

Характеристика mTiPSCs – потенційної лінії іПСК миші, отриманої за допомогою системи транспозонів Sleeping beauty

С. МАЛИШЕВА^{1,2}, Г. БУДАШ^{1,2}, Д. БІЛКО¹, Н. БІЛКО¹, Т. САРІЧ²

¹Національний університет «Києво-Могилянська академія», м. Київ

²Інститут нейрофізіології Кельнського університету, м. Кельн

Characterization of mTiPSCs – Potential Mouse iPSC Obtained by Means of Sleeping Beauty Transposon System

S. MALYSHEVA^{1,2}, G. BUDASH^{1,2}, D. BILKO¹, N. BILKO¹, T. SARICH²

¹National University of Kyiv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

²Institute of Neurophysiology, University of Cologne, Cologne

Відкриття індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) [Yamanaka, 2007] – перспективної альтернативи ембріональним стовбуровим клітинам (ЕСК), стало надзвичайною подією у клітинній біології. Проте традиційні вірусні методи отримання іПСК пов'язані з певним ризиком для потенційного подальшого застосування цих клітин у медичній практиці. Використання заснованої на мобільних генетичних елементах системи Sleeping beauty – принципово новий механізм репрограмування соматичних клітин у індуковані плюрипотентні [Izsvak, 2010]. У даній роботі досліджено ключові характеристики отриманої за допомогою цієї системи потенційно нової лінії іПСК миші – mTiPSCs (murine Transposon-Induced Pluripotent Stem Cells).

Трансфекцію ембріональних фібробластів репрограмуючою системою плазмід здійснювали на «Neon Transfection System» («Invitrogen»). Отримані колонії відбирали індивідуально та культивували як лінії ЕСК/іПСК на мітотично інактивованих фідерних клітинах у присутності LIF. Рівень експресії SSEA-1 визначали за допомогою проточної цитофлуориметрії, локалізацію експресії транскрипційного фактора Oct4 – імуногістохімічно. Експресію генів вивчали на рівні мРНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотньою транскрипцією. Диференційний потенціал отриманих клонів оцінювали при їх спонтанному диференціюванні *in vitro* [Okada, 2010] та формуванні тератом *in vivo* у імунодефіцитних тварин і лабораторних мишей лінії c57Bl6/N.

Було досліджено експресію факторів плюрипотентності на рівні білку – лужної фосфатази, SSEA-1, Oct4. Кількість SSEA-1 – позитивних клітин варіювала у різних клонах від 59,60% у клона 20 до 94% у клона 17, а у загальновідомих ліній плюрипотентних клітин AT25 і α PIG44 становила 91,5% і 93,0% відповідно. Показано реактивацію ендогенної експресії генів, асоційованих із плюрипотентністю – *nanog*, *rex1*, *stella*, *sall4*, *utf*, *tcl*. При спонтанному диференціюванні виявлено активацію експресії ранніх ентодермальних маркерів (AFP і Sox17) на 12-ту добу диференціювання, мезодермальних tBra – із 7-ї доби в усіх досліджуваних лініях, α MHC – лише у клоні 7 і контрольних лініях на 12-ту добу. Експресію гену *nestin*, що вважався ектодермальним маркером, спостерігали у недиференційованому стані та на усіх етапах диференціювання. При підшкірному введенні імунодефіцитним тваринам по 2×10^6 клітин отриманих клонів спостерігали формування тератом починаючи із 25-ї доби експерименту. Клонами 6 і 9 сформовано по одній пухлині, а клоном 7 і лінією α PIG44 – по дві. У мишей лінії c57Bl6/N формування тератом не виявлено.

Експериментальні дані є переконливим доказом плюрипотентності отриманих клонів, що свідчить про репрограмування соматичних клітин у потенційну лінію іПСК за допомогою системи Sleeping beauty.

Discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) [Yamanaka, 2007], a prospective alternative to embryonic stem cells, was an extraordinary event in cell biology. However, the traditional viral methods of iPSC derivation are associated with certain risk for potential further use of these cells in medical practice. Usage of Sleeping Beauty system based on mobile genetic elements is a fundamentally new mechanism for reprogramming somatic cells into induced pluripotent ones [Izsvak, 2010]. Basic characteristics of potentially new mouse iPSC line, mTiPSCs (murine Transposon-induced Pluripotent Stem Cells), obtained by means of Sleeping Beauty were investigated in this research.

Transfection of embryonic fibroblasts by reprogrammed plasmid system was performed with NeonTransfection system (Invitrogen). The obtained colonies were individually selected and cultured as ESC/iPSC lines on mitotically inactivated feeder cells in the presence of LIF. Expression level of SSEA-1 was determined by flow cytometry, expression localization of transcription factor Oct4 was done by immunohistochemistry. Gene expression at the level of mRNA was studied with polymerase chain reaction with reverse transcription. Differentiation potential of obtained clones was evaluated during their spontaneous differentiation *in vitro* [Okada, 2010] and formation of teratomas *in vivo* in immunodeficient animals and c57Bl6/N mice.

The expression of pluripotency factors was studied at protein level: alkaline phosphatase, SSEA-1, Oct4. The number of SSEA-1 positive cells varied in different clones from 59.60% in clone 20 upto 94% in clone 17, while standard AT25 and α PIG44 lines their number was 91.5 and 93.0%, respectively. We have found the reactivation of endogenous expression of genes associated with pluripotency: *nanog*, *rex1*, *stella*, *sall4*, *utf*, *tcl*. During spontaneous differentiation we revealed activation of early endodermic markers expression (AFP and Sox17) to the 12th day of differentiation; mesodermal tBra starting from the 7th day in all the studied lines, and α MHC was found only in clone 7 and the control lines to the 12th day. Expression of *nestin* gene, supposed as ectodermic marker, was observed in undifferentiated state and at all the stages of differentiation. Subcutaneous introduction to immunodeficient animals of 2×10^6 cells from the experimental clones resulted in formation of teratomas starting from the 25th day of the experiment. Clones 6 and 9 formed one tumor each, and clones 7 and line α PIG44 formed by 2 tumors each. In c57Bl6/N mice no teratomas were found.

The experimental data showed strong evidence that derived clones are pluripotent, that testified the reprogramming of somatic cells to potential iPSC line using Sleeping beauty system.