

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

INDUKCIJA PLURIPOTENTNIH MATIČNIH STANICA

INDUCTION OF PLURIPOTENT STEM CELLS

SEMINARSKI RAD

Mirta Rešetar

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. SVOJSTVA iPS STANICA.....	2
3. METODE INDUKCIJE.....	3
3.1. Indukcija pomo u virusnih vektora.....	3
3.2. Indukcija pomo u malih molekula.....	5
3.3. Indukcija pomo u plazmidnih vektora.....	5
3.4. Indukcija sa rekombinantnim proteinima.....	6
4. EFIKASNOST METODE INDUKCIJE PLURIPOTENTNOSTI.....	7
5. LITERATURA.....	8
6. SAŽETAK.....	10
7. SUMMARY.....	10

1. UVOD

U posljednjih 10 godina embrionalne matične stanice predmet su intenzivnih znanstvenih istraživanja. U kulturi se najčešće koriste mišje (mES, *mouse embryonic stem cells*) i ljudske (hES, *human embryonic stem cells*) matične stanice. ES stanice razlikuju se od drugih tipova stanica zbog svojstva samoobnavljanja i totipotencnosti. Morfološki se prepoznaju po velikoj jezgri, oskudnoj citoplazmi i okruglom obliku. Ekspimiraju gene uključene u održavanje pluripotencnosti, kao što su geni za transkripcijske faktore Oct3/4, Nanog i Sox2. Na površini sadrže karakteristične antigene; za identifikaciju hES stanica koriste se površinski markeri poput SSEA (*stage specific embryonic antigen*) i TRA (*tumor-related antigen*). Zbog sposobnosti diferencijacije u bilo koji tip stanice, mogle bi se koristiti u terapijske svrhe pri liječenju neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, leukemija, dijabetesa, multiple skleroze ili ozljeda leđne moždine. Problem razvoju takvih istraživanja predstavljaju etička pitanja dobivanja hES stanica, budući da to uključuje uništavanje ljudskih embrija. No i bez toga postoji problem inkompatibilnosti tkiva, odnosno odbacivanja presaanih stanica. Dobivanje pluripotencnih matičnih stanica direktno iz somatskih stanica omogućilo bi terapiju specifičnu za pojedinog pacijenta. U znanstvene svrhe, ta metoda bi omogućila dobivanje stanica u kulturi različitih genotipova za istraživanja poput djelovanja lijekova ili mehanizama bolesti.

1997. Wilmot i suradnici pokazali su da se jezgra odrasle somatske stanice može reprogramirati u nediferencirano embrionalno stanje prijenosom somatske jezgre u jajnu stanicu. Tom metodom (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*) i metodom fuzije somatske i embrionalne stanice do danas nisu uspjele nastati ljudske stanice u kulturi, no ukazano je da jajna stanica i embrionalna jezgra sadrže faktore koji održavaju stanje pluripotencnosti te da je reprogramiranje epigenetski proces.

2006. godine Takahashi i Yamanaka prvi su identificirali četiri gena, koji kodiraju transkripcijske faktore Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc, pomoću kojih su dobili inducirane pluripotencne matične stanice (iPS, *induced pluripotent stem cells*) direktno iz somatskih stanica.

2. SVOJSTVA iPS STANICA

iPS stanice morfološki su identične ES stanicama i imaju približno isto vrijeme duplikacije. Za održavanje iPS stanica u kulturi vrijede isti uvjeti kao i za ES stanice kao što su ovisnost o hranidbenom sloju i FGF (*fibroblast growth faktor*) u slučaju ljudskih stanica. iPS stanice ekspimiraju površinske markere i gene karakteristične za ES stanice poput alkalne fosfataze i telomeraze, koja omogućuje neograničenu proliferaciju. Međutim, razina ekspresije pojedinih gena nije identična. Najvažna sličnost u razini ekspresije je među genima uključenim u održavanje pluripotencije. Promjene u ekspresiji gena izazivaju epigenetske promjene koje uzrokuju reprogramiranje i faktori. iPS stanice imaju sličan uzorak DNA metilacije i modifikacije histona metiliranjem i aciliranjem kao i ES stanice. Promotori aktivnih gena se demetiliraju, modificira se kromatin na H3 histonu – acilira se, Lys9 i Lys27 se demetiliraju, a Lys4 metilira. Ženske iPS stanice također aktiviraju inaktivan X kromosom, a nakon diferencijacije utišavanje jednog od njih je nasumično (Maherali *et al.*, 2007).

iPS stanice injektirane u SCID miša stvaraju teratome – tumore od svih 3 zametna sloja, baš kao i ES stanice čime se dokazuje svojstvo pluripotencije. *In vitro*, iPS stanice se mogu upravljano diferencirati u bilo koji tip somatskih stanica u istim uvjetima kao i ES stanice. Znanstvenici su uspješno proizveli dopaminergične neurone i srčane stanice koje su spontano pulsirale iz iPS stanica (Takahashi *et al.*, 2007). Injekcijom u blastocistu, iPS stanice sudjeluju u stvaranju himera, mogu postati i germinativne stanice te se njihova svojstva naslijeđuju na potomke.

3. METODE INDUKCIJE iPS STANICA

3.1. Indukcija pomo u virusnih vektora

Prva generacija iPS stanica dobivena je retrovirusnom transdukcijom gena etiriju transkripcijskih faktora Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc u mišje embrionalne fibroblaste (Takahashi and Yamanaka, 2006). Kao selekcijski marker iPS stanica odabran je gen Fbx15 sa insercijom rezistencije na neomicin. Gen Fbx15 se eksprimira samo u embrionalnim stanicama, ali nije nužan za njihov razvoj. Prve iPS stanice bile su dosta sli ne ES stanicama, ali su se razlikovale od njih u dva važna svojstva – nisu davale himere nakon implantacije u blastocistu te su pokazivale druga iji uzorak metilacije DNA i ekspresije gena. Uzrok tomu vjerojatno je bilo nedovršeno reprogramiranje stoga je ista skupina znanstvenika za idu e istraživanje koristila novi selekcijski marker – ekspresiju gena Nanog obilježenog pomo u boje GFP. (Okita *et al.*, 2007). Nanog je gen koji se eksprimira u embrionalnim mati nim stanicama i bitan je za svojstvo pluripotentnosti. Stoga je bilo iznena uju e kad je otkriveno da nije nužan za indukciju pluripotencije. iPS stanice selekcionirane prema ekspresiji Nanog gena pridonosile su himerama te pokazivale mnogo ve u sli nost ES stanicama nego prijašnja generacija. Tako er, iPS kolonije mogu se selekcionirati i samo na temelju morfologije, bez dodatnih selekcijskih markera, što bi imalo primjenu za terapijske svrhe (Maherali *et al.*, 2007). Osim embrionalnih fibroblasta, istraživanja su pokazala da se, nešto smanjenom efikasnoš u, istom metodom mogu uspješno reprogramirati i diferencirane stanice odraslih jedinki, kako miša tako i ovjeka (Takahashi *et al.*, 2007).

Me utim, retrovirusi su problemati no sredstvo za unos gena u stanice. Kao prvo, retrovirusi se nasumi no ugra uju u genom i mogu uzrokovati insercijske mutacije te drugo, c-Myc je onkogen koji reaktivacijom u genomu uzrokuje nastanak tumora u himerama. Otkriveno je me utim, da c-Myc, kao ni Klf4 nisu nužni za indukciju pluripotentnosti, ve da samo doprinose efikasnosti. (Nakagawa *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007). Umjesto c-Myc i Klf4, skupine znanstvenika uspješno su dobili mišje i ljudske iPS stanice sa Nanog i Lin28 faktorima uz Oct3/4 i Sox2 (Yu *et al.*, 2007). Bez c-Myc faktora, efikasnost indukcije je mnogo manja, sama indukcija

traje duže, ali specifičnost je veća – dobiveno je mnogo manje ne-iPS kolonija čime je omogućena lakša izolacija malobrojnih iPS kolonija.

Slični retrovirusima, i lentivirusi su efikasno sredstvo unosa gena u stanice. Kao i retrovirusi, ugrađuju se u genom, no omogućuju kontroliranu ekspresiju transgena pod primjerice, doksiciklin inducibilnim promotorom. Time je omogućeno istraživanje mehanizma indukcije pluripotencije – određivanje vremena pojavljivanja površinskih antigena i aktivacije određenih gena. Tako je otkriveno da se prvo pojavljuje alkalna fosfataza, djelomično reprogramirane stanice počinju ekspresirati SSEA, a zadnji se ekspresiraju Oct3/4 i Nanog geni u potpuno reprogramiranim stanicama (Brambrink *et al.*, 2008). Nakon potpune uspostave pluripotencije u iPS stanicama, ekspresija transgena više nije nužna, dapače potrebno ju je utišati da bi se stanice mogle diferencirati. Same stanice imaju mehanizme utišavanja retrovirusa, ali ne i lentivirusa, pa je u radu s lentivirusima nužno izbjeći konstitutivnu ekspresiju transgena ugradnjom pod inducibilne promotore ili promotore koje stanica sama može utišati (Yu *et al.*, 2007).

Adenovirusi se ne ugrađuju u genom, no njihova ekspresija gena je kratkotrajna, a proteinski produkt se brzo gubi. Stoga je za uspješnost indukcije nužan visoki multiplicitet infekcije policistronskom cDNA sa najviše 3 faktora i virusnim 2A sekvencama (koje omogućuju dobivanje zasebnih proteinskih produkata iz policistronske mRNA u eukariotima) te zaseban virus s četvrtim, c-Myc faktorom. iPS stanice bez ugrađenih transgena mogu se detaljnije uspoređivati sa ES stanicama. Ipak, nije isključeno mogućnost integracije pojedinih fragmenata adenovirusa, a ostali nedostaci ove metode su niska efikasnost i sporadična pojava tetraploida. Nije poznato nastaju li oni zato jer adenovirusi induciraju fuziju stanica ili odabiru rijetke tetraploide unutar početne kulture (Stadtfeld *et al.*, 2008).

3.2. Indukcija pomo u malih molekula

Reprogramiranje adenovirusima i retrovirusima može se poboljšati kemijskim spojevima male molekulske mase. NPC stanice (*neural progenitor cells*) transducirane sa samo Oct4 i Klf4 mogu se reprogramirati u iPS stanice. Me utim, otkriveno je da NPC stanice endogeno ekspimiraju Sox2. Pretraživanjem fenotipa NPC stanica otkriveno je da je sam proces efikasniji uz prisutnost dvije male molekule – BIX-01294 i BayK8644. Postavilo se pitanje mogu li ta dva faktora, uz Oct4 i Klf4, inducirati pluripotenciju stanica koje endogeno ne ekspimiraju Sox2, a odgovor je bio da mogu. BIX je inhibitor G9a histon metiltransferaze te može efikasno zamijeniti Sox2, ali i Oct4. BayK je antagonist kalcijevih L kanala te se pretpostavlja da ima ulogu u procesu signalizacije, ali sam ne može zamijeniti transkripcijske faktore (Shi *et al.*, 2008). Znanstvenici su kao dopunu Oct4 i Sox2 uspješno koristili i druge epigenetske modifikatore poput valproi ne kiseline – inhibitor histon deacetilaze (Huangfu *et al.*, 2008) i 5' azacitidin (Mikkelsen i *et al.*, 2008). Trenutni interes znanstvenika na ovom podru ju je eventualna identifikacija malih molekula koje bi funkcionalno mogle zamijeniti sve transkripcijske faktore, ime bi se omogu ilo kemijski definirano i kontrolirano reprogramiranje bez unosa transgena u stanicu.

3.3. Indukcija pomo u plazmidnih vektora

Prva metoda unosa gena transkripcijskih faktora u stanicu bez posredstva virusa bila je korištenjem rekombinantnog plazmida (Okita *et al.*, 2007). Kao i kod adenovirusa, ekspresija s plazmida je kratkotrajna, zahtjeva specijalne promotore, poseban plazmid za c-Myc i dobro razra ene protokole transfekcije. Efikasnost te metode je niska, a iako analizom iPS stanice nisu pokazale prisutnost transgena, mogu a je integracija fragmenata plazmida u genom.

Iako ugradnja transgena nije nužna za reprogramiranje, ono je najefikasnije kada do njega dolazi. Stoga su rekombinantnim tehnikama stvoreni i sofisticiraniji transgeni koji imaju sposobnost ekscizije nakon što je reprogramiranje završeno. Kaji i Woltjen (2009) su koristili kompleksne ekspresijske kasete sa sva etiri transkripcijska faktora i 2A peptidima, koje na krajevima sadrže loxP mjesta. Nakon

što inducirana stanica prestane ovisiti o ekspresiji transgena, u stanice se inducira Cre rekombinaza koja izrezuje egzogeni konstrukt. Mogu nost pogreške postoji, no manji ostaci ne bi smjeli predstavljati problem. Još precizniju eksciziju omogućuje transfekcija genima ugraenim u *piggyBac* transpozom (Woltjen *et al.*, 2009) Za inserciju i eksciziju rekombinantnog transpozona nužna je samo kratkotrajna ekspresija transpozaze.

3.4. Indukcija sa rekombinantnim proteinima

Unos stranih gena u stanice, bez obzira na unapre enje metoda, uvijek nosi odre ene rizike modifikacije genoma, što je posebice neprihvatljivo za terapijske svrhe. Posljednje dostignu e reprogramiranja stanica predstavlja tehnika rekombinantnih proteina (Zhou *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). Ve od prije su poznati proteini koji imaju sposobnost penetracije stani ne membrane, takozvani CPP (*cell penetrating peptides*), poput TAT sekvence HIV virusa ili sljedovi bazi nih aminokiselina poput arginina ili lizina. Fuzijom reprogramiraju ih transkripcijskih faktora i 9R peptida utvr eno je ne samo da uspješno ulaze u stanicu, nego i u jezgru te da mogu izazvati reprogramiranje. U stanici ostaju aktivni do 48 sati, a kako je za indukciju pluripotencije potrebno najmanje 7-8 dana, proteine je potrebno dodavati u ciklusima. Samo reprogramiranje tako er traje dulje, ali dobivene iPS stanice po svemu su drugom identit e iPS stanicama dobivenim prijašnjim metodama, kao i ES stanicama. Prva skupina znanstvenika (Zhou *et al.*, 2009) koja je upotrijebila ovu metodu koristila je kombinaciju valproi ne kiseline i rekombinantnih proteina proizvedenih u *E. coli*, a Kim i suradnici su koristili samo rekombinantne proteine proizvedene u stanicama sisavaca. Obje metode imale su nisku efikasnost, no ostavljen je prostor za razvoj boljih protokola.

4. EFIKASNOST METODE INDUKCIJE PLURIPOTENTNOSTI

U samo dvije godine napravljen je velik napredak u razvoju metoda induciranja pluripotentnih matičnih stanica. Znanstvenici su uspjeli ukloniti problem tumorigenih i mutagenih iPS stanica, ali nedostatak svih do sad razvijenih metoda i dalje predstavlja niska efikasnost. Za sada je maksimalna uspješnost reprogramiranja do 1% po etnog broja stanica. Iako to nužno ne predstavlja problem za praktičnu upotrebu, jer se iPS stanice nakon izolacije mogu uspješno propagirati u kulturi, postavlja se pitanje uzroka tako niske efikasnosti (Takahashi *et al.*, 2007). Postoji nekoliko mogućih objašnjenja: jedna od pretpostavki jest da inducirane pluripotentne stanice potječu od rijetkih matičnih ili progenitornih stanica koje već postoje u kulturi. Međutim, pokušaj indukcije pluripotentnih stanica iz kulture stanica koštane srži koje sadrže puno veću udio matičnih stanica nije dao veću efikasnost. Vjerojatnije je da uspješno reprogramiranje zahtjeva vrlo specifične uvjete tako da se reprogramiraju i faktori nalaze u optimalnim količinama samo u malom broju transduciranih stanica.

Iako su veoma slične ES stanicama, iPS stanice nisu identične. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdilo kolike su razlike. Metode koje isključuju mogućnost inkorporacije bilo kojeg stranog fragmenta u genom inducirane stanice omogućuju analizu iPS stanica koje se mogu uspoređivati sa ES stanicama. To je nužno ukoliko će se iPS stanice ikad primjenjivati u medicini, no već sad postoje naznake da su iPS stanice funkcionalno ekvivalentne ES stanicama. Wernig i suradnici koristili su iPS stanice dobivene iz fibroblasta na mišjim modelima Parkinsonove bolesti. iPS stanice diferencirane *in vitro* u neuralne progenitorne stanice uspješno su se integrirale u mozak miša i dalje diferencirale u gljive i neuralne stanice. Miševi su pokazali znatno bihevioralno poboljšanje.

iPS stanice predstavljaju značajan napredak u istraživanju matičnih stanica. Za razliku od terapijskog kloniranja, metode direktnog reprogramiranja su efikasnije, praktičnije jer ne ovise o doniranju jajnih stanica, a dobivene stanice ne pokazuju aberantan fenotip. Stoga znanstvenici vjeruju da će se uskoro razviti sigurni protokoli za direktno reprogramiranje stanica u znanstvene i terapijske svrhe.

5. LITERATURA

Brambrink T *et al.*, 2008. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* **12**, 151–159.

Huangfu D *et al.*, 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct4* and *Sox2*. *Nature Biotechnology* **26**, 1269-1275.

Kaji K *et al.*, 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**, 771-775.

Kim D *et al.*, 2009. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472-476.

Maherali N *et al.*, 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* **1**, 55-70.

Mikkelsen TS *et al.*, 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49-56.

Nakagawa M *et al.*, 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology* **26**, 101-106.

Okita K *et al.*, 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317.

Park I-H *et al.*, 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141-147.

Shi Y *et al.*, 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* **3**, 568-574.

Stadtfield M *et al.*, 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration, *Science* **322**, 945-949.

Takahashi K *et al.*, 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.

Takahashi K and Yamanaka S, 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

Wernig M *et al.*, 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5856-5861.

Woltjen K *et al.*, 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766-770.

Yu J *et al.*, 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920.

Zhou H *et al.*, 2009. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381-384.

6. SAŽETAK

Diferencirane somatske stanice mogu se reprogramirati u pluripotentne matične stanice uvođenjem reprogramirajućih faktora Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc ili Oct3/4, Sox2, Lin28 i Nanog direktno u somatske stanice. Znanstvenici su razvili nekoliko metoda reprogramiranja. Reprogramirajućih faktora mogu se unijeti u stanicu kao transgeni pomoću virusnih ili plazmidnih vektora, uz posredstvo malih molekula koje poboljšavaju efikasnost reprogramiranja ili direktno kao rekombinantni proteini. Te metode omogućuju dobivanje pluripotentnih matičnih stanica različitih genetskih profila te bi se stoga mogle koristiti i u terapijske svrhe. No prije toga potrebno je utvrditi molekularne i funkcionalne razlike između iPS i ES stanica, rasvijetliti mehanizme reprogramiranja i razviti sigurnije i efikasnije protokole indukcije.

7. SUMMARY

Differentiated somatic cells can be reprogrammed into pluripotent stem cells by introduction of reprogramming factors Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc or Oct3/4, Sox2, Lin28 and Nanog directly into somatic cells. Scientists have developed several reprogramming methods. Reprogramming factors can be introduced into cells as transgenes with viral or plasmid vectors, in combination with small molecule compounds for enhanced efficiency of reprogramming, or directly as recombinant proteins. These methods enable establishment of pluripotent stem cells from different genetic background which would allow them to be used for therapeutic purposes. However, before that it would be necessary to determine molecular and functional differences between iPS and ES cells, understand mechanisms of reprogramming in detail and develop safer and more efficient protocols of induction.