

Молекулярная генетика онтогенеза

Лекция 2

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Стволовые клетки (история)

1908: российским ученым Александром Максимовым предсказано существование СК (им же введен этот термин).

1960-е гг.: Тератокарциномы. Термин “эмбриональная плюрипотентная клетка” ввел Лерой Стивенс.

1963-1968: Э. Маккаллох и Дж. Тилл показали присутствие самообновляющихся клеток в костном мозге мыши (пересадка, фокусы в селезенке). Доказана возможность восстановления кроветворения у реципиента (человека) после трансплантации костного мозга.

1970: А. Фриденштейн выделил мезенхимные стволовые клетки.

1978: в пуповинной крови человека обнаружены гемопоэтические стволовые клетки.

1981: М. Эвансом и М. Кауфманом из бластоцисты получены ЭСК мыши (Нобелевская премия за 2007 г.). Термин ЭСК.

1998: Дж. Томпсоном получены ЭСК человека (одно из 3-х лучших достижений биологии XX века).

Тератокарциномы – ключ к обнаружению стволовых клеток

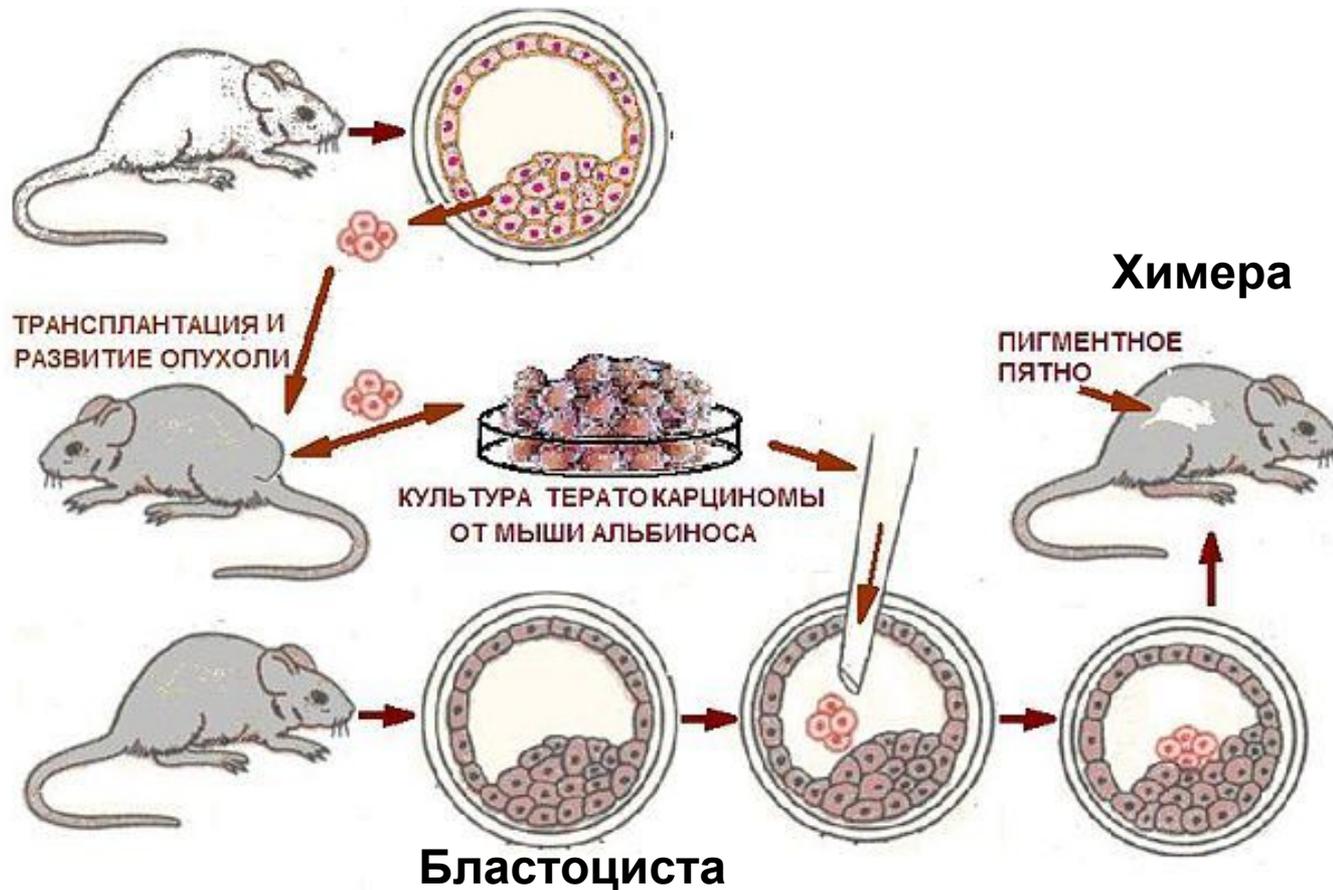
Тератокарциномы – злокачественные тератомы, которые содержат как дифференцирующиеся ткани, так и плюрипотентные стволовые опухолевые клетки (тератомы – доброкачественные опухоли, состоящие из дифференцированных тканей и остатков зачатков органов).

Стволовые тератокарциномные клетки принято называть эмбриональными карциномными клетками и обозначать их буквами ЕС или ЕСС (embryonal carcinoma cells).

Свойства тератокарциномных клеток

- Неоднородный состав клеток**
- Аномалии кариотипа**
- Легко культивируются и гибридизуются**
- Образуют солидные тератокарциномы при введении под кожу и асцидные тератокарциномы при внутрибрюшинном введении**
- Трудности получения химер с полноценными половыми клетками**
- Потенции к опухолеобразованию у химер не реализуются**

Получение химер из клеток тератокарциномы



Получение эмбриональных стволовых клеток

Классический метод (М. Эванс и М. Кауфман, 1981 г.):

Источник - ВКМ естественной бластоцисты

Среда – та же, как для роста тератокарциномных клеток

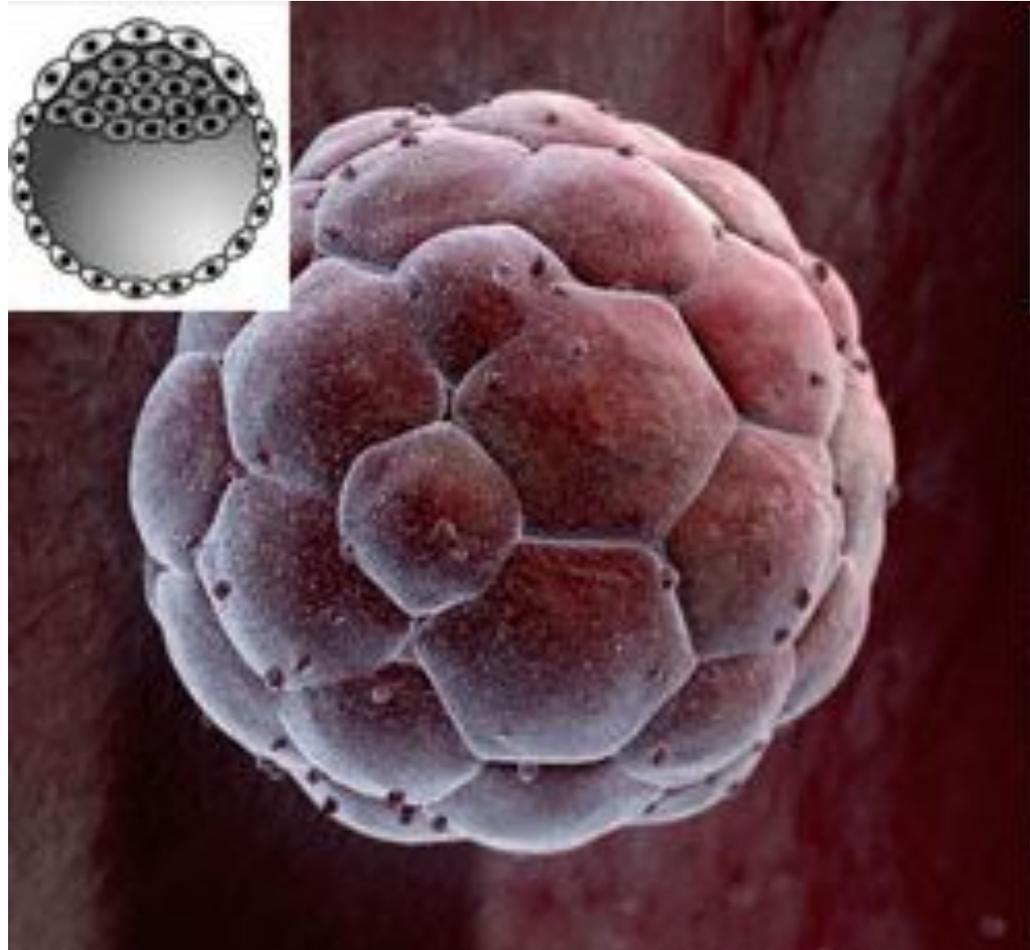
Добавки – фидерный слой (эмбриональные фибробласты) или LIF – *leukemia inhibitory factor*; bFGF (человек)

Дополнение (Ш. Миталипов, 2013 г.):

Перенос ядра соматической клетки человека в яйцеклетку, получение искусственной бластоцисты (кофеин – задержка преждевременного деления).

Далее, по классической схеме.

Вид бластоцисты под электронным микроскопом



Тотипотентность (totipotency) [лат. *totus* — весь, целый и *potentia* — сила] — способность клетки дифференцироваться в любой тип клеток организма, включая экстраэмбриональные (напр., зигота, ранние эмбрионы, клетки внутренней клеточной массы бластоциста и др.). При определенных условиях тотипотентная клетка способна дать начало созданию целого организма.

Плюрипотентность (pluripotency) [лат. *plures* — многие и *potentia* — сила, мощь] — способность клетки дифференцироваться во множество специализированных типов клеток, включая герминальную линию, но не в экстраэмбриональные клетки.

Мультипотентность (multipotency) [лат. *multum* — много и *potentia* — сила, мощь] — способность клетки дифференцироваться в разные типы зрелых клеток одного вида ткани; напр., обладающие мультипотентностью нервные стволовые клетки способны производить в организме три типа клеток: нейроны, астроциты и олигодендроциты.

Основные свойства ЭСК

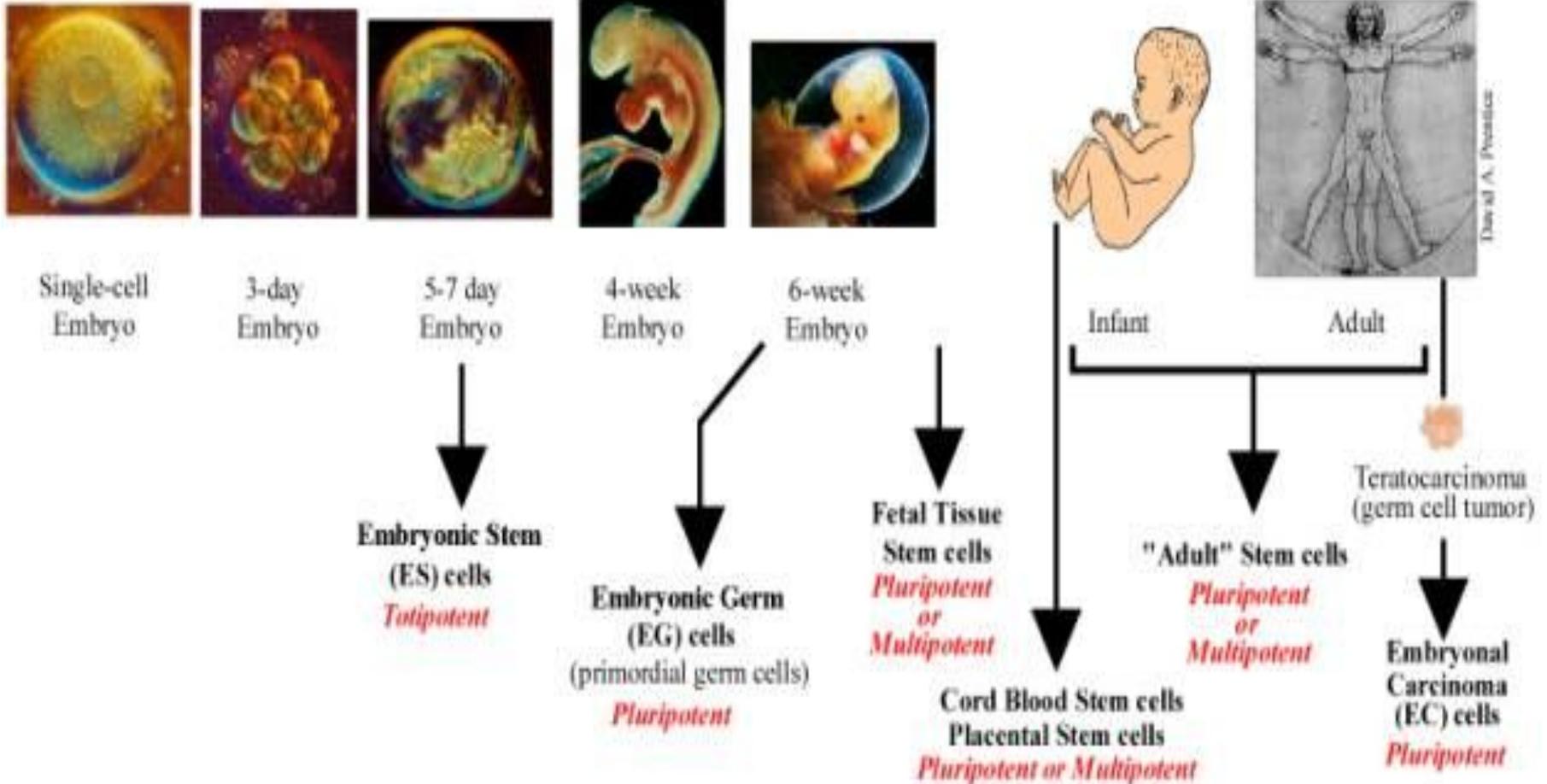
- 1) Плюрипотентность (тотипотентность?)**
- 2) Нормальный кариотип**
- 3) Самоподдержание в культуре (иммортальность)**
- 4) Гипометилирование ДНК**
- 5) Высокая теломеразная активность**
- 6) Короткая G1-фаза**
- 7) Наличие специфических молекулярных маркеров**
- 8) Отсутствие маркеров дифференцировки**
- 9) Экспрессия генов, продукты которых необходимы для поддержания «стволовости» и дальнейших стадий развития**
- 10) Синхронное и асинхронное деления**
- 11) Существуют в основном на ранних стадиях развития (у взрослого организма – в основном региональные СК).**

Классические маркеры ЭСК

Изоферменты щелочной фосфатазы, транскрипционные факторы Oct-4, Nanog, теломеразная активность, маркеры клеточной поверхности: SSEA-3, SSEA-4 – антигенные детерминанты (эпитопы) гликолипидов и TRA-1-60, TRA-1-81 – разные эпитопы одного протеогликана клеточной поверхности.

Stem Cells

Human Developmental Continuum →



Гаплоидные эмбриональные стволовые клетки — ЭС клетки с гаплоидным набором хромосом. Сочетают в себе преимущества гаплоидии и плюрипотентности и служат в качестве уникальной системы для генетического анализа молекулярных, клеточных и онтогенетических событий. Впервые такие клетки млекопитающих (мышь) с использованием партеногенеза (активация неоплодотворенных ооцитов 5% этанолом) получены М. Либом (M. Leeb) и А. Вутцем (A. Wutz) в 2011 г. **Обозначение - PhaESC**

Гаплоидные половые клетки из ЭСК

**В 2003 г. из эмбриональных
стволовых клеток получены
полноценные мышинные ооциты**

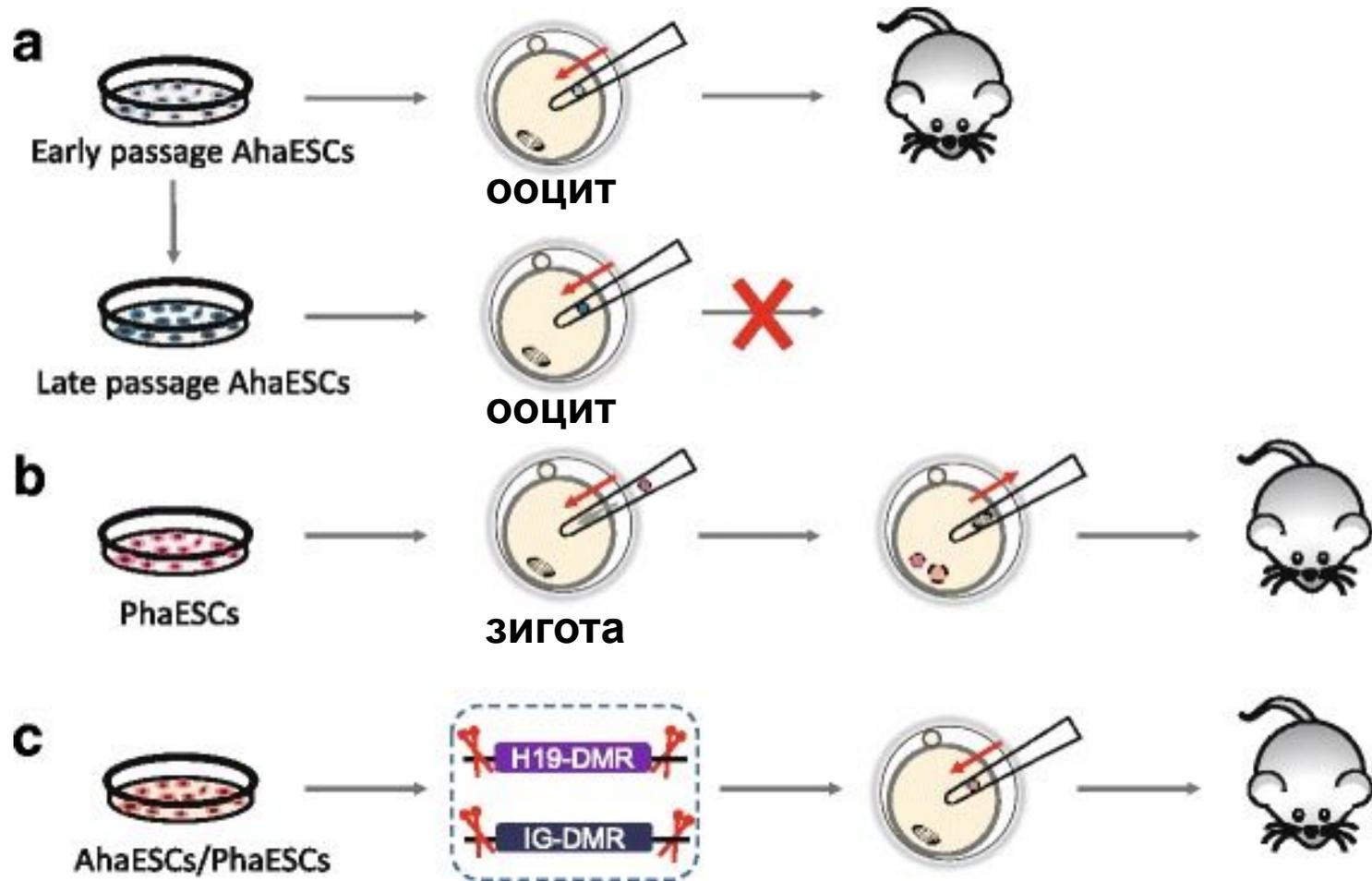
**В 2016 г. из эмбриональных
стволовых клеток получены
полноценные мышинные сперматид-
подобные клетки**

Андрогенные гаплоидные ЭСК (AhaESC)

Получение – перенос сперматозоида в энуклеированный ооцит, развитие ооцита до бластоцисты, выделение ВКМ.

Инъекции AhaЭСК в ооциты – химеры.

Strategies to generate offspring with PhaESC and AhaESC.



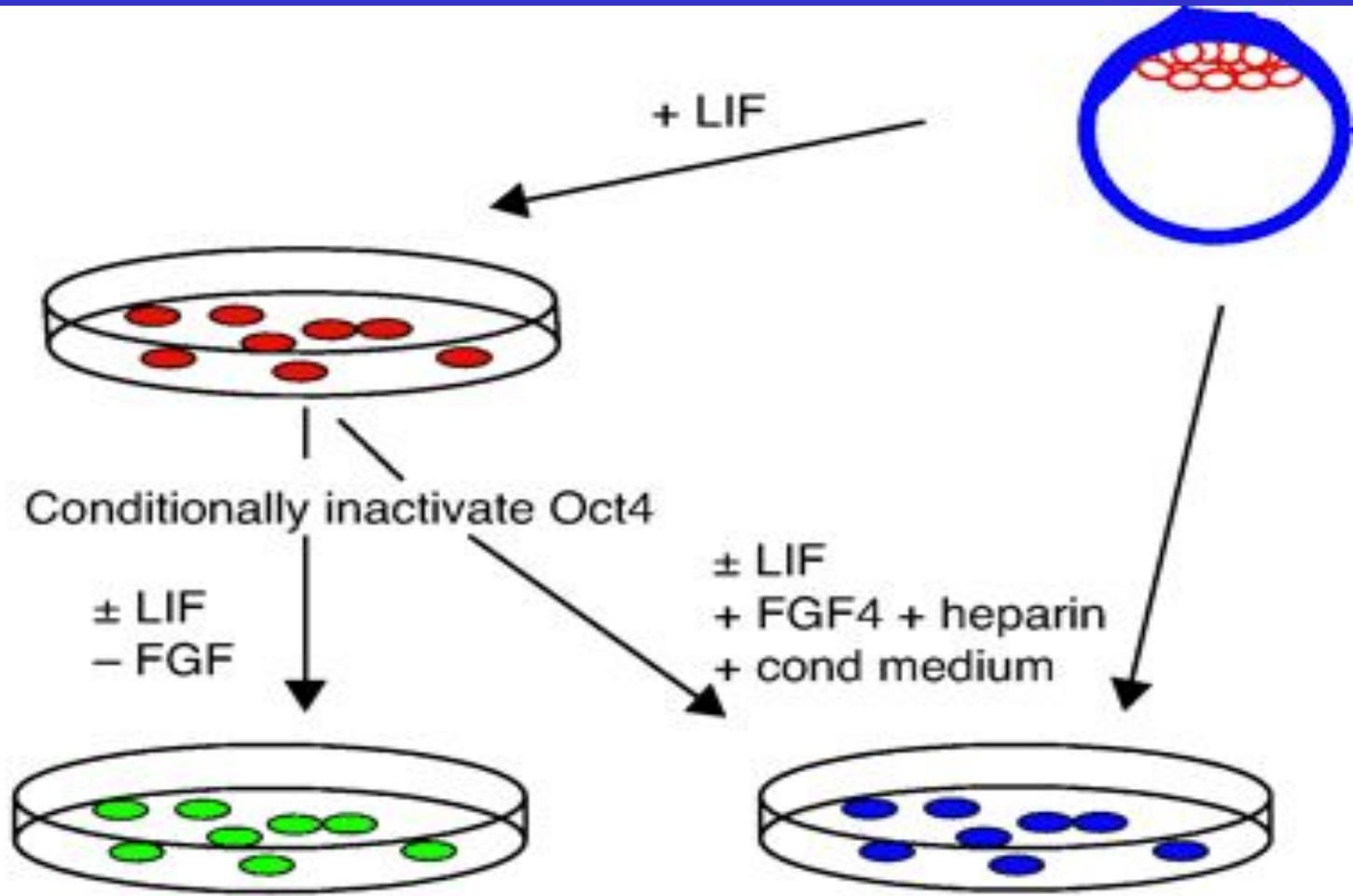
Эмбриональные стволовые клетки – подобие раковых клеток

-) Недифференцированные клетки;**
-) Способность к долговременному делению;**
-) Высокая теломеразная активность;**
-) Вызывают опухоли при внутрибрюшинной пересадке.**

**Дифференцировочная терапия –
один из путей лечения рака**

Искусственная дифференцировка клеток ВКМ бластоцисты в трофобласты

ES клетки



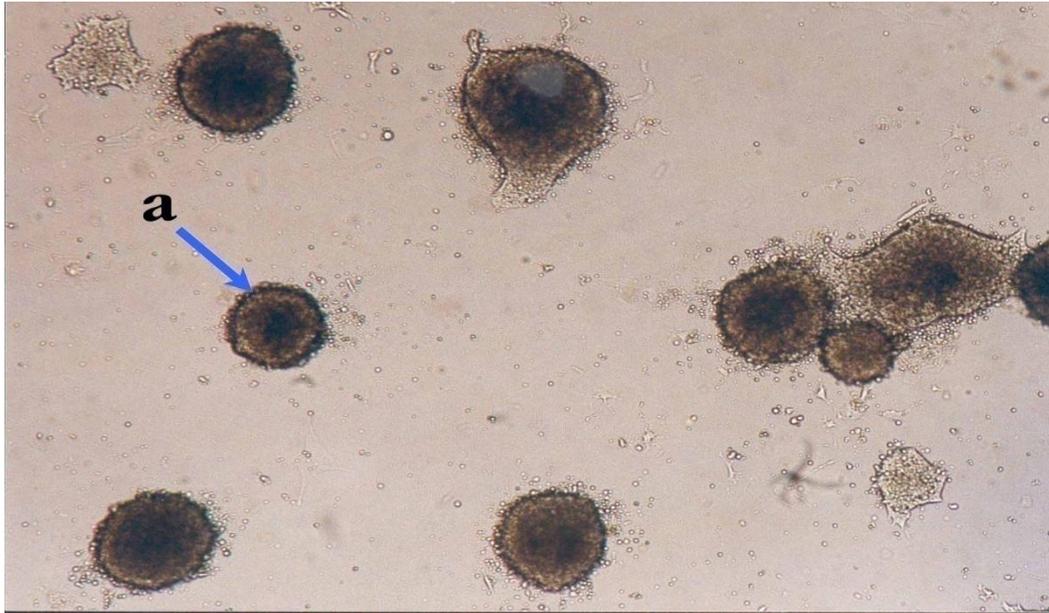
Дифференцирующиеся
трофобластные клетки

Трофобластные СК

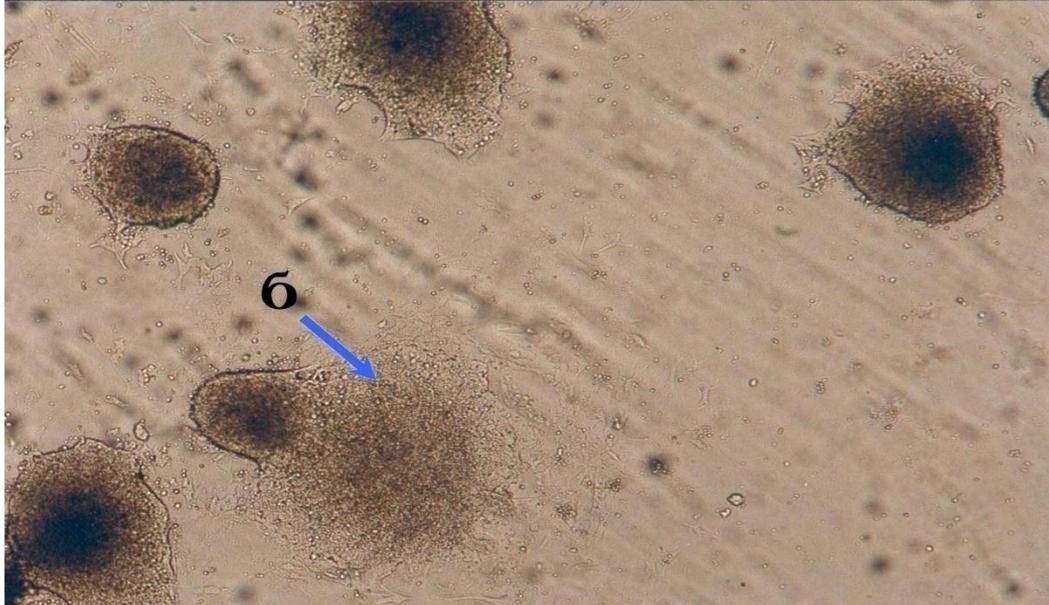
Опухолевые стволовые клетки — немногочисленные специфические долгоживущие и медленно пролиферирующие опухолевые клетки, способные при трансплантации иммунодефицитным животным *in vivo* индуцировать рост опухоли, идентичной исходной, в то время как другие короткоживущие и более дифференцированные клетки опухоли этой способностью не обладают. О.с.к. обладают способностью к самовоспроизведению и асинхронному делению, когда одна дочерняя клетка сохраняет свойства О.с.к., а вторая становится коммитированной к дифференцировке в определенном направлении и способна быстро пролиферировать, но способность к дифференцировке у ее потомков изменена.

Новое в терапия опухолей – воздействие на единичные опухолевые стволовые клетки.

Начальные этапы дифференцировки ЭСК в культуре

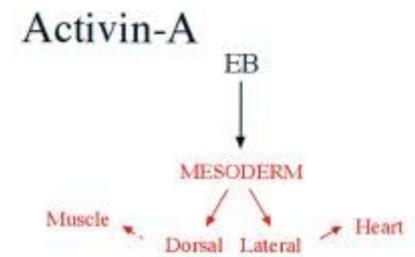
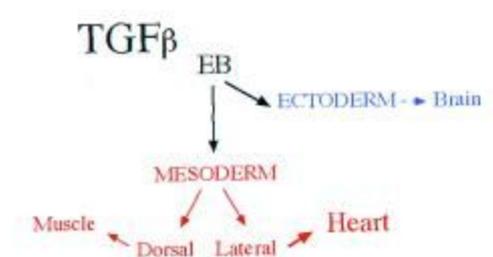
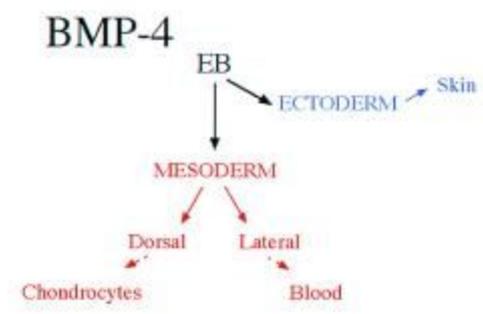
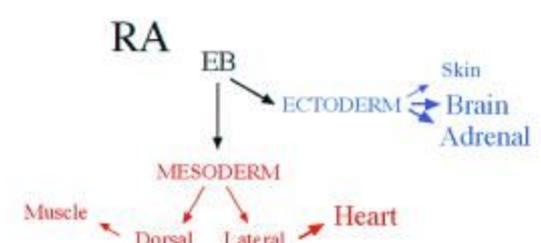
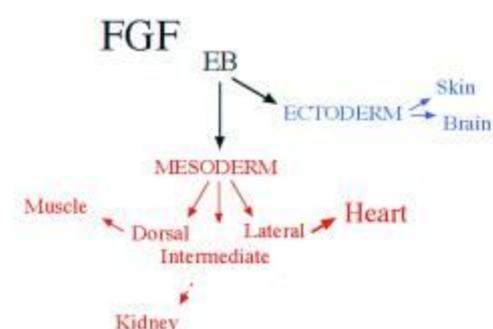
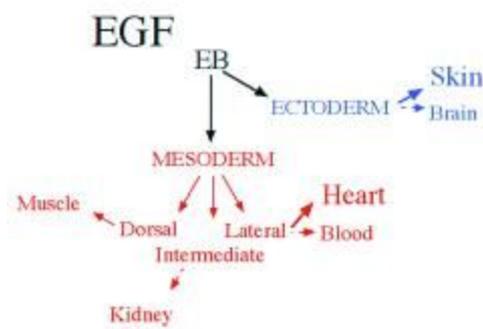
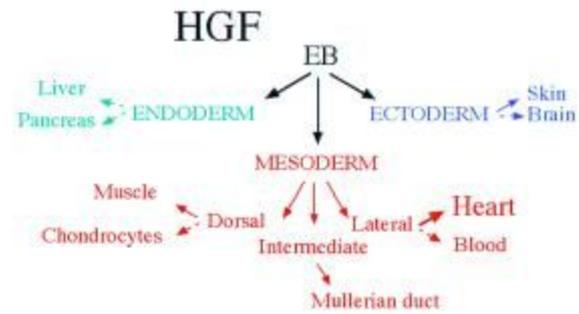
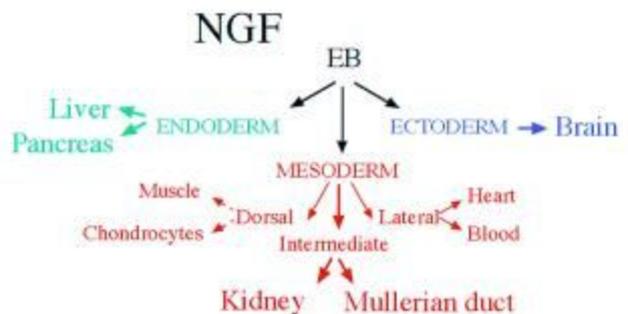


а - Эмбрионидные тела

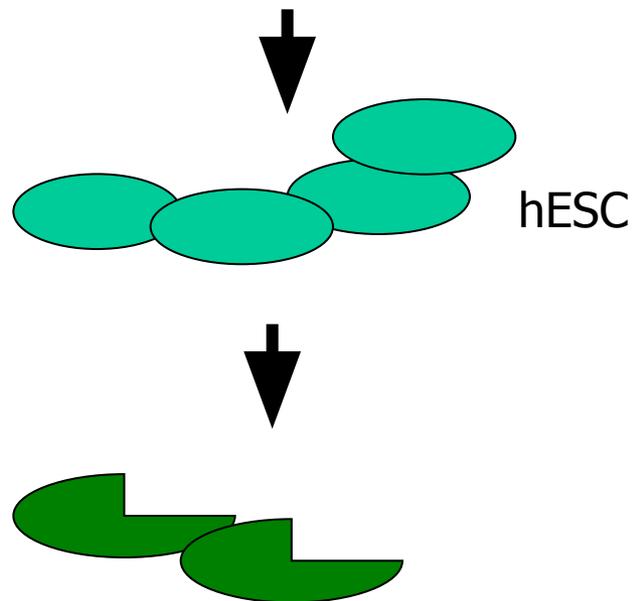


б - Начало миграции клеток из эмбрионидного тела и их дифференцировки

Дифференцировка ЭСК человека под действие различных факторов роста



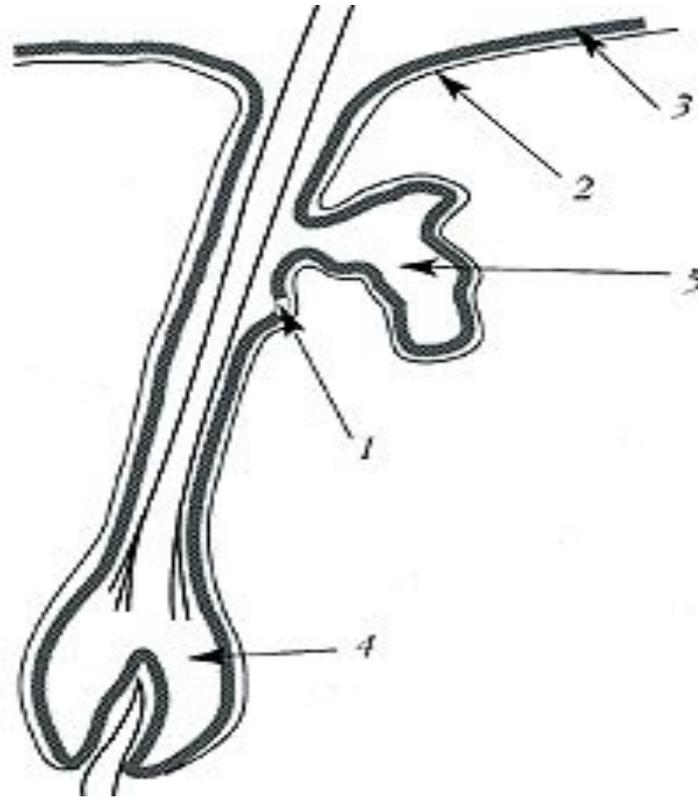
Дорзоморфин



89% клеток дифференцируют по нейрональному пути

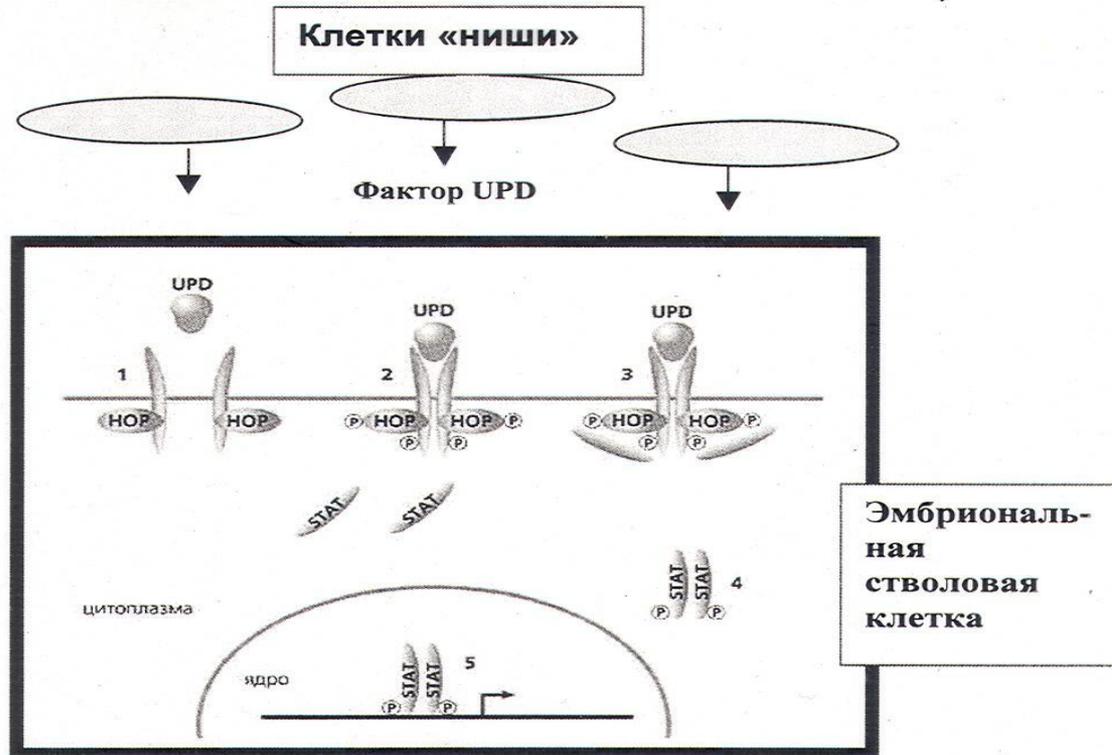
Ниша стволовых клеток

Ниша стволовых клеток в волосяном фолликуле



1 - стволовые клетки наружного волосяного влагалища ниже сальной железы; 2 - базальная мембрана; 3 - эпидермис; 4 - волосяная луковица; 5 - сальная железа

Молекулярный механизм поддержания «стволовости» ЭСК в семенниках дрозофилы



- 1 – активация киназы HOP фактором UPD
- 2 – активация транскрипционного фактора Stat
- 3 – активация генов «стволовости»

эктодерме гаструлы,
Ключевые факторы транскрипции,
примордиальных
поддерживающие «стволовость» ЭСК
(первичных) зародышевых
клетках. Определенный
уровень белка (0,5 –
трофэктодерма, 1,5 –
примитивная эндодерма).
Регуляция транскрипции –
сам по себе и в комплексе с
другими ТФ (Oct4-Sox2**)**
Nanog - Обеспечивает
самообновление ЭСК.

Основные назначения «ниши» для стволовых клеток

1) ограничение пролиферации стволовых клеток только необходимостью поддерживать тканевой гомеостаз;

2) создание условий для максимальной защищенности стволовых клеток от внешних воздействий.

Региональные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки

Ведут свое происхождение от зародышевого листка мезенхимы.

Содержатся в костном мозге, надкостнице, жировой ткани, синовиальной оболочке, скелетной мускулатуре и молочных зубах. Эти клетки обладают способностью дифференцироваться в клетки соединительной ткани, включая кость, жир, хрящ и мускулатуру.

Описано их использование для лечения коронарной болезни артерий, повреждение спинного мозга, болезнь Паркинсона и регенерация печени, для восстановления костей и хряща и при лечении остеоартрита.

Гемопоэтические стволовые клетки

— плюрипотентные кроветворные стволовые клетки, которые способны многократно делиться и дифференцироваться во все классы эритроидных клеток крови (лейкоциты, эритроциты, тромбоциты и др.). Первые ГСК обнаруживаются в областях мезодермы, называемых аорта, гонада и мезонефрос. В период внутриутробного развития ГСК присутствуют в желточном мешке, печени, селезенке и костном мозге. Трансплантированные в организм Г.с.к. способны восстанавливать систему кроветворения при ее поражении при болезни или химиотерапии. Источником ГСК, пригодных для трансплантации, служат клетки костного мозга, пуповинная кровь.

Нейрональные стволовые клетки

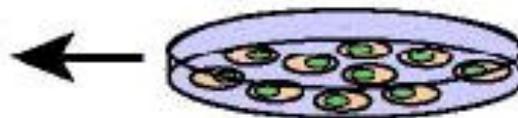
- Мультипотентные клетки, которые способны многократно делиться и дифференцироваться во все классы нейрональных клеток мозга (нейроны, олигодендроциты и астроциты).
- Располагаются в субвентрикулярной зоне латеральных желудочков мозга и в субгранулярной зоне гиппокампа.

Маркеры региональных стволовых клеток

Стволовые клетки	Белок-маркер
Стволовые нейрональные клетки	Нестин, Sur8
Начало специализации нейрональных клеток-предшественников	Виментин
Клетки, развивающиеся в нейрональном направлении	бета3-тубулин, энолаза
Клетки специализирующие как вспомогательные, глиальные	Глиальный фибриллярный кислый белок, белок S-100
Сперматогонии на стадии XII Амплифицирующиеся сперматогонии Пролиферирующие сперматогонии	Nanog, Oct-4 Plzf, Gfra1 Stra8

ПРИМЕНЕНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ И В МЕДИЦИНЕ

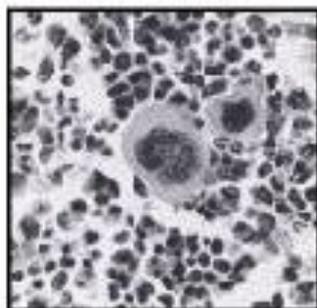
Тестирование
лекарственных
и токсичных
веществ



Культура стволовых
клеток

Опыты по изучению
процессов развития
организмов и механизмов
регуляции работы
генов

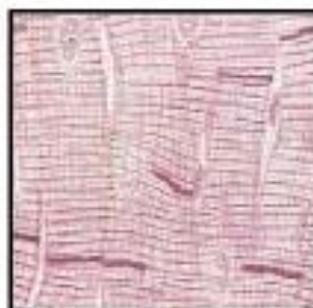
Клеточная/тканевая терапия



Костный мозг



Нервная ткань



Сердечная
мышца



Островковые клетки
поджелудочной
железы

Перечень заболеваний, при лечении которых в отдельных случаях была успешно применена трансплантация стволовых клеток

Основное внимание уделяется лечению злокачественный новообразований (в первую очередь, лейкозов).

Появляются сообщения об успешной трансплантации стволовых клеток при заболеваниях сердечно-сосудистой и нервной систем (инсульта, болезнй Паркинсона и Альцгеймера).

Проводятся исследования по применению стволовых клеток при лечении инфаркта миокарда и сердечной недостаточности. Разработаны международные протоколы лечения рассеянного склероза.

Последние новости

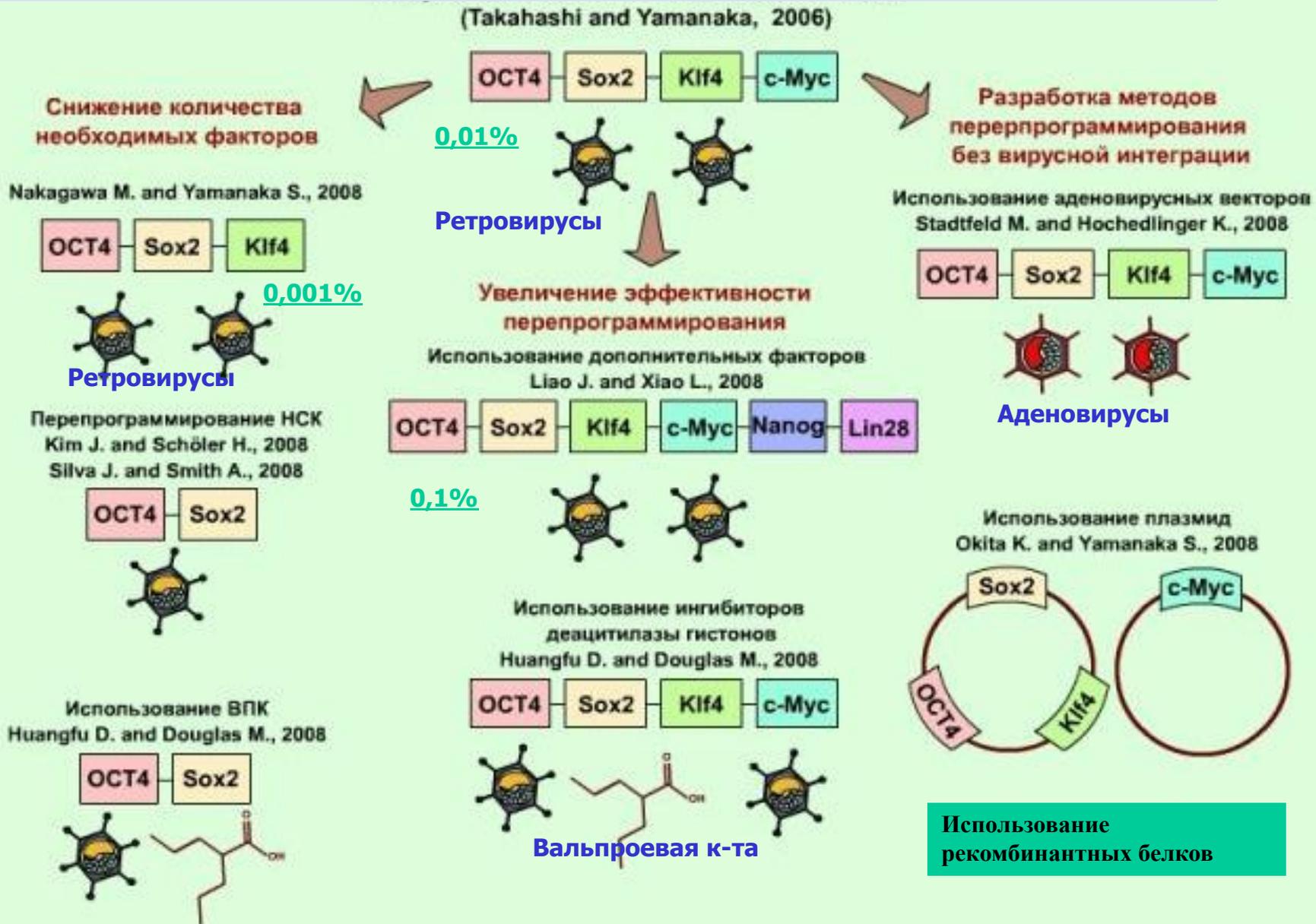
- В глазу человека обнаружены особые стволовые клетки, которые не только способны превращаться в высокочувствительные к свету клетки, но и нивелировать процессы, приводящие к дегенеративной слепоте.
- Выращены искусственные пенисы из стволовых клеток подопытных кроликов.
- Показано, как стволовые клетки в теле мышей и крыс могут быть мобилизованы, чтобы сформировать новую мышцу в поврежденных участках тела.

Индуцированные плюрипотентные клетки (iPS cells)

Индукция плюрипотентности в фибробластах с помощью ретровирусных конструкций, содержащих гены:

- 4 фактора: Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 (*Takahashi et. al., 2006*)
Фибробласты мыши
- 4 фактора: Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 (*Takahashi et. al., 2007*)
Фибробласты человека
- 4 фактора: Oct4, Sox2, NANOG, LIN28 (*Junying Yu et. al., 2007*)
Фибробласты человека
- 3 фактора: Oct3/4, Sox2, Klf4 (*Nakagawa et. al., 2008*) Фибробласты человека

Варианты получения iPS клеток



Ген c-myc – ключевой для получения полноценных iPS

**Тест с химерными мышами показал, что 3F-iPSC
(отсутствие гена *c-myc* в коктейле Яманаки)
*приводит к непередаче химерных свойств по
наследству.***

**Главное в этом: контроль ацетилирования гистонов
(эпигенетика)**

Дальнейшее развитие метода

1) Использование белков (2011).

2) Химически индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ХИПСК (смесь из 7 маленьких молекул - индукторов путей сигнальной трансдукции и модуляторов эпигенетики: forskolin, methylhydroxuptamine, D4476, azacytidine и др.) (2013).

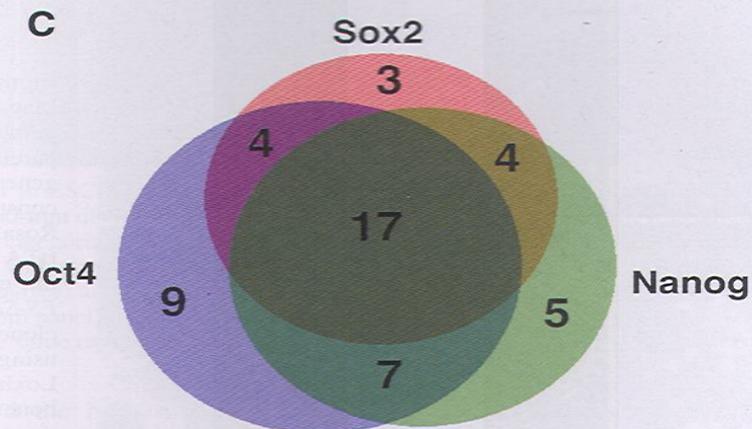
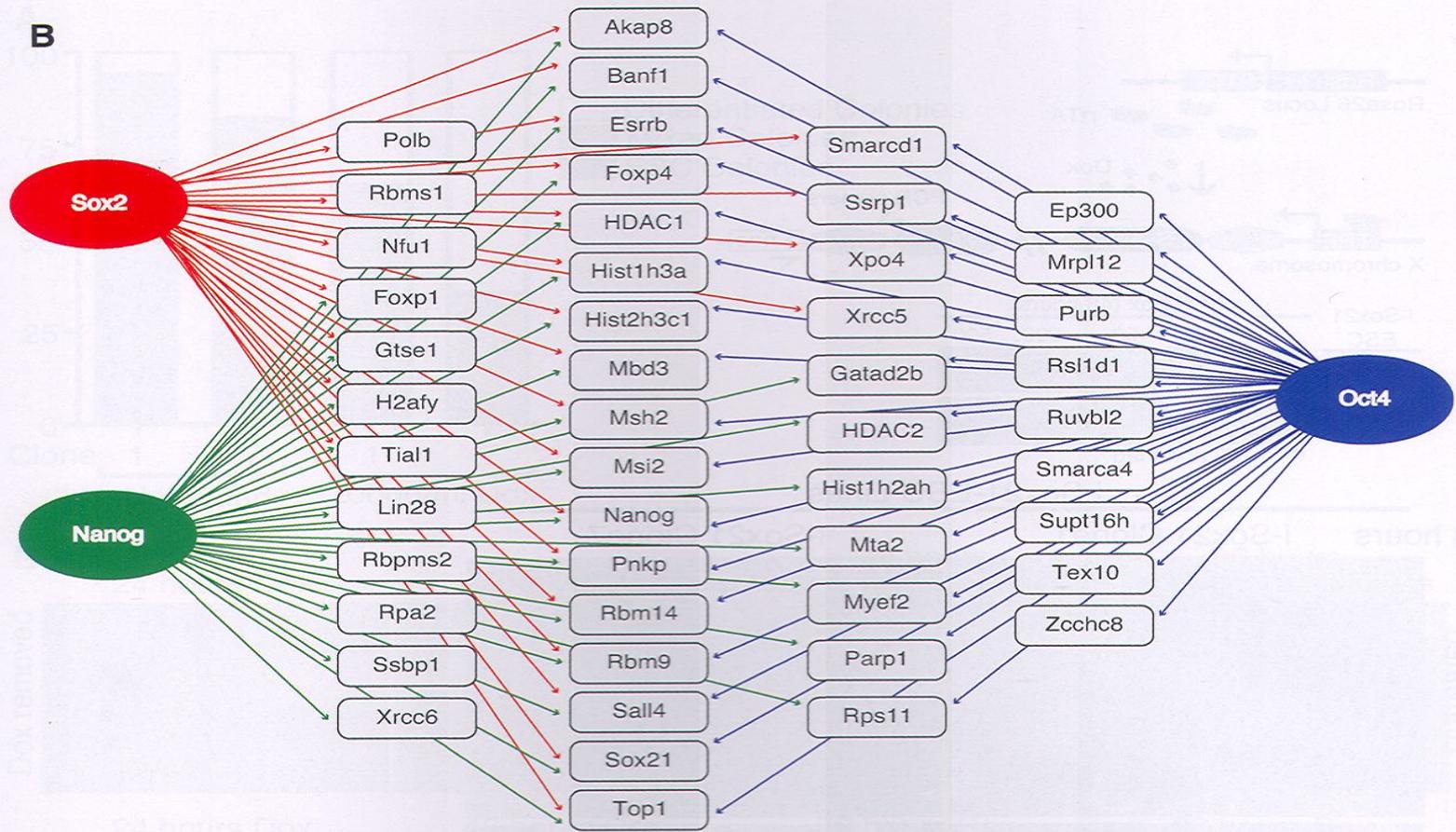
Новые данные о перепрограммировании клеток

- 1) Сочетание трех небольших соединений (форсколина, основного фактора роста фибробластов и ингибитора фермента киназы гликогенсинтазы-3 GSK-3beta) позволило перепрограммировать ИПСК в мышечные клетки, успешно прижившиеся у мышей.**
- 2) Удаление белка MBD3 из взрослых клеток может в несколько раз повысить эффективность и скорость их перепрограммирования.**
- 3) Репрограммирование in vivo (коктейль Яманаки у трансгенных мышей под контролем доксорубицина).**

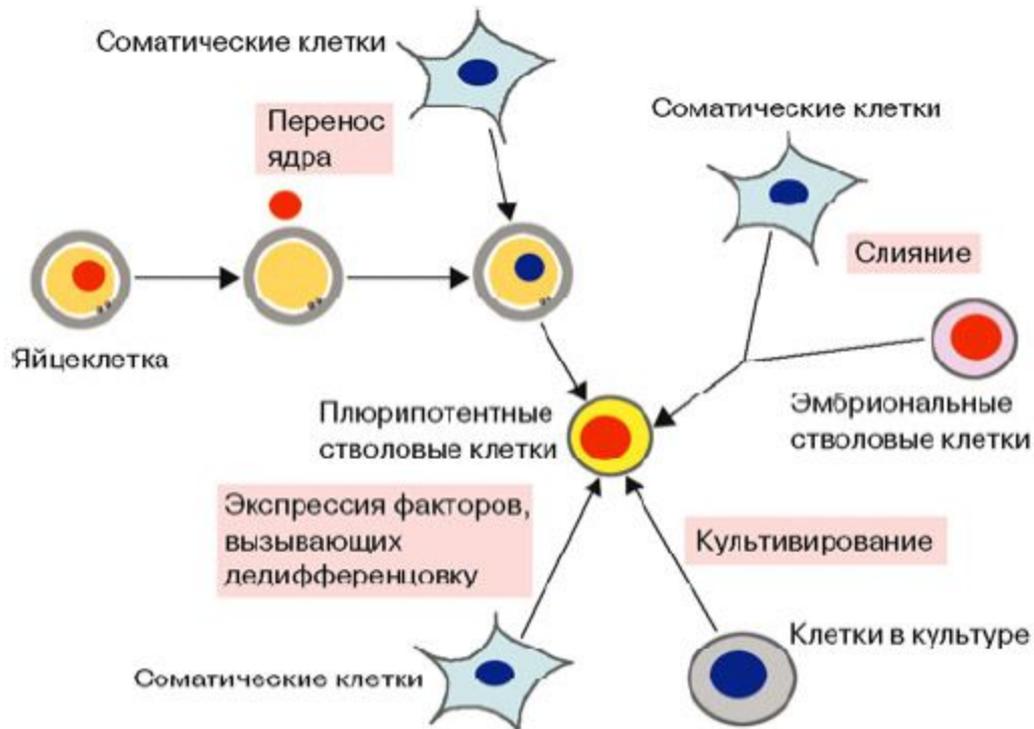
Получение кроветворных клеток из кожи – обходной механизм

Белок Oct-4 – играет ключевую роль в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток.

Клетки кожи с введенным геном выращивали в среде с цитокинами, стимулирующими кроветворение – гематопозитические стволовые клетки.



Три основных способа получения плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток

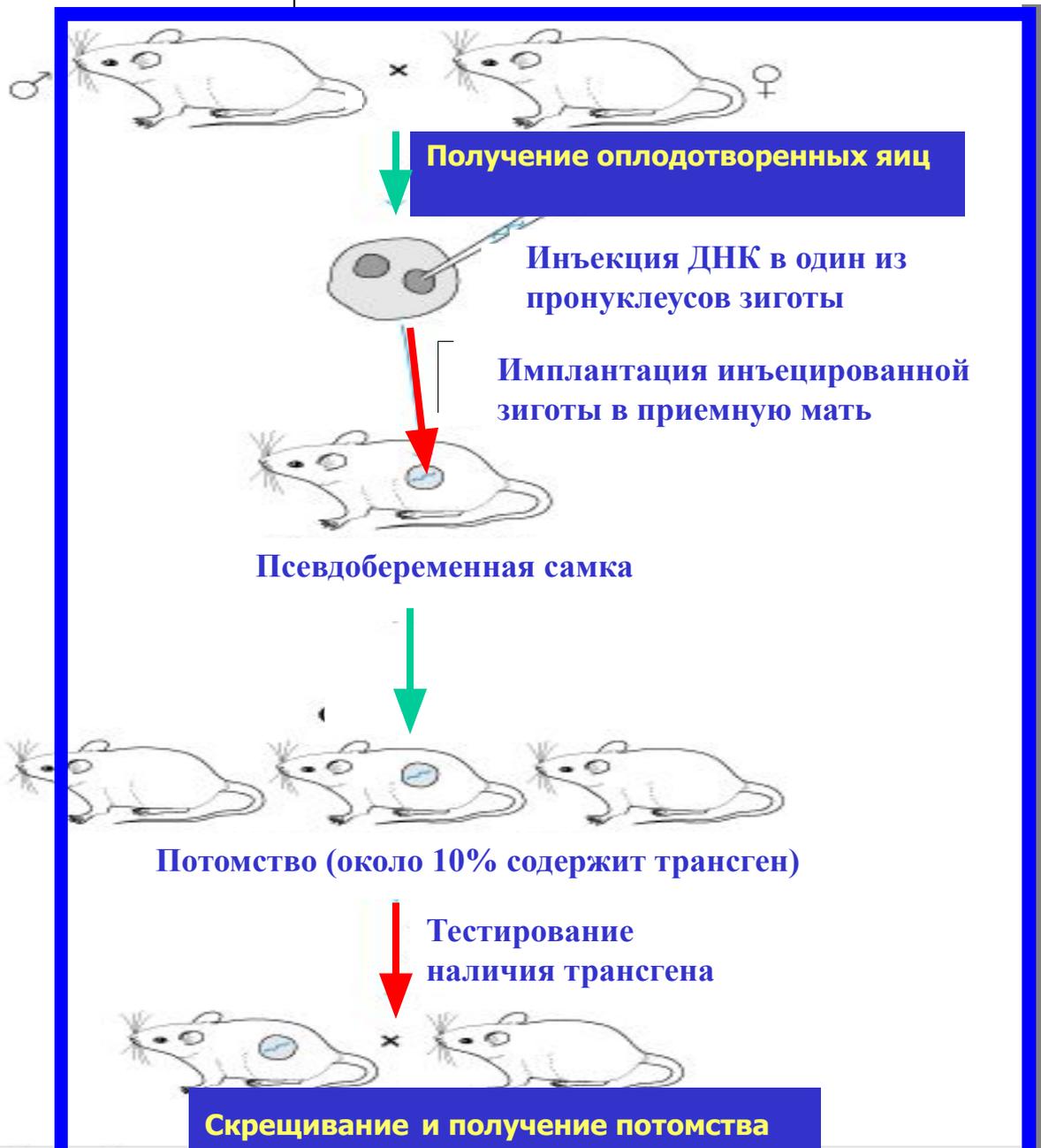


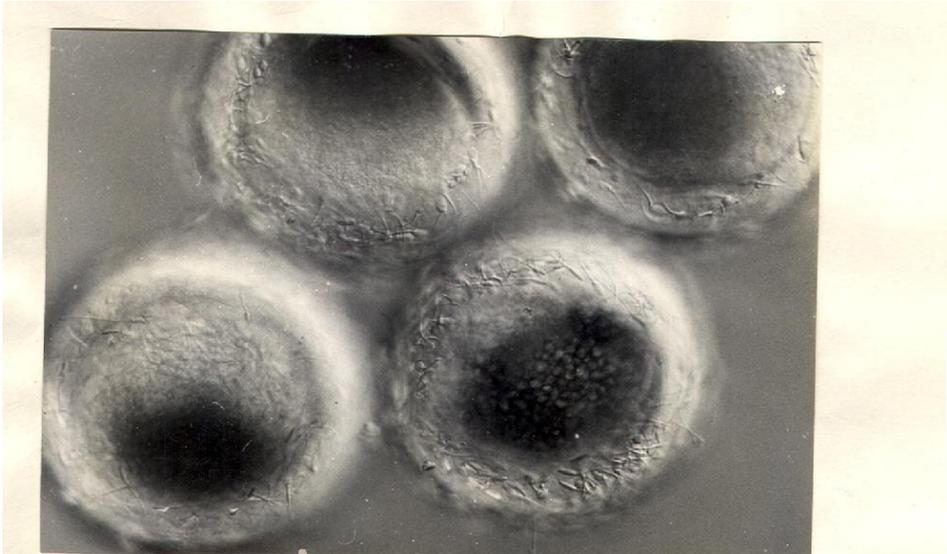
Трансгеноз, трансгенез (transgenesis) [лат. *trans(ferre)* — переносить и греч. *genes(is)* — происхождение] — искусственный перенос экзогенной ДНК, приводящий к ее интеграции с геномом клеток раннего эмбриона, в результате чего эта ДНК (ген) содержится во всех клетках развивающе-гося из эмбриона взрослого организма и передается по наследству как менделирующий признак.

Трансген – ген, перенесенный в целый организм с помощью трансгеноза.

Трансгенный организм – организм, содержащий в геноме всех своих клеток чужеродную ДНК (трансген), передающуюся по наследству.

Классическая схема трансгеноза





Зигота свиньи



Зигота человека



Из истории микроинъекций

- **Т. Лин, середина 60-х годов – первые микроинъекции веществ в яйцеклетку мыши**
- **Гермерад, 1976 – инъекции ДНК в яйца дрозофилы**
- **Гордон, 1977 – показал функционирование мРНК и ДНК в ооцитах ксенопуса**
- **Гордон, 1980 – инъекции ДНК в пронуклеус зиготы мыши, первая трансгенная мыш**

Приемы переноса генов с помощью вирусов

10 и MoMLV (Р. Яниш, Б. Минц с 1974 г.)

- инъекцией вируса под оболочку предимплантационных эмбрионов,
- прямая инфекция освобожденных от оболочек предимплантационных эмбрионов,
- кокультивирование предимплантационных эмбрионов с монослоем мышинных клеток, продуцирующих вирус,
- инъекция вируса в полость бластоцисты,
- инъекция клеток-продуцентов вируса в полость бластоцисты,
- инъекция вирусов в ткани зародышей постимплантационных стадий развития,
- вирусная инфекция ES клеток и инъекция их в полость бластоцисты,
- инфекция вирусным вектором яйцеклеток и зигот млекопитающих (1998 – 2002, КРС, обезьяна, мыши).

Перенос вирусов в с/х животных

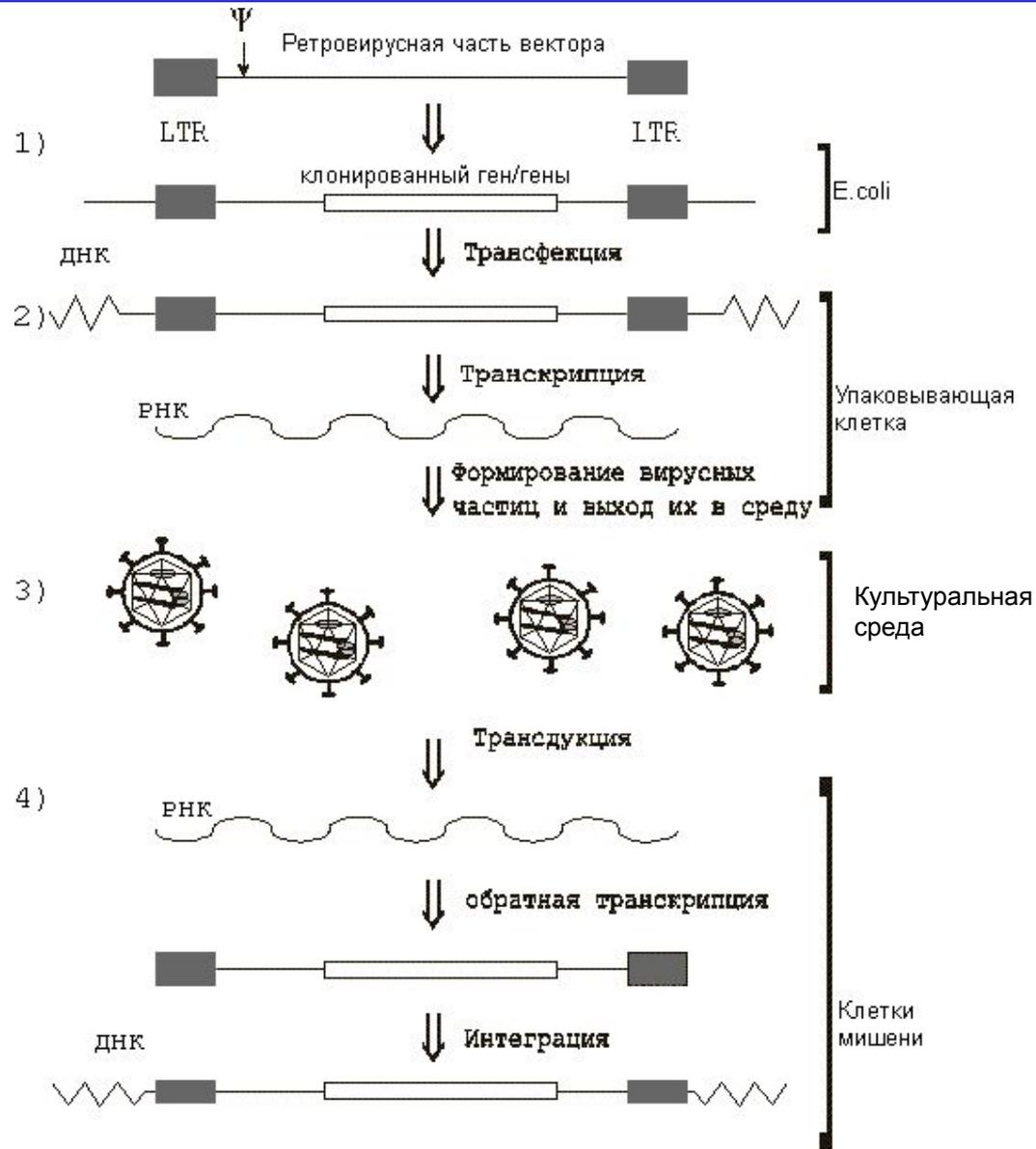
Salter, 1987 – куры (вирус лейкемии птиц)

Narvey, 1990 – овцы (кошачий вирус лейкемии)

Narvey, 1990 – свиньи (кошачий вирус лейкемии)

Kim et al., 1993 – коровы (вирус Молони с оболочкой вируса лейкемии гиббона)

Схема переноса генов с использованием ретровирусных векторов



Получение трансгенных мышей с использованием ретровирусного вектора



Трансгенез с помощью сперматозоидов



Трансфекция сперматозоидов: липофекция, использование диметилсульфоксида и др

Перенос генов с помощью сперматозоидов

**Bracket et al., 1971 – захват спермиями
чужеродной ДНК**

Lavitrano et al., 1989 – трансгенная мышь

**Brinster, 1989 – не воспроизвел этот
результат**

**Bachiller et al., 1991 - ДНК-липосомные
комплексы**

Chang et al., 1999 – кролики, крысы

Кузнецов, 1999 – с/х. животные

Способы трансгеноза

Техника переноса

Носители ДНК



Эмпирически подобранные условия для наиболее эффективного получения трансгенных организмов (мышей) с помощью микроинъекций

- Для инъекций удобен мужской пронуклеус (эффективность слегка выше)
- Наибольшая эффективность при введении ДНК в фазу синтеза ДНК в зиготе
- Объем вводимого раствора около 1 пкл
- Оптимальная концентрация ДНК – 1-3 нг/мкл
- Гибридные линии животных более удобны для трансгеноза
- Вводимая ДНК (трансген) может быть как в линейной, так и в кольцевой форме.
- Размер трансгена не влияет существенно на эффективность трансгеноза

Эффективность и стоимость трансгеноза у животных

На сегодняшний день:

1 трансгенная мышь из 10-40 инъецированных зигот

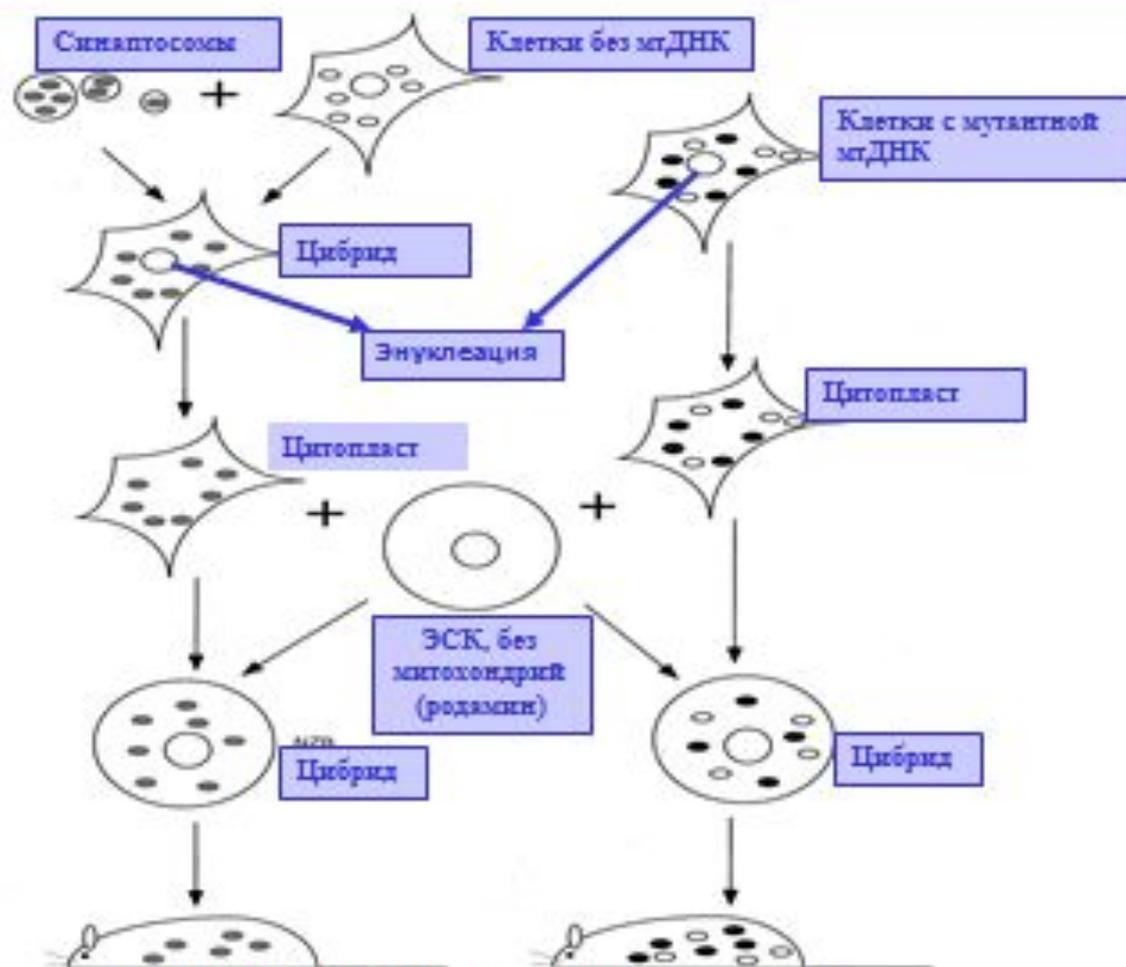
1 трансгенная корова из 1600 инъецированных зигот.

Цена трансгенного животного:

1 мышь – 100\$, 1 овца – 60000 \$, одна корова – 550000 \$.

Трансмитохондриальный организм (trans-mitochondrial organism) — животный организм, содержащий в своих клетках митохондрии другого организма, который получают путем инъекции чужеродных митохондрий в цитоплазму **зиготы** или **эмбриональных стволовых клеток**, или с использованием транс-митохондриальных цибридов. Лабораторный Т.о. представляет собой адекватную модель митохондриальных болезней человека, передаваемых по материнской линии. Первый Т.о. (мышь), передающий митохондрии по наследству, был получен **Д. Валласом** с соавт. в 1999 г.

Стратегии получения трансмитохондриальных мышечных тканей

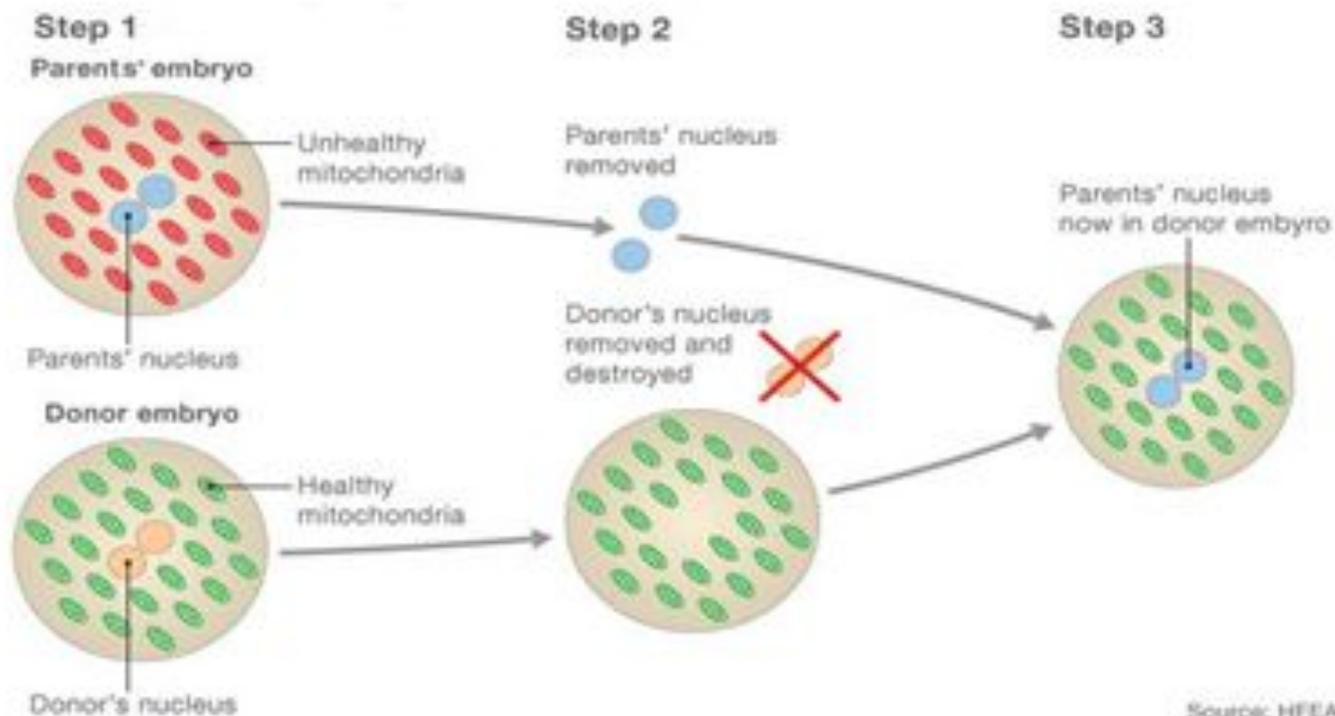


Трансмитохондриальные мышцы

«Ребенок от трёх родителей»

- Митохондриальные болезни встречаются у 1 из 6500 детей.
- Описано около 50 генетических заболеваний, связанных с мутациями в ДНК митохондрий, многие из которых являются смертельными в раннем детстве.
- В ходе процедуры получения «ребенка от трёх родителей» поврежденные митохондрии матери заменяются здоровыми митохондриями яйцеклетки другой женщины-донора. Так как эти изменения передаются из поколения в поколение, это позволит избавиться от болезни будущим поколениям в семье.

Процедура получения «ребенка от трёх родителей»



Цисгеноз (cisgenesis) — процесс получения генетически-модифицированных организмов, основанный на методах генной инженерии, при котором в отличие от обычного трансгеноза перенос генов вместе с их собственными регуляторными элементами осуществляется только между тесно связанными скрещиваемыми в природе организмами (напр., перенос генов картофеля в геном картофеля), что приводит к усилению или ослаблению уже существующего у организма признака. Термин «Ц.» впервые использовал Я. Шаарт (J. Schaart) в 2004 г. Син.: **интрагенез (intragenesis)**

Паратрансгеноз (paratransgenesis)

[лат. *para* — возле, при, вне, *trans(ferre)* — переносить и греч. *genesis* — происхождение] — метод переноса экзогенного генетического материала в целые организмы с помощью бактерий-симбионтов или вирусов-симбионтов. П. направлен обычно на подавление патогена в переносчиках инфекций, приводящих к различным заболеваниям. Напр., с помощью генетически модифицированной бактерии *Sodalis* были получены мухи це-це, устойчивые к инфекции трипаносомами, которые являются возбудителями малярии.

Метод предложен **Ч. Бирдом** с соавт. в 1993 г.

Проблемы, решаемые с помощью трансгеноза

**Изучение механизмов регуляции экспрессии генов
(ткане – и стадийспецифическая экспрессия)**

- Изучение механизмов индивидуального развития
- Изучение механизмов мутагенеза
- Поиск генов, ответственных за различные патологии человека
- Моделирование заболеваний человека
- Испытание лекарственных препаратов
- Создание животных-биореакторов
(продуценты фармакологических препаратов)

**Трансгенная
мышь с геном
гормона роста
человека**

Контроль

