9. Feron F., Perry C., McGrath J.J., Mackay-Sim A. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. 1998; 124: 861–6.
10. Bianco J.I., Perry C., Harkin D.G. et al. Neurotrophin-3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. Glia 2004; 45: 111–23.
11. Steeves J., Fawcett J., Tuszynski M. Report of international clinical trials workshop on spinal cord injury February 20–21, 2004, Vancouver, Canada. Spinal Cord 2004; 42: 591–7.
12. Takami T., Oudega M., Bates M.L. et al. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. J. Neurosci. 2002; 22: 6670–81.
13. Collazos-Castro J.E., Muneton-Gomez V.C., Nieto-Sampedro M. Olfactory glia transplantation into cervical spinal cord contusion injuries. J. Neurosurg. Spine 2005; 3(4): 308–17.
14. Murrell W., Feron F., Wetzig A. et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. Dev. Dyn. 2005; 233(2): 496–515.

Подготовил А.В. Берсенев
По материалам Brain 2005; 128(Pt 12): 2951–60

КЛОНИРОВАНИЕ

Сравнительное геномное исследование клонированных и нормальных эмбрионов

Технология переноса соматического ядра в энуклеированный овоцит имеет большое значение для биомедицины и сельского хозяйства, так как это уникальный способ получения генетически идентичных родительским клеток или животное-клон. Однако, все исследовательские группы отмечают крайне низкую частоту рождения жизнеспособного животного из такого эмбриона (nuclear transfer, NT-эмбрион). Как правило, еще при раннем эмбриональном развитии наблюдаются значительные нарушения в ткане- и органогенезе, несовместимые с жизнью. И хотя уже получено немало клонированных животных различных видов, полностью контролировать процесс и направленно увеличивать его эффективность пока не удается. Одной из основных причин низкой эффективности технологии считается нарушение эпигенетического контроля работы генов, вследствие этого – неправильное развитие эмбриона. Тем не менее, репрограммирование соматического ядра при его переносе достоверно показано, и удачные случаи клонирования доказывают изменения в генной активности и «снятие» эпигеномной информации.

Недавно была проведена работа по сравнению экспрессии генов в нескольких NT-эмбрионах коров на стадии бластоцисты, с соматическими клетками – донорами ядер и с нормально оплодотворенными бластоцистами. Анализ более 5000 тысяч генов, проведенный при помощи микрочипов, показал, что экспрессия генов в NT-эмбрионах сильно отличается от соматических клеток-доноров и минимально отличается от нормальных бластоцист. Это доказывает, что перенесенные в ооциты ядра претерпевают значительное перепрограммирование на стадии бластоцисты, и проблемы, возникающие при развитии тканей и органов из NT-эмбрионов, возможно, связаны с ошибками этого феномена, значение которых увеличивается в процессе органогенеза.

При сравнении картины транскрипции удалось выявить 29 % генов, по-разному экспрессирующихся в NT-эмбрионах и соматических клетках-донорах ядер. Эти гены относятся к следующим сигнальным путям: окислительное фосфорилирование, клеточный цикл, синтез АТФ, цикл трикарбоновых кислот, метаболизм пуринов, пирувата, гликолиз и глюконеогенез, а также апоптоз. Исследователи проанализировали в NT-эмбрионах 94 гена, которые экспрессируются в этих клетках на высоком уровне. Из них 23 гена значительно сильнее экспрессировались в исследуемых образцах, по сравнению с донорными соматическими клетками. Среди них – ранее описанные ODC1, PECAM1, CCNE1 – гены, специфичные для эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Таким образом, принимая во внимание различия в уровне экспрессии описанных генов, можно предположить, что ядро соматической клетки претерпевает значительное перепрограммирование после переноса в яйцеклетку.

Профиль экспрессии генов был сравнен у NT-эмбрионов и эмбрионов, полученных вследствие искусственной инсеминации (artificial insemination, AI-эмбрионы) и искусственного оплодотворения (*in vitro* fertilization, IVF-эмбрионы). Оказалось, что активность генов в NT-эмбрионах более схожа с таковой в AI-эмбрионах, тогда как различия между NT- и IVF-эмбрионами более значительные. Интересно, что при сравнении индивидуальных эмбрионов внутри группы более однородными являются NT-эмбрионы, а IVF-эмбрионы – наиболее разнородные. Схожая картина генной экспрессии у NT-эмбрионов также подтверждает механизм перепрограммирования ядра. Различия между IVF-эмбрионами могли возникнуть вследствие культивирования или генетических различий матерей-доноров яйцеклеток.

Несмотря на схожую генную экспрессию между NT- и AI-эмбрионами, 50 генов (около 1 %) отличаются по уровню транскрипции. Среди них 8 экспрессируются только в NT-эмбрионах, а 17 – только в AI-эмбрионах. Возможно, эти гены связаны с различиями развития *in vitro* и *in vivo*. Для некоторых из этих генов описаны функции, например, TFAP2A необходим для формирования нервной трубки и

развития сердечной мышцы [1], а MEIS2 и DUSP6 необходимы для развития конечностей [2, 3], (folate receptor 1) играет роль в транспортной системе между материнским и эмбриональным организмами [4]. Все эти гены транскрибируются на низком уровне в NT–эмбрионах и, возможно, являются причиной нарушений развития клонированных животных.

С другой стороны, множество аномалий развития клонированных животных могут быть вызваны нарушениями импринтинга. Исследователи проанализировали экспрессию 21 гена, импринтированных у мыши и человека. Среди этих генов 20 экспрессировались одинаково у NT–, AI– и IVF–эмбрионов. И только один ген – CD81 – активный в плаценте мыши, по–разному экспрессировался у NT– и AI–эмбрионов. Возможно, это нарушение послужило причиной для так называемого large offspring syndrome, часто наблюдаемого в случае NT. Нормальная экспрессия других импринтированных генов подтверждает теорию о перепрограммировании ядра.

Нарушение экспрессии генов, сцепленных с X–хромосомой, наблюдалось у клонированных умерших животных и NT–эмбрионов. Но из 123 известных человеческих генов, сцепленных с X–хромосомой, ученые не нашли ни одного, экспрессирующегося по–разному в AI– и NT–эмбрионах. Исследователи предполагают, что ключевое событие в раннем развитии – инактивация X–хромосомы – возможно, у коров происходит позже, чем те сроки развития, во время которых проводили исследования.

При анализе генов, участвующих в регуляции метилирования и модификации хроматина, не удалось выявить разницы в экспрессии генов по сравнению с нормальными эмбрионами. На основании своих данных ученые сделали вывод, что перепрограммирование соматического ядра, перенесенного в цитоплазму яйцеклетки, касается и эпигенетических изменений.

Из 434 генов, непосредственно вовлеченных в процессы раннего развития, ученым удалось выявить лишь 5 дифференциально экспрессирующихся между NT– и AI–эмбрионами, тогда как у IVF–эмбрионов таких генов 14 по сравнению с NT, и 24 по сравнению с AI–эмбрионами. Эти результаты показывают, какое влияние имеет для раннего развития искусственное оплодотворение. Три гена были активны исключительно у AI–эмбрионов (AKAP11, CCL2 и PPAP26), возможно, они отвечают за успешное развитие нормально оплодотворенных эмбрионов или активируются в ответ на условия развития *in vivo.*

Подводя итог работы, можно сказать, что ученым удалось выявить более 300 генов, которые не меняют своей активности в трех исследованных типах эмбрионов, что может свидетельствовать об их первостепенной важности на ранних этапах развития. Кроме этого, достоверно было показано, что характер экспрессии генов при переносе соматического ядра в яйцеклетку на ранних этапах более близок к таковому в нормально оплодотворенных эмбрионах (AI–эмбрионы). Анализ, проводимый на стадии бластоцисты показал, что соматическое ядро претерпевает репрограммирование, и экспрессия генов меняется в соответствии с генной активностью раннего эмбриона.

Остаётся неясным, почему искусственное оплодотворение, в котором участвуют ядра половых клеток, на ранних этапах сильнее отличается от нормального оплодотворения, чем клонирование. Возможная причина – использование незрелых ооцитов и их длительное культивирование. Необходимы дальнейшие исследования на более поздних сроках развития. По результатам работы можно предположить, что перенос ядра дает больше шансов для развития эмбриона, однако такое положение не совсем обоснованно, так как известны многие функции сперматозоида в оплодотворении помимо передачи генетического набора. Кроме активации ооцита, сперматозоиды также вносят свою РНК, необходимую для раннего контроля работы генов [5, 6], их хроматин имеет специфическую картину метилирования, которую не может воссоздать овоцит. Таким образом, нельзя предполагать лучшее развитие эмбриона при переносе соматического ядра в яйцеклетку, чем при искусственном оплодотворении. Однако, можно утверждать, что ооплазма оказывает огромное влияние на хроматин и работу генов, перестраивая их в соответствии с потребностями раннего эмбрионального развития. С целью выяснения генетических различий между клонированными и нормальными эмбрионами мыши на стадии бластоцисты была проведена аналогичная работа и в лаборатории Rudolf Jaenisch [7]. Ученые подтвердили, что по генной активности и по развитию на этой стадии ЭСК мыши из этих эмбрионов абсолютно идентичны и имеют одинаковый потенциал для использования в терапевтических целей [7]. В то же время, ограниченные сроки развития, при которых проводились исследования, не дают права утверждать, что это перепрограммирование достаточно для дальнейшего развития организма.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Brewer S., Williams T. Loss of AP–2alpha impacts multiple aspects of ventral body wall development and closure. Dev. Biol. 2004; 267(2): 399–417.
2. Kawakami Y., Rodriguez–Leon J., Koth C.M. et al. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. Nat. Cell Biol. 2003; 5(6): 513–9.
3. Mercader N., Leonardo E., Azpiazu N. et al. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. Nature 1999; 402(6760): 425–9.
4. Piedrahita J.A., Oetama B., Bennett G.D.et al. Mice lacking the folic acid–binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. Nat. Genet. 1999; 23(2): 228–32.
5. Kramer J.A., Krawetz S.A. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. Mol. Hum. Reprod. 1997; 3(6): 473–8.
6. Miller D. Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 2000; 56(2 Suppl): 259–64.
7. Brambrink T., Hochedlinger K., Bell G., Jaenisch R. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. PNAS 2006; 103(4): 933–39.

Подготовила Т. В. Лопатина
По материалам Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005; 102(49):17582