

Коротков А.В., Макеев О.Г., Шуман Е.А.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИНДУКЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Лаборатория технологий клеточной и генной терапии ГБУЗ СО ИМКТ;
Отдел молекулярных и клеточных технологий ЦНИЛ
ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург

Введение

Первые публикации об успешном репрограммировании соматических клеток взрослого организма в индуцированные плюрипотентные клетки (иПК) путем эктопической экспрессии некоторых факторов транскрипции вселили надежду на возможность замены эмбриональных стволовых клеток, применение которых в регенеративной медицине отягощено морально-этическими проблемами. Однако на этом пути предстоит решить вопросы низкой эффективности репрограммирования и продолжительности синтеза факторов транскрипции.

В настоящее время индукция плюрипотентности может быть достигнута различными методами. Эффективность репрограммирования и свойства получаемых индуцированных плюрипотентных клеток (иПК) зависят как от типа исходных клеток, так и от используемого метода репрограммирования, применяемых факторов и условий культивирования. Наибольшая эффективность репрограммирования показана при применении векторов на основе вирусов [50, 57]. Однако вызываемые ими изменения генома способны привести к ряду негативных последствий, включая злокачественную трансформацию [37, 21], что неприемлемо для применения полученных с их помощью иПК в клинике. Кроме того, рецидуальная экспрессия генов факторов репрограммирования негативно сказывается на дальнейшей дифференцировке иПК [51].

Рядом исследователей показана возможность репрограммирования с использованием неинтегрирующихся в геном клетки векторов [26, 25, 38, 55, 58], хотя эффективность последних оказывается существенно ниже по сравнению с векторами на основе вирусов.

Помимо типа вектора, эффективность репрограммирования зависит от стехиометрии факторов репрограммирования, причем эта зависимость является нелинейной и, по-видимому, строго специфичной для конкретного типа исходных клеток [33, 34, 39].

Альтернативным методом репрограммирования является внесение в клетку мРНК факторов репрограммирования или непосредственно самих факторов.

В ряде случаев авторам удалось продемонстрировать высокую эффективность такого подхода [15, 28], но отсутствие стабильности получаемых результатов как в отношении эффективности, так и полноценности репрограммирования, а так же высокая сложность выполнения ограничивают применение данного метода [16, 35].

Существенное значение для повышения эффективности репрограммирования имеют условия культивирования клеток — состав среды, рО₂, характер факторов роста и их количество в культуральной среде [17, 31, 46, 56].

Вещества, влияющие на процессы метилирования ДНК и ацетилирования гистонов, также оказывают влияние как на эффективность репрограммирования, так и на степень плюрипотентности иПК [21, 8, 41, 40, 14, 13, 24, 23].

Накопленный к настоящему времени опыт показывает, что разные типы клеток обладают различной способностью к репрограммированию что, вероятно, обусловлено их эпигенетической памятью [27].

Результаты исследований кинетики репрограммирования различных типов клеток дают основания полагать, что в конечном итоге любая линия соматических клеток может быть успешно репрограммирована, однако эффективность данного процесса зависит от времени экспрессии факторов репрограммирования, их стехиометрии и скорости деления клеток [22].

По видимому, репрограммирование клеток с признаками стволовости и большим пролиферативным потенциалом будет более успешным, чем нестволовых соматических клеток.

В связи с этим особый интерес представляют мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани, поскольку получение их в значительных количествах не представляет особой сложности, клетки обладают значительным пролиферативным потенциалом и, что особенно важно, пластичностью – способностью дифференцироваться в клетки мезо- экто- и энтодермальных зародышевых листков [2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 19, 20, 30, 32, 42, 44, 45, 47, 48, 52].

С учетом изложенного, целью работы стал поиск оптимального протокола репрограммирования.

В качестве исходных нами были приняты следующие положения.

1. Поскольку в дальнейшем мы планируем использовать полученные иПК для дифференцировки в клетки конкретных тканей с целью заместительной терапии, для репрограммирования должны применяться векторы, не изменяющие последовательность генома.

2. Время экспрессии репрограммирующих генов, как и само существование вектора в клетке должно быть строго ограничено.

3. В качестве исходных клеток наиболее перспективными представляются ММСК.

Материалы и методы

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки получали по «быстрому» протоколу [18] из липоасpirата 6 клинически здоровых женщин в возрасте 34–41 год при получении их информированного согласия. Фибробласты человека получали по протоколу, описанному нами ранее [1].

Среда для культивирования клеток. В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 с добавлением заменителя сыворотки, смеси неэссенциальных аминокислот, L-глутамина и фактора роста фибробластов (Sigma). Среда для культивирования иПК (СиПК) была приготовлена на основе DMEM/F12 (Sigma) с добавлением 20% заменителя сыворотки (KSR, Sigma), 2 мМ L-глутамина, 1×10^{-4} М не эссенциальных аминокислот (Sigma), 1×10^{-4} М 2-меркаптэтанол и 4 нг/мл фактора роста фибробластов (bFGF, Sigma).

Фидерные клетки. Митомицин С (12 мг/мл PBS, Sigma) добавляли непосредственно в культуру фибробластов (80–85 % конфлюенции) и культивировали при 37 °С в течение 3 часов. По завершении клетки дважды промывали

PBS и собирали путем обработки трипсином. В последующем клетки в количестве 1×10^6 помещали в 6-ти луночные планшеты.

Кондиционирование культуральной среды. Фибробласты в количестве 3×10^5 клеток помещали в 60 мм чашки Петри и инкубировали в CO_2 инкубаторе в течении 18 часов. Затем среду заменяли на 30 мл СиПК и инкубировали в течение 24 часов. По окончании инкубации среду собирали и фильтровали через фильтры с диаметром пор 200 нм (Millipore). Непосредственно перед использованием в среду добавляли 4 нг/мл bFGF.

Индукция дифференцировки *In Vitro*. иПК собирали путем обработки раствором, содержащим 0,1 мг/мл коллагеназы IV (Sigma), 0,25 % трипсина (Sigma), 0,1 mM CaCl_2 (Sigma) и 20 % заменителя сыворотки. Суспендированные агломераты клеток помещали в СиПК. Для индукции дифференцировки, 8-ми суточные колонии иПК обрабатывали соответствующим цитокином. Для дифференцировки в нейральном направлении в среду культивирования добавляли 100 нг/мл человеческого рекомбинантного Noggin (Sigma). Спустя 8 суток изучали клетки под микроскопом.

Для индукции энтодермальной дифференцировки, в культуральную среду, не содержащую bFGF, добавляли рекомбинантный человеческий активин А (Sigma) из расчета 100 нг/мл. Спустя 9 суток изучали клетки под микроскопом.

Для индукции дифференцировки в направлении формирования кардиомиоцитов в культуральную среду добавляли человеческий рекомбинантный BMP-4 50 нг/мл (Sigma) и активин А. Спустя 4 суток клетки пересаживали на обычную, не содержащую цитокинов среду и культивировали еще в течение 12 суток. Анализ проводили на основании наблюдения ритмично сокращающихся кластеров клеток.

Векторы. Для получения иПК, свободных от постороннего генетического материала, нами были использованы векторы, полученные в результате реализации соглашения о научно-практическом сотрудничестве с Висконсинским Университетом (США). Вектор конструировали на основе плазмиды с заменой стандартного плазмидного ORI на oriP/ EBNA1, так как вектор с таким участком инициации репликации полностью исчезает у 95 % трансфицированных клеток спустя 4 недели культивирования. Гены факторов транскрипции OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, и KLF4 с «открытой» рамкой считывания получены путем прямой ПЦР ДНК эмбриональных стволовых клеток человека. В качестве промотора транскрипции был использован ген SV40 LT, полученный из плазмиды pBAVE-puro SV40 LT (Addgene), ген hTERT (энхансер) клонирован из плазмиды pBAVE-hygro-hTERT (Addgene). Сайты инициации трансляции IRES1 и IRES2 были заимствованы из плазмиды pIRESpuro3 и pIRES2EGFP соответственно (Clontech). В качестве «стоп-кодона» был использован фрагмент F2A вируса ящура, синтезированный химически на ДНК синтезаторе ASM 800, позволяющий кодировать одной мРНК два и более различных белков. Полученные гены были вставлены в вектор pCEP4 (Invitrogen) и клонированы в *E. coli* штамме DHF α (Fermentas).

Для трансфекции ММСК вносили в 6-ти луночные планшеты из расчета 1×10^4 клеток на лунку. Трансфекцию проводили с использованием набора Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя.

С целью поиска оптимальной стехиометрии соотношения факторов транскрип-

ции векторы были контрансфецированы в ММСК в различных соотношениях.

Так, на первом этапе концентрация плазмид, кодирующих OCT4/SOX2 и NANOG/LIN28 оставались постоянными, в то время, как концентрация с-Мус/ KLF4 изменялась в широких пределах (табл. 1).

Таблица 1

Определение оптимального стехиометрического соотношения плазмид, несущих гены OCT4/SOX2, NANOG/LIN28 и с-Мус/ KLF4

	Факторы репрограммирования		
	OCT4/SOX2	NANOG/LIN28	с-Мус/ KLF4
Множитель	1	1	1
	1	1	2
	1	1	3
	1	1	4
	1	1	0,5
	1	1	0,25
	1	1	0,125
	1	1	0,125

По нахождению оптимальной концентрации с-Мус/ KLF4, данная концентрация принималась базовой и оставалась постоянной, в то время как концентрация NANOG/LIN28 изменялась аналогичным образом.

Затем найденные оптимальные концентрации с-Мус/ KLF4 и NANOG/LIN28 принимались за базовые и оставались постоянными, а изменяли концентрацию OCT4/SOX2.

Найденное оптимальное соотношение OCT4/SOX2, с-Мус/ KLF4 и NANOG/LIN28 использовали для дальнейших исследований.

Оптимизация концентрации вальпроевой и аскорбиновой кислот.

Вальпроевая (BK, Sigma) и аскорбиновая кислоты (AK, Sigma) вносили в СИПК в начальной концентрации 1мМ и 50 мкг/мл соответственно.

В ходе экспериментов по оптимизации на первом этапе исходная концентрация BK оставалась постоянной, в то время как концентрация AK изменялась в пределах от 0,125 до 4х кратной по сравнению с исходной концентрацией.

По нахождении оптимальной концентрации AK ее принимали за базовую и изменяли концентрацию BK в пределах от 0,125 до 4х кратной от исходной.

Определение щелочной фосфатазы. Определение щелочной фосфатазы в клетках колоний, имеющих структуру, подобную структуре колоний эмбриональных клеток, проводили с использованием Alkaline Phosphatase Detection Kit (Millipore) согласно протоколу производителя после 30 минутного нагревания фиксированных клеток при 65 °С для инактивации термолabileйной фосфатазы, присущий иным типам клеток.

Спустя 5 часов культивирования при 37 °С в CO₂ инкубаторе трансфецирующую смесь удаляли и заменяли на культуральную среду. Спустя 18 часов процедуру трансфекции повторяли. Цикл — трансфекция-инкубация-трансфекция выполняли трижды.

Выделение эписомной ДНК из иПК проводили с использованием наборов QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) и протеинкиназы K (Sigma). Геномную ДНК выделяли по традиционному протоколу (фенол/хлороформ). Реакцию прово-

дили с использованием рfх-ДНК полимеразы и ~ 0,1 мг геномной или эписомной ДНК. В качестве негативного контроля использовали геномную и эписомную ДНК из нетрансфицированных клеток.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов, целью которых было определение наиболее эффективной стехиометрии факторов транскрипции, на первом этапе плазмиды контрансфицировали в равных концентрациях. Выход колоний, морфологически близких к колониям эмбриональных клеток и экспрессирующих щелочную фосфатазу, составил 0,0014 +/- 0,0003 (среднее по 6 повторностям). Полученный результат существенно выше, чем зарегистрированный нашими американскими коллегами (0,0003–0,0006 %) [58]. Последнее можно объяснить тем, что в данной работе в качестве исходных клеток для репрограммирования нами были использованы ММСК, которые обычно демонстрируют лучшую способность к репрограммированию [53, 54]. Изменяя концентрацию плазмиды, кодирующей факторы NANOG/LIN28, эффективность трансфекции удалось повысить до 0,33 +/- 0,04 % (табл. 2). Результат, аналогичный нашему, показан в работе [22] и может быть объяснен, исходя из позиции, что NANOG и LIN28, действуя по разным механизмам, обладают способностью повышать эффективность и скорость репрограммирования как быстро пролиферирующих клеток, так и клеток, темпы роста которых в условиях культуры относительно невелики. Концентрация плазмиды NANOG/LIN28, при которой было зафиксировано наибольшее значение эффективности репрограммирования ММСК, была принята за базовую для дальнейших экспериментов.

Таблица 2

Результаты определения оптимальной концентрации вектора NANOG/LIN28

	NANOG/LIN28	Эффективность репрограммирования
Множитель	1	+
	2	++
	3	++
	4	+++
	0,5	++
	0,25	+
	0,125	-

+/- < =0,002%; + < 0,01%; ++ < 0,1%; +++ < 0,5%

Повышение концентрации плазмиды, несущей с-Мус/ и KLF4, не вызвало существенных изменений эффективности репрограммирования (табл. 3). Однако повышение эффективности трансфекции было получено при двукратном снижении ее концентрации. Учитывая, что с-Мус и KLF4 способны как стимулировать, так и ингибировать транскрипцию генов, и их неоднозначную роль в индукции плюрипотентности [46, 49], именно снижение концентрации последнего до определенных пределов повышает эффективность репрограммирования ММСК. Данное предположение было принято нами за базовое для дальнейших экспериментов.



Таблица 3

Результаты определения оптимальной концентрации вектора с-Мус/ KLF4

Множитель	с-Мус/ KLF4	Эффективность репрограммирования
	1	+
	2	+
	3	+/-
	4	-
	0,5	++
	0,25	+
	0,125	-1

+/- < =0,002%; + < 0,01%; ++ < 0,1%; +++ < 0,5%

Факторы OCT4 и SOX2 считаются важными как для индукции репрограммирования, так и для формирования плюрипотентности получаемых клеток. В ряде работ было продемонстрировано, что OCT4 и SOX2 способны индуцировать плюрипотентность и при отсутствии сверхэкспрессии прочих факторов [15, 29, 9]. В ходе наших исследований был отмечен рост эффективности репрограммирования при двукратном и несколько меньший — при трехкратном повышении концентрации плазмиды, несущей гены OCT4/SOX2. При дальнейшем повышении ее концентрации эффективность репрограммирования снижалась. Аналогичный результат получен ранее [34] и вероятно связан с тем, что по мере повышения концентрации ОКТ4 начинает сказываться его способность стимулировать пролиферацию клеток.

Таблица 4

Результаты определения оптимальной концентрации вектора OCT4/SOX2

Множитель	OCT4/SOX2	Эффективность репрограммирования
	1	+
	2	++
	3	++
	4	+/-
	0,5	-
	0,25	-
	0,125	-

+/- < =0,002 %; + < 0,01 %; ++ < 0,1 %; +++ < 0,5 %

При использовании векторов в оптимальном соотношении выход колоний составил 86,3 +/- 22,7 или 0,86 %.

Оптимизация концентрации вальпроевой и аскорбиновой кислот. Поскольку в ряде работ отмечено повышение эффективности репрограммирования за счет привнесения в культуру таких веществ, как аскорбиновая кислота (АК), которая, как считается, оказывает эффект путем «перехвата» свободных радикалов, блокирующих репрограммирование [58], нами была предпринята попытка найти концентрацию, которая в наших условиях окажется наи-

более эффективной. При выполнении данного исследования оказалось, что АК в концентрации в 1,5 и 1,75 раза выше по отношению к исходной действительно способна повышать эффективность репрограммирования ММСК (табл. 5).

Ряд дополнительных экспериментов позволил также оптимизировать концентрацию вальпровой кислоты (табл. 6).

Таблица 5

Результаты определения оптимальной концентрации аскорбиновой кислоты

Множитель	Аскорбиновая кислота	Эффективность репрограммирования
	1	
1,5		++
1,75		++
2		+
0,5		+
0,25		+
0,125		+

+/- < 0,5 %; + < 1,0 %; ++ < 1,5 %; +++ < 2,0 %

Таблица 6

Результаты определения оптимальной концентрации вальпровой кислоты

Множитель	Вальпровая кислота	Эффективность репрограммирования
	1	
1,5		+
1,75		++
2		+++
0,5		-
0,25		-
0,125		-

+/- < 0,5 %; + < 1,0 %; ++ < 1,5 %; +++ < 2,0 %

При совместном использовании факторов транскрипции в оптимальном стехиометрическом соотношении вальпровой и аскорбиновой кислот эффективность трансфекции составила 198,96 +/- 35,40 колоний или 1,99 %.

Оптимизация раундов трансфекции. Поскольку используемые нами векторы прогрессивно элиминируются из делящихся клеток, можно предполагать, что дополнительные раунды трансфекции позволят достигнуть большей эффективности репрограммирования. Кроме того, результаты изучения динамики репрограммирования [22] позволяют предположить, что дополнительные раунды трансфекции положительно скажутся на эффективности репрограммирования.

В нашем исследовании было зарегистрировано, что каждый дополнительный раунд повышал выход колоний иПК (табл. 7).

Результаты определения оптимального количества раундов трансфекции

Количество раундов трансфекции	Эффективность репрограммирования
1	+
2	+
3	++
4	+++

+/- < 2,0 %; + < 3 %; ++ < 4 %; +++ < 5 %

Выполнение оптимизации выхода колоний, имеющих морфологию, подобную морфологии колоний эмбриональных клеток, и экспрессирующих термостабильную щелочную фосфатазу оказалась существенно выше, чем при использовании стандартного протокола трансфекции – 491,88 +/- 48,28 колоний или 4,91 +/- 1,48 % по сравнению с 54,20 +/- 38,28 колоний или 0,54 +/- 0,38 % по стандартному протоколу $p = 0,97$.

Идентификация иПК. Важным условием, подтверждающим плюрипотентность получаемых в ходе репрограммирования клеток, является способность их дифференцировки в клетки трех эмбриональных листков.

Ранее нашими коллегами было доказано, что при использовании данных векторов получаемые иПК по палитре экспрессируемых генов идентичны эмбриональным клеткам человека [58]. Однако в наших экспериментах использовались ММСК, обладающих иной «эпигенетической» памятью, чем фибробласты, хотя и более близкой к эмбриональным клеткам. Тем не менее, мы полагаем, что проверка полученных нами иПК в отношении их способности к дифференцировке важна, тем более что в дальнейшем мы планируем использовать эти клетки с целью заместительной терапии.

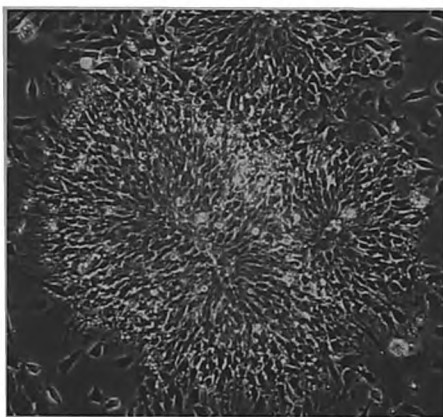


Рисунок 1. Нейтральная розеткоподобная структура. Фазовоконтрастная микроскопия. Ув. 400x

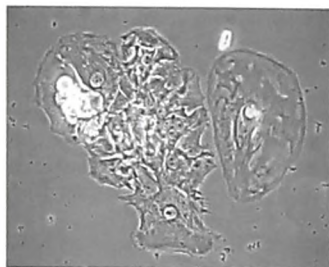


Рисунок 2. Кластер кардиомиоцитов. Фазовоконтрастная микроскопия. Ув. 400х

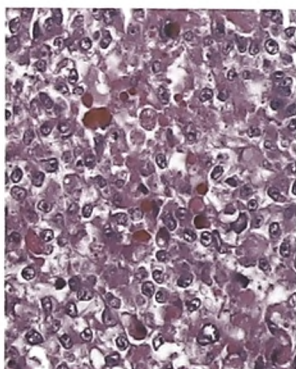


Рисунок 3. Дифференцировка в эктодермальном направлении. Гематоксин – эозин. Ув 400х

При индукции дифференцировки полученных iPK в нейральном направлении в культурах было получено обильное формирование розеткоподобных структур, типичных для нейронов (рис. 1).

При индукции в кардиальном направлении получали кластеры синхронно сокращающихся кардиомиоцитов (рис. 2).

При индукции дифференцировки в энтодермальном направлении получены типичные для эктодермального ростка полигональные клетки и эозинофильной цитоплазмой, содержащей гиалиновые включения (рис. 3).

Не менее важным обстоятельством для использования полученных клеток в клинике, является сохранность их генома и отсутствие используемых нами внегеномных векторов. В ходе выполнения ПЦР следов вектора как во фракции геномной ДНК, так и внегеномной фракции нами не выявлено.

Заключение

При трансфекции ММСК, полученных из жировой ткани здоровых испытуемых, векторами новой конструкции по описанному протоколу эффектив-

ность репрограммирования оказалась существенно выше, чем при использовании стандартного протокола трансфекции (491,88 \pm 48,28 колоний или 4,91 \pm 1,48% по сравнению с 54,20 \pm 38,28 колоний или 0,54 \pm 0,38% по стандартному протоколу $p = 0,97$). Спустя 4 недели после последнего раунда трансфекции в полученных ИПК не удалось выявить ДНК вектора или его кодирующих участков. В условиях *in vitro* показана способность полученных ИПК дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. //Cell, 2007, 131, 861–872.
2. Yu J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. //Science, 2007, 318, 1917–1920.
3. Okita K., Ichisaka T. & Yamanaka S. Generation of germ-line competent induced pluripotent stem cells. //Nature, 2007, 448, 313–317.
4. Hacein-Bey-Abina S. et al. 2003 LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. //Science 302, 415–419
5. Tenzen T., Zembowicz F., Cowan C.A. Genome modification in human embryonic stem cells. //J. Cell Physiol. 2010 Feb; 222(2):278-81.
6. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T. & Yamanaka S. 2008 Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. //Science 322, 949–953
7. Woltjen. K. et al. 2009 piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. //Nature 458, 766–770.
8. Kaji. K., Norrby. K., Paca. A., Mileikovsky. M., Mohseni. P. & Woltjen. K. 2009 Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. //Nature 458, 771–775.
9. Jia. F. et al. 2010 A non-viral minicircle vector for deriving human iPS cells. // Nat. Methods 7, 197–199.
10. Yu. J., Hu. K., Smuga-Otto. K., Tian. S., Stewart. R., Slukvin, I. I. & Thomson. J. A. 2009 Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. //Science 324, 797–801.
11. Papapetrou E. P. et al. 2009 Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106, 12 759– 12 764.
12. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M. & Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. //Cell 113, 631–642.
13. Niwa H., Miyazaki J. & Smith A. G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. //Nat. Genet. 24, 372–376.
14. Warren L. et al. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. //Cell Stem Cell 7, 1–13.
15. Kim D. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. //Cell Stem Cell 2009, 472–476.

16. Okita K. and Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges //Phil. Trans. R. Soc. B (2011) 366, 2198–2207.
17. Samavarchi-Tehrani P., Golipour A., David, L., Sung H. K., Beyer T. A., Datti A., Woltjen K., Nagy A. & Wrana J. L. 2010 Functional genomics reveals a BMPdriven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. //Cell Stem Cell 7, 64–77.
18. Li R. et al. 2010 A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. //Cell Stem Cell 7, 51–63.
19. Ezashi T., Das P. & Roberts R. M. 2005 Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. //Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 4783–4788.
20. Yoshida Y., Takahashi K., Okita K., Ichisaka T. & Yamanaka S. 2009 Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. //Cell Stem Cell 5, 237–241.
21. Shi Y., Despons C., Do J. T., Hahm H. S., Scholer H. R. & Ding S. 2008 Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. //Cell Stem Cell 3, 568–574.
22. Bhutani N., Brady J. J., Damian M., Sacco A., Corbel S. Y. & Blau, H. M. 2009 Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. //Nature 463, 1042–1047.
23. Rai K., Huggins I. J., James S. R., Karpf A. R., Jones D. A. & Cairns B. R. 2008 DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. //Cell 135, 1201–1212.
24. Popp C., Dean W., Feng S., Cokus S. J., Andrews S., Pellegrini M., Jacobsen, S. E. & Reik, W. 2010 Genomewide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. //Nature 463, 1101–1105.
25. Doi A. et al. 2009 Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. //Nat. Genet. 41, 1350–1353.
26. Deng J. et al. 2009 Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. //Nat. Biotechnol. 27, 353–360.
27. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S., Muhlestein W. & Melton D. A. 2008 Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. //Nat. Biotechnol. 26, 1269–1275.
28. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom, A., Snitow M., Chen, A. E. & Melton D. A. 2008 Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. //Nat. Biotechnol. 26, 795–797.
29. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim, Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.I., Yabuuchi A., Takeuchi A., Cunniff K.C., Hongguang H., McKinney-Freeman S., Naveiras O., Yoon T.J., Irizarry R.A., Jung N., Seita J., Hanna J., Murakami P., Jaenisch R., Weissleder R., Orkin S.H., Weissman I.L., Feinberg A.P., Daley G.Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. //Nature 467: 285–290, 2010.
30. Hanna J., Saha K., Pando B., van Zon J., Lengner C.J., Creighton M.P., van Oudenaarden A., Jaenisch R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration //Nature 2009 Vol 462 595–603.
31. Safford K. M., Hicok K. C., Safford S. D. et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. //Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 294, no. 2, pp. 371–379, 2002.

32. Brzoska M., Geiger H., Gauer S., and Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. //Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 330, no. 1, pp. 142–150, 2005.
33. Baer P. C., Griesche N., Luttmann W., Schubert R., Luttmann A., and Geiger H. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. //Cytotherapy, vol. 12, no. 1, pp. 96–106, 2010.
34. Schellenberg A., Stiehl T., Horn P. et al. Population dynamics of mesenchymal stromal cells during culture expansion. //Cytotherapy, vol. 14, no. 4, pp. 401–411, 2012.
35. Guilak F., Lott K. E., Awad H. A. et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. //Journal of Cellular Physiology, vol. 206, no. 1, pp. 229–237, 2006.
36. Rodr'iguez L. V., Alfonso Z., Zhang R., Leung J., Wu B., and Ignarro L. J. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 103, no. 32, pp. 12167–12172, 2006.
37. Case J., Horvath T. L., J. C. Howell J. C., Yoder M. C., March K. L., and Srouf E. F. Clonal multilineage differentiation of murine common pluripotent stem cells isolated from skeletal muscle and adipose stromal cells. //Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1044, pp. 183–200, 2005.
38. Russell K. C., Lacey M. R., Gilliam J. K., Tucker H. A., Phinney D. G., and O'Connor K. C. Clonal analysis of the proliferation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells as a function of potency. //Biotechnology and Bioengineering, vol. 108, no. 11, pp. 2716–2726, 2011.
39. Seo M. J., Suh S. Y., Bae Y. C., and Jung J. S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. //Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 328, no. 1, pp. 258–264, 2005.
40. Lange C., Bruns H., Kluth D., Zander A. R., and Fiegel H. C. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. //World Journal of Gastroenterology, vol. 12, no. 15, pp. 2394–2397, 2006.
41. Banas A., Teratani T., Yamamoto Y. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. //Hepatology, vol. 46, no. 1, pp. 219–228, 2007.
42. Timper K., Seboek D., Eberhardt M. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. //Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 341, no. 4, pp. 1135–1140, 2006.
43. Ashjian P. H., Elbarbary A. S., Edmonds B. et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. //Plastic and Reconstructive Surgery, vol. 111, no. 6, pp. 1922–1931, 2003.
44. Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., and Zhao R. C. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. //Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 332, no. 2, pp. 370–379, 2005.
45. Baer P. C., Bereiter-Hahn J., Missler C. et al. Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells. //Cell Proliferation, vol. 42, no. 1, pp. 29–37, 2009.
46. Baer P. C., Brzoska M., and Geiger H. Epithelial differentiation of human adipose-

derived stem cells. //Methods in Molecular Biology, vol. 702, pp. 289–298, 2011.

47. Griesche N., Bereiter-Hahn J., Geiger H., Schubert R., and Baer P. C. During epithelial differentiation of human adiposederived stromal/stem cells, expression of zonula occludens protein-1 is induced by a combination of retinoic acid, activin-A and bone morphogenetic protein-7. //Cytotherapy, vol. 14, no. 1, pp. 61–69, 2012.

48. Baer P. C., Doring C., Hansmann M. L., Schubert R., and Geiger H. New insights into epithelial differentiation of human adipose-derived stem cells. // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In press.

49. Long J. L., Zuk P., Berke G. S., and Chhetri D. K. Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal tissue engineering. //Laryngoscope, vol. 120, no. 1, pp. 125– 131, 2010.

50. Francis M.P., Sachs P.C, Lynne W. Elmore L.W., Holt S.E. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. // Organogenesis 6:1, 11-14; January/February/March 2010

51. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г. Итоги шестилетних клинических испытаний аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. //Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий: Материалы I Международной научно-практической конференции (Екатеринбург, 31 марта 2011 г.). – Москва: Издательство «Буки Веди», 2011. С. 184-186.

52. Okita K., Yamanaka S. Review. iPS cells: opportunities and challenges //Phil. Trans. R. Soc. B (2011) 2198-2207.

53. William P. Cawthorn, Erica L. Scheller, Ormond A. MacDougald Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. //Trends in Endocrinology & Metabolism, 13 March 2012

54. Rowland B. D., Bernards R. & Peeper D. S. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. // Nature Cell Biol. 7, 1074–1082 (2005).

55. Egli D., Birkhoff G.&Eggen K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. //Nature Rev. Mol. Cell Biol. 9, 505–516 (2008).

56. Kim J. B. et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. //Cell 136, 411–419 (2009).

57. Boiani M. et al. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments. //Stem Cells 23, 1089–1104 (2005).

58. Esteban A.M., Wang T., Qin B. et al Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells. //Cell Stem Cell 2010 6, 71–79