Ученые показали возможность дифференцировки этих клеток *in vitro* в нервную ткань и мезенхиму. В качестве контроля использовали две линии ESC, полученные при обычном оплодотворении. Затем, NT–pESC были использованы для получения химерных мышей. Органы этих мышей проанализировали на содержание клеток NT–pESC и их дериватов (по маркёрному белку). В каждом образце уставливали уровень метилирования импринтированных доменов, которые оказались гипометилированными по сравнению с нормой. При этом клетки NT–pESC химеризовали органы и дифференцировались в тканях мышей.

Таким образом, японская группа исследователей показала положительное влияние процедуры переноса ядра на потенциал развития партеногенетических ЭСК. Интересно, что в полученных линиях NT–pESC не наблюдали феномена потери Х–хромосомы, что обычно бывает при партеногенезе. В данном эксперименте все кариотипические и эпигенетические характеристики линий сохранялись, как и у pESC, на протяжении нескольких пассажей (до 30). Кроме того, уровень успешного образования клеточных линий после переноса ядра партогенетической клетки в ооцит был в полтора–два раза выше, чем при получении NT–ESC, когда донором ядра были соматические клетки или нормальные ESC. Причины этого неясны. Можно предположить, что улучшенное развитие, дифференцировка и жизнеспособность этих клеток явились следствием отбора самых лучших клеток для донорства ядра и цитоплазмы, и этот отбор производился неоднократно в течение двух и более переносов генетического материала в ооцит. Возможно также, что здесь наблюдается влияние новой цитоплазмы ооцита на ядро. В любом случае, положительный эффект переноса ядра на жизнеспособность и потенциал развития клеток NT–pESC был подтвержден серией экспериментов. Причины изменений потенциала развития еще предстоит выяснить. Использование партеногенетических клеток в медицине имеет многообещающие перспективы. Несмотря на генетические нарушения и аномальность развития этих клеток по сравнению с ESC, исследования в этой области имеют также и большое фундаментальное значение.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Surani M.A., Barton S.C., Norris M.L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature 1984; 308(5959): 548–50.
2. McGrath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell 1984; 37(1): 179–83.
3. Kaufman M.H., Barton S.C., Surani M.A. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. Nature 1977; 265(5589): 53–5.
4. Holm T.M., Jackson–Grusby L., Brambrink T. et al. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. Cancer Cell 2005; 8(4): 275–85.

Подготовила Т. Лопатина
По материалам: Stem Cells 2007; 25; 1: 46–53

Создание гистосовместимых эмбриональных стволовых клеток методом партеногенеза

Генетически совместимые плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки, созданные методами переноса ядра и/или с помощью партеногенеза (пЭСК), могут являться потенциальным источником тканей для трансплантации при различных заболеваниях.

Результатом партеногенеза у многих животных является развитие нормального эмбриона без предварительного оплодотворения овоцита. Однако грызуны не относятся к таким видам, так как их пренатальное развитие требует экспрессии генов отцовского генома (пронуклеуса). Ранее сообщалось о получении пЭСК из партеногенетических бластоцист мышей и приматов [1, 2]. При развитии таких животных наблюдалось явление партеногенетического химеризма. У человека такое явление было описано при получении партеногенетических клеток кожи и гематопоэтической системы [3]. В 2004 году японской группой Tomohiro Kono впервые была показана возможность рождения жизнеспособного потомства из партеногенетически развитых эмбрионов мыши [4].

Экспериментальный партеногенез у грызунов представляет собой остановку деления клеток во второй фазе мейоза, с последующей стимуляцией специальными агентами в присутствии цитохалазина, который предотвращает процесс выброса полярного тельца из ооцита. Таким образом сохраняется диплоидность, и «псевдозигота» может развиться в бластоцисту, из которой и выделяются пЭСК. ПЭСК несут удвоившиеся гаплоидные клетки, то есть они преимущественно гомозиготны. Ткани, полученные из гомозиготных клеток, будут нести один из двух родительских наборов генов гистосовместимости и, теоретически, они будут предпочтительнее для пересадки, поскольку риск их отторжения будет значительно снижен. Однако, у гетерозиготных пациентов МНС – гомозиготные ткани могут атаковаться натуральными киллерами, которые распознают нехватку одного из наборов антигенов гистосовместимости. Этот процесс называется «гибридная устойчивость» и часто проявляется при пересадке костного мозга. Поэтому идеальным вариантом была бы пересадка генотипированных МНС–совместимых клеток.

Американские ученые под руководством G. Daley из Harvard Stem Cell Institute (Harvard University, Boston, USA) разработали метод создания гистосовместимых пЭСК. Ученым удалось выделить и охарактеризовать плюрипотентные ЭСК, полученные партеногенезом, в которых поддерживалась экспрессия материнских локусов МНС. Ткани, возникшие из таких клеток, могут пересаживаться животным донорской линии без отторжения.

После партеногенетической активации ооцитов мышей и прерывания (остановки) их деления в первой или второй фазе мейоза пЭСК выделяли и генотипировали. Авторы применяли специально разработанный метод – прямое секвенирование полиморфизмов (SNP– генотипирование) для определения линий пЭСК, которые несут последовательности главного комплекса гистосовместимости (МНС) донорского овоцита. Ткани, полученные после дифференцировки таких клеток, были бы способны идеально приживаться после пересадки МНС – совместимым реципиентам – мышам.

Из 74% стимулированных овоцитов, развившихся до стадии бластоцисты, исследователи получили 72 линии пЭСК. После проведенного генотипирования полученных линий оказалось, что 33% (24 линии) из них гетерозиготны по генам МНС. Восстановление гетерозиготности произошло в процессе рекомбинации. Генотипирование фланкирующих маркеров 17-й хромосомы (которая несет гены главного комплекса гистосовместимости) подтвердило гетерозиготность исследуемых локусов уже у 8 линий. Именно эти линии ученые и назвали рекомбинантными МНС-совместимыми пЭСК. Эти линии культивировали на желатине в виде эмбриоидных телец в течение 14 дней, наблюдая за последующей экспрессией МНС. Все клетки этих линий экспрессировали МНС и имели преимущественно нормальный кариотип.

Для получения генетически идентичных клеток ученые использовали ещё один метод – они индуцировали партеногенетическое деление зрелых ооцитов мышей гибридной линии C57BL/6ЧCBA F1, изменяя процесс сегрегации парных гомологичных хромосом во время первой метафазы мейоза. При этом получались партеногенетические эмбрионы, которые являлись клонами донорского овоцита в результате предотвращения сегрегации гомологичных материнских и отцовских хромосом. В этом случае авторы получили 23 линии из 56% активированных ооцитов, а гетерозиготность по генам МНС наблюдалась у 21 линии.

Плюрипотентность полученных пЭСК исследователи подтверждали формированием тератом при пересадке клеток под кожу иммунодефицитным мышам. Кроме того, ученые наблюдали спонтанно сокращающиеся кардиомиоцитарные колонии в культуре, и стандартное розеткообразование на полужидкой среде, характерное для клеток гемопоэтического ряда. При инъекции полученных пЭСК в бластоцисту развивались химерные мыши.

Клетки пересаживали иммунокомпетентным животным после предварительной дифференцировки в культуре, так как недифференцированные ЭСК не экспрессируют молекул комплекса МНС [6]. Все линии, гетерозиготные и совместимые с реципиентами по МНС, идеально приживались в организме реципиента без видимых признаков отторжения и образования тератом. Во всех остальных случаях пересадок наблюдалось формирование тератом.

Таким образом, в работе продемонстрировали два разных способа получения партеногенетических линий мышиных ЭСК. Полученные обоими путями пЭСК были генетически идентичны (совместимы) по генам МНС с донорским овоцитом. Кроме того, генетический анализ позволил выделить и поддержать линии, несущие материнский генотип МНС.

Способность пЭСК приживаться в организме реципиента и дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков не вызывает сомнений, однако влияние потери гетерозиготности важнейшими районами генома на функции клетки в таком случае остается мало изученным. Ткани, полученные путем дифференцировки пЭСК и несущие один из двух наборов родительских генов МНС, способны приживаться в тканях гетерозиготных реципиентов (т. е. пЭСК из линии C57BL/6 приживаются при пересадке мышам гибридной линии C57BL/6ЧCBA F1). На основе этих экспериментов можно предположить, что пЭСК, гомозиготные по основным гаплотипам МНС, могут служить источником клеток для пересадок. Некоторая разница будет наблюдаться лишь в случае с клетками, несущими полный набор МНС на своей поверхности, например, клетками костного мозга.

Метод получения партеногенетических зародышей мышей приводит к тому, что эмбрион несет удвоенный гаплоидный геном, который ранее описывался как преимущественно гомозиготный (кроме тех районов, которые стали гетерозиготными в процессе рекомбинации во время первой фазы мейоза). Результаты этой работы свидетельствуют в пользу того, что большинство локусов в пЭСК претерпевает рекомбинацию, в результате чего они несут почти полностью гетерозиготный геном. Активация незрелых овоцитов и ингибирование первого мейотического деления способствуют сохранению значительной гетерозиготности в геноме, кроме тех районов, которые возвращаются к гомозиготности, опять-таки, посредством рекомбинации. Оба типа клеток (как полученные в первой, так и во второй фазе мейоза) могут отбираться для поддержания донорского МНС генотипа.

Используя методику получения партеногенетических клонов [5], ученые описали 8 линий пЭСК из клеток в первой фазе мейоза, которые демонстрировали полную гетерозиготность во всех локусах. Однако все эти клетки были либо тетраплоидны, либо анеуплоидны, то есть, несмотря на то, что они несут весь материнский геном, их нельзя использовать в качестве источника для трансплантации.

Данные, представленные в работе, доказывают, что распознавание отдельных паттернов гомо- и гетерозиготности в геномах линий ЭСК методом SNP-генотипирования является надежным способом для определения происхождения исследуемых ЭСК, получены ли они партеногенетическим путем, переносом ядра, или естественным оплодотворением ооцита.

Таким образом, партеногенез, наряду с получением ЭСК из оплодотворенного овоцита и ЭСК, полученного методом переноса ядра, может стать одним из перспективных способов получения собственных ЭСК. Основное значение работы состоит в демонстрации способа анализа генетической рекомбинации в процессе партеногенетической активации, который позволяет отличить паттерны рекомбинации, полученные в результате прерывания кариокинеза во время первой или второй стадии мейоза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Allen N.D., Barton S.C., Hilton K. et al. A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. Dev. 1994: 120: 1473-82.

2. Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B. et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. Science 2002; 295: 819.

3. Strain L., Warner J.P., Johnston T., Bonthron D.T. A human parthenogenetic chimaera. Nat. Genet. 1995; 11: 164-9.

4. Kono T., Obata Y., Wu Q. et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. Nature 2004; 428(6985): 860-4.

5. Kubiak J., Paldi A., Weber M., Maro B. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic division by cytochalasin D. Dev. 1991; 111: 763-9.

6. Rideout W.M., Hochedlinger K., Kyba M. et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. Cell 2002; 109: 17-27.

Подготовила В.С. Мелихова

По материалам: Science Express Dec. 14, 2006 DOI: 10.1126/science.1133542