

на выявление возможных хромосомных aberrаций, не выявляли уровни экспрессии критических эмбриональных генов,

таких как Oct 4, Cdx2 и др., то есть не доказали, что клетки были полностью репрограммированы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64–6.
2. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256–58.
3. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450 (7169): 497–502.
4. Stojkovic M., Stojkovic P., Leary C. et al. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2005; 11: 226–31.
5. Lu C., Lin G., Xie C. et al. Reconstruction of human embryos derived from

- somatic cells. *Chinese Science Bulletin* 2003; 48: 1840–3.
6. Campbell K.H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1999; 1: 3–15.
7. Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–74.
8. French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer (SCNT) with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485–93.
9. Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 1013–19.

Подготовил И.Я. Бозо

По материалам: French A.J., Adams C.A., Anderson L.S. Fibroblasts Development of Human cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) with Adult Fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485–93

Получение мультипотентных клеток из GPR125⁺ сперматогенных стволовых клеток

Сперматогенез является тонко регулируемым и сложным процессом, в который вовлечено несколько типов клеток. К ним относятся клетки, способные дифференцироваться в гаметы; гормон-секретирующие клетки Лейдига и клетки Сертоли, обеспечивающие регуляцию и дифференцировку клеток полового ряда. Первичные половые клетки, или гонциты, имеют внегонадное происхождение. Они обособляются на задней стенке первичной кишки от прочих клеток формирующегося эмбриона и мигрируют в область зачатка половых желез на вентральной стороне мезонефроса. У эмбрионов мужского пола мигрирующие в гонады гонциты делятся несколько раз. Тем самым они преобразуются в просперматогонии и создают некоторое число (определенный, но не окончательный пул) стволовых сперматогенных клеток. Затем сперматогенез приостанавливается на этом этапе и возобновляется уже при наступлении полового созревания, когда происходит дифференцировка стволовых клеток в сперматогонии типа А (темная цитоплазма). Они медленно делятся с образованием светлых быстроделющихся прогениторных клеток, дающих начало сперматогониям типа В. Последние, в свою очередь, вступают на путь дифференцировки в сперматоциты, а далее в сперматиды и сперматозоиды.

Культивирование сперматогенных стволовых/прогениторных клеток (СпСПК) до последнего времени являлось трудновыполнимой задачей, так как выделенные из протоков извитых семенных канальцев клетки даже на фидерном слое инактивированных мышинных эмбриональных фибробластов быстро теряют пролиферативную активность [1]. Тем не менее, используя специфический коктейль факторов роста, в состав которого входили glial cell line-derived neurotrophic factor, EGF, bFGF и LIF, Т. Shinohara с соавт. (2003) удалось культивировать СпСПК мыши в течение длительного времени [2]. После пятимесячного культивирования трансплантация полученных клеток (germinal stem cells, GS-клетки) бесплодным мышам приводила к восстановлению сперматогенеза. Формирования тератом или каких-либо соматических тканей обнаружено не было, что свидетельствовало

о том, что GS-клетки надежно коммитированы в сперматогенном направлении.

Однако в более позднем исследовании Т. Shinohara с соавт. (2004) обнаружили, что после 4–7 недель культивирования GS-клеток, наряду с типичными колониями, выявляются колонии клеток, по своей морфологии сходные с ЭСК [3]. Более того, клетки ЭСК-подобных колоний удалось выделить и размножить при культивировании в среде, содержащей 15% сыворотки плодов коров и LIF, что является стандартным условием культивирования ЭСК. ЭСК-подобные клетки дифференцировались в разные типы соматических клеток при индукции *in vitro* и формировали тератомы при трансплантации иммунодефицитным мышам. Введение ЭСК-подобных клеток в полость бластоцисты приводило к образованию химерных эмбрионов. Наличие в семенниках неонатальных мышей клеток с мультипотентной природой позже было подтверждено немецкой исследовательской группой К. Guan и др. (2006). Полученные при культивировании СпСПК мыши мультипотентные клетки получили обозначение maGSCs (multipotent adult germline stem cells) [4]. Тем не менее, фенотипический профиль специфической субпопуляции сперматогенных клеток, которые могут при культивировании конвертироваться в ЭСК-подобные клетки, остается плохо изученным.

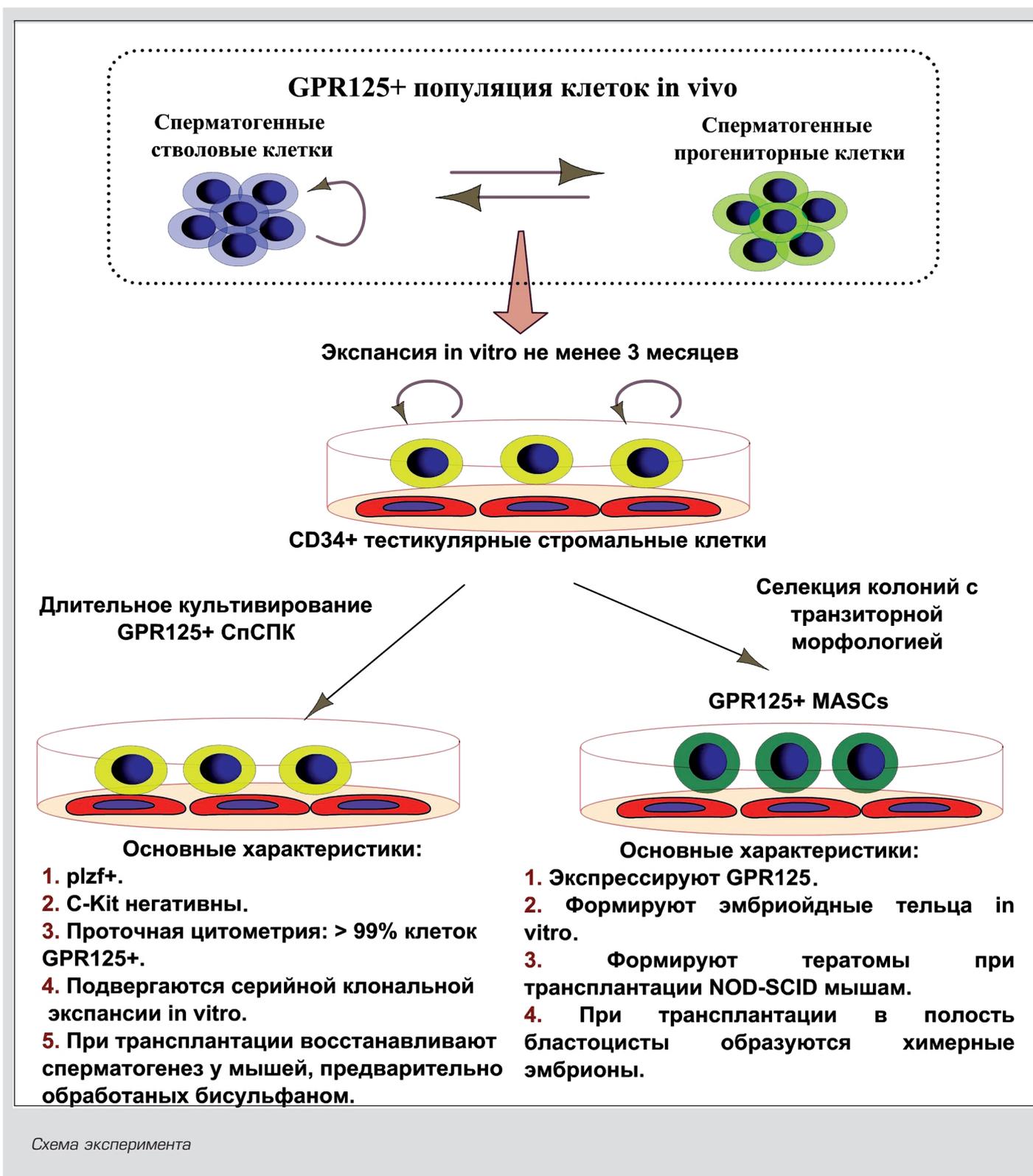
Ранее было показано, что поверхностный белок GPR125, экспрессирующийся в семенниках неонатальных мышей, является потенциальным маркером СпСПК [5]. Группа исследователей под руководством S. Rafii из Медицинского института Говарда Хьюза предположила, что GPR125⁺ является маркером субпопуляции сперматогенных клеток, конвертирующихся в ЭСК-подобные клетки при длительном культивировании.

На первом этапе исследования, для визуализации экспрессии GPR125 генноинженерными методами были получены мыши, несущие ген LacZ, под контролем GPR125-промотора. Окрашивание срезов семенников на наличие галактозидазы показало, что экспрессия маркера обнаруживалась лишь в извитых семенных канальцах и ограничивалась

первым слоем клеток, непосредственно прилегающих к базальной мембране, то есть являвшихся сперматогониями.

Культивирование GPR125⁺ клеток на обычном слое фидерных клеток оказалось неэффективно. Тогда авторы использовали фидерный слой из инактивированных тестикулярных стромальных клеток, содержащих CD34⁺ перитубулярные клетки, которые, как ранее было показано, могут играть ключевую роль в экспансии сперматогенных клеток [6].

Культивирование сперматогенных клеток от Gpr125^{lacZ/lacZ} мышей приводило к получению пролиферирующих колоний с экспоненциальной фазой роста. Клетки многократно пассировались и поддерживались в культуре вплоть до года без каких-либо признаков трансформации. На протяжении всего времени культивирования клетки поддерживали постоянный уровень экспрессии GPR125 и не экспрессировали поверхностный маркер c-kit (рис.).



Молекулярная идентичность GPR125⁺ СпСПК после одновременного культивирования подтверждалась количественной ПЦР. СпСПК экспрессировали герминальные транскрипционные факторы Dazl, PLZF, Mvh и не экспрессировали транскрипционные факторы, характерные для более поздних стадий дифференцировки сперматогенных прогениторных клеток (Sox17, Tnp1, Adam2, Prm1 и Pcgk2). Эти данные свидетельствуют, что репопулирующие СпСПК имели герминальное происхождение и при этом находились в недифференцированном состоянии. Таким образом, авторы создали условия, которые позволили получить одновременно культуру GPR125⁺ сперматогоний.

На следующем этапе эксперимента изучалась способность GFP⁺ GPR125^{lacZ/lacZ} СпСПК восстанавливать сперматогенез у обработанных бисульфатом C57Bl6 мышей. На 2–3-й месяц посттрансплантационного периода выявлялось большое количество GFP⁺ Gpr125^{lacZ/lacZ} колоний герминальных клеток внутри извитых семенных канальцев реципиентов. Клетки этих колоний характеризовались типичной сперматогенной морфологией. Окрашивание на наличие галактозидазы подтвердило, что небольшая субпопуляция GPR125⁺ (LacZ⁺) клеток среди общей массы GFP⁺ клеток непосредственно контактировала с базальной мембраной.

Как и в исследовании T. Shinohara et al. (2004), после трех месяцев культивирования СпСПК наряду с типичными колониями наблюдалось появление ЭСК-подобных колоний клеток, обозначенных авторами как MACSs (multipotent adult spermatogonial-derived stem cells). MACSs имели более высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение и успешно пролиферировали в среде для культивирования мышинных ЭСК. Абсолютное большинство MACSs после длительного культивирования имели нормальный кариотип без каких-либо цитогенетических аномалий и экспрессировали высокие уровни GPR125 и Oct4.

Потенции Gpr125^{lacZ/lacZ} MACSs на первом этапе оценивались путем формирования и дифференцировки эмбрионидных телец *in vitro* [7]. В течение 7 дней после посева в

формирующихся эмбрионидных тельцах выявлялись разные уровни экспрессии GPR125 с четкими границами между GPR125⁺ и GPR125⁻ областями. Полностью сформированные колонии содержали HNF3b⁺ (FOXA2⁺) клетки, являющиеся производными энто- или эктодермы, цитokerатин-позитивные или GFAP⁺ клетки, являющиеся производными эктодермы, и клетки, экспрессирующие миозин скелетных мышц и являющиеся производными мезодермы.

Подкожная трансплантация GPR125^{lacZ/lacZ} MACSs иммунодефицитным мышам приводила к формированию тератом (в 14 из 14 случаев). Гистологический и иммуногистохимический анализ тератом показал наличие производных всех трех зародышевых листков. Введение GPR125^{lacZ/lacZ} MACSs в полость бластоцист приводило к формированию химерных эмбрионов с эффективностью 22% (8 эмбрионов из 37 бластоцист).

Анализ экспрессии транскрипционных факторов GPR125^{lacZ/lacZ} MACSs в сравнении с ЭСК, СпСПК и мышинными эмбриональными фибробластами показал высокий уровень экспрессии Oct4, Nanog и Sox2 в MACSs и ЭСК. Минимальная экспрессия типичных маркеров сперматогенных стволовых клеток, Plzf, Ret и Stra8, наблюдалась у MACSs, тогда как высокая степень экспрессии этих факторов, как и ожидалось, обнаруживалась у СпСПК. Удивительно, что некоторые герминально-ассоциированные факторы транскрипции (например, Dazl) практически не экспрессировались в MACSs, как и некоторые типичные факторы транскрипции ЭСК (Gdf3, Esg1, Rex1). Различия в экспрессии этих генов свидетельствуют, что MACSs являются отдельным типом стволовых клеток.

Таким образом, авторы исследования охарактеризовали GPR125 как поверхностный клеточный маркер, характеризующий популяцию самообновляющихся c-kit⁺ PLZF⁺ СпСПК, которые способны восстанавливать сперматогенез при трансплантации мышам и конвертироваться в GPR125⁺ MACSs при длительном культивировании. Полученные данные позволяют утверждать, что GPR125⁺ сперматогенные клетки являются клетками-предшественниками MACSs.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Nagano M., Ryu B.Y., Brinster C.J. et al. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod.* 2003; 68: 2207–14.
2. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K. et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 612–16.
3. Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J. et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119: 1001–12.
4. Guan K., Nayernia K., Maier L.S. et al. Pluripotency of spermatogonial stem

cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199–203.

5. Valenzuela D.M., Murphy A.J., Frenthewey D. et al. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nature Biotechnol.* 2003; 21: 652–9.

6. Kuroda N., Nakayama H., Miyazaki E. et al. Distribution and role of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in human normal testicular stroma. *Histol. Histopathol.* 2004; 19: 743–51.

7. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005; 19: 1129–55.

Подготовили: С.А. Сергеев, Ю.Б. Дьякова

По материалам: Seande M., James D., Shmelkov S. et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125⁺ germline progenitors. *Nature* 2007; 449: 346–52