

Б. В. Попов

ВВЕДЕНИЕ В КЛЕТОЧНУЮ БИОЛОГИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано РИСО медицинского факультета
Санкт-Петербургского государственного университета в качестве
учебно-методического пособия для студентов биологических
и медицинских факультетов университетов, а также студентов
высших медицинских учебных заведений

Санкт-Петербург
СпецЛит
2010

УДК 611.013/612.613.1
П58

Автор:

Борис Валентинович Попов — кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник Института цитологии РАН

Рецензенты:

Н. Н. Никольский — академик РАН, заведующий отделом
внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН;
А. В. Балахонов — доктор медицинских наук, профессор кафедры физиологии
медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета

Попов Б. В.

П58 Введение в клеточную биологию стволовых клеток : учебно-методическое пособие / Б. В. Попов. — СПб. : СпецЛит, 2010. — 319 с. : ил.
ISBN 978-5-299-00430-4

Книга основана на современных данных по клеточной биологии эмбриональных, зародышевых и соматических стволовых клеток. В 10 ее главах рассматривается пластичность стволовых клеток, их роль в качестве мишеней при старении и возникновении рака. Описание сигнальных путей, поддерживающих основные функции стволовых клеток, дано в контексте регуляции клеточного цикла. Особое внимание уделяется белкам семейства продукта гена ретинобластомы, которые во взаимодействии с факторами семейства E2F выполняют роль эффекторов в транскрипционной регуляции деления клетки.

Цель автора — представить молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе функций стволовых клеток и интегрирующие их в контрольных точках клеточного цикла в общую сигнальную сеть клетки. Регуляторные белки контрольных точек клеточного цикла представляют собой потенциальные мишени лечебных воздействий, направленных на коррекцию функций стволовых клеток при различных заболеваниях.

Книга предназначена для студентов медицинских вузов, биологических и медицинских факультетов университетов, биологов и врачей.

УДК 611.013/612.613.1

ОГЛАВЛЕНИЕ

Условные сокращения	10
Предисловие	14
Введение	17
Глава 1. Концепция стволовой клетки, характеристика стволовых клеток, эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	20
1.1. Концепция стволовой клетки	20
Определение понятия «стволовая клетка» и ее основные свойства	20
Гипотеза механизма регуляции самоподдержания стволовых клеток	21
Регуляция самоподдержания стволовых клеток в контексте клеточного цикла	21
Симметрия и асимметрия деления в регуляции самоподдержания стволовых	
клеток	23
Классификация стволовых клеток	27
1.2. Эмбриональные стволовые клетки. Общая характеристика	29
Ранние стадии развития мыши	29
Тератомы и тератокарциномы	31
Основные свойства эмбриональных стволовых клеток	32
Маркеры эмбриональных стволовых клеток	33
Использование эмбриональных стволовых клеток для получения химерных	
мышей с заданными свойствами	35
Подходы к биоинженерному конструированию клеточных линий эмбриональ-	
ных стволовых клеток с заданными свойствами для лечебных целей	37
1.3. Этические проблемы в исследованиях стволовых клеток	38
Источники стволовых клеток для терапевтических целей	38
Сравнение терапевтических свойств соматических и эмбриональных стволо-	
вых клеток	39
Этическая дилемма при использовании эмбриональных стволовых клеток че-	
ловека	40
От использования человеческого эмбриона к клонированию человека	41
1.4. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	43
<i>Литература</i>	
Глава 2. Элементы машины клеточного цикла и их роль в регуляции	
 деления клетки	48
2.1. Основные элементы машины клеточного цикла	48
Обзор событий клеточного цикла	48
События клеточного цикла, видимые под микроскопом	50
Фазы клеточного цикла	51
2.2. Роль отдельных элементов машины клеточного цикла	52
Основные элементы машины клеточного цикла подобны у всех эукариот . .	52
Машина клеточного цикла дрожжей удобна для генетического анализа	52
Эмбрионы животных являются удобной моделью для биохимического анали-	
за машины клеточного цикла	54
Машина клеточного цикла млекопитающих может анализироваться <i>in vitro</i> . . .	55

2.3. Машина клеточного цикла инициирует, генерирует и контролирует основные процессы клеточного деления	56
Принципы работы машины клеточного цикла	56
Контрольные точки клеточного цикла	57
Основные элементы машины клеточного цикла	59
Циклический протеолиз в регуляции активности белков машины клеточного цикла	65
2.4. Некоторые методы изучения клеточного цикла млекопитающих	68
<i>Литература</i>	72
Глава 3. Внутриклеточный и внеклеточный контроль клеточного деления и роста	73
3.1. Внутриклеточный контроль деления клеток	73
3.1.1. Механизмы инициации и контроля репликации ДНК	73
Основные компоненты репликационной машины	73
Контрольная точка репликации ДНК	76
3.1.2. Механизм регуляции митоза	77
Роль комплекса циклин М—Cdk в механизме митоза	77
М—Cdk подготавливает дублированные хромосомы к расхождению	78
Комплекс APC* инициирует выход из митоза	79
Механизм активации APC* в ходе митоза	80
Выход из митоза нуждается в инактивации М—Cdk	80
Роль APC* в механизме расхождения сестринских хроматид	81
Контрольная точка митотического веретена	82
3.1.3. Контрольная точка повреждения ДНК	82
Молекулярный механизм распознавания однонитчатых и двунитчатых разрывов ДНК	82
Функциональная структура опухолевого супрессора p53	85
Механизмы остановки клеточного цикла в фазах G1 и G2/M при повреждении ДНК	86
3.1.4. Регуляция инициации и прогрессии фазы G1	86
3.2. Внеклеточный контроль деления и роста клеток	89
3.2.1. Регуляция деления клеток ростовыми факторами	89
Митогены стимулируют пролиферацию клеток путем активации G1—Cdk и G1/S—Cdk. Роль сигнального пути MAPK	91
Нарушение передачи пролиферативных сигналов ведет к остановке клеточного цикла или апоптозу	92
Адгезионные клетки нуждаются в прикреплении к твердой поверхности для роста и пролиферации. Роль фокальной адгезионной киназы (Fak)	93
3.2.2. Стимуляция клеточного роста ростовыми факторами	97
<i>Литература</i>	98
Глава 4. Роль семейства продукта гена ретинобластомы в контроле клеточного цикла, дифференцировки и апоптоза в соматических и стволовых клетках	101
4.1. Клонирование гена ретинобластомы (RB), общая и функциональная структура продукта гена ретинобластомы (pRb) и членов его семейства	101
Двушаговая гипотеза возникновения рака по А. Кнудсону	101
Клонирование гена ретинобластомы	101
Общая и функциональная структура pRb	103
Рентгеновский анализ структуры pRb	105
Структурное родство между белками семейства pRb	108

4.2. Регуляция эффекторных функций pRb	108
Регуляция функций pRb путем его фосфорилирования	108
Эффекторные функции pRb — контроль транскрипции, регулируемой белками семейства E2F	111
pRb и рестрикционная точка G1	112
Роль pRb в регуляции клеточного цикла после фазы G1	114
pRb как интегратор позитивных сигналов	116
pRb как интегратор негативных сигналов	117
pRb и регуляция часов клеточного цикла	117
pRb и опухолевый рост	119
4.3. Апоптоз, функциональная роль и механизмы	120
Роль белков семейства Bcl-2 в регуляции апоптоза и выживания клеток	122
Активация апоптоза внеклеточными стимулами	123
Активация апоптоза внутриклеточными стимулами	124
Взаимодействие между pRb и p53 в регуляции апоптоза	125
4.4. Роль pRb в регуляции функций стволовых клеток	127
Роль pRb в регуляции мышечной дифференцировки	127
Роль pRb в регуляции кроветворной, миокардиальной и жировой дифференцировки	128
Роль pRb в регуляции самоподдержания стволовых клеток	128
4.5. Получение антител к нефосфорилированным и фосфорилированным сайтам pRb	129
<i>Литература</i>	132
Глава 5. Роль транскрипционной регуляции в работе машины клеточного цикла	134
5.1. Структура и функции хроматина	134
Молекулы ДНК упакованы в хроматин и суперконденсированы в хромосомы	134
Нуклеосомы являются основными единицами структуры хроматина у эукариот	134
Механизмы изменения временной и пространственной организации хроматина. Роль ковалентной модификации гистонов	136
АТФ-регулируемое ремоделирование хроматина	138
Функциональные последствия модификации гистонов. Гипотеза гистонового кода	140
Особенности организации хроматина в эмбриональных стволовых клетках	142
5.2. Структурная организация контрольной области эукариотического гена	143
5.3. Механизмы взаимодействия между белками семейств pRb и E2F	143
Характеристика белков семейств E2F и DP	144
Регуляция клеточного деления на транскрипционном уровне при взаимодействии белков семейств pRb и E2F	146
Белки pRb и p107/p130 в регуляции транскрипции различных групп генов, отвечающих на E2f	147
Механизм супрессии транскрипции белками E2f и «покетными» белками в покоящихся клетках	150
Механизм регуляции транскрипции «покетными» белками в делящихся клетках	151
Семейство белков E2F координирует транскрипцию генов, ответственных за прогрессию клеточного цикла в фазах G1/S и G2/M	152
Регуляция транскрипции, опосредованной РНК-полимеразами I и III: общие компоненты и механизмы	153
5.4. Методы изучения транскрипционной активности отдельных компонентов машины клеточного цикла	154
Метод сдвига электрофоретической подвижности в геле	154
Метод репортерных белков	155

Метод иммунопреципитации хроматина	157
Двугибридная техника клонирования генов в дрожжевой системе	157
5.5. Роль микро-РНК и маленькой интерферирующей РНК в регуляции функций стволовых клеток	158
Модель биогенеза и посттранскрипционной супрессии микро-РНК и малень- ких интерферирующих РНК	158
<i>Литература</i>	161
Глава 6. Сигнальные пути Bmi1 и Shh в регуляции функций стволовых клеток	163
6.1. Роль Bmi1 — члена семейства генов Polycomb — в регуляции функций ство- ловых клеток	163
Почему биологическая роль белков Bmi1 и Shh рассматривается в одной главе?	163
Виды, причины и признаки старения клетки	164
Модификации гистонов, характерные для старения	165
Механизм внутреннего старения клеток человека	167
Механизм внутреннего старения клеток мыши	168
Механизм внешнего клеточного старения, роль pRb и p53	170
Роль члена семейства Polycomb — белка Bmi1 — в механизме клеточного старения	171
Роль семейства Polycomb и белка Bmi1 в регуляции самоподдержания ство- ловых клеток	173
Мишени Bmi1	176
6.2. Роль белка Sonig Hedgehog в регуляции функций стволовых клеток	179
Процессинг Shh	179
Сигнальный путь Shh	180
Мишени Shh и механизм регуляции функций стволовых клеток	183
Сигнальный путь Shh при канцерогенезе	184
Модели с генетическими нарушениями сигнального пути Shh	185
Роль Shh в регуляции клеточного цикла и самоподдержания стволовых клеток	186
6.3. Рак и старение организма	186
Две эволюционные стратегии опухолевой супрессии	188
Опухолевая супрессия и продолжительность жизни	189
Механизмы опухолевой супрессии и старения	189
<i>Литература</i>	191
Глава 7. Сигнальные пути MAPK, Jak-STAT, Notch и TGFβ в регуляции функций стволовых клеток	193
7.1. Передача сигналов через поверхностные рецепторы, связанные с ферментами Рецепторные тирозинкиназы обладают способностью к аутофосфорилирова- нию	194
Рецепторы, лишенные сайтов фосфорилирования, могут передавать сигналы при взаимодействии с цитоплазматическими тирозинкиназами	196
Роль тирозиновых фосфатаз в передаче сигналов внутрь клетки	197
Роль белков семейства Ras и сигнального пути MAPK в передаче сигналов от рецепторных тирозинкиназ	198
Сигнальный путь Jak-STAT	200
7.2. Сигнальный путь, активируемый суперсемейством белков TGF β , и его роль в регуляции функций стволовых клеток	202
Передача сигналов TGF β и ее негативная регуляция	202
Белки-антагонисты лигандов семейства TGF β	204

Функциональные взаимодействия между TGF β и другими сигнальными путями .	206
Мишени белков суперсемейства TGF β и механизмы опосредованной ими транскрипционной супрессии и активации	207
Роль белков семейства BMP в регуляции функций стволовых клеток	209
Роль лигандов семейства Activin в регуляции функций стволовых клеток . .	211
7.3. Роль сигнального пути Notch в регуляции функций стволовых клеток	212
Феномен латеральной ингибиции опосредован сигнальным путем Notch . . .	212
Процессинг и активация рецептора Notch	213
Мишени Notch и механизм их активации	214
Роль Notch в регуляции функций эмбриональных, зародышевых и соматических стволовых клеток	217
Сигналы Notch вызывают позитивную регуляцию дифференцировки кератиноцитов	220
Сигналы Notch ингибируют нейрогенез, но способствуют образованию глиальных клеток	221
Роль Notch в злокачественной трансформации стволовых клеток на модели рака кожи	221
Взаимодействие Notch с другими сигнальными путями	223
<i>Литература</i>	224
Глава 8. Сигнальный путь Wnt/β-катенин в регуляции функций стволовых клеток	226
8.1. Семейство белков Wnt, общая характеристика, процессинг, передача сигналов, роль в активации различных сигнальных путей	226
Общая характеристика белков семейства Wnt	226
Белки Wnt инициируют несколько сигнальных путей. Передача сигналов через неканонические сигнальные пути	227
Процессинг и секреция белков семейства Wnt	230
8.2. Роль сигналов Wnt/ β -катенин в регуляции функций стволовых клеток	230
Рецепторы и внеклеточные антагонисты Wnt	230
Передача сигналов через канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин . . .	231
Механизмы транскрипционной активации и супрессии сигналами Wnt/ β -катенин	234
Функциональная активность факторов семейства LEF/TCF в отсутствие сигналов Wnt/ β -катенин	235
Мишени Wnt	237
8.3. Сигналы Wnt/ β -катенин регулируют выбор клеточной судьбы в стволовых клетках	239
Конечный результат действия Wnt определяется внутриклеточными различиями клеток-мишеней	240
Модуляция сигнального пути Wnt внеклеточным окружением	240
Роль сигналов Wnt/ β -катенин в тканях с активным самоподдержанием у зрелых организмов	241
Активация сигнального пути Wnt может вызывать злокачественные заболевания кишечника, легких, кожи, крови и нервной системы	243
Примеры взаимодействия белков сигнального пути Wnt/ β -катенин с эффекторными молекулами других сигнальных путей	245
<i>Литература</i>	246

Глава 9. Молекулярная регуляция функций стволовых клеток, ниши стволовых клеток	248
9.1. Роль сигнальных путей Jak-STAT, MAPK и PI3K в регуляции самоподдержания и дифференцировки ЭСК	248
Сигнальный путь Jak-STAT в регуляции самоподдержания ЭСК	248
Сигнальный путь MAPK препятствует самоподдержанию ЭСК и активирует их дифференцировку	249
Сигнальный путь PI3K и его роль в регуляции функций ЭСК	251
Сопряжение самоподдержания и дифференцировки ЭСК путем согласованной регуляции передачи сигналов через сигнальные пути Jak/STAT, MAPK и PI3K	255
9.2. Сравнение механизмов регуляции перехода G1/S в ЭСК и дифференцирующихся соматических клетках	255
Экспрессия и функции циклинов в фазе G1 в ЭСК	258
Передача сигналов Lf, их роль в контроле клеточного цикла в ЭСК	259
9.3. Понятие о нишах стволовых клеток. Регуляция состояния покоя и активации СК в нише различными сигнальными путями	259
Роль сигнального пути TGF β в формировании ниш стволовых клеток	262
Роль сигнального пути Jak-STAT	264
Роль семейства транскрипционных факторов Polycomb и его члена — белка Bmi1	264
Роль сигнального пути, опосредованного фибробластными ростовыми факторами	265
Роль клеточного цикла в механизме выбора клеточной судьбы в различных типах стволовых клеток	266
<i>Литература</i>	267
Глава 10. Соматические и опухолевые стволовые клетки	269
10.1. Классификация соматических стволовых клеток	269
10.2. Стволовые клетки кожи	269
Структура волосяного фолликула и цикл его регенерации	269
Структура кожного эпителия и роль СК в его поддержании	270
Поддержание клеточного состава эпидермиса регулируется сигналами внешней среды	271
10.3. Стволовые клетки молочной железы	272
Строение молочной железы	272
Доказательства существования стволовых клеток молочной железы	273
Идентификация маркеров стволовых клеток молочной железы	274
Опухолевые стволовые клетки молочной железы	276
Сигнальные пути, регулирующие функции MaCK	277
10.4. Стволовые клетки кишечника	278
Структура и функции желудочно-кишечного тракта	278
Передача сигналов Wnt/ β -катенин в кишечнике	279
Сигнальный путь Wnt при раке толстого кишечника	280
Направленная коррекция сигнального пути Wnt/ β -катенин	280
Сигнальный путь Notch в кишечнике	281
Направленная регуляция сигнального пути Notch в эпителии кишечника	281
10.5. Стволовые кроветворные клетки	282
Схема кроветворения	282
Регуляция продукции лейкоцитов в костном мозге	283
СКК дифференцируются во все типы клеток крови	284

Сигнальные пути, регулирующие самоподдержание и дифференцировку СКК	285
Маркеры СКК, изоляция и концентрация СКК	287
10.6. Мезенхимальные стволовые клетки	288
Получение мезенхимальных стволовых клеток, их свойства и маркеры	288
Дифференцировка и пластичность мезенхимальных стволовых клеток	289
10.7. Опухолевые стволовые клетки	291
Приложение принципов биологии СК к возникновению рака	291
Особенности противоопухолевой терапии, основанной на концепции ОСК	294
<i>Литература</i>	296
Словарь	297

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ *

АПК	— антиген-презентирующие клетки
БОЕ-Э	— эритроидная бурстобразующая единица
ВКМ	— внутренняя клеточная масса
ГМК	— гладкомышечные клетки
ГМФ	— гуанозинмонофосфат
ГСК	— гемопоэтические стволовые клетки
ГТФаза	— гуанозинтрифосфатаза
ДБД	— ДНК-связывающий домен транскрипционного фактора
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	— желудочно-кишечный тракт
ЗСК	— зародышевые стволовые клетки
ИНТАС (INTAS, The International Association for the promotion of cooperation with scientists from the new independent States of the former Soviet Union)	— Международная ассоциация взаимодействия с учеными из новых независимых государств бывшего Советского Союза
иПК	— индуцированные плюрипотентные клетки
Иптг	— изопропилтиогалактозид
КОЕ	— колониеобразующая единица
КОЕ-ГЭММ	— гранулоцитарно-эритроцитарно-моноцитарно-мегакариоцитарная колониеобразующая единица
КОЕ-Э	— эритроидная колониеобразующая единица
ЛПВП	— липопротеины высокой плотности
ЛПНП	— липопротеины низкой плотности
МаСК	— стволовые клетки молочной железы
миРНК	— (siRNA) маленькая интерферирующая РНК
мкРНК	— (miRNA) микро РНК
ММ	— молекулярная масса
мРНК	— матричная рибонуклеиновая кислота
МСК	— мезенхимальные стволовые клетки
мЭСК	— мышинные эмбриональные стволовые клетки
МЭФ	— мышинные эмбриональные фибробласты
НСК	— стволовые клетки центральной или периферической нервной системы, или нейрональные стволовые клетки
ОМЛ	— острый миелоидный лейкоз
ОСК	— опухолевые стволовые клетки
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РТПХ	— реакция «трансплантат против хозяина»
РФФИ	— Российский фонд фундаментальных исследований
РХПТ	— реакция «хозяин против трансплантата»

* В условных сокращениях встречаются одинаковые буквенные написания генов и их продуктов. Для их распознавания название гена принято обозначать прописной буквой (например, GATA), а его продукта — строчной (Gata). Аналогично обозначены и другие гены и их продукты. Названия сигнальных путей и ростовых факторов обозначены прописными буквами, как это принято в зарубежной литературе.

- СК — стволовая клетка
СКК — стволовые кроветворные клетки
ССК — соматические стволовые клетки
ТАД — активирующий транскрипцию домен транскрипционного фактора
ТКП — терминальные концевые почки
ФСГ — фолликулостимулирующий гормон
цАМФ — циклический аденозинмонофосфат
ЦНС — центральная нервная система
чЭСК — эмбриональные стволовые клетки человека
ЭКП — эндотелиальные клетки-предшественники
ЭСК — эмбриональные стволовые клетки
- AA (amino acids) — аминокислоты или аминокислотные остатки
AAV (adeno-associated virus) — аденоассоциированный вирус
ADP — аденозиндифосфорная кислота (АДФ)
ANP (atrial natriuretic protein) — предсердный натрийуретический протеин
ANT (altered nuclear transfer) — перенос измененных ядер
Ap1 (activator protein 1) — активаторный белок 1
Araf1 (apoptotic protease activating factor 1) — фактор 1, активирующий протеазы апоптоза
APC (adenomatous polyposis coli) — ген, мутации которого являются причиной наследственного аденоматоза кишечника
APC* (anaphase promoting complex) — комплекс, способствующий анафазе
АТФ — аденозинтрифосфорная кислота (АТФ)
BCC (basal cell carcinoma) — карцинома, происходящая из клеток базального слоя эпидермиса кожи
Bdnf (brain derived neurotrophic factor) — нейротрофический фактор, происходящий из головного мозга
Bmp (bone morphogenetic protein) — костный морфогенетический белок
Bmpr (bone morphogenetic protein receptor) — рецептор костного морфогенетического белка
 α CA (cardiac actin α) — сердечный актин α
cTnI (cardiac troponin I) — сердечный тропонин I
EGF (epidermal growth factor) — эпидермальный ростовой фактор
Egfr (enhanced green fluorescence protein) — белок с усиленной зеленой флюоресценцией
EPO (erythropoietin) — эритропоэтин
ER (endoplasmic reticulum) — эндоплазматический ретикулум
ErbB family (epidermal growth factor receptor family) — семейство рецепторов эпидермального ростового фактора
FACS (fluorescence-activated cell sorting) — сортировка клеток, активируемая флюоресценцией
FGF (fibroblast growth factor) — фибробластный ростовой фактор
Flk-1 (fetal liver kinase 1) — киназа-1 фетальной печени
FL/FLT-3L (fetal liver tyrosin kinase receptor 3 ligand) — лиганд рецепторной фетальной печеночной тирозинкиназы 3
Fog-2 (friend of Gata-2) — белок, способствующий активности фактора Gata-2
Gata-1—Gata-6 — белки, содержащие ДНК-связывающий мотив WGATAR и родственные последовательности CGATGG и AGATTA
G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
Gfp (green fluorescence protein) — зеленый флюоресцирующий протеин
GlyA (glycophorin A) — гликофорин А

- GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- Gsk3 β (glycogen synthase kinase 3 β) – 3 β киназа гликоген синтетазы
- Has2 (hyaluronic acid synthase 2) – синтетаза 2 гиалуроновой кислоты
- Hat (histone acetyltransferase) – гистоновая ацетилтрансфераза
- Hdac (histone deacetylase) – гистоновая деацетилаза
- HDL – см. ЛПВП
- HGF (hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов
- hHo-1 (human heme oxygenase-1) – гемоксигеназа-1 гема человека, чувствительная к стрессу изоформа оксигеназы гема
- HLA (human leukocyte antigens) – антигены гистосовместимости лейкоцитов человека
- Hmg (high mobility group) – домен высокой подвижности
- Hop (homeodomain only protein) – белок, содержащий один гомеодомен
- HPV (human papilloma virus) – вирус папилломы человека
- Hsp70 (heat shock protein 70) – белок теплового шока с ММ 70 кДа
- hTert – теломеразная обратная транскриптаза человека
- Icam-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) – межклеточная адгезионная молекула 1
- Jnk (Jun N-terminal kinase) – киназа N-концевого участка фактора Jun
- IGF-1 (insulin-like growth factor-1) – инсулиноподобный ростовой фактор 1
- Lfa 1 (leukocyte function-associated antigen 1) – антиген-1, связанный с функциями лейкоцитов
- Ldlr (lipoprotein low density receptor) – рецептор лиганда липопротеинов низкой плотности
- LTCIC (long-term culture-initiating cells) – клетки, иницирующие долгосрочную культуру
- MACS (magnetic affinity cell sorting) – аффинная сортировка клеток с использованием магнита
- MAPC (multipotent adult progenitor cells) – мультипотентные клетки-предшественники зрелого организма
- M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) – макрофагальный колониестимулирующий фактор
- Mef2 (myocyte enhancer factor 2) – фактор 2, активирующий миоциты
- MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости
- Mhc β (myosin heavy chain β) – тяжелая β цепь миозина
- miRNA (micro RNA) – микро РНК
- Mlc2V (myosin light chain 2V) – легкая 2V цепь миозина
- Mlc3F (myosin light chain 3F) – легкая 3F цепь миозина
- Mmp (matrix metalloproteinases) – металлопротеиназы клеточного матрикса
- MSAC (mitotic spindle assembly checkpoint) – контрольная точка сборки митотического веретена
- MSC (mesenchymal stem cells) – мезенхимальные стволовые клетки,
- NGF (nerve growth factor) – фактор роста нервов
- PDGF (platelet derived growth factor) – тромбоцитарный ростовой фактор
- PGC (primordial germ cells) – примордиальные зародышевые клетки
- Pkc (protein kinase C) – протеинкиназа C
- PLGF (placental growth factor) – ростовой фактор плаценты
- Pr – рецептор прогестерона
- Raldh2 (retinaldehyde dehydrogenase 2) – дегидрогеназа 2 сетчатой оболочки глаза
- RB (retinoblastoma gene) – ген, мутации которого приводят к возникновению ретинобластомы – опухоли сетчатки глаз
- ROS (reactive oxygen species) – формы реактивного кислорода
- Sca-1 (stem cell antigen-1) – антиген-1 стволовых клеток
- Scf (stem cell factor) – фактор стволовых клеток

- SCID (severe combined immunodeficiency) – тяжелый комбинированный иммунодефицит
- SDF-1 (stroma-derived factor-1) – фактор-1 стромального происхождения
- Serca (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) – АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума, переносящая Ca^{2+} из цитозоля в ER в ходе расслабления мышц
- siRNA (small interfering RNA) – маленькая интерферирующая РНК
- Sm22a (smooth muscle 22a) – гладкомышечный актин 22
- Sme (smooth muscle element) – элемент гладких мышц
- SP (side-population) – краевая популяция клеток
- SRF (serum response-factor) – фактор, чувствительный к сыворотке
- Tcf (T-cell factor) – Т-клеточный фактор
- TGF β (transforming growth factor β) – трансформирующий ростовой фактор β
- TPO (trombopoietin) – тромбопоэтин
- TR – теломеразная РНК
- Vcam-1 (vascular cell adhesion molecule-1) – сосудистая клеточная адгезионная молекула 1
- VEGF (vascular endothelial growth factor) – сосудистый эндотелиальный ростовой фактор
- VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) – рецептор 2 сосудистого эндотелиального ростового фактора
- Vla-4 (very late antigen-4) – очень поздний антиген-4

ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящей книге в доступной для широкой русскоязычной аудитории форме кратко изложены современные данные об основных свойствах стволовых клеток, методах их изучения и возможностях использования. Стволовые клетки представляют собой наиболее перспективный источник восстановительного лечения, пригодный для прямой трансплантации клеток, переноса модифицированных *in vitro* клеток, биоконструирования тканей и органов. Регенеративный потенциал стволовых клеток основан на их основных свойствах, таких как иммортальность (бессмертие) и способность к дифференцировке в одну, несколько или всевозможные клетки организма. Механизм поведения стволовых клеток в настоящее время изучен не с той полнотой, которая могла бы гарантировать их эффективное применение в практической медицине. Более того, трансплантация стволовых клеток в лечебных целях может сопровождаться серьезными осложнениями, например, вызывать рост опухолей у реципиентов. В силу этих причин представляется важным рассмотрение фундаментальных сторон клеточной биологии стволовых клеток в рамках издания, предназначенного читателям с разным уровнем специальных знаний.

Стволовые клетки обладают не только уникальными, но и универсальными свойствами, общими для всех клеток организма, например, способностью делиться, дифференцироваться, подвергаться запрограммированной смерти и запрограммированному старению. Универсальные свойства клеток формировались на основе гомологичных свойств простых организмов в ходе продолжительного развития животного царства. Структурные, функциональные и регуляторные системы сложных и простых организмов имеют много общего, а отдельные их элементы могут быть взаимозаменяемы, например, перенос некоторых регуляторных белков клеточного цикла человека в одноклеточные организмы может восстанавливать функции последних в случае утраты ими гомологичных белков.

Уникальные функции стволовых клеток — иммортальность и дифференцировочный потенциал, начинают формироваться в процессе развития у простых многоклеточных организмов. Реализация этих функций основана на использовании путей передачи сигналов и их интеграции с сигнальными путями, регулируемыми универсальными функциями клетки. Интеграция и регуляция общих и специальных функций стволовых клеток осуществляется в контексте клеточного цикла. Образно говоря, настоящее и будущее стволовых клеток основано на их прошлом. Подобные представления дают основания для рассмотрения отдельных функций стволовых клеток и их регуляции на примере простых организмов, таких как дрожжи, отдельных клеток многоклеточных организмов с простым клеточным циклом, например, ооцитов лягушки, а также путем изучения клеток сложных многоклеточных организмов в культуре *in vitro*.

Настоящая книга состоит из 10 глав, в первой из которых рассматривается феноменология и классификация, этические проблемы применения, общие принципы регуляции функций стволовых клеток, наиболее важные современ-

ные достижения в изучении стволовых клеток, в частности индуцированные плюрипотентные клетки. В первой главе рассматривается также авторская гипотеза механизма регуляции функций стволовых клеток, которая может помочь читателю объединить разностороннюю информацию о стволовых клетках в одно целое. Четыре последующие главы посвящены рассмотрению клеточного цикла и его регуляции. Большое внимание, уделяемое в книге клеточному циклу, соответствует авторской гипотезе, что регуляция основных функций стволовых клеток осуществляется в контексте клеточного цикла. В ходе клеточного цикла стволовая клетка выбирает свою судьбу, что основано на ее уникальной способности совершать асимметричные деления, в результате которых одна из дочерних клеток сохраняет свойства материнской клетки, тогда как другая теряет эти свойства и коммитируется к дифференцировке. При рассмотрении контрольной системы клеточного цикла большое внимание уделяется семейству продукта гена ретинобластомы (pRb), члены которого являются вездесущими регуляторами деления клетки и играют ключевую роль в регуляции выбора судьбы в клетках различной тканевой специфичности. В главах 6–8 обсуждаются сигнальные пути *Bmi1*, *Shh*, *Notch*, *TGFβ* и *Wnt/β-катенин*, играющие основную роль в регуляции функций стволовых клеток. Сигнальные пути и их отдельные молекулы формируют материальную основу функционирования клетки, а регуляторные сигнальные молекулы представляют собой потенциальные мишени для направленного изменения ее активности. В главе 9 рассматриваются примеры молекулярной регуляции функций стволовых клеток. Такие примеры дают возможность схематично представить взаимодействие отдельных элементов сигнальных путей, создающих основы и связывающие между собой иммортабельность и дифференцировочный потенциал стволовых клеток. Эти же элементы представляют собой потенциальные мишени для фармакологических лечебных воздействий на стволовые клетки. В 10-й главе рассматриваются системы тканевого самоподдержания в отдельных органах, основанные на активности тканеспецифических соматических стволовых клеток. Утрата контроля над иммортабельностью стволовых клеток может сопровождаться их превращением в опухолевые стволовые клетки, автономная и активная пролиферация которых проявляется в форме опухолевого роста. Гипотеза опухолевых стволовых клеток утверждает, что мишенями противоопухолевой терапии должны быть именно эти клетки, а не вся опухолевая ткань, воздействие на которую может не вызывать долгосрочного эффекта и сопровождаться рецидивом ее роста.

Подготовка материала настоящей книги стала возможной в результате финансирования экспериментальных исследований автора по ниже перечисленным грантам: 95954 РФФИ/ИНТАС — «Целенаправленное слежение за миелопоэзом в процессе кроветворения как подход для идентификации специфических генов, их функционального анализа и изучения линейного коммитирования»; 96-04-48227 РФФИ — «Изучение E2F-зависимого механизма регуляции клеточного роста и дифференцировки»; 98-04-49674 РФФИ — «Изучение механизма регуляции клеточного роста и дифференцировки, опосредованного транскрипционным фактором E2F4»; 06-04-48439 РФФИ — «Изучение роли сигнального пути *Wnt/β-катенин* в энтодермальной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток»; 09-04-00595 РФФИ — «Генетическое репрограммирование соматических клеток различной тканевой специфичности в эпителиальные клетки мочевыводящей системы».

Автор выражает глубокую признательность Владимиру Борисовичу Серикову и Альберту Михайловичу Зайчику (Медицинская академия последипломного образования Росздрава, Санкт-Петербург); Людмиле Ивановне Тищенко (кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного университета); Алексею Николаевичу Томилину и Елене Николаевне Толкуновой (Институт цитологии РАН), Николаю Сергеевичу Петрову, Михаилу Александровичу Лисковых, Ольге Владимировне Жидковой, Ольге Владимировне Злобиной (аспирантам и студентам Института цитологии РАН), которые приняли участие в обсуждении материала настоящей книги.

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире читатель может страдать от избытка информации, что часто сочетается с нехваткой специальной литературы. Такая ситуация иногда вызывает дискомфорт, который сменяется чувством гармонии по мере того, как найдена идея, объединяющая хорошо известное «старое» и не совсем понятное «новое». Это действительно и по отношению к проблеме стволовых клеток. Стволовые клетки стали восприниматься в XXI в. не как интригующий, хотя и довольно абстрактный объект биологических исследований, но как реальная и даже притягательная мишень во многих областях биологии и медицины. В мире науки стволовые клетки рассматриваются сегодня как источник формирования целого организма при клонировании различных животных, как незаменимый ресурс для получения клеток человека при терапевтическом клонировании, как основа для регенерации самообновляющихся тканей многоклеточных организмов, нарушение которой является причиной широко распространенных, например злокачественных, заболеваний. Несмотря на то что стволовые клетки уже широко применяются в практической медицине как за границей, так и в нашей стране, их терапевтическое использование часто оказывается неэффективным вследствие незнания клеточных и молекулярных механизмов поведения. Об этом свидетельствуют опубликованные случаи возникновения опухолей при лечебном использовании стволовых клеток. В основе туморогенности стволовых клеток лежит их способность к неограниченно длительному делению, потеря контроля над которым в процессе лечения может осложняться превращением активно делящихся клеток в опухоль. Иначе говоря, стволовые клетки являются условно туморогенными, т. е. обладают способностью превращаться в опухолевые клетки при нарушении условий их жизни.

Сегодня известно, что все ткани зрелого организма обеспечены соматическими стволовыми клетками, постоянно «проживающими» в специальных нишах и обладающими способностью к специализации в зрелые клетки данной ткани, например в клетки кишечника, кожи, крови и другие. Зрелые клетки выполняют тканеспецифические функции, но имеют ограниченную продолжительность жизни и нуждаются в постоянном замещении новыми клетками, возникающими при размножении тканеспецифических стволовых клеток. Соматические стволовые клетки наделены пластичностью, т. е. способностью изменять свои свойства и образовывать при определенных условиях зрелые клетки иной тканевой специфичности, например, кроветворные стволовые клетки способны превращаться в клетки миокарда или клетки головного мозга. Этот феномен является основанием для практического применения соматических стволовых клеток доступной ткани, например кроветворной ткани костного мозга, для регенеративной терапии заболеваний сердца, нервной системы и других тканей. Эмпирически стволовые клетки, в частности стволовые клетки крови, используются в практической медицине с середины прошлого века для восстановительной терапии при заболеваниях крови, хотя фундаментальные биологические основы их регенеративной активности не полностью изучены. В настоящее вре-

мя список стволовых клеток различной тканевой специфичности, используемых для восстановительного лечения, значительно расширился, более того, стволовые клетки стали использоваться как объекты биотехнологического конструирования для направленной коррекции функций поврежденных органов и тканей.

Подбор и изложение материала настоящей книги основаны на двух идеях. Первая *идея* состоит в том, что регуляция в отделе стволовых клеток осуществляется путем сопряжения их уникального свойства иммортальности (самоподдержания) с универсальными функциями, присущими соматическим клеткам различных тканей, такими как дифференцировка, старение и апоптоз. Вторая *идея* утверждает, что сопряжение самоподдержания и универсальных функций клетки осуществляется в контексте клеточного цикла.

Торможение сопряжения сохраняет способность стволовых клеток к самоподдержанию и оставляет их бессмертными. Наоборот, активация сопряжения сопровождается утратой самоподдержания стволовых клеток и превращает их в смертные клетки с ограниченной продолжительностью жизни.

Современное понимание поведения клеток соответствует представлению, что их специфическая и интегративная активность основана на передаче сигналов. Сигнальные пути, поддерживающие отдельные функции стволовых и специализированных клеток, специфичны, но взаимосвязаны внутри клетки и между отдельными клетками на уровне тканей, органов и всего организма. Интеграция сигнальных путей, лежащих в основе деления клетки, регулируется специальной контрольной системой, или машиной клеточного цикла. Дополнительно, в ходе деления соматических клеток, машина клеточного цикла осуществляет интеграцию различных функций, например дифференцировки и клеточного старения с прогрессией клеточного цикла. В стволовых клетках регуляция деления и дифференцировки приобретает характер контроля клеточного бессмертия. Стволовая клетка, обладающая секретом иммортальности, демонстрирует способность к произвольному выбору между симметричным делением, в ходе которого образуются две смертные или две бессмертные клетки, и асимметричным делением, результатом которого является рождение одной смертной и одной бессмертной клетки. Рассмотрение функционирования стволовых клеток в контексте клеточного деления дает возможность для анализа и понимания механизмов их регуляции. Изучение взаимосвязей сигнальных путей стволовых и «нестволовых» клеток необходимо и для направленной фармакологической коррекции функций стволовых клеток. В современной зарубежной литературе проблеме стволовых клеток посвящено много периодических и специальных изданий, однако русскоязычный читатель, интересующийся этой проблемой, найдет в определенном информационном вакууме.

Материал настоящей книги включает три основные части: 1) описание элементов и механизмов регуляции прогрессии клеточного цикла; 2) характеристику основных сигнальных путей, регулирующих уникальные и убиквитарные функции стволовых клеток; 3) представление примеров регуляции функций эмбриональных, зародышевых, и соматических стволовых клеток отдельных тканей, основанной на взаимодействии различных сигнальных путей в контексте клеточного цикла.

В 2006–2007 гг. группа японских исследователей опубликовала результаты опытов, свидетельствующих, что стабильная экспрессия в функционально зрелых клетках мышей или человека четырех генов (ОСТ3/4, SOX2, KLF4, MYC) делает их подобными стволовым клеткам. Такие клетки назвали индуцирован-

ными плюрипотентными клетками, поскольку они приобретали способность превращаться в клетки различной тканевой специфичности. Эти публикации привлекли к себе интерес не только научной общественности, но и всего мирового сообщества. Значение феномена индукции плюрипотентности:

1) в возможности использования ограниченного числа генов для репрограммирования функционально зрелых и доступных клеток, например клеток кожи, в клетки с неограниченным регенеративным потенциалом;

2) в создании молекулярной основы для поиска конкретных генов, индуцирующих переход плюрипотентных клеток в функционально зрелые аутологичные клетки необходимой тканевой специфичности, например кардиоциты, нейроны, клетки поджелудочной железы и другие;

3) в возможности использования для лечения доступных аутологичных клеток больного, нуждающегося в восстановительной терапии.

Получение индуцированных плюрипотентных клеток с регулируемым характером дифференцировки означало бы получение неограниченного источника для регенеративного лечения.

Материал, включенный в данное пособие, формировался в процессе подготовки и прочтения курса лекций в рамках программы по Молекулярной биологии на кафедре биохимии биолого-почвенного факультета и на спецкурсе кафедры патологии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета в 2004–2009 учебных годах.

Борис Валентинович Попов

ГЛАВА 1 | КОНЦЕПЦИЯ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ, ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

1.1. Концепция стволовой клетки

Определение понятия «стволовая клетка» и ее основные свойства

Современный интерес к стволовым клеткам (СК) как объекту биологических и медицинских исследований существенно активировался за последние годы вследствие, по крайней мере, трех событий: 1) увеличения продолжительности жизни и роста числа возрастных заболеваний, лечение которых связано с регенеративной терапией, например рака, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и других; 2) открытию в биологии, которое показало, что рак возникает из клеток, обладающих свойствами СК, так называемых «раковых стволовых клеток», которые и должны быть мишенями его терапии; 3) открытию феномена пластичности СК, который лежит в основе трансдифференцировки СК в зрелые клетки другой тканевой специфичности. Таким образом, трансплантация СК крови может быть эффективным средством лечения заболеваний кроветворной и некровотворных тканей, например инфаркта миокарда, болезни Паркинсона, сахарного диабета и других.

В практической медицине лечение с использованием регенеративного потенциала СК основано на их получении из мест естественного обитания в организме донора, так называемых ниш стволовых клеток. В некоторых случаях СК донора культивируются вне организма с целью их наработки до критической массы, необходимой для последующей терапии. При культивировании *in vitro* СК могут подвергаться фармакологической обработке или биоинженерным модификациям, для придания им нужных лечебных свойств, с последующей трансплантацией аутологичному донору или иммунологически совместимым реципиенту. Успех трансплантации СК основан на априорном предположении, что эти клетки попадут обратно в свое микроокружение (ниши) и будут проявлять активность и свойства, присущие им до удаления из организма, а результатом трансплантации будет восстановление функций ткани, органа или всего организма. Однако предсказуемый успех лечения, основанного на применении СК, предполагает знание биологических основ их поведения, механизмов взаимодействия с другими клетками организма и возможностей регуляции свойств СК в специфических тканевых нишах.

СК обладает тремя фундаментальными свойствами: 1) самоподдержанием или иммортальностью (бессмертием), под которым понимается способность одной или обеих дочерних клеток сохранять полный потенциал материнской клетки, от которой они произошли; хотя клетки-предшественники и некоторые зрелые дифференцированные клетки обладают способностью делиться, в про-

цессе деления они не сохраняют свойств, присущих материнской клетке, то есть не обладают способностью к самоподдержанию; 2) способностью дифференцироваться в любые клетки тела, в несколько клеточных линий или, по крайней мере, в один вид зрелых клеток определенной тканевой специфичности; 3) общее число СК строго регулируется, благодаря существованию механизма обратной связи между отделами функционально зрелых и стволовых клеток (см. цв. вклейку, рис. 1.1).

Гипотеза механизма регуляции самоподдержания стволовых клеток

Авторская гипотеза механизма самоподдержания основана на предположении, что дифференцировочный потенциал СК регулируется путем сопряжения сигнальных путей, ответственных за самоподдержание, с сигнальными путями, поддерживающими убиквитарные функции, такими как клеточное старение, дифференцировка и апоптоз. Ингибция сопряжения сохраняет способность СК к самоподдержанию, и наоборот, активация сопряжения сопровождается утратой самоподдержания и выходом СК в популяцию временно амплифицирующихся клеток-предшественников. Клетки-предшественники утрачивают immortalность, но приобретают способность к терминальной дифференцировке, апоптозу или клеточному старению (см. цв. вклейку, рис. 1.2).

Регуляция самоподдержания стволовых клеток в контексте клеточного цикла

Самоподдержание позволяет СК воспроизвести родительские клетки с высокой степенью надежности и сохранить пролиферативный потенциал на протяжении всей жизни организма. Для достижения этой цели в популяциях СК используется механизм координации множественных сигнальных путей, который утрачивается во многих типах дифференцированных клеток. Механизм самоподдержания объединяет две функции стволовых клеток: собственно деление и поддержание потенциала развития (рис. 1.3). Стволовые клетки на различных стадиях развития и в различных тканях используют различные механизмы для регуляции самоподдержания, поскольку они обладают различными свойствами и решают различные задачи в процессе самовоспроизводящих делений. Например эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) сохраняют неограниченный потенциал к дифференцировке, тогда как соматические СК — потенциал к дифференцировке в несколько или одну тканеспецифическую линию. Механизмы поддержания потенциала развития и деления клетки основаны на использовании различных сигнальных путей, сочетание которых отличается в различных типах СК. Одни сигнальные молекулы участвуют в регуляции только деления ($p21^{Cip1}$) или потенциала развития (Notch), тогда как другие, например Wnt/ β -катенин и Sox1–3, поддерживают обе функции. В случае потери способности к пролиферации, размер популяции СК сохраняется, но не происходит восполнения числа функционально зрелых клеток при их естественной гибели, поэтому размер популяций дифференцированных клеток уменьшается. Наоборот, в случае потери способности поддерживать потенциал развития, первично уменьшается размер популяции СК (см. рис. 1.3)

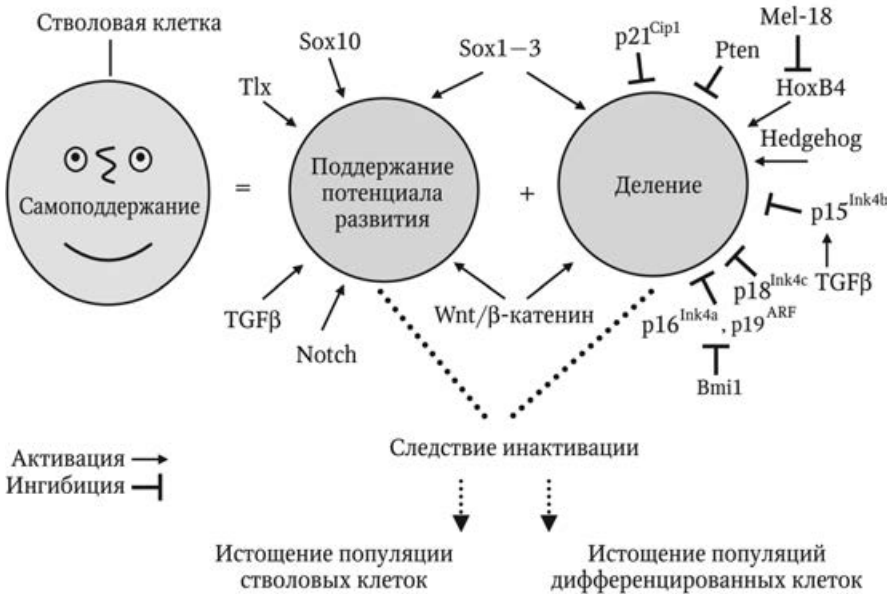


Рис. 1.3. В ходе самоподдерживающихся делений стволовых клеток координируются две различные функции: деление и поддержание потенциала развития. Bmi1, Hedgehog, HoxB4, Mel-18, Notch, p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c}, p19^{ARF}, p21^{Cip1}, Pten, TGFβ, Tlx, Wnt/β-катенин – сигнальные пути и отдельные сигнальные молекулы (Molofsky A. V. [et al.], 2004)

Клеточное деление находится под контролем специфических негативных регуляторов прогрессии клеточного цикла, которые оперируют в контрольных или рестрикционных (R) точках клеточного цикла в конце фазы G1 (R1), S, G2/М и М (рис. 1.4). Клеточная дифференцировка, клеточное старение и апоптоз, определяемые в дальнейшем изложении как убиквитарные функции клетки, также инициируются в контрольных точках клеточного цикла. Негативные

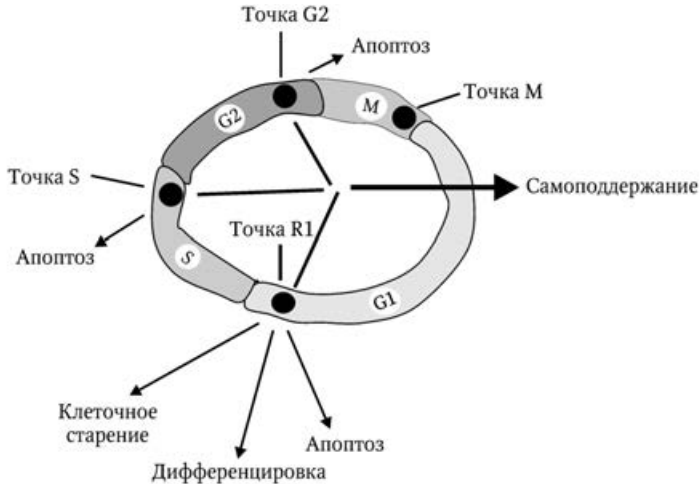


Рис. 1.4. Регуляция самоподдержания стволовых клеток осуществляется в контексте клеточного цикла

Учебное издание

Попов Борис Валентинович

**ВВЕДЕНИЕ В КЛЕТОЧНУЮ БИОЛОГИЮ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Учебно-методическое пособие

Подписано в печать 07.04.2010. Формат 70 × 100¹/₁₆.
Усл. печ. л. 26 + 2,6 цв. вкл. Тираж 1000 экз. Заказ №

Редактор *Н. Н. Атаманенко*
Компьютерная верстка *И. Ю. Илюхина*
Дизайн *И. Ю. Илюхина*

ООО «Издательство „СпецЛит“».
190005, Санкт-Петербург, Измайловский пр., 29,
тел./факс: (812) 251-66-54, 251-16-94,
<http://www.speclit.spb.ru>

Отпечатано с диапозитивов ООО «Издательство „СпецЛит“»
в ГУП «Типография „Наука“»
199034, Санкт-Петербург, 9 линия, 12

ISBN 978-5-299-00430-4



9 785299 004304