

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 эмбрионидных 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, обуславливающего 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-промотора, 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 (ЕСС), 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, обуславливающих 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., McClintock 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. Берсенов
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 –

донора ядра. Исследователи предположили, что вероятность развития и рождения клонов будет выше при переносе ядра зрелой постмитотической клетки по сравнению со взрослой стволовой. Гипотеза базировалась на результатах недавней работы японской группы Kimiko Inoue из университета RIKEN, продемонстрировавшей, что эффективность репрограммирования ядра и клонирования мыши из гемопоэтической стволовой клетки неожиданно оказалась очень низкой [5]. В настоящем эксперименте авторы также использовали гемопоэтические клетки одной линии дифференцировки, поскольку ГСК у мыши, на сегодняшний день, являются самыми хорошо описанными примерами «взрослых» стволовых клеток. Результаты работы опубликованы в журнале *Nature Genetics*.

Для сравнения эффективности клонирования были использованы ядра высокоочищенных клеток крови одной линии дифференцировки – гемопоэтической стволовой (ГСК), гемопоэтической прогениторной клетки (ГП) и постмитотического гранулоцита (Г) мыши. Эффективность клонирования ранних эмбрионов (на стадии морулы–бластоцисты) оказалась значительно ниже при использовании ГСК (8%) по сравнению с ГП (11%) и Г (35%). Большинство эмбрионов, полученных от ГСК, останавливались в развитии на 2–4-клеточной стадии. Авторам удалось получить 2 мышат при переносе ядра постмитотического гранулоцита. Частота клонирования при этом составила 1,1%. В контрольных экспериментах использование ядер кумулюсных и эмбриональных стволовых клеток приводило к развитию бластоцисты с частотой 53,3% и 49% соответственно, а также к рождению клонированного потомства в 3% и 9% случаев соответственно, что совпадает с данными, полученными другими группами исследователей [1, 6].

Авторы указывают, что это первое документированное исследование, показывающее возможность клонирования мыши непосредственно путём переноса ядра постмитотической терминально дифференцированной клетки. Все клетки – доноры ядер в эксперименте были тщательно охарактеризованы фенотипически (получены методом клеточного сортирования) и функционально (реконституция костного

мозга после пересадки ГСК и ГП, исследование колониеобразования). Было показано, что гранулоциты, используемые в работе, не были способны совершать клеточные деления. В отличие от этой работы, все клетки, используемые другими группами исследователей (кумулясные [6], NKT [7], фибробласты) были способны митотически делиться. Попытка использования постмитотической клетки приводила к успеху только при использовании двухступенчатого протокола (химической зародыша клонированными ЭСК) [3, 4].

Безусловным достоинством работы является использование системы одного «гемопоэтического дифферона» (ГСК – ГП – Г) для сравнения эффективности клонирования в зависимости от степени дифференцировки клетки – донора. Пока авторы не могут объяснить, почему ГСК (взрослая стволовая клетка) обладает меньшим потенциалом к репрограммированию и клонированию, чем зрелые клетки. Аналогичные неожиданные результаты при использовании ГСК были получены до этого японской группой [5]. Сравнительные исследования глобальной генной экспрессии позволят идентифицировать гены или эпигенетические признаки, ответственные за большую частоту репрограммирования клеточного ядра. Поскольку использование ЭСК по-прежнему приводит к самой высокой частоте клонирования, авторы предполагают, что общие гены «стволовости» ЭСК и ГСК, по-видимому, не отвечают за репрограммирование ядра клетки при его переносе в овоцит. Robert Blelloch в недавней работе указывает, что частота репрограммирования в цитоплазме овоцита зависит от степени метилирования донорского ядра [2].

Таким образом, полученные данные опровергают популярную гипотезу о возможном улучшении эффективности репрограммирования ядра и клонирования организмов при использовании менее дифференцированной клетки–донора (взрослой стволовой или прогениторной). Интересно было бы проверить эти данные на клетках человека. Кроме того, поскольку в эксперименте с использованием нейтральных стволовых клеток были получены противоположные результаты [2], в будущем предстоит сравнить несколько типов взрослых стволовых клеток в рамках одного исследования.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rideout W.M. 3rd, Eggan K., Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093–8.
2. Blelloch R., Wang Z., Meissner A. et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* 2006; 24(9): 2007–13.
3. Eggan K., Baldwin K., Tackett M. et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 2004; 428(6978): 44–9.
4. Hochedlinger K., Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear

- transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002; 415(6875): 1035–8.
5. Inoue K., Ogonuki N., Miki H. et al. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J. Cell Sci.* 2006; 119: 1985–91.
6. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810–3.
7. Inoue K., Wakao H., Ogonuki N. et al. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. *Curr. Biol.* 2005; 15(12): 1114–8.
8. Ogura A., Inoue K., Ogonuki N. et al. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning Stem Cells* 2002; 4(4): 397–40.

Подготовил А.В. Берсенева

По материалам *Nature Genet.* 2006; AOP October 1; doi:10.1038/ng1895