

Глава 3

Раскрашивая клетки

Чтобы проследить судьбу каждой клетки развивающегося эмбриона, я обратилась было к распространенной медузе, дрейфующей в холодных водах западного побережья Северной Америки. Хотя диаметр этой медузы не превышает десяти сантиметров, ее способность к биолюминесценции — самая выдающаяся в Мировом океане.

Потрясенная, она генерирует световые вспышки по краям колокола. Изначально они выглядят как голубые искры, созданные люминесцентным белком экворинном. Но мы не видим их, потому что внутри медузы они проникают в белок с маленькой структурой в центре под названием «хромофор», который поглощает синий свет и переходит в возбужденное состояние, а по мере выхода из него светится зеленым. Осаму Симомура из Принстона выделил этот белок в 1960-х, назвав его зеленым флуоресцентным белком (*green fluorescence protein, GFP*) [1]. Поскольку этот белок важен для проведения широкого спектра исследований, Симомура в 2008 году получил за его открытие Нобелевскую премию.

Сегодня этот белок можно использовать для самых разных целей, например, чтобы отследить распространение вирусных инфекций в организме, понаблюдать за регенерацией поврежденных тканей в организме

аксолотля (амфибии) или в подробностях увидеть, как переплетаются нервные пути в мозге мыши. С помощью генетических трюков и флуоресцентных белков можно покрасить сотни нервных клеток в десятки различных оттенков и создать мозговую раду (rainbow), проявляя калейдоскопом цвета всю красоту нейронных связей [2].

С помощью множества флуоресцентных меток можно представить разные стадии жизни в форме яркой мозаики синего, розового, зеленого и других цветов. Значимость подобных исследований сопоставима с их красотой.

Однако оригинальный белок медузы, выделенный Симомурой, не работал в теплокровном организме. Мне нужен был мощный флуоресцентный маркер, чтобы проследить, как активируются гены в клетках живых эмбрионов млекопитающих по мере развития или установить время рождения отдельных клеток и окончательного решения их судьбы.

GFP начали использовать в качестве маркера еще в 1994 году, когда Мартин Чалфи из Колумбийского университета в Нью-Йорке сообщил, что с помощью флуоресцентного белка можно продемонстрировать активацию гена, за что и разделил Нобелевскую премию с Симомурой [3].

Мне тоже хотелось побаловаться этой светящейся зеленой краской. Это был год, когда Мартин Эванс и я получили стипендию Европейской организации молекулярной биологии, что привело меня в Кембридж, где я могла доработать *GFP*, чтобы проследить действия генов в живом эмбрионе млекопитающего и в стволовых клетках. Ген *GFP* можно было встроить в *ДНК* млекопитающего и тем самым пометить белок

флуоресцентным маркером. Если бы клетка использовала ген для производства этого белкового компонента, то под ультрафиолетом, благодаря *GFP*, она светилась бы зеленым.

В то время меня глубоко интересовало нарушение симметрии, полярность и структурные детали развития эмбриона. Именно поэтому я загорелась концепцией самоорганизации и идеями великого английского математика Алана Тьюринга, который в 1936 году создал теорию алгоритмов, а во Вторую мировую войну взломал код нацистской шифровальной машины Enigma [4]. Тьюринга интересовали узоры, созданные самой природой: он хотел опровергнуть представление о том, что только Бог способен творить чудеса. Мне нравилась его идея, что в природных узорах нет ничего сверхъестественного.

Я знала, что клеткам мышинных и человеческих эмбрионов присуща пластичность в вопросах окончательного превращения в конкретный тип клеток. Я хотела понять базовые механизмы этой пластичности, чтобы посмотреть, соответствуют ли они математическим моделям формирования узоров, предложенных Тьюрингом.

Для этого мне надо было пометить клетки, чтобы несколько дней следить за ними и их потомками в развивающемся мышинном эмбрионе. Раньше такого никто не делал, и *GFP* казался мне идеальным помощником. Но прежде всего мне нужно было заставить его светиться в эмбрионе млекопитающего. Тогда этот подвиг еще никому не удавался, поэтому у меня не было готового решения. И как обычно бывает, когда пытаешься сделать что-то в первый раз, у меня ничего не вышло.

Примерно в то время на мою работу обратил внимание Джон Гёрдон. Он был руководителем института, в котором я работала, — Британского института клеточной биологии и онкологии под патронажем благотворительных фондов Wellcome Trust и Cancer Research (переименованного в 2004 году в Институт имени Джона Гёрдона). Считалось, что Джон бился над биологическими загадками еще в школьные годы в Итоне, а к исследованиям приступил в Оксфордском университете в 1950-х, задавшись одним из важнейших фундаментальных вопросов: действительно ли все клетки тела имеют одинаковый набор генов [5]? В 1966 году Джон сообщил, что, пересадив *ДНК* из ядра клетки молодой лягушки в энуклеированные (лишенные ядер) яйцеклетки, он создал еще одну лягушку. Позже он написал: «Среди всех проведенных нами экспериментов этот, вероятно, является самым важным, ведь он доказывает, что клетка может пройти специализацию и все-таки... [сохранить] весь генетический материал, необходимый для создания полноценного, половозрелого индивидуума... Клонирование дифференцированных и, по всей видимости, даже зрелых клеток как минимум теоретически возможно» [6].

На мой взгляд, это был один из важнейших онтогенетических экспериментов двадцатого века, поскольку он показывал, что дифференциацию клетки можно обратить вспять. Помимо разных научных последствий, этот факт, несомненно, означает, что Джон был пионером клонирования. Учитывая его высокое звание и мой низкий статус, наша встреча, не говоря уже о беседе, казалась маловероятной.

Но однажды, когда я выходила из аудитории, Джон вежливо спросил, над чем я работаю. Я описала ему свои

попытки заставить *GFP* светиться в организме мыши, чтобы с его помощью можно было увидеть активацию отдельных генов и проследить, какие клетки становятся частью мышиноного эмбриона.

Джон был заинтересован. Ему понравилась задача, и он тоже считал ее важной. Кроме того, он уже знал, как заставить продукты гена работать в организме лягушки: суть в том, чтобы вводить в клетку не сам ген, а синтетическую *PHK* — транскрипт гена, используемый клеткой для синтеза белка. Имплантированная *PHK* через несколько часов давала нужный эффект. Эта короткая случайная встреча стала поворотным моментом в моем исследовании.

На следующее утро, придя в лабораторию Мартина, я обнаружила на столе записку. В ней Джон просил меня встретиться и за чашкой чая обсудить *GFP*. Можем ли мы «настроить» *GFP* и для его лягушачьих эмбрионов? Так началась наша совместная работа, утомительная рутина которой переходила изо дня в ночь.

Моя жизнь распределилась между исследованием клеток мышинных эмбрионов в лаборатории Мартина Эванса и ночными исследованиями лягушачьих эмбрионов в лаборатории Джона Гёрдона. У обоих проектов была одна цель: найти такой способ окрашивания клеток, который не мешал бы нормальному развитию эмбриона и в то же время действовал как маркер, позволяющий отследить превращение клеток эмбриона в разные типы.

В Кембридже мне посчастливилось трудиться бок о бок со многими выдающимися учеными. Я познакомилась с Джоном Пайнзом и Джимом Хэйзеллоффом, которые пытались сделать *GFP* более устойчивым, изме-

нив участок гена, отвечающий за скорость разрушения этого белка. Я помню долгие часы, которые провела в лаборатории Джона, обсуждая способы преодоления последней неудачи и стараясь научиться у него мастерству разрезания и сшивания ДНК. В итоге мы создали такой вариант *GFP*, который флуоресцировал при более высоких температурах, характерных для организма млекопитающих. Когда я ввела его в клетки мышиноного эмбриона, они засветились зеленым. Джон назвал этот белок *Magda-modified GFP* (*GFP*, модифицированный Магдой), а в научных статьях мы упоминали его как *MmGFP*. Но, разумеется, правильнее было назвать его *JJmGFP*, то есть *Jim-and-Jon-modified GFP* (*GFP*, модифицированный Джимом и Джоном).

Бывало, закончив работу с мышинными эмбрионами в лаборатории Мартина, когда большинство моих коллег расходились по домам, я спускалась вниз, в лабораторию Джона Гёрдона, чтобы проанализировать лягушачьи эмбрионы, в которые он уже ввел разные варианты *GFP* для проверки. Поскольку в то время он был Магистром колледжа Магдалины, он исчезал в полседьмого вечера, чтобы возглавить ужин за Высоким столом¹.

И пока Джон сидел на официальном ужине с коллегами, я рассматривала его лягушачьи эмбрионы под конфокальным микроскопом, который увеличивал разрешение, собирая на специальной фокальной плоскости свет от изучаемых образцов. Здесь это был первый

¹ Ужин за Высоким столом — одна из традиций колледжа Магдалины: официальный ужин, для присутствия на котором необходимо быть в мантии. — *Примеч. ред.*

и единственный такой микроскоп, поэтому он находился в постоянном использовании, и я резервировала его на вечернее время. После ужина Джон заходил посмотреть на наши результаты. Иногда он был в красном костюме с черным галстуком или огромной красной бабочкой. Учитывая его рыжеватую шевелюру, в таком наряде он был похож на инопланетянина.

Так мы сотрудирачили многие месяцы. Мы хорошо ладили, хотя наши жизненные истории сильно отличались. Джон Гёрдон получил образование в Итоне и был родом из привилегированной семьи. Ну а я, хотя и происходила из благородной польской семьи (так называемой шляхты), мои родные все потеряли во время войны, я училась в государственной школе коммунистической страны, где все должны были быть одинаковыми, без всяких богатств или привилегий. Джон был не только добрым и мыслящим, но и авантюрным. Однажды утром он повез меня на красном спортивном автомобиле любоваться природными красотами весенней Англии, и я внезапно обнаружила себя в дендрарии, гуляющей по чудесному ковру из колокольчиков. В другой раз я уговорила Джона сходить на понравившийся мне фильм, который посмотрела предыдущим вечером. Думаю, он согласился просто из вежливости. Позже он признался, что это был его первый поход в кинотеатр. Мы посмеялись над этим случаем, который был еще одним примером того, насколько мы были разными. Но мы интересовались жизнью друг друга и поэтому подружились. Вспоминая те годы, я осознаю, что Джон был моим наставником. Он несколько раз по-отечески вмешивался, спасая меня от ошибок и помогая принять многие трудные решения, не только научные, но и личные. Я очень эмоциональный

человек (как говорится, нельзя покорить поляка силой, только сердцем), в то время как Джон был довольно рациональным [7]. Порой мы бесконечно дискутировали, пытаюсь понять друг друга.

Хотя моей основной работой было использование *GFP* для изучения развития эмбрионов мышей, своим первым реальным прогрессом в Кембридже я обязана подработкам с лягушачьими эмбрионами. В рамках нашего соглашения Джон показал мне, как имплантировать *GFP* путем введения в лягушачьи клетки синтетических посланников для соответствующих генов. Его персональное попечительство было чрезвычайно полезным. В работе эмбриолога много искусства и ловкости. Наблюдать выполнение технического приема (и на гораздо более крупных лягушачьих клетках) намного полезнее, чем попытки представить весь процесс по сухим книжным указаниям, зачастую лишенным важных подробностей.

В конце концов нам удалось получить зеленый флуоресцентный маркер и применить его для визуализации развития мышц лягушки. Джон увлекся этой работой (к тому же проложившей путь к успешному использованию *GFP* у млекопитающих) и прямо во время службы в университетской часовне набросал карандашом подробный план научной статьи, описывающей наши результаты.

Думаю, это был подходящий фон для наших откровений о сотворении лягушки, наполненных ранее неизвестными деталями онтогенетического развития. Привычная к неспешному ритму описания научных результатов в Польше, я удивилась тому нетерпению, с которым Джон хотел опубликовать статью раньше

всех. Как он сказал, «когда речь идет об открытии, нет никакой второй статьи, только первая». Статья, словно подарок, появилась на страницах журнала *Development* на Рождество 1996 года [8]. Она ознаменовала конец наших совместных экспериментов, но не нашей дружбы.

Затем я успешно применила *GFP* в исследовании мышинных эмбрионов, хотя к тому времени другие ученые без моего ведома успели опробовать этот маркер на клетках млекопитающих [9]. Наверное, из-за того, что они не использовали *GFP* для изучения яйцеклеток или эмбрионов, я и Мартин ничего не знали об их работах.

Джон Пайнз первым показал мне, как улучшить текст моих научных работ. Наша первая совместная статья описывала применение *MmGFP* для отслеживания клеток в живых эмбрионах мышей и была опубликована в 1997 году в *Development* — там же, где вышла наша с Джоном Гёрдоном статья о лягушачьих эмбрионах [10]. Неудивительно, что *Development* стал моим любимым журналом.

Но статья не рассказывала обо всем, что мы обнаружили. Эта первая работа по отслеживанию клеток в живом эмбрионе вызвала не только изумление, но и тревогу. Когда я маркировала в случайном порядке клетки эмбрионов на двух- или четырехклеточной стадиях, я видела, что клетки не вели себя как идентичные друг другу. Они противоречили общепринятому представлению о том, что «разум» первых клеток эмбриона совершенно одинаков и чист. Я предусмотрительно не включила свое открытие в статью для *Development* и сосредоточилась на описании новой технологии отслеживания.

Но я не могла забыть об этих неожиданных результатах и обсудила их с Джоном. Если обе клетки

в эмбрионе двухклеточной стадии и все четыре клетки в эмбрионе четырехклеточной стадии являются идентичными, они должны случайным образом вносить вклад в создание разных частей эмбриона на последующих стадиях. Именно так мой наставник Тарковский интерпретировал результаты новаторского эксперимента 1959 года. Однако это никак не вязалось с моими результатами.

А потом я нашла зацепку, факт, которым пренебрегали при объяснении более ранней работы. Если разделить двухклеточный эмбрион на две отдельные клетки, только одна будет развиваться в целую мышь. Многие пытались превратить две половинки двухклеточного эмбриона в двух мышей, включая ведущих онтогенетиков Энн Макларен и Джинни Папайоану, к которым я вернусь позже. Их эксперименты либо провалились, либо имели крайне низкие показатели успеха. Мы все думали, что проблема была в технике выполнения, а не в различиях между этими ранними клетками. Но что, если мы упустили нечто большее? Что, если в двухклеточном эмбрионе только одна клетка является действительно тотипотентной и поэтому, в отличие от второй клетки, может создать как плаценту, так и сам эмбрион? Если все правда, то изучение этих клеток позволит понять саму тотипотентность и то, когда и как она утрачивается в первый раз.

Подчеркну, что этот эффект не детерминирован — ни в коем случае, ведь эмбрион пластичен: мои эксперименты по отслеживанию «родословной» клеток эмбриона выявили уклон, толчок в определенном направлении развития, а не детерминированный процесс. Что еще проблематичнее — не в каждом эмбрионе этот