

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО
„Акад. Кирил Братанов”

Елена Николаева Стоянова-Петрова

ПОЛУЧАВАНЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА
ИНДУЦИРАНИ ПЛУРИПОТЕНТНИ
СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен
„Доктор”

Научна специалност „Имунология“ шифър 01. 06. 23

Научен ръководител: Доц. Милена Мурджева

София, 2015 г.

Дисертационният труд е написан на 115 страници, илюстриран е с 31 фигури и с 3 таблици. В библиографския списък са цитирани 248 литературни източника.

Изследванията, включени в дисертацията, са проведени в секция “Молекулярна имунология“ - ИБИР-БАН.

Дисертационният труд е преминал успешно процедура за предварително обсъждане и насочен за защита на заседание на Научния съвет на ИБИР-БАН, състоял се на 03.06.2015 г., София.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 17.09.2015 г. от 11.00 часа в залата ИБИР , бул. Цариградско шосе 73, гр. София пред научно жури в състав:

1. Чл.кор. Румен Панков
2. Проф. Стефан Лолов
3. Проф. Магдалена Чорбаджиева
4. Проф. Румяна Миронова
5. Доц. Милена Мурджева

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН.

Отпечатването на автореферата е финансирано по проект BG051PO001-3.3.06 - 0059 по ОПЧР на ЕСФ.

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Съдържание

УВОД	1
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	2
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	3
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	4
1. Подготовка на вирусни вектори за получаване на индуцирани плурипотентни стволови клетки	4
2. Получаване и изолиране на човешки индуцирани плурипотентни клетки.....	7
3. Повишаване продукцията на ИПСК чрез епигенетични модулатори.....	17
4. IN VITRO диференциация на препрограмираните клетки.....	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	36
ИЗВОДИ	37
ПРИНОСИ	37
ПУБЛИКАЦИИ	38
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ	38
ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	39

Използвани съкращения

ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЕСК	Ембрионални стволови клетки
ЕТ	Ембрионидни телца
иПСК	Индуцирани плурипотентни стволови клетки
МЕФ	Миши ембрионални фибробласти
мРНК	Матрични рибонуклеинови киселини
РНК	Рибонуклеинова киселина
AFP	Alpha-fetoprotein (α -фетопротеин)
GFP	Green fluorescent protein (зелен флуоресцентен белтък)
PCR	Polymerase chain reaction (полимеразна верижна реакция)

УВОД

Плурипотентните стволови клетки притежават неограничен потенциал за самообновяване и диференциация в клетъчни типове, принадлежащи към трите зародишни листа. Допреди по-малко от десет години единствен източник на плурипотентни стволови клетки беше вътрешната клетъчна маса на бластоциста, от която се изолират ембрионални стволови клетки.

Човешките ембрионални стволови клетки (ЕСК) притежават безспорен потенциал за използване в изследователската работа. Обаче, съществуващите етични ограничения относно прекъсване на човешки живот при изолирането им от ембриони, оскъдният изходен материал (вътрешна клетъчна маса на бластоцист) и доказаната имуногенност, поради алогенния им произход, са пречка за клиничното им приложение. Преодоляването на тези затруднения става възможно след успешното превръщане на соматични клетки в плурипотентни стволови клетки. Терминът, под който е познат този процес, е ядрено препрограмиране, а препрограмираните клетки са наречени *индуцирани плурипотентни стволови клетки (иПСК)*.

Индуцираните плурипотентни стволови клетки могат да бъдат получени от различни типове соматични клетки, които не са подложени на етични ограничения, а също така са слабо имуногенни при връщането им в пациента, от който произхождат. Те притежават неограничените способности за самообновяване и диференциация на ембрионалните стволови клетки. Тези свойства ги правят уникално средство както за извършване на фундаментални изследвания, така и за разработване на нови лекарства, моделиране на заболявания и клетъчни терапии.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е получаване на индуцирани плурипотентни стволови клетки от човешки фибробласти.

За нейното изпълнение бяха поставени следните задачи:

1. Да се получат вируси, носещи гени за OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC и да се изследва тяхната експресионна способност.
2. Да се препрограмират човешки фибробласти с получените вируси.
3. Да се създаде ефективна схема за ранна селекция на индуцирани плурипотентни стволови клетки.
4. Да се повиши ефективността на препрограмиране чрез използване на епигенетични модулатори - валпроева и аскорбинова киселина.
5. Да се характеризират препрограмираните човешки фибробласти.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

- **Материали**

Мишки Бременни мишки от щам ICR бяха поръчани от “Експериментална и развъдна база за опитни животни” - гр. Сливница.

Еукариотни клетъчни линии 293T, VJ и BG01v

Плазмидни вектори Използвани бяха вектори, носещи гени за hOCT4, hSOX2, hKLF4, hcMYC, hc-MYC, pUMVC и pCMV-VSV-G.

- **Методи**

Молекулярно-биологични методи

Растеж и съхранение на бактерии

Пречистване на плазмидна ДНК

Изолиране на РНК

Обратна транскрипция и полимеразна верижна реакция (PCR)

Работа с клетки

Клетъчно култивиране

Продукция на ретровириси

Инфекция на фибробласти

Имунологични методи

Индиректна имуофлуоресценция

Сепариране на инфектирани клетки чрез система за магнитно сортиране на клетки

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследванията върху ЕСК показват, че тяхното недиференцирано състояние се поддържа от действието на ограничен набор транскрипционни фактори. След ко-експресиране на комбинации от 24 гена в миши ембрионални фибробласти, групата на Yamanaka идентифицира четири основни транскрипционни фактора (наречени по-късно препрограмиращи фактори на Yamanaka), които са способни да индуцират плурипотентни свойства. Това са OCT4, SOX2, KLF4 и C-MYC (Takahashi and Yamanaka 2006). Получените клетки са наречени индуцирани плурипотентни стволови клетки (иПСК).

1. Подготовка на вирусни вектори за получаване на индуцирани плурипотентни стволови клетки

Препрограмиращите фактори могат да бъдат въведени в соматични клетки чрез интегративни или неинтегративни методи. Интегративните методи водят до вмъкване на трансгени за препрограмиращите фактори в генома на таргетната клетка на случаен принцип, докато неинтегративните предизвикват временни генетични модификации. При интегративните методи се използват ретровируси, лентивируси и транспозоми, а при неинтегративните аденовируси, плазмиди, белтъци и РНК.

Интегративните методи са по-високо продуктивни (Sommer and Mostoslavsky 2010) и все още са по-широко използвани при получаването на иПСК в сравнение с неинтегративните. Поради тази причина в нашата експериментална работа използвахме интегративна ретровирусна система, базирана на миши вирус (Moloney murine leukaemia virus). Нейно основно предимство е високата ефективност на препрограмиране (Stadtfield et al. 2008). При използването на тази система за продукция на иПСК трябва да се вземе предвид ограничението, че векторите могат да се интегрират единствено в генома на активно делящи се клетки (Maherali et al. 2007). Такива клетки са и използваните от нас човешки фибробласти (линия BJ).

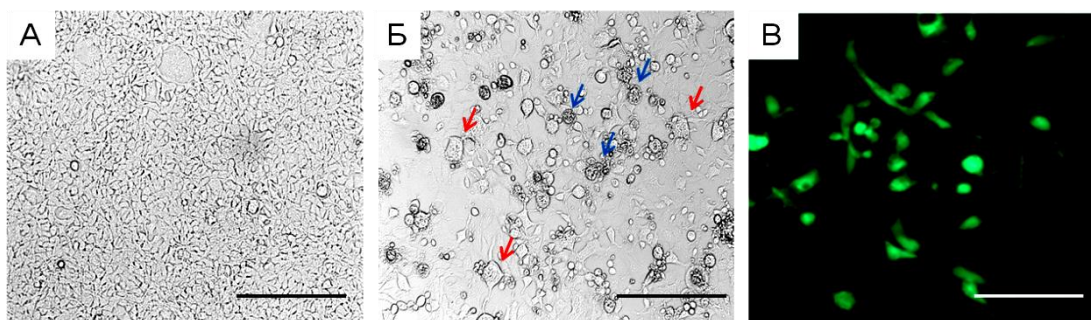
Вирусните вектори, носещи препрограмиращите фактори (OCT4, SOX2, KLF4 и C-MYC), бяха пакетирани в 293T клетки и беше анализирана тяхната способност да експресират белтъци.

Четиридесет и осем часа след трансфекцията бяха наблюдавани изменения в 293Т клетките. Контролните нетрансфектирани клетки бяха плоски и адхерирани върху дъното на съда за култивиране (Фиг. 1 А), докато при трансфектираните в част от клетките беше наблюдавано отделяне на клетъчния монослой от дъното, формиране на синцитиуми и морфологични белези на апоптоза (Фиг. 1 Б). Настъпилите морфологични изменения бяха резултат от цитопатичното действие на вируса.

За тестиране на експресионната способност на векторите беше използван като репортерен ген зелен флуоресцентен белтък (green fluorescent protein - GFP), който се експресира от ОСТ4 промотора. Избрахме именно този транскрипционен фактор да се експресира заедно с репортерения ген, тъй като той е важен за индуциране и поддържане на плюрипотентността. ОСТ4 е единственият транскрипционен фактор, който присъства във всички описани до момента комбинации от препрограмиращи гени.

Експресията на GFP беше видима 48 часа след трансфекцията на 293Т (Фиг. 1 В). Силен флуоресцентен сигнал беше установен в около 50 % от клетките на 48 час и 70 % на 72 час.

Валидирането на способността за експресия на вектори рMXs-hSOX2, рMXs-hKLF4 и рMXs-hc-MYC, които не съдържат репортерен ген, беше изследвано чрез имунофлуоресцентно оцветяване (Фиг. 2).

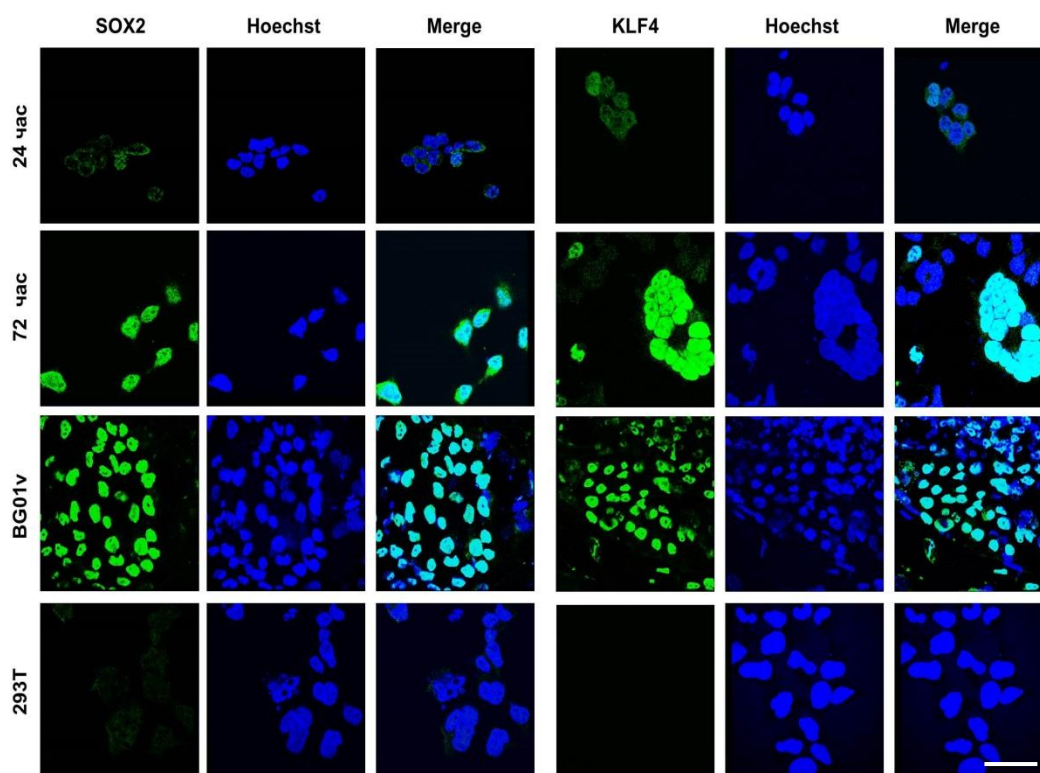


Фигура 1. 293Т клетки преди и след трансфекция: (А) Морфология на 293Т клетки преди трансфекцията; (Б) Морфология на 293Т клетки на 48 час след трансфекция. Наблюдава се цитопатичен ефект от продуцираните вируси: формират се синцитиуми (червени стрелки), част от клетките апоптозират и се отлепят (сини стрелки); (В) Експресия на GFP 48 часа след трансфекцията. Скала 200 μ т.

Оцветяването на 293Т клетките беше извършено на 24 и 72 час, което даде възможност да бъде проследена динамиката на експресия на репрограмиращите белтъци. На двадесет и четвърти час в трансфектираните с рMXs-hSOX2 клетки (SOX2-293Т) беше детектирана ядрена експресия на SOX2. На 72 час SOX2 се експресираше в около 80% от клетките (Фиг. 2).

Имунофлуоресцентното оцветяване на KLF4 в трансфектираните клетки с рMXs-hKLF4 (KLF4-293Т) на 24 час (Фиг. 2) показва ядрена експресия, която се повиши на 72 час. Положително оцветените клетки на 72 час бяха около 70 %.

Въпреки че валидирането на експресията на репрограмиращите плаزمиди беше извършено и за четирите гена, не беше възможно получаването на резултат за експресията на с-MYC. Тъй като векторът с ген *c-myc* (рMX) е същият като този, носещ *sox2* и *klf4* и *c-myc* и е пакетирен по същия начин като тях, допускаме, че и неговата продукция е успешна.



Фигура 2. Имунофлуоресцентно оцветяване на 293Т на 24 и 72 час след трансфекция с вектори рMXs-hSOX2 и рMXs-hKLF4. SOX2 и KLF4 са с ядрена локализация. Експресията се от по-голям брой клетки на 72 час. Човешки ЕСК от линия BG01v са позитивна контрола, а 293Т са негативна контрола. Скала 100 μ m.

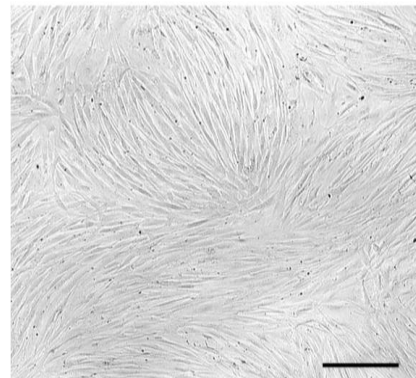
Вирусите бяха концентрирани и с тях бяха инфектирани инфекция на фибробласти. Вирусите не бяха замразявани, тъй като при замразяване се понижава вирусният титър (Rovozzo and Burke 1973). За концентриране на вирус - съдържащите супернатанти използвахме колони. Друг широко използван метод за концентриране е ултрацентрифугирането, но за разлика от него концентрирането с колони не изисква специфично оборудване, не уврежда вирусните вектори и не води до понижаване на жизнеността на вирусите (Kamps et al. 1991).

2. Получаване и изолиране на човешки индуцирани плурипотентни клетки

Нормалните човешки фибробласти (линия ВJ) са адхерентни клетки с хетерогенна морфология. Те са плоски, с удължена биполярна или мултиполярна форма (Фиг. 3). Фибробластите са единствения клетъчен тип, при които са приложени всички методи за препрограмиране. Следователно за този тип клетки има най-много информация, както за механизмите за индукция на плурипотентност, така и за механизмите за поддържането ѝ. От друга страна иПСК с фибробластен произход доста често се използват като контрола на процеса при препрограмиране на други типове соматични клетки.

При препрограмирането на фибробластните клетки бяха използвани факторите на Yamanaka - *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *C-MYC* (Takahashi et al. 2007). Векторите, носещи гените за тези фактори, бяха опаковани във вирусни частици в 293Т клетки. Вирусните частици се отделят в културалната среда на клетките, след което средата се събира и се добавя към клетките, които ще бъдат препрограмирани (Takahashi and Yamanaka 2006).

При първоначалните експерименти 1×10^6 293Т клетки бяха използвани за продуциране на вируси. Културалната среда, съдържаща вируси, беше събрана два пъти през 48 часа и с нея бяха инфектирани фибробластните клетки. Беше отчетена над 50% смъртност на фибробластите до 24 часа

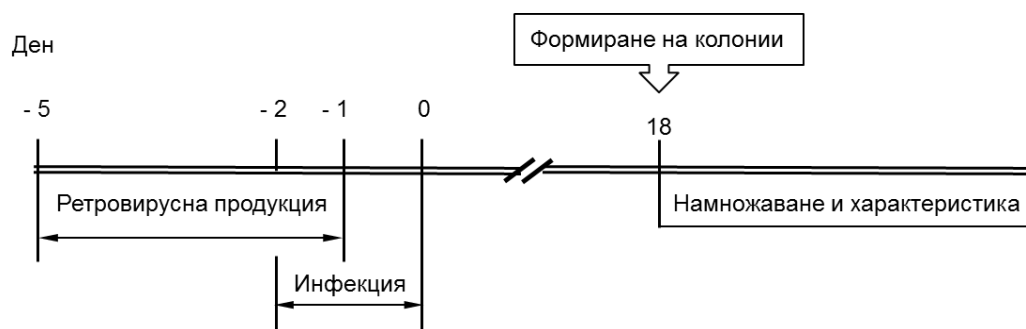


Фигура 3. Морфология на човешки фибробластни клетки от линия ВJ. Клетките са с хетерогенна морфология и удължена форма. Скала 200µm.

след инфекцията. В оцелелите клетки не бяха наблюдавани морфологични промени до 40 дни след инфекцията. Тези експерименти бяха отчетени като неуспешни.

В процеса на работа условията за продукция на вируси бяха модифицирани по Malі и сътрудници (2010), като количеството на клетките използвани за продукция на ретровируси беше повишено двукратно, а средата, съдържаща вируси, беше концентрирана. Полученият концентрат беше разреден с фиброластна среда в съотношение 1:55 и с тази смес бяха инфектирани фибробластните клетки. След 4 часа вирусната среда беше разредена 1:1 със свежа фибробластна среда. При тези условия клетките бяха култивирани още 20 часа. След това бяха инфектирани втори път по описания начин. В резултат на тези промени смъртността на инфектираните клетки се понижи под 20%. Протоколът за препрограмиране е схематизиран на Фиг. 4

При успешно протекло препрограмиране първите клетъчни струпвания, наподобяващи колонии, бяха установени до 18 дни след инфекцията.



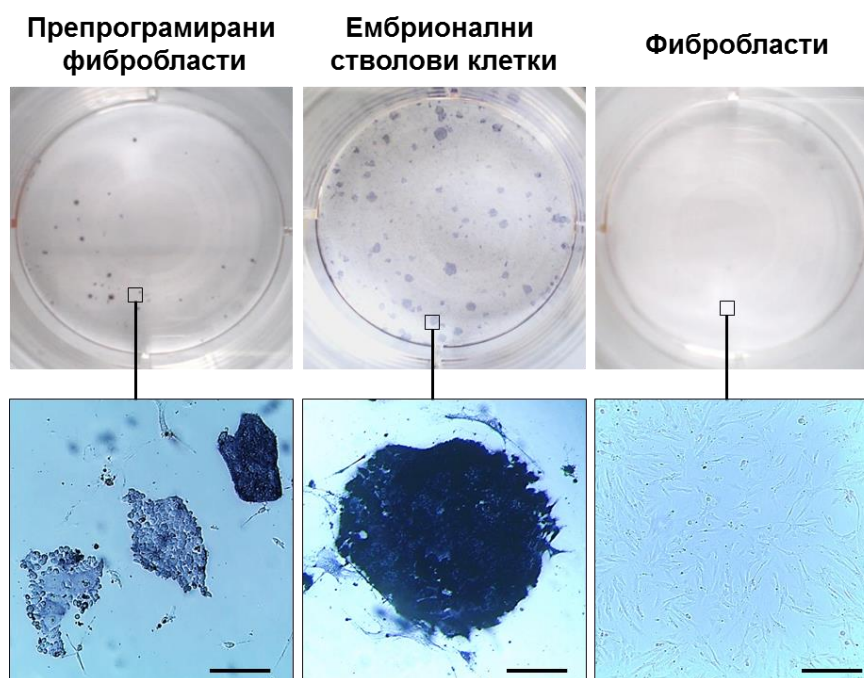
Фигура 4. Схема на приложената методика за препрограмиране на фибробластни клетки.

- **Изследване на алкално-фосфатазната активност**

Алкално-фосфатазната активност е маркер за плурипотентност при ембрионалните стволови клетки (O'Connor et al. 2008). Детектира се в ранните етапи на препрограмирането, но не винаги е пряко свързана с напълно препрограмирано плурипотентно състояние (Brambrink et al. 2008).

Алкално-фосфатазната активност беше изследвана 24 дни след инфекцията на клетките (Фиг. 5). Положителна контрола за оцветяването бяха ЕСК (BG01v), а негативна - фибробласти. Колониите от препрограмирани фибробласти бяха позитивни

за алкална фосфатаза, за разлика от контролните непрепрограмирани клетки, както и подхранващия слой от миши ембрионални фибробласти (МЕФ). Беше наблюдавана хетерогенност в оцветяването на различни колонии от препрограмирани клетки, която не беше установена при ЕСК.



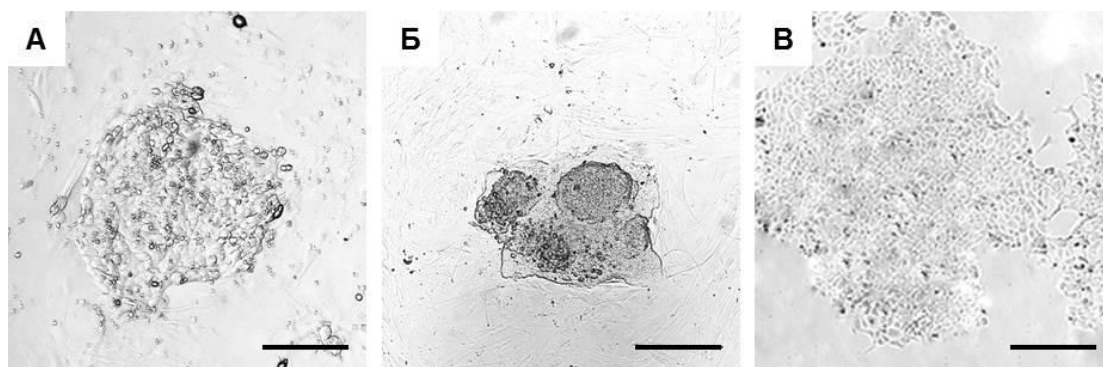
Фигура 5. Оцветяване за алкална фосфатаза на препрограмирани фибробласти на 24 ден след инфекцията, ембрионални стволови клетки и фибробластни клетки. В лилаво или синьо са оцветени клетките, позитивни за алкална фосфатаза. Скала 200µт.

- **Изолиране на клонове от препрограмирани клетки**

Двадесет и четири дни след инфекцията беше наблюдавана хетерогенност във формата и размерите на колониите от препрограмирани клетки. Някои от тях бяха плоски и ясно ограничени от МЕФ (Фиг. 6А), а други проявиха склонност към диференциация (Фиг. 6Б).

Компактни и плоски колонии от препрограмираните клетки (Фиг. 6А) бяха прехвърлени механично. Те бяха намножени и дадоха началото на пет отделни клона: iBJ1, iBJ2, iBJ3, iBJ4 и iBJ5.

Клетките бяха култивирани върху слой от подхранващи клетки (МЕФ) в ЕСК-ПК среда (Фиг. 6А, Б), а само в случаите, когато бяха предназначени за PCR анализ и за диференциране, бяха поддържани без подхранващи клетки в ЕСК среда (Фиг. 6В). Такива разлики във формата и морфологията на колониите е описана и при работата върху препрограмирането на кератиноцити (Aasen et al. 2008). Предполага се, че това се дължи на различната степен на препрограмиране на соматичните клетки. Една от причините за непълно препрограмиране на клетките е, че ретровирусните трансгени обикновено се заглушават към края на препрограмирането (Stadtfeld et al. 2008), поради активиране на хистоновы (Matsui et al. 2010) и ДНК (Lei et al. 1996) метилтрансферази. Това възпрепятства активирането на ендогените за плурипотентните фактори и клетките не успяват да придобият плурипотентни свойства.

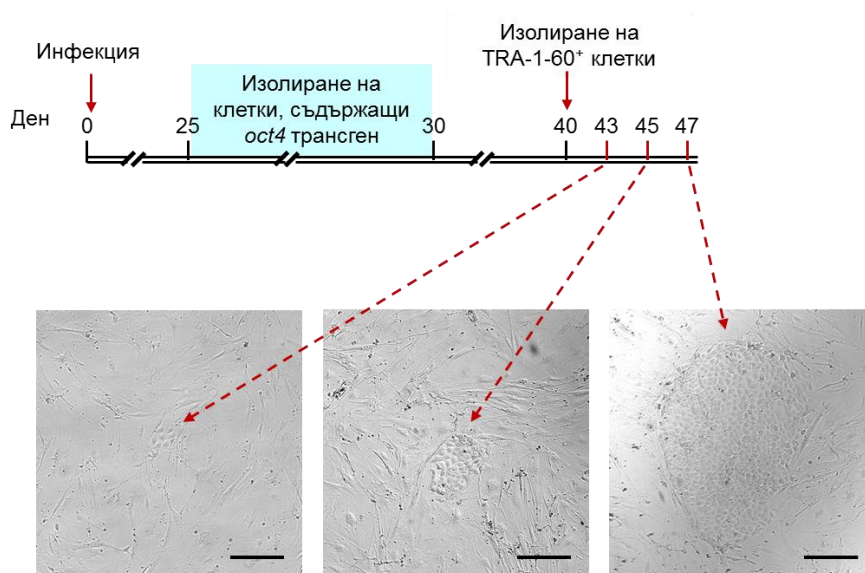


Фигура 6. Колонии от препрограмирани фибробластни клетки. (А) Компактна колония, култивирана върху МЕФ, ясно ограничена от подхранващите клетки, 24 дни след инфекцията. (Б) Колония от клетки с триъзмерен растеж, култивирана върху МЕФ, 24 дни след инфекцията. (В) Колония от препрограмирани клетки, култивирана без МЕФ. Скалата е 200μm.

Изчислената от нас ефективност, на база брой плоски колонии, отнесени към брой инфектирани клетки, е между 0.005 – 0.01% на 20 ден след инфекцията. Такава ефективност е получена и от други групи, работили върху препрограмирането на фибробластни клетки (Lowry et al. 2008 , Armstrong et al. 2010). Ниската продуктивност на процеса е свързана и с ниска вероятност за изолиране на иПСК. Ето защо в хода на нашата работа беше разработен протокол за първоначална селекция на препрограмирани клетки. Насочихме се към изолиране на клетки, които експресират

гени, носени от вектор hOct4-GFP и мембранна молекула TRA-1-60. OCT4 е смятан за основен регулатор при поддържането на плурипотентно състояние (Jin et al. 2002) и е най-важният ендегенен фактор, способен да препрограмира соматична клетка в плурипотентна (Takahashi and Yamanaka 2006, Okita et al. 2007, Wernig et al. 2007). Въпреки основната роля на OCT4 при препрограмирането, резултатът от неговото действие съвместно с останалите препрограмиращи фактори води до експресия на специфични белтъци в плурипотентните клетки. Такъв белтък е TRA-1-60. Той се използва за доказване на плурипотентни клетки (Kahler et al. 2013) и иПСК (Lowry et al. 2008). В научната литература са описани и други мембранни молекули, които се прилагат при подбор на човешки иПСК. Такива са TRA-1-81 (Dicker et al. 2005) и SSEA4 (Kahler et al. 2013).

Схемата, по която бяха селектирани препрограмираните клетки, според експресията на трансген *oct4* и повърхностен антиген TRA-1-60 е представена на Фиг. 7. Клетките, експресиращи трансген *oct4*, притежават резистентност към Puromycin. Условиата за селекция с Puromycin бяха установени опитно върху неинфектирани фибробластни клетки. Определена беше концентрация на Puromycin 1 µg/ml и време за третиране 5 дни.



Фигура 7. Схема на селекция на препрограмирани фибробластни клетки. Изолираните клетки според *oct4* трансген и експресия на TRA-1-60 формираха плоски и компактни колонии. Скала 200µm.

На 25-ия ден след инфекцията клетките бяха третирани с Puromycin. Контрола за активността на селектиращия антибиотик бяха подхранващите клетки (МЕФ). Те се отлепаха 24 часа след началото на третирането. Като резултат бяха получени малък брой клетки, които бяха прехвърлени върху нов МЕФ и подготвени за следващата селекция.

На 30-ия ден механично бяха пренесени върху МЕФ две колонии с ясни очертания и те дадоха началото на клонове O-iBJ1 и O-iBJ2. Всички останали клетки (препрограмирани клетки и МЕФ) бяха трипсинизирани и обработени с Anti-TRA-1-60-PE антитяло и Anti-PE-Microbeads. Чрез магнитно сепариране беше изолирана TRA-1-60⁺ популация от клетки.

Непосредствено след сепарирането клетките бяха посяти върху МЕФ и намножени. Три дни по-късно (43 ден след инфекцията) бяха детектирани колонии (Фиг. 7). Те бързо увеличиха размера си от 8-10 клетки на 43 ден до 50 клетки на 45 ден. Плоски и добре оформени колонии бяха прехвърлени механично, като всяка колония беше изходна за отделен клон. Тези клонове бяха обозначени както следва OT-iBJ1, OT-iBJ2 OT-iBJ3 и т.н.

Настъпилите промени в експресионния профил на фибробластите след препрограмирането бяха изследвани чрез PCR анализ на ендогени *oct4* и *nanog* и имунофлуоресцентно оцветяване на маркери за плюрипотентно състояние (OCT4, SOX2, KLF4, NANOG, TRA-1-60, SSEA4).

- **PCR анализ на ендогени *oct4* и *nanog***

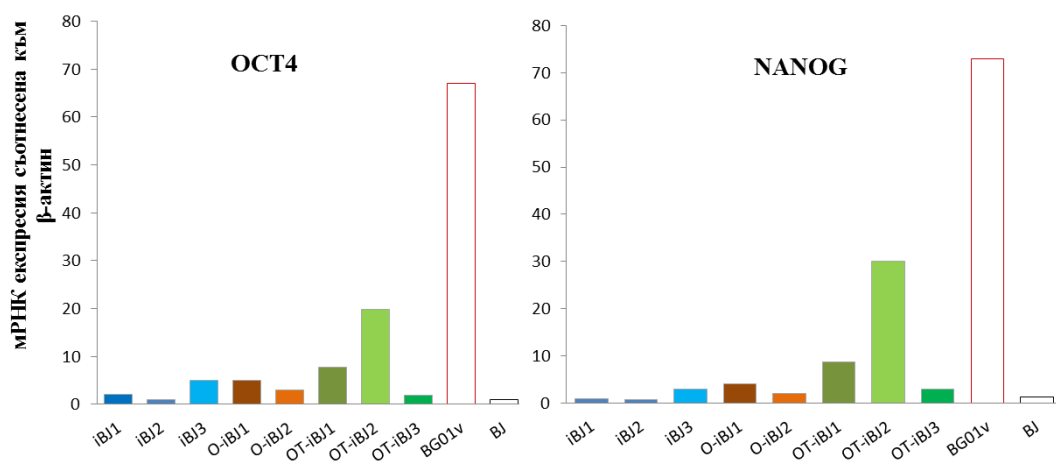
Количествената експресия на мРНК-*oct4* и мРНК-*nanog* беше изследвана в клонове, получени от клетки на различен етап от селекцията: iBJ1, iBJ2 и iBJ3-произхождат от клетки преди антибиотичната селекция, O-iBJ1 и O-iBJ2 – получени след антибиотична селекция за *oct4* трансген и OT-iBJ1, OT-iBJ2 и OT-iBJ3, преминали през всички селекции (Фиг. 8). Преди вземане на пробите от посочените по-горе клетъчни клонове, не бяха установени промени по отношение на морфологията на клетките и колониите. Всички проби бяха събрани до 14 дни след механичното прехвърляне на изходните колонии за съответните клонове.

Минимално количество на мРНК-*oct4* и мРНК-*nanog* беше детектирано в изследваните клетки, включително и във фибробластните клетки (BJ). При iBJ1 и iBJ2 нивата на мРНК-*oct4* и мРНК-*nanog* бяха близки до тези на изходните фибробласти

(ВJ). Клонът от неселектирани клетки с най-високи нива на мРНК-*oct4* и мРНК-*nanog* беше iBJ3.

Клетките, селектирани според експресия на трансген *OCT4*, показаха сходни нива на ендогени мРНК-*oct4* и мРНК-*nanog* с изходните. Този резултат е показателен, че селекцията само според *OCT4* не е достатъчна за изолиране на индуцирани плурипотентни клетки.

Клетките, селектирани като позитивни за *oct4* трансген и TRA-1-60, бяха с най-голяма промяна по отношение на експресията на двата изследвани ендогена. Най-значително повишаване на ендогенната експресия и на двата транскрипционни фактора беше установено при клон OT-iBJ2.



Фигура 8. Определяне на количеството синтезирани мРНК за ендогени *oct4* и *nanog* в клонове от препрограмирани фибробласти, BG01v и фибробластни клетки.

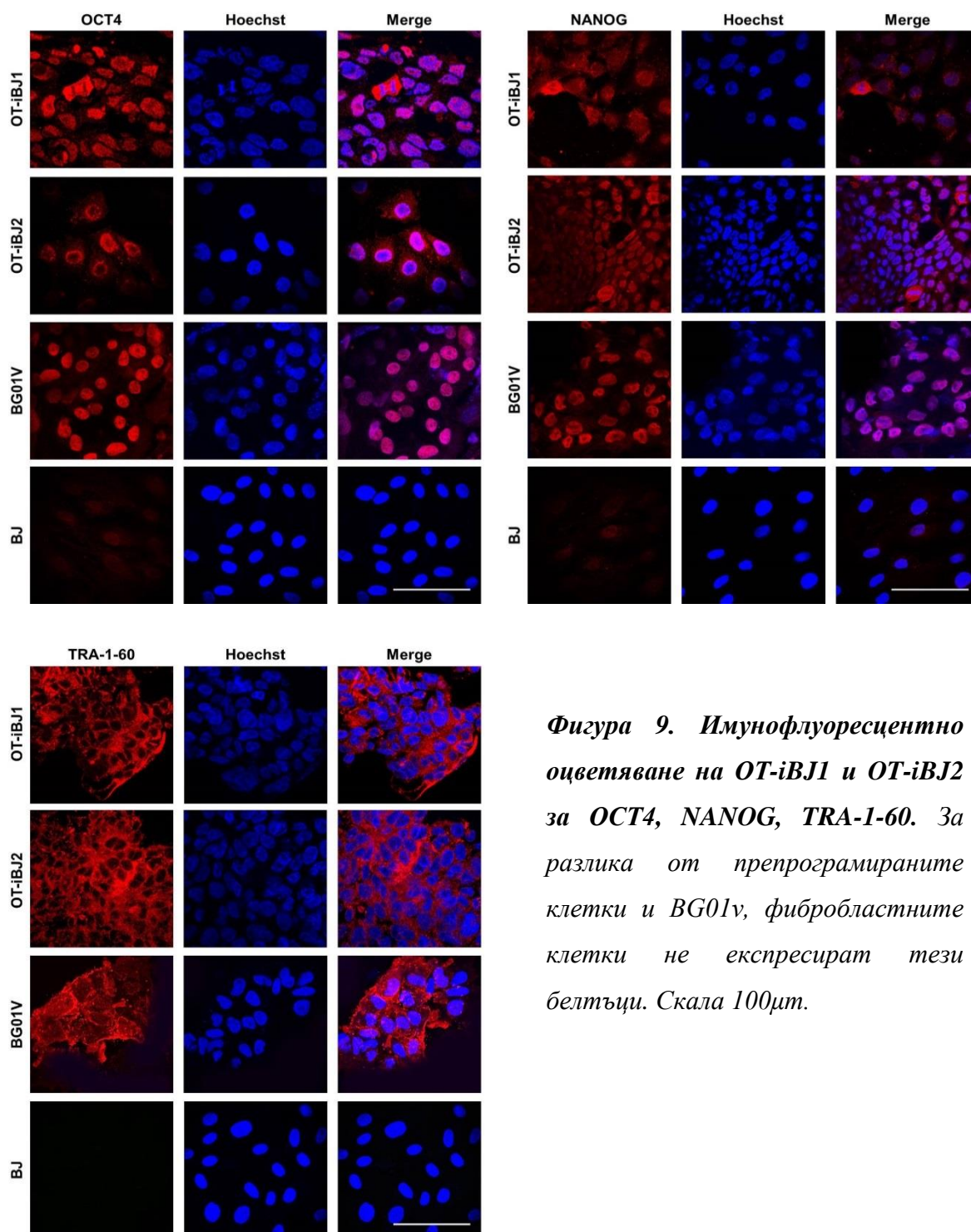
- **Фенотипна характеристика**

Непосредствено след PCR анализ, клетките от клоновете OT- iBJ1 и OT- iBJ2, в които беше детектирано най-голямо повишение на количество мРНК-*oct4* и мРНК-*nanog*, бяха изследвани чрез имунофлуоресцентно оцветяване за експресия на *OCT4*, *NANOG* и TRA-1-60. Това оцветяване беше направено 55 дни след инфекцията. С него беше доказана експресията на *OCT4* и при двата изследвани клона и липса на такава в BJ клетките (Фиг. 9). По отношение на *NANOG* беше установена експресия както в клетките от OT-iBJ2, така и във фибробластните клетки (Фиг. 9). При клон OT-iBJ1,

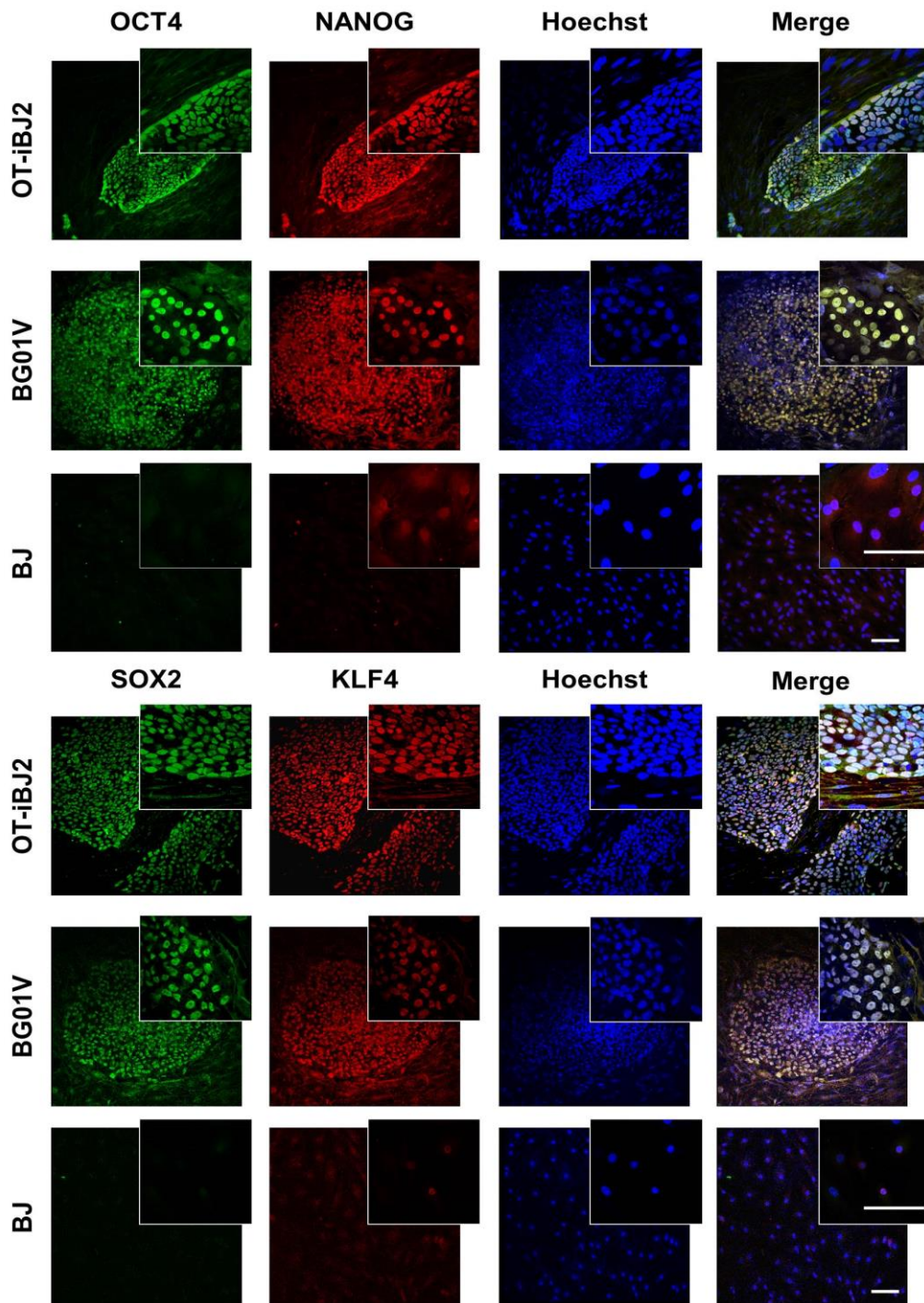
позитивни за NANOG, бяха само делящите се клетки. Повърхностният антиген TRA-1-60 беше детектиран при клетките от двата клона, но не и във фибробластите (Фиг. 9).

Наличието на OCT4, NANOG и TRA-1-60 не е доказателство, че клетките са напълно препрограмирани. Потвърждение за това е запазването на експресията на плурипотентните фактори след продължително култивиране. Ето защо клетките бяха култивирани още три месеца (170 дни след инфекцията) и отново беше изследвана експресията на плурипотентните маркери. Заедно с OCT4 и NANOG, клетките от OT-iBJ2 бяха оцветени и за SOX2, KLF4 и SSEA4 (Фиг. 10).

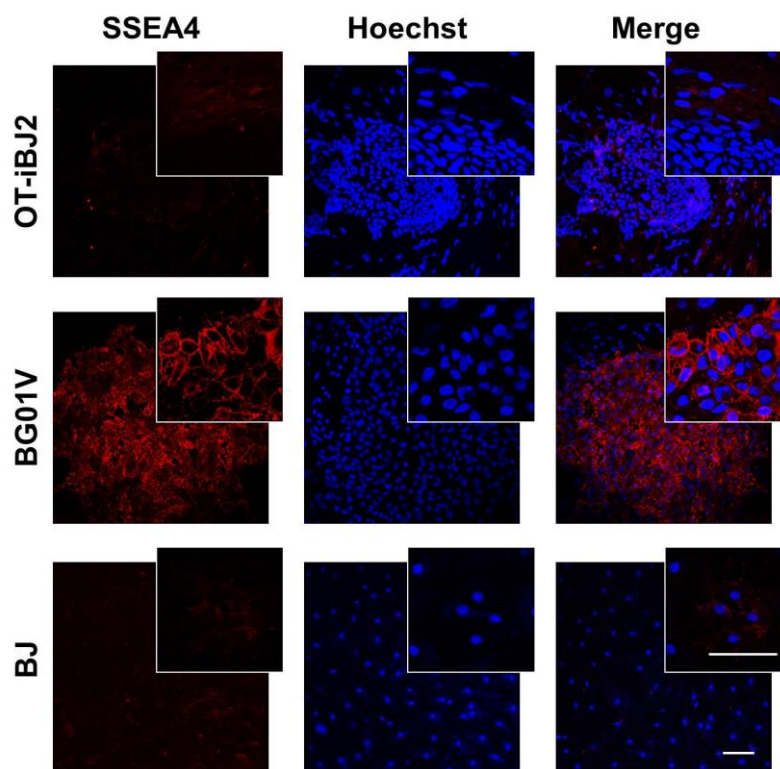
Ядрената експресия на OCT4, SOX2, KLF4, NANOG и мембранната на SSEA4 е ясно видима при положителната контрола (BG01v). Клетки от клон OT-iBJ2 бяха позитивни за OCT4, SOX2, KLF4, NANOG, но не и за SSEA4. При BJ клетките беше установена експресия на NANOG и KLF4, която беше видима само на голямо увеличение (Фиг. 10). За разлика от оцветяването на 55 ден, където беше наблюдавана слаба експресия на NANOG в OT-iBJ2, на 170 ден тя беше ясно видима в ядрата на клетките.



Фигура 9. Имунфлуоресцентно оцветяване на OT-iBJ1 и OT-iBJ2 за OCT4, NANOG, TRA-1-60. За разлика от препрограмираниите клетки и BG01v, фибробластните клетки не експресират тези белтъци. Скала 100µm.



Фигура 10. (Легендата е на следващата страница).



Фигура 10. Иммунофлуоресцентно оцветяване на OT-iBJ2, BG01v и BJ клетки за OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 и SSEA4. BG01V са контроли за плюрипотентни клетки, а BJ са контроли за експресионния профил на клетките преди препрограмирането. Скала 100µm.

3. Повишаване продукцията на иПСК чрез епигенетични модулатори

Описаните по-горе експерименти, макар и да доведоха до изолиране на клетки с плюрипотентни характеристики, показаха ниска ефективност на препрограмиране. Тази ниска ефективност е един от основните недостатъци на методиката за продукция на иПСК. Един от начините за повишаване на ефективността на препрограмиране на соматични клетки е, чрез епигенетични модулатори. Те могат да контролират генната експресия на различни нива, например чрез ДНК метилиране, хистонови модификации, ремоделиране на хроматина, микроРНК и други некодирани регулаторни РНК. Използването на инхибитори на мутаген активни кинази PD0325901 улеснява подборът на колонии от успешно препрограмирани клетки (Shi et al. 2008b). VIX-01294, който е инхибитор на G9a хистонова метилтрансфераза, може да повиши препрограмирането на миши нервни прогениторни клетки трансдуцирани с OCT4 и KLF4 (Shi et al. 2008a). Ваук (агонист на L тип калциев канал) и RG108 (ДНК метилтрансферазен инхибитор)

действат синергично с VIX-01294 и водят до повишаване на продукцията на иПСК (Shi et al. 2008b). ДНК-метилтрансферазните инхибитори 5-азациитидин и валпроевата киселина повишават ефективността на препрограмиране след трансфекция на миши ембрионални фибробласти с OCT4, SOX2, KLF4 и C-MYC (Huangfu et al. 2008b, Mikkelsen et al. 2008). Третирането с 5-азациитидин или валпроева киселина повишава продукцията на иПСК в отсъствие на C-MYC (Huangfu et al. 2008b, Mikkelsen et al. 2008).

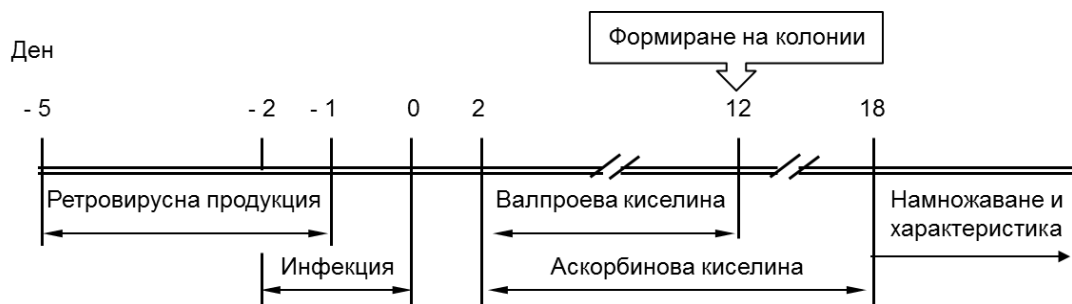
При част от експериментите за препрограмиране на човешки фибробласти използвахме хистон деацетилазен инхибитор – валпроева киселина в комбинация с антиоксидант аскорбинова киселина

- ***Препрограмиране на човешки фибробластни клетки в присъствие на валпроева и аскорбинова киселини***

Валпроевата киселина влияе положително върху ядреното препрограмиране (Huangfu et al. 2008b). Има данни, че повишава ефективността на препрограмиране на човешки фибробласти около 1% над тази, получена при инфекция само с транскрипционни фактори OCT4, SOX2 и KLF4 (Huangfu et al. 2008a). Според научната литература тя има цитотоксичен ефект върху клетките (Jurima-Romet et al. 1996) и може да предизвика оксидативен стрес (Na et al. 2003). Установено е, че при култивирането на различни типове соматични клетки, включително и фибробласти, в тях се натрупват свободни радикали в резултат на клетъчния метаболизъм (Parrinello et al. 2003). За да бъде намалено количеството на свободните радикали по време на препрограмирането на миши и човешки клетки, Esteban и сътрудници (2010) добавят аскорбинова киселина към културалната среда на клетките. Те не успяват да изяснят механизма на действие на тази киселина, но посочват, че при нейното добавяне се повишава ефективността на препрограмиране (Esteban et al. 2010).

На фигура 11 е представена схема на препрограмиране на фибробластни клетки в присъствие на валпроева и аскорбинова киселини. Ретровирусите бяха продуцирани както при описаните по-горе експерименти, след това бяха концентрирани и с тях бяха инфектирани фибробластните клетки (две инфекции през 24 часа). Инфектираните фибробласти бяха култивирани в присъствие на 0.5 mM VPA от втори ден след инфекцията до появата на първите отличими колонии (дванадесети ден).

Аскорбиновата киселина беше добавена в концентрация 50 mg/ml от пети до осемнадесети ден след инфекцията.



Фигура 11. Схема на препрограмиране на човешки фибробластни клетки и последващо култивиране в присъствие на валпроева и аскорбинова киселина.

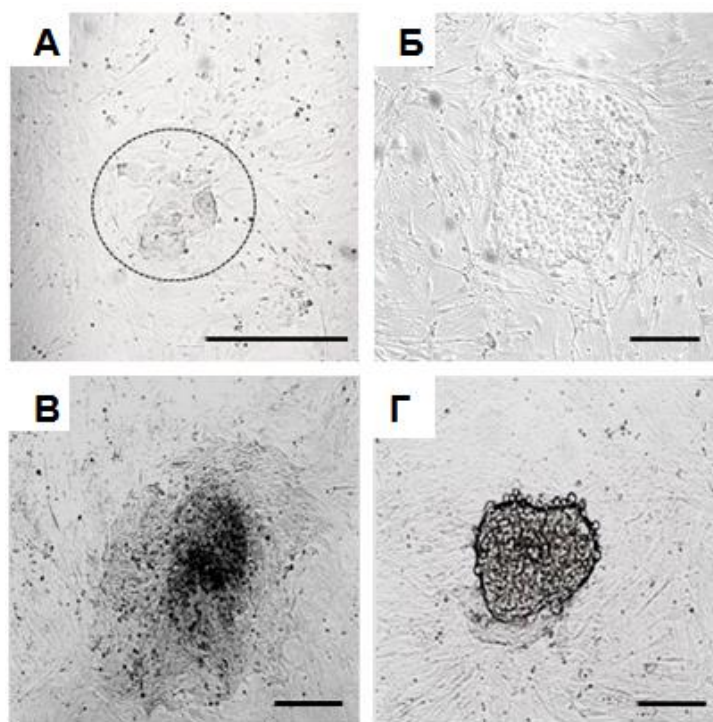
- **Характеристика на препрограмираните клетки**

Морфология

Първите колонии от препрограмирани клетки бяха установени 10-12 дни след инфекцията (Фиг. 12А). Четиринадесет дни след инфекцията бяха преброени 22 колонии. Този брой съставляше 0.04% от трансдуцираните 50000 клетки. След още четири дни бяха наблюдавани ясно отличими разлики в морфологията на колониите. Въз основа на морфологичните характеристики колониите бяха разделени на две групи: плоски колонии, ясно ограничени от МЕФ (Фиг. 12Б) и колонии с неясни и неравни очертания, които нарастват във височина (Фиг. 12В). Двата типа колонии бяха съставени от активно делящи се клетки, поради което колониите нарастваха бързо. При растежа си плоските колонии изместваха разположените около тях клетки, и така се оформяше ясна граница между тях и подхранващите клетки (Фиг. 12Б). Колониите с неравномерни граници нарастваха значително във височина (Фиг. 12В, Г.), в резултат на което се образуваха кълбовидни струпвания от диференцирани клетки (Фиг. 12Г).

Двадесет дни след инфекцията бяха преброени 31 добре ограничени колонии, от което беше определена ефективност на препрограмиране 0.06%. Колониите с неравни

граници бяха 47. Те не бяха включени при изчисляване на ефективността на препрограмиране.

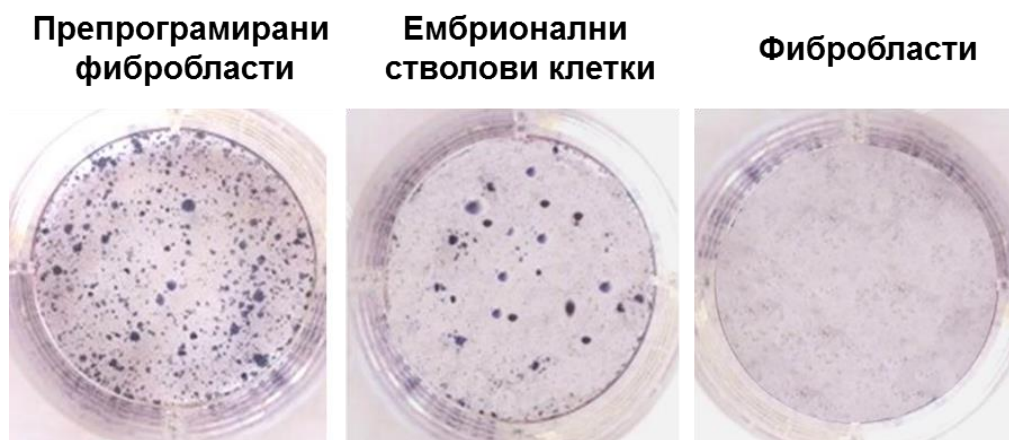


Фигура 12. Морфология на колонии от препрограмирани фибробласти. (А) Първи колонии от препрограмирани клетки 12 дни след инфекцията. (Б) Компактна колония, ясно ограничена от подхранващите клетки, 18 дни след инфекцията. (В) Колония от клетки с триизмерен растеж, който е белег за диференциация, 18 дни след инфекцията. (Г) Струпване от диференцирани клетки, 20 дни след инфекцията. Скала 200µm.

Алкално-фосфатазна активност

Алкално-фосфатазната активност беше изследвана на 20 ден след инфекцията (Фиг. 13). Колониите от препрограмирани фибробласти бяха позитивни за алкална фосфатаза също както ЕСК, за разлика от тях контролните непретрограмирани клетки бяха негативни.

Бяха подбрани плоски колонии с ясни граници (Фиг. 12Б) и пренесени механично. От тях произлизат клонове VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3 и т.н.



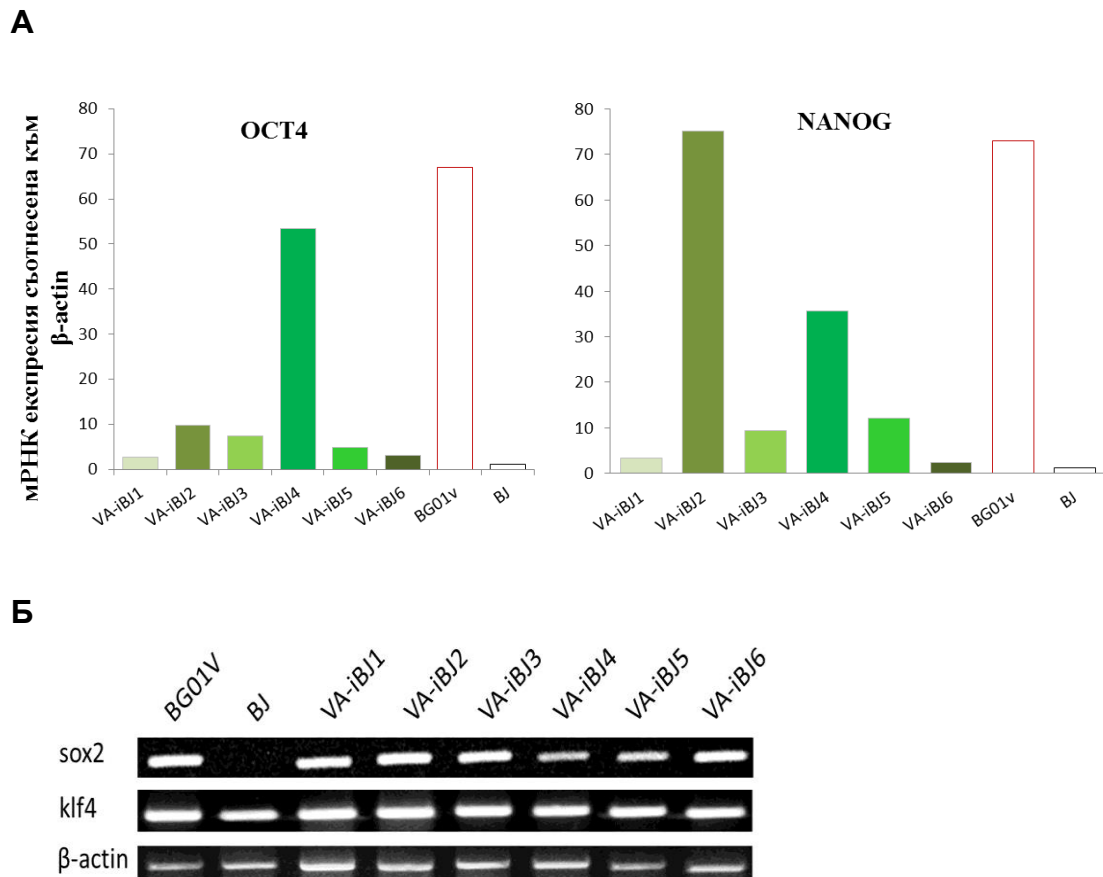
Фигура 13. Оцветяване за алкална фосфатаза на фибробластни клетки 20 дни след инфекцията, ембрионални стволови клетки и неинфектирани фибробласти.

Експресия на плурипотентни маркери

Опитът от описаните вече експерименти за получаване и изолиране на иПСК показва, че тестирането за плурипотентните маркери след продължително култивиране на клетките е показателно както за настъпило препрограмиране, така и за стабилна експресия на тези белтъци в изследваните клонове. Ето защо при този експеримент, експресията на плурипотентните маркери беше изследвана след продължително култивиране (най-малко три месеца).

Изследването на мРНК за ендогени *OCT4* и *NANOG* показва по-големи количества препрограмирани клетки в сравнение с изходните фибробласти (Фиг. 14А). Не беше установена закономерност в количествените изменения на мРНК за ендогени *OCT4* и *NANOG* при изследваните клонове. При едни клонове беше повишено значително количеството на мРНК-*OCT4*, докато при други – това на мРНК-*NANOG*. Това повишение варираше в граници от 3 до 50 пъти за мРНК-*OCT4* и от 3 до 75 пъти за мРНК-*NANOG*. Най-голямо повишение и за двата типа мРНК имаше при VA-iBJ4, а при VA-iBJ2 нивото на мРНК-*NANOG* се приближаваше в най-висока степен до това в ембрионалните стволови клетки.

Информация за синтез на мРНК-SOX2 и мРНК-KLF4 беше получена от полуколичествения PCR анализ (Фиг. 14Б). Беше установено наличие на мРНК-SOX2 в препрограмираниите клетки, което е резултат от настъпилите изменения в клетките по време на препрограмиранието. По отношение на мРНК-KLF4 бяха установени сходни количества в препрограмирани и изходни клетки.



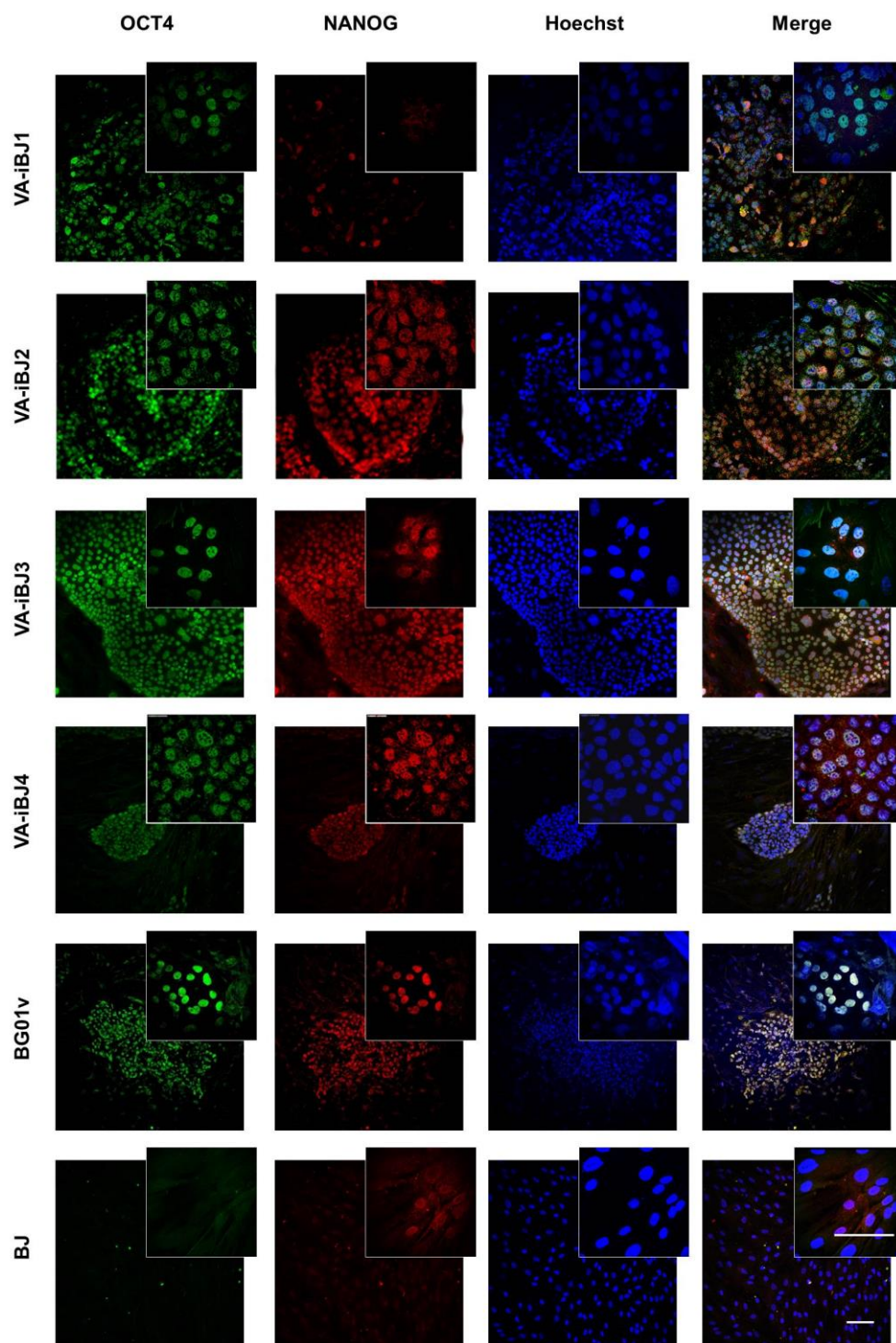
Фигура 14. PCR анализ на препрограмирани фибробласти в присъствие на валпроева и аскорбинова киселина. (А) Количествен PCR за мРНК-OCT4 и мРНК-NANOG; (Б) полуколичествен PCR за мРНК-SOX2 и мРНК-KLF4.

Фенотипната изява на плюрипотентни маркери OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 и SSEA4 беше изследвана чрез имунофлуоресцентно оцветяване (Фиг. 15-17). Резултатите от имунофлуоресцентното оцветяване са обобщени в таблица 1.

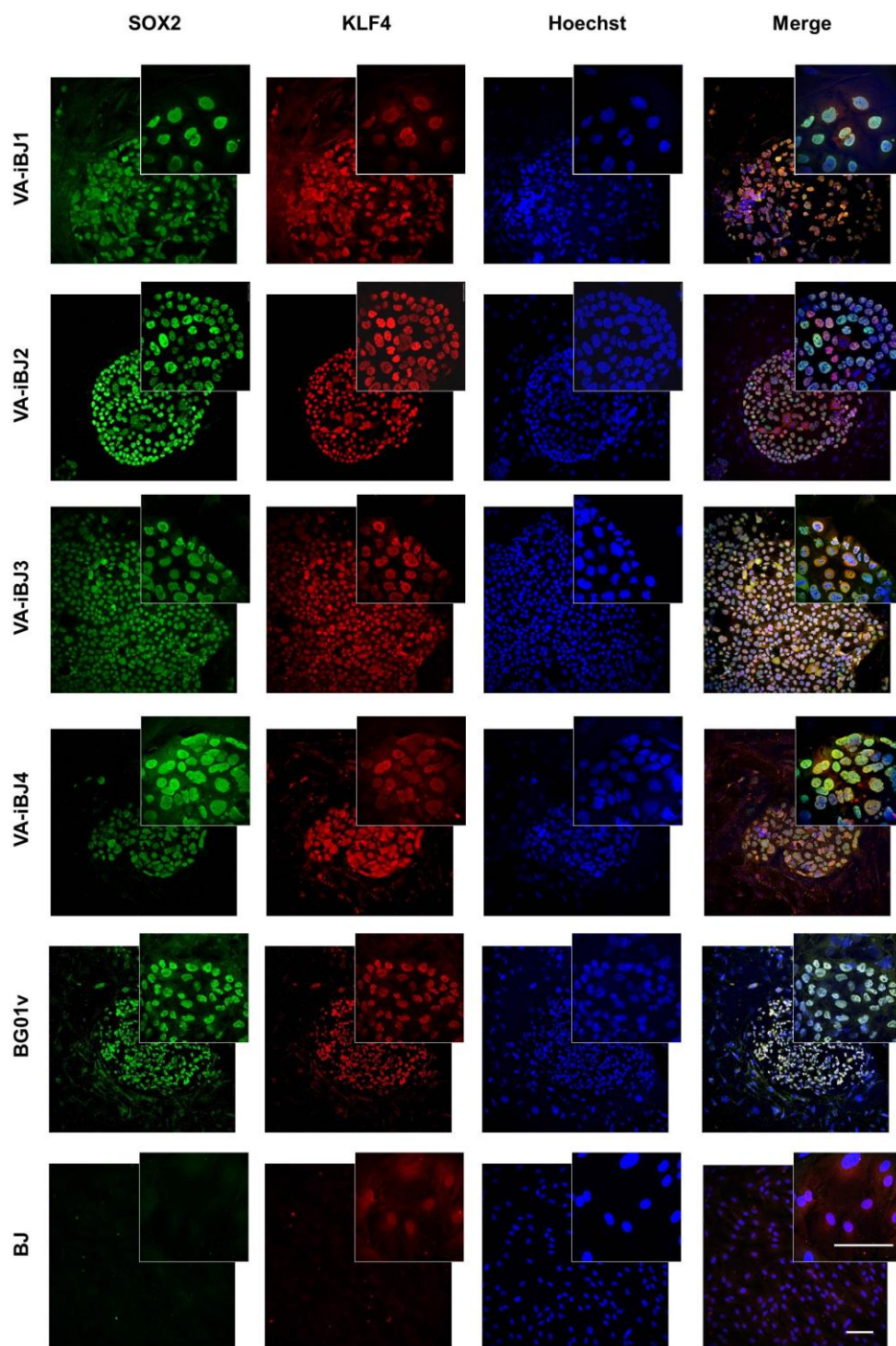
В клонове VA-iBJ2, VA-iBJ3 и VA-iBJ4 беше детектирана експресия на всички изследвани плюрипотентни маркери. В VA-iBJ1 не беше установен белтък NANOG.

Таблица 1. Обобщена фенотипна характеристика. Представя резултати от имунофлуоресцентното оцветяване от фигури 15-17. Случаите, при които експресията се наблюдава при двете увеличения (10x и 40x) са обозначени с “+/+”. Тези, при които е видима само при голямо увеличение с “-/+”. Там, където няма експресия с “-”.

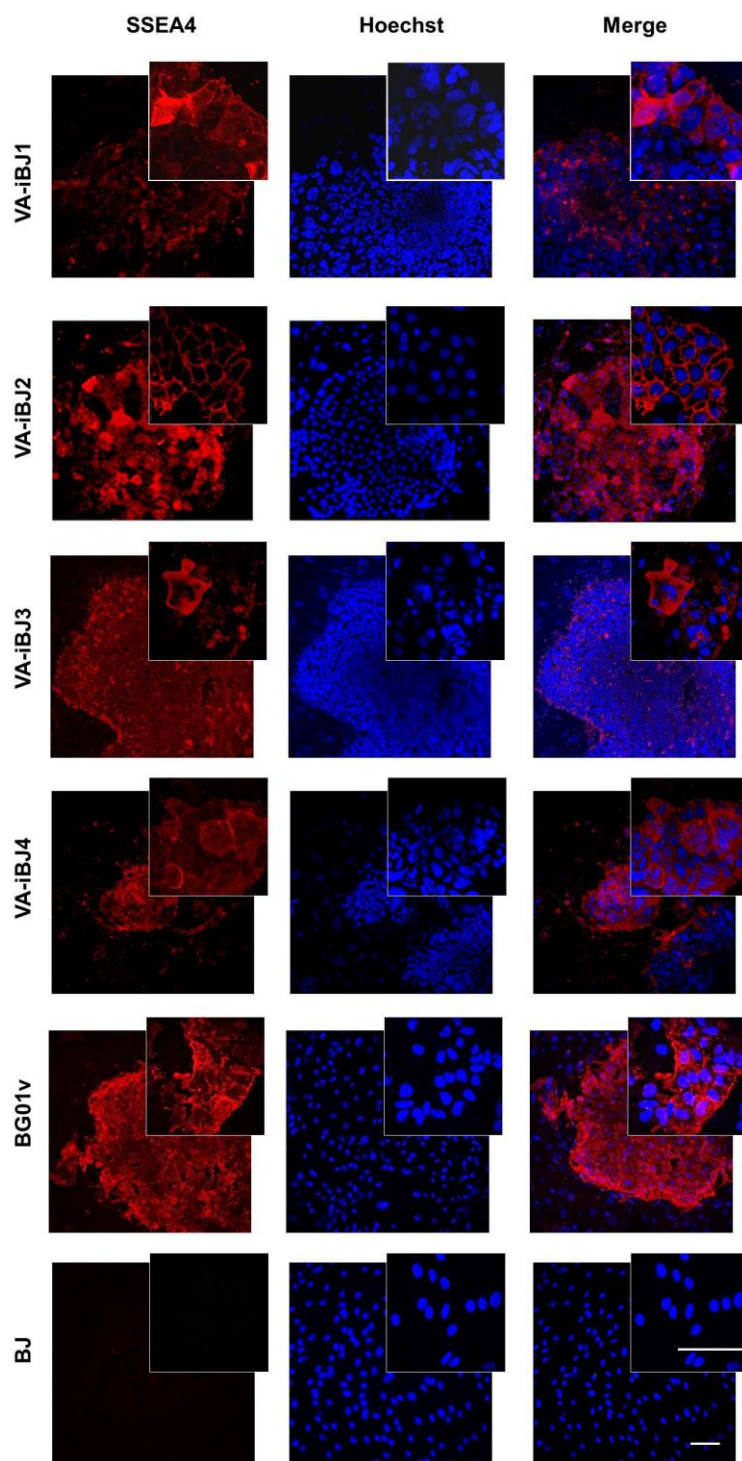
Маркери Клетки	OCT4	NANOG	SOX2	KLF4	SSEA4
VA-iBJ1	+/+	-	+/+	+/+	+/+
VA-iBJ2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
VA-iBJ3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
VA-iBJ4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BG01v	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BJ	-	-/+	-	-/+	-



Фигура 15. Имунфлуоресцентно оцветяване на VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3 и VA-iBJ4 клетки за OCT4 и NANOG. BG01v са контроли за плюрипотентни клетки, а BJ за експресионния профил на клетките преди препрограмирането. Скала 100µm.



Фигура 16. Иммунофлуоресцентно оцветяване на VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3 и VA-iBJ4 клетки за SOX2 и KLF4. BG01v са контроли за плурипотентни клетки, а BJ за експресионния профил на клетките преди препрограмирането. Скала 100µm.



Фигура 17. Имунфлуоресцентно оцветяване на VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3 и VA-iBJ4 клетки за SSEA4. BG01v са контроли за плюрипотентни клетки, а BJ за експресионния профил на клетките преди препрограмирането. Скала 100µm.

4. *In vitro* диференциация на препрограммираните клетки

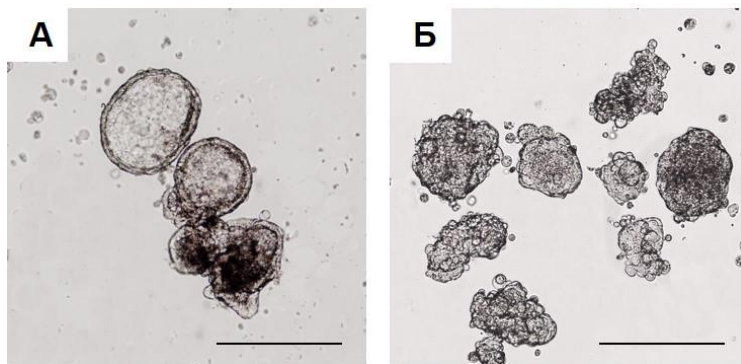
Диференциационният потенциал на плурипотентните клетки може да се изследва *in vitro* и *in vivo*. Въпросът за необходимостта от прилагане на *in vivo* тестове е изключително оспорван, като част от работните групи смятат, че тестирането *in vitro* е напълно достатъчно. Обратно, техните опоненти твърдят, че поведението на клетките в лабораторни условия се различава съществено от това *in vivo*.

В нашата работа използвахме *in vitro* тест за доказване на диференциация. Тестът включва култивиране на колониите от препрограммирани клетки в суспензия под формата на агрегати - ембрионни телца (ЕТ). При тези условия плурипотентните клетки в ЕТ се диференцират спонтанно в различни клетъчни типове или към определен клетъчен тип при култивиране в диференцираща среда (Itskovitz-Eldor et al. 2000).

В получените ЕТ се наблюдаваше хетерогенност по отношение на форма и размери (фиг.18). Размерът на ЕТ може да бъде уеднаквен, ако те се получават във всяка капка (Keller 1995). Този протокол дава възможност за контролиране на броя на агрегираните в капката клетки. Независимо от избрания протокол за получаване на ЕТ, настъпилата диференциация в тях трябва да се потвърди чрез имунофлуоресцентно оцветяване за диференциационни маркери.

При доказването на диференциация се използват разнообразни комбинации от диференциационни маркери. Например: β III-тубулин, GFAP (Glial fibrillary acidic protein), SMA (smooth muscle actin), DESMIN, SOX17, AFP (Huangfu et al. 2008a), AFP, β III-тубулин, CD34 (Mali et al. 2010), α -ACTININ, DESMIN, NESTIN, AFP (Shao et al. 2013) и други.

След 30 дни култивиране ЕТ бяха прехвърлени в съдове, покрити с желатин, което позволи на струпванията да прилепнат върху дъното. Настъпилата диференциация в ЕТ беше анализирана чрез имунофлуоресцентно оцветяване за диференциационни маркери VIMENTIN, NESTIN, α -ACTININ, DESMIN, GATA4 и AFP. Положителна контрола бяха ЕТ от BG01v клетки, а отрицателна контрола на всяко от антителата - негативните клетки в ЕТ.



Фигура 18. Морфология на ET от препрограмирани клетки на 20 ден след формирането. (А) Цистични ET; (Б) Плътни ET. Скала 200μm.

NESTIN е маркер за доказване на нервни стволони клетки, хематопоеични прекурсорни клетки, а VIMENTIN - за глиални клетки и панкреатични прекурсорни клетки. Тези два маркера бяха подбрани за доказване на ектодермален произход. Експресията на VIMENTIN е установена също и в напречно-набраздени мускулни клетки, така че той може да се използва и като мезодермален маркер. Маркери за мезодерма са α -ACTININ (напречно-набраздени мускулни клетки) и DESMIN (гладкомускулни клетки и сърдечна мускулатура), а за доказване на ендодерма: GATA4 (зачатъчни ендодермални клетки) и AFP (висцерални ендодермални клетки).

На фигури 19-24 са представени резултатите от имунофлуоресцентното оцветяване на клетки от клонове OT-iBJ2, VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3 и VA-iBJ4. Както се вижда, при положителната контрола (ET от BG01v) всички анализирани белтъци са с вътреклетъчна експресия. VIMENTIN, NESTIN, α -ACTININ, DESMIN и AFP са локализирани в цитоплазмата на клетките, а GATA4 е с ядрена локализация.

Ектодермалният маркер NESTIN беше установен във всички клонове като най-голямо количество позитивни клетки - 60% бяха наблюдавани в OT-iBJ2 и VA-iBJ4. При останалите четири клона NESTIN позитивните клетки бяха около 20-30%. Те бяха разположени на групи в различни части на ET (Фиг. 19).

VIMENTIN беше детектиран в цитоплазмата на клетки от петте клона (Фиг. 20). При OT-iBJ3 и OT-iBJ4 50% от клетките бяха позитивни, докато при останалите тяхното количество беше 30%. Основното количество позитивни клетки бяха концентрирани в крайните участъци на прилепналите ET. Там са разположени онези

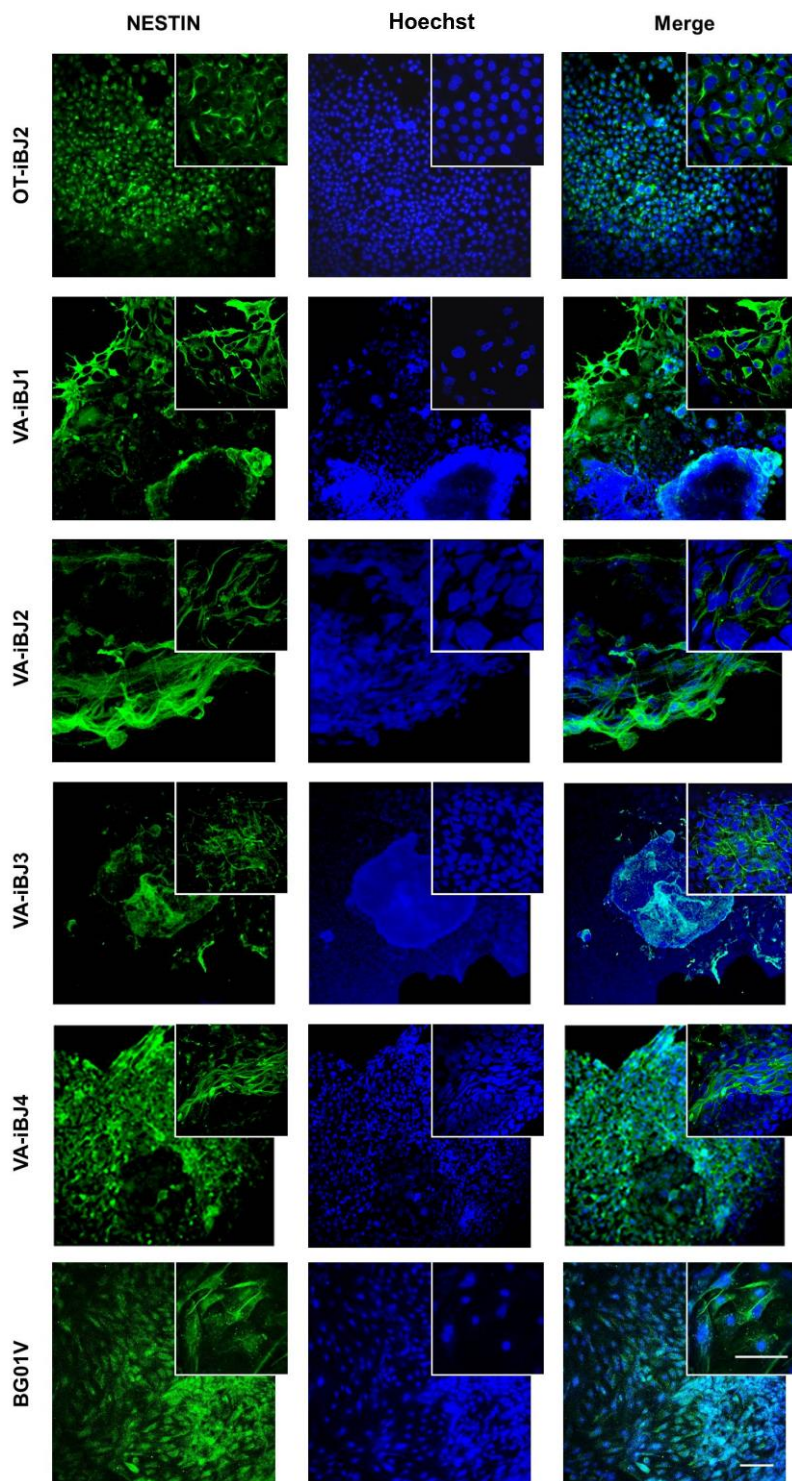
клетки, които използват от ЕТ след прилепването им към желатин-покритите повърхности.

Мезодермалният маркер α -ACTININ беше установен в 20% от клетките във всички клонове, като най-малко позитивни клетки имаше при OT-iBJ2 и VA-iBJ2 (Фиг. 21).

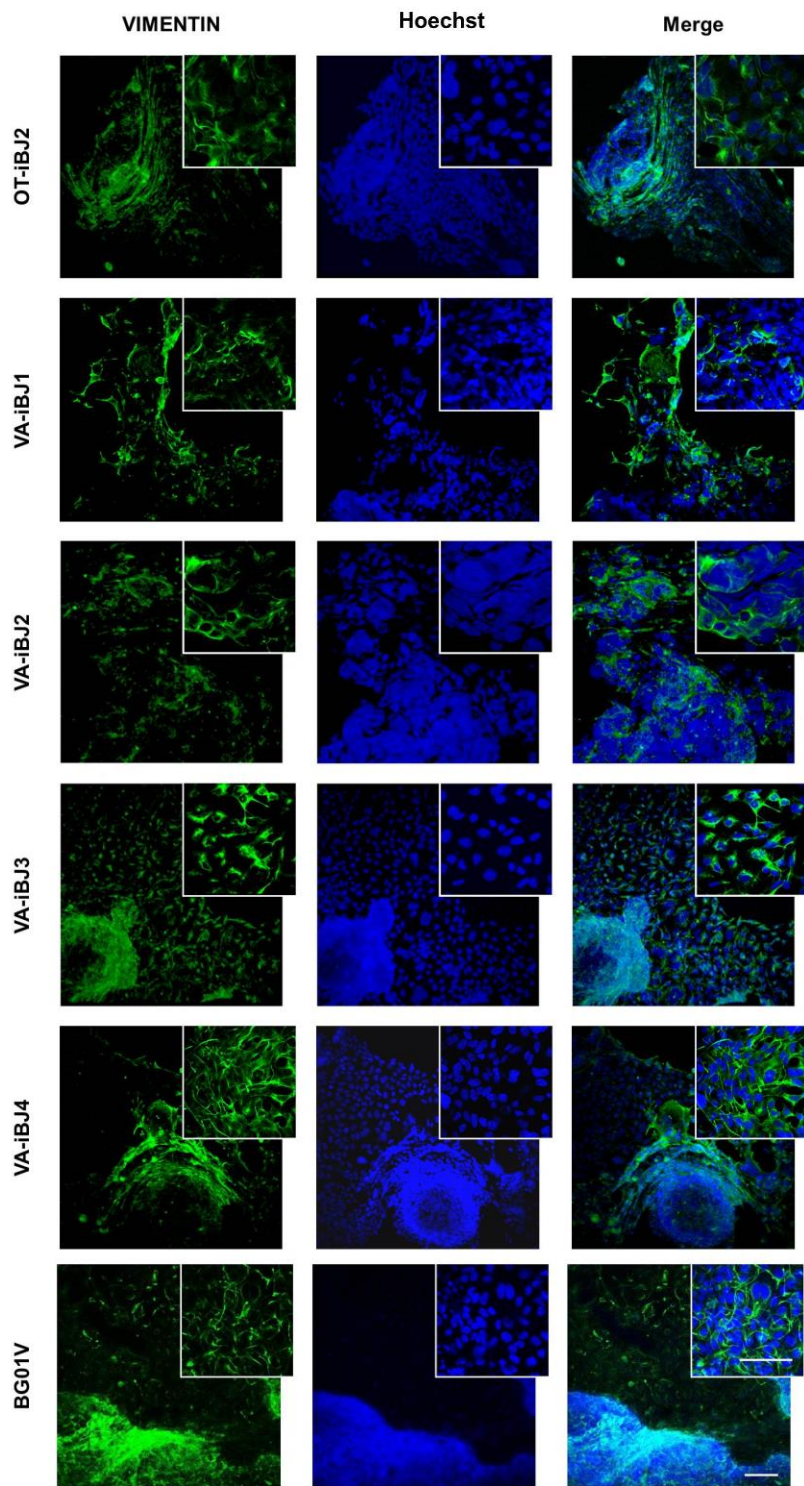
DESMIN, беше локализиран около ядрото на клетките. При всички анализирани ЕТ маркерът беше експресиран в периферно разположените клетки, като около 50-60% от тях бяха позитивни при всички клонове (Фиг.22).

Около 20% от клетките във всички клонове са позитивни за AFP. Най-слаба експресия на този ендодермален маркер беше наблюдавана при VA-iBJ2 и то само в 10% от клетките (Фиг. 23).

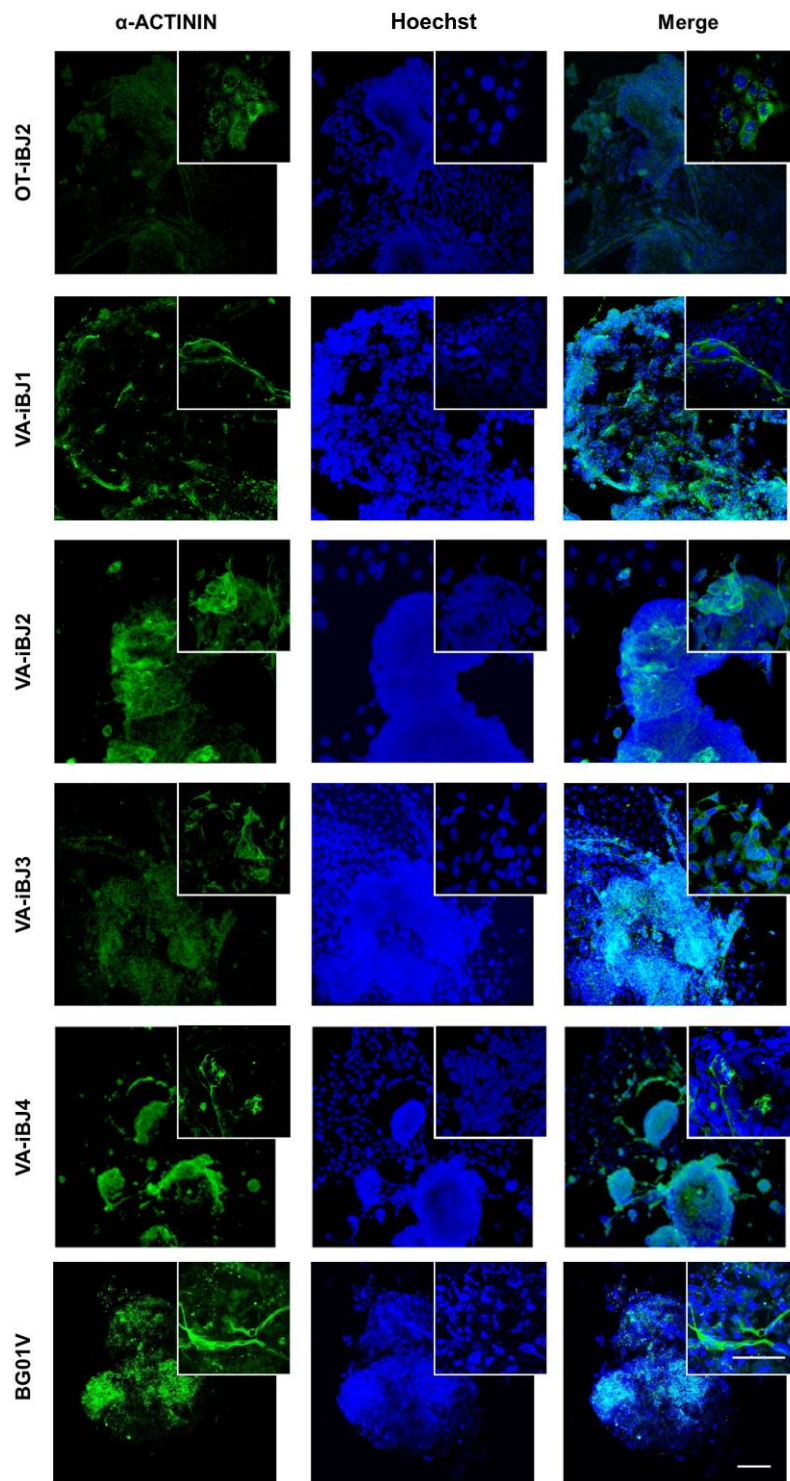
Транскрипционен фактор GATA4 беше установен в около 70% от клетките на OT-iBJ2, VA-iBJ3 и VA-iBJ4. При VA-iBJ2 експресията беше наблюдавана в 10% от клетките (Фиг. 24).



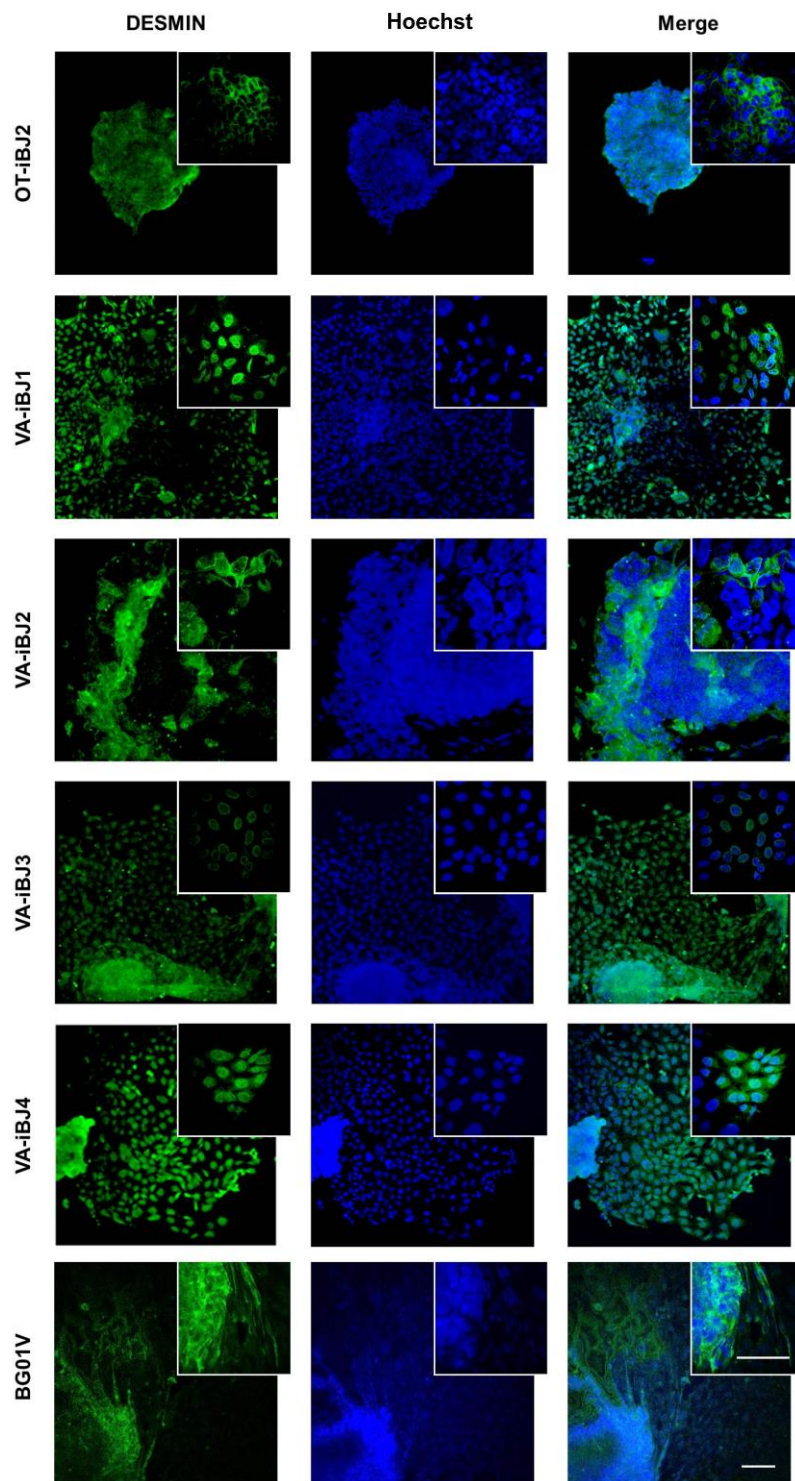
Фигура 19. Имуноресцентно оцветяване на ЕТ от *OT-iBJ*, *VA-iBJ1*, *VA-iBJ2*, *VA-iBJ3*, *VA-iBJ4* и *BG01v* за експресия на *NESTIN*. Скала 100 μ m.



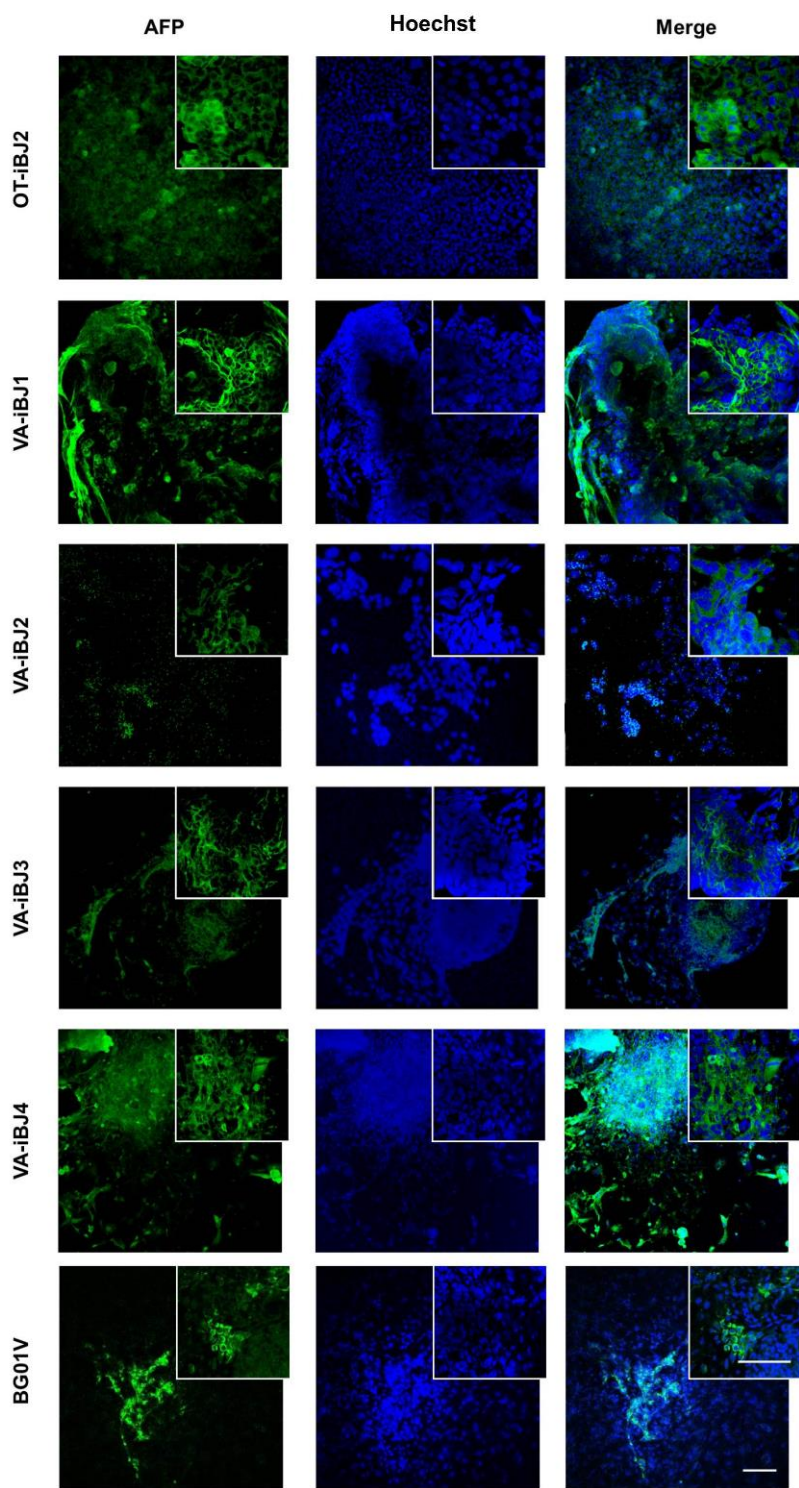
Фигура 20. Имунфлуоресцентно оцветяване на ЕТ от OT-iBJ, VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3, VA-iBJ4 и BG01v за експресия на VIMENTIN. Скала 100μm.



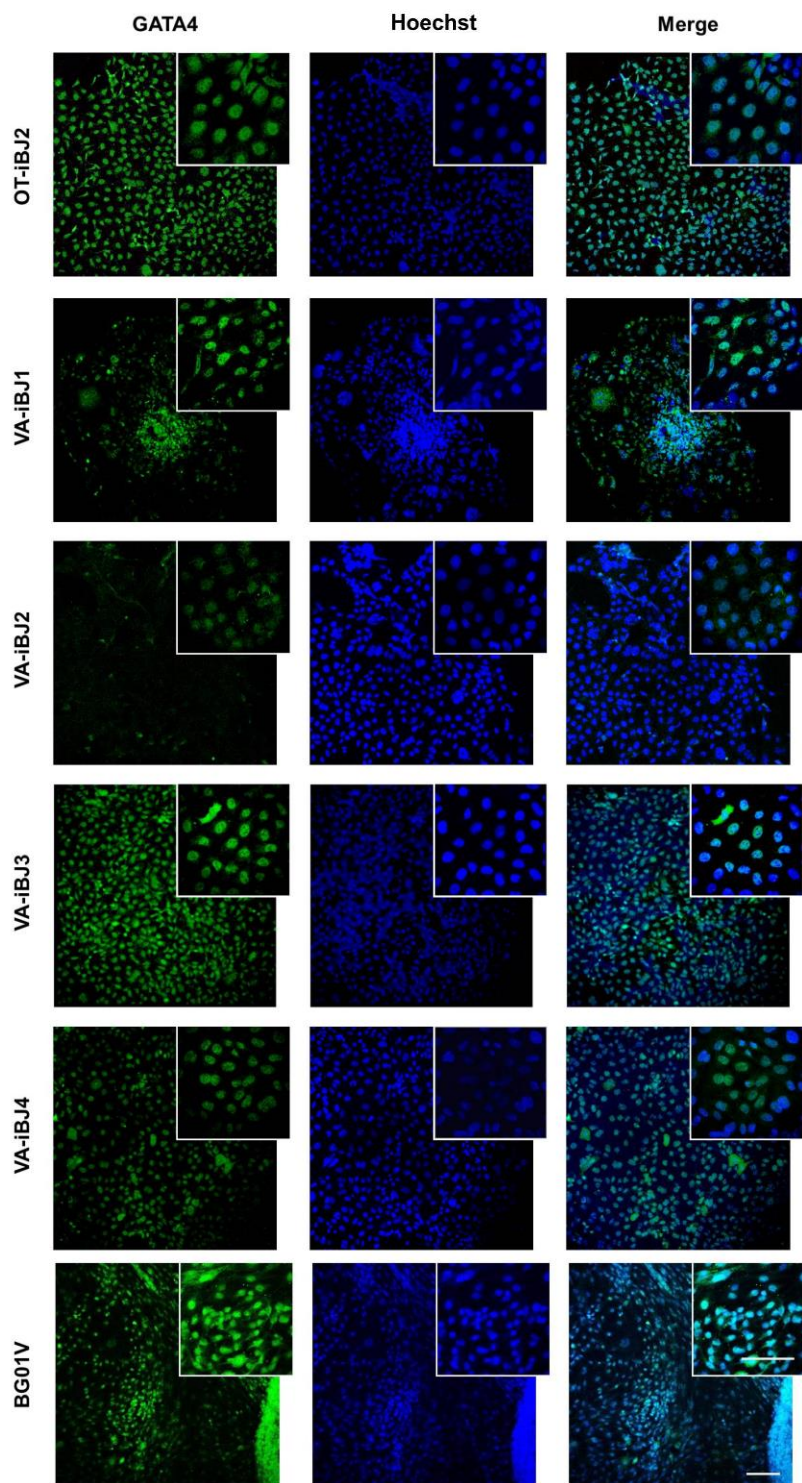
Фигура 21. Имуноресцентно оцветяване на ЕТ от OT-iBJ, VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3, VA-iBJ4 и BG01v за експресия на α -ACTININ. Скала 100 μ m.



Фигура 22. Имунофлуоресцентно оцветяване на ЕТ от *OT-iBJ*, *VA-iBJ1*, *VA-iBJ2*, *VA-iBJ3*, *VA-iBJ4* и *BG01v* за експресия на *DESMIN*. Скала 100 μ m.



Фигура 23. Иммунофлуоресцентно оцветяване на ЕТ от OT-iBJ, VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3, VA-iBJ4 и BG01v за експресия на AFP. Скала 100µm.



Фигура 24. Иммунофлуоресцентно оцветяване на ЕТ от OT-iBJ, VA-iBJ1, VA-iBJ2, VA-iBJ3, VA-iBJ4 и BG01v за експресия на GATA4. Скала 100μm.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведените експерименти бяха изолирани 18 клона от препрограмирани клетки. Пет от тях бяха характеризирани според експресия на плурипотентни маркери, способност за диференциация и идентифицирани като иПСК.

Използваните от нас подходи за препрограмиране съкращават времето за получаване и изолиране на иПСК. Смятаме, че въведените от нас промени в протоколите за препрограмиране и ранна селекция на иПСК водят до създаването на бърза и икономически изгодна процедура за получаване и подбор на индуцирани плурипотентни стволови клетки.

Понастоящем работата продължава с прилагане на установените протоколи за получаване на иПСК от фибробласти върху други типове соматични клетки. Вече са получени и частично характеризирани иПСК от мезенхимни стволови клетки, изолирани от мастна тъкан.

Друга, по-перспективна насока за бъдеща работа е директно препрограмиране на един тип соматични клетки към друг (трансдиференциация). Този препрограмиращ метод съкращава значително времето за получаване на желан тип диференцирани клетки, защото при него се прескача междинния стадий - плурипотентна стволова клетка. Получените специфични за пациента клетки не крият големия риск за индуциране на тумори както иПСК, тъй като не произлизат от стволови клетки. Един първоначален скрининг за определяне на клетъчни типове, които по-лесно могат да бъдат препрограмирани един в друг, ще даде възможност да се използват методи, които вредят минимално на клетките. Това ще ускори значително процеса на препрограмиране и изолиране на желанния клетъчен тип.

ИЗВОДИ

1. Селекцията според трансген *oct4* и експресия на мембранна молекула TRA-1-60 улеснява изолирането на препрограмирани клетки.
2. Епигенетичните модулатори (валпроева и аскорбинова киселина) повлияват положително препрограмирането на човешките фибробластни клетки.
3. Описаните протоколи за препрограмиране доведоха до получаване на индуцирани плурипотентни клетки.

ПРИНОСИ

1. Приложена е нова методика за подбор на препрограмирани клетки въз основа на експресията на трансген *oct4* и мембранна молекула TRA-1-60.
2. Оптимизирани са условията за получаване на индуцирани плурипотентни клетки от човешки фибробласти чрез култивиране на клетките в присъствие на валпроева и аскорбинова киселина.
3. Изолирани са 18 клона от препрограмирани клетки. Пет от тях са характеризирани според експресия на плурипотентни маркери и способност за диференциация като иПСК.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Е. Стоянова, М. Мурджева, С. Кюркчиев (2013) Стволови клетки и регенеративна медицина. Български медицински журнал. 2: 7-12.
2. E. Stoyanova, M. Mourdjeva, S. Kyurkchiev (2015) Early selection human fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 1-7, Published online: 11 Jun 2015, DOI: 10.1080/13102818.2015.1052015.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. E. Stoyanova, T. Oreshkova, M. Mourdjeva, S. Kyurkchiev (2012) Generation of induced pluripotent stem cells from fibroblasts and adipose mesenchymal stem cells. 13th International Symposium of Immunology of Reproduction, 22-24 June 2012, Varna, Bulgaria. Published in *AJRI*, 2012, 67, Issue Supplement s1, i-xxii. ISSN 8755-8920, Online ISSN: 1046-7408. IF: 3.317. **Special “Prof. Hans Donat” Award** - Постер
2. Е. Стоянова (2014) Получаване на индуцирани плурипотентни стволови клетки. Научна сесия с международно участие, посветена на 70-годишнината на Съюза на учените в България, 31 октомври 2014 г., Пловдив, България - Доклад
3. E. Stoyanova, M. Mourdjeva, S. Kyurkchiev (2015) Valproic and ascorbic acid enhance generation of fibroblast-derived iPSC. 14th International Symposium of Immunology of Reproduction, 22-24 May 2015, Varna, Bulgaria. Published in *AJRI*, 2015, 73, Issue Supplement 1 - Постер

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. **Aasen, T.;A. Raya;M. J. Barrero;E. Garreta;A. Consiglio;F. Gonzalez;R. Vassena;J. Bilic;V. Pekarik;G. Tiscornia;M. Edel;S. Boue and J. C. Izpisua Belmonte. 2008.** Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology* 26: 1276-1284.
2. **Armstrong, L.;K. Tilgner;G. Saretzki;S. P. Atkinson;M. Stojkovic;R. Moreno;S. Przyborski and M. Lako. 2010.** Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem cells* 28: 661-673.
3. **Brambrink, T.;R. Foreman;G. G. Welstead;C. J. Lengner;M. Wernig;H. Suh and R. Jaenisch. 2008.** Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell* 2: 151-159.
4. **Dicker, A.;K. Le Blanc;G. Estrum;V. van Harmelen;C. Gutherstrum;L. Blomqvist;P. Arner and M. Rydén. 2005.** Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental Cell Research* 308: 283-290.
5. **Esteban, M. A.;T. Wang;B. Qin;J. Yang;D. Qin;J. Cai;W. Li;Z. Weng;J. Chen;S. Ni;K. Chen;Y. Li;X. Liu;J. Xu;S. Zhang;F. Li;W. He;K. Labuda;Y. Song;A. Peterbauer;S. Wolbank;H. Redl;M. Zhong;D. Cai;L. Zeng and D. Pei. 2010.** Vitamin c enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 6: 71-79.
6. **Huangfu, D.;K. Osafune;R. Maehr;W. Guo;A. Eijkelenboom;S. Chen;W. Muhlestein and D. Melton. 2008a.** Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only oct4 and sox2. *Nature biotechnology* 26: 1269 - 1275.
7. **Huangfu, D. W.;R. Maehr;W. J. Guo;A. Eijkelenboom;M. Snitow;A. E. Chen and D. A. Melton. 2008b.** Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature biotechnology* 26: 795-797.
8. **Itskovitz-Eldor, J.;M. Schuldiner;D. Karsenti;A. Eden;O. Yanuka;M. Amit;H. Soreq and N. Benvenisty. 2000.** Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine* 6: 88-95.
9. **Jin, G. P.;Z. Y. Chang;H. R. Scholer and D. Pei. 2002.** Stem cell pluripotency and transcription factor oct4. *Cell research* 12: 321-329.
10. **Jurima-Romet, M.;F. S. Abbott;W. Tang;H. S. Huang and L. W. Whitehouse. 1996.** Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins c and e in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology* 112: 69-85.
11. **Kahler, D. J.;F. S. Ahmad;A. Ritz;H. Hua;D. N. Moroziewicz;A. A. Sproul;C. R. Dusenberry;L. Shang;D. Paull;M. Zimmer;K. A. Weiss;D. Egli and S. A. Noggle. 2013.** Improved methods for reprogramming human dermal fibroblasts using fluorescence activated cell sorting. *PloS one* 8: e59867.
12. **Kamps, C. A.;Y. C. Lin and P. K. Wong. 1991.** Oligomerization and transport of the envelope protein of moloney murine leukemia virus-tb and of ts1, a neurovirulent temperature-sensitive mutant of momulv-tb. *Virology* 184: 687-694.
13. **Keller, G. M. 1995.** In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current opinion in cell biology* 7: 862-869.
14. **Lei, H.;S. P. Oh;M. Okano;R. Juttermann;K. A. Goss;R. Jaenisch and E. Li. 1996.** De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122: 3195-3205.
15. **Lowry, W. E.;L. Richter;R. Yachechko;A. D. Pyle;J. Tchieu;R. Sridharan;A. T. Clark and K. Plath. 2008** Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 2883-2888

16. **Maherali, N.;R. Sridharan;W. Xie;J. Utikal;S. Eminli;K. Arnold;M. Stadtfeld;R. Yachechko;J. Tchieu;R. Jaenisch;K. Plath and K. Hochedlinger. 2007.** Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* 1: 55-70.
17. **Mali, P.;B. K. Chou;J. Yen;Z. Ye;J. Zou;S. Dowey;R. A. Brodsky;J. E. Ohm;W. Yu;S. B. Baylin;K. Yusa;A. Bradley;D. J. Meyers;C. Mukherjee;P. A. Cole and L. Cheng. 2010.** Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem cells* 28: 713-720.
18. **Matsui, T.;D. Leung;H. Miyashita;I. A. Maksakova;H. Miyachi;H. Kimura;M. Tachibana;M. C. Lorincz and Y. Shinkai. 2010.** Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase *eset*. *Nature* 464: 927-931.
19. **Na, L.;M. Wartenberg;H. Nau;J. Hescheler and H. Sauer. 2003.** Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 67: 174-180.
20. **O'Connor, M. D.;M. D. Kardel;I. Iosifina;D. Youssef;M. Lu;M. M. Li;S. Vercauteren;A. Nagy and C. J. Eaves. 2008.** Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem cells* 26: 1109-1116.
21. **Okita, K.;T. Ichisaka and S. Yamanaka. 2007.** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317.
22. **Parrinello, S.;E. Samper;A. Krtolica;J. Goldstein;S. Melov and J. Campisi. 2003.** Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature cell biology* 5: 741-747.
23. **Rovozzo, G. C. and C. N. Burke. 1973.** A manual of basic virological techniques, Englewood Cliffs, N.J, Prentice-Hall.
24. **Shao, K.;C. Koch;M. K. Gupta;Q. Lin;M. Lenz;S. Laufs;B. Denecke;M. Schmidt;M. Linke;H. C. Hennies;J. Hescheler;M. Zenke;U. Zechner;T. Saric and W. Wagner. 2013.** Induced pluripotent mesenchymal stromal cell clones retain donor-derived differences in DNA methylation profiles. *Mol Ther* 21: 240-250.
25. **Sommer, C. A. and G. Mostoslavsky. 2010.** Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1: 26.
26. **Stadtfeld, M.;N. Maherali;D. T. Breault and K. Hochedlinger. 2008.** Defining molecular cornerstones during fibroblast to ips cell reprogramming in mouse. *Cell stem cell* 2: 230-240.
27. **Takahashi, K.;K. Tanabe;M. Ohnuki;M. Narita;T. Ichisaka;K. Tomoda and S. Yamanaka. 2007.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
28. **Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
29. **Wernig, M.;A. Meissner;R. Foreman;T. Brambrink;M. Ku;K. Hochedlinger;B. E. Bernstein and R. Jaenisch. 2007.** In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent es-cell-like state. *Nature* 448: 318-324.