

ИСТОРИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИЙ В ЯДРАХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Идея восстановления потенций в клетках, утраченных ими в процессе дифференцировки, витала в умах исследователей начиная с 30-х годов прошлого столетия. В лаборатории **Ганса Шпемана (Hans Spemann)** были проведены **первые эксперименты по переносу ядер в энуклеированный ооцит амфибий (1939).**

Бригс и Кинг в 1952 г. (Briggs and King, 1952) инъецировали ядра клеток со стадии бластулы или ранней гаструлы (8000-16000 клеток) в предварительно энуклеированные яйца *Rana pipiens* и наблюдали нормальное развитие до стадии **питающейся личинки (головастика).** Эти же авторы позднее (1960) описали полное развитие до **взрослой лягушки.**

Существенный вклад в развитии техники переноса ядер соматических клеток в энуклеированный ооцит *Xenopus laevis* внес **Джон Гордон (J. Gordon)** **впервые показавший возможность полного развития реконструированного ооцита под контролем ядра эпителиальной клетки кишечника и эпителиальной клетки кожи головастика.**

Вилмут и др. (Wilmut et al., 1997) первое клонированное млекопитающее – **овца Долли.**

Эпигенетические механизмы определяющие и сопровождающие эмбриональную и клеточную дифференцировку

- метилирование ДНК (цитозин-метилазы и деметилазы, белки-связывающие метил-CpG)
- ремоделирование хроматина - «гистоновый код»
- укорочение теломерной ДНК
- снижение или отсутствие пролиферативной активности

- полиплоидизация, политенизация хромосом
- элиминация хроматина (диминуция хроматина)
- энуклеация (эритроциты, клетки хрусталика и т.д.)
- формирование цитоплазмы с тканевой или стадио-специфическими свойствами (?)

Схема эпигенетических процессов в развитии животных (Morgan et al., 2005)

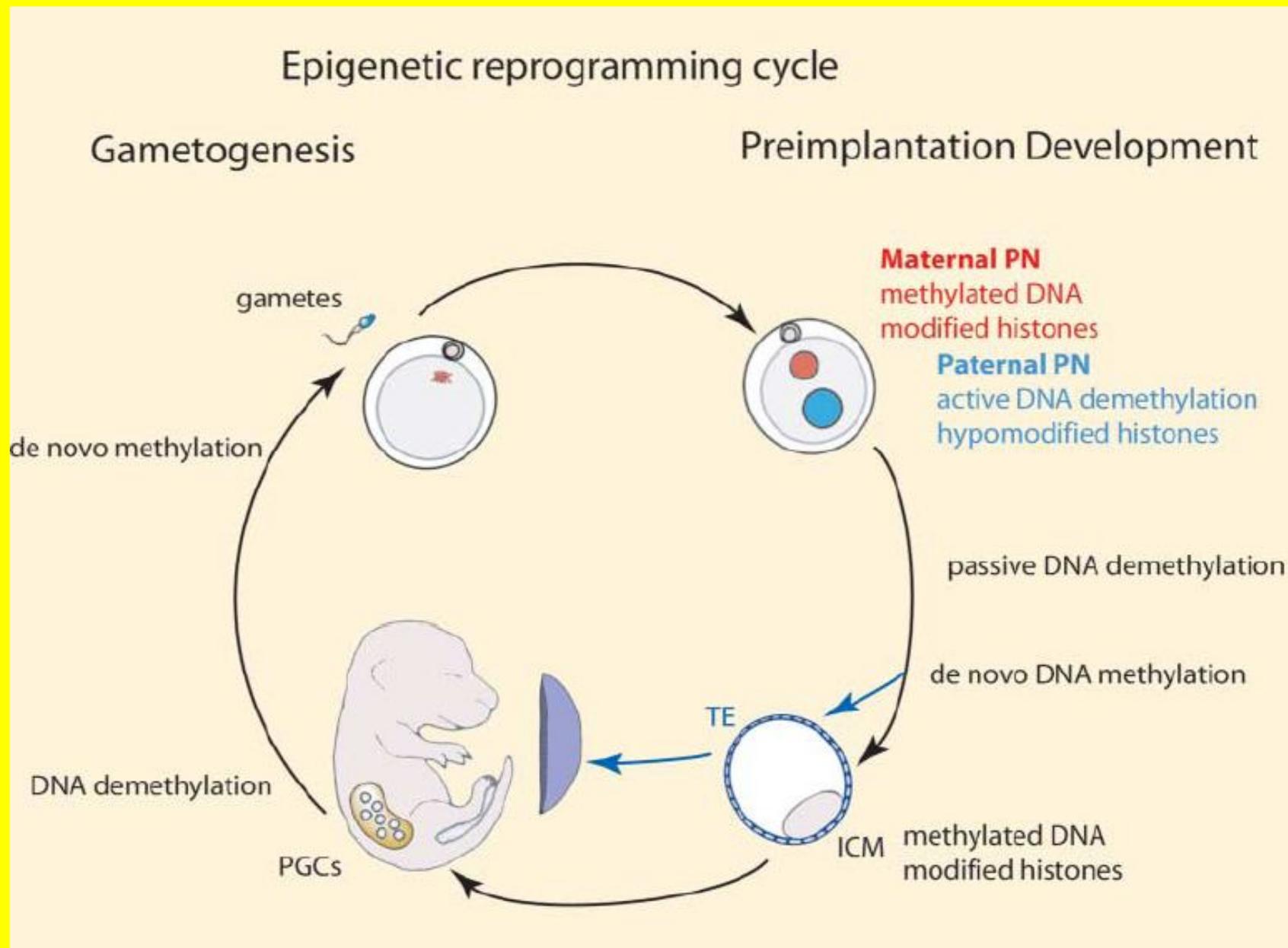
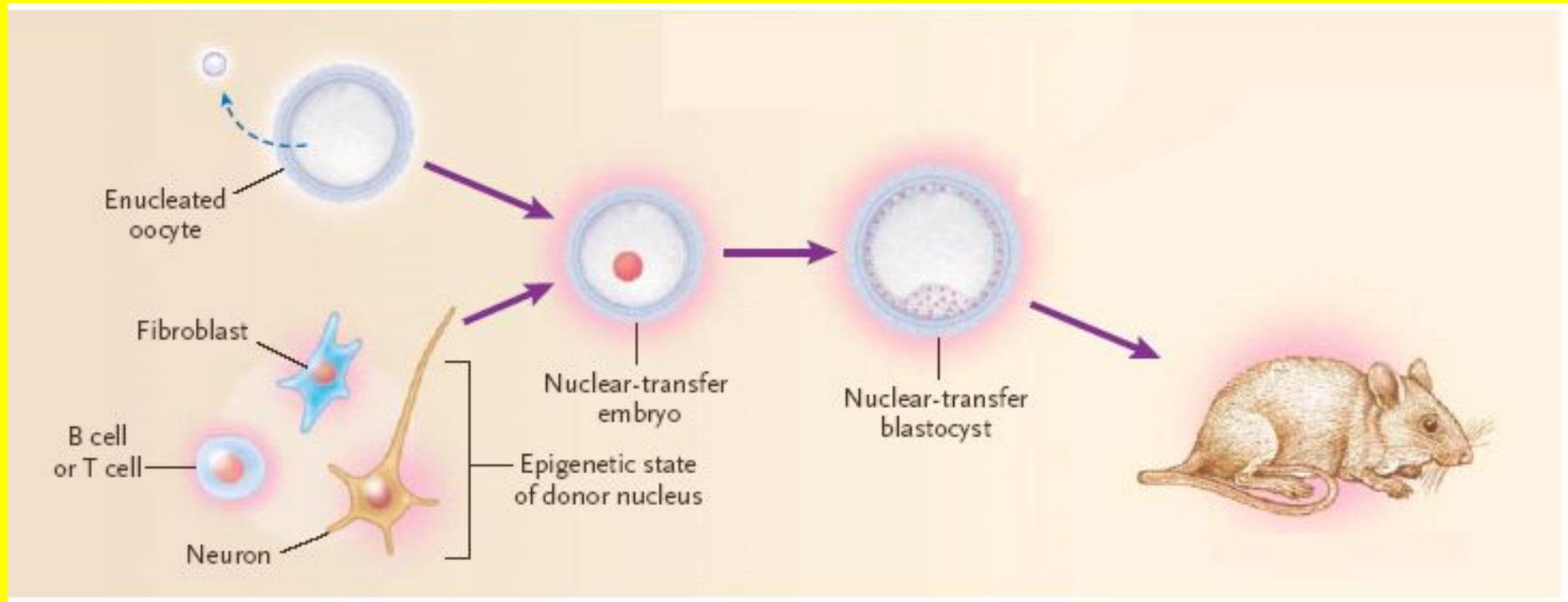


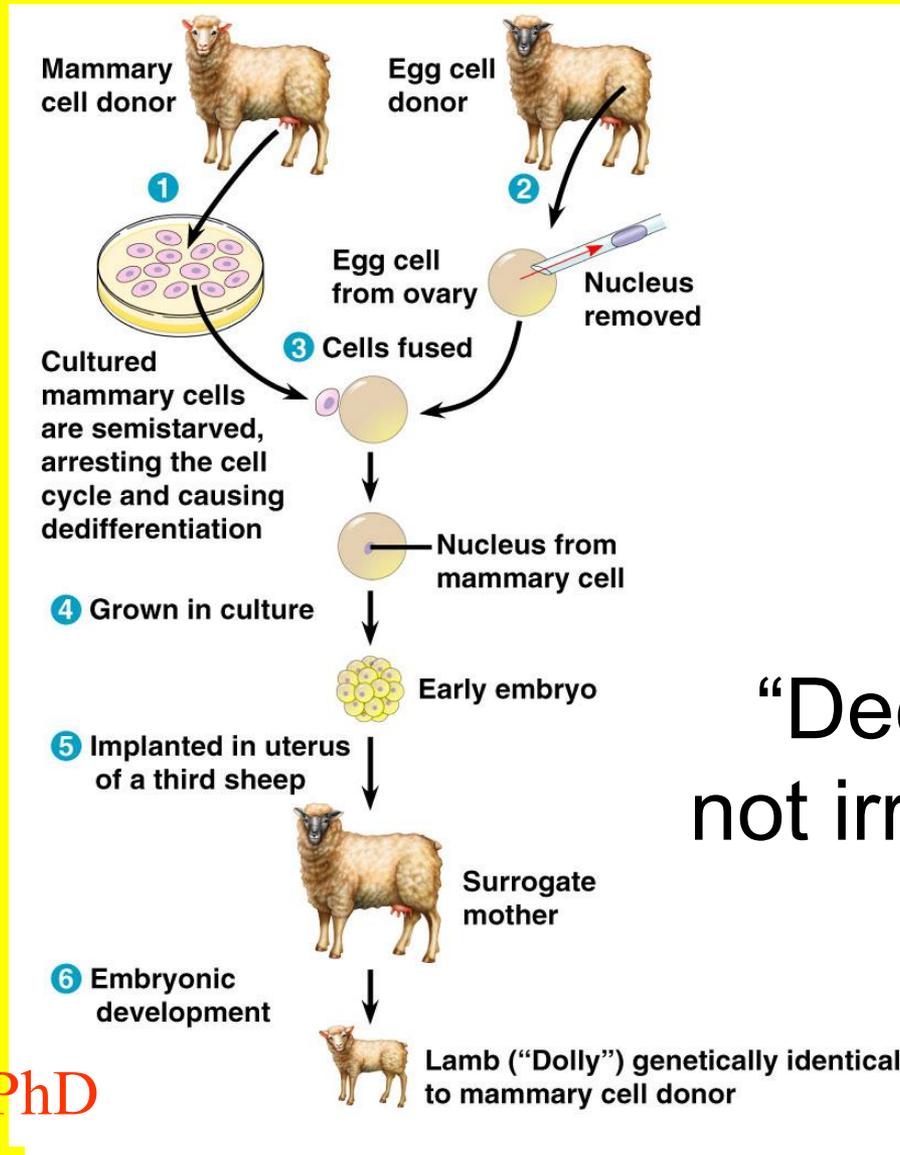
СХЕМА КЛОНИРОВАНИЯ МЫШИ

Hochedling, Jaenisch (2003)



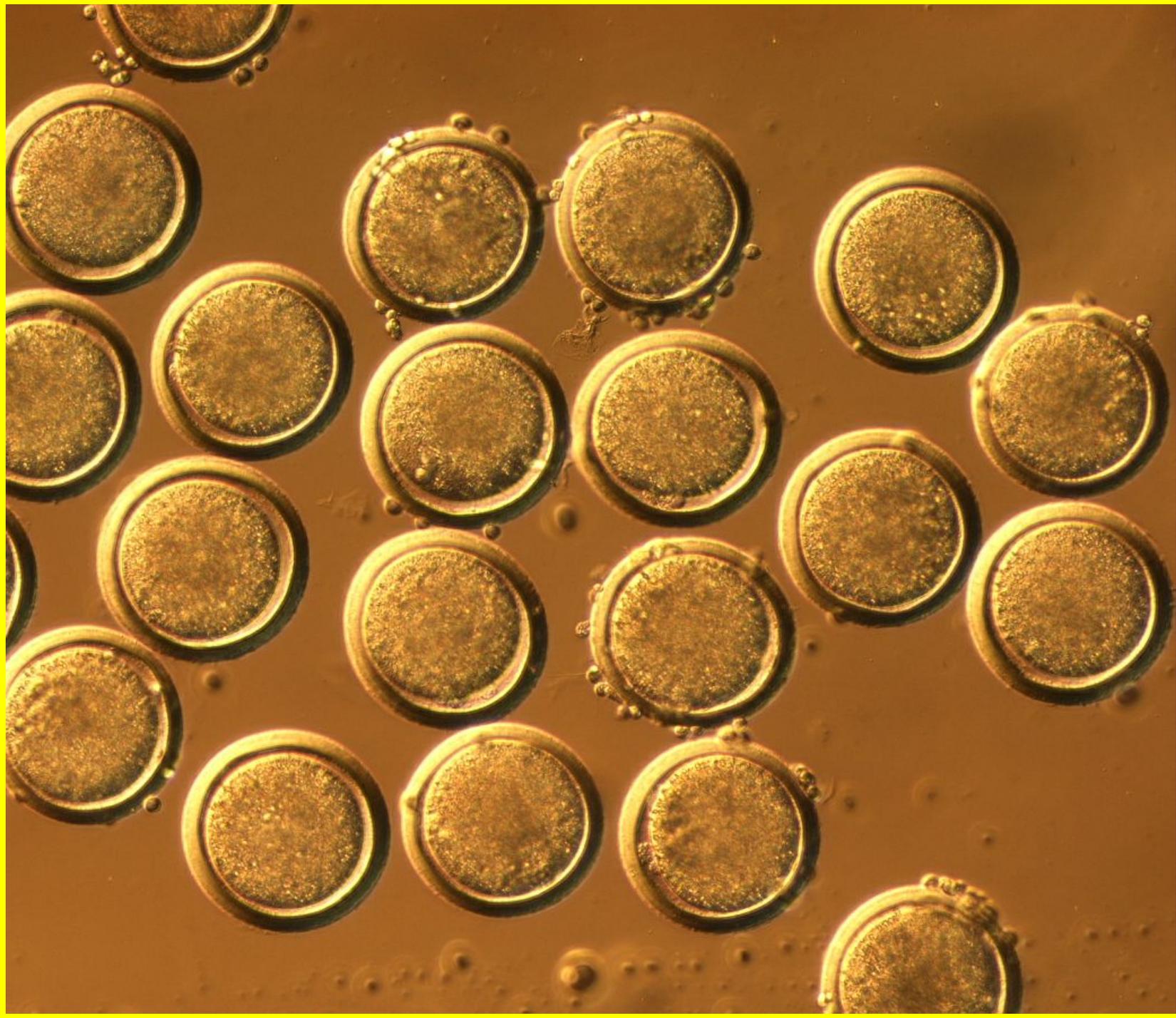
Somatic Cell Nuclear Transfer

DOLLY
1997



“Decisions”
not irreversible

Melissa Henriksen, PhD



Оплодотворенная яйцеклетка мыши



Перечень «клонированных» видов млекопитающих

Вид	Клетки	Эффективность	Ссылки
Овца	эпителий	1/277 (0.4%)	Wilmut et al. 1997
Мышь	клетки кумулюса	41/2468 (1.7%)	Wakayama et al.1998
Корова	клетки кумулюса	4/276 (1.4%)	Cibelli et al.1998
Коза	фибробласт	3/285 (1.1%)	Baguisi et al.1999
Свинья	фибробласт	1/210 (0.5%)	Onishi et al.2000
Кролик	клетки кумулюса	6/1852 (2.7%)	Chesne et al.2002
Кошка	клетки кумулюса		Shin et al. 2002
Мул	фибробласт	1/334 (0.3%)	Woods et al.2003
Лошадь	фибробласт	1/841 (0.1%)	Galli et al. 2003
Крыса	фибробласт		Zhou et al.2003
Собака			Lee et al., 2005
Гаур			Vogel et al. 2001
Красный олень (<i>Cervus elaphus</i>)	остеогенные клетки		Berg et al. 2007
Хорек			Li et al. 2006
Макака-Резус	фибробласты	35 213 (16%) бластоциста	Byme et al.2007
Человек	фибробласт	5/23 (23%) бластоциста	French et al.2008

«Клонированные» животные

Melissa Henriksen, PhD



Эффективность клонирования мышей в опытах по пересадке ядер клеток с разных стадий развития

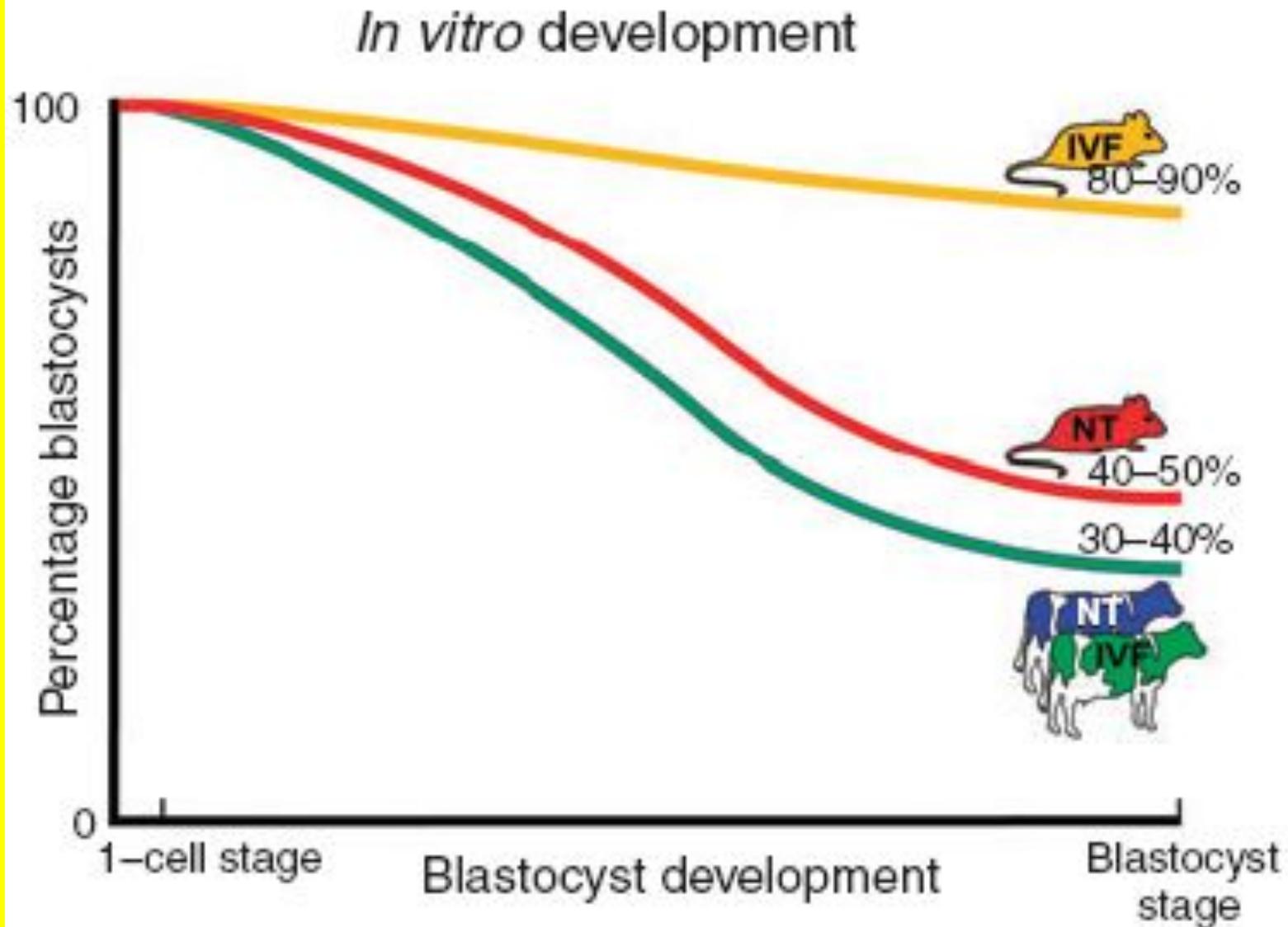
Донорские клетки	% развившихся бластоцист	% родившихся	Ссылки
2-х клеточный эмбрион	29	10	Cheong et al. (1993)
4- клеточный	22	22	
8-клеточный	17	3	
4-клеточный	83	57	Kwon and Kono (1996)
Клетки кумулуса	-	2	Wakayama and
немедленная активация	30-345	2-3	Yanagimachi (1998)
1-3 ч активации	42-61	1-3	Wakayama and Yanagimachi (1998)
Фибробласт	-	1	
Фетальный фибробласт	30	1-3	Ono et al. (2001)
Клетки мозга эмбриона	-	5,5	Yamazaki et al. (2001)

Nuclear transfer has become almost synonymous with ‘cloning’, although the aims of the two processes differ; cloning is used to generate near-identical genetic copies of an organism whereas nuclear transfer is used to generate stem cells for regenerative medicine.

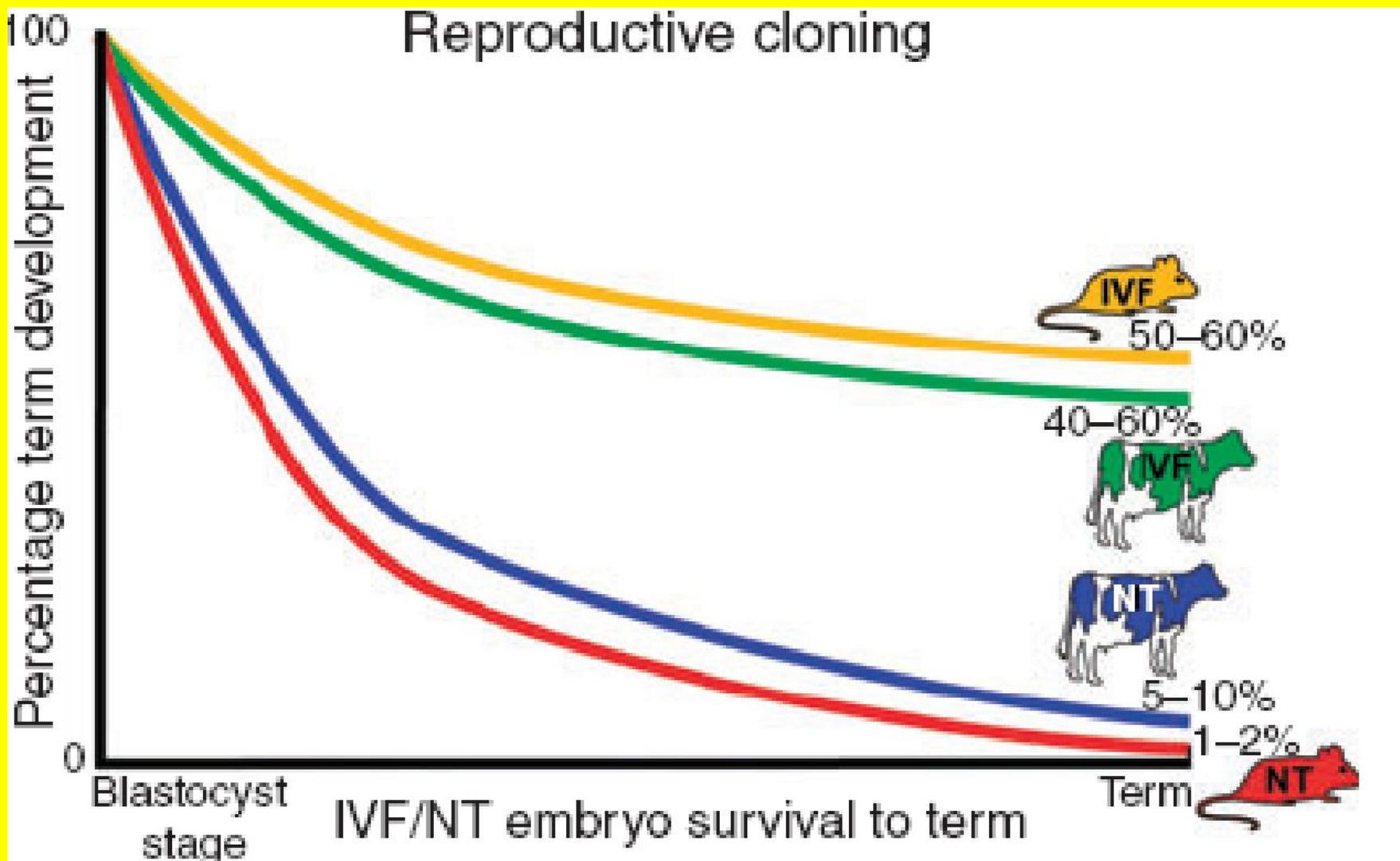
Vogelstein B, Alberts B, Shine K: Genetics. Please don’t call it cloning! Science 2002, 295:1237.

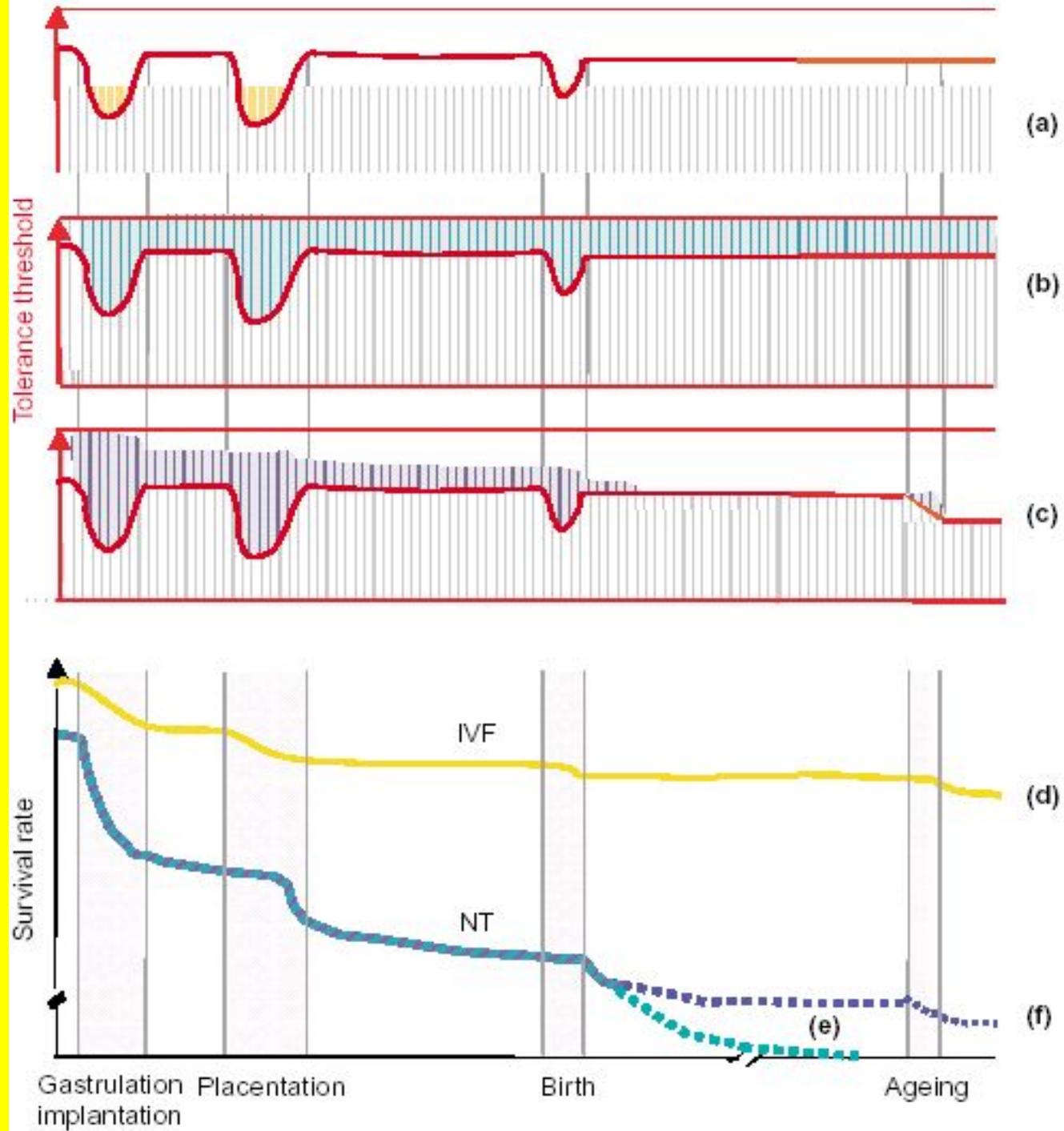
Перенос ядер в энуклеированный ооцит или яйцо часто используется как синоним «клонирование», хотя цели этих двух экспериментальных подходов разные: клонирование используется для получения идентичных генетических копий, в то время как перенос ядер в настоящее время предполагает получение стволовых клеток для регенеративной медицины»

Развитие реконструированных ооцитов мышей и коров в условиях *in vitro* до стадии бластоцисты в сравнении с оплодотворением *in vitro* (Yang et al., 2007)



Рождение «клонированных» мышей и коров по сравнению с контрольными, развившихся из зигот после их оплодотворения *in vitro* (Yang et al., 2007)





A



Taeyoung Shin et al.
A cat cloned by nuclear transplantation.
Nature 2002, v.415, 723

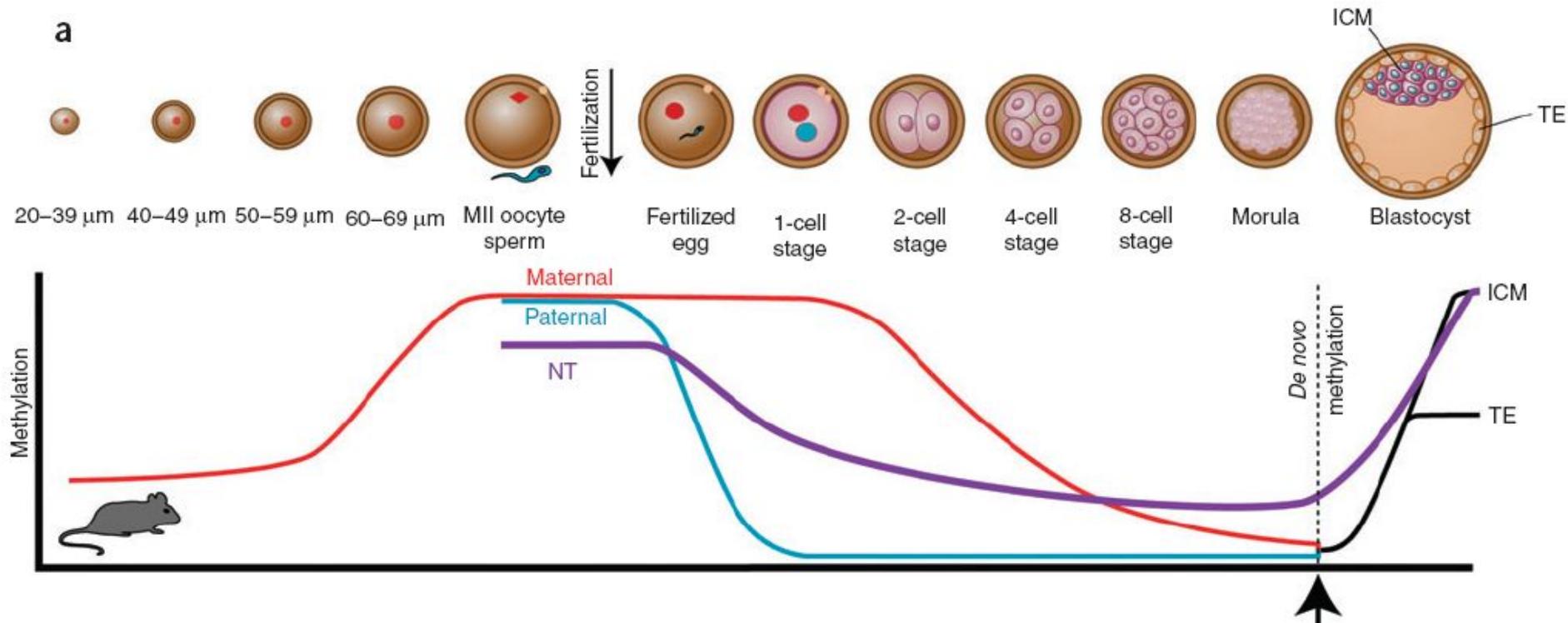


Аберрантная экспрессия генов у клонированных млекопитающих (Tamada and Kikyo 2004)

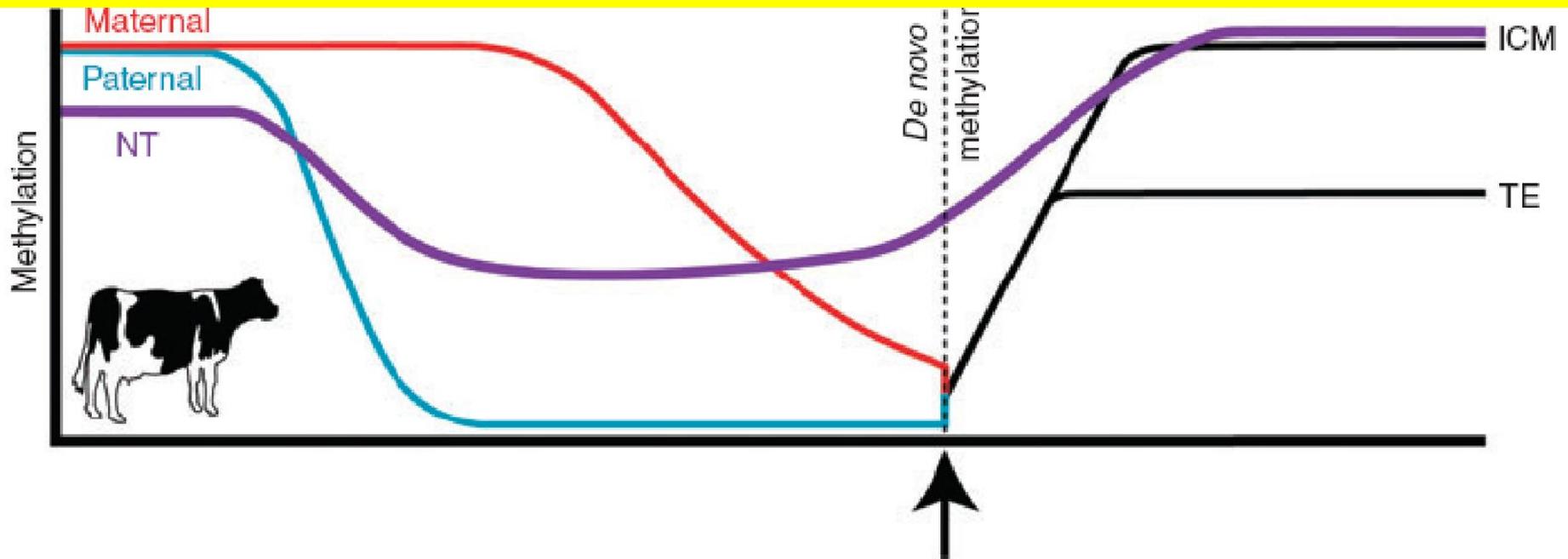
Вид	Донорские клетки	Стадия	Аберрантная экспрессия/ общее число генов	Метод	Ссылки
Корова	Гранулезные	2-х -бластоциста	3/7 (42,9%)	ОТ-ПЦР	Daniels et al.2000
Корова	Эпителиальные	Бластоциста	1/4 (25%)	ОТ-ПЦР	Daniels et al.2001
Корова	Фолликулярные	Бластоциста	1/8 (12,5%),3/8 (37,5%)	ОТ-ПЦР	Wrenzycki et al. 2001
Мышь	ЭСК	Плацента	221/12654 (1,7%)	Микрочип	Humpherys et al. 2002
		Печень	26/12654 (0,2%)	Микрочип	
	Кумулюсные	Плацента	286/12654 (2,3%)		
Мышь	ЭСК	Плацента	1807/15247 (11,9%)		Suernizu et al.2003
			1964/15247 (12,9%)		

Абберрантная экспрессия – в 2 раза выше или ниже контроля от нормальных эмбрионов

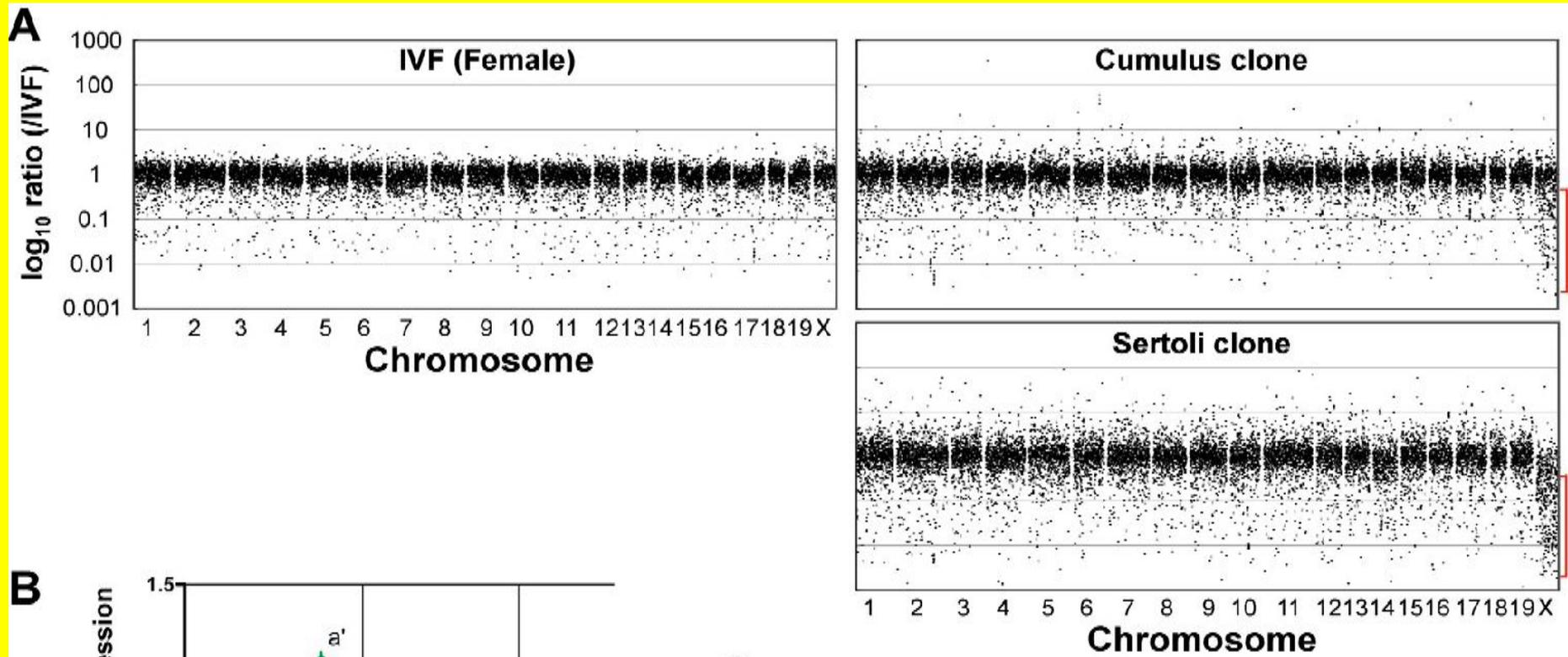
Схема развития ооцита и раннее развитие мышцы.
Метилирование ДНК материнского (красный цвет) и отцовского (синий) геномов. Сиреневый цвет показывает метилирование ДНК «клонированных» эмбрионов мышцы. Черным выделено метилирование ВКМ и ТЭ у «клонированных» мышей (Yang et al. 2007)

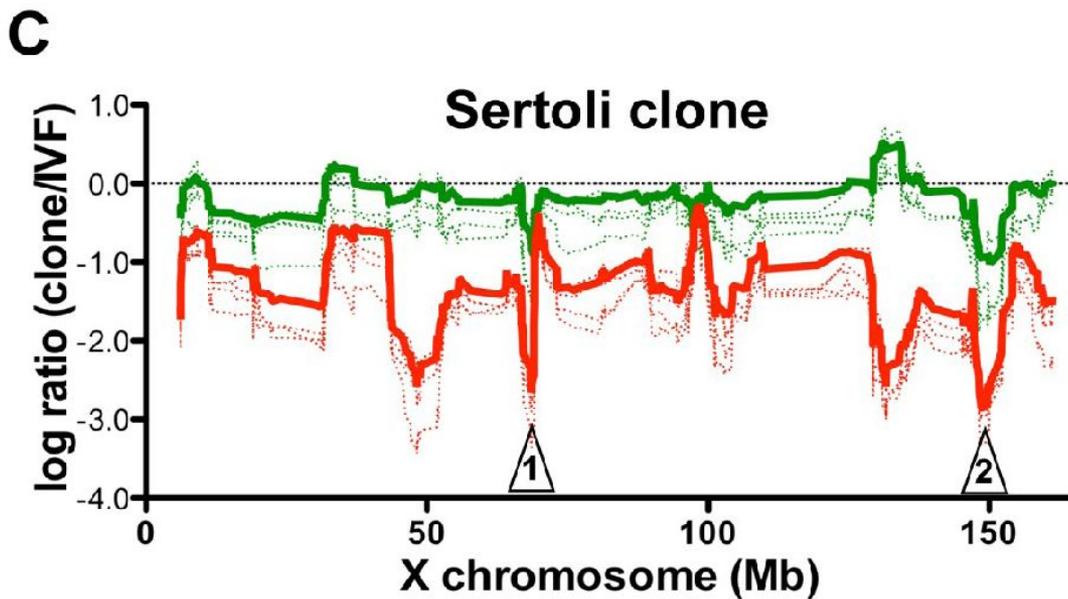
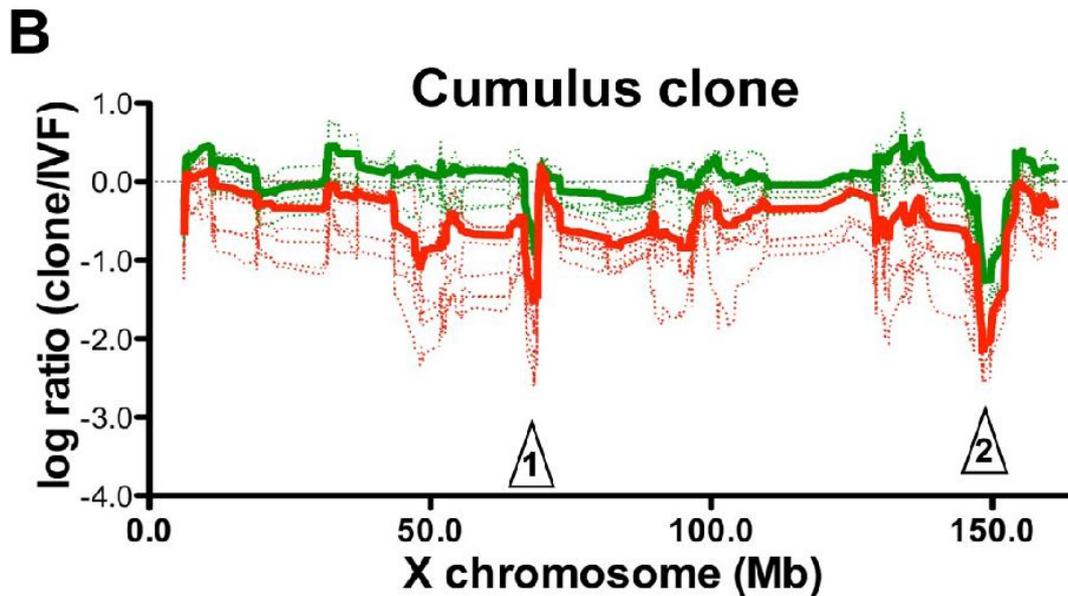


Метилирование ДНК материнского (красный цвет) и отцовского (синий) геномов в раннем развитии коров в сравнении с «клонированными эмбрионами (сиреневый). Черным цветом показано метилирование ДНК ВКМ и ТЭ у «клонированных» эмбрионов (Yang et al., 2007)

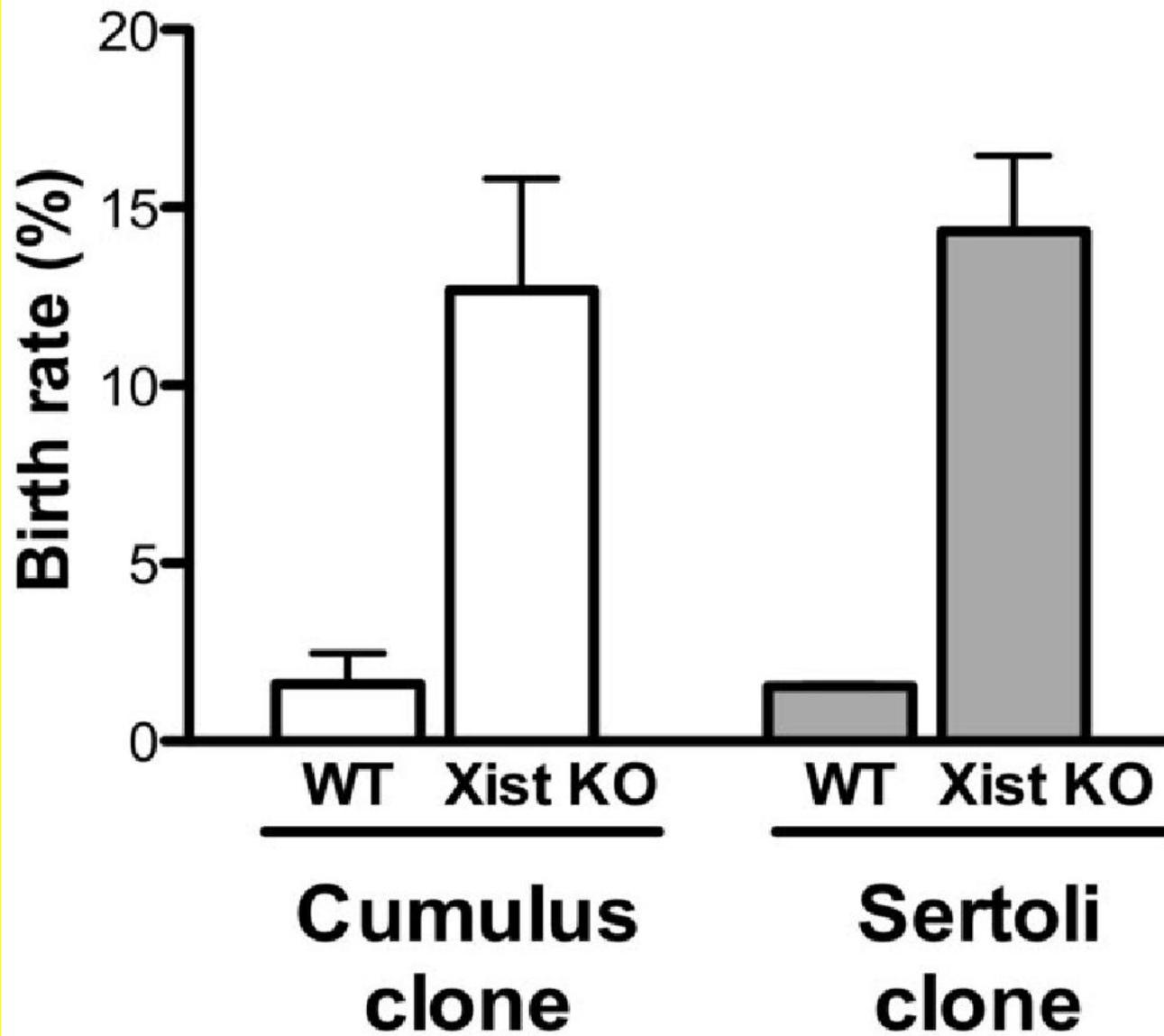


Профиль активных генов в хромосомах нормальных и клонированных» мышей (Inoue et al., 2010)



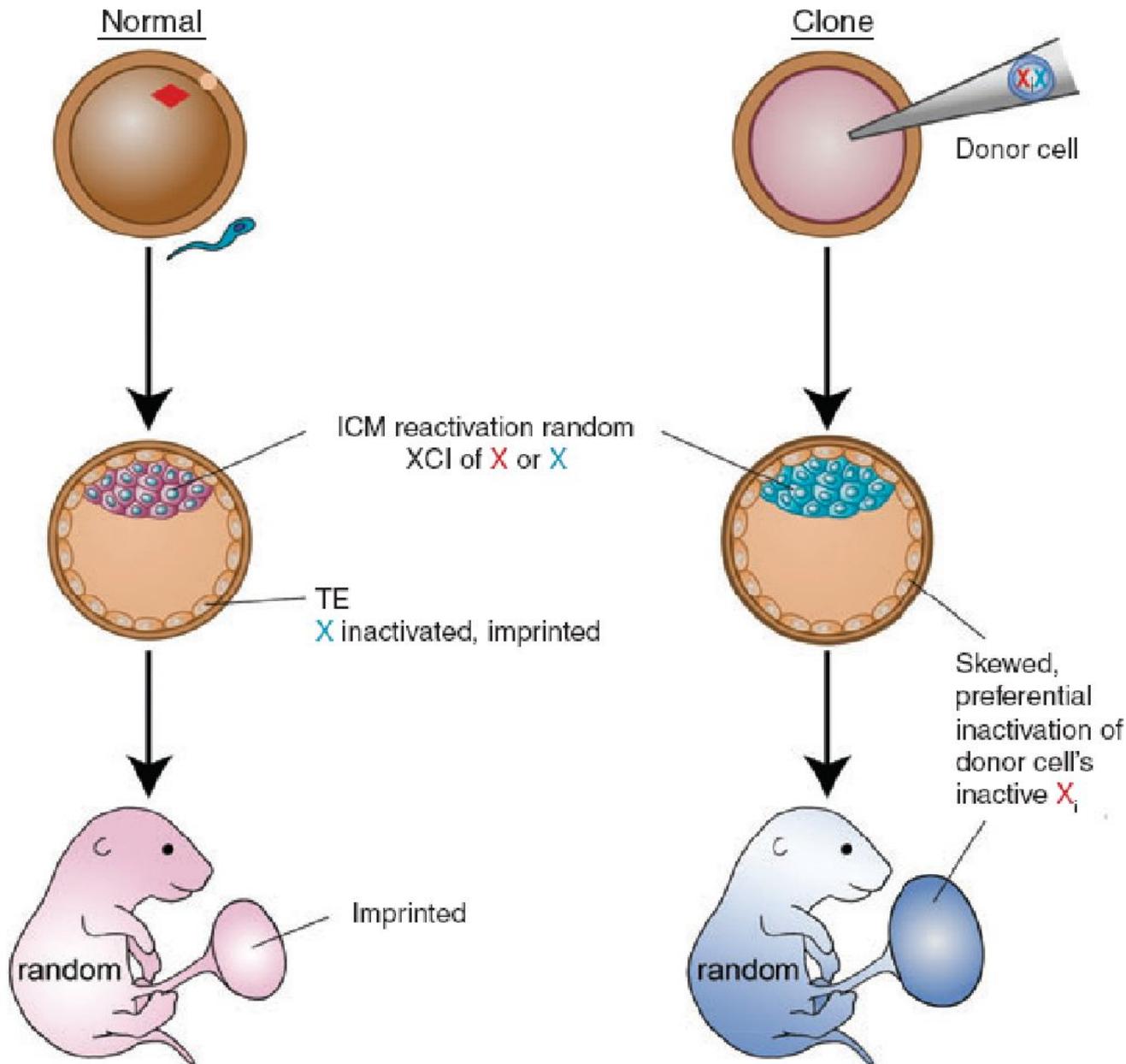


Профиль активных в X-хромосоме у клонированных мышей. Красный цвет – перенос ядер в энуклеированный ооцит от нормальных мышей; Зеленый – перенос в энуклеированный ооцит с делецией Xist локус (Inoe et al., 2010)

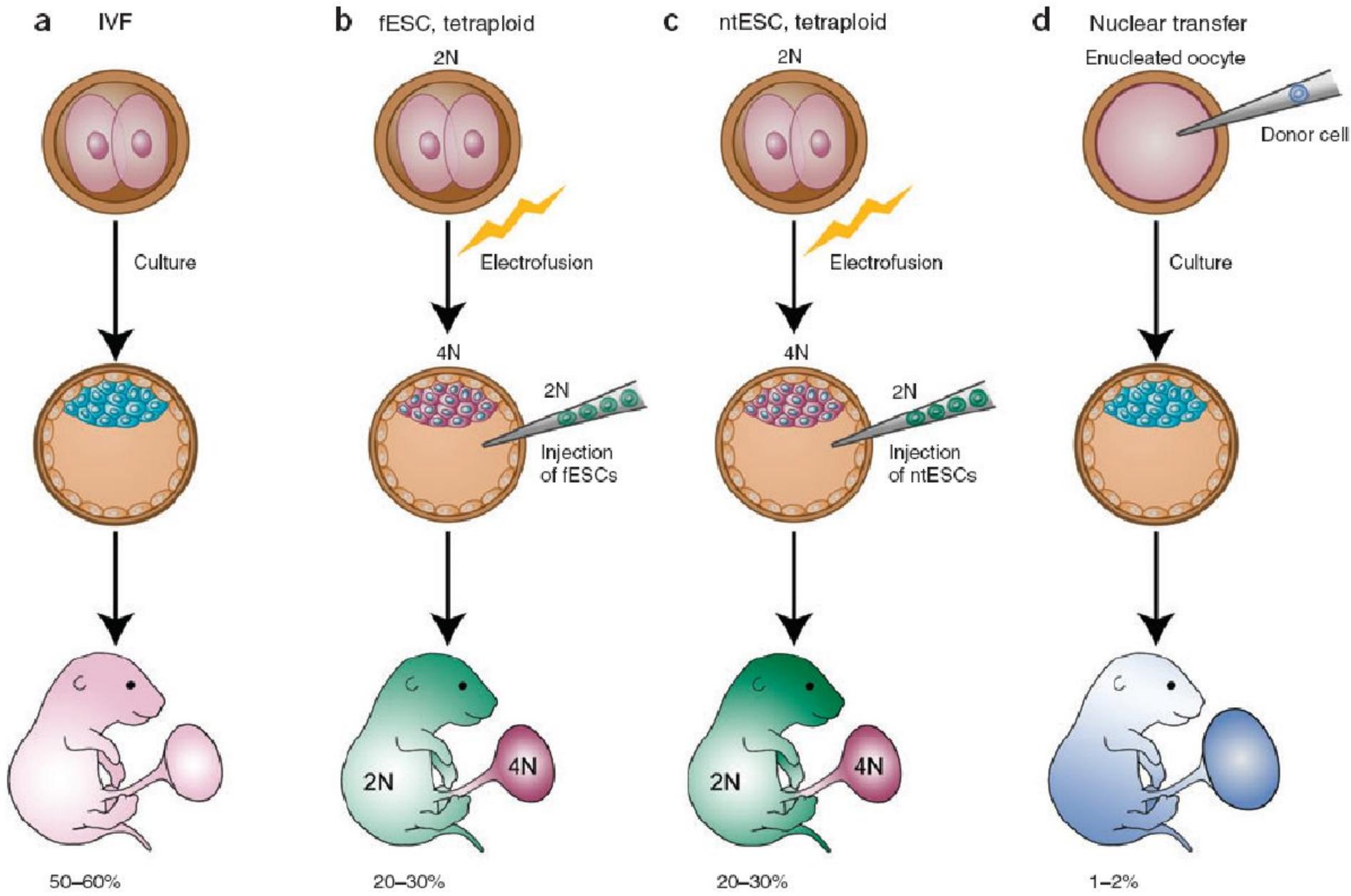


**Рождение
«клонированных»
мышей
(Inoe et al., 2010)**

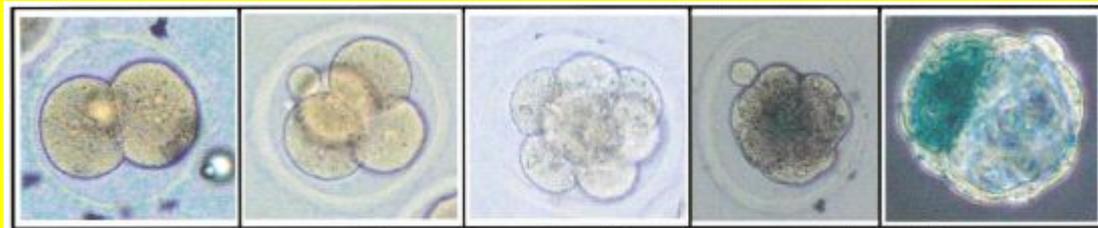
Инактивация X-хромосом у нормальных и клонированных эмбрионов мыши (Yang et al., 2007)



Эффективность развития эмбрионов после оплодотворения *in vitro* (a), инъекции ЭС клеток в тетраплоидные бластоцисты (b,c) и переноса ядер (Yang et al., 2007)



Первые стадии развития эмбриона



2 клетки

4 клетки

8 клетки

морула

бластоциста

Схема получения линий ЭС клеток из бластоцист, развившихся из реконструированных ооцитов млекопитающих (Yang et al., 2007)

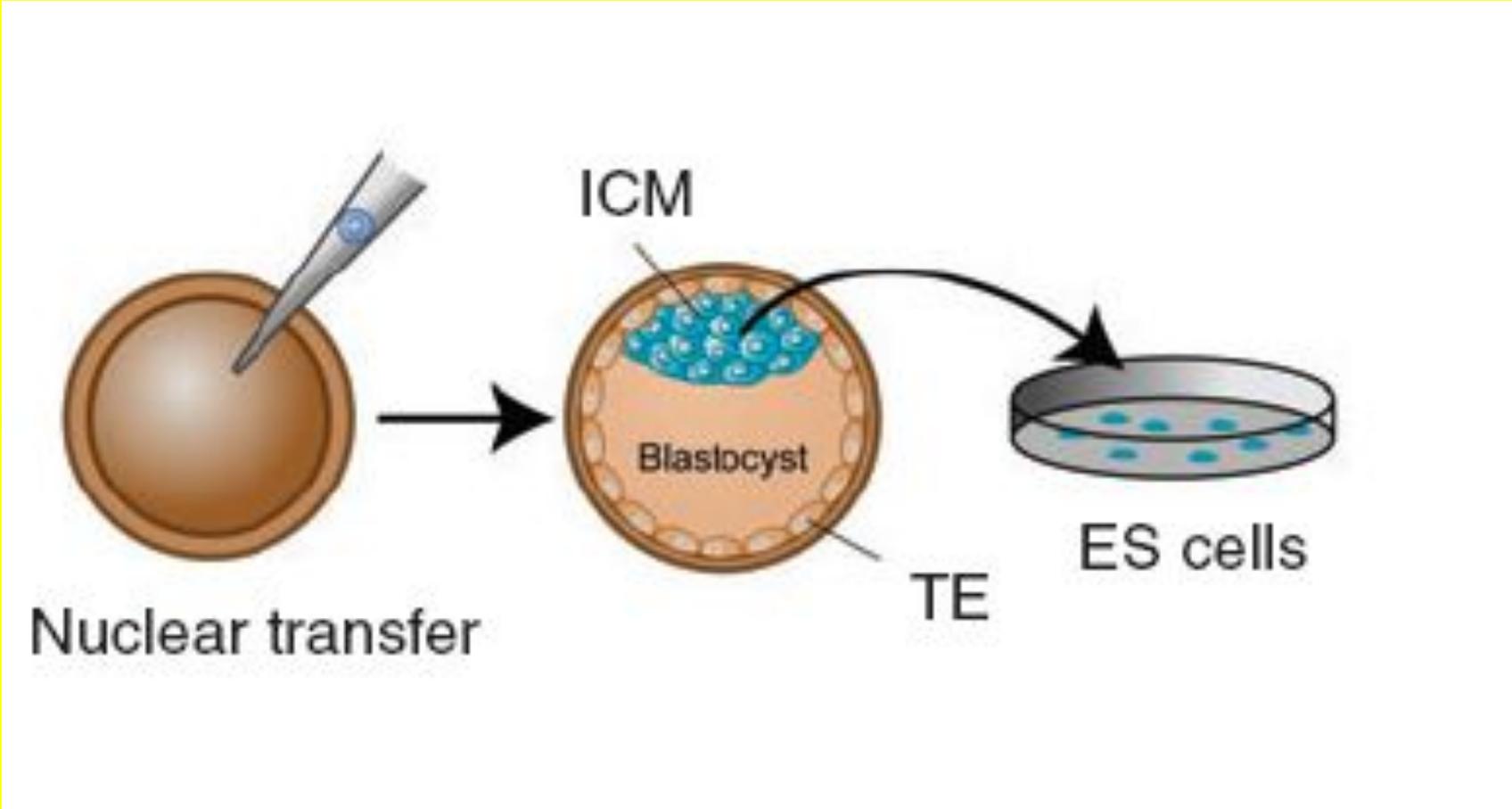
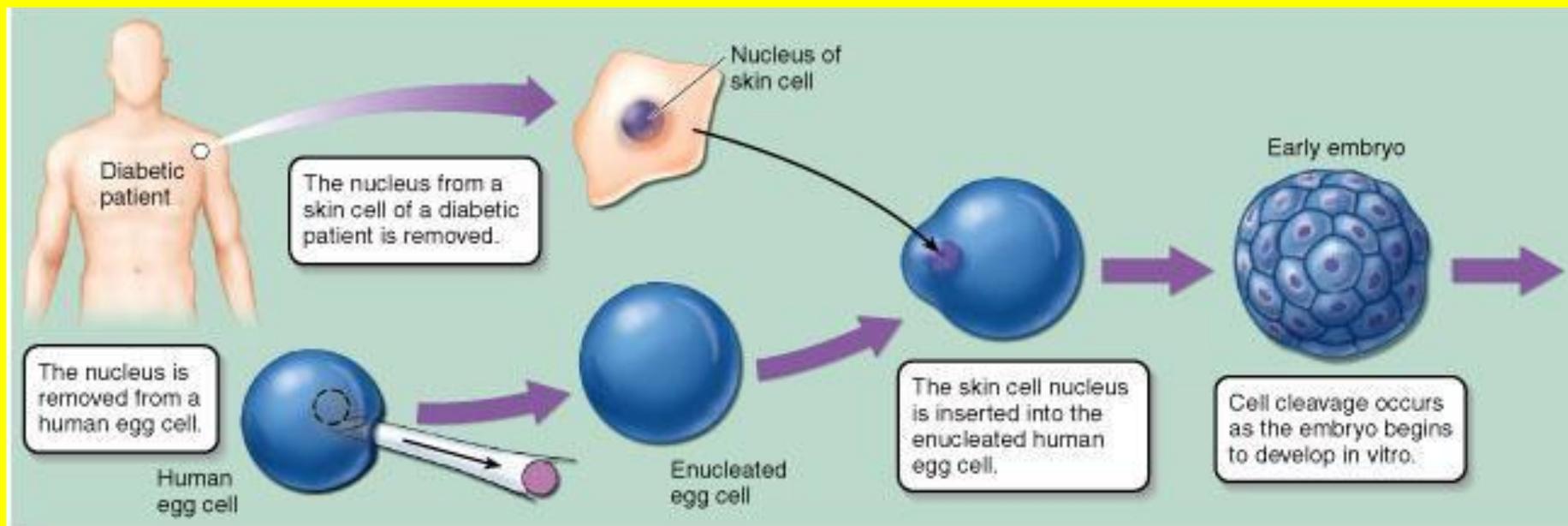


Схема получения ЭСК из «клонированных» бластоцист человека

Melissa Henriksen, PhD



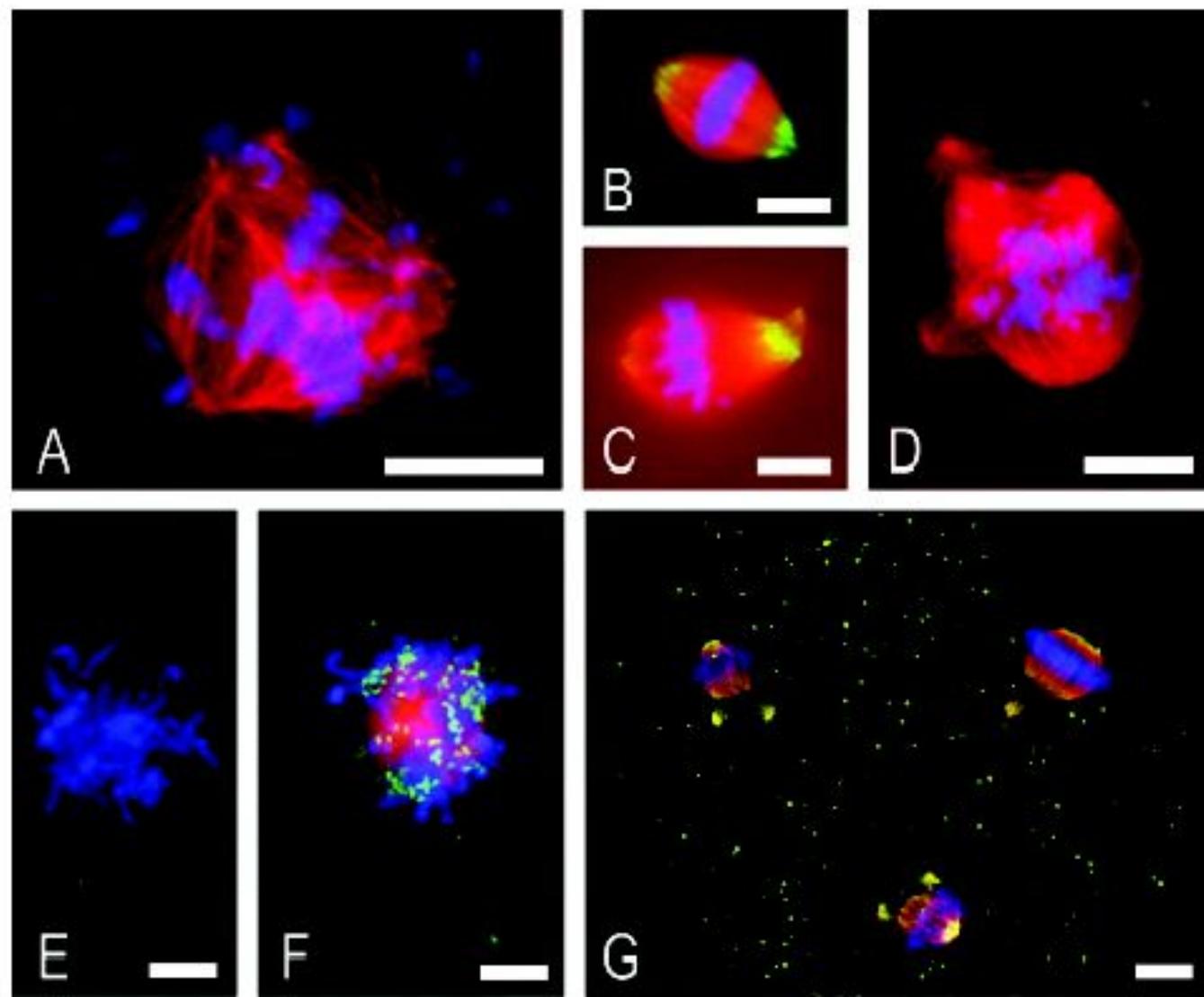
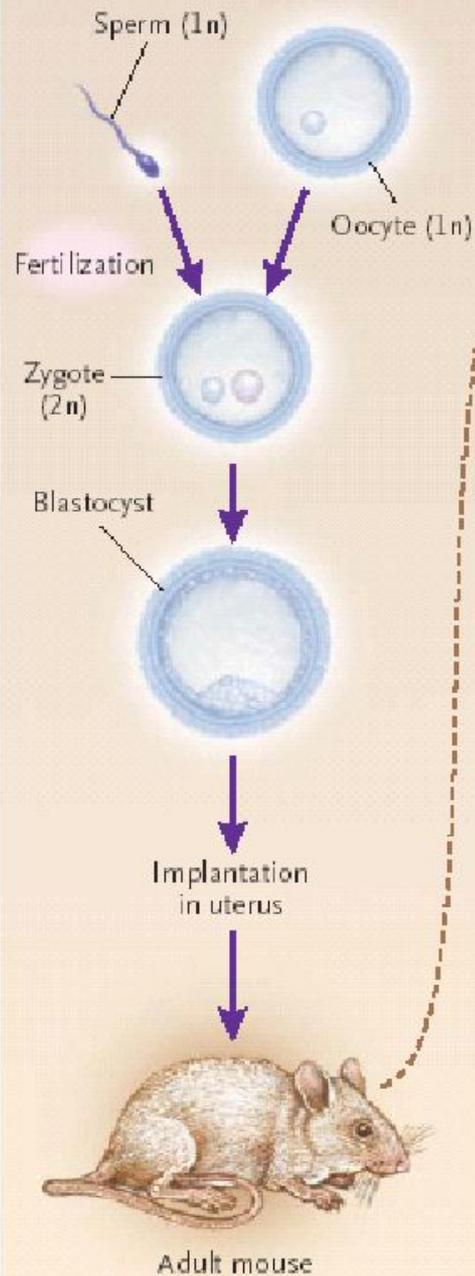
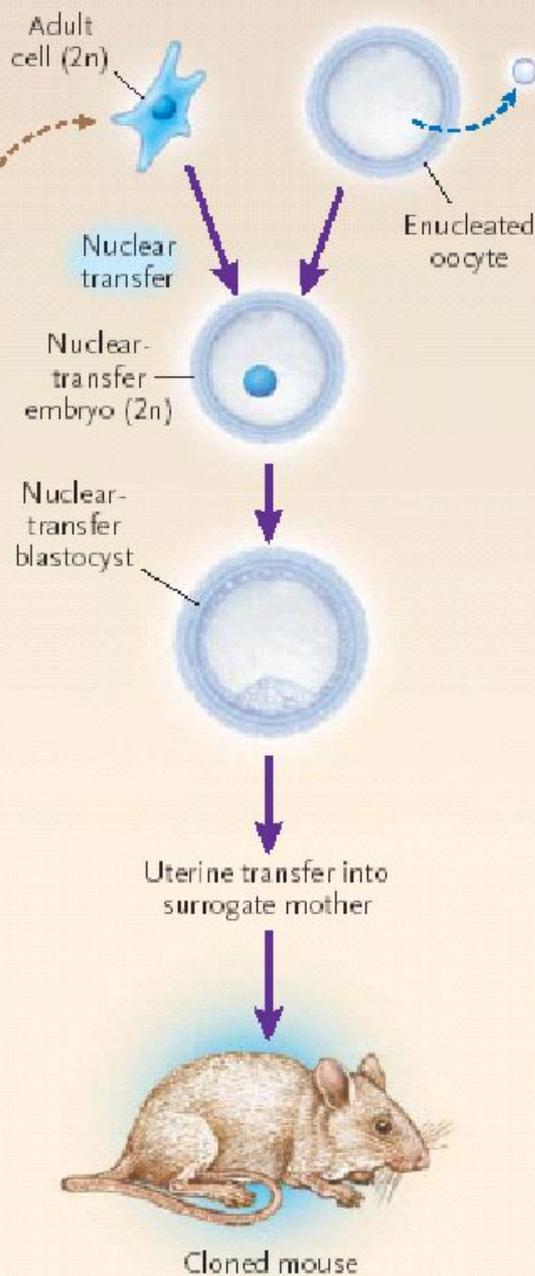


Fig. 1. Faulty mitotic spindles produce aneuploid embryos after primate nuclear transfer. (A) Defective NT mitotic spindle with misaligned chromosomes. Centrosomal NuMA at meiosis (B) and mitosis (C), but not in mitotic spindles after NT (D). The centrosomal kinesin HSET is also missing after NT (E), but not centromeric Eg5. (F). Bipolar mitotic spindles with aligned chromosomes and centrosomal NuMA after NT into fertilized eggs (G). DNA, microtubule, NuMA, and kinesin imaging as in (7, 8). Blue, DNA; red, β -tubulin; green, NuMA in (B), (C), (D), and (G); HSET in (E); and Eg5 in (F). Scale bar, 10 μ m.

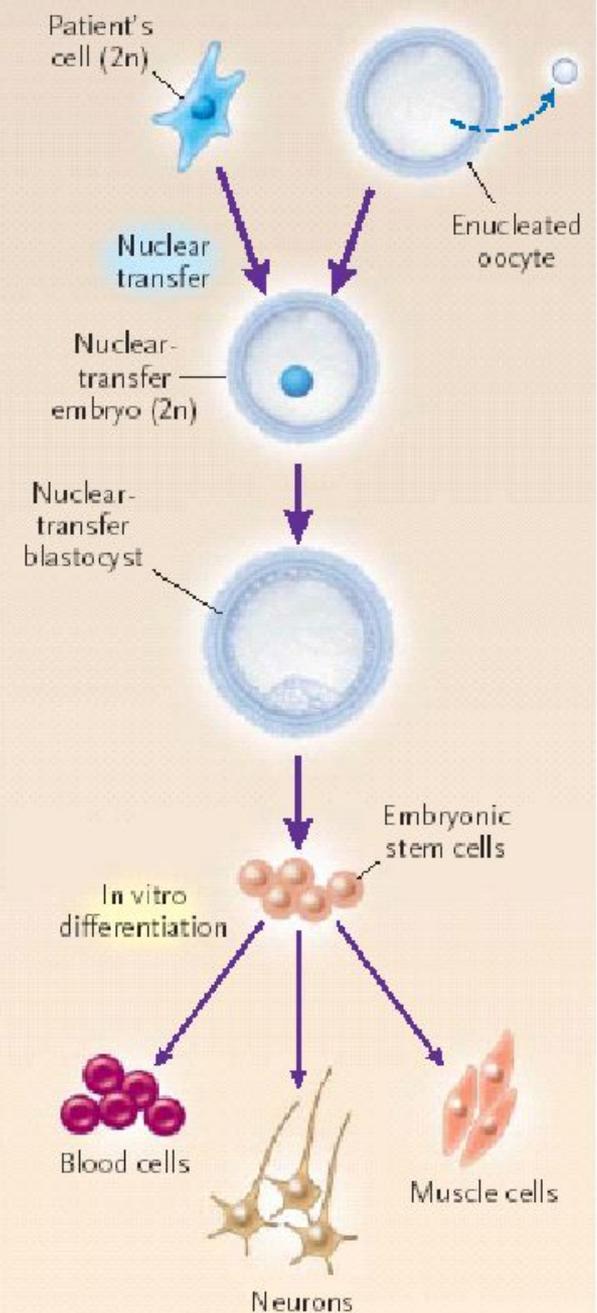
A Normal Development

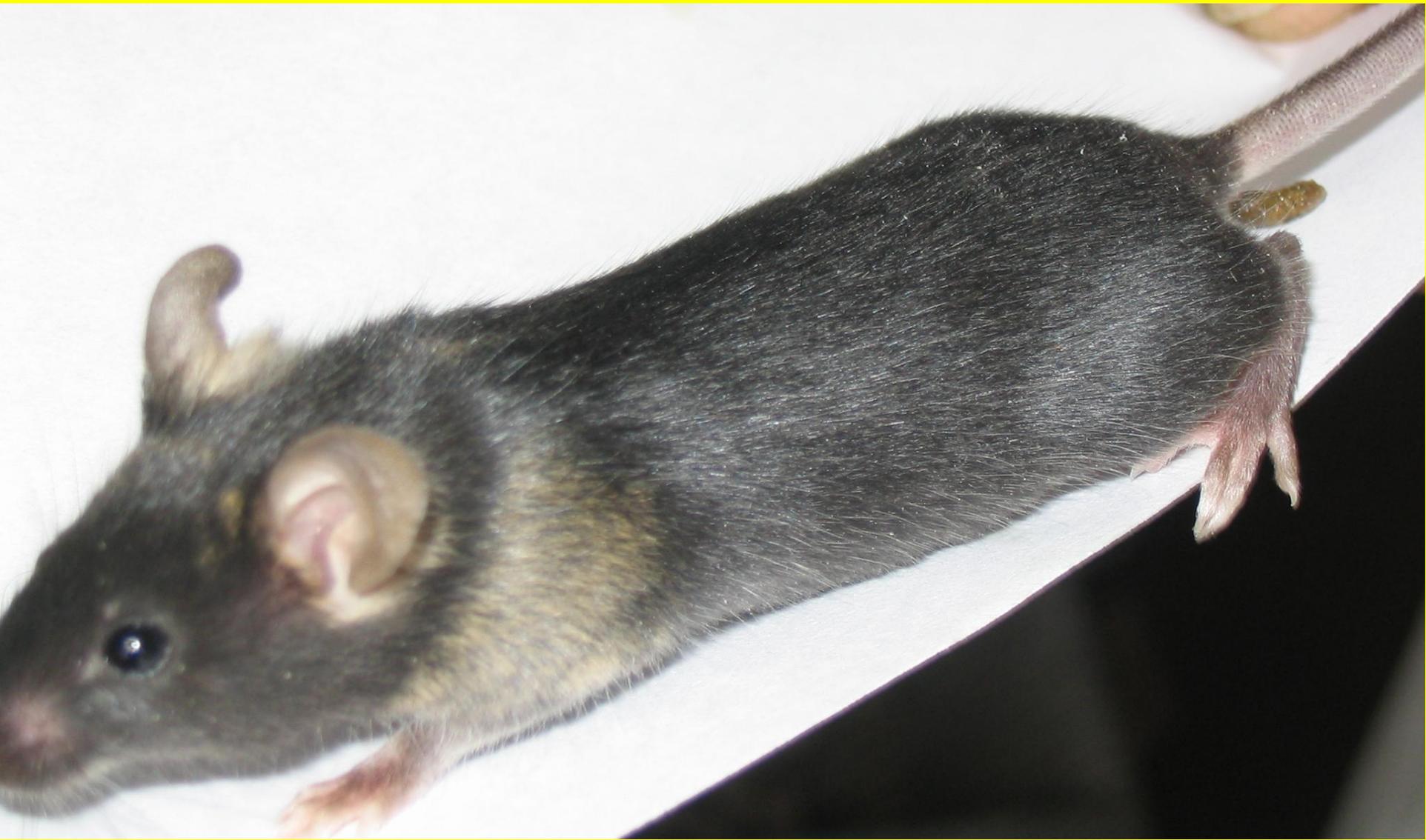


B Reproductive Cloning



C Therapeutic Cloning







Эффективность получения линий ЭС клеток из «клонированных» бластоцист коров и мышей в сравнении с бластоцистами, развившихся из зигот после их оплодотворения *in vitro* (терапевтическое клонирование) (Yang et al., 2007)

