

Новосибирский государственный университет
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

**РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ
ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ
ЛИНИИ W1STAR К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ
СОСТОЯНИЮ**

Стекленева А.Е.

Научный руководитель:

к.б.н. Павлова С.В.

Цель работы:

Провести репрограммирование эмбриональных фибробластов кожи и нейральных стволовых клеток крысы линии *Wistar* и охарактеризовать полученные клетки.

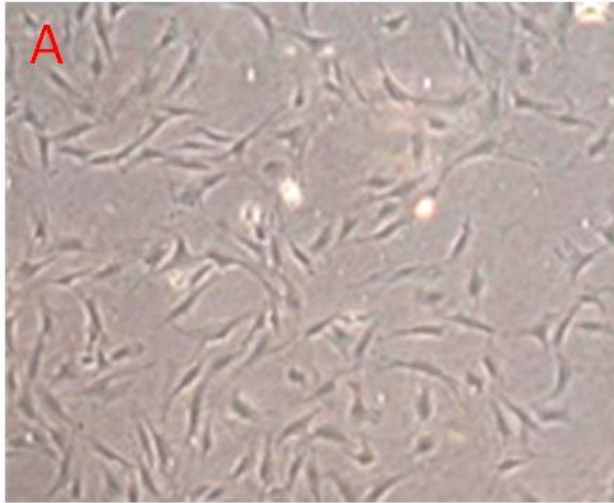
Задачи:

1. Получить культуры эмбриональных фибробластов кожи и нейральных стволовых клеток самки крысы и охарактеризовать их с помощью иммуноцитохимического метода и ОТ-ПЦР.
2. Индуцировать репрограммирование в эмбриональных фибробластах и нейральных стволовых клетках крысы с помощью трансдукции клеток лентивирусными векторами, несущими кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши.

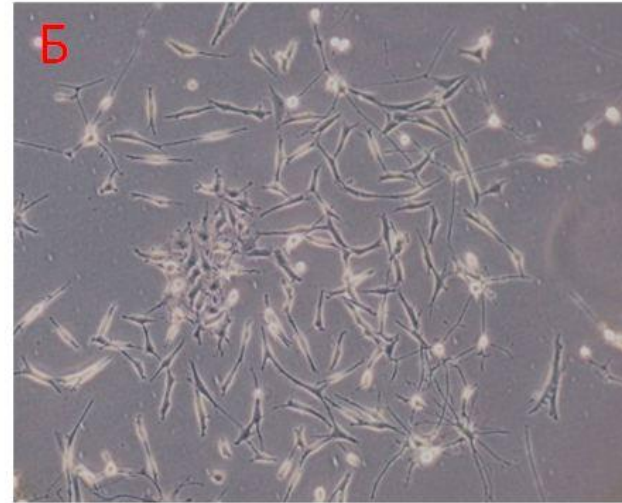
Задачи:

3. Исследовать влияние плюрипотина, вальпроевой и аскорбиновой кислот на эффективность репрограммирования соматических клеток и последующее поддержание стабильности их плюрипотентного состояния.
4. Провести анализ экспрессии маркеров плюрипотентности в репрограммированных клетках крысы с помощью иммуноцитохимического метода и ОТ-ПЦР.
5. Исследовать спектр дифференцировки репрограммированных клеток крысы.
6. Исследовать статус X-хромосомы в репрограммированных клетках самки крысы.

Морфология исходных клеток крысы



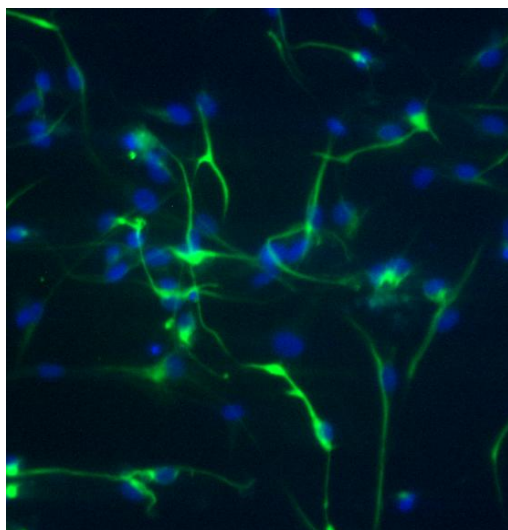
**Эмбриональные
фибробласты кожи**



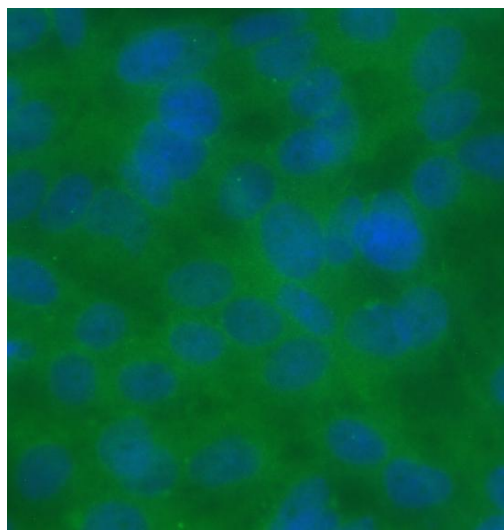
Нейральные клетки

Фазовый контраст. Увеличение 40

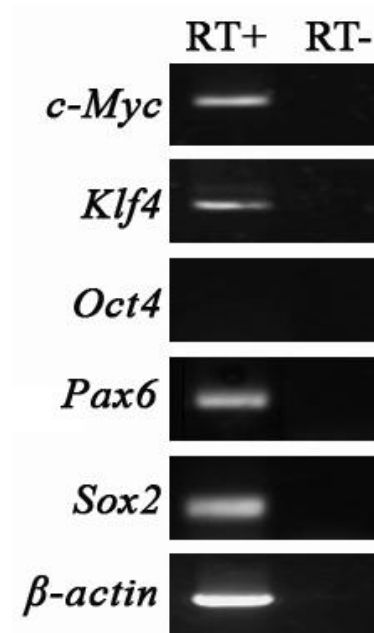
Характеристика нейральных клеток крысы



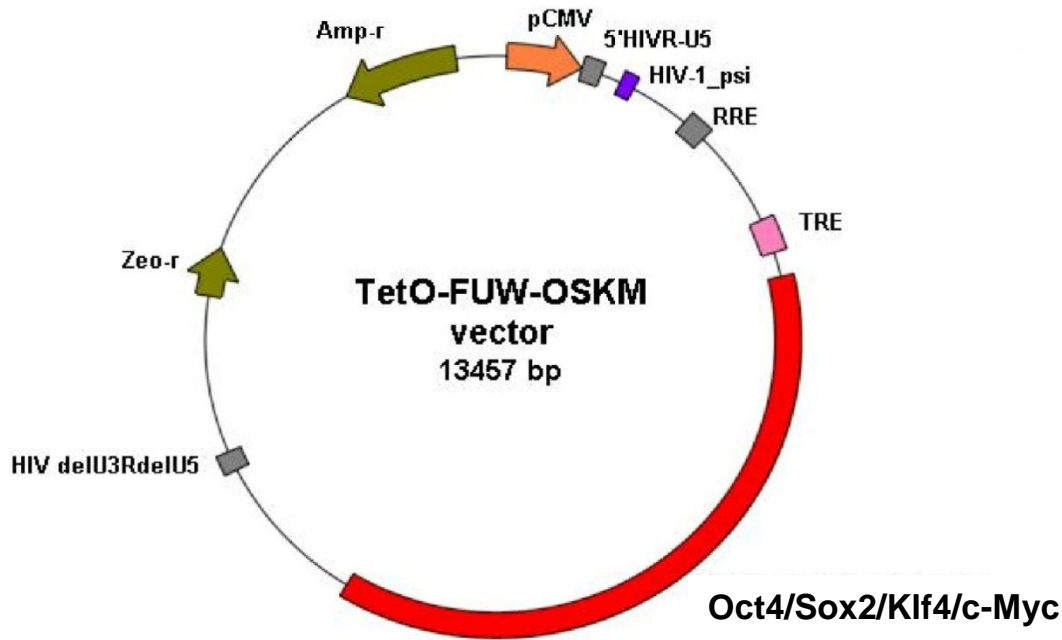
NESTIN
Увеличение 300



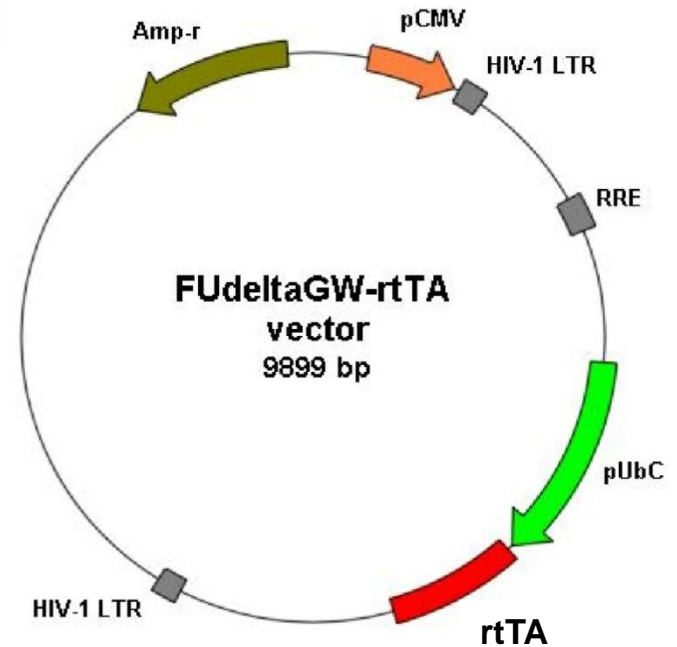
PSA-NCAM
Увеличение 600



Схемы плазмид-основ для получения лентивирусов

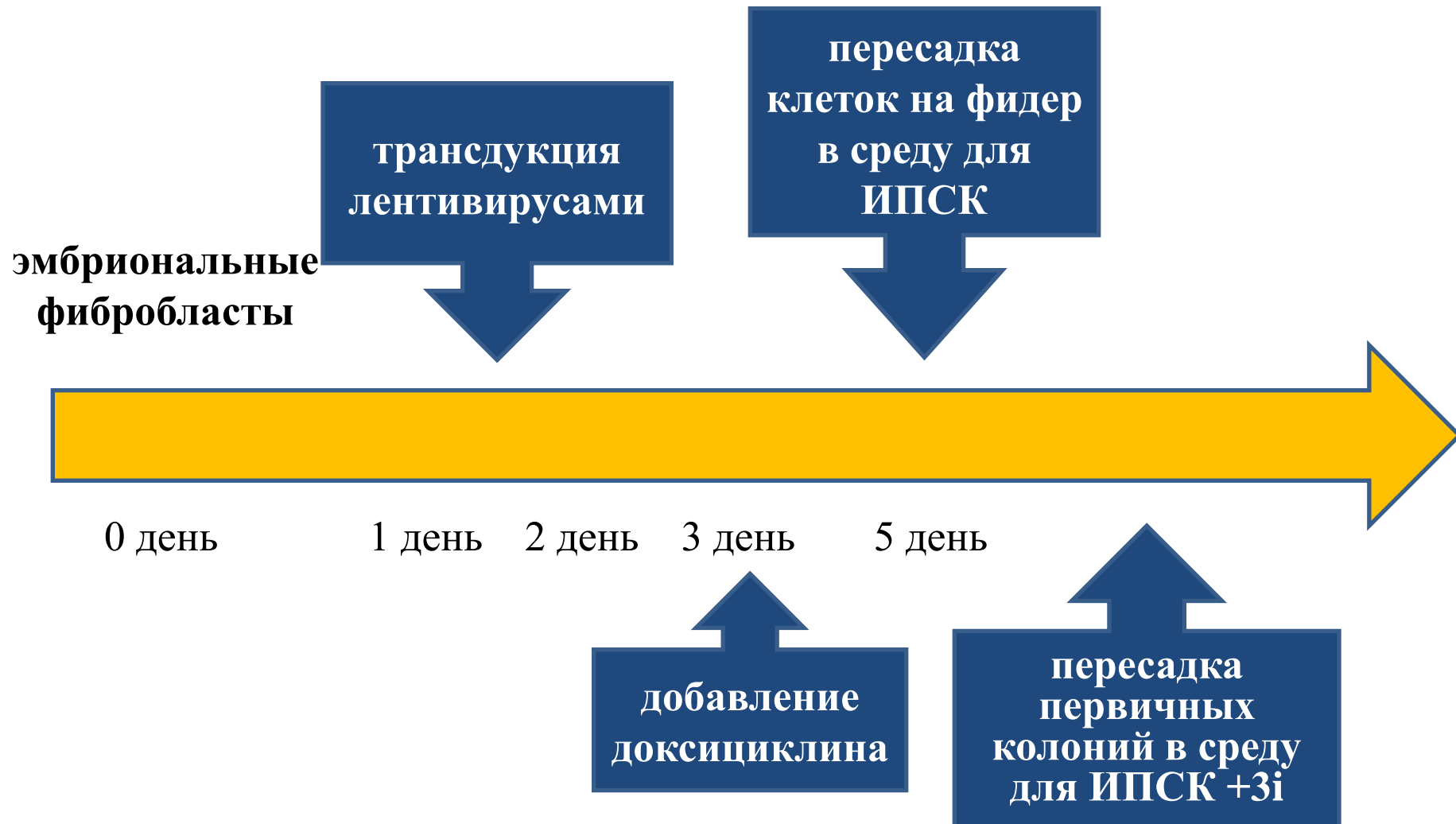


Addgene Plasmid 20321
(Carey et al., 2009)

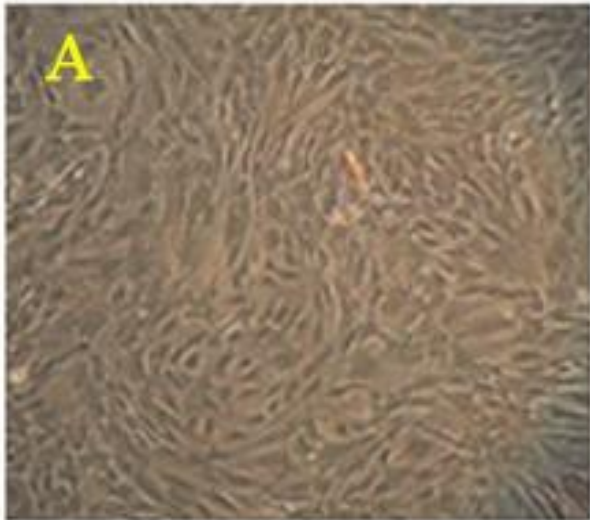


Addgene Plasmid 19780
(Maherali et al., 2008)

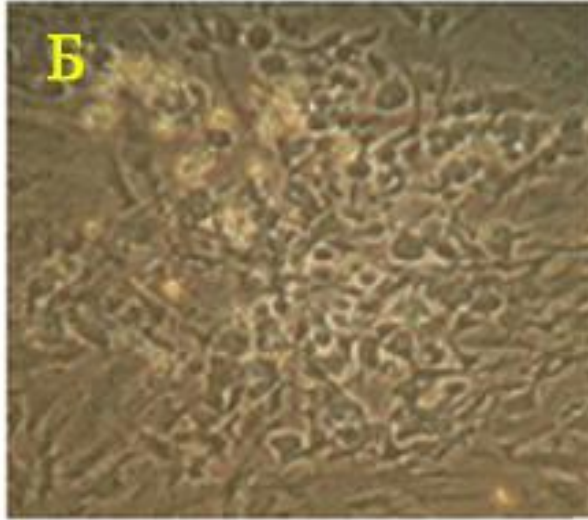
Схема эксперимента по репрограммированию фибробластов крысы



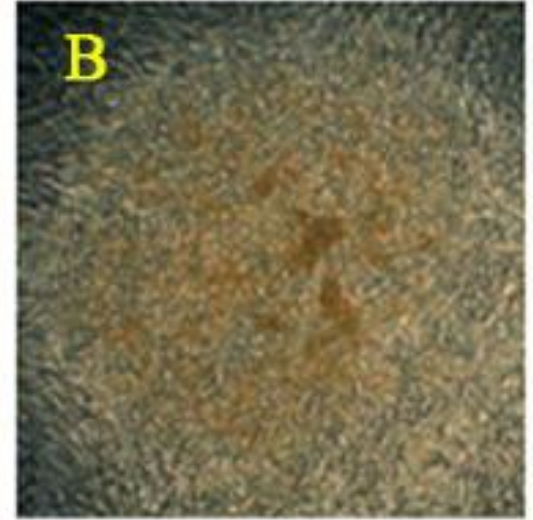
Изменение морфологии клеток при репрограммировании фибробластов крысы



А
исходная культура
фибробластов



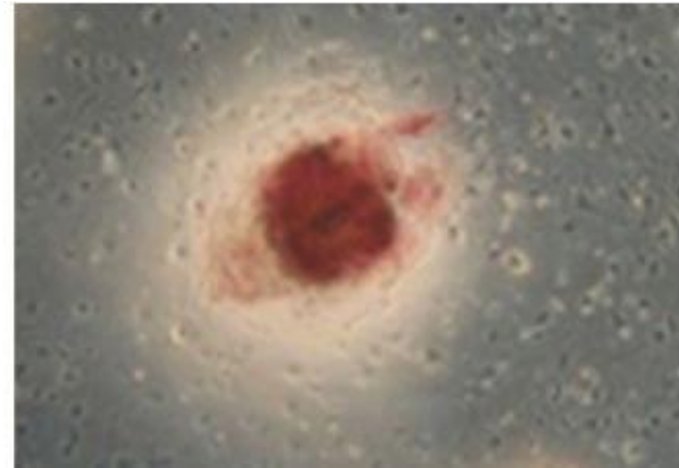
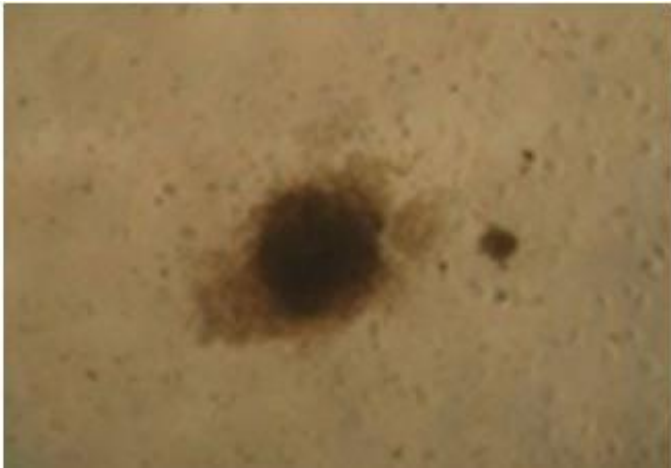
Б
4-й день
репрограммирования



В
8-й день
репрограммирования

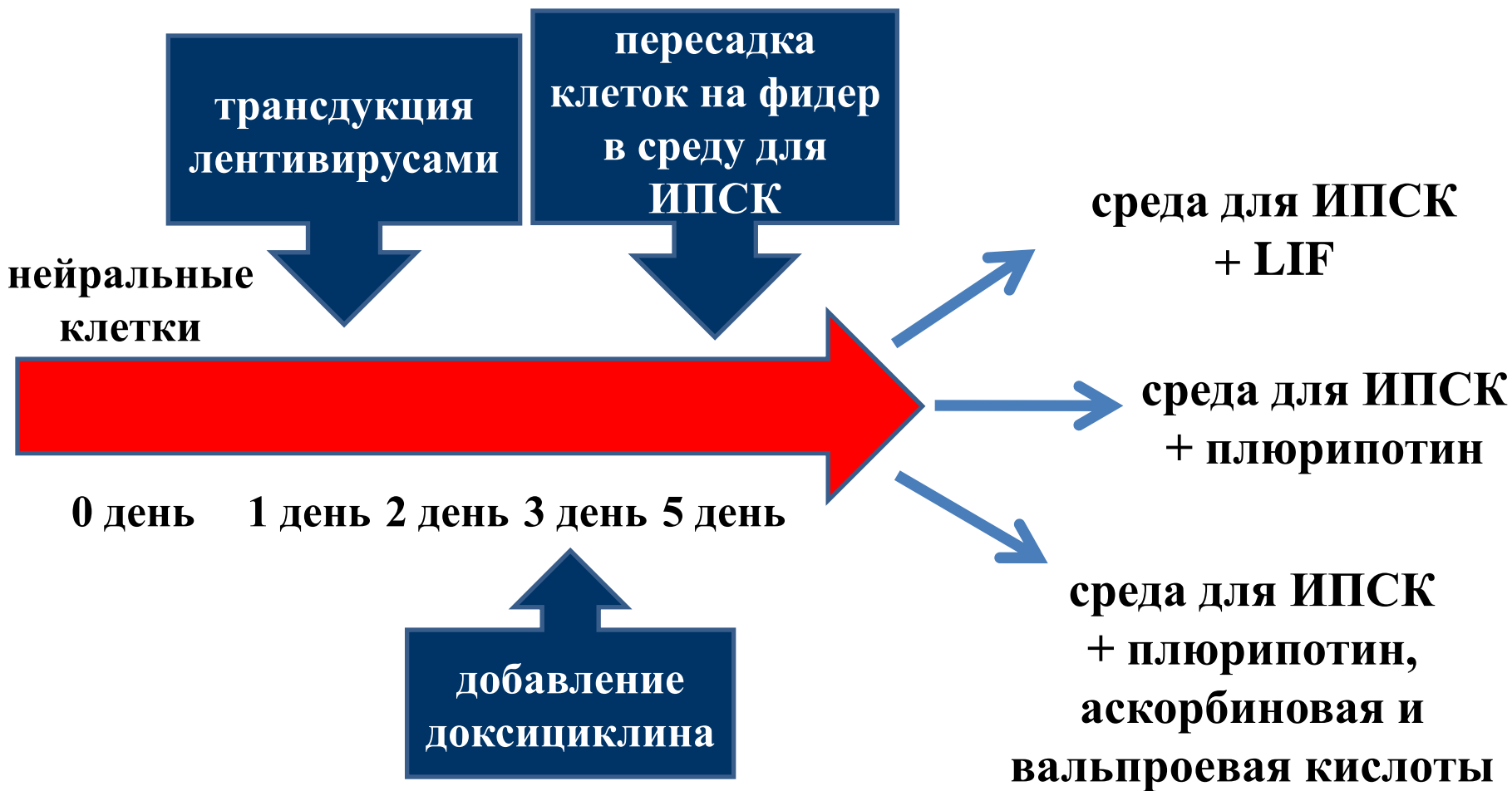
Фазовый контраст. Увеличение 25

Окрашивание на щелочную фосфатазу колонии репрограммированных фибробластов крысы

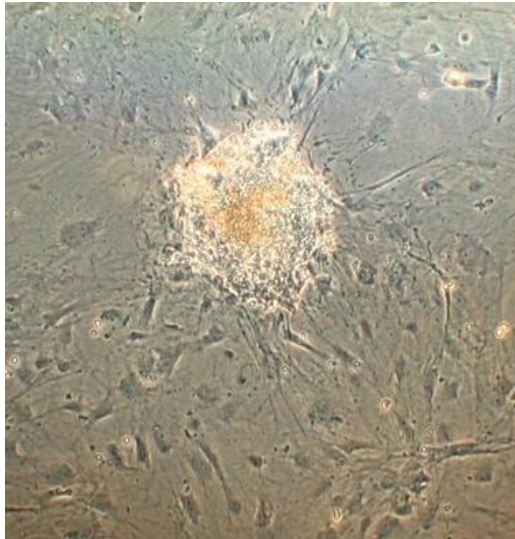


Фазовый контраст. Увеличение 15

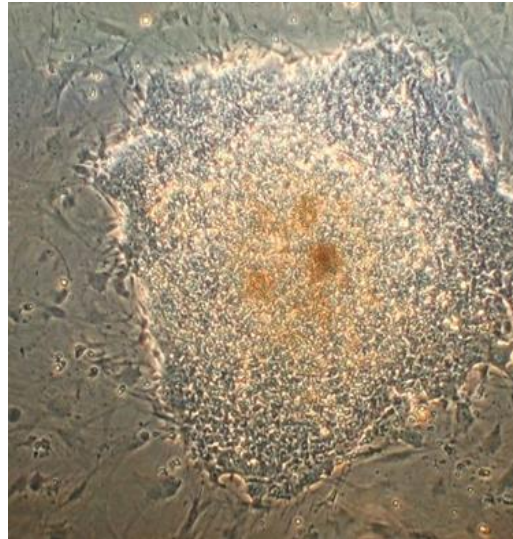
Схема эксперимента по репрограммированию нейральных клеток крысы



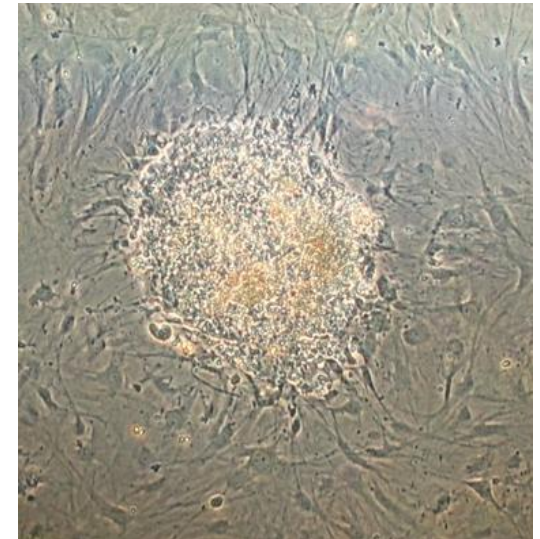
Первичные колонии клеток на 10-й день репрограммирования нейральных клеток крысы



LIF



плюрипотин



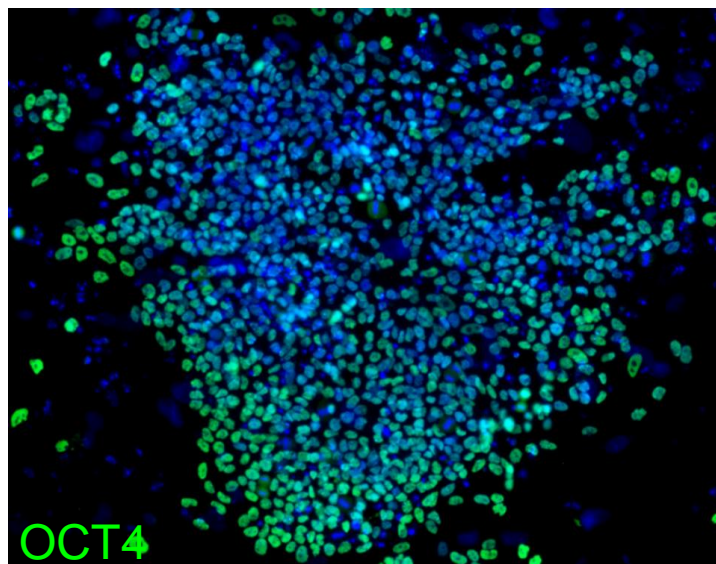
**плюрипотин,
аскорбиновая и
вальпроевая
кислоты**

Фазовый контраст. Увеличение 20

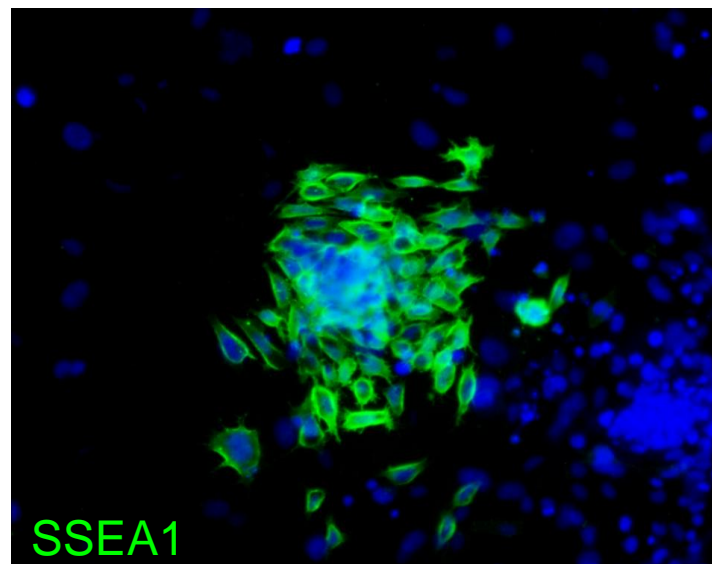
Схема эксперимента по репрограммированию нейральных клеток крысы



Экспрессия маркеров плюрипотентности в колониях репрограммированных нейральных клеток крысы

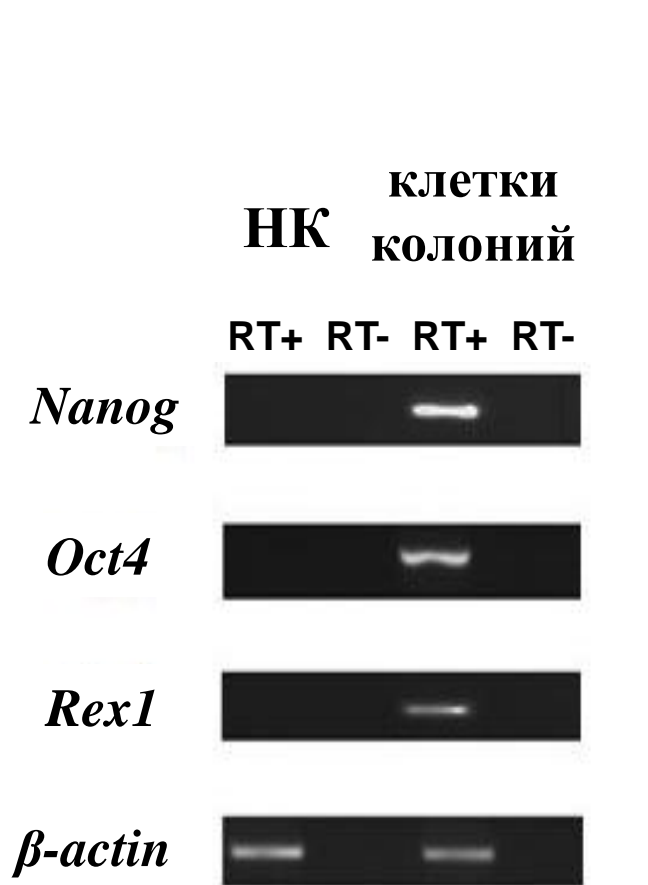


увеличение 40

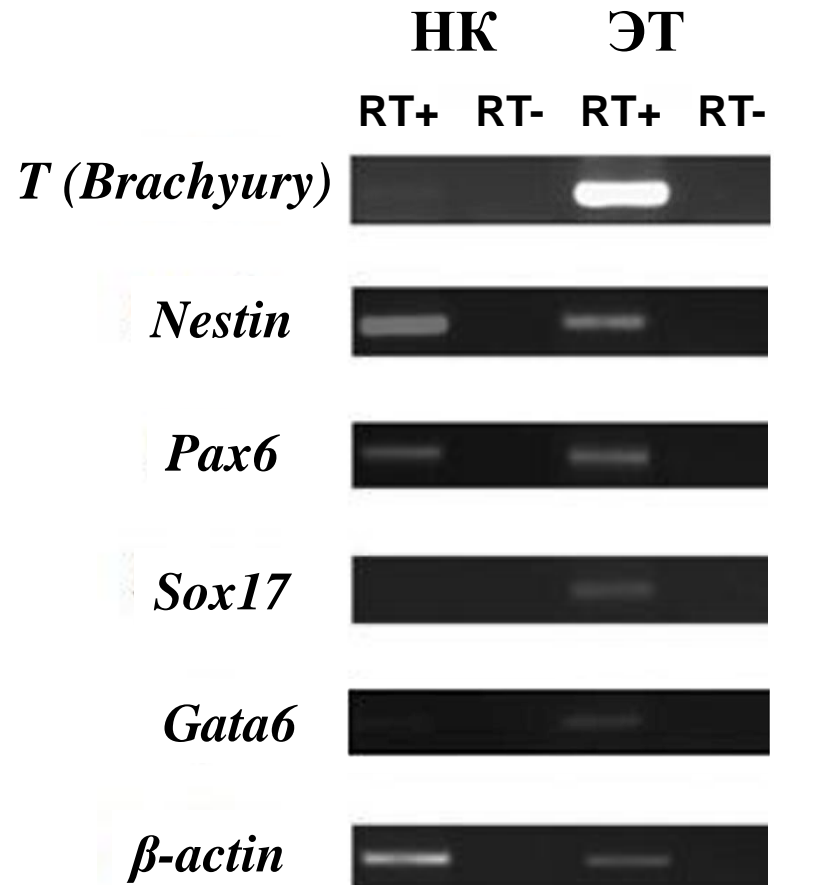


увеличение 300

ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов

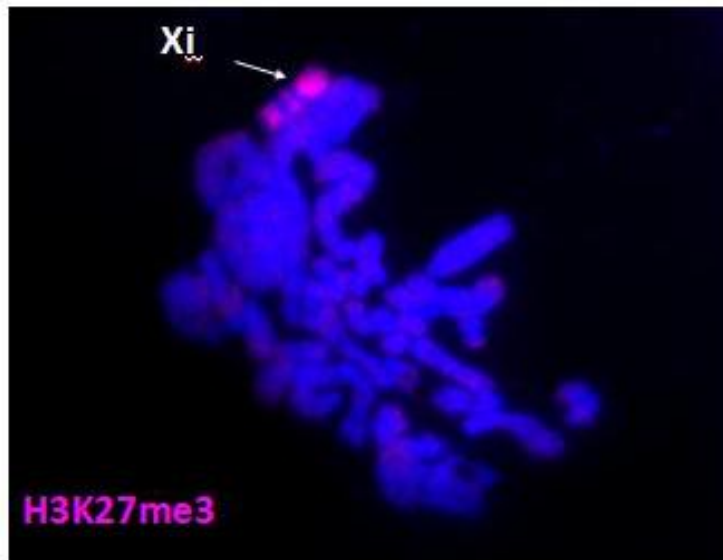


НК – нейральные клетки

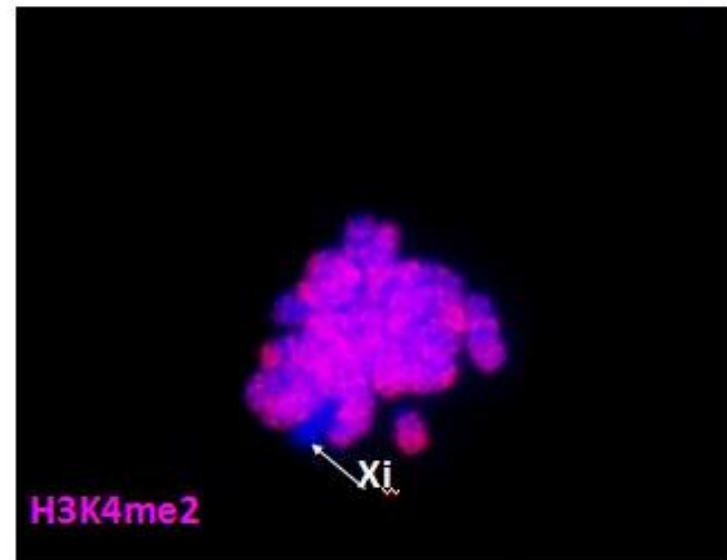


ЭТ – эмбрионидные тельца

Модификации хроматина метафазных хромосом репрограммированных клеток



H3K27me3 – триметилированный гистон H3 по лизину K27



H3K4me2 – диметилированный гистон H3 по лизину K4

Xi – неактивная X-хромосома

Выводы

- С помощью трансдукции лентивирусным вектором TetO-FUW-OSKM, несущим кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* мыши, было проведено репрограммирование нейральных клеток крысы линии Wistar до плюрипотентного состояния.
- Репрограммированные нейральные клетки формируют колонии, морфологически схожие с колониями эмбриональных стволовых клеток; экспрессируют гены, характерные для плюрипотентных клеток (*Oct4*, *Nanog*, *Rex1*) и содержат поверхностный антиген стволовых клеток SSEA1; дифференцируются *in vitro* в производные трех зародышевых листков.
- Показано, что наиболее эффективно процесс репрограммирования нейральных клеток крысы происходит в среде, содержащей плюрипотин, наименее эффективно – в среде с LIF. Добавление в культуральную среду вальпроевой и аскорбиновой кислот не повышает эффективность репрограммирования клеток крысы.
- С помощью анализа модификаций хроматина показано, что в полученных репрограммированных клетках самки крысы не происходит реактивация неактивной X-хромосомы.