состоянии. H90 влияет на обе функции этой молекулы, как нарушая как хоуминг, так и приводя к дифференцировке лейкемических бластов и их последующей гибели. Эти результаты позволяют предположить возможность появления совершенно новой линии терапии, исключающей применение препаратов, воздействующих на делящиеся клетки – тем более, что малигнизированные миелоидные клетки часто оказываются к ним устойчивы.

H90 блокирует хоуминг примитивных $CD34^+CD38^-$ клеток как в костный мозг, так и в селезёнку, а также препятствует трансмиграции лейкемических клеток через стенки капилляров. Пока неясно, может ли применение H90 стимулировать быструю дифференцировку уже начавших дифференцироваться злокачественных клеток. Может оказаться, что механизмы, справедливые для лейкозов, могут быть задействованы и в солидных опухолях, содержащих небольшую популяцию стволовых клеток, обеспечивающих рост опухолевой массы [4]. Также для клеток солидных опухолей важны контакты с их микроокружением, которое в основном составляют стромальные фибробласты. Задействованы ли в этих процессах специфические изоформы CD44, ещё предстоит выяснить. Тем не менее, недавно было показано, что инициирующие клетки рака груди также экспрессируют молекулу CD44 [9].

Таким образом, результаты, полученные группой Dick et al., открывают большие перспективы терапии, воздействующей непосредственно на стволовые клетки опухоли – то есть, фактически, на её первопричину, а не на следствие. В дополнение к этому авторы продемонстрировали, насколько важно для РСК их микроокружение, без которого они не могут сохранять свои «стволовые» характеристики. Конечно, кроме CD44 существует и ряд других поверхностных и внутриклеточных сигнальных молекул [10], отвечающих за регуляцию функций раковых и нормальных взрослых стволовых клеток, которые могут стать потенциальной мишенью для создания противораковых препаратов нового поколения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wang J.C., Dick J.E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. Trends Cell Biol. 2005; 15: 494–501.
2. Hope K., Jin .L, Dick J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. Nat. Immunol. 2004; 5: 738–43.
3. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat. Med. 1997; 3: 730–7.
4. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer Stem Cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. Cancer Res. 2006; 66: 9339–44.
5. Tallman M.S. New stratefies for the treatment of acute myeloid leukemia including anbtibodies and other novel agents. Hem. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2005; 143–50.
6. Krause D.S., Lazarides K., von Andrian U.H. et al. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. Nat. Med. 2006; 12(10): 1175–80.
7. Ponta H., Sherman L., Herrlich P.A. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003; 4: 33–45.
8. Bendall L.J., Bradstock K.F., Gottlieb D.J. Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34+ cells. Leukemia 2000; 14: 1239–46.
9. Al-Hajj M., Wicha M., Morrison S.J. et al. Prospective indentification of tumorigenic breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100: 3983–8.
10. Yilmaz O.H., Valdez R., Theisen B.K. et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. Nature 2006; 441(7092): 475–82.

Подготовила А.С. Григорян
По материалам Nat. Med. 2006; 12(10): 1167–74

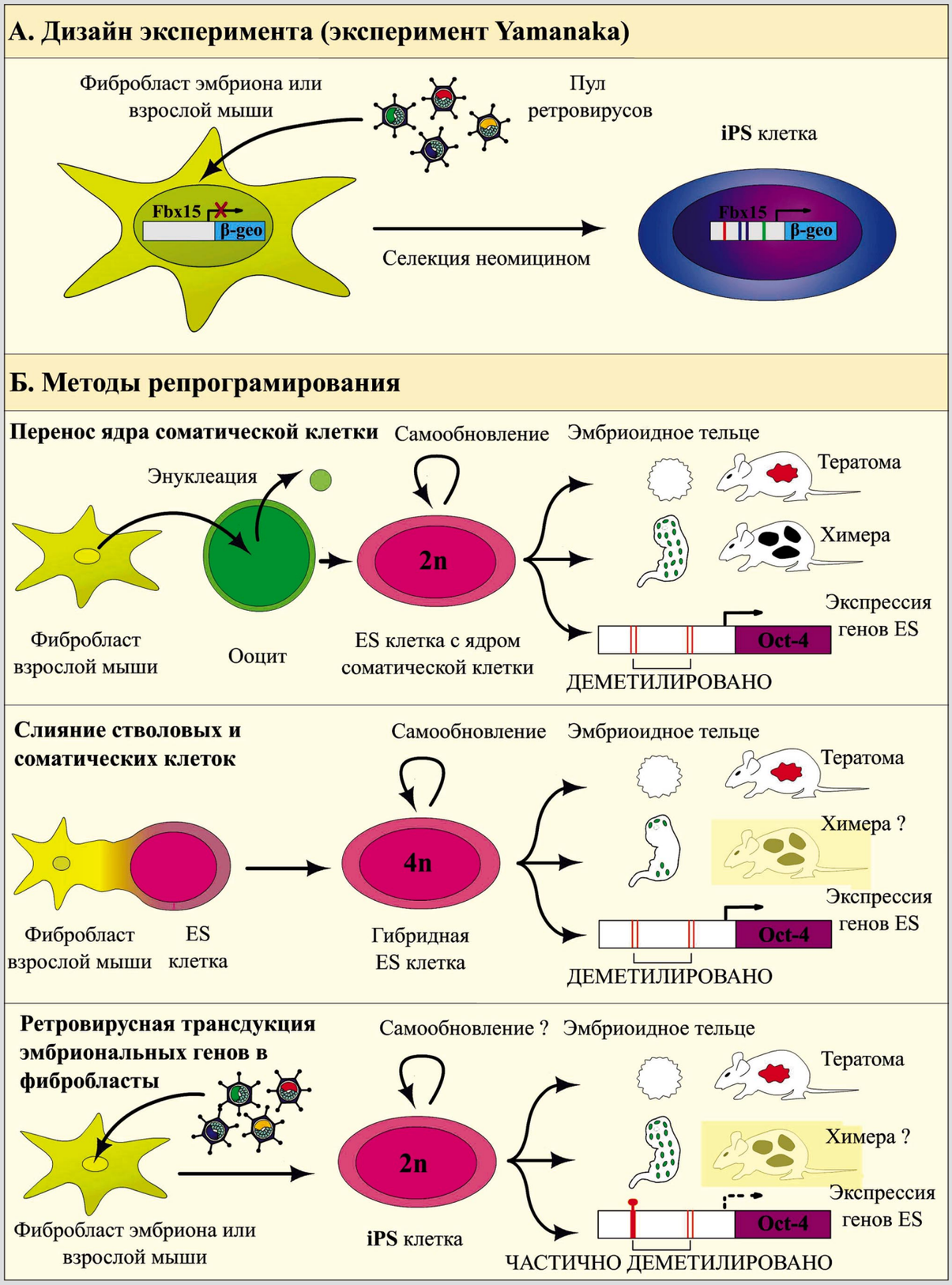
Генетическая индукция репрограммирования ядра соматической клетки установленными факторами

Феномен репрограммирования ядра взрослой соматической клетки интенсивно изучается в последнее время в связи с возможными перспективами получения «пациент-специфичных» плюрипотентных клеток, подобных эмбриональным стволовым (ЭСК). При реализации этого феномена, под влиянием неизвестных факторов в ядре соматической клетки происходит активация генов раннего эмбриогенеза и ингибирование генов, ответственных за дифференцировку и специализацию. При полном репрограммировании «стирается» как специализированная генетическая, так и эпигенетическая информация, и клетка приобретает свойство плюрипотентности.

Полное репрограммирование соматической клетки происходит при переносе ядра в энуклеированную неоплодотворённую яйцеклетку (технология клонирования) [1] и при слиянии взрослой специализированной клетки с ЭСК [2, 3]. Эти эксперименты доказали возможность полного репрограммирования ядра терминально дифференцированной клетки. Остаются неизученными механизмы и факторы, обусловливающие реализацию этого биологического феномена. Лаборатория Austin Smith показала, что одним из ключевых факторов репрограммирования ядра взрослой клетки может быть ген Nanog [4]. Недавно исследовательская группа Shinya Yamanaka из Kyoto University описала новый экспериментальный подход к репрограммированию ядра соматической клетки и изучению факторов, обусловливающих этот феномен. Результаты исследования опубликованы в журнале Cell.

Авторы предположили, что искусственно индуцированная избыточная экспрессия «генов плюрипотентности», описанных как факторы поддержания «стволовости» в ЭСК, может стимулировать процесс репрограммирования взрослой клетки до эмбриональной. Для проверки гипотезы авторы проводили трансфекцию изолированными генами-кандидатами 2 типов клеток – эмбриональных и взрослых фибробластов мыши. Всего было выбрано 24 гена-кандидата, среди них гены самообновления, а также гены активные в опухолевых клетках и ЭСК, описанных в некоторых работах и из библиотеки *in silico* (Oct3/4, Sox2, Nanog, C-myc и др.).

Одновременное введение всех 24 генов приводило к активации промотера, активного только в ЭСК (Fbx15) и появлению антибиотик-селективных колоний. Введение каждого гена по отдельности не приводило к росту ЭСК-подобных колоний. Последовательными экспериментами авторы «сузили» окно искомых генов сначала до 10 (iPS-MEF10 клетки), а потом до 4 (iPS-MEF4) – Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4.



Общая схема подходов к изучению феномена репрограммирования ядра соматической клетки: А – эксперимент Shinya Yamanaka; Б – перенос ядра [1], слияние [2, 3] и генетическая индукция Заимствовано с модификацией [8]

Все эти факторы описаны и известны как определяющие и поддерживающие самообновление и «стволовость» ЭСК [5–7]. IPS–MEF4 клетки, полученные из эмбриональных фибробластов, обладали типичными свойствами ЭСК – имели подобную морфологию и рост в культуре с формированием эмбриоидных телец, образовывали тератомы в классическом *in vivo* тесте, были способны к мульти–дифференцировке. Другим важным доказательством эффективности метода репрограммирования стал эксперимент по получению ЭСК–подобных колоний из взрослых фибробластов индукцией 4 вышеуказанных генов (iPS–TTF4) и демонстрация их плюрипотентности формированием тератом *in vivo*, а также химеризация эмбриона при их инъекции в бластоцисту.

Интересно, что эффективность формирования ЭСК–подобных колоний не зависела от введения гена Nanog – первого и значительного (по мнению группы Austin Smith) фактора–кандидата, обусловливающего феномен репрограммирования [4]. В комментарии к статье Kevin Eggan и Kit Rodolfa из Harvard Stem Cell Institute указывают, что полученные клетки нельзя назвать абсолютно идентичными ЭСК, а репрограммирование – полным. На это указывают факты отсутствия постнатальной химеризации животных после инъекции в бластоцисту, увеличение разницы в карте генной экспрессии на микрочипах при пассировании клонов по сравнению с контрольными ЭСК (например, отсутствие экспрессии Ecat1), различный уровень метилирования Oct3/4–промотера, говорящий о неполном эпигенетическом репрограммировании. Поэтому, по сравнению с другими методами, уровень репрограммирования фибробластов в работе остаётся неполным, и, возможно, iPS клетки более похожи на клетки эмбриональной карциномы (ECC), но не идентичны ЭСК [8].

Тем не менее, эксперименты Yamanaka чётко указывают на перспективность такого методического подхода для тестирования возможных факторов репрограммирования в эксперименте. Авторы впервые показали, что метод применим для индукции репрограммирования взрослой дифференцированной соматической клетки (на примере взрослого фибробласта мыши) и выявили 4 новых фактора, обусловливающих этот феномен. Остаётся неизвестным значение в репрограммировании каждого фактора в отдельности, их ансамбль и взаимодействие. Приведёт ли к полному репрограммированию взрослой терминально дифференцированной клетки добавление ещё одного–двух каких–либо факторов и каких? Будет ли этот метод работать на других типах соматических клеток и у человека? Ответы на эти вопросы позволят понять биологические механизмы феномена репрограммирования и значительно продвинуть клинические перспективы метода создания пациент–специфичных плюрипотентных клеток в регенеративной медицине.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 1997; 385(6619): 810–3.
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. Silva J., Chambers I., Pollard S., Smith A. Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. Nature 2006; 441(7096): 997–1000.
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. Cartwright P., McLean C., Sheppard A. et al. LIF/STAT3 controls ES cell self–renewal and pluripotency by a Myc–dependent mechanism. Dev. 2005; 132(5): 885–96.
7. Li Y., McClintick J., Zhong L. et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS–3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. Blood 2005; 105(2): 635–7.
8. Rodolfa K.T., Eggan K. A transcriptional logic for nuclear reprogramming. Cell 2006; 126(4): 652–5.

Подготовил А.В. Берсенев
По материалам Cell 2006; 126: 663–76

КЛОНИРОВАНИЕ

Зависимость эффективности клонирования от степени дифференцировки клетки – донора ядра

За последние 10 лет экспериментов по переносу ядра соматической клетки в энуклеированный овоцит с целью клонирования организмов или создания линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) было установлено, что успех процедуры зависит от степени дифференцировки клетки – донора ядра. Так, было постулировано, что при использовании ядра ЭСК вероятность рождения жизнеспособных клонов повышается в 5–10 раз [1]. Это привело к рождению гипотезы использования ядра «взрослой» стволовой клетки для улучшения результативности процедуры клонирования [2]. Логично предположить, что «полностью репрограммировать» ядро стволовой или прогениторной клетки теоретически легче, чем терминально дифференцированной. Справедливость такого подхода совсем недавно была показана в эксперименте, использующем в качестве донора ядра нейральную стволовую клетку [2]. Кроме того, попытки клонирования мыши из постмитотического обонятельного нейрона [3] и зрелых Т–, В–лимфоцитов [4] оказывались удачными только при применении двух–шагового протокола путём химеризации бластоцисты или тетраплоидного эмбриона клонированными ЭСК [3, 4].

Международная группа исследователей из нескольких университетов США и Японии недавно завершила интересное исследование, показывающее зависимость эффективности клонирования мыши от степени дифференцировки клетки –