

## A natural oocyte component required for the reprogramming of somatic cell nuclei

*Jerome Jullien and John Gurdon*

*The Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute; The Henry Wellcome Building of Cancer and Developmental Biology and the Department of Zoology; University of Cambridge; Cambridge, UK*

*Correspondence to: Jerome Jullien and John Gurdon; Email: [jj256@cam.ac.uk](mailto:jj256@cam.ac.uk) and [j.gurdon@gurdon.cam.ac.uk](mailto:j.gurdon@gurdon.cam.ac.uk)*

*Submitted: 04/05/10; Accepted: 04/05/10*

*Previously published online: [www.landesbioscience.com/journals/cc/article/12019](http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/12019)*

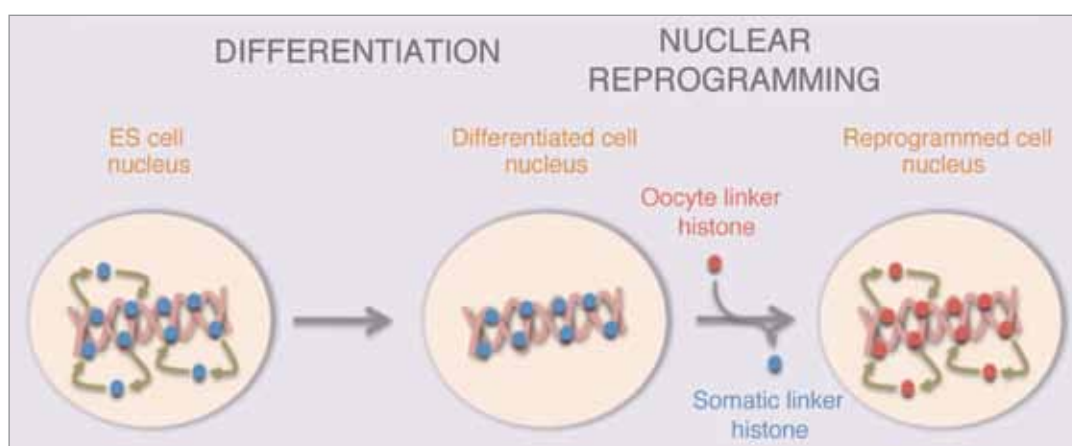
*Comment on: Jullien J, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:5483-8.*

Nuclear reprogramming (NR) presents a possible route towards cell replacement therapy. The prospect of cell replacement via NR has recently gained interest with the rapid development of the iPS technology [1]. This procedure requires the overexpression of transcription factors in somatic cells in order to reprogram them to an ES-like state. This technique however is relatively inefficient and the underlying mechanism seems difficult to analyze since the process has been deemed stochastic [2]. On the other hand, somatic cell nuclear transfer to amphibian eggs or oocytes makes use of natural components with no added genes and works at a very high efficiency; eggs reprogram sperm nuclei with 100 % efficiency. Similarly, following nuclear transfer to eggs, 30 % of nuclei will switch lineage [3].

Amphibian eggs (in second meiotic metaphase) used in our original nuclear transfer work have the advantage of easy availability and large amounts of material. But how gene expression is regulated in nuclei transplanted to eggs is not easy to analyze since the reprogramming process is accompanied by multiple rounds of cell division and DNA synthesis. To circumvent this problem we have transplanted somatic nuclei to the progenitors of eggs, that is oocytes in first meiotic prophase; these cells contain most of the same molecules as eggs many of which are important in embryo

development. Nuclear transfer to oocytes gives an opportunity to identify the natural components of oocytes and eggs required for nuclear reprogramming. We have modified the procedure of nuclear transfer to oocytes to allow realtime monitoring by confocal microscopy of nuclei undergoing reprogramming. Using this approach we have identified a key component of the reprogramming mechanism of eggs and oocytes [4].

Linker histone B4 (H1foo in mouse) is very abundant in eggs and oocytes and is not found in somatic cells. The experiments reported show that this special linker histone is essential for reprogramming somatic cell nuclei. We observe that oocyte linker histone incorporation into transplanted nuclei is an early event in the reprogramming process, prior to gene reactivation. Depletion of oocyte linker histone in oocytes, using antibodies or a dominant negative mutant, greatly reduces gene activation in the course of nuclear reprogramming. The reprogramming process is also associated with an increase of linker histone mobility, a change that is opposite to the decrease in mobility observed during cell differentiation [5,6]. Chromatin associated with oocyte linker histone may be more permissive for the activity of remodelling complex, as seen in vitro [7]. This may lead to a more open chromatin state, with high



**Figure 1. Increased chromatin protein mobility following incorporation of oocyte reprogramming factors. ES cells exhibit high mobility of chromatin protein, including somatic linker histone (left). This «breathing» of ES cell chromatin is lost upon cell differentiation (middle) [5]. During nuclear reprogramming following nuclear transfer to *Xenopus* oocyte a reversal of the differentiation process is observed. Remodelling of transplanted nuclei, including incorporation of the oocyte specific linker histone leads to an increase of the chromatin protein mobility in the reprogrammed chromatin<sub>1</sub> (right).**

mobility chromatin proteins, similar to the “breathing” of chromatin proposed to exist in ES cells (Fig. 1) [5].

Oocyte linker histone contributes to the highly specialized chromatin structure of the oocyte genome. During oogenesis in *Xenopus* the genome undergoes a dramatic remodelling culminating in the formation of lampbrush chromosomes characterized by their extremely active transcription. This specialization of the oocyte is also associated with the emergence of specific components of the basal transcription machinery [8]. Work by Kikyo et al. [9] have demonstrated that the transcription machinery of somatic nuclei incubated in *Xenopus* egg extract is also remodelled. Together these observations suggest that reprogramming by eggs and oocytes involves a global exchange of chromatin component and a switch of the basal transcription machinery of a somatic nucleus to that of the specialized oocyte.

Such a resetting on a genome wide scale is now shown for oocyte specific components such as B4, as well as for post-translational modifications of nucleosomal histones [10].

We believe that the approach described here can lead to the identification of the natural reprogramming factors of oocytes and eggs acting in concert towards gene reactivation from transplanted nuclei. Given the highly specialized nature of the oocyte transcription system, it will be of interest to test whether oocyte reprogramming factors will improve nuclear reprogramming via the iPS route. How different is the reprogramming process in oocytes and eggs to that obtained by transcription factor overexpression in the iPS procedure is indeed not known. Since some of the transcription factors used for iPS generation are present in an oocyte, it is conceivable that the oocyte contains reprogramming activity acting upstream or in concert with these factors.

## References

1. Takahashi K. et al. Cell 2006; 126:663-76.
2. Hanna J. et al. Nature 2009; 462:595-601.
3. Byrne J. A. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:6059-63.
4. Jullien J. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:5483-8.
5. Meshorer E. et al. Dev Cell 2006; 10:105-16.
6. Yellajoshiyula D. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:18568-73.
7. Saeki H. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:5697-702.
8. D'Alessio J. A. et al. Mol Cell 2009; 36:924-31.
9. Kikyo N. et al. Science 2000; 289:2360-2.
10. Murata K. et al. Epigenetics Chromatin 3:4.

Источник: Cell Cycle 9:12, 2261-2262; June 15, 2010; © 2010 Landes Bioscience

## Природный компонент ооцита, необходимый для перепрограммирования ядер соматической клетки

Джером Жюльен и Джон Гёрдон  
Кембриджский университет, Великобритания

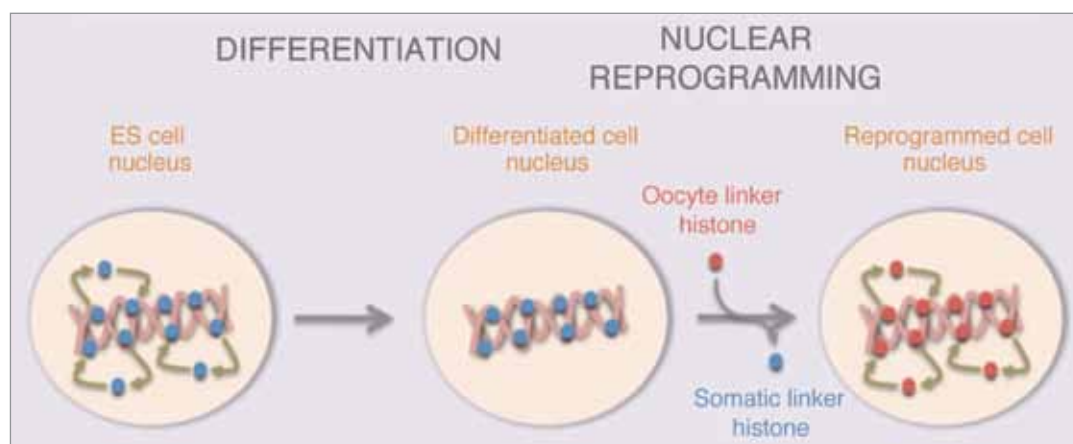
Ядерное перепрограммирование (ЯП) представляет собой возможный путь терапии с помощью замены клеток. Перспектива замены клеток ЯП в последнее время вызвала интерес в связи с быстрым развитием технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Эта процедура требует избыточной экспрессии транскрипционных факторов в соматических клетках, чтобы перепрограммировать их в состояние, подобное эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК). Этот метод, однако, относительно неэффективен, и лежащий в его основе механизм представляется сложным для анализа, так как процесс был признан стохастическим. С другой стороны, перенос ядра соматической клетки в яйца амфибий или ооцита делает возможным использование природных компонентов без добавления генов и работает с очень высокой продуктивностью: яйца перепрограммируют ядра сперматозоидов со 100 % эффективностью. При последующей ядерной пересадке в яйца, 30 % ядер перепрограммируются по прямой линии.

Яйца амфибий (во второй мейотической метафазе), используемые в нашей работе по ядерной передаче, имеют преимущества – доступность и большое количество материала. Не просто анализировать то, как экспрессия генов регулируется в ядрах, пересаживаемых в яйца, так как процесс перепрограммирования сопровождается несколькими циклами деления клеток и синтеза ДНК. Чтобы обойти эту проблему, мы пересаживали соматические ядра в прародителей яиц – ооциты в первой мейотической профазе; эти клетки содержат те же молекулы, что и яйца, многие из которых играют важную роль в развитии эмбриона. Ядерная передача ооцитов дает возможность выявить природные компоненты ооцитов

и яиц, необходимые для перепрограммирования ядер. Мы модифицировали процедуру ядерной передачи ооцитам, чтобы осуществлять мониторинг в реальном времени с помощью конфокальной микроскопии ядер, проходящих перепрограммирование. Используя этот подход, мы определили ключевой компонент механизма перепрограммирования яиц и ооцитов.

Линкерный гистон В4 (H1foo у мышей) содержится в большом количестве в яйцах и ооцитах и не найден в соматических клетках. Эксперименты показывают, что этот специальный линкерный гистон важен для перепрограммирования ядер соматических клеток. Мы наблюдали, что включение линкерного гистона ооцита в трансплантированные ядра является ранним событием в процессе перепрограммирования, до реактивации генов. Истощение ооцитов линкера гистонов в ооцитах с использованием антител или доминантного негативного мутанта значительно уменьшает активацию гена в процессе перепрограммирования ядер. Процесс перепрограммирования также связан с увеличением мобильности линкерного гистона, изменение, противоположное уменьшению подвижности, наблюдается и при дифференцировке клеток. Хроматин, связанный с ооцитом линкерного гистона, может быть более перmissive для деятельности реконструктивного комплекса, как видно *in vitro*. Это может привести к более открытому состоянию хроматина, с высокой мобильностью хроматиновых белков, схожих с «дыханием» хроматина, которое, возможно, существует в ИПСК (рис.).

Ооцит линкерного гистона соответствует узкоспециализированной структуре хроматина ооцитов генома. Во время оогенеза у *Xenopus* геном претерпевает существен-



*Рис. Повышенная мобильность хроматина белка следует за объединением факторов перепрограммирования ооцитов. ИПСК обладают высокой подвижностью хроматина белка, в том числе и соматические линкерные гистоны (слева). Это «дыхание» хроматина ИПСК теряется при дифференцировке клеток (в центре). Наблюдается смена процесса дифференцировки во время ядерного перепрограммирования вслед за ядерной передачей ооцитам Xenopus. Ремоделирование трансплантированных ядер, в том числе включение конкретных линкерных гистонов ооцита, приводит к увеличению мобильности хроматина белка в перепрограммированном хроматине (справа)*

ное ремоделирование, которое завершается формированием хромосом типа ламповых щеток, характеризующихся чрезвычайной активностью транскрипции. Эта специализация ооцита также связана с возникновением конкретных компонентов основного транскрипционного механизма. Работа Kikyo et al. показала, что транскрипционный механизм соматических ядер, выращенных на экстракте яйца Xenopus, тоже может быть реконструирован. Результаты этих наблюдений позволяют предположить, что перепрограммирование с помощью яиц и ооцитов включает глобальную систему обмена компонента хроматина и переключение основного транскрипционного механизма соматического ядра на специализированный ооцит. Такой «сброс» в геномном масштабе теперь показан на ооцитах конкретных компонентов, в частности B4, а также посттрансляционных модификаций нуклеосомальных гистонов.

Мы считаем, что подход, описанный здесь, может привести к выявлению природных факторов перепрограммирования ооцитов и яиц, действующих совместно при реактивации генов из трансплантированных ядер. Учитывая узкоспециализированный характер системы транскрипции ооцитов, будет интересно проверить, улучшат ли факторы перепрограммирования ооцитов ядерное перепрограммирование яиц с помощью пути ИПСК. Чем отличается процесс перепрограммирования в ооцитах и яйцах от получаемой с помощью транскрипционного фактора избыточной экспрессии в процедуре ИПСК, неизвестно. Так как некоторые из факторов транскрипции, используемые для генерации ИПСК, присутствуют в ооцитах, можно предположить, что ооцит обладает перепрограммированной активностью, которая проявляется перед или во взаимодействии с этими факторами.

### Список литературы

1. Takahashi K. et al. Cell 2006; 126:663-76.
2. Hanna J. et al. Nature 2009; 462:595-601.
3. Byrne J. A. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:6059-63.
4. Jullien J. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:5483-8.
5. Meshorer E. et al. Dev Cell 2006; 10:105-16.
6. Yellajoshyula D. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:18568-73.
7. Saeki H. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:5697-702.
8. D'Alessio J. A. et al. Mol Cell 2009; 36:924-31.
9. Kikyo N. et al. Science 2000; 289:2360-2.
10. Murata K. et al. Epigenetics Chromatin 3:4.