

С. П. Медведев, А. И. Шевченко, Г. Т. Сухих, С. М. Закиян

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки



2-е издание
расширенное и дополненное
2014

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ
НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПАТОЛОГИИ
КРОВООБРАЩЕНИЯ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е. Н. МЕШАЛКИНА
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В. И. КУЛАКОВА

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

С. П. МЕДВЕДЕВ, А. И. ШЕВЧЕНКО,
Г. Т. СУХИХ, С. М. ЗАКИЯН

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

2-е издание, расширенное и дополненное

Ответственный редактор
академик, профессор *В. В. Власов*



НОВОСИБИРСК
ИЗДАТЕЛЬСТВО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

2014

ББК 575
УДК 52.54
М42

Медведев, С. П.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки. — 2-е издание, расширенное и дополненное / С. П. Медведев, А. И. Шевченко, Г. Т. Сухих, С. М. Закиян; отв ред. В. В. Власов; Рос акад наук, Сиб. отд-ние, Ин-т цитологии и генетики [и др.]. — Новосибирск: Издательство СО РАН, 2014. — 376 с.

ISBN 978-5-7692-1384-7

Первая публикация, посвященная получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, увидела свет в 2006 г., и данные клетки сразу вызвали широкий интерес у мирового научного сообщества, включая специалистов в области биологии развития, эпигенетики, клеточной терапии и фармакологии. В 2012 году, за открытие способа репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию, Синъе Яманакэ была вручена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Во втором издании книги мы попытались систематизировать огромный массив новых экспериментальных данных о молекулярных основах самообновления и плюрипотентности клеток млекопитающих, эпигенетических механизмах процесса репрограммирования, методах получения линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и животных, а также методах редактирования их геномов. Кроме того, во втором издании, впервые представлена глава, целиком посвященная использованию индуцированных плюрипотентных клеток в качестве моделей для исследования механизмов патогенеза, а также поиска и тестирования способов терапии заболеваний человека. Изложенный в книге материал представляет интерес для биологов различных специальностей: генетиков, физиологов, иммунологов, биохимиков и биотехнологов, а также для медицинских генетиков, врачей, студентов и аспирантов.

Рецензенты:

Попова Н. К., докт. мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ
Васильева Л. А., докт. биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ
Стегний В. Н., докт. биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ

Утверждено к печати

Ученым советом Института химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

ISBN 978-5-7692-1384-7

© Медведев С. П., Шевченко А. И., Сухих Г. Т.,
Закиян С. М., 2011
© Медведев С. П., Шевченко А. И., Сухих Г. Т.,
Закиян С. М., 2014, с изменениями
© Оформление. Издательство СО РАН, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ	8
ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ	10
ГЛАВА 1	
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПОДДЕРЖАНИЯ САМООБНОВЛЕНИЯ И ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	12
1.1. Эмбриогенез млекопитающих и стволовые клетки. Плюрипотентные клетки <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	
1.2. Компоненты среды, применяемые для поддержания плюрипотентности.....	19
1.3. Сигнальные пути плюрипотентных клеток	20
1.3.1. <i>LIF/JAK/STAT3</i>	
1.3.2. <i>PI3K/AKT</i>	21
1.3.3. Сигнальные пути, запускаемые белками семейства <i>TGFβ</i>	22
1.3.4. <i>MAPK/ERK</i>	24
1.3.5. Сигнальный путь <i>PKC</i>	25
1.3.6. Сигнальный путь <i>Aurora Kinase A/p53</i>	
1.3.7. Сигнальный путь <i>WNT</i>	
1.4. Транскрипционные факторы <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> и <i>SOX2</i>	
1.4.1. Транскрипционный фактор <i>OCT4</i>	26
1.4.2. Транскрипционный фактор <i>NANOG</i>	28
1.4.3. Транскрипционный фактор <i>SOX2</i>	29
1.5. Гены-мишени транскрипционных факторов <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> и <i>SOX2</i>	30
1.6. Эпигенетика плюрипотентных клеток	34
1.6.1. Бивалентные домены хроматина	35
1.6.2. Метилирование ДНК и плюрипотентность	36
1.6.3. Белковые комплексы, поддерживающие активную структуру хроматина.....	38
1.6.4. АТФ-зависимые комплексы ремоделинга хроматина.....	
1.6.5. Белки группы <i>Polycomb</i>	39
1.7. Белок-белковые взаимодействия в системе поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток.....	41
1.8. Роль микроРНК и других некодирующих РНК в регуляции плюрипотентности и дифференцировки.....	46
1.9. Различия линий ЭСК по статусу плюрипотентности. Исходная и минимальная плюрипотентность	52
1.10. Стволовые клетки в фундаментальных исследованиях. Транскрипционные факторы <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> и <i>NANOG</i> и инактивация X-хромосомы.....	55

ГЛАВА 2	
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ	
РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК	60
2.1. Индуцированная плюрипотентность	
2.2. Репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию с помощью определенных факторов.....	63
2.3. Основные этапы репрограммирования соматических клеток в ИПСК	66
2.4. Инактивация вирусных конструкций, используемых при репрограммировании	72
2.5. Эпигенетические преобразования, происходящие при репрограммировании соматических клеток в ИПСК.....	73
2.6. Роль микроРНК и lincРНК в процессе репрограммирования.....	79
2.7. Проблема эффективности получения ИПСК и безопасности их применения в заместительной клеточной терапии.....	84
2.8. Гены, которые могут заменить <i>c-MYC</i> и <i>KLF4</i> при получении ИПСК.....	86
2.9. Методы повышения эффективности получения ИПСК.....	88
2.9.1. Клеточные линии, наиболее эффективно подвергающиеся репрограммированию	
2.9.2. Химические соединения, повышающие эффективность репрограммирования клеток	94
2.10. Методы получения ИПСК без генетической модификации генома клеток	100
2.10.1. Методы, предусматривающие удаление генетических конструкций.....	
2.10.1.1. <i>Cre-LoxP</i> -опосредованная рекомбинация	
2.10.1.2. <i>PiggyBac</i> -транспозиция	101
2.10.2. Использование векторов, не интегрирующихся в геном клетки	
2.10.2.1. Плазмидные векторы.....	
2.10.2.2. Эписомные векторы	102
2.10.2.3. Неинтегрирующиеся вирусные векторы.....	103
2.10.3. Методы репрограммирования, не предусматривающие использование систем доставки ДНК.....	
2.10.3.1. Трансдукция клеток рекомбинантными белками	
2.10.3.2. Репрограммирование с помощью синтетических мРНК и микроРНК.....	104
2.10.4. Репрограммирование соматических клеток в ИПСК с помощью химических веществ.....	105

ГЛАВА 3	
МОДЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА	
НА ОСНОВЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ	
ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК	108
3.1. Сердечно-сосудистые заболевания	112
3.1.1. Синдром удлиненного интервала QT.....	-
3.1.2. Катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия	119

3.1.3.	Наследственные кардиомиопатии.....	122
3.1.3.1.	Аритмогенная дисплазия правого желудочка.....	
3.1.3.2.	Дилатационная кардиомиопатия.....	125
3.1.3.3.	Наследственная гипертрофическая кардиомиопатия.....	126
3.1.3.4.	Надклапанный аортальный стеноз.....	127
3.2.	Нервные, нейродегенеративные и психиатрические болезни.....	128
3.2.1.	Боковой амиотрофический склероз.....	
3.2.2.	Болезнь Альцгеймера.....	132
3.2.3.	Лобно-височная деменция.....	136
3.2.4.	Болезнь Паркинсона.....	
3.2.5.	Болезни экспансии тринуклеотидных повторов.....	139
3.2.5.1.	Болезнь Хантингтона.....	
3.2.5.2.	Синдром ломкой X-хромосомы.....	141
3.2.5.3.	Атаксия Фридрейха.....	142
3.2.5.4.	Миотоническая дистрофия I типа.....	143
3.2.5.5.	Болезнь Мачадо—Джозефа (спиноцеребеллярная атаксия III типа) и спиноцеребеллярная атаксия II типа.....	144
3.2.5.6.	Спинально-бульбарная мышечная атрофия.....	145
3.2.6.	Спинальная мышечная атрофия.....	147
3.2.7.	Синдром Ретта.....	149
3.2.8.	Семейная дизавтономия.....	151
3.2.9.	Атаксия-телеангиэктазия.....	152
3.2.10.	X-сцепленная адренолейкодистрофия.....	153
3.2.11.	Семейная спастическая параллегия.....	154
3.2.12.	Синдром Драве.....	155
3.2.13.	Демиелинизация.....	156
3.2.14.	Шизофрения.....	158
3.2.15.	Синдромы Ангельмана и Прадера—Вилли.....	159
3.3.	Болезни крови.....	161
3.4.	Болезни печени.....	164
3.5.	Наследственный амилоидоз.....	166
3.6.	Болезни поджелудочной железы.....	167
3.7.	Болезни почек.....	170
3.8.	Болезни легких.....	
3.9.	Болезни глаз.....	171
3.10.	Болезни кожи.....	172
3.11.	Болезни опорно-двигательного аппарата.....	174
3.12.	Болезни преждевременного старения.....	175
3.13.	Мышечная дистрофия Дюшена.....	177
3.14.	Болезни накопления.....	178

ГЛАВА 4

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ — ЦЕННЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	184
--	------------

4.1.	Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки модельных животных.....	
4.2.	Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки сельскохозяйственных животных.....	189

4.3. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки редких и исчезающих видов животных	190
--	-----

ГЛАВА 5

МЕТОДЫ ИСПРАВЛЕНИЯ ГЕННЫХ МУТАЦИЙ *IN VITRO*

5.1. Генная терапия. Добавление в геном «здорового» аллеля или замена мутантных	
5.2. Проблема низкой эффективности клонирования ЭСК и ИПСК человека	194
5.3. Методы доставки генетических конструкций в клетки	195
5.4. Негомологичная рекомбинация	196
5.5. Гомологичная рекомбинация	197
5.6. Бактериальные искусственные хромосомы	198
5.7. Хелпер-зависимые аденовирусы	199
5.8. Искусственные нуклеазы, содержащие домены «цинковые пальцы»	200
5.9. Искусственные нуклеазы TALENs и система CRISPR/Cas	202

ГЛАВА 6

ПРОТОКОЛЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

6.1. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи плода человека с помощью ретровирусов	207
6.2. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из нейральных стволовых клеток с помощью плазмидных векторов	213
6.3. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из мононуклеарных клеток периферической крови с помощью лентивирусов	218
6.4. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из кератиноцитов человека с помощью ретровирусов	221
6.5. Получение эмбрионидных телец из ИПСК человека	227
6.6. Выявление активности щелочной фосфатазы	228
6.7. Протокол иммунофлуоресцентного окрашивания	229
6.8. Получение и культивирование первичных эмбриональных фибробластов (фидера)	234
6.9. Замораживание и размораживание клеток	235
6.10. Анализ кариотипа стволовых клеток	236
6.11. Выделение РНК и ДНК	238
6.12. Синтез кДНК	240
6.13. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	241
6.14. Анализ микросателлитов	249
6.15. Анализ метилирования ДНК промотора гена NANOG	250
6.16. Определение нуклеотидной последовательности ДНК	252
6.17. Методы исследования транскрипции, ДНК-белковых взаимодействий и модификаций хроматина в масштабе генома	253
6.18. Методы исследования протеома плюрипотентных клеток	255

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	259
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	260
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ.....	262
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	273
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	352
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ.....	358