

Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями

Е.Д. Некрасов¹, О.С. Лебедева^{1,3}, И.В. Честков^{1,4}, М.А. Сюсина¹, Е.Ю. Федотова², М.А. Лагарькова¹, С.Л. Киселев^{1,4}, И.А. Гривенников³, С.Н. Иллариошкин²

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

² Научный центр неврологии РАМН, Москва

³ Институт молекулярной генетики РАН, Москва

⁴ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Obtaining and characteristics of human induced pluripotent stem cells from skin fibroblasts of patients with neurodegenerative diseases

E.D. Nekrasov¹, O.S. Lebedeva^{1,3}, I.V. Chestkov^{1,4}, M.A. Syusina¹, E.Yu. Fedotova², M.A. Lagarkova¹, S.L. Kiselev^{1,4}, I.A. Grivennikov³, S.N. Illarioshkin²

¹ N.I. Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow

² Research Neurology Center, RAMS, Moscow

³ Molecular Genetics Institute, RAS, Moscow

⁴ National Research Institute «Kurchatov Institute», Moscow

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) по своим свойствам аналогичны эмбриональным стволовым клеткам и могут быть получены из соматических клеток взрослого организма. Существуют два основных направления практического применения технологий ИПСК — это регенеративная медицина и моделирование заболеваний человека. На сегодняшний день процесс получения ИПСК исследуется во многих лабораториях мира, но пока не существует стандартов в технологии получения ИПСК. Целью данной работы являлась разработка простого, дешевого и технологического протокола получения ИПСК и создание коллекции линий ИПСК, полученных из клеток пациентов с болезнью Паркинсона, для построения клеточной модели этого заболевания. В результате работы разработан протокол получения ИПСК на основе лентивирусной доставки трансгенов в клетки. Получены линии ИПСК от 3 пациентов, страдающих наследственными формами болезни Паркинсона.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, моделирование болезней, болезнь Паркинсона.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) способны к неограниченному числу делений в культуре *in vitro* и к дифференцировке во все типы клеток организма. ИПСК получают из соматических клеток взрослого организма, которые репрограммируют до плюрипотентного состояния с помощью набора определенных транскрипционных факторов. Репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния было впервые проведено в 2006 г. группой S. Yamanaka. Исследователями был проведен анализ влияния 24 факторов, тем или иным образом вовлеченных в процессы становления или поддержания плюрипотентности. Используя ретровирусные векторы, авторы произвели трансформацию мышинных эмбриональных фибробластов различными комбинациями этих факто-

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are analogous to embryonic stem cells in their properties, and might be derived from adult somatic cells. There exist two main approaches to practical application of iPSCs technologies — they are regenerative medicine and human diseases modeling. Nowadays the process of iPSCs obtaining is being investigated in many world laboratories, but there are no standards in the iPSC obtaining technology. This work was aimed to develop a simple, cheap and practical protocol for obtaining iPSCs and to establish a collection of iPSC lines derived from cells of patients with a Parkinson disease to make a cell model of this disease. The work resulted in a development of the protocol to produce iPSCs based on a lentiviral delivery of transgenes into cells. iPSC lines from 3 patients with inherited Parkinson disease forms have been obtained.

Key words: induced pluripotent stem cells, disease modeling, Parkinson's disease.

ров. В результате экспериментальной работы было установлено, что использование комбинации факторов OCT4, SOX2, c-Myc и KLF4 необходимо и достаточно для индукции плюрипотентного состояния в мышинных эмбриональных фибробластах [1]. Та же самая комбинация факторов работает и для клеток человека [2]. Хотя получение линий ИПСК выглядит концептуально и технически простой процедурой, репрограммирование — это процесс, включающий в себя большое количество мало изученных событий. На сегодняшний день этот процесс широко исследуется во многих лабораториях мира, опубликовано множество протоколов получения ИПСК, которые различаются по способу доставки трансгенов в клетки и условиям культивирования клеток в процессе репрограммирования [3].

e-mail: maryalag@yahoo.com

ИПСК могут стать удобным инструментом для изучения болезней человека, имеющих генетическую предрасположенность, так как их легко можно получить от пациента с необходимым генотипом и использовать для получения неограниченного количества дифференцированных клеток. Хотя модели на животных, вероятно, останутся ключевым методом изучения заболеваний, они имеют ограничения, которые могут быть преодолены с помощью моделирования болезней на основе ИПСК. Таким ограничением, в частности, является отсутствие адекватных моделей на животных для некоторых заболеваний, свойственных только человеку. ИПСК представляют большой интерес для поиска новых лекарств методом высокопроизводительного скрининга, так как из них можно воспроизводимо получать неограниченные объемы дифференцированных клеток определенного типа с заданным генотипом. Например, компания Пфайзер успешно использовала нейроны, полученные из плюрипотентных клеток, в высокопроизводительном скрининге [4].

Цель данной работы заключалась в определении наиболее эффективной стратегии получения ИПСК для задач моделирования заболеваний человека на примере болезни Паркинсона.

Материал и методы

Получение культуры фибробластов из биоптатов кожи человека

После подписания информированного согласия пациентов выполнялась биопсия кожи предплечья. Биоптат хранили в среде DMEM (ПанЭко, РФ), 15% фетальная бычья сыворотка (FBS) (Hyclone, США), 2 mM глутамин (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, РФ) (среда того же состава использовалась для дальнейшего культивирования фибробластов) в течение нескольких часов. Эксплантат в капле среды помещали на крышку чашки Петри и острым скальпелем разрезали на небольшие кусочки. Полученные кусочки помещали каждый в отдельную чашку Петри диаметром 35 мм (Corning, США) или по 3–4 в чашку Петри диаметром 6 см (Corning, США) и прижимали сверху стерильным покровным стеклом. На стекло наливали среду для культивирования. Через неделю меняли среду на свежую, стараясь не сдвинуть покровное стекло. Примерно через 3 нед. рассевали получившийся монослой фибробластов 0,25% трипсином (Hyclone, США).

Инфекция клеток лентивирусными векторами

В среду культивирования добавляли клеток Polybrene (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 8 мкг/мл. Через час добавляли необходимое количество вирусного супернатанта в среду с клетками.

Определение титра лентивирусных векторов

Клетки Phoenix инфицировали супернатантами, содержащими в себе вирусные векторы, в различных разведениях. Через 48 ч после заражения клетки фиксировали и проводили иммуногистохимический анализ с помощью антител к соответствующему антигену. По проценту окрашенных клеток определяли титр вирусов.

Культивирование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и ИПСК человека на фидере

Среда для культивирования ЭСК и ИПСК человека в фидерных условиях имела следующий состав: DMEM/F12 (Hyclone, США), 20% Serum replacement (Invitrogen, США), 2 mM L-глутамин (Hyclone, США), 0,1 mM β -меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 1% смесь аминокислот (Hyclone, США), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко, РФ), bFGF 4 нг/мл (PeproTech, США). В качестве подложки для культивирования (фидера) использовались митотически инактивированные мышинные эмбриональные фибробласты. Смена среды производилась каждый день. Клетки пассировали каждые 5–7 дней с использованием 1 мг/мл диспазы (Invitrogen, США).

Культивирование ЭСК и ИПСК человека в бесфидерных условиях

Культивирование проводили на среде для бесфидерного культивирования ЭСК человека mTESR1 (Stem Cell Technologies, Канада). В качестве подложки для культивирования использовался Matrigel (BD Biosciences, США). Приготовление покрытых матригелем культуральных чашек и планшетов производилось в соответствии с инструкциями производителя. Смена среды производилась каждый день. Клетки пассировали каждые 5–7 дней с использованием 1 мг/мл диспазы (Invitrogen, США).

Формирование и культивирование эмбрионидных теллец

Среда для культивирования эмбрионидных теллец имела следующий состав: DMEM/F12 (Hyclone, США), 20% FBS (Hyclone, США), 2 mM L-глутамин (Hyclone, США), 0,1 mM β -меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 1% смесь аминокислот (Hyclone, США), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко, РФ). Формирование эмбрионидных теллец проводили следующим образом. Колонии ИПСК снимались диспазой (Invitrogen, США). Для этого удаляли культуральную среду, клетки промывали PBS, добавляли 0,5 мл раствора диспазы 1 мг/мл на 35 мм чашку (Corning, США), инкубировали при 37°C в течение 7–10 мин. Затем удаляли раствор фермента, промывали 4 раза DMEM/F12 (Hyclone, США) и добавляли 1 мл культуральной среды. Колонии соскабливали пластиковым наконечником на 5–200 мкл, осторожно диссоциировали на фрагменты (400–600 клеток), центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, осадок суспендировали в среде для культивирования эмбрионидных теллец и переносили в чашки Петри с предельно низкой адгезией Ultra Low Adhesion Plates (Corning, США). На следующий день ЭСК формировали плавающие округлые агрегаты. Среда сменялась через день. На 4–5 день культивирования эмбрионидные телльца увеличивались в размере, начинала появляться полость.

Спонтанная дифференцировка ИПСК и ЭСК

Эмбрионидные телльца в возрасте 10–20 дней переносили на покрытые желатином (Sigma-Aldrich, США) чашки Петри в среде для культивирования

эмбрионидных телец. Эмбрионидные тельца прикреплялись к желатиновой подложке и начиналась миграция клеток из эмбрионидных телец на поверхность чашки. Через 2–3 нед. образовывались обширные области дифференцированных клеток.

Получение ИПСК

Фибробласты кожи, замороженные на первом пассаже, размораживали и сеяли примерно 40 000 клеток в среде для фибробластов на 35 мм культуральную чашку (Corning, США). Через 2 дня после посева клетки инфицировали четырьмя оригинальными лентивирусными векторами (LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2-IRES-GFP, LeGO-hc-Myc, LeGO-hKLF4) в различных количествах и соотношениях. Через 5 дней после инфекции клетки пересевали 1 к 12 на различные подложки: пластик (Corning, США), желатин (Sigma-Aldrich, США), матригель (BD Biosciences, США) и митотически инактивированные мышечные эмбриональные фибробласты в среде для фибробластов. На следующий после посева день среду меняли на среду для культивирования ЭСК в фидерных условиях. Затем клетки культивировались в этой среде в течение 10–12 дней (рис. 1Б), среда

менялась раз в 2 дня. К этому моменту на чашках образовалось множество клонов с различной морфологией. Эти клоны механически пересевали и культивировали отдельно в условиях культивирования ЭСК без фидера. В процессе репрограммирования в среду клеткам добавляли вальпроовую кислоту (VPA) (Sigma-Aldrich, США) до концентрации в среде 1 мМ и BIX-01294 (Sigma-Aldrich, США) до концентрации в среде 2 мкМ в течение первой недели после инфекции, в течение третьей недели после инфекции, или не добавляли вовсе.

Дифференцировка ИПСК в нейральные клетки

Для индукции нейрональной дифференцировки ИПСК культивировали до субконфлюэнтности, затем обрабатывали диспазой (Invitrogen, США), как описано выше, и переносили в новую чашку Петри, покрытую желатином и культивировали в DMEM/F12 (Hyclone, США) с 1% N2 (Invitrogen, США), 2% Serum replacement (Invitrogen, США), 50 нг/мл noggin (PeproTech, США). Среду меняли через день. Через 10–14 дней в культуре начинали появляться розеткоподобные структуры.

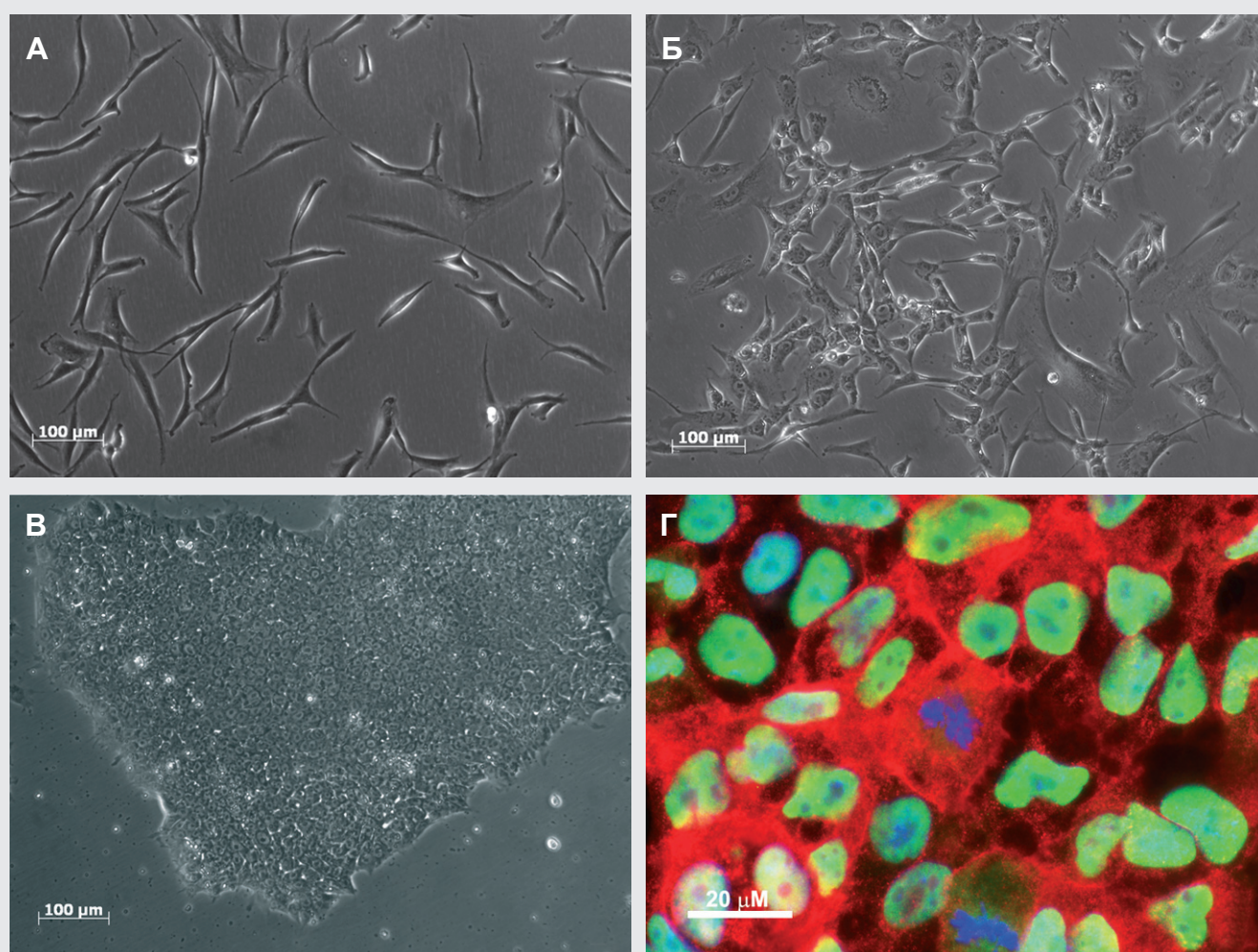


Рис. 1. Клетки на разных стадиях процесса получения ИПСК человека:

А – фибробласты кожи человека;

Б – трансфицированные лентивирусными векторами клетки;

В – колония ИПСК, полученных из фибробластов пациента с болезнью Паркинсона;

Г – культура ИПСК, окраска антителами на маркеры плюрипотентных клеток: синий – DAPI, зеленый – OCT4, красный – SSEA-4

Через 2 нед. культивирования розетки, которые могли составлять до 70% клеток, механически отделяли от остальных клеток культуры с помощью пастикового наконечника, а затем либо индуцировали дифференцировку напрямую, либо переводили культуру в суспензионную форму и культивировали в виде нейросфер, в плашках с предельно низкой адгезией Ultra Low Adhesion Plates (Corning, США) в среде DMEM/F12 (Hyclone, США) с добавлением N2 (Invitrogen, США), содержащей 20 нг/мл EGF (PeproTech, США), 20 нг/мл bFGF (PeproTech, США). Нейросферы культивировали в течение двух недель. Для дифференцировки клетки либо со стадии «розеток», либо со стадии нейросфер культивировали на пластике, покрытом желатином (Sigma-Aldrich, США). Для дифференцировки нейронов в базовую среду вместо EGF (PeproTech, США) и bFGF (PeproTech, США) добавляли 10 нг/мл BDNF (PeproTech, США) и 5 нг/мл GDNF (PeproTech, США) и продолжали культивирование в течение 2 нед. для розеток и 7–10 дней для нейросфер.

Результаты и обсуждение

Система доставки трансгенов в клетки

Для задач моделирования заболеваний человека, то есть исследований *in vitro*, на первый план выходят такие свойства протокола получения ИПСК как простота, дешевизна и воспроизводимость. На сегодняшний день уже удалось получить ИПСК с помощью множества различных методов доставки трансгенов в клетки: ретровирусные векторы [1, 2], piggyBAC транспозон [5], транзиторная трансфекция плазмидных векторов [6] и др. [7]. Нами был выбран лентивирусный метод доставки транскрипционных факторов в клетки, так как он широко используется в экспериментах по репрограммированию и хорошо отработан. Были сконструированы оригинальные плазмиды на основе LeGO vector system [8] LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2-IRES-GFP, LeGO-hc-Myc, LeGO-hKLF4 для сборки лентивирусных векторов, несущих в себе гены транскрипционных факторов OCT4, SOX2, c-Myc и KLF4, соответственно. В отличие от плазмид лаборатории S. Yamanaka, в наших оригинальных плаزمидх трансген фланкирован LoxP сайтами, что позволяет удалить его из геномной ДНК клетки. Сборка лентивирусов LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2-IRES-GFP, LeGO-hc-Myc, LeGO-hKLF4 проводилась в упаковочных клетках Phoenix по протоколу сборки лентивирусных векторов, который описан на сайте <http://www.lentigo-vectors.de/>. Мы сравнили эффективность сборки лентивирусных векторов на основе плазмид лаборатории S. Yamanaka и наших оригинальных плазмид. Новые плазмиды обеспечивают, по сравнению с плазмидами лаборатории S. Yamanaka, на порядок более эффективную сборку лентивирусных векторов, что приводит к более высокому титру вирусных векторов в супернатанте (данные не приведены). Это позволяет отказаться от концентрирования лентивирусных векторов перед использованием, а, следовательно, упростить работу с ними.

Материал для получения ИПСК

ИПСК уже удалось получить из многих типов соматических клеток человека [9–11]. В большинстве случаев мутация, вызывающая патологию, является наследственной, и содержится во всех клетках па-

циента. В таких случаях разумно использовать фибробласты кожи, так как их легко культивировать и получать от пациентов с помощью несложной и малоинвазивной процедуры — биопсии кожи [11]. Мы выбрали для моделирования болезни Паркинсона — неизлечимое хроническое нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется прогрессирующим разрушением и гибелью дофаминовых нейронов в центральной нервной системе, главным образом, компактной части чёрной субстанции и области голубого пятна головного мозга. Были получены первичные культуры фибробластов из биоптатов кожи трех пациентов мужского пола с диагнозом «болезнь Паркинсона» (рис. 1А). Причина заболевания: у первых двух пациентов — мутация G2019S в 41-м экзоне гена LRRK2, третий пациент — ди-гетерозигота по гену PARK2, мутации del 202-203 AG и IVS1+1G/A в различных аллелях. Фибробласты культивировали до 3 пассажа, при этом на первом, втором и третьем пассажах часть культуры криоконсервировали для создания банка первичных клеточных культур и сохранения клеточного материала.

Протокол получения ИПСК

Удалось получить ИПСК человека из фибробластов кожи всех трех пациентов при различных вариациях в протоколе. Было отобрано более 10 клонов ИПСК от каждого пациента, 3 клон от каждого пациента использовали для дальнейшей работы (рис. 1В), остальные клоны подвергали криоконсервации. Установлено, что количество и соотношение вирусов при инфицировании клеток изменяет количество клонов ИПСК, получаемых в процессе репрограммирования, на порядки. Наилучший результат достигается при следующих параметрах: LeGO-hOCT4 — MOI 10 (т.е. 10 инфицирующих единиц на 1 клетку), LeGO-hSOX2-IRES-GFP — MOI 10, LeGO-hc-Myc — MOI 2.5, LeGO-hKLF4 — MOI 5. Установлено, что тип подложки не оказывает значительного влияния на количество клонов ИПСК, получаемых в процессе репрограммирования.

В процессе работы был изучен эффект сайленсинга (замолкания экспрессии трансгенов). мРНК, транскрибируемая с вирусного вектора LeGO-hSox2-IRES-GFP, помимо кодирующей части транскрипционного фактора Sox2, также содержит кодирующую часть зеленого флуоресцентного белка (GFP), которому предшествует альтернативный сайт посадки рибосомы (IRES). Это приводит к тому, что с одной мРНК транслируются сразу два белка, что позволяет отслеживать транскрипционную активность трансгенов. Визуальный мониторинг наличия флуоресценции GFP в репрограммированных клетках позволил установить, что экспрессия трансгенов с вирусных конструкций происходит со 2 по 12 день после инфекции.

Был изучен эффект воздействия комплекса химических соединений VPA и VIX-01294 на репрограммирование фибробластов в плюрипотентное состояние, эти соединения по литературным данным значительно повышают эффективность репрограммирования [12, 13]. Добавление указанных химических соединений на первой неделе после инфекции приводило к увеличению количества клонов более чем на порядок, в то время как их добавление на третьей неделе не вызывало значительного увеличения количества клонов ИПСК (рис. 2).

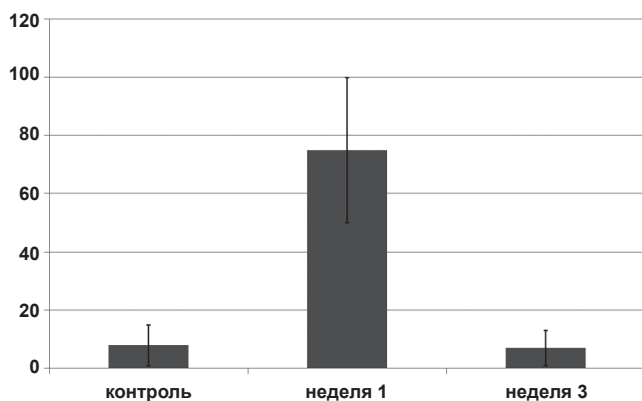


Рис. 2. Диаграмма воздействия химических соединений VPA и VIX-01294 на количество клонов ИПСК: контроль – без использования химических соединений; неделя 1 – добавление химических соединений в течение первой недели после инфекции; неделя 3 – добавление химических соединений в течение третьей недели после инфекции

Анализ клонов ИПСК

С целью подтверждения репрограммирования фибробластов кожи до плюрипотентного состояния был проведен анализ экспрессии маркеров, характерных для плюрипотентных клеток: OCT4, SOX2, с-Мyc, KLF4, NANOG, FOXD3, HESX1, SALL4, DPPA4, SALL1, SSEA-4, методами ОТ-ПЦР и иммуноцитохимии (рис.1Г). Проведенный анализ показал, что в отобранных клонах экспрессируются гены-маркеры плюрипотентного состояния.

Во время репрограммирования происходят значительные изменения не только в паттерне экспрессии генов, но также наблюдаются значительные изменения хроматина, которые могут приводить к хромосомным перестройкам. Для подтверждения отсутствия трансформации полученных ИПСК был проведен анализ кариотипа клонов методом GTG-дифференциального окрашивания. Отобранные для дальнейшего изучения клоны имеют нормальный кариотип 46 XY (данные не приведены).

Для функционального подтверждения плюрипотентного статуса репрограммированных из фибробластов клеток нами был использован анализ на формирование клетками эмбрионидных телец и дифференцировку в клетки, принадлежащие трем зародышевым листкам.

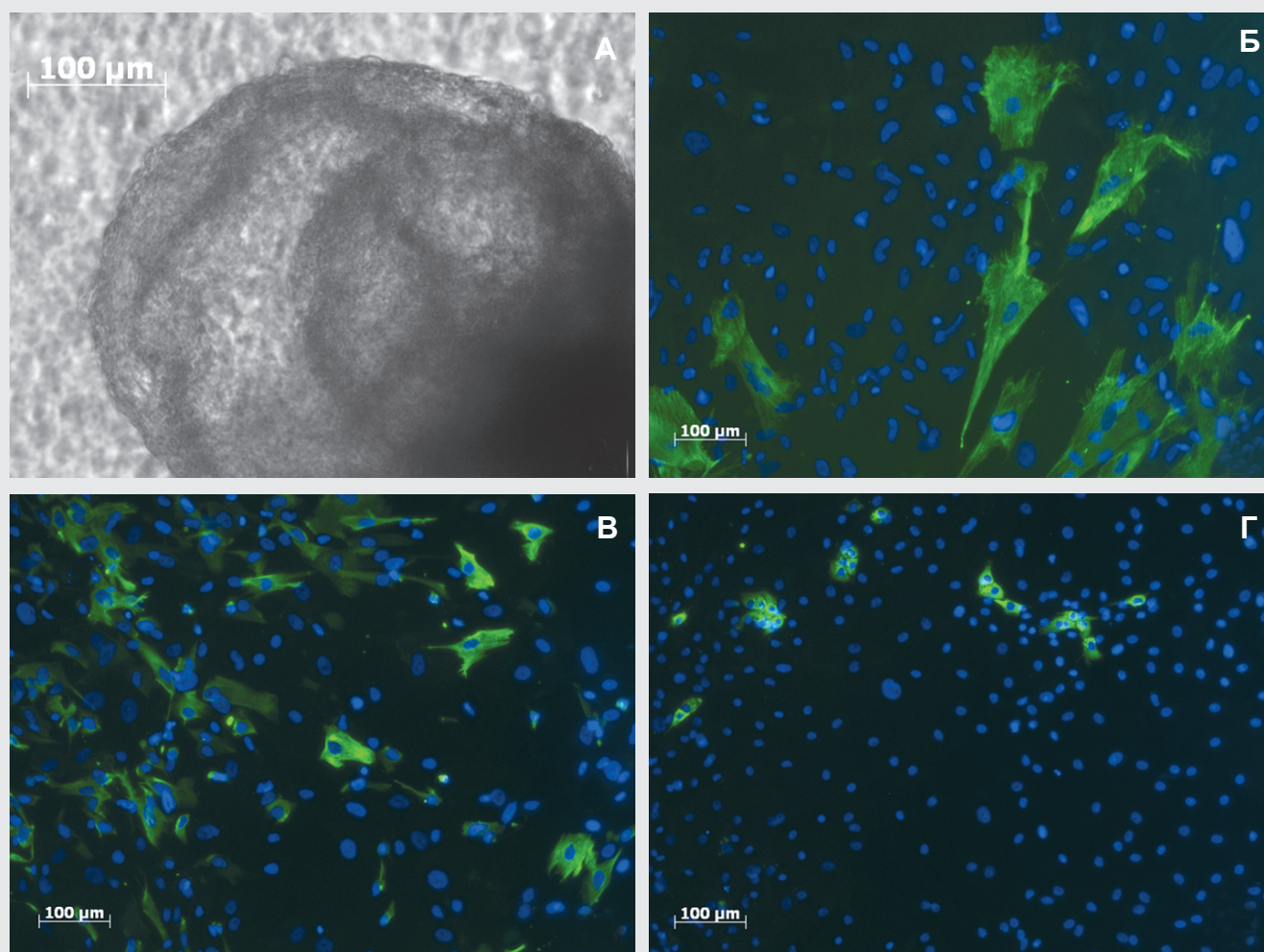


Рис. 3. ИПСК от пациента, страдающего болезнью Паркинсона, и их дериваты: А – эмбрионидные тельца; Б, В, Г – клетки, дифференцированные из ИПСК, экспрессия маркеров трех зародышевых листков (иммуноцитохимическая реакция со специфическими антителами, продукт экспрессии зеленого цвета, ядра клеток окрашены DAPI в синий цвет): Б – эпителиальный маркер панцитокератина, В – мезодермальный маркер десмин (зеленый), Г – энтодермальный маркер α-фетопротейна

Полученные ИПСК способны формировать эмбрионидные тельца и дифференцироваться в различные типы клеток. В культуре спонтанно дифференцировавшихся клеток присутствовали группы клеток, положительно окрашивающиеся на маркер клеток эктодермы — панцитокератин, мезодермы — десмин и энтодермы — α -фетопротеин (рис. 3). Таким образом, полученные репрограммированные клетки проявляли функциональные свойства плюрипотентных клеток — были способны дифференцироваться в клетки — производные трех зародышевых листков.

Для дифференцировки ИПСК в нейроны мы применили протокол, ранее разработанный нами для

дифференцировки ЭСК человека, с использованием рекомбинантных белков: noggin (антагонист BMP4), а также факторов экспансии нейрональных предшественников bFGF и EGF. В соответствии с протоколом, ИПСК, полученные из кожных фибробластов, были дифференцированы в нейросферы и, в дальнейшем, в зрелые постмитотические нейроны. Проведенный иммуногистохимический анализ показал, что полученные нейроны имеют не только специфические нейрональные маркеры (β -3-тубулин), но еще экспрессируют характерные для дофаминэргических нейронов ферменты (тирозин-гидроксилаза) (рис. 4).

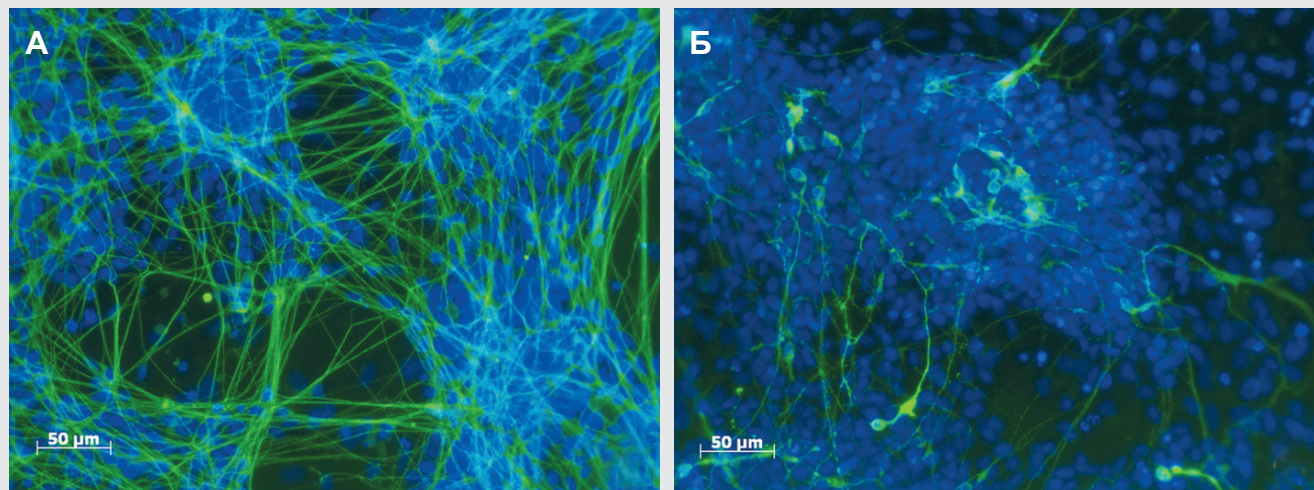


Рис. 4. Нейроны, полученные из ИПСК пациента, страдающего болезнью Паркинсона, иммуноцитохимическая реакция, продукт экспрессии зеленого цвета, ядра клеток окрашены DAPI в синий цвет:
А — β -3-тубулин; Б — тирозин-гидроксилаза

Заключение

Для целого ряда заболеваний человека эффективные методы терапии пока еще не разработаны. В первую очередь это связано с отсутствием адекватных моделей для изучения патогенеза заболевания и тестирования лекарственных средств. Поиск и разработка новых моделей для таких нейродегенеративных заболеваний человека, как болезнь Паркинсона, Альцгеймера и ряда других является актуальной задачей. Разработанная недавно технология генетического репрограммирования позволяет из легко доступных клеток, например, фибробластов кожи, получить в лабораторных условиях клетки и ткани, в которых проявляется патологический фенотип и, таким образом, получить возможность установить механизмы развития заболевания и способы их устранения. Нами предпринята попытка разработки таких моделей для больных Паркинсоном с известными мутациями. Для репрограммирования клеток кожи нами была использована система доставки транскрипционных факторов в клетки, которая имела целый ряд преимуществ по сравнению как с оригинальной системой, созданной в лаборатории S. Yamanaka с соавт. (2007), так и по сравнению с новейшими системами репрограммирования соматических клеток без интеграций в геном [14, 15]. Она проще в использовании и дешевле, при этом позволяет впоследствии удалить интегрированные в геном гены, которые могут представлять наибольший риск нарушения функционирования клетки.

Нами показано, что параметры инфекции лентивирусными векторами (соотношение в экспрессии транскрипционных факторов), а также использование химических соединений на самом начальном этапе репрограммирования оказывают значительное влияние на эффективность получения ИПСК. Необходимо отметить, что временной период применения химических молекул, приводящий к положительному эффекту, совпадает с периодом активности экзогенных транскрипционных факторов. В тоже время, подложка для культивирования и применение химических соединений на поздних этапах репрограммирования не оказывают значительного влияния на эффективность получения ИПСК. Полученные ИПСК охарактеризованы на способность дифференцироваться в клетки — производные трех зародышевых листков. Использование ранее разработанного протокола дифференцировки плюрипотентных клеток в дофаминэргические нейроны показало, что полученные из «больных» ИПСК нейроны количественно и морфологически не отличаются от дофаминэргических нейронов, полученных из нормальных культур ИПСК и ЭСК человека. Необходимы дальнейшие исследования полученных культур для выяснения молекулярных и клеточных механизмов развития патологии.

Выполненные исследования поддерживались государственными контрактами №16.512.11.2103 и №16.512.11.2105.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663–76.
2. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861–72.
3. Maherali N., Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 595–605.
4. McNeish J., Roach M., Hambor J. et al. High-throughput screening in embryonic stem cell-derived neurons identifies potentiators of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate-type glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(22): 17209–17.
5. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P. et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766–70.
6. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322(5903): 949–53.
7. Lai M.I., Wendy-Yeo W.Y., Ramasamy R. et al. Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28(4): 291–301.
8. Weber K., Mock U., Petrowitz B., Bartsch U., Fehse B. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther.* 2010; 17(4): 511–20.
9. Некрасов Е.Д., Лагарькова М.А., Киселев С.П. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как модель для изучения болезней человека. *КТТИ* 2011; 6(2): 32–7.
10. Philonenko E.S., Shutova M.V., Chestkov I.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Current Progress and Potential Practical Application for Human Pluripotent Stem Cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2011; 292: 153–96.
11. Saha K., Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 2009; 5(6): 584–95.
12. Huangfu D., Maehr R., Guo W. et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26(7): 795–7.
13. Shi Y., Despons C., Do J.T. et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 568–74.
14. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 618–30.
15. Okita K., Matsumura Y., Sato Y. et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* 2011; 8(5): 409–12.

Поступила: 15.11.2011