ЛИТЕРАТУРА:

1. Majumdar A., Ferber I., Lebkowski J. et al. Human embryonic stem cells possess immune–privileged properties. Stem Cells 2004; 22: 448–56.

2. Drukker M., Katz G., Urbach A. et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. PNAS 2002; 99: 9864–9.

3. Zavazava N., Kabelitz D. Alloreactivity and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance. J. Leukoc. Biol. 2000; 68: 167–74.

4. Сергеев В.С. Иммунологические свойства стромальных/мезенхимальных стволовых клеток. http://celltranspl.ru/journal/publications/?MESSAGES[1]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=803.

5. Halloran P.F., Brosky A.P., Batiuk T.D. et al. The molecular immunology of acute rejection: an overview. Transplant. Immunol. 1993; 1: 2–27.

6. Merad M., Hoffmann P., Ranheim E. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft–versus–host disease. Nat. Med. 2004; 10: 510–7.

7. Drukker M., Katchman H., Katz G. et al. Human embryonic cells and their differentiated derivatives are less susceptible for immune rejection than adult cells. Stem Cells 2005; 18 Epub.

8. Drukker M., Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem–derived cells. Trends in Biotechnol. 2004; 22: 136–41.

9. Bradley J., Bolton E., Pedersen R. Stem cell medecine encounters the immune system. Nat. Rev. Immunol. 2002; 2: 859–71.

Подготовил В.С. Сергеев
по материалам Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2005; 28: 461–466

Эмбриональная стволовая клетка обладает способностью репрограммировать ядро взрослой соматической клетки

Принято считать, что только цитоплазма яйцеклетки обладает уникальной способностью репрограммировать ядро взрослой соматической клетки при его переносе. Причём этот механизм универсален для многих видов млекопитающих, включая человека. Этот билогический феномен широко используется для создания клонированных организмов и индивидуальных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Однако, механизмы этого феномена, реализующегося посредством цитоплазматических факторов ооцита, остаются неизученными [1, 2].

Лаборатория Kevin Eggan из Harvard Stem Cell Institute изучает возможности репрограммирования ядра соматической клетки в ЭСК. При получении положительного результата на человеческом материале технология может заменить существующую – перенос ядра соматической клетки (ПЯСК) в энуклеированный ооцит с целью создания индивидуальных линий ЭСК (так называемого терапевтического клонирования). Последняя подразумевает использование донорских яйцеклеток и искусственное создание эмбриона, который уничтожается после выделения ЭСК. Широкое использование подобной технологии в регенеративной медицине вызывает неоднозначные этические мнения в обществе, протесты религиозных деятелей и запреты ПЯСК человека в ряде стран мира.

Если технология, предлагаемая Kevin Eggan, действительно дает положительные результаты с человеческим материалом, то её применение поможет избежать этических проблем, поскольку она не связана с созданием эмбрионов и использованием донорских яйцеклеток. Предшествующие эксперименты на мышах показали перспективность такого подхода [3, 4]. Первые результаты работы, выполненные Cowan Chad из лаборатории Eggan, были опубликованы в журнале Science. Ниже представлены основные выводы из нее.

1. *In vitro* модель, созданная исследователями, может быть применена для изучения этого феномена. Схема эксперимента представлена на рисунке.

В работе использовали фибробласт кожи человека и линию ЭСК. Оба вида клеток генетически метили и выполняли химически индуцированное слияние. За счёт генетических меток производили селекцию клеток–гибридов и изучали их свойства.

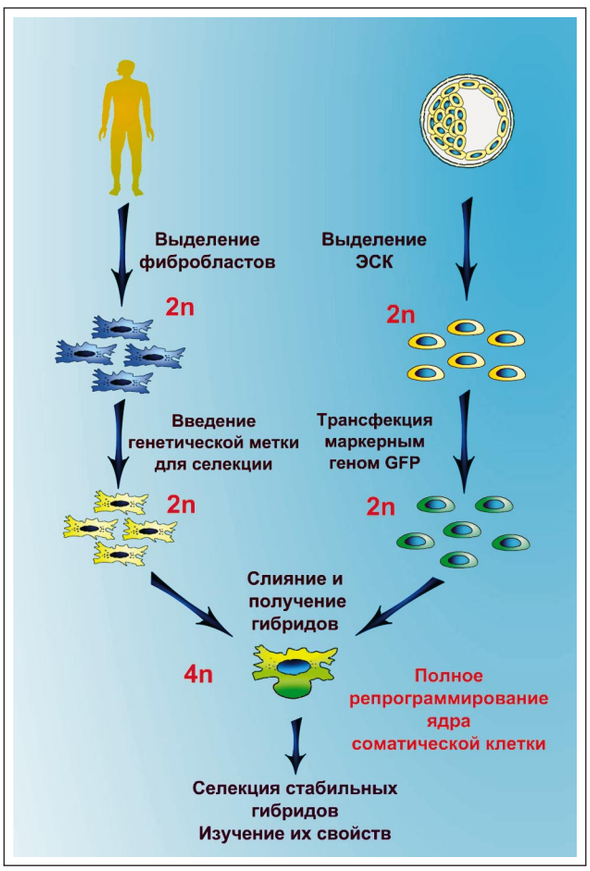

Схема эксперимента

2. Слияние с ЭСК приводит к полному репрограммированию генома ядра соматической клетки до «эмбрионального уровня». Это важное положение было доказано исследователями несколькими путями:

– клетки–гибриды имеют такие же маркёры (Oct4, telomerase, AP, SSEA4, TRA1–80) и морфологию, что и родительская линия ЭСК;

– гибриды характеризуются «иммортальным» ростом в культуре (клетки линии претерпевали более 120 делений);

– гибриды обладают плюрипотентностью и образуют тератомы в мышах–nude (в тератомах были обнаружены ткани всех 3–х зародышевых листков);

– изучение транскрипционного профиля показало максимальное сходство у линий–гибридов и ЭСК; в отличие от первичных фибробластов, соматический геном оказался репрограммированным на 99%.

3. Слияние соматической клетки с ЭСК приводит к потере эпигенетической памяти, аналогично тому, как это происходит при ПЯСК в энуклеированный ооцит [1, 2]. Авторы продемонстрировали это на примере деметилирования одного из генов, который в норме метилирован в фибробластах.

4. Репрограммирование генома соматической клетки посредством ЭСК универсально и не зависит от вида клеток. Для подтверждения этой гипотезы исследователи выполнили слияние костных клеток с другой линией ЭСК и получили такие же результаты.

Таким образом, группа Eggan впервые показала, что ЭСК человека, подобно яйцеклетке, способна репрограммировать ядро взрослой соматической клетки. Однако клетки–гибриды, полученные в опытах Cowan, имели набор хромосом 4n, поэтому неясна их биологическая судьба. Также остаётся неясным, ядерные или цитоплазматические факторы ЭСК ответственны за репрограммирование? Способны ли мутантные клетки поддерживать стабильность карио–, гено– и фенотипа? Можно ли утверждать генетическую идентичность таких линий ЭСК донору ядра? Способны ли вновь созданные индивидуальные ЭСК дифференцироваться во все типы тканей *in vitro*? Насколько такие клетки будут иммуногенны? Можно ли говорить о «терапевтическом будущем» таких гибридов? Ответить на эти вопросы позволят будущие исследования.

Более перспективной технологией, видимо, станет ПЯСК в энуклеированную ЭСК. Тем не менее, авторы работы доказали самое главное – репрограммирование ядра соматической клетки человека возможно не только в яйцеклетке, но и в ЭСК. Это указывает на наличие общих факторов овоцита и ЭСК, ответственных за «снятие» соматической геномной и эпигеномной информации.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Jeanisch R., Eggan K., Humpherys D. et al. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. Cloning Stem Cells 2002; 4: 389–96.

2. Rideout W.M. 3rd, Eggan K., Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. Science 2001; 293: 1093–8.

3. 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..

4. Do J.T., Scholer H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. Stem Cells 2004; 22: 941–9.

Подготовил А.В. Берсенев
по материалам Science 2005; 309: 1369–1373.

Индукция канцерогенеза обусловлена мутациями, связанными с асимметричным делением стволовых клеток

Сторонники модной на сегодняшний день теории канцерогенеза из стволовых клеток взрослых пока не могут объяснить причины и механизмы возникновения мутаций, обусловливающих появление клона злокачественных стволовых клеток и последующего роста опухоли [4, 5]. Известно, что стволовая клетка взрослых может делиться как симметрично, что обусловливает её самообновление и «стволовость», так и асимметрично, давая начало более зрелым дочерним прогениторам. Потеря полярности в стволовых клетках при делении и снижение потенциала к асимметричному делению, делает дочерние клетки не способными отвечать на ранее действовавшие сигналы к пролиферации [3]. Таким образом, полярность клетки и ее злокачественное перерождение могут быть тесно взаимосвязаны, однако вероятность таких событий и их причины остаются невыясненными.

Для проверки этого факта испанские ученые исследовали пролиферативную способность мутантных клеток личиночных нейробластов Drosophila melanogaster (DM) *in vivo*. Мутации были вызваны в генах, отвечающих за асимметричное деление клетки – raps, mira, pros и numb. Данная работа показывает, что нарушение в одном или нескольких из рассматриваемых генов ведет к гиперпролиферации и запускает цепочку реакций, приводящих к злокачественному росту.

Нейробласты, выделенные из головного мозга мутантных по этим генам личинок DM, меченные зеленым флуоресцирующим белком, и пересаженные во взрослых мух, вырастали в виде опухоли, в 100 раз превышающей объём трансплантированных клеток (рис. 1). В контрольных экспериментах (нейробласты от личинок дикого типа) ни в одном случае не наблюдали развития опухолей. Опухоли прорастали в окружающие ткани, активно метастазировали (92% трансплантаций) и вызывали гибель мух за 2 недели. Опухоли становились бессмертным, могли быть пересажены повторно в течение года и поддерживались в лаборатории более двух лет без признаков снижения пролиферации. Для анализа самообновления, клетки опухоли были выделены и пересажены вторичным реципиентам, более 90% из них вызвали новообразования. Через шесть недель после трансплантации в этих опухолях наблюдалась изменения центросом (органелл ответственных за образование веретена деления) – характерный признак злокачественных карцином [1, 2].

Извлеченные опухоли окрашивали иммуноцитохимически для определения экспрессии нейрональных маркеров. Интересно отметить, что опухоли характеризовались потерей экспрессии маркёрных мутантных генов, однако сохраняли фенотип нейробластов. Подобное поведение клеток, как предполагают исследователи, связано с редким делением нейробластов, дающих начало двум дочерним клеткам (доказательство возможно при анализе пролиферации таких