

Современное состояние и проблемы клонирования млекопитающих

Л. М. Морозова, И. Н. Вагина, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Обзор посвящен анализу литературных данных по клонированию млекопитающих. Рассматриваются проблемы, связанные с достижениями и ограничениями при клонировании млекопитающих: источники донорских ядер, оптимальные фазы клеточного цикла пересаживаемых ядер, методы их трансплантации, эффективность до- и постимплантационного развития клонов, дефекты их развития и связь с модификацией импринтов.

В последнее время в мире происходит ускоренное развитие биотехнологий, в том числе репродуктивных. Существенный вклад в понимание проблем индивидуального развития организмов вносят генетика, клеточная биология и экспериментальная эмбриология. Одной из центральных практических задач последней является преодоление сложностей, стоящих на пути клонирования млекопитающих. Определяющее значение в этом отношении имеет изучение регуляторных механизмов раннего доимплантационного развития млекопитающих, что и было предметом исследований нашего отдела на протяжении последних 15 лет.

В основе доимплантационного развития млекопитающих находится взаимодействие главных компонентов клетки — ядра и цитоплазмы. В связи с этим выяснение биохимических процессов, происходящих на ранних этапах цитодифференцировки и морфогенеза, может стать одним из подходов к расшифровке механизмов, через которые программа, записанная в геноме зиготы, реализуется в ходе онтогенеза. В результате проведенных нами исследований установлено, что в цитоплазме зигот мышей отсутствует прелокализация морфогенетических детерминант, которые отвечали бы за первые этапы цитодифференцировки, а межклеточные взаимодействия являются одним из механизмов, обуславливающих преддетерминацию blastomeres к различным направлениям дифференцировки [1]. Исходя из этого существенное значение приобретает

изучение механизмов дифференциальной экспрессии генов. К настоящему моменту регуляция активности генов во времени («биологические часы») — одна из основных нерешенных проблем в изучении развития млекопитающих.

В своих исследованиях мы использовали микрохирургически модифицированных ранних зародышей мыши. Результаты наших экспериментов позволили предположить, что программа раннего развития мышей, базирующаяся на взаимодействии продуктов экспрессии материнского генома и генома зародыша, обеспечивается двумя типами регуляции — на уровне цитоплазмы регулируется длительность клеточных циклов («цитоплазматические часы»), а ядро отвечает за прохождение процессов цитодифференцировки и индукцию морфогенетических преобразований («генетические часы») [2].

Изучение изменений, происходящих в мышечных зародышах на уровне транскрипции и трансляции генетической информации, важно для понимания механизмов работы «биологических часов». Исследование трансляционной активности доимплантационных зародышей мышей, цитокинез которых был угнетен цитохалазином D, позволило сделать вывод о том, что время морфогенетических переходов доимплантационных зародышей определяется не только (или не столько) достижением определенной концентрации продуктов экспрессии генома на каждом этапе, сколько составом специфических факторов, что и является своеобразным сигналом к дальнейшему развитию [3].

Как было отмечено выше, важную роль в раннем развитии млекопитающих играют межклеточные взаимодействия, являющиеся одним из механизмов дифференцировки и поддержания дифференцированного состояния клетки. Для решения вопроса о влиянии межклеточных взаимодействий на ранний онтогенез млекопитающих в качестве модели использовали химерных зародышей мышей. Выполненные в нашем отделе исследования с использованием химерных зародышей, состоящих из клеток двух разных линий мышей, впервые продемонстрировали наличие гетерозиса у химер на ранних этапах развития (ускорение доимплантационного морфогенеза) [4]. Вероятно, некоторые факторы, обеспечивающие взаимоотношения гетерологичных бластомеров химерного эмбриона, индуцируют позитивную обратную связь при взаимодействии генетически различных частей зародыша.

Проведенное нами изучение взаимоотношений ядра и цитоплазмы в раннем развитии указывает на то, что цитоплазма оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) млекопитающих не обладает столь мощными регуляторными свойствами и соответственно не способна полностью репрограммировать геном дифференцированной клетки. Достижения последних лет в области клонирования млекопитающих подтвердили справедливость нашего вывода.

Двадцатый век по праву можно назвать веком биологии — создание химер млекопитающих, открытие явления импринтинга, расшифровка генома человека и мыши, клонирование млекопитающих — вот некоторые события, вызвавшие интерес не только в научном мире, но и всего человечества.

Основоположниками клонирования можно считать Р. Бригса и Т. Кинга (1952), впервые высказавших идею о возможности перепрограммирования ядер соматических клеток цитоплазмой яйцеклеток, пересаживая ядра клеток головастиков лягушки в энуклеированные зиготы [5], а также Даниэлли (1955), который первым осуществил пересадки ядер (ПЯ) у амёб [6]. В 1975 г. Бромхэл с помощью вируса Сендай и микроинъекций произвел ПЯ морул в овулировавшие яйцеклетки кролика [7]. Впервые о получении взрослых особей мышей путем ПЯ сообщили Илменси и Хоуп в 1981 г. [8].

Далее последовала серия работ трех основных групп ученых, работающих в области клонирования млекопитающих: МакГрас и Солтер [9], Сурани и Бартон [10], Тсунода и соавт. [11]. Эти исследования сопровождалась рядом научных открытий, но получить клоны мышей методом ПЯ и подтвердить результаты работы Илменси не удавалось. Одновременно процесс клонирования пошел и

несколько иным путем — были сделаны попытки создания клонов с использованием клеток морул [12, 13]. Но и здесь исследователи столкнулись с ограничениями: клоны удавалось получить только до включения в работу геномов самих зародышей, которые у различных видов включаются на разных стадиях развития [14].

И вот в марте 1996 г. сообщили о рождении живых ягнят, полученных методом ПЯ клеток эмбрионального диска девятидневных эмбрионов овец, прошедших не более 25 пассажей в культуре в энуклеированные ооциты [15]. А в 1997 г. родилась известная во всем мире овца Долли — первый клон, полученный пересадкой ядра дифференцированной клетки эпителия молочной железы в энуклеированный ооцит овцы другой породы [16]. После Долли получили трансгенную овцу Полли [17], а затем клонировали телят [18], свиней [19], кроликов [20], мышей [21], обезьян [22], кошку [23], мула [24].

Таким образом, удалось доказать, что геном большинства дифференцированных клеток не несет необратимых изменений и может быть репрограммирован при ПЯ, что приводит к развитию до взрослых особей.

В 1999 г. методом ПЯ получены первые межвидовые клоны. Используя в качестве реципиентов клетки энуклеированных ооцитов коров, пересаживали ядра клеток фибробластов кожи телят, овец, свиней, крыс, обезьян [25]. Некоторые ядерно-цитоплазматические гибриды развились до преимплантационных стадий, но ни один из них не достиг плодного периода при пересадке самкам-реципиентам. Эти эксперименты доказали консервативность механизмов, обеспечивающих ранние этапы развития у млекопитающих.

Почему же не удалось получить взрослые клоны млекопитающих предыдущим исследователям? Успешное развитие зародыша зависит от взаимодействия ядра и цитоплазмы как в норме, так и при ПЯ [26, 27]. Поэтому первые успехи в клонировании пришли тогда, когда в качестве реципиента стали использовать не зиготы [28], а ооциты на стадии метафазы II (MII) [29]. Обосновывая предпочтение этой стадии, Вилмут подчеркнул, что при ПЯ он старался максимально приблизить стадии ядра-донора и ооциты к процессам, происходящим при оплодотворении [26].

Цитопласт, выбранный для пересадки ядер, — это энуклеированный ооцит, находящийся в MII фазе и имеющий высокие уровни MPF (mitosis promoting factor) — фактора, обуславливающего входение клетки в митоз—мейоз. Этот фактор является комплексом двух субъединиц — циклино-

вой и киназой $p34^{cdc2}$. В мейозе $p34$ киназа обеспечивает клетке вступление в М фазу при активации ооцита спермием. Ооцит же отвечает на оплодотворение инактивацией MPF, деконденсацией хромосом и образованием пронуклеусов. После репликации ДНК активность MPF вновь увеличивается, наступает митоз и формирование двухклеточного зародыша [29].

Ядра клеток, взятые для пересадки в ооциты, могут находиться на разных стадиях клеточного цикла и иметь определенную хромосомную архитектуру, направленную на выполнение функций той ткани, из которой они извлечены. Чтобы стать тотипотентными и поддерживать дальнейшее развитие, пересаженные ядра должны быть транскрипционно молчаливыми и репрограммированными. Оказалось, что потенциал к развитию реконструированных зародышей зависит от времени экспозиции ядра в ооцитах до его активации. И хотя в первых работах не найдено различий в развитии зародышей до морул и бластоцист в зависимости от времени, прошедшего между ПЯ и активацией ооцитов [15], последующие работы показали, что активация ооцитов через 3—6 ч после ПЯ приводит к наилучшему результату в развитии модифицированных зародышей [31, 32]. В то время как морфология процессов оплодотворения и событий, разворачивающихся в оплодотворенной яйцеклетке, изучена достаточно хорошо, биохимические процессы стало возможным исследовать именно благодаря пересадке ядер [33—35]. Показано, что при ПЯ идет активный обмен белками между ядром и цитоплазмой на фоне неизменного уровня в ядре таких белков, как топоизомераза, РНК-полимераза, метил-СpG-связывающий белок 2 [36].

И если в отношении ооплазмы при ПЯ исследователи определились достаточно четко, то относительно фаз клеточного цикла пересаживаемого ядра до сих пор идут дискуссии. Большинство ученых склоняется к тому, что фазы клеточного цикла G_0-G_1 и G_2-M обеспечивают ядру лучшее репрограммирование и последующее развитие зародыша до бластоцисты [13, 16, 37]. Достичь фазы G_0-G_1 у клеток легко, переводя их в культуру *in vitro* с дефицитом сыворотки в среде либо используя клетки, которые в организме находятся в этой фазе (клетки Сертолли, кумулюсные и др.) [15, 16, 18, 29, 30]. Через 1 ч после ПЯ донорских клеток, находящихся в фазе G_0-G_1 , начинается конденсация хроматина, а в период от 1 до 6 ч ооциты с донорскими ядрами в фазе G_1 активируются в культуральной среде, содержащей цитохалазин В и ионы Sr^{2+} . Конденсированные хроматиды прикреплены к одному полюсу веретена и не

могут выстраиваться в метафазную пластинку. Через 1 ч после активации Sr^{2+} хромосомы деконденсируются и обычно разделяются на две группы, образуя спустя 5 ч после активации две псевдопронуклеарные структуры. Размер этих структур и их количество могут варьировать. До 30 % ооцитов после активации имеют от трех и более таких структур. Цитохалазин В блокирует цитокинез, и все хромосомы остаются в ооците без выделения второго направительного тельца.

Хромосомный анализ ооцитов до первого деления показал, что 85 % из них имеют нормальное число хромосом — $2n$ [31], а после первого деления — дробления 65 % ооцитов с ядрами в G_0-G_1 фазе развивались до стадии морул-бластоцист. Подобные результаты получены и при ПЯ в фазе М клеточного цикла [13, 38, 39]. Ядра в М фазе собирают с помощью ингибитора полимеризации тубулина — нокадизола. При ПЯ в фазе М конденсированные хромосомы выстраивались в метафазную пластинку (подобно материнским хромосомам зрелого ооцита). После прохождения синтеза ДНК сестринские хроматиды отходят к противоположным полюсам и при активации Sr^{2+} в отсутствие цитохалазина В образуют одно псевдополярное тельце II и один псевдопронуклеус. Исследование псевдополярного тельца показало, что его хромосомный набор составлял $2n$. Складывалось впечатление, что пересадки ядер в М фазе проходят более естественным путем, приводя в дальнейшем к развитию большего количества зародышей до стадии бластоцисты.

Однако, несмотря на то, что с момента первого сообщения о клонированных овцах прошло достаточно много времени, четкого ответа на вопрос относительно оптимальной фазы клеточного цикла для донорского ядра еще не получено. Нет и оценки морул-бластоцист, хотя бы по количеству клеток, поскольку известно, что кавитация не зависит от числа клеточных делений [2].

Пересадки ядер в настоящее время проводят, в основном, двумя методами — электрослиянием клеток, носителей необходимых ядер, с энуклированными ооцитами в фазе МII [16] и методом введения ядер донорских клеток в ооциты МII с помощью пьезоимпульсной микропипетки [40, 41]. Последний метод часто называют методом Гонолулу, поскольку он был разработан группой ученых университета Гонолулу во главе с Р. Янагимачи. Необходимо отметить, что эти методы сходны по результатам развития клонов на доимплантационной стадии, но метод Гонолулу обеспечивает более высокий выход клонов-зародышей на постимплантационной стадии развития [42].

Рассмотрим эффективность клонирования млекопитающих разных видов в зависимости от типа тканей, их возраста и числа пассажей при культивировании клеток *in vitro*.

Как можно видеть из таблицы, выход клонированных особей очень невелик независимо от вида животных, типа клеток, взятых для ПЯ, их возраста и составляет около 1 %. Развитие ооцитов с пересаженными ядрами до морул-бластоцист колеблется для разных видов животных: у мышей 50—70 % [38, 48], у овец 40 % [16], 30 % у крупного рогатого скота (КРС) и свиней [19, 47]. Однако остается неясным, насколько эти разившиеся клоны жизнеспособны. Кэнг и соавт. показали, что количество клеток у бластоцист — клонов КРС на 168-й ч после активации ооцитов было ниже, чем у IVF бластоцист (оплодотворение *in vitro*), что необходимо учитывать при подборе самок-реципиентов [51].

Среди факторов, влияющих на развитие клонов, помимо уже отмеченных стадий клеточного цикла, пересаживаемых ядер, способности ооцитов к репрограммированию [52], предполагаемых генетических нарушений у донорского ядра в связи с возрастом (мутации, абберации, укорочение теломер), важное значение имеют генетическая основа пересаживаемых ядер [49—53] и изменение их импринтов [54].

Исследователи неожиданно столкнулись с невозможностью получения взрослых особей при использовании ядер клеток некоторых тканей и линий эмбриональных стволовых клеток (ESC) [31, 49]. Линии ESC удобны в работе по клонированию млекопитающих, поскольку можно провести предварительный анализ и отбор по нужному признаку, узнать половую принадлежность клеток линии, возраст (количество пассажей, пройденных этой линией), ввести чужеродную ДНК и определить ее локализацию для получения клонов трансгенных животных, а также обеспечить нужным количеством материала [49, 55].

Эффективность использования разных линий ESC при создании клонов отражена в работах [49, 53, 56].

Генетический материал клеток некоторых организмов (дрозофила, аскарида) неизменен только в зародышевых клетках, а в соматических — наблюдается потеря фрагментов ДНК. Илменс на дрозодиле показал невозможность получения взрослых особей методом ПЯ. Яйцеклетки с пересаженными ядрами на определенных стадиях приостанавливали свое развитие (часто с отклонением от нормы) [57]. Сейчас накапливается материал об отличиях взрослых клеток и клеток зародышевых

путей млекопитающих (импринтированные гены, теломерные участки, теломеразы).

Пересадка ядер нейронов коры головного мозга взрослой мыши не приводила к развитию клонов [31]. Различную способность к успешному клонированию обнаруживали клетки V (еще не дифференцированные) и P (дифференцированные) зон коры головного мозга 17,5-дневных эмбрионов мышей, что, по мнению авторов, свидетельствует о каких-то «драматических» изменениях в клетках дифференцированных P зон. Авторы предположили, что происходят существенные модификации в структуре ДНК, скорее всего, подобные таковым в клетках иммунной системы [40]. Подтверждением этому являются результаты работ по созданию клонов с использованием ядер лимфоцитов, тимуса и селезенки [58].

Развитие клонированных зародышей в самках-реципиентах сопровождается высокими доимплантационными потерями, которые колеблются у мышей в пределах 32—70 % [31, 48], а у КРС и овец 60—80 % [53, 54], что намного выше, чем при оплодотворении *in vitro* и микрохирургическом введении спермы непосредственно в оолазму. Доимплантационные потери связаны, по-видимому, с травматичностью операции по пересадке ядер, с нарушением регуляторных механизмов, обеспечивающих взаимоотношение ядра и цитоплазмы, несоответствием клеточной массы зародыша моменту имплантации. По оценкам Куботы и соавт. [45], постимплантационная гибель у КРС составляет до 60 %. У всех исследованных видов животных отмечено удлинение срока беременности, как правило, увеличение массы плодов (LOS синдром) и плацент, что часто заставляет делать Кесарево сечение. Постнатальная смертность значительно ниже, чем пренатальная, хотя у коз отмечали отсутствие пренатальной гибели плодов при 50 % постнатальном отходе [50].

У мертворожденных телят-клонов наблюдали нарушение сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а у овец — еще и нарушения в печени. Постнатальная смертность чаще всего связана с нарушением водно-солевого обмена, повышенным кровяным давлением, затрудненным дыханием (сразу на момент родов и во время вакцинации) [17, 44, 52, 59]. Выжившие животные, как правило, не отличались от сверстников в контроле.

Испытание мышей-клонов, созданных посредством ПЯ кумулюсных клеток, по многим поведенческим реакциям не выявило их отличий от нормы. Три теста (момент открытия глаз, реакция на дотрагивание до ушей, разворачиваемость на 180°, если мышенок лежит вниз головой) обнаружили

Эффективность клонирования млекопитающих.

Вид млекопитающих	Тип клеток — доноров ядер	Количество модифицированных ооцитов	Количество живых новорожденных/взрослых особей, %	Литературный источник
Овца	Эмбриональный эпителий	244	5/2 (0,8)	[15]
	Эмбриональные фибробласты	507	6/4 (0,8)	[17]
	Эмбриональные фибробласты	417	14/3 (0,7)	[43]
	Эпителий молочной железы	277	1/1 (0,4)	[16]
Коза	Эмбриональные фибробласты	366	6/1 (0,1)	[50]
Крупный рогатый скот	Неделящиеся эмбриональные фибробласты	276	4/3 (1,1)	[18]
	Эмбриональные фибробласты (старееющая культура)	1896	6/6 (0,3)	[46]
	Клетки кумулюса	99	5/2 (2,0)	[44]
	Эпителий яйцевода	150	3/2 (1,3)	[44]
	Взрослые фибробласты <i>in vitro</i>	1103	6/4 (0,4)	[45]
	Эмбриональные фибробласты	240	1/1 (0,5)	[47]
	Гранулезные клетки	404	5/5 (1,2)	[19]
Мышь	Клетки кумулюса	1345	16/10 (0,7)	[31]
	Клетки Сертоли	159	1/0	[31]
	Незрелые клетки Сертоли	1846	16/11 (0,6)	[41]
	Линия R1 (эмбриональные стволовые клетки)	1765	5/1 (0,05)	[38]
	Эмбриональные стволовые клетки	1087	26/13 (1,2)	[38]
	Взрослые фибробласты	418	8/0	[49]
	Нейроны	717	3/1 (0,4)	[48]
	Эмбриональные нейроны коры головного мозга	288	1/0	[31]
	У зона	117	5/5 (4,3)	[40]
	Р зона	182	2/1 (0,1)	[40]

различия, которые, очевидно, можно отнести за счет большей массы детенышей, бывшей в пределах нормы на момент родов, но почти в два раза превышавшей контроль к 12 месяцам [60]. Авторы выяснили, что повышенная масса клонов не влияла на другие функции (фертильность, подвижность и т. д.) [61].

F1 потомки клонов (от скрещивания клонированных самок и самцов) имели хотя и меньшую массу, но она все равно превышала массу контрольных животных и мышат, развившихся из зародышей, культивированных *in vitro*. При клонировании мышей в течение шести генераций (клон 2 от клона 1 и т. д.) масса мышей оставалась схожей с таковой мышей первой генерации. Увеличения массы детенышей и плацент с каждой последующей генерацией не отмечалось [62].

Масса мышей — клонов шестой генерации была большей, чем у мышей, произошедших от пересаженных ядер криоконсервированных клеток и зародышей, культивированных *in vitro*. По мнению

авторов, это свидетельствует о том, что на увеличение массы клонированных животных влияют либо использование разных методов, либо биологические процессы при ПЯ, либо то и другое. В большинстве случаев увеличение массы происходило за счет ожирения. Исследование плазмы крови клонированных животных выявило достоверное увеличение содержания лептина и инсулина [53]. Однако Ланза и соавт. [63] не обнаружили каких-либо нарушений у клонированных телят: все 24 клонированных животных были здоровыми и по многим показателям не отличались от контрольных. Остается выяснить, чем определяются нарушения в развитии клонов: их видовой принадлежностью, способами ПЯ, различной эпигенетической изменчивостью у видов и типов клеток, взятых для ПЯ, или совокупностью этих и других факторов.

Поскольку у мышей при клонировании в основном использовали метод Гонолулу, а у КРС и овец — электрослияние, то можно было предположить, что на возникновение аномалий у клонов

может оказывать влияние гетероплазмия и чужая митохондриальная ДНК.

Эукариотические клетки содержат два различных генома — один располагается в ядре (ядДНК), а второй — в митохондриях (мтДНК). Если ядерный геном подчиняется менделевскому распределению, то мтДНК имеет материнское наследование [64], поскольку отцовские митохондрии, поступающие при оплодотворении в яйцеклетки, элиминируются в течение первых делений с помощью неизвестного механизма [65, 66]. Ооцит млекопитающих содержит приблизительно 100 тыс. копий мтДНК, но репликация последней отсутствует до бластоцист [67]. Таким образом, каждая соматическая клетка имеет несколько тысяч или десятков тысяч молекул мтДНК на клетку [68]. При пересадке ядер в энуклеированный ооцит методом электрослияния мтДНК может быть либо только ооцита, либо ооцита и мтДНК, привнесенной от донора (гетероплазмия). Анализ мтДНК у 10 клонированных овец показал наличие только материнской мтДНК [69]. Однако авторы допускают наличие гетероплазмии, поскольку было исследовано недостаточное количество материала (четыре ткани клонов). В литературе описано слияние ооцита с другой цитоплазмой, что также приводило к гетероплазмии [70, 71]. Эти авторы отметили не только наличие гетероплазмии, но и ее сегрегацию в последующих поколениях. Кроме того, сегрегация у потомков была тканеспецифической. Наличие гетероплазмии отмечено и при клонировании КРС. Был проведен анализ соотношения материнской и донорской мтДНК в зависимости от возраста клеток доноров на разных стадиях онтогенеза клонов, а также их распределения по органам. Донорская мтДНК составляла 0—4 %. Отсутствие донорской мтДНК в некоторых клонах авторы объясняют механизмами, сходными с таковыми, происходящими при естественном оплодотворении и оплодотворении *in vitro*, а также возможной потерей митохондрий при длительном культивировании и криоконсервации донорских клеток [72]. Установить связь между аномалиями в развитии телят и процентным соотношением донорской мтДНК не удалось. Из 10 исследованных телят-клонов три не имели видимых аномалий, хотя несли от 0,4 до 1 % донорской мтДНК [73, 74]. На основании приведенных в литературе данных складывается впечатление, что идет селекция против привнесенной мтДНК, а если так, то необходимо выяснить, каково влияние донорской мтДНК на развитие зародышей на более ранних стадиях онтогенеза, когда наблюдается высокий уровень внутриутробной гибели.

В процессе эволюции на концах хромосом сформировалась так называемая теломерная ДНК с характерной линейной последовательностью азотистых оснований. Теломерная ДНК с 3'-концов представлена повторами триплетов, различающихся у разных видов. Неспаренными для соединения с теломеразой остаются 10—15 азотистых оснований ДНК [75]. Теломераза — рибонуклеопротеид, осуществляющий несколько циклов копирования и удлинения на «отстающей» нити ДНК, чтобы обеспечить нормальное копирование последнего фрагмента Оказаки и тем самым длину теломер. Без теломеразы после каждого деления происходило бы укорочение 3'-конца теломер [76].

Известно, что теломеразная активность в соматических клетках либо отсутствует, либо представлена очень низкими уровнями [77], в то время как в «бессмертных» клеточных линиях (HeLa) и на ранних доимплантационных этапах онтогенеза теломереза четко определяется [78—80]. Теломеры хромосом клеток млекопитающих укорачиваются с возрастом, а в культурах *in vitro* — с количеством клеточных делений [81]. Потеря теломерной ДНК ведет к нестабильности хромосом, «слипанию» их концов, возникновению дицентриков и колец, однако мутации по теломеразной мРНК не мешали размножению мышей в течение четырех генераций [82]. Поэтому возник вопрос о том, отражает ли длина теломер физиологический возраст. Тем не менее, когда началось клонирование млекопитающих, исследователей заинтересовало, какова будет продолжительность жизни клонов и будет ли «возраст» клетки отражаться на их продолжительности жизни.

Первое исследование теломерных участков хромосом Долли поразило экспериментаторов. Оказалось, что теломерные участки не только не совпадали с таковыми шестилетней овцы-донора, но укоротились в результате кратковременного культивирования донорских клеток в системе *in vitro* [83]. Теломерные участки ДНК Долли были меньше, чем у ягнят того же возраста в контроле. Однако у других исследованных видов (КРС, мыши) укорочения теломер не отмечали [15, 46, 80]. У телят, погибших после родов, и живых клонов различий в длине теломер также не было обнаружено. В других случаях [85, 86] наблюдали даже удлинение теломер у клонированных телят, полученных ПЯ эмбриональных фибробластов, находившихся длительное время в культуре до их полного старения. Причем старение клеточных линий определяли не только по числу пассажей и морфологии клеток, но и по способности клеток вступать в S фазу и окрашиваться β -галактозида-

зой. Теломеры в клетках крови клонированных телят были длиннее, чем у их сверстников в норме, а в некоторых случаях длиннее, чем у новорожденных, а теломеры телят, полученных при переносе ядер из «стареющих» фибробластов, были длиннее не только теломер «стареющих» клеток, но и клеток ранних пассажей. Тем не менее, с возрастом теломеры клонированных телят также укорачивались. Теломеразная активность у клонированных зародышей телят и зародышей, полученных оплодотворением *in vitro*, была схожей и наибольшего значения достигала у бластоцист [46]. Бэтс и соавт. отметили задержку в появлении теломеразной активности у клонированных телят по сравнению с таковой у зародышей IVF. Несомненно, что различия, наблюдаемые разными авторами, связаны с использованием в качестве доноров ядер клеток разного возраста, разной степени дифференцировки, количества пассажей.

Так, показано, что теломеразная активность эмбриональных фибробластов в 16 раз выше подобной активности взрослых, а старение клеток в системе *in vitro* при малом количестве сыворотки снижает ее на 30—50 % по сравнению с таковой клеток ранних пассажей [86]. Необходимо учитывать также видовые особенности животных и, следовательно, клеток доноров ядер по времени активации их собственного генома, а в связи с этим, возможно, и разную теломеразную активность сходных стадий развития. В частности, у мышей теломеры значительно длиннее, чем у других видов [88], а теломеразная активность присутствует в большинстве их взрослых соматических клеток [89]. Кроме того, репрограммирование пересаженных ядер может быть неполным или идти с задержкой, так что изучение теломер у животных, закончивших свой жизненный путь, и сопоставление их у разных видов позволит установить связь между возрастом ядер-доноров и продолжительностью жизни клонов.

Высокий уровень пре- и постнатальной смертности клонированных животных, а также различных аномалий у них чаще всего связывают с геномным импринтингом. Явлению импринтинга посвящено много работ и этот раздел эпигенетики в настоящее время активно исследуют [90—92]. Импринтированными генами называют гены, которые наследуются от матери или отца в репрессированном состоянии и в отличие от других генов экспрессируются моноаллельно. В геноме млекопитающих на сегодняшний день известно около 40 импринтированных генов, хотя по расчетам ряда авторов таких генов должно быть от 100 до 1000 [93, 94]. Импринтированные гены чаще всего со-

браны в ассоциации импринтированных локусов, в которых у разных генов может наблюдаться как отцовский, так и материнский импринт.

Импринтированные гены характеризуются стадие- и тканеспецифической экспрессией. Среди наиболее изученных импринтированных генов мышей можно назвать *Igf2*, *Igf2r*, *H19*, *Mash2*, *Ins1*, *Ins2*. Гены *Igf2r* и *Mash2* в доимплантационном периоде развития мышей экспрессируются биаллельно, а затем наблюдается экспрессия только материнских аллелей этих генов [95, 96]. Ген *Ins2* подвержен материнскому импринтингу лишь во внезародышевых тканях [97], а гены *H19* и *Snrpn* импринтированы во всех тканях и на всех стадиях развития, но у первого отмечают отцовский импринт, а у второго — материнский [98, 99]. Ген *Igf2* экспрессируется только с отцовского аллеля, но оба аллеля экспрессируются в течение всего онтогенеза в мягкой и паутинной оболочках головного мозга [100]. Импринтированным является и ген *Xisf*, локализованный на X-хромосомах и обуславливающий их инактивацию, при этом он экспрессируется только с инактивированных X-хромосом.

Инактивация X-хромосом случайна во всех тканях, кроме внезародышевых, где инактивируются, в основном, отцовские X-хромосомы [101, 102]. В основе импринтинга лежат структурные изменения импринтированных локусов, происходящие во время формирования женских и мужских половых клеток и приводящие к различиям в экспрессии.

Механизмы становления импринтинга до сих пор остаются малоисследованными. Однако основную роль в поддержании импринтинга отводят специфическому метилированию цитозиновых оснований ДНК. В последние годы появились доказательства того, что метилирование не является единственным механизмом, обуславливающим импринтинг генов [103, 104]. Эпигенетическое репрограммирование генных импринтов происходит в клетках зародышевых линий. В примордиальных половых клетках зародыша геном подвергается деметилированию, стирается аллельспецифическое метилирование, связанное с импринтингом, и наблюдается биаллельная экспрессия импринтированных локусов [98]. Пересадка ядер из примордиальных половых клеток самца в энуклеированный ооцит обеспечивала зародышу развитие только до 9,5 дней. Переводя клетки, лишённые импринта, от этих зародышей в химеры, не удавалось значительно продлить их жизнеспособность. Эти зародыши развивались не намного дольше — до 12,5 дней [105]. В таком же ключе была выполнена работа Коно и соавт. по ПЯ нерастущих ооцитов, лишен-

ных импринтов, в знклеированные ооциты МП. Такие зародыши останавливались в развитии на стадии восьмиклеточной морулы [106].

Таким образом, было доказано, что зародыши, лишенные импринтов, не способны к полноценному развитию и что стирание импринтов и их возникновение происходят в половых клетках. Процесс уничтожения эпигенетической памяти реализуется на 10,5—11,5 день эмбрионального развития, когда первичные половые клетки мигрируют в половые бугорки. Эта миграция начинается и заканчивается в вышеуказанные сроки. Потеря импринтов не является одномоментным событием, а охватывает определенный временной интервал для каждого импринтированного гена. На 12,5—13,5 день эмбрионального развития отмечают полное деметилирование геномов половых клеток и потерю моноаллельной экспрессии [107].

В норме при оплодотворении в отцовском и материнском геномах происходит ряд модификаций. Женские пронуклеусы в яйцеклетках метилированы слабо, а спермии поступают в яйцеклетки транскрипционно молчаливыми, с высоким уровнем метилирования, с хроматином, упакованным в протамины. Но уже через 2—3 ч после оплодотворения уровень метилирования мужских пронуклеусов падает, в то время как степень метилирования женского генома увеличивается в результате метилирования *de novo* [108, 109]. Через 3—6 ч степень метилирования обоих геномов становится практически одинаковой, а через 8 ч отцовский геном почти полностью деметилируется, в то время как материнский — деметилируется постепенно, на протяжении трех раундов репликации. В первые же часы после оплодотворения наблюдаются структурные изменения отцовского генома — происходит его деконденсация с заменой протаминов на гистоны.

Репликацию и транскрипцию начинает первым отцовский геном [110]. На стадии 16—32 клеточных морул геном зародышей становится деметилированным. Это второй этап деметилирования. Предполагают, что деметилирование на преимплантационной стадии онтогенеза может быть предпосылкой для формирования плюрипотентных стволовых клеток, что весьма существенно для дальнейшего развития [93]. Необходимо отметить, что деметилирование на преимплантационной стадии не является полным. Такие импринтированные гены, как *H19*, *Snrpn*, *Rasgrf1*, остаются метилированными на протяжении всего этого периода [98, 99, 111, 112]. Механизмы, позволяющие сохранять метилирование импринтированных генов при полном деметилировании генома зародыша, еще пред-

стоит выяснить. Метилирование генома *de novo* наступает на стадии расширенной бластулы.

Какие же события происходят после ПЯ в ооцит? Идет ли такое же репрограммирование, сохраняют ли импринты гены, происходит ли деметилирование и синтез белка? К сожалению, в настоящее время мало известно о репрограммировании донорского генома. Однако нормальное развитие зародышей невозможно без раннего репрограммирования генома, так как геном у мышей активируется уже на стадии двух клеток [14]. Ким и соавт. проследили изменение хроматина пересаженных ядер кумулюсных клеток в зависимости от их активации. Если ПЯ происходила до активации, то более 50 % реконструированных зародышей развивались до морул-бластоцист, однако при ПЯ в активированные ооциты лишь 1 % зародышей с пересаженными ядрами доходил до морул. Этих зародышей исследовали для выяснения их причастности к событиям, связанным с регуляцией транскрипции: изменению транскрипционной активности и чувствительности к ДНКазе I, накоплению белков, связывающих ее с ТАТА боксом (ТВР). Все эти события оказались сходными с таковыми при развитии диплоидных партеногенетических зародышей. Транскрипционная активность пересаженных ядер прекращалась и возобновлялась лишь на поздней одноклеточной стадии. ТВР-белки накапливались на ранней и поздней одноклеточной стадиях, а чувствительность к ДНКазе I вначале увеличивалась, а затем снижалась. Ничего подобного не наблюдалось при ПЯ в уже активированный ооцит. По-видимому, все упомянутые события необходимы, чтобы дифференцированные ядра преобразовались и вступили в деление [113].

Еще первые работы по изучению процесса репрограммирования генома зародыша с пересаженными ядрами (ядра восьмиклеточной морулы пересаживали в знклеированную зиготу) выявили изменения белкового синтеза на доимплантационной стадии развития. Из белков, в норме синтезирующихся у двуклеточных зародышей, 18 % синтезировались с меньшей скоростью у таких же зародышей с пересаженными ядрами. Снижение скорости синтеза белков, но не изменение их паттерна, было отмечено на всех исследованных стадиях вплоть до восьмиклеточной морулы [114, 115]. Нарушения в репрограммировании ядер у КРС при переносе их в ооцит по сравнению с контролем были выявлены на доимплантационной стадии развития, а затем в плодный и в постнатальный периоды [51, 116].

Кэнг и соавт. установили, что у клонированных зародышей КРС уровень метилирования гено-

ма на доимплантационной стадии практически не отличался от такового у донорских клеток. Однако, исследуя сателлитные последовательности I, II и Bov-B ДНК, у бластоцист-клонов обнаружили существенное метилирование при полном отсутствии такового в норме.

Кроме того, авторы отметили вариабельность в изменчивости метилирования этих и других исследованных районов ДНК у клонов, на основании чего было сделано предположение о том, что деметилированию клонированных бластоцист мешает метилтрансфераза, поддерживающая в соматических клетках определенный уровень метилирования. Чтобы выяснить, связаны ли факторы метилирования с ядром или цитоплазмой, ПЯ проводили не в ооцит, а в зиготу с последующим образованием тетраплоидных зародышей. Деметилирование генома тетраплоидов было аналогично таковому у диплоидных бластоцист, но у тетраплоидов с пересаженными ядрами последовательности Bov-B и сателлитной ДНК I не обнаруживали полного деметилирования, хотя уровни их метилирования были ниже, чем у диплоидных бластоцист с пересаженными ядрами. Это дало возможность авторам предположить наличие неизвестного механизма, с помощью которого осуществляется деметилирование генома зародышей.

Нарушения в метилировании выявлены и у клонированных мышей. Анализ степени метилирования, проведенный в плацентах, показал, что при наличии различных морфологических нарушений и увеличении их массы в 2—5 раз уровень метилирования на 99,5 % совпадал с нормой. Однако более углубленный анализ позволил обнаружить изменения в метилировании CpG островков, при этом степень метилирования отличалась в разных плацентах между собой и по сравнению с контролем. Те же закономерности отмечены для клеток кожи и почек [117]. Среди выявленных аномалий развития клонированных овец, КРС и мышей чаще наблюдается увеличенная масса как в пренатальном, так и в постнатальном периоде онтогенеза. Этот синдром «большого потомка» (LOS) был исследован рядом авторов не только на наличие морфологических и биохимических изменений, но и в отношении его возможной связи с эпигенетическими модификациями [53, 118, 119]. У плодов овец с LOS был понижен уровень мультифункционального белка Igf2r, участвующего в росте детенышей [53].

Исследование другого импринтированного гена — *Igf2* (также связанного с развитием плодов) на разных стадиях онтогенеза и в разных органах клонированных животных показало отсутствие ка-

ких-либо нарушений в его транскрипции. Экспрессия этого гена была моноаллельной, как и в норме. В то же время у LOS клонов уровень *Igf2* связывающего белка (*IgfBP2*) был повышен по сравнению с нормой [118, 119]. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что изменение метилирования отдельных CpG нуклеотидов имеет более важное значение для развития, чем общий уровень метилирования.

Весьма интересные результаты получены при исследовании у клонов эпигенетических программ, связанных с X-хромосомой. Выяснилось, что эпигенетические маркеры, возникшие на X-хромосомах в процессе гаметогенеза и ответственные за случайную инактивацию их в трофэктодерме, эквивалентны маркерам X-хромосом соматических клеток, а именно — в момент делений—дроблений обе X-хромосомы у клонов были активными. Далее, в постимплантационном периоде, так же как и в норме, у самок отмечалась инактивация одной из X-хромосом, которая была случайной у зародыша и специфической в трофэктодерме. Инактивация X-хромосом в трофэктодерме определялась детерминантами X-хромосом соматического ядра, инактивировались в ней те X-хромосомы, которые были инактивированы в донорских ядрах. В случае пересадки ядер эмбриональных стволовых клеток с двумя инактивированными X-хромосомами инактивация их была случайной как в зародышах, так и в трофэктодерме [120].

Установлено, что успех развития клонов до бластоцист значительно выше при использовании ядер ESC, чем при пересадке ядер соматических клеток. Это свидетельствует о том, что ядра недифференцированных клеток либо более податливы для репрограммирования, либо требуют меньшей степени перепрограммирования, чем ядра соматических клеток. ESC привлекают исследователей удобством работы с ними, однако они обнаруживают достаточно высокую нестабильность экспрессии генов, которая наблюдается не только у отдельных линий ESC, но и у субклонов одной колонии [121]. На момент родов выход детенышей-клонов из ядер ESC ниже, чем при использовании ядер соматических клеток, что авторы связывают с нарушением экспрессии импринтированных генов. Подобное нарушение отмечено при переводе клеток в систему *in vitro*, при этом обнаружено влияние различных культуральных сред на экспрессию отдельных импринтированных генов [122], что является очень важным моментом, свидетельствующим о необходимости тщательной отработки условий культивирования. Этот вывод подтверждают и результаты работ, где показано, что культивирование зароды-

шей *in vitro* влияет на экспрессию упомянутых генов не только до имплантации, но сказывается и на дальнейшем развитии, включая пренатальный период онтогенеза [123, 124].

Исследование экспрессии генов *H19*, *Igf2* [121] и *Igf2*, *H19*, *Igf2r*, *U2af1-rs* [125] выявило нарушения не только в самих ESC, но и в разных тканях плодов-клонов, полученных при пересадке ядер ESC; и если в первом исследовании [121] авторам не удалось установить связи между возникновением аномалий и нарушением экспрессии импринтированных генов, то в другой работе [125] между ними была найдена прямая зависимость. Отбор линий ESC по наличию минимальных отклонений в экспрессии приводил к внешне «нормальному» развитию клонов. Однако морфологический анализ (20 % погибших) детенышей показал наличие у них внутренних кровоизлияний. При этом среди 3000 проанализированных белков только 0,2 % имели количественные отклонения от нормы [114, 115, 125].

В практическом отношении развитие и совершенствование техники, а также методов и знаний технологии клонирования млекопитающих имеют весьма важное значение. С помощью клонирования можно не только спасти исчезающие виды животных, но и расширить элитное воспроизводство сельскохозяйственных животных, размножить ценных трансгенных животных, способных обеспечить человека необходимыми белками [126]. Благодаря клонированию усиливается интерес к геному сельскохозяйственных животных для идентификации генов, аллели которых контролируют хозяйственно важные признаки. А сопоставление геномов человека и животных позволит разобраться в информации о нарушениях, приводящих к патологиям человека [127, 128].

Исследование клонированных животных дает также возможность составить программу по увеличению продолжительности жизни человека, выявить специфические для каждого возраста заболевания и определить гены, ответственные за долголетие. Укорочение теломер у клонированных овец поставило вопрос о наличии «молекулярных часов», отвечающих за продолжительность жизни [129].

Клонирование стимулировало исследования в области импринтинга, биохимических процессов ранних стадий онтогенеза, изучения эмбриональных стволовых клеток, а также возможностей использования его в терапии и трансплантологии [130].

В настоящее время клонирование млекопитающих с помощью трансплантации ядер — малоэф-

фективный в прикладном отношении процесс, в результате которого большинство клонированных особей погибает на эмбриональной стадии развития, а оставшиеся в живых имеют различные аномалии развития. Однако для решения многих фундаментальных проблем биологии углубленное изучение процесса клонирования путем трансплантации ядер дифференцированных клеток представляет особый интерес, так как ставит вопрос о том, что же происходит при перепрограммировании донорского ядра, каковы механизмы этого процесса, какие факторы цитоплазмы именно неоплодотворенной яйцеклетки (а не зиготы!) в нем участвуют и почему цитоплазма зиготы уже не способна обеспечить кардинальное репрограммирование трансплантированного ядра. Решение этих и многих других вопросов, возникающих при исследовании клонированных животных, несомненно, будет способствовать пониманию механизмов, лежащих в основе развития млекопитающих.

L. M. Morozova, I. N. Vagyna, A. P. Solomko

Present state and prospects of mammalian cloning

Summary

The current data on cloning of mammals are analysed in the review. Recent problems determined by the main achievements and restrictions in mammalian cloning are also considered. Among these the source of donor nuclei, optimal stages of cell cycle for replaced nuclei, techniques for their transplantation, and efficiency of pre- and postimplantation development of clones, as well as defects and relationship with imprinting modification, are discussed.

Л. И. Морозова, И. М. Вагина, О. П. Соломко

Сучасний стан та проблеми клонування ссавців

Резюме

Огляд присвячено аналізу літературних даних з клонування ссавців. Розглядаються проблеми, пов'язані з досягненнями й обмеженнями у клонуванні ссавців: джерела донорських ядер, оптимальні фази клітинного циклу для пересаджуваних ядер, методи їхньої трансплантації, ефективність до- і постімплантаційного розвитку клонів, дефекти їхнього розвитку і зв'язок з модифікацією імпринтіа.

ПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evsikov S. V., Morozova L. M., Solomko A. P. Role of ooplasmic segregation in mammalian development // Roux's Arch. Develop. Biol.—1994.—N 203.—P. 199—204.
2. Evsikov S. V., Morozova L. M., Solomko A. P. Role of the nucleocytoplasmic ratio in development regulation of the early mouse embryo // Development.—1990.—109, N 2.—P. 323—328.
3. Евсиков А. В., Соломко А. П. Уровень и характер трансляции у доимплантационных зародышей мыши с подавленным цитокинезом // Онтогенез.—1999.—№ 2.—С. 103—109.
4. Евсиков А. В., Соломко А. П. Изменение времени запуска

- кавитации у химерных зародышей CB6F1↔BALB/c // Цитология и генетика.—1998.—№ 3.—С. 84—87.
5. Briggs R., King T. J. Living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1952.—38.—P. 455—463.
 6. Danielli J. E., Lorch J. J., Ord H. J., Wilson E. G. Nucleus and cytoplasm in cellular inheritance // Nature.—1955.—176.—P. 1114—1115.
 7. Bromhall J. D. Nuclear transplantation in rabbit egg // Nature.—1975.—258.—P. 719—722.
 8. Illmensee K., Hoppe P. C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos // Cell.—1981.—23.—P. 9—18.
 9. McGrath J., Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion // Science.—1983.—220.—P. 1300—1302.
 10. Surani M. A., Barton S. C., Norris M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis // Nature.—1984.—308.—P. 548—550.
 11. Tsunoda Y., Yasui T., Tokunaga T., Uchida T., Sugie T. Pronuclear transplantation in the mouse // Jap. J. Anim. Reprod.—1985.—31.—P. 130—134.
 12. Willadsen S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos // Nature.—1986.—320.—P. 63—65.
 13. Kwon O. Y., Kono T. Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 13010—13013.
 14. Telford N. A., Watson A. Y., Schultz G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species // Mol. Reprod. Develop.—1990.—26.—P. 90—100.
 15. Campbell K. H. S., McWhir J., Ritchie W. A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line // Nature.—1996.—380.—P. 64—66.
 16. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. I., Campbell K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nature.—1997.—385.—P. 810—813.
 17. Schnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. S. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts // Science.—1997.—278.—P. 2130—2133.
 18. Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kanue J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce deLeon F. A., Robbl J. M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts // Science.—1998.—280.—P. 1256—1258.
 19. Polejaeva I. A., Chen Sh.-H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Ball S., Dal Y., Boone J., Walker Sh., Ayares D. L., Colman A., Campbell K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells // Nature.—2000.—407.—P. 86—90.
 20. Yang X., Jiang S., Kovacs A., Foote R. H. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer // Biol. Reprod.—1992.—47.—P. 636—647.
 21. Wakajama T., Perry A. C., Zuccotti M., Johnson K. R., Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei // Nature.—1998.—394.—P. 369—374.
 22. Meng L., Ely J. J., Stouffer R. L., Wolf D. R. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer // Biol. Reprod.—1997.—57.—P. 457—459.
 23. Taeyoung S., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., Buck S., Murphy K., Lyons L., Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation // Nature.—2002.—415.—P. 859—861.
 24. Woods G. L., White K. L., Vanderwall D. K., Li G.-P., Aston K. I., Bunch T. D., Meerdo L. N., Pate B. J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer // Science.—2003.—300.—P. 1354.
 25. Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Beyhan Z., Memili E., McKusick B., First N. L. Bovine oocyte cytoplasm support development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species // Biol. Reprod.—1999.—60.—P. 1496—1502.
 26. Campbell K. H. S., Loi P., Otaegui P. J., Wilmut I. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer // Rev. Reprod.—1996.—1.—P. 40—46.
 27. Campbell K. H. S., Ritchie W. A., Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development // Biol. Reprod.—1993.—49.—P. 933—942.
 28. McGrath J., Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro* // Science.—1984.—226.—P. 1317—1318.
 29. Cheong H.-T., Takahashi Y., Kanagawa H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes // Biol. Reprod.—1993.—48.—P. 958—963.
 30. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase // Nature.—1990.—344.—P. 503—508.
 31. Solter D. Mammalian cloning: advances and limitation // Nat. Rev. Genet.—2000.—1.—P. 199—207.
 32. Kim J.-M., Ogura A., Nagata M., Aoki F. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer // Biol. Reprod.—2002.—67.—P. 760—766.
 33. Wassarman P. M., Litscher E. S. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization // Cells Tissues Organs.—2001.—168.—P. 36—45.
 34. Kirkman-Brown J. C., Sutton K. A., Florman H. M. How to attract a sperm // Nat. Cell Biol.—2003.—5.—P. 93—96.
 35. Arney K. L., Bao S., Bannister A. J., Kouzarides T., Surani M. A. Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote // Int. J. Develop. Biol.—2002.—46.—P. 317—320.
 36. Kikyo N., Wade P. A., Guschin D., Ge H., Wolffe A. P. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI // Science.—2000.—289.—P. 2360—2362.
 37. Modlinski J., Karasiewicz J. Somatic cloning in mammals // Med. Wieku Rozwoj.—2001.—1, N 1.—P. 9—25.
 38. Ono Y., Shimozawa N., Murguruma K., Kimoto S., Hioki K., Tachibana M., Shinkai Y., Ito M., Kono T. Production of cloned mice from embryonic stem cells arrested at metaphase // Reproduction.—2001.—122.—P. 731—736.
 39. Wakayama T., Rodriguez I., Perry A. C. F., Yanagimachi R., Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1999.—94.—P. 14984—14989.
 40. Yamazaki Y., Makino H., Hamaguchi-Hamada K., Hamada Sh., Sugino H., Kawase E., Miyata T., Ogawa M., Yanagimachi R., Yagi T. Assessment of developmental totipotency of neural cells in cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2001.—98.—P. 14022—14026.
 41. Ogura A., Inoue K., Ogonuki N., Noguchi A., Takano K., Nagano R., Suzuki O., Lee J., Ishino F., Matsuda J. Production of male cloned mice from fresh, cultured and cryopreserved immature Sertoli cells // Biol. Reprod.—2000.—62.—P. 1579—1584.
 42. Sato K., Hosako K., Ohi S. Mouse fetus by nuclear transfer

- from embryonic stem cells // *Hum. Cell.*—2000.—13.—P. 197—202.
43. *McGreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H. S., Colman A., Schnieke A. E., Kind A. J.* Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells // *Nature.*—2000.—405.—P. 1066—1069.
 44. *Kato Y., Tahi T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult // *Science.*—1998.—282.—P. 2095—2098.
 45. *Kubota Ch., Yamakuchi H., Todoroki J., Mizoshita K., Tabara N., Barber M., Yang X.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 990—995.
 46. *Lanza R. P., Cibelli J. B., Blackwell K., Cristofalo V. J., Francis M. K., Baerlocher G. M., Mak J., Schertzer M., Chavez E. A., Sawyer N., Lansdorp P. M., West M. D.* Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells // *Science.*—2000.—288.—P. 665—669.
 47. *Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A. C. F.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei // *Science.*—2000.—289.—P. 1188—1190.
 48. *Wakayama T., Yanagimachi R.* Cloning of male mice from adult tail-tip cells // *Nat. Genet.*—1999.—22.—P. 127—128.
 49. *Rideout III W. M., Wakayama T., Wutz A., Eggan K., Jackson-Grusby L., Dausman J., Yanagimachi R., Jaenisch R.* Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning // *Nat. Genet.*—2000.—24.—P. 109—110.
 50. *Keefer C. L., Baldassarre H., Keyston R., Wang B., Bhatia B., Bilodeau A. S., Zhou J. F., Leduc M., Downey B. R., Lazaris A., Karatzas C. N.* Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro* matured oocytes // *Biol. Reprod.*—2001.—64.—P. 849—856.
 51. *Kang Y.-K., Koo D.-B., Park J.-S.* Influence of oocyte nuclei on demethylation of donor genome in cloned bovine embryos // *FEBS Lett.*—2001.—499.—P. 55—58.
 52. *Wells D. N., Misica P. M., Dey T. A., Tervit H. R.* Production of cloned lambs from an established embryonic cells line: a comparison between *in vivo* and *in vitro* matured cytoplasts // *Biol. Reprod.*—1997.—57.—P. 385—393.
 53. *Eggan K., Akutsu H., Loring J., Jackson-Grusby L., Klemm M., Rideout III W. M., Yanagimachi R., Jaenisch R.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—98.—P. 6209—6214.
 54. *Rideout III W. M., Eggan K., Jaenisch R.* Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome // *Science.*—2001.—293.—P. 1093—1098.
 55. *Babinet C., Cohen-Tannoudji I.* Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem [ES] cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology // *Ann. Acad. Bras. Sci.*—2001.—73.—P. 365—385.
 56. *Tsunoda T., Kato Y.* Nuclear transplantation of embryonic stem cells in the mouse // *J. Reprod. Fertil.*—1993.—98.—P. 537—540.
 57. *Illmensee K.* Transplantation of embryonic nuclei into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster* // *Nature.*—1968.—219.—P. 1268—1269.
 58. *Wakayama T., Yanagimachi R.* Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type // *Mol. Reprod. Develop.*—2001.—58.—P. 376—383.
 59. *Renard J. P., Chastant S., Chesne P., Richard C., Marchal J., Cordonnier N., Chuvatte P., Vignon X.* Lymphoid hy-
- poplasia and somatic cloning // *Lancet.*—1999.—353.—P. 1489—1491.
 60. *Tamashiro K. L. K., Wakayama T., Blanchard R. J., Blanchard D. C., Yanagimachi R.* Postnatal growth and behavioral development mice cloned from adult cumulus cells // *Biol. Reprod.*—2000.—63.—P. 328—334.
 61. *Tamashiro K. L. K., Wakayama T., Akutsu H., Yamazaki X., Lachey J. L., Wortman M. D., Seeley R. J., D'Alssio D. A., Woods S. C., Yanagimachi R., Sakai R. R.* Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring // *Nat. Med.*—2002.—8.—P. 262—267.
 62. *Wakayama T., Shinkai Y., Tamashiro K. L. K., Niida H., Blanchard D. C., Blanchard R. J., Ogura A., Tanemura K., Tachibana M., Perry A. C. F., Colgan D. F., Mombaerts P., Yanagimachi R.* Cloning of mice to six generations // *Nature.*—2000.—407.—P. 318—319.
 63. *Lanza R. P., Cibelli J. B., Faber D., Sweeney R. W., Henderson B., Nevala W., West M. D., Wettstein P. J.* Cloned cattle can be healthy and normal // *Science.*—2001.—294.—P. 1893—1894.
 64. *Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. C.* Maternal inheritance of human mitochondrial DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77.—P. 6715—6719.
 65. *Kaneda H., Hayashi J.-I., Takahama S., Taya Ch., Lindahl K. F., Yonekawa H.* Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92.—P. 4542—4546.
 66. *Ankel-Simons R., Cummins J. M.* Mis conceptions about mitochondria and mammalian fertilization, implications for theories on human evolution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 13859—13863.
 67. *Piko L., Taylor K. D.* Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos // *Develop. Biol.*—1987.—123.—P. 364—374.
 68. *King M. P., Attardi G.* Human cells lacking mt DNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation // *Science.*—1989.—244.—P. 500—503.
 69. *Evans M. J., Gurer C., Loike J. D., Wilmut I., Schnieke A. E., Schon E. A.* Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep // *Nat. Genet.*—1999.—23.—P. 90—93.
 70. *Meirelles F. V., Smith L. C.* Mitochondrial genotype segregation during preimplantation development in mouse heteroplasmic embryos // *Genetics.*—1998.—148.—P. 877—883.
 71. *Jenuth J. P., Peterson A. C., Shoubridge E. A.* Tissue-specific selection for different mt DNA genotypes in heteroplasmic mice // *Nat. Genet.*—1997.—16.—P. 93—95.
 72. *Steinborn R., Schinogl P., Zakhartchenko V., Achmann R., Scherthaner W., Stojkovic M., Wolf E., Muller M., Brem G.* Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning // *Nat. Genet.*—2000.—25.—P. 255—257.
 73. *Steinborn R., Zakhartchenko V., Jelezjkov J., Klein D., Wolf E., Muller M., Brem G.* Composition paternal mitochondrial DNA in cloned bovine embryos // *FEBS Lett.*—1998.—426.—P. 352—356.
 74. *Steinborn R., Zakhartchenko V., Wolf E., Muller M., Brem G.* Non-balanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplast-blastomere fusion // *FEBS Lett.*—1998.—426.—P. 357—361.
 75. *Blackburn E. H.* Structure and function of telomeres // *Nature.*—1991.—350.—P. 569—571.
 76. *Van Steensel B., De Lange T.* Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1 // *Nature.*—1997.—388.—P. 740—743.

77. Hastie N. D., Dempster M., Dunlop M. G., Thompson A. M., Green D. K., Allshire R. C. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing // *Nature*.—1990.—343.—P. 866—868.
78. Morin G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesized TTAGGG repeats // *Cell*.—1989.—59.—P. 521—529.
79. Counter C. M., Hahn W. C., Wei W., Caddle St. D., Beyersbergen R. L., Landorp P. M., Sedivy J. M., Weinberg R. A. Dissociation among *in vivo* telomerase activity, telomere maintenance and cellular immortalization // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1998.—95.—P. 14723—14728.
80. Tian X. C., Xu J., Yang X. Normal telomere lengths found in clone cattle // *Nat. Genet.*—2000.—26.—P. 272—273.
81. Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts // *Nature*.—1990.—345.—P. 458—460.
82. Blasco M. A., Lee H.-W., Hande M. P., Samper E., Lansdorf P. M., De Pinho R. A., Greider C. W. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA // *Cell*.—1997.—91.—P. 25—34.
83. Shiels P. G., Kind A. J., Campbell K. H. S., Waddington D., Wilmut I., Colman A., Schnieke A. E. Analysis of telomere lengths in cloned sheep // *Nature*.—1999.—399.—P. 316—317.
84. Mitalipov Sh., Wolf D. P. Mammalian cloning: possibilities and treats // *Ann. Med.*—2000.—32.—P. 462—468.
85. Vogel G. In contrast to Dolly cloning resets telomere clock in cattle // *Science*.—2000.—288.—P. 586—587.
86. Betts D. H., Bordignon V., Hill J. R., Winger Q., Westhusin M. E., Smith L. C., King W. A. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2001.—98.—P. 1077—1082.
87. Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. H., Chiu Ch.-P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsfeiner S., Wreight W. E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // *Science*.—1998.—279.—P. 349—352.
88. Kipling D., Cooke H. J. Hypervariable ultra-long telomeres in mice // *Nature*.—1990.—347.—P. 400—402.
89. Prowse K. R., Greider C. W. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1995.—92.—P. 4818—4822.
90. Solter D. Imprinting // *Int. J. Develop. Biol.*—1998.—42.—P. 951—954.
91. Колюхов Б. В., Платонов Е. С. Геномный импринтинг у млекопитающих // *Генетика*.—2001.—37.—С. 5—17.
92. Reik W., Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote // *Nat. Genet.*—2001.—27.—P. 255—256.
93. Reik W., Surani A. M. Genomic imprinting.—Oxford: Oxford Univ. press, 1997.—Vol. 209.—245 p.
94. Falls J. E., Pulford D. J., Wylie A. A., Jirtle R. U. Genomic imprinting: implications for human disease // *Amer. J. Pathol.*—1999.—154.—P. 635—647.
95. Lerchner W., Barlow D. P. Paternal repression of the imprinted mouse *Igf2r* locus occurs during implantation and stable in all tissues of the postimplantation mouse embryo // *Mech. Develop.*—1997.—61.—P. 141—149.
96. Guillemot F., Caspary T., Tilghman S. M., Copeland N. G., Gilbert D. J., Anderson D. J., Joyner A. L., Rossant J., Nagy A. Genomic imprinting of *Mash-2* a mouse gene required for trophoblast development // *Nat. Genet.*—1995.—9.—P. 235—241.
97. Giddings S. J., King C. D., Harman K. W., Flood J. F., Carnaghi L. R. Allele specific inactivation of insulin 1 and 2 in the mouse yolk sack indicated imprinting // *Nat. Genet.*—1994.—6.—P. 310—313.
98. Szabo P. F., Mann J. R. Allele-specific expression and total expression levels of imprinted genes during early mouse development: implications for imprinting mechanism // *Genes Develop.*—1995.—9.—P. 3097—3108.
99. Tremblay R. D., Saam J. R., Ingram R. S., Tilghman S. M., Bartolomei M. S. A parental specific methylation imprint marks the alleles of mouse *H19* gene // *Nat. Genet.*—1995.—9.—P. 407—413.
100. De Chiara T. M., Robertson E. J., Efstratiadis S. A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene // *Cell*.—1991.—64.—P. 849—859.
101. Brockdorff N., Ashworth A., Kay G. F., Cooper P., Smith S., McCabe V. M., Norris D. P., Penny G. D. Conservation of position and exclusive expression of mouse *Xist* from the inactive X-chromosome // *Nature*.—1991.—351.—P. 329—331.
102. Takagi N., Sasaki M. Preferential inactivation of the paternal derived X-chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse // *Nature*.—1995.—276.—P. 640—642.
103. Szabo P. E., Pfeifer G. P., Mann J. R. Characterization of novel parent-specific epigenetic modifications upstream of the imprinted mouse *H19* gene // *Mol. Cell Biol.*—1998.—18.—P. 6767—6776.
104. Caspary T., Cleary M. A., Baker C. C., Guan X. J., Tilghman S. M. Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster // *Mol. Cell Biol.*—1998.—18.—P. 3466—3474.
105. Kato Y., Rideout III W. M., Hilton K., Barton S. C., Tsunoda Y., Surani M. A. Development potential of mouse primordial germ cells // *Development*.—1999.—126.—P. 1823—1832.
106. Kono T., Obata Y., Yoshimizu T., Nakahara T., Carroll J. Epigenetic modification during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse // *Nat. Genet.*—1996.—13.—P. 91—94.
107. Lee J., Inoue K., Ono R., Ogonuki N., Kohda T., Kaneko-Ishino T., Ogura A., Ishino F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11,5 primordial germ cells // *Development*.—2002.—129.—P. 1807—1817.
108. Howlett S. K., Reik W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development // *Development*.—1991.—113.—P. 119—127.
109. Oswald J., Engemann S., Lane N., Mayer W., Olek A., Fundelc R., Dean W., Reik W., Walter J. Active demethylation of paternal genome in the mouse zygote // *Curr. Biol.*—2000.—10.—P. 475—478.
110. Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf Th. Demethylation of the zygotic paternal genome // *Nature*.—2000.—403.—P. 501—502.
111. Olek A., Walter J. The pre-implantation ontogeny of the *H19* methylation on imprint // *Nat. Genet.*—1997.—17.—P. 275—276.
112. Morison I. M., Reeve A. E. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals // *Hum. Mol. Genet.*—1998.—7.—P. 1599—1609.
113. Kim J.-M., Ogura A., Nagata M., Aoki F. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer // *Biol. Reprod.*—2002.—67.—P. 760—766.
114. Latham K. E., Correls J. I., Solter D. Alteration in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nuclei to enucleated 1-cell embryos // *Develop. Biol.*—1994.—163.—P. 341—350.
115. Latham K. E., Solter D., Schultz P. M. Activation of a two-cell

- stage specific gene following transfer of heterologous nuclei into enucleated mouse embryos // *Mol. Reprod. Develop.*—1991.—30.—P. 182—186.
16. Kang Y.-K., Koo D.-B., Parks L.-S., Choi Y.-H., Chung A.-S., Lee K.-K., Han Y.-M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos // *Nat. Genet.*—2001.—28.—P. 173—177.
 17. Ohgane J., Wakayama T., Kogo Y. DNA methylation variation in cloned mice // *Genesis.*—2001.—30.—P. 45—50.
 18. Young L. E., Fernandes K., McEvoy T. G., Butterwith S. C., Gutierrez C. Y., Carolan C., Broadbent P. J., Robinson J. J., Wilmut I., Sinclair K. D. Epigenetic change in *Igf2r* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture // *Nat. Genet.*—2001.—27.—P. 153—154.
 19. Young L. E., Gutierrez C. G., Butterwith S. C., Robinson J. J., Broadbent P. J., McEvoy T. G., Wilmut I., Sinclair K. D. Altered IGF binding protein expression is associated with large offspring syndrome in fetal sheep // *Theriogenology.*—1999.—51.—P. 196.
 20. Eggan K., Akutsu H., Hochedlinger K., Rideout III. W., Yanagimamachi R., Jaenisch R. X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos // *Science.*—2000.—290.—P. 1578—1581.
 21. Humpherys D., Eggan K., Akutsu H., Hochedlinger K., Rideout III. W., Biniszkiwicz D., Yanagimamachi R., Jaenisch R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice // *Science.*—2001.—293.—P. 95—97.
 22. Doherty A. S., Mann M. R. W., Trambly K. D., Bartolomei M. S., Schultz R. M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo // *Biol. Reprod.*—2000.—62.—P. 1526—1535.
 23. Khosla S., Dean W., Brown D., Reik W., Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes // *Biol. Reprod.*—2001.—64.—P. 918—926.
 24. Beverly K. J., Levorse J., Tilghman S. M. Deletion of a nuclease-sensitive region between the *Igf2* and *H19* genes leads to *Igf2* misregulation and increased adiposity // *Hum. Mol. Genet.*—2001.—10.—P. 807—814.
 25. Dean W., Bowden L., Aitchison A., Klose J., Moore T., Meneses J. J., Reik W., Feil R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cells-derived mouse fetuses; association with aberrant phenotypes // *Development.*—1998.—125.—P. 2275—2282.
 26. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier Ph., Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β -casein and κ -casein // *Nat. Biotechnol.*—2003.—21.—P. 157—162.
 27. Bulfield G. Farm animal biotechnology // *Trends Guide Proteomics II.*—2000.—18.—P. 10—13.
 28. Wolf D. P., Meng L., Ouhibi N., Zelinski-Wooten M. Nuclear transfer in resus monkey: practical and basic implication // *Biol. Reprod.*—1999.—60.—P. 199—204.
 29. Gonos E. S. Genetics of aging: lessons from centenarians // *Exp. Gerontol.*—2000.—351.—P. 15—21.
 30. Illmensee K. Cloning in reproductive medicine // *J. Assist. Reprod. Genet.*—2001.—18, N 8.—P. 451—467.

УДК 575.22

Надійшла до редакції 31.10.03