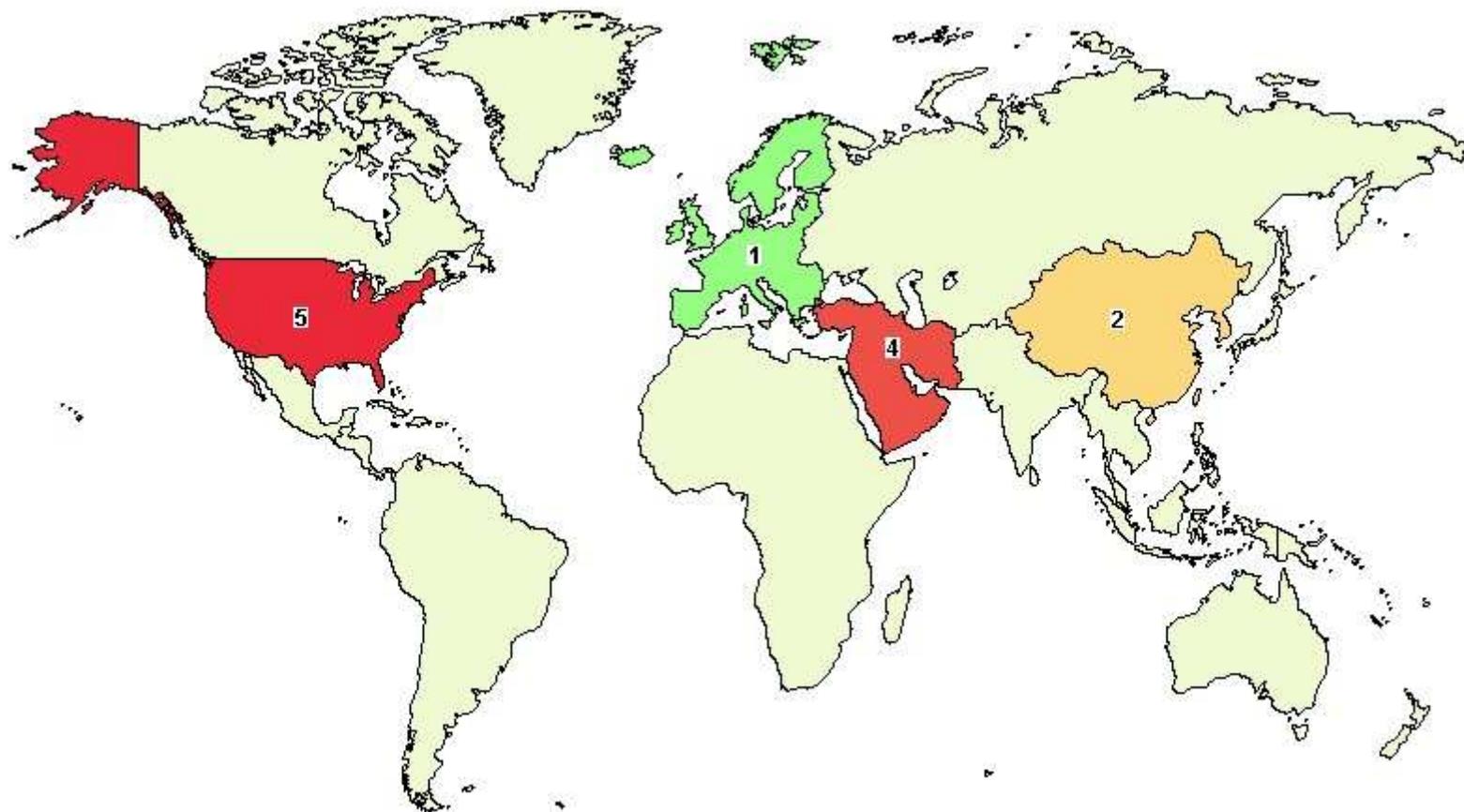
- морфология →
- ОТ-ПЦР (транскриптом) →
  - иммуноцитохимия →
  - хромосомный состав →
    - импринтинг →
- дифференцировка *in vitro* →
- дифференцировка *in vivo* (тератомы) →
- ~~• получение химерных животных →~~
- ~~• тетраплоидная комплементация~~

# Клинические испытания ЭС клеток человека (14)

**ClinicalTrials.gov**

A service of the U.S. National Institutes of Health

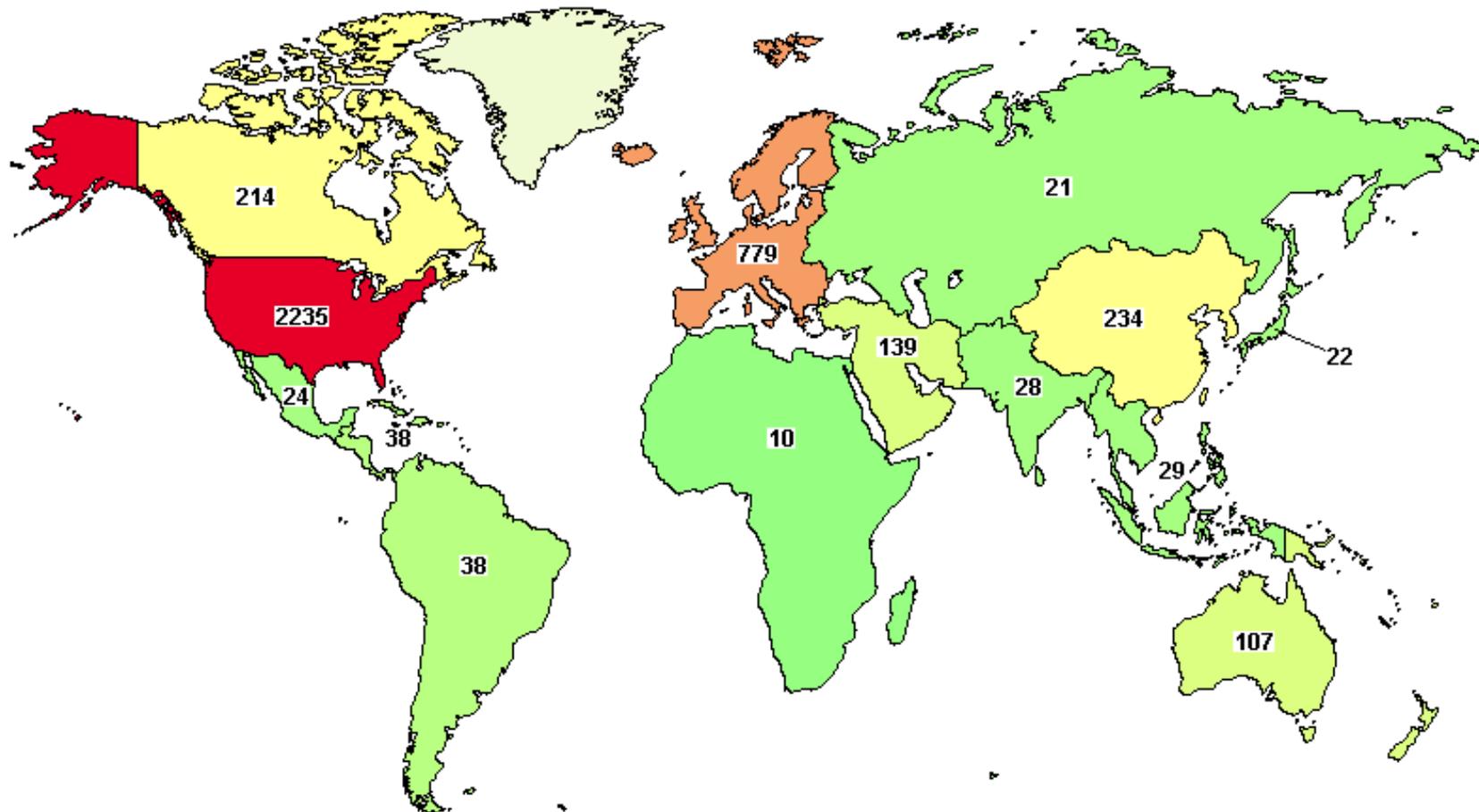
~150 линий ЭС клеток достаточно для клеточной терапии англичан (совпадение по МНС)



# Для сравнения: ГСК в терапии

**ClinicalTrials.gov**  
A service of the U.S. National Institutes of Health

3564 с использованием ГСК.



Так почему их не существует?

Эмбриональные стволовые клетки –  
*in vitro* артефакт.

# Основные события



**Нобелевская премия по физиологии и медицине 2007:**  
Марио Капеччи, Оливер Смитис, сэр Мартин Эванс