

ЛИТЕРАТУРА:

1. Dalakas E., Newsome P., Harrison D. and Plevris J. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *The FASEB Journal*. 2005; 19: 1225–31.
2. Krause D., Theise N., Collector M. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105: 369–77.
3. Askari A., Unzek S., Popovic Z. et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003; 362: 697–703.
4. Hatch H., Zheng D., Jorgensen M. et al. SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells*. 2002; 4: 339–51.

5. Houghton J., Stoicov C., Nomura S., et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004; 306: 1568–71.
6. Marx J. Bone Marrow Cells: The Source of Gastric Cancer? *Science*. 2004; 306: 1455–6.
7. Pawelek J. Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. *Lancet Oncol*. 2005; 6: 988–993.
8. Avital I., Moreira A., Klimstra D. et al. Donor Derived Human Bone Marrow Cells Contribute to Solid Organ Cancers Developing After Bone Marrow Transplantation. *Stem Cells*. First published online August 9, 2007.
9. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422: 897–901.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Cogle C., Theise N., Fu D. et al. Bone Marrow Contributes to Epithelial Cancers in Mice and Humans as Developmental Mimicry. *Stem Cells* 2007; 25: 1881–7

Использование митотической зиготы для репрограммирования ядра соматической клетки и клонирования

До сих пор клонирование животных и получение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) основано на технологии переноса ядра соматической клетки ядер в мейотические овоциты. Попытки перенести ядро соматической клетки в оплодотворенный овоцит (зиготу в интерфазе) чаще всего оканчивались неудачей. В связи с этим с целью получения «собственных» линий ЧЭСК традиционно для процесса переноса ядра принято использовать неоплодотворенные человеческие овоциты. Исследовательская группа под руководством Кевина Еггана из Harvard Stem Cell Institute сообщает о том, что мышинные зиготы (остановленные в митозе) способны поддерживать репрограммирование соматической клетки и могут использоваться как для получения линий ЭСК, так и для клонированных животных. Таким образом, человеческие зиготы, и, возможно, бластомеры, помимо овоцитов, могут стать реальными кандидатами для использования в технологии создания индивидуальных линий ЧЭСК.

В первых успешных экспериментах по переносу ядра на грызунах, исследователи провели обмен пронуклеусами между двумя оплодотворенными зиготами [1]. Полученные эмбрионы развились в полноценных взрослых животных. Однако при проведении похожих экспериментов с использованием ядер на стадиях дробления такого результата не получили, поэтому предположили, что клонирование млекопитающих невозможно, т.к. репрограммирование позднего ядра заблокировано. Однако вскоре было обнаружено, что цитоплазма неоплодотворенного овоцита способна вносить изменения в программу перенесенного ядра, и тогда были реализованы проекты по клонированию овцы, кролика, свиньи и мыши [2–4].

Не так давно было показано, что потенциал развития зародыша после переноса ядра в неоплодотворенный овоцит существенно выше такового по сравнению с переносом в оплодотворенный или искусственно активированный овоцит. То есть, потенции яйцеклетки, необходимые для успешного развития особи после переноса ядра, теряются (изменяются) после ее оплодотворения. Таким образом, и для процедуры переноса ядра с целью получения индивидуальных линий ЧЭСК необходимы неоплодотворенные овоциты.

Группа Кевина Еггана предположила, что факторы, необходимые как для репрограммирования или/и эмбрионального развития, присутствующие в цитоплазме неоплодотворенных мейотических овоцитов, становятся изолированными (уединенными) в пронуклеусах зигот. Такая компарментализация может объяснить невозможность энуклеированной интерфазной зиготы поддерживать развитие после переноса ядра, так как удаление пронуклеусов во время энуклеации может элиминировать одновременно и эти факторы, тем самым предотвращая дальнейшее развитие. Удаление конденсированных хромосом во второй метафазе мейоза из овоцита, напротив, не влияет на эти процессы. Если эта модель верна, то разрушение ядерного конверта (ядерной оболочки) при вступлении в первый эмбриональный митоз, может привести к высвобождению критических факторов в цитоплазму, что позволит удалять хромосомы без удаления тех самых необходимых сигналов к развитию.

Для того, что бы определить? может ли цитоплазма митотической зиготы поддерживать репрограммирование ядра, исследователи обратимо затормозили зиготы в митозе, удалили хромосомы и заменили их хромосомами либо эмбриональной, либо соматической донорской клетки. Ученым удалось обнаружить, что такие генетически реконструированные зиготы могут использоваться для получения клонированных животных и линий ЭСК.

Мышинные зиготы синхронизировали на стадии двух отдельных пронуклеусов путем разборки микротрубочек в митозе. Другие зиготы были синхронизированы таким же способом, но в интерфазе. Затем оба пронуклеуса в интерфазных зиготах были удалены, а вместо них трансплантированы пронуклеусы другой группы зигот. В таком случае происходило полное развитие. При пересадке ядер от 2-х дневного эмбриона происходило формирование бластоцисты, однако с гораздо более низкой эффективностью (70%).

Важнейшим результатом работы также является получение клонированных животных. Для их получения вместо вынесенных хромосом были использованы хромосомы культивируемых линий ЭСК, для того, чтобы различить хромосомы из ЭСК (донора) и хромосомы зиготы (реципиента) хромосомы донора несли флуоресцентную метку, связанную с

гистонам H2B. ЭСК были остановлены в митозе с помощью специального вещества – нокодазола, а их хромосомы были перенесены в делящуюся зиготу без веретена деления. Полученные клетки начинали дробиться, 174 зародыша на стадии морулы и бластоцисты были перенесены в матку псевдобеременным мышам. Из этого количества на 19,5 день (после проведения кесарева сечения) было обнаружено 9 жизнеспособных плодов. 7 из них не смогли нормально дышать и погибли, двое остались в живых и развились во взрослых особей. Клетки, выделенные из всех 9 зародышей, имели меченые хромосомы в ядре, это свидетельствовало о том, что они являлись клонами клеток–доноров хромосом линий ЭСК. Клонированных эмбрионов также отличала значительно увеличенная плацента.

Также было показано, что из клонированных зародышей, полученных при переносе хромосом, можно получить линии ЭСК. Так, после переноса хромосом из фибробластов кожи в овоцит эмбрионы развивались до стадии бластоцисты и использовались для получения ЭСК. Из 21 полученной бластоцисты 14 прикрепились к мышинному фидеру, в 8 случаях удалось добиться пролиферации клеток внутренней клеточной массы. В 6 случаях удалось получить собственно линии ЭСК.

Итак, мейотические овоциты и митотические зиготы способны изменять ход событий в соматическом геноме, тогда как энуклеированные и интерфазные зиготы – нет. Возможно, это объясняется тем, что существуют факторы, которые разрушаются (обратимо разбираются) и обновляются во время каждого клеточного цикла, однако, один или более факторов, ответственных за нормальное развитие эмбриона или репрограммирование, перемещаются в пронуклеусы во время интерфазы.

Таким образом, перемещение пронуклеусов одновременно перемещает и эти факторы. Во время мейоза и митоза многие регуляторные молекулы выходят из ядра в цитоплазму, а конденсированные хромосомы могут быть удалены из овоцита или зиготы без перемещения этих молекул или влияния на их активность.

Клонирование животных было основано почти полностью на использовании неоплодотворенных овоцитов и требовало искусственной активации овоцитов. В связи с этим появилось предположение о том, не влияет ли такая искусственная активация на жизнеспособность клонов и их аномалии. Эксперименты подтвердили, что нормально оплодотворенные овоциты, использованные в технологии переноса ядра, могут развиваться в нормальные эмбрионы. Перенос хромосом в митотическую зиготу исключает необходимость в искусственной активации, т.к. развитие уже запущено (слиянием со сперматозоидом).

ЛИТЕРАТУРА:

1. McGrath J., Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*. 1983; 220: 1300–2.
2. Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti M., et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998; 394: 369–74.

Мыши, полученные после переноса хромосом из ЭСК в зиготы, имели две основные аномалии развития: неонатальную дыхательную недостаточность и увеличенную плаценту. Эти аномалии часто описывали и другие группы, однако они не связывали их с искусственной активацией овоцитов. Кроме того, мыши, полученные при переносе хромосом из бластомера в зиготы, не демонстрировали подобных патологических изменений. Эксперименты К. Еггана и соавторов доказывают, что способность к репрограммированию утрачивается оплодотворенным овоцитом не полностью, что согласуется с настойчивыми попытками получить чЭСК с помощью технологии переноса ядра взрослой соматической клетки. Нормальные оплодотворенные овоциты (замороженные в клиниках ЭКО) являются гораздо более доступным и менее этически противоречивым источником для технологии переноса ядра, кроме того, 3–5% из всех человеческих зигот имеют ненормальное количество пронуклеусов после *in vitro* оплодотворения [5]. Эти зиготы не используются в технологии из-за нарушения ploидности, однако они могут использоваться для подобных исследовательских работ. Исследователи проверили, могут ли анеуплоидные мышинные зиготы поддерживать репрограммирование ядра. Оказалось, что при вступлении в митоз пронуклеусы разрушаются, чрезмерное количество хромосом собирается на единственном веретене в центре зиготы. Когда веретено деления удалено, хромосомы удаляются вместе с ним. После переноса хромосом из ЭСК клетки–реципиенты развиваются в бластоцисту и могут быть использованы для получения новых линий ЭСК с нормальным набором хромосом. Таким образом, эти результаты позволяют обсуждать получение индивидуальных линий чЭСК новым методом, который не лимитируется количеством свежесделанных овоцитов.

Овоциты, зиготы и ЭСК обладают способностью к репрограммированию, что свидетельствует о том, что эта активность переходит от неоплодотворенного яйца к доимплантационному зародышу и даже линиям ЭСК, полученным из него. Клетки от одно-, двух-, четырех- и восьмиклеточных зародышей могут использоваться в качестве реципиентов для переноса хромосом.

Если клетки из человеческих преимплантационных эмбрионов могут использоваться в качестве реципиентов генетического материала (переноса хромосом), а ЭСК, остановленные в митозе, могут использоваться для получения «цитопластов» (энуклеированных клеток) со способностью к репрограммированию, то это в значительной степени может приблизить ученых к получению человеческих ЭСК для моделирования заболеваний и использования в регенеративной медицине.

3. Chesne P., Adenot P.G., Viglietta C. et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnol.* 2002; 20: 366–369.

4. Polejaeva I. A., Chen S.H., Vaught T.D., et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 2000; 407: 86–90.

5. Munne S., Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod. Update*. 1998; 4: 842–855.

Подготовила В.С. Мелихова

По материалам: Egli D., Rosains J., Birkhoff G. and Eggan K. *Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. Nature* 2007; 447: 679–85