



Методы маркирования клеток для изучения судьбы клеточных поколений

А.М. Юнусова¹ , Н.Р. Баттулин^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

В процессе развития многоклеточного организма из одной тотипотентной зиготы образуется огромное количество клеток (триллионы для человека) с разной специализацией. Во взрослом состоянии многие ткани постоянно самообновляются: старые клетки погибают, а из популяции стволовых клеток образуются новые. Изучение судьбы отдельных клеток, их происхождения и родственных связей дает ответы на многие вопросы, связанные как с нормальным развитием, так и с патогенезом. Прямые наблюдения за развивающимися эмбрионами позволили установить судьбу бластомеров асцидии *Styela partita*, а также происхождение всех клеток червя *Caenorhabditis elegans*. Исследователям повезло с объектом: в первом случае происходит естественное «маркирование» бластомеров, во втором, поскольку тело червя прозрачно, можно следить за каждой клеткой нематоды. В большинстве же случаев определение клеточных линий и идентификация субпопуляций стволовых клеток представляют большую трудность для исследователей. Поэтому для отслеживания судьбы отдельных клеток стали разрабатываться методы маркирования, основанные на внесении в клетки специфических меток, которые наследуются в ходе делений. Поскольку все потомки исходной клетки несут одинаковые метки, их можно легко отличить от потомков других клеток. В обзоре обсуждаются методы маркирования клеток с помощью красителей и генетических конструкций, обеспечивающих синтез белков-репортеров, по наличию которых можно установить родство клеток. Особое внимание уделено методам, основанным на внесении наследуемой метки в геном клеток (генетическое маркирование), в том числе вирусному маркированию и клеточному баркодированию. Один из разделов обзора посвящен маркированию клеток с помощью системы CRISPR/Cas – популярного инструмента геномной инженерии.

Ключевые слова: отслеживание судьбы клеточных поколений; методы маркирования клеток; клеточное баркодирование; CRISPR/Cas-маркирование.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Юнусова А.М., Баттулин Н.Р. Методы маркирования клеток для изучения судьбы клеточных поколений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):909-917. DOI 10.18699/VJ16.211

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yunusova A.M., Battulin N.R. Cell-marking techniques for cell lineage tracing. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):909-917. DOI 10.18699/VJ16.211

REVIEW

Received 31.10.2016

Accepted for publication 08.12.2016

© AUTHORS, 2016

Cell-marking techniques for cell lineage tracing

A.M. Yunusova¹ , N.R. Battulin^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

A zygote, the only totipotent cell of the developing organism, transforms into a complex, multicellular entity with billions (for humans) of highly specialized cells and tissues. Most adult tissues are maintained by a combination of highly dynamic processes of senescence, apoptosis and rejuvenation with new cells constantly arising from dispersed depots of stem cells. Studying individual cell fates and their intertwined relations thus aids in understanding ontogenetic development as well as pathogenic processes in the body. Direct observations of developing embryos uncovered the fate of single blastomeres of ascidia and nematode. In both cases, research benefited from the simplicity of these objects, because, in ascidia, each blastomere has unique signatures naturally, and, in nematode, transparency of a worm's 959-cell body allows every cell to be traced through development individually. In most cases, however, studying cellular lineages and identification of stem cells' subpopulations are a true challenge for investigators. To trace the cell's fate, novel methods were invented that introduce special tags into cells, the tags that would be inherited during cell divisions. Every descendent of a marked cell bears the same tag and can easily be distinguished from unrelated cellular neighbors. This review focuses on modern methods for cell tracing with dyes and genetic constructs encoding protein reporters that mark cell lineages. Special focus is on genome-integrated tags (genetic labeling), such as viral and cellular barcoding. One chapter of the review describes novel advancements in the field of CRISPR/Cas9-based cellular barcoding.

Key words: cell lineage tracing; cell-marking techniques; cellular barcoding; CRISPR/Cas-barcoding.

Один из важнейших постулатов клеточной теории гласит: *omnis cellula ex cellula*. Это утверждение, сформулированное Р. Вирховым в 1858 г., означает, что всякая клетка происходит от другой клетки (Mazzarello, 1999). Многоклеточный организм со всем разнообразием клеточных типов берет начало от одной тотипотентной клетки – зиготы. Когда и каким образом происходит принятие клетками решения о дифференцировке в тот или иной тип? Все ли клетки-предшественники в равной мере участвуют в образовании тканей и органов? Являются ли процессы дифференцировки стохастическими (т. е. случайными) или они строго предопределены? Во всех этих вопросах центральным предметом исследования является судьба отдельной клетки в многоклеточном организме. Методы, позволяющие определять потомков отдельных клеток и изучать их судьбу, получили название «methods of lineage tracing», что можно перевести как «методы отслеживания клеточных поколений». В биологии развития эти методы широко используются для составления карт презумптивных зачатков (Kretzschmar, Watt, 2012). Помимо этого, методы отслеживания судьбы клеточных поколений нашли применение и для изучения гетерогенных популяций стволовых и раковых клеток (Buckingham, Meilhan, 2011).

Изучение судьбы клеточных поколений. Историческая справка

Прямое наблюдение – исторически первый способ изучения судьбы отдельных клеток. В конце 19 в. Э. Уилсон, наблюдая под микроскопом за поведением клеток развивающегося эмбриона многощетинкового червя, ввел понятие «клеточная линия» (Wilson, 1892). Позднее, в 1905 г., Э. Конклин установил судьбу отдельных бластомеров эмбриона асцидии *Styela partita*. В этом случае определение родства между клетками было возможным в силу того, что цитоплазма яйца этого вида асцидий различается по цвету: от темно-желтой до темно-серой и прозрачной. При дроблении яйца различные виды цитоплазмы попадают в разные бластомеры, обеспечивая их естественное маркирование, что облегчает наблюдение за делением клеток (Conklin, 1905). Метод прямого наблюдения был также успешно применен и для изучения развития червя *Caenorhabditis elegans* (Sulston, Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). С помощью микроскопии Номарского (интерференционно-контрастная микроскопия) Дж. Салстон смог проследить происхождение всех клеток этой нематоды, пользуясь тем, что ее тело прозрачно. Оказалось, что судьба каждой клетки червя строго детерминирована, а совокупное число клеток, составляющих взрослый организм, постоянно и составляет 959 клеток. Преимуществами прямого наблюдения являются его неинвазивность, а также возможность длительного и непрерывного анализа (Schroeder, 2011). С развитием методов микроскопии в режиме реального времени в этой области удалось добиться большого прогресса. Так, например, исследователи смогли реконструировать раннее развитие эмбрионов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и рыбки *Danio rerio* (Keller et al., 2008; Amat et al., 2014).

Нужно отметить, что в работах Д. Салстона и Э. Конклина не было необходимости метить клетки. Однако в

большинстве случаев исследователь не имеет возможности проследить за судьбой отдельных клеток без внесения специальных меток, позволяющих отличить потомков исследуемой клетки от потомков других клеток. Стали активно развиваться способы маркирования на основе введения в клетку (с помощью инъекций или электропорации) прижизненных красителей и радиоактивных изотопов (Vogt, 1929; Rosenquist, 1970). Во избежание распространения красителя по межклеточным контактам в соседние клетки были разработаны модификации метода с использованием жирорастворимых цианинов, встраивающихся в мембрану клетки, а также флуорохромов, конъюгированных с большими молекулами, такими как декстран, стерически затрудняющими переход молекул между клетками (Axelrod, 1979; Serbedzija et al., 1989; Eagleson, Harris, 1990). Во многих исследованиях также была использована пероксидаза хрена, большой фермент, не способный пройти через щелевые контакты и образующий в результате ферментативной реакции люминесцирующий продукт (Weisblat et al., 1980; Balakier, Pedersen, 1982; Lawson et al., 1986). Например, инъецировав пероксидазу в один из бластомеров двуклеточного эмбриона мыши, исследователи смогли проследить расположение меченых клеток до стадии морулы (Balakier, Pedersen, 1982). Среди ограничений данного метода – разбавление метки при делении клеток, что делает невозможным длительное наблюдение.

Позднее были разработаны способы маркирования клеток, основанные на внесении в их геном репортерных конструкций, как правило, кодирующих флуоресцентные белки или люциферазу, присутствие которых в клетке легко детектируется (Holt et al., 1990; Chalfie et al., 1994). Поскольку такие конструкции стабильно интегрируются в геном и наследуются клеточными поколениями в ходе

Интенсивные испытания ядерного оружия в годы холодной войны (1950–1960) привели к накоплению большого количества радиоуглерода ($C-14$) в атмосфере и, как следствие, к массовому маркированию клеток населения земного шара радиоактивными изотопами. После запрета ядерных испытаний в 1963 г. уровень $C-14$ стал экспоненциально снижаться (De Vries, 1958; Nydal, Lovseth, 1965; Levin, Kromer, 2004). Поскольку при репликации происходит включение этого изотопа в новую цепь ДНК, последняя может выступать в роли своеобразной капсулы времени, храня запись о том, когда произошло событие синтеза ДНК или, иными словами, рождения новой клетки. Группа исследователей из Швеции и США, проведя анализ количества $C-14$ в разных тканях и органах, смогла установить время жизни некоторых типов клеток. Так, например, оказалось, что возраст кортикальных нейронов в затылочной части мозга совпадает с возрастом организма, что свидетельствует об отсутствии процессов нейрогенеза в этой области мозга после рождения (Spalding et al., 2005). Этим же методом было установлено, что у человека к 50 годам 55 % кардиомиоцитов составляют клетки, образовавшиеся во время эмбриогенеза, тогда как другие 45 % образовались в ходе перинатального развития (Bergmann et al., 2009).

делений, решается проблема с разбавлением метки. На основе флуоресцентных белков была разработана технология Brainbow (по аналогии с rainbow), с помощью которой были маркированы нейроны головного мозга мыши (Livet et al., 2007; Cai et al., 2013). Эта методика основана на введении в геном организма конструкции из нескольких последовательно расположенных генов разных флуоресцентных белков (рис. 1). Эти гены разделены lox-сайтами, и только один ген в конструкции, расположенный первым и взаимодействующий с регуляторной областью, экспрессируется. Под воздействием Cre-рекомбиназы происходят вырезание и инверсия генов флуоресцентных белков, вследствие чего любой другой ген получает возможность взаимодействовать с регуляторной областью и экспрессироваться. Учитывая тот факт, что в геном интегрируется несколько копий такой конструкции, а рекомбинационные события случайны, каждая клетка характеризуется уникальным паттерном экспрессии флуоресцентных белков. Например, первая конструкция Brainbow-1.0 кодировала три флуоресцентных белка и при наличии трех копий в геноме обеспечивала 10 разных комбинаций, а при восьми копиях исследователи смогли детектировать от 90 до 160 псевдоцветов (Livet et al., 2007). Технология Brainbow является важным инструментом для изучения коннектома, поскольку окрашивание каждого нейрона и его отростков в определенный цвет позволяет визуализировать взаимодействия между нейронами (Lichtman et al., 2008). Конструкция Flybow была использована для визуализации нейронов и их связей в мозге плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Hadjiconomou et al., 2011). Подобную конструкцию, названную Skinbow, использовали для изучения регенерации кожи рыбки *Danio rerio* (Chen et al., 2016).

Генетическое маркирование

В этом разделе описаны способы маркирования клеток, основанные на внесении в геном клеток специальных меток – от хромосомных перестроек до ДНК-баркодов.

Хромосомные перестройки как метки

Первый эксперимент с использованием хромосомных перестроек как меток был проведен в начале 60-х годов прошлого века Э. Беккером под руководством Мак-Каллоха и Тилла, признанных исследователей стволовых клеток. Цель эксперимента заключалась в отслеживании судьбы гемопоэтических клеток при трансплантации. Ранее уже было показано, что клетки костного мозга, трансплантированные мышам, получившим летальную дозу радиации, образуют на поверхности селезенки скопления клеток эритроидного и гранулоцитарного ряда (Till, McCulloch, 1961). Однако было неизвестно, являются ли эти клеточные скопления клонами – потомками всего одной клетки, обладающей потенциалом к образованию эритроцитов, и гранулоцитов. Э. Беккер провел свой знаменитый эксперимент, суть которого заключалась в следующем: клетки костного мозга были облучены сублетальной дозой радиации, вызывавшей хромосомные перестройки, а затем трансплантированы облученному реципиенту. Таким образом, трансплантированные клетки несли уникальные хромосомные перестройки, которые можно наблюдать

под микроскопом. Оказалось, что каждая колония состоит преимущественно из клеток, несущих одну и ту же хромосомную мутацию, т. е. являющихся клонами. Такие мультипотентные стволовые клетки впоследствии были названы колониеобразующими единицами (Becker et al., 1963). Последующие работы с использованием данного метода подтвердили этот результат и показали, что трансплантированные клетки обнаруживаются не только в костном мозге реципиента, но и в тимусе и лимфатических сосудах. Таким образом, с помощью этого метода было прослежено и происхождение колоний клеток, и их локализация в организме (Wu et al., 1967, 1968). Очевидно, однако, что такое сильное воздействие, как радиация, вызывающая хромосомные перестройки, в значительной мере изменяет судьбу клеток, поэтому поведение облученных клеток нельзя считать идентичным поведению нативных клеток в естественных условиях.

Сайты интеграций ретровирусов как метки

Ретровирусы представляют собой семейство РНК-содержащих вирусов, способных интегрироваться в геном клетки при заражении. Благодаря этому свойству векторные конструкции на основе дефективных (неспособных к репликации) ретровирусов часто используются генными инженерами в качестве доставщиков генетического материала в геном клеток. Поскольку встройка происходит случайным образом, каждая инфицированная клетка характеризуется уникальным сайтом интеграции ретровирусной последовательности. Паттерн интеграции наследуется дочерними клетками, и, следовательно, может использоваться как метка. В первых работах с использованием этой методики определение сайта интеграции ретровируса осуществлялось с помощью Саузерн-блоттинга (Capel et al., 1990; Jordan, Lemischka, 1990). Впервые было убедительно доказано, что стволовые клетки крови мыши являются мультипотентными и, кроме того, способны достаточно продолжительное время поддерживать самообновление, т. е. не дифференцироваться (Dick et al., 1985; Mazurier et al., 2004). Позднее были предложены более чувствительные методы для определения сайтов интеграции на основе ПЦР (Laukkanen et al., 2005; Keller et al., 2008; Maetzig et al., 2011) и микрочипового анализа (Schepers et al., 2008; van Heijst et al., 2009). Помимо изучения особенностей дифференцировки гемопоэтических клеток, методика подобного рода была использована и для изучения процессов нейрогенеза млекопитающих *in vivo*. Было показано, что стволовые клетки гиппокампа мультипотентны – они способны образовывать и нейроны, и олигодендроциты, и астроглию (Palmer et al., 1997). Также с помощью ретровирусного маркирования внутри эмбриональных стволовых клеток человека удалось выделить две субпопуляции, участвующие в самообновлении, но дающие разный вклад в дифференцировку *in vivo* (формирование тератом в иммунодепрессивной мыши) и *in vitro* (дифференцировка в культуре) (Stewart et al., 2010).

ДНК-баркоды как метки

Необходимо отметить, что термин «баркодирование» знаком отечественным специалистам преимущественно в контексте молекулярного баркодирования – метода, ис-

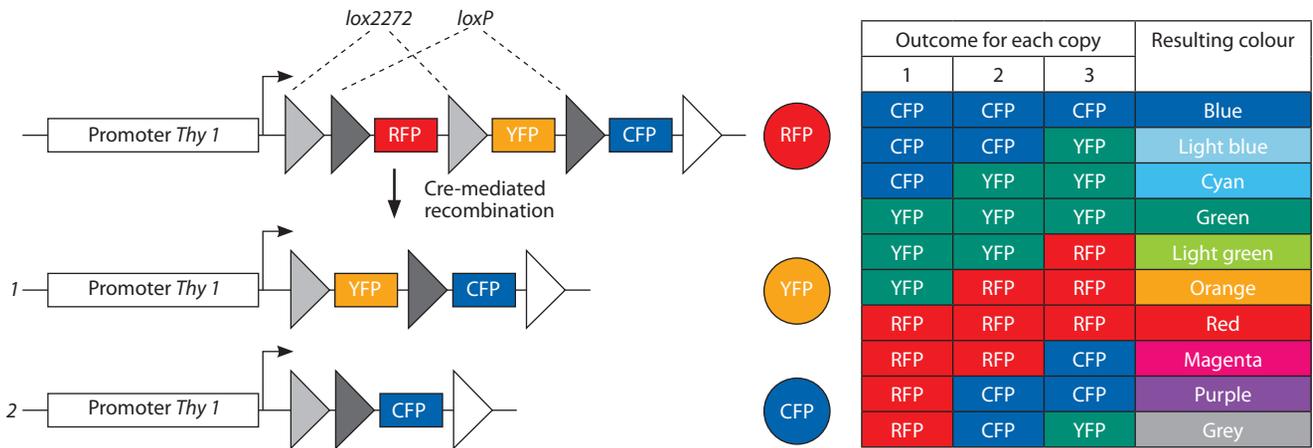


Fig. 1. Brainbow-1.0, the simplest Brainbow construction (Livet et al., 2007).

Cre-mediated recombination switches expression to either (1) YFP or (2) M-CFP. Two equally possible outcomes of the recombination event are shown. The *Thy1* promoter drives the expression of the constructs in neuronal cells. The table shows a list of pseudocolors that are assigned to every possible combination of three fluorophores (based on three copies of the construct in the genome).

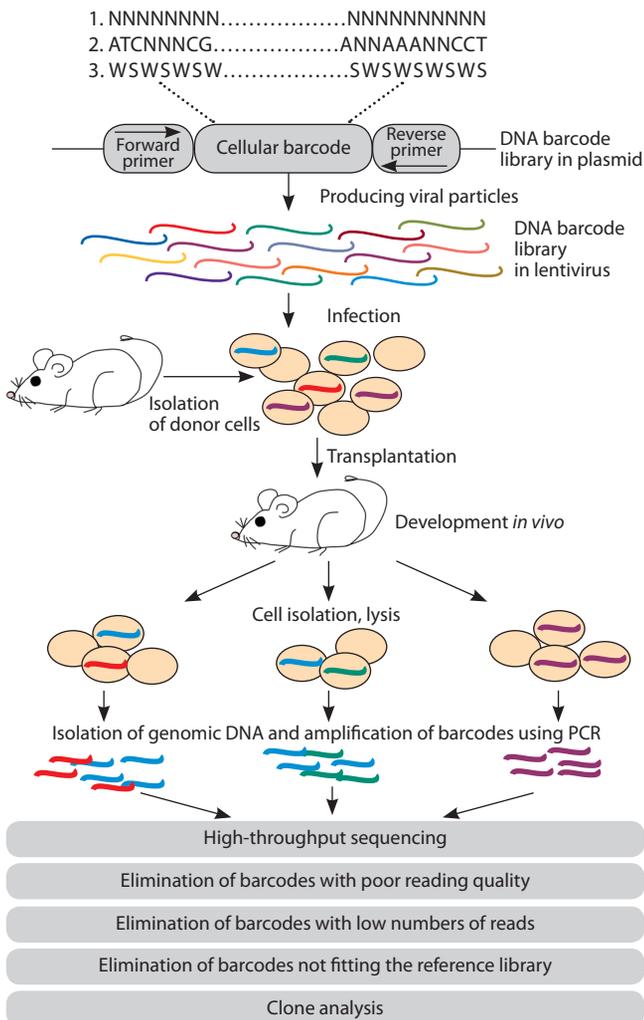


Fig. 2. Methods for cellular barcoding (Lu et al., 2011, with modifications).

The picture illustrates several variants of DNA-barcodes: (1) completely degenerate barcode; (2) partially degenerate barcode, in which random and constant nucleotides are combined; (3) GC content-balanced barcode (W stands for “weak” (AT) nucleotides and S for “strong” (GC) nucleotides).

пользуемого для устранения ошибок ПЦР и секвенирования при анализе данных высокопроизводительного секвенирования. Однако к маркированию клеточных поколений эта процедура не имеет отношения. Для этой цели был разработан метод клеточного баркодирования (cellular barcoding) (Scheepers et al., 2008; van Heijst et al., 2009). Основной принцип клеточного баркодирования заключается во внесении в геном клетки специальной метки – ДНК-баркода. ДНК-баркод представляет собой искусственно синтезированную вырожденную (или полувыврожденную) последовательность нуклеотидов, которая интегрируется в геном с помощью вирусов и наследуется в ходе делений следующими клеточными поколениями (рис. 2). Метод ДНК-баркодирования логично вытекает из описанного выше ретровирусного маркирования. Однако, в отличие от последнего, для того чтобы определить клональную принадлежность клеток, достаточно секвенировать только последовательность ДНК-баркода, а не анализировать сайты интеграции провирусов. Определение ДНК-баркодов проводится, как правило, с помощью массового параллельного секвенирования (Gerrits et al., 2010; Lu et al., 2011; Cheung et al., 2013; Gerlach et al., 2013; Naik et al., 2013; Nguyen et al., 2014a, b). Отличительная особенность данного метода заключается в возможности анализировать судьбу сотен клеток одновременно. Поскольку технология клеточного баркодирования является довольно новой и перспективной, а, кроме того, недостаточно освещенной в русскоязычной литературе, мы хотим более подробно описать некоторые особенности и ограничения этой методики.

Исследователям, собирающимся использовать клеточное баркодирование, необходимо обратить внимание на следующие экспериментальные параметры: 1) размер библиотеки баркодированных вирусов, 2) трансдукцию клеток баркодированными вирусами, а также 3) технические повторы.

1. Размер (разнообразие) библиотеки ДНК-баркодов. Поскольку внесение ДНК-баркода в геном клетки осуществляется с помощью ленти- или ретровирусных кон-

струкций, под размером библиотеки подразумевается количество уникальных ДНК-баркодов в лентивирусной библиотеке (т.е. число вирусных частиц с уникальными баркодами). Теоретически разнообразие ДНК-баркодов обуславливается длиной вырожденной части самого баркода. Так, например, для ДНК-баркода, содержащего 20 вырожденных позиций, количество уникальных комбинаций составляет более чем 10^{12} . Тем не менее на практике это разнообразие сильно ограничено в силу того, что получение библиотеки баркодированных лентивирусов включает в себя стадии клонирования ДНК-баркода в плазмидный вектор и сборку вирусных частиц. Эффективность этих стадий невысока и не позволяет сохранить все теоретическое разнообразие ДНК-баркодов. При этом чем больше клеток нужно маркировать, тем больше должен быть размер библиотеки ДНК-баркодов. В противном случае велика вероятность того, что неродственные клетки могут быть помечены одинаковым вариантом ДНК-баркода. В такой ситуации они интерпретируются как потомки одной и той же клетки. Для выбора оптимального соотношения количества уникальных ДНК-баркодов к количеству клеток создатели клеточного баркодирования предложили следующее эмпирическое правило: число маркируемых клеток должно составлять не более 10 % от количества уникальных вариантов баркодов (Naik et al., 2014). Для оценки разнообразия ДНК-баркодов рекомендуется проведение высокопроизводительного секвенирования ДНК-баркодов на разных этапах создания библиотеки, начиная от плазмидных векторов и заканчивая клетками, зараженными баркодированными вирусами. На основе полученных данных создается референсная библиотека, содержащая все доступные варианты ДНК-баркодов. Такая библиотека позволяет надежно отличить «настоящие» ДНК-баркоды от ошибок ПЦР и секвенирования. В обзоре Л.В. Быстрых с коллегами (Bystrykh et al., 2012) приведен пример, в котором при секвенировании пяти колоний клеток исследователи получили 1503 баркода, причем только шесть из них представляли пять начальных клеток (одна из клеток несла два баркода), тогда как остальные баркоды являлись ошибками ПЦР и секвенирования и были исключены из анализа как «шум». В другом обзоре, посвященном клеточному баркодированию, указано, что для включения ДНК-баркода в референсную библиотеку необходимо, чтобы количество прочтений этого баркода при секвенировании составляло не менее 0.00001 % от общего количества прочтений (Naik et al., 2014). Таким образом, чем больше разнообразие ДНК-баркодов в библиотеке, тем больше должна быть глубина секвенирования. Поэтому анализ состава ДНК-баркодов с помощью секвенирования возможен только при относительно небольшом размере библиотеки. В тех случаях, когда секвенирование полной библиотеки невозможно по ряду причин, исследователи прибегают к математическим методам, позволяющим по конечному разнообразию ДНК-баркодов в отдельных клетках/колониях клеток приблизительно оценить «изначальное» разнообразие библиотек, например с помощью симуляции Монте-Карло (Lu et al., 2011; Wu et al., 2014).

2. Трансдукция клеток баркодированными вирусами. Термин «трансдукция» означает внесение в геном клеток

генетического материала с помощью вирусов. Известно, что при трансдукции количество вирусных интеграций (multiplicity of infection) на геном клетки подчиняется распределению Пуассона. Значение MOI, равное 1, говорит о том, что в среднем на одну клетку приходится одна вирусная интеграция, при этом клетка инфицирована одной вирусной частицей с вероятностью 36.7 %, двумя – 18.39 %, тремя – 6.13 %, а вероятность того, что в клетку не попала ни одна вирусная частица, – 36.7 %. Таким образом, чем выше значение MOI, тем большая доля клеток несет одну и более вирусных интеграций. В контексте клеточного баркодирования это означает, что часть клеток несет два и больше ДНК-баркодов, что также затрудняет интерпретацию клеточных взаимоотношений. Так, например, одна клетка с тремя ДНК-баркодами будет воспринята как три клетки с индивидуальными ДНК-баркодами и одинаковой судьбой. Для того чтобы избежать этой переоценки, трансдукцию клеток баркодированными вирусами проводят с низкими значениями MOI (0.1–0.5).

3. Технические повторы. Для того чтобы учесть разного рода систематические ошибки, чрезвычайно важно проводить технические реплики. Баркодированные клетки делятся на две части (при этом предполагается, что дочерние клетки распределяются по ним равномерно), а их ДНК-баркоды амплифицируются и секвенируются независимо. При качественном анализе ДНК-баркоды реплик должны хорошо коррелировать (с коэффициентом корреляции Пирсона около 0.8).

Метод клеточного баркодирования интенсивно используется для изучения процессов кроветворения. С помощью этого метода было показано отличие клонального состава гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) молодых и старых животных. Так, из пула «старых» ГСК при трансплантации образуется много небольших клональных линий, тогда как из пула «молодых» ГСК – преимущественно несколько больших колоний (Verovskaya et al., 2013). Изучено влияние провоспалительных цитокинов на миграцию клеток при трансплантации и, как следствие, на эффективность их приживления (Verovskaya et al., 2014). Кроме того, проведена реконструкция линии натуральных киллеров на макак-резусах. Оказалось, что несмотря на общность функций натуральных киллеров и Т-лимфоцитов, развиваются эти клеточные линии из разных предшественников (Wu et al., 2014). Метод клеточного баркодирования также используется для изучения гетерогенных раковых опухолей (Nguyen et al., 2014a; Bhang et al., 2015). С его помощью было установлено, что большинство резистентных к терапии клонов являются потомками небольших субпопуляций клеток, уже присутствующих в опухоли и селективно избегающих терапии (Bhang et al., 2015).

Маркирование клеток с помощью системы CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas – система адаптивного приобретенного иммунитета архей и бактерий, направленная на уничтожение попавшей в клетку чужеродной ДНК (как правило, вирусной) (Barrangou et al., 2007). С помощью молекул РНК, закодированных в локусе CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), Cas-белки распоз-

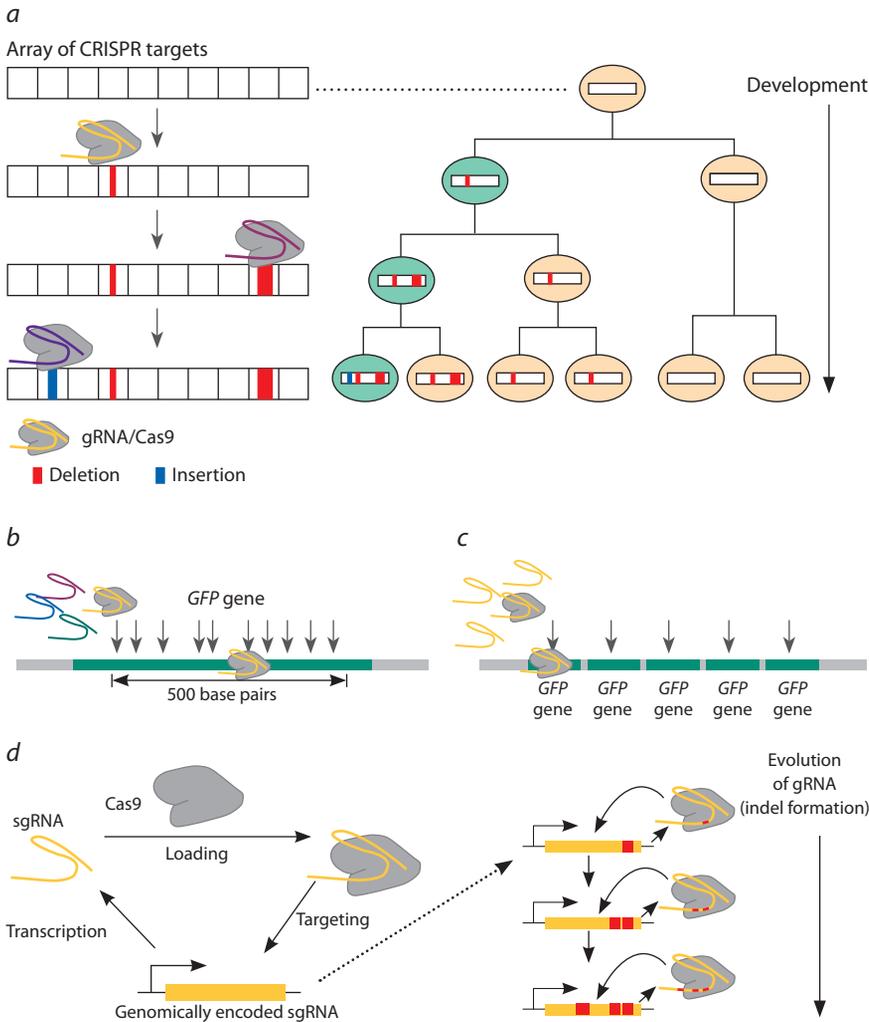


Fig. 3. Approaches for cellular barcoding based on CRISPR/Cas9: (a) GESTALT - method suggested by McKenna et al. (2016) (see in text). The barcode is represented by ten consecutive Cas9 target sites, integrated in the *Danio rerio* genome. Cas9-induced DNA damage leads to unique small insertions or deletions (indel mutations) after repair. As a result, related cells will have similar repair patterns at the break sites. (b) Method from (Schmidt et al., 2016) (see in text). Ten close Cas9 target sites are used as a DNA barcode again, but they are scattered over a 500-bp region in the *GFP* gene. (c) The Scartrace approach from (Junker et al., 2016) (see in text). A single locus with 4–5 copies of the *GFP* gene (each copy having a Cas9 recognition site) serves as a barcode. (d) The mSCRIBE – method proposed in (Perli et al., 2016) and (Kalhor et al., 2016) (see in text). In this approach, self-targeting “evolving” gRNA is chosen as a DNA barcode.

нают участки геномов вирусов и вносят двуцепочечные разрывы, вызывая их деградацию. Эта способность Cas-нуклеаз нашла широкое применение в геномной инженерии (Doudna, Charpentier, 2014; Hsu et al., 2014; Смирнов и др., 2016). С помощью синтетической химерной направляющей РНК (далее gRNA) исследователь может запрограммировать нуклеазу на целевой участок ДНК, комплементарный gRNA (Mali et al., 2013). В месте узнавания Cas-нуклеаза вносит двуцепочечный разрыв, который репарируется клеткой за счет неомологического соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ). При этом под действием экзонуклеаз и полимераз происходит потеря, реже вставка, нескольких нуклеотидов (индел-мутации). Таким образом, при лигировании двуцепочечного разрыва, внесенного Cas-нуклеазой, образуется своего рода уникальный «шрам» в ДНК, который может быть использован как метка. Группа исследователей из США решила воспользоваться таким «геномным вандализмом» для маркирования клеток и определения их родства (McKenna et

al., 2016). Разработанный ими способ был назван GESTALT (genome editing of synthetic arrays for lineage tracing) и применен для изучения развития рыбки *Danio rerio*. В качестве баркода, интегрированного в геном клетки, исследователи использовали конкатерную кассету с 10 последовательно расположенными сайтами узнавания и разрезания для Cas9-нуклеазы (рис. 3, a). Однажды внося разрыв в один из 10 сайтов, который репарируется с образованием мутаций, Cas9-нуклеаза уже не сможет его опознать. И эта метка в виде индел-мутации будет передана дочерним клеткам в ходе деления. Подобно тому как определяется филогенетическое родство между организмами, происхождение клеток и их родство внутри взрослого организма можно определить по количеству накопленных индел-мутаций. Клетки, разошедшиеся в эмбриогенезе позднее, будут иметь сходные баркоды. Исследователи ввели в одноклеточный эмбрион *Danio rerio*, содержащий кассету с 10 мишенями, 10 соответствующих gRNA (по одной на каждый целевой сайт) и Cas9-нуклеазу. Проанализировав баркоды различных органов выросших рыбок, исследователи смогли реконструировать «фамильные» деревья клеточных линий, которые можно найти на сайте <http://gestalt.gs.washington.edu>. Кроме того, было показано, что большинство клеток, составляющих органы взрослой особи рыбки, берут начало всего от нескольких клеток-предшественников. В среднем более половины клеток всех изученных органов были представлены не более чем семью аллелями баркода, за исключением головного мозга, 90 % клеток которого содержали 25 аллелей, и крови, где 98 % клеток содержали только пять аллелей баркода. Преимуществом этой методики является то, что все 10 сайтов могут быть просеквенированы за один раз.

Другая группа исследователей использовала сходный метод, но на другом объекте – круглом черве *Caenorhabditis elegans* (Schmidt et al., 2016). Предлагаемая авторами стратегия маркирования основана на внесении мутаций с помощью Cas9-нуклеазы и 10 направляющих gRNA в 10 участках гена зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein – GFP) транс-

генной линии *Caenorhabditis elegans* EG6173 (рис. 3, б). Напомним, что для этого маленького червячка, состоящего из 959 клеток, происхождение всех клеточных линий было определено методом прямого наблюдения еще в 1970-х годах (Sulston, Horvitz, 1977). Сравнение двух древ клеточных линий показало достаточно высокий уровень корреляции. Помимо экспериментального доказательства концепции метода, авторы, используя компьютерное моделирование, протестировали ряд дополнительных параметров, влияющих на эффективность маркирования клеток. Среди них ситуация, когда нуклеаза разрезает второй сайт до того, как был репарирован первый, что может привести к удалению участка ДНК между этими двумя сайтами, т. е. к потере части баркода. Поскольку эффективность работы системы CRISPR/Cas9 высока, такие ситуации должны происходить нередко. Даже несмотря на это, маркирование клеток с помощью Cas9 нуклеазы позволяет достаточно точно установить происхождение клеток (Schmidt et al., 2016).

Совместная группа исследователей из Германии и Нидерландов предложила еще один вариант использования CRISPR/Cas системы для маркирования клеток (Junker et al., 2016) (препринт статьи выложен на ресурсе bioRxiv.org). Технология маркирования, названная Scar-trace, также базируется на образовании индел-мутаций при репарации двуцепочечных разрывов ДНК. С помощью инъекций Cas9-нуклеазы и gРНК против гена *GFP* исследователи вносили мутации в одноклеточные эмбрионы *Danio rerio*, содержащие locus с несколькими интеграциями гена *GFP* (рис. 3, в). Помимо изучения происхождения клеточных линий, авторам удалось исследовать и процесс регенерации хвостового плавника. Оказалось, что пространственное расположение клеточных клонов исходного неповрежденного и регенерировавшего плавника совпадает, что свидетельствует об одинаковой программе развития и регенерации.

Принципиально другой подход с использованием программируемой нуклеазы Cas9 для маркирования клеток был реализован группой исследователей Массачусетского технологического института под руководством Т. Лу (Perli et al., 2016). Разработанная ими технология mSCRIBE (mammalian Synthetic Cellular Recorders Integrating Biological Events) основана на «самонаправленной» gRNA, которая способствует привлечению Cas9-нуклеазы в свой собственный locus, что приводит к возникновению в нем индел-мутаций (рис. 3, г). Впоследствии с этого локуса считывается немного видоизмененная gRNA, которая опять будет направлена на свой locus. Цикл повторяется много раз, при этом накапливается информация о каждом акте изменений. Эта информация может быть использована как для изучения судьбы клеточных поколений, так и для записи времени и силы воздействия различных стимулов на клетку. В последнем случае необходимо поместить такой «эволюционирующий» баркод под промотор, активирующийся под воздействием этого стимула. В роли стимула могут выступать обработка клеток антибиотиками, активация сигнальных путей, связанных с воспалением, и т. д.

Еще одна работа с использованием нуклеаз была проведена коллективом исследователей из лаборатории

Дж. Черча (Kalthor et al., 2016). Авторы также использовали принцип «эволюционирующего» баркода на основе самонаправленного локуса gRNA (в статье – homing gRNA) (рис. 3, з). В идеале в каждом таком локусе должно образовываться большое количество разнообразных вариантов мутаций, причем с равной вероятностью. Проанализировав варианты индел-мутаций и мисматчи, полученные в эксперименте, исследователи оценили информационную емкость одного локуса из 21 нуклеотидов в 5 бит. Этого количества достаточно для маркирования 32 клеток (2^5). Тогда как для маркирования всех нейронов в мозге мыши (примерно 75 млн клеток) требуется как минимум шесть самонаправленных локусов ($(2^5)^6$), а для маркирования всех клеток взрослой мыши (примерно 12 млрд клеток) необходимо семь локусов ($(2^5)^7$).

Заключение

Методы маркирования клеток прошли большой путь развития: от прямых наблюдений за развивающимися эмбрионами до баркодирования с помощью системы CRISPR/Cas9. По стратегии эти методы можно разделить на два типа. Первый тип подразумевает маркирование большого количества клеток, а затем изучение распределения и вклада их потомков в разные ткани и органы. К ним относятся методы маркирования с помощью репортерных белков, сайтов интеграций вирусов, а также метод клеточного баркодирования. Все они позволяют лишь установить родство клеток, но не открывают тайну их происхождения. Второй тип методов представлен исключительно маркированием с помощью системы CRISPR/Cas9 и имеет принципиальное отличие. В этом случае маркируется всего одна клетка, потомки которой наследуют изменяющийся, эволюционирующий баркод, что позволяет определить целые «фамильные» древа клеток. Система CRISPR/Cas9 в настоящее время заняла место главного инструмента генной инженерии, поэтому много работ, направленных на маркирование клеток с ее помощью, отражает потребность ученых в развитии методов отслеживания клеточных поколений. Можно ожидать, что в скором времени ученые смогут установить судьбу каждой клетки при развитии такого сложного организма, как человек.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Amat F., Lemon W., Mossing D.P., McDole K., Wan Y., Branson K., Myers E.W., Keller P.J. Fast, accurate reconstruction of cell lineages from large-scale fluorescence microscopy data. *Nat. Methods*. 2014;11:951-958. DOI 10.1038/nmeth.3036.
- Axelrod D. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys. J.* 1979;26:557-573. DOI 10.1016/S0006-3495(79)85271-6.
- Balakier H., Pedersen R.A. Allocation of cells to inner cell mass and trophectoderm lineages in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 1982;90:352-362. DOI 10.1016/0012-1606(82)90384-0.

- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-1712. DOI 10.1126/science.1138140.
- Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-454. DOI 10.1038/197452a0.
- Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S., Zdunek S., Barnabé-Heider F., Walsh S., Zupcic J., Alkass K., Buchholz B.A., Druid H., Jovinge S., Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324:98-102. DOI 10.1126/science.1164680.
- Bhang H.C., Ruddy D.A., Krishnamurthy Radhakrishna V., Caushi J.X., Zhao R., Hims M.M., Singh A.P., Kao I., Rakiec D., Shaw P., Balak M., Raza A., Ackley E., Keen N., Schlabach M.R., Palmer M., Leary R.J., Chiang D.Y., Sellers W.R., Michor F., Cooke V.G., Korn J.M., Stegmeier F. Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nat. Med.* 2015; 21:440-448. DOI 10.1038/nm.3841.
- Buckingham M.E., Meilhac S.M. Tracing cells for tracking cell lineage and clonal behavior. *Dev. Cell*. 2011;21(3):394-409. DOI 10.1016/j.devcel.2011.07.019.
- Bystrykh L.V., Verovskaya E., Zwart E., Broekhuis M., de Haan G. Counting stem cells: methodological constraints. *Nat. Methods*. 2012;9:567-574. DOI 10.1038/nmeth.2043.
- Cai D., Cohen K.B., Luo T., Lichtman J.W., Sanes J.R. Improved tools for the Brainbow toolbox. *Nat. Methods*. 2013;10(6):540-547. DOI 10.1038/nmeth.2450.
- Capel B., Hawley R.G., Mintz B. Long- and short-lived murine hematopoietic stem cell clones individually identified with retroviral integration markers. *Blood*. 1990;75:2267-2270.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994; 263:802-805. DOI 10.1126/science.8303295.
- Chen C.H., Puliafito A., Cox B.D., Primo L., Fang Y., Di Talia S., Poss K.D. Multicolor cell barcoding technology for long-term surveillance of epithelial regeneration in zebrafish. *Dev. Cell*. 2016;36: 668-680. DOI 10.1016/j.devcel.2016.02.017.
- Cheung A.M.S., Nguyen L.V., Carles A., Beer P., Miller P.H., Knapp D.J.H.F., Dhillon K., Hirst M., Eaves C.J. Analysis of the clonal growth and differentiation dynamics of primitive barcoded human cord blood cells in NSG mice. *Blood*. 2013;122:3129-3137. DOI 10.1182/blood-2013-06-508432.
- Conklin E.G. The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Natl. Sci.* 1905;13:1-119. DOI 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- De Vries H. Atomic bomb effect: variation of radiocarbon in plants, shells, and snails in the past 4 years. *Science*. 1958;128:250-251. DOI 10.1126/science.128.3318.250.
- Dick J.E., Magli M.C., Huszar D., Phillips R.A., Bernstein A. Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W^v mice. *Cell*. 1985;42:71-79. DOI 10.1016/S0092-8674(85)80102-1.
- Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. DOI 10.1126/science.1258096.
- Eagleson G.W., Harris W.A. Mapping of the presumptive brain regions in the neural plate of *Xenopus laevis*. *J. Neurobiol.* 1990;21:427-440. DOI 10.1002/neu.480210305.
- Gerlach C., Rohr J.C., Perié L., van Rooij N., van Heijst J.W.J., Velds A., Urbanus J., Naik S.H., Jacobs H., Beltman J.B., de Boer R.J., Schumacher T.N.M. Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8⁺ T cells. *Science*. 2013;340:635-639. DOI 10.1126/science.1235487.
- Gerrits A., Dykstra B., Kalmykova O.J., Klauke K., Verovskaya E., Broekhuis M.J.C., De Haan G., Bystrykh L.V. Cellular barcoding tool for clonal analysis in the hematopoietic system. *Blood*. 2010;115:2610-2618. DOI 10.1182/blood-2009-06-229757.
- Hadjiconomou D., Rotkopf S., Alexandre C., Bell D.M., Dickson B.J., Salecker I. Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods*. 2011;8:260-266. DOI 10.1038/nmeth.1567.
- Holt C.E., Garlick N., Cornel E. Lipofection of cDNAs in the embryonic vertebrate central nervous system. *Neuron*. 1990;4:203-214. DOI 10.1016/0896-6273(90)90095-W.
- Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157:1262-1278. DOI 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- Jordan C.T., Lemischka I.R. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Gene Dev.* 1990;4(2):220-232. DOI 10.1101/gad.4.2.220.
- Junker J.P., Spanjaard B., Peterson-Maduro J., Alemany A., Hu B., Florescu M., van Oudenaarden A. Massively parallel whole-organism lineage tracing using CRISPR/Cas9 induced genetic scars. *BioRxiv*. 2016. DOI 10.1101/056499.
- Kalhor R., Mali P., Church G.M. Rapidly evolving homing CRISPR barcodes. *Nat. Methods*. 2016. DOI 10.1038/nmeth.4108.
- Keller P.J., Schmidt A.D., Wittbrodt J., Stelzer E.H.K. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science*. 2008;322:1065-1069. DOI 10.1126/science.1162493.
- Kretzschmar K., Watt F.M. Lineage tracing. *Cell*. 2012;148:33-45. DOI 10.1016/j.cell.2012.01.002.
- Laukkanen M.O., Kuramoto K., Calmels B., Takatoku M., Von Kalle C., Donahue R.E., Dunbar C.E. Low-dose total body irradiation causes clonal fluctuation of primate hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2005;105:1010-1015. DOI 10.1182/blood-2004-04-1498.
- Lawson K.A., Meneses J.J., Pedersen R.A. Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer. *Dev. Biol.* 1986;115:325-339. DOI 10.1016/0012-1606(86)90253-8.
- Levin I., Kromer B. The tropospheric 14CO₂ level in mid-latitudes of the Northern Hemisphere (1959–2003). *Radiocarbon*. 2004;46:1261-1272. DOI 10.2458/azu_js_rc.46.4181.
- Lichtman J.W., Livet J., Sanes J.R. A technicolour approach to the connectome. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008;9:417-422. DOI 10.1038/nrn2391.
- Livet J., Weissman T.A., Kang H., Draft R.W., Lu J., Bennis R.A., Sanes J.R., Lichtman J.W. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*. 2007;450:56-62. DOI 10.1038/nature06293.
- Lu R., Neff N.F., Quake S.R., Weissman I.L. Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding. *Nat. Biotechnol.* 2011;29:928-933. DOI 10.1038/nbt.1977.
- Maetzig T., Brugman M.H., Bartels S., Heinz N., Kustikova O.S., Modlich U., Li Z., Galla M., Schiedlmeier B., Schambach A., Baum C. Polyclonal fluctuation of lentiviral vector-transduced and expanded murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011;117:3053-3064. DOI 10.1182/blood-2010-08-303222.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339:823-826. DOI 10.1126/science.1232033.
- Mazurier F., Gan O.I., McKenzie J.L., Doedens M., Dick J.E. Lentivector-mediated clonal tracking reveals intrinsic heterogeneity in the human hematopoietic stem cell compartment and culture-induced stem cell impairment. *Blood*. 2004;103:545-552. DOI 10.1182/blood-2003-05-1558.
- Mazzarello P. A unifying concept: the history of cell theory. *Nat. Cell Biol.* 1999;E13-E15. DOI 10.1038/8964.
- McKenna A., Findlay G.M., Gagnon J.A., Horwitz M.S., Schier A.F., Shendure J. Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science*. 2016;353:aaf7907. DOI 10.1126/science.aaf7907.
- Naik S.H., Perié L., Swart E., Gerlach C., van Rooij N., de Boer R.J., Schumacher T.N. Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors. *Nature*. 2013;496:229-232. DOI 10.1038/nature12013.

- Naik S.H., Schumacher T.N., Perić L. Cellular barcoding: A technical appraisal. *Exp. Hematol.* 2014. DOI 10.1016/j.exphem.2014.05.003.
- Nguyen L.V., Cox C.L., Eirew P., Knapp D.J., Pellacani D., Kannan N., Carles A., Moksa M., Balani S., Shah S., Hirst M., Aparicio S., Eaves C.J. DNA barcoding reveals diverse growth kinetics of human breast tumour subclones in serially passaged xenografts. *Nat. Commun.* 2014a;5:5871. DOI 10.1038/ncomms6871.
- Nguyen L.V., Makarem M., Carles A., Moksa M., Kannan N., Pandoh P., Eirew P., Osako T., Kardel M., Cheung A.M.S., Kennedy W., Tse K., Zeng T., Zhao Y., Humphries R.K., Aparicio S., Eaves C.J., Hirst M. Clonal analysis via barcoding reveals diverse growth and differentiation of transplanted mouse and human mammary stem cells. *Cell Stem Cell.* 2014b;1-11. DOI 10.1016/j.stem.2013.12.011.
- Nydal R., Lovseth K. Distribution of radiocarbon from nuclear tests. *Nature.* 1965;206:1029-1031.
- Palmer T.D., Takahashi J., Gage F.H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell Neurosci.* 1997;8:389-404. DOI 10.1006/mcne.1996.0595.
- Perli S.S.D., Cui C.H., Lu T.K. Continuous genetic recording with self-targeting CRISPR-Cas in human cells. *Science.* 2016;353:aag0511. DOI 10.1126/science.aag0511.
- Rosenquist G.C. Location and movements of cardiogenic cells in the chick embryo: The heart-forming portion of the primitive streak. *Dev. Biol.* 1970;22:461-475. DOI 10.1016/0012-1606(70)90163-6.
- Schepers K., Swart E., van Heijst J.W.J., Gerlach C., Castrucci M., Sie D., Heimerikx M., Velds A., Kerkhoven R.M., Arens R., Schumacher T.N.M. Dissecting T cell lineage relationships by cellular barcoding. *J. Exp. Med.* 2008;205:2309-2318. DOI 10.1084/jem.20072462.
- Schmidt S.T., Zimmerman S.M., Wang J., Kim S.K., Quake S.R. Cell lineage tracing using nuclease barcoding. *arXiv.* 2016;1606.00786.
- Schroeder T. Long-term single-cell imaging of mammalian stem cells. *Nat. Methods.* 2011;8:S30-S35. DOI 10.1038/nmeth.1577.
- Serbedzija G.N., Bronner-Fraser M., Fraser S.E. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development.* 1989;106:809-816.
- Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanichikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9: a universal tool for genomic engineering. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175. (in Russian)
- Spalding K.L., Bhardwaj R.D., Buchholz B.A., Druid H., Frisén J. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell.* 2005;122:133-143. DOI 10.1016/j.cell.2005.04.028.
- Stewart M.H., Bendall S.C., LeVadoux-Martin M., Bhatia M. Clonal tracking of hESCs reveals differential contribution to functional assays. *Nat. Methods.* 2010;7:917-922. DOI 10.1038/nmeth.1519.
- Sulston J.E., Horvitz H.R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1977;56:110-156. DOI 10.1016/0012-1606(77)90158-0.
- Sulston J., Schierenberg E., White J., Thomson J. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1983;100:64-119. DOI 10.1016/0012-1606(83)90201-4.
- Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 1961;175:145-149. DOI 10.1667/RRXX28.1.
- Van Heijst J.W.J., Gerlach C., Swart E., Sie D., Nunes-Alves C., Kerkhoven R.M., Arens R., Correia-Neves M., Schepers K., Schumacher T.N.M. Recruitment of antigen-specific CD8+ T cells in response to infection is markedly efficient. *Science.* 2009;325:1265-1269. DOI 10.1126/science.1175455.
- Verovskaya E., Broekhuis M.J.C., Zwart E., Ritsema M., van Os R., de Haan G., Bystrykh L.V. Heterogeneity of young and aged murine hematopoietic stem cells revealed by quantitative clonal analysis using cellular barcoding. *Blood.* 2013;122:523-532. DOI 10.1182/blood-2013-01-481135.
- Verovskaya E., Broekhuis M.J.C., Zwart E., Weersing E., Ritsema M., Bosman L.J., Poele T. van, Haan G. de, Bystrykh L.V. Asymmetry in skeletal distribution of mouse hematopoietic stem cell clones and their equilibration by mobilizing cytokines. *J. Exp. Med.* 2014;211:487-497. DOI 10.1084/jem.20131804.
- Vogt W. Gestaltungsanalyse am amphibienkeim mit örtlicher vitalfärbung. II. Teil gastrulation und mesodermbildung bei urodelen und anuren. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* 1929;120:384-706.
- Weissblat D.A., Zackson S.L., Blair S.S., Young J.D. Cell lineage analysis by intracellular injection of fluorescent tracers. *Science.* 1980;209:1538-1541.
- Wilson E.B. The cell-lineage of *Nereis*. A contribution to the cytogeny of the annelid body. *J. Morphol.* 1892;6(3):361-480. DOI 10.1002/jmor.1050060301.
- Wu A.M., Till J.E., Siminovitch L., McCulloch E.A. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J. Cell Physiol.* 1967;69:177-184. DOI 10.1002/jcp.1040690208.
- Wu A.M., Till J.E., Siminovitch L., McCulloch E.A. Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 1968;127:455-464. DOI 10.1084/jem.127.3.455.
- Wu C., Li B., Lu R., Koelle S.J., Yang Y., Jares A., Krouse A.E., Metzger M., Liang F., Lor K., Wu C.O., Donahue R.E., Chen I.S.Y., Weissman I., Dunbar C.E. Clonal tracking of rhesus macaque hematopoiesis highlights a distinct lineage origin for natural killer cells. *Cell Stem Cell.* 2014;14:486-499. DOI 10.1016/j.stem.2014.01.020.