

повторной сортировке на основе экспрессии обоих трансгенов. Таким путем исследователям удалось вывести 2 сперматогониальных линии – SSC7 и SSC12.

Клетки были способны формировать эмбрионидные тельца и экспрессировали белки, характерные для сперматогониев. Для определения функциональной активности полученных клеточных линий их пересаживали в семенник мышам (второй служил в качестве контрольного), которым предварительно была проведена абляция половых клеток. У 2 из 10 проанализированных животных в просвете семенного канальца, а также в его стенке, были обнаружены картины нормального сперматогенеза. Однако подвижность полученных клеток была значительно снижена по сравнению с положительным контролем. Происхождение постмейотических клеток в просвете канальца подтверждалось активной флуоресценцией трансгенных белков. У пяти мышей было зафиксировано образование тератом после трансплантации.

Внутрицитоплазматическая инъекция клеток полученных линий в неоплодотворенный овоцит мышей дикого типа приводила к последующему выбросу полярного тельца и формированию пронуклеусов. Двухклеточные эмбрионы, полученные таким образом, имплантировали в яйцевод псевдо-беременной самки. Из 65 перенесенных эмбрионов родилось 12 мышат. По сравнению с мышатами дикого

типа, мышата, полученные искусственным путем, были либо меньше, либо больше по размеру и погибали в течение 5 месяцев. Клетки, несущие трансген, были обнаружены в семенниках некоторых из потомков.

Несмотря на низкую эффективность переноса, рождение слабых и дефектных детенышей, образование тератом после трансплантации клеток, авторы впервые продемонстрировали возможность рождения потомства, полученного после оплодотворения *in vitro* «искусственно» полученными гаметам из ЭСК. Таким образом исследователи доказали, что мужские гаметы, полученные из ЭСК, полностью функциональны. При усовершенствовании методики получения половых клеток из ЭСК и увеличении эффективности оплодотворения и рождения здоровых детенышей, откроются новые перспективы использования данной технологии в биологии и медицине. Прежде всего, разработанная система может служить прекрасной моделью изучения дифференцировки гамет. Возможность выделения гамет из ЭСК может решить проблему некоторых форм бесплодия. Кроме того, выделение функциональных мужских и женских гамет из одной линии ЭСК позволит полностью автономно поддерживать и обновлять эту линию через создание новых blastocyst. Тем не менее, развитие таких технологий одновременно порождает и ряд этических вопросов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лопатина Т.В. Искусственный гаметогенез: дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в гаметы. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 2: 32–4.
2. Hubner K., Fuhrmann G., Christenson L.K. et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science 2003; 300(5623): 1251–6.

3. Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R., Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100(20): 11457–62.

4. Lacham-Kaplan O., Chy H., Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem (ES) cells into ovarian structures containing oocytes. Stem Cells 2006; 24(2): 266–73.

Подготовила В.С. Мелихова
По материалам Dev. Cell 2006; 11(1):125–32

Nanog – фактор репрограммирования ядра взрослой соматической клетки

Изучение и развитие технологии переноса ядра взрослой соматической клетки млекопитающих в энуклеированный овоцит позволило заключить, что генетические и эпигенетические изменения, приобретаемые клеткой в процессе дифференцировки, могут быть полностью «репрограммированы». При этом происходит активация «эмбриональных» генов и ингибирование генов, отвечающих за дифференцировку. Оказалось, что репрограммирование взрослого ядра может быть также достигнуто и слиянием с эмбриональной стволовой клеткой (ЭСК) [2, 3]. Таким образом, взрослая соматическая клетка может вернуться в эмбриональное плюрипотентное состояние и дать начало новому эмбриону.

Остаётся загадкой, какие именно факторы, содержащиеся в овоците и в ЭСК, могут обуславливать феномен генетического и эпигенетического репрограммирования «взрослого» ядра? Группа Austin Smith показала, что одним из таких факторов является ген Nanog. Результаты работы опубликованы в недавнем номере журнала Nature.

Ген Nanog был изолирован и описан Ian Chambers из Эдинбургского университета [4]. Он получил такое название по имени страны вечной юности Тир Нан Ог из кельтской мифологии. При взаимодействии с двумя другими важными факторами – Oct3/4, и SOX-2, Nanog поддерживает «стволовость» через активацию генов, участвующих в про-

цессе деления ЭСК, и инактивацию генов, запускающих процессы развития и дифференцировки [5].

Для проверки гипотезы значения Nanog для репрограммирования ядра и приобретения клеткой свойств плюрипотентности исследователи создавали гибриды нейтральных стволовых клеток (НСК) с ЭСК, сверхэкспрессирующей ген Nanog (ЭСК-N), сливая их *in vitro*. Причём избыточная экспрессия трансгена с Nanog в ЭСК не влияла на частоту слияния. Такой вариант слияния приводил к формированию гибридных колоний, имеющих характеристики ЭСК. Оказалось, что частота формирования колоний была в 200 раз выше, чем в обычных НСК-ЭСК – гибридах и сравнима с таковой при слиянии ЭСК-ЭСК. Клетки таких колоний теряли экспрессию генов НСК и не росли в «нейрональной» селективной среде. Колонии демонстрировали признаки репрограммирования НСК-ядра и плюрипотентности – экспрессию типичных для ЭСК генов, потерю ядерного маркера НСК, спонтанную дифференцировку эмбрионидных телец в сокращающиеся миоциты и т.д. Слияние НСК (НСК-N), избыточно продуцирующих Nanog, с обычными ЭСК приводило к возникновению эмбриональных колоний в 8 раз чаще, чем в контрольных слияниях НСК-ЭСК.

Гиперэкспрессия Nanog в трансгенных ЭСК приводила также к значительному увеличению выхода колоний при их слиянии с эмбриональными фибробластами и тимоцитами. Таким

образом, только избыточная экспрессия гена Nanog обуславливала появление ЭСК-подобных колоний и репрограммирование ядер взрослых клеток. Исследователи заключают, что Nanog играет значительную и, возможно, доминирующую роль в репрограммировании ядра взрослой соматической клетки до эмбриональной «стадии плюрипотентности».

Таким образом, авторы впервые чётко определили фактор репрограммирования «взрослого клеточного ядра». Дальнейшая идентификация таких факторов и умение управлять ими может привести к развитию технологии создания собственных ЭСК-подобных клеточных линий без использования эмбрионов, яйцеклеток и технологии переноса ядра.

Ясно, что Nanog не единственный «игрок в поле», но, возможно, основной. Уже известно, что плюрипотентное

состояние ЭСК поддерживается взаимодействием основных факторов – Oct3/4, Nanog, Sox2 и, возможно, рядом дополнительных [5]. Так Yamanaka Shinya из Kyoto University месяц назад доложил о возможности репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов до ЭСК-подобного состояния введением комбинации факторов, включающих Sox2 и Oct3/4 [6]. Возможным механизмом репрограммирования и плюрипотентности также могут являться белки (Wnt-3) и молекулы мРНК транскрипционных факторов (Oct-4, Rex-1, Nanog, SCL и GATA-2,4), содержащиеся в цитоплазме ЭСК или в мембранных везикулах и поддерживающих «стволовость» [7]. Будущие работы будут направлены на более тщательное изучение этих факторов в человеческих клетках.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rideout W.M. 3rd, Eggan K., Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093–8.
2. Tada M., Takahama Y., Abe K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 2001; 11: 1553–8.
3. Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A., Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005; 309: 1369–73.
4. Chambers I., Colby D., Robertson M. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643–55.

5. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947–56.

6. Shinya Y. Identification of factors that generate ES-like pluripotent cells from fibroblast culture. Oral presentation at 4th ISSR Annual Meeting. June 29 – July 1, 2006, Toronto, Canada.

7. Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847–56.

Подготовил А.В. Берсенева

По материалам *Nature* 2006; 441(7096): 997–1001

Выделение эмбриональных стволовых клеток человека из бластомеров

Стандартный метод выделения эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК) из внутренней клеточной массы бластоцисты вызывает ряд этических противоречий, связанных с разрушением эмбрионов, несмотря на то, что этот материал утилизируется в клиниках искусственного оплодотворения. Чтобы избежать этических проблем, учёные предлагают технологию выделения линий ЭСК из единичных бластомеров на более ранних стадиях развития человеческого эмбриона. Так, в прошлом году группа Lanza из компании Advanced Cell Technology (Worcester, MA, USA) опубликовала работу по выделению линий ЭСК из мышинных бластомеров [1]. Возможность выделения ЭСК человека из эмбрионов более ранних стадий развития (до бластоцисты) была также показана Н. Стрельченко, однако процедура сопровождается разрушением эмбриона [2].

Новая технология – выделение ЭСК из единичных бластомеров позиционируется как метод без разрушения эмбрионов. Техника биопсии бластомера без разрушения эмбриона была отработана уже давно при разработке метода предимплантационной генетической диагностики (PGD) после процедур экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). При этом было показано, что удаление одного бластомера из ранних эмбрионов (до развития стадии бластоцисты) не имеет никакого орицательного влияния на последующее развитие зародыша и ребёнка в будущем [3]. Результаты новой работы группы Lanza, описывающие технику выделения ЭСК из бластомеров человека, опубликованы в он-лайн-версии журнала *Nature*.

Исследователи использовали 16 эмбрионов, замороженных на 8–10-клеточной стадиях в клиниках ЭКО. После

выделения отдельных бластомеров их помещали в среду, оптимальную для культивирования ЭСК. В течение недели исследователи наблюдали деление бластомеров и формирование колоний ЭСК-подобных клеток. Авторам удалось выделить 2 стабильные линии ЭСК. Эти линии демонстрировали все классические признаки плюрипотентности – экспрессировали характерные маркёры, давали тератомы в SCID-мышам, дифференцировались спонтанно или индуцированно в клетки всех 3-х зародышевых листков как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, эти линии по своим характеристикам были практически неотличимы от стандартных зарегистрированных линий ЭСК, выделенных из бластоцист, и даже демонстрировали более выраженные признаки плюрипотентности.

Таким образом, авторы работы показали принципиальную возможность выделения стабильных линий ЭСК человека из единичных бластомеров, полученных из 8–10-клеточных эмбрионов, без их разрушения. Исследователи усовершенствовали технику культивирования бластомеров и индукцию развития из них ЭСК. Более ранние попытки получения ЭСК из бластомеров человека оказывались нереализованными [4, 5].

Несмотря на красивую демонстрацию идеи «выделения ЭСК человека без разрушения эмбрионов», технология не найдёт широкого применения в будущем. Поскольку, как отмечает сам Lanza, она может применяться только у клиентов клиник ЭКО, проходящих процедуру PGD. Однако число таких женщин и семейных пар крайне невелико, и гарантировать женщине – донору яйцеклеток получение собственной линии ЭСК будущего ребёнка можно только при совершенной