

ZARODKOWE KOMÓRKI MACIERZyste – W POSZUKIWANIU PLURIPOTENCJI*

EMBRYONIC STEM CELLS – SEARCHING FOR THE PLURIPOTENCY

Maria A. CIEMERYCH

Zakład Cytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: W 2007 roku Nagroda Nobla w dziedzinie Fizjologii i Medycyny przyznana została Martinowi Evansowi, Mario Cappecciemu oraz Olivierowi Smithiesowi. Martin Evans został uhonorowany za izolowanie pluripotentnych mysich zarodkowych komórek macierzystych (komórek ES), dwaj pozostali badacze za opracowanie metod genetycznej modyfikacji tych komórek. Tutaj przedstawiono historię uzyskania zarodkowych komórek macierzystych, metody wywoływania ich ukierunkowanego różnicowania *in vivo* oraz *in vitro*, a także wybrane problemy związane z potencjalnym zastosowaniem tych komórek w terapii. Omówione zostały także techniki wykorzystywane do modyfikacji genetycznej komórek ES oraz najnowsze osiągnięcia naukowe, dzięki którym możliwe jest uzyskiwanie pluripotentnych komórek nie tylko z zarodków na wczesnych etapach rozwoju, ale także z komórek somatycznych.

Słowa kluczowe: zarodkowe komórki macierzyste, pluripotencja, myszy *knock-out*, różnicowanie, potworniak.

Summary: In 2007 Martin Evans, Mario Cappecci and Olivier Smithies were granted Nobel Prize in Physiology in Medicine. Martin Evans was the first who isolated mouse pluripotent embryonic stem cells (ES cells). Cappecci and Smithies received the prize for the discovery of the methods allowing efficient genetic modification of ES cells. The current review briefly summarizes the history of ES cells, methods of their *in vivo* and *in vitro* differentiation and selected issues of their potential application in the therapy. It also focuses on the techniques of genetic modification of ES cells and studies devoted to the derivation of pluripotent stem cells from other than embryonic sources.

Key words: embryonic stem cells, pluripotency, knock-out mice, differentiation, teratoma.

WSTĘP

W 2007 roku Nagroda Nobla w dziedzinie Fizjologii i Medycyny została przyznana trzem badaczom. Martin Evans otrzymał ją za uzyskanie linii zarodkowych komórek macierzystych – komórek ES (ang. *Embryonic Stem*). Mario Cappecci i Olivier Smithies

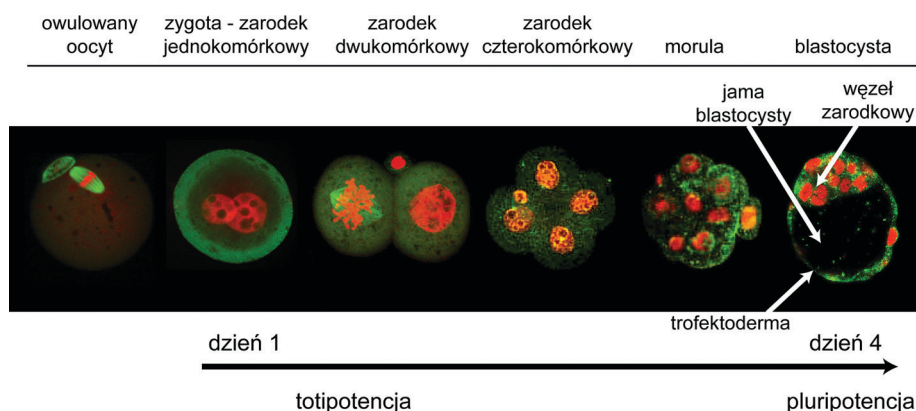
*Wykład wygłoszony 13 grudnia 2007 roku podczas sesji Towarzystwa Naukowego Warszawskiego poświęconej Nagrodzie Nobla w dziedzinie Fizjologii i Medycyny przyznanej w 2007 roku. Artykuł powstał podczas realizacji projektu badawczego finansowanego ze środków na naukę MNiSW nr N N301 4051 33.

zostali uhonorowani za opracowanie techniki, która umożliwiła modyfikacje genetyczne komórek ES [37]. Uzyskane przez Evansa zarodkowe komórki macierzyste są powszechnie uważane za komórki, z których można uzyskać wszystkie tkanki budujące organizm. Gdyby tak było, komórki te mogłyby nosić miano komórek totipotentnych. Istnieją jednak wątpliwości, czy komórki te mogą różnicować w tkanki pozazarodkowe, takie jak błony płodowe czy łożysko. Wątpliwości te sprawiają, że zarodkowe komórki macierzyste określa się raczej mianem komórek pluripotentnych [57]. Jak doszło do uzyskania tych komórek? Zaczniemy więc *ab ovo*, czyli od jaja, a dokładniej od oocyty.

1. OD OOCYTU DO POTWORNIAKA

Oocyt ssaka ulega owulacji z jajnika do jajowodu, tam może zostać zapłodniony przez plemnik i przekształcić się w jednokomórkowy zarodek – zygotę. Z zygoty, w wyniku następujących po sobie podziałów bruzdkowania, powstaje wielokomórkowa morula (16–32 komórek), a następnie zdolna do zagnieżdżenia się w błonie śluzowej macicy (implantacji) blastocysta (ryc. 1). Blastomery, czyli komórki budujące zarodek w początkowych stadiach rozwoju są totipotentne, zatem mogą z nich powstać wszystkie tkanki i narządy rozwijającego się zarodka, łącznie z tkankami pozazarodkowymi. Różnicowanie blastomerów, jak i towarzyszące temu procesowi ograniczanie potencji rozwojowych niektórych z nich zachodzi po raz pierwszy w stadium moruli, w okresie poprzedzającym powstanie blastocysty. Jednak dopiero w stadium blastocysty efekty różnicowania są wyraźnie widoczne – zarodek zbudowany jest wtedy z dwóch rodzajów komórek, które można odróżnić na podstawie ich morfologii. Zewnętrzna warstwa płaskich komórek otaczających cały zarodek to nabłonek trofektodermalny (trofektoderma lub trofoblast) – z niego powstaną tkanki pozazarodkowe – część błon płodowych i zarodkowa część łożyska. Natomiast grudka komórek zlokalizowanych wewnątrz blastocysty, na jednym z jej biegunów to węzeł zarodkowy. I właśnie te komórki są pluripotentne. W wyniku ich różnicowania, podczas kolejnych etapów rozwoju, powstaną pierwsze tkanki – multipotentne listki zarodkowe: ektoderma, endoderma i mezoderma oraz pierwotne komórki płciowe. Następnie listki zarodkowe dadzą początek swoistym tkankowo komórkom macierzystym, a te z kolei komórkom prekursorowym tkanek i narządów. Procesowi różnicowania towarzyszy więc utrata totipotencji, a jedynie węzeł zarodkowy blastocysty zawiera komórki pluripotentne (ryc. 1). Z tych pluripotentnych komórek uzyskano pierwsze linie zarodkowych komórek macierzystych.

Historia badań, które doprowadziły do uzyskania komórek ES, rozpoczęła się w latach pięćdziesiątych XX wieku. W 1954 roku, Stevens i Little opisali guzy rozwijające się w jądrach samców myszy szczepu 129, zwane potworniakami lub teratomami (od gr. *teras* – potwór), które zbudowane były z wielu rodzajów tkanek m.in. nabłonków, mięśni czy chrząstki. W 1974 roku Stevens i Varnum po raz pierwszy opisali rozwój potworniaków jajnikowych u samic szczepu myszy LT/Sv. Analiza histologiczna tych guzów wykazała obecność wielu zróżnicowanych typów komórek. Badania początkowych stadiów rozwoju potworniaków udowodniły, że powstają one z komórek



RYCINA 1. Rozwój przedimplantacyjny zarodka myszy. Oocyt zablokowany w stadium metafazy II podziału meiotycznego owulowany jest do jajowodu, gdzie po zapłodnieniu zachodzą pierwsze etapy rozwoju zarodka. Zarówno jednokomórkowy zarodek (zygota), jak i komórki (blastomery) zarodków dwu- i czterokomórkowych są totipotencjne. Aż do stadium moruli blastomery nie różnią się od siebie morfologią. W blastocystie można już wyróżnić dwa typy komórek – pluripotencjne komórki węzła zarodkowego, z których powstaną trzy listki zarodkowe: ekto-, endo- i mezoderma oraz komórki trofektodermi (trofoblastu), z których powstaną tkanki pozazarodkowe (jądra komórkowe – czerwone, mikrotubule – zielone)

rozrodczych. Cechą charakterystyczną myszy szczepu LT/Sv są zaburzenia oogenezy, które przejawiają się między innymi dużym odsetkiem oocytów nieulegających owulacji z jajnika do jajowodu. Pozostające w jajniku oocyty ulegają natomiast spontanicznej aktywacji, a początkowe stadia rozwoju powstałych w ten sposób zarodków partenogenetycznych przebiegają podobnie jak rozwój zarodków powstałych w wyniku zapłodnienia oocytów owulowanych. Stevens i Varnum, analizując preparaty histologiczne uzyskane z jajników myszy LT/Sv, zaobserwowali w nich zarodki dwu- i czterokomórkowe. Wykazali także, że zarodki te mogły osiągać stadium blastocysty, jednak kolejne etapy rozwoju przebiegały nieprawidłowo i prowadziły do rozwoju potworniaków. Potworniaki powstawały więc z komórek o bardzo dużej potencji rozwojowej – komórek rozrodczych (spermatogonia myszy szczepu 129) lub bruzdkujących zarodków partenogenetycznych (aktywowane oocyty myszy szczepu LT/Sv). Równocześnie prowadzono badania, które wykazały, że do powstania potworniaków prowadziło również przeszczepienie w miejsca pozamaciczne (np. pod torebkę nerkową lub jądro) bruzdkujących lub nawet gastrulujących normalnych zarodków myszy, a także zawiązków gonad [62]. Zatem można było stwierdzić, że różnego rodzaju tkanki mogą powstawać w miejscach pozamacicznych w wyniku podziałów komórek toti- lub pluripotencjnych. Obserwacje te zostały wykorzystane przez Gail Martin i Martina Evansa. W 1974 opublikowali oni wyniki doświadczeń, w których z będących w początkowych stadiach formowania się potworniaków otrzymali kilka linii komórek określonych jako komórki raka zarodkowego – ECC (ang. *Embryonic Carcinoma Cells*). Chociaż poszczególne linie ECC różniły się od siebie morfologią, to

jednak wszystkie badane komórki były w stanie intensywnie i nieprzerwanie proliferować. Co niezwykle istotne, były one w stanie różnicować w wiele rodzajów tkanek. Ich zdecydowanie negatywną cechą był natomiast niestabilny kariotyp. Uzyskanie linii komórek z potworników stanowiło istotny etap badań, które doprowadziły do uzyskania zarodkowych komórek macierzystych.

2. POCZĄTKI ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

W 1975 roku Michael Sherman opublikował w *Cell* pracę podsumowującą ówczesną wiedzę na temat warunków hodowli *in vitro* zarodków różnych gatunków ssaków oraz próby uzyskiwania z nich linii komórkowych. Jednak żadna z opisanych przez niego prób nie doprowadziła do opracowania metody gwarantującej rutynowe uzyskiwanie linii komórek zarodkowych, charakteryzujących się takimi cechami, jak zdolność do nieograniczonych podziałów czy różnicowania. Dopiero w 1981 roku Martin Evans i Matthew Kaufman oraz niezależnie od nich Gail Martin opublikowali prace opisujące uzyskanie linii mysich pluripotentnych komórek zarodkowych [16, 38]. Sukces Evansa i Kaufmana możliwy był dzięki spełnieniu trzech warunków: i) zarodki, z których wyprowadzano linię komórek znajdowały się w odpowiednim stadium rozwoju – obecne w nich były komórki pluripotenne; ii) uzyskano odpowiednio dużą liczbę komórek z jednego zarodka; iii) środowisko, w którym prowadzono hodowlę sprzyjało podziałom komórkowym, a hamowało różnicowanie.

Doboru stadium rozwojowego optymalnego dla uzyskania komórek ES dokonano porównując wzór syntezy białek zachodzącej w komórkach raka zarodkowego oraz zarodkach myszy na różnych stadiach rozwoju okołoinplantacyjnego. Takie porównanie wykazało, że ECC i gastrulujące zarodki myszy charakteryzował podobny wzór syntezy białek. Ponieważ zarodki we wczesnych etapach gastrulacji były stosunkowo trudne do wyizolowania, zdecydowano się na uzyskanie blastocyst, a następnie ich kilkudniową hodowlę *in vitro*, co zapewniało uzyskanie większej liczby komórek. Zabieg ten miał także zapewnić osiągnięcie przez hodowane zarodki stadium rozwoju odpowiadające okresowi gastrulacji. Podczas hodowli *in vitro* węzły zarodkowe blastocyst rozrastały się, ale ich komórki zachowywały nie zróżnicowany charakter. Enzymatyczna dezagregacja takich węzłów, a następnie kilkukrotne pasażowanie otrzymanych komórek doprowadziły do uzyskania linii komórek, które w odpowiednich warunkach pozostawały nie zróżnicowane. Komórki te charakteryzował również stabilny kariotyp, ekspresja markerów komórek zarodkowych oraz zdolność do różnicowania w wiele tkanek. Gail Martin, prowadząca badania niezależnie od Evansa, zastosowała pożywkę, w której uprzednio hodowane były komórki raka zarodkowego. W ten sposób zapewnione zostało środowisko stymulujące podziały komórkowe, a jednocześnie blokujące różnicowanie. Ponadto Martin hodowała węzły zarodkowe blastocyst na warstwie odżywczej inaktywowanych fibroblastów. Zastosowana przez nią technika inaktywacji fibroblastów nie odbiegała od tej stosowanej współcześnie – komórki poddawane były działaniu mitomycyny C, która powoduje uszkodzenia DNA komórek, co uniemożliwia ich

proliferaację. Takie niedzielące się fibroblasty stanowią bardzo dobre podłoże dla hodowli zarodkowych komórek macierzystych [7, 43]. W ciągu ostatnich kilku lat wykazano, że możliwe jest uzyskanie linii komórek ES nie tylko z węzłów zarodkowych blastocysty, ale także z pojedynczych blastomerów izolowanych z zarodków we wcześniejszych stadiach rozwojowych (np. morula), czy nawet z zarodków jednokomórkowych [12, 29, 30, 75].

W 1998 roku opublikowano dwa pierwsze doniesienia opisujące otrzymanie ludzkich zarodkowych komórek macierzystych. Komórki te otrzymano dwoma różnymi sposobami. Thomson i współpracownicy uzyskali je z blastocyst, czyli w sposób podobny do zastosowanego w przypadku mysich linii komórkowych [70]. Natomiast Shambloott i współpracownicy opisali izolację i hodowlę *in vitro* ludzkich pierwotnych komórek płciowych, z których następnie wyprowadzano linię komórek ES [67]. Pierwotne komórki płciowe izolowano z zawiązków gonad 5–9-tygodniowych płodów poddanych aborcji z przyczyn medycznych. Obecnie ludzkie komórki ES można uzyskać z pojedynczego blastomeru, a jego mikromanipulacyjne pobranie nie prowadzi do zniszczenia zarodka [11]. Bez względu na sposób uzyskania, ludzkie zarodkowe komórki macierzyste miały normalny kariotyp, nieulegający zmianom podczas wielokrotnego pasażowania i hodowli *in vitro* [61, 70]. Syntetyzowały one także telomerazę oraz markery charakterystyczne dla komórek pluripotentnych, między innymi należące do rodziny białek powierzchniowych SSEA (ang. *Stage Specific Embryonic Antigen*). Podobnie jak mysie, także i ludzkie komórki ES charakteryzowała wysoka aktywność fosfatazy zasadowej – enzymu, który jest również markerem pierwotnych komórek płciowych [3, 20].

Do dnia dzisiejszego otrzymano około 100 linii ludzkich komórek macierzystych. W 2007 roku, w amerykańskim Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH) zarejestrowanych było 78 takich linii. Jednak dostępnych do badań jest jedynie 21 linii komórek ES, o których wiadomo, że w długotrwałej, prowadzonej w odpowiednich warunkach hodowli *in vitro* zachowują stabilny kariotyp, zdolność do samoodnawiania oraz niezróżnicowany charakter.

3. JAK PRZETESTOWAĆ PLURIPOTENCJĘ KOMÓREK ES?

Z zarodków w różnych stadiach rozwojowych można uzyskać wiele typów linii komórkowych. Jednak nie wszystkie spełniają warunki niezbędne do uznania ich za zarodkowe komórki macierzyste. Głównym kryterium jest zdolność tworzenia wszystkich tkanek organizmu, a więc pluripotencja. Aby wykazać, czy dana linia komórkowa rzeczywiście ma takie zdolności, należy przeprowadzić odpowiednie testy.

3.1. Chimery

Najpełniejszy test, jakiemu mogą zostać poddane komórki ES, polega na stwierdzeniu, czy mogą one różnicować we wszystkie tkanki i budować wszystkie narządy organizmu. Najlepszą metodą, która umożliwia zweryfikowanie pluripotencji komórek ES, jest uzyskanie i analiza zwierząt chimerowych, czyli takich, w których funkcjonują komórki pochodzące od dwóch różnych osobników.

Pierwsze mysie chimery były dziełem Andrzeja K. Tarkowskiego i powstały 20 lat przed uzyskaniem mysich zarodkowych komórek macierzystych. Przeprowadzone przez Tarkowskiego doświadczenia polegały na agregacji dwóch, kilkukomórkowych zarodków myszy [68, 69]. Komórki tych zarodków ulegały przemieszaniu i w efekcie powstawał jeden chimerowy organizm. Obecnie zwierzęta chimerowe uzyskuje się zazwyczaj w inny sposób – nie poprzez agregację, ale poprzez mikromanipulacyjne wprowadzanie komórek ES do jamy blastocysty [67]. Doświadczenie planowane jest w taki sposób, aby ESy oraz blastocysty biorczynie pochodziły od zwierząt różniących się genami warunkującymi pigmentację. ESy wprowadzone do jamy blastocysty zasiedlają węzeł zarodkowy, a następnie, jeżeli są one pluripotenne, biorą udział w tworzeniu wszystkich tkanek. Oczywiście rozwój chimerowego zarodka może być kontynuowany jedynie wtedy, gdy zostanie on przeniesiony do dróg rodnych samicy biorczynie, tam ulegnie implantacji i przejdzie wszystkie etapy embriogenezy. Jeżeli sierść urodzonej myszy jest łaciata lub też dominuje kolor sierści myszy, z której zarodków uzyskano testowane komórki, można podejrzewać, że komórki te weszły w skład także innych tkanek i narządów. Stosując tę technikę wykazano niezbicie, że mysie zarodkowe komórki macierzyste są pluripotenne.

Uzyskiwanie zwierząt chimerowych stanowi istotny etap w badaniach, w których uzyskiwane są myszy zmodyfikowane genetycznie – *knock-out* (w polskim żargonie naukowym zwane myszami nokautowymi), czyli pozbawione wybranych przez naukowców funkcjonalnych genów. W ten sposób można też otrzymywać np. myszy typu *knock-in*, czyli takie, w których genomach wybrany gen zastąpiony został przez zmodyfikowaną kopię tego samego genu czy też nawet przez inny gen. Technika uzyskiwania zwierząt chimerowych została tak zmodyfikowana, że gwarantuje powstanie myszy zbudowanej wyłącznie z komórek ES. Możliwe jest to dzięki eksperymentalnemu otrzymywaniu zarodków tetraploidalnych (4N). Stosunkowo prosta metoda elektrofuzji komórek, wykorzystywana do dziś podczas tetraploidyzacji zarodków myszy, opracowana została w 1985 roku przez Kubiaka i Tarkowskiego [32]. Badacze ci przeprowadzili elektrofuzję blastomerów dwukomórkowego zarodka myszy. W efekcie uzyskali jednokomórkowy, tetraploidalny zarodek, który był w stanie przechodzić kolejne etapy bruzdkowania i osiągnąć stadium blastocysty. W takiej blastocystie można wyróżnić zarówno trofektodermę, jak i węzeł zarodkowy. Jednak tetraploidalne komórki węzła zarodkowego nie są w stanie normalnie proliferować. Zostało to udowodnione w 1991 roku, gdy Andras Nagy i jego współpracownicy, stosując opisaną powyżej technikę, wykazali, że komórki tetraploidalne wchodzą jedynie w skład tkanek pozazarodkowych (błon płodowych, łożyska) oraz że są one skutecznie eliminowane z ciała zarodka. A zatem jeśli komórki ES wprowadzimy do jamy tetraploidalnej blastocysty, to ciało rozwijającego się zarodka będzie zbudowane jedynie z komórek wywodzących się z ESów [14, 15, 60]. Metoda ta jest wprawdzie mniej wydajna niż klasyczny sposób tworzenia chimer, ale jest ona niezastąpiona, gdy na przykład uzyskane zarodki nokautowe umierają *in utero* z powodu nieprawidłowego funkcjonowania tkanek pozazarodkowych. W takiej sytuacji analiza fenotypu zmodyfikowanego genetycznie zwierzęcia możliwa byłaby jedynie wtedy, gdy tkanki pozazarodkowe funkcjonowałyby bez zarzutu. Wprowadzenie komórek ES pozbawionych obu alleli danego genu do

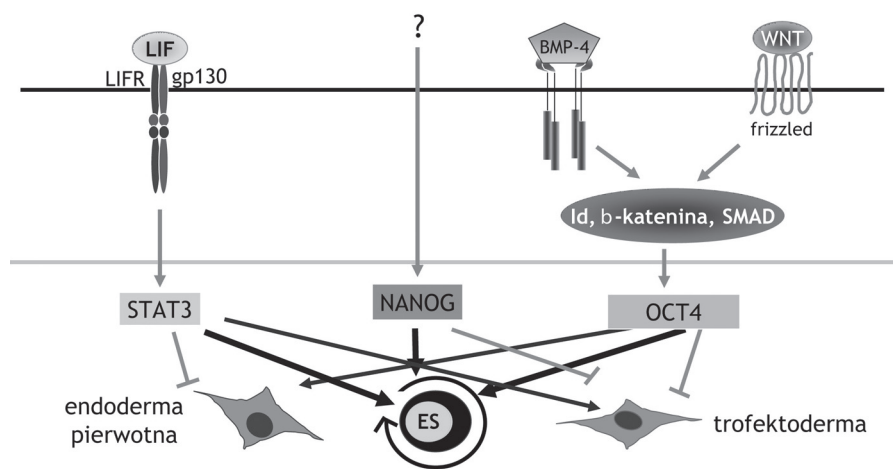
jamy blastocytu uzyskanej w wyniku tetraploidyzacji normalnych zarodków gwarantuje, że nie dojdzie do utworzenia zarodka chimerowego. Powstanie wtedy zarodek zbudowany wyłącznie z komórek ES, natomiast tkanki pozazarodkowe zbudowane będą z normalnie funkcjonujących komórek tetraploidalnych. Stosując tę tzw. „tetraploidalną komplementację” wykazano między innymi, że zarodki pozbawione genu supresorowego nowotworu retinoblastoma [78] czy też cyklin E1 i E2 [18] umierają *in utero* z powodu dysfunkcji łożyska. „Wymiana” nieprawidłowo funkcjonującego, „nokautowego” łożyska na łożysko tetraploidalne umożliwiła bardziej zaawansowany rozwój tych myszy. Opisana technika może być także używana do „przyspieszonego” uzyskiwania myszy zmodyfikowanych genetycznie [60].

3.2. Potworniaki

Uzyskiwanie zwierząt chimerowych to jedyny test dający gwarancję stwierdzenia, czy badane komórki są w stanie różnicować i tworzyć wszystkie rodzaje tkanek. Jednak mikromanipulacyjne wprowadzenie komórek do jamy blastocysty wymaga specjalistycznego i kosztownego sprzętu, doświadczenia w manipulowaniu zarodkami oraz dostępu do hodowli myszy. Ponadto test ten, z oczywistych względów, stosowany jest jedynie do określania pluripotencji komórek zwierzęcych. Możliwość badania zdolności do różnicowania komórek zarówno zwierzęcych, jak i ludzkich zapewnia inny rodzaj testu *in vivo* polegający na stwierdzeniu, czy badane komórki mogą tworzyć potworniaki. Jeżeli tak, to po wprowadzeniu tych komórek pod skórę myszy charakteryzujących się osłabioną odpowiedzią immunologiczną, np. SCID (ang. *Severe Combined ImmunoDeficient*) będą one tworzyć guz zbudowany z wielu rodzajów tkanek [19]. Zarówno mysie, jak i ludzkie komórki macierzyste z powodzeniem przechodzą tego rodzaju weryfikację, co udowadnia, że są one pluripotenne.

3.3. Kule zarodkowe i różnicowanie *in vitro*

Rozwój technik uzyskiwania i hodowli komórek i tkanek sprawił, że przebieg różnicowania komórek ES można śledzić *in vitro*. Testy *in vitro* mają wielką zaletę, gdyż mogą być stosowane zarówno w badaniach nad mysimi, jak i ludzkimi komórkami. Jeżeli zapewnione zostaną odpowiednie warunki hodowli, to komórki ES zachowują pluripotencję i zdolność do samoodnawiania. W przypadku mysich komórek niezbędna jest obecność czynnika przeciwbiałaczkowego LIF (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*) (ryc. 2). ESy stymulowane przez LIF przechodzą intensywne podziały i zachowują nieodróżniony charakter. Usunięcie LIF ze środowiska lub wprowadzenie innych, subtelnych modyfikacji warunków hodowli powoduje, że komórki macierzyste zaczynają tworzyć agregaty, tzw. kule zarodkowe (ang. *embryoid bodies*) [33]. Kolejność różnicowania komórek w kulach zarodkowych stanowi odzwierciedlenie procesów zachodzących w zarodku rozwijającym się *in vivo*. U myszy po implantacji blastocysty, rozrastający się węzeł zarodkowy tworzy tzw. cylinder zarodkowy, który początkowo zbudowany jest z ektodermy zarodkowej oraz znajdującej się na jej powierzchni endodermy pierwotnej. Podczas gastrulacji na tylnym biegunie zarodka dochodzi do powstania mezodermy, która wrasta pomiędzy ekto- i endodermę. Analiza morfologii



RYCINA 2. Główne szlaki przekazywania sygnałów warunkujące samoodnawianie się oraz zachowanie pluripotencji przez zarodkowe komórki macierzyste (ES) (schemat adaptowany za zgodą Macmillan Publishers Ltd: *Nature Rev Cell Biol* [4], copyright 2005)

nabłonków oraz ekspresji markerów charakterystycznych dla określonych listków zarodkowych wykazała, że także w kulach zarodkowych znajdująca się na zewnątrz endoderma pierwotna odseparowana jest warstwą komórek mezodermy od położonego wewnątrz nabłonka ektodermalnego. Degradując enzymatycznie kule zarodkowe, a następnie hodując uzyskane z nich komórki można doprowadzić do ich dalszego różnicowania. Warunkiem jest obecność czynników, które podczas rozwoju zarodkowego kontrolują powstawanie określonych tkanek [31, 34, 72]. Przykładowo, zastosowanie czynnika Noggin doprowadza do powstania komórek neuroektodermy, które syntetyzują białka charakterystyczne dla tej tkanki, takie jak np. N-CAM (ang. *Neural Cell Adhesion Molecule*) czy nestyna [21, 64]. Obecność czynnika BMP-4 (ang. *Bone Morphogenetic Protein-4*) powoduje różnicowanie mezodermy, której komórki syntetyzują takie czynniki, jak Brachyury czy Nodal [13, 77]. Dodanie do hodowli czynnika VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) doprowadza do powstania komórek hematopoetycznych [50], a pożywka bez surowicy wzbogacona w FGF2 (ang. *Fibroblast Growth Factor 2*) i inhibitory kinazy fosfatydylinozytolowej 3 powoduje powstanie komórek produkujących insulinę [13, 36, 77]. Możliwość różnicowania komórek ES *in vitro* ma szczególne znaczenie dla analizy mechanizmów molekularnych towarzyszących różnicowaniu komórek w czasie organogenezy u człowieka. W przeciwieństwie do procesów zachodzących w trakcie rozwoju zarodka myszy, różnicowanie tkanek ludzkich nie jest dostatecznie dobrze poznane. Pomimo że mysz stanowi bardzo dobry model wykorzystywany w badaniach rozwoju ssaków, to jednak istnieją dowody, że nie wszystkie procesy towarzyszące różnicowaniu są identycznie regulowane podczas embriogenezy myszy i człowieka.

4. JAK ZACHOWAĆ PLURIPOTENCJĘ?

Główne cechy zarodkowych komórek macierzystych to zdolność do samoodnawiania oraz utrzymania niezróżnicowanego charakteru. Hodując komórki ES można zapewnić warunki, które gwarantują zachowanie obu tych cech. Podczas rozwoju zarodkowego komórki węzła zarodkowego, z których potencjalnie można uzyskać linię komórek ES, zachowują zdolności przypisane komórkom macierzystym jedynie przez bardzo krótki okres. Ponieważ jeszcze przed implantacją dochodzi do ekspresji genów warunkujących różnicowanie tych komórek w endodermę pierwotną (np. genu GATA 4/6), a następnie tuż po implantacji dochodzi do indukcji mezodermi (synteza np. czynnika Brachury) – zarówno stan toti-, jak i pluripotencji komórek jest stanem przejściowym. Jedynie w komórkach budujących ektodermę zarodkową jeszcze w trakcie gastrulacji obserwowana jest synteza białek charakterystycznych dla totipotentnych komórek węzła zarodkowego, takich jak np. Oct-4. W kolejnych stadiach rozwoju synteza Oct-4 zostaje jednak ograniczona do pierwotnych komórek płciowych [47, 52]. Zachowanie pluripotencji wymaga warunków sprzyjających syntezie czynników umożliwiających samoodnawianie komórek oraz gwarantujących zachowanie ich pluripotentnego charakteru. Konieczne jest także zahamowanie ekspresji genów odpowiedzialnych za różnicowanie. Dotychczas scharakteryzowano wiele szlaków przekazywania sygnałów, których aktywacja zapewnia takie właśnie warunki. Wiadomo również, że istnieją różnice w regulacji tych procesów między mysimi i ludzkimi zarodkowymi komórkami macierzystymi [3, 20].

W przeciwieństwie do komórek ludzkich, aby mysie zarodkowe komórki macierzyste zachowały swój niezróżnicowany charakter, wymagana jest obecność czynnika LIF. Jego związanie z receptorem LIF (LIFR) prowadzi do powstania heterodimeru, w którego skład wchodzi, poza LIFR, również białko gp130 [39, 45] (ryc. 2). Oddziaływanie LIF z jego receptorem prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT3, który stymuluje procesy samoodnawiania komórek macierzystych oraz indukuje różnicowanie w trofektodermę. Jednocześnie STAT3 hamuje powstawanie endodermi pierwotnej. Kolejnym czynnikiem kluczowym dla utrzymania pluripotencji i dla samoodnawiania komórek macierzystych jest Nanog (w języku celtyckim słowo to oznacza krainę wiecznej młodości). Nanog blokuje różnicowanie komórek ES w trofektodermę [9, 10, 42]. Inne szlaki przekazywania sygnału, np. zależne od obecności czynników BMP-4 (ang. *bone morphogenetic protein 4*) czy WNT, oddziałując za pośrednictwem czynników Id (ang. *Inhibitor of differentiation*) czy SMAD, indukują syntezę czynnika transkrypcyjnego Oct-4 [34, 58, 79]. Oct-4 jest nie tylko klasycznym markerem komórek pluripotentnych, ale także indukuje powstawanie endodermi pierwotnej [51, 52] (ryc. 2). Utrzymanie pluripotencji zależy wobec tego od subtelnej równowagi między wieloma różnymi szlakami przekazywania sygnałów [9, 27, 28, 34, 55]. Zakłócenia aktywności tych szlaków, związane na przykład z brakiem LIF lub innych niezbędnych czynników wzrostu, prowadzi do różnicowania zarodkowych komórek macierzystych.

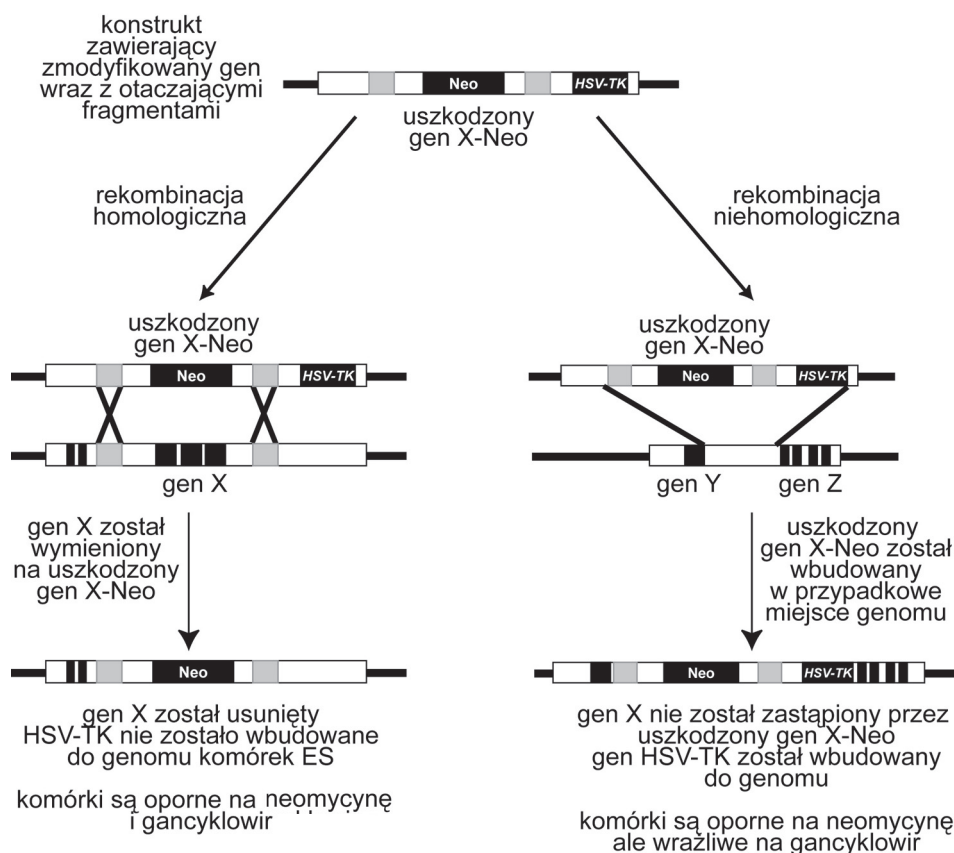
5. JAK WYKORZYSTAĆ ZARODKOWE KOMÓRKI MACIERZYSTY?

Wyjątkowe właściwości zarodkowych komórek macierzystych sprawiają, że są one niezwykle cennym materiałem zarówno do badań funkcji wybranych genów np. w zachowaniu pluripotencji, czy różnicowaniu, jak i doświadczeń mających na celu opracowanie metod leczenia chorób wynikających z zaburzeń funkcjonowania określonych tkanek.

5.1. Modyfikacje genetyczne komórek macierzystych – badanie funkcji genów

Badania prowadzone przez Cappecciego, które doprowadziły do opracowania metod modyfikacji genetycznej komórek ES, były rozwinięciem prac Axela. W 1977 roku wykazał on, że ssące komórki nieprodukujące kinazy tymidynowej mogą wykorzystywać wprowadzoną do nich kinazę wirusa *Herpes*. W 1980 roku Cappecci odkrył, że wydajność przeniesienia tego genu zwiększała się drastycznie, gdy został on wstrzyknięty mikropipetą do jądra komórki somatycznej. Jednak wprowadzane taką metodą DNA integruje się w genomie biorcy w sposób przypadkowy. Osiągnięciem Cappecciego i jego współpracowników, opublikowanym w 1986 roku, było opracowanie techniki gwarantującej precyzyjną wymianę wybranego genu. Badania prowadzone przez Olivera Smithiesa również koncentrowały się na wymianie zmutowanych genów na ich prawidłowo funkcjonujące odpowiedniki. Wyniki przeprowadzonych przez niego doświadczeń, w których locus kodujący beta-globinę został zmodyfikowany w wyniku homologicznej rekombinacji z udziałem odpowiednio skonstruowanego plazmidu, zostały opublikowane w 1985 roku w *Nature*. Zastosowanie technik opracowanych przez Cappecciego i Smithiesa do modyfikacji zarodkowych komórek macierzystych uzyskanych przez Martina Evansa umożliwiło uzyskiwanie myszy o precyzyjnie zmodyfikowanych określonych fragmentach genomu.

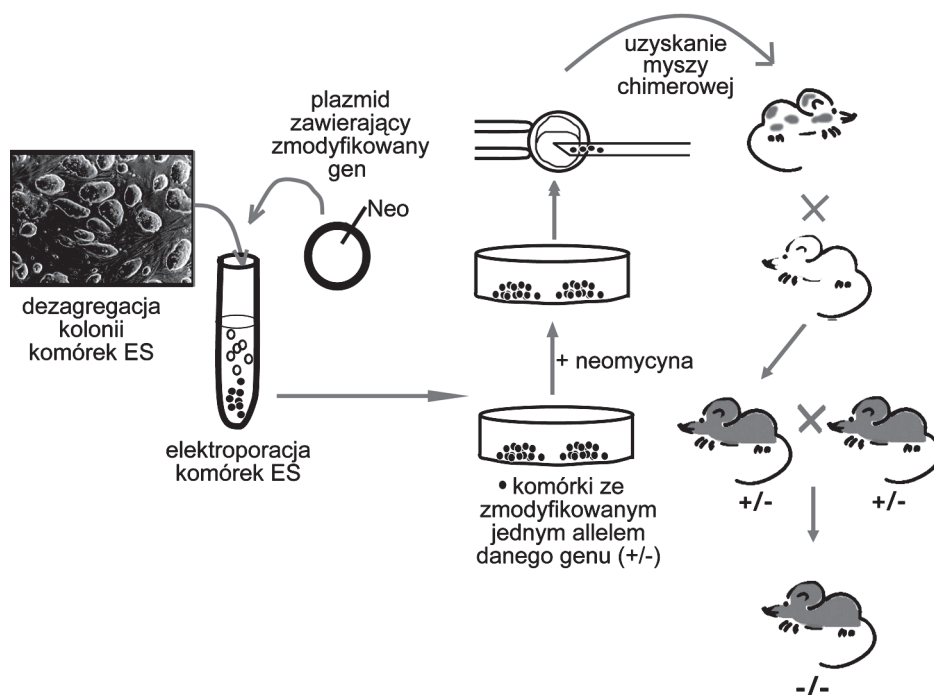
Aby uzyskać mysz pozbawioną danego genu, potrzebne są mysie komórki ES oraz odcinek DNA zawierający gen wraz z otaczającymi go sekwencjami DNA. Taki fragment DNA, nazywany konstruktem (ang. *targeting construct*), włączony zostaje do DNA odpowiedniego plazmidu bakteryjnego. Zabieg ten umożliwia uzyskiwanie odpowiedniej liczby kopii plazmidu kodującego dany gen. Obecność wystarczająco długich sekwencji otaczających gen, identycznych z sekwencjami genomowymi zlokalizowanymi wokół tego właśnie locus, zwiększa szansę, że po wprowadzeniu konstruktu do komórek ES, dojdzie do parowania i homologicznej rekombinacji we właściwym rejonie genomu. Niezwykle istotny jest fakt, że dzięki temu możliwa jest wymiana znajdującej się tam kopii genu na jego zmodyfikowaną kopię. Sam sposób modyfikacji genu zależy od intencji eksperymentatora. Niezależnie od typu modyfikacji, konieczne jest wprowadzenie do genomu sekwencji warunkującej oporność na określony związek chemiczny (antybiotyk). Umożliwia to selekcję zmodyfikowanych komórek – obecność tego związku w środowisku hodowlanym powinna prowadzić do śmierci komórek, które nie włączyły do swojego DNA zmodyfikowanego fragmentu. Dzięki temu, stosując antybiotyki (np. neomycynę), eksperymentator może wyizolować interesujące go komórki.



RYCINA 3. Uzyskiwanie zmodyfikowanych genetycznie komórek ES (objaśnienia w tekście)

Dodatkowo konstruktor może zawierać sekwencję kodującą kinazę tymidynową wirusa *Herpes simplex* (HSV-TK, tzw. *suicide gene*, gen „samobójczy”). Sekwencja ta powinna znajdować się w tej części konstruktoru, która po prawidłowej rekombinacji homologicznej nie powinna zostać włączona do DNA komórek ES. Komórki, w których rekombinacja zaszła w sposób nieprawidłowy (w przypadkowym, a nie docelowym miejscu genomu) i które włączyły do swojego genomu HSV-TK, stają się wrażliwe na analog nukleozydu – gancyklowir. Związek ten po ufosforylowaniu przez kinazę tymidynową i inkorporacji do DNA blokuje replikację i prowadzi do śmierci komórek ES (ryc. 3).

Przygotowany konstruktor wprowadzany jest do komórek ES, które są w tym celu poddane elektroporacji. Następnie prowadzona jest selekcja wykorzystująca odpowiedni antybiotyk oraz jeżeli konstruktor zawierał HSV-TK, także gancyklowir. Jedynie te komórki, w których doszło do prawidłowej integracji, będą odporne zarówno na antybiotyk, jak i na gancyklowir (ryc. 3). Odpowiednio przeprowadzona selekcja zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania klonów komórek ES z poprawnie wbudowanym zmodyfikowanym fragmentem DNA. Wyselekcjonowane komórki muszą być poddane dokładnej analizie, która powinna potwierdzić, że zmodyfikowana sekwencja DNA znajduje się we właściwym



RYCINA 4. Uzyskiwanie myszy nokautowych. Kolonie komórek ES zostają zdezagregowane, a następnie poddane elektroporacji w obecności plazmidu kodującego fragment DNA, zmodyfikowany w taki sposób, że np. sekwencja kodująca genu zastąpiona została przez gen warunkujący oporność na neomycynę (Neo). W wyniku rekombinacji homologicznej zmodyfikowany fragment DNA zostaje włączony do genomu komórek ES. Selekcja w obecności neomycyny prowadzi do eliminacji komórek, w których nie doszło do włączenia zmodyfikowanego DNA kodującego Neo. Odpowiednio wyselekcjonowane i przetestowane komórki ES, w których jeden z alleli kodujących dany gen został usunięty i zastąpiony przez fragment kodujący neomycynę (komórki heterozygotyczne) wprowadzane są do jamy blastocysty. Uzyskane myszy chimerowe krzyżowane są z myszami innego szczepu. Jeżeli z komórek ES powstały gamety, potomstwo będzie heterozygotyczne (+/-). Skrzyżowanie dwóch myszy heterozygotycznych może prowadzić do urodzenia myszy homozygotycznej, której komórki pozbawione są obu kopii danego genu (-/-)

miejscu. Równie ważne jest wykazanie, że do genomu została wprowadzona tylko jedna kopia zmodyfikowanego genu. Otrzymane w ten sposób komórki są heterozygotyczne, wymianie ulega bowiem tylko jeden allel danego genu.

Odpowiednio przetestowane komórki ES mogą zostać wykorzystane do uzyskania myszy chimerowych (ryc. 4). Jeżeli w chimerze pierwotne komórki płciowe, a następnie gamety powstaną z komórek ES, to wprowadzona modyfikacja genetyczna będzie dziedziczona z pokolenia na pokolenie. W wyniku krzyżowania takich chimer z myszami wybranego szczepu uzyskiwane są myszy heterozygotyczne zawierające tylko jeden zmodyfikowany allel. Krzyżując ze sobą heterozygoty można doprowadzić do powstania organizmów homozygotycznych, w których oba allele danego genu zostały zastąpione przez ich zmodyfikowane wersje. Uzyskanie hetero- i homozygot otwiera przed badaczami niezwykle ważny i często długotrwały etap – analizę fenotypu uzyskanej myszy. Przeprowadzenie takich badań może doprowadzić do precyzyjnego określenia roli danego

genu w rozwoju organizmu oraz w funkcjonowaniu określonych tkanek czy narządów. Analiza fenotypu może jednak nastroczać wiele problemów. Szczególnie, jeżeli uzyskany efekt odbiega od efektu założonego. Pomocna w tego typu badaniach może być opublikowana w 2005 roku „instruktażowa” książka Virginii Papaioannou i Richarda Behringera – *Mouse phenotypes. A handbook of mutation analysis*, której mottem są słowa Ann McLaren „*A mouse with no phenotype is non-existing*” [48].

Niemal każdy gen można zamienić na jego zmodyfikowaną kopię. Wprowadzane modyfikacje genomu mogą polegać na usunięciu całego genu lub też takiego jego fragmentu, który jest niezbędny dla inicjacji transkrypcji. W efekcie w komórkach myszy nokautowej nie będzie syntetyzowane dane białko. Gen może zostać również zmodyfikowany w taki sposób, że kodowane przez niego białko nie będzie w pełni funkcjonalne. Może ono stracić np. swoją aktywność enzymatyczną czy też zdolność do tworzenia kompleksów z innym białkiem. Usunięte mogą zostać sekwencje kodujące domeny odpowiedzialne za degradację białka, czy też reszty aminokwasowe podlegające modyfikacjom posttranslacyjnym mogą zostać zastąpione przez aminokwasy „niemodyfikowalne”. W ten sposób uzyskujemy zwierzęta określane mianem *knock-in*. Ich analiza umożliwia badanie określonych funkcji danego białka. Innym przykładem modyfikacji typu *knock-in* jest wymiana określonego genu na gen kodujący inne białko. Analiza uzyskanych w ten sposób zwierząt pozwala określić, czy funkcja danego genu może być pełniona przez inny gen. Przykład takich badań stanowi uzyskanie myszy, w których zastąpiono gen kodujący cyklinę D1 genem cykliny D2 [8] lub też gen cykliny D1 genem kodującym ludzką cyklinę E [17].

W latach dziewięćdziesiątych XX wieku wprowadzono istotną modyfikację techniki uzyskiwania zwierząt nokautowych, pozwalającą na usunięcie danego genu w określonym czasie (wybrany etap rozwoju) i/lub miejscu (wybrany typ komórek). Technika ta okazała się istotna w badaniach, których celem była analiza funkcji danego genu w konkretnej tkance czy narządzie. Uzyskiwanie myszy nokautowej w klasyczny sposób mogło prowadzić do sytuacji, kiedy brak syntezy określonego czynnika przez cały czas i we wszystkich komórkach uniemożliwiał prawidłowy rozwój zarodka i powodował jego śmierć *in utero*. Tym samym niemożliwe było stawianie pytań o znaczenie danego genu i kodowanego przez niego białka dla prawidłowego funkcjonowania określonej tkanki lub narządu w dorosłym organizmie. To istotne ograniczenie zostało usunięte, kiedy opracowano techniki uzyskiwania tzw. nokautów warunkowych (ang. *conditional knock-out*). Modyfikacja klasycznej metody polegała na umieszczeniu wokół genu (lub jego fragmentu), który chcemy usunąć, specyficznych sekwencji rozpoznawanych przez enzymy bakteryjne – rekombinazę *cre* (sekwencje LoxP), rekombinazę *flip* (sekwencje FRT) lub enzym kodowany przez faga – Φ C31 (sekwencje att) [2, 6]. Tak „otoczony” gen mógł zostać usunięty z komórek tylko wtedy, gdy obecny był enzym rozpoznający wprowadzone sekwencje. Technika ta umożliwia uzyskanie myszy, w których komórkach funkcja genu zachowana jest tak długo, jak długo nie zostanie wprowadzona do nich rekombinaza *cre* czy *flip*. Z tak zmodyfikowanych myszy możliwe jest uzyskanie i hodowla *in vitro* wybranych komórek, do których możliwe jest wprowadzanie wektorów kodujących odpowiednie rekombinazy. Obecnie dostępne są także myszy transgeniczne, których genomy zmodyfikowane zostały w taki sposób,

że rekombinaza *cre* syntetyzowana jest jedynie w komórkach określonej tkanki czy narządu. Krzyżując ze sobą myszy, w których badany gen został „otoczony” sekwencjami LoxP, z odpowiednio dobranymi myszami *cre* można uzyskać potomstwo, w którym tylko wybrane tkanki pozbawione będą funkcjonalnego genu. Możliwe jest również wykorzystanie takich myszy *cre*, w których komórkach ekspresja rekombinazy jest indukowana podaniem odpowiedniego związku chemicznego. Dzięki temu badany gen, otoczony sekwencjami LoxP, może zostać usunięty w określonych tkankach i w określonym czasie. Technika ta otworzyła zupełnie nowy rozdział w badaniach funkcji genów – obecnie badacz może decydować, kiedy i w jakich tkankach „wylączyć” określony gen [41, 73, 74].

5.2. Terapie komórkowe

Uzyskanie ludzkich komórek ES rozbudziło wielkie nadzieje na ich zastosowanie w terapiach komórkowych u ludzi. Od wielu lat opracowywane są techniki różnicowania zarodkowych komórek macierzystych w określone typy komórek, w nadziei, że będzie je można wykorzystać dla poprawy regeneracji uszkodzonych tkanek lub też zastąpienia tkanek funkcjonujących nieprawidłowo. Naukowcy, którzy starają się opracować skuteczne terapie komórkowe, muszą jednak rozwiązać wiele problemów.

Po pierwsze, długotrwała hodowla *in vitro* może prowadzić do mutacji w genomie komórek ES. Wiadomo, że na pewno prowadzi to do zmian w modyfikacjach epigenetycznych. Wykazał to w 2001 roku zespół Rudolfa Jaenisch. Opublikowano wtedy wyniki doświadczeń, w których z jednej macierzystej linii komórek ES wyprowadzono kilka linii potomnych. Komórki tych linii poddano różnicowaniu, a następnie wykazano, że badane linie komórkowe znacząco różniły się od siebie poziomem metylacji wybranych genów (gen *H19*) [24]. Zmiany w metylacji DNA określonych sekwencji, czy też w metylacji i acetylacji oddziałującego z DNA histonu H3, w znaczący sposób wpływają na ekspresję genów, a co za tym idzie, mogą modyfikować np. różnicowanie komórek ES.

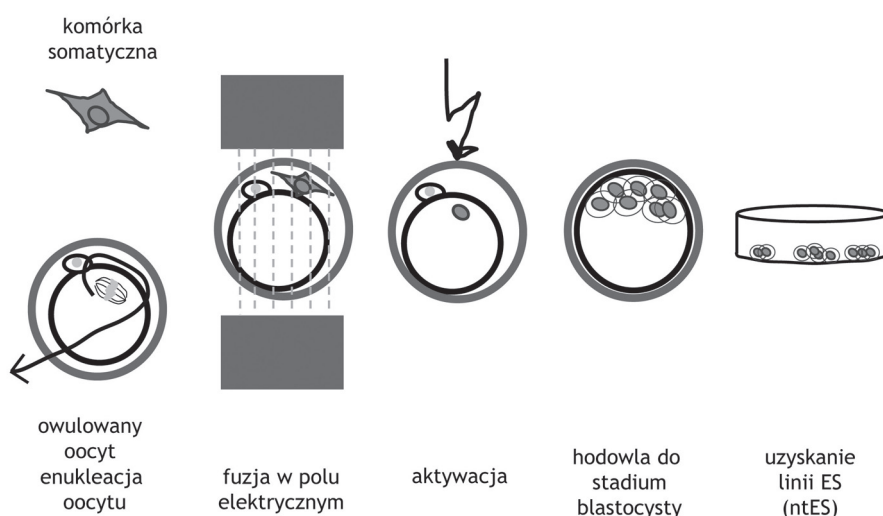
Po drugie, wykorzystując komórki ES w terapiach należy brać po uwagę to, że wprowadzenie do organizmu komórek nie zróżnicowanych, o charakterze zarodkowym może zaindukować powstawanie potworników. Dlatego obecnie szuka się takich metod różnicowania i selekcji komórek, które pozwolą wyeliminować komórki nie zróżnicowane, a zatem ciągle pluripotenne (zobacz np. [80]).

Trzeci, istotny problem związany z wykorzystaniem ludzkich zarodkowych komórek macierzystych w terapii wiąże się z dostępnością niewielu linii ludzkich komórek ES. Planując przeszczep takich komórek należy brać pod uwagę możliwość ich odrzucenia przez biorcę. Problem ten mógłby zostać wyeliminowany, gdyby dostępnych było tak wiele linii komórek ES, że możliwe byłoby ich dopasowanie pod względem antygenów zgodności tkankowej do każdego niemal biorcy. Obliczono, że dysponowanie około 200 liniami ESów pozwoliłoby na takie ich dobranie do biorców, że u pacjentów, którym przeszczepiono obce komórki, możliwe byłoby ograniczenie stosowania immunosupresji. Obecnie jednak tego typu przedsięwzięcie wydaje się niemożliwe, głównie ze względu na regulacje prawne obowiązujące w krajach prowadzących badania z wykorzystaniem

komórek ES. Brana była również pod uwagę możliwość uzyskania komórek macierzystych pozbawionych kluczowych antygenów zgodności tkankowej. W obliczu tych trudności duże nadzieje pokłada się w klonowaniu terapeutycznym.

5.3. Klonowanie terapeutyczne

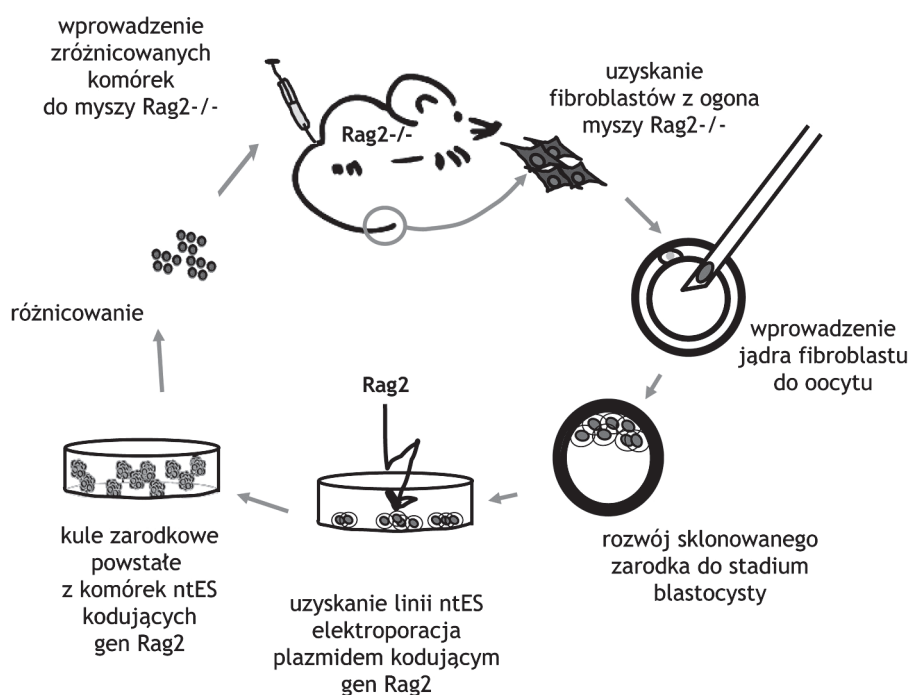
Prototyp metody uzyskiwania „skrojonych na miarę” zarodkowych komórek macierzystych, czyli komórek o genotypie identycznym z genotypem danego zwierzęcia czy człowieka, został opracowany w latach dziewięćdziesiątych zeszłego stulecia. Pierwszym sklonowanym zwierzęciem była owca Dolly. Podobna technika zastosowana została podczas klonowania również innych gatunków zwierząt. Wykorzystano ją także w badaniach, w których najpierw sklonowano zarodek myszy, a następnie uzyskano z niego komórki ES. W pierwszym etapie tych doświadczeń przeprowadzono mikromanipulacyjne usunięcie DNA z owulowanego oocyty myszy (chromosomy ułożone w płytce metafazy II podziału meiotycznego). Następnie na jego miejsce wprowadzono jądro komórki somatycznej dawcy i taki oocyt pobudzono do rozwoju partenogenetycznego. Stworzony w ten sposób zarodek przeszedł kolejne podziały bruzdkowania, a każda z jego komórek funkcjonowała pod kontrolą jądra wywodzącego się od jądra komórki dawcy czyli komórki somatycznej. Po osiągnięciu przez zarodek stadium blastocysty uzyskano z niej zarodkowe komórki macierzyste identyczne pod względem



RYCINA 5. Klonowanie somatyczne – uzyskiwanie komórek ntES. Z owulowanego oocyty myszy usuwane jest wrzeciono oraz chromosomy metafazy II podziału meiotycznego. Następnie pod osłonkę otaczającą oocyt wprowadzana jest komórka somatyczna dawcy. Umieszczenie oocyty w polu elektrycznym indukuje fuzję obu komórek – jądro komórki somatycznej trafia do cytoplazmy oocyty. Alternatywnie, jądro komórki somatycznej może zostać wstrzyknięte mikropipetą wprost do wnętrza oocyty. Aktywowany partenogenetycznie oocyt (impulsem aktywującym może być umieszczenie w polu elektrycznym, w roztworze zawierającym jony strontu lub w niskoprocentowym roztworze alkoholu etylowego) przechodzi podziały bruzdkowania i osiąga stadium blastocysty. Z węzła zarodkowego blastocysty uzyskuje się komórki ntES

genetycznym z komórkami dawcy (ryc. 5). Komórki te określono mianem ntES (ang. *nuclear transfer ES*). W dotychczas przeprowadzonych badaniach do oocytów wprowadzano już jądra tak różnych komórek, jak fibroblasty czy limfocyty B [23]. Wykazano także, że uzyskane komórki ntES można różnicować w określone tkanki i potencjalnie wykorzystywać w terapiach komórkowych.

Komórki ntES, podobnie jak klasyczne komórki ES, można także poddawać manipulacjom genetycznym mającym na celu np. usunięcie istniejącej mutacji. Stosując tę technikę „wyleczono” mysz, która pozbawiona była genu *Rag2* kodującego enzym niezbędny do powstawania limfocytów T i B. Fibroblasty pobrane z ogona takiej nokautowej myszy zostały dawcami jąder komórkowych wprowadzanych do oocytów. Po aktywacji partenogenetycznej oocyty utworzyły zarodki, z których po osiągnięciu stadium blastocysty wyprowadzono linię komórek ntES. Do komórek tych w drodze elektroporacji wprowadzono plazmid zawierający odpowiednio przygotowany konstrukt kodujący gen *Rag2*, a następnie poddano selekcji w celu uzyskania klonu, w którym doszło do rekombinacji homologicznej oraz wstępnemu różnicowaniu w kierunku



RYCINA 6. Klonowanie terapeutyczne. Z ogona myszy, której komórki pozbawione były obu alleli genu kodującego enzym *Rag2*, (*Rag2*^{-/-}) pobrano fibroblasty. Jądro fibroblastu posłużyło do sklonowania zarodka, z którego, gdy osiągnął stadium blastocysty, uzyskano komórki ntES. Do komórek tych elektroporowano wektor zawierający gen *Rag2* wraz z otaczającymi go sekwencjami homologicznymi do sekwencji genomowych zlokalizowanych wokół genu, który ma zostać zastąpiony. Po wyselekcjonowaniu klonów komórek (konstrukt kodował również gen warunkujący oporność na antybiotyki), które zintegrowały gen w prawidłowy sposób, komórki poddano różnicowaniu *in vitro*. Po umieszczeniu ich w pożywce pozbawionej LIF utworzyły one kule zarodkowe, z których, stosując odpowiednie czynniki wzrostu, uzyskano komórki hematopoetyczne. Komórki te wprowadzono do krwioobiegu myszy *Rag2*^{-/-}, gdzie różnicowały w limfocyty T i B (schemat adaptowany za zgodą wydawnictwa Elsevier: Cell [54] copyright 2002)

komórek hematopoetycznych. Takie komórki wprowadzono do krwioobiegu myszy pozbawionej genu kodującego *Rag2* i w ten sposób doprowadzono do usunięcia „defektu” – we krwi leczonego zwierzęcia pojawiły się limfocyty [54] (ryc. 6). Istnieje już zatem technika, która teoretycznie mogłaby być zastosowana w terapii człowieka. Na przeszkodzie próbom jej wykorzystania stają jednak istotne ograniczenia, przede wszystkim bardzo mała dostępność oocytów ludzkich, które byłyby biorcami jąder komórek somatycznych. Doniesienia o uzyskaniu ludzkich komórek ntES oraz wykorzystaniu ich do terapii okazały się sfałszowane [25, 26, 59]. Być może do opracowania dogodnej metody klonowania terapeutycznego doprowadzą badania, których wykonywanie zostało ostatnio dopuszczone w Wielkiej Brytanii, a w których biorcami jąder ludzkich komórek somatycznych miałyby być oocyty innego gatunku ssaka. W doświadczeniach takich nie byłyby więc wykorzystywane ludzkie oocyty. Tymczasem jednak lata 2006 i 2007 przyniosły nadzieję na nowy, niebudzący zastrzeżeń etycznych, sposób uzyskiwania komórek ES.

6. KOMÓRKI iPS CZYLI OD FIBROBLASTU DO KOMÓRKI MACIERZYTEJ

Latem 2006 roku pojawiło się pierwsze doniesienie wykazujące, że mysie pluripotentne komórki można uzyskać z fibroblastów. Takahashi i Yamanaka opublikowali wyniki doświadczeń udowadniających, że jednoczesna ekspresja genów *Oct-4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc* może doprowadzić do przekształcenia fibroblastów w komórki pluripotentne, określane przez badaczy jako komórki iPS (ang. *induced Pluripotent Stem*) [66]. Podobne próby zostały z powodzeniem przeprowadzone także przez inne grupy badawcze [40, 53, 76]. Wskazanie odpowiedniego zestawu genów nie było proste. Japońscy badacze wytypowali najpierw 24 geny, o których wiadomo było, że odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu pluripotencji przez komórki ES lub też, że zaangażowane są w regulację proliferacji komórek. Testowano aktywne formy takich genów, jak: *beta-katenina*, *Stat3*, *Nanog*, *Oct-4*, ale także onkogenu *c-Myc* oraz nieaktywne formy genów, które nie sprzyjają utrzymaniu pluripotencji, jak np. *Grb2*. Fibroblasty były kolejno transfekowane wirusami, kodującymi oddzielnie każdy z testowanych czynników. Nie doprowadziło to jednak do zmiany cech tych komórek. Natomiast nadekspresja wszystkich 24 genów spowodowała przekształcenie fibroblastów w komórki, które miały cechy komórek ES. Kolejne doświadczenia, mające na celu znalezienie czynników krytycznych, pozwoliły ustalić, że połączenie czterech z nich jest wystarczające do transformacji fibroblastów w komórki iPS. *Oct-4* i *Sox2* są to białka, o których wiadomo było, że są kluczowe dla zachowania pluripotencji przez komórki ES, *Klf4* jest czynnikiem odpowiedzialnym za represję p53, białka, które bierze udział między innymi w zahamowaniu syntezy innego kluczowego dla pluripotencji czynnika – *Nanog*. *c-Myc* jest białkiem stymulującym podziały komórkowe oraz zaangażowanym w indukcję apoptozy – ten efekt uboczny znoszony jest jednak przez aktywność *Klf4*. Komórki iPS, które uzyskano po nadekspresji tych genów w fibro-

blastach charakteryzowała ekspresja genów typowych dla zarodkowych komórek macierzystych [5, 56, 66]. Były one w stanie różnicować *in vivo* – tworzyły potworniaki, a wprowadzone do jamy blastocysty brały udział w powstawaniu wszystkich tkanek rozwijającego się chimerowego zarodka. Mogły z nich również powstawać gamety – uzyskane myszy chimerowe były płodne, a ich młode zawierały w swoich genomach markery wprowadzone do fibroblastów podczas uzyskiwania komórek iPS [46]. Niestety, ekspresja onkogenu *c-Myc* nie zawsze pozostawała bez negatywnych konsekwencji. U znaczącego odsetka myszy badanych przez zespół Yamanaki rozwinęły się nowotwory [46]. Próba wyeliminowania tego zagrożenia została podjęta przez Jaenisch'a i jego współpracowników, którzy w swoich kolejnych doświadczeniach wykorzystywali konstrukt kodujący gen *c-Myc* otoczony sekwencjami LoxP. Po uzyskaniu komórek iPS usuwano *c-Myc* wprowadzając do tych komórek rekombinazę *cre* [22]. Przeprowadzono również badania, w których komórki iPS uzyskiwane były z pominięciem nadekspresji *c-Myc* [44]. Dodatkowe analizy wykazały, że komórki iPS można identyfikować wyłącznie na podstawie ich morfologii i dzięki temu wyeliminować stosowany w oryginalnych pracach skomplikowany system selekcji [53]. Komórki iPS uzyskano nie tylko z fibroblastów, ale także z mysich hepatocytów oraz komórek nabłonkowych żołądka [1]. Badania analizujące mechanizmy odpowiedzialne za przeprogramowanie zróżnicowanej mysiej komórki somatycznej (fibroblastu) w komórkę pluripotentną wykazały, że pierwszym etapem transformacji było wyciszenie ekspresji genów charakterystycznych dla komórki somatycznej [63]. Następnie komórki rozpoczynały syntezę czynników typowych dla komórek zarodkowych i komórek ES (np. białko powierzchniowe SSEA-1). Kolejnym etapem była aktywacja genów odpowiedzialnych za zachowanie pluripotencji. Zaskakujące okazało się odkrycie, że geny kodujące markery pluripotencji *Nanog* czy *Oct-4* nie były aktywowane jako pierwsze, lecz dopiero po reaktywacji innego markera komórek pluripotentnych, genu *Fbx15*. Dotychczas uważano, że ekspresja tego genu regulowana jest właśnie przez *Oct-4* [71]. Ponadto, w komórkach iPS wznawiana była synteza telomerazy [63].

Równocześnie z doniesieniami na temat uzyskania mysich komórek iPS pojawiły się prace, w których opisywano podobny sposób otrzymywania ludzkich komórek iPS. Ludzkie fibroblasty, do których wprowadzono ten sam zestaw genów, również przekształcały się w komórki pluripotentne charakteryzujące się wysoką ekspresją telomerazy i syntezą czynników charakterystycznych dla komórek ES oraz różnicujące *in vitro* i tworzące teratomy [35, 49, 65].

Równolegle z opracowywaniem optymalnych technik uzyskiwania komórek iPS prowadzono badania mające na celu wykorzystanie tych komórek w terapii. Pierwszym obiektem takich doświadczeń były myszy pozbawione genu beta-globiny stanowiące zwierzęcy model ludzkiej anemii sierpowatej [22]. Uzyskane z fibroblastów tych myszy komórki iPS zostały poddane elektroporacji w obecności plazmidu kodującego gen beta-globiny. Zabieg ten doprowadził do uzyskania komórek, w których doszło do rekombinacji homologicznej i wprowadzenia funkcjonalnego genu w prawidłowe miejsce genomu myszy. Tak „nareperowane” komórki iPS poddano różnicowaniu w komórki hematopoetyczne, a następnie wprowadzono je do krwioobiegu myszy z objawami anemii sierpowatej. W efekcie we krwi myszy obok erytrocytów „sierpowatych”

wykrywano normalne krwinki i zaobserwowano także częściowe ustąpienie objawów anemii u tych zwierząt [22]. Pojawiła się więc nadzieja na opracowanie techniki podobnej do klonowania terapeutycznego, która mogłaby być stosowana w leczeniu ludzkich chorób. Autorzy tej pracy podkreślają jednak, że zanim to nastąpi, konieczne jest opracowanie modyfikacji pozwalających na całkowite pominięcie ekspresji onkogenu *c-Myc* oraz zaniechanie wykorzystywania retrowirusów, jako nośników genów wprowadzanych do fibroblastów. Jak już wspomniałam, opracowywane są techniki, które nie wymagają wprowadzania do komórek onkogenu *c-Myc* [44]. Ponadto, szczególnie ważne jest kontynuowanie doświadczeń, które zapewniłyby opracowanie skutecznych metod różnicowania komórek iPS [22].

PODSUMOWANIE

Uzyskanie zarodkowych komórek macierzystych oraz opracowanie technik ich modyfikacji genetycznej stworzyło szansę na prowadzenie wielu bardzo istotnych badań. Pozwoliły one na zrozumienie funkcji wielu genów, a także mechanizmów różnicowania komórek. Możliwe było także opracowanie nowatorskich metod badawczych i zainicjowanie badań, których nadrzędnym celem było opracowanie skutecznych metod naprawy uszkodzonych lub nieprawidłowo funkcjonujących tkanek. Poznanie mechanizmów warunkujących pluripotencję oraz samoodnawianie komórek macierzystych okazało się kluczowe dla opracowania techniki przekształcania komórek somatycznych w komórki mające cechy komórek macierzystych. Historia odkrycia i poznawania cech tych komórek pokazuje, w jak ścisłej zależności pozostają biologiczne badania podstawowe i te prowadzone przez nauki medyczne

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować Towarzystwu Naukowemu Warszawskiemu za zaproszenie mnie do wygłoszenia wykładu, który stał się podstawą powyższego artykułu. Dziękuję również Katarzynie Koziak, Iwonie Grabowskiej, Grzegorzowi Litwinienko, Jackowi Kubiakowi oraz Markowi Maleszewskiemu za cenne uwagi dotyczące tekstu.

SPIS LITERATURY

- [1] AOI T, YAE K, NAKAGAWA M, ICHISAKA T, OKITA K, TAKAHASHI K, CHIBA T, YAMANAKA S. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science* 2008; **10**:1126/science.1154884.
- [2] BABINET C, COHEN-TANNOUDJI M. Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An Acad Bras Cienc* 2001; **73**: 365–383.
- [3] BHATTACHARYA B, MIURA T, BRANDENBERGER R, MEJIDO J, LUO Y, YANG AX, JOSHI BH, GINIS I, THIES RS, AMIT M, LYONS I, CONDIE BG, ITSKOVITZ-ELDOR J, RAO MS, PURI RK. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* 2004; **103**: 2956–2964.

- [4] BOIANI M, SCHOLER HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 872–884.
- [5] BRAMBRINK T, FOREMAN R, WELSTEAD GG, LENGNER C, WERNIG M, SUH H, JAENISCH R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 151–159.
- [6] BRANDA CS, DYMECKI SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 2004; **6**: 7–28.
- [7] BRYJA V, BONILLA S, ARENAS E. Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2006; **1**: 2082–2087.
- [8] CARTHON BC, NEUMANN CA, DAS M, PAWLYK B, LI T, GENG Y, SICINSKI P. Genetic replacement of cyclin D1 function in mouse development by cyclin D2. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 1081–1088.
- [9] CAVALERI F, SCHOLER HR. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 2003; **113**: 551–552.
- [10] CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, NICHOLS J, LEE S, TWEEDIE S, SMITH A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; **113**: 643–655.
- [11] CHUNG Y, KLIMANSKAYA I, BECKER S, LI T, MASERATI M, LU SJ, ZDRAVKOVIC T, ILIC D, GENBACEV O, FISHER S, KRTOLICA A, LANZA R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 113–117.
- [12] CHUNG Y, KLIMANSKAYA I, BECKER S, MARH J, LU SJ, JOHNSON J, MEISNER L, LANZA R. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 2006; **439**: 216–219.
- [13] CZYZ J, WOBUS A. Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation* 2001; **68**: 167–174.
- [14] DUNCAN SA. Generation of embryos directly from embryonic stem cells by tetraploid embryo complementation reveals a role for GATA factors in organogenesis. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 1534–1536.
- [15] EGGAN K, RODE A, JENTSCH I, SAMUEL C, HENNEK T, TINTRUP H, ZEVNIK B, ERWIN J, LORING J, JACKSON-GRUSBY L, SPEICHER MR, KUEHN R, JAENISCH R. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 455–459.
- [16] EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; **292**: 154–156.
- [17] GENG Y, WHORISKEY W, PARK MY, BRONSON RT, MEDEMA RH, LI T, WEINBERG RA, SICINSKI P. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* 1999; **97**: p767–777.
- [18] GENG Y, YU Q, SICINSKA E, DAS M, SCHNEIDER JE, BHATTACHARYA S, RIDEOUT WM, BRONSON RT, GARDNER H, SICINSKI P. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 2003; **114**: 431–443.
- [19] GERTOW K, WOLBANK S, ROZELL B, SUGARS R, ANDANG M, PARISH CL, IMREH MP, WENDEL M, AHLUND-RICHTER L. Organized development from human embryonic stem cells after injection into immunodeficient mice. *Stem Cells Dev* 2004; **13**: 421–435.
- [20] GINIS I, LUO Y, MIURA T, THIES S, BRANDENBERGER R, GERECHT-NIR S, AMIT M, HOKE A, CARPENTER MK, ITSKOVITZ-ELDOR J, RAO MS. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004; **269**: 360–380.
- [21] GRATSCH TE, O'SHEA KS. Noggin and chordin have distinct activities in promoting lineage commitment of mouse embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 2002; **245**: 83–94.
- [22] HANNA J, WERNIG M, MARKOULAKI S, SUN CW, MEISSNER A, CASSADY JP, BEARD C, BRAMBRINK T, WU LC, TOWNES TM, JAENISCH R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; **318**: 1920–1923.
- [23] HOCHEDLINGER K, JAENISCH R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002; **415**: 1035–1038.
- [24] HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGER K, RIDEOUT WM, 3RD, BINISZKIEWICZ D, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001; **293**: 95–97.
- [25] HWANG WS, ROH SI, LEE BC, KANG SK, KWON DK, KIM S, KIM SJ, PARK SW, KWON HS, LEE CK, LEE JB, KIM JM, AHN C, PAEK SH, CHANG SS, KOO JJ, YOON HS, HWANG JH, HWANG YY, PARK YS, OH SK, KIM HS, PARK JH, MOON SY, SCHATTEN G. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005; **308**: 1777–1783.

- [26] HWANG WS, RYU YJ, PARK JH, PARK ES, LEE EG, KOO JM, CHUN HY, LEE BC, KANG SK, KIM SJ, AHN C, HWANG JH, PARK KY, CIBELLI JB, MOON SY. Evidence of a Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived from a Cloned Blastocyst. *Science* 2004; **303**: 1669–1674.
- [27] IVANOVA N, DOBRIN R, LU R, KOTENKO I, LEVORSE J, DECOSTE C, SCHAFER X, LUN Y, LEMISCHKA IR. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; **442**: 533–538.
- [28] JAENISCH R, YOUNG R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008; **132**: 567–582.
- [29] KLIMANSKAYA I, CHUNG Y, BECKER S, LU SJ, LANZA R. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat Protoc* 2007; **2**: 1963–1972.
- [30] KLIMANSKAYA I, CHUNG Y, BECKER S, LU SJ, LANZA R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006; **444**: 481–485.
- [31] KUAI XL, CONG XQ, LI XL, XIAO SD. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 2003; **9**: 1094–1099.
- [32] KUBIAK JZ, TARKOWSKI AK. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res* 1985; **157**: 561–566.
- [33] KUROSAWA H. Methods for inducing embryoid body formation: *in vitro* differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007; **103**: 389–398.
- [34] LOEBEL DA, WATSON CM, DE YOUNG RA, TAM PP. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* 2003; **264**: 1–14.
- [35] LOWRY WE, RICHTER L, YACHECHKO R, PYLE AD, TCHIEU J, SRIDHARAN R, CLARK AT, PLATH K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 2883–2888.
- [36] LUMELSKY N, BLONDEL O, LAENG P, VELASCO I, RAVIN R, MCKAY R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; **292**: 1389–1394.
- [37] MAK TW. Gene targeting in embryonic stem cells scores a knockout in Stockholm. *Cell* 2007; **131**: 1027–1031.
- [38] MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7634–7638.
- [39] MATSUDA T, NAKAMURA T, NAKAO K, ARAI T, KATSUKI M, HEIKE T, YOKOTA T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 1999; **18**: 4261–4269.
- [40] MEISSNER A, WERNIG M, JAENISCH R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 1177–1181.
- [41] METZGER D, CLIFFORD J, CHIBA H, CHAMBON P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6991–6995.
- [42] MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H, SEGAWA K, MURAKAMI M, TAKAHASHI K, MARUYAMA M, MAEDA M, YAMANAKA S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; **113**: 631–642.
- [43] NAGY A, GERTSENSTEIN M, VINTERSTEN K, BEHRINGER R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (3rd edition). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2003.
- [44] NAKAGAWA M, KOYANAGI M, TANABE K, TAKAHASHI K, ICHISAKA T, AOI T, OKITA K, MOCHIDUKI Y, TAKIZAWA N, YAMANAKA S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 101–106.
- [45] NIWA H, BURDON T, CHAMBERS I, SMITH A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; **12**: 2048–2060.
- [46] OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; **448**: 313–317.
- [47] OVITT CE, SCHOLER HR. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 1021–1031.
- [48] PAPAIOANNOU V, BEHRINGER RR. Mouse phenotypes. A handbook of mutation analysis. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2005.
- [49] PARK IH, ZHAO R, WEST JA, YABUUCHI A, HUO H, INCE TA, LEROU PH, LENSCH MW, DALEY GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; **451**: 141–146.

- [50] PEARSON S, SROCZYNSKA P, LACAUD G, KOUSKOFF V. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development* 2008; w druku.
- [51] PESCE M, ANASTASSIADIS K, SCHOLER HR. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 1999; **165**: 144–152.
- [52] PESCE M, WANG X, WOLGEMUTH DJ, SCHOLER H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 1998; **71**: 89–98.
- [53] QIN D, LI W, ZHANG J, PEI D. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4. *Cell Res* 2007; **17**: 959–962.
- [54] RIDEOUT WM, 3RD, HOCHEDLINGER K, KYBA M, DALEY GQ, JAENISCH R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002; **109**: 17–27.
- [55] RODDA SJ, KAVANAGH SJ, RATHJEN J, RATHJEN PD. Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development. *Int J Dev Biol* 2002; **46**: 449–458.
- [56] RODOLFA KT, EGGAN K. A transcriptional logic for nuclear reprogramming. *Cell* 2006; **126**: 652–655.
- [57] ROSSANT J. Stem cells and early lineage development. *Cell* 2008; **132**: 527–531.
- [58] SATO N, MEIJER L, SKALTSOUNIS L, GREENGARD P, BRIVANLOU AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; **10**: 55–63.
- [59] SAUNDERS R, SAVULESCU J. Research ethics and lessons from Hwanggate: what can we learn from the Korean cloning fraud? *J Med Ethics* 2008; **34**: 214–221.
- [60] SEIBLER J, ZEVIK B, KUTER-LUKS B, ANDREAS S, KERN H, HENNEK T, RODE A, HEIMANN C, FAUST N, KAUSELMANN G, SCHOOR M, JAENISCH R, RAJEWSKY K, KUHN R, SCHWENK F. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: e12.
- [61] SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, WANG S, BUGG EM, LITTLEFIELD JW, DONOVAN PJ, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, GEARHART JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13726–13731.
- [62] SOLTER D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 2006; **7**: 319–327.
- [63] STADTFELD M, MAHERALI N, BREAU DT, HOCHEDLINGER K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 1–11.
- [64] STAVRIDIS MP, SMITH AG. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 45–49.
- [65] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861–872.
- [66] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676.
- [67] TAM PP, ROSSANT J. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development* 2003; **130**: 6155–6163.
- [68] TARKOWSKI AK. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Naturwissenschaften* 1961; **190**: 857–860.
- [69] TARKOWSKI AK. Mouse chimaeras revisited: recollections and reflections. *Int J Dev Biol* 1998; **42**: 903–908.
- [70] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145–1147.
- [71] TOKUZAWA Y, KAIHO E, MARUYAMA M, TAKAHASHI K, MITSUI K, MAEDA M, NIWA H, YAMANAKA S. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2699–2708.
- [72] TOYOOKA Y, TSUNEKAWA N, AKASU R, NOCE T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 11457–11462.
- [73] UTOMO AR, NIKITIN AY, LEE WH. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 1091–1096.
- [74] VALLIER L, MANCIP J, MARKOSSIAN S, LUKASZEWICZ A, DEHAY C, METZGER D, CHAMBON P, SAMARUT J, SAVATIER P. An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their *in vitro* and *in vivo* differentiated derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 2467–2472.

- [75] WAKAYAMA S, HIKICHI T, SUETSUGU R, SAKAIDE Y, BUI HT, MIZUTANI E, WAKAYAMA T. Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells* 2007; **25**: 986–993.
- [76] WERNIG M, MEISSNER A, FOREMAN R, BRAMBRINK T, KU M, HOCHEDLINGER K, BERNSTEIN BE, JAENISCH R. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; **448**: 318–324.
- [77] WOBUS AM, BOHELER KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005; **85**: 635–678.
- [78] WU L, DE BRUIN A, SAAVEDRA HI, STAROVIC M, TRIMBOLIA, YANG Y, OPAVSKA J, WILSON P, THOMPSON JC, OSTROWSKI MC, ROSOL TJ, WOOLLETT LA, WEINSTEIN M, CROSS JC, ROBINSON ML, LEONE G. Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. *Nature* 2003; **421**: 942–947.
- [79] YING QL, NICHOLS J, CHAMBERS I, SMITH A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003; **115**: 281–292.
- [80] ZANDSTRA PW, BAUWENS C, YIN T, LIU Q, SCHILLER H, ZWEIGERDT R, PASUMARTHI KB, FIELD LJ. Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng* 2003; **9**: 767–778.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 21.03. 2008 r.

Przyjęto: 26.03. 2008 r.

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl