

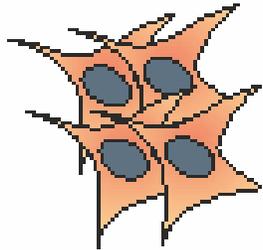
Получение серотонинергических нейронов из фибробластов МЫШИ

Фишман Вениамин Семенович

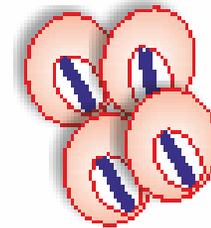
Научный руководитель:
д.б.н., проф. Серов Олег Леонидович

Репрограммирование и трансдифференцировка

Фибробласты



Oct4, Sox2, cMyc, Klf4



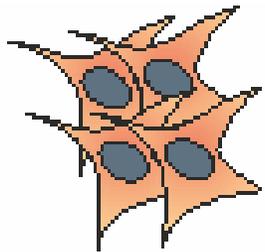
Индуцированные
плюрипотентные
столовые (ИПС)
клетки



John Gordon, Shinya Yamanaka
Нобелевская премия 2012

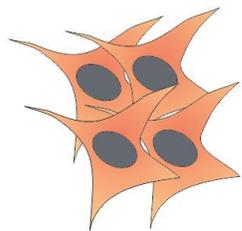
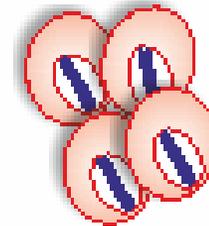
Репрограммирование и трансдифференцировка

Фибробласты

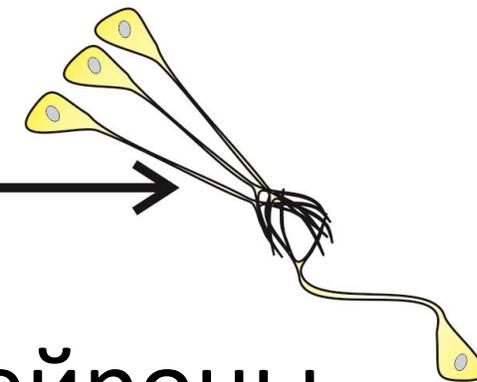


Oct4, Sox2, cMyc, Klf4

ИПС клетки



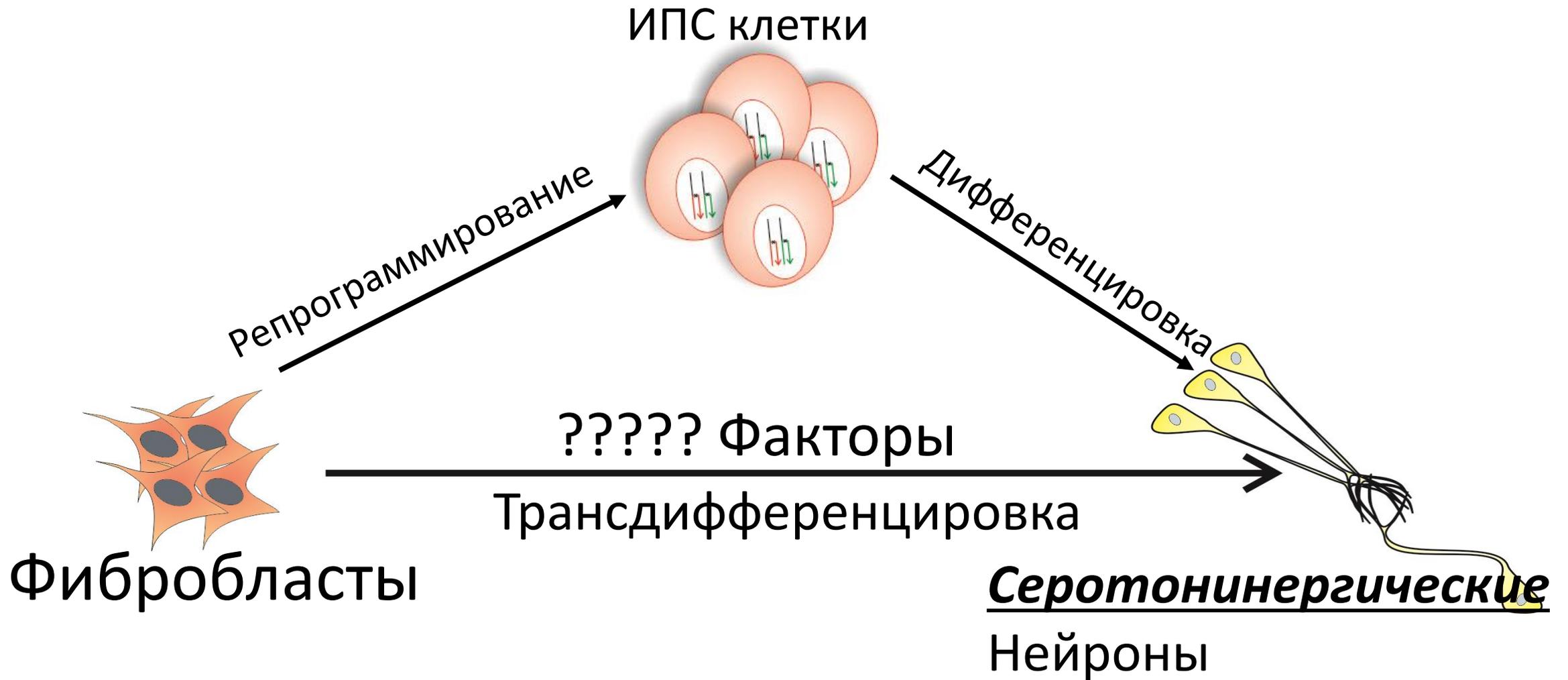
Ascl1, Brn2, Myt1l



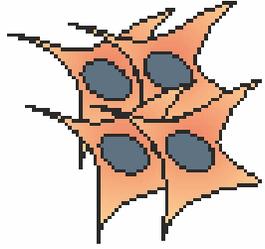
Фибробласты

Нейроны

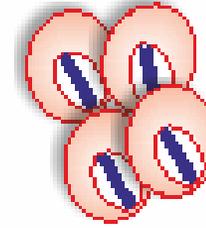
Репрограммирование и трансдифференцировка



Фибробласты



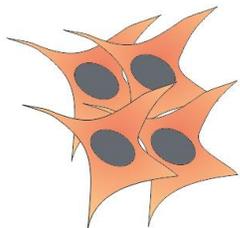
ИПС клетки



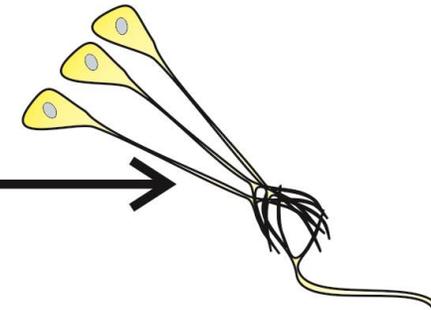
Требуются клеточные деления

Одинаков ли механизм?

Не требуются клеточные деления?



Набор факторов



Исходный клеточный тип
(фибробласты)

Целевой клеточный тип
(нейроны)

Цели

1. Получение серотонинергических нейронов при помощи дифференцировки ИПС клеток или прямой конверсией фибробластов мыши
2. Оценка роли клеточного деления в процессе прямой конверсии фибробластов в нейрональные клетки

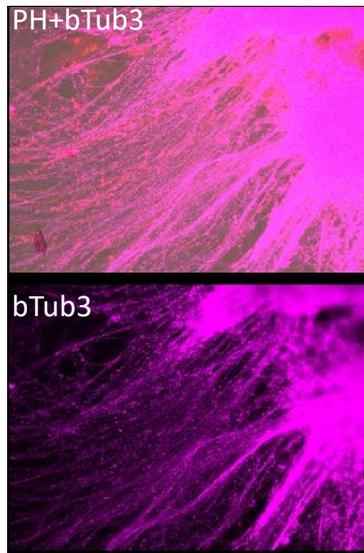
Задачи

1. Выбрать систему для *in vitro* детекции нейрональных клеток и, в частности, серотонергических нейронов
2. Выявить возможные эпигенетические барьеры, препятствующие конверсии фибробластов в серотонинергические нейроны.
3. Получить серотонинергические нейроны из фибробластов путем дифференцировки ИПС клеток
4. Выбрать набор генов-кандидатов, способный осуществить прямую конверсию фибробластов в серотонинергические нейроны
5. Создать банк лентивирусных конструкций, экспрессирующих выбранные для прямой конверсии фибробластов в серотонинергические нейроны факторы
6. Оценить эффект экзогенной экспрессии выбранных факторов в экспериментах по прямой конверсии фибробластов в серотонинергические нейроны.
7. Оценить эффект экзогенной экспрессии выбранных факторов при направленной дифференцировке ИПС клеток в серотонинергические нейроны
8. Исследовать возможность трансдифференцировки фибробластов в нейрональные клетки в присутствии ингибиторов клеточных делений

Выбор системы *in vitro* детекции нейрональных клеток

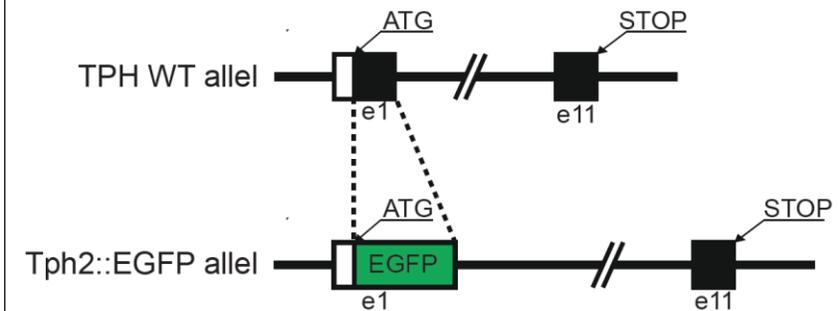
Системы *in vitro* детекции определенных типов клеток

Иммуноцитохимическое
окрашивание на
нейрональные маркеры



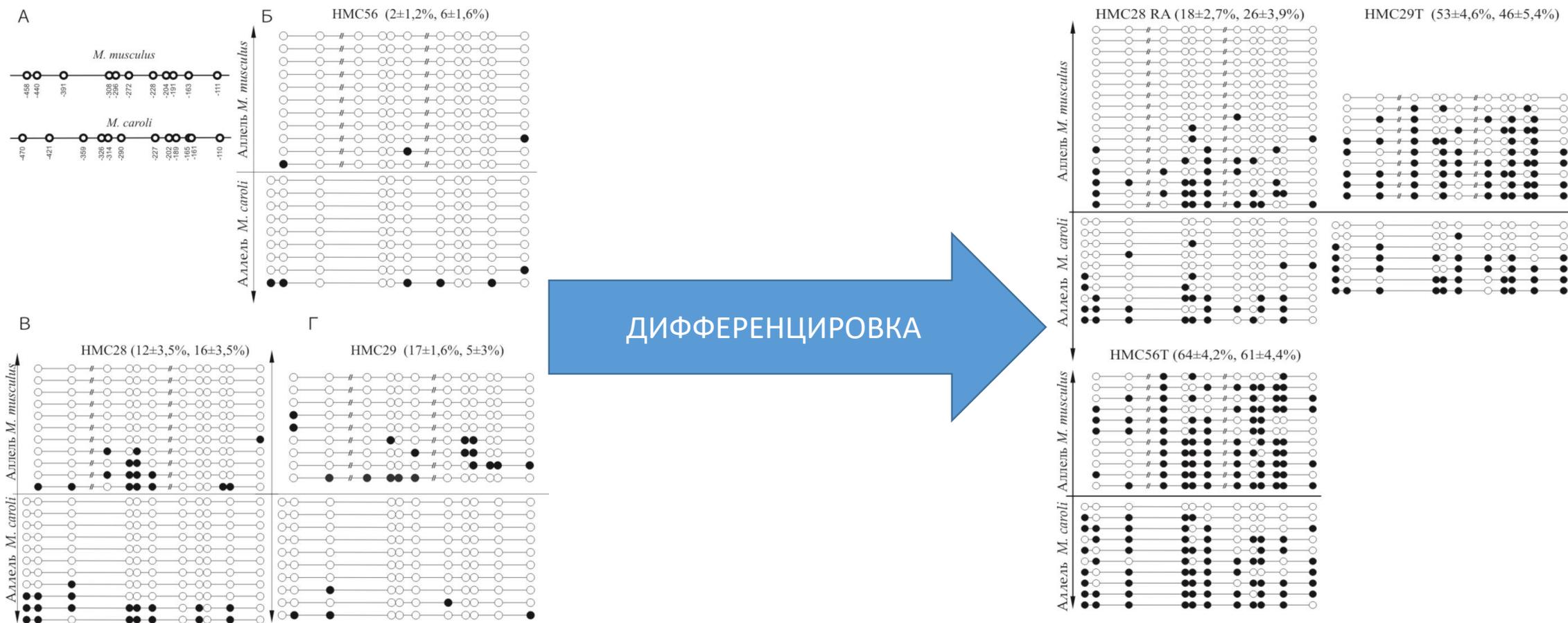
ИПС клетки линии iTEN404
дифференцированы в нейроны и
окрашены на маркер bTub3

Использование клеточных линий,
несущих репортерные конструкции под
эндогенными тканеспецифичными
промоторами



Организация локуса *Trp2* у мышей линии TEN
(Migliarini et al., 2013)

Выявление возможных эпигенетических барьеров, препятствующих конверсии фибробластов в серотонинергические нейроны.

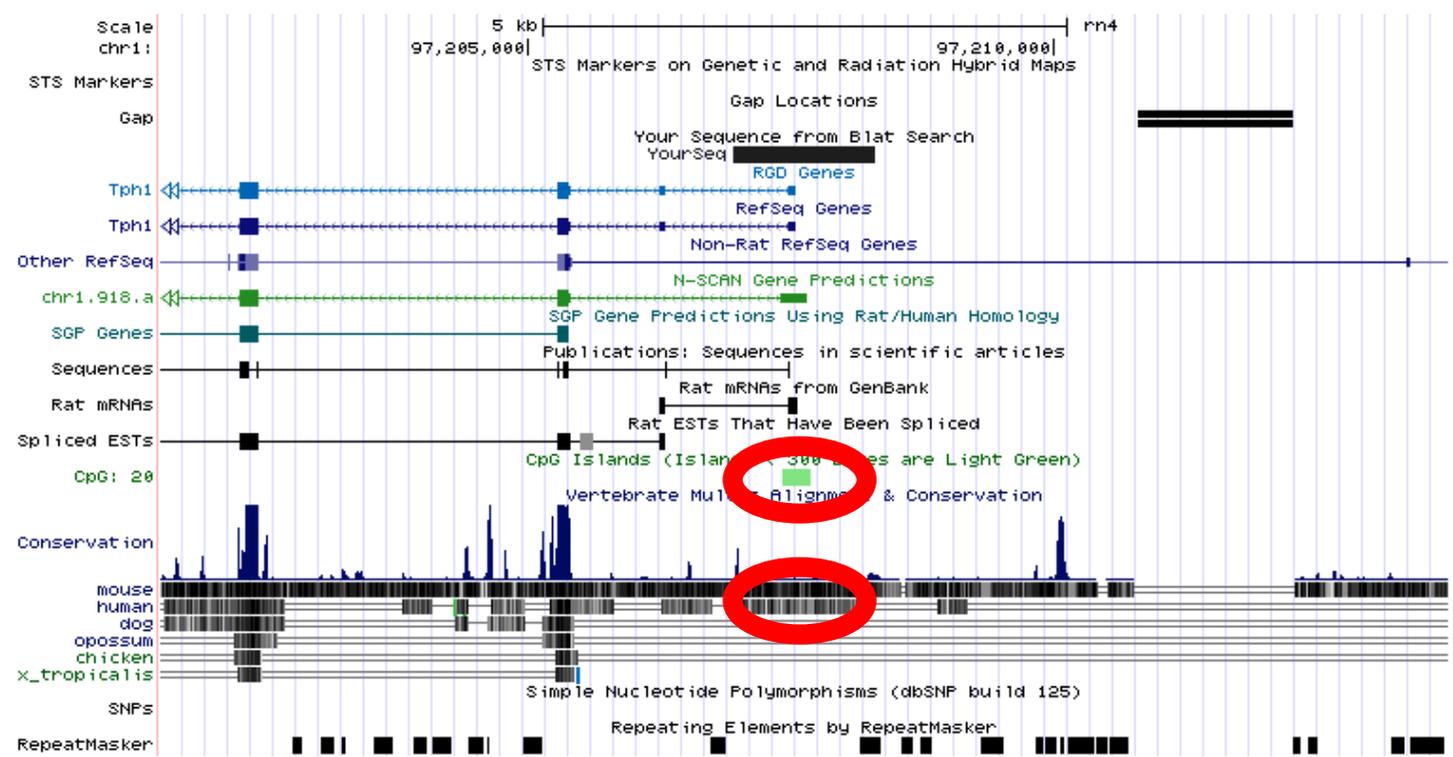


Изменение статуса метилирования регуляторных регионов гена *Oct4* при дифференцировке гибридных клонов НМС

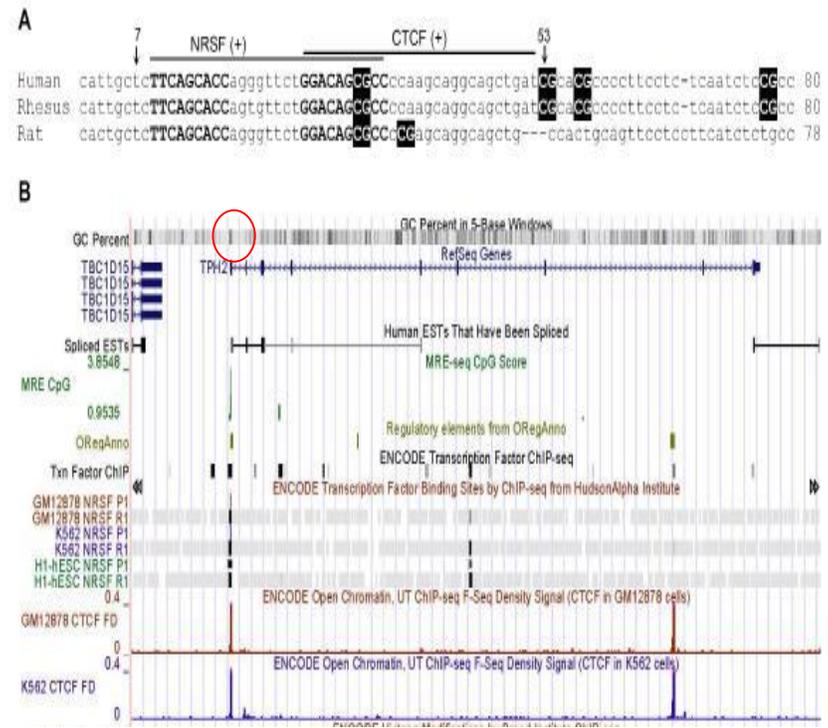
Выявление возможных эпигенетических барьеров, препятствующих конверсии фибробластов в серотонинергические нейроны.

1. Биоинформационный поиск CpG островков в регуляторных регионах генов Trh1 и Trh2

Участок 1

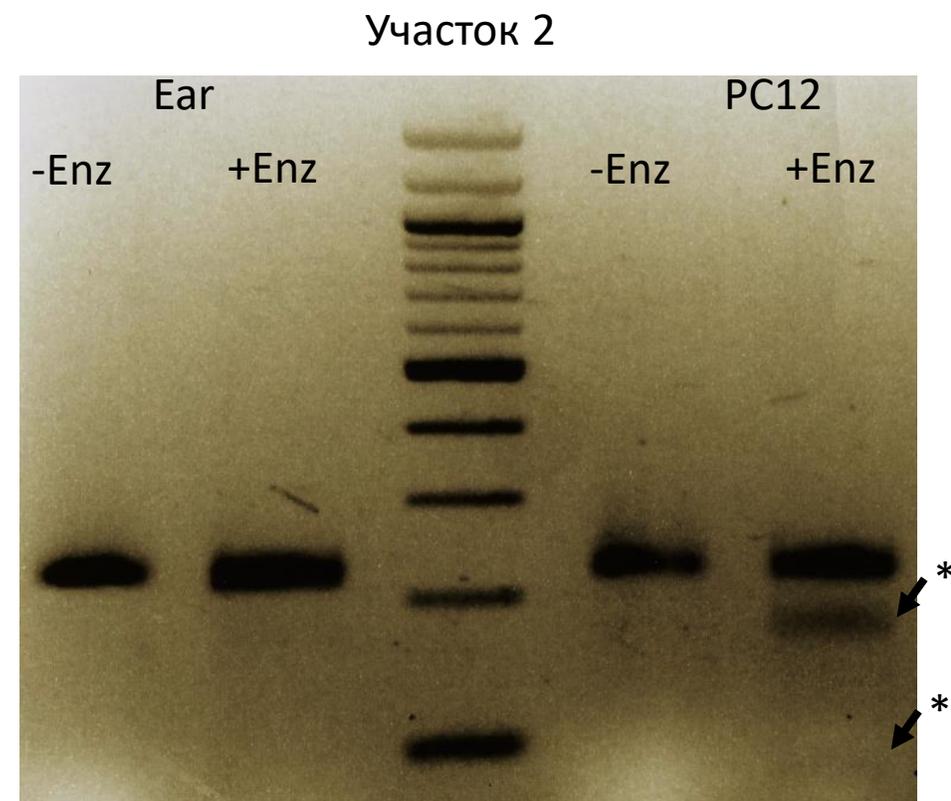
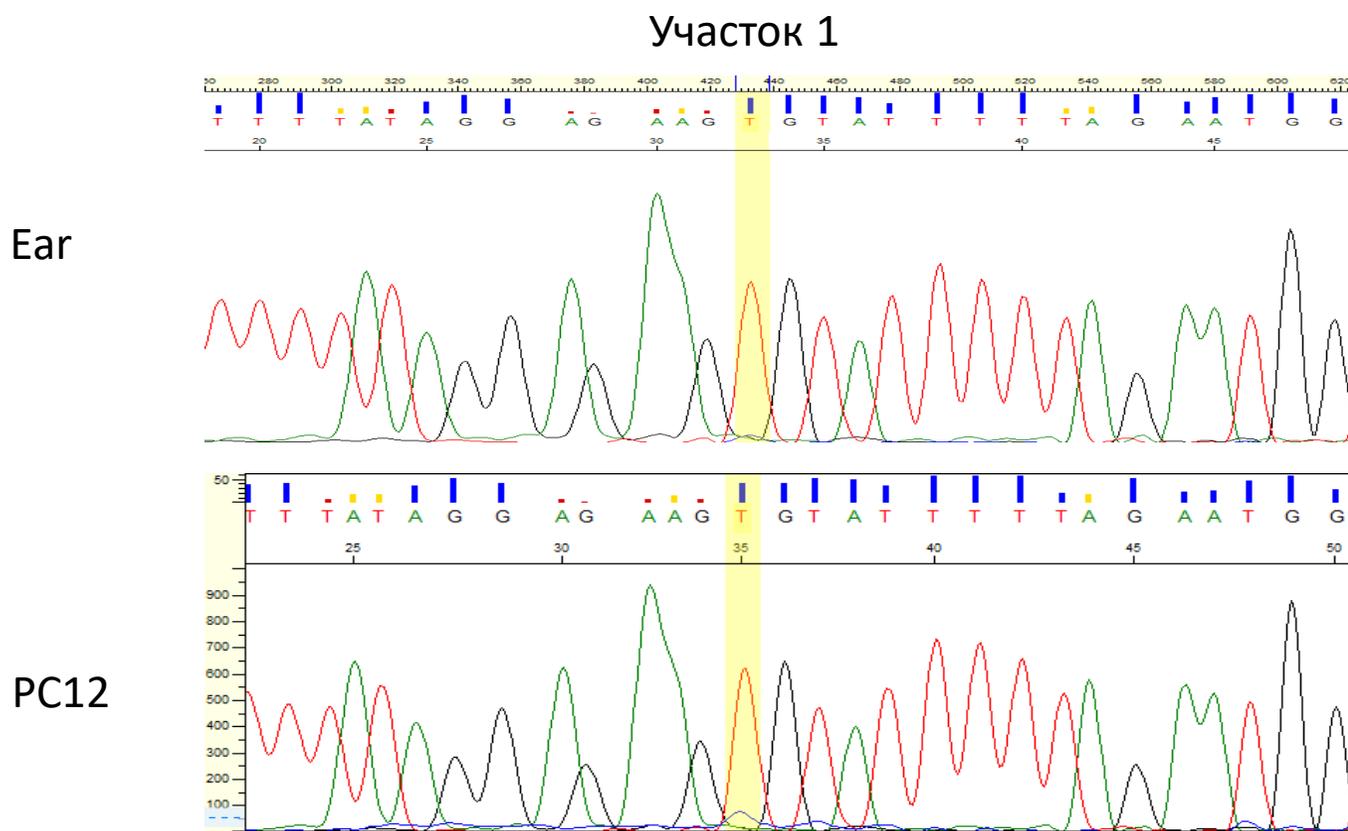


Участок 2



Выявление возможных эпигенетических барьеров, препятствующих конверсии фибробластов в серотонинергические нейроны.

2. Анализ метилирования выбранных участков



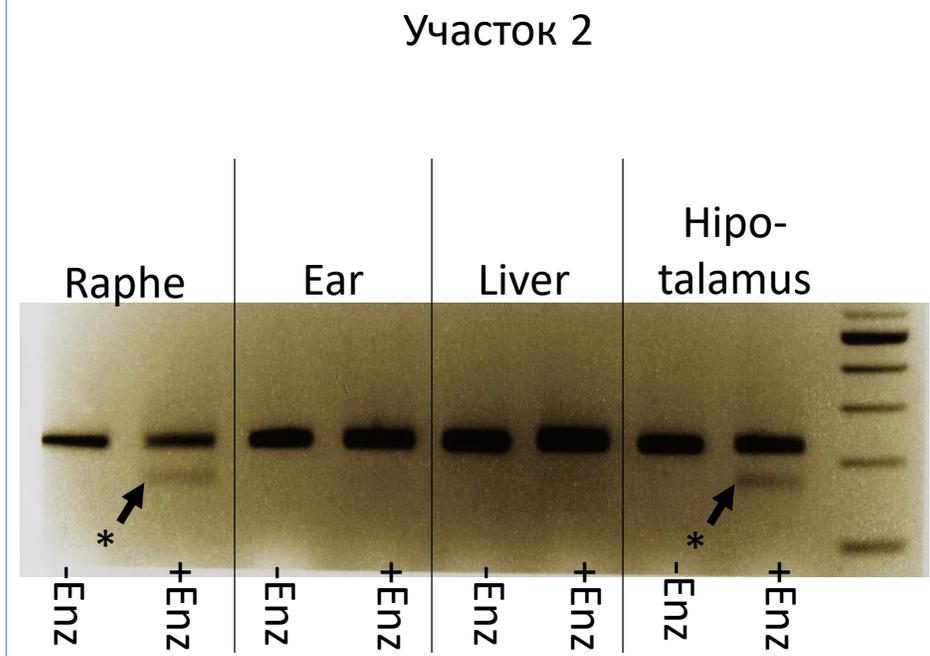
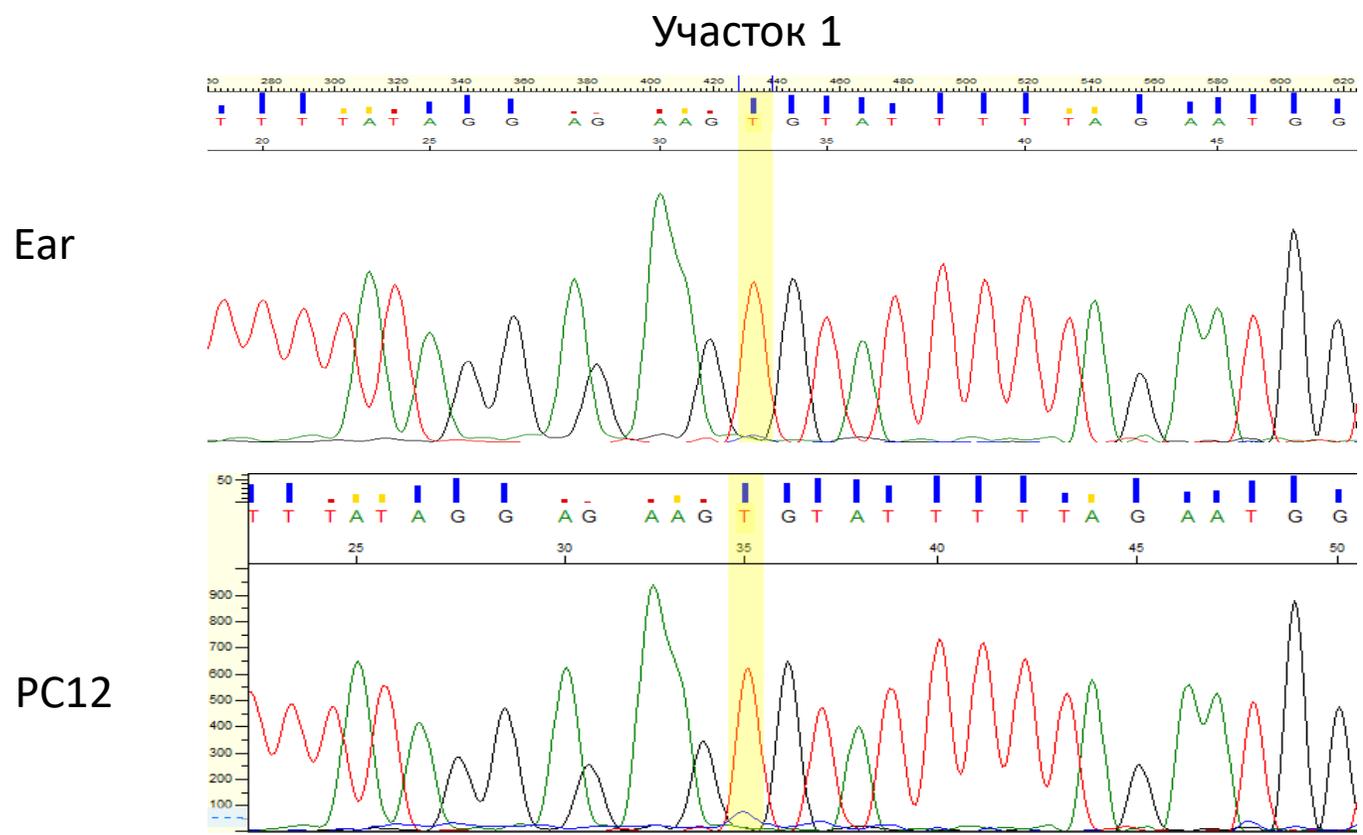
Обозначения: Ear - ДНК из образца ткани уха крысы, PC12 - ДНК линии клеток PC12 (после 7 дней дифференцировки)

Enz – эндонуклеаза рестрикции Taq I

* - бенд образуется в случае, если исходная последовательность ДНК была метилирована

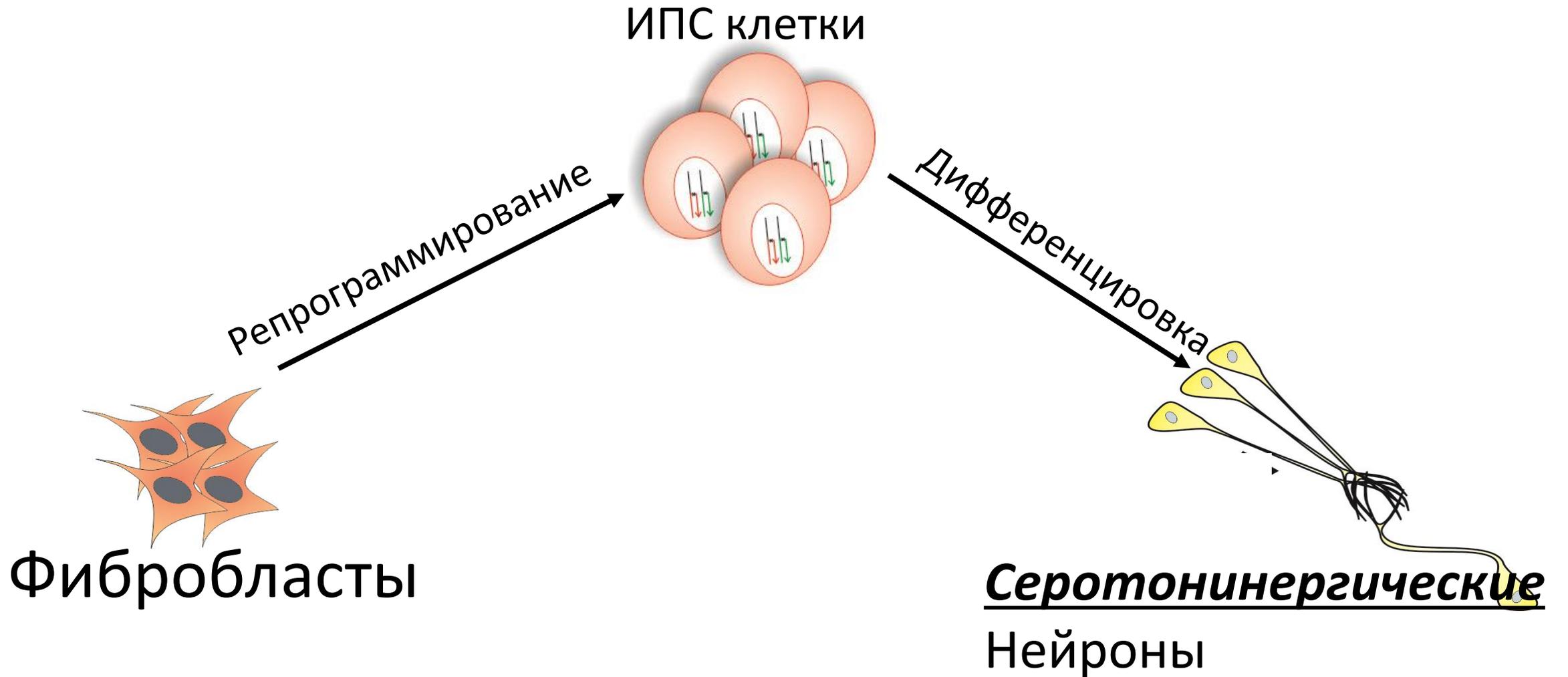
Выявление возможных эпигенетических барьеров, препятствующих конверсии фибробластов в серотонинергические нейроны.

2. Анализ метилирования выбранных участков



Обозначения: Ear - ДНК из образца ткани уха крысы, PC12 - ДНК линии клеток PC12 (после 7 дней дифференцировки)
 Enz – эндонуклеаза рестрикции Taq I * - бенд образуется в случае, если исходная последовательность ДНК была метилирована

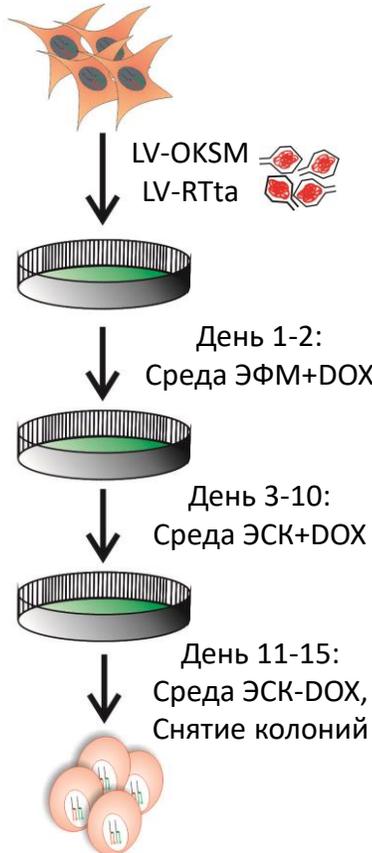
Получение серотонинергических нейронов из фибробластов путем дифференцировки ИПС клеток



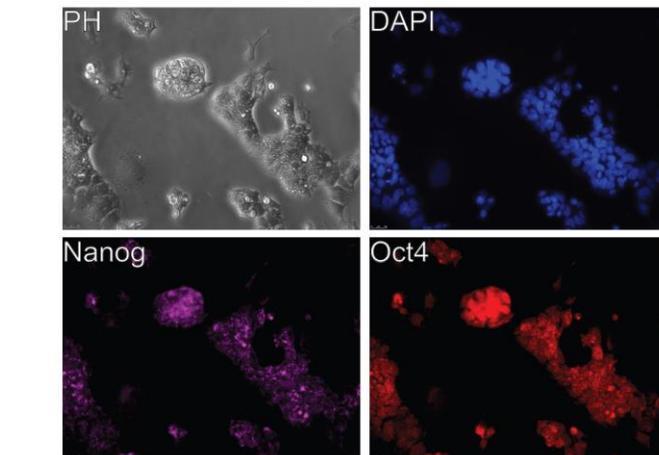
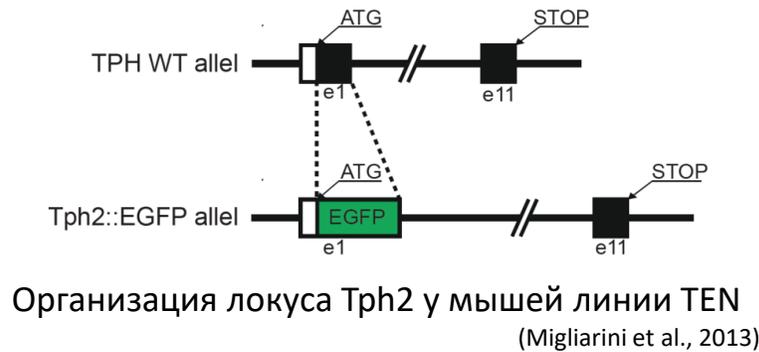
Получение серотонинергических нейронов из фибробластов путем дифференцировки ИПС клеток

1. Получение линий ИПС клеток из фибробластов линии TEN

Эмбриональные Фибробласты
Мыши (ЭФМ) линии TEN



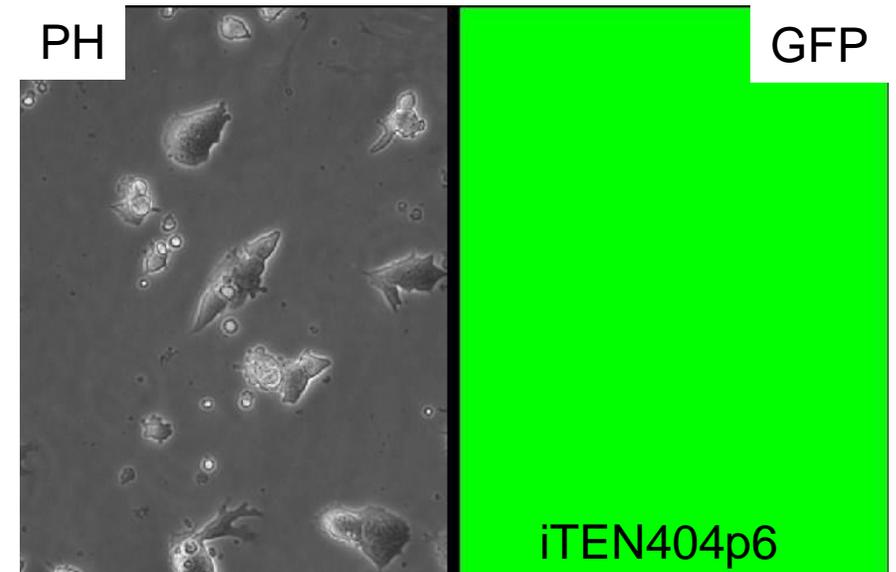
ИПС клетки линии iTEN4xx



Иммуноцитохимическое окрашивание ИПС клеток iTEN 404 на маркеры плюрипотентности Oct4 и Nanog

Снято ~25 колоний
Получено ~10 первичных линий

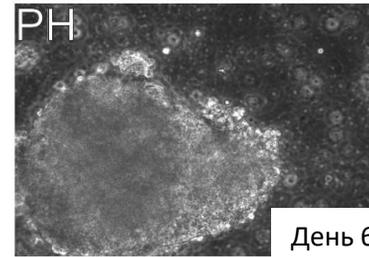
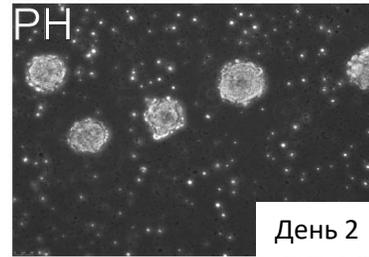
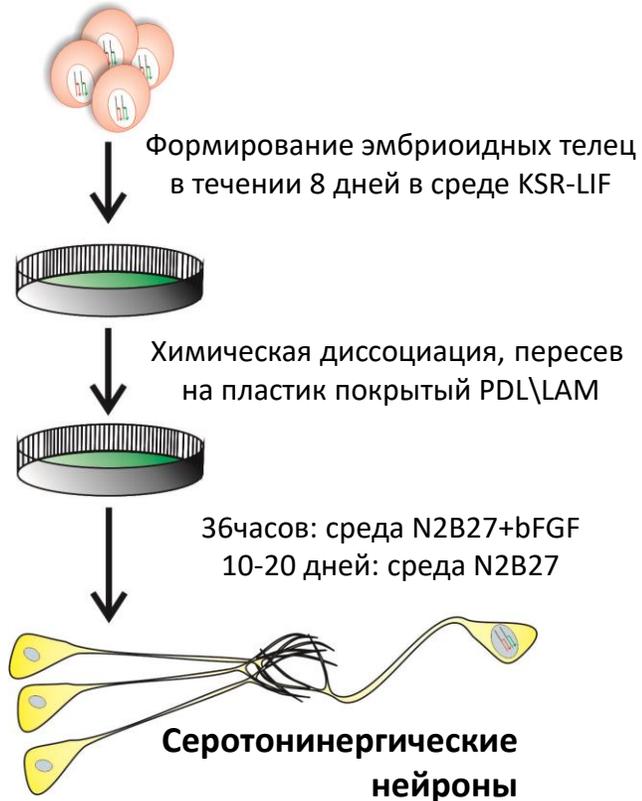
4 линии (iTEN404, 405, 403, 402)
заморожены для дальнейших работ



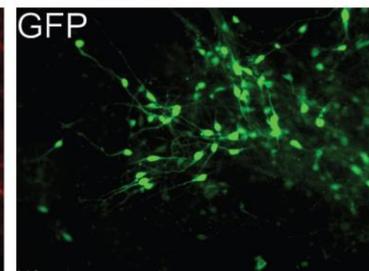
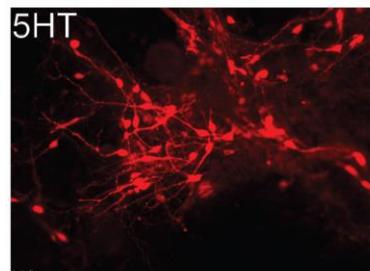
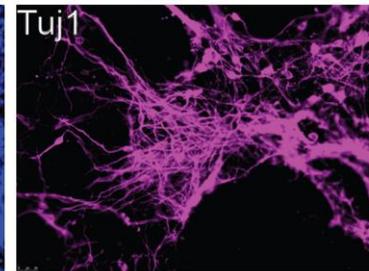
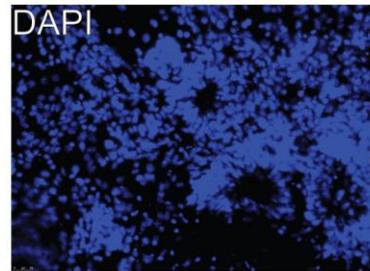
Получение серотонинергических нейронов из фибробластов путем дифференцировки ИПС клеток

2. Направленная дифференцировка ЭСК линии iTEN404 в серотонинергические нейроны

ИПС клетки линии iTEN404

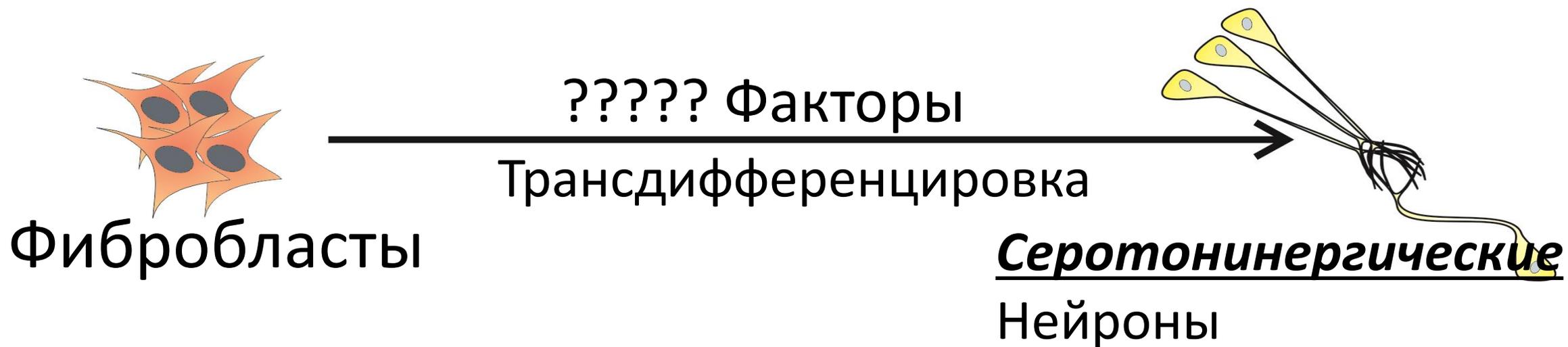


ИПС клетки линии iTEN404 спустя 2 (слева) или 6 (справа) дней после начала формирования эмбрионных телц



Иммуноцитохимическое окрашивание полученных в ходе дифференцировки нейронов на маркер нейрональных клеток (Tuj1) и серотонин (5HT). Видно, что сигнал 5HT совпадает с эндогенным свечением GFP

Получение серотонинергических нейронов из фибробластов путем дифференцировки ИПС клеток



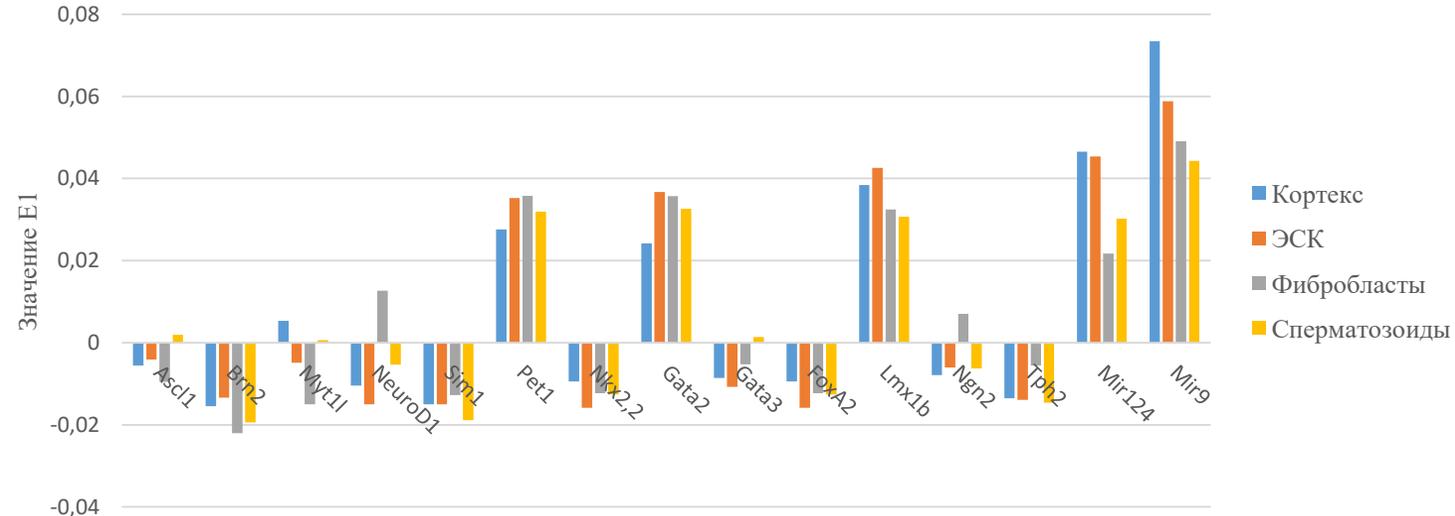
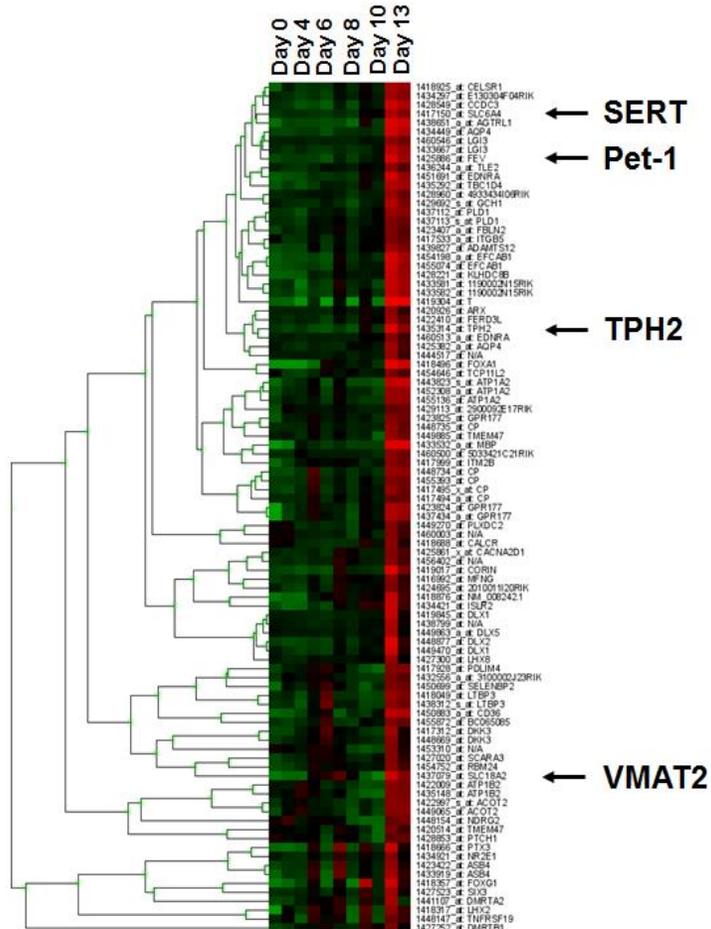
Выбор набора генов-кандидатов, способных осуществить прямую конверсию фибробластов в серотонинергические нейроны

Гены кандидаты:

Из данных микро-чипового анализа экспрессии:
Gata2, Gata3, Nkx2.2, Sim1, FoxA2, Pet1, Itm2b, Lmx1b

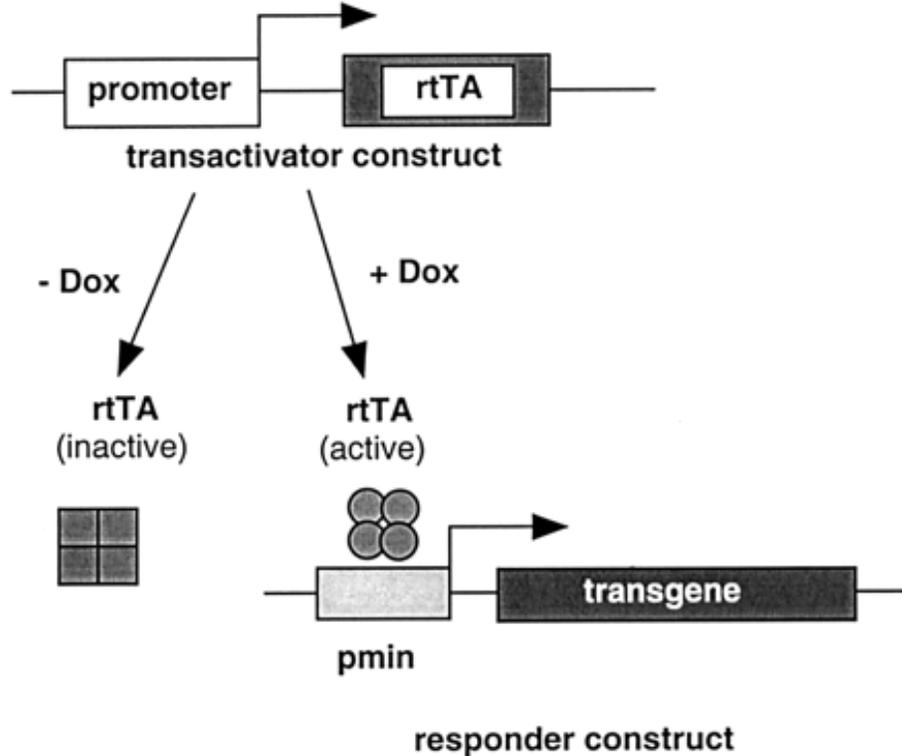
Из данных экспериментов по прямой конверсии фибробластов в нейрональные клетки:
Ascl1, Brn2, Myt1l, NeuroD1, Ngn2 и микроРНК 9,124

Ascl1, Brn2, Myt1l, NeuroD1, Ngn2 и микроРНК 9,124

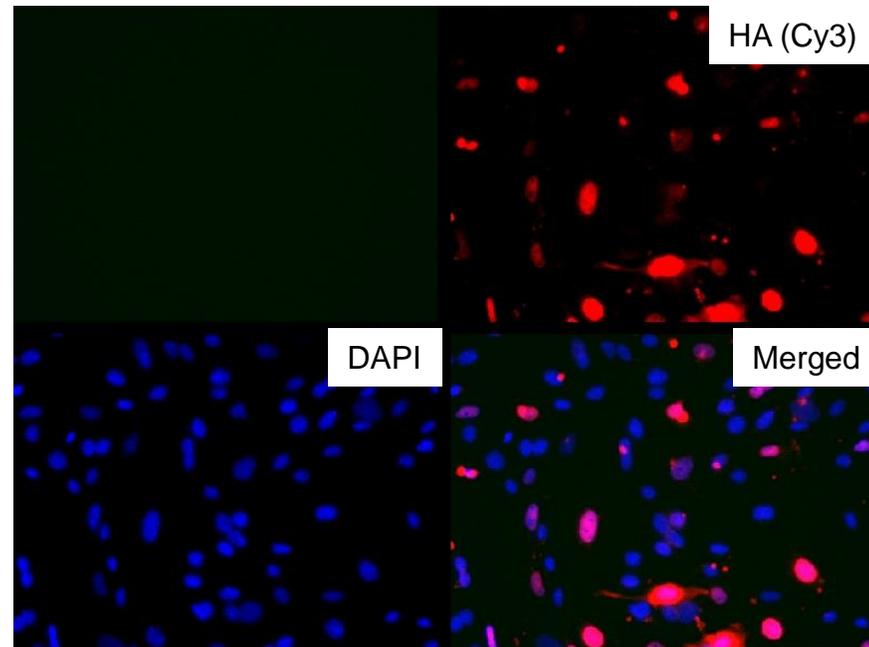
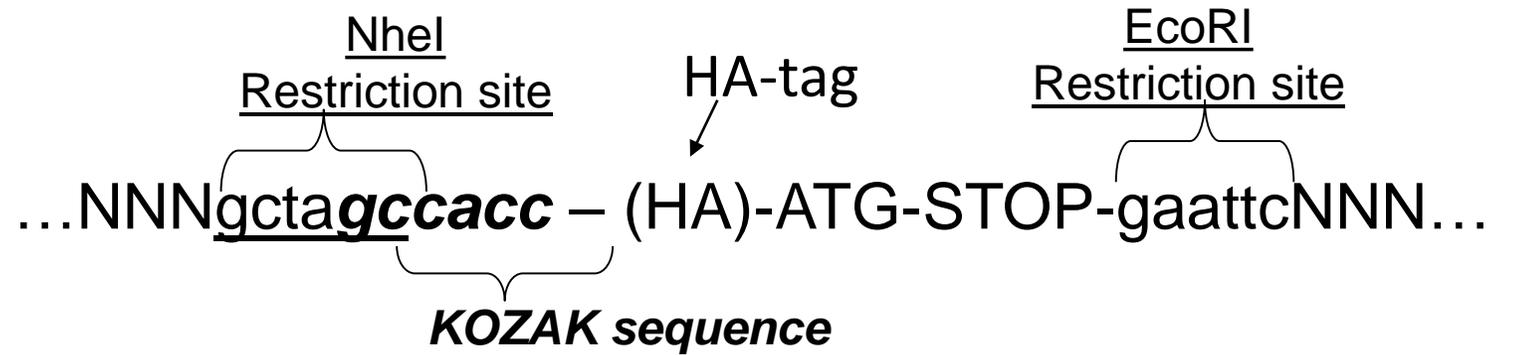


Клонирование выбранных факторов и наработка вирусных конструкций

DOX-индуцибельная система FUW



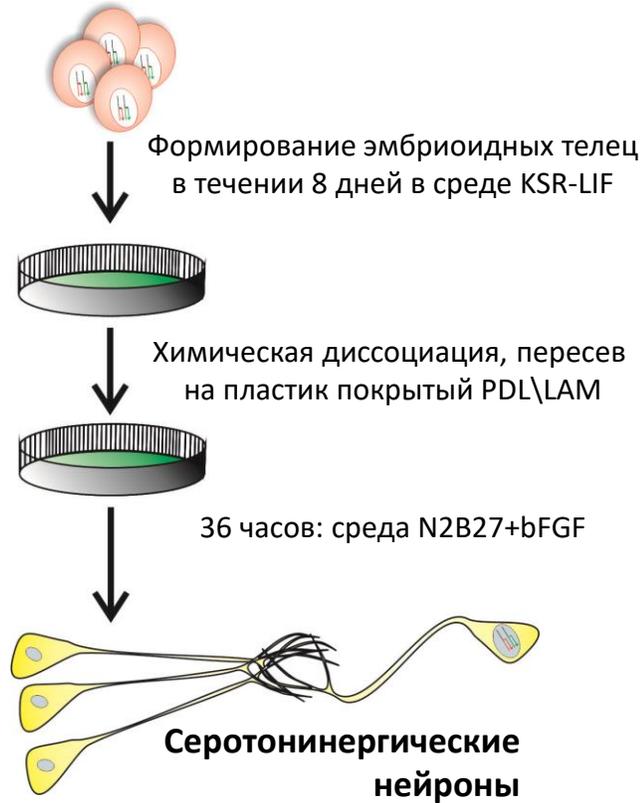
Puttini et al, 2000



Титрование
вирусов,
несущих HA-tag

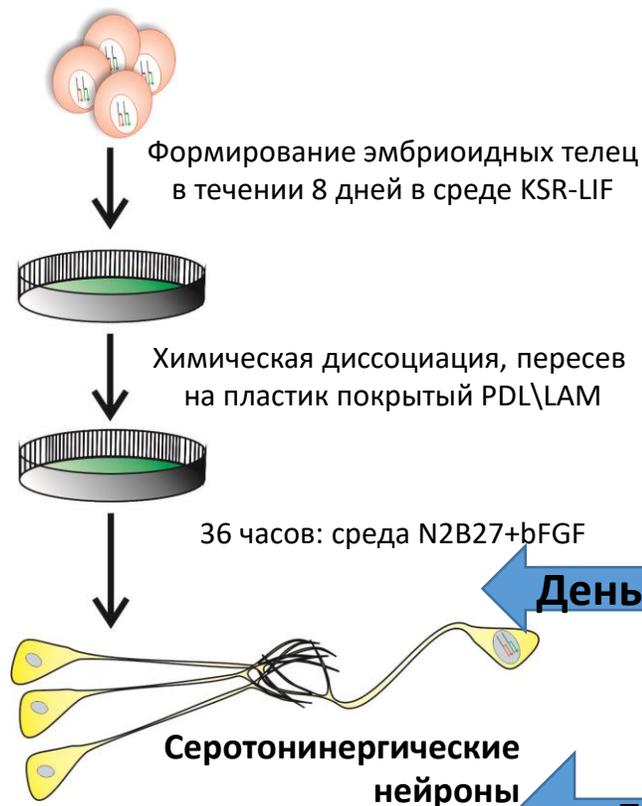
Оценка эффектов выбранных генов в экспериментах по дифференцировке ИПС клеток в серотонинергические нейроны

ИПС клетки линии iTEN404



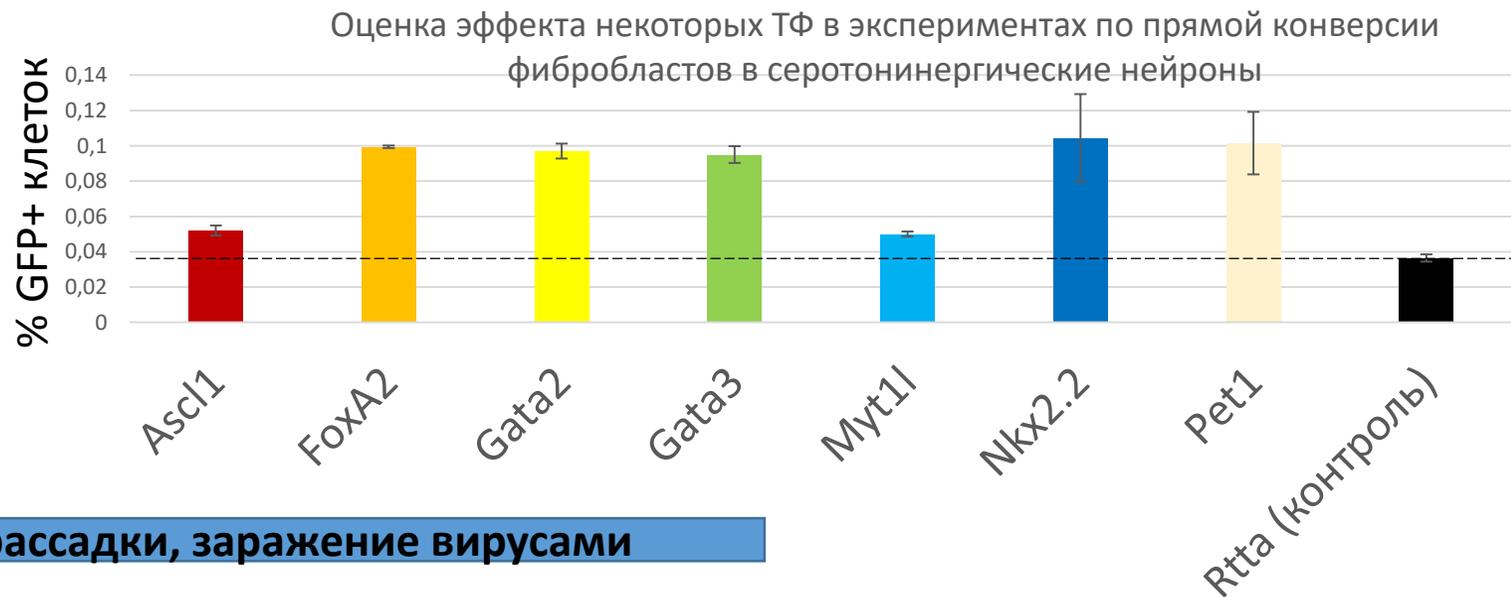
Оценка эффектов выбранных генов в экспериментах по дифференцировке ИПС клеток в серотонинергические нейроны

ИПС клетки линии iTEN404

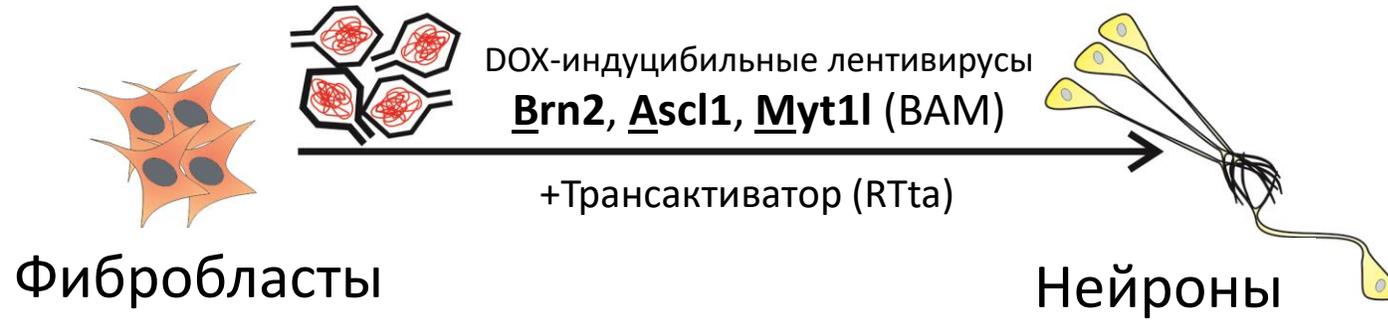


← День 1 после рассадки, заражение вирусами

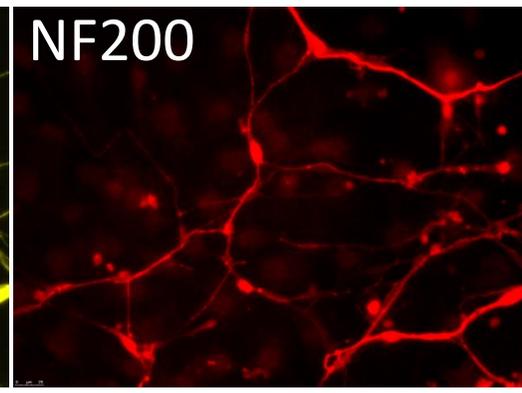
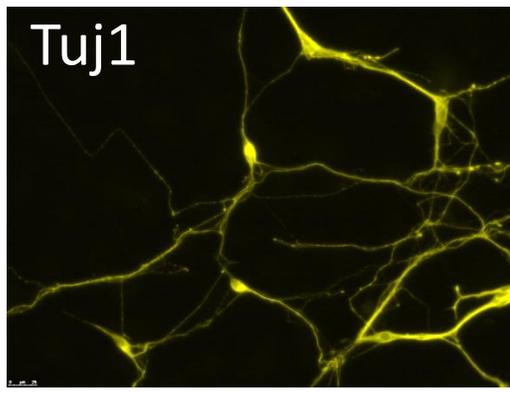
← День 14 после рассадки, FACS анализ количества серотонинергических нейронов



Прямая конверсия фибробластов в нейрональные клетки



День 19
Клетки, зараженные
вирусом



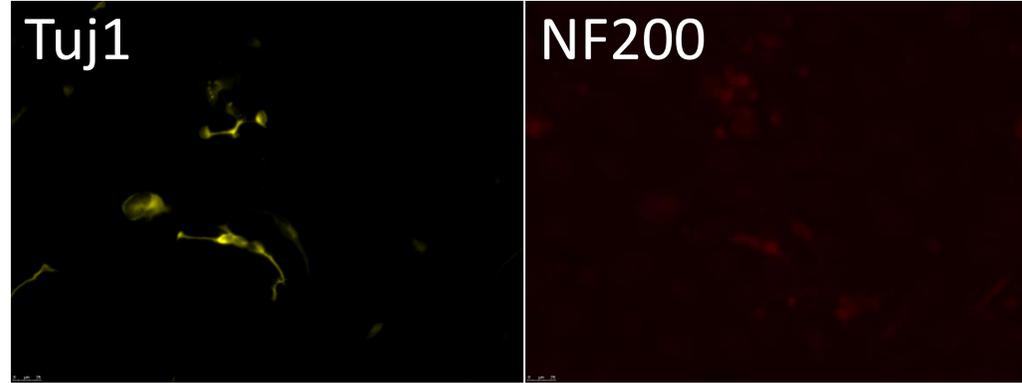
День 19
Контрольные клетки



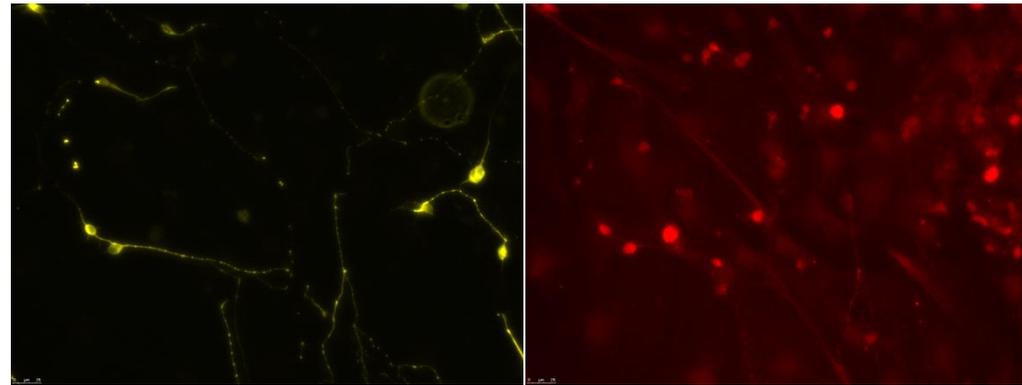
Прямая конверсия фибробластов в нейрональные клетки

День после заражения вирусом

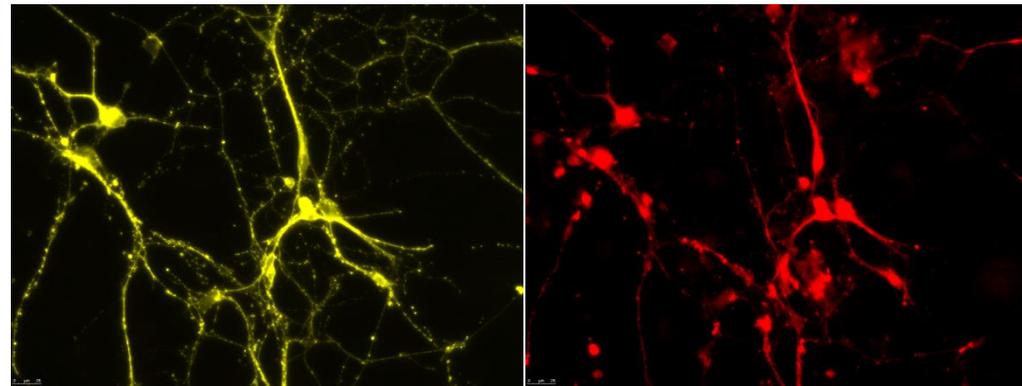
День 5



День 9



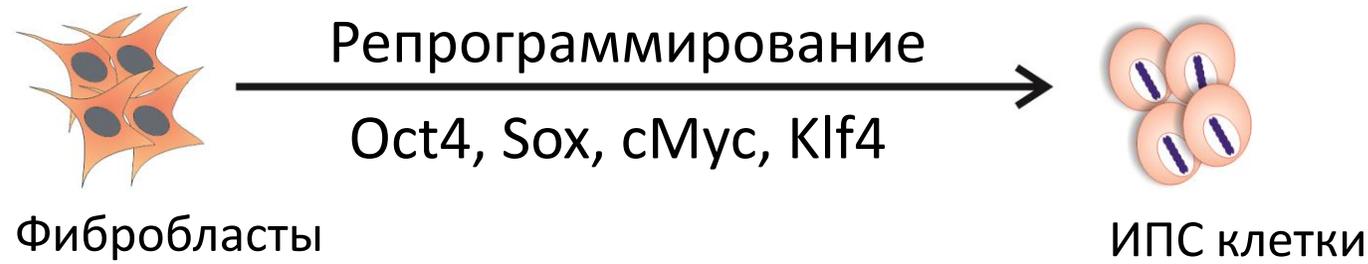
День 13



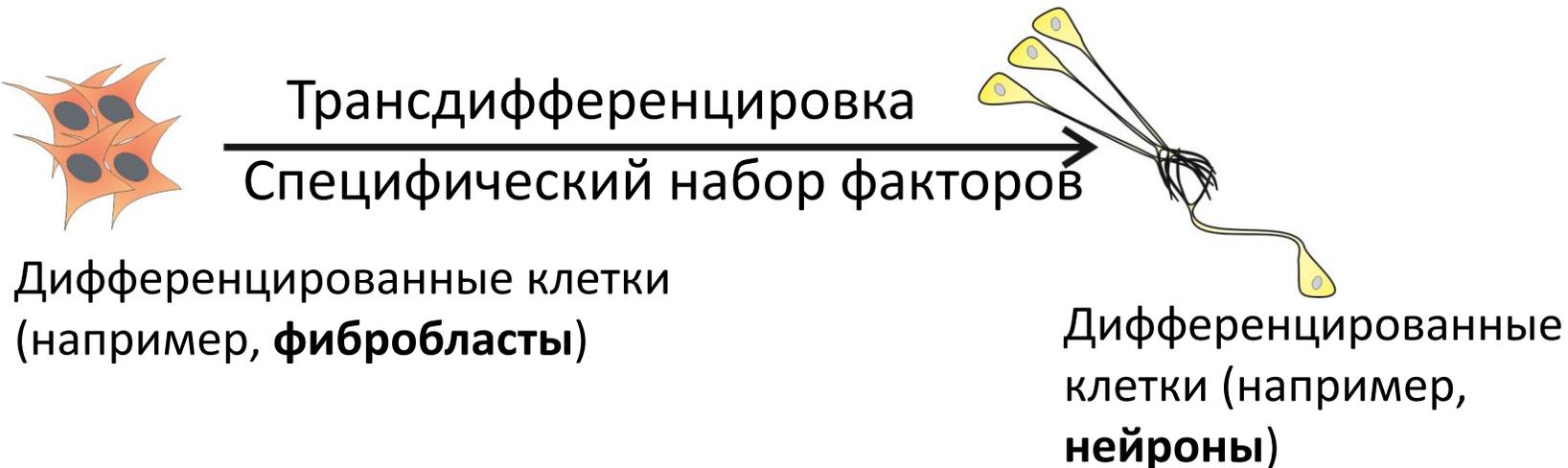
Прямая конверсия фибробластов в нейрональные клетки



Изучение роли клеточного деления в процессе прямой конверсия фибробластов в нейрональные клетки

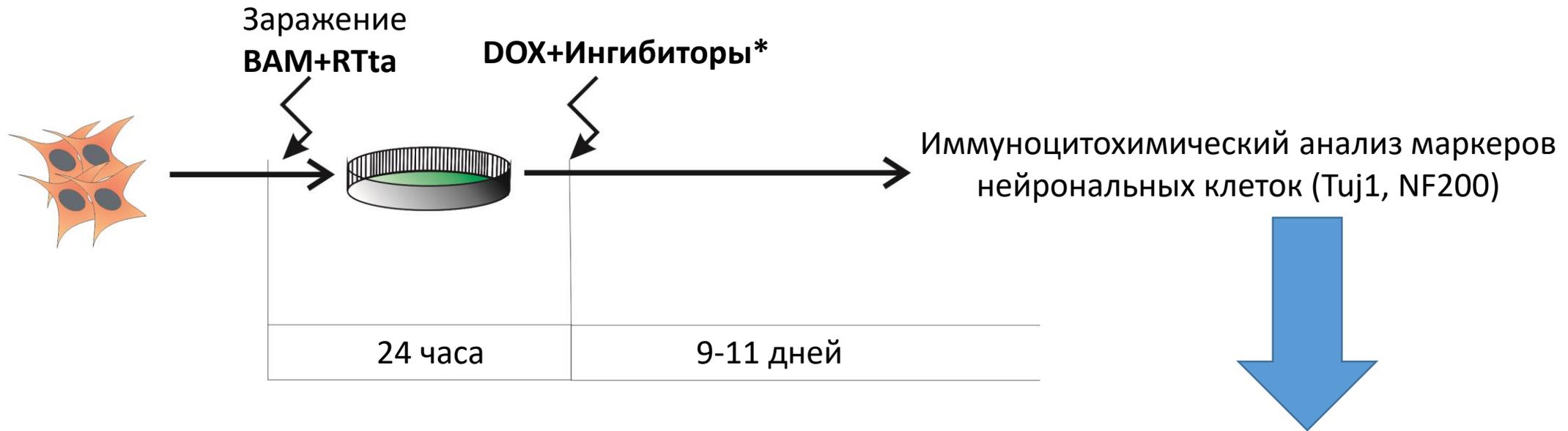


- Медленно
- Малоэффективно
- **Необходимы** клеточные деления

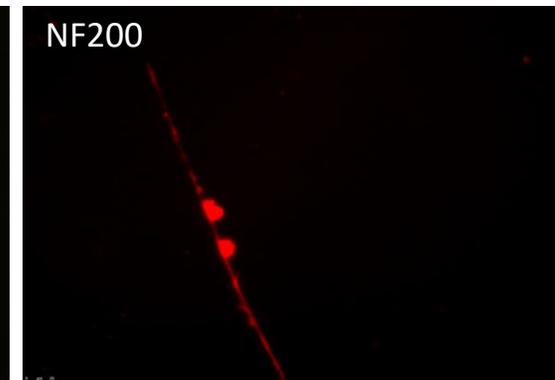
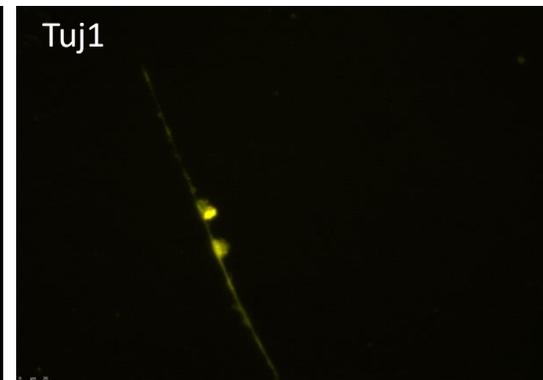
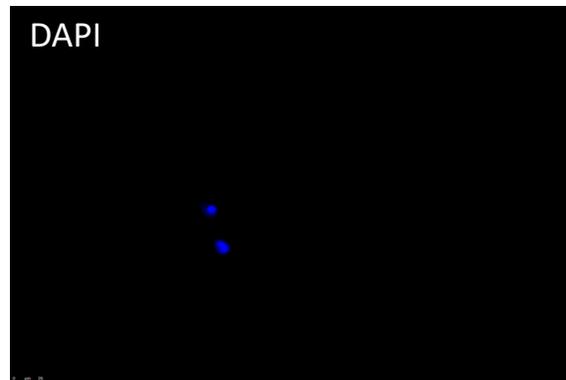


- Быстро
- Высокоэффективно
- **Без** клеточных делений???

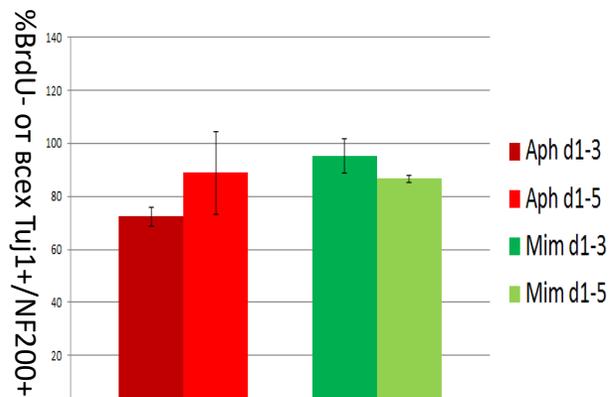
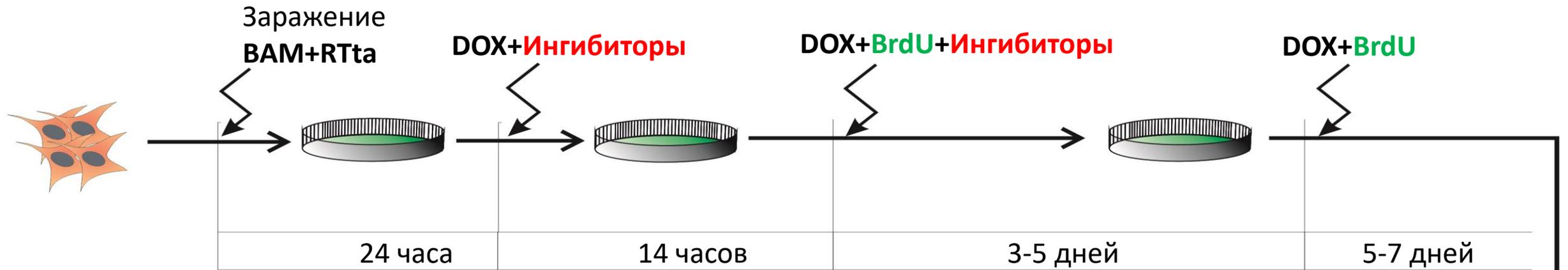
Изучение роли клеточного деления в процессе прямой конверсия фибробластов в нейрональные клетки



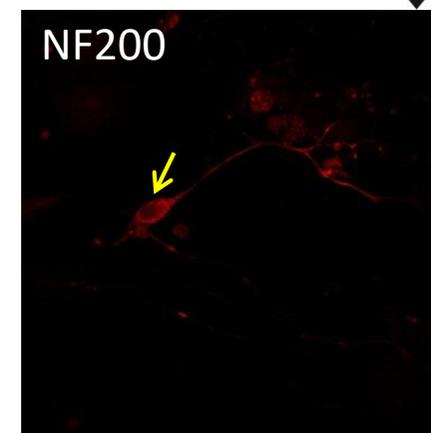
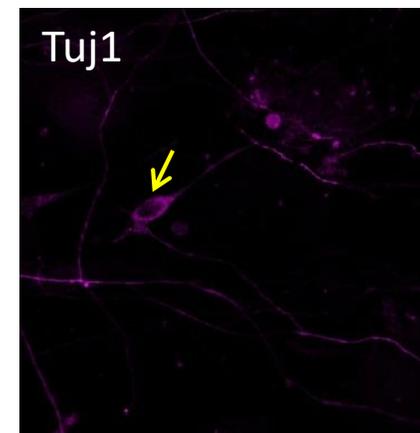
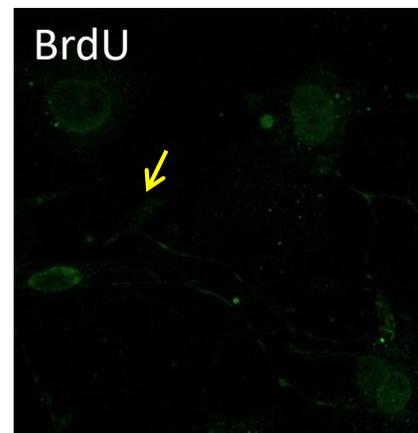
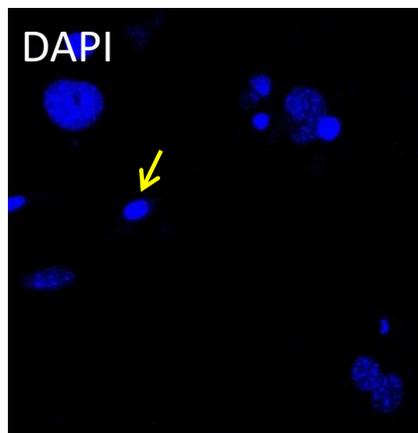
* - В качестве ингибиторов клеточного деления использовались **МИМОЗИН** и **афидиколин**. На рисунке показан иммуноцитохимический анализ маркеров нейрональных клеток (Tuj1, NF200) спустя 10 дней после инфекции при культивировании в присутствии афидиколина



Изучение роли клеточного деления в процессе прямой конверсия фибробластов в нейрональные клетки



Процент BrdU-негативных нейрональных клеток полученных в эксперименте по прямой конверсии фибробластов



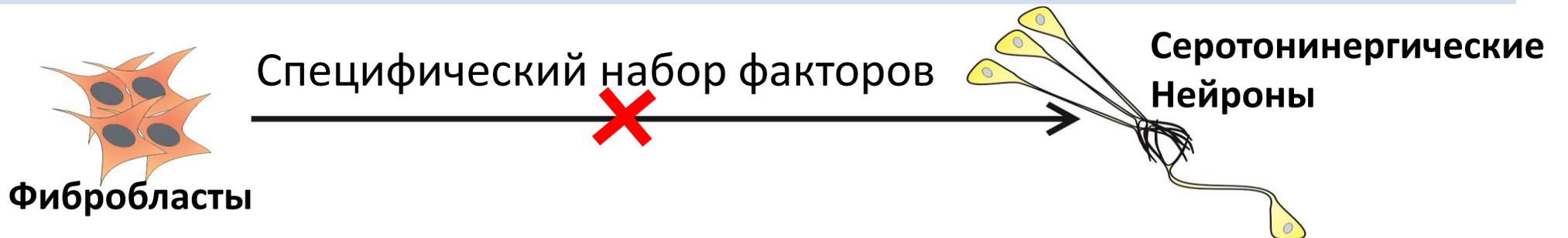
Иммуноцитохимический анализ маркеров нейрональных клеток (Tuj1, NF200) и маркер клеточного деления (BrdU) спустя 10 дней после инфекции при культивировании в присутствии афидиколина (5 дней)

Прямая конверсия фибробластов в нейрональные клетки



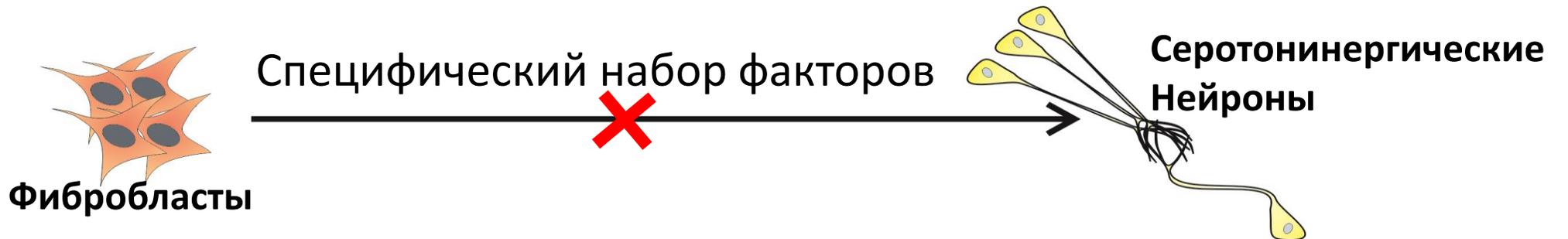
Прямая конверсия фибробластов в серотонинергические нейроны

Имя набора	Факторы
ВММ	Ascl1, Brn2, Myt1l
3F	Ascl1, Gata2, FoxA2
6F	Ascl1, Brn2, Myt1l, Pet1, Gata2, mLmx1b
7F	Ascl1, Brn2, Myt1l, Gata3, Gata2, mLmx1b, Nkx2.2
9F_E1	Ascl1, Brn2, Myt1l, NeuroD1, Sim1, Nkx2.2, Gata3, FoxA2, Ngn2
12F	Ascl1, Brn2, Myt1l, Gata3, Gata2, mLmx1b, Nkx2.2, NeuroD1, Sim1, Pet1, Ngn2, FoxA2
15F	Ascl1, Brn2, Myt1l, Gata3, Gata2, mLmx1b, Nkx2.2, NeuroD1, Sim1, Pet1, Ngn2, FoxA2, mir9/9*-124, Itm2b



Прямая конверсия фибробластов в серотонинергические нейроны

Имя набора	Факторы
15F_EPIGEN	15F + VPA + 5AZA
15F_GF	15F + SHH + NOGGIN + CHIR99021
15F_GF2	15F + SHH + FGF2



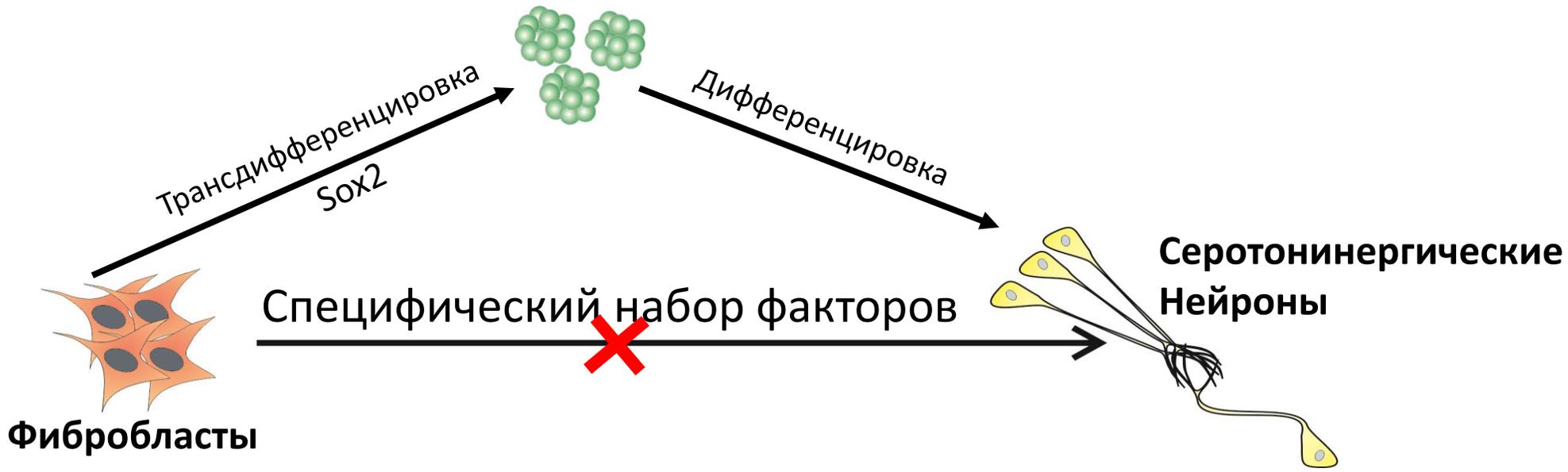
Прямая конверсия фибробластов в серотонинергические нейроны

Cell Stem Cell

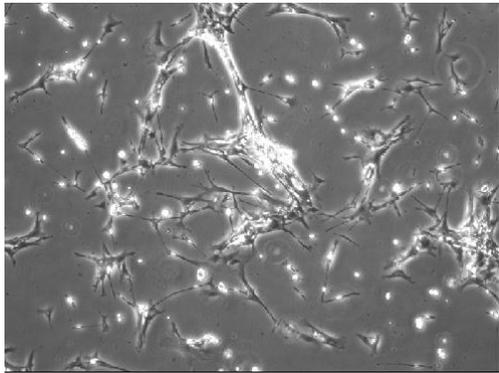
Short Article

Direct Reprogramming of Mouse and Human Fibroblasts into Multipotent Neural Stem Cells with a Single Factor

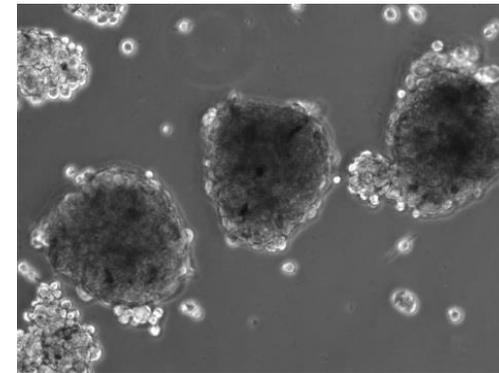
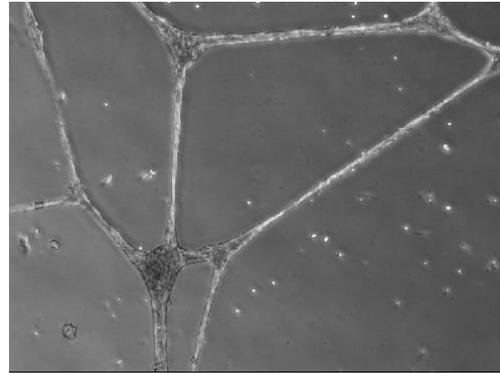
Karen L. Ring,^{1,3} Leslie M. Tong,^{1,3} Maureen E. Balestra,^{1,2} Robyn Javier,^{1,3} Yaisa Andrews-Zwilling,^{1,4} Gang Li,¹ David Walker,^{1,2} William R. Zhang,¹ Anatol C. Kreitzer,^{1,3,4} and Yadong Huang^{1,2,3,4,5,*}



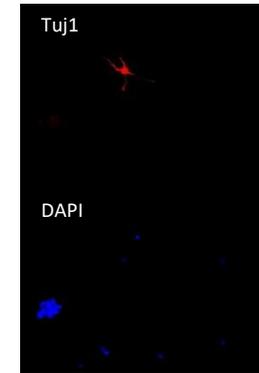
Прямая конверсия фибробластов в серотонинергические нейроны



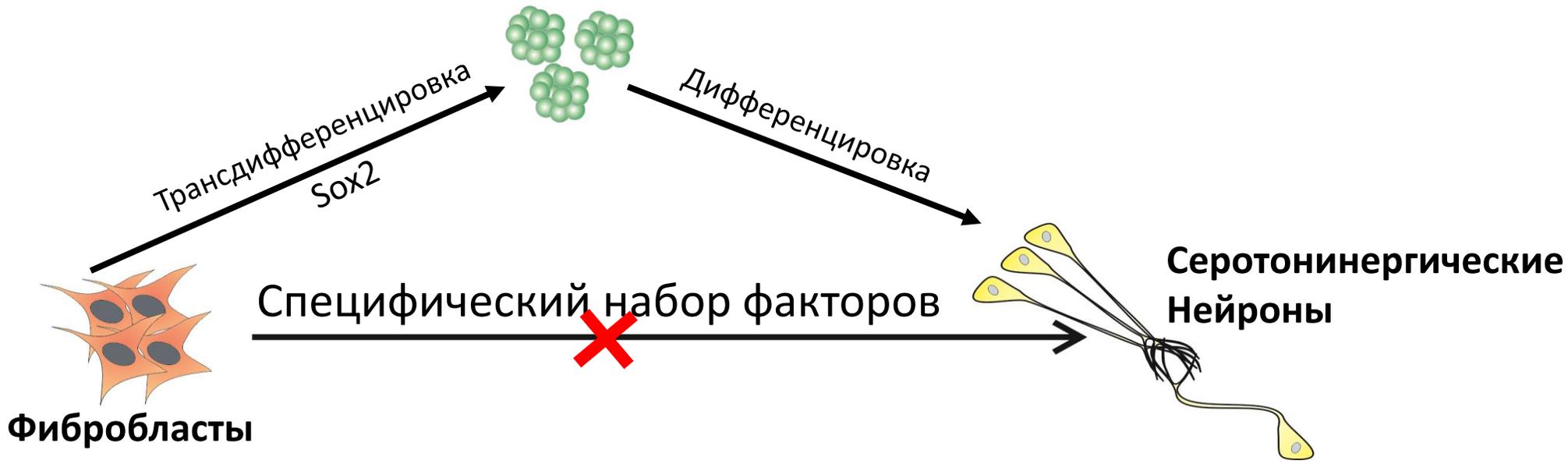
Фибробласты спустя **8 дней** после инфекции вирусом несущим ген Sox2



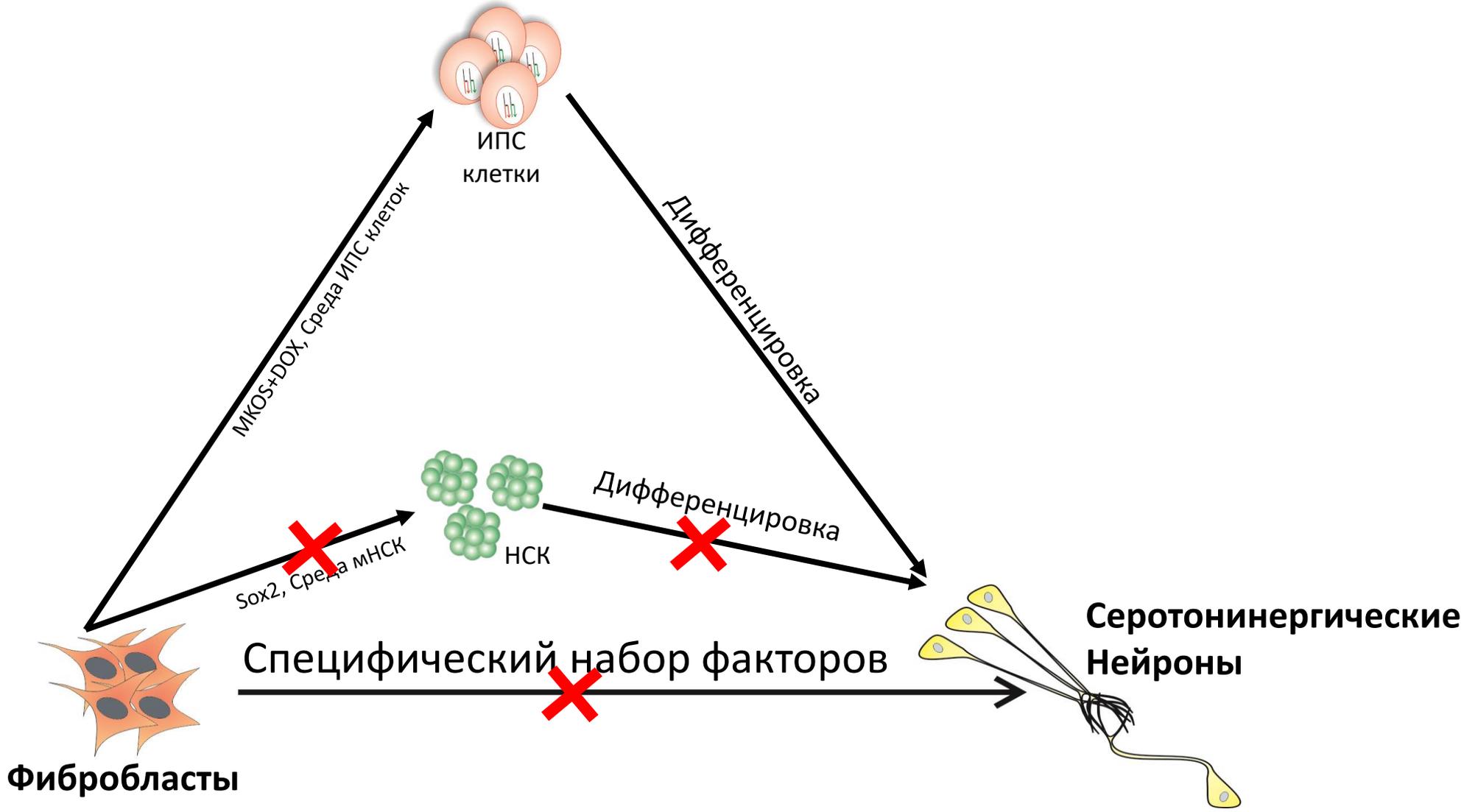
Культура клеток inTEN, спустя **30 дней** после инфекции вирусом несущим ген Sox2



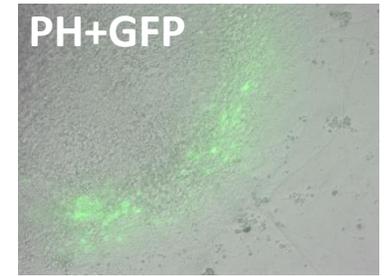
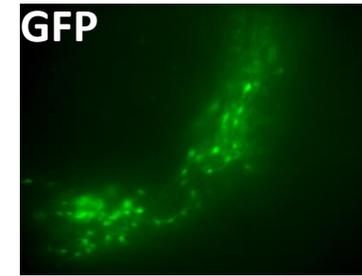
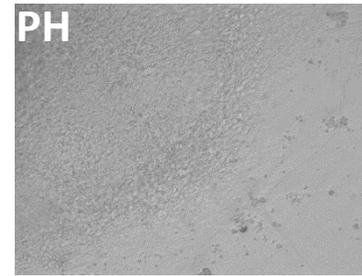
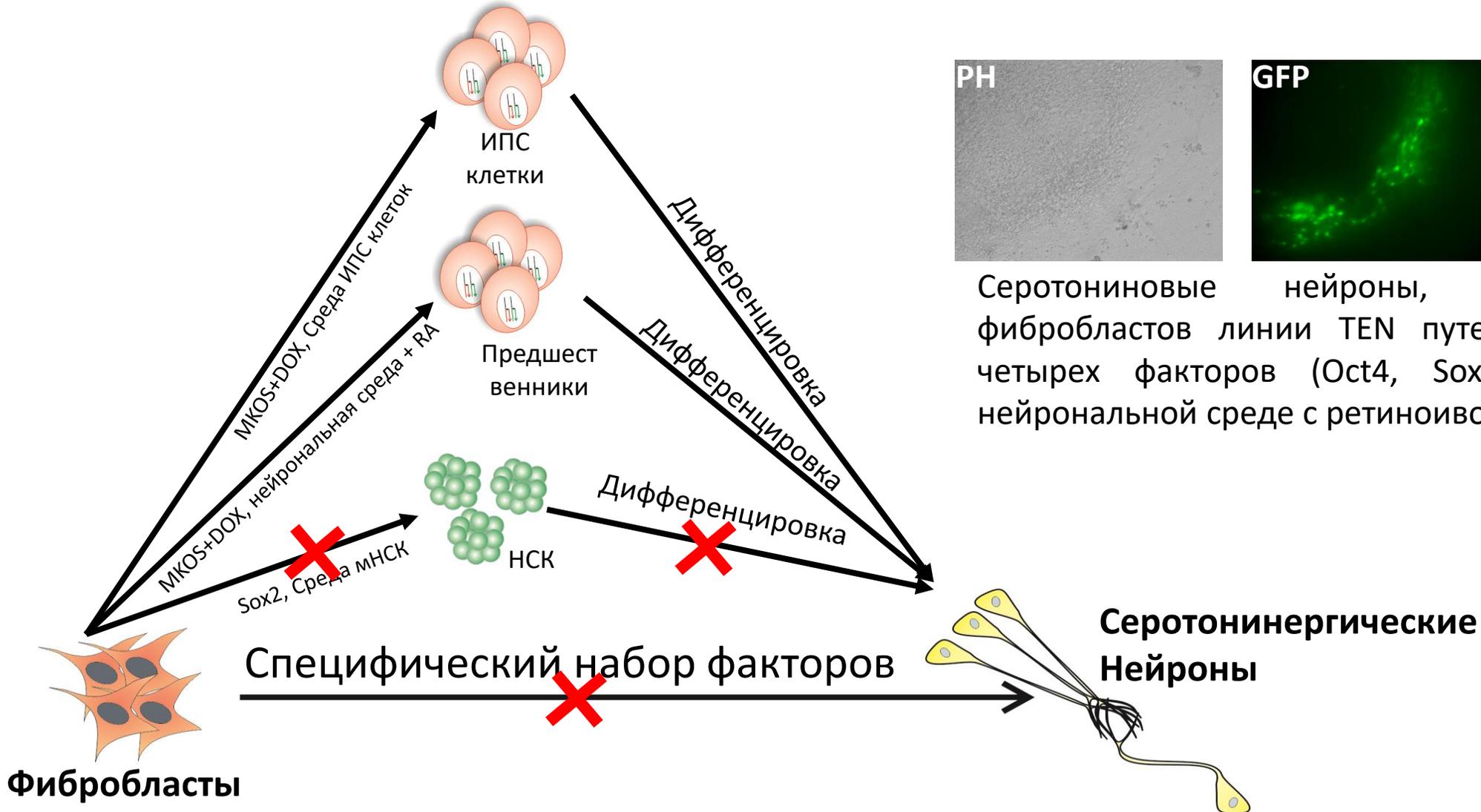
Иммуноцитохимический анализ маркеров нейрональных клеток в дифференцированных дериватах клеток линии inTEN



Прямая конверсия фибробластов в серотонинергические нейроны



Прямая конверсия фибробластов в серотонинергические нейроны



Серотониновые нейроны, полученные из фибробластов линии TEN путем сверхэкспрессии четырех факторов (Oct4, Sox2, cMyc, Klf4) в нейрональной среде с ретиноевой кислотой без LIF

Выводы

1. С помощью экзогенной экспрессии 4-х транскрипционных факторов: *Oct4*, *Sox2*, *cMyc* и *Klf4*, получено 10 линий ИПС клеток iТЕН из эмбриональных фибробластов мыши ТЕН, несущих репортёрную конструкцию GFP под эндогенным промотором гена *Trh2*. Показана экспрессия маркеров плюрипотентности *Oct4* и *Nanog* в клоне iТЕН404 и его способность к формированию эмбриоидных телец (ЭТ). Используя протокол дифференцировки посредством ЭТ, из клеток линии iТЕН404 были получены β TubulinIII-позитивные нейроны. среди которых идентифицированы GFP-позитивные клетки продуцирующие серотонин.

2. На основе данных микрочипового анализа экспрессии генов при дифференцировке ЭСК и литературных данных, мы выбрали 15 генов-кандидатов, потенциально способных осуществить прямую конверсию фибробластов мыши в серотонинергические нейроны. Последовательности отобранных 13 транскрипционных факторов и 2 микроРНК были клонированы в плазмидные вектора, на основе которых были созданы псевдолентивирусные конструкции. Анализ пространственной организации доменов ДНК показал, что 9 из 15 локализуются в доменах с отрицательными значениями собственного вектора E1, как и ген *Trh2*.

Выводы

3. Экзогенная экспрессия транскрипционных факторов FoxA2, Gata2, Gata3, Nkx2.2 и Pet1 в ходе дифференцировки клеток линии iTEN404 вызывает более чем двукратному увеличению выхода серотонинергических нейронов.
4. В экспериментах по экзогенной экспрессии 15 отобранных генов в эмбриональных фибробластах мыши не наблюдалась формирование серотонинергических нейронов.
5. Экзогенная экспрессия транскрипционного фактора Sox2 в фибробластах TEN, несущих репортерный ген GFP под контролем промотора Trh2, вызывает образование нейросферно-подобных структур - сходных по морфологии с нейрональными клетками-предшественниками. Полученные нейросферные структуры образовывали при дифференцировке *in vitro* β TubulinIII-позитивные клетки, но не GFP-позитивные серотонинергические нейроны. Более того, экзогенная экспрессия 15-ти отобранных ранее генов при дифференцировке нейросферных структур не сопровождалась появлением серотонинергических нейронов.

Выводы

6. 18-ти-дневная экзогенная экспрессия *Oct4*, *Sox2*, *cMyc* и *Klf4* в эмбриональных фибробластах TEN, при культивировании их в нейрональной среде с добавлением ретиноевой кислоты, индуцирует конверсию фибробластов в серотонинергические нейроны.
7. Прямая конверсии фибробластов мыши в нейрональные клетки может проходить в присутствии ингибиторов клеточных делений. При этом более чем в 75% случаев образование *bTubulinIII*- *NF200*-позитивных нейрональных клеток из фибробластов не сопровождается клеточным делением. Таким образом, клеточное деление не является необходимым для прямой конверсии фибробластов в нейрональные клетки

Публикации по теме диссертации

Выпущенные:

1. Battulin N.R., Pristyazhnyuk I.E., Matveeva N.M., **Fishman V.S.**, Vasilkova A.A., Serov O.L Allelic expression and DNA methylation profiles of promoters at the parental *Oct4* and *Nanog* genes in *Mus musculus* ES cell/*Mus caroli* splenocyte hybrid cells. // Cell Tissue Res. 2009 V.337 P. 439-448.
2. N.R. Battulin, **V.S. Fishman**, Yu.L. Orlov, A.G. Menzorov, D.A. Afonnikov, O.L. Serov 3C-BASED METHODS FOR 3D GENOME ORGANIZATION ANALYSIS. // Vavilov journal of genetics and breeding, 2012, V 16, № 4/2, p 872-878.
3. Баттулин Н.Р., **Фишман В.С.**, Хабарова А.А., Помазной М.Ю., Афонников Д.А., Серов О.Л. Методика получения библиотеки взаимодействующих районов генома соматических и половых клеток для исследования пространственной организации генома // ВОГиС, 2013
4. Т. Шнайдер, **В. Фишман**, М. Лисковых, С. Понамарцев, О. Серов, А. Томилин, Н. Аленина. Репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные и нейрональные типы клеток // Цитология, 2014

Публикации по теме диссертации

Готовятся к публикации:

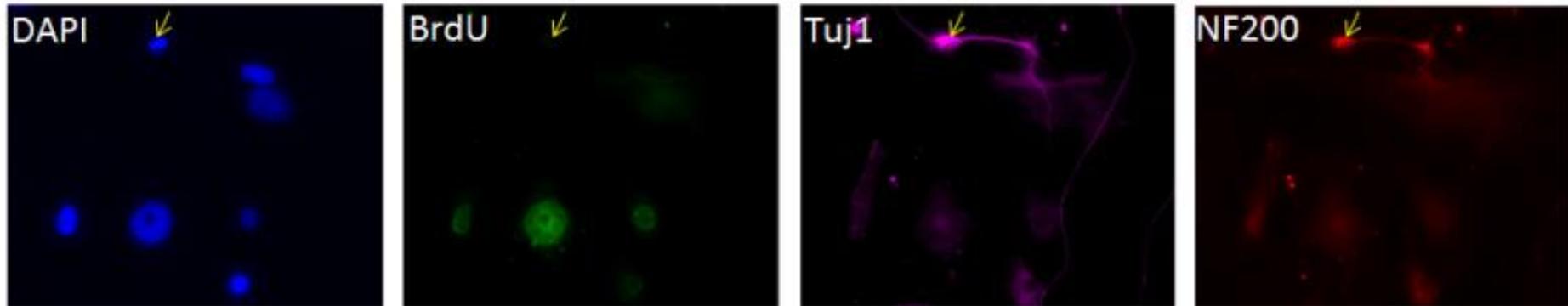
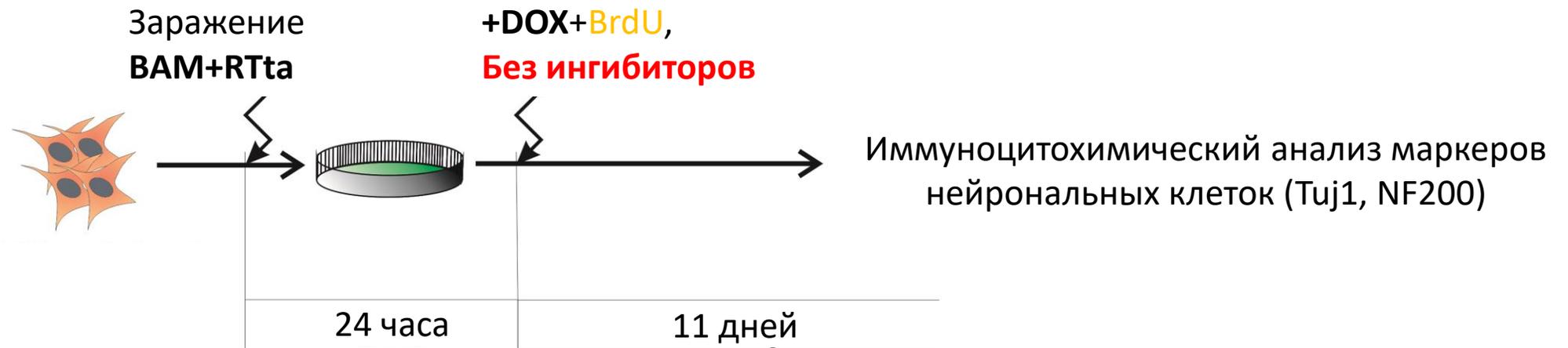
1. CELL DIVISIONS ARE NOT ESSENTIAL FOR THE DIRECT CONVERSION OF FIBROBLASTS INTO NEURONAL CELLS
2. Comparison of the 3D-organization of sperm and fibroblast genomes by Hi-C approach

Публикации не относящиеся к теме диссертации:

1. Alenina, N, **Fishman, V**, Popova, E, Mosienko, V, Charpak, S, Kasparov, S, Bader, M. Brain endothelium specific reporter: a novel rat model based on ectopic transgene expression // TRANSGENIC RESEARCH, 2013, V 22, I1, P236-237

Также опубликованы тезисы на 13 конференциях, из них 3 на зарубежных

Изучение роли клеточного деления в процессе прямой конверсия фибробластов в нейрональные клетки

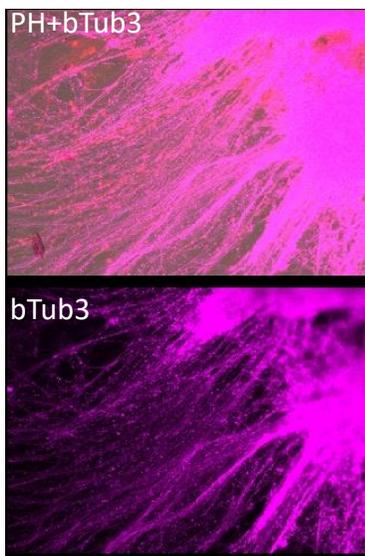


Культивирование в среде с BrdU, 11 дней

Выбор системы *in vitro* детекции нейрональных клеток

Системы *in vitro* детекции определенных типов клеток

Иммуноцитохимическое окрашивание на нейрональные маркеры



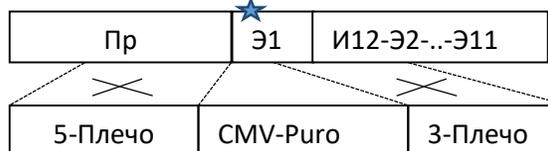
ИПС клетки линии iTEN404 дифференцированы в нейроны и окрашены на маркер bTub3

Создание новых клеточных линий, несущих репортерные конструкции под эндогенными тканеспецифичными промоторами

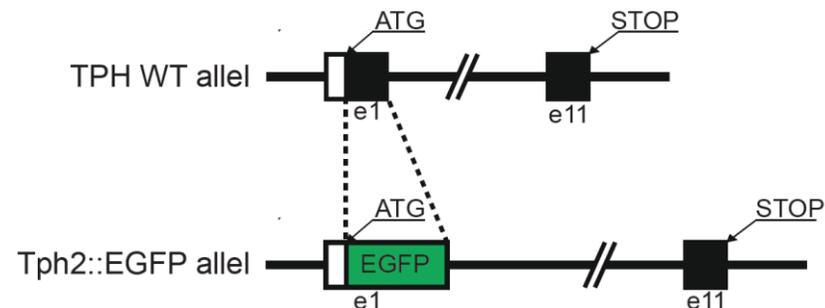
Технология TALEN

Эндогенный аллель *Tph2*

pHR_CVM-Puro



Использование клеточных линий, несущих репортерные конструкции под эндогенными тканеспецифичными промоторами

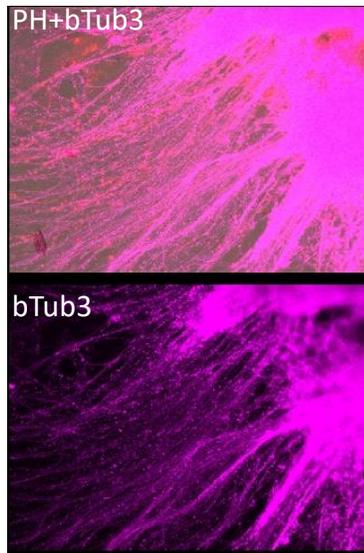


Migliarini et al., 2013

Выбор системы *in vitro* детекции нейрональных клеток

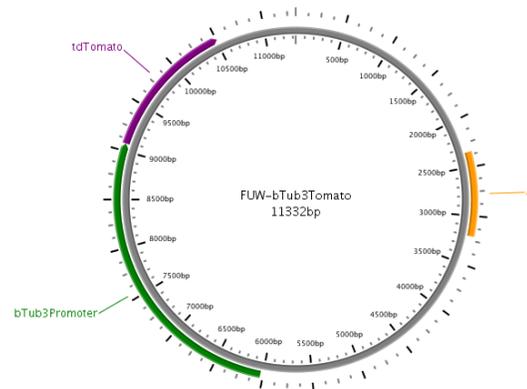
Системы *in vitro* детекции определенных типов клеток

Иммуноцитохимическое окрашивание на нейрональные маркеры

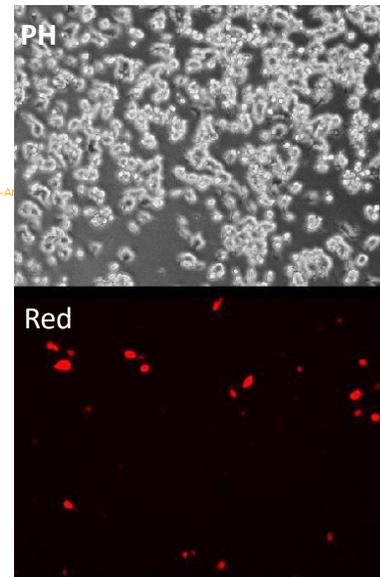


ИПС клетки линии iTEN404 дифференцированы в нейроны и окрашены на маркер bTub3

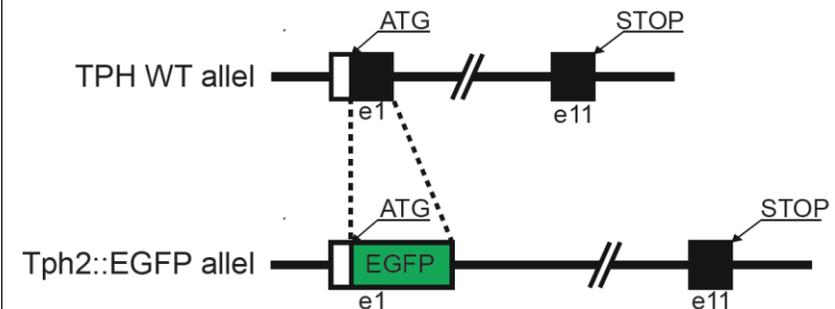
Экзогенное введение репортерных конструкций под тканеспецифическими промоторами



Клетки линии PC12 трансфицированы конструкцией bTub3Pr-Tomato



Использование клеточных линий, несущих репортерные конструкции под эндогенными тканеспецифическими промоторами



Организация локуса Trp2 у мышей линии TEN (Migliarini et al., 2013)