

№1 1997 год ПЕРСПЕКТИВЫ КЛОНИРОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ

Идея клонирования животных, т.е. получение генетически идентичных копий, родилась благодаря успешным экспериментам по пересадке ядер дифференцированных клеток в энуклеированные яйцеклетки или ооциты, выполненным на амфибиях. Цель этих экспериментов была сугубо теоретическая — выяснить вопрос, способно ли ядро (геном) дифференцированной клетки к репрограммированию и восстановлению тотипотентности, т.е., будучи помещенным в цитоплазму яйца, способно ли оно обеспечить полное развитие подобно оплодотворенной яйцеклетке. Фактически речь шла о возможности обратимости эмбриональной дифференцировки и выяснению вопроса: претерпевает ли геном в процессе развития необратимые изменения или модификации? Успешные опыты J.Gurdon и его сотрудников, показавшие возможность развития взрослых амфибий из реконструированных яйцеклеток после трансплантации в них ядер из клеток эпителия кишечника плавающей личинки (головастика), были интерпретированы как убедительное доказательство, что геном дифференцированных клеток способен к репрограммированию в цитоплазме яйцеклетки и восстановлению тотипотентности, подобно оплодотворенному яйцу. Из этих результатов логично вытекало, что используя технику трансплантации ядер из соматических клеток взрослых особей в энуклеированные яйца или ооциты, можно получать генетические копии животного, служившего донором ядер дифференцированных клеток. Безусловно, клонирование животных открывало бы заманчивые перспективы для генетического копирования животных, прежде всего сельскохозяйственных, тех, которые имеют те или иные выдающиеся показатели продуктивности.

Однако первые попытки применить описанный выше подход для клонирования млекопитающих были безуспешными и даже скандальными. Сенсационные результаты Illmensee по рождению мышей, развившихся после пересадки кариопластов из разных частей предимплантационных эмбрионов мыши в энуклеированные яйца, не были подтверждены другими исследователями. Эти результаты вызвали еще большие сомнения после заявления лаборанта Illmensee, что результаты опытов Illmensee были фальсифицированы. В начале 80-х годов эксперименты по трансплантации ядер дифференцированных клеток в энуклеированные яйца или ооциты показали, что у мышей тотипотентность утрачивается после 2-го деления-дробления. Другой экспериментальный подход для изучения тотипотентности эмбрионов был основан на разделении бластомеров на ранних стадиях развития (до 16-клеточной стадии) и независимой их трансплантации приемным матерям. Результаты этих экспериментов показали, что у мышей тотипотентность утрачивается после 4-клеточной стадии, хотя у овец такая потеря происходит на более поздней стадии развития (после 16-клеточной стадии). Открытие импринтинга и его существенной роли в развитии млекопитающих сделало еще более проблематичной возможность клонирования млекопитающих, поскольку выяснилось, что материнский и отцовский геномы имеют разный вклад в нормальное развитие эмбриона, причем эти функциональные различия родительских геномов формируются в процессе овогенеза и сперматогенеза, импринтируются и реализуются в течение всего онтогенеза.

Тем не менее, исследования тотипотентности и плюрипотентности в эмбриональном развитии продолжались с использованием новых экспериментальных подходов. Уже в конце 80-х годов стало очевидным, что ооцит на стадии M2 (второе мейотическое деление) обладает факторами, способными репрограммировать геном клеток, полученных из внутренней клеточной массы бластоцисты после их трансплантации в энуклеированный ооцит M2. Здесь следует отметить значительный вклад в разработку этой техники шотландской группы исследователей под руководством Ian Wilmut и американских исследователей Keefer, Mathews и First. В 1996 г. вышли две публикации по успешному рождению ягнят и развитию эмбрионов коров до 80-85 дней беременности в экспериментах по трансплантации кариопластов, полученных из клеток культуры эмбриональных стволовых клеток, в энуклеированные ооциты M2 (Campbell et al., 1996; Keefer et al., 1996). По-видимому, эти успехи подтолкнули Ian Wilmut и его коллег попытаться использовать в качестве доноров ядра (кариопласты) дифференцированных клеток, взятых от эмбрионов или взрослых животных. Результатом этих экспериментов явилось рождение Dolly, овцы, развившейся из ооцита M2, у которого было заменено собственное ядро на ядро клетки из культуры эпителиальных клеток, полученной из молочной железы взрослой лактирующей овцы. Вне всяких сомнений, это выдающийся успех в клонировании животных. Впервые предложен, хотя и сложный в техническом отношении, способ получения генетических копий млекопитающих. Несомненно также и то, что клонирование станет сильнейшим стимулом для развития нового направления в биотехнологии животных и откроет широкие возможности в селекции сельскохозяйственных животных.

В теоретическом плане работа группы Ian Wilmut показала, что в процессе развития геном не претерпевает каких-либо необратимых изменений, по крайней мере, в части высокодифференцированных соматических клеток. Более того, возможно репрограммирование генома соматических клеток путем трансплантации его в цитоплазму ооцита M2. Фактически это исследование заложило теоретическую базу клонирования животных, хотя здесь имеется много неясностей и нужны дополнительные экспериментальные исследования.

Уместно в этом контексте упомянуть недавние результаты, полученные в лаборатории генетических основ онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН. Здесь были впервые получены гибридные клетки путем слияния высокоплюрипотентных стволовых эмбриональных клеток с клетками селезенки взрослой мыши. Некоторые клоны гибридных клеток имели нормальный диплоидный набор хромосом и дополнительную X-хромосому, происходящую из высокодифференцированной клетки. В экспериментах по микроинъекциям гибридных клеток в полость бластоцисты была получена серия химерных животных, что показало сохранение высокой плюрипотентности в гибридных клетках. Однако самым впечатляющим результатом этих опытов было обнаружение функциональной «соматической» X-хромосомы (происходящей от дифференцированной клетки) в разных тканях и органах химер. Показана возможность репрограммирования индивидуальной хромосомы, происходящей от дифференцированной клетки, при введении ее в геном плюрипотентных эмбриональных клеток. Иными словами, получены сходные данные по обратимости дифференцировки на уровне индивидуальных хромосом генома дифференцированной клетки, подобно реактивации целого генома в опытах Ian Wilmut. Другим следствием этого исследования является возможность

переноса индивидуальных хромосом от одного животного в геном другого этого же или близкого вида. Таким образом, открывается перспектива использовать плюрипотентные гибридные клетки в качестве носителей-векторов для переноса индивидуальных хромосом между животными и создавать уникальные генотипы, не существующие в природе, поскольку их невозможно получить обычным половым путем.

1. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813
2. Gurdon J.B., Uehlinger B. (1966) «Fertile» intestine nuclei. *Nature* 210: 1240-1241
3. Gurdon J.B., Laskey R.A., Reeves O.R. (1975) The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J.Embryol.Exp.Morphol.*, 34:93-112
4. Campbell K.H.S., McWhir J., Titchie W.A., Wilmut I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66
5. Matveeva N.M., Shilov A.G., Kaftanovskaya E.M. et al. (1997) In vitro and in vivo study of pluripotency in intra-specific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes. Submitted to «Development»

О.Л.Серов, д.б.н., зав. лабораторией генетических основ онтогенеза ИЦиГ СО РАН,
Университет г.Кампос, штат Рио-де-Жанейро, Бразилия