

**Біологічні науки**

УДК: 606:616.8

**Депутатова Тетяна Олегівна**

De Novo

Керівник відділу

**Депутатова Татьяна Олеговна**

De Novo

Руководитель отдела

**Tatyana Deputatova**

De Novo

Head of Department

**ПЕРЕПРОГРАМУВАННЯ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН З УТВОРЕННЯМ  
НЕЙРОНІВ З ДОПОМОГОЮ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ СПОЛУК  
ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК С  
ОБРАЗОВАНИЕМ НЕЙРОНОВ ПОСРЕДСТВОМ  
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
REPROGRAMMING OF SOMATIC CELLS TO NEURONS WITH  
SMALL MOLECULES**

**Резюме.** Застосування регенеративної медицини задля лікування розладів і порушень центральної нервової системи людини десятиріччями обмежувалися науково-методологічними й етичними бар'єрами. Передусім ці перешкоди заважали розвитку трансплантаційно-терапевтичних підходів з використанням стовбурових клітин. Революційне дослідження японських вчених на чолі з Яманакою у 2006 році стимулювало пошук ефективних шляхів з перетворення диференційованих соматичних клітин ссавців на клітини потрібних типів, у тому числі на нейрони. Встановлення комплексів низькомолекулярних сполук, що здатні забезпечити перепрограмування соматичної клітини із застосуванням та без застосування транскрипційних факторів, дозволило суттєво підвищити ефективність перепрограмування. У

цій статті пропонується стислий огляд актуальних робіт з культивування індукованих нейронів завдяки застосуванню низькомолекулярних сполук.

**Ключові слова:** перепрограмування соматичних клітин, перепрограмування з допомогою низькомолекулярних сполук, хімічно індуковані нейрони.

**Резюме.** Использование регенеративной медицины в целях лечения нарушений центральной нервной системы человека десятилетиями ограничивалось научно-методологическими и этическими барьерами. Прежде всего эти препятствия стояли на пути развития трансплантационно-терапевтических подходов с использованием стволовых клеток. Революционное исследование Яманаки в 2006 году стимулировало поиск эффективных путей преобразования дифференцированных соматических клеток млекопитающих в клетки необходимых типов, в том числе в нейроны. Определение комплексов низкомолекулярных соединений, способных обеспечить перепрограммирование соматической клетки с использованием и без использования транскрипционных факторов, позволило существенно повысить эффективность перепрограммирования. В этой статье предлагается краткий обзор актуальных работ по культивированию индуцированных нейронов с использованием низкомолекулярных соединений.

**Ключевые слова:** перепрограммирование соматических клеток, перепрограммирование с помощью низкомолекулярных соединений, химически индуцированные нейроны.

**Summary.** Regenerative medicine faced scientific, methodological and ethical barriers in therapeutic treatment of human CNS diseases for decades. First of all the barriers limited the development of stem cell based transplantation therapeutic approaches. In 2006 the breakthrough study of Yamanaka and colleagues encouraged search for effective means to convert differentiated

somatic cells of mammals into targeted cell types, including neurons. Small molecules cocktails were found to enable reprogramming of somatic cells with and without ectopic expression of transcriptional factors and enhance reprogramming efficiency. Here we offer a review of the latest studies reporting induction of neurons with small molecules.

**Key words:** reprogramming of somatic cells, reprogramming with small molecules, chemically induced neurons.

**Вступ.** Процес утворення нейронів у дорослому організмі ссавців є спрямованим передусім на підтримання нормального функціонування нервової системи та не може задовольнити потребу у регенерації нервової тканини, що виникає у випадках травм і пошкоджень мозку. У зв'язку з цим дослідження у сферах регенеративної медицини, а також моделювання порушень роботи центральної нервової системи наразі сфокусовано на пошуку ефективних шляхів культивування пацієнтоспецифічних функціональних нервових клітин різних типів [3; 7; 12; 13; 17-22].

Поштовх для нових досліджень дало явище перепрограмування диференційованих соматичних клітин, що було здійснено групою науковців на чолі з Яманакою з допомогою чотирьох транскрипційних факторів (ТФ) [23; 29]. У 2006 році ці японські вчені опублікували працю про успішне перетворення (перепрограмування) фібробластів шкіри миші на плюрипотентні стовбурові клітини. Отримані науковцями індуковані стовбурові клітини було визначено як плюрипотентні, оскільки вони мали здатність до диференціації у будь-які типи клітин, за винятком трофектодерми, клітин позазародкових органів (плацента, жовтковий мішок) [6]. Відповідно, винайдена у 2006 році технологія перепрограмування та індукції плюрипотентності відкривала нове джерело для культивування пацієнтоспецифічних клітин, у т.ч. нейронів.

Подальші розробки у сфері перепрограмування соматичних клітин стимулювалися питаннями безпеки, що їх викликало застосування

ретровірусних векторів та онкогенних транскрипційних факторів через можливість реактивації вірусів та розвиток пухлинних захворювань, та намаганнями підвищити ефективність процесу перепрограмування [16; 26-28; 34]. Новітні дослідження з використанням низькомолекулярних сполук (або ж малих молекул) є багатообіцяючим напрямком розвитку технології перепрограмування, оскільки пропонують більш швидкий та безпечний шлях конверсії диференційованих клітин з одного типу на інший, зокрема на нейрони [1; 5; 11; 14; 32].

## **Нейрони, культивовані з допомогою низькомолекулярних комплексів.**

### **Характеристики**

Низькомолекулярні сполуки (біологічно активні речовини з молекулярною вагою <900 дальтон) визначаються здатністю впливати на біологічні процеси. У 2015 році одразу дві дослідницькі групи з Китаю на чолі з Лі та Ху повідомили про перепрограмування фібробластів на нейрони з допомогою низькомолекулярних сполук – **хімічну індукцію нейронів** [14; 15; 11]. Індуковані нейрони, що дослідники отримали у ході експериментальних робіт, визначалися низкою властивостей, притаманних нервовим клітинам. Зокрема, індуковані нейрони мали властиву нервовим клітинам морфологію, потенціал-залежні іонні канали, здатність до утворення спайків і формування синапсів тощо. Фахівці на чолі з Ху застосували методики флуоресцентної мікроскопії та оптичних спостережень внутрішньоклітинних процесів (зокрема кальцієвої візуалізації), щоб підтвердити активність значної частини індукованих нейронів. Дослідження профіля експресії генів у і) фібробластах, ii) хімічно індукованих нейронах (хіН), iii) нейронах, що їх було культивовано зі стовбурових клітин, iv) нервових клітин, отриманих шляхом перепрограмування з використанням ТФ, також засвідчили подібність хіН до нервових клітин, отриманих за допомогою зазначених технологій культивування. З іншого боку, хімічно індуковані нейрони

характеризувалися суттєвими генетичними, а також морфологічними відмінностями порівняно з фібробластами [1; 11; 14].

Щоб детальніше вивчити перебіг процесу перепрограмування, фахівці на чолі з Лі провели РНК-секвенування клітин через 48 годин та 19 днів після впливу низькомолекулярним комплексом (про складові комплексу див. докладніше у наступній частині статті) на перепрограмовані фібробласти. Ієрархічна кластеризація отриманих даних вказала, що за глобальним профілем експресії генів хімічно індуковані нейрони були відмінними від фібробластів та не експресували типові для фібробластів гени.

Власне механізми перебігу перепрограмування соматичних клітин на нейрони потребують подальшого вивчення. Однак у згаданих працях повідомляється про індукцію нейронів, що відбувається без стадії утворення попередників нервових клітин. Адже обидві групи вчених не спостерігали експресії генів, властивих попередникам нейронів, що вказує на безпосереднє перепрограмування на нервові клітини [1].

### **Індукція нейронів з допомогою низькомолекулярних комплексів, встановлених у 2014-2015 рр.**

Фахівці лабораторії Денга визначили комплекс низькомолекулярних сполук, що забезпечував ефективне перепрограмування фібробластів миші та появу у них властивостей нервових клітин [14]. Щоб визначити, які саме низькомолекулярні сполуки можуть забезпечити індукцію перепрограмування на нейрони, було застосовано скринінгові дослідження. На початку дослідження було встановлено, що три ТФ – *Ascl1*, *Brn2* та *Myt1l* (дані ТФ відіграють вирішальну роль у формуванні нервової трубки підчас раннього ембріонального розвитку ссавців та диференціації нервових клітин), здатні індукувати перепрограмування мишачих фібробластів на нейрони. Причому вирішальну роль у цьому процесі відіграє *Ascl1*, тоді як *Brn2* та *Myt1l* покращують ефективність перепрограмування та є

підтримуючими факторами. Також було виявлено, Ascl1 з низькою ефективністю може індукувати утворення нервових клітин навіть без двох інших ТФ [25].

Після проведення скринінгу приблизно 5000 низькомолекулярних сполук, що забезпечують зумовлене Ascl1 перепрограмування клітин, було виявлено комплекс **FICS** [14; 2]. Даний комплекс включав:

- Forskolin, активатор циклічного аденозинмонофосфату;
- ISX9, інгібітор циклооксигенази 2, що забезпечує індукцію генів, відповідальних за фенотип нервових клітин (зокрема, NeuroD1);
- CHIR99021, інгібітор кінази глікогенсинтази 3, що індукує формування дофамінергічних нейронів з ембріональних стовбурових клітин людини;
- SB431542, інгібітор активін-рецептороподібної кінази 5, що індукує утворення нервових клітин з плюрипотентних стовбурових клітин [11].

Подальший аналіз низькомолекулярних сполук дозволив визначити, що застосування I-BET151 (інгібітор білків BET, корегуляторів транскрипції, що пригнічує експресію притаманних фібробластам генів) значно підвищує рівень ефективності перепрограмування. Відповідно, було визначено комплекс **FICSB** як ефективний засіб обумовленого Ascl1 перепрограмування мишачих фібробластів на незрілі нейрони [14]. Винайдені за результатами досліджень низькомолекулярні комплекси впливають на сигнальні шляхи, що відіграють вагомую роль у спрямованій нейрональній диференціації *in vitro* та навіть у розвитку нервової системи *in vivo*. Так, наприклад, згаданий вище CHIR99021 стимулює утворення нервових клітин з плюрипотентних стовбурових клітин за перепрограмування під впливом ТФ [2; 4].

У 2015 році китайські спеціалісти вперше повідомили про пряме перепрограмування фібробластів людини на нервові клітини за допомогою комплексу з семи низькомолекулярних сполук **VCRFSGY**. Дослідники

поінформували, що здійснили перепрограмування фібробластів людини на нейрони з допомогою попередньо встановленого комплексу VCR (V, вальпроєва кислота; C, CHIR99021, інгібітор кінази глікогенсинтази 3; R, Repsox, інгібітор сигнальних шляхів трансформуючого фактору росту  $\beta$ ) та чотирьох додаткових низькомолекулярних сполук. Цими додатковими сполуками були Forskolin (F, активатор циклічного аденозинмонофосфату), SP600125 (S, інгібітор c-Jun-N-термінальної кінази), GO6983 (G, інгібітор протеїнкінази C) та Y-27632 (Y, інгібітор кінази з родини серин-треонінових протеїнкіназ) [11]. Застосування цих чотирьох речовин зумовлювалося їх наступними властивостями.

- Форсколін стимулює перепрограмування фібробластів людини на холінергічні нейрони [15].
- SP600125, за використання лише одного ТФ ОСТ4, сприяє формуванню нейронів фібробластів з шкіри людини.
- GO6983 є сприяє підтриманню плюрипотентних стовбурових клітин людини [8].
- Y-27632 бере участь у забезпеченні підтримання функціонування плюрипотентних стовбурових клітин і виживаності нейронів.

Електрофізіологічні властивості нейронів, індукованих з фібробластів під дією винайденого комплексу VCRFSGY, мали притаманний нервовим клітинам профіль експресії генів та майже не експресували властиві фібробластам гени. У подальшому цей підхід успішно використовувався для хімічної індукції нейронів пацієнтів зі спадковою хворобою Альцгеймера та подальшого моделювання цього захворювання з урахуванням генетичних особливостей пацієнтів, а також дослідження потенційних засобів гальмування нейродегенеративних процесів [11].

Автори також повідомляли, що хімічна індукція нейронів супроводжувалася інактивацією генів, специфічних для фібробластів, та підвищенням експресії ендогенних ТФ нейронів. Ці дані відповідали результатам попередніх досліджень щодо можливості перепрограмування



соматичних клітин миші та людини на нейрони завдяки посиленій експресії окремих ТФ, притаманних нервовим клітинам. Отже, комплекс VCRFSGY забезпечує припинення притаманної фібробластам експресії генів, специфічно підвищує експресію генів, відповідальних за фенотип нервових клітин, та уможливорює конверсію фібробластів у нейрони.

Нещодавно група науковців на чолі з Жангом повідомила, що з допомогою комплексу низькомолекулярних сполук можна перепрограмувати астроцити людини на функціональні нейрони *in vitro*. А саме послідовний вплив низькомолекулярними комплексом, що у т.ч. включає інгібітор кісткового морфогенетичного білка LDN193189, інгібітор активін-рецептороподібної кінази 5 SB431542, інгібітор кінази з родини серин-треонінових протеїнкіназ Тіазовівін (Thiazovivin), інгібітор кінази глікогенсинтази 3 CHIR99021, вальпроєву кислоту й інгібітор рецептор-залежного латентного фактора транскрипції DAPT, забезпечує перепрограмування астроцитів на функціональні нейрони впродовж 8-10 днів. Після пересадки до мишачого мозку індуковані нейрони лишалися функціональними понад одного місяця та долучилися до локальних нейрональних мереж. Подальші дослідження процесів перепрограмування надаватимуть можливість відкриття інноваційних підходів у фармакотерапії з регенерації нервових клітин [31-32].

**Висновки.** Перетворення однієї соматичної клітини на клітину необхідного типу досягається завдяки ектопічній, тобто не притаманній клітині у нормі, експресії транскрипційних факторів або ж низькомолекулярних сполук. Технологія перепрограмування клітин з допомогою низькомолекулярних сполук відкриває швидкий і зручний шлях до отримання пацієнтоспецифічних клітин потрібних типів. Хімічна індукція перепрограмування дозволяє перетворювати клітини, що легко отримувати (наприклад, фібробласти шкіри), на аутогенні клітини необхідного типу. Роботи дослідницьких груп США та Китаю 2014-2016 рр. доводять перспективність суто хімічного перепрограмування соматичних



клітин і культивування нейронів – завдяки застосуванню низькомолекулярних сполук та без транскрипційних факторів. Важливим джерелом даних для розробки низькомолекулярних комплексів перепрограмування клітин є вивчення сигнальних шляхів, пов'язаних з розвитком клітини.

Подальші дослідження з перепрограмування соматичних клітин і хімічної індукції перепрограмування потребують фокусу на з'ясуванні механізмів процесів трансдиференціації соматичних клітин ссавців, а також на створенні безпечних і зручних підходів до перепрограмування соматичних клітин. Ефективне культивування нейронів різних типів належить до нагальних векторів сучасних розробок із застосуванням низькомолекулярних сполук.

### **Література**

1. Babos K., Ichida J.K. Small Molecules Take a Big Step by Converting Fibroblasts into Neurons. *Cell Stem Cell*. August 6, 2015, 17, p.127-130.
2. Biswas D., Jiang P. Chemically Induced Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotent Stem Cells and Neural Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. 17, 226; doi:10.3390/ijms17020226
3. Brennand KJ, Gage FH. Modeling psychiatric disorders through reprogramming. *Dis Model Mech.* 2012. N.5, p.26–32.
4. Chambers, S.M.; Fasano, C.A.; Papapetrou, E.P.; Tomishima, M.; Sadelain, M.; Studer, L. Highly efficient neural conversion of human es and ips cells by dual inhibition of smad signaling. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27, 275–280.
5. Chen G, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods.* 2011. N.8, p.424–429.
6. Condic M.L. Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells Dev.* 2014 Apr 15. 23(8): 796–812.

7. Darrick T. Balu, Irwin Lucki. Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation, Functional Implications, And Contribution to Disease Pathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009. 33(3): 232–252.
8. Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature.* 2013. 504, 282–286.
9. Gaspard N, Vanderhaeghen P. Mechanisms of neural specification from embryonic stem cells. *Curr Opin Neurobiol.* 2010. N.20, p.37–43.
10. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science.* New York, 2013. N.341, p.651–4.
11. Hu, W.; Qiu, B.; Guan, W.; Wang, Q.; Wang, M.; Li, W.; Gao, L.; Shen, L.; Huang, Y.; Xie, G.; et al. Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell.* 2015, 17, 204–212.
12. Kim DS, Ross PJ, Zaslavsky K, Ellis J. Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. *Front Cell Neurosci.* 2014. N.8, p.109.
13. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // *Nature.* – 2013. – N.501, p.373–9.
14. Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y et al. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell.* 2015. N.17, p.195–203.
15. Liu, M.L.; Zang, T.; Zou, Y.; Chang, J.C.; Gibson, J.R.; Huber, K.M.; Zhang, C.L. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat. Commun.* 2013. 4: 2183. doi:10.1038/ncomms3183

16. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008. N. 3, p.595–605
17. Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010. N.143, p.527–39.
18. Meng-Lu Liu, Tong Zang, Chun-Li Zhang. Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients. *Cell Rep*. 2016 January 5; 14(1): 115–128. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.018.
19. Okano H, Yamanaka S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain*. 2014. N.7, p.22.
20. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. 2011. N.476, p.220–3
21. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015. N.3:2.
22. Srikanth P, Young-Pearse TL. Stem cells on the brain: modeling neurodevelopmental and neurodegenerative diseases using human induced pluripotent stem cells. *J Neurogenet*. 2014. N.28, p.5–29.
23. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006. 126, 663–676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
24. Velasco I, Salazar P, Giorgetti A, Ramos-Mejia V et al. Concise review: generation of neurons from somatic cells of healthy individuals and neurological patients through induced pluripotency or direct conversion. *Stem cells*. Ohio, 2014. N.32, p.2811–7.
25. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 2010. 463, p.1035–41.

26. Wang Y., et al. Reprogramming of mouse and human somatic cells by high-performance engineered factors. *EMBO Rep.* 2011. N.12, p.373–378.
27. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells // *Nature.* – 2009. – N.458, p.766–70.
28. Xu J, Du Y, Deng H. Direct Lineage Reprogramming: Strategies, Mechanisms, and Applications. *Cell Stem Cell.* 2015. N.16, p.119–34
29. Yamanaka S: Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* London, 2008. N.363, p. 2079-2087
30. Yeo GW, Coufal N, Aigner S, Winner B et al. Multiple layers of molecular controls modulate self-renewal and neuronal lineage specification of embryonic stem cells. *Hum Mol Genet.* 2008. N. 17, p.R67-R75.
31. Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H et al. Rapid singlestep induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron.* 2013. 78, 785–98.
32. Zhang, L.; Yin, J.C.; Yeh, H.; Ma, N.X.; Lee, G.; Chen, X.A.; Wang, Y.; Lin, L.; Chen, L.; Jin, P.; et al. Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell Stem Cell.* 2015. 17, 735–747.
33. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):645-60. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.033.
34. Zhou YY, Zeng F. Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2013. N.11, p.284–7.