



Potencje rozwojowe komórek somatycznych ssaków

Jacek A. Modliński, Anna Piliszek, Jolanta Karasiewicz

Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec

Developmental potential of mammalian somatic cells

Summary

The analysis of the experiments on somatic cloning of mammals reveals that possibly there is a group of cells whose nuclei have greater developmental potential than those of other cells. The group comprises cells of a particular developmental lineage, namely those originating from embryonic mesenchyme and mesoderm. It remains to be elucidated if somatic cells effectively used for cloning are terminally differentiated, not yet fully differentiated or if they are stem cells.

Developmental potential of somatic cell nuclei is best revealed when they are quiescent (i.e. in G0 phase of the cell cycle) upon being introduced into enucleated oocytes. The main obstacle in revealing the potencies of nuclei are the difficulties in their reprogramming before starting embryonic transcription, probably consisting in improper and not fast enough erasing of epigenetic modifications of the genome.

Developmental plasticity of whole cells as opposed to their nuclei has been experimentally demonstrated in a particular class of somatic cells, namely in stem cells. Stem cells renewing a tissue of their origin can undergo transdifferentiation, that is, in atypical conditions they can differentiate into cells of other tissue and in chimaeras with early embryos – even into many different types of cells.

Key words:

somatic cells, developmental potential, somatic cloning, stem cells.

1. Wstęp

Analiza potencji rozwojowych somatycznych komórek ssaków jest od kilku lat przedmiotem intensywnych badań prowadzonych na wielu gatunkach, w tym również u człowieka. Składa się

Adres do korespondencji

Jacek A. Modliński,
Zakład Embriologii
Doświadczalnej,
Instytut Genetyki
i Hodowli Zwierząt,
Polska Akademia Nauk,
Jastrzębiec,
05-552 Wólka Kosowska;
e-mail:
j.a.modlinski@ighz.pl

na to wiele powodów zarówno poznawczych, jak i czysto praktycznych. Komórki somatyczne wykorzystane być mogą jako dawcy jąder w klonowaniu somatycznym; możliwa jest ich modyfikacja genetyczna *in vitro* (w tym również *gene targeting*), a tym samym produkcja zwierząt transgenicznych na szerszą niż dotychczas skalę. Sądzi się również, że użyte być one mogą w różnych modelach doświadczalnych i klinicznych, w terapii wielu chorób u zwierząt i człowieka. Szczególnie cenne jest wykorzystanie jąder tych komórek w procedurach klonowania somatycznego oraz całych komórek w tworzeniu osobników chimerowych, a być może również – drogą klonowania chimerowego – zwierząt wywodzących się całkowicie z komórek somatycznych. Badania prowadzone w ostatnich latach przynoszą coraz więcej informacji dotyczących plastyczności rozwojowej komórek somatycznych oraz potencji rozwojowych ich jąder. Informacje te zmieniły w zasadniczy sposób dotychczasowe poglądy na właściwości komórek somatycznych ssaków i przełamały – w wielu przypadkach – obowiązujące dogmaty dotyczące mechanizmów i skutków ich różnicowania. Celem tego artykułu jest próba podsumowania wyników doświadczeń dotyczących potencji rozwojowych komórek somatycznych i ich jąder.

2. Potencje jąder komórek somatycznych – klonowanie somatyczne

W ciągu sześciu lat, które minęły od narodzin Dolly (1) i Cumuliny (2), pierwszych ssaków uzyskanych w wyniku klonowania z komórek somatycznych, otrzymano wiele somatycznych klonów z myszy, bydła, owcy, kozy i świni. Uzyskano również pojedyncze osobniki u kota domowego, gaura i jednego z podgatunków muflona. Prowadzone są intensywne prace nad somatycznym klonowaniem gatunków dzikich kotowatych oraz naczelnych, w tym również człowieka. Uzyskane wyniki omówione są szczegółowo w rozdziale „Zdolności rozwojowe komórek i jąder komórkowych ssaków – klonowanie” opublikowanym w tomie *Molekularne podstawy rozwoju zarodkowego* (3). Klonowanie somatyczne jest najbardziej obiecującą techniką, umożliwiającą zarówno otrzymanie genetycznych kopii cennych egzemplarzy zwierząt, jak i znacznie efektywniejsze – niż dotychczas – uzyskiwanie i namnażanie zwierząt transgenicznych. W prowadzonych do tej pory badaniach nad klonowaniem somatycznym ssaków komórkami używanymi najczęściej jako dawcy jąder były, w przypadku zwierząt dorosłych, komórki warstwy ziarnistej otaczającej owulowane oocyty lub też pozyskiwane z pęcherzyków jajnikowych, komórki nabłonka jajowodu oraz komórki pobrane z ucha, końca ogona i z mięśni (w tych trzech ostatnich przypadkach były to najprawdopodobniej fibroblasty). Wprawdzie urodzone zwierzęta uzyskano po transplantacji jąder wszystkich wspomnianych rodzajów komórek, niemniej jednak nie wiadomo dokładnie, jądra których komórek posiadają większe, a które mniejsze potencje do kierowania rozwojem rekonstruowanych zarodków, a tym samym, które są najbardziej kompetentne i dogodne do klonowania somatycznego. Wątpliwości te dotyczą nie tylko typu komórek, ale również ich płci,

wieku, stopnia zróżnicowania oraz fazy cyklu komórkowego, w jakiej się one znajdują w momencie transplantacji ich jąder do enukleowanych oocytów.

Próba odpowiedzi na pytania dotyczące potencji rozwojowych jąder komórek somatycznych w zależności od płci, rodzaju i wieku komórek, były zakrojone na szeroką skalę badania przeprowadzone u bydła przez Kato i wsp. (4) oraz u myszy przez Wakayamę i Yanagimachiego (5). Kato i wsp. (4) testowali – jako dawców jąder – wiele rodzajów komórek pochodzących z różnych narządów i uzyskanych od osobników obu płci, będących w różnym wieku. Komórkami tymi były u osobników żeńskich:

- komórki skóry, mięśni, jelita i nerki pochodzące z płodów;
- komórki skóry, ucha, mięśni, płuc, serca, wątroby, nerki i macicy, pochodzące z cieląt noworodków płci żeńskiej;

– komórki skóry, ucha, serca, nerki, jajowodu i macicy oraz komórki pęcherzykowe, pochodzące od dorosłych krów;

u osobników męskich:

- komórki skóry, języka, serca, wątroby, jelita i nerki pochodzące z płodów;
- komórki skóry, ucha, serca, wątroby, sutków, jąder i najądrzy, pochodzące z cieląt noworodków płci męskiej;

– komórki skóry, ucha, serca, wątroby i nerki pochodzące od dorosłych buhajów.

Okazało się, że w hodowli *in vitro* jądra pochodzące ze wszystkich rodzajów testowanych komórek podtrzymywały rozwój rekonstruowanych oocytów do stadium blastocysty. Odsetek zarodków osiągających to stadium był stosunkowo wysoki i wynosił przeciętnie od 30 do 40% w stosunku do liczby hodowanych, rekonstruowanych oocytów. Odstępstwem od reguły był, z jednej strony, niski odsetek (23%) blastocyst powstałych z oocytów rekonstruowanych w wyniku transplantacji jąder komórek mięśni pochodzących z żeńskich płodów, z drugiej zaś wysoki odsetek rozwoju rekonstruowanych oocytów uzyskanych po transplantacji jąder pochodzących z komórek skóry dorosłych krów i buhajów (odpowiednio 52 i 53% przypadków). Nie stwierdzono także istotnych różnic w sumarycznych odsetkach blastocyst uzyskanych po transplantacji jąder pochodzących z komórek osobników dorosłych (42%), noworodków (37%) oraz z komórek płodowych (37%), a także jąder pochodzących z komórek osobników żeńskich i męskich (39 vs 40%). Dowodzi to wyrażnie, że u bydła ani płeć, ani wiek osobników, z których pobierane były komórki – dawcy jąder, jak również prawdopodobnie typ tkanek/narządów, które były źródłem tych komórek, nie mają istotnego wpływu na przedimplantacyjny rozwój rekonstruowanych oocytów. Różnice w potencjach rozwojowych rekonstruowanych zarodków zaznaczyły się natomiast wyraźnie w okresie rozwoju poimplantacyjnego. Ze 172. zarodków przeniesionych do 134. biorczyń uzyskano 24 cielęta, z których przeżyło tylko 13. Pozostałe cielęta padły w czasie porodu, głównie z powodu dystocji spowodowanej – w większości przypadków – nadmierną masą okołourodzeniową (*large calf syndrome*), bądź też w kilka lub kilkanaście dni po urodzeniu. Cielę-

ta, które się urodziły pochodziły z rekonstruowanych zarodków uzyskanych po transplantacji do enukleowanych oocytów jąder komórek pęcherzykowych/ziarnistych (trzy osobniki), komórek nabłonka jajowodu i macicy dorosłych krów (odpowiednio po dwa osobniki), fibroblastów pochodzących ze skóry płodów męskich (jeden osobnik) oraz skóry cieląt noworodków obojga płci (po jednym osobniku), fibroblastów skóry dorosłych krów i buhajów (odpowiednio: jeden i pięć osobników), fibroblastów ucha dorosłych buhajów (pięć osobników), jak również z komórek wątroby noworodków płci męskiej (dwa osobniki). Cielęta, które przeżyły były uzyskane po transplantacji jąder pochodzących z komórek pęcherzykowych/ziarnistych (trzy cielęta), komórek nabłonkowych jajowodu (dwa cielęta), fibroblastów skóry noworodków żeńskich oraz dorosłych krów (po jednym osobniku), fibroblastów skóry męskich płodów (jeden osobnik), fibroblastów ucha dorosłych buhajów (trzy cielęta) oraz komórek wątroby noworodków płci męskiej (jeden osobnik). Analizując, pod kątem płci, potencje rozwojowe somatycznych komórek-dawców jąder nie można zauważyć – zależnych od płci – różnic w ich kompetencjach rozwojowych. Liczba urodzonych osobników uzyskanych po transplantacji jąder komórek żeńskich i męskich jest taka sama (9 i 9), zaś niewielka różnica w liczebności płci cieląt, które przeżyły krytyczne kilkanaście dni (7 żeńskich vs 5 męskich) jest statystycznie nieistotna w odniesieniu do liczby operowanych oocytów. Z kolei, analiza potencji rozwojowych zwierząt uzyskanych po transplantacji jąder komórek w różnym wieku wykazała, że znacznie więcej przypadków spontanicznych poronień oraz znacznie większą liczbę różnego typu anomalii rozwojowych obserwowano u płodów i urodzonych cieląt rozwijających się po transplantacji jąder komórek dorosłych osobników niż po transferze jąder komórek płodowych i z noworodków.

Różnorodność narządów i tkanek, z których pobierane były komórki nie jest jednoznaczna z różnorodnością tych komórek. W przypadku skóry, ucha, języka i jąder, komórkami-dawcami były, z całą pewnością, wyłącznie fibroblasty; w przypadku mięśni – mogły to być fibroblasty i fibrocyty lub też mięśniowe komórki satelitarne. Te ostatnie wykazują duże powinowactwo do sarkoblastów (uważa się wręcz, że są one tymi sarkoblastami z okresu embriogenezy, które nie uległy fuzji z mioblastami), a zatem komórek macierzystych tkanki mięśniowej.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzamy obserwacje wielu autorów (6,7), że w klonowaniu somatycznym komórkami najbardziej kompetentnymi jako dawcy jąder, jak się wydaje, są komórki ziarniste/pęcherzykowe, komórki nabłonka jajowodu (i być może również macicy) oraz fibroblasty/fibrocyty. Dotyczy to nie tylko bydła, ale również myszy oraz prawdopodobnie innych gatunków ssaków. Wakayama i Yanagimachi (5) testowali potencje rozwojowe zarodków uzyskanych po transplantacji do enukleowanych oocytów jąder komórek pęcherzykowych, fibroblastów skóry, komórek Sertolego, neuronów z mózgu, komórek śledziony, tymocytów z grasicy oraz makrofagów z jamy otrzewnowej dorosłych myszy, a także komórek uzyskanych z gonad płodów obojga płci. Podobnie jak w doświadczeniach Kato i wsp. (4), oocyty rekonstruowane przy użyciu jąder wszystkich testowanych

rodzajów komórek rozwijały się do stadium blastocysty. Jednak urodzone myszy uzyskano jedynie po transferze jąder komórek pęcherzykowych, fibroblastów skóry oraz komórek płodowych gonad. Najprawdopodobniej jednak i w tym ostatnim przypadku dawcami jąder były również fibroblasty (a być może także jakieś inne komórki zrębu gonady), a nie oogonia i prespermatogonia. Na marginesie warto jednak dodać, że Ogura i wsp. (8) uzyskali myszy po transplatacji jąder komórek Sertolego pochodzących od noworodków.

Jednymi z bardziej spektakularnych osiągnięć w dziedzinie klonowania somatycznego była było uzyskanie przez Gallego i wsp. (9) buhajka po transplatacji jądra leukocyta krwi obwodowej oraz przez Kishiego i wsp. (10) dwóch jałówek po transplatacji do enukleowanych oocytów jąder komórek somatycznych uzyskanych z siary w ciągu 48. godzin po porodzie. Autorzy twierdzą, że były to komórki nabłonkowe. Dość powszechnie przyjmowanym *a priori* poglądem jest to, że tzw. ciała siary (*corpuscula colostri*) są złączonymi do światła pęcherzyków gruczołu mlekowego komórkami nabłonka. Jednak zdaniem niektórych autorów nie są to komórki nabłonkowe (jak się powszechnie sądzi), lecz wędrujące komórki fagocytarne, a zatem komórki szeregu monocytarnego (makrofagi) oraz granulocytarnego (mikrofagi), które po przejściu przez nabłonek pęcherzyków dostały się do ich światła.

Analizując uzyskane wyniki wskazuje się, że w znakomitej większości przypadków – na co, jak się wydaje, nie zwrócono większej uwagi – urodzone zwierzęta uzyskano jedynie po transplatacji jąder komórek pochodzenia mezenchymatyczno/mezodermalnego. Dotyczy to fibroblastów/fibrocytów, komórek nabłonkowych jajowodu i macicy, komórek ziarnistych/pęcherzykowych (ich pochodzenie nie jest wprawdzie w pełni wyjaśnione, sądzi się jednak, że są to przekształcone komórki nabłonka mezodermalnego), komórek Sertolego, limocytów oraz – być może – komórek uzyskanych z siary (jeśli były to mikro-, i makrofagi). Odstępstwem od reguły jest uzyskanie cielęcia po transplatacji jądra komórki wątroby noworodka. Trudno jednak określić (podobnie jak i w przypadku Dolly; 1) jakiego rodzaju jądra komórek użyte były do transplatacji. W tym pierwszym przypadku mogły to być hepatocyty, które różnicują się z komórek endodermalnych pod wpływem kontaktu z mezenchymą, ale mogły to być również powstające z mezenchymy komórki śródbłonkowe naczyń włosowatych, lub też – na przykład – powstające z monocytów komórki Browicza i Kupffera oraz zbliżone do tzw. dużych ziarnistych limfocytów i mające właściwości komórek NK (*natural killers*) tzw. komórki ziarnkowe (*pit cells*), jak również, zbliżone do fibroblastów, komórki gwiaździste (stosunek tych komórek do hepatocytów wynosi u niektórych zwierząt oraz u człowieka 1:30). Nie ma zatem – jak do tej pory – przekonującego dowodu uzyskania urodzonych zwierząt po transplatacji jąder komórek somatycznych będących pochodnymi ekto-, i endodermy. Otwartą jest kwestią, czy klonowanie somatyczne ssaków opierać się może jedynie na dawcach jąder pochodzenia mezenchymatycznego (niewyspecjalizowanej tkanki zarodkowej, która zasadniczo daje początek tkance łącznej oraz wy-

ściółce jam ciała oraz naczyń krwionośnych i limfatycznych) i mezodermalnego (najbardziej dynamicznego i plastycznego listka zarodkowego, który tworzy większość narządów i układów), czy też jednorodność uzyskanych wyników jest skutkiem przypadkowego (a raczej rutynowego) doboru komórek-dawców jąder, co *eo ipso* świadczy o niewystarczającym zakresie badań w tej dziedzinie.

Osobną kwestią jest możliwość przypadkowego użycia, jako dawców jąder, komórek nie w pełni zróżnicowanych (część z tych komórek mogła mieć – z pewnością – pochodzenie mezenchymatyczne) lub też komórek macierzystych. W przypadku Dolly, pierwotne hodowle komórek gruczołu mlekowego składały się w 90% z nabłonkowych komórek gruczołu mlekowego, a także fibroblastów i komórek mioepitelioidalnych. Są to kurczliwe komórki występujące pomiędzy komórkami nabłonkowymi gruczołów wydzielniczych a błoną podstawną, które mają cechy zarówno komórek nabłonkowych, jak komórek mięśni gładkich. Wynika to prawdopodobnie z tego, że powstające w okresie rozwoju gruczołu mlekowego zgrubienia ektodermy w okolicy piersiowej (tworzące ektodermalne sznury komórkowe), które są jego zawiązkami, rozwijają się pod wpływem mezenchymy i stopniowo zasiedlają. Oprócz komórek mioepitelioidalnych w nabłonku mlekowych przewodów międzypłacikowych występują tzw. komórki mięśniowo-nabłonkowe koszyczkowe, które są również (najprawdopodobniej) pochodzenia mezenchymatyczno-mezodermalnego. Sądzić można, że wiele z tych komórek nie jest jeszcze komórkami w pełni zróżnicowanymi. Dowodem na to jest, że wiele rodzajów hodowanych *in vitro* komórek gruczołu mlekowego ulega – pod wpływem pozakomórkowego materiału pochodzącego z mysiego nowotworu Engelbertha-Holma-Swarma (EHS) i obecności hormonów laktogennych (hydrokortyzon, insulina i prolaktyna) – ostatecznemu różnicowaniu w komórki o charakterze wydzielniczym (11). Natomiast przy braku EHS i w obecności czynnika wzrostu naskórka (EGF, *epidermal growth factor*) zamiast prolaktyny, komórki te zachowują charakter komórek niezróżnicowanych.

Urodzone zwierzęta uzyskano również po transplantacji jąder pochodzących z komórek nabłonka jajowodu i macicy. Ponieważ, podobnie jak w wielu innych przypadkach, fenotyp i morfologia również i tych komórek nie zostały dokładnie określone nie można wykluczyć, że w populacji komórek-dawców jąder znajdowały się komórki niezróżnicowane. W błonie śluzowej jajowodu, u podstawy nabłonka, występują tzw. komórki podstawne (stanowiące ok. 1% komórek nabłonka), które mają charakter komórek niezróżnicowanych i mogących się prawdopodobnie przekształcać w komórki urzęsione i wydzielnicze nabłonka. Istnieje również pogląd, że komórki te są wędrującymi komórkami limfoidalnymi (komórki tego rodzaju stwierdza się w nabłonkach wielu innych narządów). Komórki niezróżnicowane występują również w blaszce właściwej błony śluzowej jajowodu. W warstwie tej, o czym należy pamiętać, występują również licznie fibroblasty oraz, wspomniane już, wędrujące limfocyty. Komórki te występują także, obok licznych, mało zróżnicowanych komórek, w blaszce właściwej błony śluzowej macicy.

Pewne wątpliwości nasuwają się również odnośnie do rzeczywistej konieczności wymuszonego wprowadzania komórek-dawców jąder w spoczynkowy stan G0. Wiadomo, na podstawie badań Campbella i wsp. (12), że – istotnie – jądrami najbardziej podatnymi na przemodelowanie i przeprogramowanie w cytoplazmatycznym *millieu* oocytu są jądra będące w stanie G0 lub w fazie G1 cyklu komórkowego. Jednakże analiza tkanek/narządów, z których pochodziły komórki-dawcy jąder pozwala na stwierdzenie, że – w większości przypadków – mogą być one także źródłem komórek będących w naturalnym stanie spoczynkowym. Dotyczy to fibrocytów [według Schnieke i wsp. (13) 51% fibroblastów (fibrocytów?) płodowych jest w tym stanie], komórek Sertolego, limfocytów (limfocyty B przed interakcją z antygenem znajdują się w większości w stanie G0) oraz komórek ziarnistych/pęcherzykowych, które są mieszaną populacją komórek G0/G1. Z kolei, wśród wielu rodzajów komórek nabłonka jajowodu, około 1% ogólnej populacji komórek stanowią tzw. komórki klinowate (ang. *peg cells*), które – jak się wydaje – stanowią nieaktywną, spoczynkową formę komórek wydzielniczych.

Wprowadzanie komórek-dawców jąder w spoczynkowy stan G0 przeprowadza się najczęściej poprzez ich długotrwałą hodowlę w pożywce o drastycznie obniżonej (do 0,5%) zawartości surowicy. Jednakże w badaniach przeprowadzonych przez Peurę (14) wykazano, że takie warunki hodowli powodują wiele zmian w strukturze DNA jąder hodowanych komórek. Jeżeli zmiany te są zmianami nieodwracalnymi, rzutować to może w istotny sposób na zdolności transplantowanych jąder do prawidłowego kierowania rozwojem rekonstruowanych zarodków. Jeśli tak jest, to znacznie lepszym sposobem zwiększenia odsetka komórek będących w stanie G0 jest wprowadzenie ich w ten stan zastosowaną przez Onishiego i wsp. (15) metodą inhibicji kontaktowej lub też selekcji komórek G0/G1 przy użyciu metody sortowania w cytometrze przepływowym. Ta ostatnia metoda została przez nas użyta z powodzeniem do uzyskania frakcji G0/G1 pierwotnych komórek zarodkowych myszy (16) i jest rutynowo stosowana w Zakładzie Fizjologii Rozrodu Instytutu Zootechniki w Balicach do selekcji tej frakcji z wielu rodzajów komórek różnych gatunków ssaków.

Wpływ fazy cyklu komórkowego transplantowanych jąder oraz stanu ich zróżnicowania na rozwój rekonstruowanych zarodków jest szczególnie widoczny, jeśli porówna się wyniki transplantacji do oocytów jąder pierwotnych komórek zarodkowych (PKZ) z wynikami uzyskanymi po transplantacji jąder komórek somatycznych. Zazwyczaj, około 65% zarodków uzyskanych po transplantacji jąder somatycznych osiąga stadium blastocysty, podczas gdy tylko 10-20% zarodków rekonstruowanych po transplantacji jąder PKZ rozwija się do tego stadium. Jednak odsetek zarodków rozwijających się do urodzenia, jest – w przypadku PKZ – kilkunastokrotnie wyższy niż odsetek zwierząt uzyskanych po transplantacji jąder komórek somatycznych. Wynika to prawdopodobnie z tego, że w przeciwieństwie do komórek somatycznych, które są naturalnie w fazie G0/G1, lub są w tę fazę wprowadzane, około 60% populacji PKZ jest w fazie S. Faza ta jest najmniej sprzyjająca utrzymaniu pra-

widłowego wzorca replikacji DNA oraz zachowaniu prawidłowej ploidii rekonstruowanych zarodków. Zarodki, które po transplantacji jąder PKZ rozwijają się do stadium blastocysty uzyskane są prawdopodobnie po transferze jąder stosunkowo nielicznej populacji PKZ będącej w fazie G1. Z kolei, wysoki odsetek zarodków rozwijających się do urodzenia świadczy o tym, że jądra niezróżnicowanych komórek, jakimi są PKZ, są bardziej podatne na przeprogramowanie (lub wymagają mniejszego przeprogramowania) niż jądra komórek somatycznych.

Przemodelowanie i przeprogramowanie jąder komórek somatycznych w cytoplazmie oocyty jest *conditio sine qua non* prawidłowego rozwoju rekonstruowanych zarodków. O ile istnieje wiele informacji dotyczących przeprogramowania jąder komórek zarodkowych, o tyle mechanizmy warunkujące przeprogramowanie jąder komórek są praktycznie nieznanne. Sądzić można, że istnieje kilka typów reakcji jądra somatycznego na czynniki cytoplazmatyczne oocyty wpływające tym samym na odmienne potencje rozwojowe rekonstruowanych zarodków:

a) całkowity brak przeprogramowania genomu powodujący natychmiastowe obumarcie zarodków,

b) częściowe przeprogramowanie umożliwiające wprawdzie zainicjowanie rozwoju, lecz kończące się najczęściej powstaniem nienormalnych zarodków/płodów obumierających w różnych etapach rozwoju,

c) całkowite, prawidłowe przeprogramowanie genomu umożliwiające uzyskanie normalnych zwierząt. Dotychczasowa efektywność klonowania somatycznego świadczy o tym, że ten typ reakcji jest zdecydowanym wyjątkiem.

Oczywiście, na niską wydajność klonowania somatycznego wpływać mogą także zmiany genetyczne kumulujące się w komórkach w miarę ich starzenia, a także zmiany powstające w genomie w wyniku hodowli komórek *in vitro*. Jednakże wysoka częstotliwość anomalii rozwojowych pojawiających się u sklonowanych zwierząt, a także ich niespecyficzne gatunkowo podobieństwo sugeruje, że są one skutkiem braku, lub nieprawidłowego „odwrócenia” epigenetycznych modyfikacji genomu zachodzących normalnie w ontogenezie. Każdy rodzaj komórki somatycznej ma swój specyficzny profil epigenetycznych modyfikacji genomu, który – po transplantacji jej jądra do oocyty – musi być usunięty, a stan genomu przywrócony do stanu charakterystycznego dla genomu zygoty. Tak zatem geny, które są nieaktywne w komórkach somatycznych muszą być reaktywowane w rekonstruowanych oocytach, gdyż działalność wielu z nich jest związana z pierwszymi etapami rozwoju zarodkowego. Jednym z takich genów jest Oct3/4 przejawiający ekspresję w stadium blastocysty, i który jest istotny dla pierwszych etapów rozwoju poimplantacyjnego. Gen ten jest nieaktywny w większości komórek somatycznych, m.in. w fibroblastach i komórkach pęcherzykowych, a zatem w komórkach powszechnie używanych jako dawcy jąder w klonowaniu somatycznym. W rozwoju ssaków są przynajmniej dwa okresy, w których zachodzi przeprogramowanie epigenetycznych modyfikacji genomu obejmujące przede wszystkim zmianę wzorców metylacji DNA (metylacja DNA jest jedną z najważniejszych epigenetycznych modyfikacji genomu regulującą jego

działanie). Pierwszym z tych etapów jest okres gametogenezy, drugim zaś okres rozwoju przedimplantacyjnego.

Przeprogramowanie genomu w tych okresach ma prawdopodobnie istotne znaczenie w osiągnięciu totipotencji jąder komórek zarodkowych. W normalnym rozwoju przeprogramowanie genomu zachodzi w określonych warunkach środowiskowych i komórkowych i w określonym, stosunkowo długim, czasie. Natomiast w rekonstruowanych zarodkach przeprogramowanie genomu komórki somatycznej zachodzi w zupełnie odmiennym środowisku i w bardzo krótkim czasie, obejmującym okres od transplantacji jądra somatycznego do momentu, w którym aktywność transkrypcyjna (EGA, *embryonic genome activation*) zrekonstruowanego jądra somatycznego staje się niezbędna dla rozwoju zarodkowego. Jest to, zdaniem niektórych autorów, prawdopodobnie jedną z głównych przyczyn zaburzeń w przeprogramowaniu genomu komórek somatycznych, których cykl komórkowy jest na dodatek znacznie dłuższy niż cykl komórek zarodkowych. Krótki czas przeprogramowania genomu jąder somatycznych dotyczyć może jednak tylko myszy, gdyż u innych gatunków, m.in. przeżuwaczy, moment EGA jest znacznie późniejszy (mysz – wczesny zarodek 2-komórkowy vs zarodki 8-16-komórkowe królika i przeżuwaczy). Stosunkowo wysoka, w porównaniu do myszy, efektywność klonowania somatycznego przeżuwaczy byłaby zatem zgodna z sugestiami innych autorów, że przeprogramowanie genomu komórek somatycznych nie jest zjawiskiem jednorazowym, lecz ciągiem przemian zachodzących w czasie kolejnych podziałów bruzdkowania. Hipoteza ta nie jest bezzasadna, świadczą o tym dodatkowo wyniki uzyskane po reklonowaniu zarodków otrzymanych w następstwie klonowania somatycznego. Choć fragmentaryczne, są one w wielu przypadkach lepsze, niż wyniki bezpośredniego klonowania somatycznego. W niektórych przypadkach, tylko procedura reklonowania umożliwiła uzyskanie sklonowanych zwierząt (9,17). Sądzić można, że dodatkowa runda przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC, *premature chromosome condensation*), której podlegają jądra somatyczne w następstwie reklonowania, sprzyjać może prawidłowemu procesowi ich przeprogramowania.

Wspomniano już, że wiele rekonstruowanych zarodków obumiera w różnych etapach rozwoju na skutek nieprawidłowego lub niepełnego przeprogramowania jąder somatycznych. Interesujące jest jednak to, że w znakomitej większości sklonowanych zarodków żeńskich proces inaktywacji chromosomu X jest wiernie zrekapitulowany; w zarodkach tych – podobnie jak w zarodkach rozwijających się w wyniku zapłodnienia – inaktywacja chromosomu X jest przypadkowa w komórkach będących pochodnymi epiblastu, zaś w trofoektodermie preferencyjnie inaktywowany jest chromosom X pochodzenia ojcowskiego. Zagadnienia związane z epigenetycznym przeprogramowaniem jąder komórek zarodkowych i somatycznych omówione są szerzej w pracach Rideouta III i wsp. (18) oraz Reika i wsp. (19).

3. Potencje komórek somatycznych

„(...) *that is the question*”, czy potencje jąder komórek somatycznych rozciągają się również na komórki somatyczne *per se*. W badaniach prowadzonych przez Nagia i wsp. (20), Modlińskiego i wsp. (21,23) oraz Amano i wsp. (22) wykazano, że stosując metody: a) agregacji pierwotnych komórek zarodkowych (PKZ) myszy z nośnikowymi blastomerami tetraploidalnymi (20), b) mikrochirurgicznego zastępowania węzła zarodkowego (ICM, *inner cell mass*) tymi komórkami (21), c) wprowadzania PKZ do blastocyst traktowanych krótkim, ostrym szokiem termicznym (22), czy wreszcie d) wprowadzania PKZ do zarodków pozbawionych ICM w wyniku długotrwałego traktowania zarodków 2-, 4-, i 8-komórkowych łagodnym szokiem termicznym (23) można uzyskać myszy wywodzące się całkowicie z pierwotnych komórek zarodkowych. Pierwotne komórki zarodkowe są zatem, obok komórek zarodkowych, jedynymi znanymi – jak na razie – komórkami totipotentnymi. Należy jednak pamiętać, że wywodząc się bezpośrednio z węzła zarodkowego, są one niezróżnicowanymi komórkami pochodzenia zarodkowego. Potencje pierwotnych komórek zarodkowych, jak również zbliżonych do nich (pod pewnymi względami) komórek raka zarodkowego omówione zostały szczegółowo w rozdziale „Linie komórek zarodkowych zwierząt w badaniach rozwoju”, zawartym w tomie *Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego* (24).

Czy komórki somatyczne, a przynajmniej pewne z nich, mogą mieć charakter komórek pluri-, i totipotentnych? Przedmiotem szczególnego zainteresowania stały się, w pierwszym rzędzie, komórki macierzyste dorosłych tkanek, zwłaszcza po opracowaniu metod ich izolacji i zagęszczania. Komórki macierzyste tkanek występują wśród komórek tkanek, biorąc udział w procesach ich odnawiania. W ostatnich latach stwierdzono, że komórki macierzyste tkanek – po ich przeszczepieniu do biorców, lub też w układzie *in vitro* – różnicować się mogą nie tylko w tkankę, z której pochodzą, ale także w inne tkanki. Co więcej, nawet w tkanki pochodzące z innego listka zarodkowego. Proces ten, polegający na zmianie kierunku różnicowania, określane jest mianem transdyferencjacji. Wykazano, że:

- u myszy komórki macierzyste krwi (mezoderma) różnicować się mogą w komórki nerwowe (ektoderma), hepatocyty (endoderma) i komórki mięśniowe, komórki macierzyste mięśni w komórki krwi, zaś macierzyste komórki nerwowe (ektoderma) w pochodzące z mezodermy komórki krwi i mięśni, w hepatocyty (endoderma) oraz w komórki jelita (głównie endoderma);

- u szczura i człowieka macierzyste komórki ze zrzębu szpiku (mezenchyma-mezoderma) przekształcać się mogą w komórki nerwowe (ektoderma);

- u człowieka komórki macierzyste krwi różnicować się mogą w hepatocyty.

Dokładniejsze omówienie możliwości transdyferencjacji komórek macierzystych tkanek zawarte jest w artykule Karasiewicz i Modlińskiego (25). W nowszych danych wskazuje się, że ze szpiku kostnego człowieka, szczura i myszy wyizolowano komórki macierzyste, które mogą przekształcić się w każdy rodzaj komórek. Komórki

te nazwano dorosłymi multipotentnymi komórkami *progenitorowymi* (*multipotent adult progenitor cells*; MAP cells). Jeśli informacja ta się potwierdzi, to komórki MAP będą jednymi z najważniejszych komórek, jakie do tej pory odkryto. Potwierdzono (26) – przez wprowadzenie pojedynczych komórek MAP do blastocyst myszy – że uczestniczyły one w tworzeniu większości tkanek pochodzących ze wszystkich listków zarodkowych.

W porównaniu z potencjami komórek macierzystych tkanek, możliwości transdiferencjacji zróżnicowanych komórek somatycznych są, jak się wydaje, bardzo ograniczone. Możliwości takie stwierdzono, jak na razie, u płazów i ptaków, zaś u ssaków jedynie w przypadku komórek nabłonka siatkówki oraz komórek β (B) wysp trzustkowych.

Należy również pamiętać, że niektóre zróżnicowane komórki somatyczne ulegać mogą procesom odróżnicowania. Dotyczy to, między innymi, fibrocytów, które – w procesie gojenia się ran – przekształcać się mogą z powrotem w fibroblasty.

Przeszczepianie komórek macierzystych tkanek do biorców (nawet w okresie płodowym) nie daje jednak pełnej odpowiedzi odnośnie do ich potencji rozwojowych. Na przykład, transplantacja macierzystych komórek krwi (HSCs, *hematopoietic stem cells*) pochodzących z płodowej wątroby do dorosłych biorców powoduje w tych komórkach zmianę ekspresji genu globiny z typu zarodkowego na typ dorosły, a także przekształcenie tych komórek w erytrocyty charakterystyczne dla dorosłych zwierząt. Świadczyłyby to, z jednej strony, o plastyczności tych komórek, z drugiej zaś o tym, że środowisko dorosłego organizmu jest w stanie kontrolować procesy różnicowania płodowych macierzystych komórek krwi. Z kolei jednak HSCs pochodzące ze szpiku kostnego dorosłych osobników nie są w stanie, po ich przeszczepieniu do grasicy płodowej, utworzyć płodowych komórek typu T. Powodem tego mogą być zarówno rzeczywiste różnice w potencjach rozwojowych pomiędzy macierzystymi komórkami krwi pochodzących z wątroby płodowej, a komórkami pochodzącymi ze szpiku dorosłych zwierząt, jak i zmiany (być może nieodwracalne), jakim podlegają HSCs (oraz być może również inne komórki somatyczne) podczas ich dojrzewania i różnicowania w czasie ontogenezy. Rzeczywisty charakter tych zmian określić można jedynie poddając te komórki tej samej sekwencji interakcji międzykomórkowych, jakie mają miejsce w ontogenezie, a zatem wprowadzając je do wczesnych zarodków. Idealnym modelem doświadczalnym do tego rodzaju badań są zarodki i zwierzęta chimerowe, które od czasu uzyskania przez Tarkowskiego w 1961 r. (27) pierwszych chimerowych myszy, stały się potężnym narzędziem badawczym i analitycznym, zwłaszcza w dziedzinie biologii rozwoju. W większości prowadzonych do tej pory badań, zarodki chimerowe tworzone były poprzez agregację dwóch (lub więcej) zarodków lub też poprzez agregację z zarodkami (lub wprowadzenie do jamy blastocysty) różnego rodzaju komórek pochodzenia zarodkowego (komórki węzła zarodkowego, pierwotne komórki zarodkowe, komórki raka zarodkowego). Potencje rozwojowe dwóch ostatnich rodzajów komórek w układach chimerowych omówione zostały szczegółowo przez Karasiewicz i Mo-

dlińskiego (24). Podobne doświadczenia, w odniesieniu do komórek macierzystych pochodzących z dorosłych tkanek przeprowadzili ostatnio Geiger i wsp. (28) i Clarke i wsp. (29). Geiger i wsp. (28) wprowadzali do blastocyst HSCs pochodzące ze szpiku dorosłych transgenicznych myszy, zawierających cały *locus* ludzkiego genu β -globiny. W przeprowadzanej analizie tkanek krwiotwórczych chimerowych płodów wykazano w potomstwie „dorosłych” HSCs zarodkowy i płodowy wzorzec transkrypcji genów. Dowodzi to, że HSCs pochodzące z dorosłych tkanek zachowują większą niż dotychczas sądzono (patrz wyżej) plastyczność rozwojową oraz, że warunki środowiska zarodkowego dominują nad stadium rozwojowym wprowadzonych doń HSCs. Również w odniesieniu do macierzystych komórek nerwowych sądzono powszechnie, do tej pory, że ich potencje rozwojowe ograniczone są jedynie do tworzenia komórek nerwowych. Clarke i wsp. (29) wprowadzali do blastocyst myszy i jamy owodni zarodka kury macierzyste komórki nerwowe pochodzące z mózgów dorosłych, transgenicznych myszy (ROSA26) wykazujących ekspresję β -galaktozydazy, co pozwalało na łatwą identyfikację komórek potomnych. Komórki te hodowane były *in vitro* i wprowadzane w postaci tzw. neurosfer, czyli tworzących się w warunkach hodowli *in vitro* agregatów macierzystych komórek nerwowych. Okazało się, że potomstwo macierzystych komórek nerwowych myszy zasiedlać może pochodne wszystkich trzech listków zarodkowych. W chimerowych zarodkach kury chimerizm wykryto w kilkunastu tkankach, zaś jego największą częstotliwość stwierdzono, obok rdzenia kręgowego i naskórka (ektoderma), w strunie grzbietowej i mezenchymie przednercza (mezoderma) oraz w nabłonku jelita i wątrobie (endoderma). Występowanie chimeryzmu potwierdzono również w płodach mysich. Obserwacje te, w połączeniu z innymi danymi dotyczącymi transdyferencyjnych możliwości różnych rodzajów komórek macierzystych dorosłych tkanek, pozwalają na postawienie hipotezy, że – być może – ich charakter jest bardziej do siebie zbliżony niż dotychczas sądzono, a także, iż ich potencje rozwojowe są pod pewnymi względami podobne do potencji rozwojowych pierwotnych komórek zarodkowych.

Do tej pory nie próbowano analizować potencji rozwojowych zróżnicowanych komórek somatycznych w potencjalnie chimerowych płodach i zwierzętach, które powstać by mogły po wprowadzeniu tych komórek do wczesnych zarodków. Nie ma zatem informacji dotyczących plastyczności rozwojowej tych komórek pod wpływem środowiska zarodkowego. Pierwszą tego typu próbą są podjęte przez nas badania polegające na wprowadzaniu fibroblastów płodowych myszy do zarodków 8-komórkowych. Stwierdzono, że wprowadzone do zarodków fibroblasty ulegają podziałom i część z nich lokuje się w węzle zarodkowym chimerowych blastocyst. Dalsze badania wykażą, czy potomstwo wprowadzonych fibroblastów kolonizować może również tkanki płodowe. Należy dodać, że ewentualne uzyskanie chimer płciowych byłoby pierwszym przypadkiem dokumentującym możliwość przekształcenia się komórek somatycznych w komórki płciowe.

4. Wnioski

W dokonanej analizie wyników doświadczeń polegających na klonowaniu somatycznym ssaków sugeruje się, że być może istnieje grupa komórek, których jądra mają większe od innych potencje rozwojowe. Byłyby to komórki o określonym pochodzeniu zarodkowym, mianowicie te rozwijające się z mezenchymy i mezodermy. Do wyjaśnienia pozostaje, czy komórki somatyczne umożliwiające klonowanie są komórkami terminalnie zróżnicowanymi, czy może zróżnicowanymi nie w pełni albo komórkami macierzystymi.

Ujawnieniu potencji rozwojowych jąder komórek somatycznych wprowadzonych do wyjądrzonych oocytów sprzyja faza spoczynkowa (G0) cyklu komórkowego. Główną natomiast przeszkodą w ujawnianiu potencji tych jąder są trudności ich przeprogramowania przed rozpoczęciem transkrypcji zarodkowej, polegające być może na nieprawidłowym i niedostatecznie szybkim zmywaniu wniesionych epigenetycznych modyfikacji genomu.

Plastyczność rozwojową całych komórek, a nie tylko ich jąder, ujawniono doświadczalnie w stosunku do szczególnych komórek somatycznych, jakimi są komórki macierzyste. Komórki macierzyste odnawiające tkankę, z której się wywodzą mogą podlegać transdyferencjacji, tzn. w nietypowych warunkach różnicować się w komórki innej tkanki, a w chimerach z wczesnymi zarodkami – nawet w wiele typów różnych tkanek.

Literatura

1. Wilmut I., Schnieke A., McWhir J., Campbell K. H. S., (1997), *Nature*, 385, 810-813.
2. Wakayama T., Perry A. C. F., Zucotti M., Johnson K. R., Yanagimachi R., (1998), *Nature*, 57, 369-374.
3. Modliński J. A., Karasiewicz J., (2002), *Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego*, red. Krzanowska H., Sokół-Misiak W., PWN, Warszawa, 346-404.
4. Kato Y., Tani T., Tsunoda Y., (2000), *J. Reprod. Fert.*, 120, 231-237.
5. Wakayama Y., Yanagimachi R., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 58, 376-383.
6. Modliński J. A., Karasiewicz J., (2001), *Zesz. Nauk. Przeg. Hod.*, 56, 17-26.
7. Modliński J. A., Karasiewicz J., (2001), *Post. Biol. Kom.*, 28 (Supl.18), 157-176.
8. Ogura A., Inoue K., Ogonuki N., Noguchi T., Takano K., Nagano R., Suzuki O., Lee J., Ishino F., Matsuda J., (2000), *Biol. Reprod.*, 62, 1579-1584.
9. Galli C., Duchi R., Moor R. M., Lazzari G., (1999), *Cloning*, 1(3), 161-170.
10. Kishi M., Itakagi T., Takakura R., Imamura M., Sudo T., Yoshinari M., Tanimoto M., Yasue H., Kashima N., (2000), *Theriogenology*, 54, 675-684.
11. Finch L. B. M., (1996), *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 369.
12. Campbell K. H. S., McWhir J., Ritchie W. A., Wilmut I., (1996), *Nature*, 380, 64-66.
13. Schnieke A., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. S., (1997), *Science*, 278, 2130-2133.
14. Peura T. T., (2001), *Theriogenology*, 55, 285.
15. Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hamada H., Perry A. C. F., (2000), *Science*, 289, 1188.
16. Modliński J. A., Bochenek M., Smorąg Z., Reed M. A., Karasiewicz J., (1998), *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 16(Suppl.1), 17-22.

17. Polejaeva I. A., Chen S-H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Ball S., Boone J., Walker S., Ayares D. L., Colman A., Campbell K. H. S., (2000), *Nature*, 406, 505-508.
18. Rideout III W. M., Eggan K., Jaenisch R., (2000), *Science*, 293, 1093-1098.
19. Reik W., Dean W., Walter J., (2000), *Science*, 293, 1089-1093.
20. Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Ivanyi E., Markulla P., Rossant J., (1990), *Development*, 110, 815-821.
21. Modliński J. A., Reed M. A., Wagner T. E., Karasiewicz J., (1996), *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 437-446.
22. Amano T., Nakamura K., Tani T., Tsunoda Y., (2000), *Theriogenology*, 53, 1449-1458.
23. Modliński J. A., Górniewska, M., Modlińska M. K., Reed M. A., Wagner T. E., Karasiewicz J., (2003), *Theriogenology* (w druku).
24. Karasiewicz J., Modliński J. A., (2002), *Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego*, red. Krzanowska H., Sokół-Misiak W., PWN, Warszawa (w druku).
25. Karasiewicz J., Modliński J. A., (2001), *Post. Biol. Kom.*, 28(2), 219-242.
26. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., LargaEspada D.A., Verfaillie C.M., (2002), *Nature*, 418, 41-49.
27. Tarkowski A. K., (1961), *Nature*, 190, 857.
28. Geiger H., Sick S., Bonifer C., Mueller A. M., (1998), *Cell*, 93, 1055-1065.
29. Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Kalstrom H., Lendahlk U., Friesen J., (2000), *Science*, 288, 1660-1663.