

На правах рукописи



ЛАГАРЬКОВА Мария Андреевна

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ПЛУРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

**Специальности 03.02.07 – «генетика» и 03.03.04 – «клеточная биология,
цитология, гистология»**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

МОСКВА - 2010

Работа выполнена в лаборатории генетических основ клеточных технологий
Учреждения Российской академии наук Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Киселев Сергей Львович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Серов Олег Леопидович
доктор биологических наук
Гривенников Игорь Апатольевич
доктор биологических наук
Васильев Андрей Валентинович

Ведущая организация:
Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН

Защита диссертации состоится 22 апреля 2010 года в 14 часов
на заседании Диссертационного совета Д 002.214.01 при Институте
общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, дом 3.
факс (499) 132-8962, электронная почта jogen@vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии
наук института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, ул. Губкина, д.3.
Автореферат разослан 16 марта 2010 года.

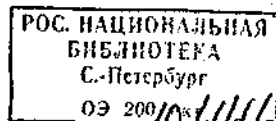
Ученый секретарь
Диссертационного совета



К.Б.в. Синельщикова Т.А.

2010 А
11145

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.



Актуальность темы. В процессе индивидуального развития многоклеточный организм млекопитающих проходит путь от одной единственной клетки, зиготы, до целого организма. В результате четвертого деления зиготы эмбрион на стадии морулы подразделяется на наружные, более крупные клетки и внутренние клетки меньшего размера. На пятый день развития эмбриона человека – на стадии бластоцисты, наружные клетки морулы формируют экстраэмбриональный внешний слой – трофобластическую оболочку, необходимые в дальнейшем для имплантации эмбриона. Внутренняя часть клеток морулы образует компактную внутреннюю клеточную массу (ВКМ) бластоцисты. Из ВКМ образуются в дальнейшем эмбриональные и экстраэмбриональные ткани организма. Таким образом, в процессе эмбрионального развития организма млекопитающих существует короткий период, когда группа клеток ВКМ способна дать начало многим, если не всем, тканям будущего организма. Клетки внутренней массы бластоцисты, культивируемые в лабораторных условиях, получили название эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (Evans & Kaufman 1981, Thomson 1998). Можно подобрать такие условия культивирования, что программа дальнейшего развития ЭСК *in vitro* не реализуется, они сохраняют свойство плюрипотентности неограниченное время. В то же время, сменяя условия культивирования, можно получить контролируемую дифференцировку ЭСК во все производные трех зародышевых листков. На сегодняшний день исследования биологии стволовых клеток и, особенно, биологии эмбриональных стволовых клеток являются интенсивно развивающимся направлением современной науки. ЭСК мыши стали незаменимым инструментом для изучения функции гена, сделав возможным получение генетических нокаутов. ЭСК человека представляют собой уникальный объект для исследования раннего эмбрионального развития человека. С помощью ЭСК можно изучать генетические процессы, происходящие в раннем онтогенезе, особенности поддержания плюрипотентности, исследовать механизмы регуляции экспрессии генов. Помимо перечисленных фундаментальных аспектов, все более реальной становится возможность практического применения технологий с использованием эмбриональных стволовых клеток, как, например, создание модельных систем для поиска путей лечения заболеваний человека или скрининга лекарственных средств. Самые большие надежды на применение ЭСК человека в медицине связаны с тем, что в процессе направленной дифференцировки из них можно получить специализированные дифференцированные клетки (кардиомиоциты, клетки сосудов, инсулин-

продуцирующие клетки и др.), которые, в свою очередь, при решении проблемы иммунологической совместимости, можно использовать в терапевтических целях. Именно эти фундаментальные и практические аспекты биологии ЭСК определяют актуальность темы настоящей диссертационной работы, которая посвящена молекулярно-генетическим и эпигенетическим особенностям новых линий ЭСК и изучению возможностей их дифференцировки.

Цель и задачи исследования. Проведение фундаментальных и прикладных исследований по изучению линий эмбриональных стволовых клеток человека.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить линии ЭСК человека, в том числе в отсутствии неохарактеризованных компонентов среды. Создать Российскую коллекцию линий ЭСК человека. Охарактеризовать способность полученных линий ЭСК к самоподдержанию на протяжении длительного времени.
2. Продемонстрировать генетическую стабильность ЭСК на уровне кариотипа при оптимальных условиях культивирования. Провести детальный молекулярно-цитогенетический анализ аномальных хромосом для установления возможных причин их возникновения.
3. Используя ЭСК человека как модель раннего эмбрионального развития, изучить контактное взаимодействие клеток в пределах структурно-морфологической единицы в плюрипотентном и дифференцированных состояниях.
4. Изучить статус инактивации X хромосомы в женских полуприпотентных клетках и в их дифференцированных производных.
5. С целью стандартизации линий ЭСК человека в отношении их потенциала дифференцировки разработать генетические и эпигенетические критерии характеристик линий ЭСК на основе известных генов раннего эмбрионального развития.
6. С целью возможного дальнейшего практического применения специализированных производных ЭСК человека для скрининга или терапии разработать протоколы дифференцировки ЭСК человека в функциональные клетки нескольких типов.
7. Доказать, что полученные из ЭСК человека специализированные производные соответствуют их взрослым аналогам на генетическом и эпигенетическом уровнях.

Научная новизна и практическая ценность работы. Новым является создание российской коллекции линий ЭСК человека, полученных с использованием различных методов культивирования, в том числе и с использованием нового метода выделения ВКМ. Новым является установление линий ЭСК в среде с полностью

охарактеризованными компонентами не животного происхождения. Впервые при изучении линий обнаружены эпигенетические различия между линиями ЭСК человека. Показана кариотипическая стабильность ЭСК на протяжении более 100 пассажей. Выявлены и охарактеризованы сублинии ЭСК человека с аномальными хромосомами 9 и 18, аналогичные ранее описанным аномалиям у пациентов с рядом патологий. Таким образом, впервые получены модельные объекты для изучения и терапии этих патологий. В ходе исследований разработаны новые протоколы получения и селекции функциональных дифференцированных производных из ЭСК человека. Впервые показано, что статус метилирования промоторных областей генов, связанных с клеточной специализацией, коррелирует с изменением их экспрессии в процессе дифференцировки ЭСК в эндотелий. Эти и другие результаты работы являются оригинальными и получены впервые, о чем свидетельствуют публикации в рецензируемых международных журналах. Результаты работы имеют практическую значимость. Получены «терапевтические» линии ЭСК, разработаны технологии дифференцировки ЭСК и селекции специализированных производных, которые могут в будущем найти применение в регенеративной медицине. Технологии запатентованы. Работа выполнена в соответствии с темой госрегистрации №01200802669.

Апробация работы. Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на Wilsede Meeting “Modern trends in human leukemia” (Wilsede, Germany, 2005), всероссийских конференциях “Фундаментальные науки – медицине” (Новосибирск, 2005, 2007), VI Международной конференции по молекулярной генетике соматических клеток (Звенигород, 2005), Всероссийском симпозиуме “Биология клетки в культуре” (Санкт-Петербург, 2004, 2005, 2006), I-st Congress of the German society for SC research (Cologne, Germany, 2006), Британско-Российском совещании “Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации” (Москва, 2007), на конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2004, 2008), Международной конференции Mechanisms of early differentiation (Barsinghausen, Germany, 2008), German-Russian Bilateral Symposium (Санкт-Петербург, 2008), на II съезде Общества клеточной биологии, (Санкт-Петербург, 2007), на II, IV, VI съездах International Society of Stem Cell Research (Boston, USA 2004, Cairns, Australia, 2007, Barcelona, Spain, 2009). Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных и теоретических исследований. Основные результаты работы получены лично автором, под его непосредственным руководством или при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 40 печатных работ, в том числе 20 статей в российских и международных журналах и 18 тезисов докладов и материалов конференций, получено 2 патента.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 203 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Диссертация содержит 55 рисунков. Библиография включает 334 ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Получение и характеристика ЭСК человека. В качестве источника клеток, с информированного согласия пациентов, нами были использованы бластоцисты, не вошедшие или оставшиеся после завершения программы по вспомогательным репродуктивным технологиям. Для получения 4 линий ЭСК hESM01-04 на фидере



Рисунок 1. Морфология ЭСК в культуре (А) ВКМ, выделенная методом гипотонического лизиса, на фидере. (В) колония ЭСК линии hESM03 на фидере; (С) колония ЭСК линии hESMK-05 на матригле. Масштабная линейка= 100 мкм

было использовано 46 бластоцист различного качества. Указанные линии были получены с использованием фидерного слоя из инактивированных мышиных эмбриональных фибробластов (МЭФ), а культивирование происходило в среде содержащей сыворотку животных. Несомненно, неохарактеризованные компоненты не

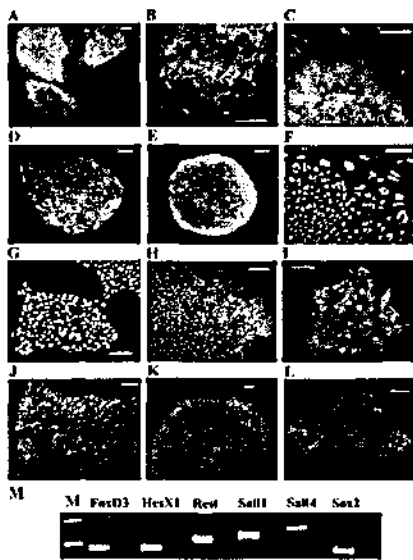


Рисунок 2. Характеристика ЭСК человека. (А-Ф) Иммуногистохимический анализ чЭСК, культивируемых на фидере. Показана линия hESM01. (А) активность щелочной фосфатазы, (В) SSEA-3, (С) SSEA-4, (D) TRA1-60, (E) TRA1-31, (F) OCT-4, (G-L). Иммуногистохимический анализ ЭСК, полученных и культивируемых на матригле. Показана линия hESMK05. (G) OCT-4, (H) SSEA-4, (I) активность щелочной фосфатазы, (J), TRA1-60, (K) CD 30, (L), NANOG. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка =100мкм. (М) ОТ-ПЦР анализ экспрессии транскрипционных факторов, характерных для ЭСК. Показана линия hESM04.

позволяют работать в стандартизованных условиях, а клеточные линии в связи с присутствием компонентов животного происхождения не могут в дальнейшем применяться в практических целях. В связи с этим было решено получить линии ЭСК в

коммерчески доступной среде с определенным составом и в бесфидерной системе. Традиционно для получения ВКМ используется комплемент-зависимый лизис с использованием компонентов животного происхождения или механическое извлечение ВКМ, что приводит к ее повреждению. Нами была разработана оригинальная технология выделения ВКМ, основанная на различной чувствительности трофобласта и ВКМ к гипотонической обработке. Это позволило существенно повысить эффективность получения линий ЭСК человека. Четыре бластоцисты качества AA были использованы для получения бесфидерной линии hESMK05. Новая линия ЭСК человека – hESMK05, полученная и поддерживаемая на среде mTESR1, постоянно культивируется более 2 лет, прошла более 80 пассажей и перенесла несколько криоконсерваций (рис.1). Все линии ЭСК, как фидерные, так и бесфидерные, экспрессируют характерные маркеры ЭСК, включая OCT3/4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-81, обладают высокой теломеразной активностью и активностью щелочной фосфатазы. ОТ-ПЦР анализ показал, что все линии ЭСК экспрессируют гены транскрипционных факторов, связанных с плюрипотентностью (рис. 2, таблица 1).

При переводе в суспензионную культуру все линии образуют эмбрионидные тельца

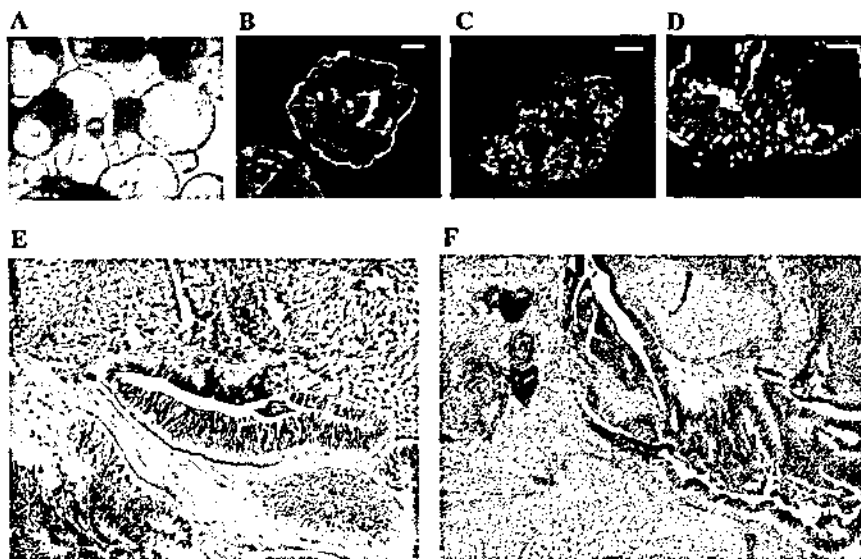


Рисунок 3. Плюрипотентность линий ЭСК. (А) Морфология ЭТ 8 дней культивирования, линия hESM04. (В-Д) Иммуногистохимический анализ ЭТ 14 дней культивирования. Линия hESM01. Ядра окрашены DAPI (синий). (В) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к CD105 (зеленый) and MOG-31 (красный), (С) окрашивание антителами к десмину (D) окрашивание антителами в альфа-фетопротеину. (Е, F) Тератомы, образованные ЭСК после введения иммунодефицитным мышам. Окраска гематоксилином-эозином. Показаны линии hESM03 и hESM01.

(ЭТ), содержащие клетки-производные трех зародышевых листков (рис.3). Таким образом, линии ЭСК человека проявляли свойство плюрипотентности при спонтанной дифференцировке *in vitro*. Одним из основополагающих тестов на плюрипотентность линий ЭСК человека *in vivo* является их способность формировать тератома-подобные структуры при введении клеток иммунодефицитным животным. Мы проверили способность клеточных линий hESM01-04 к спонтанной дифференцировке *in vivo*. В результате введения чЭСК *in vivo* мышам были получены тератома-подобные структуры (рис.3). Гистологический анализ образований показал, что они состоят из тканей, происходящих из трех зародышевых листков (кость, эпителий, мышцы, железы и т.д.). В настоящий момент наша коллекция пополнилась тремя линиями HUES7-9 из лаборатории Д.Мелтона, США, и двумя линиями H9 и H14 из лаборатории Дж. Томсона. В сотрудничестве с коллегами из Красноярского Медицинского Университета получено и охарактеризовано еще 2 линии ЭСК человека. Таким образом, нами создана коллекция и криобанк линий ЭСК человека (всего 15 линий) на различных пассажах после их подробной характеристики и подтверждения плюрипотентности.

| Линия/ Характеристика | hESM01 | hESM02 | hESM03 | hESM04 | hESM05 | hESM06 |
|---|--|---------------------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Кариотип | 46XX | 46XY | 46XX | 46XX | 46XX | 46XX |
| Год получения | 2003 | 2003 | 2003 | 2003 | 2003 | 2009 |
| Среда при выделении | KO-DMEM 20%FBS | KO-DMEM 20%FBS | KO-DMEM 20%FBS | KO-DMEM 20%FBS | mTeSR-1 +ROCK inhibitor | mTeSR-1 +ROCK inhibitor |
| Подложка при получении | MEF | MEF | MEF | MEF | Matrigel | Matrigel |
| Среда для культивирования | KO-DMEM SR bFGF or mTeSR1 | KO-DMEM SR bFGF or mTeSR1 | KO-DMEM SR bFGF or mTeSR1 | KO-DMEM SR bFGF or mTeSR1 | mTeSR1 | mTeSR1 |
| Подложка при культивировании | MEF, HS-27, Matrigel | MEF, Matrigel | MEF, HS-27, Matrigel | MEF, Matrigel | Matrigel | Matrigel |
| Субтип | Да, 1стабильная 46,XX, Δ (18)(p 11.31→q21.2:: q21.2→p11.31) | Нет | Да, одна стабильная 46,XX, Δ del(4)(q25 q3.1),dup(9)(q12q 33) | Нет | Да | да |
| Время удвоения, MEF ч | 30 24 | 32 n/d | 36 30 | 42 32 | n/d 26 | n/d 23-30 |
| Экспрессия маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog, tra 1-60, SSEA-4, SSEA-3 | + | + | + | + | + | + |
| Другие маркеры ЭСК: AP, тетамераз, CD30, фра 3, фра 5 | + | + | + | + | + | + |
| Статус X-инaktivации Xi - одна X хромосома инaktivирована Xa - обе X активны | 20% клеток Xi 80% клеток Xa | - | Xi | Xi | Xa | Xa |
| Обработка тертом | + | + | + | + | n/d | n/d |
| Формирование | + | + | + | + | + | + |
| Максимальное число пассажей | 100 | 70 | 75 | 72 | 60 | 20 |
| Доступность для научного сообщества | Да | | | | | |

Таблица 1. Характеристика линий ЭСК человека серии hESM.

Изучение стабильности кариотипа эмбриональных стволовых клеток человека серии hESM в процессе культивирования *in vitro*. Изменение целого ряда свойств ЭСК, таких как скорость роста, плюрипотентность, экспрессия специфических маркеров, и, наконец, туморогенность может быть обусловлено генетической нестабильностью клеток в культуре. Так, при длительном культивировании первичных культур клеток можно отобрать клетки, в которых произошла генетическая трансформация и они приобрели возможность неограниченного роста в культуре. В случае ЭСК, самоподдержание клеток в культуре в отсутствие трансформации является ключевым свойством, отличающим стволовые клетки от первичной культуры дифференцированных клеток организма. В связи с этим, при работе с ЭСК человека необходимо проведение тщательного контроля за численными и структурными изменениями хромосом. Нами был предложен новый метод кариотипирования линий ЭСК человека, который позволил эффективно получать метафазные пластинки высокого качества. Клетки линии hESM01 анализировали на пассажах от 11 до 100, линии hESM03 – на пассаже 8 и на пассажах от 36 до 75, клетки линии hESM04 - на пассажах 14, 22 и на пассажах между 36 и 75, клетки линии hESM02 - на пассажах 16 и 17, 45, 56, линии hESKM05 – на пассажах 5, 10, 27, 40, 60, 80. В результате проведенных на протяжении пяти лет исследований по мониторингу кариотипической стабильности линий выявлены два субклона линий hESM03 и hESM01 с абберациями в хромосомах 4, 9 (hESM03) и 18 (hESM01), которые стабильно наследовались в ряду клеточных поколений на протяжении нескольких десятков пассажей. Детальное исследование этих сублиний было продолжено в сотрудничестве с д.б.н. Н.Б.Рубцовым и к.б.н. Т.В.Карамышевой (ИЦиГ СО РАН). Для описания структурных хромосомных перестроек были использованы методы молекулярно-цитогенетического анализа. Для определения состава аномальной хромосомы в линии ESM01г18 была получена ДНК-проба, специфичная аномальной хромосоме, для чего несколько ее копий с помощью микроманипуляционной техники было выделено из метафазных пластинок фиксированных митотических клеток, и проведена амплификация их ДНК в полимеразной цепной реакции с частично вырожденным праймером MW6. FISH полученной ДНК-пробы с метафазными хромосомами клеток ESM01г18 и лимфоцитов здоровых доноров показал, что она представляет собой 46,XX,X(18)::(p11.31→q21.2::q21.2→p11.31::) (рис. 4).

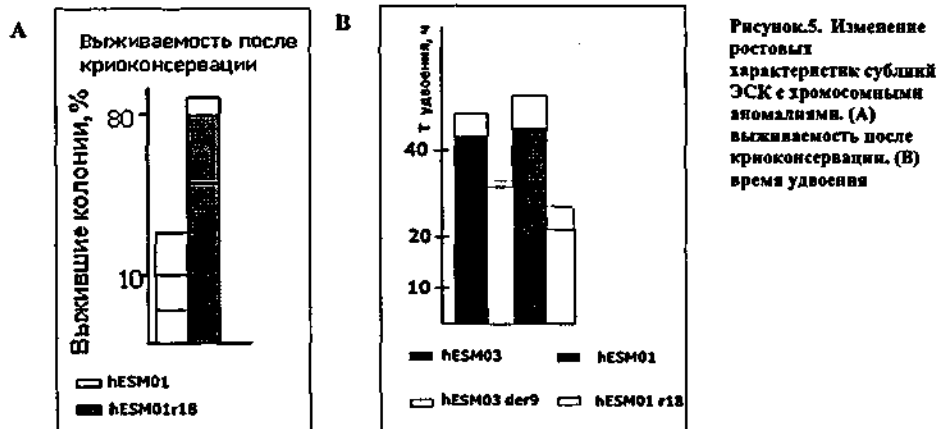


Рисунок 4. Анализ кариотипа ЭСК человека. (А) нормальный 46 XX кариотип линии hESKM05. GTG бэндинг. (В) FISH ДНК-пробы r18 (зелёный) с хромосомами клеток линии hESM01r18 (окраска DAPI). Стрелки указывают на хромосомы 18 и r(18). (С) FISH проб WCP9 (красный) и PCP9C (зелёный) с хромосомами клеток линии hESM03der9 (окраска DAPI). Жёлтый цвет - результат совмещения красного и зелёного сигналов близкой интенсивности. Стрелка указывает на аномальную хромосому 9.

Для анализа организации и состава маркерной хромосомы из сублинии hESM03der9 был получен набор микродиссекционных проб из 9 хромосомы здорового донора и из клеток сублинии. Для определения точного кариотипа линии hESM01der9 был проведен ряд FISH с различными зондами. Результаты проведенных экспериментов возможно суммировать выразив точный кариотип линий как hESM03der9, как 46,XX,del(4)(q25q31.1),dup(9)(q12q33).

Исследование кариотипа линии hESKM05 на 7 пассаже показало, что культура гетерогенна, встречаются клетки как с нормальным набором хромосом, так и анеуплоидные клетки (от 60 до 65 хромосом) клонального происхождения (до 20% клеток). После двух последовательных субклонирований нескольких колоний линии hESKM05 нам удалось выделить стабильную сублинию, имеющую нормальный диплоидный 46 XX набор хромосом (рис.4А) и сохраняющую нормальный кариотип уже более 80 пассажей. Необходимо отметить, что линия hESKM05 была получена в бесфидерных условиях в среде с определенным составом mTeSR1. Можно предположить два варианта изначальной гетерогенности культуры. Возможно, что в результате применения ВРТ клетки ВКМ исходно имели смешанный кариотип. Во втором случае не исключено, что применение mTeSR1 привело к дестабилизации кариотипа на первых пассажах.

Сравнение свойств клеток сублиний hESM03der9 и hESM01r18 с клетками исходных линий выявило увеличение темпов клеточной пролиферации в hESM01r18 и hESM03der9 относительно исходных линий. Кроме того, процент выживаемости клеток сублинии hESM01r18 после криоконсервации был существенно (в 5-7 раз) выше, чем у исходной линии hESM01 (рис.5). Тем не менее, клетки этих сублиний сохранили основные характеристики, присущие ЭСК человека, в том числе экспрессию Oct3/4, SSEA-4, щелочной фосфатазы и ряда других специфических маркеров. В то же время



было отмечено изменение спектра типов тканей в тератомах, полученных из клеток hESM01r18, снижение способности к спонтанной дифференцировке клеток hESM01r18 и hESM03der9, замедление формирования эмбрионных телц клетками сублинии hESM01r18.

Таким образом, в результате проведения цитогенетического анализа было показано, что постоянный кариотипический контроль позволяет осуществлять длительное культивирование ЭСК с сохранением их нормального кариотипа. В то же время, при условии детального описания перестроенных хромосом, сублинии с хромосомными аномалиями могут оказаться мощным инструментом в изучении роли конкретных хромосомных районов в поддержании плюрипотентности ЭСК и определении спектра их возможной дифференцировки.

CD30 как новый маркер недифференцированного статуса ЭСК человека. Как было упомянуто выше, сохранение нормального кариотипа является необходимым условием и критерием работы с ЭСК человека, поэтому обнаружение удобных маркеров трансформированного состояния ЭСК человека имеет большое значение. Herszfeld и соавторами было показано, что рецептор семейства ФНО CD30 может быть использован для того чтобы отличить клетки с аномальным кариотипом от нормальных ЭСК (Herszfeld et al., 2006). Изначально CD30 был обнаружен как антиген лимфом Риджа-Стенберга и Ходжкина. Экспрессия CD30 характерна также для клеток эмбриональной карциномы. Нами был проведен иммуногистохимический и FACS анализ экспрессии CD30 в 6 линиях ЭСК с нормальным кариотипом и 4 – с хромосомными aberrациями. Проведенный анализ показал, что независимо от метода культивирования и от кариотипа все исследованные линии экспрессируют CD30 антиген. Мы также исследовали экспрессию CD30 в ЭСК человека при дифференцировке *in vitro* и *in vivo*. В частично дифференцированных колониях ЭСК

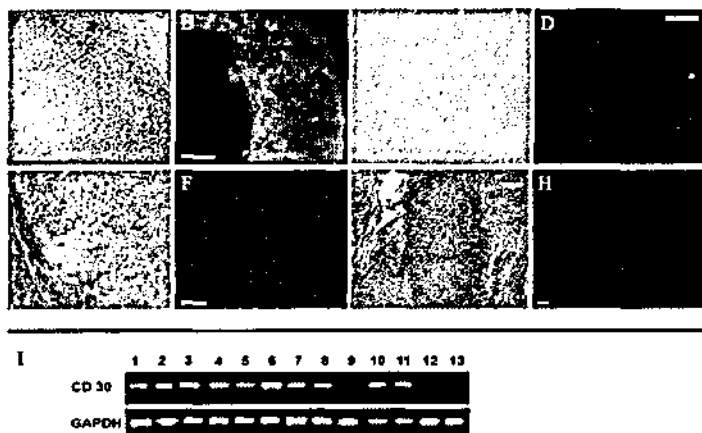


Рисунок 6. CD30 является маркером недифференцированных ЭСК человека. Иммуногистохимический (вверху) и ОТ-ПЦР анализ (внизу) экспрессии CD30 в ЭСК и их дифференцированных производных. А - Частично дифференцированная колония ЭСК (фазовый контраст). В - Та же колония, окрашенная антителами к CD30 (зеленый). С - нейроны, дифференцированные из ЭСК (фазовый контраст) D – нейроны, окрашенные антителами к CD30 (зеленый). Е-Н - Анализ экспрессии CD30 в тератомах, происходящих из ЭСК Е,Г Окрашка гематоксилином-эозином, F,Н – окраска антителами к CD30. Ядра окрашены DAPI I – CD30 транскрипт детектируется в недифференцированных ЭСК всех проанализированных линий (дорожки 1-8, 10, 11) и не детектируется в тканях проанализированных тератом (9, 12, 13).

CD30 не детектировался в участках дифференцировки (рис.6). Дифференцировка ЭСК по нейрональному (рис.6С, D) эндотелиальному пути и в фибробластоподобные клетки также приводила к исчезновению экспрессии CD30. Мы также проанализировали

гистологические срезы тератом, образованных в иммунодефицитных мышах клетками линии hESM01 с нормальным кариотипом и сублинией с кольцевой хромосомой 18. Мы не обнаружили экспрессии CD30 ни в тератомах из клеток с нормальным кариотипом, ни в тератомах, образованных мутантными клетками. Все полученные нами данные свидетельствуют о том, что CD30 скорее является новым маркером недифференцированного состояния ЭСК, чем маркером генетической нестабильности.

Исследование диффузионной связи через щелевые контакты в чЭСК и в процессе из спонтанной дифференцировки. Хорошо известно, что одним из важных элементов при локальном межклеточном взаимодействии являются щелевые контакты (ЩК), которые в своем активном состоянии обеспечивают интенсивную диффузионную связь между соседними клетками. Экспериментально было показано, что локальные межклеточные взаимодействия на основе ЩК имеют важное значение в процессах развития, в процессах эмбриональной индукции и дифференцировки. Однако, до настоящего момента оставалось неизвестным каким образом изменяются щелевые взаимодействия в процессе культивирования ЭСК и их дифференцировке. Проницаемость ЩК определяли методом внутриклеточных инъекций флуоресцентного красителя люцифера желтого в одну из клеток монослоя с последующей регистрацией его распространения в соседние клетки. Количество окрашенных клеток подсчитывалось через 2 мин. после инъекции красителя. Проницаемость ЩК исследовали на разных этапах развития культуры ЭСК человека. В первоначальных небольших колониях плюрипотентных клеток краситель, введенный в одну из центральных клеток, за 2 минуты после инъекции распространяется во все клетки островка (рис.7а, б). Иммуногистохимический анализ частично дифференцированных колоний на наличие маркеров плюрипотентности Oct3/4, Nanog и CD30 показывает, что в центральных клетках колонии эти маркеры отсутствуют, в то время как в окружающих их мелких клетках эти маркеры еще сохраняются (рис.7б, окраска на Oct3/4). Это доказывает, что клетки расположенные в центре колонии вступили в процесс дифференцировки и потеряли свойство плюрипотентности, а окружающие их клетки являются исходными плюрипотентными ЭСК. На рисунке 7d в одном поле зрения проведено две инъекции красителя в частично дифференцированной колонии ЭСК. Первая инъекция произведена в плюрипотентную клетку (левая часть кадра), а вторая - в дифференцированную клетку (верхняя часть того же кадра). Видно, что при первой инъекции хорошо окрашиваются многочисленные плюрипотентные клетки, а при второй краситель из дифференцированных клеток никуда не распространяется. Существенно отметить, что краситель распространяется только в плюрипотентные

клетки и никогда не переходит в зону дифференцированных клеток, что говорит о потере связи между дифференцированными и недифференцированными клетками в пределах одной структурно-морфологической единицы. Диффузионная связь внутри пула дифференцирующихся клеток не очень устойчива, и может колебаться в значительных пределах – от 10 окрашенных соседних клеток за две минуты после инъекции красителя в одну из клеток до полного отсутствия распространения красителя. Между плюрипотентными клетками в любом случае сохраняется высокий уровень диффузионной связи – до 30 окрашенных соседних клеток за 2 минуты после

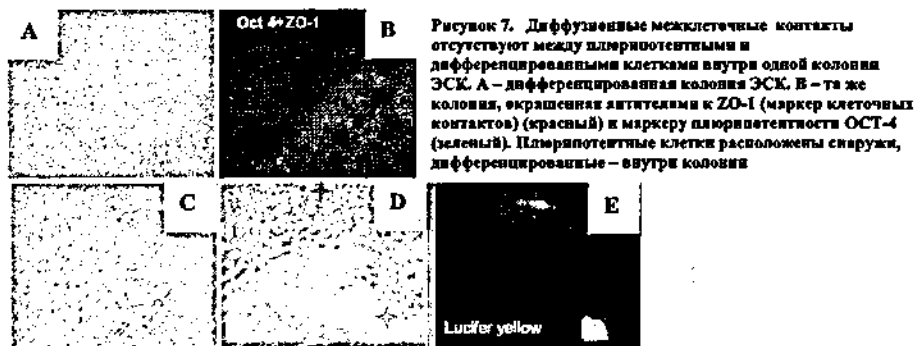


Рисунок 7. Диффузионные межклеточные контакты отсутствуют между плюрипотентными и дифференцированными клетками внутри одной колонии ЭСК. А – дифференцированная колония ЭСК, В – та же колония, окрашенная антителами к ZO-1 (маркер клеточных контактов) (красный) и маркеру плюрипотентности OCT-4 (зеленый). Плюрипотентные клетки расположены снаружи, дифференцированные – внутри колонии

С-Е. Исследование плотности диффузионных контактов с помощью инъекции люцифера зеленого в дифференцированные (D на C) и недифференцированные клетки в колонии ЭСК. Места инъекции обозначены звездочками на D. E – распределение люцифера зеленого в течение 20 сек после инъекции. Видно отсутствие связи между пулами плюрипотентных и дифференцированных клеток в колонии.

инъекции. Очень высокая диффузионная связь между плюрипотентными ЭСК указывает на то, что эти клетки весьма интенсивно обмениваются между собой пулом низкомолекулярным растворимых в воде соединений, который может включать в том числе и плюрипотентности. Подобная интеграция или кооперация плюрипотентных ЭСК несомненно создает высокую устойчивость в поддержании соответствующего биологического статуса этих клеток, так как любые изменения метаболизма в отдельных клетках, например, при различных отклонениях в работе генома, будут нивелироваться мощными потоками соединений, поступающих из соседних клеток. В этой связи становится очевидным важный функциональный смысл возникающего блока диффузионной связи между общим пулом плюрипотентных ЭСК и отдельными клетками этого же пула, которые стремятся детерминироваться в определенном направлении с потерей плюрипотентности. Полученные результаты позволяют

предположить, что блокада диффузионной связи в самом начале детерминации ЭСК является одним из ключевых моментов в развитии процесса дифференцировки в культуре ЭСК. Вопрос о неустойчивости диффузионной связи между дифференцированными ЭСК требует более детального изучения. Возможно, в этом случае для дальнейшего развития начавшегося процесса дифференцировки наличие или отсутствие диффузионной связи не является существенным. Возможно и другое объяснение. Потеря диффузионной связи между этими клетками может быть важна для последующих дифференцировок, которые могут развиваться в разных направлениях.

Линии ЭСК человека имеют различный статус инактивации X хромосом. Известно, что в линиях ЭСК мыши с кариотипом XX обе X-хромосомы активны, а инактивация одной из них происходит в процессе дифференцировки. Однако, ЭСК человека не полностью соответствуют ЭСК мыши, а более близки к ЭСК мыши, полученным из эпибласта, в которых уже произошла инактивация одной из X хромосом. До настоящего момента остается открытым вопрос о статусе инактивации X-хромосомы в женских линиях ЭСК человека. Показано, что статус инактивации зависит от конкретной линии и условий культивирования (Silva et al., 2008). Мы

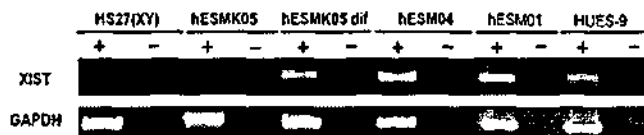


Рисунок 8. ОТ-ПЦР анализ экспрессии гена XIST в различных линиях ЭСК

решили изучить, существуют ли эпигенетические отличия между линиями ЭСК человека на уровне статуса инактивации X хромосомы в женских клетках. Мы проанализировали экспрессию гена *Xist* – ключевой молекулы в процессе инактивации X хромосомы. Результат ОТ-ПЦР анализа экспрессии гена *XIST* в линиях ЭСК человека представлен на рисунке 8. Высокий уровень экспрессии *XIST* наблюдался в клетках линий hESM01 и hESM04, в линии HUES9 ген XIST экспрессировался очень слабо, а в линии ESMK-05 экспрессии не было обнаружено. По уровню экспрессии *XIST* можно предположить, что линии hESM01 и hESM04 имеют неактивную X-хромосому, а в линиях HUES9 и hESMK05, по-видимому, инактивированная X-хромосома отсутствует, в то же время ген *XIST* экспрессируется дифференцированными клетками линии hESMK05. Для того, чтобы проверить статус X-хромосом, было решено провести исследование модификаций, характерных для

транскрипционно активного и неактивного хроматина (рис.9). Существует несколько гистоновых модификаций, ассоциированных с транскрипционно активным хроматином, наиболее распространенная - диметилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4me2). Было исследовано, каким образом данная модификация распределена на X-хромосомах ЭСК человека. Всего было проанализировано не менее 100 ядер и 40 метафазных пластинок для каждой линии. В линии hESM04 четко выявляется неактивная X-хромосома, на которой отсутствует диметилирование гистона H3 по лизину 4. В линиях hESKM05 и HUES9 данная модификация обнаружена на всех хромосомах, что свидетельствует об отсутствии неактивной X-хромосомы. Одновременно было проведено исследование гистоновых модификаций, ассоциированных с транскрипционно неактивным хроматином. Основной из них является триметилирование гистона H3 по лизину 27 (H3K27me3), данная модификация маркирует неактивную X-хромосому. При изучении модификации H3K27me3 на

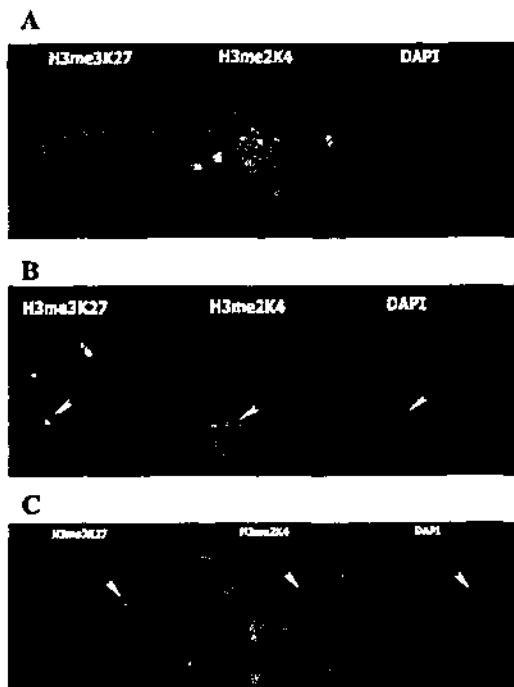


Рисунок 9. Различный статус инактивации X хромосомы в клетках ЭСК человека с кариотипом XX. Иммуногистохимическое окрашивание метафазных пластинок и ядер антителами к H3me3K27 и H3me2K4. А – линия hESKM05. Обе X хромосомы активны. В - линия hESM04. Одна X хромосома неактивна во всех проанализированных клетках. С- линия hESM01, X хромосома инактивирована в 10% клеток, в остальных клетках обе X хромосомы активны. Стрелками указана позиция инактивированной X.

препаратах интерфазных ядер оказалось, что сигнал неактивной X-хромосомы обнаруживается во всех клетках линии hESM04, в 10 % клеток в линии hESM01, а в линиях hESMK05 и HUES9 не обнаруживается совсем. В процессе дифференцировки линии hESMK05 одна из X хромосом теряет маркер активного хроматина и

приобретала маркер неактивного. Таким образом, мы показали, что линии ЭСК человека имеют эпигенетические различия в статусе инактивации X хромосомы. Учитывая, что все линии культивировались в одинаковых условиях, мы предполагаем, что, скорее всего, различия в статусе инактивации X хромосомы в женских клетках является исходным свойством линии, хотя нельзя полностью исключить возможность влияния длительного культивирования.

Различия в эпигенетическом статусе линий ЭСК человека не затрагивает метилирования регуляторных районов генов ключевых транскрипционных факторов, необходимых для самоподдержания и сохранения плюрипотентности. В регуляции самоподдержания и плюрипотентности ЭСК человека принимает участие ряд ключевых транскрипционных факторов, такие как *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2* и др. Сложное сочетание разного уровня экспрессии и взаиморегуляции этих факторов необходимо для нормального развития эмбриона *in vivo* и самоподдержания ЭСК *in vitro*. Моделью дальнейшего развития ЭСК *in vitro*, эквивалентной стадии гастрюляции, является эмбрионное тельце. На стадии гастрюляции начинается специализация клеток, поэтому функционирование генов, вовлеченных в поддержание плюрипотентного состояния, должно быть надежно заблокировано на этой и дальнейших стадиях развития эмбриона. Эпигенетические механизмы позволяют инактивировать транскрипцию гена через сложный многоступенчатый процесс, одним из этапов которого является метилирование ДНК. Ранее было показано, что метилирование ДНК лежит в основе регуляции экспрессии гена *Oct3/4* мыши, и предполагается, что именно метилирование регуляторного района гена *Oct3/4* является критическим при репрограммировании генома методом переноса ядер соматических клеток. На стадии бластоцисты в том же временном интервале, что и *Oct3/4*, экспрессируются так называемые *Oct3/4*-ассоциированные гены. Следует отметить, что часть *Oct3/4*-ассоциированных генов может реактивироваться в клонированных эмбрионах мыши, а некоторые гены остаются в неактивном состоянии. Для анализа

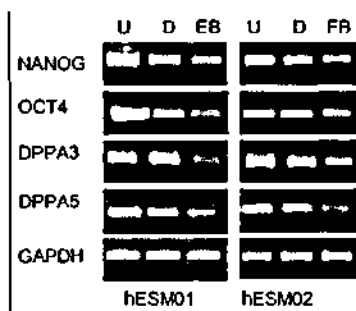


Рисунок 10. Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ генов NANOG, OCT4, DPPA3, DPPA5 в недифференцированных (U), дифференцированных ЭСК человека (D) и в эмбрионных тельцах (EB) из ЭСК человека линий hESM01 и hESM02. GAPDH использован как внутренний контроль.

эпигенетического статуса были выбраны гены *DPPA3* и *DPPA5*, которые, в отличие от *Oct3/4*, полностью реактивируются при переносе соматического ядра в ооцит мыши. Для анализа экспрессии генов *Oct3/4*, *Nanog*, *DPPA3* и *DPPA5* использовали РНК, выделенную из недифференцированных колоний ЭСК частично дифференцированных колоний и из эмбрионных телца на 12 день дифференцировки. Мы проанализировали экспрессию генов *Nanog*, *Oct3/4*, *DPPA3* и *DPPA5* по мере дифференцировки ЭСК в ЭТ. Во всех проанализированных линиях ЭСК экспрессия всех четырех генов снижалась на стадии дифференцировки в ЭТ (рис. 10). Основываясь на данных экспрессии, было решено определить изменения в статусе метилирования регуляторной области человеческого гена *Oct3/4* и 5'-концевых областей генов *Nanog*, *DPPA3* и *DPPA5*

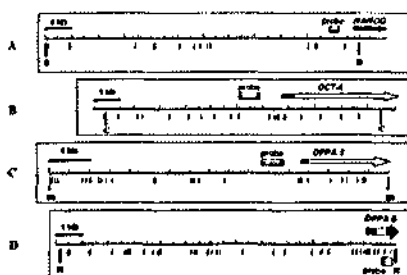


Рисунок 11. Карта 5'-концевых регионов генов NANOG (А), OCT4 (В), DPPA3 (С), DPPA5 (D). Экзоны показаны черным цветом, а направление транскрипции гена стрелкой. HpaII/MspI сайты рестрикции показаны вертикальными линиями. Гибридационные пробы закрашены диагональной штриховкой. Буквы В, С, В1 и D обозначают ограничивающие сайты рестрикции BamHI, Cfr91, BglII и HindIII, соответственно.

(рис.11) в линиях ЭСК человека во время дифференцировки в эмбрионные телца. В качестве контроля была использована ДНК из терминально дифференцированных клеток: лимфоцитов периферической крови, в которых исследуемые гены не экспрессируются. Статус метилирования ДНК анализировался с помощью Саузерн-блот гибридизации геномной ДНК, обработанной чувствительной к метилированию рестриктазой HpaII и нечувствительной к метилированию MspI с пробами, с соответствующими 5'-концевым участкам исследуемых генов. Выбранный подход позволял проанализировать качественные изменения метилирования на большом участке генома (в нашем случае 8-12 т.п.н.), то есть анализируются все вероятные регуляторные области, которые попадают в исследуемый участок. Ранее, сравнительный анализ статуса метилирования и уровня ацетилирования в ЭСК и трофобластах мыши выявил строгую взаимосвязь между эпигенетическим статусом гена и его активностью. Однако, подобные эксперименты не проводились на клетках человека, поэтому был проанализирован статус метилирования 5'-области гена *Oct3/4* человека, соответствующей регуляторной области гена *Oct3/4* мыши. Гибридационный анализ показал, что вся область между ограничивающими сайтами рестрикции размером около 10 т.п.н. и включающая промоторную область гена *Oct3/4*

не метилирована в недифференцированных ЭСК (рис.12а). Во время дифференцировки в ЭТ, в которых экспрессия *Oct3/4* все еще наблюдается, но уровень значительно снижен, исследуемая область гена частично метилирована во всех исследованных линиях ЭСК человека. На рисунке 12а приведены результаты, полученные для линии hESM02. Частичное метилирование в ЭТ можно объяснить тем, что ЭТ представляют собой гетерогенную популяцию клеток на разных стадиях дифференцировки, с разным уровнем экспрессии гена *Oct3/4*. Регуляторная область гена *Nanog* человека изучена недостаточно. Была показана функциональная значимость некоторых регуляторных

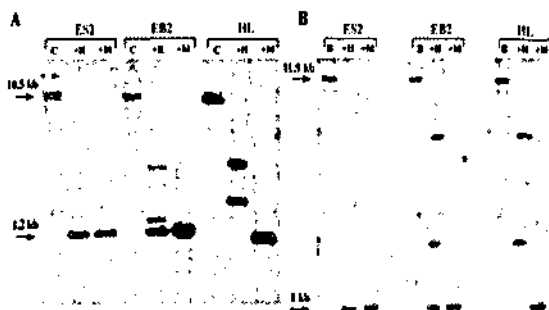


Рисунок 12. Анализ уровня метилирования промоторной области гена OCT4 и предполагаемой регуляторной области гена NANOG. (А) Саузерн-блот гибридизация OCT4 пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телец (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной Cfr91 (C), Cfr91 и HpaII (+H), Cfr91 и MspI (+M). (B) Саузерн-блот гибридизация NANOG пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телец (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной BamHI (B), BamHI и HpaII (+H), BamHI и MspI (+M). Молекулярный вес гибридационных

элементов 5' области гена *Nanog* мыши, которые содержат сайты связывания транскрипционных факторов *Oct3/4* и *Sox*. Нами был проанализирован уровень метилирования 5'- области гена *Nanog* размером 12 т.п.н., куда могли попадать основные регуляторные элементы гена. Как видно из рисунка 12в, регуляторная область гена *Nanog* не метилирована в недифференцированных ЭСК и частично метилирована в ЭТ. Изменение статуса метилирования 5'-концевой области гена *Nanog* в процессе дифференцировки ЭСК в ЭТ происходит сходно с изменением статуса метилирования регуляторной области гена *Oct3/4*. Учитывая эпигенетическую инактивацию *Oct3/4* и *Nanog* в соматических клетках, можно предположить, что при репрограммировании генома будет происходить неполная реактивация не только гена

Oct3/4, но и *Nanog*. Регуляторные области генов *DPPA3* и *DPPA5* не изучены. Основываясь на данных экспрессии генов *DPPA*, было предположено, что регуляция их экспрессии осуществляется аналогично генам *Oct3/4* и *Nanog*. Нами был проанализирован статус метилирования генов *DPPA3* и *DPPA5* в клетках линий hESM01, hESM02, hESM03 и в лимфоцитах периферической крови человека. 5'-концевая область гена *DPPA3* полностью метилирована в недифференцированных клетках линии hESM02 и частично метилирована в эмбрионных тельцах, а в недифференцированных клетках линии hESM01 и эмбрионных тельцах частично метилирована (рис.13а). Схожие изменения в статусе метилирования наблюдаются и в 5'-концевой области гена *DPPA5* во время дифференцировки ЭСК в эмбрионные тельца. 5'-концевая область гена *DPPA5* метилирована в недифференцированных клетках линии hESM02 и частично метилирована в эмбрионных тельцах, а в

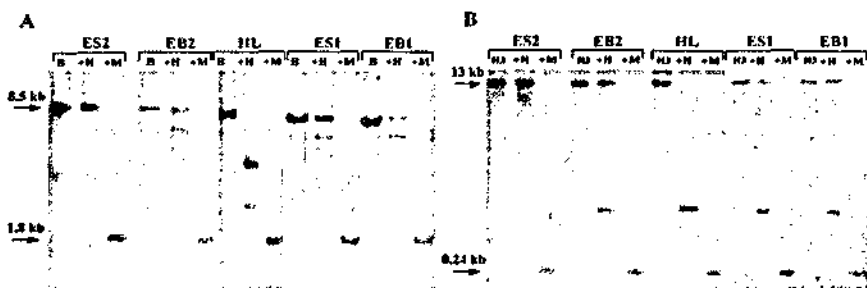


Рисунок 13. Анализ уровня метилирования предполагаемых регуляторных 5'-концевых областей генов *DPPA3* и *DPPA5*. (А) Саузер-блот гибридизации *DPPA3* пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телц (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной BglII (B), BglIII и HpaII (+H), BglIII и MspI (+M). (Б) Саузер-блот гибридизации *NANOG* пробы с геномной ДНК из колоний ЭСК (ES), эмбрионных телц (EB) и из лимфоцитов периферической крови человека (HL), обработанной HindIII (H), HindIII и HpaII (+H), HindIII и MspI (+M). Молекулярный вес гибридизационных полос обозначен сбоку.

недифференцированных клетках линии hESM01 и эмбрионных тельцах частично метилирована (рис.13в). Таким образом, было продемонстрировано, что полученные по одному протоколу линии ЭСК отличаются статусом метилирования в области аутомных генов, не вовлеченных напрямую в поддержание плюрипотентности. Разный статус метилирования генов *DPPA3* и *DPPA5* не влияет на их экспрессию в ЭСК и на процесс дифференцировки в эмбрионные тельца. В данном случае метилирование не приводит к ингибированию экспрессии генов. Эти данные показывают, что экспрессия генов *DPPA3* и *DPPA5* в ЭСК человека не зависит от метилирования и потенциально возможна их реактивация после репрограммирования генома. Экспрессия генов *Oct3/4* и *Nanog* зависит от статуса метилирования их

промоторной области и возможно поэтому они хуже реактивируются при соматическом переносе ядер.



Рисунок 14. Результаты дифференциального анализа метилирования 14000 CpG в ДНК клеток линий hESM01 и hESM03. Зеленым показаны неметилированные CpG, красным – метилированные.

Полногеномный анализ статуса метилирования 27000 CpG более 14000 генов (Methylation BeadChip, Illumina) в двух линиях ЭСК человека, позволил обнаружить различия в степени метилировании CpG в промоторах более 400 генов (рис.14). Одно из возможных объяснений разного эпигенетического статуса линий ЭСК человека, заключается в том, что внутренняя клеточная масса, из которой получали ЭСК, была взята с небольшой временной разницей, в то время, когда идет волна тотального метилирования генома *de novo*. На основании полученных данных можно предположить, что линии ЭСК человека могут использовать сходные принципы поддержания плюрипотентного состояния, но их эпигенетическое наследие может

быть различным, и, соответственно, потенциал дифференцировки тоже может отличаться. Таким образом, для дальнейшего практического применения ЭСК человека, необходимо определять эпигенетический статус каждой линии.

Дифференцировка ЭСК человека *in vitro* в специализированные типы клеток. Нами были поставлены эксперименты по проверке способности ЭСК линий hESM01 и hESM04 к дифференцировке в клетки эритроидного ряда. Для этого колонии недифференцированных ЭСК высевали в субконфлюэнтности на фидер из стромальных клеток линии OP9, известных своей способностью к поддержанию гемопоэза. После 2х дней культивирования, в ростовую среду добавляли ростовые факторы и добавки (SCF, BMP-4, FLT-3L, эритропоэтин, VEGF, IGF, дексаметазон) в различных концентрациях и сочетаниях и продолжали культивирование в течение трех-четырёх недель. На рисунке 15а представлены эритроblast-подобные клетки, полученные в ходе разработки протокола дифференцировки ЭСК человека.

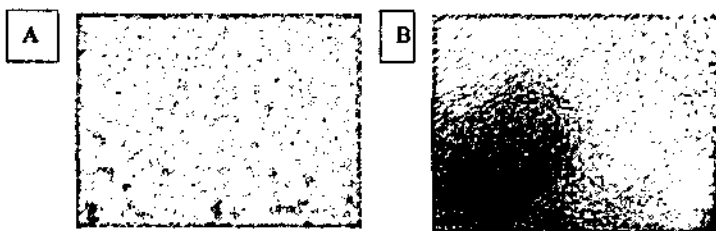


Рисунок 15. Дифференцировка ЭСК человека в специализированные типы мезодермальных клеток *in vitro*. А. Морфология эритроид-подобных клеток, дифференцированных из ЭСК. В – сокращающиеся кардиомиоциты, дифференцированные из ЭСК

ЭСК были также дифференцированы *in vitro* в другие производные мезодермального листка – фибробласты, миобласты (не показано), кардиомиоциты (рис.15 в)

Дифференцировка чЭСК в компоненты сетчатки глаза. Культивирование ЭСК в высокой плотности в условиях, дающих преимущество для развития нейроэпителия (добавление *poggin*, EGF, bFGF), а затем добавление BMP, VEGF и сыворотки при культивировании около 90 дней приводило к образованию сложных трехмерных структур, нейроэпителиального происхождения. Как показал иммуногистохимический и ОТ-ПЦР анализ, в фокусах происходит формирование структурированных тканей, имеющих маркеры развивающегося глаза (рис. 16), в том числе пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторов, и, возможно, зачатков хрусталика глаза (рис. 16 J, экспрессия кристаллинов А и В, характерных для хрусталика).

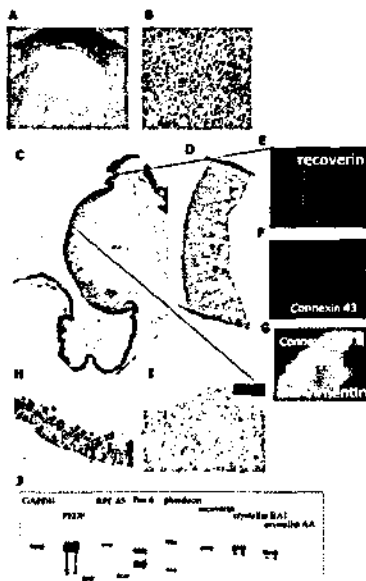


Рисунок 16. Дифференцировка ЭСК в компоненты сетчатки глаза. А – вид трехмерной структуры, напоминающей глаз, после месяца культивирования. В - Клетки пигментного эпителия, составляющие наружный слой структуры, изображенной на А. С, D – полутонкие срезы структур, изображенных на А, окраска метиленовым синим. E-G иммуногистохимический анализ срезов. H – полутонкий срез, пигментного эпителия. Видны границы мезалевия. I – электронная микрофотография пигментного эпителия. J – ОТ-ПЦР анализ РНК выделенной из фокусов, демонстрирующий экспрессию генов, характерных для развивающегося глаза

Разработка технологии дифференцировки и очистки эндотелиальных клеток из ЭСК для практического использования. Кроме дифференцировки ЭСК в желаемом направлении для практического использования специализированных клеток с целью терапии или скрининга субстанций необходимо иметь чистую популяцию специализированных клеток. Примесь низкодифференцированных клеток или клеток другой специализации может критически сказаться на их терапевтическом потенциале и может привести к нежелательным последствиям. В случае скрининга субстанций, примесные популяции клеток могут искажать действие вещества на тестируемый клеточный тип. Поэтому было решено разработать эффективную систему дифференцировки ЭСК человека в эндотелий сосудов и на этой модельной системе

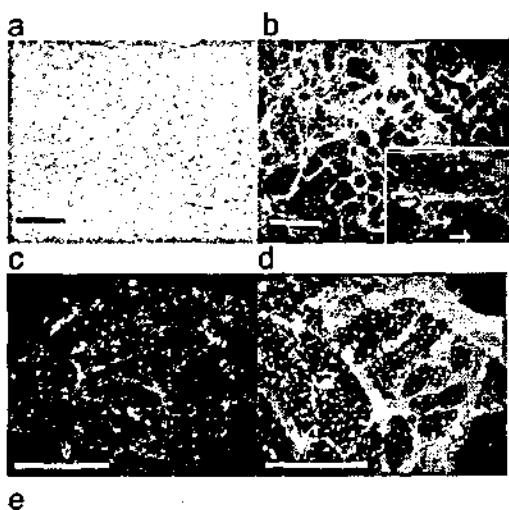


Рисунок 17. Иммуногистохимический анализ эндотелия из ЭСК после 6 дней (b) 8 дней (c) и 12 дней (d) культивирования в среде для дифференцировки. а - сосудистоподобные структуры - светлое поле; б-экспрессия раннего эндотелиального маркера CD31 (красный); ядра окрашены DAPI (синий); в - экспрессия позднего эндотелиального маркера vWF (красный), д - экспрессия эндотелиального маркера CD165 (красный), ядра окрашены DAPI (синий). Вторичные антитела Alexa Fluor 546 (b,c) и Alexa Fluor 488 (d). Е - Анализ экспрессии CD31 с помощью проточной цитофлуориметрии, изотип-контроль (открытое поле), CD31 специфичные антитела (красное поле).

отработать выделение чистой популяции эндотелиальных клеток. Разработанная методология должна быть универсальна для различных линий ЭСК. Для разработки

технологии были использованы линии hESM01, hESM02 и hESM03. Эти линии, полученные в лаборатории ранее, проявляли характерную для данного типа клеток морфологию, экспрессировали соответствующие маркеры и имели нормальный кариотип. При переводе в суспензионную культуру ЭСК формировали ЭТ с характерной морфологией для данного типа структур. При иммуногистохимическом анализе ЭТ после 10-12 дней культивирования были обнаружены в небольшом

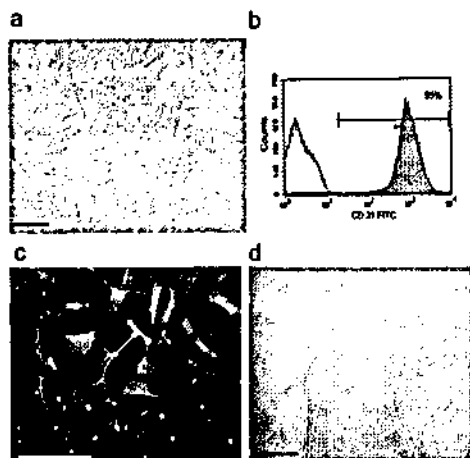


Рисунок 18. А - клетки эндотелия, полученные из ЭСК, через 24 часа после селекции (фотография в светлом поле). В - анализ чистоты популяции клеток после иммуномагнитной селекции с помощью проточной цитофлуориметрии, с - иммуногистохимический анализ эндотелиальных клеток после проведения иммуномагнитной селекции. Экспрессия CD31 (красный); ядра окрашены DAPI (синий). d - Тест на матригеле (Matrigel Assay), показывающий функциональность клеток, выделенных с помощью иммуномагнитной селекции

количестве (не более 5%) эндотелиоцитоподобные клетки, экспрессирующие специфический маркер CD31. Такой метод дифференцировки имел ряд недостатков. Во-первых, требовалось получение ЭТ, что требует времени и эффективность процесса не высока, во-вторых, неконтролируемая дифференцировка дает небольшой выход желаемых клеток. Было решено разработать метод дифференцировки ЭСК в эндотелий сосудов минуя стадию формирования ЭТ. Отсутствие в литературе данных по дифференцировке ЭСК человека в двумерной системе без формирования ЭТ в эндотелиальные клетки потребовало подбора условий и сред для дифференцировки. Мы использовали различный состав сред с различным сочетанием факторов роста, концентраций и типов сывороток, и остановились на наиболее эффективных условиях культивирования. Колонии недифференцированных ЭСК снимали с обработанного коллагеназой фидера и помещали на чашки Петри, покрытые коллагеном IV типа. В среде DMEM/F12, содержащей 15% FBS, bFGF (4 нг/мл), SCF (20 нг/мл), VEGF (20 нг/мл), IGF(20 нг/мл), гидрокортизон, гепарин, клетки на 5 день начинали приобретать морфологию дифференцированных производных. На 7ой день культивирования колонии содержали кластеры сосудоподобных структур. Разработанный протокол дифференцировки позволял получить культуру клеток, в которой доля эндотелиальных

клеток составляла до 50% (Рис.17). Иммуноцитохимический анализ показал, что большая часть клеток была положительна не только по ранним маркерам эндотелия, но и экспрессировала маркер позднего, зрелого эндотелия – фактор Вон Виллибрандта (vWF). Таким образом, нами была показана возможность высокоэффективного получения клеток эндотелия из ЭСК человека в двумерной системе минуя стадию формирования ЭТ.

Следующей задачей являлась разработка метода селекции предшественников эндотелия и эндотелиальных клеток из дифференцированных ЭСК человека. Был выбран метод иммуномагнитной сепарации MACS (magnetic activated cell sorting). Подобный метод позволяет с чистотой более 98% провести селекцию нужной популяции клеток по поверхностным маркерам. Для селекции эндотелия, полученного из ЭСК был использован поверхностный маркер CD31. После соответствующих промывок проводили сепарацию на колонках. Фракцию CD31-положительных клеток высевали на чашки, покрытые коллагеном, в среду для эндотелиальной дифференцировки. Из CD31 положительной фракции клеток отбирали аликвоты для оценки жизнеспособности после сепарации, оценки чистоты популяции (иммуногистохимический анализ) и для оценки функциональной способности выделенных клеток образовывать сосудистые структуры (Matrigel assay). Как видно из рисунка 18, клетки формировали характерную для эндотелия ячеистую сосудоподобную сеть. Иммуногистохимический анализ и данные проточной цитофлуориметрии показали, что более 95% клеток после селекции были положительны по CD31. Анализ экспрессии генов, характерных для эндотелия, методом полуколичественного ОТ-ПЦР показал, что уровень экспрессии этих генов в клетках эндотелия из ЭСК сравним с уровнем их экспрессии в эндотелиальных клетках человека (HUVEC). Таким образом мы показали, что клетки эндотелия, дифференцированные из ЭСК человека, могут быть успешно очищены методом магнитной сепарации, при этом сохраняя жизнеспособность и функционально были идентичны нормальным клеткам эндотелия сосудов человека.

Дифференцировка ЭСК в специализированный тип клеток сопровождается изменением паттерна экспрессии генов и закрепляется на эпигенетическом уровне. Роль метилирования в регуляции экспрессии генов *GATA-2*, *GATA-3* и *NOX* при дифференцировке ЭСК человека в эндотелий. Формирование эндотелия в эмбриогенезе и функционирование во взрослом организме сопровождается экспрессией целого ряда транскрипционных факторов. Ранее было показано, что транскрипционные факторы семейства GATA принимают непосредственное участие в реорганизации

внеклеточного окружения дифференцированных эндотелиальных клеток, регулируя экспрессию своих генов – мишеней. *GATA-2* экспрессируется в различных типах тканей и играет важную роль в образовании гематопозитических предшественников. В процессе дифференцировки и в дифференцированных эндотелиальных клетках *GATA-2* регулирует экспрессию таких генов, как *eNOS*, *Эндотелин-1*, *Fli-1*, *ICAM-2*, *P-селектин*, *PECAM-1*, *Urokinase*, *vWF*. *GATA-3* экспрессируется во многих тканях мышечного эмбриона. Как *GATA-1* и *2*, *GATA-3* принято относить к гематопозитическим транскрипционным факторам. Роль *GATA-3* в эндотелии мало изучена. *GATA-3* принимает участие в позитивной регуляции экспрессии гена *VCAM-1*, а *GATA-6* негативно регулирует тот же ген. Тем самым, образуется сложная сеть регуляции экспрессии, которая отражается на фенотипе клеток. Эти и другие транскрипционные факторы оказывают влияние на экспрессию генов, специфических для эндотелия. Одним из характерных эндотелиальных генов является *eNOS*. *eNOS* производит основную часть оксида азота в эндотелиальных клетках. *eNOS* экспрессируется на поздних стадиях дифференцировки эндотелия и характеризует зрелый эндотелий. ОТ-ПЦР анализ ЭСК и полученного из него эндотелия сосудов показал, что в чистой

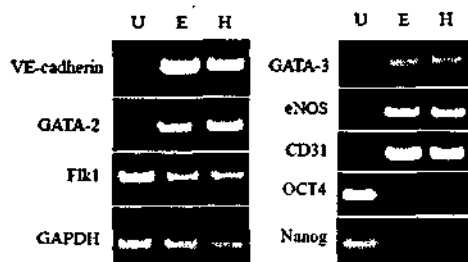


Рисунок 19. Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ генов VE-кадгерин, *GATA-2*, *Fli1*, *GAPDH*, *GATA-3*, *eNOS*, *CD31* и генов плюрипотентности *oct4* и *nanog* в недифференцированных ЭСК линии ESM03 (U), клетках эндотелия из ЭСК линии ESM03, полученных с помощью иммуномагнитной сепарации (E) и в клетках эндотелия из пупочной вены человека (H).

популяции эндотелиальных клеток отсутствует экспрессия генов, связанных с плюрипотентностью (*Oct3/4*, *Nanog*), зато наблюдается экспрессия генов, характерных для эндотелия сосудов (рис.19).

Таким образом, в дифференцированных производных работает генетическая программа, характерная для клеток эндотелия сосудов. Однако, по нашему мнению, кроме изменения генетической программы критерием «совершенной» дифференцировки должны также быть изменения в эпигенетическом статусе при переходе из дифференцированного состояния в плюрипотентное. Например, для *eNOS* была показана зависимость экспрессии от эпигенетического статуса его регуляторных областей в эндотелиальных и неэндотелиальных клетках (Chan et al., 2004). Для транскрипционных факторов *GATA-2* и *GATA-3* такие исследования не проводились, поэтому было решено исследовать метилирование промоторных областей генов *eNOS*

GATA-2 и *GATA-3* во время тканеспецифической дифференцировки ЭСК человека в клетки функционального эндотелия, полученные по технологии описанной выше. Паттерн метилирования промоторных районов *GATA-2*, *GATA-3* и *eNOS* был проанализирован в ЭСК человека а также в клетках эндотелия, полученных из ЭСК человека и в первичной культуре нормальных эндотелиальных клеток человека, выделенных из пупочной вены (HUVEC). С помощью бисульфитного секвенирования была проанализирована область, соответствующая селективному промотору гена *GATA-2*, экспрессия с которого осуществляется в гематопозитических клетках и гемангиобласте. В недифференцированных ЭСК человека уровень метилирования исследуемого района оказался высоким, доля метилированных CpG-динуклеотидов в

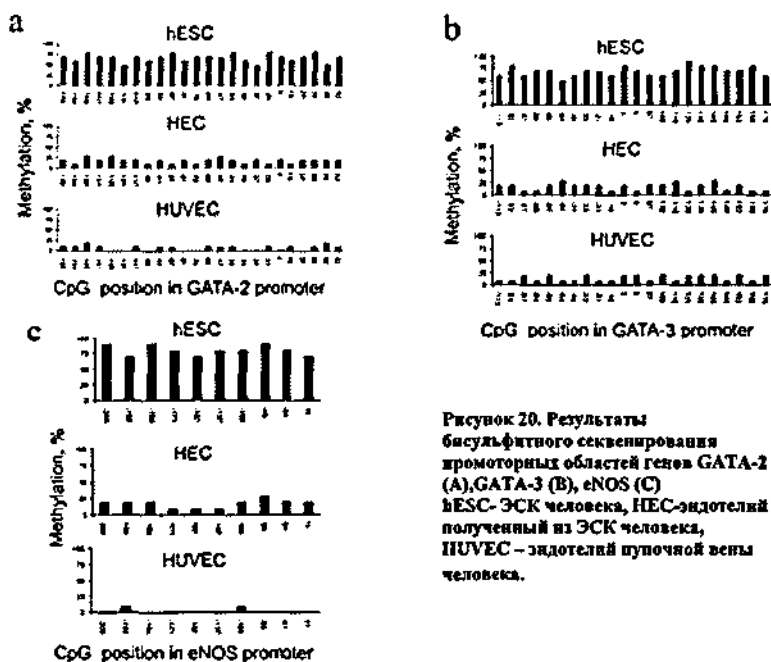


Рисунок 20. Результаты бисульфитного секвенирования промоторных областей генов *GATA-2* (А), *GATA-3* (В), *eNOS* (С) hESC- ЭСК человека, HEC-эндотелий полученный из ЭСК человека, HUVEC – эндотелий пупочной вены человека.

одном сайте варьировала от 50% до 80% (рис.20). В эндотелиальных клетках, полученных из ЭСК человека, уровень метилирования был значительно ниже, доля метилированных CpG-динуклеотидов в одном сайте метилирования варьировала от 10% до 30% (рис. 20). В HUVEC уровень метилирования был немного ниже, доля метилированных CpG динуклеотидов в одном сайте метилирования варьировала от 0 до 20%. Таким образом, в недифференцированных ЭСК, которые не экспрессируют *GATA-2*, селективный промотор транскрипционного фактора гиперметилирован, а в клетках экспрессирующих *GATA2* – гипометилирован. Из этого следует, что метилирование

селективного промотора *GATA-2* в ЭСК человека может оказывать влияние на экспрессию этого транскрипционного фактора. Анализ транскрипции *GATA-3* выявил низкий уровень экспрессии гена в недифференцированных ЭСК человека и высокий в клетках эндотелия из ЭСК и в HUVEC (рис. 20). Как и в случае *GATA-2*, у *GATA-3* существует два промотора. Экспрессия с альтернативного промотора обнаруживалась только в тканях головного мозга, поэтому для изучения возможной эпигенетической регуляции гена *GATA-3* нами была выбрана область основного промотора гена. В недифференцированных ЭСК человека исследуемая область была гиперметилирована и уровень варьировал от 60% до 90% метилированных CpG-динуклеотидов. В эндотелии, полученном из ЭСК человека, уровень метилирования был низкий - от 10% до 30% метилированных CpG. В HUVEC наблюдался схожий уровень метилирования от 10% до 20% метилированных CpG. Таким образом, полученные нами данные говорят о том, что даже в случае гиперметилирования основного промотора гена *GATA-3* наблюдается слабая экспрессия гена в недифференцированных ЭСК человека. Из этого следует, что метилирование основного промотора в недифференцированных ЭСК недостаточно для полного ингибирования экспрессии *GATA-3*. Ранее было показано, что для некоторых промоторов ингибирование, опосредованное метилированием ДНК, эффективно лишь в контексте хроматина. Вторым возможным вариантом является работа альтернативного промотора гена *GATA-3* в ЭСК человека. В рамках настоящей работы альтернативный промотор не исследовался. Тем не менее, опираясь на полученные нами данные по существенному увеличению экспрессии *GATA-3* в дифференцированных клетках эндотелия, мы можем утверждать, что гипометилирование промотора гена по мере дифференцировки ЭСК человека в клетки эндотелия, оказывает положительное влияние на транскрипцию гена *GATA-3*. По результатам ОТ-ПЦР ген *eNOS* экспрессируется в клетках эндотелия, полученных из ЭСК, и в HUVEC и не экспрессируется в недифференцированных ЭСК человека (рис. 20). По данным Чап и соавторов (Чап Y., 2004), наиболее существенным эпигенетическим модификациям в эндотелиальных клетках подвергается регуляторный район гена *eNOS* в ближайшем к старту транскрипции районе, поэтому для бисульфитного секвенирования была использована праймеры на значимую цепь на область с 13 по -297 нуклеотид относительно старта транскрипции. Доля метилированных CpG-динуклеотидов в каждом сайте метилирования варьировала в недифференцированных ЭСК от 70% до 90% (рис 19.). В эндотелиальных клетках, полученных из ЭСК человека доля метилированных CpG динуклеотидов в каждом сайте метилирования варьировала от 10% до 30% CpG динуклеотидов (рис. 20). В клетках HUVEC доля метилированных

СрG-динуклеотидов не превышала 10%. Исследуемая регуляторная область гена *eNOS* содержит сайты связывания конститутивных транскрипционных факторов Sp1, Sp3, Ets-1, которые активны и в клетках эмбриона. Гиперметилирование этого участка в ЭСК человека скорее всего блокирует связывание этих факторов с промоторной областью гена, как это и было показано для гладкомышечных клеток стенки сосудов. Известно, что транскрипционный фактор GATA-2 участвует в регуляции экспрессии гена *eNOS*. В соответствии с нашими данными по мере дифференцировки ЭСК в клетки эндотелия наблюдается одновременное гипометилирование регуляторных районов генов *GATA-2* и *eNOS*. Таким образом, происходит двойной негативный контроль экспрессии *eNOS* в недифференцированных клетках ЭСК человека, метилирование блокирует не только промоторный район самого гена, но и промоторный район транскрипционного фактора GATA-2, контролирующего экспрессию гена *eNOS*. Из полученных данных видно, что уровень метилирования промоторных районов сильно отличается в недифференцированных ЭСК и клетках эндотелия. Однако, также наблюдается разница (хотя и гораздо менее существенная), в уровне метилирования между клетками эндотелия из ЭСК и HUVEC. Объяснение возможно заключается в том, что клетки эндотелия из ЭСК были получены *in vitro*, и, несмотря на то, что по экспрессии основных эндотелиальных маркеров и по образованию сосудоподобных структур они аналогичны первичным клеткам эндотелия, таким как HUVEC, они демонстрируют отличие на эпигенетическом уровне. Возможно, эти отличия возникли из-за гетерогенности самой эндотелиальной культуры, поскольку не ясно окончательно, к какому типу эндотелия относятся полученные клетки или они представляют смесь специализированных эндотелиальных клеток. Это предположение подтверждается данными Чап с соавторами, которыми показана разница в уровне метилирования регуляторной области гена *eNOS* в HUVEC и в HuDerMVEC (эндотелий микрососудов кожи человека), в то время как уровень экспрессии гена *eNOS* в обоих типах клеток сходен. Таким образом, разработанная нами технология дифференцировки и селекции ЭСК человека в эндотелий сосудов приводит не только к изменению паттерна экспрессии генов, но закрепляет генетические изменения на уровне эпигенома через деметилирование промоторных районов.

Использование чЭСК для изучения эпигенетической регуляции нейрональной дифференцировки. Мы использовали разработанную нами модель дифференцировки ЭСК человека по нейрональному пути, чтобы проверить возможную роль новой некодирующей РНК *anti-NOS2A*, которая ингибирует нейроспецифическую индуцибельную NO-синтазу *NOS2A*.

Для этого мы сначала индуцировали нейрональную дифференцировку в двух линиях ЭСК hESM01 и hESM02 путем культивирования клеток в бессывороточной среде в

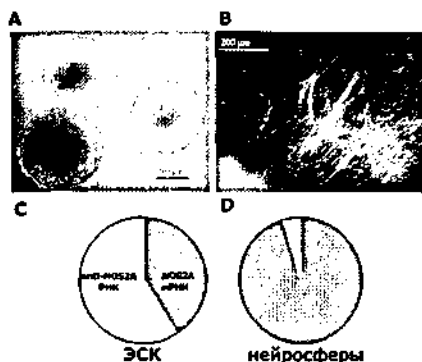


Рисунок 21. Экспрессия гена *NOS2A* и его антагониста pRNC anti-NOS при нейрональной дифференцировке ЭСК. А-нейросферы фазовый контраст, В-нейросферы, дифференцируемые в нейроны (зеленый) и глию (красный), окраска антителами к NSE и GFAP, соответственно. С, D - соотношения между транскриптами гена *NOS2a* и anti-*NOS2A* pRNC в недифференцированных ЭСК (С) и в нейросферах (D).

присутствии рекомбинантных факторов *Noggin* и *bFGF*. Часть клеток образовывала розетки из нейрональных предшественников, которые, при переводе в суспензию, культивировались как нейросферы (рис. 21) и могли при дальнейшем культивировании дифференцироваться в нейроны и глию. Используя метод ОТ-ПЦР в реальном времени, мы обнаружили, что уровень экспрессии anti-NOS2A pRNC в недифференцированных ЭСК в полтора раза превышает уровень экспрессии *NOS2A* (рис. 22). В то же время в нейросферах уровень экспрессии anti-NOS2A меньше уровня экспрессии *NOS2A* почти в 20 раз. Интересно, что экспрессия *NOS2A* имеет противоположную динамику (рис. 22) Из этих результатов мы можем заключить, что нейрональная дифференцировка ассоциирована со снижением экспрессии anti-NOS2A pRNC и увеличением экспрессии *NOS2A*, что позволяет предположить роль anti *NOS2A* в негативной регуляции нейрональной дифференцировки ЭСК путем ингибирования *NOS2A*.

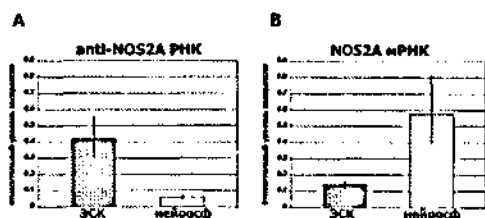


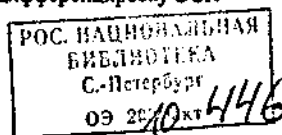
Рисунок 22. Экспрессия anti- *NOS2A* pRNC (А) и гена *NOS2a* (В) носит взаимно конкурирующий характер в ЭСК и нейросферах, полученных из ЭСК. На рисунке показаны результаты ПЦР в реальном времени.

ВЫВОДЫ.

1. Создана коллекция и проведена подробная характеристика линий ЭСК человека, в том числе получены, поддерживаются и доступны для исследований линии ЭСК в культуральной среде с полностью охарактеризованными компонентами (потенциальные «терапевтические» линии ЭСК).
2. Впервые обнаружены эпигенетические различия в разных линиях ЭСК человека. Впервые показано, что экспрессия транскрипционного фактора Nanog в ходе дифференцировки ЭСК человека сопровождается изменением уровня метилирования его регуляторного района, а уровень метилирования регуляторных районов генов DPPA-3 и DPPA-5 различается между линиями ЭСК человека и не отражается на уровне экспрессии этих генов во время дифференцировки.
3. Доказано, что длительное культивирование ЭСК человека в стандартизованных условиях и криокопсервация клеток не приводит к кариотипическим изменениям. Разработаны рекомендации по мониторингу кариотипа ЭСК человека в процессе культивирования.
4. Впервые продемонстрировано, что рецептор семейства ФНО CD30 является новым маркером плюрипотентных стволовых клеток, а не маркером трансформированных ЭСК человека.
5. Показана высокая диффузионная связь через щелевые контакты между плюрипотентными клетками в культурах ЭСК. Впервые продемонстрировано, что на ранних этапах детерминация, сопровождающихся потерей экспрессии *Oct3/4*, между недифференцированными и дифференцированными клетками в колонии ЭСК полностью нарушается диффузионная связь.
6. Разработан новый протокол дифференцировки ЭСК человека в функциональные клетки эндотелия. Показано влияние транскрипционного фактора NOXB4 на дифференцировку эндотелия из ЭСК. Показана способность ЭСК к дифференцировке *in vivo* и *in vitro*, в том числе в кардиомиоциты, фибробласты, сетчатку глаза, клетки крови, нейроны и глию. С использованием протокола дифференцировки ЭСК человека по нейрональному пути обнаружено, что транскрипты anti-NOS2A и NOS2A изменяют свой профиль экспрессии при дифференцировке ЭСК в нейросферы.
7. Впервые показано, что повышение экспрессии генов транскрипционных факторов, участвующих в дифференцировке в эндотелий, *GATA-2*, *GATA-3* и гена *eNOS* при дифференцировке ЭСК человека в клетки эндотелия сопровождается деметилированием регуляторных районов этих генов.

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации.

1. M.A. Lagarkova, A.V. Ereemeev, A.V. Svetlakov, N.B. Rubtsov, S.L. Kiselev. Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization. // *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 2010. Springer. Special issue, pp. 232-238.
2. M.A. Lagarkova, M.V. Shutova, A.N. Bogomazova, E.M.Vassina, E.A.Glazov, P Zang., A.A Rizvanov., I.V. Chestkov., S.L. Kiselev. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale // *Cell Cycle*. 2010 V9 (5) pp. 956-963.
3. Шаровская Ю.Ю., Лагарькова М.А, Киселев С.Л., Чайлахян Л.М. Исследование диффузионной связи через щелевые контакты в эмбриональных стволовых клетках человека. // *ДАН*, 2009, т.427, № 3, стр 33-38.
4. Еремеев А.В, Светлаков А.В, Полстяной А.М, Богомазова А.Н, Филоненко Е.С, Шейна Ю.И. Киселев С.Л., Лагарькова М.А. Получение новой линии ЭСК человека в отсутствии фидера и сыворотки. // *ДАН*, 2009 т. 426, №. 2, стр. 270–272.
5. M.A. Lagarkova, P.Y. Volchkov, E.S. Philonenko, S.L. Kiselev. Efficient differentiation of hESCs into endothelial cells in vitro is secured by epigenetic changes. // *Cell Cycle*. 2008. Vol. 7, №18. pp. 2929-2935.
6. M.A. Lagarkova, P. Y. Volchkov, E.S. Philonenko, K. Pfannkuche, M. A. Prokhorovich, T. Zobotina, J. Hescheler, S. L. Kiselev CD 30 is a marker of undifferentiated human embryonic stem cells rather than a biomarker of transformed hESCs. // *Cell Cycle*. 2008; Vol. 7, № 22 pp. 3475-3480
7. S A. Korneev, E I. Korneeva, M.A. Lagarkova, S L. Kiselev, G Critchley, M O'Shea Novel noncoding antisense RNA transcribed from human anti-NOS2A locus is differentially regulated during neuronal differentiation of embryonic stem cells. // *RNA*. 2008; 14 (10) 1232-1239.
8. Филоненко Е.С., Камнев А.Н., Зауторов В.Г., Шутова М.В., Цховребова Л.В., Богомазова А.Н., Киселев С.Л., Лагарькова М.А. Особенности культивирования ЭСК человека в отсутствии фидера и сыворотки. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2008, т. 3, стр 31-36.
9. М.А. Лагарькова, И.А. Муфазалов, П.Ю. Волчков, С.Л. Киселев. Секретируемый транскрипционный фактор НОХВ4 стимулирует дифференцировку эндотелия из ЭСК человека. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2007. №1. Стр. 56-59.
10. П.Ю. Волчков, М.А. Лагарькова, М.А. Прохорович, С.Л. Киселев Двойной негативный контроль генов, контролирующих направленную дифференцировку ЭСК



человека в эндотелий. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. №2. стр. 34-39

11. М.А. Прохорович, М.А. Лагарькова, А.Г. Шилов, Т.В. Карамышева, С.Л. Киселев, Н.Б. Рубцов *Культуры эмбриональных стволовых клеток человека серии hESM: хромосомные перестройки и стабильность кариотипа*. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007, №3, стр.143-147.

12. Рубцов Н.Б., Прохорович М.А., Лагарькова М.А., Карамышева Т.В., Киселев С.Л. *Цитогенетика стабильных линий эмбриональных стволовых клеток человека hESM01-04*. // Медицинская Генетика, 2007, т. 6 №10 11-15

13.Филоненко Е.С., Волчков П.Ю., Муфазалов И.А, Киселев С.Л., Лагарькова М.А. *Анализ протеникиназ, преимущественно экспрессирующихся в линиях ЭСК человека в процессе дифференцировки*. // Цитология, № 1 2007 стр.561-565

14. И.В. Высочин, А.А. Исаев, М.А. Лагарькова, Г.А. Космиади, С.П. Киселев. *Выявление технологических и прогностических факторов, определяющих качество образцов стволовых клеток пуповинной крови*. // Клеточная Трансплантология. 2007 №;1(1): стр 60-.62.

15. M.A. Lagarkova, P.Y. Volchkov, A.V. Lyakisheva, E.S.Philonenko, S.L. Kiselev. *Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines*. // Cell Cycle. 2006. Vol. 5. №4. pp. 416-420.

16. Киселев С.Л., Волчков П.Ю., Филоненко Е.С., Прохорович М.А., Муфазалов И.А., Лякишева А.В., Лагарькова М.А. *Молекулярная и клеточная биология линий ЭСК человека*. // Молекулярная медицина. 2006. №2. Стр. 6-11.

17. Лагарькова М.А., Лякишева А.В., Филоненко Е.С., Волчков П.Ю., Рубцова К.В., Герасимов Ю.В., Чайдахян Р.К., Киселев С.Л. *Характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, выделенных методом иммуномагнитной селекции*. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. №141(1). Стр.112-116.

18. М.А. Прохорович, А.Г. Шилов, Н.Б. Рубцов, С.Л. Киселев, М.А.Лагарькова. *Метод быстрого и эффективного кариотипирования эмбриональных стволовых клеток человека*. // Клеточные культуры. 2006, вып. 21 стр 55-58

19. Прыжкова М.В., Лагарькова М.А. *Стволовые клетки: современные тенденции исследований*. // Онтогенез. 2004, т. 35, № 6: 473-475.

20. Бокерия Л.А., Георгиев Г.П., Голухова Е.З., Еремеева М.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Асланиди И.П. и др., *Клеточные технологии для лечения сердечно-сосудистых заболеваний*. // Вестник РАМН, 2004, 9:48-55

Патенты.

21. Патент на изобретение 2359030. Способ получения эндотелиальных клеток человека (варианты) Киселев С.Л., Лагарькова М.А. 2009 г.
22. Решение о выдаче патента РФ на изобретение по заявке №2008111708/13(01265) Способ получения эндотелиальных и фибробластоподобных клеток из пупочного каптика. Приходько А.В., Исаев А.А., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Кошелева Н.В., Сабурова И.Н., Мелихова В.С. 2008г.

Избранные тезисы конференций

23. М.А. Лагарькова, М.В. Прыжкова, П. Волчков, С.Л. Киселев. Молекулярно-генетическая характеристика линий эмбрионально-стволовых клеток человека на ранних стадиях дифференцировки. // Международный симпозиум "Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия". Санкт-Петербург. 25 - 27 октября 2004.
24. Лагарькова М.А., Волчков П.Ю., Филоненко Е.С., Медвинский А., Киселев С.Л. Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в клетки эндотелия. // Всероссийская конференция «Фундаментальные науки – медицине» 4-8 сентября 2005. Новосибирск. стр. 37.
25. М.А. Прохорович, А.Г. Шилов, Е.С. Филоненко, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев «Разработка быстрого метода кариотипирования эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека». // Конференция "Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты". Сборник материалов Конференции, Москва, 17-18 ноября 2005; стр. 23.
26. М.А. Lagarkova, P.Y. Volchkov, A.V. Lyakisheva, E.S. Philonenko, S.L. Kiselev. Promoter regions divers methylation profile of pluripotency-related genes in newly derived hESC lines. // XVI. Wilsede Meeting "Modern trends in human leukemia". June 18-22, 2005. Wilsede, Germany. p. 78.
27. С.Л. Киселев, Лагарькова М.А., Филоненко Е.С., Прохорович М.А., Волчков П.Ю. Молекулярная генетика линий эск человека и проблемы направленной дифференцировки. // VI Международная конференция по молекулярной генетике соматических клеток. 12-16 декабря 2005. Звенигород.
28. М.А. Лагарькова, П.Ю. Волчков, Е.С. Филоненко, С.Л. Киселев. Проблемы направленной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток. // Конференция "Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты" 17-18 ноября 2005. Москва. стр. 5.
29. М.А. Лагарькова, М.А. Прохорович, А.Г. Шилов, С.Л. Киселев, С. М. Закиян «Создание коллекции линий эмбриональных стволовых клеток человека:

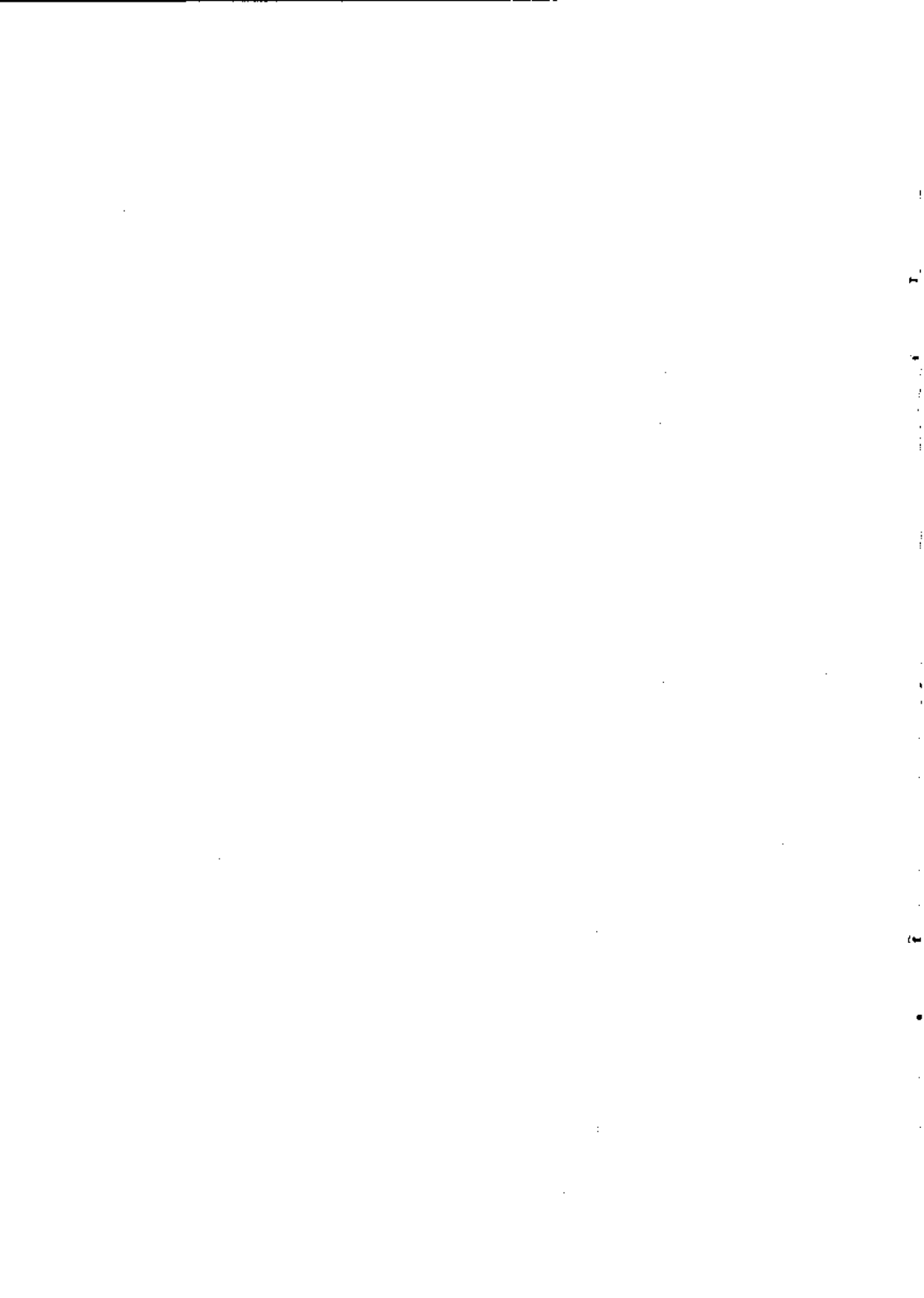
- сравнительные характеристики клеточных линий» Всероссийский симпозиум «Биология клетки в культуре». Санкт-Петербург, 17 - 19 октября 2006. Цитология. 2006. Т. 48. №9. Стр. 776.
30. М.А. Лагарькова, Волчков П.Ю., Филоненко Е.С., Медвинский А., Киселев С.Л. Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток человека в клетки эндотелия. // Всероссийский симпозиум "Биология клетки в культуре". Санкт-Петербург. 17 - 19 октября 2006
31. Kiselev S., Lagarkova M., Prokhorovich M., Volchkov P. Human embryonic stem cell lines: cultivation and differentiation. // I-st Congress of the German society for SC research. 2006. Cologne, Germany. p. 95.
32. Volchkov P.Y., Lagarkova M.A., Prokhorovich M.A., Kiselev S.L. Epigenetic control of human embryonic stem cells differentiation into endothelial cells. // Британско-российское совещание "Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации." Москва. 2007.р. 77
33. Lagarkova M., Volchkov P., Philonenko E., Kiselev S. Epigenetic control of human embryonic stem cells differentiation into endothelial cells. // 5th ISSCR meeting. Australia, Cairns 17-20 June 2007, p.167.
34. М.А. Прохорович, Т.В. Карамышева, М.А. Лагарькова, Н.Б. Рубцов «Структурная реорганизация хромосомы 18 и её положение в интерфазном ядре эмбриональной стволовой клетки человека» // Международная молодёжная научно-методическая конференция. Сборник материалов Конференции, стр. 150. Томск 9-12 мая 2007;
35. Т.В. Карамышева, М.А. Прохорович, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселёв, Н.Б. Рубцов «Получение микродиссекционных хромосомо- и районспецифичных зондов для анализа хромосомных перестроек в эмбриональных стволовых клетках человека». II съезд Общества клеточной биологии совместно с юбилейной конференцией, посвящённой 50-летию Института цитологии РАН. Санкт-Петербург, 16-19 октября 2007. // Цитология. 2007. Т. 49. №9. Стр. 752.
36. Н.Б. Рубцов, Т.В. Карамышева, М.А. Прохорович, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселёв «Положение аномальных хромосом в интерфазных ядрах эмбриональных стволовых клеток человека». II съезд Общества клеточной биологии совместно с юбилейной конференцией, посвящённой 50-летию Института цитологии РАН. Санкт-Петербург, 16-19 октября 2007. // Цитология. 2007. Т. 49. №9. Стр. 789.
37. Lagarkova M., Philonenko E., Volchkov P., Bogomazova A., Zautov V., Kamnev A., Tskhovrebova L., Kiselev S. Human embryonic stem cells as a model to study early

differentiation events. // "Mechanisms of early differentiation". 1-5 September 2008, Barsinghausen, Germany, p.97.

38. Т.В. Карамышева, М.А. Прохорович, М.А. Лагарькова, Н.Б. Рубцов «Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа в диагностике онкологических заболеваний». // II Региональная конференция молодых учёных им. Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Сборник материалов Конференции, стр. 32. Томск, 27 апреля 2007;

39. М.А. Прохорович, М.А. Лагарькова, Т.В. Карамышева, А.И. Железова, А.Г. Шилов, Н.Б. Рубцов, С.Л. Киселев «Особенности культивирования, дифференцировки и цитогенетические характеристики линий эмбриональных стволовых клеток человека, имеющих хромосомные aberrации» Всероссийский симпозиум «Биология клетки в культуре». Санкт-Петербург, 17 - 19 октября 2006. // Цитология. 2006. Т. 48. №9. Стр. 794;

40. MA Lagarkova, YuY Sharovskaya, S.L Kiselev and LM Chailakhyan. Changes in gap junctional intercellular communication during spontaneous differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotency cells. // VI Congress of ISSCR, 2009, 7-12 July 2009, Barcelona. Spain p.176



Формат 60x90/16. Заказ 886. Тираж 100 экз.
Печать офсетная. Бумага для множительных аппаратов.
Отпечатано в ООО "ФЭД+", Москва, ул. Кедрова, д. 15, тел. 774-26-96

10-11145

2010A

11145