

## Почему мы любим ES cells?

Е. Кудрявцева

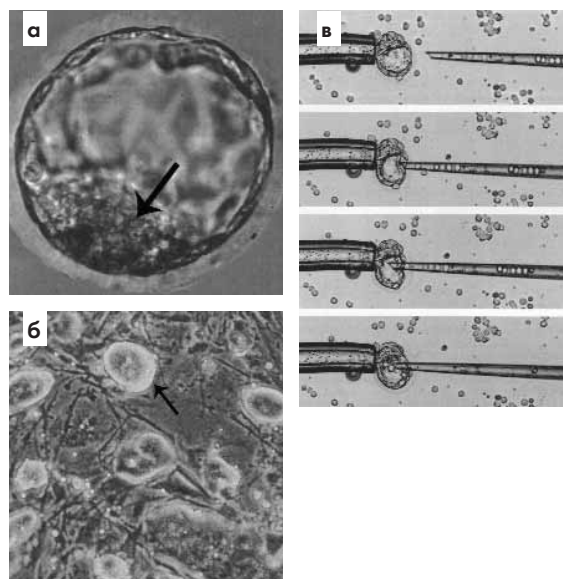
Эмбриональные стволовые клетки — ES cells (от Embryonic Stem cells), как их гораздо привычнее называть, — впервые были получены в 1981 г. (Evans, Kaufman, 1981). Получили их из раннего эмбриона мыши, взятого на стадии еще до имплантации в стенку матки (3–4 дня после оплодотворения). Чтобы немного понять, кто они и откуда, надо сказать сначала два слова о раннем развитии млекопитающих.

Как вы, конечно, знаете, все многоклеточные организмы начинают свою жизнь с одной клетки, и наш класс млекопитающих тут не исключение. Однако есть несколько характерных, свойственных млекопитающим, особенностей. Первая — им не нужно иметь много желтка в яйцеклетке. Эмбрион будет получать всю пищу от матери. Надо запастись ему совсем немного на самое первое время, пока контакт с материнским кровотоком еще не установлен, поэтому яйцеклетка млекопитающих — относительно небольшая клетка с прозрачной цитоплазмой. Однако вторая особенность млекопитающих — это то, что в эволюции наши предки (рептилии) были яйцекладущими и имели огромную яйцеклетку, набитую желтком (вспомните хорошо знакомое куриное яйцо). Поэтому требовался целый штат клеток, которые были нужны в основном для того, чтобы управиться со всей этой массой еды, и для того, чтобы создать зародышу приемлемые для жизни условия, отделив его от желточного склада. Эти внезародышевые клетки потом просто отмирали, так как после рождения были не нужны. Таким образом, у высших позвоночных только часть потомков яйцеклетки войдет в состав взрослого организма, а другая часть им в развитии послужит, а потом погибнет. Млекопитающие, как высшие позвоночные, сохранили это деление на зародышевую и внезародышевую части, несмотря на то, что утратили огромные запасы желтка.

После оплодотворения яйцеклетка млекопитающих начинает делиться — сначала на две клетки, потом каждая из дочерних клеток еще на две, и так далее, пока не получится плотный комочек из клеток — морула. Далее клетки в моруле реорганизуются — они выстраиваются так, что образуют шарик, наполненный внутри

жидкостью. Шарик этот называется бластоцистой — похож на бластулу, как у морского ежа, например, да не совсем бластула! Если присмотреться, видно, что с одной стороны стенка этого шарика толще (рисунок 1). В этом месте клетки лежат не в один слой, а в несколько. Оказалось, что будущий организм будет образовываться только из клеток этого утолщения (их называют внутренней клеточной массой), а все остальные клетки — это внезародышевая часть. Можно сказать, что клетки внутренней клеточной массы плюрипотентны — они дадут начало всем типам клеток, которые появятся в организме.

Вот именно эти клетки и были выделены Эвансом и Кауфманом в культуру. Очень тонким капилляром они прокололи стенку бластоцисты мыши и, контролируя свои действия под микроскопом, отсосали несколько клеток из внутренней клеточной массы. Понятно, что несколько клеток, помещенных в чашку Петри со средой, имеют очень мало шансов выжить, если это не



**Рисунок 1. Бластоциста и стволовые клетки.**

(а) — бластоциста; стрелкой отмечена внутренняя клеточная масса; (б) — эмбриональные стволовые клетки (отмечены стрелкой), растущие на подложке из облученных эмбриональных фибробластов; (в) — подсадка эмбриональных стволовых клеток в бластоцисту (из *Methods in Molecular biology*, v. 158, *Gene Knockout protocols*).

раковые клетки, конечно. Нормальные клетки любят жить среди себе подобных. Поэтому клетки из бластоцисты были помещены на слой эмбриональных фибробластов. Фибробласты были специально облучены такой дозой рентгена, что они могли жить 1–2 недели, продуцировать ростовые факторы, но не могли делиться. Прием с фибробластами сработал, и клетки из внутренней клеточной массы бластоцисты начали делиться в культуре. Клетки эти стали называть эмбриональные стволовые клетки (ES cells).

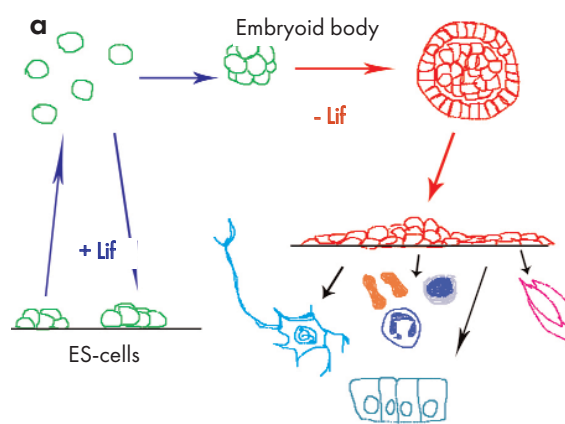
ES клетки растут очень быстро и выглядят, как плотные группы очень мелких клеток, между которыми трудно разглядеть границы (рисунок 2). Их необходимо часто пересаживать, часто менять среду, им необходим определенный набор ростовых факторов, большинству линий необходимы фибробласты в качестве подложки. Кроме того, при пересадке их необходимо каждый раз разбивать до единичных клеток. Оказалось, что если соблюдать эти простые правила, то эмбриональные стволовые клетки можно поддерживать в таком состоянии очень долго и нарастить в огромных количествах.

Но если взять из культуры несколько этих клеток тонким капилляром и проделать обратную операцию — проколоть стенку бластоцисты и прибавить их к внутренней клеточной массе, то они будут приняты там как родные, начнут развиваться во всех возможных направлениях.

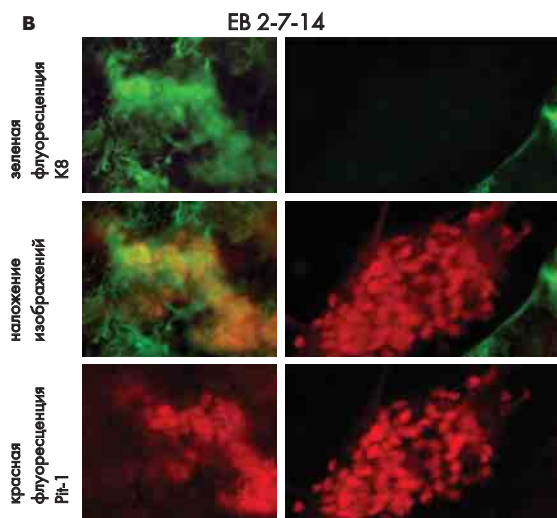
Как мы это знаем? А вот как — мы можем эмбриональные стволовые клетки пометить. Причем пометить не временно, а постоянно. В тот момент, когда они растут в культуре, можно внедрить в них чужеродную ДНК. Не буду описывать, как это делается, тем более что способов несколько. Важно, что это возможно, — так же, как для других клеток в культуре.

Теперь представим, что эта чужеродная ДНК кодирует какой-либо цветной белок. Зеленый флуоресцентный белок, например. Поставим ген зеленого белка под сильный промотор (регуляторный участок, управляющий транскрипцией). Выберем такой промотор, чтобы он работал во всех типах клеток. Введем ДНК зеленого белка под сильным промотором в ES клетки. Известно, что в некотором проценте случаев эта чужеродная ДНК встраивается в геном клетки. Подождем немного и отберем только те клетки, в геном которых эта ДНК встроилась. Обычно для этого вместе с геном зеленого белка в геном клетки встраивают ген устойчивости к антибиотику.

Возьмем зеленые ES клетки и подсадим их в бластоцисту без метки. Все это происходит еще на стадии до имплантации, поэтому такой «сборный» эмбрион (его называют химерой)



**б**  
Pit-1  
EB 2-7-14



**Рисунок 2. Поведение эмбриональных стволовых клеток в культуре.**

(а) — схема, иллюстрирующая поведение эмбриональных стволовых клеток в культуре; (б) — пример дифференцировки клеток, образовавшихся из эмбриональных стволовых. Через 3 недели после образования эмбриоидных тел (EB, embryoid body) некоторые клетки синтезируют транскрипционный фактор Pit-1 (темно-коричневая окраска ядер), который синтезируется только в гипофизе и совершенно необходим для его развития; (в) — пример, показывающий, что потомки ES клеток повторяют нормальный ход событий. Такая же 3-недельная культура была покрашена смесью флуоресцентных антител на Pit-1 (красный цвет, ядра) и K8 (кератин 8) (зеленый цвет, цитоскелет). Видно, что эти два белка в большинстве случаев находятся в разных клетках. В нормальном развитии клетки зачатка гипофиза сначала синтезируют кератин 8, однако к моменту включения Pit-1 он выключается. Наиболее яркие Pit-1 положительные клетки на правых фотографиях совершенно не синтезируют K8.

можно подсадить другой мышке, и он будет развиваться нормально. Когда такой эксперимент был поставлен, то зеленые клетки были обнаружены среди всех тканей и органов мышонка, развившегося из химерного эмбриона. Это значит, что клетки, которые мы размножаем в культуре, по-прежнему эмбриональные, т.е. могут развиваться. И главное — они плюрипотентны, т.е. могут развиваться в любом направлении.

Когда выяснилось, что все вышеописанное можно сделать в реальности, это открыло очень широкие возможности для исследований. Если вы можете внедрить в организм ген зеленого белка, то вся эта технология сработает и с любым другим геном, который вам по какой-то причине интересен. Более того, если первое поколение мышей — это химера, где часть клеток несет встроенный ген, а часть нормальные, то во втором поколении можно получить мышью, все клетки которой будут со встроенным белком. Ведь эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны, они превращаются во все клеточные типы, в том числе и в будущие половые клетки, которые становятся гаметами.

Такие мыши со встроенной чужой ДНК называются трансгенными. Появление технологии получения таких мышей во многом определило развитие биологии в последние 20 лет. Ведь вы можете встроить интересующий вас ген под сильным промотором и посмотреть, что будет происходить, если гена больше, чем надо. Вы можете сломать этот ген бессмысленной вставкой и посмотреть, что случится, если ваш ген отсутствует. Вы можете включить ген только в определенной ткани, если поставите его под специфический промотор, работающий только в этой ткани. Вы можете изучать, как работают различные участки, регулирующие экспрессию гена, если соедините эти регуляторные кусочки с тем же зеленым белком, а потом посмотрите, где и когда начнут появляться зеленые клетки. Наконец, можно сделать регулируемый промотор, который будет активен только при добавлении определенного вещества. И вы сами будете решать, когда ген включить, а когда — выключить.

Однако, как становится понятно, это еще далеко не всё, что эти замечательные клетки могут дать науке. Давно было известно, что клетки эти очень капризны, и поддерживать их — мука. Чуть что — они начинают дифференцироваться прямо в чашке Петри, без всякой подсадки в эмбрион. Забыл пересадить вовремя, не разбил на одиночные клетки при пересадке, не добавил нужных ростовых факторов — и, пожалуйста, они уже во что-то превратились! Если же дать им агрегировать в комочки и не

разбивать каждые два дня, то через несколько дней в образовавшейся культуре можно обнаружить очень многие типы клеток.

Конечно, первыми бросились в глаза клетки сердца, т.к. примерно через 10–12 дней они начинают сокращаться. Но также можно видеть нервные клетки с длинными отростками, которые куда-то целеустремленно прорастают; клетки миотубулы поперечно-полосатых мышц; гладкие мышечные клетки; кость; хрящ; клетки крови; клетки печени. Создается впечатление, что поищите то, что вам надо, — и найдете. Удалось найти даже такие специализированные клетки, как яйцеклетки и сперматозоиды. Я в моей работе искала клетки гипофиза — и нашла.

Эмбриональные стволовые клетки подтверждают свою плюрипотентность и в культуре. Причем с момента, когда их оставляют в покое и дают возможность агрегировать, они в общих чертах повторяют последовательность событий в развитии зародыша. Сначала включаются более ранние гены, потом — более поздние. Но структурная организация зародыша оказывается полностью утраченной. Клетки в результате такого развития получаются «правильными», однако сложены они совершенно неправильно, и ничего похожего на нормальный зародыш не получается. То же самое происходит, если недифференцированные клетки подсадить взрослой мышью.

Они не понимают сигналов во взрослом организме, продолжают бешено делиться и дифференцироваться во все стороны, и превращаются в опухоль. Из-за этого их качества давать опухоли при трансплантации очень долго интерес к их способностям дифференцироваться в культуре был невелик. Сейчас эта ситуация стала меняться.

Во-первых, накопились данные о том, что дифференцированные клетки, получаемые из эмбриональных стволовых клеток в культуре, — «правильные», т.е. это реально существующие типы клеток, которые могут функционировать правильным образом. Во-вторых, эмбриональные стволовые клетки удалось получить не только из эмбрионов мыши, но и от других млекопитающих, в том числе и из человеческого эмбриона. Естественно, в трансгенных экспериментах человеческие клетки никто не проверял, но они очень неплохо дифференцируются в культуре. Возникает надежда: не можем ли мы использовать такие, полученные в культуре, клетки для трансплантации? Ведь очень многие страшные болезни на деле обусловлены преждевременной гибелью определенного типа клеток: болезнь Паркинсона, например, когда погибает определенный тип нейронов, или диабет, когда умирают клетки, продуцирующие инсулин.

Проблема с такими подсаженными клетками та же, что и при любой трансплантации органов. Иммунная система найдет и убьет чужие клетки. Но можно попробовать обойти и это ограничение. Показано, что если ядро из соматической клетки (не гаметы) пересадить в цитоплазму яйцеклетки, то побеждает цитоплазма. Ядро начинает вести себя, как ядро яйцеклетки. Можно взять яйцеклетку, вынуть из нее ее собственное ядро, заменить его на ядро, взятое из ткани больного, дать яйцеклетке развиваться до стадии бластоцисты (это прекрасно происходит в культуре), получить из нее линию ES клеток с геномом нашего больного и вырастить нужные клетки для трансплантации. Такие эксперименты идут в лаборатории Джоржа Дали из Гарварда. Причем, если у вас есть проблемы с использованием человеческих яйцеклеток, то рассматривается другая возможность. Ведь яйцеклетки были найдены среди клеток, образовавшихся из ES в культуре. Может быть они тоже пригодны для репрограммирования соматических ядер?

Еще одна трудность — при развитии ES клеток вы имеете все типы клеток сразу. Несколько больше, чем вам бы хотелось. Вы хотели бы получить, например, дофаминовые нейроны. Они здесь, пожалуйста. Но как отделаться от клеток печени, сердца и хряща? Можно — и многие исследователи это делают — попытаться подобрать набор регуляторных молекул, которые заставят большинство клеток развиваться в нужном направлении. Однако популяцию 100%-ной чистоты все равно получить не удастся.

Есть другой подход — можно попытаться нужные клетки из смеси отобрать. Выберем ген, который экспрессируется только в нужных нам клетках. Найдем область ДНК, которая необходима для его правильной работы. Соединим ее все с тем же зеленым белком. Теперь зеленый

белок будет экспрессироваться там же, где и ген, характерный для данного типа клеток. Встроим полученную конструкцию в геном эмбриональных стволовых клеток. Дадим этим клеткам возможность дифференцироваться. Если мы всё сделали правильно, то через некоторое время в общей неразберихе мы начнем видеть зеленые клетки. Они-то нам и нужны. Сейчас существует специальная машина, которая может из суспензии отделить зеленые клетки от незеленых. Конечно, это очень тонкая операция. Дифференцированные клетки очень нежные. Одно могу сказать: некоторые ученые в настоящее время вполне добились успеха с некоторыми типами клеток. Значит, это возможно.

Одна из самых интересных особенностей ES клеток — их феноменальная «жажда превращения». Как работает этот мотор? Что подвешивает клетку в столь неустойчивое положение, из которого она готова «покатиться» в любую сторону? Ведь гаметы — это очень специализированные клетки, приспособленные природой для определенной работы — встретиться, слиться, объединить генетический материал. За несколько последующих делений их потомки обретают плюрипотентность, которую затем неуклонно теряют в процессе развития. И только некоторые «избранные» в какой-то мере сохраняют это удивительное качество. Я имею в виду стволовые клетки, сохранившиеся во взрослом организме. Но это уже несколько другая история. Не менее интересная.

## Литература

**Evans M.J., Kaufman M.H.** 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos // *Nature*, 292: 154–156.