

**Юнусова Анастасия Маратовна**

**НАСЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ К  
РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ В ИНДУЦИРОВАННЫЕ  
ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории генетики развития, г. Новосибирск

**Научный**

**руководитель**

**Баттулин Нариман Рашитович**

к.б.н., заведующий лабораторией генетики развития

**Официальные**

**оппоненты**

**Гуляева Людмила Федоровна**

д.б.н., проф., заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики СО РАН, г. Новосибирск

**Кулемзин Сергей Викторович**

к.б.н., с.н.с. лаборатории иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

**Ведущее учреждение:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. на утреннем заседании диссертационного совета на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090, тел +7 (383) 3634906, факс +7(383) 3331278.

e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: [www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) представляют собой не только прекрасную модель для изучения процессов, происходящих в раннем эмбриогенезе, но и считаются наиболее перспективным источником пациент-специфичных клеток для тканезаместительной терапии. Однако, несмотря на настоящий шквал работ, многие фундаментальные основы индукции плюрипотентности остаются неустановленными. Так, эффективность получения индуцированных плюрипотентных клеток крайне низка – только малая часть клеток исходной популяции способна образовать плюрипотентного потомка. Кроме того, время, необходимое для полного репрограммирования сильно варьирует даже для клеток одной линии (Hanna et al. 2009).

Для объяснения этих явлений были предложены две альтернативные модели: стохастическая и элитарная (Hanna et al., 2009, Yamanaka & Blau, 2010). Стохастическая модель предполагает, что способность к репрограммированию – случайное событие, независимо возникающее в каждой клетке после деления. Таким образом, все клетки имеют возможность репрограммироваться, причем с равной вероятностью. Однако, предсказать, когда, и произойдет ли вообще полное репрограммирование клетки невозможно. Согласно же элитарной модели, в исходной клеточной популяции присутствует особая субпопуляция клеток, предрасположенная к репрограммированию. Предрасположенность в этом случае означает повышенную вероятность репрограммирования родственных клеток внутри элитарной субпопуляции. Изначально на роль элитарных клеток рассматривались соматические стволовые клетки. Однако, позднее в многочисленных экспериментах было показано, что статус дифференцировки не влияет на принципиальную возможность клетки образовать плюрипотентного потомка: ИПСК были получены из терминально-дифференцированных клеток: В-лимфоцитов, гепатоцитов, клеток поджелудочной железы и т.д. (Aoi et al. 2008, Stadtfeld et al. 2008, Hanna et al. 2008). Тем не менее, это не опровергает наличие у некоторых клеток предрасположенности к репрограммированию. На данный момент существуют работы, подтверждающие как первую (Hanna et al. 2009), так и вторую модель (Wakao et al. 2011; Guo et al. 2014), поэтому невозможно однозначно ответить на вопрос, как происходит репрограммирование клеток к плюрипотентному состоянию.

Для того, чтобы исследовать этот вопрос на уровне отдельных клеток, мы решили использовать метод ДНК-баркодирования. Баркодирование

представляет собой внесение в геном клетки уникальной метки – ДНК-баркода, последовательности случайных нуклеотидов. ДНК-баркоды интегрируются в геном клетки с помощью лентивирусов, и в виде провирусов наследуются в ходе делений (Naik, Schumacher, & Peri 2014). Таким образом, потомки одной клетки несут один и тот же ДНК-баркод и могут быть легко определены с помощью секвенирования. Данный метод позволяет проследить за судьбой потомков тысяч клеток в течение процесса репрограммирования.

**Целью данной работы** является изучение закономерностей распределения способности к репрограммированию в плюрипотентные стволовые клетки в популяции эмбриональных фибробластов мыши. Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Создать и охарактеризовать библиотеку ДНК-баркодированных лентивирусных векторов, подходящую для маркирования большой популяции клеток.
2. Провести эксперименты по репрограммированию баркодированных эмбриональных фибробластов мыши в плюрипотентные стволовые клетки.
3. Разработать компьютерную модель, позволяющую на основе частоты синхронного репрограммирования родственных клеток определить закономерности наследования способности к репрограммированию.

**Научная новизна работы.** Для изучения распределения способности к репрограммированию в популяции клеток впервые был использован метод ДНК-баркодирования. В отличие от других методов исследования судьбы отдельных клеток, описываемый метод позволяет маркировать и отслеживать тысячи клеток в ходе эксперимента. Важно отметить, что в данной работе впервые с помощью метода ДНК-баркодирования была маркирована большая клеточная популяция (до 200 000 клеток). Кроме того, была разработана компьютерная модель, позволяющая на основе экспериментальных данных и с учетом параметров баркодирования, определить уровень наследования способности к репрограммированию.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** С теоретической точки зрения, изучение закономерностей распределения способности к репрограммированию способствует расширению наших знаний в области клеточной биологии и регуляции клеточной судьбы. Выявление характеристик успешно репрограммирующихся клеток позволит сделать поиск факторов, увеличивающих эффективность репрограммирования, более осмысленным и продуктивным. Плюрипотентные стволовые клетки являются

уникальным объектом для исследования фундаментальных проблем биологии, связанных с основами плюрипотентности и регуляцией дифференциальной активности генов в процессе раннего развития млекопитающих. Заложенный в плюрипотентных стволовых клетках потенциал к дифференцировке позволяет использовать данные клетки в тканезаместительной терапии и скрининге лекарственных препаратов.

**Положение, выносимое на защиту:**

В популяции эмбриональных фибробластов мыши присутствуют клетки с имманентной предрасположенностью к репрограммированию, передающуюся дочерним клеткам в ходе делений.

**Вклад автора.** Автором самостоятельно получены все основные результаты. Компьютерная модель, позволяющая на основе экспериментальных параметров определять уровень наследуемости способности фибробластов к репрограммированию, была разработана совместно с В.С.Фишманом.

**Апробация работы.** Работа была представлена на пяти научных конференциях. По материалам работы опубликованы две статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 119 страницах, содержит 17 рисунков, 3 таблицы и 7 приложений, состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Материалы.** В работе были использованы эмбриональные фибробласты мыши (ЭФМ) линии OG2 (ген *Gfp* под контролем промотора *Oct4*), любезно предоставленные д.б.н., чл.-корр. РАН, проф. А.Н. Томилиным (Санкт-Петербург).

**Схема эксперимента.** Схема эксперимента представлена на Рис.1.

### 1. ТРАНСДУКЦИЯ

Контрансдукция ЭФМ доксициклин-индуцибельными лентивирусами, кодирующими репрограммирующие факторы и баркодированными лентивирусами.

На этом этапе ДНК-баркод интегрируется в геномную ДНК. Экспрессии репрограммирующих факторов еще нет.

### 2. УДВОЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Трансдуцированные клетки культивируются до тех пор, пока не достигнут удвоения клеточной популяции (24-48 часов).

### 3. РАССАДКА

Клетки в равном количестве рассаживаются на 4 чашки с фидерными клетками. На этом этапе происходит распределение дочерних клеток на разные чашки.

### 4. СТАРТ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ

Запуск экспрессии репрограммирующих факторов путем добавления доксициклина в культуральную среду. Клетки культивируются в присутствии доксициклина в течение недели.

### 5. СОРТИРОВКА

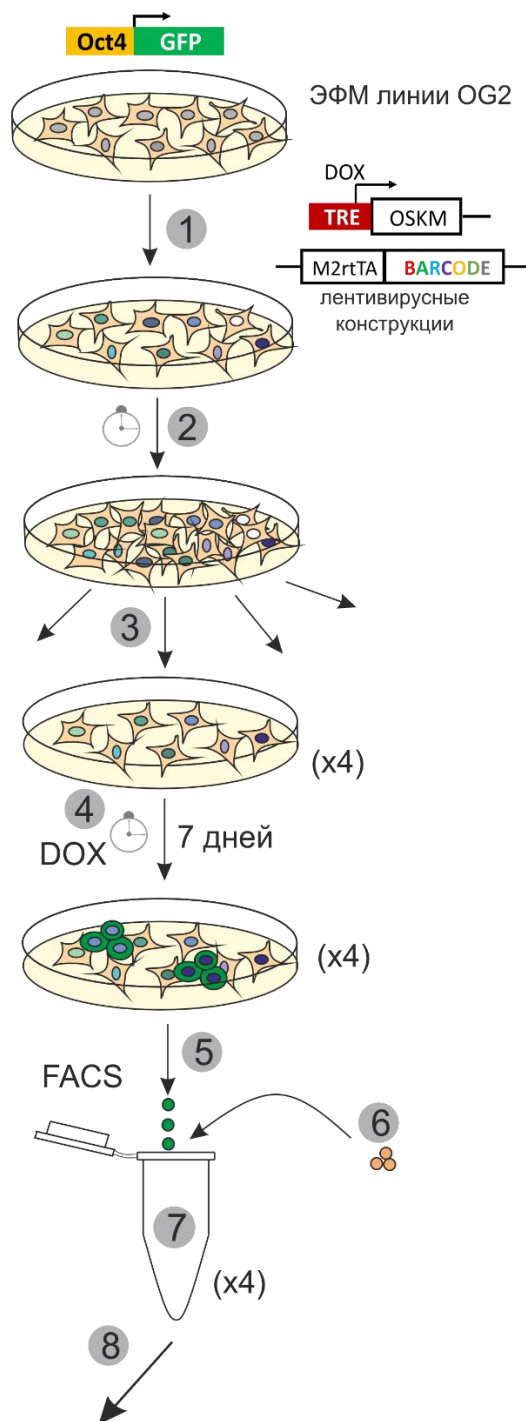
Репрограммированные клетки с каждой чашки отбираются на клеточном сортире (сортировка по GFP).

### 6. ДОБАВЛЕНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ КЛЕТОК

Определенное количество контрольных клеток с известными ДНК-баркодами добавляется в каждый образец с сортированными клетками.

### 7. АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК-БАРКОДОВ

Клетки лизируются, и все ДНК-баркоды амплифицируются при помощи ПЦР.



## 8. Секвенирование ДНК-баркодов на платформе Ion Torrent

Биоинформационная обработка ридов

Распределение ридов по принадлежности одной из 4-ех библиотек

Сравнение пересечений ДНК-баркодов

Рисунок 1. Схема эксперимента

Согласно схеме эксперимента, эмбриональные фибробласты мыши были ко-трансдуцированы двумя лентивирусными конструкциями, одна из которых содержит репрограммирующие факторы Яманаки (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc) под контролем доксициклин-индуцибельного промотора, а другая – индивидуальный 30-нуклеотидный ДНК-баркод и белок-трансактиватор. Именно этот трансактиватор при взаимодействии с доксициклином запускает экспрессию репрограммирующих факторов. Это позволяет нам контролировать экспрессию OSKM факторов добавлением доксициклина в культуральную среду. Клетки культивировались около двух суток до удвоения клеточной популяции, а затем были рассажены на 4 чашки, для того чтобы потомки одной клетки могли попасть в разные чашки. Затем, добавляя в среду доксициклин, мы запускали экспрессию репрограммирующих факторов. Таким образом, все баркодированные клетки вступали в процесс репрограммирования одновременно. После 7 дней индукции мы отбирали GFP-позитивные клетки, (GFP-индикатор репрограммирования), а их ДНК-баркоды секвенировали. Пересечение ДНК-баркодов с разных чашек свидетельствует о том, что потомки одной клетки попали на разные чашки и успешно репрограммировались. При этом, чем больше вероятность дочерних клеток получить способность к репрограммированию по наследству, тем большее количество пересечений ДНК-баркодов между чашками мы будем наблюдать.

**Массовое параллельное секвенирование ДНК-баркодов** проводилось на платформе Ion Torrent в секторе геномных исследований ИЦиГ СО РАН в соответствии со стандартными протоколами производителя.

**Биоинформационный анализ данных секвенирования** проводился с помощью алгоритмов на языке Python. С помощью программы cutadapt 1.3 были удалены последовательности, фланкирующие ДНК-баркод, а также риды, длина которых не соответствовала заданной. Риды с низким качеством прочтения (где 20% позиций имеют значение Phred ниже 20), были удалены. Оставшиеся риды были переведены в FASTA формат и кластеризованы по гомологии с помощью программы DNAClust с пороговым значением гомологии 80%. Кластеры, представленные одним ридом, были исключены из анализа.

**Вычислительные ресурсы:** Для запуска скриптов использовался вычислительный кластер Новосибирского Государственного Университета (<http://www.nusc.ru/>) под управлением ОС SUSE Linux Enterprise Server 11. Все скрипты были написаны на языке Python (версии 2.6 и 2.7) сотрудником лаборатории генетики развития В.С. Фишманом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Пилотный эксперимент по репрограммированию баркодированных фибробластов мышцы к плюрипотентному состоянию

В пилотном эксперименте, выполненном по описанной выше схеме, мы просеквенировали ДНК-баркоды GFP-позитивных клеток и провели биоинформационный анализ. Оказалось, что между чашками наблюдается значительное количество пересечений ДНК-баркодов. Мы предполагаем, что этот результат отражает события, когда потомки одной и той же клетки попали на разные чашки и синхронно репрограммировались. Доля ДНК-баркодов, общих и уникальных для каждой чашки отражены на Рис.2.

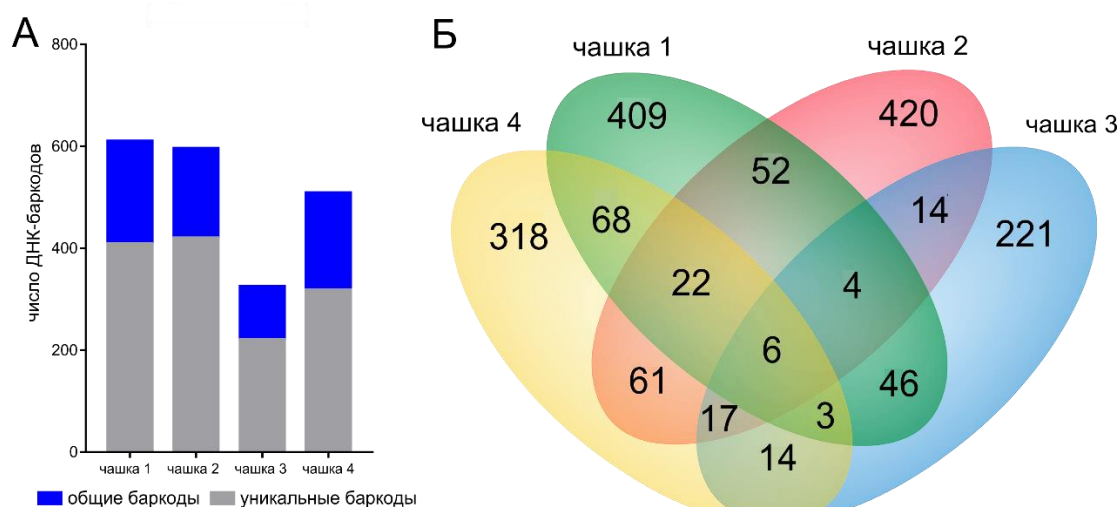


Рисунок 2. Сравнение ДНК-баркодов репрограммированных клеток, собранных с четырех чашек в пилотном эксперименте. (А). На диаграмме показано соотношение общих ДНК-баркодов (синие блоки) и уникальных ДНК-баркодов (серые блоки) для каждой чашки. (Б). Диаграмма Венна, отражающая число общих ДНК-баркодов для четырех библиотек/чашек.

Для подсчета количества наблюдаемых в эксперименте двойных пересечений ДНК-баркодов, мы использовали следующую формулу (1).

$$T_{\text{observed}} = \sum_{i=2..4} ((\sum P_i) * (i-1) * (-1)^i), \quad (1)$$

где  $P_i$  отражает пересечение баркодов между  $i$  разными чашками (от 2 до 4). В нашем эксперименте  $T_{\text{observed}}=215$ . Если же способность к репрограммированию не наследуется, то ожидаемое количество пересечений баркодов  $T_{\text{expected}}$  будет рассчитываться по следующей формуле (2).

$$T_{\text{expected}} = N * C * E^2, \quad (2)$$

где  $N$  – количество трансдуцированных клеток,  $C$  – вероятность того, что дочерние клетки попадут при рассадке в разные чашки, и  $E$  – эффективность репрограммирования. В пилотном эксперименте  $N$  составило 170 000;  $C$  - 0.75,



а E была оценена как отношение общего количества ДНК-баркодов к числу трансдуцированных клеток и составила 0.01. Вычисленное таким образом  $T_{\text{expected}}$  равнялось 13, что намного меньше наблюдаемого пересечения  $T_{\text{observed}}$  (215). Этот результат говорит в пользу того, что способность к репрограммированию может передаваться в ходе клеточных делений, и не является случайным процессом. Однако для того, чтобы дать более точную оценку, необходимо учесть ряд дополнительных параметров, непосредственно связанных с самой методикой баркодирования.

### **Параметры, определяющие эффективность баркодирования клеток**

*Разнообразие библиотеки баркодированных вирусов.* Один из наиболее важных параметров при маркировании клеток ДНК-баркодами – это размер или разнообразие библиотеки баркодированных лентивирусов (другими словами - количество уникальных вариантов ДНК-баркодов). При недостаточном разнообразии библиотеки, клетки, которые имеют разное происхождение, получают одинаковый ДНК-баркод и будут интерпретироваться как потомки одной клетки. В эксперименте это грозит получением завышенного уровня пересечений баркодов с разных чашек. По теоретической оценке, разнообразие нашей библиотеки слишком большое, что делает ее секвенирование трудоемким. Поэтому мы предложили альтернативный метод, позволяющий оценить, по крайней мере, порядок библиотеки. Поскольку все эксперименты должны были быть проведены с использованием вирусных частиц, собранных при одной трансфекции (то есть из одного стока), то оценив долю баркодов, общих для нескольких экспериментов, мы можем предсказать примерное разнообразие общей библиотеки. Таким образом, ДНК-баркоды из разных экспериментов являются случайными выборками одной генеральной совокупности.

*Количество интеграций баркодов на одну клетку (MOI).* Значение MOI (Multiplicity of infection) описывает количество интеграций провирусов на клетку и оказывает сильное влияние на эффективность маркирования клеток. Клетка с двумя ДНК-баркодами будет интерпретироваться как 2 клетки с индивидуальными баркодами, но общей судьбой, а это грозит завышением реального пересечения ДНК-баркодов между чашками. Мы определяли значение MOI из дополнительных экспериментов, проводимых параллельно экспериментам по репрограммированию при аналогичных условиях: плотность рассадки клеток до трансдукции, время трансдукции, а также количество баркодированного вируса. За одним исключением, вирусы с репрограммирующими факторами были заменены на вирусы с Gfp под контролем доксициклин-индуцибельного промотора. Таким образом, процент

GFP-позитивных клеток, несущих ДНК-баркод, мы можем оценить с помощью проточного цитофлуориметра, а значение MOI вычислить по формуле Пуассона.

*Количество потомков исходных клеток.* До рассадки на разные чашки исходные «материнские» клетки могут поделиться несколько раз. Тогда чем больше потомков имеет клетка, тем больше вероятность распределения этих потомков по разным чашкам. Поэтому нам необходима информация о количестве потомков каждой клетки, которое, к слову, может равняться 0 (гибель клетки до деления). Для мониторинга количества делений трансдуцированных фибробластов, мы использовали прижизненную микроскопию с детальной съемкой в течение 24-48 часов на приборе CellIQ в центре клеточных технологий ИЦиГ СО РАН.

И, наконец, еще один важный параметр, это *случайная потеря ДНК-баркодов* на разных стадиях эксперимента, начиная от потерь клеток при рассадке на четыре чашки и сортировки репрограммированных клеток до неэффективной амплификации и недостаточной глубины секвенирования.

### **Описание компьютерной модели, симулирующей экспериментальные стадии**

Поскольку с учетом описанных выше параметров, расчет по формуле (2) дает только грубую оценку, мы разработали компьютерную модель, симулирующую все стадии эксперимента и позволяющую оценить вероятность синхронного репрограммирования сестринских клеток. Схема функционирования модели отражена на Рис. 3. Кратко, алгоритм модели следующий. Сначала создается некое количество объектов, численно равное экспериментальному количеству клеток. Затем объектам присваиваются номера, что отражает мечение клеток ДНК-баркодом, причем номера присваиваются в соответствии со значением MOI, то есть какие-то объекты получают два и более номера, тогда как другие не получают свой номер-метку совсем и исключаются из дальнейшего моделирования. Далее объекты мультиплицируются, исходя из количества делений клеток после трансдукции (от 0 до 8). После этого, объектам присваивается еще один номер – номер группы (от 1 до 4), таким образом имитируется рассадка на 4 чашки. Затем часть каждой группы элиминируется (параметр «потеря материала»,  $d$ ). Поскольку этот параметр не может быть оценен экспериментально, в модели он варьируется от 10 до 90%. И, наконец, последний шаг в моделировании – это отбор количества объектов из каждой группы, равного экспериментально полученному количеству ДНК-баркодов на каждой чашке. Отбор объектов проводится согласно нормальному распределению, где  $n$  – среднее количество ДНК-баркодов на четырех чашках с дисперсией  $s$ . Цель моделирования

заключается в подборе такого уровня наследуемости способности к репрограммированию ( $h$ ), при котором количество пересечений между четырьмя группами в модели значимо не отличается от пересечений баркодов между чашками в эксперименте. Этот уровень определяет вероятность синхронного репрограммирования потомков одной клетки.

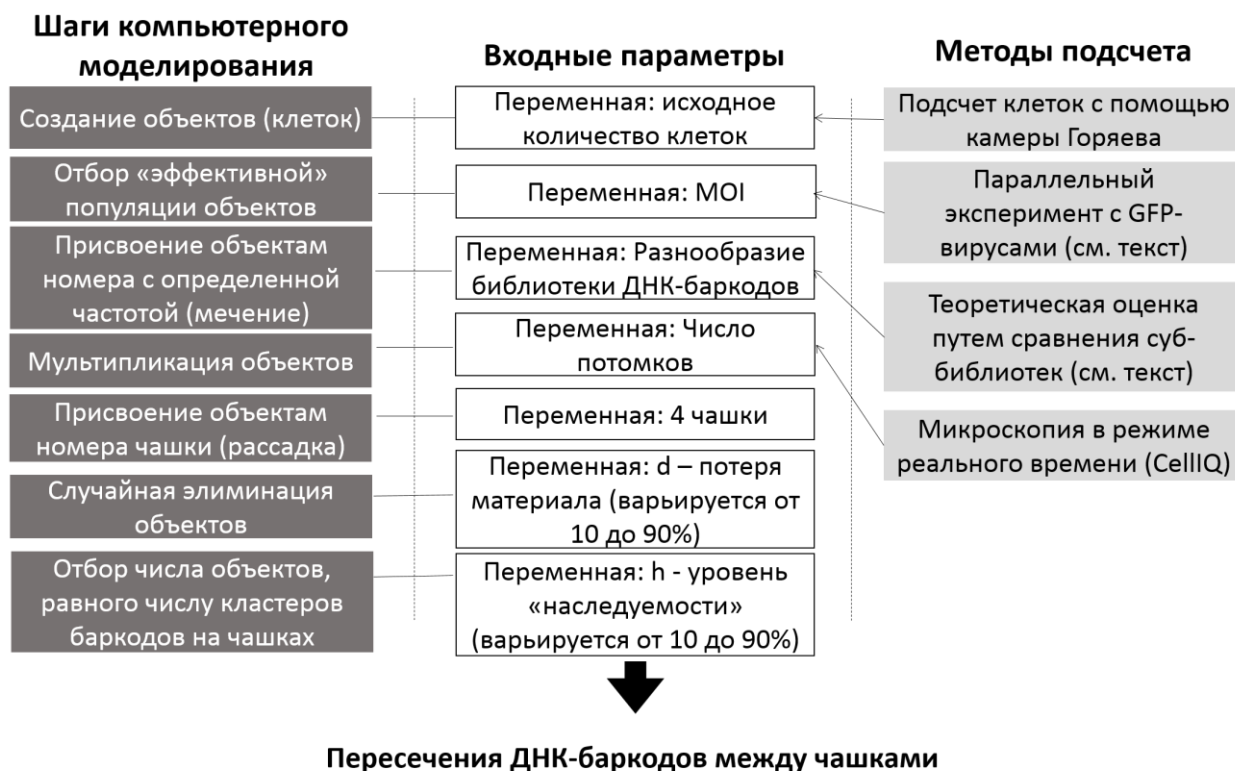


Рисунок 3. Схема компьютерной модели, симулирующей экспериментальные этапы. Параметр  $d$  обозначает потерю материала, параметр  $h$  – уровень наследуемости.

Результатом моделирования является число клеток с баркодами, общими для двух чашек (двойные пересечения), трех чашек (тройные пересечения) и четырех чашек (четверные пересечения). Поскольку на каждую точку  $d$  приходится несколько подходящих значений  $h$ , наиболее подходящее из них выбирается по близости средних значений.

### Репрограммирование баркодированных фибробластов мыши к плюрипотентному состоянию: Эксперименты 1 и 2

Следующие два эксперимента мы провели в соответствии с вышеуказанными изменениями. В течение 24 часов после трансдукции клетки культивировались в приборе CellIQ со съемкой каждые 10 минут. После недели культивирования в присутствии доксициклина мы отобрали GFP-позитивные клетки с 4-ех чашек, амплифицировали и просеквенировали их ДНК-баркоды. Проанализировав качественный состав ДНК-баркодов на каждой чашке, мы обнаружили, что значительная часть баркодов представлена более чем на одной чашке (Рис.4).

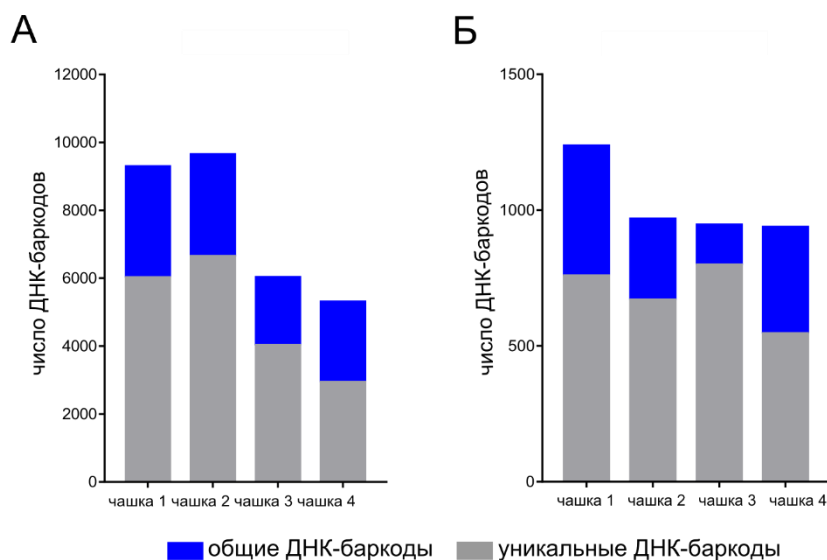


Рисунок 4. Сравнение ДНК-баркодов репрограммированных клеток в четырех чашках для первого (А) и второго (Б) экспериментов. На диаграммах отражено соотношение общих ДНК-баркодов (синие блоки) и уникальных ДНК-баркодов (серые блоки) на каждой чашке.

Мы провели моделирование первого и второго эксперимента при соответствующих входных параметрах. Размер библиотеки был оценен по количеству пересечений ДНК-баркодов между первым и вторым экспериментами и составил от 2 до 12 миллионов вариантов баркодов. Для каждого эксперимента было сделано 100 запусков моделирования. В результате моделирования мы получили диапазон подходящих значений уровня наследуемости в зависимости от потери материала (Рис. 5).

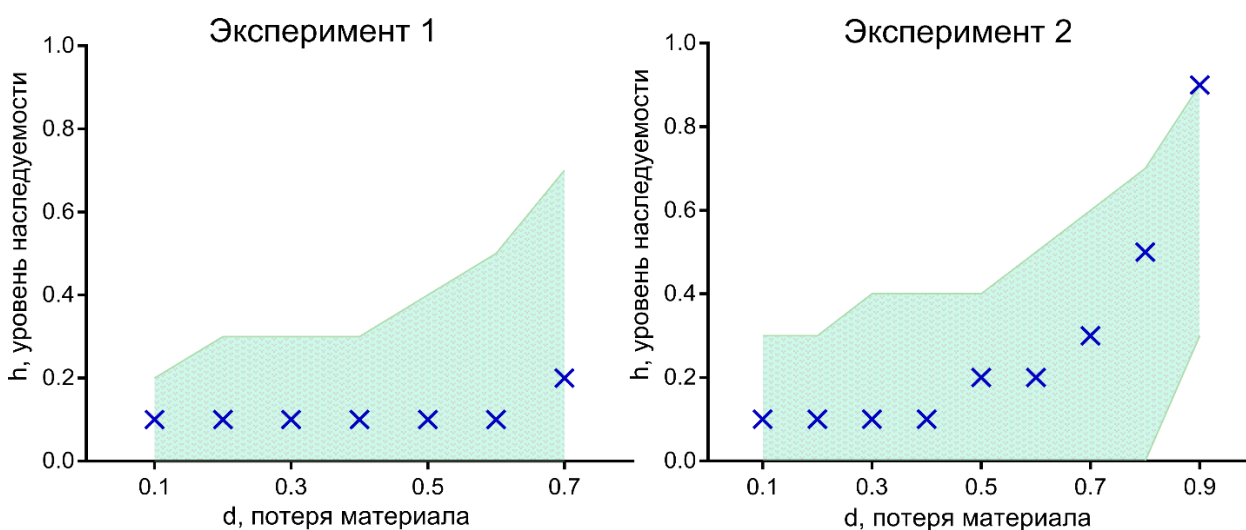


Рисунок 5. Результаты компьютерного моделирования первого и второго экспериментов. По оси X отмечена потеря материала; по оси Y –уровень наследуемости, при котором количества пересечений ДНК-баркодов между чашками значимо не отличаются в эксперименте и модели ( $p < 0.05$ ). Заштрихованная область показывает подходящий уровень наследуемости при определенной потере материала. Крестиками выделены наиболее подходящие значения. Анализ проводился с помощью непараметрического дисперсионного анализа (критерий Краскела-Уоллиса) в программе GraphPad Prism 6. График, показывающий результаты моделирования первого эксперимента, не включает значения h при d, равной 0.8 и 0.9, по причине невозможности функционирования алгоритма при данных параметрах для этого эксперимента.

Согласно моделированию, значение уровня наследуемости ( $h$ ) лежит в диапазоне 0-30%, при наиболее подходящем значении 10%. Это значит, что при условии репрограммирования отдельно взятой клетки, вероятность репрограммирования родственных ей клеток составляет 10%.

Для того, чтобы проверить достоверность полученного результата и определить число пересечений баркодов между чашками при условии, что успешное приобретение плюрипотентности определяется лишь случаем, мы разработали контрольный эксперимент, симулирующий отбор репрограммированных клеток случайным образом (т.е. при нулевой наследуемости). Схема контрольного эксперимента почти полностью повторяет схему эксперимента по репрограммированию. За исключением того, что вирус с репрограммирующими факторами был заменен на вирус с доксицилин-индуцибельным GFP. ДНК-баркодирование этих клеток было проведено при тех же условиях. После вирусной трансдукции клетки культивировались в приборе CellIQ в течение суток для подсчета количества делений, а затем были рассажены на 4 чашки и культивировались в присутствии доксицилина. Через неделю, мы *случайным образом* отбирали на клеточном сортере столько же GFP-позитивных клеток с каждой чашки, сколько в параллельном эксперименте по репрограммированию. Поскольку клетки были отобраны случайным образом, пересечения ДНК-баркодов между четырьмя чашками в контрольном эксперименте обусловлены случайными событиями.

Кроме того, мы ограничили исходную экспериментальную популяцию клеток только Thy1-позитивными клетками (Thy1 – маркер терминально-дифференцированных фибробластов). Это позволяет снизить гетерогенность исходных клеток, и исключить из эксперимента менее дифференцированные Thy1-негативные клетки, являющиеся претендентами на роль «элитарной» субпопуляции.

### **Репрограммирование баркодированных фибробластов мыши к плюрипотентному состоянию: Контрольный эксперимент и Эксперимент 3 (ЭФМ, сортированные по Thy-1)**

Проанализировав ДНК-баркоды с каждой чашки, мы обнаружили, что количество двойных, тройных и четверных пересечений ДНК-баркодов в контрольном эксперименте значительно меньше чем в эксперименте по репрограммированию (Рис. 6). Данный результат хорошо согласуется с тем фактом, что баркоды в контрольном эксперименте были выбраны случайно, и наследуемости не предполагается совсем.

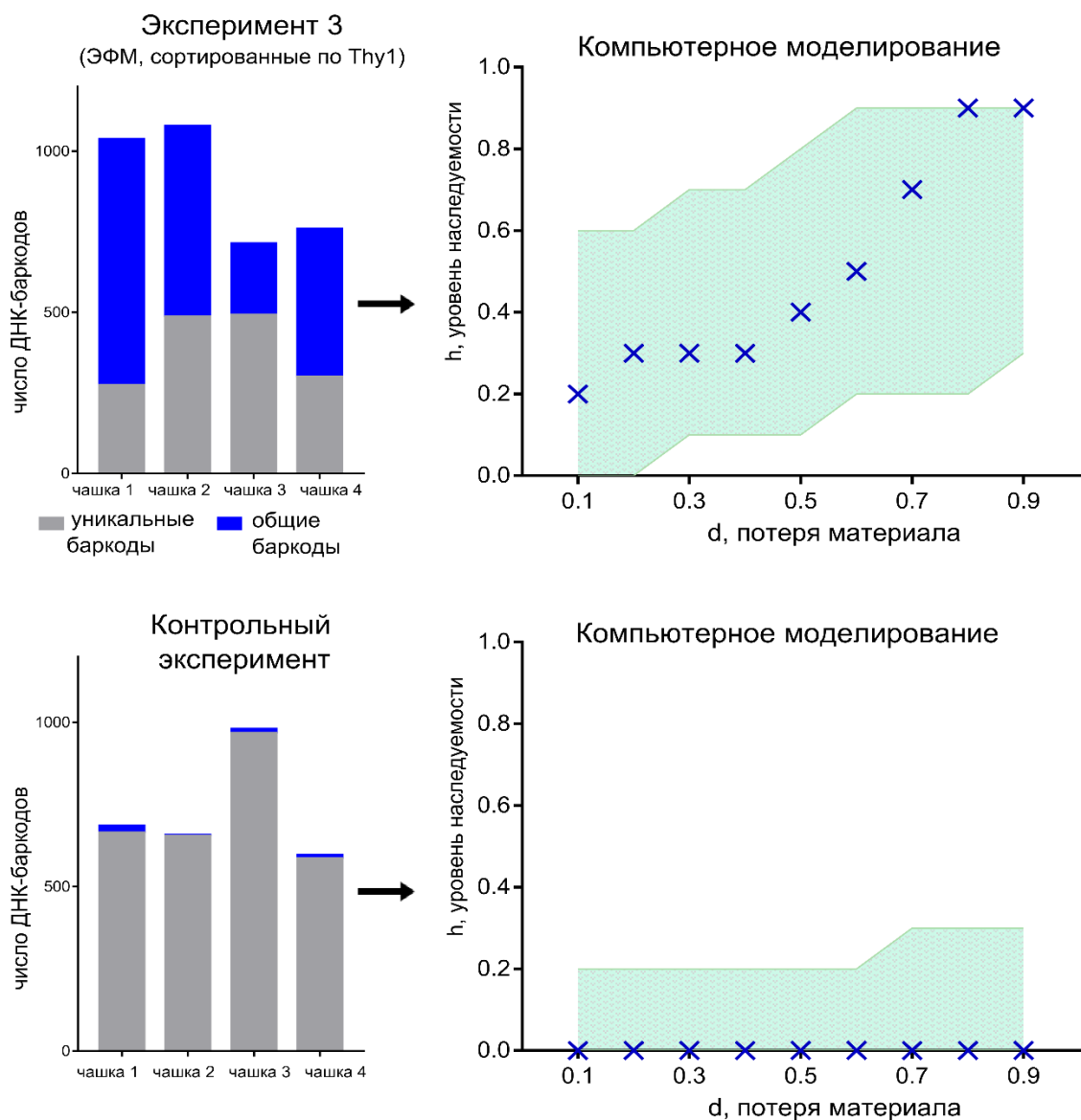


Рисунок 6. Слева на диаграммах показано соотношение общих ДНК-баркодов (синие блоки) и уникальных ДНК-баркодов (серые блоки) на каждой чашке для обсуждаемых экспериментов. Справа показаны результаты моделирования описываемых экспериментов. По оси X отмечена потеря материала; по оси Y –уровень наследуемости, при котором количества пересечений ДНК-баркодов между чашками значимо не отличаются в эксперименте и модели ( $p < 0.05$ ). Заштрихованная область показывает подходящий уровень наследуемости при определенной потере материала. Крестиками выделены наиболее подходящие значения. Анализ проводился с помощью непараметрического дисперсионного анализа (критерий Краскела-Уоллиса) в программе GraphPad Prism 6.

Компьютерное моделирование показало такие же результаты: уровень наследуемости в контрольном эксперименте оказался равен 0 (при всех значениях потери материала) (Рис. 6). Таким образом, события, когда родственные клетки делят общую судьбу, не являются абсолютно случайными. Кроме того, исключение из анализа менее дифференцированных клеток, не приводит к уменьшению доли синхронно репрограммирующихся дочерних клеток.

## Быстрораспределяющиеся клетки как кандидаты на роль элитарных клеток

С помощью моделирования мы оценили вклад клеток с разным количеством потомков в общее число двойных пересечений ДНК-баркодов. Несмотря на то, что доля быстрораспределяющихся клеток в исходной клеточной популяции небольшая (менее 25%), их вклад в число двойных пересечений составил более 50%. Поскольку описанная нами модель предполагает однородное распределение уровня наследования способности к репрограммированию для всех клеток, клетки с большим количеством потомков имеют больший шанс попасть на разные чашки, и вместе с тем большую вероятность быть выбранными. Таким образом, модель уже отражает ситуацию, когда быстрораспределяющиеся клетки имеют больший шанс репрограммироваться только за счет количества потомков. И тем не менее, для того, чтобы получить сходимость в количестве пересечений баркодов между чашками в модели и эксперименте, необходимо задать ненулевой уровень наследуемости. Мы проанализировали альтернативную гипотезу, заключающуюся в том, что быстрораспределяющиеся клетки с обладают предрасположенностью к репрограммированию (то есть являются элитарными). Модифицировав компьютерную модель и присвоив быстрораспределяющимся клеткам больший уровень наследуемости  $h$ , мы получили даже большую сходимость результатов моделирования с экспериментальными данными относительно тройных и четверных пересечений (Рис. 7).

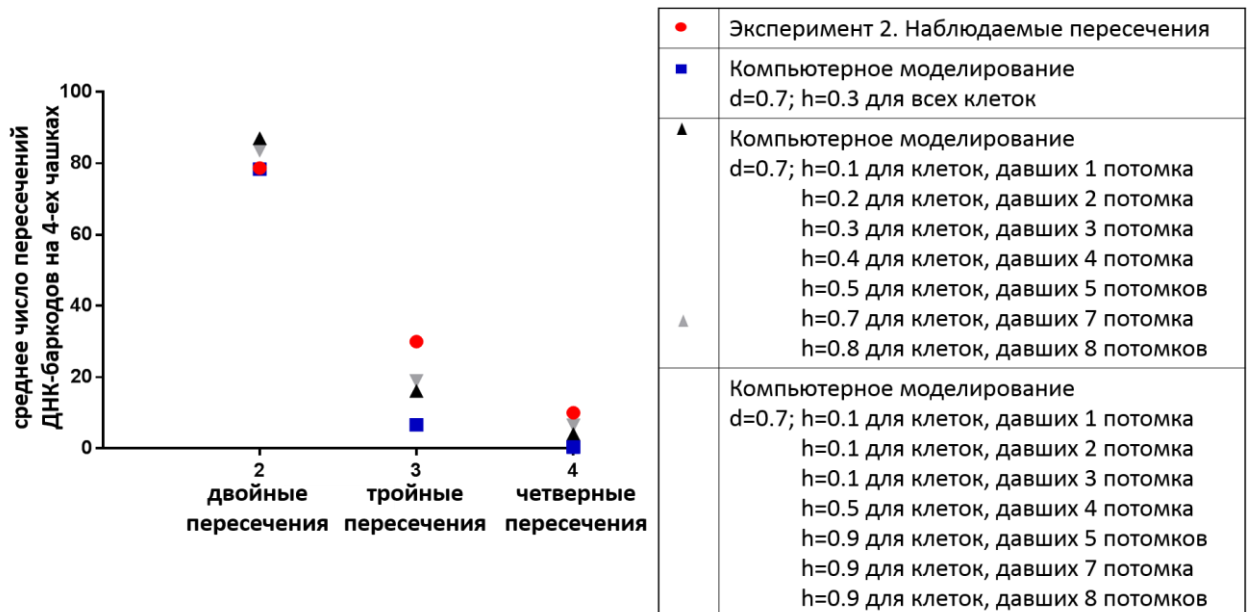


Рисунок 7. На графике показано сравнение двойных, тройных и четверных пересечений ДНК-баркодов при разных распределениях способности к репрограммированию в клеточной популяции (однородное и дифференциальное распределения). В качестве модельных взяты пересечения, полученные при параметрах  $d=0.7$  и  $h=0.3$

## ОБСУЖДЕНИЕ

Вопрос о том, обладают ли клетки наследуемой предрасположенностью к репрограммированию до плюрипотентного состояния, ставится исследователями уже давно. Тем не менее, определенного ответа на него все еще нет, а имеющиеся данные противоречивы. В нашей работе, для исследования того, как способность к репрограммированию распределяется между дочерними клетками, был использован метод ДНК-баркодирования, позволяющий проследить судьбу тысяч клеток.

Мы показали, что дочерние клетки зачастую становятся плюрипотентными синхронно. Кроме того, синхронное репрограммирование дочерних клеток не является случайным явлением, и некоторые клетки в популяции имеют предрасположенность к репрограммированию, которая передается в ходе клеточных делений.

Ключевой вопрос заключается в том, какова природа этой предрасположенности. Согласно первому сценарию (стохастическому), она возникает спонтанно у какой-то доли клеток. Возможно, ее возникновение обусловлено стохастичностью, присущей всем молекулярным процессам, происходящим в клетке, начиная от экспрессии генов и заканчивая процессами деградации белков. Случаи, когда стохастические процессы определяют судьбу клетки хорошо известны в литературе. Наиболее ярким примером является случайная моноаллельная экспрессия одного из более чем 1000 генов ольфакторных рецепторов мыши, закрепленная формированием специфической трехмерной структуры генома и обеспечивающая специфичность конкретного нейрона к определенному стимулу [Lomvardas et al., 2006]. Возможно, в некоторых клетках еще до индукции плюрипотентности экспрессируются факторы, способствующие репрограммированию, или наоборот, не экспрессируются факторы, препятствующие ему. И если такое состояние устойчиво, как минимум, несколько делений, мы будем наблюдать частые случаи синхронного репрограммирования дочерних клеток. Так, долгое время считалось, что программа поддержания плюрипотентности строго репрессируется в дифференцированных клетках, поэтому обнаружить в них экспрессию факторов плюрипотентности невозможно. Однако недавно было показано, что один из главных транскрипционных факторов плюрипотентных клеток, Oct4, присутствует в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов, выполняя атеропротективную функцию (Cherapanova et al., 2016). Таким образом наши результаты можно интерпретировать следующим образом: предрасположенность возникает спонтанно, но устойчива в ходе делений и с



какой-то долей вероятности передается дочерним клеткам, которые репрограммируются по детерминистической траектории.

Согласно второму сценарию (элитарному), предрасположенность к репрограммированию – характеристика привилегированных клеток. Свойство «элитарности» подразумевает то, что обладающие им клетки имеют некий общий признак, отличающий их от других клеток, не предрасположенных к репрограммированию. Так, менее дифференцированный статус соматических стволовых клеток и большая эффективность репрограммирования сделали их главными кандидатами на роль элитарных клеток (Eminli et al., 2009). Мы проверили гипотезу об их элитарности и провели эксперимент по репрограммированию Thy1-позитивных зрелых фибробластов, исключив из анализа соматические стволовые клетки. К нашему удивлению, доля синхронно-репрограммирующихся дочерних клеток в эксперименте не уменьшилась. Среди других характеристик клеток, обладающих большей вероятностью образовать плюрипотентного потомка, – высокая скорость пролиферации. Присвоив быстроделаящимся клеткам больший уровень наследуемости способности к репрограммированию в модели, мы получили такое же соотношение количества двойных, тройных и четверных пересечений ДНК-баркодов между чашками, которое наблюдалось в эксперименте. Таким образом, предположение о том, что быстроделаящиеся клетки являются элитарными, и их потомки репрограммируются синхронно с гораздо большей вероятностью, чем потомки других клеток, хорошо согласуется с результатами моделирования. Стоит отметить, что существование привилегированных клеток с ультрабыстрым клеточным циклом уже было показано для популяции гемопоэтических клеток (Guo et al., 2014). Однако вопрос о присутствии подобных клеток в других клеточных популяциях все еще открыт.

## **ВЫВОДЫ**

1. Создана и охарактеризована библиотека ДНК-баркодированных лентивирусных векторов, позволяющая эффективно маркировать клеточную популяцию, включающую до 200 000 эмбриональных фибробластов мыши.
2. Разработана компьютерная модель, позволяющая оценить вероятность синхронного репрограммирования дочерних клеток.
3. Согласно этой модели, вероятность синхронного репрограммирования дочерних клеток составляет около 10%. Это значение превышает вероятность их случайного репрограммирования за время наблюдения, что свидетельствует в пользу передачи предрасположенности к репрограммированию при делении для первичных эмбриональных фибробластов мыши.

4. Показано, что исключение из эксперимента Thy1-негативных фибробластов (15-20%), представляющих собой менее дифференцированные клетки, не приводит к уменьшению частоты синхронного репрограммирования дочерних клеток.

5. С помощью компьютерного моделирования установлено, что быстроделющиеся клетки (оценка по количеству дочерних клеток при 2-х суточном наблюдении), при меньшем содержании в исходной популяции фибробластов, являются основным источником репрограммированных клеток.

6. Быстроделющиеся клетки являются возможными кандидатами на роль «элитарных» клеток. Присвоение им большего уровня наследуемости способности к репрограммированию в компьютерной модели удовлетворяет количеству пересечений ДНК-баркодов в эксперименте.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Юнусова А.М.**, Баттулин Н.Р. Методы маркирования клеток для изучения судьбы клеточных поколений. //Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т.20. №6. С. 909-917.

2. **A.Yunusova**, V.Fishman, G.Vasiliev, N.Battulin. Deterministic versus stochastic model of reprogramming: new evidence from cellular barcoding technique. //Open Biol. 2017. Т. 7 №4. С. 160311.

3. **Юнусова А.М.**, Фишман В.С., Баттулин Н.Р. Наследование способности фибробластов к репрограммированию в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки //Материалы 51-й международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс". Новосибирск. 2013 г. С. 175.

4. **Юнусова А.М.**, Фишман В.С., Баттулин Н.Р. Создание системы ДНК-баркодированных вирусов для маркирования клеток //Материалы VI Международной школы молодых ученых по молекулярной генетике на тему «Геномика и системная биология». Звенигород. 2014г. С. 51.

5. **A.Yunusova**, V.Fishman, N.Battulin, O.Serov. Susceptibility of embryonic fibroblasts to reprogramming inherited through cell division. //Abstracts for Cell Technologies at The Edge: Research & Practice. St. Petersburg. 2016. P. 53.

6. **A.Yunusova**, V.Fishman, N.Battulin. Symmetric reprogramming fate in somatic cell lineages. //Abstract Book for EMBO Workshop «Nuclear function and cell fate choice». Kyllini, Greece. 2016. P. 116.

7. **A.Yunusova**, V.Fishman, N.Battulin. Reprogramming potential is an inheritable trait. // Abstracts for Cell Symposia: 10 years of iPSCs. Berkley, USA. 2016. P. 5.