

Б. В. Попов

ВВЕДЕНИЕ В КЛЕТОЧНУЮ БИОЛОГИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие



Санкт-Петербург
СпецЛит



ПОКРОВСКИЙ БАНК СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК



Высокотехнологичный банк стволовых клеток в Северо-Западном регионе Российской Федерации (Санкт-Петербург)

- Соответствие банка всем международным требованиям
- Самое современное оборудование для выделения и хранения стволовых клеток крови пуповины
- Сертифицированные технологии для работы со стволовыми клетками
- Определение количества стволовых клеток методом проточной цитофлуорометрии
- Эффективная максимально сберегающая система забора крови пуповины
- Надежное высокотехнологичное хранилище клеток
- Автоматизированная система учета и хранения образцов
- Диагностика иммунного статуса ребенка и родителей
- Диагностика скрытых инфекций с помощью иммуноферментного анализа и ПЦР
- Диагностика мутаций и генетических заболеваний методом секвенирования ДНК
- Определение совместимости образцов между ребенком и родственниками методом секвенирования генов главного комплекса гистосовместимости (HLA-типирование)
- Теломерный тест для определения биологического возраста
- Гибкая система скидок и оплата в рассрочку
- Страхование образцов стволовых клеток крови пуповины по желанию клиента

199106, Санкт-Петербург, Большой проспект В. О., д. 85 (вход со стороны Среднегаванского пр.)

Тел.: 8(812)777-02-66; 8(812)322-05-41; 8(812)322-04-02

Тел./факс: 8(812)322-05-07

г. Череповец: 8-921-723-33-94;

г. Великий Новгород: 8-905-291-64-86;

г. Тверь: 8-910-647-52-59

E-mail: stemcellbank@inbox.ru; alexander.smol@stemcellbank.spb.ru;

www.stemcellbank.spb.ru

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

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 контрольные точки 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 мышечей с заданными свойствами	35
Подходы к биоинженерному конструированию клеточных линий эмбриональных 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 стволовых клеток	39
Этическая дилемма при использовании эмбриональных стволовых клеток человека	40
От использования человеческого эмбриона к клонированию человека	41
1.4. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	43
Литература	
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 анализа 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 одонитчатых 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	193
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 Lif, 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
Литература	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 МаСК	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
Литература	296
Словарь	297

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ *

АПК	— антиген-презентирующие клетки
БОЕ-Э	— эритроидная бурстобразующая единица
ВКМ	— внутренняя клеточная масса
ГМК	— гладкомышечные клетки
ГМФ	— гуанозинмонофосфат
ГСК	— гемопозитические 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
цЭК	— 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

Apa1 (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

ATP — 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

Egfp (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 A

- GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- Gsk3 β (glycogen synthase kinase 3 β) — 3 β киназа гликоген синтазы
- Has2 (hyaluronic acid synthase 2) — синтаза 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 (thrombopoietin) — 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 immortalность (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 программированной смерти и программированному 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 — immortalность 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, регулирующими универсальные функции 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, TGF β 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 взаимодействия отдельных элементов сигнальных путей, создающих основы и связывающие между собой иммортальность 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 иммортальностью 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 мизлопозом 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 время

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, находится 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 (OCT3/4, 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 активизировался 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 некроветворных 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 реципиентам. 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

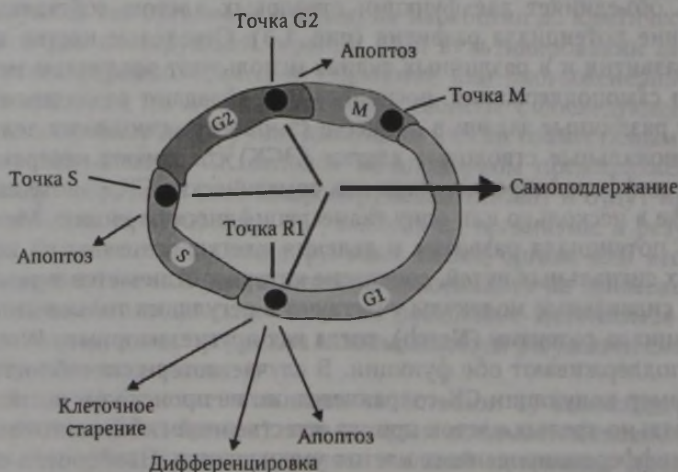


Рис. 1.4. Регуляция самоподдержания стволовых клеток осуществляется в контексте клеточного цикла

регуляторы клеточного цикла, члены семейств продукта гена ретинобластомы (pRb) и опухолевого супрессора p53, оперирующие в контрольных точках клеточного цикла, выполняют роль молекулярных посредников, сопрягающих прогрессию клеточного цикла и терминальные функции клетки. Можно полагать, что разобщение или сопряжение самоподдержания с другими функциями СК осуществляется в рестрикционных точках клеточного цикла.

Симметрия и асимметрия деления в регуляции самоподдержания стволовых клеток

Теоретически для поддержания популяции СК одна половина дочерних клеток при каждом делении должна сохранять свойства родительских СК, тогда как другая половина может терять эти свойства и покидать отдел СК. Подобная регуляция может достигаться двумя путями — асимметрией микроокружения или асимметрией деления. Первая стратегия предполагает, что в процессе деления СК образуются две подобные дочерние клетки, судьба которых в дальнейшем регулируется их микроокружением, под влиянием которого половина дочерних клеток сохраняет свойства материнской клетки (рис. 1.5, б). Эта гипотеза не рассматривает ситуации, когда обе дочерние клетки сохраняют свойства материнской клетки или, наоборот, теряют таковые свойства. Другое предположение основано на допущении, что деление СК всегда строго асимметрично. В результате деления одна дочерняя клетка сохраняет свойства материнской клетки, тогда как другая клетка теряет эти свойства (рис. 1.5, а). При асимметричном типе деления число СК не может увеличиваться, что не соответствует реальным условиям тканевого гомеостаза. В настоящее время получены доказательства, что СК обладают способностью к асимметричному делению и произвольному выбору между симметричным и асимметричным типом деления, что позволяет поддерживать тканевый состав путем комбинации различных типов деления.

Контроль асимметричного деления в СК может быть внутренним или внешним. Механизм внутреннего контроля основан на использовании факторов кле-



Рис. 1.5. Возможные механизмы асимметричных делений стволовых клеток: а — механизм асимметрии деления; б — механизм асимметрии микроокружения

точной полярности и детерминант клеточной судьбы, которые локализуются асимметрично в ходе митоза и наследуются только одной из двух дочерних клеток. В ситуации, где единственным различием между дочерними клетками является их позиция по отношению к нише, изначально обе клетки могут иметь одинаковый потенциал развития, но затем наследуют различную судьбу благодаря действию внешних факторов. Классическим примером асимметричного деления, которое контролируется внутренними факторами, являются первые деления зиготы у червей *C. elegans*, в результате которых образуется большой бластомер, формирующий эктодерму, и маленький бластомер, на основе которого в процессе асимметричных делений формируется мезодерма, энтодерма и, в конце концов, зародышевая линия (рис. 1.6).

Под полярностью понимается неравное распределение внутриклеточных компонентов между дочерними клетками. В недифференцированном эпителии различают два вида полярности: планарную (плоскостную) и апикобазальную. Планарная полярность определяет поляризацию клетки относительно эпителиального слоя, в котором она находится. Апикобазальная полярность предполагает подразделение клеточной поверхности на три различные части: базальную, ориентированную к базальной мембране; латеральную, контактирующую с соседними клетками, например в переднезаднем направлении; и апикальную, направленную во внешнюю по отношению к базальной мембране сторону.

Специализированные внутриклеточные механизмы регулируют передвижение отдельных молекул и молекулярных комплексов относительно этих поверхностей, что в свою очередь влияет на положение внутриклеточных органелл, например ядра и митотического веретена, и регулирует расположение оси деления клетки. Асимметричное клеточное деление совершается в процессе четырех последовательных этапов. Во-первых, устанавливается ось полярности клетки относительно оси тела. Во-вторых, формируется митотическое веретено, которое ориентируется относительно оси полярности клетки. В-третьих, детерминанты клеточной судьбы распределяются в соответствии с установленной полярностью вдоль ее оси. Неравномерное распределение детерминант клеточной судьбы гарантирует, что наследуемые свойства будут принадлежать только одной из двух дочерних клеток, а различная концентрация таких детерминант в двух дочерних клетках определяет их различную клеточную судьбу.



Рис. 1.6. Первые деления зиготы у червей *C. elegans* происходят асимметрично и контролируются внутренними факторами (Morrison S. J., Kimble J., 2006)

У червей *C. elegans* точка входа сперматозоида в овоцит в дальнейшем развитии определяет аккумуляция белков семейства Par (Partitioning), в частности белков Par-3, Par-6, и атипичной белковой киназы (aPkc), которые образуют комплекс, называемый Par-3/6. Локализация комплекса Par-3/6, через плохо изученные пока процессы, регулирует положение centrosомы и митотического веретена (см. цв. вклейку, рис. 1.7, а). Комплекс Par-3/6 модулирует взаимодействие между микротрубочками и изменяет положение митотического веретена таким образом, что из той части зиготы, где располагается комплекс Par-3/6, происходит образование большей по размеру дочерней клетки. Локализация комплекса Par-3/6 направляет асимметричное расположение детерминант клеточной судьбы, хотя у червей *C. elegans* и мух *Drosophila* химическая природа детерминант клеточной судьбы и их внутриклеточная локализация различны. У *C. elegans* роль детерминант клеточной судьбы играют белки, обладающие доменами типа «цинковые пальцы», — Mex1,5,6, Pie-1, Pos-1, а также цитоплазматические рибонуклеиновые комплексы, называемые гранулами «Р». В нейробластах *Drosophila* мишенью комплекса Par-3/6 является цитоскелетный белок, называемый Lgl (Lethal(2)giant larvae). Белок Lgl высококонсервативен в развитии от дрожжей до человека, а его отсутствие у мух сопровождается гиперпролиферацией в ткани личинки и ведет к ее гибели. Роль белка Lgl в нейральных клетках мух заключается в регуляции локализации детерминант клеточной судьбы, в частности, белка Numb и убиквитиновой лигазы E3, которая называется Neuralized. Белок Numb ингибирует активность рецептора Notch в одной из дочерних клеток, а лигаза Neuralized ингибирует активность лиганда Delta, который связывает рецептор Notch, в соседней клетке, таким образом активируя дифференцировку в той клетке, где находится белок Numb, и препятствует дифференцировке соседней клетки (см. цв. вклейку, рис. 1.7, б).

Классический пример асимметричного деления, контролируемого внешними механизмами, дают ЗСК дрозофилы, которые делятся с воспроизводимой ориентацией и образуют одну дочернюю клетку, которая остается в нише и сохраняет идентичность материнской стволовой клетки, тогда как другая дочерняя клетка покидает нишу и дифференцируется (см. цв. вклейку, рис. 1.7, б; рис. 1.8, а). Ниша СК определяется как микроокружение, которое обеспечивает самоподдержание СК.

В яичнике дрозофилы в создании ниш принимают участие клетки Cap, а в сперматогенезе дрозофилы — клетки Hub. Клетки Cap и Hub синтезируют, соответственно, лиганды Decapentaplegic (Dpp) и Glass bottom boat (Gbb), которые активируют в зародышевых СК сигнальный путь TGF β , таким образом репрессировав активность гена bag-of-marbles (BAM), продукт которого активирует дифференцировку (см. цв. вклейку, рис. 9.15). Классическим примером симметричного деления является деление зародышевых клеток *C. elegans* (рис. 1.8, б). Личинка червя выходит из скорлупы только с двумя зародышевыми СК, которые в последующем развитии образуют примерно 2000 потомков, состоящих из недифференцированных зародышевых стволовых клеток и дифференцированных половых клеток. Удаление одной исходной ЗСК не изменяет соотношения различных потомков оставшейся ЗСК (см. рис. 1.8, б).

В настоящее время установлено, что деление некоторых типов СК млекопитающих, обладающих маркерами симметрии, контролируется эволюционно консервативными механизмами. Например, недифференцированные нейральные клетки-предшественники в развивающейся коре головного мозга грызунов рас-



Рис. 1.8. Сравнение симметричных и асимметричных делений стволовых клеток:

а — схема симметричных и асимметричных делений зародышевых стволовых клеток *Drosophila*;
 б — симметричные деления зародышевых клеток *C. elegans*
 (Morrison S. J., Kimble J., 2006)

пределяют белок Numb асимметрично по отношению к предшественникам нейронов. Ингибция белком Numb сигналов Notch является критической не только в нейрогенезе у мух, но, вероятно, вовлечена в регуляцию асимметричных делений у млекопитающих. Белок Numb распределяется асимметрично в потомках культивируемых стволовых сателлитных мышечных клеток, в которых он облегчает миогенную дифференцировку одной дочерней клетки. Таким образом, распределение белка Numb может быть общим и высококонсервативным механизмом контроля асимметричного клеточного деления в животном царстве.

Симметричное клеточное деление наблюдается у многих видов животных в процессе развития и после рождения, например у млекопитающих при заживлении ран и регенерации. Характерной чертой симметричного деления является интенсивность увеличения числа СК, которое нельзя объяснить ограничением числа асимметричных делений, при которых только одна дочерняя клетка сохраняет свойства материнской СК. В середине эмбрионального периода мышечные кроветворные СК удваиваются в числе каждый день, показывая, что большая часть этих клеток возникает в результате симметричных делений. Однако прямые доказательства характера делений в кроветворных СК пока отсутствуют. С другой стороны, получены прямые изображения делений недифференцированных нейральных клеток-предшественников в культуральных эксплантатах и клеток-предшественников в базальном слое эпидермиса кожи плода. При эмбриональном развитии мозжечковой коры и эпидермиса, популяция недифференцированных клеток-предшественников вначале увеличивается в числе без образования значительного количества дифференцированных клеток. При таком типе делении, в кортикальной желудочковой зоне головного мозга видны

две морфологически идентичные дочерние клетки, которые недифференцированы и лежат бок о бок в зоне локализации СК. В базальном слое эпидермиса кожи плода при делении образуются морфологически эквивалентные недифференцированные клетки вдоль оси базального слоя, т. е. в месте локализации стволовых клеток эпидермиса.

ЗСК мух *Drosophila* могут делиться асимметрично или симметрично. Удаление одной из двух зародышевых стволовых клеток яичника приводит к тому, что оставшаяся стволовая клетка делится симметрично, тогда как последующее деление совершается асимметрично (см. рис. 1.8, а).

Классификация стволовых клеток

По определению, любая стволовая клетка способна к длительному самоподдержанию, сравнимому с продолжительностью жизни хозяйского организма, и к дифференцировке, по крайней мере, в один зрелый клеточный тип. Существуют различные классификации СК, основанные на их видовом или тканевом происхождении, потенциале к дифференцировке в один или более специфический тип зрелых клеток. В наиболее распространенной классификации СК подразделяются на эмбриональные, зародышевые и соматические (см. цв. вклейку, рис. 1.9).

Эмбриональные стволовые клетки образуются при культивировании *in vitro* клеток внутренней клеточной массы бластоцисты. ЭСК являются плюрипотентными, т. е. способны формировать в процессе эмбриогенеза клетки любой тканевой специфичности, включая зародышевые и соматические СК. ЭСК могут поддерживаться в культуре *in vitro* неопределенно долгое время. Зародышевые СК (ЗСК) являются унипотентными и у млекопитающих образуют в процессе созревания дифференцирующиеся клетки сперматогония, которые превращаются в зрелые сперматозоиды. Однако, регуляция функций ЗСК имеет много общего с ЭСК, в частности по экспрессии уникальных регуляторных молекул Oct3/4, Nanog и Sox2 (рис. 1.10).

Соматические СК (ССК) в зрелом организме содержатся в каждой ткани и являются источником образования функционально зрелых клеток любой тканевой специфичности. ССК могут быть мультипотентными или унипотентными. В костном мозге содержатся по крайней мере два различных вида соматических СК — кроветворные и мезенхимальные. Мезенхимальные СК обладают способностью прикрепляться к твердой поверхности и расти в культуре *in vitro*. Овальные клетки печени и пневмоциты 2-го типа эпителия легких способны дифференцироваться только в соответствующие тканеспецифические клетки, тогда как СК молочной железы образуют все клетки этого органа, а мезенхимальные стволовые клетки способны к дифференцировке в мезодермальные клетки различных тканей: костной, хрящевой, мышечной, а также в нейральные клетки эктодермального происхождения (см. цв. вклейку, рис. 1.9).

Регуляция самоподдержания ЭСК основана на координации множества сигнальных путей, часть из которых является уникальной для этого вида клеток (рис. 1.10). Транскрипционные факторы Oct3/4 и Nanog необходимы для поддержания плюрипотентности клеток внутренней клеточной массы. При потере Oct3/4 или Nanog развитие эмбриона нарушается на стадии бластоцисты, в отсутствие одного из этих факторов ЭСК не могут поддерживаться в культуре *in vitro*. Oct3/4 и Nanog экспрессируются только в клетках внутренней клеточной

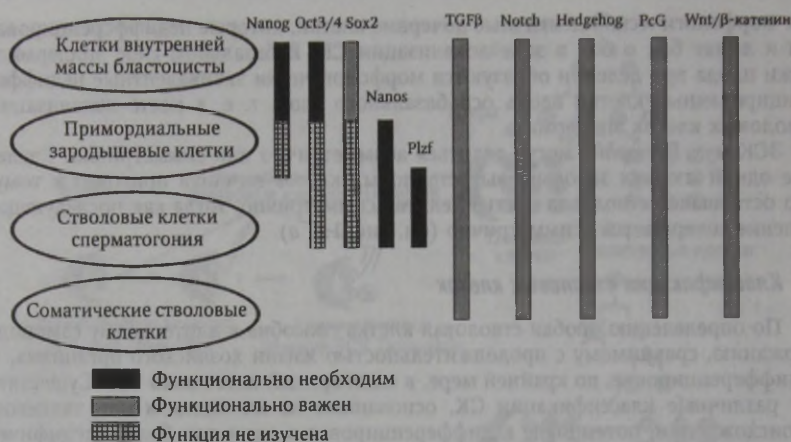


Рис. 1.10. Функциональная значимость различных сигнальных путей для поддержания свойств разных видов стволовых клеток (Molofsky A. V. [et al.], 2004)

массы (ВКМ) и в клетках зародышевой линии, а их экспрессия в культуре *in vitro* ограничена плюрипотентными клеточными линиями. Поэтому считается, что Oct3/4 и Nanog поддерживают плюрипотентность, но не регулируют мультипотентность соматических СК. Поддержание плюри- и мультипотентности различно, хотя их механизмы не полностью изучены. Некоторые транскрипционные факторы регулируют самоподдержание как ЭСК, так и соматических СК. Например, белок Foxd3, член семейства транскрипционных факторов Fox, необходим для поддержания клеток ВКМ *in vivo*, размножения ЭСК *in vitro*, он также экспрессируется в СК нервной гребешка, из которых образуются клетки периферической нервной системы. Сверхэкспрессия Foxd3 в клетках мезодермальных кроветворных линий или клетках, происходящих из нейральной трубки, тормозит их дифференцировку. То есть белок Foxd3 участвует в механизме регуляции самоподдержания как плюрипотентных, так и мультипотентных СК.

ЗСК — предшественники половых клеток, по своим свойствам являются промежуточными между эмбриональными и соматическими СК. Гаметогенез начинается в эмбриональных клетках-предшественниках, известных как примордиальные зародышевые клетки на стадии E7.5 у мыши. Примордиальные зародышевые клетки дифференцируются в сперматогонияльные СК у самцов и СК овоцитов у самок после миграции в генитальный гребень на стадии E12.5. Стволовые клетки сперматогония обладают самоподдержанием и образуют сперму в течение всего периода функциональной зрелости. Овоцитарные стволовые клетки также обладают самоподдержанием в постнатальной жизни. Потенциал самоподдержания зародышевых СК подобен таковому в эмбриональных СК и регулируется путем ингибции экспрессии генов с помощью высококонсервативных белков Nanos и Pumilio. Эти белки впервые были найдены у мух *Drosophila*, а их гомологи затем были обнаружены у всех животных от червей до млекопитающих. Белки Nanos и Pumilio образуют комплекс, который связывает 3'UTR мРНК и тормозит ее трансляцию, предотвращая синтез белков, которые активируют дифференцировку СК. В отсутствие Nanos, примордиальные зароды-

шевые клетки дифференцируются в ненормальные зародышевые цисты, тогда как зародышевые СК преждевременно вступают в стадию овогенеза. Существует несколько различных изоформ белков Nanos. При дефиците белка Nanos3 у мышей отмечаются дефекты в формировании примордиальных зародышевых клеток, тогда как мыши с дефицитом Nanos2 показывают истощение популяции зародышевых СК у взрослых самцов. Белок Nanos играет уникальную физиологическую роль только в поддержании зародышевых СК, но не проявляет физиологической активности в регуляции СК других тканей у мышей. Мыши, у которых отсутствует транскрипционный фактор Plzf, включающий в свою структуру домен «цинковых пальцев», не формируют постнатально СК сперматогония. Вероятно, роль Plzf заключается в ингибции экспрессии дифференцировочных белков только в СК сперматогония. Регуляция функций соматических СК основана на специфическом взаимодействии белков различных сигнальных путей, например TGF β , Notch, Hedgehog, PcG, Wnt/ β -катенин, которые убиквитарно экспрессируются в тканях в эмбриональном и постнатальном периоде (см. рис. 1.3, 1.10).

1.2. Эмбриональные стволовые клетки.

Общая характеристика

Мышиный эмбрион имеет два важных свойства, привлекательных для клеточных биологов. Во-первых, мышь является млекопитающим, во-вторых, среди млекопитающих она является наиболее удобной моделью для генетических работ из-за маленького размера и скорости размножения. Мышь стала основным модельным организмом в генетике млекопитающих, наиболее интенсивно изучаемым объектом, который заменяет опыты на человеке. Ее геном имеет тот же размер, что и геном человека, и существует очень близкое к равенству соотношение между генами мыши и человека. Белки человека и мыши на 80–90 % идентичны в аминокислотной последовательности, а большие блоки регуляторных участков генов этих видов также показывают близкое подобие. Экспериментально разработанный нетравматичный доступ к эмбриону мыши на ранних стадиях его развития позволяет в настоящее время получать мышей с мутациями в любом гене. Практически любая генетическая модификация, вызванная у червей, мух или полосатых рыбок, может быть воспроизведена у мышей. В результате мышь стала богатым источником информации во всех аспектах молекулярной генетики развития и ключевой моделью не только для изучения функций генов млекопитающих, но и для характеристики процессов развития у других видов животных.

Ранние стадии развития мыши

Оплодотворенное яйцо делится и образует 16 клеток через три дня после оплодотворения (см. цв. вклейку, рис. 1.11). Поначалу клетки внутренней клеточной массы неплотно прилегают друг к другу, но на стадии 16 клеток они подвергаются сжатию, формируя плотный шарик, который называется *морулой*. Плотные контакты, формирующиеся между клетками, герметично отделяют внутреннее содержимое морулы от внешней среды. Вскоре после этого образуется внутренняя полость, превращая морулу в бластоцисту — полую сферу. Внешний слой клеток, формирующий стенки сферы, называется *трофобластодермой*. В дальнейшем он превращается во внеэмбриональную ткань. Внутренний

клеточный конгломерат называется *внутренней клеточной массой* (ВКМ). Он расположен на одной стороне полости бластоцисты и из него впоследствии возникает весь эмбрион. После того как на четвертый день развития эмбрион освобождается от желевидной капсулы, клетки трофобласты плотно контактируют со стенкой матки, инициируя образование плаценты. В это время внутренняя клеточная масса растет и дифференцируется. Частично она превращается во внеэмбриональные структуры, такие как желточный мешок, тогда как оставшаяся ее часть формирует эмбрион в процессе гаструляции, нейруляции и т. д.

Бластомеры, образованные в процессе первых клеточных делений, обладают замечательной адаптивной способностью. Если ранний эмбрион разделяется на две части, то в результате могут сформироваться два идентичных близнеца, т. е. два совершенно нормальных и генетически идентичных организма, происходящих из одной клетки. Если же одну из этих клеток эмбриона разрушить и оставшуюся «половину эмбриона» поместить обратно в матку псевдобеременной мыши, то рождается совершенно нормальная мышь. При объединении двух восьмиклеточных эмбрионов от генетически различных мышей образуется морула большого размера. Такая морула может затем развиваться в мышь нормальных размеров. Организмы, которые возникают из клеток генетически различных животных, называются *химерами*. Химеры могут быть образованы и путем инъекции клеток, взятых у раннего эмбриона мыши, во внутреннюю клеточную массу бластоцисты мыши с другим генотипом. Одна инъецированная клетка, взятая из восьмиклеточного эмбриона или из внутренней клеточной массы ранней бластоцисты другого животного, может превратиться в химерном животном в любую комбинацию клеточных типов, включая зародышевые клетки половых органов (рис. 1.12).

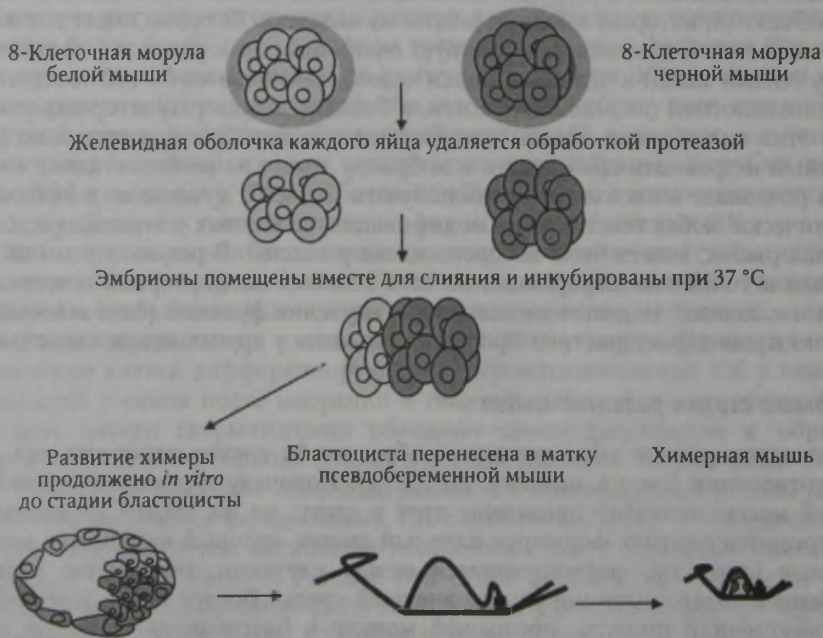


Рис. 1.12. Схема опыта, демонстрирующего плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток (Alberts B. [et al.], 2004)

Тератомы и тератокарциномы

Если нормальный мышинный эмбрион примерно 7-дневного возраста трансплантируется в эктопическое место, например под капсулу почки или яичка взрослого животного, его развитие не останавливается, но нарушается из-за отсутствия естественной внешней регуляции. В результате возникает опухоль, известная как тератокарцинома, состоящая из дезорганизованной клеточной массы, содержащей множество дифференцированных клеток различной тканевой специфичности: эпидермиса, волосяных фолликулов, кости и мышц, нервной ткани, железистого эпителия и других клеток, которые растут вместе с недифференцированными СК, продолжающими делиться и образующими возрастающие количества дифференцированных клеток (см. цв. вклейку, рис. 1.13).

Подобные опухоли возникают спонтанно в яичниках, где они известны как доброкачественные цисты яичников. В последнем случае опухоль возникает из овоцитов, которые подвергаются партеногенезу. В яичках подобные опухоли характеризуются злокачественностью и называются тератокарциномами. Они выделены в группу опухолей зародышевых клеток и представляют практически все раки яичек. Тератокарциномы могут возникать из гонадитов в случае появления мутаций в этих клетках, что отмечается у молодых людей в раннем постпубертатном периоде. Количество тератокарцином яичек резко возросло в последние 50 лет. Эти опухоли могут давать метастазы, но эффективно лечатся рентгеновской терапией. У 1 % мышей-самцов линии 129 тератокарциномы возникают спонтанно между 11 и 13,5 днями эмбрионального развития. Стабильные линии клеток, обладающие способностью расти *in vitro* неограниченно долго, полученные из тератокарцином, называются клетками эмбриональной карциномы. Тератокарциномы содержат ЭСК, которые в различных линиях показывают различную степень способности к спонтанной и индуцированной дифференцировке и служат модельной системой для изучения различных сторон физиологии ЭСК (см. цв. вклейку, рис. 1.13).

В 1975 г. американские исследователи Беатриса Минтц и Карл Иллменси (Beatrice Mintz and Carl Illmensee) из Института рака в г. Филадельфия (США) опубликовали очень интересную и важную статью, результаты которой до настоящего времени служат источником научных дискуссий (см. цв. вклейку, рис. 1.14). Исследователи использовали клетки асцитной формы тератокарциномы, рост которой поддерживается *in vivo* путем пересева клеток от одного животного другому. При таком росте клетки опухоли обычно сохраняют диплоидный кариотип в противоположность клеткам тератокарцином, которые культивируются *in vitro* на адгезивной поверхности. В последнем случае клетки опухоли быстро приобретают изменения кариотипа. В работе Б. Минтц клетки тератокарциномы, которые пересевали *in vivo* в течение 8 лет, были кариотипированы как нормальные диплоидные клетки. Клетки такой тератокарциномы вводили в бластоцисту сингенных мышей, которые отличались от донора по некоторым иммунологически инертным маркерам. В результате исследователи получили несколько химерных мышей, которые были физиологически нормальны и экспрессировали продукты генов тератокарциномы в клетках различной тканевой специфичности: меланоцитах, волосяных фолликулах, почке, тимусе, печени, иммуноцитах, эритроцитах и даже в зрелых половых клетках. Эти мыши имели нормальное потомство (см. цв. вклейку, рис. 1.14). Опыты Б. Минтц и К. Иллменси показали, что опухоль на начальной стадии развития является эпигене-

тическим заболеванием, обратимым в том случае, если составляющие ее клетки растут в нормальном окружении. Вероятно, опухоль становится необратимой после того, как в геноме СК, являющихся источником ее роста, возникают структурные нарушения, которые придают необратимый характер первоначальным эпигеномным изменениям. При отсутствии структурных нарушений клетки опухоли могут подвергаться обратимому превращению и продуцировать нормальные дифференцированные клетки.

Исследования СК в тератомах и родственных типах опухолей привели к заключению, что поведение СКК отражает замечательное свойство клеток внутренней клеточной массы: делящиеся клетки сохраняют плюрипотентность.

Основные свойства эмбриональных стволовых клеток

ЭСК плюрипотентны, т. е. одна и та же клетка способна превращаться в любые клеточные типы в организме плода. ЭСК сохраняют плюрипотентность даже после продолжительного пребывания в культуре *in vitro*. Такое заключение было сделано при переносе ЭСК в бластоцисту с последующей ее пересадкой псевдобеременной мыши и анализом генотипа и фенотипа различных тканей химерных животных, происходящих из рекомбинантной бластоцисты. ЭСК могут также подвергаться мультипотентной дифференцировке *in vitro* и продуцировать широкий ряд зрелых клеток-потомков. ЭСК демонстрируют свои свойства без какой-либо модификации, они не подвергаются клеточному кризису, старению и сохраняют диплоидный кариотип. ЭСК оперируют без очевидного ограничения и могут быть клонированы. Они могут размножаться *in vitro* без фетальной бычьей сыворотки, не проявляют ингибиции пролиферации, зависимой от контакта с соседними клетками или с адгезивной поверхностью. Фактически не известны способы индукции клеточного ареста или состояния покоя в ЭСК. Несмотря на нормальный кариотип, ЭСК демонстрируют свойства типичных опухолевых клеток. Например, они канцерогенны и образуют тератокарциномы при эктопическом переносе под капсулу яичка или почки взрослого организма, поэтому их называют условно опухолевыми клетками. Свойства эмбриональных стволовых клеток:

1. Способны неопределенно долго делиться в культуре *in vitro* без потери основных свойств, т. е. самоподдержания и плюрипотентности, без признаков апоптоза, клеточного старения и изменения диплоидного кариотипа.

2. Полностью интегрируются в развивающийся эмбрион после введения в бластоцисту.

3. Могут быть использованы для переноса сложных генетических модификаций другому животному.

4. Способны дифференцироваться *in vitro* в клетки различной тканевой специфичности.

5. Клонировются *in vitro*.

6. Делятся *in vitro* без фетальной сыворотки и не проявляют феноменов контактной и адгезивной ингибиции пролиферации.

7. Не известны способы индукции остановки клеточного цикла ЭСК.

8. Являются условно опухолевыми клетками — образуют тератокарциномы при эктопическом введении.

Маркеры эмбриональных стволовых клеток

Недифференцированные ЭСК человека (чЭСК) могут быть охарактеризованы по экспрессии поверхностных маркеров, таких как Ssea-3, 4 (stage specific embryonic antigen), Tra-1–60, Tra-1–81 (tumor rejection antigen), Gctm-2 (germ cell tumor marker). Экспрессионный профиль мышиных ЭСК (мЭСК) отличается от чЭСК в том отношении, что, будучи недифференцированными, они экспрессируют высокий уровень Ssea-1, но не экспрессируют других антигенов Ssea, Tra-1–60/81 и Gctm-2. Общей чертой чЭСК и мЭСК является высокий уровень экспрессии щелочной фосфатазы, транскрипционных факторов Oct3/4, Nanog, Sox2 и теломеразы (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Маркеры эмбриональных стволовых клеток человека и мыши
(Stewart R. [et al.], 2006)

Антиген	ЭСК человека	ЭСК мыши
Ssea-1	–	+
Ssea-3	+	–
Ssea-4	+	–
Tra-1–60	+	–
Tra-1–81	+	–
Tra-2–49	+	–
Tra-2–54	+	–
Gctm-2	+	–
Щелочная фосфатаза	+	+
Теломераза	+	+
Trf-1	+	+
Nanog	+	+
Oct3/4	+	+
Sox-2	+	+
Rex1	+	+
Foxd3	+	+
FGF4	+	+

Обозначения: «++» — экспрессируется в ЭСК; «–» — не экспрессируется в ЭСК.

Маркер эмбриональных стволовых клеток Nanog относится к транскрипционным факторам, содержащим гомеобоксный домен. Экспрессия Nanog необходима для поддержания клеток внутренней клеточной массы человека *in vivo*, а чЭСК и мЭСК — *in vitro*. Экспрессия Nanog уменьшается при дифференцировке. Инактивация Nanog в ЭСК сопровождается увеличением экспрессии транскрипционных факторов Gata-4, Gata-6 и Cdx2, причем это сочетается с активацией энтодермальной дифференцировки (рис. 1.15). Такая реципрокная экспрессия Nanog и Gata-4/Gata-6/Cdx2 предполагает, что Nanog может поддерживать мультипотентность ЭСК путем супрессии генов GATA-4/GATA-6/CDX2. Присутствие сайта связывания Nanog в промоторе гена GATA-6 предполагает прямой механизм транскрипционной ингибиции генов GATA-4/GATA-6/CDX2 продуктом гена NANOG (рис. 1.15). Механизм регуляции Nanog не изучен, хотя

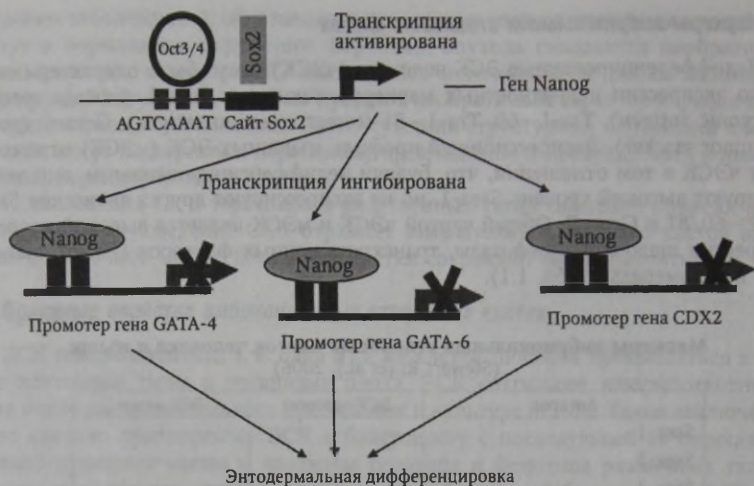


Рис. 1.15. Функциональная характеристика некоторых маркеров эмбриональных стволовых клеток (Stewart R. [et al.], 2006)

установлено, что транскрипционные факторы Oct3/4 и Sox2 имеют расположенные по соседству сайты связывания в промоторе гена Nanog. Маркер эмбриональных стволовых клеток Oct3/4 является транскрипционным фактором, содержащим домен POU. Oct3/4 регулирует гены-мишени путем связывания октамерной нуклеотидной последовательности AGTCAAAT в их промоторах. Oct3/4 действует совместно с Sox2, членом одноименного семейства транскрипционных факторов, содержащих домен высокой подвижности (Hmg). Продукт гена SOX2 связывается со специфическим сайтом на ДНК, прилегающим к октамерному сайту связывания Oct3/4. Сочетанное действие Oct3/4 и Sox2 приводит к увеличению уровня Nanog, транскрипционной супрессии генов GATA-4, GATA-6, CDX2 и активации самоподдержания ЭСК (см. рис. 1.15).

Теломеры — это комплексы ДНК, которые покрывают концы эукариотических хромосом, поддерживают их стабильность, предотвращают слияние хромосом по типу «конец в конец» и хромосомную деградацию. Теломеры образованы двунитчатыми тандемными повторами 6-нуклеотидной последовательности TTAGGG с выступающей на 3' конце одной 150–200-нуклеотидной ниткой ДНК (3' overhang), которая складывается в двойную нитку ДНК, формируя «Т-петлю» (рис. 1.16). В соматических клетках теломеры укорачиваются с каждым клеточным делением, так как ДНК-полимераза не реплицирует конец выступающей нити ДНК. Вследствие этого теломеры достигают критической длины, инициируя клеточное старение или «клеточный кризис». Следствием клеточного кризиса может быть апоптоз или трансформация клетки. Клетки, обладающие способностью к самоподдержанию, продуцируют теломеразу — рибонуклеопroteиновый комплекс, способный удлинять и стабилизировать теломеры. Теломераза состоит из двух основных единиц: теломеразной обратной транскриптазы (Tert) и теломеразной РНК (TR). Теломеразная РНК необходима для удержания матрицы ДНК, на которой в стадиях элонгации и транслока-

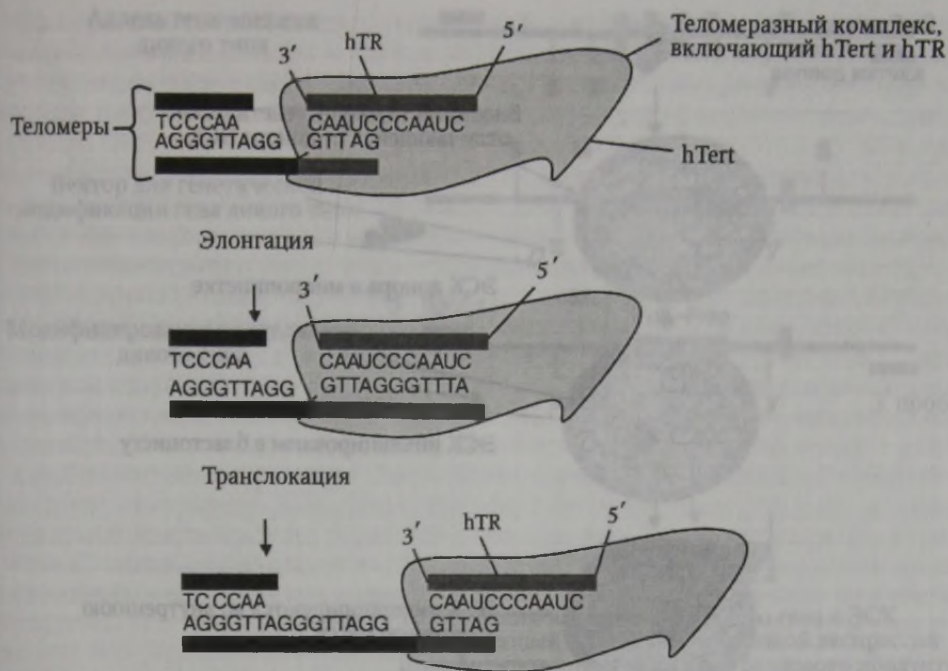


Рис. 1.16. Структура и механизм действия теломеразного комплекса. hTert — теломеразная обратная транскриптаза человека, hTR — теломеразная РНК человека (Stewart R. [et al.], 2006)

ции образуются новые последовательности TTAGGG и происходит удлинение матричной ДНК (см. рис. 1.16). Для теломеразной активности нужны и другие белки, такие как Terp-1, Diskerin, p23 и Hsp90. Однако эти белки, в отличие от Tert, экспрессируются конститутивно в соматических клетках. ЭСК экспрессируют высокий уровень Tert и теломеразной активности, которые быстро снижаются при их дифференцировке. Поэтому теломеразная активность или экспрессия Tert могут рассматриваться как маркеры ЭСК.

Использование эмбриональных стволовых клеток для получения химерных мышей с заданными свойствами

Состояние, в котором находятся ЭСК в культуре, вероятно, эквивалентно таковому в клетках ВКМ. Такое утверждение следует из результатов опытов по введению ЭСК, взятых из культуры клеток *in vitro*, в бластоцисту мыши, генетически отличающейся от донора ЭСК. Инъецированные клетки инкорпорируются во ВКМ бластоцисты и участвуют в формировании физиологически нормального химерного потомства, образуя клетки любой ткани, включая зародышевые стволовые клетки (рис. 1.17). Потомки инъецированных клеток могут быть найдены практически в любой ткани химерной мыши, где они дифференцируются правильным образом в соответствии с их локализацией и иногда могут формировать жизнеспособные зародышевые клетки. Необычные адаптивные свойства ЭСК предполагают, что сигналы клеточного окружения не только направляют выбор между различными путями дифференцировки, но могут также

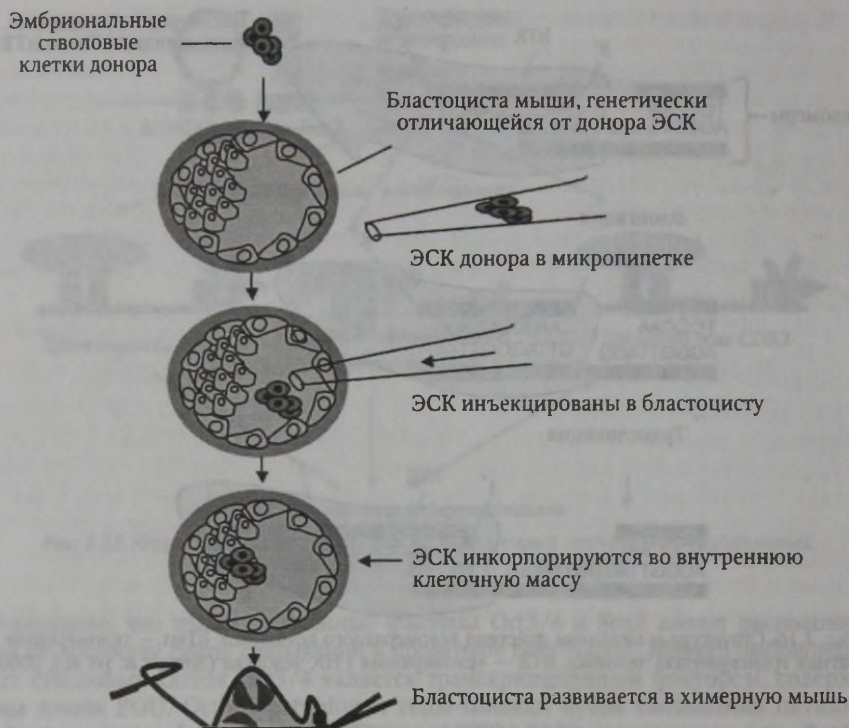


Рис. 1.17. Получение химерных животных с помощью эмбриональных стволовых клеток от генетически различных мышей (Alberts B. [et al.], 2004)

останавливать или включать программу, которая регулирует развитие эмбриональной клетки в клетку взрослого животного.

На практическом уровне ЭСК имеют двукратную важность. С медицинской точки зрения, они могут рассматриваться в качестве источника разнообразных клеток для репарации поврежденных и дефективных тканей взрослого организма. Использование ЭСК делает также возможным конструирование точно контролируемых форм генетических модификаций в клетках, которые затем воспроизводятся в организме целого животного. Техника генетической модификации основана на гомологичной рекомбинации в геноме ЭСК, в процессе которой происходит замена нормального участка ДНК в аллели гена-мишени (E—Y) на гомологичный участок рекомбинантной ДНК (E—Y), содержащий функционально значимую мутацию (M) и ген, кодирующий селективный маркер (Pgk—Neo), который передает устойчивость к реагенту, используемому для селекции. Несмотря на то что очень небольшое число ЭСК содержат правильно инкорпорированную ДНК, селекция позволяет отобрать эти клетки среди тысяч других, в которые была введена рекомбинантная ДНК. Одной селектированной и генетически модифицированной ЭСК может быть достаточно для инъекции в бластоцисту и создания химерной мыши (рис. 1.18). В некоторых «счастливых» случаях зародышевые клетки химерной мыши формируются из введенных ЭСК,

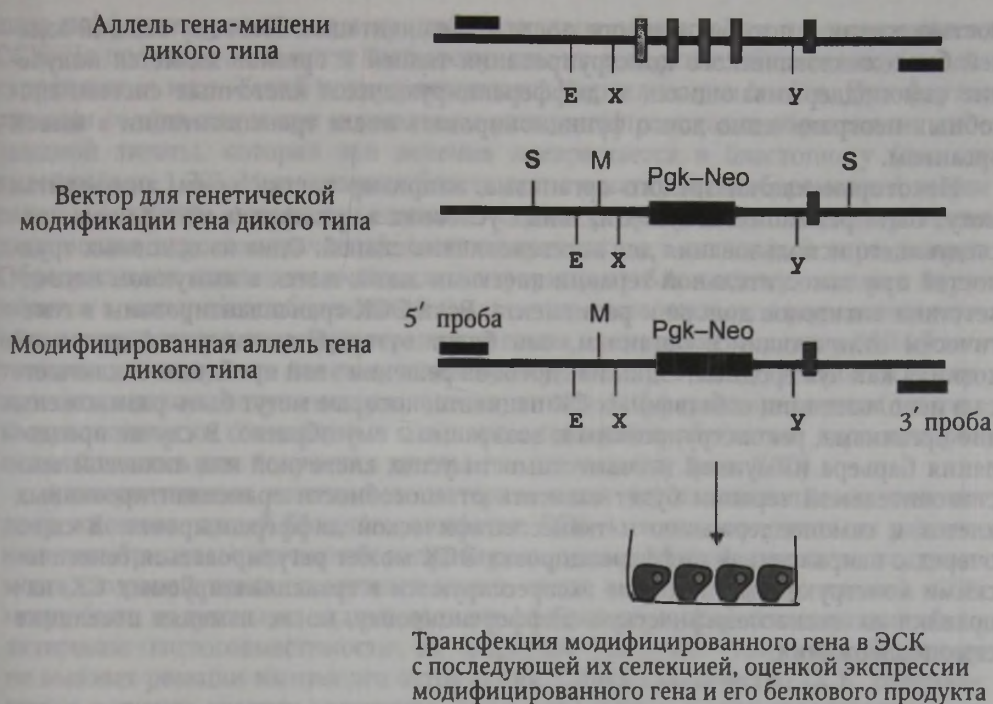


Рис. 1.18. Схема генетической модификации эмбриональных стволовых клеток: E, M, X, Y — рестрикционные сайты; S — сайты гомологичной рекомбинации; 5' и 3' пробы — праймеры для амплификации модифицированного гена. Другие объяснения — в тексте

а ее потомство представляет собой новую генерацию мышей, состоящих полностью из клеток, несущих направленную мутацию. Такая мышь называется «фанундер» — основатель новой линии химерных животных. Таким образом, мутантная мышь будет воссоздана полностью из клеток, растущих в культуральной чашке.

Подходы к биоинженерному конструированию клеточных линий эмбриональных стволовых клеток с заданными свойствами для лечебных целей

Клетки со свойствами, подобными мышинным ЭСК, могут быть получены в настоящее время из раннего эмбриона человека, яичников или яичек плода человека, представляющих собой потенциально неистощимый запас материала, который может быть использован для замещения или репарации зрелых тканей человека в случае их повреждения.

Мышинные ЭСК в культуре *in vitro* могут быть индуцированы с помощью специальных реагентов к дифференцировке в зрелые клетки различной тканевой специфичности (см. цв. вклейку, рис. 1.19). Такие клетки при трансплантации в организм могут выполнять соответствующие функции и замещать клетки тканей, которые по тем или иным причинам самостоятельно не могут восполнить клеточный дефицит. Однако зрелые дифференцированные клетки обладают ограниченной способностью к самоподдержанию, небольшой продолжитель-

ностью жизни и погибают вскоре после трансплантации. Поэтому важной задачей биотехнологического конструирования тканей и органов является получение самоподдерживающихся и дифференцирующихся клеточных систем, способных неограниченно долго функционировать после трансплантации в живой организм.

Некоторые клетки зрелого организма, например клетки кожи, лимфоциты, могут быть размножены в специальных условиях в культуре *in vitro* с целью последующего использования для восстановления тканей. Одна из основных трудностей при заместительной терапии клетками заключается в иммунном несоответствии антигенов донора и реципиента. Если ЭСК трансплантированы в генетически отличающийся организм, они будут отторгнуты иммунной системой хозяина как чужеродные. Один из способов решения этой проблемы заключается в использовании собственных СК пациента, которые могут быть размножены вне организма, реконструированы и возвращены ему обратно. В случае преодоления барьера иммунной несовместимости успех клеточной или тканевой восстановительной терапии будет зависеть от способности трансплантированных клеток к самоподдержанию и тканеспецифической дифференцировке. В свою очередь, направленная дифференцировка ЭСК может регулироваться генетическими конструкциями, которые экспрессируются в трансплантируемых СК, направляя их тканеспецифическую дифференцировку, но не изменяя потенциал самоподдержания.

1.3. Этические проблемы в исследованиях стволовых клеток

Источники стволовых клеток для терапевтических целей

Соматические стволовые клетки (ССК) обеспечивают самоподдержание клеточного состава тканей в нормальных условиях, но они не способны восстанавливать ткань при ее массивном повреждении. Например, при инсульте происходит нарушение притока крови к определенному участку мозга, что является причиной гибели нервных клеток в этом участке и сопровождается нарушением функций организма, зависящих от активности поврежденных нервных клеток, например потерей подвижности конечностей, утратой речи, памяти или чувствительности. Реабилитация больных после инсульта основана на обучении клеток в здоровых участках мозговой ткани, которые компенсаторно берут на себя функцию поврежденного участка. Подобное массивное повреждение клеток стенки сердечной мышцы происходит при инфаркте миокарда, но, в отличие от инсульта, при инфаркте миокарда невозможна функциональная компенсация. Необходимость замещения клеток в медицинских клиниках также возникает при повреждении спинного мозга, сахарном диабете, слепоте, потере слуха, циррозе печени, рассеянном склерозе, болезни Паркинсона и многих других заболеваниях и патологических состояниях. Информация о попытках клинического применения СК постоянно отражается на сайте Национального института здоровья США — правительственного фонда, поддерживающего научные исследования (www.clinicaltrials.gov).

Какие клетки могут рассматриваться в качестве внешнего источника СК для лечения подобных заболеваний? При первом взгляде на эту проблему представляется, что лучшим источником являются ЭСК, обладающие значительно боль-

шим дифференцировочным и пролиферативным потенциалом по сравнению со ССК. На практике ЭСК могут быть получены из донорских яйцеклеток, оплодотворенных *in vitro*. Такой подход называется фертилизация *in vitro*. При фертилизации *in vitro*, как и при нормальном развитии, происходит образование диплоидной зиготы, которая при делении превращается в бластоцисту (см. цв. вклейку, рис. 1.20). Имплантация бластоцисты в матку псевдобеременной мыши ведет к развитию нового организма. В случае репродуктивного клонирования диплоидное ядро соматической клетки переносится в лишенный ядра овоцит. Образующаяся диплоидная яйцеклетка формирует бластоцисту, которая переносится в матку псевдобеременной мыши, что сопровождается рождением клонированного животного. При терапевтическом клонировании клетки ВКМ бластоцисты используются для получения культуры ЭСК. В последующем ЭСК служат источником получения различных линий дифференцированных клеток, иммунологически совместимых с донором соматической клетки, ядро которой использовалось для получения зиготы (см. цв. вклейку, рис. 1.20).

Альтернативным источником материала для восстановительного лечения поврежденных тканей больного являются ССК, которые получают из различных неэмбриональных тканей, например из амниотической жидкости, костного мозга, жировой ткани, скелетных мышц, кожи, печени и других тканей. ССК могут быть получены из тканей пациента и благодаря отсутствию различий по антигенам гистосовместимости их обратное введение тому же больному не вызовет реакции иммунного отторжения. Однако количество ССК, содержащихся в тканях зрелого организма, очень ограничено и, для терапевтического использования, должно быть увеличено путем размножения клеток вне организма. *Пластичность* ССК, на которой основана возможность терапевтического применения легко доступных клеток, например СК костного мозга для компенсации дефектов других тканей, значительно расширяет возможности терапевтического использования ССК.

Сравнение терапевтических свойств соматических и эмбриональных стволовых клеток

Поскольку ЭСК обладают большим регенеративным и дифференцировочным потенциалом, чем ССК, до недавнего времени доминировала идея об их большей пригодности для лечебных целей, а сами ЭСК привлекали значительно больше внимания и средств для их изучения. Однако до настоящего времени не было получено никаких существенных результатов ни в одной из попыток клонирования человека, не было публично доложено ни об одной попытке использования ЭСК в клинических условиях. Напротив, ССК, в частности стволовые кроветворные клетки (СКК), используются для лечения заболеваний кроветворной системы уже более 50 лет, а трансплантация островковых клеток поджелудочной железы стала одним из методов лечения диабета. Повышение интереса к ССК как к ресурсу для лечения основано на результатах экспериментальных исследований, показывающих, что эти клетки могут быть репрограммированы с помощью генетической инженерии с целью увеличения их регенеративного и дифференцировочного потенциала. Например, охарактеризованы условия, при которых клетки соединительной ткани мыши или человека могут превращаться в плюрипотентные клетки, подобные ЭСК. С другой стороны, открывается возможность для поиска факторов прямого репрограммирования ССК одной тка-

невой специфичности в стволовые клетки других тканей, например легко доступных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клетки-предшественники внутренних органов (печени, почек, легких и т. д.). Наиболее простым случаем генетического репрограммирования является активация покоящихся эндогенных СКК. В этом контексте активация СК кожи может быть использована для лечения облысения, а СК мышц — для регенерации мышечных тканей при их повреждениях или атрофических заболеваниях. С другой стороны, основываясь на данных по индуцированной трансдифференцировке СК, трансплантация СКК и МСК широко используется в клинике для лечения различных заболеваний внутренних органов.

Трансплантация СК сопряжена с риском для жизни реципиента, что можно рассмотреть на примере трансплантации СКК, которая включает предтрансплантационную подготовку, состоящую из химиотерапии, облучения или их комбинации для элиминации пораженных эндогенных СК. Предсказуемым осложнением предтрансплантационной подготовки является интоксикация, от которой погибают более 10 % пациентов. Осложнения включают также нарушение венозного оттока в печени, воспаление слизистых оболочек и инфекционные заболевания. Пациенты с трансплантацией костного мозга или внутренних органов нуждаются в использовании иммуносупрессивных препаратов для подавления болезни «трансплантат против хозяина» и реакции отторжения трансплантата. Другим подходом при трансплантации аллогенных СКК является щадящая терапия, при которой используются низкие дозы химиотерапевтических средств и облучения, не приводящие к удалению всех эндогенных стволовых клеток. Поэтому трансплантация аллогенных СКК требует высоких доз иммуносупрессивных препаратов на ранних стадиях посттрансплантационного лечения. Трансплантация клеток островков поджелудочной железы взрослых при лечении диабета также сочетается с иммуносупрессивной терапией. Одной из трудностей при этом является ограниченное количество таких клеток в ткани взрослого организма. Например, для получения нужного количества материала для трансплантации одному реципиенту необходимо собрать клетки от 2–3 трупов.

Этическая дилемма при использовании эмбриональных стволовых клеток человека

Точкой отсчета в широком обсуждении этических вопросов, связанных с потенциальным применением ЭСК, можно считать публичное обсуждение этой проблемы, инициированное экс-президентом США Джорджем Бушем в 2001 г. Д. Буш назвал две основные этические проблемы, связанные с использованием ЭСК: 1) криоконсервирование человеческих эмбрионов; 2) утилизация человеческих эмбрионов пусть даже для самых высоких целей, например для исследований, направленных на спасение и улучшение жизни других людей. В интерпретации Д. Буша этическая дилемма при использовании ЭСК заключается в том, что клетки — носители человеческой жизни — могут быть использованы для утилитарных целей, пусть даже в случае неизбежной гибели эмбриона, полученного на их основе. Признание высшей ценности человеческой жизни связано с представлением, что человек возникает в момент зачатия, поэтому ЭСК находятся в центре дискуссий по многим биомедицинским этическим вопросам, включая такие проблемы, как искусственное прерывание беременности, репро-

дуктивные технологии, исследование стволовых клеток человека, клонирование человека и др. Существует точка зрения, что ЭСК, оплодотворенные вне организма, а не в организме женщины, не следует рассматривать как человеческий плод. Но разве жизнь определяется тем, где была оплодотворена яйцеклетка? Чем отличаются эмбрионы, полученные *in vitro* для исследовательских целей, от тех, что получены путем фертилизации *in vitro*?

Если эмбрионы рассматривать как человеческие существа, то их следует защищать этическими правилами и законами, а их разрушение рассматривать как убийство. Кто же должен нести моральную ответственность за разрушение эмбрионов: сотрудник лаборатории, в которой осуществляются опыты с использованием эмбрионов; психолог, убеждающий женщину-донора пожертвовать яйцеклетку; или менеджер центра искусственного оплодотворения, разрешающий фертилизацию *in vitro*? В чем заключается роль «владельцев» эмбрионов? В настоящее время последние обладают законной властью распоряжаться судьбой эмбрионов вне зависимости от того, являются они биологическими родителями эмбрионов или нет. Следует ли рассматривать владельцев эмбрионов также виновными в их утилизации? Эти вопросы порождают идею морального соучастия, подразумевающую возможную моральную вину человека, связанного с тем лицом, которое непосредственно совершает антиморальное действие. По аналогии с уголовным законодательством, соучастник или помощник является в некоторой степени виновным, поскольку он согласен с антиморальным действием, хотя и не совершает его.

Второй этический вопрос, поднятый экс-президентом США Д. Бушем, рассматривает возможность оправдания научных исследований, в процессе которых утилизируются и при этом разрушаются человеческие эмбрионы, основываясь на мотиве направленности таких исследований на спасение других человеческих жизней. Даже если рассматривать человеческий эмбрион не как личность, но как промежуточную сущность, заслуживающую специального уважения, то и в этом случае следует ограничить утилитарные аргументы, использование которых неизбежно приведет к отрицанию высшей ценности человеческой жизни. Утилитарный подход для узаконивания использования «остатков» эмбриона может нарушить специальный статус таких эмбрионов. Более того, существует вероятность расширения утилитарных аргументов за пределы использования криоконсервированных эмбрионов для применения этой же логики при клонировании человека. Внедрение такого подхода означает, что «цель оправдывает средства», а этот принцип исторически отвергнут человеческим обществом. С другой стороны, в широких научных кругах существует точка зрения, что опасения по поводу утилитарного подхода при терапевтическом клонировании сильно преувеличены, тормозят научные исследования и практическое использование ЭСК.

От использования человеческого эмбриона к клонированию человека

Чтобы убедиться в том, каким образом оправдание утилитарного подхода при разрушении эмбриона может привести к расширению области использования процедур, не имеющих этических основ, нужно рассмотреть природу клонирования целого организма. Такое клонирование основано на процедуре, которая на научном языке называется «перенос ядер соматических клеток». В процессе клонирования ядро из соматической клетки зрелого организма, на-

пример клетки кожи или слизистой рта, переносят в яйцеклетку человека, лишенную ядра (см. цв. вклейку, рис. 1.20). При таком подходе реализуется генетический материал того организма, ядро клетки которого используется для клонирования, тогда как цитоплазматический материал яйцеклетки участвует в реализации генетических ядерных программ. Клонирование человека можно подразделить на репродуктивное, направленное на рождение нового человека, и терапевтическое, имеющее целью получить человеческий материал для утилитарных целей (см. цв. вклейку, рис. 1.20).

Большинство комментариев, представляющих точки зрения различных слоев общества, сводятся к необходимости закона, запрещающего репродуктивное клонирование. Опыты по клонированию овцы Dolly, которая была первым клонированным млекопитающим, показали существование множества технических проблем. Для клонирования Dolly понадобились 434 попытки, при которых иногда происходила остановка развития эмбриона на стадии 4–8 бластомеров, а в других случаях возникали нарушения на более поздних стадиях развития, которые приводили к многочисленным деформациям плода. Сама Dolly родилась не совсем нормальной и умерла вследствие преждевременного старения. Многочисленные деформации в процессе эмбрионального развития при клонировании организмов явились причиной возникновения в научно-популярной литературе понятия «фактора чудовища». В основе таких деформаций лежат множественные дефекты в экспрессии генов: 4–5 % от всего числа генов и 50 % так называемых «импринтированных генов» (гены, активность которых регулируется путем унаследованных признаков) неправильно экспрессируются в тканях клонированного животного непосредственно после рождения. С возрастом у клонированных животных число таких нарушений существенно возрастает.

У нормальных животных хромосомы материнского и отцовского происхождения имеют эпигенетические различия. Например, рисунок специфического метилирования родительских генов регулирует экспрессию импринтированных генов таким образом, что только одна копия гена, происходящая из яйцеклетки или сперматозоида, проявляет активность, тогда как другая аллель этого гена инактивирована метилированием. Экспрессия только одной копии каждого гена является важным фактором правильного развития плода. В процессе объединения геномов сперматозоида и яйцеклетки при фертилизации эпигенетический характер маркирования родительских геномов сохраняется в зиготе (рис. 1.21). В течение нескольких часов после фертилизации большая часть маркеров метилирования, за исключением импринтированных генов, удаляется из отцовского генома, тогда как геном яйцеклетки оказывается устойчивым к деметилированию. Наоборот, при переносе ядра соматической клетки в яйцеклетку в случае клонирования животных, оба родительских генома проявляют равную чувствительность к репрограммирующей активности яйцеклетки и эпигенетические различия, установленные в ходе гаметогенеза между отцовским и материнским геномами, по крайней мере частично, исчезают (см. рис. 1.21). Для технологически безопасного клонирования перед фертилизацией родительские геномы должны быть изолированы из ядра соматической клетки и обработаны индивидуально таким образом, как это происходит в гаметогенезе. Однако в настоящее время не существует технологических возможностей для выполнения подобной процедуры.

Если технологические проблемы при репродуктивном клонировании будут решены, эта процедура может стать не более затруднительной, чем фертилиза-

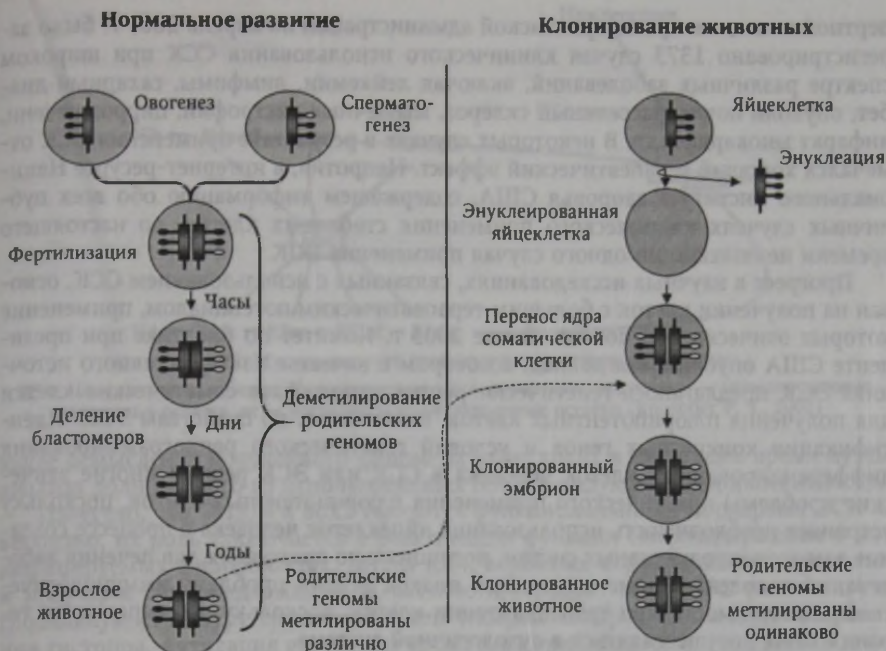


Рис. 1.21. Эпигенетическая характеристика родительских геномов при нормальном развитии и клонировании животных (Jaenisch R., 2004)

ция *in vitro*. Рассуждая последовательно, можно предположить, что если оплодотворение вне организма морально приемлемо, то использование клонирования с этой же целью можно рассматривать как помощь в рождении нового существа. Терапевтическое клонирование потенциально может вызвать еще больше этических вопросов, чем репродуктивное клонирование. Этот тип клонирования направлен на получение СК человека без намерений оставить в живых новое существо. Поэтому терапевтическое клонирование не поддерживается законодательствами многих стран. С другой стороны, в обществе, где применяются утилитарные аргументы, может быть запрещено репродуктивное, но не терапевтическое клонирование. В таком случае аргумент о возможности использования клеток из остатков эмбриона после фертилизации *in vitro*, поскольку он обречен на гибель, перефразируется в аргумент о целесообразности использования клеток из клонированного эмбриона, который обречен на гибель.

1.4. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

В качестве источника для восстановительной терапии ССК имеют очевидные преимущества перед ЭСК. ССК могут быть получены из тканей пациента, размножены *in vitro* и использованы для лечения того же больного, что исключает возможность иммунологических конфликтов при трансплантации клеток и необходимость использования иммуносупрессивной терапии. По данным экс-

пертной комиссии при американской администрации на апрель 2007 г. было зарегистрировано 1373 случая клинического использования ССК при широком спектре различных заболеваний, включая лейкемии, лимфомы, сахарный диабет, опухоли почек, рассеянный склероз, мышечные дистрофии, цирроз печени, инфаркт миокарда и др. В некоторых случаях в результате применения ССК отмечался хороший терапевтический эффект. Напротив, в интернет-ресурсе Национального института здоровья США, содержащем информацию обо всех публичных случаях клинического применения стволовых клеток, до настоящего времени не описано ни одного случая применения ЭСК.

Прогресс в научных исследованиях, связанных с использованием ССК, основан на получении клеток с большим терапевтическим потенциалом, применение которых этически обосновано. В мае 2005 г. Комитет по биоэтике при президенте США опубликовал доклад, в котором в качестве альтернативного источника ЭСК предлагалось генетически репрограммировать соматические клетки для получения плюрипотентных клеток, идентичных по свойствам ЭСК. Идентификация конкретных генов и условий генетического репрограммирования дифференцированных клеток человека в ССК или ЭСК решает многие этические проблемы практического применения плюрипотентных клеток, поскольку устраняет необходимость использования яйцеклеток человека в процессе создания высокорепродуктивных систем, потенциально пригодных для лечения заболеваний человека. Кроме того, такой подход решает проблему иммунологической совместимости при трансплантации клеток, поскольку регенеративная терапия может осуществляться в аутологичной системе.

Работы японских исследователей под руководством доктора С. Яманака (S. Yamanaka), опубликованные в 2006 и 2007 гг., показали, что стабильная экспрессия в фибробластах мышей или человека четырех генов (ОСТ3/4, SOX2, KLF4, MYC) вызывает их генетическое репрограммирование в индуцированные плюрипотентные клетки (иПК), что вызвало огромный интерес во всем мире (рис. 1.22). Аналогичные по свойствам ЭСК, иПК являются, вероятно, наиболее перспективными при получении новых ресурсов для медицинских целей. Значимость феномена индукции плюрипотентности заключается в возможности использования ограниченного числа генов для репрограммирования фибробластов в функционально зрелые клетки любой необходимой тканевой специфичности, например кардиоциты, нейроны, клетки поджелудочной железы, печени и т. д. Совокупность генов, которую доктор С. Яманака и его сотрудники использовали для репрограммирования зрелых соматических клеток в иПК, была подобрана случайным образом, из нескольких комбинаций различных генов. Последу-

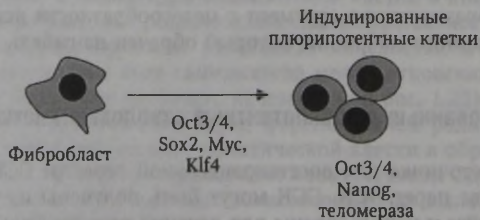


Рис. 1.22. Схема генетического репрограммирования зрелых соматических клеток в индуцированные плюрипотентные клетки

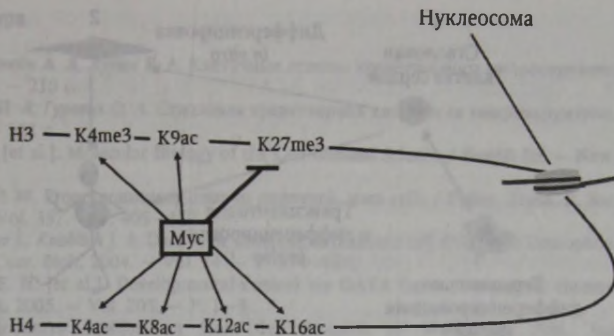


Рис. 1.23. Мус активирует глобальную структуру хроматина:

Н3 и Н4 – гистоновые белки; К – лизиновые аминокислотные остатки; me – метилированные лизиновые остатки; ac – ацетилированные лизиновые остатки (Knoepfler P. S., 2008)

ющее осмысление полученного феномена происходит в настоящее время путем анализа роли каждого из использованных генов в индукции плюрипотентности.

Известно, что Oct3/4 и Sox2 являются функциональными маркерами ЭСК и, вероятно, их роль заключается в реактивации функции самоподдержания в модифицируемых фибробластах. Мус и Klf4, вероятно, подготавливают хроматин к индукции самоподдержания. В частности, продукт гена MYC реактивирует глобальную структуру хроматина путем гиперацилирования и деметилирования гистонов. Активация структуры хроматина при экспрессии гена MYC в дифференцированных соматических клетках опосредована ацетилированием лизина 4, 8, 12, 16 в гистоне Н4, ацетилированием лизина 9 и триметилированием лизина 4 гистона Н3. Мус ингибирует триметилирование лизина 27 гистона Н3, что также направлено на активацию хроматина (рис. 1.23). Klf4 ингибирует клеточный цикл, активирует дифференцировку и предотвращает вызываемый продуктом гена MYC апоптоз.

Продукт гена KLF4 относится к опухолевым супрессорам. Механизм его действия включает торможение клеточного цикла во всех его фазах. Ингибция прогрессии цикла в фазе G1 может быть оценена по снижению активности циклина D1, уменьшению продукции белков Ki67 и Bmi1, а также по активации ингибиторов циклинзависимых киназ p21^{Cip1} и p57^{Kip2}. Ингибция фазы S белком Klf4 оценивается по супрессии белка Mcm2, вход в фазу M – по супрессии Ki67 и Cdk2, а выход из фазы M – по ингибции белков Bub1 и Rad21. Кроме того, Klf4 индуцирует дифференцировку цитокератинов 1, 2a, 6, 7, 13, 18, 19 и щелочной фосфатазы кишечника (см. цв. вклейку, рис. 1.24). Стабильная экспрессия Мус и Klf4, по-видимому, необходима для реактивации хроматина как в случае репрограммирования фибробластов в ЭСК, так и в ССК любой тканевой специфичности. Эти предположения основаны на известной функциональной характеристике белков Мус и Klf4. Вероятно, репрограммирование фибробластов в зрелые клетки другой специфичности, например кардиоциты, нельзя осуществить в один этап, поскольку зрелых клеток находится в неактивном состоянии, т. е. многие генетические программы, например программа самоподдержания, в фибробластах находятся в «разобранном состоянии». Поэтому репрограммирование фибробластов в зрелые кардиоциты нужно осуществлять в два этапа. На первом этапе необходимо реактивировать структуру хроматина и придать клетке необходимый потенциал развития, т. е. возможность диффе-

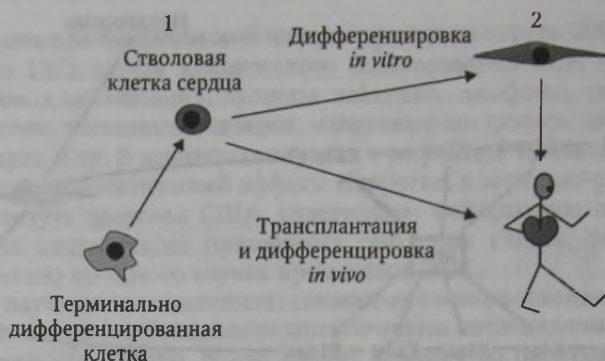


Рис. 1.25. Схема этапов репрограммирования фибробластов в кардиоциты:

1 — образование стволовых клеток сердца; 2 — образование зрелых кардиоцитов

ренцировки в различные кардиоцитарные клеточные линии. На втором этапе — индуцировать дифференцировку сформированной стволовой клетки сердца в зрелые кардиоциты (рис. 1.25).

Для образования стволовых клеток сердца из фибробластов необходимо вызвать в этих клетках экспрессию тканеспецифических генов сердца, например регуляторного гена сердечной дифференцировки *ISL1*, который способствует экспрессии двух других сердечных генов — *NKX2.5* и *FLK1*. *ISL1* экспрессируется как в мультипотентных, так и в бипотентных кардиоцитах. Бипотентные клетки-предшественники, продуцирующие *Isl1* и *Nkx2.5*, дифференцируются в кардиомиоциты и гладкомышечные клетки, тогда как бипотентные предшественники, продуцирующие *Isl1* и *Flk1*, дают начало гладкомышечным и эндотелиальным клеткам (рис. 1.26).

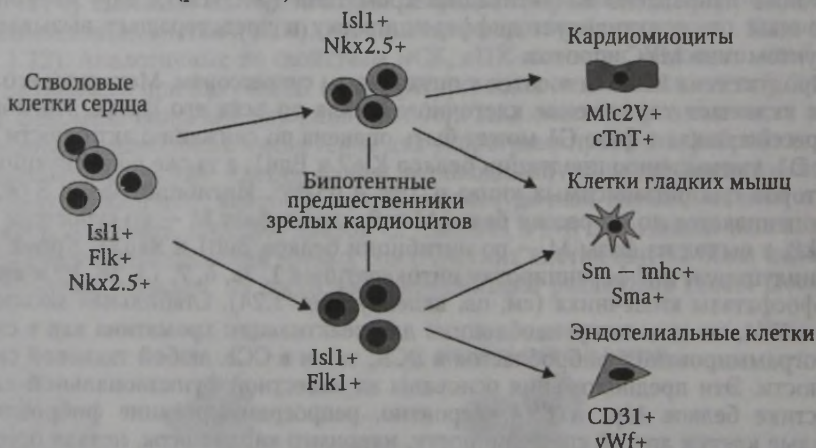


Рис. 1.26. Кардиогенный тканеспецифический фактор *Isl1* необходим для формирования сердечных клеток-предшественников

Flk1 — киназа 1 фетальной печени; *Nkx2.5* — тканеспецифический активатор кардиогенной дифференцировки; *Mlc2V* — легкая цепь 2V миозина предсердий; *cTnT* — сердечный тропонин T; *Sm-mhc* — тяжелая цепь миозина гладких мышц; *Sma* — гладкомышечный актин; *CD31* (PECAM 1) — адгезионная молекула тромбоцитов и эндотелиальных клеток; *vWf* — фактор фон Виллебранда (Laugwitz K. L. [et al.], 2008)

Литература

- Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. — М.: Медицина, 1980. — 210 с.
- Чертков И. Л., Гуревиз О. А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. — М.: Медицина, 1984. — 221 с.
- Alberts B. [et al.]. *Molecular Biology of the Cell* Garland Science / Fourth Ed. — New York, 2004. — 1463 p.
- Andrews P. W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells / *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.*, 2002. — Vol. 357. — P. 405–417.
- Betschinder J., Knoblich J. A. Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates / *Curr. Biol.*, 2004. — Vol. 14. — P. 674–685.
- Bresnick E. H. [et al.]. Developmental control via GATA factor interplay at chromatin domains. / *J. Cell Physiol.*, 2005. — Vol. 205. — P. 1–9.
- Bush Announces Position on Stem Cell Research // *Washington Post*, August 9, 2001. (http://www.washingtonpost.com/wp-srv/onpolitics/transcripts/bushtext_080901.htm).
- Chen X., Whitney E. M., Gao S. Y. [et al.]. Transcriptional profiling of Krüppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation / *J. Mol. Biol.*, 2003. — Vol. 326. — P. 665–677.
- De Coppi P., Bartsch G. J., Siddiqui M. M. [et al.]. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy / *Nat. Biotechnol.*, 2007. — Vol. 25. — P. 100–106.
- Fuchs E., Tumber T., Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche / *Cell.*, 2004. — Vol. 116. P. 769–778.
- Hock R., Furusawa T., Ueda T. [et al.]. HMG chromosomal proteins in development and disease / *Trends Cell. Biol.*, 2007. — Vol. 17. — P. 72–79.
- Jaenisch R. Human cloning — the science and ethics of nuclear transplantation / *N. Engl. J. Med.*, 2004. — Vol. 351. — P. 2787–2791.
- Knoepfler P. S. Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail / *Cell. Stem. Cell.*, 2008. — Vol. 2. — P. 18–21.
- Knoblich J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division / *Cell.*, 2008. — Vol. 132. — P. 583–597.
- Laugwitz K. L., Moretti A., Caron L. [et al.]. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? / *Development.*, 2008. — Vol. 135. — P. 193–205.
- Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells / *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.*, 1981. — Vol. 78. — P. 7634–7638.
- Meissner A., Jaenisch R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts / *Nature*, 2006. — Vol. 439. — P. 212–215.
- Mintz B., Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells / *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1975. — Vol. 72. — P. 3585–3589.
- Molofsky A. V. [et al.]. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2004. — Vol. 16. — P. 700–707.
- Morgan D. O. *The cell cycle. Principles of control* / New Science Press Ltd., 2007. — 297 p.
- Morrison S. J., Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer / *Nature*, 2006. — Vol. 441. — P. 1068–1074.
- National Institute of Health resource for stem cell research (<http://stemcells.nih.gov/>).
- President's Council of Bioethics. — White paper: Alternative sources of pluripotent stem cells (<http://www.bioethics.gov/>).
- Stewart R. [et al.]. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells / *Eur. J. Cancer.*, 2006. — Vol. 42. — P. 1257–1272.
- Sullivan D. M. The conception view of personhood: a review / *Ethics and Medicine*, 2003. — Vol. 19. — P. 11–33.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. [et al.]. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors / *Cell.*, 2007. — Vol. 131. — P. 861–872.
- Wegner M., Stolt C. C. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development / *Trends Neurosci.*, 2005. — Vol. 28. — P. 583–588.
- Wong M. D. [et al.]. Molecular mechanisms of germline stem cell regulation / *Ann. Rev. Genet.*, 2005. — Vol. 39. — P. 173–195.

ГЛАВА 2 || ЭЛЕМЕНТЫ МАШИНЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТКИ

2.1. Основные элементы машины клеточного цикла

Обзор событий клеточного цикла

Все живые организмы от бактерий до млекопитающих размножаются повторными циклами деления. Механизм деления начал формироваться на Земле 3 млрд лет назад и включает предварительное воспроизведение материнской клетки путем удвоения ее содержимого с последующим разделением удвоенного материала между двумя дочерними клетками. Цикл удвоения и деления клетки известен как *клеточный цикл*. У одноклеточных видов, таких как бактерии и дрожжи, в результате клеточного деления возникает совершенно новый организм. Возникновение нового организма у многоклеточных является значительно более сложным процессом. В зрелом организме клеточное деление необходимо для замещения умерших клеток. Организм каждого млекопитающего для выживания должен производить много миллионов клеток каждую секунду. Если деление клеток прекращается, например в результате облучения большой дозой рентгеновских лучей, человек погибает через несколько дней.

Детали клеточного цикла отличаются у каждого вида организмов и в разное время жизни одного и того же организма. Однако определенные черты клеточного цикла являются универсальными. К таким характеристикам можно отнести минимальный ряд процессов, которые клетка осуществляет для выполнения своей основной задачи — передачи генетической информации следующему поколению клеток. Для образования двух генетически идентичных дочерних клеток ДНК каждой хромосомы должна быть точно воспроизведена и удвоенные (реплицированные) хромосомы должны быть точно разделены между двумя дочерними клетками, так чтобы каждая клетка получила полную копию генома (рис. 2.1).

Эукариотические клетки сформировали в процессе эволюции сложную сеть регуляторных белков, известную как *регуляторная система*, или *машина кле-*

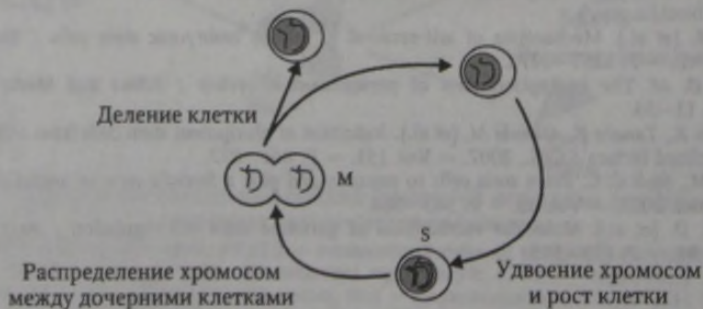


Рис. 2.1. Схема клеточного цикла

точного цикла, которая управляет прогрессией клеточного цикла. Прогрессия клеточного цикла осуществляется на основе упорядоченной последовательности биохимических переключений, контролирующих повторение основных этапов деления клетки: удвоение ДНК и разделение удвоенных хромосом. Эффективность клеточного деления обеспечивается элементами машины клеточного цикла, которая воспринимает различные сигналы, формирующиеся внутри и снаружи клетки, и отвечает на них. Машина клеточного цикла осуществляет цикличность работы путем передачи сигналов тем биохимическим элементам, которые непосредственно выполняют работу удвоения материала клетки и его деления, т. е. репликационной и митотической машинам. Таким образом, все элементы клеточного цикла можно подразделить на три части:

1) сигнальные пути, образующие и передающие сигналы снаружи и изнутри клетки машине клеточного цикла;

2) собственно машину клеточного цикла, воспринимающую сигналы внутри клетки и трансформирующую их в биохимические процессы, которые обеспечивают циклическую активацию репликационного и митотического аппарата клетки;

3) собственно репликационный и митотический аппараты клетки, осуществляющие удвоение и разделение генетического и эпигенетического материала.

Внутри клетки машина клеточного цикла отслеживает прогрессию клеточного цикла и замедляет последующие события до полного завершения предыдущих. Расхождение реплицированных хромосом не разрешается до завершения репликации ДНК. Восприятие внешних сигналов, т. е. сигналов из внешней среды и от других клеток, позволяет машине клеточного цикла стимулировать клеточные деления в том случае, когда нужно больше клеток, и тормозить их, когда нет потребности в новых клетках. Таким образом, машина клеточного цикла играет ключевую роль в поддержании клеточного состава организма.

В процессе деления клетки удваивают не только ДНК, но также цитоплазматические органеллы, мембраны, структурные белки и РНК, иначе они уменьшались бы в размерах с каждым делением. Для поддержания нормального соотношения между всеми элементами, которые удваивают свою массу, клетка должна координировать свой рост, т. е. увеличивать клеточную массу при каждом делении. Механизмы такой координации пока недостаточно изучены. Удвоение клеточной массы и подготовка к репликации ДНК происходят в фазе G1. Клетка также может находиться в постмитотическом состоянии, которое называется фазой G0 (см. цв. вклейку, рис. 2.2).

Основная задача клеточного цикла заключается в точном удвоении всей ДНК в хромосомах с последующим точным разделением удвоенного материала между двумя генетически идентичными дочерними клетками. Эти процессы определяют две основные фазы клеточного цикла. Удвоение ДНК происходит в фазе S (S — от первой буквы слова «synthesis»), которая длится 10–12 ч и занимает в типичной клетке млекопитающего около трети клеточного цикла. После фазы S расхождение хромосом и деление клетки происходит в фазе M (M — от первой буквы слова «mitosis»), которая состоит из деления ядра (митоз) и деления цитоплазмы (цитокинез). Фаза M длится в клетке млекопитающего приблизительно 1 ч и начинается с ядерного деления. Митоз, в свою очередь, начинается с конденсации хромосом: конденсация нитей ДНК в хромосомах значительно увеличивается, что необходимо для их последующего разделения. Затем ядерная оболочка распадается, и удвоенные хромосомы, каждая из которых со-

стоит из пары сестринских хроматид, прикрепляются к микротрубочкам митотического веретена.

В процессе клеточного цикла наблюдается короткая пауза в стадии, которая называется метафазой, когда хромосомы, готовясь к расхождению, выстраиваются вдоль экватора митотического веретена. Расхождение сестринских хроматид начинается в анафазе, во время которой хромосомы движутся к противоположным полюсам митотического веретена, где они деконденсируются и образуют ядра, характерные для интерфазной клетки. Затем клетка делится на две части путем цитокинеза.

Большая часть белков, РНК и других клеточных макромолекул синтезируются постоянно в ходе клеточного цикла, присутствуют во многих копиях и равномерно распределяются между дочерними клетками при делении, также как и маленькие органеллы: митохондрии, лизосомы и белковые комплексы — рибосомы. Большие органеллы, например аппарат Гольджи, сначала фрагментируются на маленькие везикулы в ходе митоза и затем распределяются поровну вместе с другими цитоплазматическими компонентами. В некоторых организмах эндоплазматический ретикулум (ER) перед делением также распадается на маленькие везикулы, тогда как в других — разделяется в неизменном виде. Некоторые белковые комплексы, например centrosомы, подобно хромосомам удваиваются только один раз в ходе клеточного цикла, обычно в фазе S.

В некоторых клеточных типах, например овоцитах, нейронах, мышечных клетках млекопитающих, увеличение клеточной массы происходит без деления, и наоборот, деление оплодотворенного яйца происходит без накопления клеточной массы. Эти примеры показывают, что хромосомный клеточный цикл и рост клетки являются событиями, которые могут регулироваться независимо друг от друга.

Структура клеточного цикла отличается в различных клетках и организмах. Например, ранние деления эмбрионов лягушки *Xenopus laevis* характеризуются короткими фазами S и M, которые следуют друг за другом и не перемежаются фазами G1 и G2 (см. цв. вклейку, рис. 2.3). В ходе клеточного цикла эмбрионов отсутствует процесс роста, оплодотворенное яйцо удваивает ДНК и распределяет ее между дочерними клетками вместе с ранее накопленными огромными запасами цитоплазматического материала. У большинства животных митоз и цитокинез следуют друг за другом до входа в следующую фазу G1. Однако у некоторых организмов цитокинез является относительно медленным процессом и может продолжаться долго после окончания митоза. Например, у быстро делящихся пивных дрожжей фаза S появляется вскоре после деления ядра, но окончательное разделение дочерних организмов возникает после завершения S фазы следующего цикла.

События клеточного цикла, видимые под микроскопом

Клетка удваивает свои составляющие элементы в интерфазе, которая состоит из трех фаз: фазы G1, во время которой происходит подготовка к репликации ДНК; фазы S, во время которой ДНК реплицируется; фазы G2, во время которой происходит подготовка к митозу (см. цв. вклейку, рис. 2.2). Многие события интерфазы не видны под световым микроскопом. Однако даже световой микроскоп позволяет обнаружить, что в интерфазе клетка увеличивается в размерах, что происходит вследствие удвоения ее материала, включая репликацию

хромосом и удвоение центросом. Под световым микроскопом можно наблюдать события, которые происходят в митозе, состоящем из профазы, прометафазы, метафазы, анафазы и телофазы (см. цв. вклейку, рис. 2.2).

В профазе реплицированные хромосомы, каждая из которых состоит из двух близко связанных сестринских хроматид, конденсируются. Вне ядра, между двумя центросомами, которые реплицируются и расходятся, собирается митотическое веретено. Прометафаза начинается с распада ядерной оболочки. Хромосомы с помощью их *кинетохоров*, структурных образований в центре хромосомы, состоящих из нескольких белков, прикрепляются к микротрубочкам веретена, которые осуществляют их активное передвижение. В метафазе хромосомы выстраиваются в экваторе митотического веретена, которое образуется микротрубочками, между его полюсами. Микротрубочки, которые связаны с кинетохорами хроматид, противоположными концами прикрепляют их к противоположным полюсам веретена. В анафазе сестринские хроматиды синхронно разделяются, формируя две дочерние хромосомы. Каждая хромосома медленно движется по направлению к ближнему полюсу веретена. Кинетохорные микротрубочки укорачиваются, и полюса веретена также расходятся, способствуя расхождению хромосом. В телофазе два набора дочерних хромосом подходят к полюсам веретена и деконденсируются. Вокруг каждого набора хромосом собирается новая ядерная оболочка, завершая формирование двух ядер и весь процесс митоза. Цитокинез начинается со сборки сократительного кольца, состоящего из актиновых и миозиновых филаментов. Прогрессивное уменьшение диаметра сократительного кольца способствует делению цитоплазмы на две части и завершению формирования ядерной оболочки.

Фазы клеточного цикла

Большинству клеток нужно значительно больше времени для роста и удвоения клеточной массы белков и органелл, чем для репликации ДНК и деления. Для того чтобы дать клетке больше времени для роста, существуют дополнительные промежутки между репликацией ДНК и митозом: фаза G1 — между фазами M и S, фаза G2 — между фазами S и M. Фазы G1, S и G2 вместе называются интерфазой (см. цв. вклейку, рис. 2.2). В типичной клетке человека, делящейся в культуре, интерфаза занимает 23 ч из 24-часового клеточного цикла, тогда как митоз продолжается около 1 ч.

Фазы G1 и G2 клеточного цикла служат не только обеспечению дополнительного времени для роста клетки, но и для восприятия и анализа сигналов со стороны внутреннего и внешнего микроокружения. Анализ таких сигналов дает клетке возможность сделать заключение, что окружающие условия способствуют делению, а машина клеточного цикла готова его совершить. В этом аналитическом процессе особенно важна фаза G1. Ее продолжительность может значительно изменяться в зависимости от внешних условий и сигналов от других клеток. Если внешние условия не способствуют делению, клетка может замедлить прохождение через фазу G1 и даже войти в фазу G0 и оставаться в ней неопределенно долгое время до возобновления пролиферации. Некоторые клетки находятся в фазе G0 в течение всей жизни организма. При благоприятных условиях и наличии сигналов для роста и деления клетки из фазы G1 или G0 проходят через точку коммитирования в конце фазы G1, известную как рестрикционная точка (R1) у млекопитающих или Start у дрожжей. После прохождения этой

точки клетки коммитируются к репликации ДНК даже в том случае, если внеклеточные сигналы, стимулирующие рост и деление клетки, отсутствуют. Второй основной точкой клеточного цикла, контролирующей вход в митоз, является точка G2/М. Выход из митоза контролируется в так называемой точке метафазно-анафазного перехода, или точке М. Прогрессия клеточного цикла может быть остановлена в любой контрольной точке цикла и опосредована действием специальных негативных регуляторов, например белков семейства продукта гена ретинобластомы (pRb), которые являются элементами машины клеточного цикла.

2.2. Роль отдельных элементов машины клеточного цикла

Основные элементы машины клеточного цикла подобны у всех эукариот

Некоторые черты клеточного цикла, включая продолжительность отдельных его фаз, существенно отличаются в различных клетках одного и того же организма. Однако принципы организации клеточного цикла и основные составляющие элементы его машины подобны у всех эукариотических клеток. Белки машины клеточного цикла появились миллиарды лет тому назад и являются настолько консервативными, что многие из них показывают функциональную активность при переносе из клетки человека в дрожжевую клетку. Поэтому клеточный цикл и его регуляцию можно изучать в разнообразных организмах, будучи уверенным в том, что его отдельные элементы, найденные у простых организмов, например у дрожжей, представлены гомологичными элементами у более сложных организмов, а их идентификация позволяет сформировать общую картину механизма деления эукариотических клеток. Наиболее широко используемыми моделями для изучения контрольной системы клеточного цикла являются дрожжи, эмбрионы лягушек, фруктовая мушка *Drosophila melanogaster* и культуры клеток млекопитающих.

Машина клеточного цикла дрожжей удобна для генетического анализа

Дрожжи относятся к маленьким одноклеточным грибам, наиболее просто организованным эукариотическим организмам, механизм контроля клеточного цикла которых подобен таковому у человека. Дрожжи размножаются в простых условиях, их клеточный цикл продолжается 1,5–2 ч. Дрожжам присуща высокая скорость *гомологичных рекомбинаций* — процесса, при котором последовательности гена на хромосоме заменяются близкородственными последовательностями или искусственной плазмидной ДНК. Гомологичные рекомбинации используются для направленной инактивации генов, замещения их специальными мутантными формами или введения дополнительных генных последовательностей в определенные участки генома. Гены могут также быть стабильно экспрессированы в дрожжевых клетках без интеграции в хромосомы. Регуляция экспрессии введенных извне генов может осуществляться с их естественных промоторов или так называемых «кондиционных» промоторов, активность которых регулируется реагентами, добавленными в ростовую среду. Два вида дрожжей обычно используются для изучения клеточного цикла: пивные и пекарские. Пивные дрожжи (*Schizosaccharomyces pombe*) получили свое название после того, как

были использованы для приготовления африканского пива. Они имеют палочкообразную форму и растут путем удлинения их концов (см. цв. вклейку, рис. 2.4).

Деление проявляется образованием перегородки в центре палочки. Пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) используются как в пивоварении, так и в хлебопечении. Они представляют собой клетки размером 3—5 мкм в диаметре, имеют овальную форму и делятся с формированием почки, которая появляется в фазе G1 и растет в фазах S и M до середины следующего клеточного цикла, пока размер почки не достигнет размера материнской клетки (см. цв. вклейку, рис. 2.4). После перераспределения одного набора хромосом из материнской клетки в почку дочерняя клетка отделяется от материнской. Несмотря на видимые различия, эти два вида дрожжей имеют набор общих характеристик, которые делают их удобными для генетических исследований. Дрожжи делятся почти так же быстро, как и бактерии, а размер их генома составляет примерно 1 % от такового у млекопитающих. Они обладают необычной способностью делиться в гаплоидном состоянии, когда в каждой клетке присутствует только одна копия каждого гена. Последняя особенность делает дрожжи удобными для быстрых молекулярно-генетических манипуляций, при которых гены могут быть удалены, замещены или модифицированы.

Различия в организации клеточного цикла у пивных и пекарских дрожжей дают основания использовать их для моделирования различных фаз цикла и его контрольных точек у млекопитающих. Пекарские дрожжи имеют продолжительную фазу G1, но у них отсутствует фаза G2 между фазой S и M, а вход в митоз регулируется иначе, чем у большинства эукариот. С другой стороны, метафазно-анафазный переход является более важной регуляторной точкой цикла у пекарских дрожжей. Пивные дрожжи, напротив, регулируют вход в митоз подобно тому, как это делают многоклеточные организмы, поэтому изучение регуляции входа в митоз у этих организмов является эффективным подходом для понимания таковой у млекопитающих.

Систематические исследования машины клеточного цикла дрожжей с использованием мутационного анализа привели ко многим открытиям. Гены, которые кодируют белки машины клеточного цикла, называются CDC (*cell division cycle*). Многие мутации таких генов приводят к аресту прогрессии клеточного цикла в специфических точках. Это дает основание предположить, что нормальный продукт мутантного гена необходим для прохождения через ту точку клеточного цикла, в которой происходит его остановка при мутации специфического гена. Клетка, несущая мутантный ген CDC, не может завершить клеточный цикл и разделиться, т. е. не может размножаться. Например, продукт гена CDC2 у пивных дрожжей необходим для инициации митоза. У пекарских дрожжей гомологичный ген называется CDC28. По другой номенклатуре этот ген называется CDK1. Таким образом, клетки, содержащие мутантные гены CDC, могут быть отобраны и размножены только в том случае, когда их фенотипическая активность зависит от внешних условий, т. е. если клетки имеют так называемый «кондиционный, или обусловленный фенотип» (см. цв. вклейку, рис. 2.5, а).

В случае создания гена с кондиционным фенотипом продукт этого гена не активен в условиях, которые называются рестриктивными, но активен в других условиях, которые называются перmissive. Большинство кондиционных мутантов генов клеточного цикла являются чувствительными к температуре. В этих случаях продукт мутантного гена не способен функционировать при высо-

кой температуре, но проявляет достаточную активность при низкой температуре, способствуя клеточному делению. Использование таких мутантных генов создает возможность размножать хозяйские клетки при низкой температуре, а затем путем повышения температуры вызывать остановку клеточного цикла в той его фазе, для прохождения которой необходим продукт мутантного гена (см. цв. вклейку, рис. 2.5, б). Ингибция синтеза продукта мутантного гена достигается путем повышения температуры, которая является рестриктивным условием для проявления активности гена и отменяет синтез его продукта, необходимого для прохождения названной точки клеточного цикла. При высокой температуре прогрессия клеточного цикла продолжается до достижения клеткой регуляторной точки, для прохождения которой требуется участие продукта мутантного гена. В этой точке клетки с мутантным геном CDC останавливаются. У пекарских дрожжей подобную остановку клеточного цикла можно распознать под световым микроскопом по наличию или отсутствию почки, так как ее размеры ясно указывают на стадию клеточного цикла, в которой произошла остановка деления.

Эмбрионы животных являются удобной моделью для биохимического анализа машины клеточного цикла

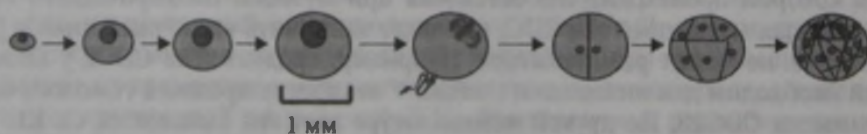
Дрожжи очень удобны для генетического анализа клеточного цикла, а биохимический анализ более эффективен на гигантских оплодотворенных яйцах многих животных, которые содержат большие запасы белков, необходимых для клеточного деления. Например, яйцо лягушки *Xenopus* имеет диаметр более 1 мм и объем ее цитоплазмы в 100 тыс. раз больше, чем таковой у соматической клетки (рис. 2.6). Оплодотворенное яйцо лягушки делится очень быстро и образует за несколько часов эмбрион, состоящий из тысяч маленьких клеток. В процессе таких делений единственными молекулами, которые синтезируются, являются молекулы ДНК, необходимые для образования тысяч новых ядер. После первого деления, которое занимает около 90 мин, следующие 11 делений происходят более или менее синхронно с 30-минутным интервалом, что завершается образованием за несколько часов бластулы, состоящей из 4 тыс. клеток. Кле-

а

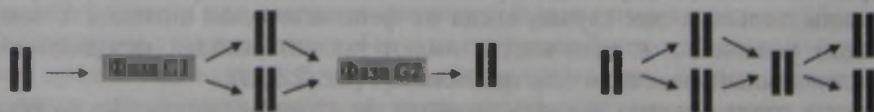
Овоцит растет без деления в течение нескольких месяцев

Оплодотворение

Оплодотворенное яйцо делится без роста за несколько часов



б



Стандартный клеточный цикл соматической клетки

Эмбриональный клеточный цикл

Рис. 2.6. Рост овоцита и деление яйцеклетки у лягушки *Xenopus*:

а — деление яйцеклетки у лягушки; б — схема эмбрионального и стандартного клеточных циклов (Murray A. V., 2004)

точный цикл оплодотворенного яйца делится на фазы S и M, каждая из которых продолжается около 15 мин, тогда как фазы G1 и G2 практически отсутствуют. Самые быстрые эмбриональные клеточные циклы длятся менее 5 мин.

Клетки раннего эмбриона лягушки *Xenopus*, также как и фруктовой мушки *Drosophila*, способны быстро делиться в условиях отсутствия роста и многих контрольных механизмов, которые присутствуют в более сложных клеточных циклах. Машина клеточного цикла в эмбриональных клетках животных упрощена до минимума, необходимого для достижения основной задачи — удвоения генома в двух дочерних клетках. Другим преимуществом ранних эмбрионов для анализа клеточного цикла является их большой размер. Эти условия позволяют легко вводить в эмбрион тестируемые реагенты для изучения их влияния на прогрессию клеточного цикла. Для опытов *in vitro* путем центрифугирования большого количества активированных яиц лягушки цитоплазма отделяется от других компонентов клетки. Неразведенная цитоплазма собирается, к ней добавляются ядра спермы и АТФ. В этих условиях хромосомы ядер спермы деконденсируются и проходят через повторные циклы репликации ДНК и митоза, показывая, что машина клеточного цикла эмбрионов лягушки может оперировать в бесклеточной системе (см. цв. вклейку, рис. 2.7). Еще одно преимущество использования эмбрионов лягушки заключается в возможности приготовления практически чистой цитоплазмы из яиц *Xenopus* и анализа с ее помощью многих событий клеточного цикла в пробирке. В эмбриональных экстрактах можно наблюдать клеточные события *in vitro* и манипулировать ими в простых и контролируемых условиях.

Машина клеточного цикла млекопитающих может анализироваться *in vitro*

У многоклеточных животных анализ событий, происходящих в отдельных клетках внутри организма, представляет собой непростую задачу. Поэтому культура клеток *in vitro*, в которой клетки нормальных или опухолевых тканей растут в суспензии или на пластиковой поверхности, создает удобные условия для изучения отдельных компонентов машины клеточного цикла. Клетки *первичной культуры*, полученные из нормальных тканей, обладают *диплоидным* набором хромосом, но вне организма быстро прекращают деление. Поэтому *in vitro* наиболее часто используются *стабильные линии* клеток, получаемые из опухолевых тканей человека или животных. Такие линии являются бессмертными, или иммортальными. Необходимо учитывать, что условия вне организма являются искусственными и создают возможность для неадекватного поведения клеток и изменения их функций. Например, деление клеток может прекращаться или, наоборот, они могут трансформироваться в клетки злокачественной опухоли. Клетки первичных культур млекопитающих также могут подвергаться мутациям, что способствует их иммортализации, то есть появлению таких свойств, которые обеспечивают клетке неопределенно долгую жизнь в культуре. Хотя такие клеточные линии не являются нормальными, они представляют собой неограниченный источник генетически гомогенных клеток и широко используются для изучения компонентов клеточного цикла. Клетки в культуре имеют удобные размеры для микроскопического и биохимического анализа белков машины клеточного цикла. Метод культуры клеток млекопитающих особенно эффективен в изучении молекулярных механизмов контроля пролиферации у многоклеточных организмов в нормальных условиях и при его нарушении и возникновении рака.

3. Механизм, который гарантирует, что каждое событие вызывается только один раз за цикл.

4. Выключатели типа «включено/выключено», которые вызывают события в полной и необратимой манере, т. е. если процесс инициирован, то он обязательно завершится. Например, клетка, в которой репликация ДНК была инициирована, но не завершилась, неизбежно погибнет.

5. Принцип надежности означает, что, используя механизмы обратной связи, машина клеточного цикла будет работать правильно даже при поломке ее отдельных частей.

6. Принцип приспособляемости гарантирует, что машина клеточного цикла оперирует в соответствии с текущими условиями внешней среды.

Контрольные точки клеточного цикла

Контрольная система простых эмбриональных клеточных циклов действует подобно оператору простой автоматической машины, действие которого основано на часовом механизме. В таком механизме нет обратных связей, он не чувствителен к событиям, которые регулирует, и инициирует следующий процесс даже в том случае, если предыдущий процесс не был завершен. В сложных машинах, включая биологический клеточный цикл, контрольная система оперирует с учетом информации, которую она получает от контролируемых процессов. Существуют сенсоры, которые информируют контрольную систему о завершении предыдущего процесса до начала следующего, например о завершении фазы G1 до начала репликации ДНК, завершении репликации ДНК до начала формирования митотического веретена, об окончании формирования митотического веретена до начала расхождения хромосом. Только при получении подобной информации «процессор» инициирует следующую фазу. Если же предыдущий процесс, например репликация ДНК, не завершен, то «процессор» останавливает прогрессию клеточного цикла до начала митоза (рис. 2.9). Такая остановка дает возможность биологической системе восстановить поврежденный элемент и предотвращает серьезные нарушения, которые могли бы возникнуть при преждевременном переходе в следующую фазу.

Процесс деления может быть остановлен в любой контрольной точке клеточного цикла: R1, G2/M или M (см. рис. 2.9). В контрольных точках сходятся биохимические пути, сигнализирующие машине клеточного цикла о необходимости клеточного деления, его временной или постоянной остановки и перехода клетки в фазу G0. Например, стадия анафазы не начинается, пока последняя хромосома не прикрепится к митотическому веретену. При повреждении ДНК прогрессия клеточного цикла может быть остановлена в контрольных точках с помощью специальных механизмов. Остановка прогрессии клеточного цикла в контрольных точках обеспечивает время для репарации поврежденной ДНК, после чего тормозные механизмы отменяются и ход клеточного цикла возобновляется. Контрольные точки также являются каналами, через которые сигналы окружения влияют на прогрессию клеточного цикла и контролируют работу машины клеточного цикла.

Машина клеточного цикла функционирует путем формирования негативных сигналов, которые останавливают прогрессию клеточного цикла, а не через отмену позитивных сигналов, которые активируют деление клетки. Например, выход из митоза начинается с процесса расхождения хромосом, т. е. с анафазы.

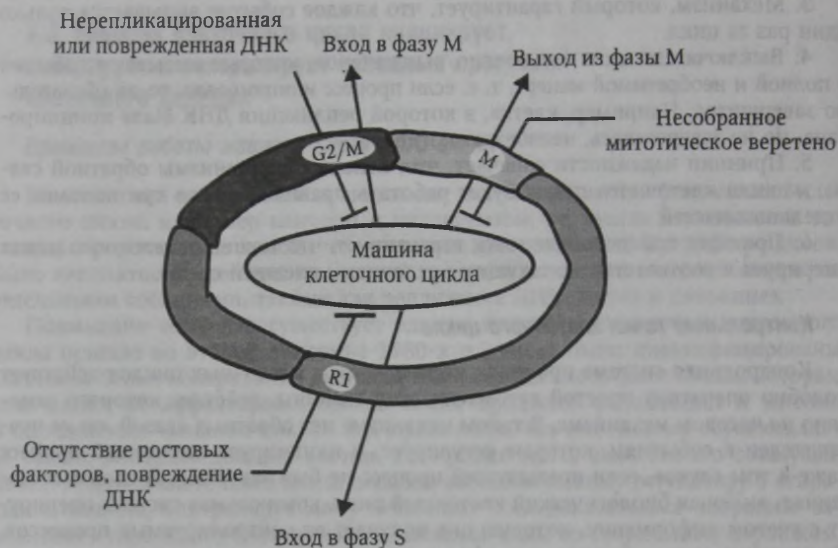


Рис. 2.9. Контрольные точки клеточного цикла (Murray A. V., 1992)

В случае контроля анафазы через положительные сигналы машина цикла должна была бы отслеживать прикрепление всех хромосом и суммировать сигнал от каждой из них в процессе прикрепления к митотическому веретену таким образом, чтобы вызвать процесс расхождения после прикрепления последней хромосомы. Однако такой сигнал было бы трудно определить, поскольку он составляет только небольшую часть от общей величины сигнала, необходимого для инициации расхождения хромосом. Напротив, если каждая неприкрепленная хромосома посылает негативный сигнал, который тормозит прогрессию клеточного цикла, прикрепление последней хромосомы будет легко определить, поскольку при этом прекращается сигнализация. Таким же образом нереплицированная ДНК ингибирует инициацию митоза путем образования «стоп»-сигналов, которые передаются до завершения репликации ДНК.

Убедительные доказательства того, что функционирование контрольных точек цикла опосредовано негативными сигналами, были получены в результате экспериментов на клетках, в которых контрольные точки были инактивированы с помощью мутаций или химической обработки. В таких клетках прогрессия клеточного цикла продолжается даже в том случае, если репликация ДНК или сборка митотического веретена не завершена, показывая, что контрольные точки не играют роли в прогрессии клеточного цикла. Контрольные точки следует рассматривать как вспомогательные тормозные системы, роль которых в работе машины клеточного цикла заключается в обеспечении более сложных форм регуляции. Популяция клеток с дефектами контрольных точек часто накапливает мутации, возникающие из-за случайных нарушений в репликации, репарации ДНК или в сборке митотического веретена. Накопление в клетке таких мутаций содержит опасность возникновения рака.

Основные элементы машины клеточного цикла

Машина клеточного цикла запускается митогенами, активирующими синтез циклинов D, которые инициируют начало фазы G1. Циклины D отменяют тормозящее действие на пролиферацию клеток белков семейства pRb путем освобождения из комплексов с ними транскрипционных факторов семейства E2F. В свою очередь, белки E2F способствуют синтезу циклинов E и A, инициирующих репликацию ДНК и митоз.

В состав машины клеточного цикла входят продукты нескольких белковых семейств, выполняющих эффекторные и регуляторные функции: циклинзависимых киназ (Cdk); циклинов, активных в различных фазах цикла — G1, G1/S, S и M; ингибиторов циклинзависимых киназ (CdkI), например продуктов локуса Ink4 (p15, p16, p18, p19) и белков семейства Cip/Kip — p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}; негативных регуляторов клеточной пролиферации (членов семейства pRb и белков семейства p53); убиквитиновых лигаз SCF и APC*, участвующих в периодической инактивации регуляторных белков клеточного цикла в ходе его прогрессии (рис. 2.10, а).

Эффекторными элементами машины клеточного цикла, образующими его движущую силу, являются белковые киназы, известные как циклинзависимые киназы (Cdk). Они получили свое название потому, что активность этих ферментов зависит от их регуляторных компонентов — циклинов, которые синтезируются и разрушаются в клеточном цикле с определенной периодичностью (рис. 2.11). Периодические колебания активности циклинов и Cdk сопровождаются параллельными изменениями активности их мишеней — регуляторных внутриклеточных белков. Фосфорилирование этих белков под действием Cdk инициирует последовательность событий, результатом которых является индукция репликации ДНК, митоз и цитокинез. Например, увеличение активности Cdk в фазе G1 сопровождается фосфорилированием продуктов семейства pRb, освобождением от связи с ними транскрипционных факторов семейства E2F, инициирующих репликацию и митоз (рис. 2.10, б).

Cdk действуют в комплексе с циклинами, образование которых необходимо для активации киназ и физического взаимодействия с белками-мишенями (см. рис. 2.11). В отличие от циклинов, уровень Cdk в клеточном цикле не изменяется. Наоборот, при образовании комплексов с циклинами киназная активность Cdk периодически изменяется, что и вызывает прогрессию клеточного цикла. Существуют четыре класса циклинов, функции которых определяются фазой клеточного цикла, в которой они связывают и активируют Cdk (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Наиболее важные циклины и циклинзависимые киназы у позвоночных и у пекарских дрожжей (Sherr C. J., 1993)

Комплексы циклин—Cdk	Позвоночные		Пекарские дрожжи	
	Циклины	Cdk	Циклины	Cdk
G1—Cdk	Циклины D1—3	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1 (Cdc28)
G1/S—Cdk	Циклин E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S—Cdk	Циклин A	Cdk2	Cln5, 6	Cdk1
M—Cdk	Циклин B	Cdk1 (Cdc2)	Cln1—4	Cdk1

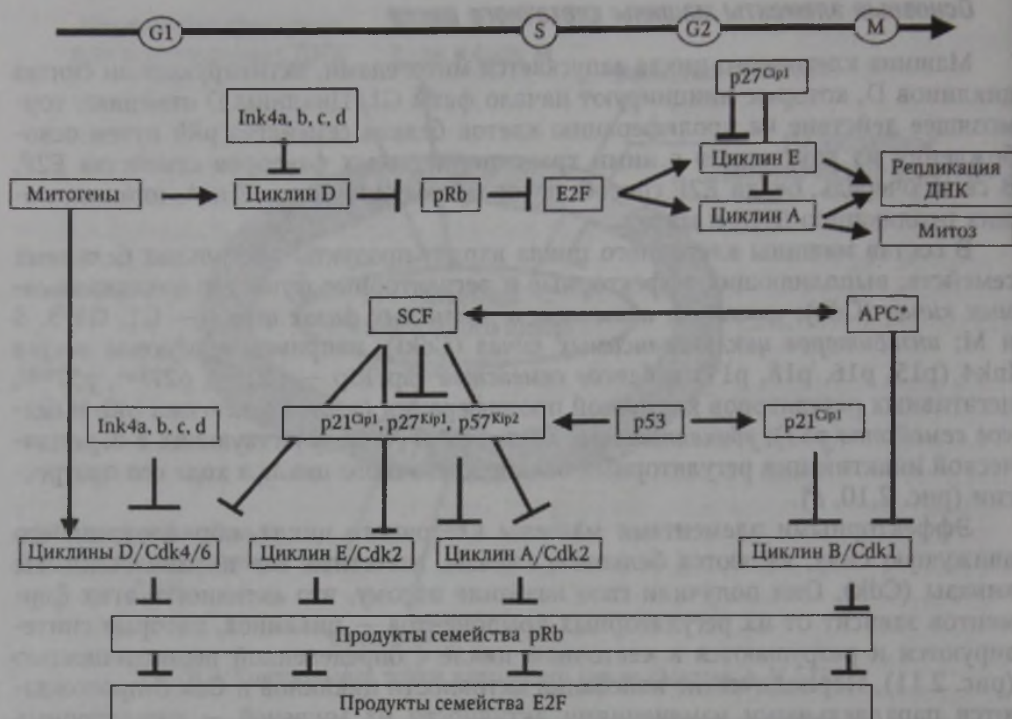


Рис. 2.10. Последовательность активации машины клеточного цикла и ее основные компоненты: а — последовательность активации машины клеточного цикла; б — основные компоненты машины клеточного цикла (Weinberg R. A., 1995)

Три класса циклинов эффективны во всех эукариотических клетках:

- 1) циклины фаз G1/S связывают Cdk в конце фазы G1 и коммитируют клетку к репликации ДНК;
- 2) циклины фазы S связывают Cdk в ходе фазы S и инициируют репликацию ДНК;
- 3) циклины фазы М облегчают митоз.

У большинства клеток существует и четвертый класс циклинов, циклины G1, которые облегчают прохождение рестрикционной точки R1.

У дрожжей одна и та же Cdk связывает все классы циклинов и инициирует прогрессию клеточного цикла путем замены своего партнера — циклина в различных фазах цикла. В клетках позвоночных существует четыре Cdk. Две киназы взаимодействуют с циклинами фазы G1, одна — с циклинами фаз G1/S и S и одна — с циклинами фазы М. Соответственно, эти киназы называются G1-Cdk, G1/S-Cdk, S-Cdk и М-Cdk (см. табл. 2.1).

Каким образом различные комплексы циклин-Cdk инициируют различные события клеточного цикла? Ответ на этот вопрос, по крайней мере отчасти, заключается в том, что циклины не просто активируют связанные с ними Cdk, но также направляют их к специфическим белкам-мишеням. В результате каждый комплекс циклин-Cdk фосфорилирует различную группу белков. Один и тот же комплекс циклин-Cdk в разное время может оказывать различное влияние на клеточный цикл, так как доступность различных субстратов для Cdk изменя-

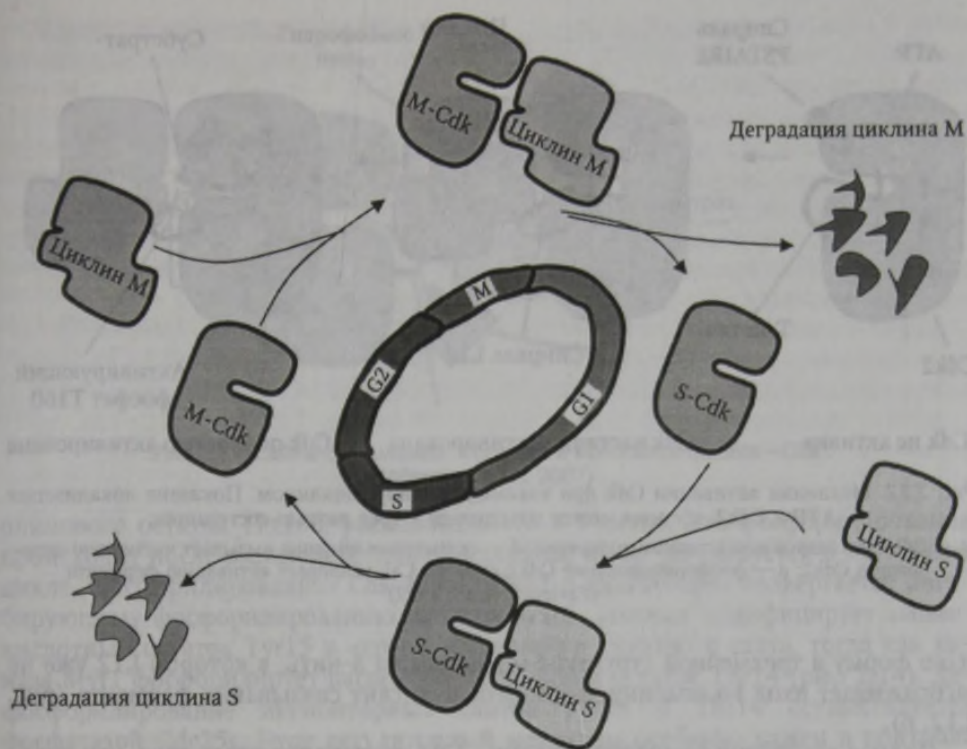


Рис. 2.11. Схема действия циклинов и циклинзависимых киназ в простых клеточных циклах. На рисунке показаны циклины, которые действуют в фазе S (циклины S) и фазе M (циклины M). Те и другие циклины взаимодействуют с одной и той же Cdk. Комплексы циклинов S и M с Cdk обозначены, соответственно, S-Cdk и M-Cdk (Evans T. [et al.], 1983)

ется в течение клеточного цикла. Например, некоторые белки, которые функционируют в митозе, могут быть доступными для Cdk только в фазе G2.

Cdk состоит из меньшей аминоконцевой и большей С-концевой долей. Сайт фосфорилирования Cdk расположен во впадине между ее двумя долями (рис. 2.12, а). Сайт связывания АТФ в молекуле Cdk располагается в глубине впадины таким образом, что его фосфатные остатки ориентированы наружу к началу впадины. Белковый субстрат не может взаимодействовать с сайтом фосфорилирования Cdk во впадине, поскольку вход в нее в неактивной молекуле Cdk занят подвижной *T-петлей*, которая формируется из С-концевой части Cdk (см. рис. 2.12, а).

Ключевые остатки в АТФ-связывающем сайте также ориентированы «неправильно» в мономерной Cdk, что соответствует неактивному состоянию фермента. Взаимодействие с циклином вызывает важные конформационные изменения в субстратном сайте Cdk. Две α -спирали вносят наиболее важный вклад в контроль активности Cdk. Высококонсервативная $\alpha 1$ -спираль N-концевой части Cdk (часто называемая по входящим в нее аминокислотным остаткам *спиралью* PSTAIRE) физически взаимодействует с циклином и после связывания с ним движется внутрь молекулы, вызывая реориентацию аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с фосфатными группами АТФ. Спираль L12 изменяет

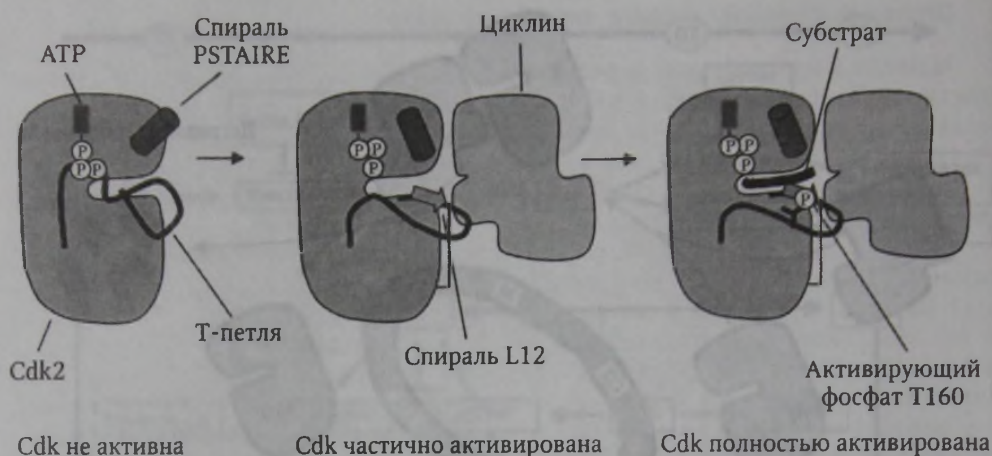


Рис. 2.12. Механизм активации Cdk при взаимодействии с циклином. Показана локализация ATP в Cdk2, которая может находиться в трех разных состояниях:

а — Cdk2 находится в неактивном состоянии; *б* — связывание циклина вызывает частичную активацию Cdk2; *в* — фосфорилирование Cdk2 киназой Cak усиливает активацию фермента (Pavletich N. P., 1999)

свою форму в трехмерной структуре молекулы на β -нить, в которой L12 уже не загораживает вход во впадину, формирующую сайт связывания фермента (рис. 2.12, б).

Полная активация комплекса циклин—Cdk происходит после того, как киназа, активирующая Cdk, *циклинактивирующая киназа* (Cak), фосфорилирует треониновый аминокислотный остаток Thr 160 Т-петли, расположенный рядом с киназным сайтом Cdk (рис. 2.12, в). Это фосфорилирование является причиной более активного взаимодействия киназы с циклином, а также способствует более активному взаимодействию Т-петли с субстратом, содержащим последовательность SPXK. Фосфорилирование субстрата Cdk способствует последующим событиям клеточного цикла.

Некоторые циклины, прежде всего циклины S, физически взаимодействуют с субстратными белками, активность которых связана с клеточным циклом. У человека комплексы циклин А—Cdk взаимодействуют и фосфорилируют белок p107 — важный регулятор перехода G1/S. Субстратная специфичность циклинов S зависит от области молекулы, которая называется гидрофобным пятном и находится на поверхности молекулы циклина. Это пятно связывает с умеренным аффинитетом субстратный белок, который содержит комплементарную гидрофобную последовательность, известную как мотив RXL. Такое взаимодействие увеличивает аффинитет между субстратом и киназой и ускоряет субстратное фосфорилирование. Центральный сайт распознавания белкового субстрата в Cdk в активном сайте Т-петли взаимодействует с последовательностью субстрата SPXK, содержащей сайт фосфорилирования (рис. 2.13).

Хотя активность Cdk прежде всего зависит от повышения или снижения уровня циклинов, существует несколько дополнительных механизмов, которые регулируют активность Cdk в определенные периоды цикла. Как уже указывалось ранее, активность Cdk нуждается в фосфорилировании киназой Cak тре-

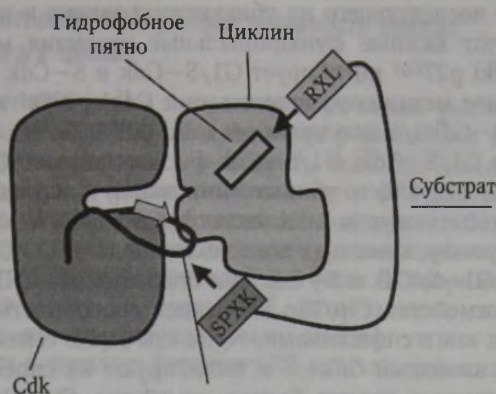


Рис. 2.13. Сайты связывания субстрата в комплексе циклин—Cdk (Morgan D. O., 2007)

онинowego остатка Thr160, расположенного в Т-петле. Это фосфорилирование происходит после взаимодействия с циклином, но не регулируется в клеточном цикле. Фосфорилированная Cdk киназа Cdk1 в дальнейшем подвергается ингибирующему фосфорилированию киназой Wee1, которая модифицирует аминокислотный остаток Tyr15 в «крыше» активного киназного сайта, тогда как киназа Myt1 фосфорилирует расположенный рядом остаток Thr14 (рис. 2.14). Дефосфорилирование ингибиторных сайтов Tyr15 и Thr14 осуществляется фосфатазой Cdc25c. Этот регуляторный механизм особенно важен в контроле активности M—Cdk в начале митоза.

Активность комплексов циклины—Cdk регулируется также путем связывания с CdkI. Физиологическая необходимость существования этих белков заключается в ингибировании активности Cdk во время выхода клетки из митоза и до начала следующей фазы клеточного цикла, т. е. в фазе G1, когда клетка растет и накапливает информацию, необходимую для инициации нового цикла деления. CdkI, экспрессирующиеся в фазе G1, обладают способностью избирательно ингибировать активность G1—Cdk и G1/S—Cdk и фосфорилируются Cdk с формиро-

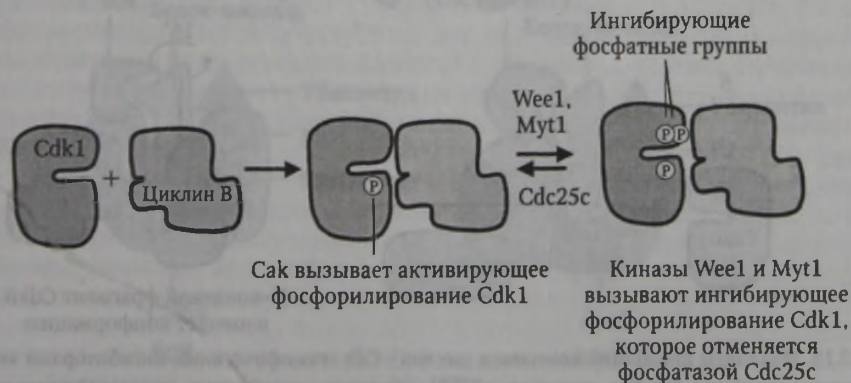


Рис. 2.14. Регуляция активности Cdk активирующим и ингибирующим фосфорилированием (Murray A. W., 1992)

ванием сигнала для последующего их убиквитинирования и инактивации в протеасомах. Существуют важные функциональные различия между различными CdkI. Например, CdkI $p27^{Kip1}$ ингибирует G1/S-Cdk и S-Cdk. Поэтому у млекопитающих существуют механизмы инактивации CdkI $p27^{Kip1}$ в поздней фазе G1. Комплекс циклин D-Cdk4/6 аккумулирует CdkI $p27^{Kip1}$ и, таким образом, удаляет его из комплекса G1/S-Cdk. G1/S-Cdk фосфорилируют CdkI $p27^{Kip1}$, придавая ему метку для последующего убиквитинирования и деградации. Другие CdkI, в частности, кодируемые локусом *Ink4*, являются специфическими ингибиторами киназ фазы G1, например, киназных комплексов циклин D-Cdk4/6. CdkI $p21^{Cip1}$ ингибирует киназы G1-S/Cdk и S-Cdk при повреждении ДНК.

CdkI — члены семейства Cip/Kip, обладают способностью взаимодействовать как с киназами, так и с циклинами, тогда как белки семейства *Ink4* взаимодействуют только с киназами Cdk4/6 и ингибируют их способность связывать циклины. Аминоконцевые участки белков семейства Cip/Kip ($p21$, $p27$, $p57$) включают мотив RXL, опосредующий связывание циклинов, и имеют более протяженную последовательность, необходимую для связывания Cdk. Таким образом, белки семейства Cip/Kip связывают оба компонента комплекса циклин-Cdk, препятствуя его взаимодействию с субстратом. Белки, кодируемые локусом *Ink4*, взаимодействуют только с Cdk, ингибируя ее способность взаимодействовать с циклином. Например, при взаимодействии $p16^{Ink4a}$ с N-концевым участком Cdk6, противоположным сайту связывания субстрата, происходит вращение на 15° N-концевого фрагмента молекулы, что изменяет ее конформацию и снижает способность взаимодействовать с циклином (рис. 2.15).

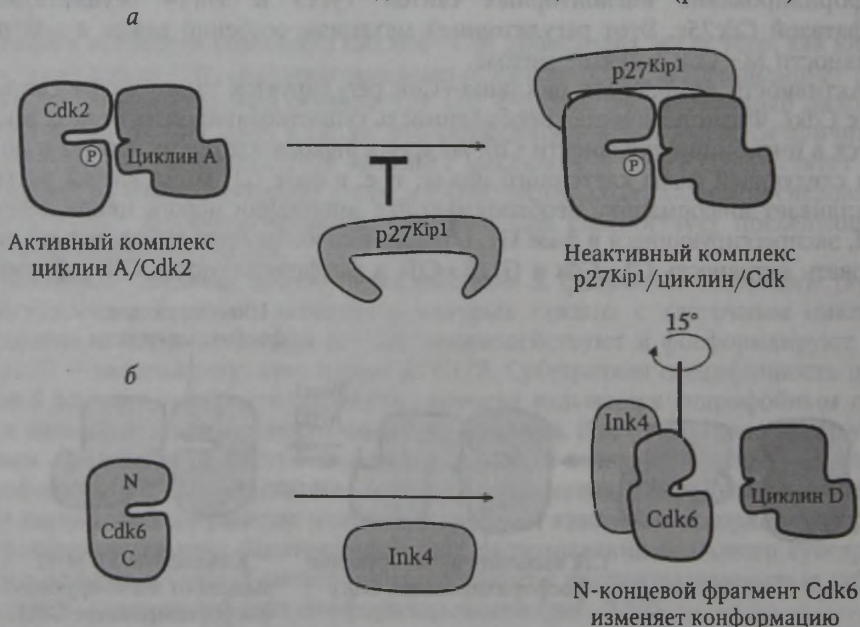


Рис. 2.15. Механизм ингибиции комплекса циклин—Cdk специфическими ингибиторами киназ: а — члены семейства Cip/Kip, например $p27^{Kip1}$, обладают способностью взаимодействовать как с киназами, так и с циклинами; б — белки семейства *Ink4* взаимодействуют только с киназами Cdk4/6 (Sherr C. J., Roberts J. M., 1999)

Циклический протеолиз в регуляции активности белков машины клеточного цикла

Контроль клеточного цикла зависит от двух видов различных ферментных комплексов: SCF и APC*, которые действуют в различное время в клеточном цикле и инактивируют ключевые компоненты машины клеточного цикла путем протеолиза. В фазе G1 и S ферментный комплекс SCF (название составлено из первых букв трех белковых субъединиц комплекса: Skp1, Cullin, F-box) опосредует убиквитинацию и деструкцию циклинов фазы G1/S и некоторых Cdk1, контролирующих инициацию фазы S, например $p27^{kip1}$. У млекопитающих известно более 70 лигаз SCF, включающих различные белковые субъединицы F-box, которые обеспечивают специфичность при прямом рекрутировании субстрата к лигазе и ферменту E2, конъюгирующему убиквитин (рис. 2.16).

Комплекс, облегчающий анафазу (APC*), является ответственным за инициацию метафазно-анафазного перехода, убиквитинацию и протеолиз циклина M и других регуляторов митоза. APC* состоит из 11–13 субъединиц и по молекулярной массе значительно превосходит SCF. Подобно SCF, APC* включает в качестве основной субъединицы cullin (Apc2) и субъединицу RING finger (Apc11), которая физически взаимодействует с ферментом E2 (см. рис. 2.16). Активация APC* происходит при взаимодействии с активаторными белками (Cdc20 или Cdh1), которые, подобно субъединице F-box в SCF, осуществляют контакт с белком-мишенью. В отличие от лигазы SCF, распознающей в белке-мишени сайт специфического фосфорилирования, активированный комплекс APC* взаимодействует в мишенях со специфическими аминокислотными последовательностями (мотивами), наиболее распространенными среди которых являются деструктивный D-box и KEN-box. D-box включает последовательность RXXLXXXXN, где R — аргинин, X — любая аминокислота, L — лейцин, N — аспарагин. KEN-box включает последовательность KENXXXXN, в которой K — лизин, E — глутаминовая кислота, N — аспарагин. Убиквитиновые лигазы SCF и APC* регулируются различными путями.

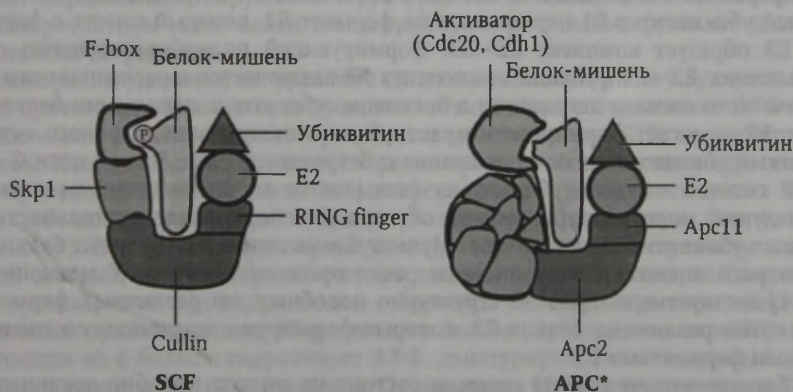


Рис. 2.16. Схема строения убиквитиновых лигаз SCF и APC* и их взаимодействие с белком-мишенью (Morgan D. O., 2007)

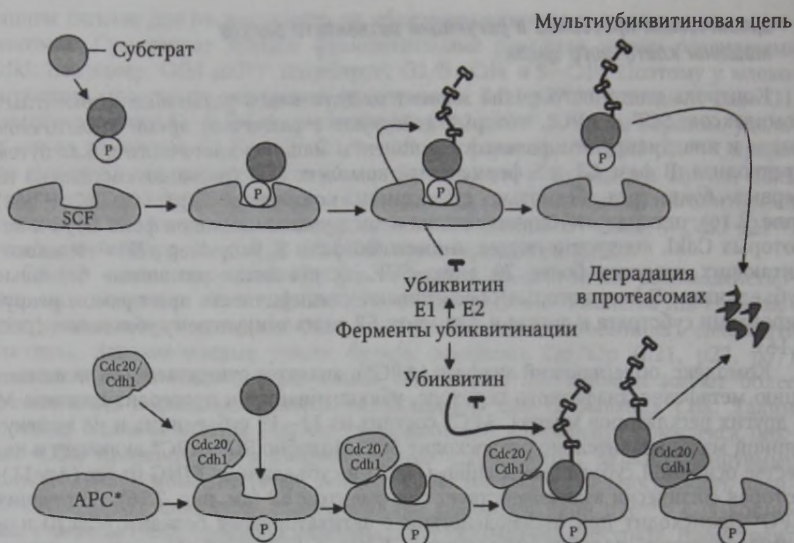


Рис. 2.17. Сравнение механизма убиквитинации лигазами SCF и APC* (Peters J. M., 2002)

Активность SCF постоянна в течение клеточного цикла, а убиквитинация, вызываемая SCF, инициируется изменением состояния фосфорилирования ее мишеней. Только специфически фосфорилированные белки распознаются и убиквитинируются SCF. В противоположность SCF, активность APC* изменяется в различных стадиях клеточного цикла путем добавления различных активирующих субъединиц (рис. 2.17).

Убиквитин подготавливается для конъюгации с другими белками с помощью фермента E1, активность которого зависит от АТФ (рис. 2.18). Активированный убиквитин с E1 переносится на фермент E2, который вместе с ферментом E3 образует комплекс E2–E3, формирующий полиубиквитиновую цепь. В комплексе E2–E3 функция компонента E3 заключается в распознавании специфического сигнала деградации в белковом субстрате и связывании белка-мишени. E2 помогает формировать мультиубиквитиновую цепь, перенося активированный убиквитин на остаток лизина субстратного белка. В этой цепи С-концевой остаток каждого убиквитина связывается со специфическим лизином предыдущей молекулы убиквитина, образуя линейную последовательность отдельных убиквитиновых остатков. Мультиубиквитиновая цепь метит белки, которые распознаются специфическим рецептором протеасомы. У млекопитающих существует примерно 30 структурно подобных, но различных ферментов E2 и сотни различных белков E3, которые формируют комплексы со специфическими ферментами E2.

Убиквитин-протеасомная система состоит из многих подобно организованных протеолитических путей, общим в которых является фермент E1 в начале процесса и протеасома — в его конце, а отличаются эти пути композицией убиквитиновых лигаз E2–E3 и вспомогательных белков. Различные белковые лигазы

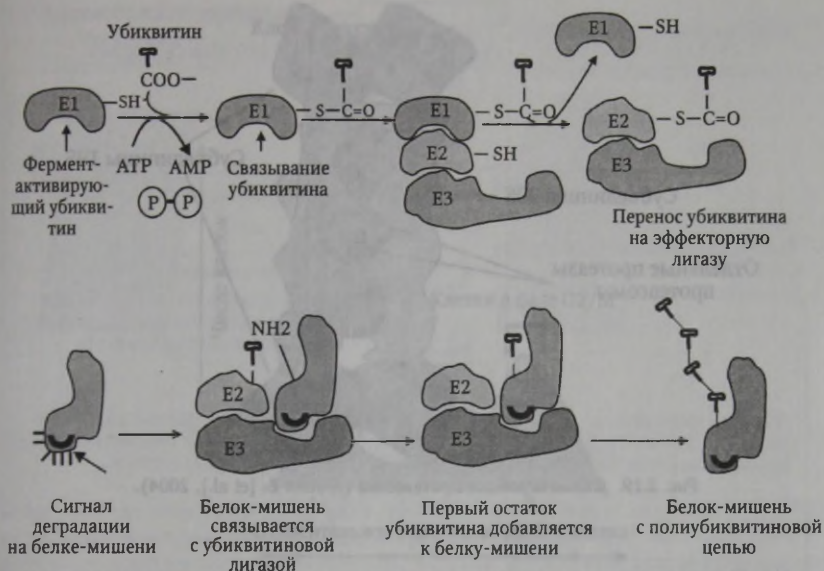


Рис. 2.18. Последовательность формирования полиубиквитиновой цепи на белке-мишени (Alberts B. [et al.], 2004)

распознают различные сигналы деградации, поэтому метят для деградации различные группы внутриклеточных белков, которые несут эти сигналы.

В нормальных условиях задачей протеасом является разрушение вновь синтезированных клетками белков, которые имеют неправильную форму из-за ошибок при их трансляции. Примерно треть вновь синтезированных белков имеют определенные нарушения структуры. После вхождения в цитоплазматический ретикулум такие белки селективируются и ретранслоцируются в цитозоль с целью их деградации.

Аппаратом удаления неправильно синтезированных белков у эукариот являются протеасомы. Протеасомы представляют собой многочисленные АТФ-зависимые комплексы протеаз, которые составляют примерно 1 % всех клеточных белков. Каждая протеасома состоит из центрального полого цилиндра (основная протеасомная субъединица 20S) и сформирована из множественных белковых субъединиц, которые собраны в структуру, состоящую из 4 колец (рис. 2.19). Эти субъединицы представляют собой различные протеазы с активными сайтами, направленными во внутреннюю полость цилиндра. Каждый конец протеасомного цилиндра связан с большим белковым комплексом 19S, содержащим приблизительно 20 различных белков. Субъединица комплекса 19S, состоящая из 6 белков, гидролизует АТФ, денатурирует белки и передвигает их во внутреннюю полость протеасомы. Субъединица 19S также отвечает за связывание белковых субстратов протеасомой, в частности, она распознает белки, ковалентно связанные с полиубиквитиновой цепью. В протеасоме убиквитинированный белок находится до его полной деградации на мелкие полипептиды.

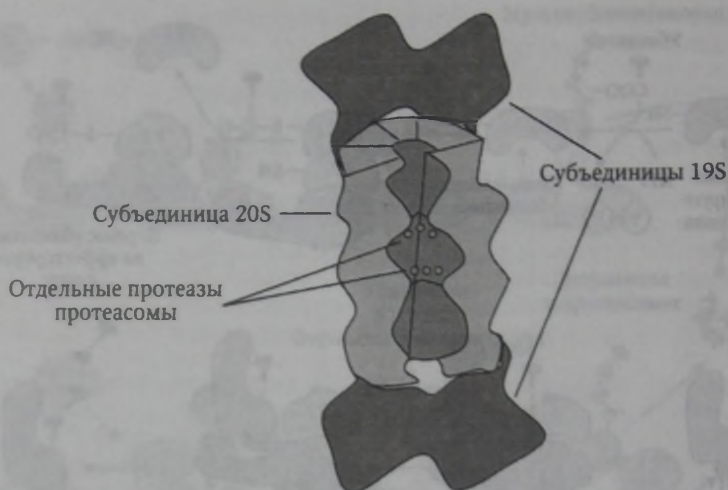


Рис. 2.19. Схема строения протеасомы (Alberts B. [et al.], 2004).

2.4. Некоторые методы изучения клеточного цикла млекопитающих

Каким образом можно определить стадию клеточного цикла, в которой находится клетка? Один способ заключается в микроскопическом наблюдении. Например, с большой вероятностью можно предполагать, что адгезивные клетки, которые имеют округлую форму и лишены отростков, находятся в митозе. Клетки в стадии цитокинеза также могут распознаваться под микроскопом. Однако клетки, находящиеся в фазе S, не могут быть распознаны под микроскопом, но визуализируются путем мечения с помощью радиоактивного ^3H -тимидина или искусственного аналога тимидина — бромдезоксисуридина (BrdU) с последующей ауторадиографией или путем выявления BrdU специфическими антителами, связанными с иммунофлуоресцентной меткой.

В типичном случае популяция клеток, которая делится быстро и асинхронно, включает 30–40 % клеток в фазе S, которые метятся импульсной меткой с ^3H -тимидином или BrdU. Зная пропорцию меченых клеток в популяции (индекс мечения), можно определить продолжительность фазы S как части от целого числа — продолжительности клеточного цикла. Аналогично, зная пропорцию клеток в митозе (митотический индекс), можно определить продолжительность фазы M. Пометив клетки импульсной меткой (^3H -тимидином или BrdU) и разрешив им продолжить цикл деления, можно определить продолжительность других фаз клеточного цикла — G2, M и G1.

Другим способом оценки стадии, в которой находится клетка в клеточном цикле, является измерение содержания ДНК, которое удваивается в фазе G2/M по сравнению с фазой G1. Этот подход значительно облегчается при использовании флуоресцентных красителей, связывающих ДНК, и проточного сортировщика, активируемого флуоресценцией, который дает возможность автома-

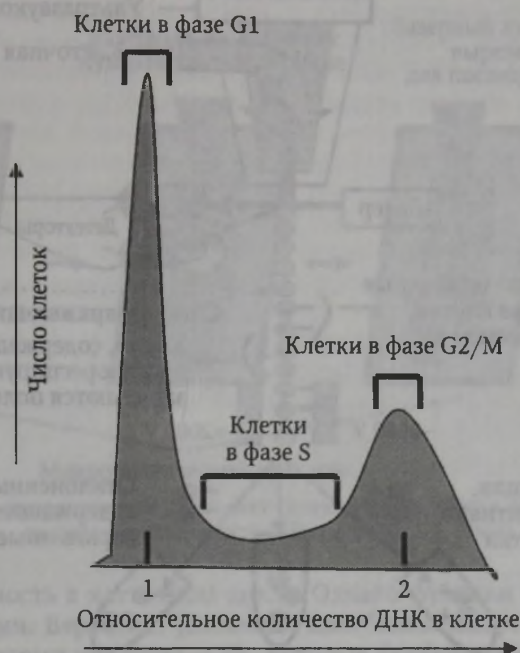


Рис. 2.20. Интенсивность флуоресценции клеточных популяций, окрашенных красителем ДНК, прямо соответствует количеству ДНК в клетках (Alberts B. [et al.], 2004)

тически анализировать большое число клеток (рис. 2.20). FACS можно также использовать для определения продолжительности фаз G1, S и G2/M, зная продолжительность всего клеточного цикла и процентное содержание клеток, которые находятся в той или иной его фазе. Количество клеток в определенной фазе цикла прямо соответствует содержанию ДНК в этих клетках, которое определяется с помощью флуоресцентной метки. Количество ДНК в клетках, находящихся в фазе G2/M, удваивается по сравнению с таковым в фазе G1, тогда как в фазе S клетки содержат промежуточное количество ДНК. Количественная оценка содержания ДНК в популяции клеток путем проточной цитометрии дает возможность быстро и эффективно исследовать распределение клеток по различным фазам клеточного цикла.

При сортировке с помощью FACS клетки, меченные красителем ДНК или антителами, связанными с флуоресцентной меткой, проходят в тонком потоке жидкости через лазерный луч, что дает возможность количественно измерить флуоресценцию каждой клетки. Вибрирующий ультразвуковой носик, через который проходит струя жидкости, преобразует ее в маленькие капли, большинство из которых содержат только одну клетку или не содержат клеток вообще (рис. 2.21). Каплям, содержащим одну клетку, автоматически придается позитивный или негативный заряд в момент их образования в зависимости от того, флуоресцирует или нет клетка, которую содержит данная капля. Затем заряженные капли отклоняются с помощью сильного электрического поля и направляются в соответствующий контейнер. Случайные конгломераты клеток, определяемые по увеличенному рассеянию света, остаются незаряженными и



Рис. 2.21. Схема автоматической сортировки клеток на основе активации сигнала специфической флуоресценцией (Alberts B. [et al.], 2004)

выбрасываются. Такие проточные анализаторы могут точно отбирать одну меченую клетку из популяции, содержащей 1000 немеченых клеток, и сортировать несколько тысяч клеток в секунду.

Изучать состояние компонентов машины клеточного цикла в отдельных клетках можно также путем точного вырезания их из тонких срезов для микроскопии. В одном из методов, который называется *лазерной связывающей микродиссекцией*, тканевый срез покрывается тонкой пластиковой пленкой и нужная область среза облучается фокусированным лучом инфракрасного лазера (рис. 2.22). Пульсовый свет расплавляет маленький кружок пленки, который связан с подлежащими клетками. Связанные с пластиком клетки удаляются вторым лазерным лучом для последующего анализа. Эта техника используется для разделения и сравнительного анализа клеток, включая характеристику белков машины клеточного цикла в клетках опухоли и окружающей опухоль нормальной ткани.

Для анализа изменения экспрессии генов, связанных с прогрессией клеточного цикла, в настоящее время широко используется одновременная оценка активности многих генов, количество которых может достигать десятков тысяч. Такой подход называется *молекулярным дисплеем*. Оценка экспрессии молекул методом молекулярного дисплея осуществляется на небольших по размеру носителях — *микрогипах*, на которые с помощью роботов наносятся десятки тысяч образцов исследуемого материала. При помощи молекулярного дисплея было найдено, что у пекарских дрожжей около 10 % всех генов периодически изме-

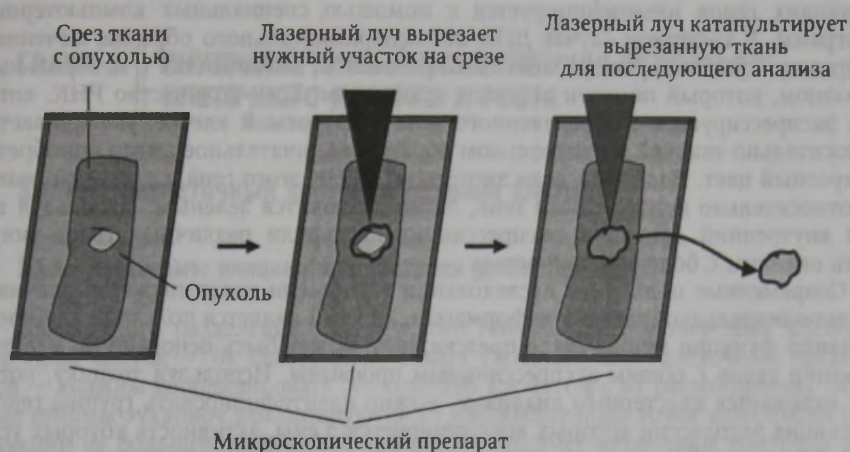


Рис. 2.22. Лазерная микродиссекция позволяет селектировать клетки из тканевых срезов для последующего анализа (Alberts B. [et al.], 2004)

няют свою активность в клеточном цикле. Однако функции многих генов остаются неизученными. Вероятно, указанные колебания экспрессии генов контролируются комплексами циклины—Cdk, которые фосфорилируют множество регуляторных белков, однако детали этого процесса остаются не ясными.

Техника молекулярного дисплея включает несколько модификаций. В качестве объектов оценки активности генов могут быть использованы ДНК, РНК или белки, а в качестве индикаторной пробы — ДНК или антитела. *Микродисплей ДНК* может быть сформирован на стандартном стекле для микроскопического анализа, на которое нанесено большое число различных фрагментов ДНК, содержащих специфические нуклеотидные последовательности множества генов. Наиболее информативные дисплеи ДНК могут содержать десятки тысяч таких фрагментов на площади в 1 см². Это создает возможности для одновременного проведения многих тысяч гибридизационных реакций. Некоторые микродисплеи формируют с использованием больших фрагментов ДНК, которые получают с помощью *полимеразной цепной реакции* (ПЦР). Фрагменты ДНК с помощью робота наносят на материал, используемый в качестве матрицы. Другие дисплеи содержат короткие олигонуклеотиды, которые синтезируются непосредственно на поверхности матрицы. В любом случае заранее известны точная последовательность и положение каждой пробы на матрице. Таким образом, любой нуклеотидный фрагмент, взятый из клетки и гибридизуемый с известной пробой на дисплее, может быть идентифицирован как продукт специфического гена путем определения положения пробы на дисплее.

При использовании микродисплея для оценки экспрессии генов из клеток сначала экстрагируется мРНК, которая затем конвертируется в ДНК (см. цв. вклейку, рис. 2.23). Затем кДНК метится флуоресцентной меткой. *Микрогип* гибридизуется с меченым образцом кДНК, затем отмывается, чтобы удалить кДНК, которая непрочно связана с матрицей, и положение каждой пробы на микрочипе определяется путем автоматического сканирования на лазерном микроскопе. Положение отдельных пятен на микрочипе и активность соответ-

ствующих генов идентифицируется с помощью специальных компьютерных программ. В типичном случае ДНК из экспериментального образца, меченная, например, красным флюоресцентным красителем, смешивается с контрольным образцом, который помечен зеленым красителем. Если количество РНК, которая экспрессируется с определенного гена в изучаемой клетке, увеличивается относительно таковой в контрольном образце, окончательное пятно приобретает красный цвет. Наоборот, если экспрессия мРНК этого гена в клетке снижается относительно контрольного гена, пятно становится зеленым. Используя такой внутренний контроль, экспрессионные профили различных генов могут быть оценены с большой точностью.

Современные подходы в исследовании экспрессии генов также обеспечивают дополнительный уровень информации, которая является полезной для предсказания функции генов. Такое предсказание может быть основано на идентификации генов с общим экспрессионным профилем. Используя технику, которая называется кластерным анализом, можно идентифицировать группы генов, регуляция экспрессии которых координируется. Гены, активность которых усиливается и ослабляется однонаправленно при множестве различных условий, вероятно, функционируют согласованно. Такие гены могут кодировать белки, которые являются частью одной и той же многокомпонентной белковой машины, или являться белками, имеющими координированную активность, участвуя, например, в репликации ДНК или сплайсинге РНК.

Литература

- Фаллер Дж. М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки : руководство для врачей ; пер. с англ. / под ред. И. Б. Збарского. — М. : БИНОМ-Пресс, 2003. — 272 с.
- Evans T., Rosenthal E. T., Youngblom J. [et al.]. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division / *Cell.*, 1983. — Vol. 33/ — P. 389–396.
- Hardwick K. G., Musacchino A. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling / *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002. — Vol. 3. — P. 731–741.
- May K. M., Hardwick K. J. The spindle checkpoint / *J. Cell. Sci.*, 2006. — Vol. 119. — P. 4139–4142.
- Morgan D. O. The cell cycle. Principles of control. — New Science Press Ltd., 2007. — 297 p.
- Murray A. W. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls / *Nature*, 1992. — Vol. 359. — P. 599–604.
- Murray A. W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited / *Cell.*, 2004. — Vol. 116. — P. 221–234.
- Nasmyth K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation / *Science*, 2002. — Vol. 297. — P. 559–565.
- Pavletich N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and CIP and Ink4 inhibitors / *J. Mol. Biol.*, 1999. — Vol. 287. — P. 821–828.
- Peters J. M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond / *Mol. Cell.*, 2002. — Vol. 9. — P. 931–943.
- Sherr C. J. Mammalian G1 cyclins / *Cell.*, 1993. — Vol. 73. — P. 1059–1065.
- Sherr C. J., Roberts J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression / *Genes Dev.*, 1999. — Vol. 13. — P. 1501–1512.
- Stein G. A. [et al.]. The molecular basis of cell cycle and growth control. — New York : Wiley-Liss, 1999. — 373 p.
- Weinberg R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control / *Cell.*, 1995. — Vol. 81. — P. 323–330.

ГЛАВА 3 || ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ И РОСТА

3.1. Внутриклеточный контроль деления клеток

3.1.1. Механизмы инициации и контроля репликации ДНК

Для точного разделения материнского генома между дочерними клетками все типы клеток — от бактерий до самых сложных многоклеточных организмов — должны координировать репликацию хромосом с их расхождением. Большие геномы эукариот реплицируются со множественных точек инициации репликации на большом количестве хромосом. Поэтому механизмы контроля репликации должны обладать большой надежностью, для того чтобы каждая точка репликации активировалась в фазе S только один раз, а удвоение каждого нуклеотида было безошибочным.

Основные компоненты репликационной машины

Первые идеи о механизмах регуляции в фазе S возникли в результате опытов, в которых производили слияние клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла. Эти опыты показали, что при слиянии двух клеток, одна из которых находится в фазе S, в ядре клетки, находившейся до слияния в фазе G1, иницируется репликация ДНК (см. цв. вклейку, рис. 3.1). Репликация ДНК опосредуется активностью S—Cdk той клетки, которая до слияния находилась в фазе S. G1- и S-фазные клетки не вызывают синтеза ДНК в их партнерской клетке, находившейся до слияния в фазе G2. На основании этих опытов возникла идея, что клетка в фазе G2, которая уже завершила репликацию ДНК, не способна к повторной репликации. Значит, для восстановления чувствительности к инициации репликации ДНК клетка должна завершить митоз и репликация ДНК может вызываться только один раз за время одного клеточного цикла.

Как уже отмечалось в главе 2, прогрессия клеточного цикла эукариотических клеток вызывается колебательными изменениями уровня циклинов, который регулируется путем их синтеза и деградации в протеасомах. Каждая фаза клеточного цикла у позвоночных вызывается специальными циклинами (см. рис. 2.10, табл. 2.1). Активность циклинов фазы S проявляется только в узком «коридоре» клеточного цикла, размер которого координируется путем взаимодействия многих регуляторных молекул, определяющих время действия Cdk в этой фазе клеточного цикла. Действие S—Cdk возможно только при условии ингибции активности киназ, иницирующих другие фазы клеточного цикла. Ключевыми S—Cdk у млекопитающих являются циклины E—Cdk2 и A—Cdk2. M—Cdk активирует комплекс APC*, иницирующий выход из митоза (рис. 3.2).

Существуют 2 формы APC*. Одна из них, содержащая Cdc20, необходима для расхождения сестринских хроматид и инициации протеолиза циклина M. Cdc20 активирует только ту APC*, которая была фосфорилирована M—Cdk, по-

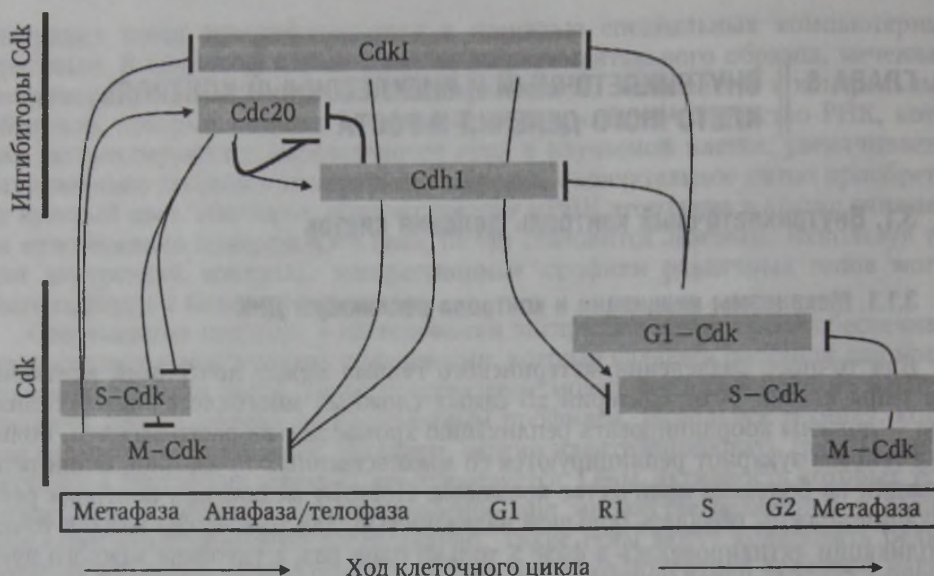


Рис. 3.2. Регуляция активности фазоспецифических Cdk в клеточном цикле. Взаимная регуляция активности Cdk позволяет каждой из них быть эффективной только на небольшом участке клеточного цикла (Diffley J. F., 2004)

этому считается, что комплекс APC*—Cdc20 облегчает собственную инактивацию путем снижения уровня циклина М. Во многих типах клеток существует другая форма APC*, которая находится в комплексе с Cdh1 и активируется после инактивации М—Cdk, зависимой от Cdc20. Комплекс APC*—Cdh1 может проявлять активность только после ингибции Cdk1, которая тормозит его действие прямым фосфорилированием. Cdh1 способствует не только протеолизу циклина М, но также активирует протеолиз Cdc20, завершая инактивацию комплекса APC*—Cdc20. В фазе G1, S—Cdk и М—Cdk поддерживаются в неактивном состоянии белками Cdh1 и Cdk1 (см. рис. 3.2). Напротив, циклины фазы G1 не являются субстратами Cdh1 и активируются в начале фазы G1 под действием митогенов. В точке R1 происходит убиквитинация и деградация Cdh1 и Cdk1 с помощью убиквитиновой лигазы SCF. Последнее обстоятельство является условием активации S—Cdk и инициации репликации.

Репликация ДНК начинается в *точках инициации репликации* (replication origin), которые находятся в различных местах хромосомы. Точки инициации репликации легко определяются у пекарских дрожжей, и понимание механизма инициации репликации пришло из опытов, выполненных на дрожжах. Машина клеточного цикла активирует репликацию только один раз за один клеточный цикл.

Анализ белков, которые связываются с точками инициации репликации у дрожжей, выявил большой многокомпонентный комплекс, известный как *комплекс, распознающий точки инициации репликации* (ORC). Этот комплекс связывается с точками инициации репликации в течение всего клеточного цикла, однако он активируется и служит как посадочная площадка для нескольких дополнительных регуляторных белков только в позднем митозе и ранней фазе G1 (рис. 3.3).

Два из множества регуляторных белков называются Cdc6 и Cdt1. Они присутствуют в низкой концентрации в течение всего клеточного цикла, но их уро-

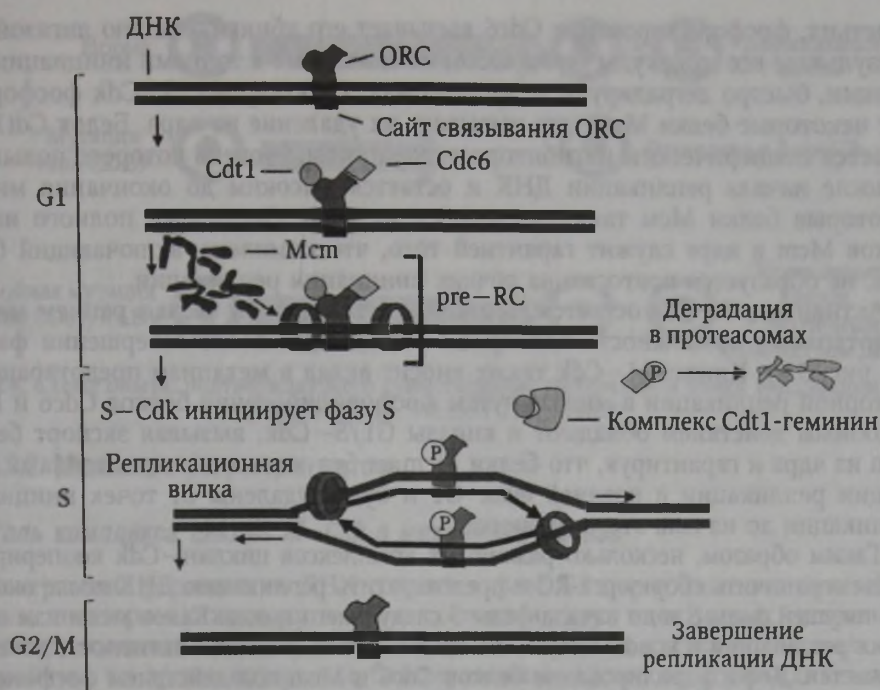


Рис. 3.3. Механизм инициации репликации ДНК (Morgan D. O., 2007)

вень повышается в начале фазы G1, способствуя взаимодействию с ORC в точках инициации репликации и облегчая формирование *пререпликационного комплекса* (pre-RC). Pre-RC включает шесть различных белков семейства Mcm (Mcm2–7), обладающих геликазной активностью. С момента образования pre-RC в фазе G1, точки инициации репликации готовы запустить весь процесс репликации. Активация S–Cdk в поздней фазе G1 является необходимым событием для репликации ДНК. S–Cdk включает активные киназные комплексы циклин E–Cdk2 и циклин A–Cdk2, которые необходимы для фосфорилирования множественных мишеней в ORC и pre-RC.

Инициация репликации нуждается также в киназе Cdc7, образующей активный комплекс с регуляторным белком Dbf4, функционально подобным циклинам. Dbf4 не только усиливает ферментную активность Cdc7, но и способствует ее связыванию с pre-RC, таким образом вызывая фосфорилирование белков Mcm. Важным регулятором сборки pre-RC является белок геминин, который связывает Cdt1 и предотвращает его взаимодействие с ORC. В фазе G1 геминин убиквитинируется APC*, что способствует сборке pre-RC с участием Cdt1. Когда APC* инактивируется в конце фазы G1, геминин накапливается и инактивирует Cdt1 до окончания митоза (см. рис. 3.3).

S–Cdk вызывает не только активацию точек инициации репликации, но также помогает предотвратить повторную репликацию, действуя на несколько мишеней. Во-первых, эта киназа способствует освобождению белка Cdc6 из ORC после начала репликации. Диссоциация Cdc6 и ORC ведет к разборке pre-RC, что предотвращает возможность повторной репликации с той же точки инициации репликации. Во-вторых, диссоциация Cdc6 и ORC предотвращает повторную сборку белков Cdc6 и Mcm в любой точке инициации репликации.

В-третьих, фосфорилирование Cdc6 вызывает его убиквитинацию лигазой SCF. В результате все молекулы белка Cdc6, не связанные с точками инициации репликации, быстро деградируют в протеасомах. В-четвертых, S-Cdk фосфорилирует некоторые белки Msm, что вызывает их удаление из ядра. Белок Cdt1 связывается специфическим ингибитором геминином, уровень которого повышается после начала репликации ДНК и остается высоким до окончания митоза. Некоторые белки Msm также удаляются из ядра. Отсутствие полного набора белков Msm в ядре служит гарантией того, что комплекс, включающий белки Msm, не образуется повторно на точках инициации репликации.

Активность S-Cdk остается высокой в течение фазы G2 и в раннем митозе, предотвращая возможность повторной репликации после завершения фазы S (см. рис. 3.2). Киназа M-Cdk также вносит вклад в механизм предотвращения повторной репликации в митозе путем фосфорилирования белков Cdc6 и Msm. Подобным действием обладают и киназы G1/S-Cdk, вызывая экспорт белков Msm из ядра и гарантируя, что белки Msm не будут связываться с точками инициации репликации в поздней фазе G1 и будут удалены от точек инициации репликации до начала этого процесса.

Таким образом, несколько различных комплексов циклин-Cdk кооперируют, чтобы ограничить сборку pre-RC и предотвратить репликацию ДНК после окончания текущей фазы S и до начала фазы S следующего цикла. Каков механизм появления репликации в новом клеточном цикле? В конце митоза активность всех Cdk снижается. Дефосфорилирование белков Cdc6 и Msm под действием фосфатаз делает возможным повторную сборку pre-RC и новый цикл репликации.

Контрольная точка репликации ДНК

Если клетка входит в митоз до окончания репликации ДНК, то она обязательно передаст своим дочерним клеткам измененный набор хромосом. Клетка избегает возникновения этого потенциально опасного нарушения путем введения контрольной точки репликации ДНК, которая гарантирует, что митоз не может иницироваться до момента, пока последний нуклеотид в геноме не будет скопирован. Механизм контрольной точки репликации определяет нереплицированную ДНК или незавершенную репликационную вилку и посылает негативные сигналы машине клеточного цикла, блокируя активацию M-Cdk. Дрожжевые клетки с мутацией гена CDC9, продукт которого участвует в репарации ДНК, в рестриктивных условиях не вступают в фазу митоза. Однако в клетках с мутациями генов CDC9 и RAD9 остановки клеточного цикла не происходит. Это свидетельствует о том, что продукт гена RAD9 участвует в работе механизма контрольной точки репликации ДНК (рис. 3.4).

Аналогично нормальные клетки, обработанные химическими ингибиторами синтеза ДНК, например дезоксимочевинной, не вступают в митоз. Однако при повреждении механизма контрольной точки S, например при обработке клеток млекопитающих большими дозами кофеина, культивируемая в среде с дезоксимочевинной клетка входит в митоз до завершения репликации ДНК, что заканчивается ее гибелью. Конечными мишенями негативных сигналов контрольной точки G2 являются ферменты, которые контролируют активацию M-Cdk. Негативные сигналы активируют белковую киназу, которая ингибирует фосфатазу Cdc25c. В результате M-Cdk остается фосфорилированной и неактивной до завершения репликации ДНК (см. цв. вклейку, рис. 3.5).

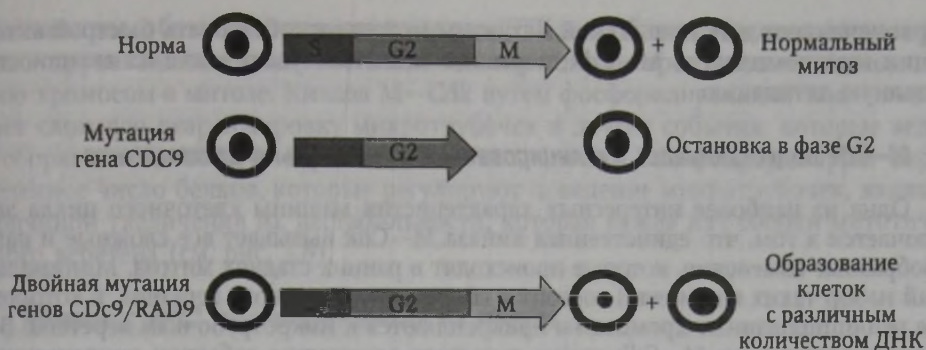


Рис. 3.4. Схема опыта, подтверждающего существование контрольной точки репликации ДНК (Hartwell L. H., Weinert T. A., 1989)

3.1.2. Механизм регуляции митоза

Роль комплекса циклин M—Cdk в механизме митоза

Завершение репликации ДНК создает в фазе G2 две точные копии полного генома, в котором каждая хромосома состоит из двух идентичных сестринских хроматид, соединенных вместе по всей длине. В фазе M клетка подвергается перестройкам, во время которых дублированные хромосомы разъединяются и распределяются поровну между двумя дочерними клетками. Митоз инициируется M—Cdk, активация которой завершается после фазы S. Активация M—Cdk начинается с накопления циклина M (циклин B — у позвоночных).

В эмбриональных клеточных циклах синтез циклина M не изменяется в клеточном цикле, а его аккумуляция является результатом снижения деградации белка в протеасомах. Однако в большинстве клеточных типов синтез циклина M увеличивается в фазах G2 и M, что первично связано с активацией транскрипции гена циклина M. Такое увеличение уровня циклина M сопровождается аккумуляцией M—Cdk (комплекс киназы Cdk1 и циклина B) во время наступления митоза (см. цв. вклейку, рис. 3.5).

Хотя Cdk1 в комплексе с циклином B фосфорилирована в сайтах активации киназой Sak, она удерживается в неактивном состоянии ингибиторным фосфорилированием киназами Wee1 и Myt1 по двум соседним сайтам. Таким образом, при достижении конца фазы G2, клетка содержит избыток M—Cdk, которая может быть активирована путем удаления двух фосфатных групп, блокирующих активность киназного сайта. Критическим событием в активации M—Cdk служит удаление фосфатных групп, репрессирующих активность M—Cdk белковой фосфатазой Cdc25c. Параллельно с активацией Cdc25c M—Cdk также фосфорилирует и супрессирует киназу Wee1, создавая условия для незамедлительной активации M—Cdk. Cdc25c активируется двумя киназами: Plk1 и M—Cdk, которые фосфорилируют Cdc25c по различным сайтам (см. цв. вклейку, рис. 3.5).

Способность M—Cdk активировать свой собственный активатор, фосфатазу Cdc25c, и ингибировать свой собственный ингибитор, киназу Wee1, предполагает, что активация M—Cdk в митозе включает позитивную обратную связь. В соответствии с этой моделью активация Cdc25c частично осуществляется киназой Plk1, что ведет к начальной активации субпопуляции M—Cdk, которая затем фосфорилирует больше молекул Cdc25c и Wee1. Это ведет к дефосфорилированию и активации большего числа молекул M—Cdk, таким образом усиливая ее

первоначальное действие. Такой механизм может способствовать быстрой активации всех комплексов М—Cdk, переводя частичное увеличение их активности в полную активацию.

М—Cdk подготавливает дублицированные хромосомы к расхождению

Одна из наиболее интересных характеристик машины клеточного цикла заключается в том, что единственная киназа М—Cdk вызывает все сложные и разнообразные изменения, которые происходят в ранних стадиях митоза. Минимальный набор таких изменений состоит в сборке митотического веретена, в котором все реплицированные хромосомы прикрепляются к микротрубочкам веретена. Во многих организмах М—Cdk также вызывает следующие события: конденсацию хромосом, разрушение ядерной оболочки, реаранжировку актинового цитоскелета, реорганизацию аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума. Активность М—Cdk в некоторых случаях может быть опосредована другими белками, например киназами семейства Auroга и киназой Plk1 (рис. 3.6).

Считается, что многие события раннего митоза вызываются специфическими структурными или регуляторными белками, которые фосфорилируются М—Cdk, хотя большинство этих белков пока не идентифицировано. Например, разрушение ядерной оболочки нуждается в разборке ядерного белкового полимера — ламина, который формирует филаменты, придающие ядерной оболочке структурную прочность. Прямое фосфорилирование ламина М—Cdk ведет к его деполимеризации, которая является важным первым шагом в разрушении ядерной мембраны. Конденсация хромосом, по-видимому, также является прямым следствием фосфорилирования киназой М—Cdk.

Комплекс из пяти белков, известных как кондексиновый комплекс, необходим для конденсации хромосом у эмбрионов лягушек *Xenopus*. После того как М—Cdk фосфорилирует несколько субъединиц в этом комплексе, две его субъ-

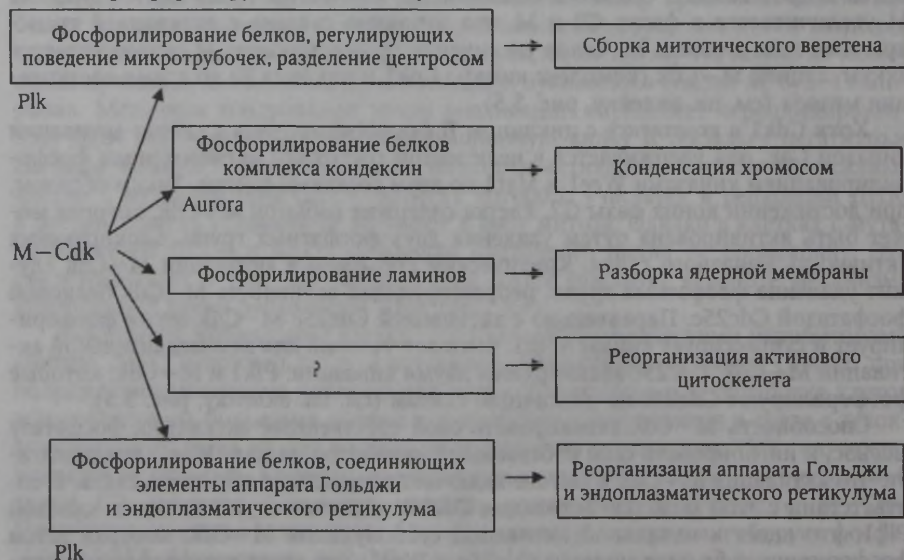


Рис. 3.6. Мишени и функции М—Cdk в регуляции митоза (Alberts B. [et al.], 2004)

единицы способны изменять скручивание ДНК в пробирке. Предполагается, что эта «скручивающая» активность аналогична той, которая вызывает конденсацию хромосом в митозе. Киназа М—Cdk путем фосфорилирования также вызывает сложную реаранжировку микротрубочек и другие события, которые ведут к сборке митотического веретена. Известно, что М—Cdk фосфорилирует определенное число белков, которые регулируют поведение микротрубочек, являясь причиной увеличения их нестабильности, которая важна для сборки митотического веретена (см. рис. 3.6).

Комплекс APC* инициирует выход из митоза

Наиболее яркое событие митоза, видимое под микроскопом, заключается в разделении сестринских хроматид во время перехода от метафазы к анафазе. Анафаза начинается с внезапного нарушения связи между сестринскими хроматидами, что разрешает им разделиться и двигаться к противоположным полюсам веретена. Хотя активность М—Cdk организует многие события, необходимые для этого перехода, не М—Cdk, а убиквитиновая лигаза APC* вызывает расхождение сестринских хроматид.

Добавление ингибитора APC* к эмбриональному экстракту лягушки *in vitro* останавливает митоз в переходе от метафазы к анафазе. Это показывает, что разделение сестринских хроматид в метафазно-анафазном переходе нуждается в протеолизе APC*. Подобная остановка клеточного цикла появляется у пекарских дрожжей с мутацией компонентов APC*. Добавление к митотическому экстракту яиц лягушки рекомбинантного циклина М, лишенного способности подвергаться деградации и поэтому конститутивно активного, вызывает остановку митоза после расхождения сестринских хроматид, свидетельствуя, что деградация циклина М является необходимой не для расхождения сестринских хроматид, а для последующего выхода клетки из митоза (рис. 3.7).

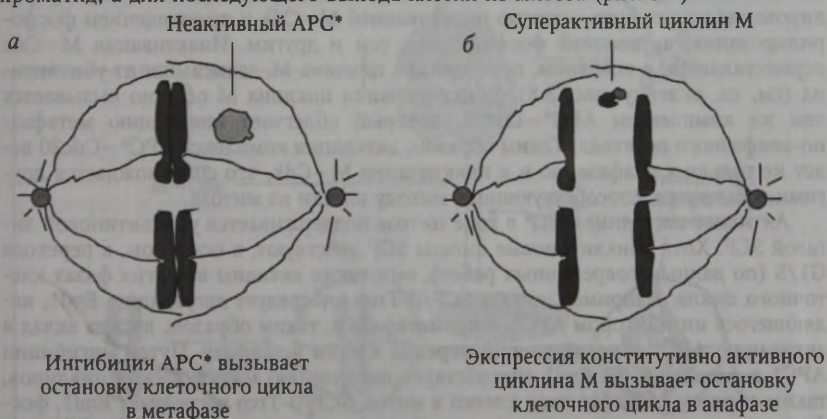


Рис. 3.7. APC* инициирует метафазно-анафазный переход:

а — добавление ингибитора APC* к эмбриональному экстракту лягушки *in vitro* останавливает митоз в метафазе; б — гиперактивный циклин М при добавлении к митотическому экстракту яиц лягушки останавливает митоз после расхождения сестринских хроматид (Holloway S. L. [et al.], 1993)

Механизм активации APC* в ходе митоза

Активация APC* происходит путем его взаимодействия с белками Cdc20 или Cdh1, которые рекрутируют субстраты к APC* (см. цв. вклейку, рис. 3.8). Два процесса регулируют активацию Cdc20 и его взаимодействие с APC*. Во-первых, синтез Cdc20 усиливается при вхождении клетки в митоз путем активации его транскрипции циклином М. Во-вторых, активация APC* происходит в результате его фосфорилирования киназой Cdk1, что помогает Cdc20 связывать APC*, таким образом, формируя активный комплекс. Кроме того, в неактивном состоянии Cdc20 связан с ингибиторным белком Emi1, который освобождается от связи с Cdc20 под действием убиквитиновой лигазы SCF. В ходе митоза APC* меняет своего партнера с Cdc20 на Cdh1, гомолог которого у дрожжей называется Hct1. Механизм этой смены заключается в том, что активная киназа М фосфорилирует Cdh1, как и Cdc20, однако фосфорилирование Cdh1 вызывает его ингибцию в противоположность Cdc20, активность которого при фосфорилировании киназой М возрастает. Поэтому комплекс APC*—Cdh1 остается неактивным до момента инактивации Cdk1 комплексом APC*—Cdc20 в конце митоза (см. цв. вклейку, рис. 3.8). Наоборот, активность комплекса APC*—Cdh1 в условиях инактивации Cdk1 увеличивается и сопровождается ингибцией активности Cdk1, что способствует выходу клетки из митоза.

Выход из митоза нуждается в инактивации М—Cdk

После расхождения хромосом к противоположным полюсам веретена клетка должна воссоздать те условия, в которых она находилась в начале митоза, т. е. демонтировать митотическое веретено, деконденсировать хромосомы и сформировать ядерную оболочку. Поскольку вход в митоз вызывается фосфорилированием различных белков, можно предположить, что дефосфорилирование тех же белков требуется для выхода из митоза. По существу, такое дефосфорилирование может быть вызвано инактивацией М—Cdk и прекращением фосфорилирования, активацией фосфатаз или тем и другим. Инактивация М—Cdk осуществляется, в основном, протеолизом циклина М, зависимым от убиквитиновой (см. цв. вклейку, рис. 3.8). Убиквитинация циклина М обычно вызывается тем же комплексом APC*—Cdc20, который облегчает инициацию метафазно-анафазного перехода. Таким образом, активация комплекса APC*—Cdc20 ведет не только к анафазе, но и к инактивации М—Cdk, что сопровождается другими событиями, способствующими выходу клетки из митоза.

Активное состояние APC* в ходе митоза поддерживается убиквитиновой лигазой SCF. Хотя убиквитиновые лигазы SCF действуют, в основном, в переходе G1/S (по данным современных работ), они также активны в других фазах клеточного цикла. Например, лигаза SCF/ β -Trcp опосредует деградацию Emi1, являющегося ингибитором APC*, в прометафазе и, таким образом, вносит вклад в активацию APC* и последующий переход клетки в анафазу. Путем ингибции APC* в фазах S и G2 Emi1 способствует накоплению митотических циклинов, таким образом облегчая вход клетки в митоз. SCF/ β -Trcp распознает Emi1, фосфорилированную по специфическим сайтам двумя киназами — Cdk1 и Plk1.

Регуляция активности SCF и APC* происходит путем взаимодействия с Cdk, а нарушение регуляции SCF и APC*, сопровождающееся активацией деления клетки, может играть важную роль в возникновении опухолей. Многие факты

показывают, что убиквитиновая лигаза SCF/Skp2, которая связывает и инактивирует Cdk1 p27^{Kip1}, фосфорилированный Cdk2, является протоонкогеном. При раке молочной железы, прямой кишки, желудка, простаты, карциноме полости рта и других опухолях отмечается повышение уровня SCF/Skp2.

Роль APC* в механизме расхождения сестринских хроматид

Участие APC* в инициации анафазы предполагает, что протеолиз играет центральную роль в этом процессе. APC* в качестве убиквитиновой лигазы участвует в разрушении нескольких регуляторных белков, действующих в митозе. Прикрепление двух сестринских хроматид к противоположным полюсам митотического веретена в начале митоза образует механические силы, стремящиеся к разделению двух сестринских хроматид. Эти тянущие силы вначале испытывают сопротивление, вызванное тем, что сестринские хроматиды тесно связаны друг с другом в их центромерах и вдоль всей длины плеч хроматид. Такое связывание сестринских хроматид опосредуется комплексом белков когезинов. Когезины имеют высокую степень гомологии с белками конденсинами, вовлеченными в конденсацию хромосом. Такая гомология предполагает, что конденсация хромосом и расхождение хроматид имеют общее эволюционное происхождение. Разделение сестринских хроматид происходит с участием белка секурина, который является мишенью APC*. До анафазы секурин связывает и ингибирует активность протеазы, которая называется сепаразой (рис. 3.9).

Разрушение секурина является результатом действия APC* в конце метафазы. Активация APC* происходит при его взаимодействии с Cdc20 и ведет к убиквитинации и деструкции секурина, который в нормальных условиях поддерживает сепаразу в неактивном состоянии. Активация сепаразы вызывает ферментативное разделение субъединиц когезивного комплекса, который в ин-

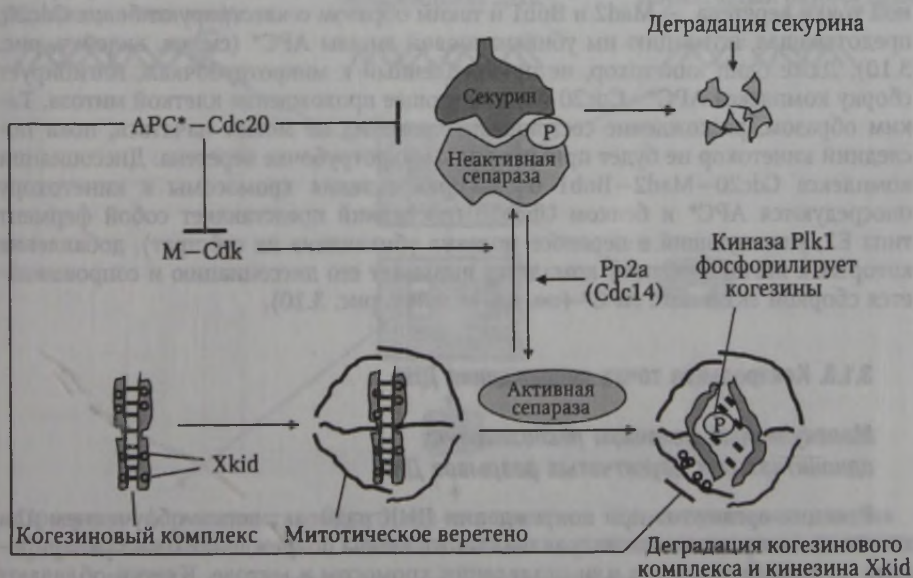


Рис. 3.9. Роль APC* в механизме расхождения сестринских хроматид (Peters J. M., 2002)

терфазе соединяет сестринские хроматиды. Кроме того, APC*—Cdc20 способствует инаktivации циклина М, таким образом предотвращая фосфорилирование и инаktivацию сепаразы. В условиях активации APC*—Cdc20 проявляется действие фосфатазы Pp2a (Cdc14 у дрожжей), которая дефосфорилирует и активирует сепаразу. APC*—Cdc20 инициирует деградацию кинезина Xkid, который способствует локализации хромосом в экваторе митотического веретена, что помогает расхождению хромосом. У пекарских дрожжей ферментативное разрезание когезина сепаразой облегчается фосфорилированием сайтов когезина, прилежащих к сайтам разрезания сепаразой, непосредственно перед началом анафазы. Это фосфорилирование опосредуется киназой Plk1 и обеспечивает дополнительный контроль метафазно-анафазного перехода.

Контрольная точка митотического веретена

В большинстве клеточных типов действует механизм контрольной точки митотического веретена, который отслеживает правильность прикрепления всех хромосом к митотическому веретену и контролирует инициацию расхождения сестринских хроматид. Эта контрольная точка основана на работе сенсорного механизма, контролирующего состояние кинетохоров — структурных образований, расположенных в центромерах хромосом, к которым прикрепляются микротрубочки веретена. Любой кинетохор, который не прикреплен к митотическому веретену, посылает негативные сигналы машине клеточного цикла, предотвращая активацию APC* и разделение сестринских хроматид (см. цв. вклейку, рис. 3.8).

Природа негативных сигналов, образуемых кинетохором, не прикрепленным к микротрубочке, стала более понятной в результате опытов, результаты которых опубликованы в последние 5 лет. Оказалось, что кинетохоры способствуют образованию комплекса Cdc20 с двумя белками, участвующими в механизме контрольной точки веретена, — Mad2 и Bub1 и таким образом секвестрируют белок Cdc20, предотвращая активацию им убиквитиновой лигазы APC* (см. цв. вклейку, рис. 3.10). Даже один кинетохор, не прикрепленный к микротрубочкам, ингибирует сборку комплекса APC*—Cdc20 и последующее прохождение клеткой митоза. Таким образом, расхождение сестринских хроматид не может начаться, пока последний кинетохор не будет прикреплен к микротрубочке веретена. Диссоциации комплекса Cdc20—Mad2—Bub1 после прикрепления хромосомы к кинетохору опосредуются APC* и белком Ubch10 (последний представляет собой фермент типа E2, участвующий в переносе молекул убиквитина на субстрат), добавление которых к ингибирующему комплексу вызывает его диссоциацию и сопровождается сборкой активного APC* (см. цв. вклейку, рис. 3.10).

3.1.3. Контрольная точка повреждения ДНК

Молекулярный механизм распознавания однонитчатых и двунитчатых разрывов ДНК

Реакция организма при повреждении ДНК радиоактивным облучением или химическими реагентами направлена на то, чтобы повреждение было репарировано до начала удвоения или разделения хромосом в митозе. Клетки обладают разнообразными механизмами для детекции и репарации поврежденной ДНК.

Если клетка не может репарировать повреждение, она активирует так называемый ответ на повреждение ДНК или *контрольную точку повреждения ДНК*. При активации контрольной точки повреждения ДНК клетка прекращает деление до репарации, при нерепарируемом повреждении — активирует апоптоз.

Машина клеточного цикла обеспечена механизмами детекции повреждения ДНК и остановки клеточного цикла в контрольных точках повреждения ДНК. Большинство клеток имеют, по крайней мере, две такие точки, одна из них находится в поздней фазе G1 и предотвращает репликацию ДНК, другая — в поздней G2 и предотвращает митоз. Контрольная точка повреждения ДНК зависит от механизма, подобного тому, который замедляет вход в митоз при неполной репликации ДНК. Повреждение ДНК распознается группой сенсорных белков, которые экспрессируются во всех эукариотических клетках и образуют несколько комплексов. Сигналы с сенсорных белков передаются киназам семейства PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase related kinases).

В клетках млекопитающих 2 киназы этого семейства играют критическую роль в передаче сигналов контрольной точки повреждения ДНК — Atm и Atr. Повреждение ДНК сопровождается фосфорилированием и вовлечением в ответ на повреждение двух других киназ — Chk1 и Chk2, опосредующих остановку клеточного цикла и активацию многих белков, участвующих в репарации ДНК (рис. 3.11). Atr и Atm вовлекают в ответ на повреждение ДНК опухолевые супрессоры p53 и pRb, опосредующие остановку клеточного цикла и активацию апоптоза. Киназа Atr опосредует ответ на различные формы повреждения ДНК, включая заторможенную репликационную вилку, повреждение нуклеотидов и двунитчатые разрывы ДНК, тогда как киназа Atm специфически опосредует ответ на двунитчатые разрывы ДНК (см. рис. 3.11).

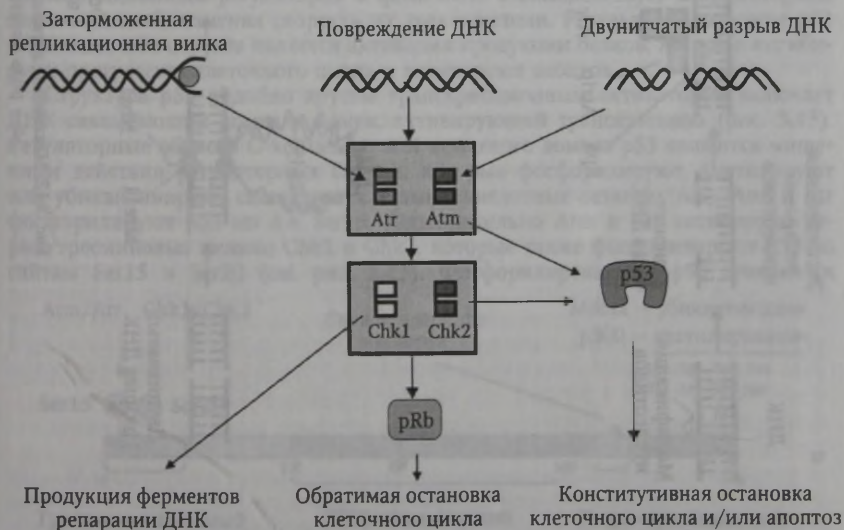


Рис. 3.11. Общая схема механизма контрольной точки повреждения ДНК (Abraham R. T., 2001)

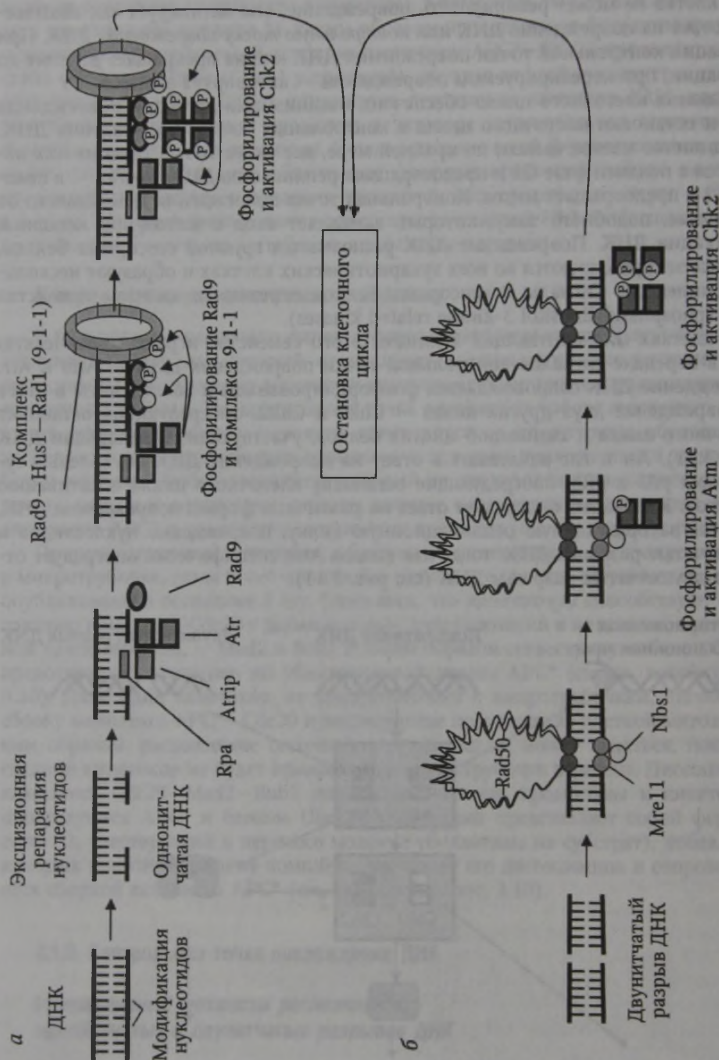


Рис. 3.12. Механизмы активации ответа клетки на повреждение одной или двух нитей ДНК:
 а — роль киназы Atr; б — роль киназы Atm (Morgan D. O., 2007)

Каким образом Atr распознает различные формы повреждения ДНК? По-видимому, Atr взаимодействует с белком Rpa, покрывающим однонитчатую ДНК. Это взаимодействие опосредовано адапторным белком Atrip (рис. 3.12, а). К 5'-концу двунитчатой ДНК, соседнему с 3'-концом однонитчатой ДНК, прикрепляется комплекс 9-1-1, состоящий из белков Rad1, Rad9 и Hus1, гомологичных по структуре и функции белку Pсna (proliferative cell nuclear antigen). Белок Pсna участвует в репликации ДНК, формируя гомотримерный комплекс, окружающий ДНК в форме кольца, которое связывает полимеразу δ с ниткой ДНК.

Белки комплекса 9-1-1, подобно Pсna, формируют гетеротримерный комплекс, окружающий ДНК и выполняющий роль контрольного скользящего кольца (checkpoint sliding clamp), служащего для активации контрольной точки поврежденной ДНК. Atr фосфорилирует белки комплекса 9-1-1, что позволяет в последующем привлекать к месту повреждения адапторный белок Rad9, который образует олигомеры и фосфорилируется при взаимодействии с Atr. Фосфорилированный Rad9 формирует сайты связывания для Chk2, которая активируется после фосфорилирования киназой Atr. Результатом активации Chk2 является остановка клеточного цикла (рис. 3.12, а). ДНК с двунитчатыми разрывами связывает комплекс MRN, включающий белки Mre11, Nbs1 и Rad50. Белок Nbs1 взаимодействует с киназой Atm, которая фосфорилируется и инициирует передачу сигналов, вызывающих остановку клеточного цикла (рис. 3.12, б).

Функциональная структура опухолевого супрессора p53

При больших повреждениях ДНК киназы Atm и Atr вовлекают в механизм ответа на повреждение опухолевый супрессор p53. Этот белок относится к транскрипционным регуляторам и физически взаимодействует с промоторами генов-мишеней, изменяя скорость их транскрипции. Результатом действия p53 в большинстве случаев является активация продукции белков, которые ингибируют прогрессию клеточного цикла и активируют апоптоз.

Структура p53 подобно другим транскрипционным активаторам включает ДНК-связывающий домен и домен, активирующий транскрипцию (рис. 3.13). Регуляторные области С-концевого и N-концевого домена p53 являются мишенями действия регуляторных белков, которые фосфорилируют, ацетилируют или убиквитинируют специфические аминокислотные остатки (AA). Atm и Atr фосфорилируют p53 по AA Ser15. Дополнительно Atm и Atr активируют серин/треониновые киназы Chk1 и Chk2, которые также фосфорилируют p53 по сайтам Ser15 и Ser20 (см. рис. 3.13). Фосфорилированный p53 становится

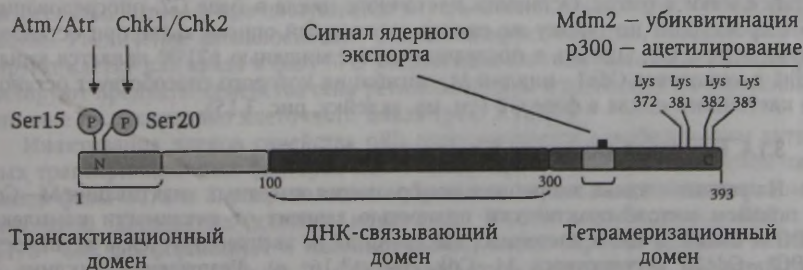


Рис. 3.13. Структура гена p53 (Morgan D. O., 2007)

устойчивым к действию специфической убиквитиновой лигазы Mdm2, накапливается и активирует $p21^{Cip1}$, вызывающий остановку клеточного цикла и апоптоз путем ингибции G1- и S-Cdk.

Основным регулятором активности p53 является убиквитиновая лигаза Mdm2, которая убиквитинирует p53, фосфорилированный по С-концевым лизинам, опосредуя его деградацию в протеасомах. При повреждении ДНК Chk2 фосфорилирует Mdm2 по Ser395, что сопровождается убиквитаинацией этой лигазы и повышением уровня p53. Активность p53 регулируется также гистоновой ацетилтрансферазой p300, ацетилирующей те же лизиновые остатки в его С-концевом домене, которые убиквитинируются Mdm2. Таким образом, p300 конкурирует с Mdm2 за взаимодействие с одними и теми же сайтами связывания и препятствует убиквитаинации p53, стабилизируя его уровень при повреждении ДНК.

Механизмы остановки клеточного цикла в фазах G1 и G2/M при повреждении ДНК

Повреждение ДНК вызывает остановку репликации, остановку клеточного цикла в фазах G1, G2 и апоптоз. Механизм этих феноменов опосредован ингибцией белков семейства Cdc25 и активацией белка p53. Остановка клеточного цикла в фазе G1 опосредуется ингибцией фосфатазы Cdc25a и активацией Cdk1 $p21^{Cip1}$ (см. цв. вклейку, рис. 3.14). В нормальных условиях Cdc25a дефосфорилирует и активирует Cdk2 в комплексе циклин Е—Cdk2, способствуя прогрессии клеточного цикла. При повреждении ДНК Chk1 и Chk2 фосфорилируют Cdc25a, что ведет к ее убиквитаинации и деградации. Chk1 и Chk2 также фосфорилируют p53 и его инактиватор — убиквитиновую лигазу Mdm2. Фосфорилирование p53 сопровождается диссоциацией комплекса p53—Mdm2, активирует p53, и наоборот, инактивирует Mdm2, которая убиквитинируется и деградирует в протеасомах. p53 транскрипционно активирует синтез $p21^{Cip1}$, который взаимодействует с активным комплексом циклин Е—Cdk2, вызывая его инактивацию и остановку клеточного цикла (см. цв. вклейку, рис. 3.14). Механизм активации апоптоза, опосредованный p53, рассматривается в главе 4.

Механизм остановки клеточного цикла в фазе G2 при повреждении ДНК опосредуется фосфорилированием, убиквитаинацией и экспортом из ядра белка Cdc25c, а также активацией белка p53 (см. цв. вклейку, рис. 3.15). В нормальных условиях фосфатаза Cdc25c дефосфорилирует и активирует Cdk1 в комплексе Cdk1—циклин М, способствуя входу клетки в митоз. Инактивация Cdc25c оставляет комплекс циклин М—Cdk1 в неактивном состоянии и препятствует входу клетки в митоз. Остановка клеточного цикла в фазе G2, опосредованная p53, происходит по такому же сценарию, который описан выше при остановке цикла в фазе G1. Однако, в последнем случае мишенью $p21^{Cip1}$ является киназа Cdk1 в комплексе Cdk1—циклин М, ингибция которого способствует остановке клеточного цикла в фазе G2 (см. цв. вклейку, рис. 3.15).

3.1.4. Регуляция инициации и прогрессии фазы G1

На ранних стадиях эмбрионального развития животных инактивация М—Cdk в позднем митозе практически полностью зависит от активности комплекса APC*—Cdc20. В таких клеточных циклах Cdh1 не экспрессируется, а активность APC*—Cdc20 регулируется М—Cdk (рис. 3.16, а). Разрушение циклина М в позднем митозе вскоре ведет к ингибции всей активности APC* в эмбриональ-



Рис. 3.16. Ингибция М—Cdk после митоза создает условия для возникновения фазы G1: а — механизм реактивации деления в ранних эмбриональных клеточных циклах; б — механизм реактивации деления в клетках, имеющих фазу G1 (Peters J. M., 2002)

ных клетках. Это является очень удобным для быстрых эмбриональных клеточных циклов, так как инактивация APC* немедленно после митоза разрешает клетке быстро начать аккумуляцию нового циклина М для следующего цикла. Однако быстрое накопление циклина М немедленно после митоза несовместимо с клеточными циклами, включающими фазу G1. В таких циклах прогрессия в последующую фазу S замедляется в фазе G1, чтобы дать возможность для роста и регуляции клетки внеклеточными сигналами (рис. 3.16, б).

Прогрессия клеточного цикла в фазе G1 осуществляется благодаря накоплению циклинов G1, которые не являются мишенями ни комплекса APC*—Cdh1, ни ингибиторов киназ фазы М. Например, у пекарских дрожжей циклины G1 не ингибируются комплексом APC*—Hct1 и ингибитором CdkI белком Sic1 (рис. 3.17). В клетках животных накопление циклинов G1 стимулируется внеклеточными митогенами, которые при поступлении внутрь клетки стимулируют ее пролиферацию. Увеличение активности G1—Cdk инициирует события, которые коммитируют клетку для входа в фазу S. В частности, в клетках животных Cdk фосфорилируют продукты семейства гена ретинобластомы и отменяют их тормозящее влияние на прогрессию клеточного цикла (рис. 3.18).

Инактивация членов семейства pRb сопровождается освобождением активных транскрипционных факторов E2f и стимулирует транскрипцию генов циклинов фазы G1/S и S, сопровождаясь образованием активных киназных комплексов. В дрожжевых клетках комплексы S—Cdk ингибируются Sic1, но G1/S—Cdk фосфорилирует и ингибирует Sic1, таким образом вызывая активацию S—Cdk. G1/S—Cdk и S—Cdk также фосфорилируют и инактивируют APC*—Hct1 (см. рис. 3.17).

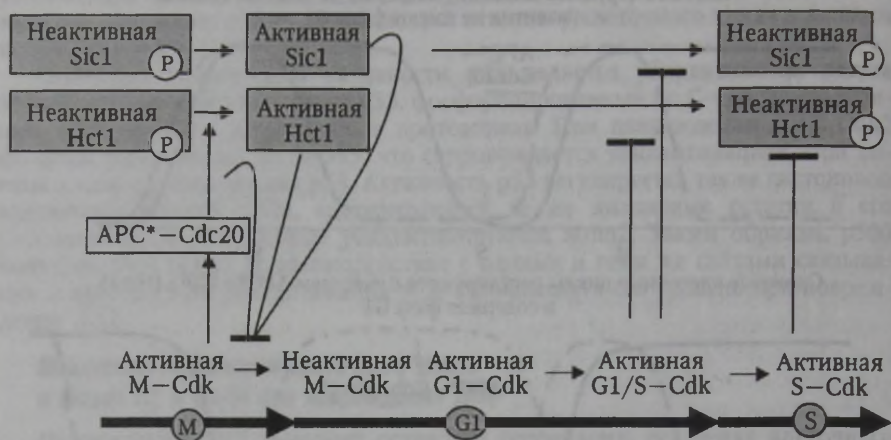


Рис. 3.17. Изменение активности различных Cdk в ходе клеточного цикла (Alberts B. [et al.], 2004)

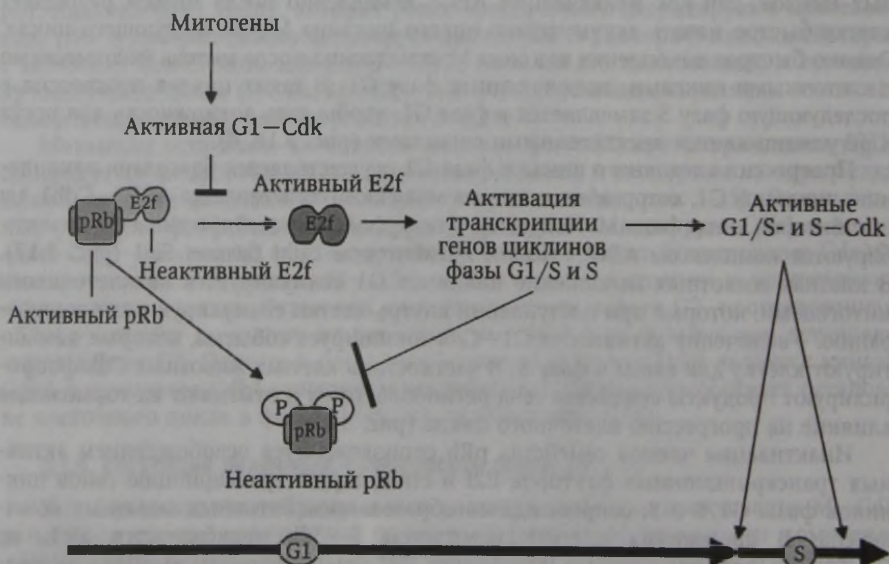


Рис. 3.18. Механизм инициации фаз G1 и S в клетках млекопитающих (Weinberg R. A., 1995)

3.2. Внеклеточный контроль деления и роста клеток

3.2.1. Регуляция деления клеток ростовыми факторами

Размер органов и всего тела, а также их реакция на внешние воздействия во многом определяются процессами клеточного роста, деления, старения, дифференцировки и смерти. Каждая из названных функций регулируется внутриклеточными сигнальными путями и внеклеточными сигнальными молекулами. Внеклеточные сигнальные молекулы, которые регулируют размеры и число клеток, обычно представляют собой растворимые секретируемые белки; белки, связанные с поверхностью клетки или компоненты внеклеточного матрикса. Ростовые факторы, которые способствуют формированию отдельных органов и организма в целом, можно разделить на факторы, вызывающие позитивную или негативную регуляцию клеточных функций (рис. 3.19).

Некоторые внеклеточные молекулы способствуют нескольким процессам, например делению, росту и выживанию клеток, тогда как другие влияют только на одну из названных функций. Одноклеточные организмы делятся с предельно возможной скоростью, которая регулируется наличием питательных веществ в окружающей среде. Клетка многоклеточного организма делится в соответствии с потребностями всего тела, т. е. для нее наличие питательных веществ в окружающей среде не является достаточным стимулом для деления. Такая клетка нуждается в получении от других клеток стимулирующих внеклеточных сигналов в форме митогенов. Действие митогенов направлено на преодоление внутриклеточных тормозных механизмов, которые тормозят ее продвижение по клеточному циклу.

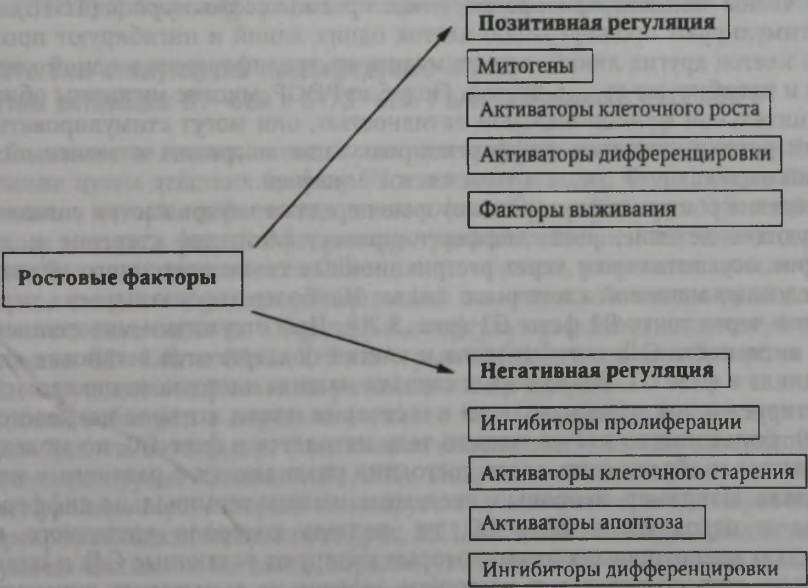


Рис. 3.19. Схема влияния ростовых факторов на различные клеточные функции

Одним из первых ростовых факторов, обладающих митогенной активностью, был *тромбоцитарный ростовой фактор* (platelet derived growth factor, PDGF). Путь к его открытию начался с наблюдения: фибробласты в культуре *in vitro* делятся в том случае, если в культуральной среде содержится сыворотка, но не плазма крови. Плазма приготавливается путем удаления клеточной части крови без активации процесса свертывания. Напротив, сыворотка представляет собой жидкую часть крови, оставшуюся после ее свертывания. В процессе свертывания крови происходит агрегация клеток, и тромбоциты, входящие в состав агрегата, при его плотном сжатии освобождают содержимое своих секреторных пузырьков. Предполагалось, что в состав таких пузырьков входит один или несколько факторов, необходимых для деления клеток *in vitro*, т. е. митогенов. Эта гипотеза позднее была подтверждена путем демонстрации, что экстракты тромбоцитов могут заменять сыворотку крови в тесте стимуляции деления фибробластов. Фактор, который вызывает деление клеток, впоследствии был очищен и назван PDGF. Физиологическая роль PDGF, который освобождается из сгустков крови в целом организме, заключается в стимуляции клеточного деления при заживлении ран.

PDGF является одним из более чем 50 белков, известных как митогены. Большинство таких белков обладают широкой специфичностью и подобно PDGF и *эпидермальному фактору роста* (EGF) могут стимулировать многие клеточные типы к делению. Например, PDGF действует на несколько клеточных типов, включая фибробласты, гладкомышечные и глиальные клетки. Подобно PDGF, EGF действует как на эпителиальные, так и на неэпителиальные клетки. Существуют митогены, которые действуют только на один клеточный тип. Например, *эритропоэтин* вызывает пролиферацию клеток-предшественников эритроцитов, но не действует на клетки других линий.

В дополнение к митогенам существуют ростовые факторы, например некоторые члены семейства *трансформирующего ростового фактора* β (TGF β), которые стимулируют пролиферацию клеток одних линий и ингибируют пролиферацию клеток других линий, или стимулируют пролиферацию в одной концентрации и ингибируют ее — в другой. Подобно PDGF, многие митогены обладают дополнительной функциональной активностью, они могут стимулировать клеточный рост, выживание, дифференцировку или миграцию в зависимости от условий окружающей среды и типа клеток-мишеней.

Действие ростовых факторов, которые передают внутрь клетки сигналы, активирующие деление, рост, дифференцировку, клеточное старение и другие функции, осуществляется через рестрикционные точки клеточного цикла, т. е. опосредовано машиной клеточного цикла. Наиболее хорошо изучена передача сигналов через точку R1 фазы G1 (рис. 3.20). При отсутствии митогенных сигналов активность Cdk ингибирована и клетки подвергаются остановке клеточного цикла в фазе G1. В некоторых случаях машина клеточного цикла частично демонтируется, и клетки находятся в состоянии покоя, которое называется фазой G0. Большинство клеток нашего тела находятся в фазе G0, но молекулярные основы и обратимость этого состояния различаются в различных клеточных типах. Например, нейроны и скелетные мышцы терминально дифференцированы и находятся в фазе G0, их система контроля клеточного цикла полностью демонтирована: гены, которые кодируют различные Cdk и циклины, стабильно супрессированы, и клеточное деление не вызывается при широком наборе воздействий, активирующих пролиферацию. Напротив, гепатоциты в

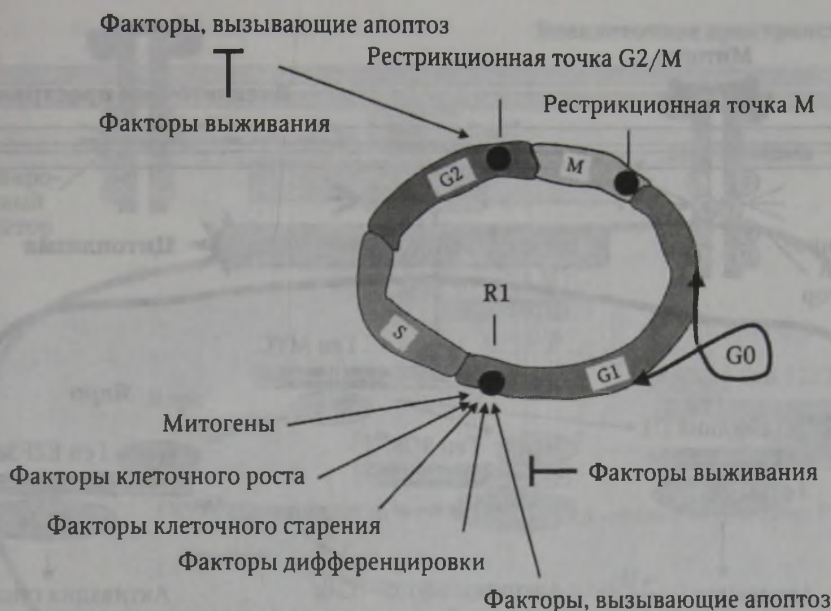


Рис. 3.20. Внеклеточная регуляция клеточных функций опосредуется через рестрикционные точки клеточного цикла

обычных условиях находятся в фазе G0, но стимулируются к делению при повреждении печени, поскольку машина их клеточного цикла находится в собранном состоянии. Другим примером клеток с неразобранной машиной клеточного цикла являются лимфоциты, для которых характерен переход из фазы G0 в состояние активной пролиферации при контакте со специфическим антигеном.

Митогены стимулируют пролиферацию клеток путем активации G1—Cdk и G1/S—Cdk. Роль сигнального пути MAPK

В большинстве клеток животных митогены контролируют скорость клеточного деления путем действия на фазу G1 клеточного цикла. Существует множество механизмов, которые действуют в течение фазы G1, супрессируя Cdk и препятствуя входу клетки в фазу S. Митогены устраняют действие негативных сигналов, которые блокируют активность Cdk и, таким образом, разрешают начало фазы S. Митогены связывают рецепторы клеточной поверхности и инициируют сложные внутриклеточные сигналы. Обязательным результатом этого является активация комплексов G1—Cdk и G1/S—Cdk, которые преодолевают ингибиторные барьеры, блокирующие в нормальных условиях вход в фазу S.

Ранним событием в передаче сигналов через митогены является активация ГТФазы Ras, что затем ведет к активации сигнального каскада, опосредованного митогенактивируемой киназой (МАРК). Индукция сигнального пути МАРК повышает уровень Мус, который активирует ход клеточного цикла через несколько перекрывающихся механизмов (рис. 3.21). В частности, Мус трансктивирует продукцию циклинов D, таким образом увеличивая активность G1—Cdk (циклин D—Cdk4/6). Мус также активирует транскрипцию гена, кодирующего один из компонентов убиквитиновой лигазы SCF^{skp2}. Это способствует деградации

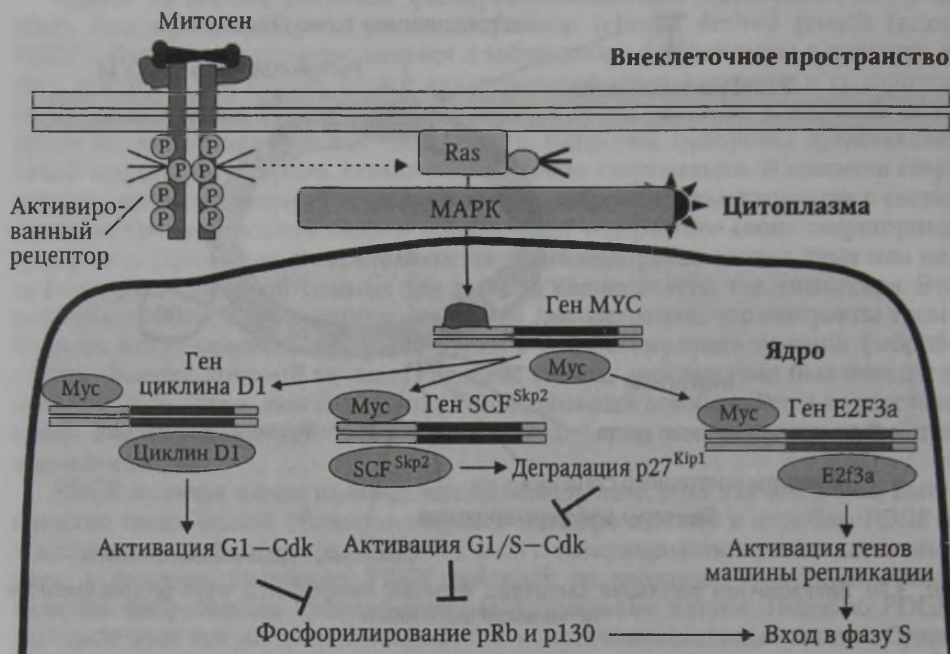


Рис. 3.21. Механизм активации клеточного деления митогенами (Zhu W. [et al.], 2005)

CdkI p27^{Kip1}, тормозящего активность G1/S-Cdk, в частности комплекса циклин E-Cdk2. Увеличение активности G1-Cdk и G1/S-Cdk стимулирует фосфорилирование белков — членов семейства pRb, в частности, самого pRb и белка p130. В гипофосфорилированном состоянии белки семейства pRb активны и связывают транскрипционные факторы семейства E2F, удерживая их в неактивном состоянии и тормозя переход клетки в фазу S. Фосфорилирование pRb и p130 сопровождается освобождением E2f и переходом клетки в фазу репликации ДНК. Дополнительно Мус является прямым транскрипционным стимулятором продукции гена E2F3a, основного активатора перехода G1/S, а также активирует транскрипцию генов, которые стимулируют клеточный рост.

Нарушение передачи пролиферативных сигналов ведет к остановке клеточного цикла или апоптозу

Многие компоненты внутриклеточных сигнальных путей кодируются протоонкогенами. Мутация, эквивалентная замене одной аминокислоты в продукте гена RAS, ведет к стабильной гиперактивации этого белка и, соответственно, к спонтанной и постоянной стимуляции сигнального пути Ras, которая в этих условиях не нуждается в действии митогенов. Подобные мутации, вызывающие сверхэкспрессию Мус, облегчают избыточный рост и пролиферацию клеток, способствуя возникновению рака.

Существуют факты, свидетельствующие, что конечным результатом экспериментальной гиперактивации Мус или Ras в нормальных клетках может быть

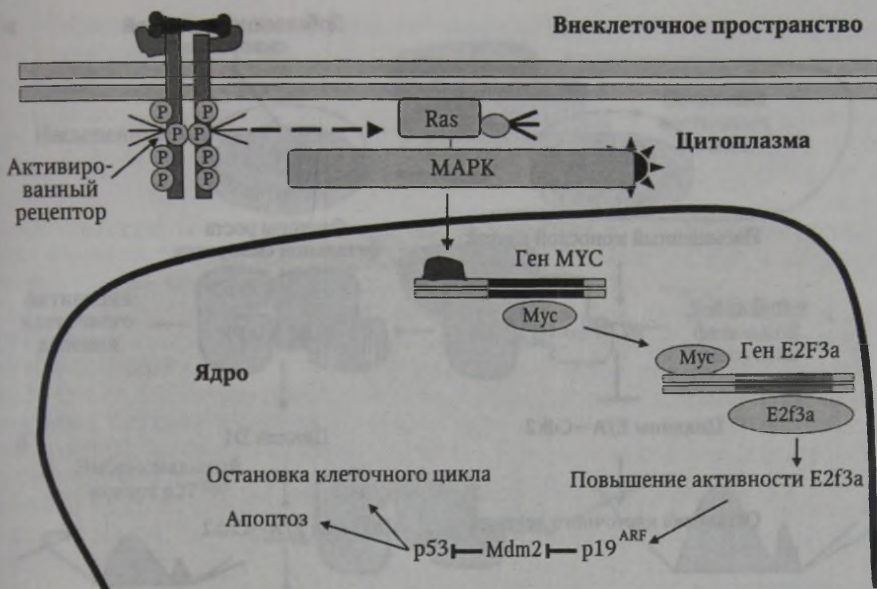


Рис. 3.22. Механизм остановки клеточного цикла и активации апоптоза гиперпролиферативными сигналами (Zhu W. [et al.], 2005)

не избыточная пролиферация, а напротив, остановка клеточного цикла, апоптоз или клеточное старение. Вероятно, в клетке существует рестрикционная точка, содержащая механизм контроля за избыточной митогенной стимуляцией. Физиологическая значимость такого механизма заключается в предотвращении избыточной пролиферации клеток с различными мутациями, облегчающими развитие опухолей. Хотя не понятно, каким образом клетка определяет избыточную митогенную стимуляцию, установлено, что такая стимуляция может сопровождаться продукцией ингибитора CdkI — белка $p19^{ARF}$, который связывает и ингибирует убиквитиную лигазу Mdm2. В свою очередь, инактивация Mdm2 ведет к увеличению уровня белка $p53$, опосредующего остановку клеточного цикла и апоптоз (рис. 3.22).

Возникает вопрос, каким образом опухолевой клетке удастся выжить в условиях существования механизмов контроля сигналов гиперпролиферации? Ответ на этот вопрос был найден и подтвержден при обнаружении мутаций в генах, продукты которых участвуют в работе механизма, контролирующего соответствующую контрольную точку, в частности мутаций в генах $p19^{ARF}$ и $p53$.

**Адгезионные клетки нуждаются в прикреплении к твердой поверхности для роста и пролиферации.
Роль фокальной адгезионной киназы (Fak)**

Большинство клеток млекопитающих в культуре *in vitro* в присутствии фетальной сыворотки прикрепляются к пластиковой поверхности, распластаются и делятся до формирования насыщенного монослоя. В этих условиях клетки занимают всю поверхность дна культурального сосуда, а соседние клетки кон-

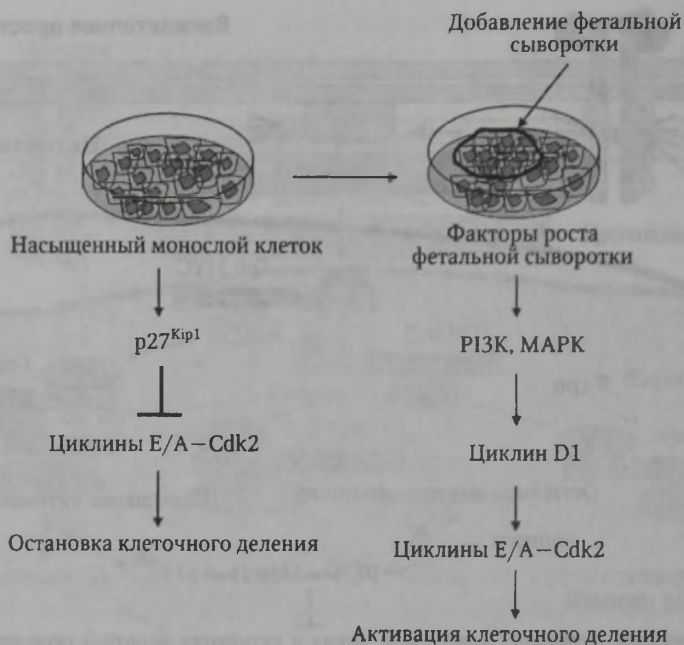


Рис. 3.23. Механизм контактной ингибиции клеточного деления (Weinberg R. A., 1995)

тактируют между собой со всех сторон. При достижении насыщающей плотности роста нормальные клетки, в отличие от опухолевых, прекращают деление. Феномен прекращения деления, вызываемый межклеточными контактами, называется *контактной ингибицией клеточного деления* (рис. 3.23). Увеличение концентрации фетальной сыворотки в культуральной среде увеличивает плотность роста клеток, при которой наступает контактная ингибиция деления, или реактивирует деление клеток, подвергшихся контактной ингибиции деления. В механизме контактной ингибиции деления ведущую роль играет усиление продукции белка $p27^{Kip1}$, тормозящего активность Cdk2. Преодоление феномена контактной ингибиции при добавлении в культуру клеток фетальной сыворотки основано на активации сигнальных путей MAPK и PI3K и накоплении активного комплекса циклинов E/A–Cdk2. При инактивации гена $p27^{Kip1}$ в эмбриональном периоде (эмбриональный нокаут) возникает стойкое повышение клеточности органов и увеличение размеров тела, что опосредовано увеличением активности комплекса циклинов E/A–Cdk2 (рис. 3.24).

Форма клетки изменяется, когда она взаимодействует с пластиковым субстратом, занимая свободное пространство на пластике и прикрепляясь к нему. Этот процесс оказывает большое влияние на клеточный рост, деление и выживание клетки. Если нормальные фибробласты или эпителиальные клетки культивировать в суспензии неприкрепленными к плотной поверхности, они принимают округлую форму, не делятся и погибают вследствие активации апоптоза. Феномен зависимости пролиферации от прилипания к твердой поверхности известен как «субстратная ингибиция пролиферации» (рис. 3.25). Если таким клеткам создать условия для прилипания к пластику, они быстро формируют

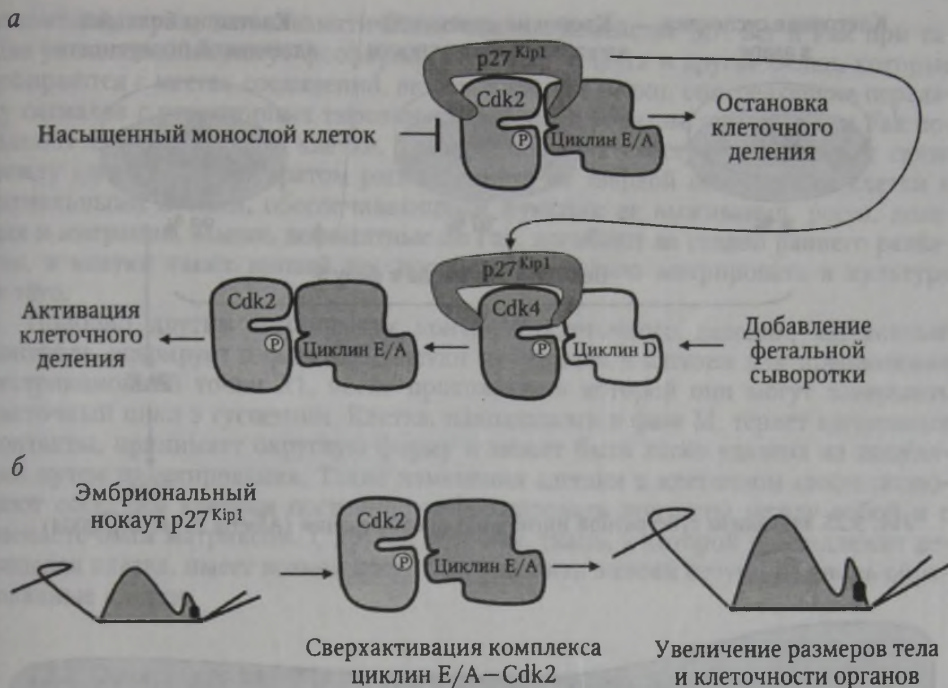


Рис. 3.24. Механизмы контактной ингибиции клеточного деления и регуляции клеточности органов:

а — в основе контактной ингибиции клеточного деления лежит повышение уровня CdkI $p27^{Kip1}$; **б** — при эмбриональном нокауте гена $p27^{Kip1}$ возникает стойкое повышение клеточности органов и увеличение размеров тела (Sherr C. J., Roberts J. M., 1999)

фокальные контакты в местах взаимодействия с твердой поверхностью, а затем начинают расти и делиться, причем скорость деления адгезивных клеток зависит от площади прикрепления к субстрату.

Каким образом ростовые и пролиферативные сигналы, продуцируемые клеткой, способствуют ее прикреплению к твердой поверхности? Фокальные контакты возникают там, где молекулы внеклеточного матрикса, такие как ламинин и фибронектин, взаимодействуют с рецепторами клеток — интегринами, связанными с актиновым цитоскелетом. Связывание молекул внеклеточного матрикса с интегринами ведет к активации локальных белковых киназ, включая *фокальную адгезионную киназу* (Fak), которая активирует внутриклеточные сигнальные пути, облегчающие выживание, рост и деление клетки (рис. 3.26).

Когда интегрины образуют кластеры в местах контактов с внеклеточным матриксом, они помогают собирать соединения типа «клетка-матрикс», так называемые фокальные адгезионные соединения. Среди многих белков, рекрутированных в эти соединения, есть киназы Fak, которые опосредуют передачу сигналов от интегриновых рецепторов в ядро клетки. Взаимодействие между Fak и интегриновым рецептором опосредуется белками талином и паксилином, причем белок талин связывает β -субъединицу, а паксинин — α -субъединицу интегрин. Собранные в кластеры, различные молекулы комплекса Fak перекрестно фосфорилируют друг друга, создавая фосфотирозиновые сайты, с которыми

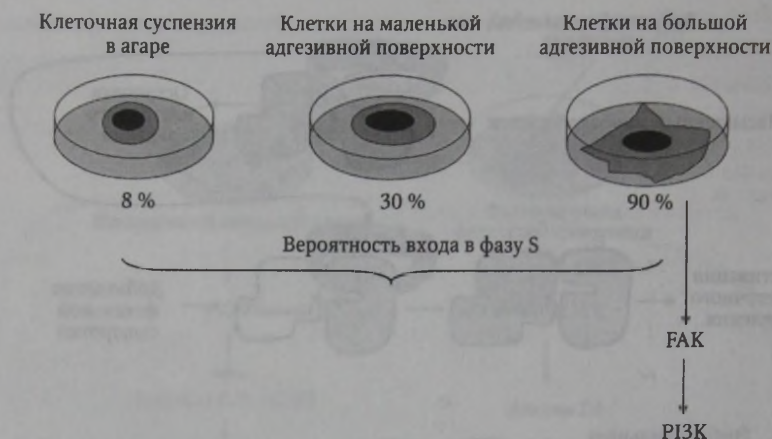


Рис. 3.25. Механизм субстратной ингибиции пролиферации (Alberts B. [et al.], 2004)

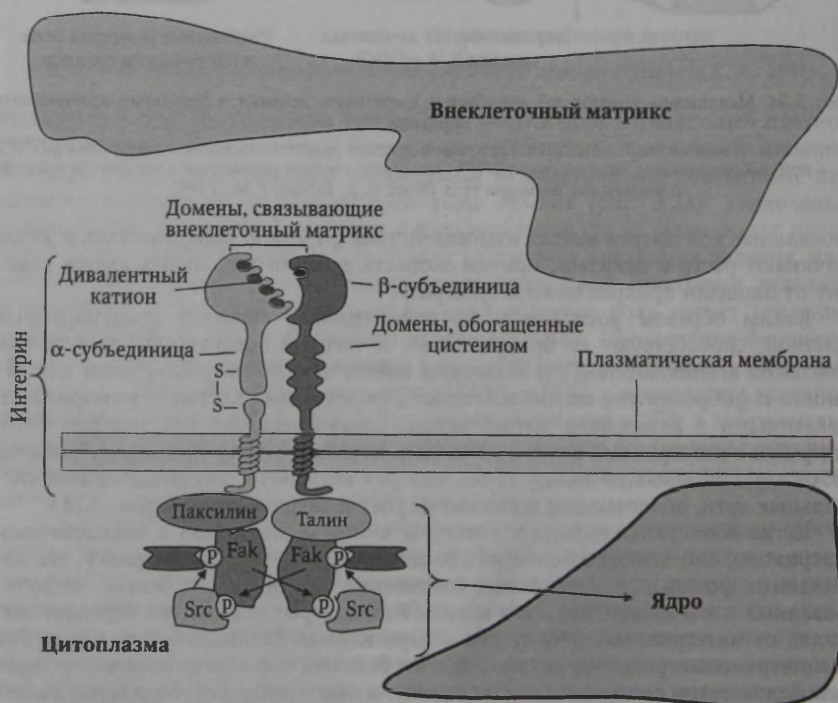


Рис. 3.26. Сигнальный путь фокальной адгезионной киназы (Alberts B. [et al.], 2004)

взаимодействуют цитоплазматические киназы семейства Src. Src и Fak при таком расположении могут фосфорилировать друг друга и другие белки, которые собираются с местх соединений, включая многие белки, опосредующие передачу сигналов с рецепторных тирозинкиназ. Таким образом, киназы Src и Fak посылают сигналы в ядро клетки, прикрепленной к субстрату, формируя связи между адгезивным аппаратом распластанной на твердой поверхности клетки и сигнальными путями, обеспечивающими функции ее выживания, роста, деления и миграции. Мыши, дефицитные по Fak, погибают на стадии раннего развития, а клетки таких мышей не способны нормально мигрировать в культуре *in vitro*.

Подобно другим механизмам контроля клеточного деления, адгезивный контроль оперирует в фазе G1. Клетки нуждаются в адгезии для преодоления рестрикционной точки R1, после прохождения которой они могут завершить клеточный цикл в суспензии. Клетка, находящаяся в фазе M, теряет адгезивные контакты, принимает округлую форму и может быть легко удалена из популяции путем пипетирования. Такие изменения адгезии в клеточном цикле позволяют соседним клеткам постоянно реформировать контакты между собой и с внеклеточным матриксом. С другой стороны, ткань, к которой принадлежит делящаяся клетка, имеет возможность распределить в своей структуре вновь образованные клетки.

3.2.2. Стимуляция клеточного роста ростовыми факторами

Рост целого организма или отдельного органа зависит от клеточного роста. Клеточное деление само по себе не может увеличить тотальную клеточную массу. В одноклеточных организмах, таких как дрожжи, для клеточного роста необходимы только питательные вещества. У многоклеточных животных, наоборот, клеточный рост и клеточное деление зависят от сигналов других клеток. Внеклеточные ростовые факторы, которые стимулируют клеточный рост, связывают рецепторы на клеточной поверхности и активируют внутриклеточные сигнальные пути. В результате передачи сигналов накапливаются белки и другие макромолекулы, в основе чего лежит увеличение скорости синтеза и уменьшение скорости деградации молекул.

Один из наиболее важных внутриклеточных сигнальных путей, активируемых рецепторами ростовых факторов, включает киназу R13k, которая способствует активации нескольких белковых киназ, например киназы S6. Фосфорилирование киназы S6 опосредуется киназой Pdk1. Киназа S6 фосфорилирует рибосомальный белок S6, активируя способность рибосом транслировать несколько различных мРНК, большинство из которых кодируют рибосомальные компоненты. Таким образом, происходит активация белкового синтеза. При инактивации гена, кодирующего киназу S6 у дрозофилы, мутантные мухи имеют маленький размер при нормальном количестве клеток. Факторы роста клеток также активируют фактор инициации трансляции eif4e, способствующий белковому синтезу (рис. 3.27).

Продукт протоонкогена MYC действует на различные клеточные функции, в том числе активирует транскрипцию некоторых генов, которые кодируют белки, включенные в регуляцию клеточного метаболизма и синтеза макромолекул. Таким способом MYC стимулирует как обмен, так и рост клеток. Ростовый фак-

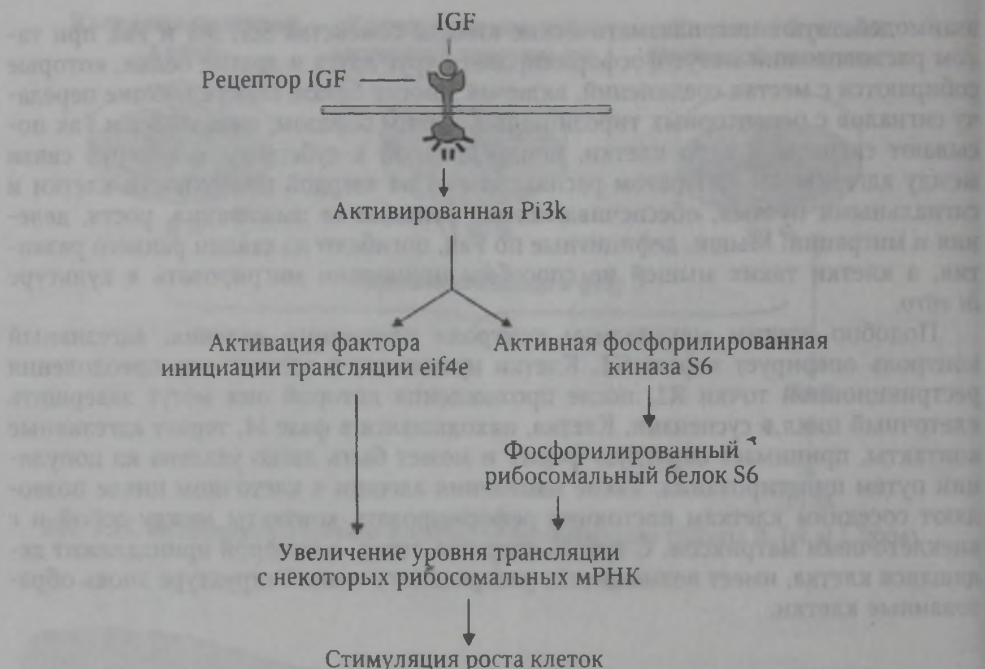


Рис. 3.27. Активация синтеза белка и роста клеток факторами роста (Alberts B. [et al.], 2004)

тор PDGF и протоонкоген RAS стимулируют как клеточный рост, так и деление клеток. Некоторые внеклеточные сигнальные белки, например *фактор роста нервов* (NGF), стимулируют только клеточный рост. Размер симпатических нейронов, которые конститутивно находятся в фазе G₀, напрямую зависит от количества NGF, секретируемого клеткой-мишенью, которую он иннервирует.

Литература

- Красильников М. А. Сигнальные пути, регулируемые фосфатидилинозит-3-киназой, и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток / Биохимия, 2000. — Т. 65. — С. 68–78.
- Татосян А. Г., Мизенина О. А. Киназы семейства SRC: структура и функции / Биохимия, 2000. — Т. 65. — С. 57–67.
- Abraham R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases / Genes Dev., 2001. — Vol. 15. — P. 2177–2196.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. [et al.]. Molecular Biology of the Cell. Garland Science.— New York : Fourth Ed., 2004. — 1463 p.
- Aleem E., Berthet C., Kaldis P. Cdk2 as a master of S phase entry / Cell cycle, 2004. — Vol. 3. — P. 135–137.
- Morgan D. O. The cell cycle. Principles of control. — London : New Science Press Ltd., 2007. — 297 p.
- Musacchino A., Hardwick K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signaling / Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2002. — Vol. 3. — P. 731–741.
- Diffley J. F., Labib K. The chromosome replication cycle / J. Cell. Sci., 2002. — Vol. 115. — P. 869–872.
- Diffley J. F. Regulation of early events in chromosome replication / Curr. Biol., 2004. — Vol. 14. — P. 778–786.
- Hartwell L. H., Weinert T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events / Science, 1989. — Vol. 246. — P. 629–634.

- Holloway S. L., Glotzer M., King R. W. [et al.]. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor / *Cell.*, 1993. — Vol. 73. — P. 1393–1402.
- Krylov D. M., Nasmyth K., Koonin E. V. Evolution of eukaryotic cell cycle regulation: stepwise addition of regulatory kinases and late advent of the CDKs / *Curr. Biol.*, 2003. — Vol. 13. — P. 173–177.
- Malumbres M. Mammalian cell cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6 / *Cell.*, 2004. — Vol. 118. — P. 493–504.
- May K. M., Hardwick K. J. The spindle checkpoint / *J. Cell. Sci.*, 2006. — Vol. 119. — P. 4139–4142.
- Mimura S., Seki T., Tanaka S. [et al.]. Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control / *Nature*, 2004. — Vol. 431. — P. 1118–1123.
- Murray A. W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited / *Cell.*, 2004. — Vol. 116. — P. 221–234.
- Nasmyth K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation / *Science*, 2002. — Vol. 297. — P. 559–565.
- Neel B. J., Tonks N. K. Protein tyrosine phosphatase in signal transduction / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1997. — Vol. 9. — P. 193–204.
- Peters J. M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond / *Mol. Cell.*, 2002. — Vol. 9. — P. 931–943.
- Peters J. M. The checkpoint brake relieved / *Nature*, 2007. — Vol. 446. — P. 868–869.
- Sherr C. J., Roberts J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression / *Genes Dev.*, 1999. — Vol. 13. — P. 1501–1512.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A. Surfing the 53 network / *Nature*, 2000. — Vol. 408. — P. 307–310.
- Weinberg R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control / *Cell.*, 1995. — Vol. 81. — P. 323–330.
- Zhu W., Giangrande P. H., Nevins J. R. Temporal control of cell cycle gene expression mediated by E2F transcription factors / *Cell. Cycle*, 2005. — Vol. 4. — P. 633–636.

ГЛАВА 4 || РОЛЬ СЕМЕЙСТВА ПРОДУКТА ГЕНА РЕТИНОБЛАСТОМЫ В КОНТРОЛЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АПОПТОЗА В СОМАТИЧЕСКИХ И СТЕВЛОВЫХ КЛЕТКАХ

4.1. Клонирование гена ретинобластомы (RB), общая и функциональная структура продукта гена ретинобластомы (pRb) и членов его семейства

Двушаговая гипотеза возникновения рака по А. Кнудсону

В 1971 г. в журнале Национальной академии наук США (PNAS) был опубликован анализ родословных больных ретинобластомой, наиболее часто встречающейся опухолью сетчатки глаз у детей раннего возраста. Автор публикации доктор А. Кнудсон подразделил все опухоли этого типа на билатеральные и монологатеральные (рис. 4.1).

Билатеральные ретинобластомы имеют очевидный наследственный характер, и у их носителей часто возникают опухоли другой локализации, в частности, остеосаркомы и меланомы. Наследуемая форма опухоли также характеризуется возникновением в раннем возрасте и множественными очагами роста.

В противоположность наследуемым формам заболевания, ненаследуемая форма ретинобластомы появляется в более зрелом возрасте в форме одного опухолевого очага роста только в одном глазу, то есть является монологатеральной. Больные с монологатеральной ретинобластомой исключительно редко оказываются носителями опухоли другой локализации.

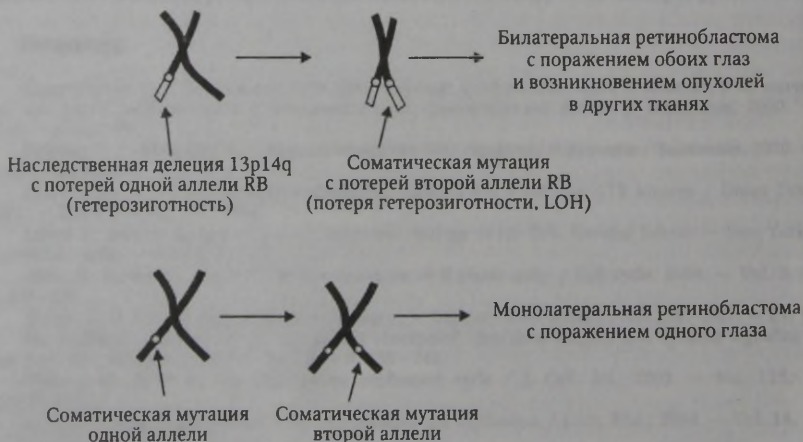


Рис. 4.1. Двушаговая гипотеза возникновения ретинобластомы по А. Кнудсону
(Knudson A. G., 1971)

А. Кнудсон предположил, что причиной билатеральной ретинобластомы является сочетание наследственной мутации в одной аллели гена, который был условно назван «геном чувствительности к ретинобластоме», с приобретенной мутацией во второй аллели этого гена. Причиной монолатеральной ретинобластомы является возникновение двух независимых соматических мутаций в разных аллелях одного и того же гена.

Чувствительность к наследуемой ретинобластоме передается потомству как аутосомально-доминантная черта с 90 % проявляемостью (пенетрантностью). Ретинобластома была использована в качестве модели генетического предрасположения к возникновению рака, причиной которого является мутация гена, кодирующего белок, способный подавлять рост опухоли, т. е. опухолевого супрессора. Генетический локус, определяющий чувствительность к возникновению ретинобластомы, был найден при цитогенетической оценке делеций в банде 14 (q14) хромосомы 13 человека, который располагается за геном фермента эстеразы D. Физическая связь этих локусов была подтверждена родословной больных ретинобластомой. Последующие наблюдения показали, что локус RB повреждается и при ненаследуемых формах ретинобластом, о чем свидетельствуют частые нарушения структуры хромосомы 13 и сниженная активность эстеразы D при таких заболеваниях.

Клонирование гена ретинобластомы

Ген ретинобластомы был первым геном опухолевой супрессии, который удалось клонировать. Трудность решения подобной задачи заключалась в том, что фенотипически, при заболеваниях или в эксперименте, гены опухолевой супрессии могут быть выявлены только по снижению или отсутствию функциональной активности. В противоположность, протоонкогены выявляются в клинических или экспериментальных условиях по эффекту гиперфункции при, соответственно, амплификации гена или его гиперактивации, вызванной естественными мутациями у больных или трансфекцией гена в клетки в эксперименте. RB, кодирующий мРНК размером 4,6 кб (килобаз), был клонирован благодаря своему свойству передавать чувствительность к ретинобластоме, в частности, путем одновременной оценки нескольких характеристик: хромосомной локализации гена, эффекта его гомозиготной мутации и специфического нарушения экспрессии при опухолях.

Учитывая важность RB как нового типа гена, ассоциированного с развитием опухолей, была предпринята попытка его изоляции путем метода «прогулки по хромосоме», используя маркеры хромосомы 13. Поскольку у продукте RB ничего не было известно, ген-кандидат мог быть найден по хромосомному расположению локуса, в котором располагался ген, характеризующийся рецессивным типом наследования. Это означает, что нормальный RB должен экспрессироваться в нормальной ткани ретины, но не в ткани ретинобластомы. При клонировании в качестве начальной точки гибридизации ДНК был использован ген, кодирующий эстеразу D, который связан с локусом RB в банде 13q14 (рис. 4.2).

На выбранной для анализа протяженности хромосомы 13 в 1500 кб в качестве пробы для изоляции геномных клонов RB был использован клон CL-22, содержащий С-концевой участок гена эстеразы D, который, предположительно, мог гибридизоваться с клоном из геномной библиотеки, содержащим N-концевой участок RB. В свою очередь, С-концевые фрагменты отобранных при гиб-

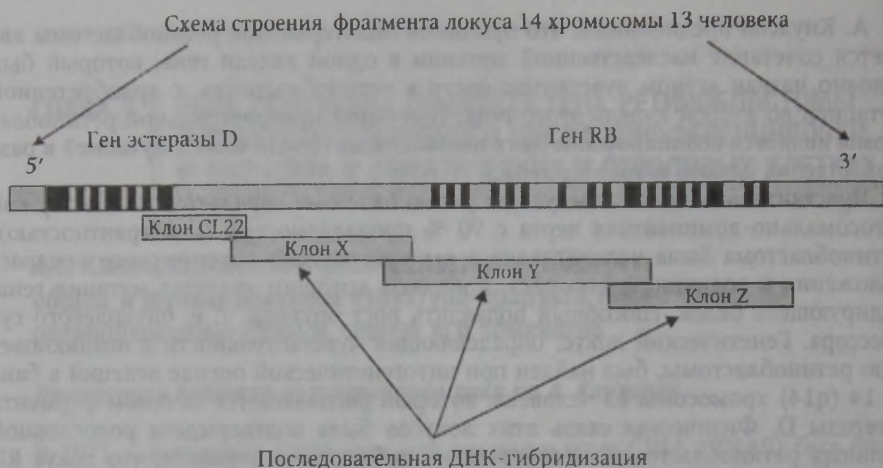


Рис. 4.2. Схема клонирования гена ретинобластомы методом «прогулки по хромосоме» (Lee W. H. [et al.], 1987)

ридизации геномных клонов ДНК могли быть использованы для изоляции полной геномной последовательности RB. Такая тактика оказалась успешной. В области 350 кб за 3'-концом гена эстеразы D был найден уникальный фрагмент ДНК, который гибридизовался с двумя перекрывающимися клонами, полученными из библиотек кДНК нормальной плаценты человека. Найденная последовательность ДНК — кандидат на роль RB, была использована в качестве пробы для гибридизационного анализа мРНК с целью определения соответствующих транскриптов мРНК в различных тканях. Для этого РНК получали из ткани сетчатой оболочки глаза плода человека, плаценты человека, ткани ретинобластом и опухолей другой локализации. Кандидатный ген RB гибридизовался с 4,6 кб мРНК, полученной из нормальной сетчатой оболочки глаза плода или ткани плаценты. Напротив, гибридизация с мРНК ткани сетчатки, полученной от пациентов с ретинобластомой, не выявляла специфических транскриптов или выявляла транскрипты уменьшенных размеров (рис. 4.3).

Анализ последовательности клонированной ДНК методом термации с помощью дидезоксинуклеотидов по Сэнджеру (Sanger F. [et al.], 1977) позволил установить полную последовательность кДНК RB (см. цв. вклейку, рис. 4.4). Такой метод секвенирования основан на следующих подходах:

- 1) использование специфических праймеров для считывания последовательности ДНК полимеразой;
- 2) использование специфических дидезоксинуклеотидов (ddNTP) для остановки полимеризации ДНК;
- 3) использование полиакриламидного геля для выявления различий в длине фрагментов ДНК, отличающихся на один нуклеотид.

Дидезоксинуклеотиды (2', 3' ddNTP) отличаются от обычных dNTP тем, что у них отсутствует гидроксильный остаток в положении 3' дезоксирибозы. Дидезоксинуклеотиды могут встраиваться при полимеризации ДНК в ее растущую цепочку через 5' трифосфатную группу. Однако из-за отсутствия гидроксильного остатка в положении 3' нарушается образование фосфодиэфирной связи с последующим dNTP и рост цепи ДНК останавливается (см. цв. вклейку, рис. 4.4).

Показатель	Плациента	Нормальная сетчатка	Образцы опухолей сетчатки						Медуллобластома	Нейробластома
			1	2	3	4	5	6		
Размер мРНК, кб	4,6	4,6	4,0	4,0	4,0	4,5	Нет	Нет	4,6	4,6
— — — —	—	—	—	—	—	—			—	—
РНК тестируемой ткани, гибридизирующаяся с клонированной кДНК гена RB										

Рис. 4.3. Гибридизационный анализ экспрессии продукта гена ретинобластомы. Результаты гибридизационного анализа, характеризующие продукцию мРНК RB в нормальных и опухолевых тканях (Lee W. H. [et al.], 1987)

Полная последовательность RB содержит около 4500 нуклеотидов с коротким поли-(A) хвостом и сигнальной последовательностью полиаденилирования (AATAA) на 3'-конце. Открытая рамка считывания RB включает 2784 оснований, а трансляция от первого метионинового кодона формирует белок, состоящий из 928 AA с ММ 105 кДа (см. цв. вклейку, рис. 4.5).

Общая и функциональная структура pRb

Структура pRb включает несколько доменов, функции которых заключаются в связывании и ингибировании активности функционально различных клеточных белков, в частности белков, регулирующих ход клеточного цикла. Первым доменом, найденным в структуре pRb, был так называемый «малый карман», или «покет», поэтому белки с подобным доменом называются «покетными» белками. Область кармана pRb включает домены A и B (см. цв. вклейку, рис. 4.5, а).

В последующих исследованиях было обнаружено, что с областью «малого кармана» физически связываются белки ДНК-овых опухолевых вирусов, в частности большой Т-антиген вируса SV-40, белок E1a аденовируса и белок E7 вируса папилломы человека (HPV). Трансформирующая активность таких вирусов связана со способностью продуцируемых ими онкогенных белков физически взаимодействовать с pRb. Онкогенные белки могут вызывать переход покоящихся клеток в фазу S путем смещения внутриклеточных белков, связывающих pRb в области «кармана». Установлено, что в нормальных клетках прогрессия клеточного цикла требует циклического фосфорилирования pRb киназами Cdk. Фосфорилирование pRb также ведет к освобождению клеточных белков, подобных транскрипционным факторам семейства E2F, которые связывают область «кармана» A/B.

Полноразмерный pRb содержит несколько различных доменов:

- 1) аминоконцевой домен N (1–379 AA);
- 2) район «малого кармана», включающий домены A (379–572 AA) и B (646–772 AA);
- 3) домен-вставку, или спейсер (572–646 AA);
- 4) С-концевой домен (772–928 AA).

В структуре pRb выделяют также область «большого кармана», включающую последовательность 379–869 AA, который был идентифицирован на основании свойства опосредовать взаимодействие pRb с транскрипционными факторами семейства E2F. С-концевой домен pRb обладает способностью связывать протоонкоген c-ABL, а последовательность «большого кармана» — циклины D и транскрипционные факторы семейства E2F. Домен C функционирует независимо от домена, включающего область «малого кармана». pRb может одновременно связывать вирусные онкопротеины и белок c-Abl.

Активность c-Abl, как и pRb, регулируется в клеточном цикле. Cdk снижает его ДНК-связывающую активность. В фазе G0/G1 киназа c-Abl связана с областью «кармана» pRb и ее тирозинкиназная активность не определяется. По мере прогрессии клеточного цикла pRb фосфорилируется, c-Abl освобождается и приобретает способность фосфорилировать тирозиновые остатки С-концевого домена (CTD) РНК-полимеразы II. Фосфорилирование CTD коррелирует с переключением полимеразы II со стадии инициации на стадию элонгации транскрипции. В соответствии с гипотезой «матрицы» разные домены pRb одновременно связывают функционально различные молекулы, создавая им условия для взаимодействия между собой *in situ* и таким образом регулируя прогрессию клеточного цикла. Нарушение связывания с pRb одной из взаимодействующих молекул может приводить к полной функциональной инактивации pRb (рис. 4.6).

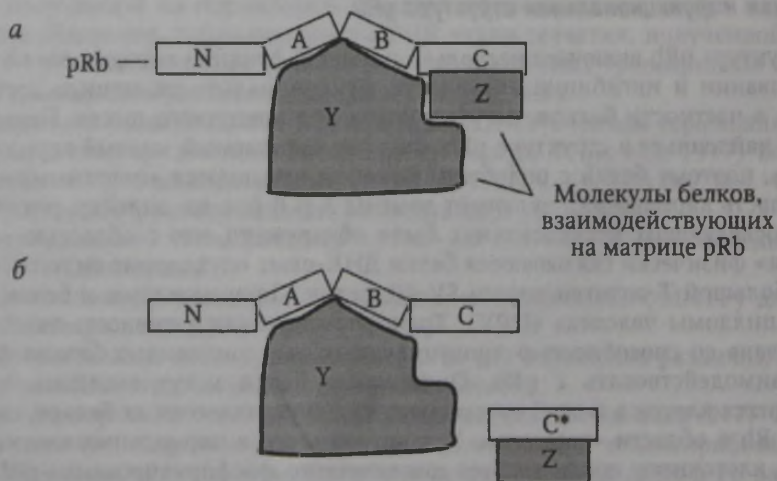


Рис. 4.6. Модель, рассматривающая pRb как матрицу для взаимодействия функционально различных молекул (Welch P. J., Wang J. Y. J., 1995):

N, A, B, C — домены pRb; C* — полипептид, гомологичный по первичной структуре домену C pRb

Рентгеновский анализ структуры pRb

Взаимодействие pRb с онкобелками E7 вируса папилломы человека (HPV), E1a аденовируса, и большим Т-антигеном вируса SV-40 необходимо для трансформации клетки и опосредовано мотивом LxCxE (лейцин-цистеин-глутаминовая кислота) в структуре онкогенных белков. Для рентгеноструктурного анализа pRb был сконструирован белок с ММ 45 кДа, состоящий из доменов А и В молекулы pRb, но лишенный области спейсера. Этот белок был кокристаллизован с 9-аминокислотным пептидом, включающим мотив LxCxE, с последовательностью, идентичной таковой в консервативном домене 2 (CR2) онкобелка E7 HPV. Домены А и В pRb содержат так называемую циклиновую укладку, представляющую собой мотив, состоящий из 5 α -спиралей (см. цв. вклейку, рис. 4.5, б). Этот мотив присутствует также в структуре циклинов и базального транскрипционного фактора TFIIB, входящего в состав РНК-полимеразы II. Пептид E7 в развернутой конформации связывает мелкую бороздку в домене В молекулы pRb. Интерфейс между доменами А и В молекулы pRb занимает большое пространство и может рассматриваться как составная часть структуры «кармана». Этот интерфейс имеет гидрофобную основу, которая является продолжением гидрофобной основы домена В, предполагая, что домен В нуждается в интерфейсе А–В для стабильной конформации своей структуры.

Циклиновая укладка (фолдинг) молекулы pRb состоит из узла, включающего три основные спирали в его основании и две дополнительные спирали, упакованные по разным сторонам узла, что в сумме создает мотив, состоящий из 5 основных α -спиралей в каждом домене ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ в домене А и $\alpha 11$, $\alpha 12$, $\alpha 14$, $\alpha 15$, $\alpha 17$ в домене В). Дополнительные 8 спиралей, β -шпилька и длинный «хвост» области «кармана» pRb служат для формирования интерфейса А–В ($\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 13$) сайта, связывающего LxCxE ($\alpha 16$, β -шпилька, $\alpha 18$), и внешней конформации циклиновых упаковок А и В ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, «хвост»). Интерфейс между доменами А и В формируется при упаковке частей семи спиралей (трех из домена А и четырех из домена В) и включает область, скрытую внутри молекулы.

Отличительной топологической чертой интерфейса pRb является чередующееся расположение спиралей, принадлежащих доменам А и В. Взаимодействие между доменами А и В опосредуется компактной гидрофобной основой, состоящей приблизительно из 20 боковых цепей, основной аминокислотной цепью и водородными связями боковых цепей. Анализ сайта, связывающего мотив LxCxE, выявляет его насыщенный консерватизм. Наиболее важными являются четыре консервативных аминокислотных остатка, которые контактируют со скелетными аминокислотами пептида: Tyr709, Tyr756, Asn757, Lys713. Три первые аминокислоты являются идентичными в молекулах pRb и его гомологов у различных видов животных и растений (человек, тритон, курица, фруктовая муха и кукуруза), тогда как Lys713 идентичен в молекулах pRb у животных, а в белке кукурузы заменен на Arg (см. цв. вклейку, рис. 4.5, б). Для объяснения регуляции связывания сайта LxCxE предположено, что при фосфорилировании аминокислотных остатков Thr821 и Thr826 в домене С молекулы pRb этот участок белка приобретает способность изменять конформацию всей молекулы pRb так, что предотвращает доступ онкопротеинов к сайту связывания LxCxE.

Данные рентгеноструктурного анализа молекулы pRb показывают, что интерфейс А—В является вероятным сайтом связывания E2f:

1) интерфейс А—В представляет собой единственную высококонсервативную часть «кармана», кроме сайта связывания LxCxE, представленную на поверхности молекулы;

2) целый ряд мутаций, ведущих к возникновению рака, картируются в области интерфейса;

3) в третичной структуре молекулы pRb существует бороздка протяженностью в половину окружности интерфейса, которая подходит для связывания пептида с последовательностью сайта связывания pRb в E2f.

В дальнейшем эта гипотеза была подтверждена путем рентгеноструктурного анализа кристалла, полученного из раствора, в котором рекомбинантный pRb кристаллизовался с 18АА пептидом из последовательности белка E2f, идентичной сайту связывания «покетных» белков, т. е. белков, имеющих в структуре область «кармана».

Множество эндогенных белков, которые взаимодействуют с pRb, также содержат последовательность, подобную LxCxE. К таким белкам относятся гистоновые деацетилазы Hdac-1/2, белок Brg1 (АТФаза из комплекса SWI/SNF, ремоделирующего хроматин) и многие другие. Сайт связывания LxCxE является наиболее хорошо охарактеризованным, но не единственным связывающим сайтом в районе «кармана». Например, белки семейства E2F не содержат последовательности LxCxE и связывают другой мотив в pRb, который включает точки контакта как в районе «кармана», так и в С-концевой области. Это позволяет pRb одним участком молекулы взаимодействовать с белком E2f на промоторе гена-мишени, а другим функциональным доменом рекрутировать к той же области промотора белки иной функциональной специфичности, например содержащие мотив LxCxE.

Гистоновые деацетилазы Hdac1 и Hdac2 содержат мотив LxCxE, тогда как Hdac3 не содержит этой последовательности, и мутации в сайте связывания мотива LxCxE в гене RB не влияют на способность Hdac3 связывать pRb. Хотя белок Brg1, участвующий в формировании комплексов, ремоделирующих хроматин, содержит мотив LxCxE, он не использует эту последовательность для связывания с pRb, что позволяет pRb рекрутировать Brg1 и Hdac в один комплекс на промоторе одного и того же гена.

Домен «малый карман» pRb, содержащий циклиновые укладки А и В, физически взаимодействует с трансактивирующим доменом (TD) E2f и ингибирует его активность (см. цв. вклейку, рис. 4.7, а). Другой функциональный домен pRb локализован в его С-концевой области (pRbC) и содержит два дополнительных сайта связывания E2f, которые формируются при образовании димера между белком семейства E2F и его функциональным партнером — белком семейства DP. pRbC взаимодействует с сайтами белков E2f-Dp, расположенными в участках этих молекул, опосредующих их димеризацию.

В pRbC найдены 2 последовательности: pRbC^{786–800} и pRbC^{839–864}, необходимые для физического взаимодействия с E2f. Фосфорилирование фосфатной группы в районе спейсера молекулы pRb сопровождается нарушением взаимодействия между TD E2f и районом малого кармана pRb, тогда как фосфорилирование остатков Ser788/795 в pRbC, вызываемое комплексом циклин—Cdk4/6,

дестабилизирует взаимодействие между pRbC и димером E2f-Dp (см. цв. вклейку, рис. 4.7, б). Оставшиеся участки взаимодействия между pRbC⁸³⁹⁻⁹⁶⁴ и E2f-Dp инактивируются путем фосфорилирования фосфатных групп Thr821/826 комплексами циклин E/A—Cdk2. Это фосфорилирование вызывает взаимодействие между pRbC и доменом «малый карман» и конкурирует со связыванием pRbC с димером E2f-Dp (см. цв. вклейку, рис. 4.7, в).

C-домен pRb физически взаимодействует и с тирозиновой киназой c-Abl, но сайт связывания c-Abl отличается от сайта связывания E2f в pRbC. Тирозинкиназная активность c-Abl ингибируется при взаимодействии с pRb. Это взаимодействие является важным для супрессии деления клетки, опосредованной pRb. Гиперфосфорилирование pRb ведет к освобождению активной киназы c-Abl. C-концевая область pRb принимает участие в сборке многокомпонентных комплексов, содержащих pRb, E2f, c-Abl и потенциально другие белки. Существует гипотеза, в соответствии с которой pRb выполняет роль матрицы для взаимодействия функционально различных молекул, что необходимо для регуляции деления клетки (см. рис. 4.6).

Аминоконцевая область pRb связывает несколько белков, включая Mcm7 (лицензирующий репликацию фактор), Ap48 — адапторный белок, опосредующий взаимодействие pRb с транскрипционными факторами семейств E2F, Мус и другими регуляторными белками (рис. 4.8).

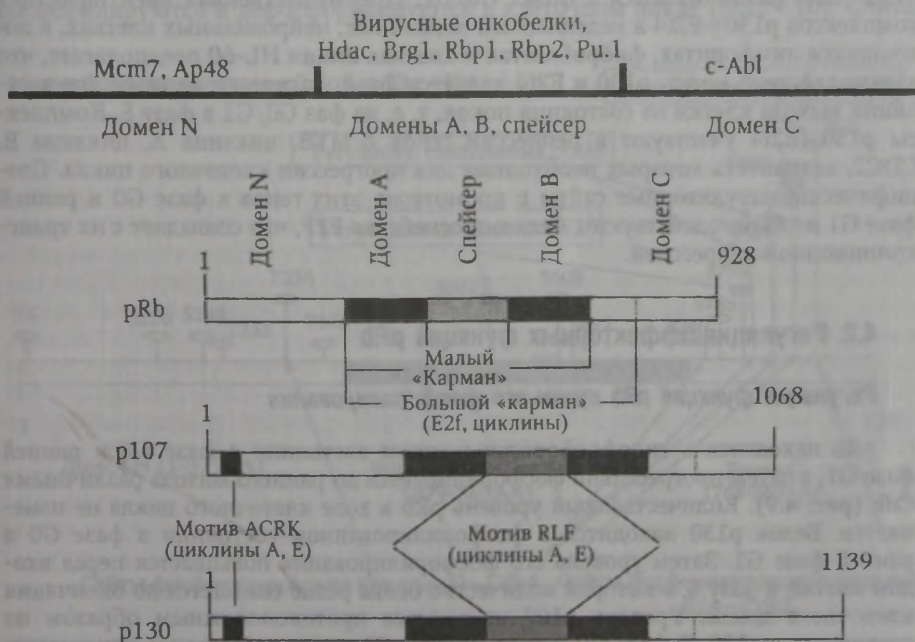


Рис. 4.8. Сравнительная характеристика структурной организации членов семейства pRb (Grana X. [et al.], 1998)

Структурное родство между белками семейства pRb

Сравнение структуры pRb, p107 и p130 человека показывает высокий уровень гомологии и эволюционного консерватизма аминокислотных последовательностей, расположенных в области «кармана» (см. рис. 4.8). Область «кармана» опосредует взаимодействие всех членов семейства pRb с другими регуляторными белками, включая белки семейства E2F. Домен В имеет высокий аффинитет к мотиву LxCxE, найденному в некоторых внутриклеточных белках-партнерах pRb и вначале идентифицированному в качестве мотива, присутствующего в онкогенных белках.

В противоположность доменам А и В, уровень консерватизма вне этих доменов и в области спейсера в белках p107 и p130 очень незначителен. Последовательности в N-концевом домене (мотив ACRK) и области спейсера (мотив RLF) в белках p107 и p130 наделяют их способностью связывать комплексы циклин E/A—Cdk2. Связывание комплексов циклин—Cdk с мотивом ACRK не регулируется уровнем фосфорилирования p130, в противоположность мотиву RLF. Хотя функция этих взаимодействий не совсем ясна, демонстрация того, что p107 и p130, с одной стороны, и pRb, с другой, взаимодействуют с различными белками, показывает, что члены семейства pRb имеют различные биохимические свойства. Например, pRb взаимодействует с E2f1—4, а p107/p130 — с E2f4/5.

Важной характеристикой p130 и p107 служат различия в фазах клеточного цикла, в которых эти белки взаимодействуют с членами семейства E2F. В частности, комплексы p107—E2f4 преобладают в фазе S, тогда как комплексы p130—E2f4 накапливаются в фазах G0/G1. Преимущественная идентификация комплексов p130—E2f4 в неделящихся мышечных, нейрональных клетках, в поющих лимфоцитах, фибробластах и клетках линии HL-60 предполагает, что взаимодействие между p130 и E2f4 является физиологически важным для регуляции выхода клетки из состояния покоя, т. е. из фаз G0/G1 в фазу S. Комплексы p130—E2f4 участвуют в репрессии генов b-MYB, циклина А, циклина В, CDC2, активность которых необходима для прогрессии клеточного цикла. Специфические регуляторные сайты в промоторах этих генов в фазе G0 и ранней фазе G1 не взаимодействуют с белками семейства E2F, что совпадает с их транскрипционной репрессией.

4.2. Регуляция эффекторных функций pRb

Регуляция функций pRb путем его фосфорилирования

pRb находится в гипофосфорилированном состоянии в фазе G0 и ранней фазе G1, а затем прогрессивно фосфорилируется до раннего митоза различными Cdk (рис. 4.9). Количественный уровень pRb в ходе клеточного цикла не изменяется. Белок p130 находится в фосфорилированном состоянии в фазе G0 и ранней фазе G1. Затем уровень его фосфорилирования повышается перед входом клетки в фазу S, в которой количество белка резко снижается до окончания клеточного цикла. Уровень p107 изменяется противоположным образом по сравнению с p130. В фазе G0 и ранней фазе G1 p107 практически отсутствует. Во время перехода G1/S количество p107 и уровень его фосфорилирования резко повышаются и остаются таковыми до окончания клеточного цикла. Все члены

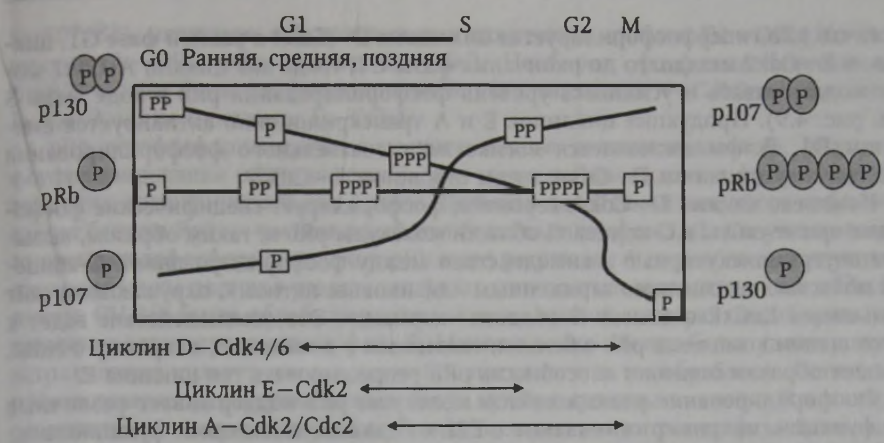


Рис. 4.9. Последовательность и характер фосфорилирования «пocketных» белков в ходе клеточного цикла. Количество фосфатных остатков – «Р» прямо соответствует уровню фосфорилирования членов семейства pRb (Grana X. [et al.], 1998)

семейства продукта гена ретинобластомы последовательно фосфорилируются в ходе клеточного цикла различными циклинзависимыми киназами: сначала комплексом циклин D–Cdk4, затем последовательно киназами циклин E–Cdk2 и циклин A–Cdk2/Cdc2 (см. рис. 4.9).

pRb содержит 16 сайтов фосфорилирования с мотивом Ser/Thr-Pro, которые фосфорилируются и дефосфорилируются в клеточном цикле (рис. 4.10). Счита-

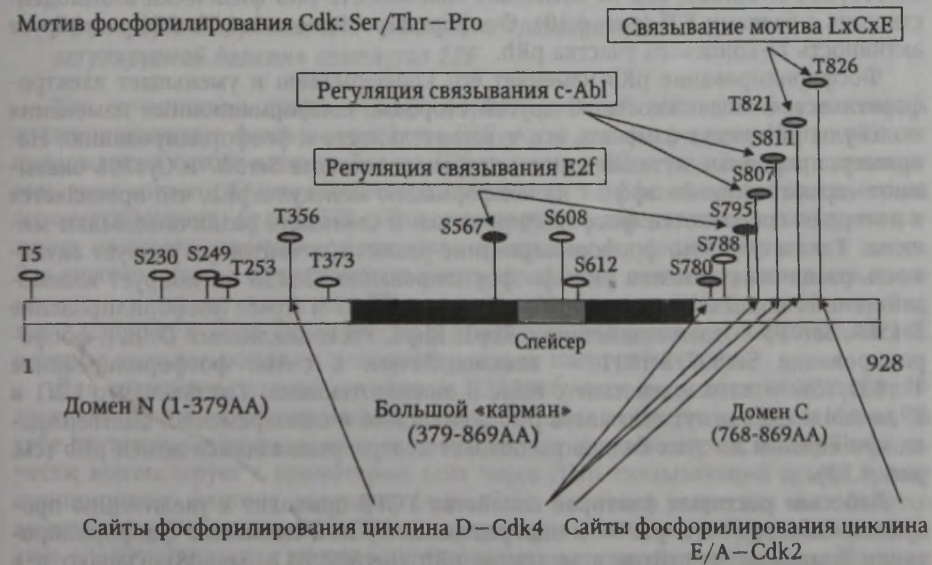


Рис. 4.10. Доменное расположение сайтов фосфорилирования в молекуле pRb и их киназная специфичность (Knudsen E. S., Wang J. Y. J., 1996)

ется, что pRb гиперфосфорилируется циклином D—Cdk4 в ранней фазе G1, циклином E—Cdk2 незадолго до окончания фазы G1, тогда как циклин A—Cdk2 может поддерживать и усиливать уровень фосфорилирования pRb в ходе фазы S (см. рис. 4.9). Продукция циклинов E и A транскрипционно активируется циклином D1. В чем заключается логика последовательного фосфорилирования pRb сначала циклином D—Cdk4, затем циклином E—Cdk2?

Комплекс циклин D—Cdk4, вероятно, фосфорилирует специфические фосфоакцепторные сайты в С-концевой области молекулы pRb и, таким образом, вызывает внутримолекулярные взаимодействия между фосфорилированной С-концевой областью и позитивно заряженным «лизиновым пятном», окружающим сайт связывания LxCxE в домене В области «кармана». Это взаимодействие ведет к диссоциации комплекса pRb с белком, связанным с доменом В, например с Hdc, и таким образом отменяет способность pRb репрессировать ген циклина Е.

Фосфорилирование разных сайтов молекулы pRb поддерживает различные его функции, например связывание с E2f, с белками, имеющими функциональный сайт LxCxE, или с киназой c-Abl. Домены А и В связывают белки с мотивом LxCxE, домен С связывает ядерную тирозиновую киназу c-Abl, тогда как район большого «кармана» — транскрипционные факторы семейства E2F и циклины D. Фосфорилирование сайтов Thr821/826 препятствует связыванию pRb белков, содержащих мотив LxCxE, но не препятствует его взаимодействию с белками, содержащими другие сайты связывания. С другой стороны, гиперфосфорилируемый по другим сайтам pRb сохраняет способность связывать Т-антиген вируса SV-40, белок E7 HPV или транскрипционный фактор Elf-1, каждый из которых содержит мотив LxCxE. Фосфорилирование остатков Ser807/811 нарушает связывание киназы c-Abl, однако сочетанные мутации Ser807/811 и Thr821/826 не отменяют способность pRb физически взаимодействовать с белками E2f (рис. 4.10). Фосфорилирование сайта Thr356 регулирует активность N-концевого участка pRb.

Фосфорилирование pRb изменяет его конформацию и уменьшает электрофоретическую подвижность. С другой стороны, конформационные изменения молекулы pRb могут изменять его чувствительность к фосфорилированию. Например, природные мутации аминокислотных остатков Ser567 и Cys706 оказывают «драматический» эффект на конформацию молекулы pRb, что проявляется в потере ее способности фосфорилироваться и связывать различные белки-мишени. Таким образом, фосфорилирование различных сайтов регулирует активность различных доменов pRb: фосфорилирование Thr356 ингибирует взаимодействие N-концевого участка pRb с белками Mcm7 и Ap48; фосфорилирование Ser567, Ser795 — взаимодействие с Rbp1, Rbp2, Pu.1, циклинами D, E2f; фосфорилирование Ser807/Ser811 — взаимодействие с c-Abl; фосфорилирование Thr821/826 — взаимодействие с Hdc и онкопротеинами. Тот факт, что E2f1 и E7, c-Abl и E2f1 могут связывать pRb независимо и одновременно, подтверждает, что каждый из этих белков распознает неперекрывающийся домен pRb (см. рис. 4.10).

Действие ростовых факторов семейства TGF β приводит к увеличению продукции Cdk1 p15^{Ink4b} и p27^{Kip1} и опосредованному ими снижению фосфорилирования большинства сайтов в молекуле pRb (Ser807/811, Ser608). Однако и в этих условиях пять сайтов молекулы pRb: Thr5, Thr253, Thr373, Ser788, Ser795 остаются фосфорилированными. Вероятно, эти сайты фосфорилируются не Cdk, а киназами другого типа, например киназой MAPK. Остатки Thr356 и

Ser807/811 являются субстратами для комплекса циклин D1–Cdk4/6, но не циклин A–Cdk2 или циклин E–Cdk2. Наоборот, фосфоакцепторный сайт Thr821 может быть фосфорилирован *in vitro* циклином A–Cdk2 или циклином E–Cdk2, но не циклином D–Cdk4.

pRb гипофосфорилируется в позднем митозе, начиная с анафазы. Анализ дефосфорилирования pRb в опытах *in vitro* привел к нахождению фосфатазной активности, специфической для митоза. Большая часть такой активности обеспечивается белком Pp1 — членом семейства белковых фосфатаз. Для изучения точно времени дефосфорилирования pRb и его регуляции был использован протокол синхронизации клеток в различных фазах митоза. Адгезионные клетки обезьяны линии CV-1P были обработаны гидроксимочевинной, которая ингибирует прогрессию клеточного цикла в фазе S. Митотические клетки были удалены путем встряхивания культур клеток через 8 ч после начала их обработки. Оставшиеся распластаные на пластике клетки были культивированы в течение 2 ч в среде с реактивом нокадазол, который останавливает деление в прометафазе. Затем клетки были собраны путем встряхивания, отмывы от нокадазола и культивированы в свежей среде для изучения прогрессии клеточного цикла, включая прохождение митоза и фазы G1. Прогрессия клеточного цикла оценивалась путем слежения за хромосомным рисунком клеток с ДНК, окрашенной красителем DAPI. В названных условиях отмечался высокий уровень синхронизации клеток: 94 % клеток в культурах, обработанных нокадазолом, содержали конденсированные хромосомы, и большинство из них достигало метафазы через 30 мин после культивирования в среде без нокадазола. Через 40 мин большинство таких клеток находилось в анафазе и телофазе. Через 60 мин почти все клетки достигали фазы G1, что определялось по присутствию деконденсированных хромосом.

Эффекторные функции pRb — контроль транскрипции, регулируемой белками семейства E2F

Как упоминалось ранее, гипофосфорилированный pRb способен связывать транскрипционные факторы семейства E2F, тогда как фосфорилирование pRb сопровождается освобождением белков E2f от связи с pRb и позволяет им активировать гены-мишени. Путем обратимого связывания и функциональной инактивации (секвестрирования) белков E2f, pRb контролирует экспрессию генов, продукты которых являются важными участниками программы регуляции клеточного цикла. Эта внешне простая схема является очень сложной за счет избирательности взаимодействия членов семейства pRb с различными белками E2f. С другой стороны, такая избирательность позволяет контролировать экспрессию генов-мишеней E2f, которые экспрессируются в различных стадиях клеточного цикла.

Для транскрипционной ингибиции E2F требуются последовательности в области «кармана» и С-концевой области pRb, однако область «кармана» сама по себе достаточна для индукции активной репрессии в том случае, если pRb физически контактирует с промотером гена через ДНК-связывающий домен транскрипционного фактора, например белка Gal4. Активная репрессия выполняется молекулой pRb, связанной с E2f на промотерах генов, регулирующих прогрессию клеточного цикла, путем рекрутирования корепрессоров, взаимодействующих с районом «кармана» молекулы pRb. Таким образом достигается активная транскрипционная репрессия ферментами, ремоделирующими хроматин (см. рис. 5.10).

pRb и рестрикционная точка G1

Известно, что зависимость деления клетки от митогенной стимуляции действует на ограниченном участке цикла, на первых 2/3 фазы G1. Клетка, получившая такую стимуляцию, может завершить клеточный цикл при прекращении воздействия митогенных стимулов. Переход от состояния, зависимо от митогенов, к состоянию, не зависимо от них, происходит в рестрикционной точке R1. Если внешние условия неблагоприятны для деления, клетка из фазы G1 может вернуться в фазу G0 или войти в дифференцированное постмитотическое состояние, подвергнуться клеточному старению или апоптозу (рис. 4.11).

Во время прохождения рестрикционной точки R1 pRb и другие члены его семейства находятся в состоянии прогрессивного фосфорилирования. Уровень фосфорилирования pRb увеличивается и поддерживается в ходе прогрессии клеточного цикла до окончания митоза. Выход из митоза совпадает с дефосфорилированием pRb. Фосфорилирование инактивирует pRb как негативный регулятор клеточного деления. Об этом свидетельствуют следующие факты. Во-первых, белки разных онкогенных ДНК-овых вирусов инактивируют pRb путем взаимодействия и секвестрации гипофосфорилированного, но не гиперфосфорилированного белка. Во-вторых, гипофосфорилированный, но не гиперфосфорилированный pRb взаимодействует и контролирует многие внутриклеточные белки. В-третьих, гипофосфорилированный pRb накапливается в поющих клетках, а гиперфосфорилированный — в делящихся клетках.

Характер фосфорилирования pRb предполагает простую и привлекательную модель регуляции прогрессии фазы G1 клеточного цикла. Клетка проходит часть клеточного цикла и достигает точки R1, в которой она останавливается в том случае, если pRb находится в гипофосфорилированном состоянии. Если внешние и внутренние условия являются благоприятными для деления клетки, то pRb фосфорилируется и инактивируется, разрешая прохождение точки R1. Клетки, в которых функции pRb нарушены, заканчивают фазу G1, не подверга-

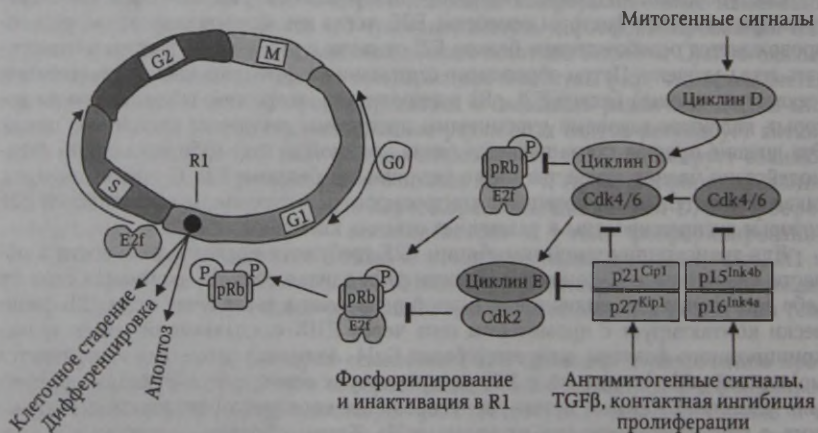


Рис. 4.11. Механизм регуляции прогрессии клеточного цикла в точке R1 (Sherr C. J., Roberts J. M., 1999)

ясь контролю, который опосредуется этим белком. Внешний контроль, опосредованный pRb, осуществляется белками семейства TGF β , а при феномене контактной ингибиции пролиферации pRb вовлекается посредством активации CdkI — p27^{Kip1} (см. рис. 4.11). С потерей функций pRb клетка утрачивает способность контролировать прохождение точки R1 и окончание фазы G1.

Сверхэкспрессия циклина E достаточна для преодоления остановки клеточного цикла, вызванного мутантным белком pRb, резистентным к фосфорилированию. Эти результаты показывают, что комплекс циклин E—Cdk2 является критической мишенью в сигнальном пути, опосредованном pRb, и поддерживают модель, в которой роль pRb заключается в последовательной регуляции экспрессии циклинов в ходе клеточного цикла (рис. 4.12).

Комплекс циклин D—Cdk4 способствует экспрессии циклина E путем разрушения комплекса pRb—Hdac, а экспрессия циклина E является достаточной для преодоления опосредованной pRb остановки клеточного цикла в фазе G1. Такая модель объясняет, почему прогрессия клеточного цикла может осуществляться без комплекса циклин D—Cdk4/6 в клетке, которая конститутивно или преждевременно экспрессирует циклин E в клеточном цикле.

Таким образом, в фазе G1 комплексы циклин D—Cdk4 и циклин E—Cdk2 взаимодействуют между собой, способствуя входу клетки в фазу синтеза ДНК. Суммарно взаимодействие этих комплексов можно представить в следующем виде (см. рис. 4.12).

В ответ на митогенные сигналы происходит синтез и сборка циклинов D, секвестрация CdkI — p27^{Kip1}, который освобождается из комплексов циклин E—Cdk2, приобретающих вследствие такой диссоциации активность. Затем обе киназы G1 (циклин D—Cdk4 и циклин E—Cdk2) взаимодействуют в процессе

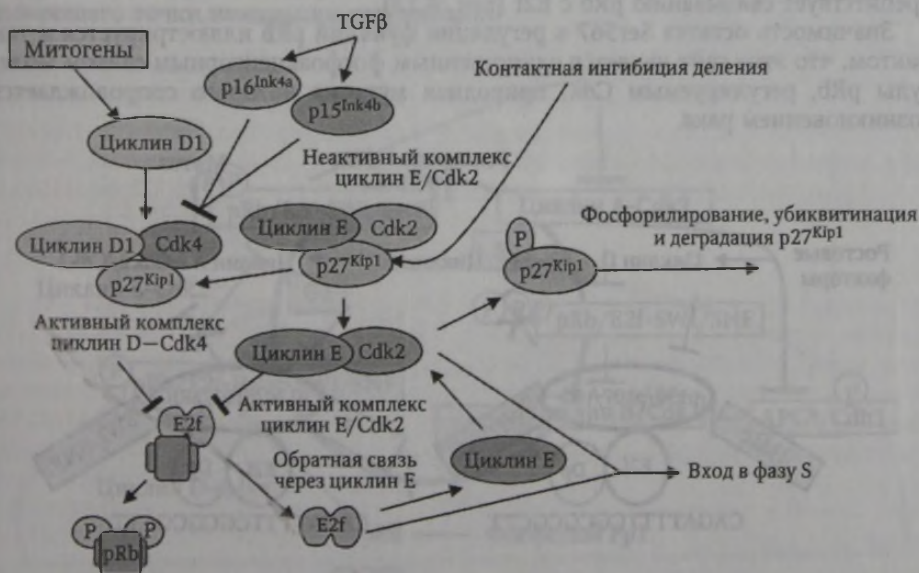


Рис. 4.12. Регуляторный каскад фазы G1 клеточного цикла (Sherr C. J., McCormick F. Мс., 2002)

последовательного фосфорилирования продуктов семейства гена ретинобластомы. Это освобождает E2f от ингибции со стороны белков семейства pRb и ведет к активации генов, необходимых для входа в фазу S. Среди них находится ген циклина E, транскрипционная регуляция которого обеспечивает позитивную обратную связь, направленную на инициацию входа в фазу S.

Одним из субстратов комплекса циклин E—Cdk2 является ингибитор киназ p27^{Kip1}, фосфорилирование которого вызывает его убиквитинацию и деградацию в точке входа в фазу S.

Роль pRb в регуляции клеточного цикла после фазы G1

Введение в клетку мутантного и резистентного к фосфорилированию pRb препятствует синтезу ДНК после прохождения клеткой рестрикционной точки R1. Этот результат предполагает, что pRb может ингибировать прогрессию клеточного цикла после фазы G1. Вход в фазу S и ее завершение, которые возникают после экспрессии p16^{Ink4a}, активирующего pRb или резистентного к фосфорилированию pRb, могут быть преодолены экспрессией циклина E. Вероятно, циклин E может быть мишенью сигналов, передаваемых pRb через E2f. Внутримолекулярные взаимодействия в молекуле pRb, вызванные его фосфорилированием комплексом циклин D—Cdk4, способствуют не только освобождению Hdc из комплексов с pRb, но также и рекрутированию комплекса циклин E—Cdk2 к области «кармана» pRb. Это рекрутирование облегчает фосфорилирование фосфоакцепторного сайта Ser567, который в нормальных условиях скрыт в глубине интерфейса между доменами A и B и недоступен для киназы циклин E—Cdk2. Ser567 создает критические контакты между доменами A и B, а его фосфорилирование разрушает взаимодействие между доменами A и B и препятствует связыванию pRb с E2f (рис. 4.13).

Значимость остатка Ser567 в регуляции функций pRb иллюстрируется и тем фактом, что этот сайт является единственным фосфоакцепторным сайтом молекулы pRb, регулируемым Cdk, природная мутация которого сопровождается возникновением рака.



Рис. 4.13. Роль pRb-содержащих комплексов, ремоделирующих ДНК, в регуляции прогрессии клеточного цикла (Harbour J. W., Dean D. C., 2000)

Какие эффекторные белки могут быть мишенью циклина E—Cdk2 в нижежащих сигнальных путях? Одной такой потенциальной мишенью может быть Brg1 — компонент ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF.

Установлено, что циклин E взаимодействует с Brg1 и ингибирует вызванную им клеточную пролиферацию. Brg1 фосфорилируется по ходу клеточного цикла, что ингибирует функции комплекса SWI/SNF (см. рис. 4.13). Таким образом, циклин E и pRb могут играть ключевую роль в фазе S путем фосфорилирования комплекса SWI/SNF.

Комплекс Hdac—pRb—SWI/SNF необходим для ингибции экспрессии циклина E и предотвращения входа клетки в фазу S. Фосфорилирование pRb киназой циклин D—Cdk4 ингибирует связывание pRb с Hdac, но не с Brg1. Существующий в конце фазы G1 комплекс pRb—SWI/SNF позволяет провести накопление активности киназы циклин E—Cdk2, которая необходима для сборки пререпликационных комплексов и входа в фазу S. Увеличение уровня и активация циклина E ведет к фосфорилированию pRb и/или Brg1, а инактивация комплексов pRb—SWI/SNF позволяет аккумуляцию комплекса циклин A—Cdk2 (см. рис. 4.13).

Убиквитинная лигаза APC*—Cdh1 остается активной в фазе S и контролирует низкий уровень циклина B до тех пор, пока комплекс циклин A—Cdk2 не фосфорилирует субъединицу Cdh1, снижая активность APC* и разрешая накопление циклина B в конце фазы S (рис. 4.14). Образование активного комплекса циклин B—Cdk1 необходимо для входа в митоз. Этот процесс контролируется ингибцией гена циклина A комплексом pRb—E2f. Возможно, что регуляция выхода из фазы S в клетках человека с помощью pRb и E2f, соединенных в комплексы с ферментами, ремоделирующими хроматин, может опосредоваться прямым контролем экспрессии одного из компонентов комплекса ORC, связывающего точки инициации репликации.

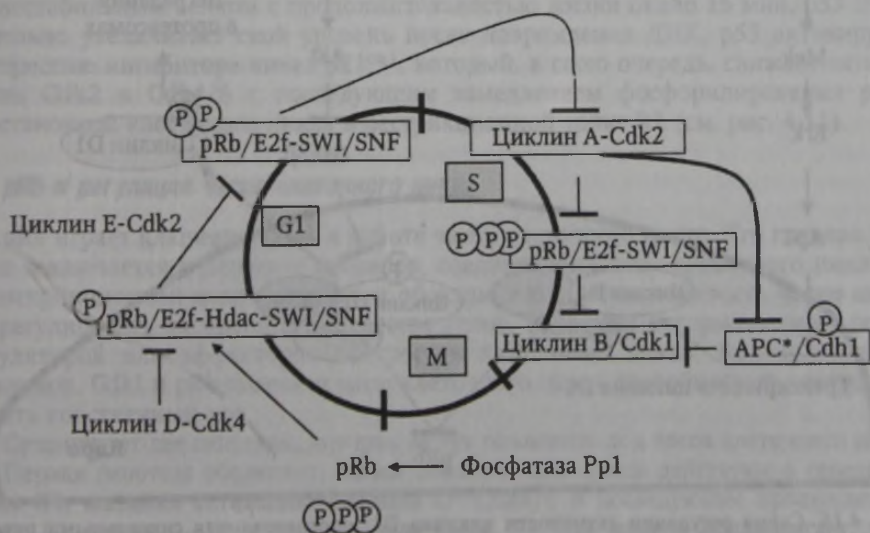


Рис. 4.14. Роль pRb в регуляции прогрессии клеточного цикла после фазы G1 (Harbour J. W., Dean D. C., 2000)

pRb как интегратор позитивных сигналов

pRb функционирует в критических точках клеточного цикла, действуя как коллектор различных афферентных сигналов и передавая эти сигналы через различные нижележащие пути, такие как E2F и c-Abl. Сигналы, которые способствуют пролиферации клеток, опосредуют фосфорилирование pRb. Большинство таких сигналов передаются митогенами, влияющими на рецепторы клеточной поверхности, которые, в свою очередь, активируют цитоплазматические сигнальные пути, передающие в ядро сигналы для деления клетки. Например, митогены инициируют синтез циклина D1, фосфорилирующего pRb. Подобно белку Мус, время полураспада циклина D1 составляет 15 мин, поэтому его уровень быстро снижается при удалении внеклеточных митогенов. Быстрая регуляция активности циклина D1 может осуществляться через сигнальный путь MAPK, активируемый митогенами (рис. 4.15). Вероятно, клетка отслеживает уровень циклина D1 в середине фазы G1 и изменяет его в зависимости от необходимости стимулировать или тормозить деление.

Митогены также активируют сигнальный путь PI3K, что сопровождается снижением активности киназы Gsk3 β , которая в нормальных условиях фосфорилирует циклин D1 и способствует его убиквитинации и деградации. Таким образом, митогены активируют в клетке сигнальные пути MAPK и PI3K, которые кооперируют в ингибировании активности pRb и отмене его тормозящего влияния на прогрессию клеточного цикла (см. рис. 4.15).

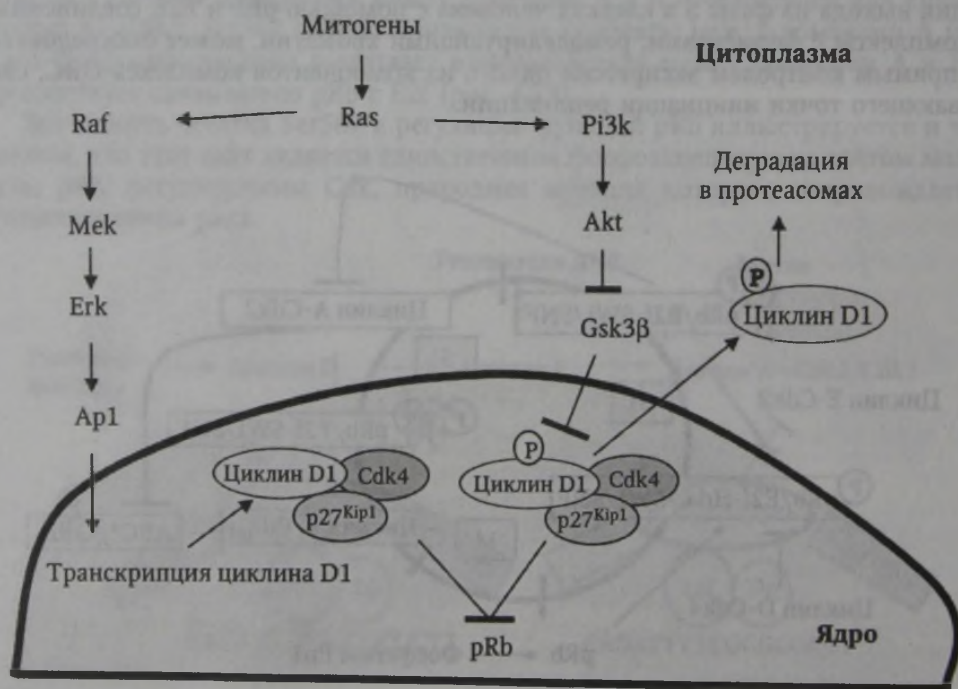


Рис. 4.15. Схема регуляции активности циклина D1, опосредованная сигнальными путями MAPK и PI3K (стрелками отмечена последовательность передачи сигналов: влево — по пути MAPK; вправо — по пути PI3K) (Sherr C. J., McCormick F. Мс., 2002)

pRb как интегратор негативных сигналов

Существует множество физиологических сигналов, которые препятствуют фосфорилированию pRb и, таким образом, блокируют прохождение клетки через точку R1 в поздней фазе G1. Такие ингибиторные сигналы действуют не прямо на молекулу pRb, а модулируют активность киназ Cdk, которые затем фосфорилируют pRb. Негативные сигналы, которые ингибируют фосфорилирование pRb через Cdk, передаются через сигнальный путь TGF β , циклический AMP (сAMP), а также лежат в основе феномена контактной ингибиции деления (см. рис. 4.11). В каждом случае негативный сигнал активирует один из ингибиторов Cdk, который взаимодействует либо непосредственно с Cdk, либо с комплексом циклин—Cdk, таким образом ингибируя его функцию.

Белки семейства TGF β индуцируют экспрессию CdkI p15^{Ink4b}, который конкурирует с циклинами D за связь с Cdk4/6. p15^{Ink4b} и p16^{Ink4a} ингибируют клеточную пролиферацию только в клетках с активно функционирующим pRb. Этот факт показывает, что единственной физиологически важной мишенью циклина D—Cdk4/6 является pRb и что Tgf β , p15^{Ink4b}, Cdk4/6 и pRb соединены в один сигнальный путь. В некоторых линиях клеток белки Tgf β существенно снижают уровень Cdk4, таким образом предотвращая фосфорилирование pRb. Снижение уровня Cdk4 может приводить к освобождению значительных количеств CdkI p27^{Kip1}, который, в свою очередь, может препятствовать функции других Cdk. Механизмы контактной ингибиции пролиферации и действие цАМФ основаны на мобилизации белка p27^{Kip1}. Конечной точкой действия различных механизмов, ингибирующих деление клетки, является молекула pRb, дефосфорилирование которой предотвращает прохождение клеткой R1. Радиоактивное облучение и другие факторы, повреждающие ДНК, также ингибируют фосфорилирование pRb путем активации другого ингибитора CdkI — белка p21^{Cip1}. При повреждении ДНК белок p53 способствует активации pRb. Будучи в нормальных условиях нестабильным белком с продолжительностью жизни около 15 мин, p53 значительно увеличивает свой уровень после повреждения ДНК. p53 активирует экспрессию ингибитора киназ p21^{Cip1}, который, в свою очередь, снижает активность Cdk2 и Cdk4/6 с последующим замедлением фосфорилирования pRb и остановкой клеточного цикла в рестрикционной точке R1 (см. рис. 4.11).

pRb и регуляция часов клеточного цикла

pRb играет ключевую роль в работе часов клеточного цикла. Его главная задача заключается в передаче сигналов, соединяющих часы клеточного цикла с транскрипционной машиной. Таким образом, pRb дает возможность часам цикла регулировать экспрессию множества генов, продукты которых играют роль регуляторов или эффекторов прогрессии клеточного цикла. Взаимодействие циклинов, CdkI и pRb наделяет часы клеточного цикла способностью контролировать собственный ход.

Существуют две гипотезы, которые могут объяснить ход часов клеточного цикла. Первая гипотеза объясняет, каким образом часы цикла действуют в середине фазы G1, вызывая активацию циклина D—Cdk4/6 и последующее прохождение точки R1 спустя 6—10 ч после начала фазы G1. Эта модель предполагает, что CdkI — p27^{Kip1} экспрессируется на постоянном уровне в ходе фазы G1 (рис. 4.16). В ранней фазе G1 все имеющееся в клетке количество циклина D—Cdk4/6 связы-

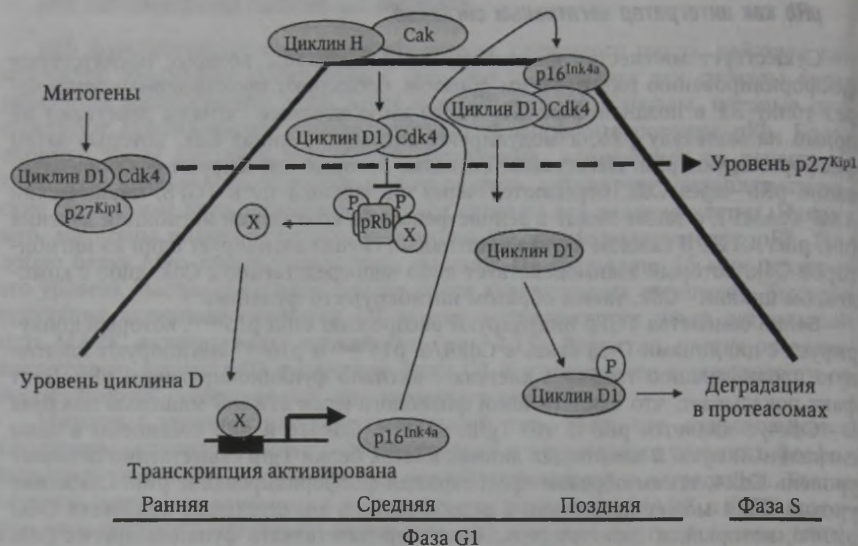


Рис. 4.16. Схема регуляции часов клеточного цикла, зависящая от pRb (Weinberg R. A., 1995)

ается и инактивируется белком $p27^{Kip1}$, который в это время присутствует в молярном избытке и действует как ингибитор активации циклина D–Cdk4/6. Когда увеличение уровня циклина D–Cdk4/6 в циклирующей клетке превосходит порог связывания белком $p27^{Kip1}$, избыток комплексов циклин D–Cdk4/6 фосфорилируется киназой Cak и активная киназа Cdk4 фосфорилирует pRb, способствуя прогрессии клеточного цикла.

Вторая гипотеза основана на участии CdkI — $p16^{Ink4a}$, механизм действия которого заключается в связывании Cdk4/6 и предотвращении взаимодействия этих киназ с циклинами D. Эта гипотеза учитывает факты, что $p16^{Ink4a}$ сверхэкспрессируется в клетках, трансформированных ДНК-овыми онкогенными вирусами, которые инактивируют pRb. В других экспериментах было найдено, что pRb негативно регулирует промотер гена $p16^{Ink4a}$. Более того, экспрессия $p16^{Ink4a}$ существенно возрастает к концу фазы G1, то есть в то время, когда pRb подвергается инактивации. Взятые вместе, эти наблюдения предполагают существование негативной обратной связи, которая оперирует следующим образом:

1. В ранней фазе G1 комплексы циклин D–Cdk4/6 фосфорилируют и инактивируют pRb.

2. Будучи инактивированным, pRb освобождает гипотетический транскрипционный фактор, который индуцирует экспрессию $p16^{Ink4a}$.

3. Повышение уровня $p16^{Ink4a}$ сопровождается связыванием всей активности Cdk4/6 и освобождением циклина D из комплексов с Cdk4/6.

4. Циклин D, более не связанный с Cdk4/6 и, таким образом, не защищенный от действия убиквитиновых лигаз, подвергается фосфорилированию и деградации в протеасомах. Уменьшение уровня циклина D означает окончание фазы G1 и часового цикла, который оперирует в этой фазе (см. рис. 4.16).

pRb и опухолевый рост

pRb играет фундаментальную роль в регуляции поведения клеток и является мишенью для мутаций, ведущих к опухолевому росту во многих типах клеток. Дети с наследственными ретинобластомами имеют 30-кратный риск возникновения опухоли второго глаза, опухолей костей и соединительной ткани в юношеском возрасте, а меланом — во взрослой жизни. Вторичные опухоли появляются в результате спорадических мутаций второй аллели гена RB у пациентов с наследственной мутацией его первой аллели. Существуют многочисленные доказательства того, что pRb располагается в центре регуляторного пути, нарушение которого играет основную роль в патогенезе многих опухолей у человека (рис. 4.17). Не исключено, что этот путь нарушается при всех типах рака человека.

При ретинобластоме, мелкоклеточной карциноме легких, многих саркомах и раке мочевого пузыря функция pRb теряется вследствие мутаций в этом гене. В подавляющем большинстве карцином шейки матки pRb инактивируется вследствие действия онкопротеина E7 вируса папилломы человека. При раке пищевода, молочной железы, чешуйчатых карциномах амплифицируется ген циклина D1. Сверхэкспрессия циклина D1 при В-клеточных лимфомах происходит вследствие хромосомной транслокации, активирующей его транскрипцию. Вирус герпеса Саймири является потенциально онкогенным вирусом у некоторых приматов, благодаря сверхэкспрессии собственного циклина D. Ген CDK4 амплифицирован при многих глиобластомах и некоторых глиомах. Гены $p15^{Ink4b}$, $p16^{Ink4a}$ одновременно могут нести делеции при многих карциномах пищевода, глиобластомах, карциномах легких, мочевого пузыря и поджелудочной железы или могут присутствовать в мутантной форме в зародышевых клетках больных с семейными меланомами. Таким образом, при большинстве раковых заболеваний функция pRb нарушается путем его функциональной инактивации при потере активности CdkI $p16^{Ink4a}$, гиперактивации циклина D или Cdk4/6, а не вследствие генетических нарушений RB (табл. 4.1).

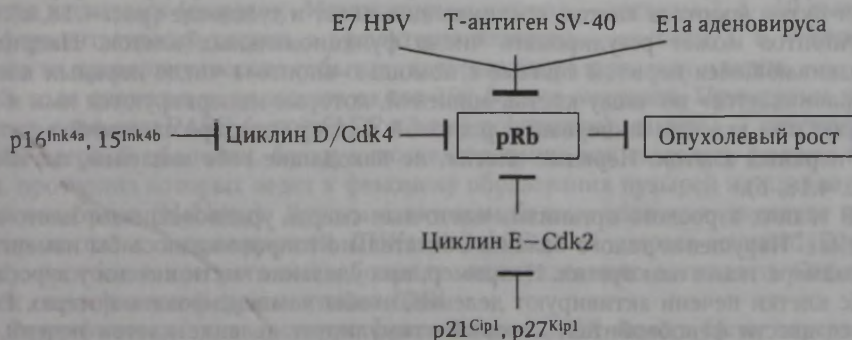


Рис. 4.17. Механизмы функциональной инактивации pRb при опухолевом росте (Weinberg R. A., 1995)

Таблица 4.1

**Статистический анализ различных форм
функциональной инактивации pRb при опухолевых заболеваниях**
(Weinberg R. A., 1995)

Тип опухоли	Потеря p16 ^{Ink4a} , %	Сверхэкспрессия циклина D1 или Cdk4, %	Потеря pRb, %
Мелкоклеточная карцинома легких	15	5 (циклин D1)	80
Немелкоклеточная карцинома легких	58	—	20–30
Рак поджелудочной железы	80	—	—
Рак молочной железы	30	> 50 (циклин D1)	—
Глиобластома	60	40 (Cdk4)	—
Острый Т-клеточный лимфо- лейкоз	75	—	—
Мантийная форма лимфомы	—	90 (циклин D1)	—

4.3. Апоптоз, функциональная роль и механизмы

Судьба клеток многоклеточного организма является вторичной по отношению к судьбе всего тела. Развитие отдельных клеток регулируется их делением, ростом, выживанием, старением, дифференцировкой и запрограммированной клеточной смертью или *апоптозом* («апоптоз» от греч. — «уходить, покидать»). При завершении жизненной программы в клетке активируется специальная функция, направленная на ее уничтожение. Апоптоз широко используется в процессах развития, например при становлении нервной системы позвоночных. Он выполняет функцию формообразования при образовании дистальных конечностей мыши. В этом случае из лопатообразных лап формируются отдельные фаланги путем апоптоза клеток, заполняющих межфаланговые промежутки. В другом случае, когда головастики превращаются в лягушку, он утрачивает хвост путем апоптоза клеток, соединяющих хвост и туловище (рис. 4.18, а).

Апоптоз может регулировать число функциональных клеток. Например, в развивающейся нервной системе с помощью апоптоза число нервных клеток «выравнивается» по числу клеток-мишеней, которые иннервируются ими и выделяют при условии иннервации ростовой фактор, поддерживающий выживание нервных клеток. Нервные клетки, не находящие себе мишеней, погибают (рис. 4.18, б).

В тканях взрослого организма клеточная смерть уравнивает клеточное деление. Нарушение такого баланса обязательно сопровождалось бы изменением размера ткани или органа. Например, при удалении части печени у взрослых крыс клетки печени активируют деление, чтобы компенсировать потерю. Если крысе ввести фенотарбитал, который стимулирует деление клеток печени, то размеры печени увеличиваются. Следствием увеличения размеров органа является активация апоптоза, который продолжается до того момента, пока размеры печени не станут исходными.

Существуют два механизма клеточной смерти: некроз и апоптоз. Некроз представляет собой неожиданную клеточную смерть, вызванную токсическим

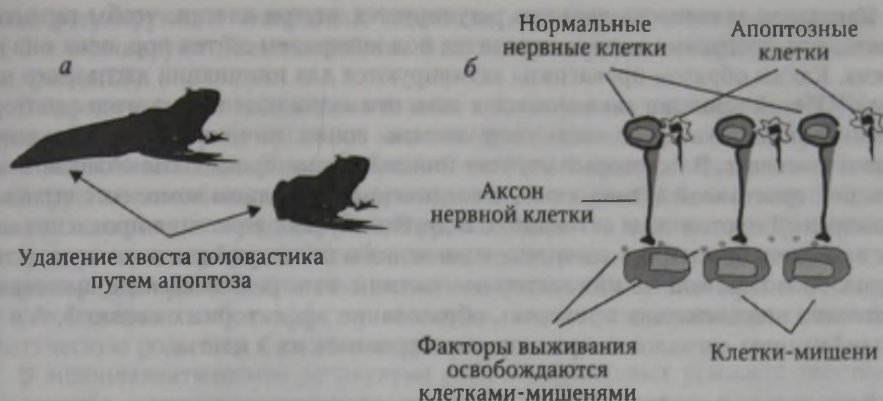


Рис. 4.18. Роль апоптоза в регуляции различных функций организма:

а — удаление хвоста при превращении головастика в лягушку происходит путем апоптоза; б — механизм, контролирующий соответствие количества взаимодействующих клеток с помощью апоптоза (Alberts B. [et al.], 2004)

или механическим повреждением клетки. Некроз обычно сопровождается воспалением, которое повреждает окружающие клетки.

Клетка, подвергаясь апоптозу, погибает «аккуратно», не вызывая повреждения соседних клеток. Она уменьшается в размерах, ее ядро конденсируется, цитоскелет и ядерная оболочка распадаются, а ядерная ДНК фрагментируется. На клеточной поверхности погибающей клетки экспрессируются фосфотидилсерины и другие молекулы, которые вызывают ее фагоцитоз еще до того, как содержимое клетки выходит за ее пределы. Таким образом, компоненты апоптозной клетки подвергаются утилизации, не причиняя вреда микроокружению.

Внутриклеточная машина апоптоза очень похожа у клеток различных животных. Она основана на семействе протеаз, в активном сайте которых содержится остаток цистеина (С — Cys) и которые разделяют белки-мишени в сайте, содержащем аспарагиновую кислоту (D — Asp). Поэтому такие протеазы называются каспазами (caspases). Инициаторы апоптоза — каспазы 2, 8–10 вызывают ферментативный каскад, а эффекторы апоптоза — каспазы 3, 6, 7 ответственны за протеолитические события, которые ведут к распаду клетки.

В ходе апоптоза разрушается около 100 белков-мишеней. Примерами таких белков являются PARP (a poly(ADP-ribose) polymerase), ламины — структурные белки ядерной оболочки, белки цитоскелета, такие как гелсолин, фодрин и актин, протеолиз которых ведет к феномену образования пузырей на плазматической мембране (blebbing). Другим ключевым белком-мишенью является ингибитор каспазы, активирующей ДНКазу (inhibitor of caspase-activated DNase, Icad), протеолиз которого высвобождает эндонуклеазную активность Cad и ведет к специфической фрагментации ДНК.

Специфическая для апоптоза фрагментация ДНК может быть определена с помощью электрофореза ДНК, который выявляет специфический рисунок «лестницы» на геле. Регуляция внутриклеточного апоптоза происходит по типу «все или ничего», подобно регуляции клеточного цикла. Протеазный каскад является не только разрушительным, но самоамплифицирующимся и необратимым.

Каспазная активность надежно регулируется внутри клетки, чтобы гарантировать, что программа смерти находится под контролем до тех пор, пока она не нужна. Каким образом прокаспазы активируются для инициации каспазного каскада? Общий принцип заключается в том, что активация вызывается адапторными белками, которые соединяют многие копии инициаторных прокаспаз в один комплекс. В некоторых случаях инициаторные прокаспазы обладают небольшой протеазной активностью, и соединение их в одном комплексе вызывает взаимный протеолиз и активацию. В других случаях агрегация прокаспаз может вызывать их конформационные изменения и последующую взаимную активацию. Активированные инициаторные каспазы на вершине каскада вызывают протеолиз нижележащих прокаспаз, образование эффекторных каспаз 3, 6 и 7, амплификацию сигналов смерти и распространение их в клетке.

Роль белков семейства Bcl-2 в регуляции апоптоза и выживания клеток

Ключевую роль в механизмах апоптоза и выживания клеток играют белки семейства Bcl-2, которое у млекопитающих включает три группы функционально различных и взаимодействующих между собой факторов, содержащих в своей структуре от 1 до 4 консервативных доменов ВН (Bcl homology), впервые обнаруженных в структуре белка Bcl-2. Белок Bcl-2 и четыре родственные ему молекулы (Bcl-X_L, Bcl-W, A1, Mcl-1) облегчают выживание клеток. Напротив, две другие группы родственных белков активируют клеточную смерть (рис. 4.19). Группа белков, включающих три домена ВН, состоит из Bax, Bak, Bok. Третью группу составляют белки, в структуру которых входит только один домен ВН, эта группа называется «ВН3-only». В нее входят 8 белков, например Bad, Bid, Bim, Puma и др. У млекопитающих белки группы ВН3-only воспринимают сиг-

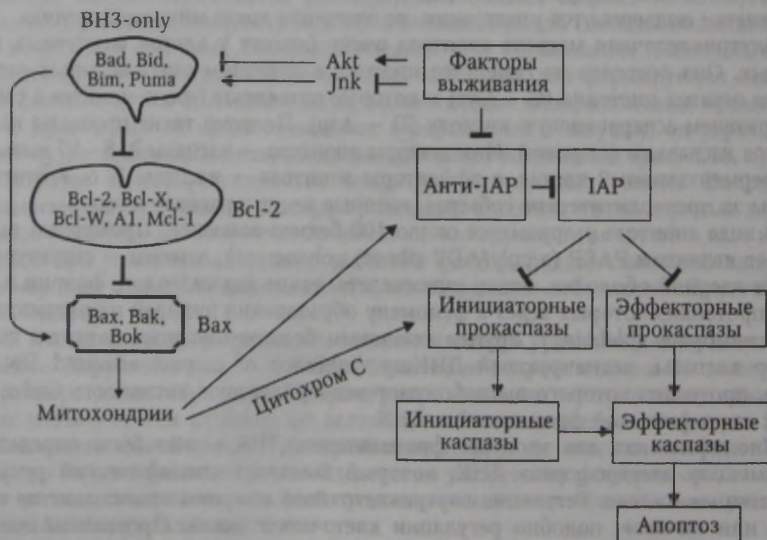


Рис. 4.19. Роль белков семейства Bcl-2 в регуляции апоптоза (Adams J. M., 2003)

налы, регулирующие инициацию апоптоза, ингибируют активность семейства Bcl-2 и активируют белки семейства Вах, таким образом способствуя апоптозу (см. рис. 4.19).

В передаче сигналов апоптоза важное значение имеет расположение белков группы Вах в мембране органелл: митохондрий, эндоплазматического ретикулаума и клеточного ядра. Гидрофобный С-концевой домен большинства белков этой группы способствует их прикреплению к мембране, где они могут образовывать олигомеры, например Вах/Вах или Вах/Вак, вызывающие увеличение проницаемости мембран и освобождение в цитозоль апоптогенных факторов, например цитохрома С. В случае инактивации генов Вах и Вак клетки становятся устойчивыми к большинству стимулов, вызывающих апоптоз, показывая критическую роль этих белков в индукции апоптоза.

В эндоплазматическом ретикулуме (ER) в нормальных условиях действуют механизмы, контролирующие процессы гликозилирования и последующего фолдинга белков. Нарушение пространственной структуры белков в результате, например, стресса может активировать апоптоз. В передаче апоптогенных сигналов между митохондриями и ER, а также в активации каспаз важную роль играют ионы Ca^{2+} , механизмы действия которых пока не изучены. Однако известно, что передатчик сигналов Ca^{2+} , белок аннексин, необходим для освобождения митохондриями цитохрома С. Возможно, что аннексин передает сигналы Ca^{2+} , вызывающие нарушение мембраны митохондрий, из ER к митохондриям.

Важным внутриклеточным регулятором апоптоза является семейство *ингибиторов апоптоза* (IAP). Белки этого семейства ингибируют апоптоз двумя путями:

- 1) связыванием инициаторных прокаспаз и торможением их активации;
- 2) связыванием эффекторных прокаспаз и ингибацией их активности (см. рис. 4.19).

Члены семейства IAP были открыты как белки, продуцируемые вирусами насекомых, которые предотвращают самоубийство инфицированных клеток до репродукции вируса. Когда митохондрии освобождают цитохром С, активирующий медиатор апоптоза Араф-1 (apoptotic protease activating factor-1), они также освобождают белки семейства анти-IAP, активность которых создает условия для действия каспаз и активации апоптоза.

Активация апоптоза внеклеточными стимулами

Внешний путь активации апоптоза опосредован «рецепторами смерти» (death receptors) клеточной поверхности, содержащими цитоплазматические «домены смерти» (death domains, DD), которые входят в семейство фактора некроза опухоли (TNF). Это семейство рецепторов включает три различных белка: Cd95 (Fas/Apo1), Tnfr1 и Dr3 (Apo3/Ws11). После связывания с лигандом на поверхности клетки такой тримерный рецептор рекрутирует на своей цитоплазматической стороне адапторные белки, например белок Fadd (Fas receptor-associated DD), который, в свою очередь, рекрутирует и активирует прокаспазу 8. Активная каспаза 8 активирует эффекторы апоптоза, такие как каспазы 3 и 7, инициирующие основные его проявления. Внеклеточный и внутриклеточный пути активации апоптоза сопряжены друг с другом, например через медиатор внеклеточного пути — белок Bid, активация которого каспазой 8 сопровождается вовлечением внеклеточного пути (рис. 4.20).

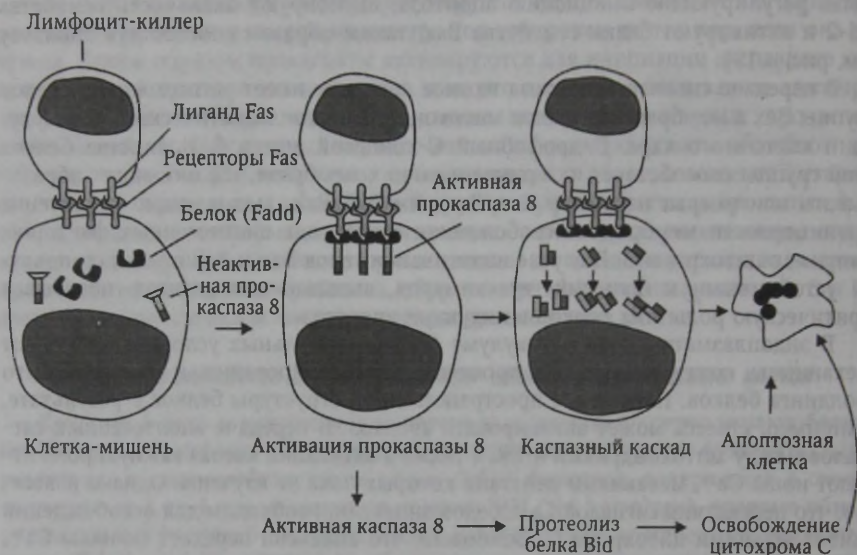


Рис. 4.20. Внеклеточный путь активации апоптоза (Недоспасов С. А., Лаврик И. Н., 2004)

Активация апоптоза внутриклеточными стимулами

Внутриклеточный путь активации апоптоза начинается в митохондриях, которые могут получать сигналы, подобные тем, что получают рецепторы Fas/Tnf (рис. 4.21). Начальным событием этого пути является освобождение из митохондрий цитохрома С, которое опосредуется белком Вах (белок наружной мембраны митохондрий, формирующий один из мембранных каналов). Белок Вах ингибируется членами семейства Bcl-2. При активации мембранного канала митохондрий увеличивается проницаемость мембраны, что сопровождается освобождением в цитозоль цитохрома С и изменением других митохондриальных функций. В цитозоле цитохром С взаимодействует с белком Араф-1 и множеством молекул прокаспазы 9, способствуя образованию активного комплекса — «апоптосомы», который активирует каспазу 9 (см. рис. 4.21). Подобно событиям во внешнем пути активации апоптоза, активация каспазы 9 сопровождается индукцией каспазного каскада, в ходе которого активируется эффекторная каспаза 3, индуцирующая основные проявления апоптоза.

Существуют специальные механизмы ингибиции апоптоза, которые направлены на выживание клеток. Например, киназа Akt передает сигналы выживания с активированных интегриновых рецепторов, которые взаимодействуют с лигандами внеклеточного матрикса, что может быть опосредовано фокальными адгезионными киназами. Akt фосфорилирует белок Bad, активирующий апоптоз. Фосфорилированный белок Bad связывается с одним из белков семейства 14-3-3 и инактивируется, что способствует выживанию клетки. Akt также способствует клеточному выживанию путем ингибиции перехода прокаспазы 9 в активированную форму и инактивации транскрипционных факторов семейст-

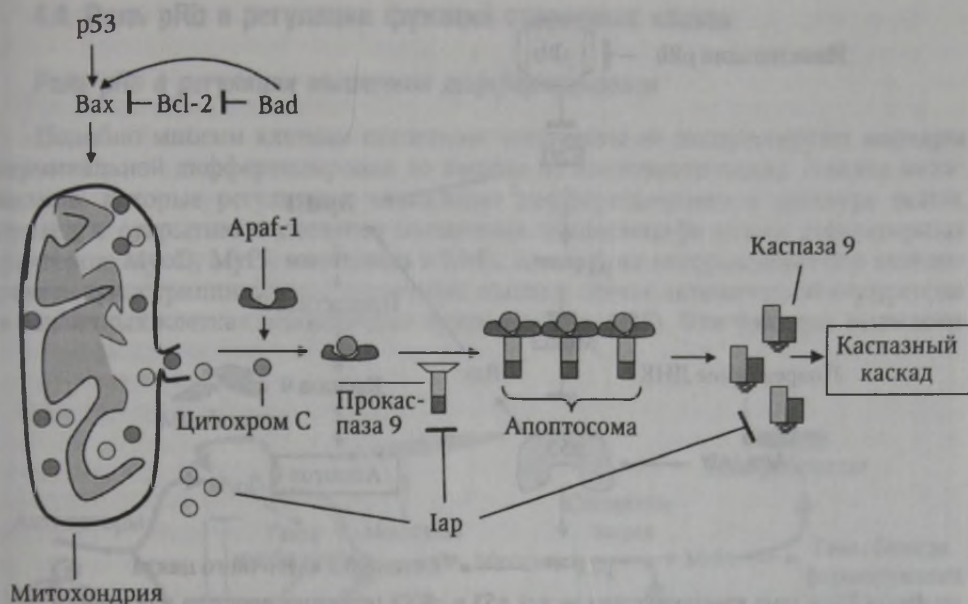


Рис. 4.21. Внутриклеточный путь активации апоптоза (Adams J. M., 2003)

ва FOX, которые в активном состоянии поддерживают апоптоз, облегчая синтез лигандов рецептора Fas (см. цв. вклейку, рис. 4.22). Факторы выживания могут ингибировать активность киназы Jnk, которая в нормальных условиях стимулирует экспрессию белка Vim группы белков VH3-only, активирующих апоптоз (см. рис. 4.19).

Взаимодействие между pRb и p53 в регуляции апоптоза

Хорошо известна роль pRb как ингибитора апоптоза. У эмбрионов мышей с инактивированным геном RB резко активируется апоптоз в периферической и центральной нервной системе, в клетках крови и печени. Потеря функций pRb может вызвать активацию зависимого от p53 пути активации апоптоза (рис. 4.23). Такой апоптоз служит внутренней защитой для элиминации клеток с deregulированным сигнальным путем pRb. Связь между pRb и p53 может опосредоваться белком E2f1, который освобождается при утрате функции pRb. Об этом свидетельствует тот факт, что у трансгенных мышей с инактивированным pRb возникают медленно растущие опухоли с высоким уровнем апоптоза, тогда как дополнительная инактивация p53 сопровождается появлением быстро растущих опухолей, что связано с 85 %-ным снижением уровня апоптоза у таких животных. Сопутствующая инактивация гена E2F1 у таких мышей ведет к 89 %-му снижению уровня апоптоза, зависимого от E2f1. Мыши с эмбриональным нокаутом RB погибают в середине эмбрионального периода с признаками широко распространенного апоптоза, тогда как дополнительная инактивация E2f1 ведет к значительному снижению уровня апоптоза, а также снижению активности сигнального пути p53. E2f1 способен индуцировать экспрессию проапоптозного

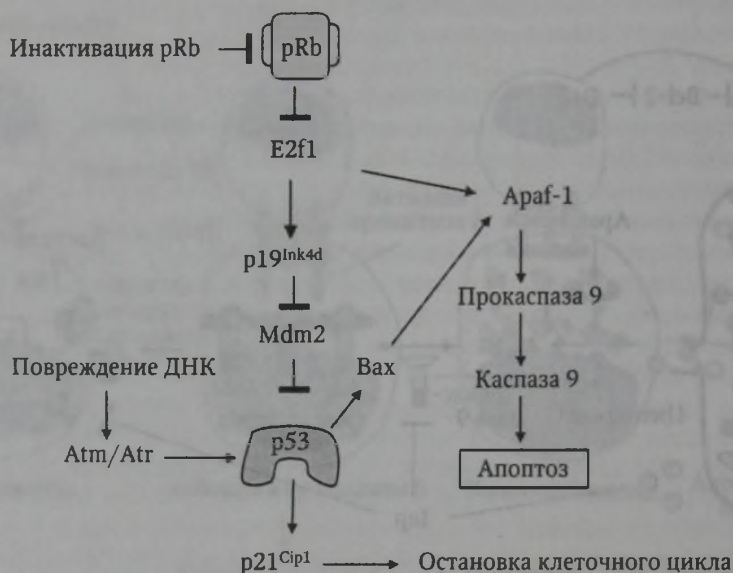


Рис. 4.23. Схема взаимодействия между p53 и pRb в регуляции апоптоза и остановки клеточного цикла (Lundberg A. S., Weinberg R. A., 2000)

фактора Araf1 и вызывать активацию транскрипции генов каспаз 3 и 7. Взаимодействие между сигнальными путями pRb и p53 происходит в рестрикционной точке R1 фазы G1 и опосредуется CdkI p21^{Cip1}, а также семейством CdkI, которые кодируются локусом Ink4 (рис. 4.24).

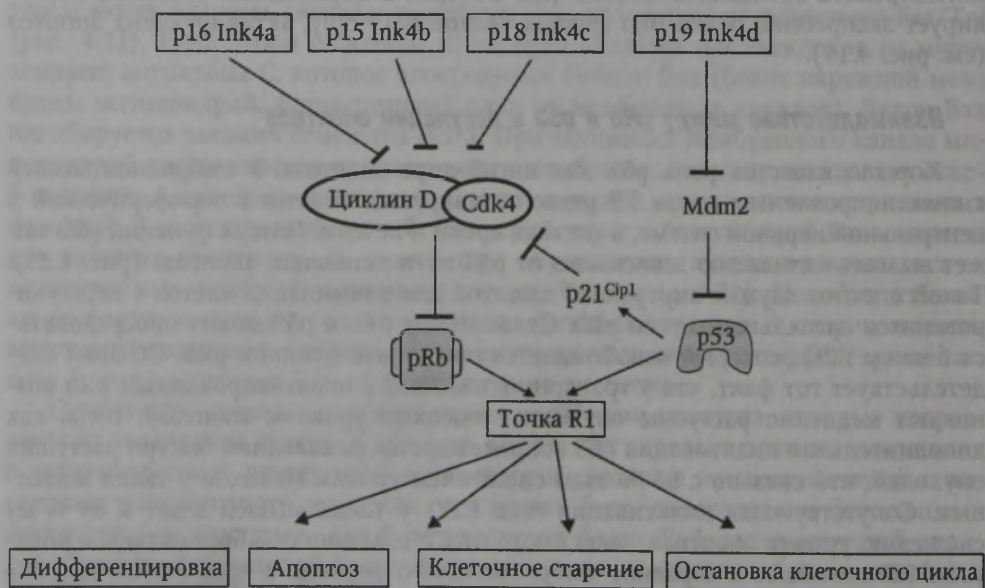


Рис. 4.24. Семейство ингибиторов киназ Ink4 и CdkI p21^{Cip1} связывают сигнальные пути pRb и p53 в рестрикционной точке R1 (Sherr C. J., Roberts J. M., 1999)

4.4. Роль pRb в регуляции функций стволовых клеток

Роль pRb в регуляции мышечной дифференцировки

Подобно многим клеткам скелетные миобласты не экспрессируют маркеры терминальной дифференцировки до выхода из клеточного цикла. Анализ механизмов, которые регулируют мышечную дифференцировку в культуре ткани, привел к открытию 4 скелетно-мышечных тканеспецифических регуляторных факторов: MyoD, Myf5, миогенина и Mrf4, каждый из которых способен активировать транскрипцию генов скелетных мышц в случае эктопической экспрессии в различных клетках немышечной природы (рис. 4.25). Эти факторы выявляют

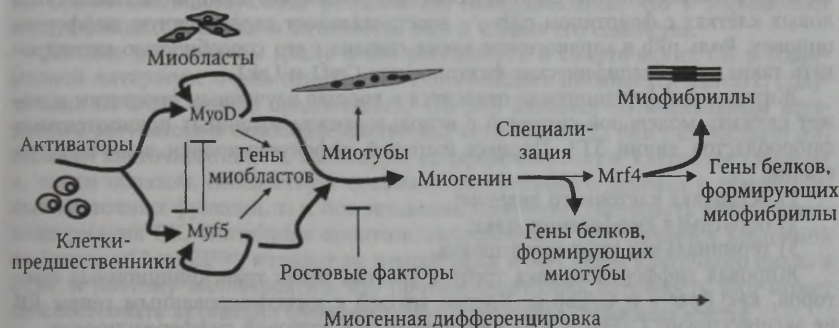


Рис. 4.25. Роль тканеспецифических факторов семейства MyoD в мышечной дифференцировке (Olson E. N., Klein W. H., 1994)

80 %-ную аминокислотную идентичность в мотиве bHLH, который опосредует димеризацию и связывание ДНК. В области amino- и карбоксильных доменов, которые функционируют как транскрипционные активаторы, белки семейства bHLH имеют только ограниченное подобие. Миогенные белки bHLH формируют гетеродимеры с убиквитарными белками того же семейства, известными как белки E. В форме гетеродимеров они активируют транскрипцию мышечноспецифических генов при помощи связывания с последовательностями CANNTG (Е-боксы), выполняющими функцию специфических сайтов связывания в промоторах и инхансерах мышечных генов (рис. 4.26). pRb регулирует мышечную дифференцировку путем остановки клеточного цикла, связывания димеров bHLH на промоторах и инхансерах специфических мышечных генов и активации транскрипции таких генов.



Рис. 4.26. Роль pRb в регуляции мышечной дифференцировки (Wei O., Paterson B. M., 2001)

Роль pRb в регуляции кроветворной, миокардиальной и жировой дифференцировки

В настоящее время хорошо известно, что pRb участвует в регуляции дифференцировки многих тканевых линий. Возможно, что вызываемая pRb остановка клеточного цикла является необходимым условием для последующей терминальной дифференцировки многих тканей, хотя механизмы этих явлений различны. Клетки некоторых линий, например лимфоциты и кардиомиоциты, начинают дифференцировку, находясь в клеточном цикле. Однако дифференцировка сердечной мышцы у мышей с отсутствием экспрессии гена RB замедляется, что сочетается со сниженной экспрессией кардиоспецифических транскрипционных факторов Nkx2.5 и Mef2c. Эктопическая экспрессия pRb в эмбриональных стволовых клетках с фенотипом pRb^{-/-} восстанавливает кардиогенную дифференцировку. Роль pRb в кардиогенезе также связана с его способностью активировать такие тканеспецифические факторы, как Cmf1 и Lek1.

Жировая дифференцировка относится к хорошо изученным процессам и может служить модельной системой с использованием мышиных полипотентных фибробластов линии 3T3. Процесс жировой дифференцировки включает три стадии:

- 1) остановка клеточного деления;
- 2) обратимая дифференцировка;
- 3) терминальная дифференцировка.

Жировая дифференцировка требует участия таких транскрипционных факторов, как Pparg-γ и C/EBP-α. Клетки мышей с инактивированным геном RB не экспрессируют C/EBP-α и не индуцируются к жировой дифференцировке.

У эмбрионов мышей с инактивацией гена RB нарушается эритроидная дифференцировка. pRb может также детерминировать в клетках-предшественниках, экспрессирующих маркер стволовых клеток CD34, выбор между нейтрофильной и моноцитарной судьбой. В частности, pRb взаимодействует с транскрипционным фактором C/EBP-α в активации моноцитарной дифференцировки, супрессируя при этом гранулоцитарную дифференцировку.

Роль pRb в регуляции самоподдержания стволовых клеток

Предположительно, pRb играет ключевую роль в регуляции самоподдержания стволовых клеток, активируя ее сопряжение с терминальными функциями. В ЭСК белки, кодируемые генами локуса Ink4, ингибиторы киназ семейств Cip/Kip и их посредники — продукты семейства гена ретинобластомы — не играют большой роли в регуляции клеточного цикла (см. цв. вклейку, рис. 9.11). Фаза G1 в эмбриональных стволовых клетках имеет короткую продолжительность, большинство клеток находятся в фазе S; pRb гиперфосфорилирован, а p130 не экспрессируется. Среди циклинов только циклин B проявляет характерную для соматических дифференцирующихся клеток цикличность экспрессии.

Только в случае потери способности к самоподдержанию и активации дифференцировки в ЭСК экспрессия циклинов A и E становится зависимой от клеточного цикла и контролируется активностью комплексов циклины—Cdk и, соответственно, белков семейства pRb. Наоборот, инактивация всех генов семейства pRb в мышиных эмбриональных фибробластах вызывает их иммортализацию, потерю чувствительности к сигналам, вызывающим клеточное старе-

ние. Таким образом, можно предположить, что самоподдержание в ЭСК сопряжено с функциональной инактивацией генов семейства ретинобластомы.

Эти данные поддерживаются результатами исследований по изучению роли pRb в индукции клеточного старения. Установлено, что семейство генов PcG и его член, Bmi1, активно противодействуют клеточному старению путем ингибции генов локуса Ink4, активность которых опосредуется через pRb и опухолевый супрессор p53. Активация pRb играет ключевую роль в индукции клеточного старения (см. рис. 6.6). Ген Bmi1 был клонирован как онкоген, который амплифицирован при некоторых формах лейкозов. Если исходить из представления, что опухоли возникают из стволовых опухолевых клеток, то нужно считать факт повышенной активности гена Bmi1 и связанной с ним супрессии гена RB прямо соответствующим результатам, показывающим, что в нормальных и опухолевых СК снижена активность pRb и членов его семейства.

Данные о клеточном цикле и его регуляторах в соматических СК в современной литературе очень отрывочны. На основании имеющихся данных, полученных на ЭСК, можно предполагать, что pRb является потенциальным негативным регулятором самоподдержания для всех типов СК. pRb способствует ингибции клеточного цикла, активирует дифференцировку и клеточное старение и, таким образом, способствует сопряжению клеточного деления и убиквитарных клеточных функций, т. е. потенциально может способствовать потере самоподдержания СК. Ингибция апоптоза, активируемая pRb, является зависимой от белков p53 и p21^{Cip1}, которые не играют роли в регуляции клеточного цикла в ЭСК, и поэтому маловероятно, что противоапоптотная активность pRb может способствовать активации функции самоподдержания стволовых клеток.

4.5. Получение антител к нефосфорилированным и фосфорилированным сайтам pRb

Для получения рекомбинантных фрагментов молекулы pRb можно использовать систему GST (глутатион трансфераза), основанную на экспрессии исследуемого полипептида в составе рекомбинантного белка с Gst и его последующей аффинной очистке с помощью глутатион-сефарозы (рис. 4.27). К достоинствам этой системы следует отнести наличие в экспрессионном векторе промотора РТАС, который индуцируется при добавлении в культуральную среду углевода изопропилтиогалактозида (Ипгт). Под контролем промотора РТАС находится ген глутатион трансферазы, за которым следует последовательность для клонирования, содержащая сайты для часто используемых рестриктаз, например EcoRI, BamHI и HindIII, что позволяет клонировать требуемый фрагмент гена в любой рамке считывания. Иногда экспрессируемый белок является токсичным для клеток, что отрицательно сказывается на их способности к росту. Чтобы избежать подобных осложнений, вектор pGEX содержит ген LACI^q, кодирующий репрессор, который подавляет экспрессию белка в отсутствие индуктора вне зависимости от штамма используемых клеток. Кроме того, система GST позволяет элюировать белок в сравнительно мягких условиях (используется 5 мМ глутатион), не прибегая к значительному увеличению ионной силы и крайним значениям pH. Глутатион можно удалить из очищенных белковых препаратов диализом или очисткой на сефадексе G-50. За геном GST следует сайт фактора Ха

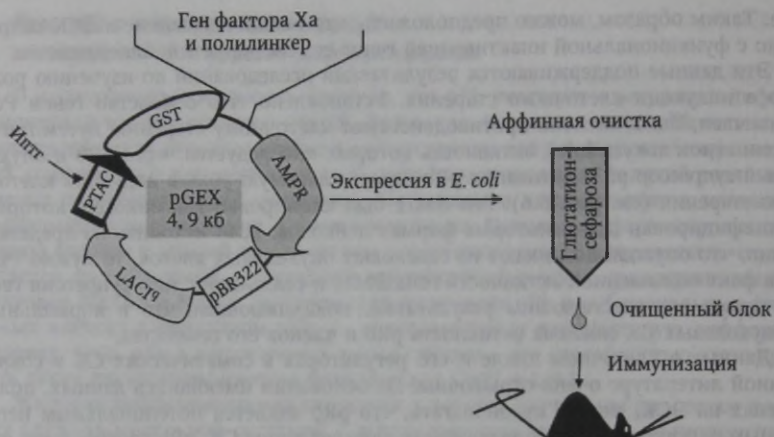


Рис. 4.27. Схема получения рекомбинантного белка в бактериальной системе для индукции иммунного ответа (Smith B., Johnson K. S., 1988)

или другого фермента, обработка которым химерного белка позволяет разделить его на Gst и клонируемый полипептид.

Система, основанная на использовании фермента глутатион трансферазы, была описана в 1988 г. Фермент Gts с молекулярной массой 26 кДа, выделенный из тканей червей *Schistosoma janonica* (Sj26), экспрессировали в *E. coli* в функционально активной форме. Многие изоформы Gst млекопитающих могут быть очищены с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном глутатионе с последующей конкурентной элюцией избытком восстановленного глутатиона. Нативный Sj26, а также Sj26, который экспрессируется в *E. coli*, в равной степени обладают способностью обратимо адсорбироваться на колонке с глутатионом.

Для получения экспрессионных векторов, содержащих требуемые фрагменты гена RB, нужные последовательности ДНК амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции. Праймеры для амплификации должны содержать рестрикционные сайты тех рестриктаз, которые предполагается использовать для получения рекомбинантной ДНК, например сайты для рестриктаз BamHI (5'-праймер) и EcoRI (3'-праймер). Такой прием позволяет получить правильную ориентацию интересующих фрагментов по отношению к вектору при лигировании. В праймерах с каждой стороны от рестрикционного сайта должны содержаться фланкирующие последовательности из 4 (для BamHI) и 5 нуклеотидов (для EcoRI), поскольку для полноценного действия разным рестриктазам необходимы участки ДНК различной протяженности, ограничивающие сайт распознавания с каждой стороны.

Праймеры подбираются так, чтобы фрагменты гена RB после лигирования считывались в одной рамке с Gst. Таким образом, использование праймеров с указанными характеристиками оптимизирует условия для последующего лигирования. Для синтеза белка с использованием полученных плазмид применяют клетки *E. coli* штамма Bl21, в которых не экспрессируются некоторые протеазы.

Известно, что при значительных уровнях экспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* может происходить появление в цитоплазме гранул (тельца включения), которые можно отделить от экстракта клеток центрифугированием. В некоторых случаях тельца включения не формируются и образуется полностью растворимый рекомбинантный белок, который может быть очищен аффинной хроматографией на глутатион-сепарозе. Степень очистки полученного препарата определяется путем денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.

Для идентификации pRb с помощью полученных антител можно использовать клеточные линии, продуцирующие нормальный или мутантный белок. С этой целью клетки метаболически метят [^{35}S]-метионином и иммунопреципитируют антителами к pRb. Идентификация в контроле белка с молекулярной массой 105–116 кДа, который отсутствует в клетках, не экспрессирующих pRb, является хорошим тестом на специфичность полученных антител. Для тестирования фосфорилирования этого белка клетки метаболически метятся [^{32}P]-фосфорной кислотой. Если антитела иммунопреципитируют белок, который движется при электрофорезе как одиночная полоса с ММ, идентичной той, с которой двигался pRb, помеченный [^{35}S]-метионином, то эти данные подтверждают специфичность полученных антител.

Антитела к специфическим сайтам фосфорилирования pRb впервые были получены путем химического синтеза фосфопептидов в качестве антигенов. Для синтеза пептидов со стабильно фосфорилированным серином или треонином остаток Cys соединяется с N-концом пептида с тем, чтобы оставить возможность для последующей конъюгации с белком-носителем, например с Klh, с целью более эффективной иммунизации (рис. 4.28). Поскольку эпитопы антител могут состоять из трех-четырех АА, рекомендуется не помещать более трех АА в С-концевом участке фосфосерины/треонина. Если эта часть антигена содержит более трех АА, образующиеся антитела могут распознавать нефосфорилированный эпитоп. Принято включать пять АА остатков на N-концевом участке антигена между фосфорилированным остатком и Cys.

Если пептид получается слишком гидрофобным, это делает его нерастворимым. Чтобы избежать получения гидрофобного пептида, два-три гидрофобных АА остатка на стороне цистеина (Cys) заменяют остатками аргинина (Arg). Для целей химического синтеза следует избегать расположения остатков Met или Cys внутри молекулы. В случае, если невозможно избежать включения несоответствующих оригиналу аминокислотных остатков в N-концевой части молеку-

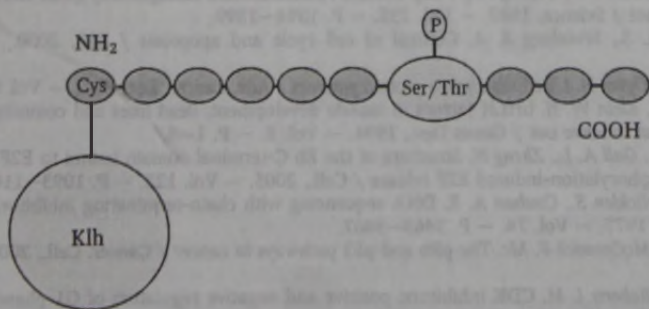


Рис. 4.28. Схема приготвления антигена для получения антител против фосфорилированных сайтов белков (Taya Y. [et al.], 2003)

лы, рекомендуется изменить длину N-концевой части на С-концевую и конъюгировать K1h с С-концевым участком.

Для синтеза фосфопептида существует две основные стратегии:

1) метод предварительного фосфорилирования, в котором защищенные фосфорилированные производные аминокислот используются в качестве строительных блоков для синтеза пептида;

2) метод последующего фосфорилирования, в котором незащищенные гидроксильные группы фосфорилируются на полностью собранной пептидной цепи.

Литература

- Киселев Ф. Л. Вирус-ассоциированные опухоли человека: рак шейки матки и вирусы папиллом / Биохимия, 2000. — Т. 65. — С. 79–91.
- Копнин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Биохимия, 2000. — Т. 65. — С. 5–33.
- Недоспасов С. А., Лаврик И. Н. Механизмы активации программируемой клеточной гибели через рецепторы смерти / Канцерогенез; под ред. Д. Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 168–179.
- Чумаков П. М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью / Биохимия, 2000. — Т. 65. — С. 34–47.
- Abraham T. M. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases / Genes Dev., 2001. — Vol. 15. — P. 2177–2196.
- Adams J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis / Genes Dev., 2003. — Vol. 17. — P. 2481–2495.
- Friend S. H. [et al.]. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma / Nature, 1986. — Vol. 323. — P. 643–647.
- Galderisi U., Cipollaro M., Giordano A. The retinoblastoma gene is involved in multiple aspects of stem cell biology / Oncogene, 2006. — Vol. 25. — P. 5250–5256.
- Grana X. [et al.]. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth / Oncogene, 1998. — Vol. 17. — P. 3365–3383.
- Harbour J. W., Dean D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms / Genes Dev., 2000. — Vol. 14. — P. 2393–2409.
- Knudsen E. S., Wang J. Y. J. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites / JBC, 1996. — Vol. 271. — P. 8313–8320.
- Knudson A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma / Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971. — Vol. 68. — P. 820–823.
- Lee J.-O., Russo A. A., Pavletich N. P. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7 / Nature, 1998. — Vol. 391. — P. 859–865.
- Lee W. H., Bookstein R., Hong F. [et al.]. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence / Science, 1987. — Vol. 235. — P. 1394–1399.
- Lundberg A. S., Weinberg R. A. Control of cell cycle and apoptosis / EJC, 2000. — Vol. 35. — P. 1886–1994.
- Morris E. J., Dyson N. J. Retinoblastoma protein partners / Adv. Cancer. Res., 2001. — Vol. 82. — P. 1–54.
- Olson E. N., Klein W. H. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out / Genes Dev., 1994. — Vol. 8. — P. 1–8.
- Rubin S. M., Gall A. L., Zheng N. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release / Cell., 2005. — Vol. 123. — P. 1093–1106.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977. — Vol. 74. — P. 5463–5467.
- Sherr C. J., McCormick F. Mc. The pRb and p53 pathways in cancer / Cancer. Cell., 2002. — Vol. 2. — P. 103–112.
- Sherr C. J., Roberts J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression / Genes Dev., 1999. — Vol. 13. — P. 1501–1512.
- Skapek S. X., Pan Y.-R., Lee E. Y.-H. P. Regulation of cell lineage specification by the retinoblastoma tumor suppressor / Oncogene, 2006. — Vol. 25. — P. 5268–5276.

- Smith B., Johnson K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase / Gene. 1988. — Vol. 67. — P. 31–40.
- Taya Y., Nakajima K., Yoshizawa-Kumagaye K. [et al.]. Generation and application of phospho-specific antibodies for p53 and pRB / Methods Mol. Biol., 2003. — Vol. 223. — P. 17–26.
- Wei O., Patterson B. M. Regulation of MyoD function in the dividing myoblasts / FEBS Lett., 2001. — Vol. 490. — P. 171–178.
- Weinberg R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control / Cell., 1995. — Vol. 81. — P. 323–330.
- Welch P. J., Wang J. Y. J. Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment / Genes Dev., 1995. — Vol. 9. — P. 31–46.
- Willis S. N., Adams J. M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis / Curr. Opin. Cell. Biol., 2005. — Vol. 17. — P. 617–625.

ГЛАВА 5 || РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ В РАБОТЕ МАШИНЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

5.1. Структура и функции хроматина

***Молекулы ДНК упакованы в хроматин
и суперконденсированы в хромосомы***

У всех эукариот ДНК упакована в ядре в хроматин, которым называют комплексы ядерной ДНК со специфически взаимодействующими с ней белками. Функции хроматина включают не только оптимальную упаковку геномной ДНК, длина которой у человека составляет примерно 1 м в клетке диаметром 5–10 мкм. На уровне хроматина происходит дополнительная регуляция всех функциональных состояний ДНК: репликации, репарации и экспрессии генов.

Хроматин подразделяют на гетеро- и эухроматин. Гетерохроматин был вначале определен цитогенетически как часть генома, которая остается конденсированной после перехода от метафазы к интерфазе. По расположению гетерохроматин соответствует теломерам, центромерам и хромосомным зонам, которые находятся в местах прикрепления к перинуклеарному отделу. Области гетерохроматина обогащены повторяющимися последовательностями. В них относительно мало генов, отмечается низкая транскрипционная активность, поздно начинается репликация. Напротив, эухроматин представляет собой часть генома, которая деконденсирована в интерфазе, содержит большую часть генов, является транскрипционно активной и реплицируется раньше, чем гетерохроматин. Организация хроматина может изменяться локально в геноме в ответ на клеточные стимулы и дифференцировочные программы. Эукариоты выработали способы суперконденсации ДНК путем ее упаковки в хромосомы. Например, хромосома 22 человека содержит около 48 млн нуклеотидных пар. Вытянутая из конца в конец ее ДНК должна протянуться на 1,5 см. Однако, в митозе эта хромосома имеет протяженность 2 мкм, показывая сжатие в 10 000 раз. Такая укладка хромосомы осуществляется белками, которые скручивают и укладывают ДНК в новые формы. Интерфазная ДНК сжата не так сильно, примерно в 1000 раз. Структура хромосомы динамична, в клеточном цикле конденсируется не только хромосома в целом, но и отдельные ее части, изменяя доступ к специфическим последовательностям ДНК для регуляции генной экспрессии, репарации и репликации. Поэтому упаковка хромосом должна осуществляться таким образом, чтобы разрешать регуляторным белкам быстрый, но локальный доступ к ДНК.

***Нуклеосомы являются основными единицами
структуры хроматина у эукариот***

Белки, связывающие ДНК в эукариотических хромосомах, традиционно делятся на два больших класса: *гистоны* (Н) и *негистоновые белки*. Гистоны присутствуют в громадном количестве в каждой клетке — около 60 млн молекул

каждого типа на одну клетку человека, так что общая масса гистонов в клетке примерно равна массе ДНК.

Основной структурной единицей хроматина является *нуклеосома*, которая состоит из 147 пар оснований ДНК и делает 1,7 оборота в левом вращении вокруг белковой сердцевины — *гистонового октамера*. Гистоновый октамер состоит из 8 молекул 4 гистоновых белков — по 2 молекулы каждого из гистонов: H2A, H2B, H3, и H4. В сборке нуклеосомы гистоновые укладки сначала связывают одна другую, чтобы сформировать H3—H4 и H2A—H2B димеры и тетрамеры, а затем H3—H4 тетрамер формирует октамер с H2A—H2B тетрамером, вокруг которого закручивается ДНК (см. цв. вклейку, рис. 5.1, а). Не все октамеры содержат основные гистоны H2A, H2B, H3 и H4. В некоторых частях хромосомы они замещены вариантными гистонами, которые отличаются от основных гистонов модификациями, необходимыми для локальной функции хроматина. Вариантным гистоном H3 является гистон CenH3, который находится в нуклеосомах центромеров, прикрепляющих хромосомы к митотическому веретену. Вариантные гистоны H2A.Z и H3.3 найдены в активно транскрибируемом хроматине, а вариантный гистон H2A.X находится в областях повреждения ДНК.

Каждая нуклеосомная частица отделена от другой частицы линкерной ДНК, которая может отличаться в длине от нескольких до 80 нуклеотидных пар. В среднем нуклеосома повторяется с интервалом примерно 200 нуклеотидных пар. Например, диплоидная клетка человека содержит $6,4 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов, упакованных в $3 \cdot 10^7$ нуклеосом. Образование нуклеосом переводит ДНК в хроматиновую нитку около $\frac{1}{3}$ первоначальной длины, которая формирует структуру, называемую «бусы на нитке», и представляет собой первый уровень упаковки ДНК. Хроматин в клетке организован в более сложную структуру, которая под электронным микроскопом видна в форме фибрилл с диаметром около 30 нм (см. цв. вклейку, рис. 5.1, б).

Формирование 30-нанометровой нитки ДНК зависит от взаимодействия между соседними нуклеосомами, между гистонами, между гистонами и негистоновыми белками. Линкерный гистон H1 связывается с ДНК в месте ее отделения от гистонового октамера и стабилизирует 30-нанометровую структуру хроматина путем нейтрализации негативного заряда на ДНК, а также путем взаимодействия с гистоновым октамером и негистоновыми белками (см. цв. вклейку, рис. 5.2, б).

Все 4 основных гистона — сравнительно маленькие белки, состоящие из 102–105 аминокислотных остатков. Гистоны включают структурный мотив, известный как гистоновая укладка, образованный тремя α -спиралями и двумя петлями. В дополнение к гистоновой укладке, каждый из основных гистонов имеет длинный N-концевой участок — «хвост», который протягивается вне ДНК-овой гистоновой сердцевины и подвергается нескольким видам ковалентной модификации (см. цв. вклейку, рис. 5.2, а). Гистоны — одни из самых консервативных эукариотических белков. Например, аминокислотная последовательность гистона H4 горошины и коровы отличается только двумя из 102 аминокислотных остатков. Это предполагает, что почти все аминокислоты гистонов функциональны и изменение любого из них повреждает структуру и функции хроматина.

Механизмы изменения временной и пространственной организации хроматина. Роль ковалентной модификации гистонов

Клетка выработала несколько механизмов быстрого изменения организации хроматина, необходимых как для прохождения митотического и мейотического деления, так и для быстрого ответа на внутренние и внешние стимулы. К таким механизмам относятся:

1) посттрансляционные ковалентные модификации гистонов в пределах нуклеосом, которые затрудняют или облегчают взаимодействие регуляторных белков с хроматином;

2) использование АТФ-зависимых ремоделирующих комплексов, которые нарушают контакты между нуклеосомами, таким образом, способствуя упрощению структуры хроматина;

3) канонические гистоны в нуклеосомах могут быть замещены другими гистонами;

4) метилирование в 5' положении остатков цитозина, представленных в динуклеотиде CpG, с помощью *метилтрансфераз ДНК* (Dnmt) облегчает долгосрочный *сайленсинг генов* и обеспечивает стабильность генома.

Сайленсинг генов достигается путем распознавания метилцитозинспецифическими белками, связывающими метилированные остатки ДНК, которые рекрутируют транскрипционные репрессорные комплексы, модифицирующие гистоны.

Определение *эпигенетический* относится к информации, содержащейся не в последовательностях ДНК, а в хроматине, и передающей по наследству специфический рисунок экспрессии генов. Механизмы эпигенетической регуляции часто оперируют координированно в конкретном локусе и представляют собой сложную эпигенетическую сеть, которая контролирует экспрессионные программы генов у высших эукариот. Изменения эпигенетического баланса ведут к изменениям экспрессии генов и могут сопровождаться злокачественной трансформацией клетки.

N-концевая последовательность («хвост») каждого из четырех гистонов консервативна и выполняет критические функции в регуляции структуры хроматина. «Хвост» каждого гистона может подвергаться многим типам ковалентных модификаций, основными из которых являются ацетилирование и метилирование лизинов, метилирование аргининов, фосфорилирование серинов и треонинов и убиквитинирование лизинов (табл. 5.1).

Таблица 5.1

**Некоторые типы модификаций гистонов
и их функциональная значимость (Kouzarides T., 2007)**

Тип модификации хроматина	Модифицированный аминокислотный остаток	Регулируемая функция
Ацетилирование (ac) лизинов (K)	K-ac	Транскрипция, репарация, репликация, конденсация
Метилирование (me) лизинов (K)	K-me1, K-me2, K-me3	Транскрипция, репарация
Метилирование аргининов (R)	R-me1, R-me2a, R-me2s	Транскрипция
Фосфорилирование (ph) серинов (S) и треонинов (T)	S-ph, T-ph	Транскрипция, репарация, конденсация
Убиквитинирование (ub) лизинов (K)	K-ub	Транскрипция, репарация

Большинство модификаций гистоновых «хвостов» являются динамичными, т. е. вызываются и отменяются специфическими ферментами, многие из которых уже идентифицированы (табл 5.2).

Таблица 5.2

Ферменты, модифицирующие гистоны, и модифицируемые ими аминокислотные остатки (Kouzarides T., 2007)

Название фермента	Модифицируемый остаток	Название фермента	Модифицируемый остаток
<i>Ацетилтрансферазы</i>		<i>Аргининовые метилтрансферазы</i>	
Hat1	H4 (K5, K12)	Carm1	H3 (R2, R17, R26)
Cbp/p300	H3 (K14, K18) H4 (K5, K8) H2A (K5) H2B (K12, K15)	Prmt4	H4R3
Pcaf/Gcn5	H3 (K9, K14, K18)	Prmt5	H3R8, H4R3
Tip60	H3 (K14) H4 (K5, K8, K12, K16)	<i>Серин/треониновые киназы</i>	
<i>Лизиновые метилтрансферазы</i>		Haspin	H3T3
Suv39h1/h2	H3K9	Msk1/2	H3S28
Mll1–5	H3K4	CkiI	H4S1
Set1a/b	H3K4	Mst1	H2BS14
Nsd1	H3K36	<i>Убиквитиназы</i>	
Ezh2	H3K27	Bmi/Ring1a	H2AK119
Suv420h1/h2	H4K20	Rnf20/Rnf40	H2BK120

Например, ацетильные группы лизинов удаляются гистоновыми деацетилазами, а метильные — деметилазами. Исключением является метилирование аргининов, деметилирующая активность для которых не была найдена.

Модификации гистонов оказывают влияние на стабильность 30-нанометровой хроматиновой нити и более высокоорганизованных структур хроматина. Например, ацетилирование гистонов ведет к дестабилизации хроматиновой структуры, так как добавление ацетильной группы удаляет положительный заряд с лизина, что создает необходимость нейтрализовать отрицательный заряд ДНК при упаковке хроматина. Однако, наиболее глубокий эффект модифицированных гистонов заключается в их способности привлекать специфические белки к модифицированному участку хроматина. В зависимости от характера модификации эти изменения могут способствовать дальнейшему уплотнению хроматина или, наоборот, облегчению доступа к ДНК. В настоящее время найдено более 60 аминокислотных остатков гистонов, которые могут быть модифицированы. Было предположено, что благодаря ковалентной модификации гистонов измененный участок хроматина может передавать особый сигнал в клетку. Например, один тип маркирования может сигнализировать, что участок хроматина был только что реплицирован. Другое маркирование может показывать, что экспрессия генов не нужна в данное время. Согласно этой идее, гистоны с различным маркированием взаимодействуют с белками, которые осуществляют разные функции. Поскольку гистоновые «хвосты» расположены снаружи от гистоновой нити, они доступны даже в том случае, когда хроматин конденсирован, и обеспечивают удобный формат для передачи сигналов, направленных на регуляцию активности генов.

Как и комплексы, ремоделирующие хроматин, ферменты, которые модифицируют гистоны, представляют собой многокомпонентные белковые структуры. Белки, физически взаимодействующие с гистонами, распознают модифицированные участки через специфические домены. Например, метилированные остатки распознаются *хромодоменами*, ацетилированные — *бромодоменами*, а фосфорилированные — *доменами белков семейства 14-3-3* (см. цв. вклейку, рис. 5.3). Недавно были идентифицированы белки, которые специфически взаимодействуют с модифицированными участками хроматина. Например, белок Bptf, компонент комплекса NURF, ремоделирующего хроматин, распознает трижды метилированный лизин 4 гистона H3 (H3K4me3), а трижды метилированный лизин 27 гистона H3 (H3K27me3) распознается членом семейства Polycomb — белком Pc2. Белки семейства HP-1 связывают метилированный лизин 9 гистона H3 (H3K9me).

Множество модификаций гистонов предполагает возможность взаимодействий между модифицированными остатками, которые осуществляются несколькими различными способами. Например, один и тот же остаток лизина может подвергаться различным модификациям, которые взаимно исключают друг друга. Связывание белком определенного аминокислотного остатка может препятствовать модификации в соседнем сайте связывания. Например, фосфорилирование H3S10 препятствует взаимодействию Hp-1 с метилированным H3K9. Кроме того, каталитическая активность фермента может зависеть от модификации сайта распознавания в субстрате. Например, изомеризация пролина H3P38 влияет на метилирование лизина H3K36 метилтрансферазой Set2. Наконец, фермент может распознавать субстрат более эффективно в контексте другой модификации. Например, ацетилтрансфераза Gcn5 распознает H3 более эффективно в случае его фосфорилирования по H3S10.

Взаимодействие между модифицированными основаниями может происходить и в том случае, если они расположены на разных гистонах. Например, убиквитинация H2B необходима для метилирования H3K4me3.

АТФ-регулируемое ремоделирование хроматина

Эукариотические клетки содержат комплексы, ремоделирующие хроматин, которые представляют собой белковые машины, использующие энергию зависящего от АТФ гидролиза для временного изменения структуры нуклеосом, чтобы ДНК стала менее связанной с гистоновой основой (см. цв. вклейку, рис. 5.4). Ремоделирование может быть следствием изменения положения гистонового димера H2A—H2B в нуклеосоме, тогда как димер H3—H4 не изменяет своего положения. Ремоделирование нуклеосом имеет два важных последствия:

- 1) ремоделирование обеспечивает доступ к ДНК тем белкам, которые вовлечены в регуляцию транскрипции, репликации и репарации ДНК;
- 2) ремоделирующие комплексы могут катализировать изменения в положении нуклеосом вдоль ДНК или даже переносить гистоновые частицы с одной молекулы ДНК на другую.

Клетки содержат несколько комплексов, ремоделирующих хроматин, отличающихся друг от друга по своим свойствам. Большинство комплексов состоят из 10 и более белков. Вероятно, они используются всегда, когда эукариотическая клетка нуждается в прямом доступе к нуклеосомной ДНК для экспрессии генов репликации и репарации ДНК. Различные комплексы могут иметь черты,

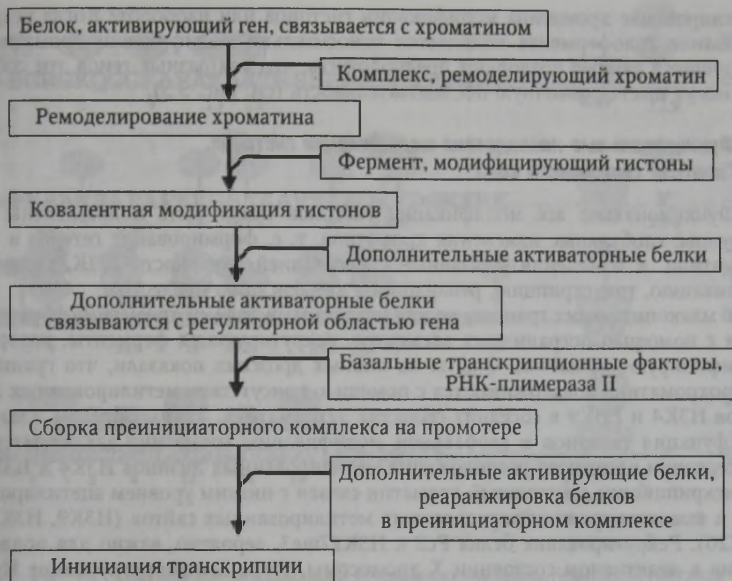


Рис. 5.5. Порядок событий, ведущий к инициации транскрипции с регуляторной части гена (Alberts B. [et al.], 2004)

отличающие один комплекс от другого: одни разрешают доступ к нуклеосомной ДНК, другие реформируют нуклеосомы в том случае, если доступ больше не нужен. Последовательность действия ремоделирующих хроматин комплексов и модифицирующих гистоны ферментов контролируется клеткой, которая влияет на структуру хроматина путем передвижения регуляторных белков к специфическим областям ДНК (рис. 5.5). Во время митоза, по крайней мере, некоторые из комплексов инактивируются путем фосфорилирования их белковых компонентов. Это помогает плотно упаковать митотические хромосомы.

Циклы модификаций гистоновых «хвостов» позволяют хроматиновой структуре быть динамичной, локально конденсируя и деконденсируя ее, и таким образом привлекать дополнительные белки для каждой модификации. Возможно, ферменты, модифицирующие гистоны, и ремоделирующие хроматин комплексы работают согласованно, чтобы конденсировать и деконденсировать одни и те же участки хроматина, а функциональная активность тех и других иницируется транскрипционными факторами, взаимодействующими со специфическими мотивами в регуляторной области гена (см. цв. вклейку, рис. 5.4). Некоторые хроматиновые ремоделирующие комплексы содержат в качестве субъединиц ферменты, модифицирующие хроматин, что дает возможность прямо объединить эти два процесса.

Поскольку транскрипционные факторы вызывают активацию генов различными путями, возникает вопрос, существует ли определенная последовательность активации генов различными факторами? Например, предшествует ли ре-

моделирование хроматина модификации гистонов или наоборот? Когда рекрутирование голофермента появляется относительно модификации хроматина? Имеющиеся данные позволяют предположить, что для разных генов эти события могут иметь различную последовательность (см. рис. 5.5).

Функциональные последствия модификации гистонов.

Гипотеза гистонового кода

Функционально все модификации гистонов могут быть подразделены на 2 группы: глобальные изменения хроматина, т. е. формирование гетеро- и эухроматина, и изменения, связанные с регуляцией активности ДНК, включая репликацию, транскрипцию, репарацию и конденсацию нуклеосом.

У млекопитающих границы между различными типами хроматина формируются с помощью пограничных элементов, рекрутирующих ферменты, которые модифицируют хроматин. Опыты на пивных дрожжах показали, что границы гетерохроматина поддерживаются с помощью присутствия метилированных лизинов H3K4 и H3K9 в соседних областях эухроматина. Таким образом, ключевая функция гистонов в глобальной модификации хроматина заключается в консервации взаимного расположения метилированных лизинов H3K4 и H3K9. Транскрипционно неактивный хроматин связан с низким уровнем ацетилирования и высоким уровнем определенных метилированных сайтов (H3K9, H3K27, H4K20). Рекрутирование белка Pc2 к H3K27me₃, вероятно, важно для поддержания в неактивном состоянии X хромосомы, тогда как рекрутирование Hр-1 к H3K9me необходимо для поддержания стабильности перичентрического гетерохроматина (см. цв. вклейку, рис. 5.3).

Модификации гистонов могут создавать или стабилизировать сайты связывания для регуляторных белков, например для транскрипционных факторов или белков, вовлеченных в модификацию хроматина или репарацию ДНК. Гипотеза гистонового кода основана на предположении, что каждая модификация гистона передает специфический смысл участку хроматина. Ацетилирование по лизинам 9, 14, 18, 23 в гистоне H3 и по лизинам 5, 8, 12, 16 в гистоне H4 коррелирует с активной транскрипцией (рис. 5.6). Метилирование лизинов 9 и 27 гистона H3 и лизина 20 гистона H4 является показателем транскрипционно неактивного хроматина, тогда как триметилирование или ацетилирование лизинов 4, 36, и 79 гистона H3 коррелирует с транскрипционно активным хроматином. Каждый лизин может быть метилирован одним, двумя или тремя метильными остатками. Комплекс гистоновой метилтрансферазы (Hmt) содержит белки Set1, относящиеся к семейству Trithorax. Белки Set1 опосредуют триметилирование лизина 4 гистона H3 (H3K4me₃), именно ту модификацию хроматина, которая найдена в высокоактивных генах и связана с открытыми хроматиновыми структурами *in vivo*. Остатки аргинина во 2, 17 и 26-м положении в гистоне H3 и в 3-м положении в гистоне H4 могут быть также метилированы, что часто сочетается с активацией генов определенных ядерных рецепторов. Примером связи между этими модификациями гистонов и сигнальными путями клеток является фосфорилирование гистона H3 по серину 10. Этот остаток может быть фосфорилирован киназой Rsk-2 в ответ на сигналы EGF или киназой Ikb в ответ на цитокины. Фосфорилирование серина 10 гистона H3 облегчает ацетилирование лизина 14 (рис. 5.6).

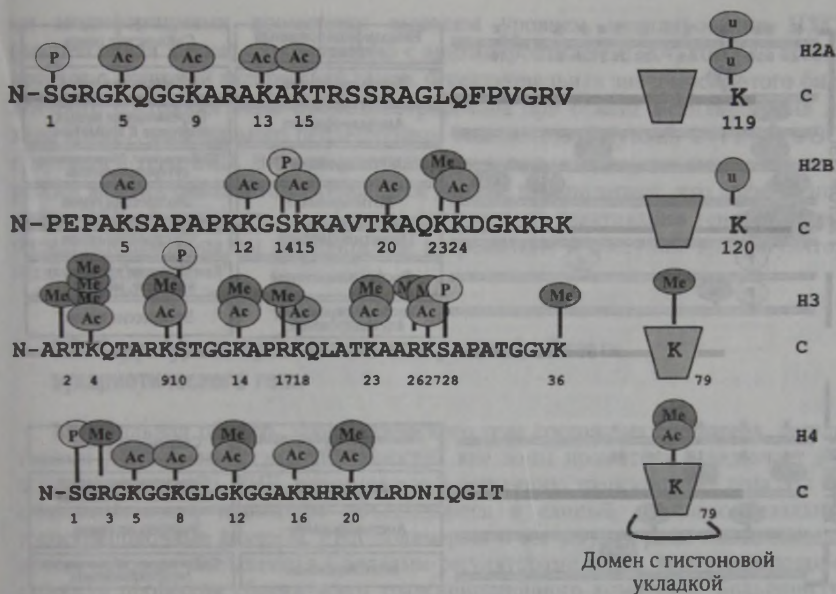


Рис. 5.6. Ковалентные модификации N-концевых последовательностей гистонов (гистоновых «хвостов») (Santos-Rosa H., Caldas C., 2005)

В настоящее время идентифицировано множество гистоновых ацетилтрансфераз (HAT) и гистоновых деацетилаз (Hdac), которые, в противоположность HAT, затрудняют доступ транскрипционных факторов к ДНК. Некоторые транскрипционные факторы и коактиваторы проявляют активность HAT, и наоборот, многие корепрессоры имеют активность Hdac. Транскрипционные факторы семейства E2F взаимодействуют с различными HAT, включая p300/Cbp, P/Caf и Tip60. Подобно другим транскрипционным факторам, белки семейства E2F могут быть ацетилированы ферментами p300/Cbp и P/Caf, которые усиливают их ДНК-связывающую и транскрипционную активность.

Известны несколько функционально специфических значений комбинаций ацетилированных гистонов. Например, гистон H3, ацетилированный по Lys14, и гистон H4, ацетилированный по Lys8 и 16, узнаются белками HAT, что необходимо для активации экспрессии генов (рис. 5.7). Ацетилирование лизина 5 и 12 гистона H4 и одного лизина гистона H3 немедленно после синтеза гистонов происходит в цитоплазме до того, как они формируют нуклеосому и катализируются HAT. Эти модифицированные гистоны взаимодействуют с ДНК после ее репликации, и их ацетильные группы удаляются вскоре после этого Hdac. Ацетилирование H3K14 и H4K8 сигнализирует о вновь синтезированном хроматине. Модификации определенных позиций в гистоновом «хвосте» могут иметь различный смысл в зависимости от других характеристик локальной структуры хроматина. Например, фосфорилирование H3 по серину 10 связано не только с конденсированием хромосом в митозе и мейозе, но и с экспрессией определен-



Рис. 5.7. Гипотеза гистонного кода (Santos-Rosa H., Caldas C., 2005)

ных генов. Некоторые модификации зависят друг от друга. Например, метилирование гистона H3 по лизину 9 препятствует фосфорилированию H3 по серину 10, и наоборот (см. рис. 5.7).

Особенности организации хроматина в эмбриональных стволовых клетках

У эмбрионов многоклеточных организмов обнаружена популяция клеток, которые стабильно демонстрируют специфическую транскрипционную программу и передают ее своим потомкам в процессе деления. Механизм сохранения рисунка экспрессии генов при его передаче от материнской к дочерней клетке не совсем понятен, однако установлена необходимость генов семейств *Trithorax* и *Polycomb* для их эпигенетического наследования. Гены семейства *Polycomb* играют ключевую роль и в поддержании идентичности ЭСК. Найдено, что в ЭСК промоторы примерно половины генов, кодирующих транскрипционные факторы поздних стадий дифференцировки, физически взаимодействуют с белками семейства *Polycomb* — *Phc1*, *Rnf2*, *Suz12*, *Eed*. Локализация связывания этих белков часто совпадает с сайтами, в которых найдены маркерные транскрипционные факторы ЭСК: *Oct3/4*, *Sox2* или *Nanog*. Причем сайты связывания транскрипционного активатора *Oct3/4* и транскрипционного репрессора *Pc* часто перекрываются. Ключ к пониманию этих результатов, возможно, содержится в необычной конфигурации хроматина в ЭСК. Например, транскрипционно неактивные гены в ЭСК мечены функционально противоположны-

ми модификациями хроматина: высоким уровнем метилирования H3K27 (репрессивная метка) одновременно с ацетилизированием H3K4, которая ассоциируется с активной экспрессией генов. Функциональная значимость этого бивалентного состояния была продемонстрирована при отмене метилирования лизина H3K27, вызываемого репрессорным комплексом Polycomb-2 (PRC2) в ЭСК с мутацией гена EED. В таких клетках отмечалась глобальная активация экспрессии многих бивалентных генов. Эти данные предполагают, что дифференцировка ЭСК может быть результатом селективной реактивации генов, которые определенным образом расположены в хроматине и доступны для регуляторных воздействий.

5.2. Структурная организация контрольной области зукариотического гена

Контрольная область зукариотического гена состоит из промотора, регуляторных ДНК-овых последовательностей вне зоны промотора и включает всю последовательность ДНК, вовлеченную в регуляцию транскрипции гена. На последовательности промотора объединяются в единый комплекс базальные транскрипционные факторы, РНК-полимераза и все регуляторные последовательности, которые связываются с белками-регуляторами генов, контролирующими скорость процессов сборки всего транскрипционного комплекса. Большинство белков-регуляторов, например Gal4, состоят из ДНК-связывающего домена (ДБД) и трансаактивирующего домена (ТАД), ускоряющего скорость инициации транскрипции (см. цв. вклейку, рис. 5.8).

Активаторный белок, находясь вблизи промотора, может привлекать к нему РНК-полимеразу, что, в свою очередь, опосредовано медиаторным комплексом, состоящим из многих белковых субъединиц. Белки-активаторы также могут облегчать инициацию транскрипции путем изменения хроматиновой структуры регуляторных последовательностей в промоторах генов, в частности, вызывать ковалентную модификацию гистонов и ремоделирование нуклеосом. Транскрипция иницируется после привлечения к промотору РНК-полимеразы, состоящей более чем из 100 белков. РНК-полимераза может привлекаться к промотору отдельно от основных транскрипционных факторов TFIId и TFIIa (см. цв. вклейку, рис. 5.8, а). Белки, активирующие гены, могут влиять на инициацию транскрипции различными способами, например путем транскрипционной синергии, при которой скорость транскрипции регулируется одновременно несколькими активаторными белками, что значительно превышает таковую при действии любого активатора в одиночку.

5.3. Механизмы взаимодействия между белками семейств pRb и E2F

Точные механизмы контроля клеточной пролиферации членами семейства pRb — «покетными» белками — не полностью изучены. «Покетные» белки физически связываются с широким рядом транскрипционных факторов и комплексов, взаимодействующих с хроматином. Принято считать, что основное влияние членов семейства pRb опосредуется факторами E2f, регулирующими транс-

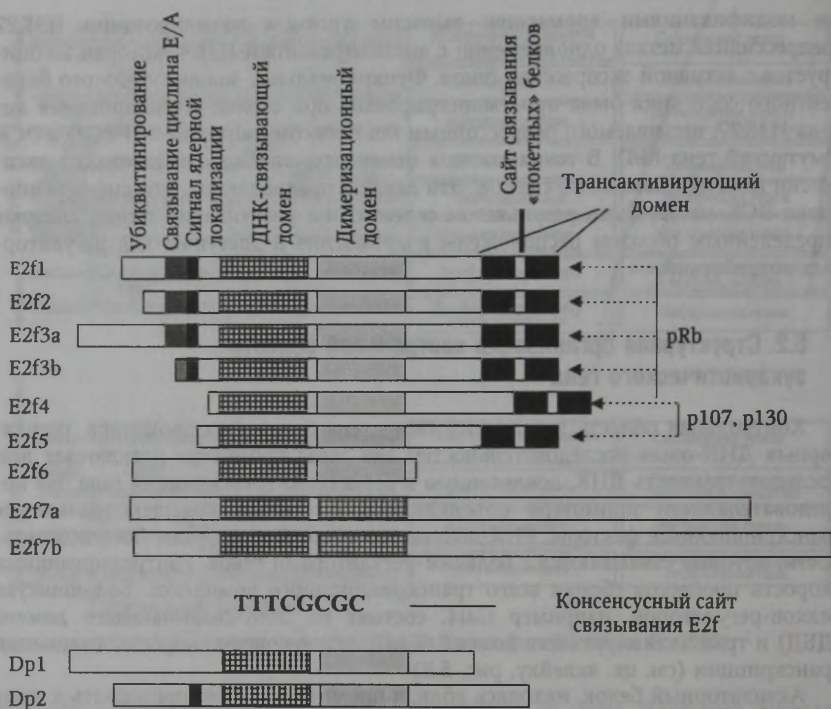


Рис. 5.9. Структурная характеристика белков семейств E2F и DP (Dyson N., 1998)

крипцию. Сайты связывания белков E2f найдены в промоторах многих генов, активность которых необходима для пролиферации клеток. Наиболее хорошо изученные факторы E2f эффективны в гетеродимерных комплексах, одна субъединица которых кодируется геном E2F, а вторая — геном DP (рис. 5.9).

Характеристика белков семейств E2F и DP

Транскрипционные факторы семейства E2F были вначале идентифицированы как связывающие ДНК белки, необходимые для активации промотора E2 в аденовирусном гене E1A. Взаимодействие E2F с последовательностью TTTCGCGC, представленной дважды в промоторе гена E1A аденовируса, стимулирует его транскрипцию. Сайты связывания белков E2f, в последующем найденные в промоторах генов человека и животных различных видов, можно подразделить на четыре функционально различные группы:

- 1) способствующие прогрессии клеточного цикла (с-MYC, с-MYB, циклины E/A, E2F1, CDK1–2, циклин B, CDC25A);
- 2) активирующие репликацию ДНК (дегидрофолатредуктаза, тимидинкиназа, тимидинсинтетаза, ДНК-полимераза α);
- 3) компоненты машины репликации ДНК (MCM, CDC6, ORC1);
- 4) компоненты машины митоза (циклин B, CDC2, MAD2).

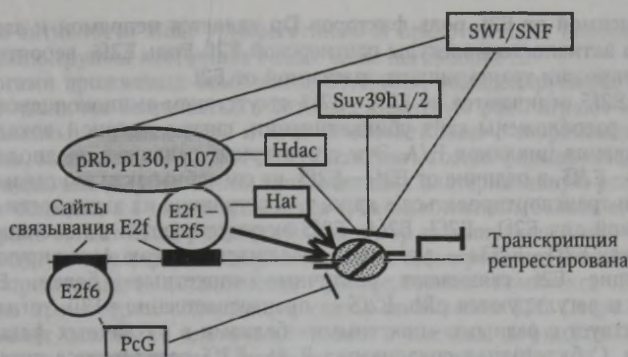


Рис. 5.10. Пассивная и активная транскрипционная репрессия белками семейства pRb (Frolov M. V., Dyson N. J., 2004)

В настоящее время клонировано 9 различных генов семейства E2F и два гена семейства DP. Среди всех членов семейства E2F функциональная активность белков E2f1–E2f5 ассоциируется со взаимодействием с членами семейства pRb (рис. 5.10). Белки E2f1–E2f6 образуют гетеродимеры с белками Dp, тогда как E2f7 связывает ДНК независимо от Dp. E2f1–E2f5 подразделяются на активаторные (E2f1, E2f2, E2f3a) и репрессорные факторы (E2f3b, E2f4 и E2f5). Активаторные E2F способны инициировать прогрессию клеточного цикла в поющих клетках, а также инициировать апоптоз, тогда как функция репрессорных E2f связана с задержкой поющих клеток в фазе G0/G1. Среди активирующих E2f, функция E2f3a преимущественно связывается с активацией клеточной пролиферации, тогда как функция E2f1 — с активацией апоптоза, что опосредуется через p53-независимый и зависимый механизмы. E2f1 участвует в механизме контрольной точки повреждения ДНК. При повреждении клеток химиотерапевтическими препаратами увеличивается уровень E2f1. Киназы семейств ATM и ATR, которые активируются при повреждении ДНК (см. главу 4), фосфорилируют E2f1 и стабилизируют его свойства. E2f1 связывается с белками рекомбинационно-репарационного комплекса (Nbs1–Mre11–Rad50). Возможно, E2f1 необходим для репрессии инициации репликации ДНК при ее повреждении.

E2F1 был клонирован благодаря способности его продукта связывать pRb. Используя пептидную последовательность, комплементарную сайту связывания E2F1, с помощью метода аффинной хроматографии была изолирована другая кДНК, родственная E2F1, названная DP1. Современные работы показывают, что E2f и Dp образуют гетеродимеры, которые обладают значительно более высоким сродством к ДНК и «пocketным» белкам, чем мономеры. Используя E2F1 в качестве пробы ДНК для скрининга библиотек, были изолированы три других белка семейства E2F, названные E2f2, E2f3 и E2f4. В опытах *in vivo* E2f1–E2f3 показывают высокий аффинитет к pRb по сравнению с p107 и p130. E2F5 был клонирован с помощью двугибридной дрожжевой системы. Белки семейств E2F и DP содержат высококонсервативные ДНК-связывающие и димеризационные домены (см. рис. 5.9). С-концевая последовательность E2f1–E2f5 содержит также трансаактивирующий домен, который отсутствует в E2f6–E2f7 и Dp. Эти данные предполагают, что E2f6–E2f7 не могут самостоятельно трансаактивировать гены, с промоторами которых они взаимодействуют. В активации транскрипции

генов, зависимой от E2f, роль факторов Dr является не прямой и заключается в усилении активности молекулы партнерской E2f. Роль E2f6, вероятно, заключается в репрессии транскрипции, зависимой от E2f.

E2f4 и E2f5 отличаются от E2f1—E2f3 отсутствием аминоконцевого домена, в котором расположены сайт убиквитинации, сигнал ядерной локализации и сайт связывания циклинов E/A. Эти структурные различия предполагают, что белки E2f4—E2f5, в отличие от E2f1—E2f3, не способны активно связывать циклины E/A и транспортироваться в ядро, т. е. регуляция их активности отличается от таковой для E2f1—E2f3. E2f4—E2f5 аккумулируются в покоящихся клетках, тогда как E2f1—E2f3а — в активно делящихся клетках. Активирующие и супрессирующие E2f связывают различные «покетные» белки. E2f1—E2f3 связывают и регулируются pRb, E2f5 — преимущественно p130, тогда как E2f4 взаимодействует с разными «покетными» белками в различных фазах клеточного цикла. Субклеточная локализация E2f4—E2f5 регулируется путем их экспорта из ядра транспортным белком Crm1 (взаимодействующим с сигнальной экспортной последовательностью в E2f4—E2f5) или путем импорта в ядро «покетными» белками.

В области трансактивирующего домена E2f1—E2f5 расположен высококонсервативный сайт связывания «покетных» белков (см. рис. 5.9). В условиях связывания «покетного» белка E2f лишается собственной трансактивирующей активности, что опосредовано инактивацией его С-концевого домена, физически связанного с молекулой «покетного» белка.

Регуляция клеточного деления на транскрипционном уровне при взаимодействии белков семейств pRb и E2F

Белки семейства pRb могут репрессировать транскрипцию при взаимодействии с факторами E2f с помощью двух различных механизмов. Поскольку pRb связывает белки семейства E2F в пределах их трансактивационного домена, такое взаимодействие физически ингибирует трансактивацию белками E2F. Известно, что факторы E2f обладают собственной гистонацетилазной активностью, а также взаимодействуют с другими гистоновыми ацетилтрансферазами, например p300/Cbp, P/Caf, Tip60, облегчая доступ транскрипционных факторов к ДНК (см. рис. 5.10).

pRb и члены его семейства также могут ингибировать E2f путем рекрутирования белков Hdac и ферментов, модифицирующих хроматин. Семейство HDAC включает 7 различных ферментов, которые удаляют ацетильные группы из «хвостов» гистоновых октамеров, что облегчает конденсацию нуклеосом в хроматине. Это, в свою очередь, ингибирует экспрессию генов путем отмены доступа транскрипционных факторов к промотеру. «Покетные» белки опосредуют рекрутирование Hdac к E2f и, таким образом, отменяют активность Nat. Было показано, что E2f1 может быть ацетилирован, что увеличивает связывание комплексов E2f1—Dr с ДНК. Три из семи белков семейства HDAC (Hdac1—Hdac3) взаимодействуют с pRb, который способен связывать одновременно Hdac и E2f, создавая возможность для рекрутирования репрессорного комплекса Hdac—pRb—E2f к промотерам генов клеточного цикла. Мутации гена RB в домене, связывающем белки с мотивом LxCxE, отменяют его способность взаимодействовать с Hdac1—Hdac2, но не влияют на способность pRb ингибировать транскрипционную активацию E2f. Однако такие мутанты не способны активно репрессировать некоторые гены и поддерживать остановку клеточного деления.

Ингибция активности Hdac трихостатином А предотвращает опосредованную pRb репрессию группы клеточных генов, включая циклин Е.

Гомологами дрожжевых комплексов SWI/SNF, ремоделирующих хроматин, у человека являются комплексы, в которых ключевую роль играют их АТФазные компоненты — белки Brg1 и Brm. В соответствии с современными представлениями, комплексы SWI/SNF могут изменять состав формирующих их белков путем включения субъединиц, выполняющих альтернативную роль. В зависимости от вошедших в состав комплекса субкомпонентных белков его функциональная роль может быть различной, например активирующей или ингибирующей клеточную пролиферацию. pRb способен одновременно связывать Brm и E2f, что предполагает возможность формирования комплекса SWI/SNF—pRb—E2f на промоторах, содержащих сайты связывания E2f. Сверхэкспрессия Brg1 вызывает остановку клеточного цикла в клетках, дефицитных по Brg1. Такая остановка опосредуется функционально активным pRb.

Гистоновые метилтрансферазы (Hmt), например Suv39h1 и Suv39h2, также участвуют в активной транскрипционной супрессии, опосредованной «покетными» белками. Эти ферменты могут метилировать остаток лизина 9 в гистоне H3 и, таким образом, создавать сайт связывания для гетерохроматиновых белков семейства HP-1. Белки этого семейства локализуются в области гетерохроматина и вызывают феномен *сайленсинга* (временной инактивации) транскрипции. Вероятно, эти белки участвуют в передаче сигналов гистонового кода путем точной координации транскрипционной регуляции. Например, Hdac деацетирует остаток лизина 9 в гистоне H3 перед тем, как Hmt метилирует этот остаток, стабилизируя закрытую структуру хроматина.

pRb играет роль не только транскрипционного супрессора, но и активатора. pRb необходим для трансактивации гена MYOD и, таким образом, способен индуцировать миогенную дифференцировку в клетках немышечной природы, например в фибробластах. pRb может усиливать дифференцировку путем прямой транскрипционной активации без физического связывания с геном-мишенью. pRb также способен репрессировать транскрипцию путем участия в механизмах, независимых от Hdac и комплексов, ремоделирующих хроматин. Эти механизмы включают взаимодействие pRb с другими белками, например с CtIp, Rbp1, Hbp1 и др.

CtIp взаимодействует с Ctbp*, названным так потому, что он связывает С-концевую область белка Е1а аденовируса. CtIp связывается с «покетным» доменом pRb и показывает репрессорную активность. Rbp1 также связывает «покетный» домен pRb и представляет собой белок, обладающий способностью супрессировать трансактивацию генов и пролиферацию клеток в случае сверхэкспрессии E2f. Rbp1 содержит два репрессорных домена, один из которых связывает Hdac с «покетным» доменом pRb, что необходимо для активной репрессии, зависимой от Hdac. Hbp1 является транскрипционным супрессором, принадлежащим семейству белков с высокой мобильностью. Он также имеет два мотива LxCxE и взаимодействует с pRb или p130, опосредуя репрессию гена N-MYC.

Белки pRb и p107/p130 в регуляции транскрипции различных групп генов, отвечающих на E2f

Различия в строении и свойствах «покетных» белков pRb, p107 и p130 предполагают различные механизмы их участия в опосредованной белками E2f регуляции транскрипции.

* Ctbp — C-terminal binding protein.

Во-первых, эти белки взаимодействуют с различными E2f. E2f1—E2f3 преимущественно связывают pRb, E2f5 — p130, тогда как E2f4 связывает любой «поCKETный» белок. p107 и p130 связывают E2f4 со значительно более высоким аффинитетом, чем E2f1—E2f3. Выяснение биохимических основ этих различий затрудняется тем, что различные комплексы E2f с «поCKETными» белками обладают различной способностью связывать ДНК.

Во-вторых, pRb, p107 и p130 участвуют в образовании комплексов с E2f в разных фазах клеточного цикла. Комплексы p130—E2f4 образуются в покоящихся и дифференцирующихся клетках. Напротив, комплексы p107—E2f4 обнаруживаются в делящихся, особенно в S-фазных, клетках. Комплексы pRb—E2f4 выявляются во всех фазах клеточного цикла. Дополнительные трудности в выявлении специфической роли pRb, p107 и p130 в опосредованной E2f регуляции клеточного цикла связаны с тем, что специфичность взаимодействия между белками семейств E2f и pRb теряется в случае их сверхэкспрессии. Например, в нормальных условиях E2f1 взаимодействует в опытах *in vivo* с pRb, но не с p107, однако при сверхэкспрессии p107 этот белок опосредует транскрипционную репрессию, ингибируя активность E2f1. E2f5 взаимодействует с p130 *in vivo*, но каждый из белков семейства pRb способен супрессировать транскрипцию, зависимую от E2f5, в тесте временной трансфекции.

Мутации сайтов связывания E2f в генах, регулирующих прогрессию клеточного цикла (B-MYB, CDC2, E2F1), сопровождаются увеличением транскрипции этих генов в фазах G0/G1. Методом иммунопреципитации хроматина было показано, что E2f4 и p130 занимают сайты связывания на промоторах этих генов в фазах G0/G1, тогда как по мере прогрессии клеточного цикла комплексы E2f4—Dp—p107/p130 на промоторах указанных генов замещаются белками E2f1—E2f3.

Для анализа физиологической роли «поCKETных» белков были получены мыши с эмбриональным нокаутом генов или отдельных аллелей генов RB, p107 и p130, а также E2F4 и E2F5. Затем такие мыши были спарены между собой для получения из ткани плодов их гибридов мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ), дефицитных одновременно по двум или более генам. МЭФ с дефицитом белков E2f4, E2f4/E2f5 или p107/p130 проявляли отсутствие способности задерживаться в фазе G0/G1 в ответ на сигналы, активирующие остановку деления, например сверхэкспрессию p16^{Ink4a} или контактную ингибицию деления.

Рисунок экспрессии предполагаемых генов-мишеней белков E2f был исследован для определения функциональных изменений, которые появлялись в случае отсутствия в клетках животных pRb, p107 или p130. Поскольку сайты связывания E2f опосредуют в различных генах транскрипционную супрессию или, наоборот, активацию, была исследована широкая панель выявленных ранее или предполагаемых генов-мишеней E2f. МЭФ были синхронизированы путем сывороточного голодания и рестимуляции фетальной сывороткой. Тотальная РНК была изолирована из МЭФ в одни и те же сроки после рестимуляции сывороткой, и экспрессия различных генов была оценена посредством ее гибридизации с пробам ДНК указанных ниже генов. Кислый рибосомальный фосфопротеин был использован в качестве контроля. При отсутствии одного гена из семейства «поCKETных» белков, экспрессия генов-мишеней изменялась незначительно. Экспрессия генов циклина E и p107 в МЭФ с эмбриональной инактивацией RB (RB-/-) увеличивалась примерно в 2 раза по сравнению с таковой в клетках дикого типа (табл. 5.3).

Таблица 5.3

**Функциональные различия между «покетными» белками
в регуляции клеточных функций** (Hurford R. K. J. [et al.] , 1997)

Генотип/фенотип	pRb-/-	p107-/-, p130-/-	pRb-/-, p107-/-, p130-/-
p107	Активация	Не изменяется	—
Циклин E	Активация	Не изменяется	—
B-Myb	Не изменяется	Активация	—
Cdc2	Не изменяется	Активация	—
E2f1	Не изменяется	Активация	—
Тимидин синтетаза	Не изменяется	Активация	—
Циклин A2	Не изменяется	Активация	—
Иммортальность	Не изменяется	Не изменяется	Активация
Дифференцировка	Не изменяется	Не изменяется	Ослабление
Апоптоз	Не изменяется	Не изменяется	Не изменяется
Старение	Не изменяется	Не изменяется	Отсутствует

Этот эффект является результатом потери репрессорного действия комплекса pRb—E2f на транскрипцию генов циклина E и p107.

Экспрессия шести генов, несущих в своих промоторах сайты связывания E2f, в клетках с фенотипом p107-/-, p130-/- (B-MYB, CDC2, E2F1, тимидинсинтетаза, субъединица M2 рибонуклеотид редуктазы, циклин A2) была повышена в фазе G0/G1. Экспрессия генов B-MYB и CDC2 была изменена наиболее значительно в отсутствие экспрессии белков p107 и p130 (см. табл. 5.3). Поскольку экспрессия гена B-MYB изменялась наиболее выражено в МЭФ, не экспрессирующих p107 и p130, роль сайта связывания E2f в регуляции активности промотора гена B-MYB была изучена более детально. Клетки с фенотипом p107-/-, p130-/- и нормальные клетки были трансфицированы люциферазной репортерной конструкцией, включающей фрагмент промотора гена B-MYB с делецией трех пар оснований в сайте связывания E2f, вместе с экспрессионными векторами «покетных» белков. При трансфекции указанных конструкций в контрольные МЭФ наблюдалась дерепрессия гена B-MYB, содержащего мутантный промотор. В таких клетках, культивируемых в условиях дефицита ростовых факторов, экспрессия репортерного белка, кодируемого геном B-MYB с мутантным промотором, была в 20 раз выше, чем экспрессия репортерного белка, регулируемого геном с нормальным промотором. Если увеличенная экспрессия эндогенного гена B-MYB в клетках с фенотипом p107-/-, p130-/- была вызвана отсутствием репрессорного комплекса, содержащего E2f, то нарушение регуляции должно было происходить и в клетках с фенотипом p107-/-, p130-/-, экспрессирующих в фазе G0/G1 мутантный или дикий тип промотора гена B-MYB. Действительно, экспрессия репортерного белка с промотора гена дикого типа была в 15 раз повышена в клетках, дефицитных по p107 и p130. Репрессия гена B-MYB с нормальным промотором в дефицитных клетках была восстановлена при экзогенной экспрессии белков p107 или p130. Активность конструкции, содержащей мутантный ген B-MYB, не изменялась при экзогенной экспрессии любого «покетного» белка.

Отсутствие изменений в экспрессии генов-мишеней E2f в МЭФ с фенотипом p107-/- и p130-/- предполагает, что функция белков p107 и p130 избыточна. В МЭФ с фенотипами pRb-/- и p107-/-, p130-/- рисунок комплексов, включающих E2f, показывал изменения в дополнение к отсутствию соответствующих белков семейства pRb. Покоящиеся клетки дикого типа содержат очень небольшое количество комплексов p107-E2f, и наоборот, количество комплексов p107-E2f значительно увеличивается в покоящихся МЭФ с фенотипом pRb-/-.

Механизм супрессии транскрипции белками семейства E2f и «покетными» белками в покоящихся клетках

В состоянии покоя клетка не испытывает действия митогенов, поэтому киназы фазы G1 находятся в неактивном состоянии, и наоборот, «покетные» белки активны, секвестрируют транскрипционные факторы E2f и удерживают клетку в фазе G0/G1 (рис. 5.11). Состояние транскрипционной супрессии в покоящихся клетках опосредуется путем связывания «покетными» белками Hdac, комплексов, ремоделирующих хроматин, и гистоновых метилтрансфераз. Существует гипотеза, что белки E2f взаимодействуют с p107, p130 или pRb в зависимости от длительности остановки клеточного цикла. Например, временная остановка клеточного цикла может быть опосредована рекрутированием p107, p130 и Hdac, тогда как длительная или необратимая его остановка при клеточном старении может быть опосредована комплексами E2f-pRb-Suv39h1-Hp-1 (см. рис. 5.11).

Состояние длительной или необратимой остановки клеточного цикла, которую вызывают «покетные» белки, ассоциируется с клеточной дифференцировкой. В этом случае «покетные» белки играют двойственную роль. Во-первых, клетки дифференцируются только из рестрикционной точки R1 фазы G1, про-



Рис. 5.11. Механизм супрессии транскрипции «покетными» белками в покоящихся клетках (Attwooll C. [et al.], 2004)

хождение которой регулируется членами семейства pRb. Во-вторых, pRb связывается с несколькими тканеспецифическими транскрипционными факторами, включая жировой фактор C/Eb β и остеобластный фактор Cbfa1. pRb усиливает транскрипционную активность этих факторов и облегчает тканеспецифическую дифференцировку.

Транскрипционная супрессия генов, регулируемых белками E2f, может быть прямым эффектом экспрессии E2f6, в структуре которого присутствуют ДНК-связывающий и димеризационный домены, но отсутствует трансактивирующий домен (см. рис. 5.9). E2f6 обладает способностью взаимодействовать с белками семейства PcG (Polycomb), в частности с белком Rybp (Ring1 and Yy1 binding protein), связывающим транскрипционные факторы Ring1, Yy1 и Bmi1. Это предполагает, что E2f6 может супрессировать транскрипцию опосредованно через белки комплекса PcG (см. рис. 5.10), которые, в свою очередь, контролируют активность генов локуса HOX. Современные данные предполагают, что гены HOX имеют прямое отношение к регуляции самоподдержания соматических стволовых клеток.

Механизм регуляции транскрипции «пocketными» белками в делящихся клетках

При действии митогенов происходит образование активных киназ фазы G1 и G1/S, фосфорилирующих «пocketные» белки, которые образуют комплексы с транскрипционными факторами E2f на промоторах регулируемых ими генов. Это фосфорилирование отменяет транскрипционную супрессию, опосредованную «пocketными» белками и активирует синтез белков, кодируемых E2f-регулируемыми генами. Синтез таких белков сопровождается активацией перехода G1/S, инициацией репликации и последующим прохождением фазы S и митоза (рис. 5.12).

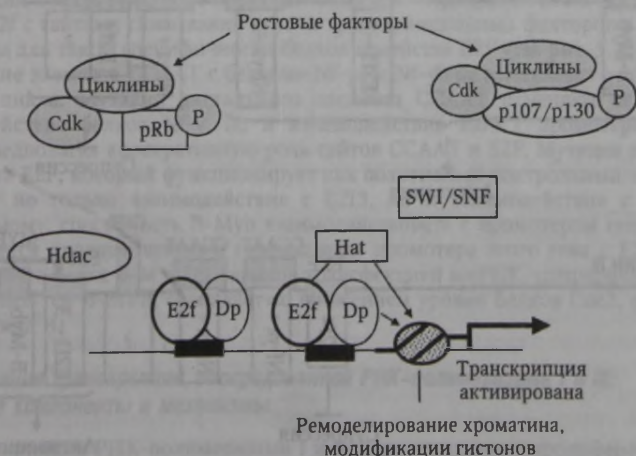


Рис. 5.12. Механизм активации транскрипции в делящихся клетках (Attwooll C. [et al.], 2004)

Семейство белков E2F координирует транскрипцию генов, ответственных за прогрессию клеточного цикла в фазах G1/S и G2/M

Белки E2f регулируют экспрессию генов, продукты которых обладают регуляторными и эффекторными функциями в репликации ДНК и контроле прогрессии клеточного цикла. Гены CDC2, циклин В, циклин А2, CDC20 в нормальных условиях трансктивируются в фазе G2/M, тогда как гены циклин Е и PCNA — в фазе G1/S. Промоторы генов CDC2 и циклина В содержат элементы, специфически связывающие белки E2f. Эксперименты, включающие мутагенез сайтов, связывающих E2f на промоторах генов CDC2 и циклина В, и временную трансфекцию люциферазных репортерных конструкций, экспрессирующихся с таких промоторов в клетках, синхронизированных с помощью гидроксимочевина и синхронно проходящих фазу G2/M, показали, что белки E2f регулируют очередность прохождения клеткой фаз G1/S и G2/M.

Люциферазная активность, регулируемая с промоторов генов CDC2 и циклина В, имитирует рисунок аккумуляции эндогенных мРНК этих генов. Промоторная активность генов CDC2 и циклина В находится на нижнем уровне в фазе G1/S, повышается до самого высокого уровня в фазе G2/M и затем снижается. Мутация дистального участка связывания E2f в промоторе гена CDC2 и проксимального участка связывания E2f в промоторе гена циклина В снижает их активацию, показывая, что оба промотора содержат позитивный сайт связывания E2f, который необходим для экспрессии продуктов этих генов в фазе G2/M (рис. 5.13).

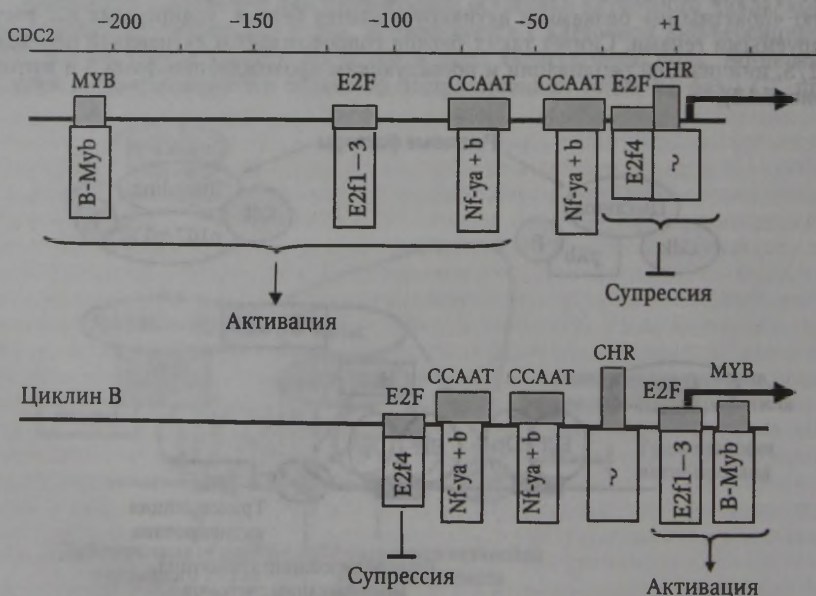


Рис. 5.13. Схема регуляторных областей генов CDC2 и циклина В человека (Zhu W. [et al.], 2004)

Мутация проксимального сайта связывания E2f в промоторе гена CDC2 и дистального сайта связывания E2f в промоторе гена циклина В заметно усиливают их активность в покоящихся клетках, показывая, что оба промотера содержат негативные элементы регуляции белками E2f, необходимые для репрессии генов-мишеней в фазе G0/G1. При анализе транскрипционной регуляции этих промотеров было также обнаружено кооперативное взаимодействие E2f и других транскрипционных факторов, включая Tfe3 и Yy1. Взаимодействие этих факторов с промоторами отменялось при мутации сайтов связывания белков B-Myb, Nf-ya и Nf-yb (последние связывают последовательность CCAAT), которые являются позитивными регуляторами транскрипции генов CDC2, циклина A2 и E2F1, тогда как сайт CHR (cell cycle homology region) является негативным регулятором деления. Мутации сайта связывания белка B-Myb в промоторе гена CDC2 отменяют его активацию. Мутация дистального элемента CCAAT также отменяет активацию промотера этого гена, подобно мутации дистального участка связывания E2f. Мутация элемента CHR сопровождается увеличением промотерной активности.

С промоторами генов CDC2 и циклина В взаимодействуют как активаторные, так и репрессорные E2f. Белок E2f4 взаимодействует с промотором каждого из этих генов в покоящихся клетках. Рисунок взаимодействия активаторных E2f с промоторами генов CDC2 и циклина В противоположен рисунку их взаимодействия с белком E2f4. Ни один из активаторных белков E2f не связывается с промоторами генов CDC2 и циклина В в покоящихся клетках, но каждый из них физически взаимодействует с промоторами этих генов в фазе G1/S, остается связанным в фазе S и не определяется в клетках, находящихся в фазе G2 и митозе.

E2f4, как и E2f1–E2f3, был найден на промоторе гена CDC2 в клетках, оставленных в фазе G1/S. Активаторные E2f связываются с дистальным сайтом E2f, тогда как репрессорный E2f4 — с проксимальным сайтом. Современные публикации показывают роль кооперативных взаимодействий сайта связывания белков E2f с сайтами связывания других транскрипционных факторов в качестве основы для такой специфичности белков семейства E2F (см. рис. 5.13). Взаимодействие элемента CCAAT с белками Nf-ya и Nf-yb не изменяется в ходе клеточного цикла. Мутации дистального элемента CCAAT отменяют не только взаимодействие белков Nf-y, но и взаимодействие E2f3 с промотором гена CDC2, предполагая кооперативную роль сайтов CCAAT и E2F. Мутация дистального сайта E2F, который функционирует как позитивный контрольный элемент, отменяет не только взаимодействие с E2f3, но и взаимодействие с B-Myb. По-видимому, способность B-Myb взаимодействовать с промотором гена CDC2 опосредуется предшествующим связыванием промотера этого гена с E2f. Снижение уровня белка B-Myb, вызванное трансфекцией мРНК, специфически ингибирующей ген B-MYB, совпадает со снижением уровня белков Cdc2, циклина А и циклина В.

Регуляция транскрипции, опосредованной РНК-полимеразами I и III: общие компоненты и механизмы

Транскрипция РНК-полимеразами I и III строго связана с пролиферативным состоянием клетки. Покоящиеся и митотические клетки показывают сниженную скорость транскрипции этими полимеразми сравнительно с делящимися

клетками. В настоящее время установлено, что несколько механизмов вовлечены в регуляцию транскрипции, опосредованной РНК-полимеразой II. Эти же механизмы могут участвовать в регуляции транскрипции и другими полимеразам.

Транскрипционный фактор Ubf (upstream-binding factor) усиливает транскрипцию РНК-полимеразой I в присутствии двух других транскрипционных факторов: самой РНК-полимеразы I и фактора селективности 1 (Sl1). pRb, содержащий нормальный «пocketный» домен, эффективно репрессирует транскрипцию, активированную Ubf.

Ubf коиммунопреципитируется с pRb, и это взаимодействие опосредуется мотивом LxCxE в домене третьей группы высокой подвижности Ubf и «пocketным» доменом pRb. Активация транскрипции, опосредованная Ubf, зависит от взаимодействия между Sl1 и РНК-полимеразой I. Связывание pRb с Ubf может репрессировать транскрипционную активацию путем ингибции этих взаимодействий.

Известно, что транскрипция глобально репрессируется в митозе, но механизм этой ингибции не был изучен до недавнего времени. При использовании экстракта яиц лягушек *Xenopus* было установлено, что транскрипция РНК-полимеразой III (транспортная РНК-полимераза) может быть репрессирована комплексом циклин В—Cdc2. В этой системе добавление очищенного комплекса циклин В—Cdc2 было достаточным, чтобы конвертировать интерфазный клеточный экстракт (компетентный в транскрипции, опосредованной РНК-полимеразой III, и дефицитный по митотической киназной активности) в экстракт с митотической активностью, способный полностью супрессировать транскрипцию РНК-полимеразой III. Эта репрессия обратима при добавлении транскрипционного фактора TFIIB из интерфазных ядер, но не митотического экстракта, предполагая, что компонент TFIIB, который состоит из белка, связывающего ТА-ТА-бокс (Tbp), и специфического фактора, активирующего транскрипцию (Taf) полимеразы III, является мишенью митотической киназы — циклин В—Cdc2.

5.4. Методы изучения транскрипционной активности отдельных компонентов машины клеточного цикла

Метод сдвига электрофоретической подвижности в геле

Идентификация продуктов регуляторных генов может быть основана на определении в клеточном экстракте белка, который связывает последовательность ДНК, контролирующую экспрессию специфического гена. Наиболее широко используемая техника идентификации факторов, взаимодействующих со специфическими сайтами связывания в промоторах генов, основана на оценке изменения электрофоретической подвижности меченой пробы ДНК, включающей последовательность данного сайта. Молекула ДНК заряжена негативно и при электрофорезе движется быстро к позитивному электроду. Связывание белковой молекулы с пробой ДНК вызывает замедление ее электрофоретической подвижности. Чем больше молекулярная масса белка, связанного с ДНК, тем медленнее движется комплекс ДНК—белок при электрофорезе. На этом феномене основан метод сдвига электрофоретической подвижности в геле (EMGA).

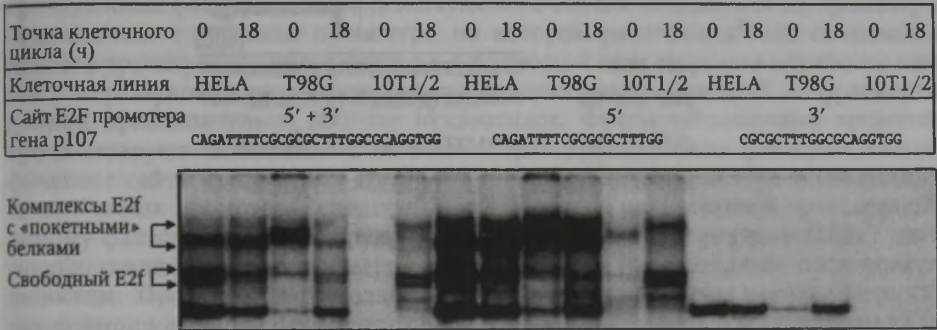


Рис. 5.14. Оценка взаимодействия ДНК с белками методом задержки электрофоретической подвижности в геле (Popov B. [et al.], 2005)

В этом методе короткие последовательности ДНК, включающие сайты связывания транскрипционных регуляторов, например 5'-, 3'- или 5' + 3'- сайты связывания E2f в промоторе гена p107 человека, метятся радиоактивной меткой и смешиваются с клеточными экстрактами клеток различных линий (T98G, HELA, 10T1/2), синхронизированными в состоянии покоя (0 ч) и фазы S (18 ч) клеточного цикла (рис. 5.14). Затем смесь наносится на полиакриламидный гель для последующего электрофореза.

После электрофореза радиоактивная метка визуализируется тем или иным способом. Если происходит связывание ДНК с белком, то на геле появляются полосы, мигрирующие с различной скоростью в зависимости от белкового состава комплекса ДНК-белок, но значительно медленнее, чем свободная проба ДНК. Применение специфических антител к белкам, входящим в состав комплексов ДНК-белок, вызывает разрушение комплексов или уменьшение их электрофоретической подвижности вследствие увеличения молекулярной массы комплекса в результате присоединения антитела. Радиоактивное мечение последовательности ДНК может быть сделано с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы Кленова, который добавляет недостающие нуклеотиды на 3'-конце последовательности ДНК, комплементарная цепь которой имеет «лишние» нуклеотиды на 5'-конце (см. рис. 5.14).

Метод репортерных белков

Для оценки транскрипционной активности гена и роли отдельных транскрипционных факторов в регуляции его активности используется так называемая репортерная конструкция. Такая конструкция состоит из промотора гена или его части (минимальный промотор), включающей сайты связывания изучаемого транскрипционного фактора. Минимальный промотор соединяется с кодирующей областью гена, активность продукта которого можно определить количественно. Количество и активность белка, продуцируемого репортерной конструкцией, находится в прямой зависимости от активности транскрипционного фактора, взаимодействующего со специфическим сайтом связывания в промоторе репортерного гена. По существу, продукт репортерного гена является маркером и информирует о специфической транскрипционной активности.

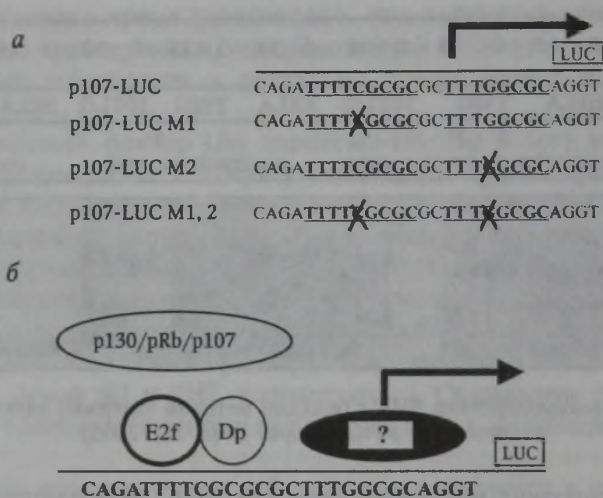


Рис. 5.15. Схема метода репортерных белков:

а — приготовление экспрессионных векторов, включающих промотор гена p107 с мутациями в одном или двух сайтах связывания E2f и кодирующую последовательность гена люциферазы: p107-LUC — репортерная конструкция, включающая регуляторную область гена p107 и кодирующую область гена люциферазы (LUC); M1, M2, M1, 2 — мутации дистального, проксимального или обоих сайтов связывания E2f в промоторе гена p107, соответственно; **б** — трансфекция репортерных и регуляторных конструкций в клетки и оценка активности люциферазы в клеточных экстрактах: Dp — белок, в комплексе с которым E2f образует функциональные димеры, связывающие специфические участки ДНК (Alam J., Cook J. L. 1990)

В качестве репортерного белка широко используется люцифераза — фермент, активность которого определяется высокочувствительным, легко воспроизводимым и относительно недорогим методом. Световая активность, продуцируемая люциферазой при взаимодействии с субстратом в результате хемилюминесцентной реакции, может быть количественно измерена с помощью специального прибора — люминометра, порог чувствительности которого соответствует 0,001 пкг люциферазы в экстракте исследуемой ткани.

Схема метода репортерных белков (рис. 5.15) основана на приготовлении конструкции, включающей участок промотора гена p107 человека с 5'- и 3'-сайтами связывания белков E2f, соединенного с кодирующей областью гена люциферазы. Такую конструкцию вводят в клетки вместе с экспрессионными векторами, кодирующими белки E2f и взаимодействующие с ними «покетные» белки. Последующее определение активности люциферазы в экстрактах трансфицированных клеток дает возможность оценить роль транскрипционных факторов семейства E2F и взаимодействующих с ними белков в регуляции транскрипционной активности гена p107. Мутации отдельных сайтов связывания E2f помогают оценить их функциональную роль в передаче сигналов E2f (см. рис. 5.15).

Метод иммунопреципитации хроматина

Этот метод используют для оценки взаимодействия ДНК — белок *in vivo*. Метод включает обработку формальдегидом клеток, растущих в культуре, что позволяет «сшить» физически взаимодействующие между собой молекулы ДНК и белков (см. цв. вклейку, рис. 5.16). Например, при такой обработке транс-

крипционные факторы, взаимодействующие с сайтом связывания на промоторе, «сшиваются» с участком промотора, на котором расположен сайт связывания данного транскрипционного фактора. Следующий этап включает обработку клеток ультразвуком, в результате чего происходит разделение ДНК на фрагменты длиной приблизительно 600 пар нуклеотидов. Фрагментированный хроматин преципитируют антителами к белкам — транскрипционным факторам, специфические сайты связывания которых картируются на промоторе исследуемого гена. Участок промотора гена, преципитированный антителами к транскрипционному фактору, амплифицируют в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью специфических праймеров к его концевым нуклеотидным последовательностям. Продукты ПЦР разделяют путем электрофореза, и специфичность амплифицированного фрагмента оценивают по его молекулярному размеру на геле.

Двугибридная техника клонирования генов в дрожжевой системе

Метод двугибридного клонирования основан на технике транскрипционной активации. Транскрипционные активаторы, например Gal4 или LexA, содержат два физически разделяемых домена: ДБД и ТАД (рис. 5.17). Взаимодействие этих доменов на промоторе генов, продукты которых обладают маркерными или селективными свойствами, например гена галактозидазы (LACZ) или гистидина (HIS), дает возможность инициировать синтез этих белков, селектировать клетки-продуценты и затем клонировать искомые гены. Для подобной селекции можно использовать кДНКовые библиотеки, приготовленные на основе векторов, включающих ТАД транскрипционного активатора. ДБД того же транскрипционного фактора, например GAL4, соединенный с сайтом связывания для селективируемого гена, служит «приманкой». С помощью этого метода были клонированы гены $p21^{Cip1}$, $p130$, $p16^{Ink4a}$, MDM2, каспаза 8, FLASH — позитивный регулятор каспазы 8.

E2F5 был также клонирован с помощью двугибридной системы следующим образом. Клетки дрожжевой линии Y190, которые содержат в хромосомах два



Рис. 5.17. Схема метода двугибридного клонирования генов (Gietz R. D. [et al.], 1997)

репортерных гена, индуцибельных транскрипционным активатором Gal4, H1S3 и LACZ, были трансфицированы плазмидой-приманкой, содержащей «покетную» область гена p107 (AA 240–816), рекомбинированного с ДБД гена GAL4 (см. рис. 5.17). Линия клеток, экспрессирующих ген-приманку, была затем трансфицирована библиотекой кДНК, полученной из тканей мышинового плода на стадии 14,5 дней внутриутробного периода, в которой фрагменты кДНК были соединены с трансактивирующим доменом гена GAL4. В результате последующей гистидиновой селекции 2 млн клонов были получены 87 колоний, растущих на среде без гистидина, 16 из которых также экспрессировали галактозидазу. Анализ последовательностей ДНК показал, что ДНК 3 клонов представляла собой один и тот же ген и показывала значительную гомологию с четырьмя известными генами E2F. Этот ген был назван E2F5 (см. рис. 5.17).

5.5. Роль микро-РНК и маленькой интерферирующей РНК в регуляции функций стволовых клеток

Модель биогенеза и посттранскрипционной супрессии микро-РНК и маленьких интерферирующих РНК

Микро-РНК (мкРНК) составляют семью маленьких некодирующих РНК, которые регулируют экспрессию генов на основе распознавания нуклеотидной последовательности информационной РНК. Два первых члена семейства мкРНК были идентифицированы у червей *C. elegans* как гены, которые необходимы для регуляции процессов развития. С того времени были найдены сотни новых мкРНК почти во всех геномах позвоночных, у червей, мух, растений и млекопитающих. Предполагается, что мкРНК принимают участие в регуляции экспрессии 30 % всех кодируемых генов и вовлечены в регуляцию всех клеточных процессов.

Известно, что мкРНК состоят из 21–25 нуклеотидов и регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Хотя механизмы их действия во многом не изучены, действие некоторых мкРНК основано на феномене интерференции РНК. Первый член семейства мкРНК, Lin-4, был идентифицирован у червей *C. elegans* при генетическом скрининге дефектов в контроле постэмбрионального развития. У *C. elegans* клетки личинки имеют различные характеристики в ходе четырех различных стадий развития, названных L1–L4. Мутации мкРНК Lin-4 нарушают развитие личинки, вызывая повторение стадии L1 при более позднем развитии. Противоположный фенотип в процессе развития – отсутствие стадии L1 и преждевременное появление стадии L2, наблюдается у червей при нарушении продукции белка Lin-14. Ген LIN-4 кодирует некодирующую 22-нуклеотидную РНК, которая частично комплементарна 7 консервативным остаткам, локализованным в 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК Lin-14 (см. цв. вклейку, рис. 5.18).

LIN-14 кодирует ядерный белок, который в конце первой стадии развития личинки тормозит переход во вторую стадию. Негативная регуляция белка Lin-14 опосредована участием 3'-UTR его мРНК в качестве мишени мкРНК Lin-4. Открытие подобных генетических взаимодействий послужило стимулом для серии молекулярно-биологических исследований, показавших, что способ-

ность мкРНК Lin-4 контролировать экспрессию белка Lin-14, опосредована регуляцией белкового синтеза и требует прямого, хотя и неточного, взаимодействия между парами нуклеотидов Lin-4 и 3'-UTR мРНК Lin-14 (см. цв. вклейку, рис. 5.18).

Интерференция РНК (иРНК) была охарактеризована как отдельный биологический процесс вскоре после открытия роли мкРНК. иРНК является эволюционно консервативным механизмом сайленсинга генов, основанным на распознавании специфической нуклеотидной последовательности и вызывается двуцепочечной РНК (дцРНК). Для инициации иРНК требуется введение пусковой дцРНК размером около 500 пар оснований. Эта пусковая дцРНК процессируется *in vivo* в маленькую дцРНК размером 21–25 пар оснований, названную маленькой интерферирующей РНК (миРНК). В настоящее время известно, что одна нитка миРНК селективно включается в эффекторный комплекс, вызывающий сайленсинг генов, который называется RISC (RNA induced silencing complex). RISC направляет протеолиз комплементарных мишеней миРНК, известный как посттранскрипционный сайленсинг генов (PTGS). Эволюционно консервативный ответ с помощью интерференции РНК на экзогенные дцРНК соответствует эндогенным механизмам защиты против вирусной инфекции или паразитарных ядерных кислот. В соответствии с этим мутации компонентов, формирующих процесс иРНК, ингибируют противовирусную защиту у растений, показывая, что PTGS может в нормальных условиях опосредовать деструкцию вирусных РНК.

Основные процессы действия миРНК и мкРНК подобны по их молекулярным характеристикам биогенезу и эффекторным функциям: миРНК и мкРНК имеют общий процессирующий фермент (РНКазу III), который называется Dicer, и близкородственный эффекторный комплекс RISC. С другой стороны, мкРНК отличаются от миРНК по молекулярному происхождению и, во многих случаях, по способу распознавания мишеней. Например, мкРНК образуются из специфических предшественников, которые кодируются в геноме. Структура первичных транскриптов мкРНК и распознавание этих предшественников ядерной процессирующей машиной, вероятно, определяет последовательность и структуру зрелых мкРНК. Напротив, миРНК образуются из предшествующей дцРНК, которая может быть экзогенной или образовываться из транскрибированной в двух направлениях эндогенной РНК после ее отжига. Действие мкРНК основано на взаимодействии с мРНК в ее 3'-UTR путем гибридизации по нескольким основаниям с неполной комплементарностью. В противоположность этому, миРНК часто образует совершенные двуцепочечные комплексы с мРНК-мишенями.

Два события в ходе процессинга ведут к образованию зрелой мкРНК. Во-первых, незрелый транскрипт мкРНК (pri-мкРНК) процессируется в 70-нуклеотидный предшественник (pre-мкРНК). Во-вторых, этот предшественник рестрицируется с образованием 21–25-нуклеотидной зрелой мкРНК (см. цв. вклейку, рис. 5.19). Известно, что pri-мкРНК локализуется в интронах генома клетки-хозяина и поэтому может транскрипционно регулироваться с использованием промоторов генов хозяина.

Возникает мкРНК из предшественников, сложенных в двуцепочечную структуру, подобную «шпильке». Зрелая мкРНК чаще всего образуется из одного плеча предшествующей «шпильки» РНК и освобождается из первичных транскриптов путем шагообразного процессинга двумя разными ферментами типа РНКазы III, один из которых называется Drosha, а другой — Dicer. Эти ферменты образуют в сайте рестрикции РНК на ее 3'-конце 2 непарных нуклео-

тида. РНКазы III Drosha расположена в ядре, где путем рестрикции ргi-мкРНК она образует рге-мкРНК размером приблизительно 70 пар оснований. Экспортируется рге-мкРНК в цитоплазму с помощью белка экспортина 5, ядерно-цитоплазматического переносчика РНК, зависящего от ГТФазы. Оказавшись в цитоплазме, эти предшественники преобразуются ферментом Dicer в маленькие диРНК, которые содержат зрелую нить мкРНК и комплементарную ей одноцепочечную копию РНК — мкРНКк (см. цв. вклейку, рис. 5.19).

К компонентам комплекса RISC относятся белки семейства *Argonaute* (AGO). У человека четыре белка этого семейства (Ago1–Ago4) принимают участие в формировании комплексов RISC с мкРНК, и только один (Ago2) — в формировании комплексов RISC с миРНК. Мутации в гене Dicer нарушают биогенез мкРНК и вызывают разнообразные дефекты развития, включая дефекты ЗСК у червей *C. elegans*, остановку развития у полосатых рыбок, и уменьшение числа стволовых клеток у мышей. Мутации генов семейства AGO связаны с возникновением разнообразных фенотипов в процессе развития и нарушением функции самоподдержания зародышевых стволовых клеток в процессе овогенеза у дрозофилы (рис. 5.20).

Некоторые мкРНК различно экспрессируются в стволовых клетках, в зависимости от специфической роли в регуляции функций стволовых клеток. Геном дрозофилы содержит два изофермента Dicer: Dicer-1 и Dicer-2. Dicer-1 участвует в процессинге мкРНК, тогда как Dicer-2 необходим для процессинга миРНК. Повреждение двух аллелей гена Dicer-1 ведет к опустошению яйцевых камер в яйцеклетках у самки дрозофилы. При этом нарушается пролиферация ЗСК,

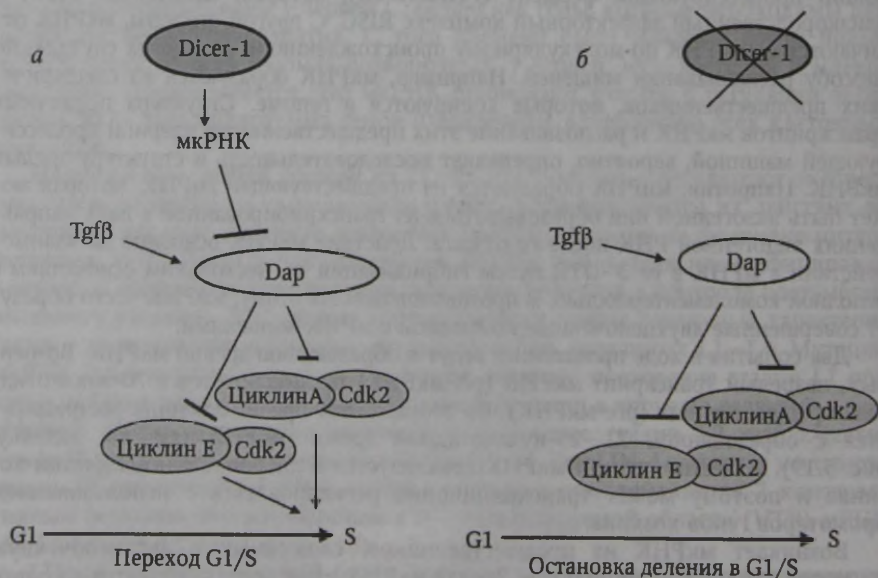


Рис. 5.20. Механизм регуляции деления зародышевых стволовых клеток в овоцитах дрозофилы с помощью мкРНК:

а — белок Дар негативно регулируется специфической мкРНК; б — утрата Dicer-1 нарушает функцию мкРНК, активность Дар повышается (Hatfield S. D. [et al.], 2005)

отмечается снижение активности циклина А, циклина В и фосфогистона 3. Белок *Dacapo* (Dap), гомолог белков семейства ингибиторов циклинзависимых киназ p21^{Cip1}/p27^{Kip1}, негативно регулируется мкРНК. Dap связывает и инактивирует комплексы циклин Е—Cdk2, циклин А—Cdk2, а повышенный уровень Dap ведет к остановке клеточного цикла в переходе G1/S. Число ЗСК, экспрессирующих Dap, увеличивается в популяции клеток, мутантных по *Dicer-1*. Снижение уровня Dap частично спасает продукцию цист у мух с мутантным *Dicer-1*.

Поскольку Dap является ключевым компонентом перехода G1/S, этот белок используется как мишень для машины, ответственной за деление ЗСК в нише, где большинство клеток находятся в состоянии покоя. Сбалансированность регуляции перехода G1/S в ЗСК осуществляется путем ингибции деления, вызываемой Tgf β , и активации деления с помощью снижения активности белка Dap посредством связывания мкРНК со специфическими сайтами в 3'-UTR мРНК Dap.

Литература

- Alam J., Cook J. L. Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription / *Anal. Biochem.*, 1990. — Vol. 188. — P. 245–254.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. [et al.]. *Molecular Biology of the Cell* — New York : Garland Science, Fourth Ed., 2004. — 1463 p.
- Attwooll C., Lazzerini E., Denchi E. [et al.]. The E2F family: specific functions and overlapping interests / *EMBO J.*, 2004. — Vol. 23. — P. 4709–4716.
- Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control / *Oncogene*, 2005/ — Vol. 24. — P. 2796–2809.
- Dannenberg J. H., van Rossum A., Schuijff L. [et al.]. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions / *Genes Dev.*, 2000. — Vol. 14. — P. 3051–3064.
- Dyson N. The regulation of E2F by pRb-family proteins / *Genes Dev.*, 1998. — Vol. 12. — P. 2245–2262.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S. N., Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? / *Nat. Rev. Genet.*, 2008. — Vol. 9. — P. 102–114.
- Frolov M. V., Dyson N. J. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRb-mediated repression / *J. Cell. Sci.*, 2004. — Vol. 117. — P. 2173–2181.
- Giadrossi S., Dvorkina M., Fisher A. Chromatin organization and differentiation in embryonic stem cell models / *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 2007. — Vol. 17. — P. 132–138.
- Gietz R. D., Triggs-Raine B., Robbins A. [et al.]. / *Mol. Cell. Biochem.*, 1997. — Vol. 172. — P. 67–79.
- Hannon G. J. RNA interference / *Nature*, 2002. — Vol. 418. — P. 244–250.
- Harbour J. W., Dean D. C. The Rb/E2F pathway: expending roles and emerging paradigms / *Genes Dev.*, 2000. — Vol. 14. — p. 2393–2409.
- Hatfield S. D., Scherbata H. R., Fischer K. A. [et al.]. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway / *Nature*, 2005. — Vol. 435. — P. 974–978.
- Hatzis P., Talianidis I. Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation / *Mol. Cell.*, 2002. — Vol. 10. — P. 1467–1477.
- He L., Hannon G. J., Small R. N. As with a big role in gene regulation / *Nat. Rev. Gen.*, 2004. — Vol. 5. — P. 522–531.
- Hurford R. K. J., Cobrinik D., Lee M. H. [et al.]. pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different of E2F responsive genes / *Genes Dev.*, 1997. — Vol. 11. — P. 1447–1463.
- Knudsen E. S., Wang J. Y. J. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites / *JBC*, 1996. — Vol. 271. — P. 8313–8320.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their functions / *Cell.*, 2007. — Vol. 128. — P. 693–705.
- Morgan D. O. *The cell cycle. Principles of control* — London : New Science Press Ltd., 2007. — 297 p.
- Nagl N. G. J., Wang X., Patsialou A. [et al.]. Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control / *EMBO J.*, 2007. — Vol. 26. — P. 752–763.
- Popov B., Chang L. S., Serikov V. Cell cycle-related transformation of the E2F4–p130 repressor complex / *BBRC*, 2005. — Vol. 336. — P. 762–769.

Ren B., Cam H., Takahashi Y. [et al.]. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints / *Genes Dev.*, 2002. — Vol. 16. — P. 245–256.

Santos-Rosa H., Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer / *Eur. J. Cancer.*, 2005. — Vol. 41. — P. 2381–2402.

Trimarchi J. M., Lees J. A. Sibling rivalry in the E2F family / *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002. — Vol. 3. — P. 11–20.

White R. J. RNA polymerases I and III, growth control and cancer / *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005. — Vol. 6. — P. 69–78.

Yurford R. K. J., Cobrinik D., Lee M. H. [et al.]. pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes / *Genes Dev.*, 1997/ — Vol. 11. — P. 1447–1463.

Zhu W., Giangrande P. H., Nevins J. R. E2Fs link control of G1/S and G2/M transcription / *The EMBO J.*, 2004. — Vol. 23. — P. 4615–4626.

ГЛАВА 6 || СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ Bmi1 И SHH В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

6.1. Роль Bmi1 — члена семейства генов Polycomb — в регуляции функций стволовых клеток

Почему биологическая роль белков Bmi1 и Shh рассматривается в одной главе?

Рассмотрим два сигнальных пути, в которых важную роль играют транскрипционные факторы Bmi1 и Shh. Современные публикации показывают, что Bmi1, член семейства генов *Polycomb*, играет ключевую роль в самоподдержании стволовых кроветворных клеток (СКК) и нейрональных стволовых клеток (НСК) взрослого организма посредством репрессии генов, вовлеченных в развитие клеточного старения (рис. 6.1). Сигналы, передаваемые белком *Sonic Hedgehog* (Shh), членом семейства генов *Hedgehog*, регулируют клеточные функции с помощью нескольких механизмов, в том числе и путем активации синтеза Bmi1.



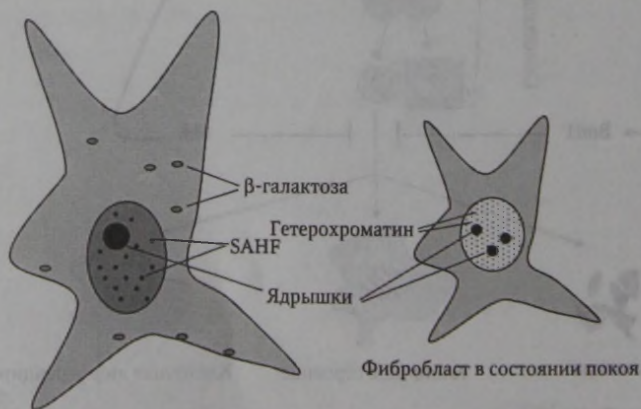
Рис. 6.1. Белки Bmi1 и Shh активируют самоподдержание кроветворных и нейрональных стволовых клеток путем репрессии генов, вовлеченных в развитие клеточного старения, клеточной дифференцировки и апоптоза (Sparmann A., van Lohuizen M., 2006)

Виды, причины и признаки старения клетки

Клеточное старение, так же как дифференцировка и апоптоз, является генетически запрограммированной функцией клетки. Клеточное старение может активироваться внешними или внутренними сигналами. Выделяют внешнее и внутреннее клеточное старение, отличающиеся не только причиной возникновения, но и механизмом развития. Внутреннее (intrinsic), или репликативное клеточное старение, возникает в результате укорочения концов хромосом при делении клетки, его причины и механизмы рассматривались в главе 1 (см. рис. 1.16).

Внешнее (extrinsic) старение, не зависящее от теломер, может быть вызвано разнообразными факторами, такими как рентгеновское или ультрафиолетовое облучение, гипероксия, эктопическая экспрессия определенных онкогенов или опухолевых супрессоров. Внешнее клеточное старение активируется сигналами, независимыми от теломер, возникает при наличии функциональных теломер и при нормальном пролиферативном потенциале клетки. Например, в диплоидных фибробластах человека линии IMR90 внешнее старение можно вызвать путем экспрессии экзогенного онкогена RAS, экспрессии активированной киназы Mek, обработкой хемотерапевтическим реактивом этопозид, экзогенной экспрессией CdkI p16^{Ink4a} или интенсивным пассированием в культуре *in vitro*. В состоянии старения клетки характеризуются одним большим ядрышком и небольшими фокусами ДНК, которые визуализируются при ее окраске красителем DAPI. Напротив, покоящиеся клетки характеризуются несколькими маленькими ядрышками и более равномерной окраской ДНК красителем DAPI (рис. 6.2).

Клетки линии IMR90, инфицированные ретровирусом RAS и селективным маркером, через 3–5 дней после селекции накапливают гипофосфорилированный pRb, белок p16^{Ink4a}, и формируют так называемые *фокусы гетерохроматина*, связанные со старением (SAHF). Клетки с признаками старения остаются метаболически активными, проявляют характерные изменения в клеточной физиологии и экспрессии генов и активно продуцируют β -галактозидазу, ассоциированную с клеточным старением (senescence-associated β -galactosidase, Sa- β -gal).



Фибробласт в состоянии старения

В клетках в состоянии старения не экспрессируются гены, необходимые для пролиферации, даже в случае поступления митогенных сигналов извне. Эти черты отличают клеточное старение от остановки клеточного цикла, которое обратимо в ответ на действие митогенов. Клеточное старение, подобно апоптозу, является ответом на стресс, который ограничивает пролиферацию поврежденных клеток.

Существует предположение, что клеточное старение связано с изменением экспрессии генов, которое регулируется эпигенетическими механизмами. Об этом свидетельствуют данные, что ингибиторы гистоновых ацетилаз, которые конденсируют хроматин и ингибируют транскрипцию некоторых генов, могут вызывать состояние, подобное клеточному старению в фибробластах человека. Эти результаты позволяют предположить, что конденсация хроматина и последующее снижение активности определенных генов может регулировать клеточное старение.

Хотя обычно клеточное старение изучается на отдельных клетках, этот процесс важен для старения всего организма и развития опухолей. Клеточное старение часто обсуждается как клеточный эквивалент старения организма. Действительно, увеличение активности Sa- β -gal может определяться в клетках пожилых людей и пациентов с синдромом преждевременного старения. Более того, мутации, которые предотвращают репарацию ДНК или способствуют ее хроническому повреждению, могут способствовать и преждевременному старению клетки *in vitro* и *in vivo*. Некоторые гены, модулирующие старение клетки в культуре, влияют на продолжительность жизни у мышей. Благодаря антипролиферативному эффекту, клеточное старение потенциально является противоопухолевым механизмом. Мутации в определенных генах опухолевой супрессии компрометируют клеточное старение, таким образом делая вклад в клеточную иммортализацию и возникновение рака. Цитотоксические реагенты, которые используются в противоопухолевой терапии, могут вызывать клеточное старение, а нарушение процесса клеточного старения может способствовать устойчивости к действию противораковых лекарств.

Модификации гистонов, характерные для старения

На молекулярном уровне гетерохроматиновые области обычно характеризуются отсутствием ацетилирования по лизину 9 и 14 (H3K9/14ac) и метилирования по лизину 4 гистона H3 (H3K4me), но обогащены по метилированному лизину 9 того же гистона, который обозначается как H3K9me (рис. 6.3). H3K9me обеспечивает сайт связывания для белков семейства HP-1, адапторных молекул, которые нужны для сборки гетерохроматина и вовлечены в эпигенетическую регуляцию генов. Белки семейства HP-1 являются небольшими молекулами, располагающимися в области гетерохроматина у многих видов животных, включая дрожжи, мух, а также человека. Мутации генов HP-1 снижают сайленсинг генов в областях гетерохроматина, предполагая, что белки этого семейства необходимы для его локальной упаковки. Вероятно, роль белков HP-1 в образовании гетерохроматина подобна роли белков семейства Sir в формировании теломерных участков гетерохроматина у пивных дрожжей. Белки семейства HP-1 специфически связывают через хромодомены метильную группу лизина 9 гистона H3 (H3K9me). Кроме того, белки семейства HP-1 образуют комплексы с метилтрансферазой Suv39h, которая метилирует H3K9. Наконец, молекулы HP-1 способны образовывать гомополимерные структуры. Эти факты предполагают, что самовоспроизведение гетерохроматина у высших эукариот происхо-

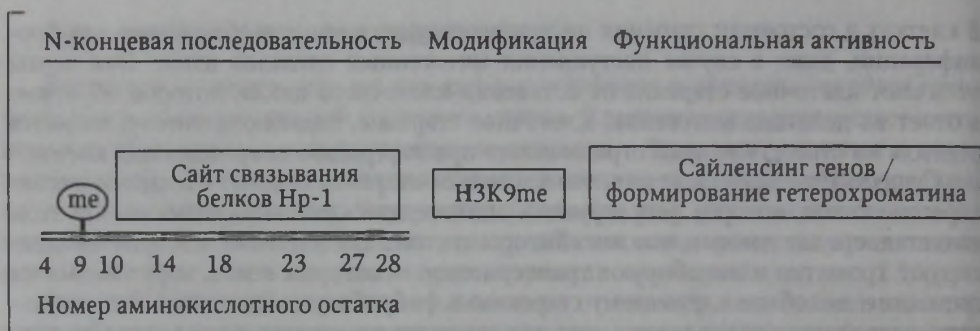


Рис. 6.3. Маркеры модификации гистона H3 при клеточном старении (Narita M. [et al.], 2003)

дит с помощью белков семейства HP-1, которые действуют подобно белкам семейства Sir у пивных дрожжей (см. цв. вклейку, рис. 6.4).

При удвоении ДНК присутствие комплексов Нр-1—Suv39h на родительских нуклеосомах способствует метилированию вновь синтезированных нуклеосом, т. е. обеспечивает сайты связывания для других молекул Нр-1 и инициирует каскад формирования гетерохроматина. Вновь образованный хроматин дочерней клетки, расположенный рядом с участками гетерохроматина материнской клетки, метилируется, связывает Нр-1 и приобретает свойства гетерохроматина.

Ацетилирование лизинов 9 и 14 гистона H3 (H3K14ac) характеризует активацию генов. Известно, что гены *стромелизин-1* (*stromelysin-1*) и *p16^{Ink4a}* активируются в процессе клеточного старения, тогда как гены циклин А и PCNA, которые относятся к мишеням белков семейства E2F, активируются в пролиферирующих клетках (рис. 6.5). Накопление ацетилированного по лизинам 9 и 14 гистона

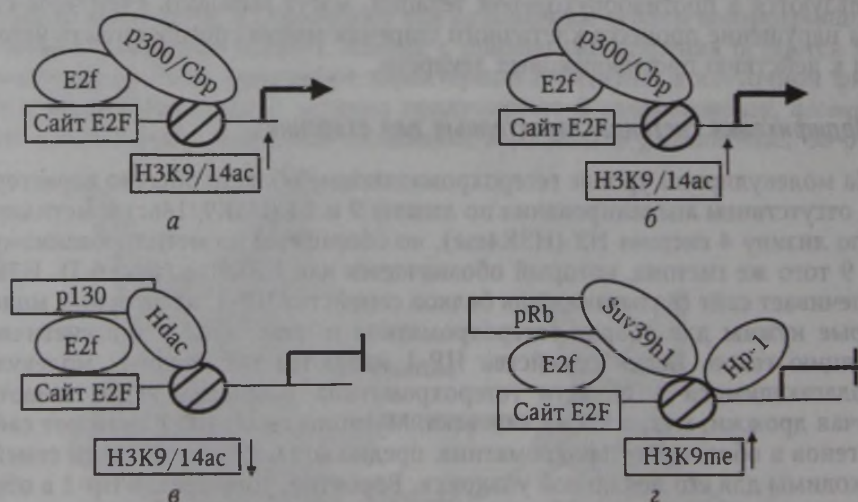


Рис. 6.5. Характеристика регуляторных белков, взаимодействующих с транскрипционными факторами E2f при клеточном старении:

увеличение H3K9/14ac на промоторе гена стромелизина-1 отмечается при клеточном старении, но не в покоящихся клетках (а); количество H3K9/14ac на промоторах генов PCNA и циклина А увеличивается в делящихся клетках (б) и снижается в покоящихся клетках (в); количество H3K9me и белка Нр-1 на промоторах генов циклина А и PCNA увеличивается в стареющих клетках (г) по сравнению с покоящимися клетками (Narita M. [et al.], 2003)

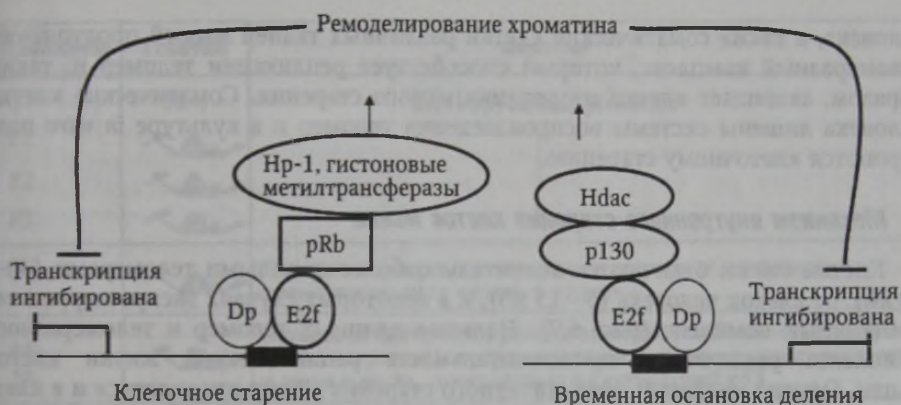


Рис. 6.6. Роль продукта гена ретинобластомы в механизме клеточного старения (Narita M. [et al.], 2003)

H3 (H3K9/14ac), связанного с промотором гена стромелизин-1, отмечается в клетках с клеточным старением, но не в покоящихся клетках, тогда как количество H3K9/14ac, связанное с генами PCNA и циклином А, снижается при клеточном старении. С другой стороны, количество H3K9/14ac, ассоциированное с геном стромелизин-1, не увеличивается в покоящихся клетках, показывая, что этот феномен специфичен для клеточного старения. Уровень ацетилирования H3K9/14ac на промоторах генов циклина А и PCNA снижается в покоящихся клетках, показывая, что этот феномен не является специфичным для стареющих клеток.

Количество H3K9me и Hr-1, связанное с промоторами генов циклина А и PCNA, увеличивается в стареющих клетках по сравнению с покоящимися клетками. При клеточном старении на промоторах генов циклина А и PCNA повышается также уровень связанного pRb, но не p130, тогда как в покоящихся клетках на тех же промоторах отмечается аккумуляция p130 (рис. 6.6).

Механизм внутреннего старения клеток человека

В 1961 г. доктор Л. Хейфлик (L. Hayflick) опубликовал работу, в которой показал, что нормальные фибробласты человека имеют ограниченную продолжительность репликативной жизни. Фибробласты человека необратимо останавливаются после 50 клеточных делений и в культуре *in vitro* представляют собой большие и распластанные на адгезивной поверхности клетки. Такие клетки характеризуются необратимой остановкой клеточного цикла и выживают в культуре в течение длительного времени без очевидных признаков апоптоза. Это состояние было названо *репликативным клеточным старением* (рис. 6.7).

Концы хромосом — теломеры, упакованы в гетерохроматиновые структуры, которые воспроизводятся в клеточном цикле с помощью специальной теломеразной системы. Если клетка не обеспечена такой системой, то хромосомы укорачиваются при каждом клеточном делении. Теломеры предохраняют хромосомы от слияния и предотвращают активацию контрольной точки повреждения ДНК и последующий апоптоз, который активируется при образовании двуцепочечных концов ДНК (см. главу 4). Зародышевые и другие стволовые клетки

человека, а также соматические клетки различных тканей мышей продуцируют теломеразный комплекс, который способствует репликации теломер и, таким образом, защищает клетки от репликативного старения. Соматические клетки человека лишены системы воспроизведения теломер и в культуре *in vitro* подвергаются клеточному старению.

Механизм внутреннего старения клеток мыши

Клетки мыши отличаются значительно более длинными теломерами (40–60 кб), от клеток человека (5–15 кб), и в некоторых случаях экспрессируют теломеразный комплекс (рис. 6.7). Наличие длинных теломер и теломеразного комплекса увеличивает продолжительность репликативной жизни клеток мыши. Однако механизм репликативного старения может проявляться и в клетках мыши при их интенсивном делении или нарушении функций теломеразного комплекса. Для изучения влияния повреждения теломер в мышечных клетках ген РНК (TR) в теломеразном комплексе был мутирован в зародышевой мышечной линии, затем были получены трансгенные мыши с генотипом TR^{-/-}, не продуцирующие этот компонент теломеразного комплекса. У первых трех поколений мышей с фенотипом TR^{-/-} не проявлялись видимые нарушения. В четвертом поколении рекомбинантные мыши начинали показывать потерю теломерных повторов, анеуплоидию и слияние хромосом по типу «конец-в-конец» (рис. 6.8). Клетки 5-го или 6-го поколения таких животных показывали зависимость от p53 остановку клеточного цикла и геномную нестабильность. Эти мыши были бесплодными вследствие неспособности их зародышевых стволовых клеток делиться.

Для понимания роли p53 в клеточном старении мыши с генотипом TR^{-/-} были скрещены с мышами с генотипом p53^{+/-}. В гибридах TR^{-/-}, p53^{+/-} за-

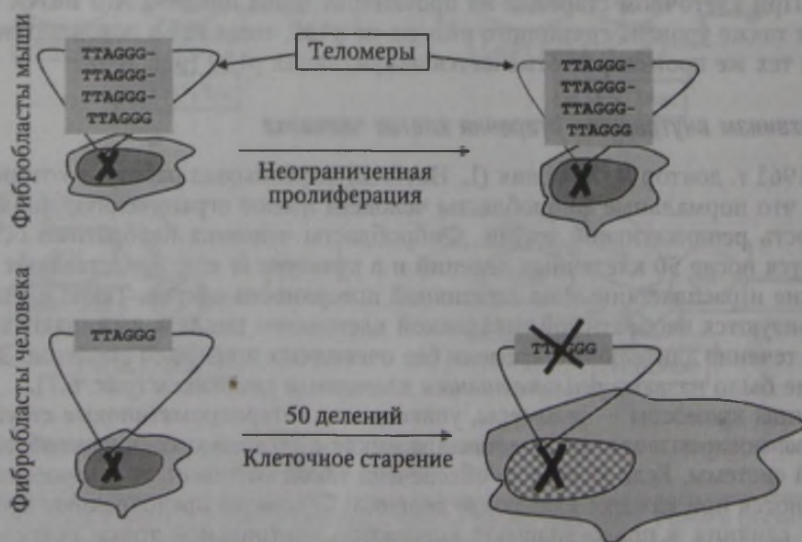


Рис. 6.7. Сравнение механизмов репликативного старения в клетках человека и мыши (Hayflick L., 1965)

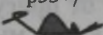
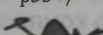
Поколение	Генотип	Фенотип
F1 F2 F3	TR-/-   	Нет нарушений фенотипа ↓
F4		Потеря теломерных повторов, анеуплоидия и слияние хромосом по типу «конец в конец»
F5 F6		Остановка клеточного роста и апоптоз, устойчивость к индукции канцерогенами опухолей кожи, сердечная недостаточность и стерильность, опосредованная активацией p53
F8	TR-/-, p53+/- 	Зависимый от p53 апоптоз ослаблен, мыши фертильны и выживают до 8-го поколения. У мышей возникает бесплодие вследствие истощения пролиферативного потенциала ЗСК
F6	TR-/-, p53+/- 	Сверхэкспрессия MYC и RAS увеличивает чувствительность к формированию рака, тогда как восстановление продукции TR предотвращает злокачественную трансформацию, вызванную экспрессией протоонкогенов MYC и RAS

Рис. 6.8. Механизм клеточного старения у трансгенных мышей с эмбриональной инактивацией компонента РНК теломеразного комплекса (TR-/-) (Chin L. [et al.], 1999)

висимый от p53 апоптоз был ослаблен, и такие мыши выживали до 8-го поколения. Эти данные предполагают, что пролиферация клеток мышей может быть остановлена в результате повреждения теломеров подобно таковой в клетках человека, подвергающихся репликативному старению. Эмбриональные СК мышей с фенотипом TR-/- прекращают деление после 450 удвоений.

Пятое поколение мышей TR-/- показывает зависимость от p53 устойчивость к индукции опухолей кожи, шестое поколение — симптомы преждевременного клеточного старения, включая сниженную способность отвечать на стрессы, такие как заживление ран и восстановление кроветворения при истощении костного мозга. Потеря теломер в пятом поколении мышей TR-/- также ведет к сердечной недостаточности, связанной с повышением уровня опухолевого супрессора p53. Эти данные предполагают, что укорочение теломер является не только механизмом опухолевой супрессии, но может способствовать старению организма и возникновению связанных с ним заболеваний.

Каков механизм передачи сигналов от поврежденных теломеров к p53? В нормальных и стареющих клетках p53 показывает различный рисунок фосфорилирования. Сигнал от поврежденной ДНК к p53 передается киназами семейства ATM (см. главу 5). Повреждение теломер ускоряется в фибробластах пациентов с атаксией-телеангиэктазией (наследственном синдроме, возникающем вследствие инактивирующих мутаций в киназах семейства ATM). Другой известной посттрансляционной модификацией, которая активирует p53, является его ацетилирование. p53 ацетируется в стареющих клетках с помощью различных ацетилтрансфераз, например p300/Cbp или Mpl, что предотвращает его убиквитинацию лигазой Mdm2 (см. рис. 6.9).

Активация p53 в ответ на стрессорные условия является причиной остановки клеточного цикла, активации апоптоза и возникновения клеточного старе-

ния. Инактивация p53 увеличивает продолжительность жизни фибробластов человека. Активность p53 и его мишени — гена Cdk1 p21^{Cip1} — увеличивается при клеточном старении. Направленная инактивация гена p21^{Cip1}, который играет патогенетическую роль в индукции клеточного старения в фибробластах человека путем инактивации Cdk, является достаточной для преодоления клеточного старения. p53 может быть стабилизирован с помощью белка p19(p14)^{Arf}, активация которого ингибирует Mdm2 — убиквитиновую лигазу, инактивирующую p53. Поскольку многие клетки человека при злокачественной трансформации имеют мутации в гене p19^{Ink4d}, этот белок рассматривается как опухолевый супрессор. Уровень мРНК p19^{Ink4d} очень низок в нормальных фибробластах человека, но его экспрессия увеличивается в том случае, если клетки подвергаются репликативному старению (см. рис. 6.9).

У трансгенных мышей с фенотипом TR-/- и нефункционирующей контрольной точкой повреждения ДНК, укорочение теломеров может вызывать геномную нестабильность и образование опухолей, независимо от присутствия теломеразного комплекса. Сверхэкспрессия онкогенов MYC и RAS в мышиных эмбриональных фибробластах, полученных от шестого поколения мышей TR-/-, p53+/- вызывает злокачественную трансформацию клеток, тогда как эктопическая экспрессия TR нормализует активность теломеразного комплекса и предотвращает трансформацию клеток (см. рис. 6.8).

Механизм внешнего клеточного старения, роль pRb и p53

Почему нормальные мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ), обладающие длинными теломерами и теломеразным комплексом, стареют в культуре вне организма? Потому что эти клетки подвергаются внешнему старению, которое является ответом на оксидативный стресс в культуре *in vitro*. Внешнее старение клетки является результатом ее ответа на стресс и последующее повреждение ДНК, или прямое повреждение ДНК. Стандартные условия в культуре *in vitro* включают присутствие в газовой среде для культивирования клеток 20 % атмосферного кислорода, что создает значительно более высокое напряжения кислорода по сравнению с тем, которое испытывает большинство клеток внутри организма. В таких условиях нормальные МЭФ показывают признаки оксидативного стресса, включая повреждение ДНК. МЭФ, полученные от мышей с инактивированным геном p53, не стареют в условиях оксидативного стресса (рис. 6.9).

pRb и p53 являются важными регуляторами клеточного старения, типично активируются в процессе клеточного старения, и усиленная экспрессия любого из этих белков вызывает старение в некоторых клеточных типах. В фибробластах человека экспрессия онкобелков вирусов, трансформирующих ДНК и инактивирующих pRb и p53, может преодолеть клеточное старение. Например, экспрессия большого Т-антигена вируса SV40, который физически взаимодействует с pRb и p53, преодолевает клеточное старение. Т-антиген, лишенный способности связывать эти белки, в значительной степени утрачивает такую способность. Белок E1a аденовируса связывает «пocketные» белки, препятствует остановке клеточного деления, опосредованной p53, и предотвращает клеточное старение, вызванное повреждением ДНК и онкогеном RAS. Утрата фибробластами белка p53 достаточна для преодоления клеточного старения, тогда как изолированная инактивация pRb не оказывает очевидного эффекта на этот

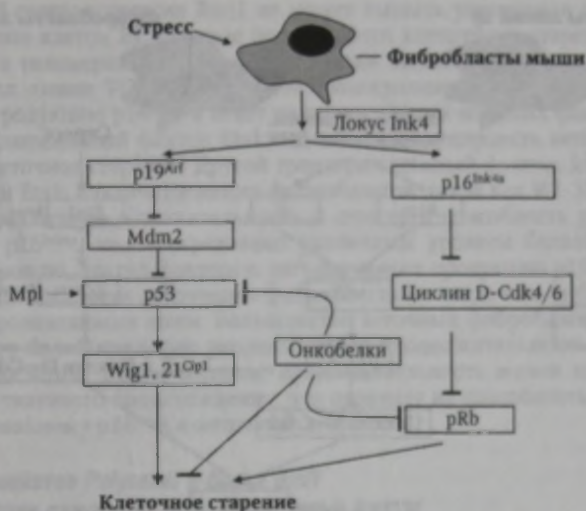


Рис. 6.9. Механизм внешнего старения клеток мыши (Sherr C. J., DePinho R. A., 2000)

феномен. Однако МЭФ с инактивацией всех трех членов семейства pRb теряют способность подвергаться клеточному старению в культуре *in vitro* (см. табл. 5.3). Как описывалось ранее, член семейства продукта гена ретинобластомы, белок p130, опосредует состояние клеточного покоя путем взаимодействия с белками семейства E2F на промоторах генов, регулирующих прогрессию клеточного цикла. Наоборот, pRb может связываться с белками семейства HP-1 и гистоновой метилтрансферазой Suv39h1, показывая возможность своего участия в метилировании гистонов и рекрутировании белков семейства HP-1 к промоторам генов, отвечающих на E2f в процессе клеточного старения (см. рис. 6.6). pRb колокализуются с SAHF в клетках с активированным механизмом старения.

Во многих случаях p53 и pRb активируются и способствуют клеточному старению с помощью продуктов генов p16^{Ink4a}/p19^{Arf}, которые аккумулируются в стареющих клетках. Мутации в генах p16^{Ink4a} или p19^{Arf} могут предотвратить клеточное старение (см. рис. 6.9). Онкобелок E1a, который вызывает иммортализацию клеток, препятствует функции pRb и предотвращает формирование фокусов гетерохроматина, ассоциированных с клеточным старением (SAHF). pRb взаимодействует с Hp-1 путем связывания мотива LxSxE, и это взаимодействие может разрушаться белком аденовируса E1a. Экспрессия белка p16^{Ink4a} индуцирует продукцию β-галактозидазы, способствует формированию SAHF и репрессирует гены-мишени E2f.

Роль члена семейства Polycomb — белка Bmi1 — в механизме клеточного старения

МЭФ, полученные от животных с инактивацией в эмбриональном периоде обеих аллелей гена BMI1, члена семейства Polycomb, показывают ускоренное старение, что сочетается с аккумуляцией белков p16^{Ink4a} и p19^{Arf}. Наоборот,

Фибробласты линии BJ

Фибробласты линии WI-38

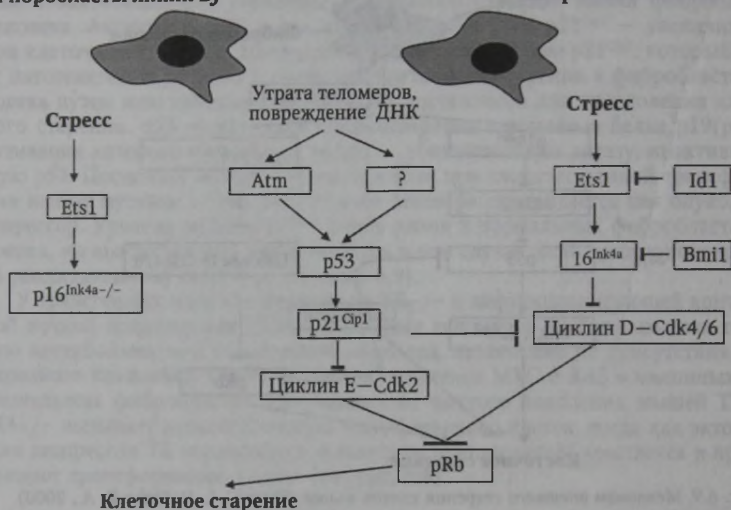


Рис. 6.10. Сравнение различных механизмов клеточного старения в фибробластах человека линий WI-38 и BJ (Itahana K. [et al.], 2004)

сверхэкспрессия Bmi1 замедляет старение МЭФ и увеличивает репликативную продолжительность жизни фибробластов человека путем ингибции активности локуса Ink4.

Сверхэкспрессия Bmi1 в фибробластах человека линии WI-38, продуцирующих p16^{Ink4a}, ведет к элиминации таких клеток уже на ранних пассажах (рис. 6.10). Продукция в клетках WI-38 мутантного белка Bmi1, проявляющего доминантно-негативную активность, индуцирует экспрессию p16^{Ink4a} и ускоряет старение. Клетки со сверхэкспрессией Bmi1 и укороченными теломерами стареют медленнее контрольных клеток, обладающих подобными по длине теломерами. Клетки с фенотипом старения при поддержании в культуре *in vitro* более 1 мес. показывают сниженный уровень Bmi1 и увеличение продукции p16^{Ink4a}. Основываясь на этих наблюдениях, было предположено наличие двух различных механизмов старения фибробластов человека в культуре *in vitro*: внешнего, опосредованного p16^{Ink4a}, и внутреннего, являющегося следствием укорочения теломер. В культуре фибробластов линии WI-38, обладающих сравнительно длинными теломерами, постоянно возникают клетки с признаками старения. Сверхэкспрессия Bmi1 спасает эти клетки от внешнего старения путем супрессии p16^{Ink4a} и увеличивает продолжительность жизни таких клеток. Однако укорочение теломер вследствие активной пролиферации постепенно вызывает внутреннее старение и в клетках со сверхэкспрессией Bmi1. С другой стороны, клетки линии BJ, не экспрессирующие p16^{Ink4a}, резистентны к стрессу, вызванному внешними факторами, и не подвергаются внешнему клеточному старению (см. рис. 6.10).

Таким образом, клетки, лишенные белка p16^{Ink4a}, подвергаются только внутреннему типу старения, зависящему от укорочения теломер. В соответствии

с этой идеей сверхэкспрессия Bmi1 не может вызвать увеличения продолжительности жизни клеток BJ, которые подвергаются клеточному старению при более коротких теломерах, чем стареющие клетки линии WI-38.

В клетках линии WI-38 существуют транскрипционные факторы, которые вызывают продукцию $p16^{Ink4a}$ в ответ на стресс. Одним из таких факторов является транскрипционный фактор Ets1, способный индуцировать активность гена $p16^{Ink4a}$ и клеточное старение. Другой транскрипционный фактор, Id-1, является ингибитором Ets1. Различные линии фибробластов, такие как WI-38 и BJ, могут проявлять различную чувствительность к стрессу и способность регулировать продукцию $p16^{Ink4a}$, что опосредовано различным уровнем белков Ets1, Id-1, Bmi1 и, возможно, других факторов, регулирующих продукцию $p16^{Ink4a}$. Известно, что WI-38 являются легочными фибробластами, тогда как фибробласты BJ являются производными кожи. Большинство легочных фибробластов, по-видимому, имеют более короткую репликативную продолжительность жизни, чем фибробласты кожи. Таким образом, продолжительность жизни клеток может зависеть от тканевого происхождения, что отражает их способность подвергаться опосредованному $p16^{Ink4a}$ клеточному старению.

Роль семейства Polycomb и белка Bmi1 в регуляции самоподдержания стволовых клеток

Гены, контролирующие план и сегментацию тела у мух, формируют семейство НОХ. Активность генов НОХ поддерживается двумя большими группами транскрипционных регуляторов, семействами генов *Polycomb* (PcG) и *Trithorax* (TrxG). При нарушении активности продуктов этих генов рисунок экспрессии генов НОХ вначале не изменяется, но в процессе развития плода не может поддерживаться на исходном уровне. Факторы семейств PcG и TrxG действуют в противоположных друг другу направлениях. Белки TrxG необходимы для поддержания предварительно активированной транскрипции генов НОХ. Напротив, белки семейства PcG формируют стабильные комплексы, связывающие хроматин и поддерживающие экспрессионное состояние генов в клетках, в которых экспрессия генов НОХ не была активирована в критическое время. Члены семейств PcG и TrxG, участвующие в ремоделировании хроматина и регулирующие эпигенетические события, такие как модификация гистонов, вовлечены в регуляцию судьбы соматических стволовых клеток зрелого организма путем участия в механизмах их самоподдержания, клеточного старения и, возможно, старения организма в целом.

В составе семейства генов PcG идентифицировано два многокомпонентных белковых комплекса, *Polycomb репрессивные комплексы 2 и 1* (PRC2 и PRC1) (табл. 6.1).

Комплекс PRC2 вовлечен в инициацию феномена сайленсинга генов и содержит гистоновые деацетилазы и гистоновые метилтрансферазы, метилирующие лизины 9 и 27 гистона H3 и лизин 26 гистона H1, что является меткой сайленсинга генов. Комплекс PRC2 содержит белки Suz12, Eed, RbAp46/48, гистоновую метилтрансферазу Ezh2, которая триметилирует H3K27 (H3K27me3). Комплекс PRC1 вовлечен в поддержание репрессии генов путем распознавания метилированного лизина H3K27me3 (рис. 6.11).

У мух *Drosophila* комплекс PRC1 состоит из 4 основных элементов, тогда как у млекопитающих существует несколько гомологичных белков каждого из

Таблица 6.1

Номенклатура генов семейства Polycomb
(Valk-Lingbeek M. E. [et al.], 2004)

Название комплекса	Белки, входящие в состав комплекса
PRC2 — комплекс, инициирующий сайленсинг генов	Eed
	Ezh1
	Ezh2
	Suz12
	Cbx2/Hpc1
PRC1 — комплекс, поддерживающий сайленсинг генов	Cbx4/Hpc2
	Cbx8/Hpc3
	Edr1/Hph1
	Edr2/Hph2
	Edr3/Hph3
	Ring1/Rnf1/Ring1a
	Rnf2/Ring1b
	Bmi1
	Rnf110/Zep144
	Znf134
	Yy1
	Scml1
	Scml2
	Phf1
	Mel-18
	Rae-28

4 основных элементов. На рисунке 6.12 (см. цв. вкл.) в качестве основных элементов комплекса PRC1 показаны Ring1b, Bmi1, Cbx2, 4 или 8 и Edr1. Стабильное взаимодействие комплекса PRC1 с H3K27me₃ нуждается в убиквитинации лизина 119 гистона H2A (H2AK119ub1) лигазой Ring1b.

Семейство TtgG состоит из трех основных элементов: Wdr5, Ash2l и Rbbp5. Эти элементы могут взаимодействовать с гистоновыми метилтрансферазами (Hmt), например Set1 или членами семейства лейкемии смешанного типа

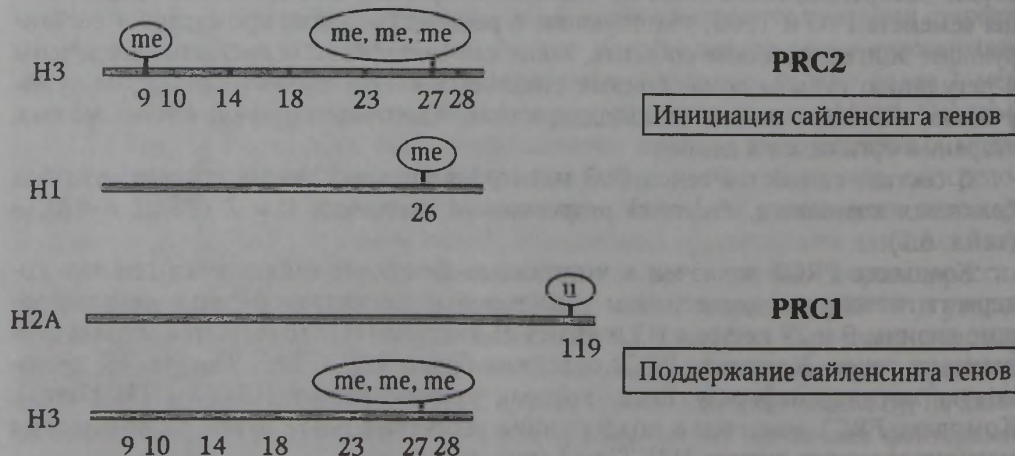


Рис. 6.11. Модификации гистонов, характеризующие активацию комплексов PRC1 и PRC2 и феномен сайленсинга генов (Valk-Lingbeek M. E. [et al.], 2004)

(MLL). Hmt комплекса TrxG триметилируют лизин 4 гистона H3 (H3K4me3), что является меткой активного хроматина (см. цв. вклейку, рис. 6.12).

Важность белков семейства PcG иллюстрируется опытами с эмбриональным нокаутом. Инактивация любого белка семейства PRC2 вызывает гибель мыши в эмбриональном периоде. Опыты *in vitro* показывают, что клетки с инактивированными генами EED или SUZ12, полученные от эмбрионов, не способны поддерживать плюрипотентность и склонны к дифференцировке. Несколько членов комплекса PRC1 играют критическую роль в регуляции самоподдержания соматических стволовых клеток. Например, инактивация Eed1 или Bmi1 сопровождается потерей способности к самоподдержанию кроветворных стволовых клеток. Утрата Bmi1 связана также с нарушением самоподдержания стволовых клеток молочной железы и центральной нервной системы.

В 2006 г. несколько групп исследователей опубликовали результаты, показывающие, что мишенями белков семейства PcG в ЭСК являются не только гены семейства HOX, но и другие регуляторы, такие как транскрипционные факторы Sox, Tbx и Gata. Эти гены репрессированы в ЭСК, но в ходе дифференцировки частично экспрессируются. Для хроматина ЭСК характерно широкое присутствие бивалентных доменов, т. е. двойной гистоновой метки: H3K4me3, присущей активному хроматину, и H3K27me3, связанной с неактивным хроматином. Гены в ЭСК можно подразделить на три категории:

- 1) несущие только метку активного хроматина H3K4me3;
- 2) содержащие одновременно метку активного хроматина H3K4me3 и неактивного хроматина H3K27me3;
- 3) не содержащие ни одной из этих меток.

Функционально гены этих групп различны. В частности, маркировка гена только триметилированием лизина 4 гистона H3 (H3K4me3) сочетается с активной экспрессией и метит гены, включенные в общий метаболизм. Гены с бивалентными доменами характеризуются значительно более низкой экспрессией и представляют собой регуляторы развития. Отсутствие той и другой метки свойственно генам с тканеспецифическими функциями. Такие гены, вероятно, регулируются стимулами, требующими быстрого ответа, что несовместимо с эпигенетическим характером регуляции. Напротив, наличие бивалентных доменов позволяет клетке отложить решение об ответе, что играет роль при анализе сложных сигналов, например в случае выбора клеточной судьбы. В некоторых случаях семейство PcG играет регуляторную роль в зрелом организме, например при регуляции активности локуса Ink4. Этот локус кодирует гены p16^{Ink4a} и p14(p19)^{Arf}, которые экспрессируются при стрессе, онкогенной активации и клеточном старении. В отсутствие генов BMI1 или EZH2, белки Ink4a и p14/p19^{Arf} начинают экспрессироваться конститутивно, что вызывает клеточное старение. Сверхэкспрессия Bmi1 способствует торможению активации Ink4a/Arf даже при наличии онкогенных стимулов.

В эмбриональных стволовых клетках транскрипционные факторы, регулирующие плюрипотентность (например Nanog и Oct3/4), характеризуются присутствием H3K4me3 в хроматине, связанном с их генами. При репрессии этих генов в ходе дифференцировки ЭСК формируют бивалентные домены. В более дифференцированных клетках, например в легочных фибробластах, соотношение H3K27me3/H3K4me3 в генах OCT3/4 и NANOG увеличивается. В этом случае PcG используется для инициации сайленсинга в большей степени, чем для выбора клеточной судьбы.

Стволовые кроветворные клетки (СКК) и нейральные стволовые клетки, т. е. клетки центральной и периферической нервной системы (НСК) экспрессируют высокий уровень белка Bmi1, члена семейства PcG и одного из основных факторов комплекса PRC1. Bmi1 вначале был идентифицирован как продукт онкогена, взаимодействующий с белком С-трус на модели мышинной лимфомы. Белок Bmi1 содержит на аминокислотном конце домен — «кольцевой палец» (RING finger), а в центре молекулы — домен HtH (helix-turn-helix), ответственный за образование димеров с другими членами семейства HtH. Структурная целостность домена «кольцевой палец» опосредует роль Bmi1 в образовании лимфомы у трансгенных мышей, экспрессирующих этот белок. Мыши, у которых в постнатальном периоде отсутствует Bmi1, проявляют дефекты кроветворения, скелетных, кроветворных, нейробиологических функций и нарушения развития мозжечка.

Современные исследования показали, что Bmi1 необходим для самоподдерживающих делений СКК и НСК, но его активность не является обязательной для образования дифференцирующихся клеток-потомков. Например, трансплантация клеток фетальной печени с фенотипом Bmi1^{-/-} приводит только ко временному восстановлению кроветворной системы реципиентов, предполагая, что трансплантированные мутантные клетки не способны образовывать долгоживущие СКК, но формируют мультипотентные предшественники, способные поддерживать кроветворение в течение 4–8 нед. Как и в случае со СКК, ослабление функции самоподдержания НСК, у которых снижена активность Bmi1, сопровождается их истощением в постнатальном периоде, но пролиферация и выживание коммитированных клеток-предшественников с низкой активностью Bmi1 остаются нормальными. Поскольку у мышей, не экспрессирующих Bmi1, происходят изменения во многих тканях, было предположено, что продукт гена Bmi1 участвует в регуляции самоподдержания многих или всех типов СКК.

Bmi1 может также играть ключевую роль в возникновении некоторых типов рака. В 11 % клеток лимфомы мантийного типа отмечаются 3–7-кратная амплификация гена Bmi1 и повышение уровня его продукта. На модели мышинной лейкемии установлено, что Bmi1 необходим для поддержания лейкоэмических клеток. Среди всех клеток при остром миелоидном лейкозе только клетки, содержащие ген Bmi1 дикого типа, обладали способностью выживать при повторных трансплантациях. Учитывая, что в стволовых клетках больных с острым миелоидным лейкозом отмечается высокий уровень белка Bmi1, предполагается, что он необходим для самоподдержания лейкоэмических СК у человека.

Мишени Bmi1

Опыты с изучением большой выборки генов предполагают, что продукт гена Bmi1 модулирует самоподдержание СКК, опосредованное регуляцией генов, важных для выбора клеточной судьбы, а также генов выживания и антипролиферативных генов. Мишень Bmi1 — локус Ink4, кодирующий белки p16^{Ink4a} и p19^{Arf}, при активации в СКК способствует клеточному старению и апоптозу (рис. 6.13).

Уменьшение активности p16^{Ink4a} в НСК со сниженной продукцией Bmi1 частично восстанавливает их способность к самоподдержанию. Мыши с отсутствием Bmi1 способны к индукции как p16^{Ink4a}, так и p19^{Arf} в различных кроветворных и нейральных тканях. Сверхэкспрессия как p16^{Ink4a}, так и p19^{Arf} вызывает остановку клеточного цикла и апоптоз через зависимый от p53 сигнальный

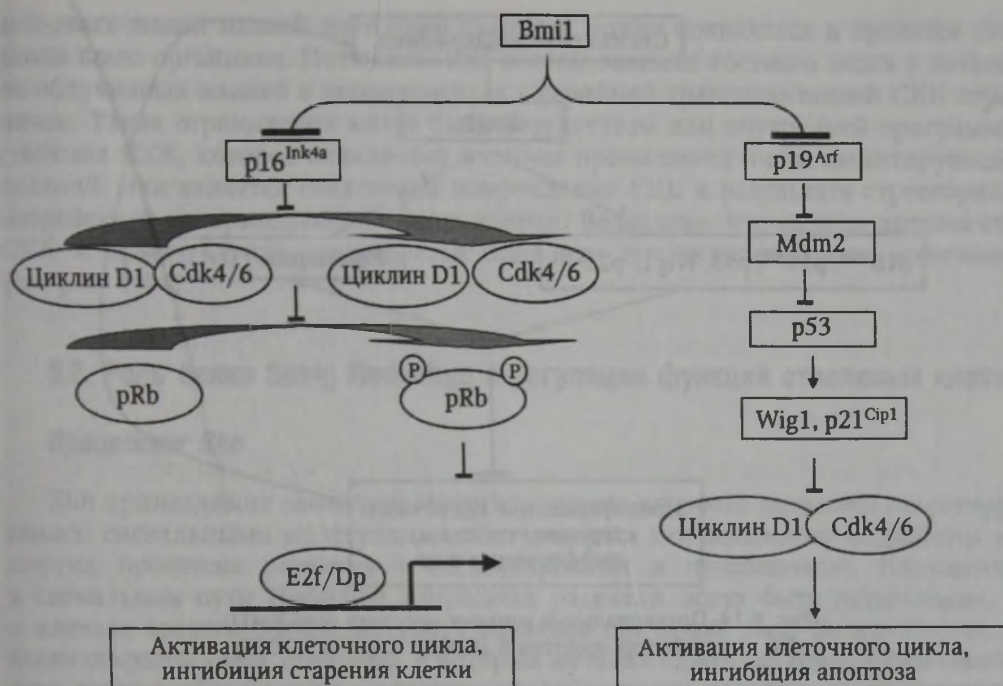


Рис. 6.13. Механизм регуляции клеточного цикла, апоптоза и клеточного старения продуктом гена Bmi1 (Park I. K. [et al.], 2004)

путь. Двойная делеция генов $p16^{Ink4a}/p19^{Arf}$ частично спасает фенотип, наблюдаемый у мышей со сниженной активностью Bmi1, предполагая, что $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ и p53 являются нижележащими эффекторами Bmi1, вовлеченными в контроль пролиферации и выживания СКК при самоподдерживающихся клеточных делениях. Bmi1 поддерживает популяцию СКК отчасти путем репрессии генов, вовлеченных в регуляцию клеточного старения.

Увеличение уровня экспрессии мишени гена p53 — Wig1 в костном мозге мышей с фенотипом Bmi1^{-/-} предполагает, что сигнальный путь $p19^{Arf}$ может быть активирован в кроветворных клетках мышей в ответ на инактивацию Bmi1. Wig1 является белком, связывающим двухцепочечную РНК и ингибирующим рост опухоли *in vitro*. Вероятно, этот белок может принимать участие в сигнальном пути p53, активируемом в ответ на стресс. Наблюдение, что мыши со сниженной активностью p53 содержат увеличенное число стволовых клеток, соответствует фактам, что p53 является мишенью Bmi1. Экспрессия некоторых членов семейства генов HOX также изменяется в кроветворных тканях и *нейросферах* (колонии, возникающие при делении НСК в культуре *in vitro*), полученных от мышей со сниженной активностью продукта гена Bmi1.

Существуют доказательства, что Bmi1 может регулировать экспрессию теломеразы в эпителиальных клетках молочной железы человека и играет важную роль в развитии опухолей молочной железы. Bmi1 сверхэкспрессирован в нескольких стабильных линиях, полученных из клеток опухолей молочной железы. Вероятно, Bmi1 активирует иммортализацию клеток молочной железы путем сайленсинга гена $p16^{Ink4a}$ и увеличивает продолжительность их репликативной жизни,

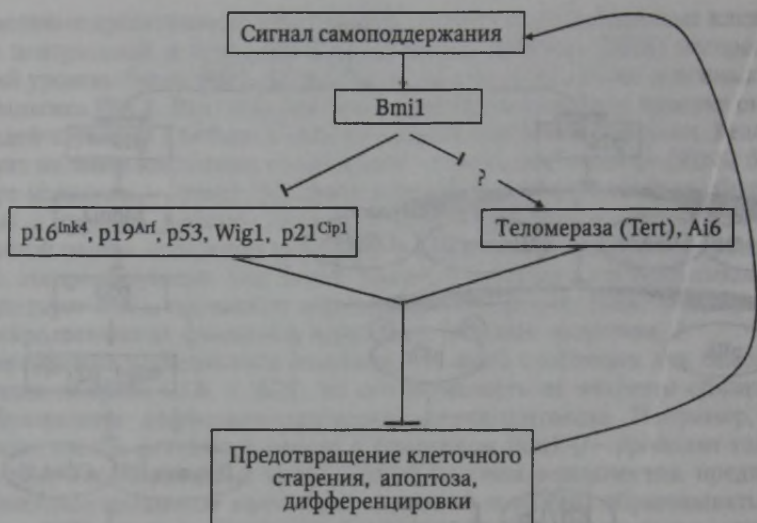


Рис. 6.14. Потенциальные мишени продукта гена Bmi1: Ai6 — ингибитор апоптоза 6 (Park I. K. [et al.], 2004)

что позволяет трансформированным клеткам молочной железы избегать клеточного старения. В клетках человека механизм иммортализации может быть связан с активацией обратной транскриптазы теломеразного комплекса, что ведет к индукции теломеразной активности. Хотя TERT является прямой мишенью c-Myc, который вызывает активацию ее транскрипции в МЭФ, Bmi1, вероятно, действует независимо от c-Myc (рис. 6.14).

Поскольку Bmi1 является транскрипционным репрессором, индукция теломеразной активности в случае активации теломеразы является непрямым механизмом. Мутационный анализ Bmi1 предполагает, что домены «кольцевой палец» и мотив HtH в его структуре поддерживают способность этого белка индуцировать теломеразу и вызывать иммортализацию. Эти данные предполагают, что Bmi1 прямо или опосредованно активирует экспрессию теломеразы в эпителии молочной железы и может способствовать развитию рака молочной железы. Индукция теломеразы с помощью Bmi1 зависит от типа клеток. Например, Bmi1 не способен индуцировать активность теломеразы в фибробластах кожи человека линии BJ. Этот факт соответствует наблюдению, что сверхэкспрессия Bmi1 не иммортализует некоторые линии фибробластов человека. Вероятно, активность Bmi1 важна для поддержания многих типов ССК, поскольку этот белок экспрессируется во многих тканях. Мыши со сниженной активностью Bmi1 проявляют дефекты развития многих органов. Bmi1 также важен для поддержания лейкоэмических и других ОСК, поэтому этот ген и его продукт могут быть использованы как молекулярные мишени для индукции клеточного старения в ОСК.

Bmi1 поддерживает размер популяции ССК и регулирует ключевые гены, вовлеченные в механизмы старения организма и клеточного старения. Пока не ясно, подвергаются ли СК старению по мере старения организма. У мышей линии C57BL, которые служат моделью в большинстве экспериментов, число ССК увеличивается с возрастом без потерь клеточных функций. Однако у опре-

деленных линий мышей клеточное старение может появляться в процессе старения всего организма. Потенциал для восстановления костного мозга у летально облученных мышей в экспериментах с серийной трансплантацией СКК ограничен. Такие ограничения могут быть результатом или внутренней программы старения СКК, которое появляется в случае превышения числа лимитирующих делений, или является следствием повреждения СКК в результате стрессорных воздействий на трансплантируемые клетки. Возможно, что потеря активности СКК в любом случае опосредуется *Bmi1* или его нижележащими мишенями (см. рис. 6.14).

6.2. Роль белка Sonig Hedgehog в регуляции функций стволовых клеток

Процессинг *Shh*

Shh принадлежит семейству Hedgehog, члены которого являются секретируемыми сигнальными молекулами, действующими как локальные медиаторы во многих процессах развития у беспозвоночных и позвоночных. Нарушения в сигнальном пути Hedgehog в процессе развития могут быть летальными, а в клетках зрелого организма могут являться причиной рака. Белки Hedgehog были открыты у мух *Drosophila*, у которых мутация одного из генов этого семейства ведет к образованию личинки с иглообразными отростками, напоминающими ежа (Hedgehog). Три гена кодируют белки семейства Hedgehog у позвоночных — Sonic, Desert и Indian. В активной форме члены семейства Hedgehog необычны в том отношении, что они ковалентно связаны с холестерином, который помогает ограничить диффузию белков при секреции (рис. 6.15).

Shh приобретает характеристики секреторной молекулы в результате внутримолекулярного аутопротеолиза и липидной модификации белка-предшественника с ММ 45 кДа, катализируемого его С-концевой частью (см. рис. 6.15).

Предшественник *Shh* – белок с ММ 45 кДа

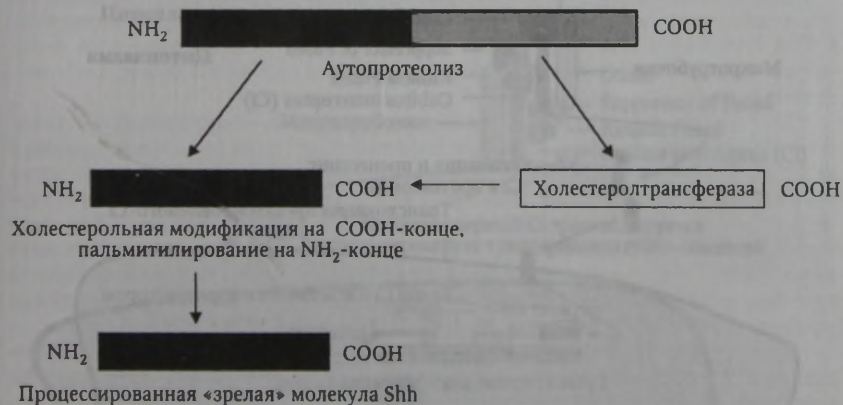


Рис. 6.15. Процессинг белка *Shh* – члена семейства Hedgehog (Benson R. A. [et al.], 2005)

Аутопротеолиз сопровождается образованием аминоконцевого пептида с ММ 19 кДа, эстерифицированного в его С-концевом домене молекулой холестерина. Эстерифицированный пептид ответственен за все известные сигнальные функции Shh. После присоединения холестерина белок подвергается дальнейшему пальмитилированию в его N-концевом участке, причем эффективное добавление пальмитина зависит от предыдущей модификации холестерином и может усилить сигнальную активность белка. Белок, модифицированный двумя жирными остатками, взаимодействует с дистантными клетками-мишенями в формирующихся конечностях и нейральной трубке позвоночных. Модификация холестерином придает белку Shh свойства, необходимые для его освобождения от секретирующих клеток и эффективного внеклеточного транспорта.

Сигнальный путь Shh

Два трансмембранных белка Patched (Ptc) и Smoothened (Smo) опосредуют передачу сигналов, инициируемых всеми белками семейства Hedgehog (рис. 6.16). Белок Ptc имеет 12 трансмембранных доменов и служит рецептором для белков Hedgehog. В отсутствие сигналов Hedgehog Ptc ингибирует активность Smo. Smo является 7 мембранным белком со структурой, подобной рецептору Frizzled в сигнальном пути Wnt (см. гл. 8). Ингибция Smo отменяется в том случае, когда Shh связывает Ptc, позволяя Smo передавать сигналы внутрь клетки. Большинство информации о передаче сигналов белком Smo было получено при генетических опытах на мухах *Drosophila*. В некоторых отношениях сигнальный путь Hedgehog оперирует подобно сигнальному пути Wnt. В отсутствие лигандов Hedgehog белок регуляторного гена Cubitus interruptus (Ci) протеолитиче-

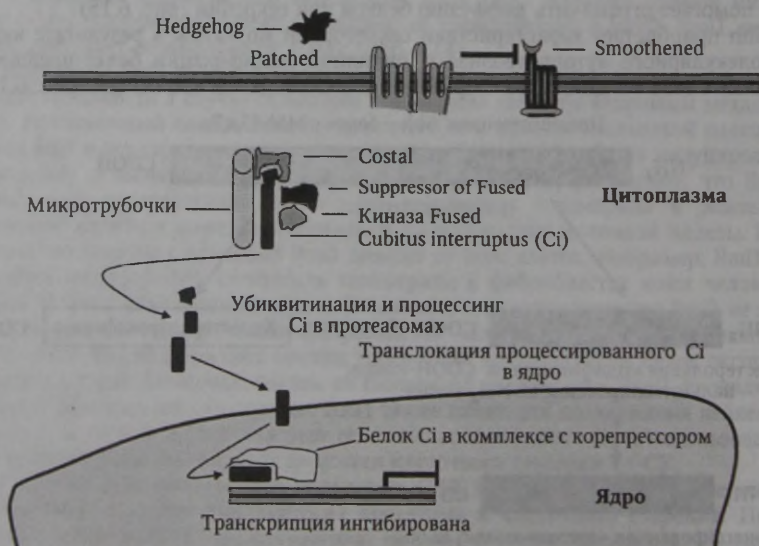


Рис. 6.16. Схема сигнального пути Hedgehog в неактивном состоянии (Ingham P. W., 1998)

ски делится в протеасомах. В результате процессинга образуется полипептид с ММ 75 кДа, который транслоцируется в ядро, где он действует как транскрипционный супрессор на гены-мишени сигнального пути Hedgehog (см. рис. 6.16).

Протеолитический процессинг белка Ci зависит от большого многокомпонентного белкового комплекса. Этот комплекс содержит серин-треониновую киназу Fused с неизвестной функцией и адапторный белок Costal, который связывает процессирующий комплекс с микротрубочками, таким образом секвестрируя белок Ci вне ядра. В комплекс также входит адапторный белок Suppressor of Fused. При связывании лигандов Hedgehog с Ptc происходит активация сигнального пути Shh (рис. 6.17). Протеолиз белка Ci ингибируется, его полноразмерная форма освобождается из процессирующего комплекса, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию генов-мишеней.

Одним из генов-мишеней сигнального пути Shh является Bmi1, функциональная роль которого в регуляции стволовых клеток уже рассматривалась. Другой мишенью Shh являются гены семейства Wnt, играющие важную роль в эмбриогенезе и регуляции функций соматических стволовых клеток. В число мишеней Shh входят также N-MYC и циклин D1 (рис. 6.18). Перечисление этих генов показывает, что Shh участвует в регуляции клеточного цикла и самоподдержания стволовых клеток через несколько сигнальных путей, один из которых опосредован белком Bmi1. Ген PTC также является мишенью Shh. Усиление экспрессии белка Ptc на клеточной мембране ингибирует сигналы Hedgehog, выполняя функцию негативной обратной связи.

В настоящее время остаются невыясненными вопросы:

- 1) каким образом Ptc ингибирует Smo;
- 2) как Smo активирует передачу сигналов в ядро;

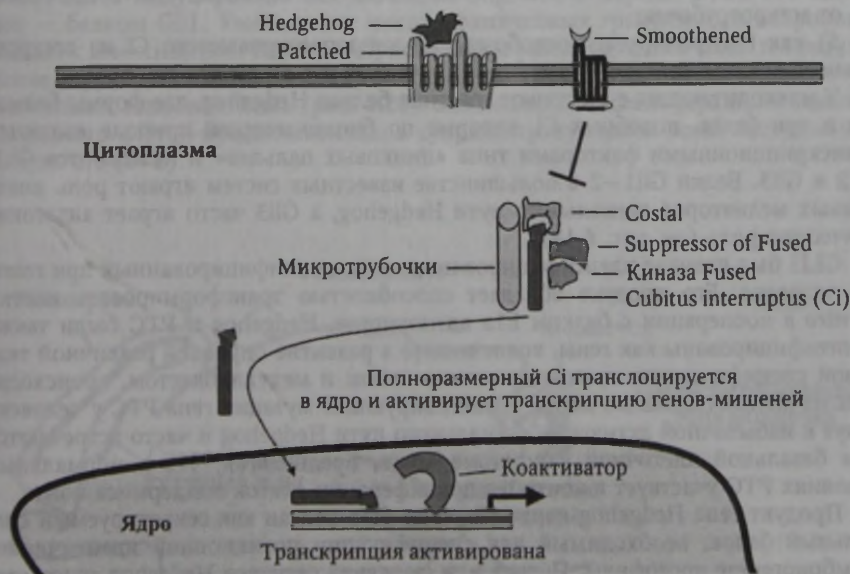


Рис. 6.17. Схема сигнального пути Hedgehog в активном состоянии (Ingham P. W., 1998)

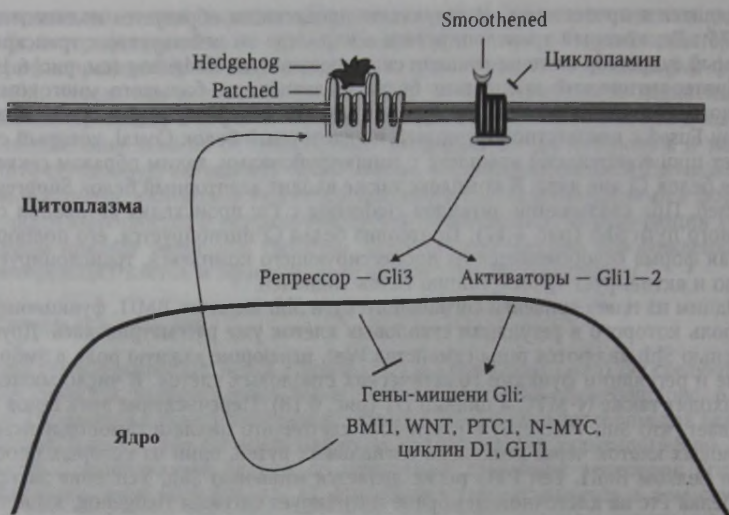


Рис. 6.18. Мишени сигнального пути Hedgehog (Altaba A. R. [et al.], 2004)

3) каким образом регулируется протеолиз белков Ci (хотя известно, что они фосфорилируются);

4) каким образом происходит освобождение комплекса, инактивирующего Ci, от микротрубочек;

5) как контролируется освобождение непротессированного Ci из деструктивного комплекса?

У млекопитающих существуют три типа белков Hedgehog, две формы белков Ptc и три белка, подобных Ci, которые по биохимической природе являются транскрипционными факторами типа «цинковых пальцев» и называются Gli1, Gli2 и Gli3. Белки Gli1-2 в большинстве известных систем играют роль позитивных медиаторов сигнального пути Hedgehog, а Gli3 часто играет антагонистическую роль (см. рис. 6.18).

Gli1 был вначале идентифицирован как ген, амплифицированный при глиоме человека. Его продукт обладает способностью трансформировать клетки *in vitro* в кооперации с белком E1a аденовируса. Hedgehog и PTC были также идентифицированы как гены, вовлеченные в развитие опухолей различной тканевой специфичности, преимущественно глиом и медуллобластом, происходящих из клеток головного мозга. Инактивирующие мутации гена PTC у человека ведут к избыточной активации сигнального пути Hedgehog и часто встречаются при базальной клеточной карциноме кожи, предполагая, что в нормальных условиях PTC участвует в контроле пролиферации клеток эпидермиса кожи.

Продукт гена Hedgehog первоначально был описан как секретируемый сигнальный белок, необходимый для спецификации позиционной идентичности в эмбриогенезе дрозофилы. Потеря или снижение сигналов Hedgehog сочетается со многими нарушениями развития, одно из которых — циклопия. Она является результатом потери продукции белка Shh.

Мишени Shh и механизм регуляции функций стволовых клеток

Shh может регулировать самоподдержание стволовых клеток через свою мишень — ген Bmi1. Ключ, с помощью которого внешние сигнальные молекулы модулируют функцию генов семейства PcG, в частности Bmi1, в нервной системе был найден при изучении *гранулярных нейральных клеток-предшественников мозжечка* (CGNP). Развитие мозжечка регулируется белком Shh, который продуцируется клетками Пуркинье (рис. 6.19). В ходе позднего эмбриогенеза коммитированные гранулярные мозжечковые клетки мигрируют в область расположения *внешнего гранулярного слоя* (EGL), где они дифференцируются в гранулярные клетки-предшественники и активно пролиферируют. В последующем CGNP мигрируют внутрь мозга и дифференцируются в зрелые клетки, принимая участие в формировании внутреннего гранулярного слоя мозжечка.

In vitro и *in vivo* Shh ингибирует терминальную дифференцировку мышинных CGNP и поддерживает их активную пролиферацию до 14 дня эмбрионального развития. Этот день совпадает с аккумуляцией в CGNP CdkI p27^{Kip1}, который останавливает пролиферацию CGNP в присутствии Shh. Прекращение передачи сигналов Shh ведет к немедленной потере пролиферативной активности CGNP. EGL содержит небольшое количество клеток, которые не подвергаются ограничению пролиферации и не накапливают CdkI p27^{Kip1}. Такие клетки продолжают экспрессировать белок нестин, маркер НСК, и поддерживают неограниченно долгую пролиферативную активность. В опытах *in vitro* Shh также вызывает пролиферацию CGNP, которые в этих условиях активируют экспрессию генов N-MYC и циклинов D. CGNP, не продуцирующие Bmi1, показывают нарушение пролиферативного ответа при стимуляции Shh. В этих клетках экспрессия Bmi1 может быть индуцирована как лигандом Shh, так и передатчиком его сигнала — белком Gli1. Уменьшение числа мозжечковых гранулярных нейронов у мышей с инактивацией Bmi1 в эмбриональном развитии также является результатом нарушений в сигнальном пути Shh вследствие отсутствия одной из его нижележащих мишеней, Bmi1 (рис. 6.20). Shh важен для пролиферации и самоподдержания клеток-предшественников суправентрикулярной зоны латерального желудочка (SVZ).

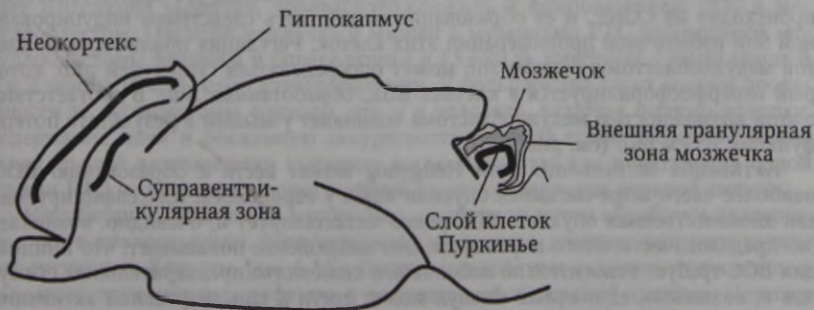


Рис. 6.19. Продольный срез головного мозга мыши (Altaba A. R. [et al.], 2004)

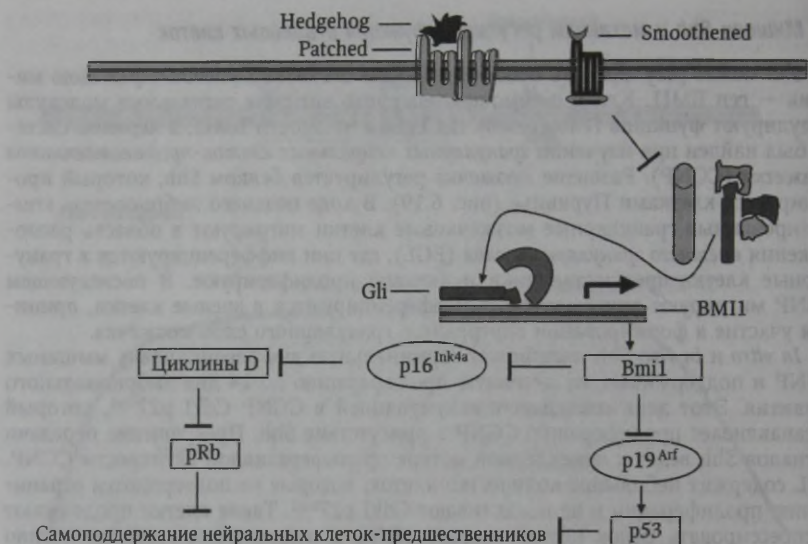


Рис. 6.20. Сигнальный путь Bmi1 опосредует действие белка Shh (Altaba A. R. [et al.], 2004)

Сигнальный путь Shh при канцерогенезе

Вовлеченность сигнального пути Hedgehog в механизм возникновения рака у человека была установлена при идентификации Ptc как опухолевого супрессора при синдроме Corlin, при котором отмечается увеличение риска возникновения базальной клеточной карциномы кожи (BCC), медуллобластомы и других опухолей. Мутации, возникновению которых способствует конститутивная активация передатчика сигналов Shh — белка Smo в отсутствие лигандов Hedgehog, были найдены также при спорадических опухолях. Доказательства важной роли Shh в возникновении медуллобластомы были получены при анализе физиологической роли Shh в развитии мозжечка. Считается, что медуллобластома происходит из CGNP, и ее образование может быть следствием индуцированной Shh избыточной пролиферации этих клеток. Регуляция пролиферации клеток медуллобластомы белком Shh может опосредоваться супрессией pRb, который гиперфосфорилируется в клетках EGL, обработанных Shh. В соответствии с этой возможностью медуллобластома возникает у мышей в результате потери функций p53 и pRb (см. рис. 6.20).

Активация сигнального пути Hedgehog может вести к образованию BCC, наиболее часто встречающейся опухоли кожи у европейцев. Классифицируемая как злокачественная опухоль, BCC редко метастазирует и, очевидно, возникает без предзлокачественного поражения. Это наблюдение показывает, что инициация BCC требует относительно небольшого количества предварительных стимулов и, возможно, единичный стимул может вести к конститутивной активации транскрипции, опосредованной передатчиком сигналов Shh — белком Gli. Опухоль возникает из недифференцированных эпителиальных клеток волосяного

фолликула. Shh участвует в морфогенезе волосяного фолликула, пролиферация клеток которого стимулируется при активации его экспрессии. Возможно, ВСС возникает в результате зависимой от сигналов Shh пролиферации фолликулярных стволовых клеток. Это предположение подтверждается экспериментальной моделью, на которой ВСС у мышей вызывается гиперпродукцией белка Gli, экспрессирующегося в недифференцированных эпителиальных клетках, в том числе в стволовых клетках волосяного фолликула. Гиперпродукция белка Gli регулируется в такой модели путем экспрессии рекомбинантной конструкции, содержащей ген этого белка под промотером тканеспецифического гена цитокератина 5.

Мутации в других компонентах сигнального пути Shh наиболее часто встречаются при sporadической ВСС и медуллобластоме. Например, у детей с медуллобластомами были найдены зародышевые и соматические мутации в гене *Suppressor of Fused*, который контролирует процессинг белка Gli1 (см. рис. 6.17).

Мутации гена *Suppressor of Fused* приводят к образованию неполноразмерного белка, не способного транспортировать Gli1 из ядра, что сопровождается конститутивной активацией транскрипции генов-мишеней Gli1. Мутации в сигнальном пути Shh отмечаются у 25 % пациентов с медуллобластомами. Медуллобластомы наиболее часто возникают у детей 2–7 лет, что соответствует высокой пролиферативной активности клеток-предшественников мозжечковых гранулярных нейронов во внешнем гранулярном слое в неонатальном и раннем постнатальном периоде.

Модели с генетическими нарушениями сигнального пути Shh

Мыши с направленной делецией гена РТС представляют собой ценный инструмент для исследования роли сигнального пути Shh/Ptc в контроле нормальной и неопластической пролиферации. Получены две различные линии мышей, гетерозиготных по РТС: 1) с отсутствием части экзона 1 и всего экзона 2; 2) с делецией экзонов 6 и 7. Гомозиготная инактивация РТС ведет к гибели мышей на стадии E9.5 эмбрионального периода, вызывая значительные дефекты в развитии нервной и сердечно-сосудистой систем. Обе линии мышей, гетерозиготных по гену РТС, воспроизводят фенотип синдрома базально-клеточной карциномы (ВСС) человека, который характеризуется зародышевой мутацией РТС и включает нарушения развития, предрасположенность к возникновению ВСС и медуллобластом. Опухоли мозжечка у мышей с мутациями РТС напоминают медуллобластомы человека и определяются у 15–20 % животных с инактивацией 1 и 2 экзона РТС к 10-месячному возрасту. У большинства таких мышей проявляются те же симптомы опухоли, что и у человека, включая шаткую походку, недержание мочи и сниженную аккуратность ухода за собой. Нервная система таких мышей анатомически выглядит нормальной, так как инактивация одной аллели РТС не разрушает молекулярный контроль закладки нервной системы.

Ингибция сигналов Shh может быть достигнута путем обработки делящихся клеток циклопамином, растительным алкалоидом, действие которого тормозит активность Smo (см. рис. 6.18). Однако циклопамин является тератогеном и вызывает значительные дефекты в развивающейся нервной системе. Поэтому его использование для ингибции сигналов Shh не может быть рекомендовано в терапевтических целях для лечения опухолей мозга.

Гаплонедостаточность (инактивация одной аллели гена) с сохранением активности второй аллели известна для нескольких генов, включая гены нейрофиброматоза, p27^{Kip1}, p53, PTEN и других опухолевых супрессоров. Экспрессия белка, кодируемого оставшейся нормальной аллелью, может иметь промежуточное значение между полностью достаточным и недостаточным уровнем для супрессии опухоли. Хотя существует гипотеза, что Ptc функционирует как опухолевый супрессор, данные, полученные при анализе первичных опухолей человека и мыши, предполагают, что потеря одной аллели PTC недостаточна для возникновения опухоли. Клетки опухоли человека и мыши при потере одной аллели гена PTC экспрессируют высокий уровень специфической мРНК.

В эксперименте на мышах активация сигнального пути Shh/Ptc может быть индуцирована несколькими механизмами: сверхэкспрессией лиганда Shh или транскрипционных факторов Gli1/Gli2; активирующими мутациями SMO, снижающими репрессию со стороны Ptc. Каждый из этих механизмов способствует образованию ВСС у мышей. Отмечено, что у пациентов с мутацией гена PTC увеличивается чувствительность к ионизирующей радиации и обычно возникающие опухоли из клеток базального слоя эпидермиса, подвергнутых ультрафиолетовому или ионизирующему облучению. У мышей с мутацией одной аллели PTC также отмечена повышенная чувствительность к облучению и склонность к возникновению опухолей после облучения в неонатальном периоде.

Роль Shh в регуляции клеточного цикла и самоподдержания стволовых клеток

Сигнальный путь Shh регулирует аккумуляцию клеток в фазе G2/M клеточного цикла. Было найдено, что белок Ptc взаимодействует с циклином B1 и поддерживает цитоплазматическую локализацию фосфорилированного циклина B1, ингибируя клеточную пролиферацию. Перераспределение циклина B1 и замедление перехода G2/M, которое опосредуется связыванием циклина B1 с Ptc, может быть отменено с помощью лиганда Ptc — Shh, который активирует транслокацию циклина B1 в ядро и последующую прогрессию клеточного цикла. Таким образом, сигнальный путь Shh регулирует самоподдержание стволовых клеток в фазе G1, что опосредовано белком Bmi1, и в фазе G2/M путем ингибиции активности белка Ptc. Мишенью действия Shh также являются гены WNT, N-MYC и циклинов D, активность которых связана с регуляцией клеточного цикла. Суммарно действие Shh представлено на рисунке 6.21, где видно, что этот белок является внеклеточным фактором и может влиять на самоподдержание стволовых клеток через внеклеточные или внутриклеточные сигнальные пути, что в некоторых случаях опосредовано активацией его мишени — гена Bmi1.

6.3. Рак и старение организма

Организмы, обладающие способностью к тканевому самовоспроизведению, используют сеть генетических путей и клеточных ответов для предотвращения рака, который возникает вследствие нарушений регуляции в отделе активно делящихся клеток. Основные пути опухолевой супрессии у млекопитающих возникли в процессе эволюции на основе консервативных механизмов, которые у простых организмов действуют для регуляции эмбриогенеза или защиты зародышевых клеток. Сдвиг от поддержания зародышевых клеток и контроля эмбри-

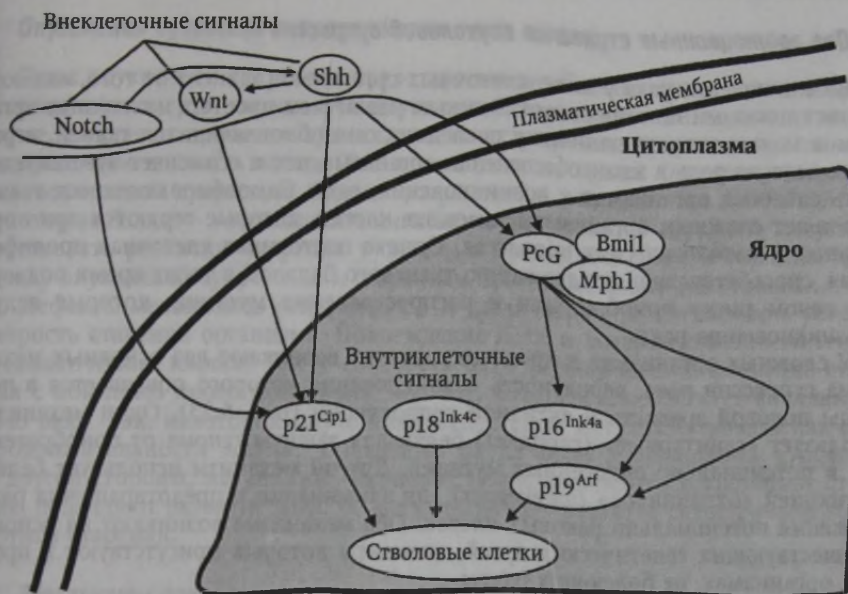


Рис. 6.21. Место Bmi1 и Shh среди других сигнальных путей, регулирующих самоподдержание стволовых клеток (Valk-Lingbeek M. E. [et al.], 2004)

онального развития у простых организмов до поддержания стабильности при воспроизведении соматических клеток у сложных организмов может иметь не только позитивные, но и негативные последствия. Современные данные показывают, что некоторые механизмы опухолевой супрессии, поддерживающие стабильность в самообновляющихся тканях млекопитающих, могут способствовать старению организма.

Рак поражает сложные организмы, такие как мышь и человек почти неизбежно, по мере старения (рис. 6.22). Однако это правило не является общим для всех организмов. Например, у таких животных как *C. elegans* и *Drosophila melanogaster* не бывает рака. Каким образом возникает рак и что отличает организмы, болеющие опухолями, от тех, у которых опухоли не возникают?

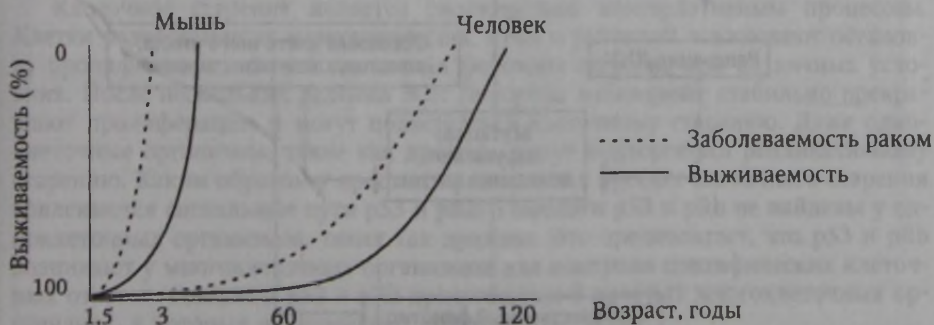


Рис. 6.22. У сложных организмов заболеваемость раком увеличивается с возрастом (Campisi J., 2003)

Две эволюционные стратегии опухолевой супрессии

Возникновение рака у многоклеточных организмов зависит от того, являются они сложными или простыми. Важным различием простых и сложных организмов можно назвать наличие у последних самообновляющихся тканей, играющих важную роль в жизнеобеспечении организма, что и объясняет чувствительность сложных организмов к возникновению рака. Самообновляющиеся ткани позволяют сложным организмам замещать клетки, которые теряются при нормальных и патологических процессах. Однако постоянная клеточная пролиферация, способствующая поддержанию тканевого баланса, в то же время подвергает геном риску приобретения и распространения мутаций, которые ведут к возникновению рака.

У сложных организмов в процессе развития возникают два основных механизма супрессии рака, вероятность возникновения которого повышается в периоды половой зрелости и активной репродукции (рис. 6.23). Один механизм использует «санитарные» (caretaker) белки для защиты генома от приобретенных и потенциально онкогенных мутаций. Другой механизм использует белки с функцией «охранников» (gatekeeper) для элиминации и предотвращения размножения потенциально раковых клеток. Оба механизма возникают на основе предшествующих генетических путей, элементы которых присутствуют в простых организмах, не болеющих раком.

Многие «санитарные» гены кодируют белки, которые принимают участие в поддержании эволюционно консервативных функций генома, таких как репарация ДНК. Они включают геликазы, компоненты эксцизионного репарационного пути, белки, поддерживающие функцию теломеров и др. Напротив, многие гены-«охранники», играющие роль опухолевых супрессоров, отсутствуют у одноклеточных организмов и появляются только у многоклеточных. Такие гены, например, кодируют белки p53 и pRb, которые контролируют клеточное старение и апоптоз (см. рис. 6.23).

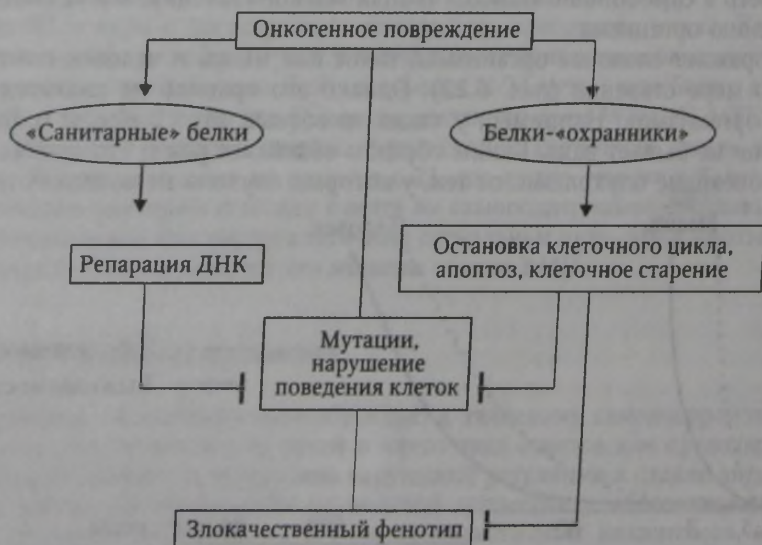


Рис. 6.23. Эволюционные механизмы опухолевой супрессии основаны на активности «санитарных» и «охранных» систем (Campisi J., 2003)

Опухолевая супрессия и продолжительность жизни

Гены опухолевой супрессии предотвращают заболеваемость раком и преждевременную смерть, так что их следует рассматривать как гены долголетия, которые замедляют процесс старения, помогают сохранить здоровье и увеличивают продолжительность жизни. Такие гены и их продукты являются «санитарами» опухолевой супрессии. Однако современные исследования допускают, что некоторые белки — «охранники», ингибирующие развитие опухолей, могут способствовать развитию старения у сложных организмов. Таким образом, связь между опухолевой супрессией и старением организма имеет две стороны.

Дефекты механизмов репарации ДНК увеличивают заболеваемость раком и скорость старения организма. Повреждение ДНК и потеря целостности генома в соматических клетках могут способствовать формированию фенотипа старения с помощью иного механизма, чем тот, который способствует возникновению рака. Так, некоторые опухолевые супрессоры могут действовать как гены продолжительности жизни, независимо от их роли в опухолевой супрессии. С другой стороны, механизмы «охраны», такие как апоптоз и клеточное старение, подавляют развитие рака, но могут облегчать развитие специфического фенотипа старения.

Механизмы опухолевой супрессии и старения

При клеточном старении происходит остановка деления, но не удаление из организма поврежденных или функционально неполноценных клеток. Клеточное старение сопровождается изменениями в экспрессии генов, часть которых вызывает долговременную остановку пролиферации. Например, происходит индукция ингибиторов клеточного цикла CdkI $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ и $p21^{Cip1}$, что сопровождается активацией опухолевых супрессоров: pRb и p53, тогда как стимуляторы клеточного цикла — циклины A, B, ген c-FOS репрессируются. Подобные изменения могут вызываться онкогенными стимулами. Изменения экспрессии других генов при клеточном старении ведут к клеточно-специфической экспрессии в фибробластах человека металлопротеиназ клеточного матрикса, воспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1, и эпителиальных ростовых факторов, таких как херегулин (*heregulin*), тогда как экспрессия стромальных молекул клеточного матрикса, таких как коллаген и эластин, снижается.

Клеточное старение является эволюционно консервативным процессом. Клетки разнообразных млекопитающих, птиц и рептилий показывают остановку пролиферации в случае появления фенотипа старения при различных условиях. После нескольких делений ЗСК *Drosophila melanogaster* стабильно прекращают пролиферацию и могут подвергаться клеточному старению. Даже одноклеточные организмы, такие как дрожжи, могут подвергаться репликативному старению. Каким образом у простых организмов в процесс клеточного старения вовлекаются сигнальные пути p53 и pRb? Гомологи p53 и pRb не найдены у одноклеточных организмов, таких как дрожжи. Это предполагает, что p53 и pRb возникают у многоклеточных организмов для контроля специфических клеточных ответов. Гомологи p53 и pRb присутствуют в простых многоклеточных организмах, у которых не возникают опухоли (рис. 6.24).

У некоторых простых многоклеточных организмов гены p53 и pRb и их белки-партнеры структурно и функционально родственны аналогичным генам слож-

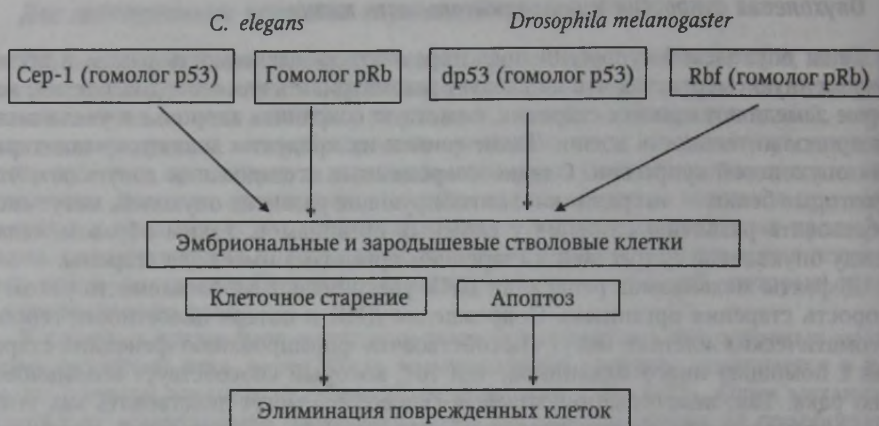


Рис. 6.24. Роль pRb и p53 у многоклеточных организмов, не болеющих раком (Campisi J., 2003)

ных организмов. Например, гомологи p53 у *C. elegans* (белок Cep-1) и у *Drosophila* (dp53) могут трансактивировать промотор гена, который содержит консенсусный связывающий сайт p53 человека. У мух *Drosophila* гомолог pRb (Rbf) взаимодействует с белками, гомологичными транскрипционным факторам E2f. Однако ни у *C. elegans*, ни у *Drosophila* не возникают опухоли. В чем же заключаются функции p53 и pRb у этих простых многоклеточных организмов? Показано, что у тех и других организмов функция гомологов p53 заключается в индукции апоптоза в ответ на повреждение ДНК у эмбрионов или в ЗСК. У *Drosophila* и, возможно, у *C. elegans*, гомолог pRb негативно контролирует пролиферацию в процессе развития. Таким образом, клеточные процессы, которые контролируются pRb и p53, подобны у простых и сложных организмов и представляют собой, соответственно, клеточный цикл и апоптоз. Однако у простых организмов эти белки не играют роли опухолевых супрессоров. В большей степени их действие направлено на элиминацию поврежденных зародышевых и эмбриональных клеток-предшественников и, таким образом, на поддержание эмбрионального развития. p53 и pRb в простых организмах функционируют только в заро-

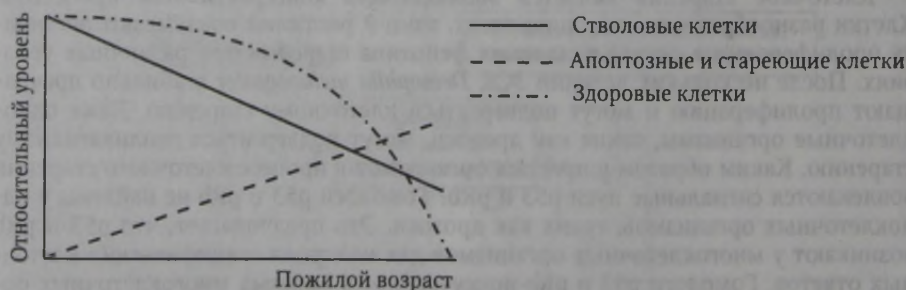


Рис. 6.25. Соотношение между количеством апоптозных, стареющих и стволовых клеток в различном возрасте (Campisi J., 2003)

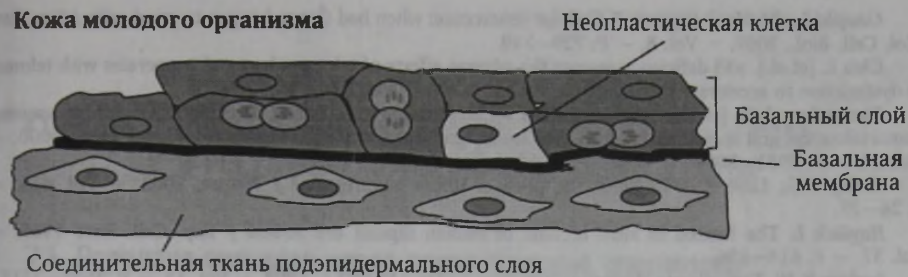
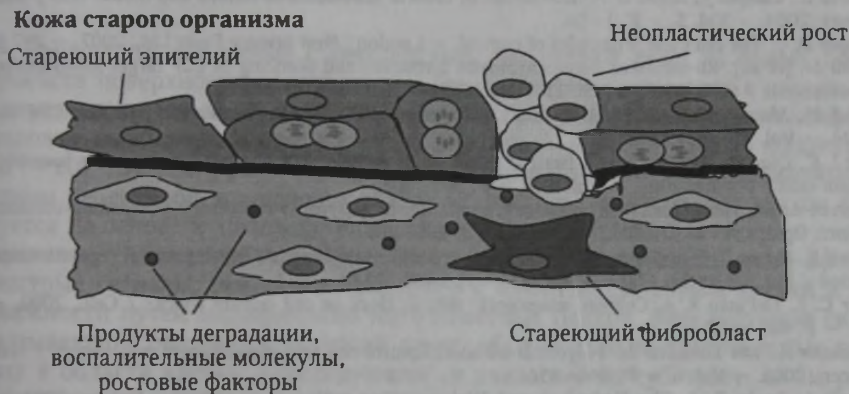
Кожа молодого организма**Кожа старого организма**

Рис. 6.26. Клеточное старение на уровне целого организма способствует развитию опухолей (Campisi J. [et al.], 2007)

дыхательных и эмбриональных клетках (см. рис. 6.24). Эти белки приобретают дополнительные соматические функции, такие как опухолевая супрессия, только у сложных организмов. Не исключено, что эти соматические функции могут развиваться в ущерб другим свойствам организма и не являются для него абсолютным благом.

В зрелом организме апоптоз и клеточное старение могут быть причиной истощения популяции стволовых клеток, вести к потере клеточности и функциональной активности в самообновляющихся тканях, к преждевременному старению всего организма (рис. 6.25). Более того, стареющие клетки могут накапливать с возрастом продукты протеолиза ферментов деградации, цитокины и ростовые факторы. Таким образом, при увеличении числа стареющих клеток они также могут вносить свой вклад в процесс старения организма путем разрушения его целостности, функций и гомеостаза тканей, способствуя возникновению опухолей (рис. 6.26).

Литература

- Altava A. R., Stecca B., Sanchez P. Hedgehog-Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer / *Cancer. Let.*, 2004. — Vol. 204. — P. 145–157.
 Benson R. A. [et al.]. Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery / *Curr. Opin. Immunol.*, 2005. — Vol. 17. — P. 259–266.
 Campisi J. Cancer and ageing: Rival demons? / *Nature Rev.*, 2003. — Vol. 3. — P. 339–349.

- Campisi J., d'Adda di Fagagna F.* Cellular senescence: when bad things happen to good cells / *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2007. — Vol. 8. — P. 729–740.
- Chin L. [et al.].* p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis / *Cell.*, 1999. — Vol. 97. — P. 527–538.
- Dannenberg J.-H. [et al.].* Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G1 control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions / *Genes Dev.*, 2000. — Vol. 14. — P. 3051–3064.
- Ferbeyre G., Lowe S. W.* Ageing: the price of tumor suppression? / *Nature*, 2002. — Vol. 415. — P. 26–27.
- Hayflick L.* The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains / *Exp. Cell. Res.*, 1965. — Vol. 37. — P. 614–636.
- Ingham P. W.* Transducing Hedgehog: the story so far / *EMBO J.*, 1998. — Vol. 13. — P. 3505–3511.
- Itahana K., Campisi J., Dimri G. P.* Mechanism of cellular senescence in human and mouse cells / *Bio-gerontology*, 2004. — Vol. 5. — P. 1–10.
- Morgan D. O.* The cell cycle. Principles of control. — London: New Science Press Ltd., 2007. — 297 p.
- Narita M. [et al.].* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence / *Cell.*, 2003. — Vol. 113. — P. 703–716.
- Park I. K., Morrison S. J., Clarke M. F.* Bmi1, stem cells, and senescence regulation / *Journal Clin. Invest.*, 2004. — Vol. 113. — P. 175–179.
- Park I. K., Qian D., Kiel M. [et al.].* Bmi1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells / *Nature*, 2003. — Vol. 423. — P. 302–305.
- Pietersen A. M., van Lohuizen M.* Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2008. — Vol. 20. — P. 201–207.
- Samuel S., Naora H.* Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation / *Eur. J. Cancer.*, 2005. — Vol. 41. — P. 2428–2437.
- Sherr C. J., DePinho R. A.* Cellular senescence: mitotic clock or cell culture shock? / *Cell.*, 2000. — Vol. 102. — P. 407–410.
- Sparmann A., van Lohuizen M.* Polycomb silencers control cell fate, development and cancer / *Nat. Rev. Cancer.*, 2006. — Vol. 6. — P. 846–856.
- Taipale J., Beach P. A.* The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer / *Nature*, 2001. — Vol. 411. — P. 349–354.
- Valk-Lingbeek M. E., Bruggeman S. W., van Lohuizen M.* Stem cells and cancer; the polycomb connection / *Cell.*, 2004. — Vol. 118. — P. 409–418.
- Wetmore C.* Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal model / *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 2003. — Vol. 13. — P. 34–42.

ГЛАВА 7 || СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ MARK, Jak-STAT, Notch и TGF β В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

7.1. Передача сигналов через поверхностные рецепторы, связанные с ферментами

Рецепторы, связанные с ферментами, составляют одно из самых больших семейств поверхностных рецепторов. Они играют важную роль в передаче внеклеточных сигналов от ростовых факторов, регулирующих деление, дифференцировку, выживание и рост в клетках животных, и эффективны в концентрации 10^{-9} – 10^{-11} М. Как правило, ответ на ростовые факторы, опосредованный этим типом рецепторов, происходит в течение нескольких часов, так как он формируется на основе взаимодействия многих внутриклеточных молекул и включает изменение экспрессии генов. Этот тип рецепторов опосредует также простые и быстрые сигналы, связанные, например с изменением формы клетки и ее подвижности путем модификации цитоскелетных белков. Внеклеточные сигналы, вызывающие быстрый клеточный ответ, обычно вызывают локальные изменения в области клетки, опосредующей ее движение по субстрату, но не распространяются по всей клетке. Нарушения передачи сигналов через поверхностные рецепторы, связанные с ферментами, сопровождаются изменением основных клеточных функций и часто ведут к злокачественным заболеваниям.

Рецепторы, связанные с ферментами, являются трансмембранными белками, включающими один трансмембранный домен, один домен, связывающий лиганд на внешней стороне плазматической мембраны, тогда как их цитозольный домен либо обладает собственной ферментной активностью, либо способен физически взаимодействовать с цитоплазматическим ферментом (рис. 7.1). Идентифицировано шесть классов рецепторов, связанных с ферментами:

- 1) рецепторные тирозиновые киназы, обладающие собственной ферментативной активностью;
- 2) рецепторы, взаимодействующие с внутриклеточными белками с тирозинкиназной активностью;
- 3) подобные рецепторам тирозиновые фосфатазы, способные удалять фосфатные группы с тирозинов на специфических внутриклеточных сигнальных белках. Они называются «подобные рецепторам», поскольку их потенциальные лиганды не найдены, а рецепторная функция не доказана;
- 4) рецепторные серин/треониновые киназы, фосфорилирующие специфические серины или треонины на регуляторных белках замедленного действия;
- 5) рецепторные гуанилциклазы, катализирующие продукцию циклического ГМФ в цитозоле;
- 6) рецепторы, ассоциированные с гистидиновыми киназами, активирующие «двухкомпонентный» сигнальный путь, в котором киназа аутофосфорилируется по гистидину и затем немедленно переносит фосфатный остаток на другой внутриклеточный сигнальный белок.

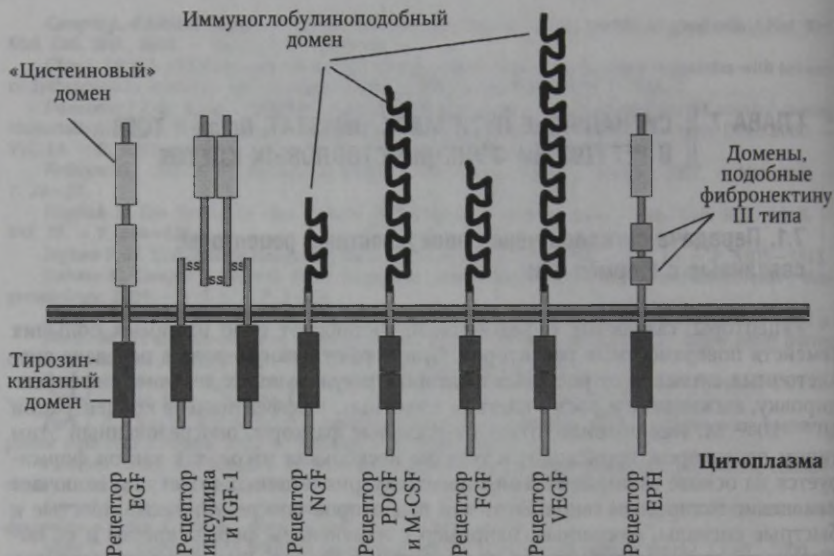


Рис. 7.1. Схема строения различных рецепторных тирозинкиназ.
SS — дисульфидные связи (Alberts B. [et al.], 2004)

Рецепторные тирозинкиназы обладают способностью к аутофосфорилированию

Внеклеточные сигнальные белки, которые действуют через рецепторные тирозинкиназы, включают разнообразные секретируемые ростовые факторы и гормоны, наиболее хорошо известными из которых являются EGF, PDGF, FGF, HGF, инсулин, IGF-1, VEGF, M-CSF, NGF (см. рис. 7.1). Многие клеточные белки, связанные с мембранами, также передают сигналы через рецепторы этого типа. Самой большой группой лигандов, связанных с мембраной, являются эфрины (efrins), которые регулируют адгезию и негативные реакции на прикрепление к адгезивной поверхности, миграцию клеток и аксонов вдоль специфических путей в процессе развития. Рецепторы эфринов (Eph) необычны в том отношении, что они одновременно действуют как лиганды и как рецепторы: при связывании со специфическим рецептором некоторые эфрины не только активируют рецептор, но активируются сами и передают сигналы внутрь клетки, экспрессирующей эфринный лиганд. В этом случае взаимодействие между белком ephrin на одной клетке и рецептором Eph — на другой может сопровождаться передачей сигналов, изменяющих поведение обеих клеток.

Связывание сигнального белка рецепторным доменом на внешней стороне клетки активирует внутриклеточный тирозинкиназный домен. Будучи активированным, киназный домен переносит фосфатную группу с АТФ на специфический тирозин рецепторной цепи и внутриклеточные сигнальные белки, которые в последующем связывают эти фосфорилированные рецепторы. Каким образом связывание внеклеточного лиганда активирует киназный домен на другой сто-

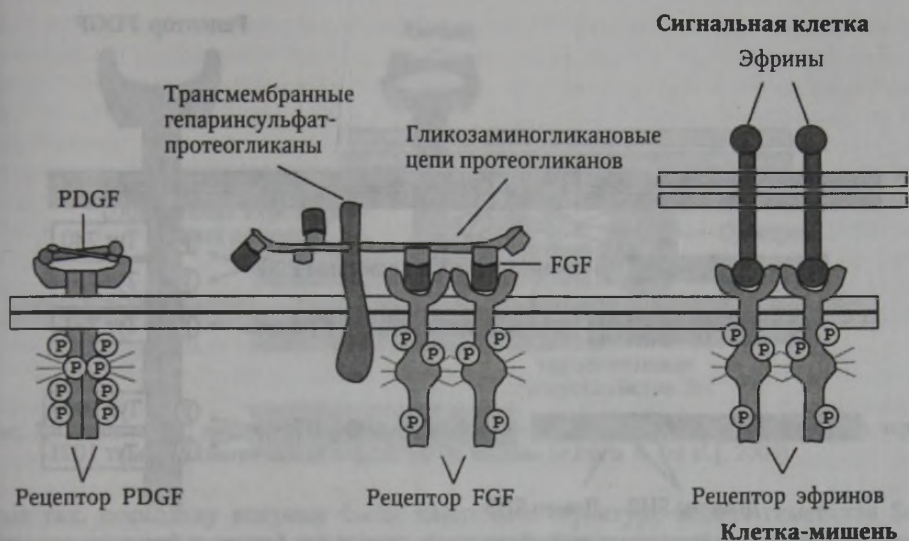


Рис. 7.2. Три различных типа образования рецепторных димеров при взаимодействии с лигандами. Символом «р» с отходящими от него линиями показаны активированные сайты фосфорилирования (Alberts B. [et al.], 2004)

роне плазматической мембраны? Трудно представить, каким образом конформационные изменения могут распространяться сквозь мембрану, используя единичную трансмембранную α -петлю. В рецепторах, связанных с ферментами, две или более рецепторных цепи соединяются в мембране, формируя димер или олигомер, содержащий большее число цепей. В некоторых случаях связывание лиганда вызывает олигомеризацию. В других случаях олигомеризация появляется до связывания лиганда, а лиганд вызывает реориентацию рецепторных цепей в мембране. В любом случае рецепторная реаранжировка опосредует инициацию внутриклеточных сигналов цитозольным «хвостом» рецептора. В рецепторных тирозиновых киназах реаранжировка вызывает дополнительно перекрестное фосфорилирование соседних киназных доменов по множественным тирозинам, что называется аутофосфорилированием (рис. 7.2).

Для активации рецепторной тирозиновой киназы лиганд должен связывать одновременно две соседние рецепторные цепи. Например, PDGF является димером, который перекрестно связывает две рецепторные цепи. Даже некоторые мономерные лиганды, такие как EGF, связывают и соединяют одновременно два рецептора. Напротив, FGF, которые также являются мономерами, сначала формируют мультимерные лиганды путем связывания гепаринсульфатпротеогликанов на клеточной поверхности клетки-мишени или во внеклеточном матриксе. Таким образом, они приобретают способность соединять в один комплекс соседние рецепторы. При инициации передачи сигналов путем клеточных контактов лиганды формируют кластеры в плазматической мембране сигнализирующей клетки и приобретают способность связывать рецепторы на клетке-мишени. Эфрины, связанные с мембраной, способны активировать рецепторы на клетке-мишени (см. рис. 7.2), тогда как растворимые эфрины приобретают такую способность только после формирования агрегатов.

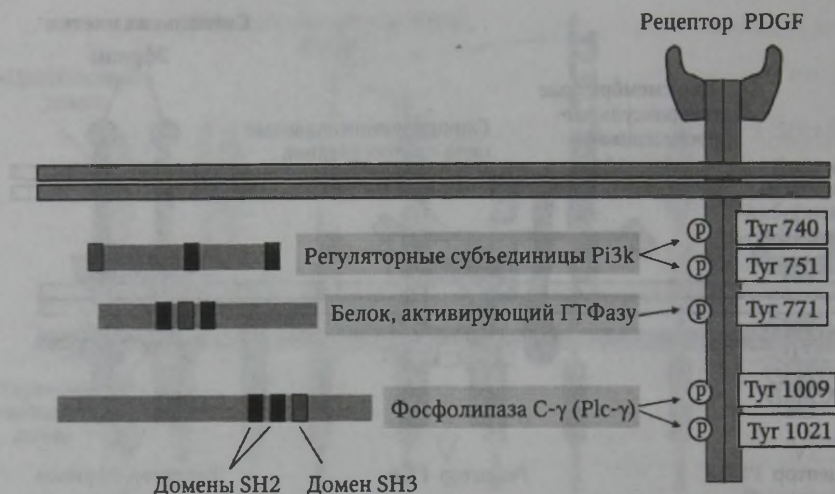


Рис. 7.3. Связывание различных внутриклеточных сигнальных белков, содержащих домены SH2, с активированным рецептором PDGF. Рисунок показывает 5 сайтов аутофосфорилирования рецептора PDGF, которые связывают три различных сигнальных белка (Alberts B. [et al.], 2004)

Фосфорилированные тирозиновые остатки в рецепторных киназах распознаются множеством функционально различных белков, содержащих домены SH2 (рис. 7.3). Например, белки, активирующие ГТФазу (GAP), фосфолипаза C- γ (Plc- γ) и подобные белкам Src цитоплазматические белковые тирозинкиназы, обладают подобными свойствами. Plc- γ активирует инозитолфосфолипидный сигнальный путь, а Pi3k активирует клеточную пролиферацию, выживание и рост различных клеточных популяций, играет роль в активации самоподдержания стволовых клеток (см. гл. 9).

Рецепторы, лишенные сайтов фосфорилирования, могут передавать сигналы при взаимодействии с цитоплазматическими тирозинкиназами

Сигнал внутри клетки может передаваться через рецепторы клеточной поверхности, которые не имеют собственных тирозинкиназных доменов. Передача сигнала через такие рецепторы может происходить при их взаимодействии с цитоплазматическими тирозинкиназами семейств Src, FAK и другими (рис. 7.4, см. рис. 3.26). Киназы семейств Src или FAK могут связываться с названными рецепторами и фосфорилировать различные белки, включая сами рецепторы. Взаимодействуя с цитоплазматическими тирозинкиназами, некоторые рецепторы приобретают способность действовать как рецепторные тирозиновые киназы, в которых киназные домены кодируются отдельными генами и нековалентно связаны с рецепторной полипептидной цепью (см. рис. 7.4). Многие из рецепторов, лишенных собственных сайтов для фосфорилирования, зависят от членов большой семьи цитоплазматических тирозиновых киназ суперсемейства Src (Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck и Blk). Киназы этого суперсемейства содержат домены гомологии с Src — SH2 и SH3 (Src homology region 2 and 3), назван-

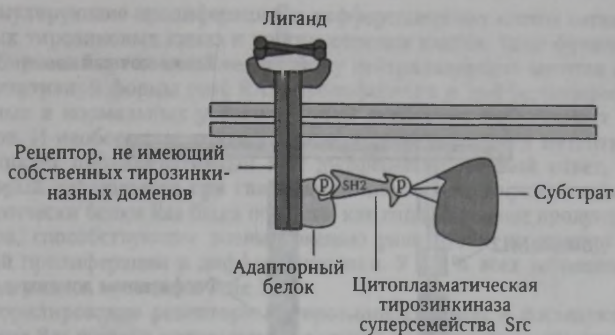


Рис. 7.4. Рецепторы, лишённые тирозинкиназной активности, могут передавать сигнал через цитоплазматические тирозиновые киназы (Alberts B. [et al.], 2004)

ные так, поскольку впервые были найдены в структуре белков семейства Src, известных своей ролью в индукции опухолей. Киназы семейства Src локализуются на цитоплазматической стороне плазматической мембраны, удерживаясь путем связывания с рецептором и ковалентно прикрепленной цепью жирной кислоты. Домен SH2 распознает фосфорилированные тирозины и наделяет белки, которые их содержат, способностью связывать и активировать рецепторные тирозиновые киназы, как и другие внутриклеточные белки, временно фосфорилированные по тирозиновым остаткам. Функция домена SH3 не понятна. Возможно, он играет роль адапторного белка в нижележащих сигнальных путях.

Роль тирозиновых фосфатаз в передаче сигналов внутрь клетки

Некоторые белковые фосфатазы могут действовать как рецепторы клеточной поверхности. В геноме человека кодируется примерно 30 белковых тирозиновых фосфатаз, существующих в мембранной или цитоплазматической формах (рис. 7.5). Их функциональная активность направлена на удаление фосфатных групп со специфических фосфотирозинов фосфорилированных белков. Таким образом, фосфатазы регулируют время активности соответствующих ферментов и поддерживают уровень фосфорилирования по тирозинам на очень низком уровне. Две цитоплазматические тирозиновые фосфатазы у позвоночных имеют в структуре домены SH2 и поэтому называются Shp-1 и Shp-2 (см. рис. 7.5). Shp-1 регулирует продолжительность ответа некоторых цитокинов в клетках крови путем дефосфорилирования активированных киназ Jak. В случае мутации генов рецепторов эритропоэтина, при которой продукты теряют способность рекрутировать Shp-1, активация Jak2 длится значительно дольше, чем это происходит в нормальных условиях. Мыши, дефицитные по Shp-1, имеют нарушения почти во всех линиях клеток крови, что показывает важную роль фосфатазы Shp-1 в развитии системы кроветворения.

Существует большая группа трансмембранных белковых тирозиновых фосфатаз, функции которых в большинстве не изучены. Некоторые из них действуют как рецепторы. Все они имеют один трансмембранный домен и обычно два тирозинфосфатазных домена на цитозольной стороне плазматической мембраны.

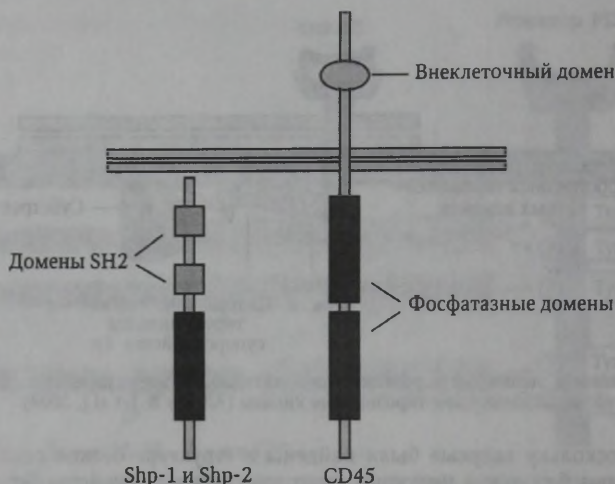


Рис. 7.5. Схема строения тирозиновых фосфатаз (Alberts B. [et al.], 2004)

Важным примером белка такого семейства является CD45, найденный на поверхности лейкоцитов крови и играющий существенную роль в активации Т- и В-лимфоцитов в ответ на антигенную стимуляцию.

Лиганд, связывающий внеклеточный домен CD45, не идентифицирован, однако роль CD45 в передаче сигналов была изучена с помощью техники рекомбинантной ДНК. С этой целью был получен гибридный белок с внеклеточным EGF-связывающим доменом и внутриклеточным CD45-тирозинфосфатазным доменом. В этой модели связывание EGF сопровождалось отменой фосфатазной активности гибридного белка, а не ее активацией. Такой результат предполагает, что рецепторные тирозиновые киназы и фосфатазы могут взаимодействовать при связывании с соответствующими лигандами клеточной поверхности. При таком взаимодействии киназы добавляют фосфатные группы, а фосфатазы удаляют избыточную активность, что создает возможность для оптимальной стимуляции рецепторов.

Роль белков семейства Ras и сигнального пути MAPK в передаче сигналов от рецепторных тирозинкиназ

Белки Ras принадлежат к большому суперсемейству мономерных ГТФаз, которые содержат два других семейства:

- 1) Rho и Ras, члены которых передают сигналы с клеточной поверхности к актиновому цитоскелету;
- 2) семейство Rab, вовлеченное в регуляцию перемещения внутриклеточных транспортных везикул.

Подобно другим мономерным ГТФамам, белки Ras содержат фенильную группу, которая помогает прикрепить их к цитозольной стороне мембраны, где белки Ras проявляют свою активность. Существует множество изоформ Ras, которые отличаются друг от друга и действуют в разных клетках. Белки Ras пере-

дают стимулирующие пролиферацию и дифференцировку клеток сигналы от рецепторных тирозиновых киназ к другим отделам клетки. Если функция белков Ras ингибирована путем введения в клетку нейтрализующих антител или доминантно негативной формы гена RAS, пролиферация и дифференцировка, индуцированные в нормальных условиях путем активации тирозиновых киназ, не возникают. И наоборот, если ввести в клетку гиперактивный мутантный белок Ras, возникает пролиферативный или дифференцировочный ответ, схожий с тем, который наблюдается при связывании лиганда с поверхностным рецептором. Фактически белки Ras были открыты как гиперактивные продукты мутантных генов, способствующие возникновению рака путем нарушения контроля клеточной пролиферации и дифференцировки. У 30 % всех заболевших раком людей содержатся мутации в гене RAS.

Фосфорилирование рецепторных тирозиновых киназ и последующая активация белка Ras широко используются клеткой для передачи сигналов ростовых факторов, обладающих митогенной активностью. Например, при связывании рецепторных тирозиновых киназ с митогенными ростовыми факторами, Ras может активироваться для передачи сигналов с поверхностной мембраны к внутриклеточной сигнальной машине с помощью адапторного белка Grb-2 и фактора обмена гуаниновых нуклеотидов Sos (рис. 7.6).

Фосфорилирование тирозинов и активация Ras являются кратковременными событиями. Для последующего функционального ответа, например активации пролиферации или дифференцировки клеток, Ras конвертирует свою активность в фосфорилирование серин/треониновых киназ путем вовлечения сигнального пути MAPK, в котором роль эффекторной киназы выполняет Erk. Состояние активации этих киназ является более продолжительным и передается в ядро. Erk активируется путем фосфорилирования тирозинового и треонинового мотивов, которые разделены между собой одним аминокислотным остатком (рис. 7.7).

Фосфорилирование Erk осуществляется киназой Mek, которая, в свою очередь, фосфорилируется киназой Raf. Активированная Erk фосфорилирует цитоплазматические мишени и транслоцируется в ядро, что позволяет ей модулировать активность транскрипционных регуляторов, таких как Elk, Ets, c-Мyc и фактор сывороточного ответа (Srf). В течение нескольких минут Erk вызывает



Рис. 7.6. Ras активируется рецепторными тирозиновыми киназами и передает сигналы с поверхности внутрь клетки (Alberts B. [et al.], 2004)

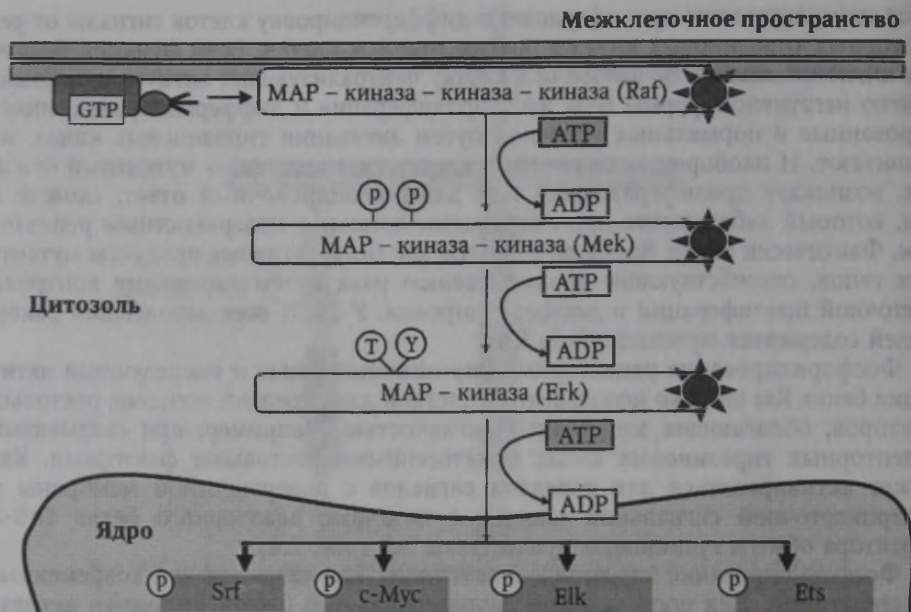


Рис. 7.7. Схема активации белком Ras сигнального пути митогенактивированной белковой киназы (Widmann C. [et al.], 1999)

активацию генов немедленного ответа клетки, включая с-Мус. В зависимости от идентичности лиганда активность MAPK киназы может продолжаться от нескольких минут до нескольких часов. Инактивация MAPK киназы осуществляется специфической фосфатазой.

Сигнальный путь Jak-STAT

Среди путей, передающих сигналы с плазматической мембраны в ядро, сигнальный путь Jak-STAT является наиболее прямым и быстрым (рис. 7.8). Этот путь был найден вначале как опосредующий влияние интерферонов — цитокинов, секретируемых клетками, особенно лейкоцитами крови, в ответ на вирусную инфекцию. Интерфероны связывают рецепторы на неинфицированных клетках и активируют их к продукции белков, которые повышают устойчивость к вирусной инфекции. В активном состоянии рецепторы интерферона активируют семейство цитоплазматических тирозиновых киназ, названных киназами Janus (Jak) по имени двуликого римского бога Януса. Киназы Jak фосфорилируют и активируют семейство регуляторных белков STAT (signal transducers and activators of transcription), которые после активации транслицируются в ядро и стимулируют транскрипцию специфических генов. В настоящее время идентифицировано более 30 цитокинов и гормонов, активирующих сигнальный путь Jak-STAT путем связывания с цитокиновыми рецепторами.

Все молекулы белков Stat имеют в своей структуре домен SH2, который наделяет их способностью связывать специфические тирозины на активированных рецепторных тирозиновых киназах. Эти рецепторы могут прямо активировать связанные с ними молекулы STAT, независимо от Jak. Известно, что черви

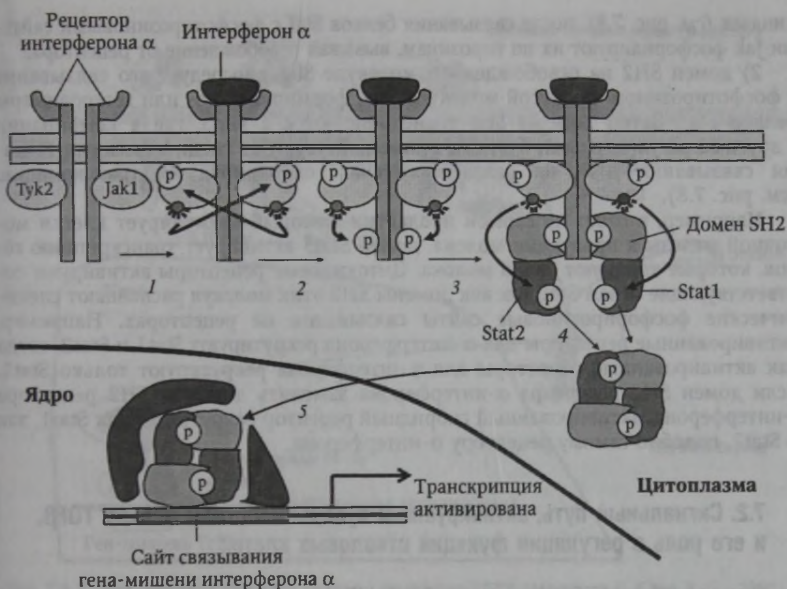


Рис. 7.8. Сигнальный путь Jak-STAT (1–5 — этапы пути, активируемого интерфероном α) (Alberts B. [et al.], 2004)

C. elegans используют белки Stat для передачи сигналов, хотя не продуцируют ни факторы семейства Jak, ни цитокиновые рецепторы.

Цитокиновые рецепторы формируются из двух или более полипептидных цепей и взаимодействуют с одной и той же или различными молекулами Jak. Семейство Jak включает четыре белка — Jak1, Jak2, Jak3 и Tyk2, каждый из которых взаимодействует со специфическими цитокиновыми рецепторами. Например, рецепторы для α -интерферона взаимодействуют с Jak1 и Jak2, тогда как рецепторы для γ -интерферона — с Jak1 и Jak2. Животные, лишенные продукции Jak1, не способны реагировать на оба вида интерферонов. Рецепторы гормона эритропоэтина, который стимулирует выживание, деление и дифференцировку клеток-предшественников эритроцитов, связаны только с Jak2 и не чувствительны ни к одному из интерферонов. Если мышей лишить продукции Jak2, они погибают во внутриутробном периоде.

Связывание цитокинов вызывает олигомеризацию или реориентацию рецепторных цепей и сближает взаимодействующие с ними молекулы Jak настолько, чтобы вызвать взаимное фосфорилирование и инициировать активацию их тирозинкиназных доменов. Затем киназы Jak фосфорилируют тирозиновые остатки на цитокиновых рецепторах, создавая тем самым фосфотирозиновые сайты связывания для молекул Stat и других сигнальных белков. Семейство STAT включает семь различных белков, обладающих доменами SH2, которые выполняют две функции:

1) они опосредуют связывание хозяйских белков с фосфотирозиновыми сайтами на активированных цитокиновых рецепторах или рецепторных тирозиновых

киназах (см. рис. 7.8), после связывания белков Stat с фосфотирозиновыми сайтами Jak фосфорилируют их по тирозинам, вызывая освобождение от рецептора;

2) домен SH2 на освобожденной молекуле Stat опосредует его связывание с фосфотирозином на другой молекуле Stat, формируя гомо- или гетеродимеры белков Stat. Затем димеры Stat транслоцируются в ядро, где в комбинации с другими регуляторными белками взаимодействуют со специфическими сайтами связывания ДНК на различных генах, стимулируя их транскрипцию (см. рис. 7.8).

Например, в ответ на гормон пролактин, который стимулирует клетки молочной железы к продукции молока, димер Stat5 активирует транскрипцию генов, которые кодируют белки молока. Цитокиновые рецепторы активируют соответствующие белки Stat, так как домены SH2 этих молекул распознают специфические фосфотирозиновые сайты связывания на рецепторах. Например, активированные рецепторы для α -интерферона рекрутируют Stat1 и Stat2, тогда как активированные рецепторы для γ -интерферона рекрутируют только Stat1. Если домен SH2 рецептора α -интерферона заменить доменом SH2 рецептора γ -интерферона, активированный гибридный рецептор рекрутирует как Stat1, так и Stat2, подобно самому рецептору α -интерферона.

7.2. Сигнальный путь, активируемый суперсемейством белков TGF β , и его роль в регуляции функций стволовых клеток

Суперсемейство TGF β включает более 40 различных, но структурно родственных секретируемых димерных белков. Они действуют как гормоны или локальные медиаторы, регулируя широкий ряд биологических функций у различных видов животных. В процессе развития белки суперсемейства TGF β регулируют рисунок образования тела и влияют на различные функции, включая пролиферацию, дифференцировку, продукцию внеклеточного матрикса и клеточную смерть. В зрелом организме белки суперсемейства TGF β вовлечены в репарацию тканей и иммунную регуляцию. Суперсемейство транскрипционных факторов TGF β включает белки собственно семейства TGF β , семейство костно-морфогенетических белков (Bmp) и активины. Белки семейства TGF β являются функционально важными ингибиторами деления эпителиальных клеток, ингибиторами функций иммунной и кроветворной систем, они активируют рост соединительной ткани.

Активины играют важную роль в репродукции эндокринных клеток млечопитающих. Белки семейства BMP играют инструктивную роль в эмбриогенезе, а у зрелых организмов участвуют в репарации костной и других тканей. Несмотря на различия в структуре и функциях, члены суперсемейства TGF β используют один и тот же рецепторный аппарат и систему белков-передатчиков Smad для трансляции разнообразных сигналов в ядро.

Передача сигналов TGF β и ее негативная регуляция

Все члены суперсемейства TGF β действуют через рецепторные серин/треониновые трансмембранные киназы с одним серин/треониновым доменом на цитозольной стороне плазматической мембраны (рис. 7.9). Существуют две такие киназы — рецепторы I и II типа. Каждый член семейства TGF β связывает

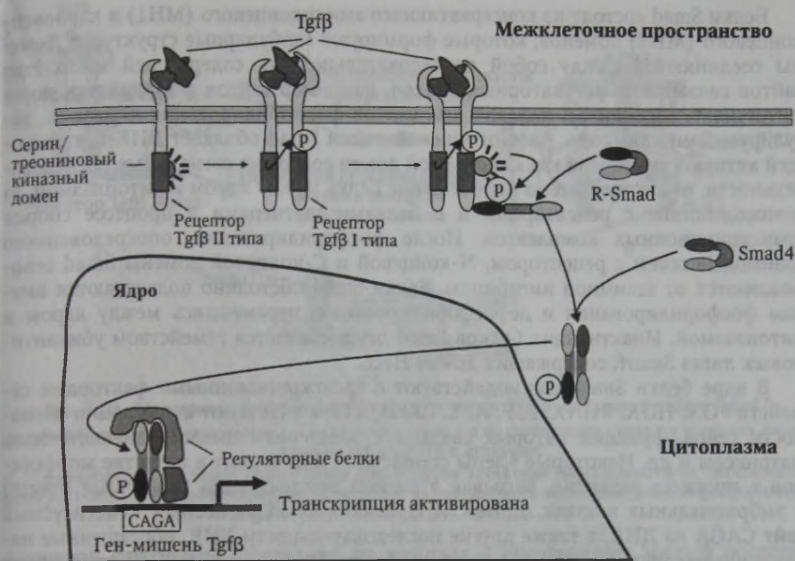


Рис. 7.9. Схема передачи сигналов белками семейства TGF β (Massague J., Chen Y. G., 2000)

специфический тип комбинации рецепторов I и II, в которой оба рецептора необходимы для передачи сигнала. Специфический лиганд связывает и активирует гомодимер рецептора II типа, который рекрутирует, фосфорилирует и активирует гомодимер рецептора I типа, формируя активный тетрамерный рецепторный комплекс. Будучи активированным, рецепторный комплекс использует стратегию быстрой передачи сигнала в ядро, что подобно стратегии сигнального пути Jak-STAT. Рецептор I типа прямо связывает и фосфорилирует регуляторный белок семейства Smad (названной по первым буквам первых двух найденных членов этого семейства, «Sma» у *C. elegans* и «Mad» у *Drosophila*).

Белки семейства TGF β и активина (активин, Nodal и миостатин) передают сигналы через Smad2 или 3, тогда как белки семейства BMP используют Smad1, 5, 8. Будучи фосфорилированным, любой из 5 белков Smad, взаимодействующих с рецепторами, которые называются рецепторными Smad (R-Smad), освобождается от рецептора и связывает белки группы Smad4, которые называются кооперирующими Smad (co-Smad). При взаимодействии R-Smad и co-Smad образуется комплекс R-Smad/co-Smad, который перемещается в ядро, где он вместе с другими регуляторами, например транскрипционными факторами семейств FAST и FOX, связывается со специфическими сайтами генов-мишеней и регулирует их транскрипционную активность (см. рис. 7.9).

Помимо Smad, транскрипционные факторы семейства TGF β используют другие, недостаточно хорошо изученные пока белки-посредники, с помощью которых активируются такие сигнальные молекулы, как Erk, Jnk, Pi3k, фосфатаза Pp2a и члены семейства Rho.

Белки Smad состоят из консервативного аминоконцевого (MH1) и карбокси-концевого (MH2) доменов, которые формируют глобулярные структуры. Домены соединяются между собой последовательностью, содержащей множество сайтов связывания регуляторных белков, например сайтов фосфорилирования митогенактивированной киназой Erk, сайтов фосфорилирования киназами, регулируемые кальцием. Аминоконцевой домен Smad обладает ДНК-связывающей активностью, тогда как С-концевой домен содержит сигнальные последовательности, ответственные за перемещение белка между ядром и цитоплазмой, за взаимодействие с рецепторами и с белками-партнерами в процессе сборки транскрипционных комплексов. После фосфорилирования, опосредованного взаимодействием с рецептором, N-концевой и С-концевой домены Smad освобождаются от взаимной ингибиции. Белки Smad постоянно подвергаются циклам фосфорилирования и дефосфорилирования, перемещаясь между ядром и цитоплазмой. Инактивация белков Smad осуществляется семейством убиквитиновых лигаз Smurf, содержащих домен Hect.

В ядре белки Smad взаимодействуют с транскрипционными факторами семейств FOX, NOX, RUNX, E2F, AP1, CREB/ATF и участвуют в регуляции активности генов, функции которых связаны с клеточным циклом, внеклеточным матриксом и др. Некоторые члены семейства TGF β служат в качестве морфогенов в процессе развития, вызывая в разной концентрации различные ответы в эмбриональных клетках. Домен MH1 белков Smad распознает консенсусный сайт CAGA на ДНК, а также другие последовательности ДНК, обогащенные парами нуклеотидов GC. Однако взаимодействие между Smad и ДНК происходит со слабым аффинитетом, означающим, что разнообразие белки-коактиваторы могут изменять этот аффинитет, регулируя специфичность взаимодействия Smad с генами-мишенями. После связывания с ДНК белки Smad приобретают способность контролировать активность генов-мишеней путем изменения структуры хроматина, что опосредовано взаимодействием домена MH2 Smad с ферментами и комплексами, модифицирующими структуру хроматина.

К семейству белков Smad у позвоночных относятся также Smad6 и Smad7, которые действуют как антагонисты факторов Tgf β , отменяя передачу сигналов R-Smad. Smad6 и Smad7 содержат нормальный домен MH2, но домен MH1 в их структуре значительно отличается от канонического домена MH1. Smad7 связывает активированные рецепторы суперсемейства TGF β типа I и предотвращает передачу сигналов лигандами семейств TGF β и активина (рис. 7.10, а). γ -Интерферон усиливает синтез белка Smad7 путем активации сигнального пути, опосредованного лигандами Jak1-Stat1 и, таким образом, блокирует фосфорилирование белка Smad3 и последующую передачу сигналов в ядро (рис. 7.10, б). Экспрессия белка Smad7 может быть также активирована через сигнальный путь NF- κ B. Белок Smad6 не изменяет передачу сигналов с рецепторов, но конкурирует со Smad4 за связывание с активированным и фосфорилированным белком Smad1 (рис. 7.10, в). Образование комплекса Smad1-Smad6 ингибирует передачу сигналов, инициированных белками Vmr.

Белки-антагонисты лигандов семейства TGF β

Связывание факторов семейства TGF β с рецепторами ингибируется белками-антагонистами. Tgf β синтезируется в форме белка-предшественника, который ферментативно делится в ходе процессинга на аминоконцевой и карбокси-

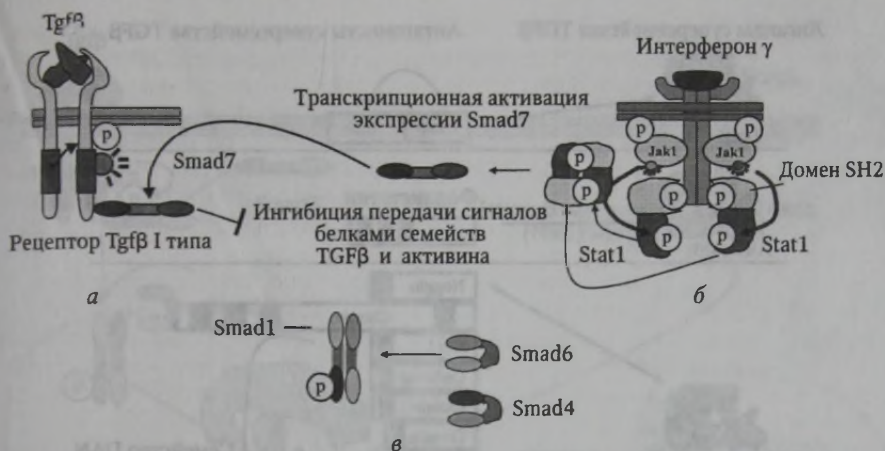


Рис. 7.10. Механизмы ингибции передачи сигналов TGF β белками Smad6 и Smad7:

а — Smad7 связывает активированные рецепторы типа I и предотвращает передачу сигналов лигандами семейств TGF β и активина;

б — γ -интерферон усиливает синтез белка Smad7 путем активации сигнального пути, опосредованного Jak1-Stat1; в — Smad6 конкурирует со Smad4 за связывание с активированным и фосфорилированным Smad1 (Massague J., Chen Y. G., 2000)

концевой фрагменты, последний из которых и представляет зрелый ростовой фактор. Зрелый фактор семейства TGF β в комплексе с аминоконцевым пептидом не способен распознавать специфические рецепторы и называется латентно-ассоциированным белком (Lap) (рис. 7.11). Активация белков Tgf β осуществляется семейством больших секреторных гликопротеинов, которые ковалентно связывают Lap через дисульфидные связи.

Активность белков семейства активина, который является индуктором фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) гипофиза и играет важную роль в регуляции репродукции, ингибируется *фоллистатином* (follistatin) — растворимым секретиремым гликопротеином. Фоллистатин тормозит освобождение ФСГ путем связывания с активином и предотвращает его взаимодействие со специфическим рецептором. У мышей с нехваткой фоллистатина возникают дефекты образования костей. Фоллистатин также играет важную роль в регуляции деления клеток различных тканей, например его гиперпродукция клетками предстательной железы при раке этого органа имеет патогенетическое значение, блокируя антипролиферативную активность тканеспецифического активина.

К числу антагонистов белков семейства BMP относятся *ноггин* (noggin), *хордин* (chordin) и *семейство белков DAN* (см. рис. 7.11). Ноггин и хордин являются высококонсервативными секретиремыми белками, которые регулируют формирование первичной мезодермы и нервной трубки в ходе развития различных животных. Хотя эти белки структурно отличны, они, как и белки семейства DAN, специфически связываются с лигандами Bmp, но не Tgf β , препятствуя взаимодействию белков Bmp со специфическими рецепторами. Cerberus — член семейства DAN, ингибирует не только белок Bmp4, но и белки семейства Wnt и активина. В эмбриогенезе у кур Shh индуцирует экспрессию двух членов семейства DAN, *Caronte* и *Cremlin*, которые путем ингибции Bmp способствуют экспрессии белка *Nodal* в различных частях тела развивающегося эмбриона.

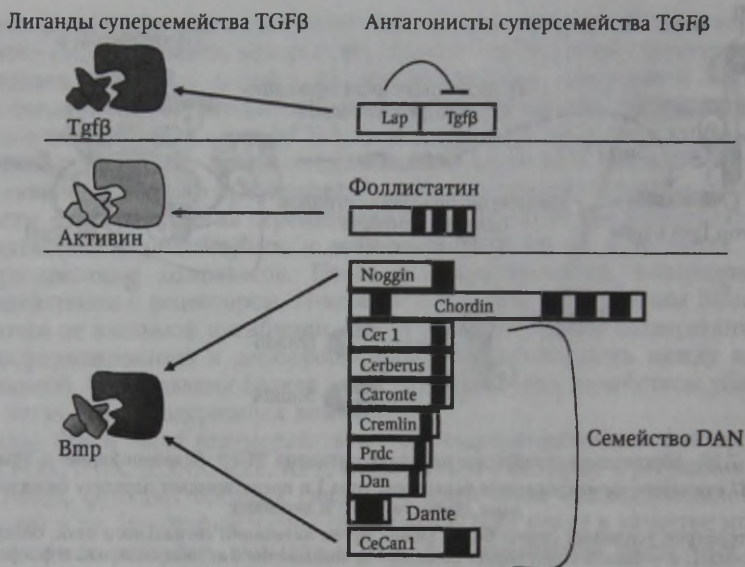


Рис. 7.11. Белки-антагонисты различных лигандов суперсемейства TGF β (Massague J., Chen Y. G., 2000)

Функциональные взаимодействия между TGF β и другими сигнальными путями

Как уже упоминалось ранее, белки Smad в области линкерной последовательности между доменами MH1 и MH2 содержат множество сайтов Ser/Thr-Pro, которые фосфорилируются киназами сигнального пути MAPK, кальций-кальмодулинзависимой киназой и различными Cdk. Фосфорилирование по этим сайтам ослабляет функциональную активность Smad.

ДНК-связывающие партнеры Smad обеспечивают другую возможность регуляции активности сигнального пути TGF β . Например, транскрипционные факторы FoxO, члены семейства FOX, находятся под негативным контролем сигналов Pi3k/Akt и других киназ. Фосфорилирование белков FoxO ведет к их выведению из ядра и в некоторых случаях к протеасомной деградации. Оксидативный стресс опосредует ацетилирование белков FoxO. Белковые деацетилазы Sir2 и Hdac деацетируют белки FoxO, предотвращая зависимость от их транскрипционной активности индукцию генов, активирующих апоптоз. Изменения биохимического статуса и активности белков FoxO влияют на их способность взаимодействовать с белками Smad и модифицируют физиологическую активность, опосредованную сигналами TGF β , например способность активировать продукцию Cdk1 p21^{Cip1} и вызывать остановку клеточного цикла.

Сигнальные пути TGF β и Notch взаимодействуют в транскрипционной регуляции генов-мишеней Notch, например ингибируют миогенную дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток. Hes1, ген-мишень сигнального пути Notch, является также прямой мишенью белков суперсемейства TGF β в нескольких клеточных типах, включая миобласты линии C2C12. Сигналы TGF β индуци-

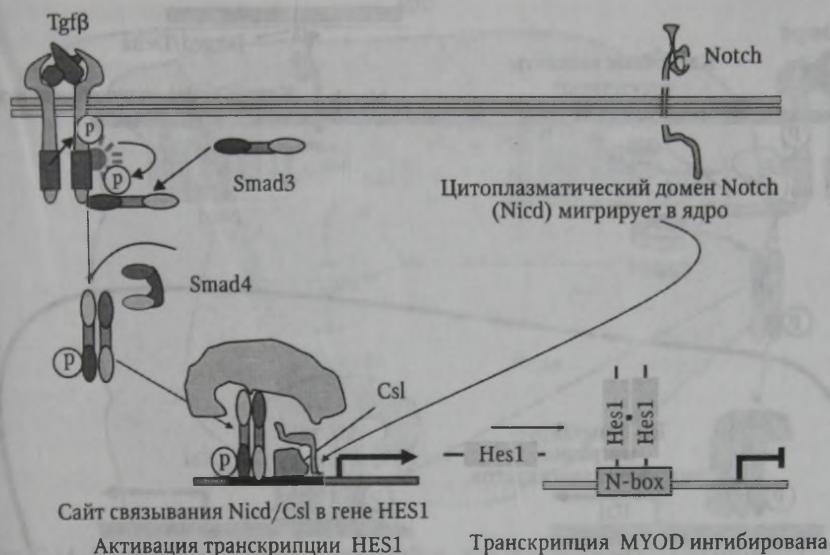


Рис. 7.12. Сигнальные пути Notch и TGF β взаимодействуют в ингибции мышечной дифференцировки (Kluppel M., Wrana J. L., 2005)

руют экспрессию Hes1 в клетках, обработанных циклогексимидом. Медиаторы сигнального пути Notch, Csl и Nidc, вызывают индукцию гена HES-1, что опосредовано активацией и фосфорилированием белка Smad3. Комплекс, включающий белки Csl, Nidc и Smad3, в свою очередь, активирует экспрессию продукта гена HES1, который в дальнейшем ингибирует синтез миогенных регуляторных белков, включая MyoD, и последующую активацию миогенеза (рис. 7.12).

Промотор гена HERP2, который является мишенью сигналов Notch, может быть синергично индуцирован белками суперсемейства TGF β и Notch (рис. 7.13). В случае, если эндотелиальные клетки, не имеющие межклеточных контактов, подвергаются действию лигандов Vmр, последующее фосфорилирование и транслокация в ядро белка Smad1 ведет к экспрессии продукта гена ID1, активатора миграции эндотелиальных клеток (см. рис. 7.13). При контакте с клетками, экспрессирующими Jagged или Delta, параллельно индуцируется сигнальный путь Notch, что сопровождается синергичной трансактивацией комплексом Smad1—Nidc гена HERP2. Белок Herp2 является негативным регулятором миграции эндотелиальных клеток, что основано на его свойстве облегчать специфическое разрушение Id1.

Мишени белков суперсемейства TGF β и механизмы опосредованной ими транскрипционной супрессии и активации

Сигналы TGF β оказывают сильное ингибирующее влияние на пролиферацию эпителиальных клеток различных органов, включая кожу, легкие, кишечник, поджелудочную железу, молочную железу, предстательную железу, яичники, а также кроветворные, лимфоидные и эндотелиальные клетки. Потеря чувствительности

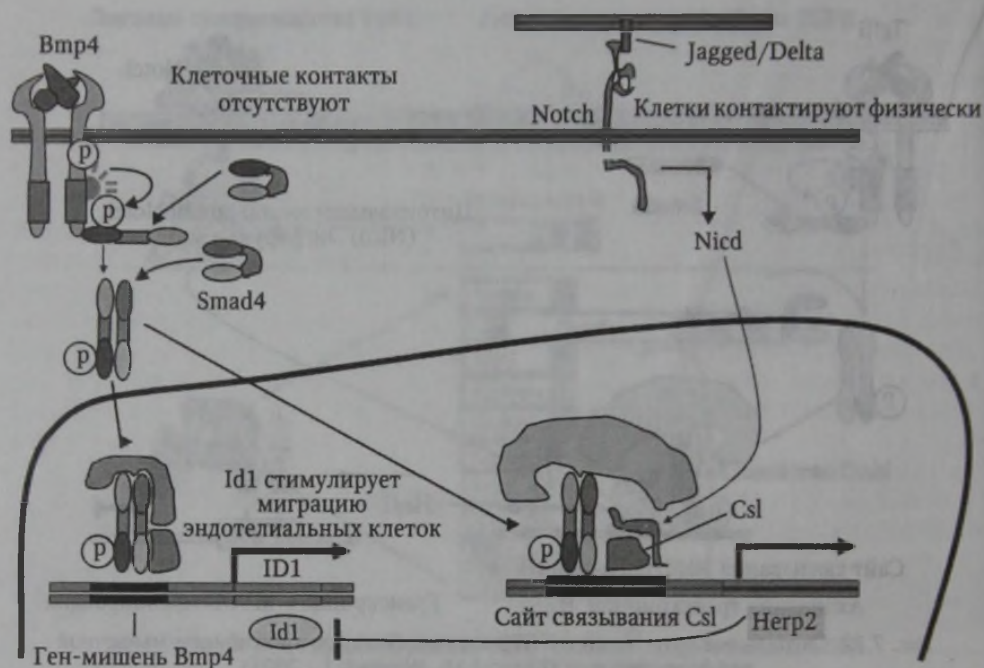


Рис. 7.13. Схема взаимодействия Notch и TGF β в регуляции миграции эндотелиальных клеток.

Промотор гена HERP-2 может быть синергично индуцирован сигналами TGF β и Notch:

а — эндотелиальные клетки, не имеющие межклеточных контактов, под действием лигандов Bmp экспрессируют белок Id1, активатор миграции эндотелиальных клеток; б — при контакте с клетками, экспрессирующими Jagged или Delta, индуцируется сигнальный путь Notch, что ведет к активации продукции Herp2 и негативной регуляции миграции эндотелиальных клеток

(Kluppel M., Wrana J. L., 2005)

к TGF β — яркая метка многих типов рака, в основе чего могут лежать мутации генов рецепторов семейства TGF β или генов SMAD, опосредующих передачу сигналов TGF β . Убиквитарный цитостатический ответ на TGF β включает активацию экспрессии генов, которые кодируют CdkI p15^{Ink4b} и p21^{Cip1}, а в кроветворных клетках-предшественниках — CdkI p57^{Kip2}. Индукция этих белков лигандами TGF β нейтрализует активность Cdk2 и Cdk4 в фазе G1 клеточного цикла (рис. 7.14).

Инактивация Cdk сопровождается активацией членов семейства продукта гена ретинобластомы, которые снижают уровень функциональных белков E2f1—E2f3 и, таким образом, предотвращают вход клеток в фазу S клеточного цикла. Другой класс генов, вовлекаемых в цитостатический ответ TGF β , кодирует продукты, способствующие пролиферации и росту клеток, прежде всего продукт гена MYC. В дополнение к прямой активности, стимулирующей пролиферацию и рост клеток, белок Myc также действует как прямой ингибитор транскрипции CdkI p15^{Ink4b} и p21^{Cip1}. Таким образом, транскрипционная репрессия MYC, вызываемая сигналами TGF β , отменяет его собственную активность, стимулирующую пролиферацию и рост клеток, а также способствует прямой транскрипционной активации генов, кодирующих ингибиторы пролиферации (см. рис. 7.14).

Механизм транскрипционной активации p15^{Ink4b} и p21^{Cip1} включает, соответственно, образование комплексов Smad3, Smad4—FoxO и Smad3, Smad4—FoxO—C/Ebp β .

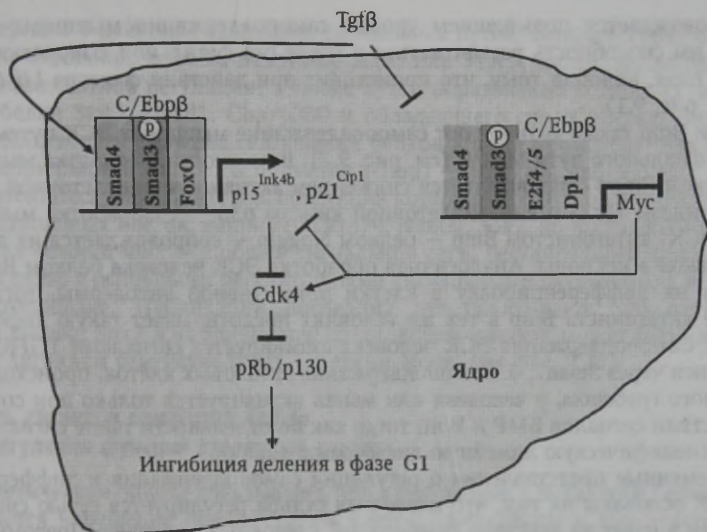


Рис. 7.14. Механизм ингибции пролиферации, опосредованный сигнальным путем TGF β (Chen C. R. [et al.], 2002)

Указанные комплексы связывают специфические сайты на промоторах генов p15^{Ink4b} и p21^{Cip1}, активируя транскрипцию этих генов. Репрессия гена MYC опосредована образованием комплекса Smad3, Smad4–E2f4/5–C/EBP β , который связывает неканонический сайт Smad и прилегающий к нему сайт E2f на промоторе гена MYC, формирующий так называемый «ингибиторный элемент TGF β », локализующийся на промоторе гена MYC между нуклеотидами –92–63 относительно сайта инициации транскрипции.

Сигналы TGF β вызывают не только дефосфорилирование и активацию pRb, ингибируя образование комплексов pRb с E2f1/2/3, но в еще большей степени способствуют дефосфорилированию и аккумуляции p130, который в этих условиях повышает свою способность формировать комплексы с E2f4 и ингибировать выход клетки из фазы G1 клеточного цикла.

Роль белков семейства BMP в регуляции функций стволовых клеток

Предположение о том, что белки семейства BMP играют важную роль в регуляции функций стволовых клеток основано, прежде всего, на функциональной роли этих белков в процессах развития. В эмбриогенезе белки Bmp участвуют в закладке нервной трубки, индукции мезодермы при гастрляции и формировании зачатков системы кровотоения. Белки Bmp участвуют также в регуляции функций стволовых клеток с различным дифференцировочным потенциалом: эмбриональных, зародышевых и соматических стволовых клеток. Одним из механизмов, в котором принимают участие лиганды Bmp, является регуляция экспрессии генов, кодирующих факторы ингибции дифференцировки (Id) — негативные регуляторы экспрессии тканеспецифических индукторов дифференцировки, белков суперсемейства bHLH. Активация экспрессии генов

ID сопровождается повышением уровня самоподдержания мышинных ЭСК и придает им способность размножаться в среде без фетальной сыворотки и фидерного слоя, подобно тому, что происходит при действии фактора Lif (см. цв. вклейку, рис. 9.1).

Белки Вмр также активируют самоподдержание мышинных ЭСК путем ингибиции сигнального пути MAPK (см. рис. 9.2). В частности, обработка мышинных ЭСК белком Вмр4 сопровождается снижением активности внеклеточной рецепторной киназы (Erg) и внутриклеточной киназы p38^{MAPK}. Обработка мышинных ЭСК (мЭСК) антагонистом Вмр — белком Noggin — сопровождается их дифференцировкой в нейроны. Аналогичная обработка ЭСК человека белком Вмр активирует их дифференцировку в клетки примитивной энтодермы, тогда как действие антагониста Вмр в тех же условиях предотвращает такую дифференцировку. Самоподдержание ЭСК человека активируется сигналами TGF β , передающимися через Smad2, 3. Самоподдержание стволовых клеток, происходящих из нервного гребешка, у человека или мыши активируется только при сочетании действия сигналов BMP и Wnt, тогда как по отдельности такие сигналы вызывают специфическую линейную дифференцировку.

Современные представления о регуляции самоподдержания и дифференцировки СК основаны на том, что клеточная судьба регулируется сетью сигнальных путей в ответ на действие комбинаций клеточных лигандов. Поэтому роль отдельных факторов, включая Вмр, в регуляции клеточной судьбы является не статичной, а динамичной, т. е. влияние Вмр на ту или иную функцию СК зависит от комбинации действующих в данный момент сигналов и факторов других путей (рис. 7.15).

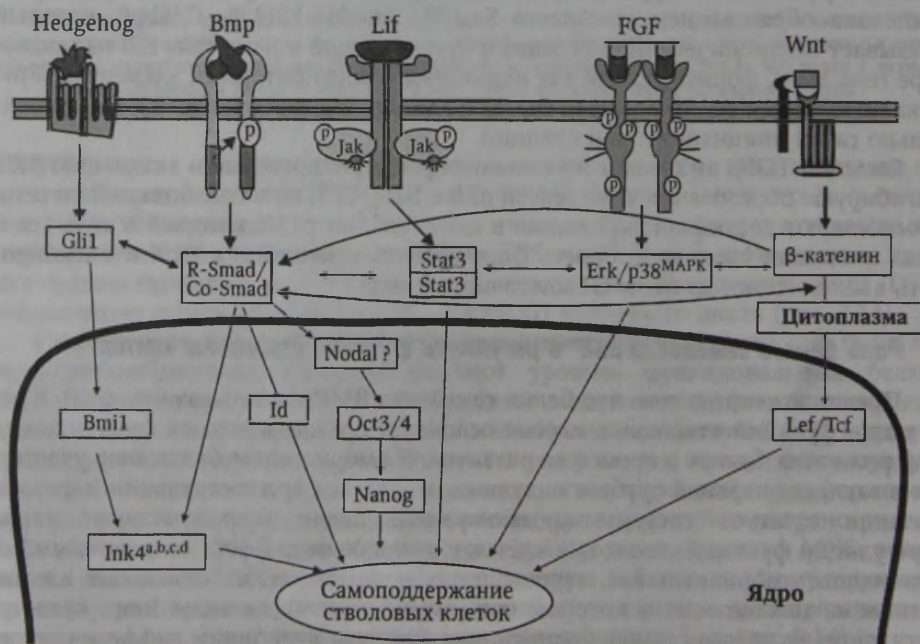


Рис. 7.15. Схема взаимодействия различных сигнальных путей в регуляции самоподдержания стволовых клеток (Varga A. C., Wrana J. L., 2005)

Синергизм в действии отдельных сигнальных путей, активирующих самоподдержание стволовых клеток, например Smad или STAT, может происходить путем их независимой регуляции, а также путем образования комплекса, включающего белки Stat3, Smad1, Cbp/p300 и обладающего способностью физически взаимодействовать с сайтом связывания белков Stat на промоторе гена глиального фибриллярного кислого протеина (Gfap) — маркера нейральных стволовых клеток. Несколько факторов, продукция которых необходима для самоподдержания стволовых клеток, например Oct3/4, Nanog, Sox2, до настоящего времени не нашли «своего места» в общей сигнальной сети, регулирующей функции СК, хотя их связь с основными регуляторными сигнальными путями была ясно продемонстрирована. Публикации последних лет показывают, что активность Oct3/4, Nanog, Sox2 в эмбриональных стволовых клетках может быть инициирована лигандом семейства BMP — белком Nodal (см. рис. 7.15).

Роль лигандов семейства Activin в регуляции функций стволовых клеток

Генетические опыты показывают, что у эмбрионов с нехваткой белка Smad4 отмечается нарушение пролиферации клеток бластоцисты и замедляется формирование внутренней клеточной массы. Эти результаты соответствуют данным о том, что мыши с инактивацией гена Nodal в эмбриональном периоде продуцируют сниженное количество белка Oct3/4 и демонстрируют уменьшение размеров бластоцисты. Изучение профиля экспрессии генов методом молекулярного дисплея показывает, что суперсемейство TGF β играет ключевую роль в регуляции самоподдержания эмбриональных и соматических стволовых клеток.

Установлено, что сигнальный путь Nodal особенно активен в недифференцированных ЭСК человека, а его белки-мишени в этих клетках транскрипционно активированы. Оказалось, что белки Smad2, Smad3, передающие сигнал Nodal от активированного рецептора, в недифференцированных ЭСК человека находятся в фосфорилированном активном состоянии и локализуются в ядре. При ингибции сигналов эндогенного Nodal в мышиных ЭСК путем активации экспрессии Smad7 или применении специфического ингибитора Nodal — SB-431542 — количество стволовых клеток существенно снижается, что не отмечается при торможении сигналов контрольного белка Bmp ингибитором Smad6. Эти данные предполагают, что в ЭСК активность Oct3/4, Nanog, Sox2 может быть инициирована лигандом семейства BMP — транскрипционным фактором Nodal, что способствует их самоподдержанию.

Необходимо учитывать, что клеточная судьба регулируется сетью сигнальных путей в ответ на действие различных комбинаций лигандов. Роль отдельных факторов в регуляции клеточной судьбы является динамичной, т. е. влияние одного фактора на функции стволовых клеток зависит от комбинации действующих в данный момент сигналов и факторов других сигнальных путей (см. рис. 7.15).

7.3. Роль сигнального пути Notch в регуляции функций стволовых клеток

Феномен латеральной ингибции опосредован сигнальным путем Notch

Notch является одним из наиболее широко используемых природой сигнальных путей, контролирующих процессы развития у животных. Notch играет роль в контроле выбора клеточной судьбы в процессе развития путем уточнения и усиления молекулярных различий между клетками. Хотя сигнальный путь Notch вовлечен в развитие большинства тканей, он наиболее хорошо известен по канонической роли в поддержании недифференцированного состояния исходных эпителиальных клеток при их дифференцировке в нервные клетки у мух *Drosophila*. Нервные клетки обычно возникают как единичные клетки из эпителиальных клеток-предшественников. В ходе дифференцировки каждая коммитированная нервная клетка-предшественник передает контактирующим с ней клеткам сигналы, ингибирующие повторение ее судьбы, то есть тормозящие специализацию соседних клеток в том же направлении. Этот процесс известен как *латеральная ингибция* (рис. 7.16).

У эмбрионов мух клетки, расположенные вокруг будущей нервной клетки, развиваются в эпидермальном направлении. Латеральная ингибция у млекопитающих зависит от сигналов, которые опосредуются лигандами Notch, белками семейств Delta, Serrate и Jagged, экспрессирующимися на клеточной поверхности будущих нервных клеток. При связывании с Notch лиганд Delta передает клетке, на поверхности которой находится рецептор Notch, сигналы, тормозящие ее нейральную специализацию. При нарушении передачи сигналов между белками Delta и Notch обе контактирующие клетки могут становиться нейральными, что сопровождается образованием избытка нейронов. Сигналы между соседними клетками через рецепторы Notch и их лиганды регулируют выбор клеточной судьбы в разнообразных тканях у различных животных. Сигналы Notch могут также вызывать не латеральную ингибицию, но другие эффекты. В некоторых тканях они действуют противоположным образом, способствуя переходу клеток в себе подобные. Зависимая от Notch регуляция образования разнообразных клеточных линий используется у мух *Drosophila* при развитии нейронов, мышц, кишечника, сердца и других органов, а у позвоночных этот сигнальный путь вовлечен в нейрогенез и миогенез. Notch и Delta содержат один трансмем-

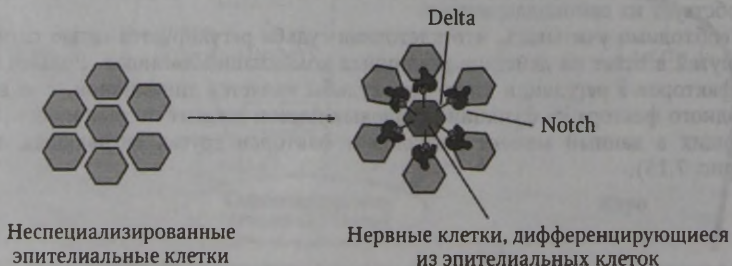


Рис. 7.16. Феномен латеральной ингибции (Alberts B. [et al.], 2004)

бранный домен, и оба нуждаются в протеолизе для функционирования. Значение протеолиза в процессинге Notch изучено значительно лучше, чем в процессинге Delta.

Процессинг и активация рецептора Notch

У млекопитающих продуцируются четыре различных рецептора Notch (Notch 1–4) и 5 лигандов типа Delta (Delta like (Dll) 1, 3, 4 и Jagged-1, -2). В ходе процессинга рецептор Notch подвергается трем протеолитическим делениям, два из которых зависят от Delta (рис. 7.17). Первое протеолитическое деление молекулы (S1) осуществляется протеазой, которая называется Furin и действует в аппарате Гольджи. Furin разделяет вновь синтезированный белок Notch и его будущий внеклеточный домен. Это разделение превращает Notch в гетеродимер, состоящий из двух нековалентно связанных полипептидных фрагментов, которые затем транспортируются на клеточную поверхность. Фрагмент Notch с ММ 180 кДа содержит его внеклеточную часть, а фрагмент с ММ 120 кДа включает трансмембранный и внутриклеточный домены. Внеклеточная часть рецептора Notch состоит из 36 повторов, подобных таковым в EGF. Лиганд Delta включает 9 подобных повторов. Повторяющиеся аминокислотные последовательности в структуре Notch подвергаются фукозилации ферментом О-фукозилтрансферазой, что необходимо для последующей активации Notch его лигандами. Связывание Delta с Notch сопровождается вторым протеолизом (S2) во внеклеточном домене, опосредованном у различных видов животных протеаза-

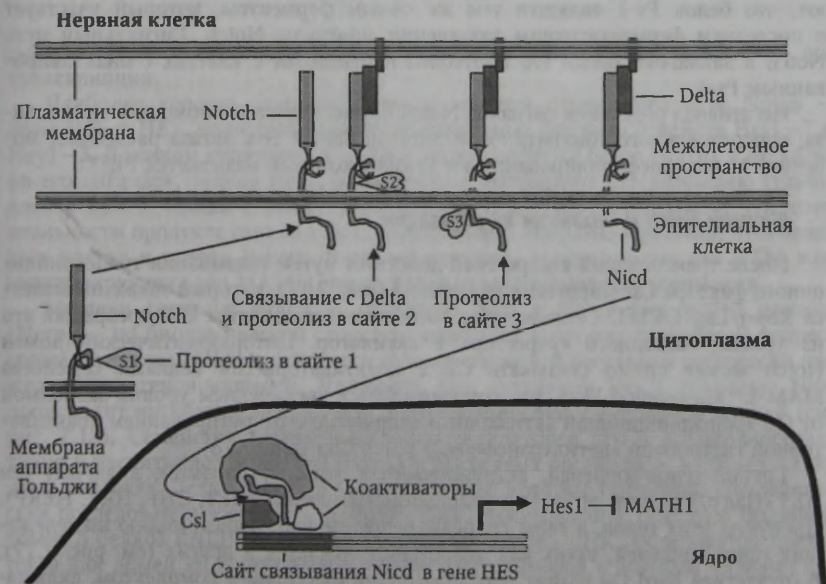


Рис. 7.17. Процессинг и активация рецептора Notch (Chan Y. M., Jan Y. N., 1998; Van Es J. H., Clevers H., 2005)

ми, относящимися к различным семействам. У мух *Drosophila* эту роль может выполнять фермент Kuzbanian из семейства металлопротеиназ Adam. У млекопитающих протеолиз S2 осуществляется металлопротеиназой Tage (фермент, конвертирующий белок Tnf- α). Последнее ферментативное разрезание молекулы Notch в липидном слое мембраны (S3) осуществляется многокомпонентным комплексом *j*-секретазы и следует быстро за предыдущим протеолизом, освобождая цитоплазматический домен активированного рецептора Notch (Ncd) (см. рис. 7.17). Комплекс *j*-секретазы включает в качестве отдельных компонентов протеиназы *презенилин-1* и *презенилин-2* (Ps-1, Ps-2).

Разрезание С-концевой части белка Notch в пределах трансмембранного домена напоминает протеолиз другого трансмембранного белка — предшественника β -амилоида (App), который экспрессируется в нейронах и вовлечен в развитие болезни Альцгеймера. App протеолизуется в пределах трансмембранного сегмента, освобождая один пептидный фрагмент во внеклеточное пространство в головном мозге, и другой — в цитозоль нейрона. При болезни Альцгеймера внеклеточные фрагменты накапливаются в избыточном количестве и собираются в филаменты, которые формируют амилоидные бляшки (плаки). Предполагают, что именно эти бляшки повреждают нервные клетки. Наиболее частая генетическая причина раннего начала болезни Альцгеймера — мутация в гене PS-1, который кодирует 8-мембранный белок, принимающий участие в протеолизе App. Мутация PS-1 сопровождается активацией протеолиза App с образованием фрагментов, формирующих амилоидные бляшки. Генетические доказательства, полученные на червях *C. elegans*, мухах *Drosophila* и мышах, показывают, что белок Ps-1 является тем же самым ферментом, который участвует в последнем ферментативном разделении молекулы Notch. Сигнальный путь Notch и заключительный его протеолиз нарушаются в клетках с инактивированным Ps-1.

Негативная регуляция сигналов Notch осуществляется с помощью протеолиза, опосредованного убиквитиновой лигазой Sel-10. Эта лигаза распознает молекулу Notch, фосфорилированную в домене, который называется PEST.

Мишени Notch и механизм их активации

После транслокации в ядро Ncd действует путем связывания транскрипционного фактора Csl (suppressor of hairless) (рис. 7.17), который также называется Rbp-j/Lag-1/Cbf1. Связывание с Ncd изменяет свойства Csl, превращая его из транскрипционного супрессора в активатор. Цитоплазматический домен Notch может прямо связывать Csl с коактиваторными белками семейства MAM-L (Mastermind-like), что сопровождается увеличением уровня зависимой от Csl транскрипционной активации и сопряжено с рекрутированием коактиваторной гистоновой ацетилтрансферазы p300/Cbp (рис. 7.18).

Группа генов-мишеней, активированных этим механизмом, включает ген HES (Hairy/Enhancer of Split) и родственные ему гены (HEY, CHF, HRT, HERP). Продукты этих генов, в свою очередь, репрессируют транскрипцию нижележащих генов-мишеней, таких как нейрогенин, MATH-1 и других (см. рис. 7.17). В отсутствие Ncd Csl взаимодействует с корепрессорным комплексом, включающим Hdac, и связывает специфический мотив ДНК с последовательностью GTGGGAA на промотерах генов-мишеней. Образование комплекса Ncd с Csl

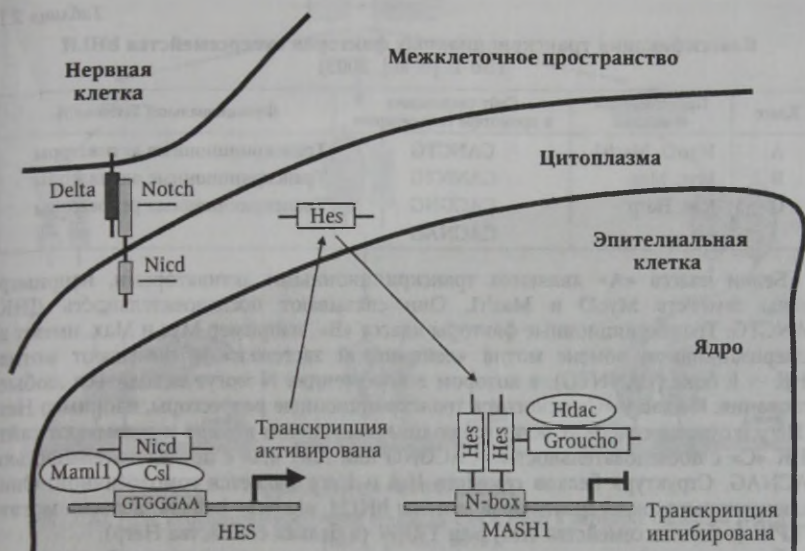


Рис. 7.18. Схема действия сигналов Notch в ингибции нейральной дифференцировки (Iso T. [et al.], 2003)

смещает Hdc с промотора гена-мишени и сопровождается активацией его транскрипции.

Наиболее хорошо охарактеризованы мишени сигнального пути Notch — гены HES и HEY, кодирующие транскрипционные факторы семейств Hes1–7 и Hey1–3. В тонком кишечнике у мышей экспрессируется белок Notch1 и несколько его лигандов, белков Hes1, 6, 7, которые регулируют детерминацию судьбы клеток крипт. Мыши с инактивированным геном HES1 показывают усиление активности продукта гена MATH1, аккумуляцию нейроэндокринных, кубковидных клеток и клеток Paneth. В случае мутаций, активирующих ген HES1 или инактивирующих ген MATH1, происходят противоположные изменения.

Мишени сигналов Notch — семейство белков Hes и Hes-related proteins (Hesr) — по биохимической структуре относятся к транскрипционным репрессорам семейства bHLH и действуют путем негативной регуляции экспрессии нижележащих генов-мишеней. Например, при активации Hes с помощью Ncd происходит ингибция нейральной дифференцировки у эмбрионов мышей (см. рис. 7.18). Семейство транскрипционных регуляторов bHLH высококонсервативно и насчитывает более 240 белков у различных организмов, включая дрожжи и человека. Белки bHLH образуют димеры, которые связывают специфические последовательности ДНК в промоторах генов-мишеней. При этом основной домен b белков bHLH выполняет роль связывающей ДНК последовательности, тогда как домен HLH опосредует образование димеров с другими членами семейства bHLH. Транскрипционные факторы bHLH подразделяются на несколько групп в соответствии с их структурными и биохимическими характеристиками (табл. 7.1).

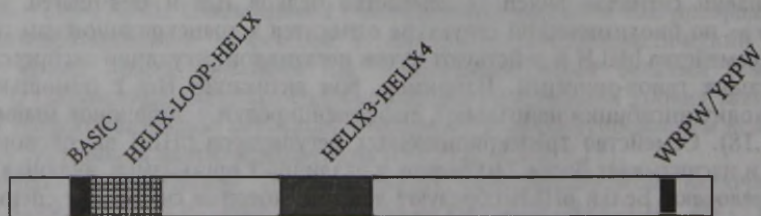
Таблица 7.1

Классификация транскрипционных факторов суперсемейства bHLH
(Iso T. [et al.], 2003)

Класс	Представители семейств	Сайт связывания в промоторе гена-мишени	Функциональная активность
A	MyoD, Mash1	CANCTG	Транскрипционные активаторы
B	Мус, Max	CANNTG	Транскрипционные активаторы
C	Hes, Herp	CACGNG CACNAG	Транскрипционные репрессоры

Белки класса «А» являются транскрипционными активаторами, например члены семейств MyoD и Mash1. Они связывают последовательность ДНК CANCTG. Транскрипционные факторы класса «В», например Мус и Max, имеют в димеризационном домене мотив «лейциновой застёжки» и связывают мотив ДНК — Е бокс (CANNTG), в котором в положениях N могут находиться любые основания. К классу «С» относятся транскрипционные репрессоры, например Hes и Herp, которые содержат остаток пролина в основном домене и связывают сайт ДНК «С» с последовательностью CACGNG или сайт «N» с последовательностью CACNAG. Структура белков семейств Hes и Herp является гомологичной. Они включают высококонсервативные домены bHLH, «helix3—helix4», а также мотив WRPW (в белках семейства Hes) или YRPW (в белках семейства Herp).

Существует несколько различных механизмов транскрипционной супрессии белками Hes и Herp. Одним из механизмов является активная супрессия, в процессе которой белки Hes формируют гомодимеры, взаимодействующие с последовательностями ДНК класса «С» (рис. 7.19). Гомодимеры Hes образуют комплексы с корепрессорами Groucho или их гомологами у млекопитающих факторами Tle (transducin-like enhancer of split), что опосредовано мотивом WRPW в С-концевой части молекулы Hes. В свою очередь, корепрессор может рекрутировать белки Hdac, которые модифицируют структуру хроматина. Другим механизмом является пассивная супрессия, в процессе которой происходит секвестрация потенциального активатора транскрипции. Например, Hes1 способен формировать нефункциональные гетеродимеры с E47 — убиквитарным белком семейства bHLH, потенциальным партнером транскрипционных факторов MyoD и Mash1, таким образом, предотвращая образование функциональных гетеродимеров MyoD-E47 или Mash1-E47. Третий механизм, с помощью которого



Консервативные домены в молекуле белков семейств Hes/Herp

Рис. 7.19. Схема строения белков семейств Hes и Herp (Iso T. [et al.], 2003)

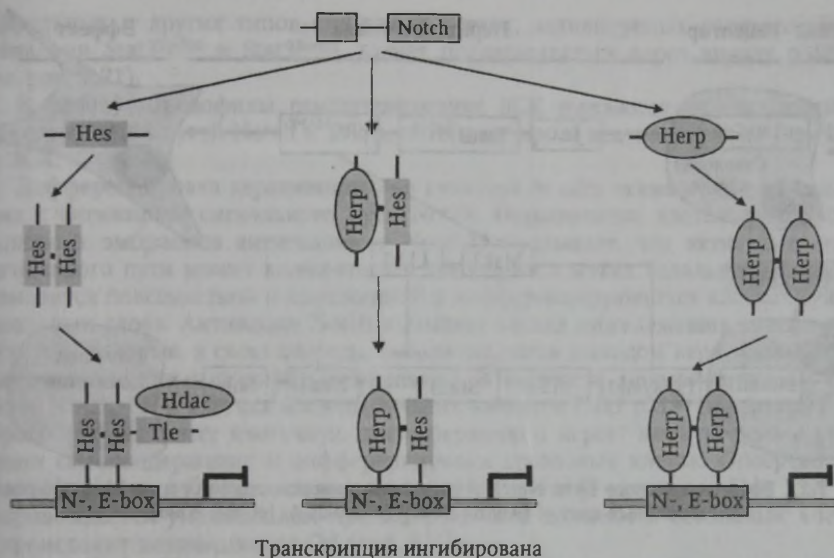


Рис. 7.20. Роль кооперации продуктов семейств Hes и Herp в передаче сигналов Notch (Iso T. [et al.], 2003)

может супрессироваться транскрипция генов-мишеней, состоит в активации транскрипции CdkI p21^{Cip1}, опосредованной доменом «helix3–helix4», в структуре белков Hes. Кроме того, молекулы Hes и Herp способны взаимодействовать между собой, формируя гетеродимеры, которые предотвращают активацию транскрипции генов-мишеней (рис. 7.20).

Роль Notch в регуляции функций эмбриональных, зародышевых и соматических стволовых клеток

Наиболее хорошо изученный канонический путь активации Notch связан с транслокацией его С-концевого домена в ядро, где этот полипептид взаимодействует с Csl. Большинство эффектов Notch связано с активацией транскрипционных супрессоров семейств Hes и Herp. Однако в некоторых случаях сигналы Notch могут вызывать трансактивацию генов-мишеней, используя кооперацию с другими сигнальными путями. В ЭСК человека Notch активирует сигнальный путь PI3K/АКТ (см. гл. 9), способствуя специфическому фосфорилированию молекулы Stat3 по серину 727 (Stat3^{Ser727}), которое вызывает экспрессию мишеней, включая Shh, и облегчает выживание стволовых клеток (рис. 7.21). Такой позитивный сигнал выживания уравнивается негативными сигналами, передаваемыми через сигнальный путь, опосредованный Jak-p38^{MAPK}, который противодействует фосфорилированию молекулы Stat3 по серину 727.

Сигналы Jak-p38^{MAPK} способствуют фосфорилированию молекулы Stat3 по тирозину 705 (Stat3^{Tyr705}), что сопряжено с последующей клеточной дифференцировкой. В культуре *in vitro* НСК плода подвергаются апоптозу, уровень которого резко снижается при экспрессии лиганда Notch, Dll4. Этот эффект выживания отменяется при обработке клеток ингибитором γ -секретазы — Dapt, кото-

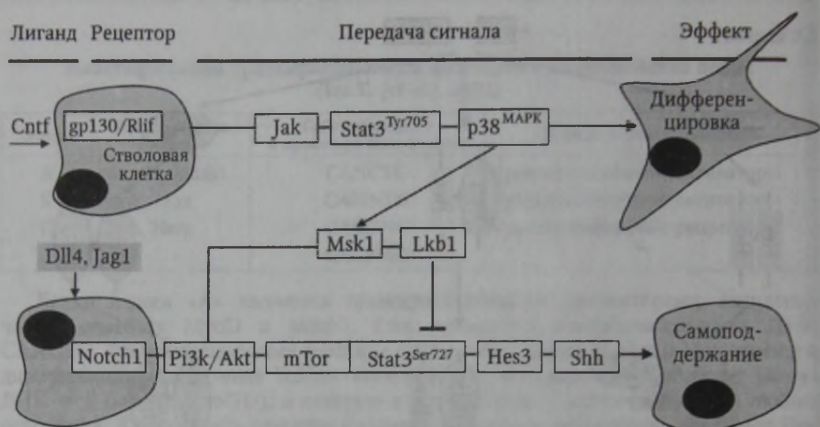


Рис. 7.21. Роль сигнального пути Notch в регуляции самоподдержания и дифференцировки стволовых клеток (Androutsellis-Theotokis A. [et al.], 2006)

рый препятствует протеолитическому разделению молекулы Notch ферментом Ps-1 (см. рис. 7.17). В случае экспрессии лиганда Dll4, нейральные стволовые клетки сохраняют способность образовывать нейроны, астроциты и олигодендроциты при длительной культивации. Сигнал Dll4 передается через киназы Pi3k и Akt и их нижележащую мишень mTor (mammalian target of rapamycin), которая является регулятором клеточной пролиферации. В свою очередь mTor способствует фосфорилированию молекулы Stat3 по серину 727, что можно предотвратить при обработке клеток ингибиторами сигнального пути Notch/Dapt или рапамицином. Stat3^{Ser727} транскрипционно активирует белок Hes3, что можно предотвратить путем воздействия на клетки *цилиарным нейротрофическим фактором* (Cnlf), активирующим киназу семейства Jak. Белок и мРНК, кодируемые геном HES3, были найдены в высокой концентрации в субтравентрикулярной зоне центральной нервной системы, которая у зрелого организма является местом расположения нейральных стволовых клеток. В этой же зоне обнаружена экспрессия транскрипционных факторов Shh и Bmi1. Jag1 вызывает продолжительную активацию продукции белка Shh, что опосредовано белком Hes3. Активность Shh и Bmi1 способствует самоподдержанию эмбриональных и соматических стволовых клеток различной тканевой специфичности (см. рис. 7.21). Активность белка mTor регулируется негативной обратной связью, которая опосредуется киназами Msk1 и Lkb1, фосфорилирование и активация которых вызывается Jak1.

Транскрипционный фактор Stat3 активируется сигналами клеточной поверхности, воспринимаемыми рецепторным комплексом gp130/Rlf и передаваемыми тирозиновой киназой семейства Jak (см. цв. вклейку, рис. 9.1). Внеклеточные лиганды, которые облегчают фосфорилирование Stat3 по тирозину 705, стимулируют дифференцировку НСК в глиальные клетки. Дифференцировочная активность Stat3^{Tyr705} опосредована киназой p38^{MAPK}, которая ингибирует самоподдержание стволовых клеток путем фосфорилирования и активации киназы Msk. Таким образом, баланс между дифференцировкой и самоподдержанием

нейральных и других типов стволовых клеток, активируемых соответственно сигналами Stat3^{Tyr705} и Stat3^{Ser727}, может поддерживаться через киназу p38^{MARK} (см. рис. 7.21).

В яичнике дрозофилы самоподдержание ЗСК нуждается во взаимодействии сигнальных путей Notch и TGFβ, потеря которого ведет к уменьшению числа ЗСК.

Дифференцировка кератиноцитов в культуре *in vitro* также может быть связана с активацией сигнального пути Notch. Окрашивание клеток эпидермиса мышиных эмбрионов антителами к Notch1 показывает, что активация этого сигнального пути может выявляться в некоторых клетках базального слоя, но становится повсеместной и выраженной в дифференцирующихся клетках супрабазальных слоев. Активация Notch вызывает каскад нижележащих сигнальных событий, которые, в свою очередь, сопровождаются выходом кератиноцитов из клеточного цикла и их дифференцировкой. В частности, прямой мишенью сигналов Notch/Csl в клетках млекопитающих является CdkI p21^{Cip1}, активация которого останавливает клеточную пролиферацию и играет важную роль в регуляции самоподдержания и дифференцировки стволовых клеток. Опосредованная Notch ингибция сигнальных путей Wnt/β-катенин, Shh, NF-κB сопровождается уменьшением пролиферативной активности стволовых клеток и происходит независимо от Csl (рис. 7.22).



Рис. 7.22. Сигналы Notch ингибируют деление стволовых клеток путем прямой транскрипционной активации гена CdkI p21^{Cip1} и торможения передачи сигналов Wnt/β-катенин, Shh и NF-κB (Lefort K., Dotto G. P., 2004).

Сигналы Notch вызывают позитивную регуляцию дифференцировки кератиноцитов

Взаимодействие между Notch и Delta способствует регуляции разнонаправленной дифференцировки стволовых клеток базального слоя эпидермиса, обладающих изначально одинаковым дифференцировочным потенциалом. С другой стороны, Notch и его лиганды могут коэкспрессироваться в одних и тех же клетках, подвергающихся координированной дифференцировке в одном и том же направлении. Такие клетки в мышцах и коже млекопитающих в процессе эмбрионального развития экспрессируют лиганд Jagged1. В этом случае Notch усиливает экспрессию Jagged1, который действует как позитивный регулятор обратной связи и координирует дифференцировку клеток в том же направлении, что и Notch (рис. 7.23). Относительный вклад негативных и позитивных механизмов обратной связи в модуляции сигналов Notch, по-видимому, контролируется белками-помощниками, такими как белки семейства Fringe, которые селективно ингибируют ответ Notch к лигандам, подобным Jagged.

В эпидермисе кожи человека повышение уровня экспрессии Notch и Delta на различных стволовых клетках базального слоя способствует индукции коммитирования клеток-соседей Notch во временно амплифицирующиеся клетки так, как это происходит при латеральной ингибиции (см. рис. 7.23). С другой стороны, в эпидермисе новорожденных и эмбрионов мышей экспрессия Jagged1 и Notch1 совпадает в дифференцирующихся кератиноцитах в супрабазальном слое, тогда как Jagged1 и Notch1 отсутствуют в терминально дифференцирующихся клетках внешних слоев. Шиповатый слой является единственной зоной эпидермиса, свободной от экспрессии белков семейства Fringe, создавая границу

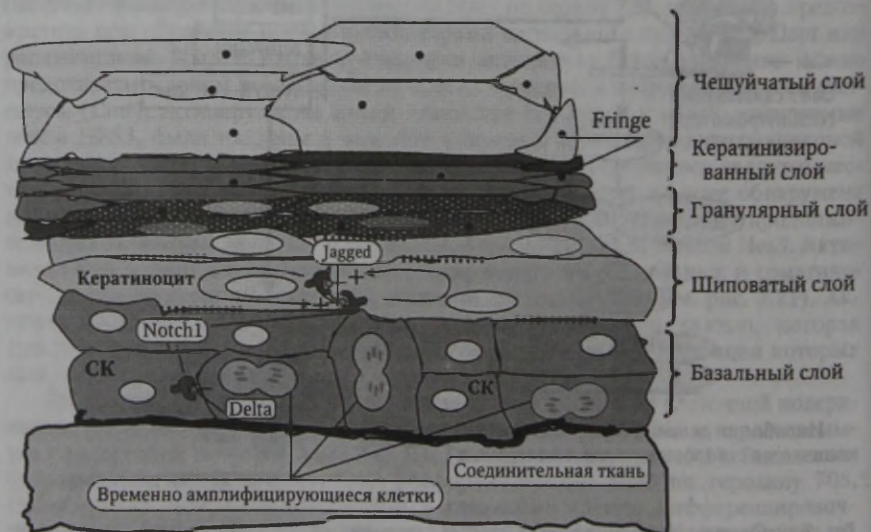


Рис. 7.23. Роль сигнального пути Notch в регуляции дифференцировки стволовых клеток эпидермиса (Lefort K., Dotto G. P., 2004)

между базальным и гранулярными слоями, которые отличаются по экспрессии молекул сигнального пути Notch.

Роль Notch в облегчении коммитирования СК эпидермиса во временно амплфицирующиеся клетки была предположена на основе данных о кератиоцитах, у которых повышена продукция Delta, супрессирующего пролиферацию соседних клеток, маркированных Notch. Потеря экспрессии Notch у мышей сопровождается гиперплазией эпидермиса с неправильной экспрессией кератинов в базальном и верхних эпидермальных слоях и гиперактивацией экспрессии интегринов $\beta 1$ и $\beta 4$ в супрабазальном слое, в котором экспрессия этих интегринов в нормальных условиях является низкой или отсутствует. Напротив, активация сигнального пути Notch в мышинных кератиоцитах является достаточной для того, чтобы вызвать их выход из клеточного цикла, что опосредовано активацией продукции $p21^{Cip1}$ и сочетается с экспрессией маркеров терминальной дифференцировки промежуточного эпидермального слоя (кератинов 1, 10 и инволюкрина), а также супрессией поздних маркеров дифференцировки кератиоцитов (лорикрина, филагрина).

Сигналы Notch ингибируют нейрогенез, но способствуют образованию глиальных клеток

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что Notch ингибирует дифференцировку нейральных клеток-предшественников и способствует поддержанию их в неактивном состоянии. Эти данные дополнены новыми результатами, свидетельствующими, что Notch1 и его мишени — гены HES1 и HES5 — способствуют активации глиогенеза. Например, культивирование нейральных стволовых клеток гребешка (NCSC) с высокой частотой ведет к образованию *шванновских клеток* в случае активации сигнального пути Notch. Инструктивная роль Notch была найдена и при дифференцировке клеток зрительной оболочки глаза — ретины. Ретинальные клетки-предшественники, экспрессирующие экзогенные Nid или Hes1, дифференцируются в глиальные тканеспецифические клетки Мюллера (MGC), тогда как эктопическая экспрессия доминантно-негативного гена HES1 снижает число глиальных клеток.

В других опытах клетки ретины с низким уровнем транскрипционного фактора Hes5 показывают уменьшение числа глиальных клеток, тогда как экзогенная экспрессия Hes5 сопровождается увеличением числа глиальных клеток в ущерб количеству нейронов. Белок Herp1, экспрессирующийся в области внутреннего ядерного слоя ретины, в котором располагаются MGC, также обладает способностью активировать образование глиальных клеток, но не нейронов. Двойная мутация тканеспецифических нейрональных генов MASH1 и MASH2 ведет к увеличению числа MGC и повышению уровня продукта гена HERP1.

Роль Notch в злокачественной трансформации стволовых клеток на модели рака кожи

Модель рака кожи является предпочтительной из-за поверхностной локализации клеток эпидермиса и их доступности для проведения опытов. Протокол индукции опухоли кожи включает четыре стадии.

На *первой стадии* кожа подготавливается путем воздействия небольшими дозами канцерогена, что приводит к мутации онкогена RAS в единичных кератиоцитах, трансформация которых ингибируется сигналами нормальных клеток микроокружения (табл. 7.2).

Таблица 7.2

Стадии и механизм развития экспериментального рака кожи у мышей
(Lefort K., Dotto G. P., 2004)

Стадия развития рака	Механизм развития и фенотипические проявления
Инициация	Под действием канцерогена происходит мутация протоонкогена RAS в единичных стволовых клетках, размножение которых ограничивается сигналами микроокружения
Активация	В результате действия опухолевого промотера, который нарушает сигналы микроокружения, происходит активация делеции стволовых клеток, содержащих мутантный ген RAS, образуется доброкачественная опухоль — папиллома
Прогрессия	Доброкачественная папиллома превращается в злокачественную опухоль путем накопления мутаций, способствующих активации пролиферации трансформированных клеток, формируется базально-клеточная карцинома
Метастазирование	Образуется агрессивно растущая опухоль, не экспрессирующая тканевых маркеров (веретенообразно-клеточная карцинома), приобретающая способность к метастазированию

Мишенью канцерогена, вероятно, являются СК эпидермиса, обладающие способностью к неограниченно длительному самоподдержанию. Об этом свидетельствует тот факт, что кожа, обработанная канцерогеном, сохраняет свое «инициированное» состояние на всю жизнь.

Вторая стадия индукции опухоли включает повторную обработку кожи реагентами, не обладающими мутагенными свойствами, но способствующими формированию опухоли (опухолевыми промоторами). Функция опухолевых промоторов заключается в нарушении нормального микроокружения, что способствует превращению кератиноцитов, продуцирующих мутантный ген RAS, в папиллому, т. е. доброкачественную опухоль, характеризующуюся неинвазивным ростом. Большинство папиллом остаются высокодифференцированными, доброкачественными и зависимыми в своем росте от обработки опухолевыми промоторами.

На *третьей стадии* маленькая фракция папиллом постепенно приобретает потенциал для дальнейшей прогрессии в инвазивную злокачественную опухоль — чешуйчатую клеточную карциному. Скорость трансформации папилломы в карциному усиливается путем дополнительных генетических изменений клеток папилломы, что происходит на стадии прогрессии опухоли.

Четвертая стадия развития опухоли заключается в конверсии чешуйчатой карциномы, т. е. опухоли с распознаваемыми эпителиальными характеристиками, в более агрессивную и метастатическую опухоль, которая утрачивает тканеспецифические характеристики. Такая опухоль называется веретенообразной клеточной карциномой.

Инактивирующая мутация гена Notch1 в коже мыши достаточна для того, чтобы вызвать возникновение гиперпролиферативного фенотипа с нарушением границ эпидермиса. Этот феномен напоминает таковой при обработке кожи химическими опухолевыми промоторами. Мыши с делецией гена Notch1 проявляют повышенную чувствительность к развитию опухолей, вызванных путем использования стандартного канцерогенного протокола. Клетки с генотипом Notch1-/-, инфицированные онкогеном RAS и инъецированные подкожно им-

мунодефицитным мышам линии *nude*, могут формировать агрессивную опухоль, которую не формируют клетки, экспрессирующие нормальный уровень белка Notch1. Эти опыты показывают, что потеря белка Notch в коже сопровождается увеличением числа стволовых клеток в базальном слое эпидермиса, которые являются мишенями онкогенной трансформации у мышей при экспрессии протоонкогена RAS. Такая возможность соответствует представлениям, что активация сигнального пути Notch тормозит пролиферацию стволовых клеток путем прямой транскрипционной активации Cdk1 p21^{Cip1} (см. рис. 7.22).

Взаимодействие между Notch и другими сигнальными путями

Активация Notch в кератиноцитах вызывает события, которые могут быть опосредованы другими молекулами-передатчиками, а не Csl. Например, опосредованная Notch активация сигнальных путей Wnt/ β -катенин, Shh, NF- κ B может происходить независимо от Csl. При ингибции сигналов Notch повышается активность сигнальных путей Wnt/ β -катенин, Shh, NF- κ B, что сопровождается увеличением числа СК, их пролиферативной активности и повышением риска злокачественной трансформации (см. рис. 7.22).

Сигнальный путь Notch также влияет на другие сигнальные пути, которые играют ключевую роль в регуляции функций кератиноцитов. Мыши с эмбриональной инактивацией гена Notch отличаются от мышей с генотипом p21^{Cip1}-/- . После трехмесячного возраста у таких животных в различных частях тела возникают опухоли, которые высоковаккуляризованы и состоят из маленьких пролиферирующих базофильных клеток. У таких мышей также отмечается гиперплазия и кератинизация роговицы с последующей слепотой. Как в гиперплазированном эпидермисе, так и в опухолях, подобных базально-клеточной карциноме, возникающей из клеток базального слоя эпидермиса, снижение продукции Notch1 сопряжено с повышением уровня белка Gli2, опосредующего передачу сигналов Shh. Активация сигнальных путей Wnt/ β -катенин и NF- κ B в кератиноцитах также найдена при утрате функции Notch. Передача сигналов β -катенином может быть супрессирована при активации сигналов Notch1 (см. рис. 7.22).

В эпителиальных клетках сигналы Notch инициируют различные ответы, часть которых ограничивает пролиферативный потенциал и вызывает дифференцировку, тогда как другие облегчают выживание клеток. Эта двойственность функций может относиться не только к эпителиальным клеткам. Онкогенные эффекты активации Notch были вначале продемонстрированы при остром Т-клеточном лейкозе, происхождение которого может быть связано со специфической хромосомной транслокацией, сопровождающейся образованием аберрантного белка Notch1, проявляющего конститутивную активацию. Было установлено, что усиленная экспрессия подобной формы белка Notch в культуре клеток или у трансгенных животных сопровождается клеточной трансформацией.

Возникновение слизисто-эпидермоидных карцином, наиболее часто встречающихся опухолей слюнной железы, связано со специфической хромосомной транслокацией и образованием рекомбинантного белка, состоящего из транскрипционных активаторов Creb и Maml2 (см. цв. вклейку, рис. 7.24). Образующийся рекомбинантный белок Creb-Maml2 ингибирует экспрессию генов, опосредованную сайтом связывания Nid-Csl. Вместо этого белок Creb-Maml2 активирует транскрипцию с промоторов генов, содержащих сайт связывания Creb.

В этом случае нормальная передача сигналов Notch нарушается и появляется новая функция, опосредованная стимуляцией транскрипции, зависимой от транскрипционного фактора Cregb.

Карциномы шейки матки представляют собой наиболее часто встречающийся тип опухолей, происходящих из кератиноцитов. Инфицирование кератиноцитов вирусами папилломы человека штаммов HPV16 и HPV18 нарушает контроль клеточного цикла вследствие взаимодействия белков E6 и E7 вируса папилломы с регуляторными клеточными белками. При этом белок E6 HPV взаимодействует с p53 с последующей его убиквитинацией и деградацией, а белок E7 функционально инактивирует pRb, p107, p130 и p21^{Cip1}. Белок E6 активирует теломеразу, что позволяет инфицированным клеткам избежать старения (см. цв. вклейку, рис. 7.25).

В клетках HeLa, происходящих из ткани опухоли шейки матки, сигнальные пути p53 и pRb репрессированы онкопротеинами. При потере экспрессии белков E6 и E7 вирусом HPV сигнальные пути p53 и pRb могут быть реактивированы. Находясь в клетке в эписомальном состоянии, HPV долгое время может не проявлять свое супрессивное действие. При неопластической трансформации происходит интеграция вирусной ДНК в геном эпителиальной клетки, что сопровождается нарушением открытой рамки считывания вирусного гена E2. Функция гена E2 заключается в репрессии регуляторной области вирусного промотора (UTR), которая управляет транскрипцией генов E6 и E7, так что потеря активности гена E2 сопровождается инициацией экспрессии генов E6 и E7. Экспрессия этих генов может быть ингибирована в инфицированных кератиноцитах белком Notch1. В таких клетках экспрессия активированной формы Notch1 — Ncd, вызывает супрессию пролиферации, которая может быть следствием торможения экспрессии белков E6 и E7. Активация транскрипции белков E6 и E7 сопровождается взаимодействием их продуктов с негативными регуляторами клеточной пролиферации — белками p53 и pRb, функциональной инактивацией этих белков и активацией клеточной пролиферации (см. цв. вклейку, рис. 7.25).

Литература

- Alberts B., Johnson A., Lewis J. [et al.]. *Molecular Biology of the Cell*. — New York : Garland Science, Fourth Ed., 2004. — 1463 p.
- Androutsellis-Theotokis A. [et al.]. Notch signalling regulates stem cell numbers *in vitro* and *in vivo* / *Nature*, 2006. — Vol. 442. — P. 823–826.
- Artavanis-Tsakonas S. [et al.]. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development / *Science*, 1999. — Vol. 284. — P. 770–776.
- Barker T. [et al.]. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5* / *Nature*, 2007. — Vol. 449. — P. 1003–1007.
- Baron M. An overview of the Notch signaling pathway / *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2003. — Vol. 14. P. 113–119.
- Benson R. A. [et al.]. Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery / *Curr. Opin. Immunol.*, 2005. — Vol. 17. — P. 259–266.
- Blaumueller C. M. [et al.]. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane / *Cell*, 1997. — Vol. 90. — P. 281–291.
- Bray S. J. Notch signaling: a simple pathway becomes complex / *Nature Rev.*, 2006. — Vol. 7. — P. 678–689.
- Chan Y. M., Jan Y. N. Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction / *Cell*, 1998. — Vol. 94. — P. 423–426.

Chen C. R., Kang Y., Siegel P. M. [et al.]. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the Tgf β receptor to c-myc repression / *Cell.*, 2002. — Vol. 110. — P. 19–32.

Hu X. [et al.]. Transforming growth factor beta inhibits the phosphorylation of pRB at multiple serine/threonine sites and differentially regulates the formation of pRB family-E2F complexes in human myeloid leukemia cells / *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000. — Vol. 276. — P. 930–939.

Hurlbut G. D. [et al.]. Crossing paths with Notch in the hyper-network / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2007. Vol. 19. — P. 166–175.

Iso T. [et al.]. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway / *J. Cell. Physiol.*, 2003. — Vol. 194. — P. 237–255.

Kluppel M., Wrana J. L. Turning it up a Notch: cross-talk between TGF β and Notch signaling / *Bio Essays.*, 2005. — Vol. 27. — P. 115–118.

Lefort K., Dotto G. P. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression / *Semin. Cancer. Biol.*, 2004. — Vol. 14. — P. 374–386.

Massague J., Chen Y. G. Controlling TGF β signaling / *Genes Dev.*, 2000. — Vol. 14. — P. 627–644.

Massague J., Gomis R. R. The logic of TGF β signaling / *FEBS Lett.*, 2006. — Vol. 580. — P. 2811–2820.

Ogawa K. [et al.]. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells / *J. Cell. Sci.*, 2007. — Vol. 120. — P. 55–65.

Okajima T. [et al.]. Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding / *Science*, 2005. — Vol. 307. — P. 1599–1603.

Van Es J. H., Clevers H. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease / *Trends Mol. Med.*, 2005. — Vol. 11. — P. 496–502.

Van Es J. H. [et al.]. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells / *Nature*, 2005. — Vol. 435. — P. 959–963.

Varga A. C., Wrana J. L. The disparate role of BMP in stem cell biology / *Oncogene*, 2005. — Vol. 24. — P. 5713–5721.

ГЛАВА 8 || СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ Wnt/ β -КАТЕНИН В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

8.1. Семейство белков Wnt, общая характеристика, процессинг, передача сигналов, роль в активации различных сигнальных путей

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин участвует в регуляции функциональной активности эмбриональных, зародышевых и соматических стволовых клеток различных тканей, включая кроветворную систему, кожу, мышцы, нервную ткань, эпителий внутренних органов и молочной железы, хрящевую и костную ткани. Эти данные позволяют предположить, что белки сигнального пути Wnt/ β -катенин, как и факторы нескольких других сигнальных путей (PcG/Bmi1, Notch, Hedgehog, TGF β), создают фундаментальную основу для сопряжения самоподдержания стволовых клеток с их убиквитарными функциями (рис. 8.1).

Общая характеристика белков семейства Wnt

Белки Wnt были открыты вне зависимости друг от друга у мух и мышей. У мух *Drosophila* был найден ген Wingless, функция которого связана с контролем формирования сегментов тела при развитии личинки. Ген Wingless, как оказалось



Рис. 8.1. Основные сигнальные пути, регулирующие самоподдержание соматических стволовых клеток различной тканевой специфичности (Reya T., Clevers H., 2005)

позднее, является гомологом гена WNT1, который был обнаружен у мышей и назван INT1. Он был идентифицирован в 1982 г. после установления его роли в развитии рака молочной железы, возникающего в результате интеграции мышиного вируса рака молочной железы (MMTV) в сайт интеграции гена INT1.

Мутации генов *Dishevelled* (DSH) и *Armadillo* у мух (β -катенин у позвоночных) приводили к возникновению фенотипа, подобного таковому при мутации WNT1, тогда как мутации Shaggy/zeste-white 3 (гомолог киназы 3β гликоген синтетазы, Gsk3 β) сопровождалась возникновением противоположного фенотипа. Было предположено, что продукты генов WNT, DSH, GSK3 β и β -катенина играют ключевую роль в сигнальном каскаде Wnt. Введение мРНК WNT1 в вентральные бластомеры лягушки *Xenopus* на стадии четырех клеток приводило к удвоению оси тела. Этот результат свидетельствовал, что сигнальный путь Wnt/ β -катенин консервативен в развитии позвоночных и играет важную роль в эмбриогенезе. Дубликация оси тела также наблюдалась при экзогенной экспрессии DSH, β -катенина и доминантно негативной версии GSK3 β . В 1991 г. был открыт ген APC (adenomatous polyposis coli), мутации которого играют ведущую роль в возникновении семейного полипоза прямой кишки (FAP). В 1993 г. была найдена связь между β -катенином и Arc, а также установлена важная роль сигнального пути Wnt/ β -катенин в возникновении рака кишечника.

Белки Wnt инициируют несколько сигнальных путей.

Передача сигналов через неканонические сигнальные пути

Семейство белков Wnt у млекопитающих включает 19 различных секреторных молекул, контролирующих несколько сигнальных путей (рис. 8.2). Один из таких путей регулирует вход в клетку Ca^{2+} и активирует *протеинкиназу C* (Pkc) в процессе формирования формы клеток и их адгезивной функции. Два других сигнальных пути связаны с регуляцией планарной клеточной полярности — конвергентного расхождения (PCP-CE) или накоплением β -катенина (Wnt/ β -катенин). Сигналы Wnt, связанные с различными сигнальными путями, передаются через белки Dishevelled (Dsh), которые у млекопитающих представлены тремя различными молекулами.

Структура Dsh включает три консервативных домена:

- 1) N-концевой домен DIX, который связывает белок аксин и, таким образом, опосредует активацию сигнального пути Wnt/ β -катенин;
- 2) центральный домен PDZ, вовлеченный в формирование многих белковых взаимодействий;
- 3) C-концевой домен DEP, опосредующий взаимодействие с белками семейства Rho в сигнальном пути, регулирующем планарную клеточную полярность и конвергентное расхождение (см. рис. 8.2).

Из 623 аминокислотных остатков в молекуле Dsh у мух *Drosophila* 15 % принадлежит серинам или треонинам, и большинство из них находятся в центральной части молекулы Dsh, где располагается домен PDZ. Dsh взаимодействует со множеством белков-партнеров, функциональная активность которых зависит от такого взаимодействия:

— с *казеинкиназами* 1, 2 (Ck1, 2) и *фосфатазой* Prp2a, которые контролируют уровень фосфорилирования некоторых белков сигнального пути Wnt/ β -катенин, включая молекулу β -катенина;

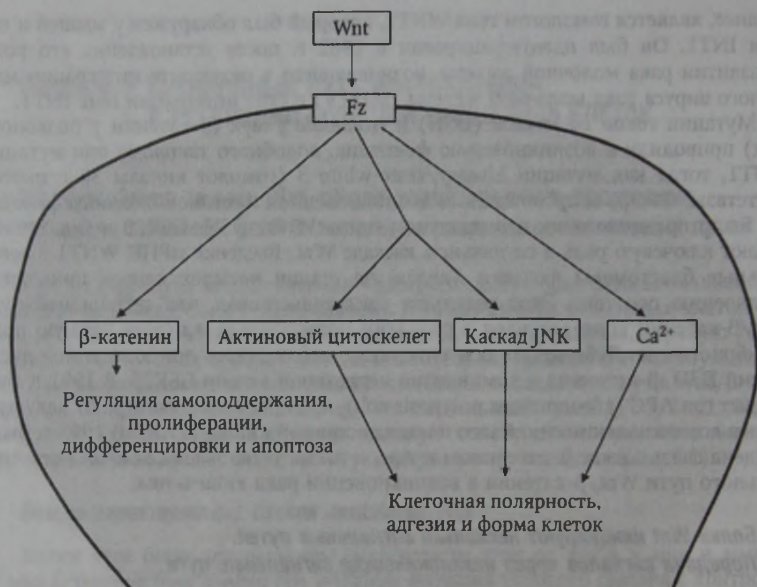


Рис. 8.2. Сигнальные пути, регулируемые семейством белков Wnt (Wharton K. A. Jr., 2003)

- с белком Par1, регулирующим аккумуляцию детерминант клеточной судьбы при асимметричном делении зародышевых стволовых клеток;
- с белком аксином, играющим роль адаптора при сборке комплекса, инактивирующего β -катенин;
- с белком Stbm (Strabismus), который модулирует сигналы PCP;
- с белком Daam (Dishevelled-associated activator of morphogenesis), опосредующим взаимодействие Dsh с белками семейства Rho и др.

Первым белком, физическое взаимодействие которого с Dsh было установлено, является Notch. Роль Notch, взаимодействующего с Dsh при формировании закладки крыла у мух *Drosophila*, заключается в ингибции изменения судьбы сенсорных клеток, контактирующих с клетками, формирующими зачаток крыла под действием сигналов Wnt.

Семейство Rho включает три ГТФазы: Cdc42, Rac и Rho, которые действуют как молекулярные переключатели, контролируя клеточные процессы путем циклирования между активным состоянием, в котором они связывают ГТФ, и неактивным состоянием, в котором они связывают ГДФ (рис. 8.3). Активация Cdc42 вызывает полимеризацию актина и образование пучков полимеров, формирующих филоподии, или более короткие клеточные выступы, которые называются микрошипами. Активация Rac облегчает полимеризацию актина на периферии клеток и ведет к образованию складкообразных выступов — ламеллоподий и мембранных складок. Активация Rho облегчает образование пучков актиновых филаментов с филаментами миозина II в так называемых стресс-

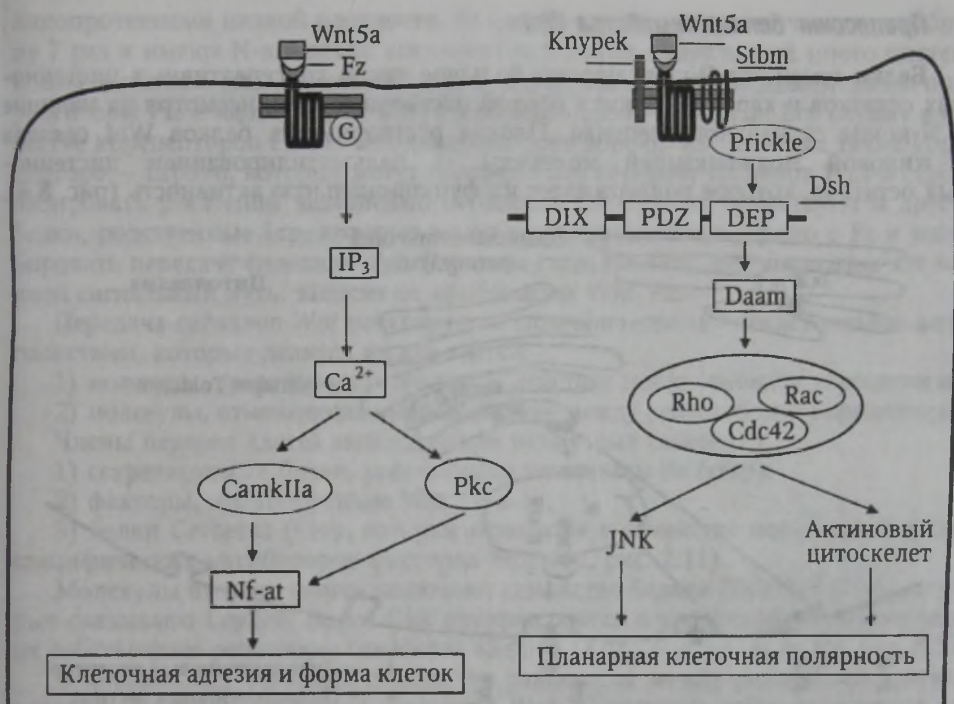


Рис. 8.3. Схема передачи сигналов в неканонических сигнальных путях, регулируемых семейством белков Wnt:

G (G protein) — член семейства белков G (остальные обозначения — в тексте)
(Veeman M. T. [et al.], 2003)

фибриллах, а также образование кластеров интегринов и связанных с ними белков для формирования фокальных клеточных контактов. Dsh через его домен DEP вызывает активацию каскада JNK в сигнальном пути планарной клеточной полярности.

Белки Wnt подразделяются на два класса — *канонические* и *неканонические*. Канонические Wnt (Wnt1, Wnt3a, Wnt8) контролируют сигнальный путь Wnt/β-катенин, который в постэмбриональном периоде участвует в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза, что опосредуется путем взаимодействия β-катенина с транскрипционными факторами семейства LEF/TCF. Генами-мишенями этого пути являются c-MYC, c-JUN, циклин D1, которые инициируют вход клетки в клеточный цикл и репликацию ДНК. У эмбрионов *Xenopus*, сверхэкспрессия Wnt5a или Wnt11 может активировать зависящие от кальция ферменты: *протеинкиназу C* (Pkc) и *кальмодулин киназу IIa* (CamkIIa), которые в свою очередь активируют транскрипционный фактор Nf-at. Dsh, лишенный домена DIX и еще активный в передаче сигналов Pkc, теряет активность в передаче сигналов Wnt/β-катенин. Некоторые белки Wnt могут проявлять свойства канонических и неканонических молекул в зависимости от типа клеток хозяина и рецепторных молекул Frizzled (Fz), с которыми они взаимодействуют. На сегодня у человека охарактеризовано 10 различных белков семейства Frizzled.

Процессинг белков семейства Wnt

Белки семейства Wnt включают большое число консервативных цистеиновых остатков и характеризуются плохой растворимостью, несмотря на наличие в N-конце сигнального пептида. Плохая растворимость белков Wnt связана с жировой модификацией молекулы — пальмителированием цистеиновых остатков, которое поддерживает их функциональную активность (рис. 8.4).



Рис. 8.4. Процессинг и секрета белков семейства Wnt (Clevers H., 2006)

Фермент, ответственный за пальмителирование Wnt в эндоплазматическом ретикулуме у мух *Drosophila*, называется Porcupine, а у червей — mom-1. Секрета Wnt во внеклеточное пространство зависит от гена, который у мух *Drosophila* называется Wntless/evenness interrupted (WLS/EVI). Ген WLS/EVI консервативен и клонирован у червей (MOM-3) и человека (hWLS). Продукт гена WLS/EVI обнаруживается постоянно в аппарате Гольджи, где он колокализуется и физически взаимодействует с Wnt (см. рис. 8.4). Считается, что Wnt действует как морфоген, а его активность зависит от градиента концентрации, хотя пока не ясно, каким образом формируется протяженный градиент Wnt.

8.2. Роль сигналов Wnt/ β -катенин в регуляции функций стволовых клеток

Рецепторы и внеклеточные антагонисты Wnt

Белки Wnt инициируют передача сигналов путем связывания с трансмембранными рецепторами Fz и родственными рецепторам белками (Lgr), которые включают один трансмембранный домен и по химической природе являются

липопротеинами низкой плотности. Fz проходят через плазматическую мембрану 7 раз и имеют N-концевой внеклеточный домен, содержащий много цистеиновых остатков (см. цв. вклейку, рис. 8.5). Wnt могут связывать различные рецепторы Fz, и наоборот, Fz могут связывать различные Wnt. Lgr служат в качестве корецепторов Fz. На сегодняшний день хорошо изучены два таких корецептора — Lgr5/6, которые могут опосредовать передачу сигналов Wnt и стабилизировать β -катенин независимо от белков Fz. Однако, существуют и другие белки, родственные Lgr, которые могут взаимодействовать прямо с Fz и ингибировать передачу сигналов Wnt. Передача сигналов Wnt, активирующих тот или иной сигнальный путь, зависит от комбинации Wnt/Fz.

Передача сигналов Wnt регулируется специфическими внеклеточными антагонистами, которые делятся на два класса:

- 1) молекулы, предотвращающие взаимодействие между лигандом и рецептором;
 - 2) молекулы, отменяющие взаимодействие между рецептором и корецептором.
- Члены первого класса включают три различных семейства:

- 1) секретируемые белки, родственные молекулам Fz (sFrp);
- 2) факторы, ингибирующие Wnt (Wif-1);
- 3) белки Cerberus (Cer), которые относятся к семейству полипептидов Dan, специфических ингибиторов факторов Wnt (см. рис. 7.11).

Молекулы второго класса включают семейство белков Dickkopf (Dkk), которые связывают Lgr5/6. Белки Dkk прикрепляются к клеточной мембране через их собственные рецепторы семейства Kremen (Krm) (см. цв. вклейку, рис. 8.5).

В нормальных условиях существует равновесие между различными регуляторными молекулами сигнального пути Wnt. Нарушение этого равновесия при различных заболеваниях представляет единственно возможный природный эксперимент, который может пролить свет на регуляторную машину Wnt. Например, ингибция гена WIF-1 вследствие метилирования его промотора и потеря экспрессии белков sFrp найдены при различных типах злокачественных заболеваний.

Передача сигналов через канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин

Центральную роль в каноническом сигнальном пути Wnt играет белок β -катенин, который в отсутствие связывания Wnt инактивируется специальным деструктивным комплексом (см. цв. вклейку, рис. 8.6). Роль адаптора, взаимодействующего с отдельными белками деструктивного комплекса и соединяющего их в одну функциональную структуру, играет опухолевый супрессор — аксин. В отсутствие связывания Wnt в рецепторный комплекс, киназы Ck1 α и Gsk3 β последовательно фосфорилируют β -катенин по нескольким высококонсервативным остаткам Ser/Thr в его N-концевом домене. Сначала Ck1 α фосфорилирует β -катенин в сайте Ser45, а затем Gsk3 β — в сайтах Ser33, Ser37, и Thr41, что формирует в β -катенине сигнал для убиквитинации (см. цв. вклейку, рис. 8.6). Фосфорилированный β -катенин распознается убиквитиновой лигазой β -Tcrp, убиквитинируется, и разрушается в протеасомах. Киназы Ck1 α и Gsk3 β играют двойственную роль в передаче сигналов Wnt, являясь агонистами на уровне активации рецепторного комплекса, и антагонистами в процессе деструкции β -катенина (см. цв. вклейку, рис. 8.6; рис. 8.7).

Хотя установлено, что мутации гена APC сопряжены с раком кишечника, а его продукт назван опухолевым супрессором, роль белка Arc в комплексе, инактивирующем β -катенин, не полностью изучена. Структура Arc включает

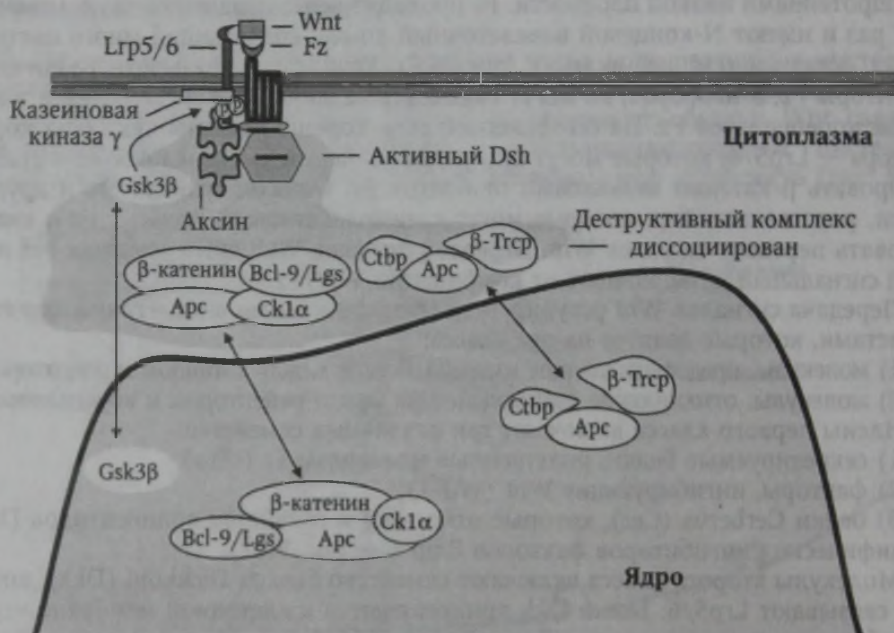


Рис. 8.7. Связывание белков Wnt с клеточной мембраной сопровождается накоплением β -катенина в цитоплазме и транслокацией в ядро (Logan C. Y., Nusse R., 2004)

несколько (15–20) аминокислотных повторов, опосредующих его взаимодействие с β -катенином. Между этими повторами расположены три мотива связывания аксина. Повышение уровня аксина в опухолевых клетках с дефицитом Арс восстанавливает активность комплекса, разрушающего β -катенин, при условии, что клетка нуждается в Арс только в случае нехватки аксина. Возможно, специфическая роль Арс заключается в регуляции ядерно-цитоплазматического переноса β -катенина и включения его в деструктивный комплекс. В аксине и Арс содержатся сигнальные последовательности для ядерного импорта и экспорта. Вероятно, эти белки совершают челночные перемещения из ядра в цитоплазму в составе одного и того же комплекса, который может включать β -катенин и адапторный белок Bcl-9/Lgs. Регуляция активной роли Арс и аксина в формировании деструктивного комплекса достигается путем их фосфорилирования.

Белковая фосфатаза Prp2a входит в состав деструктивного комплекса и, возможно, регулирует активность β -катенина в качестве антагониста киназ, фосфорилирующих этот белок. Prp2a способна также физически связывать аксин и Арс и дефосфорилировать субстраты Gsk3 β в деструктивном комплексе, способствуя передаче сигналов Wnt (см. цв. вклейку, рис. 8.6).

В нестимулированных белками Wnt клетках, большая часть эндогенного β -катенина находится в межклеточных контактных соединениях, где он взаимодействует с E-кадхерином и β -катенином, опосредуя взаимодействие соседних клеток. Молекулярная популяция мембранного β -катенина, в противоположность белку, который играет центральную роль в передаче сигналов Wnt, очень стабильна.

Инициация передачи сигналов при связывании белков Wnt с рецепторным комплексом Lrp–Fz сопровождается активацией белка Dishevelled (Dsh)

(см. рис. 8.7). Внутриклеточный домен Fz содержит мотив KTxxxW, который рекрутирует к мембране Dsh после связывания Wnt с рецепторным комплексом. Кореептор Lrp5/6 взаимодействует с белком аксин (axin) через мотив, включающий пять фосфорилированных повторов PPP(S/T)P в цитоплазматическом домене Lrp5/6. Wnt вызывает фосфорилирование в цитоплазматическом домене Lrp5/6, регулируя связывание им аксина. Киназа Gsk3 β фосфорилирует мотив PPP(S/T)P, тогда как казеиновая киназа 1 γ (Ck1 γ) фосфорилирует множественные сайты, расположенные рядом с мотивом PPP(S/T)P. Ck1 γ прикрепляется к цитоплазматической стороне мембраны благодаря пальмитилированию ее С-концевого фрагмента. Обе киназы — Gsk3 β и Ck1 γ , необходимы для активации сигнального пути Wnt/ β -катенин, хотя пока не ясно, какая из них опосредует сигналы Wnt, направленные на фосфорилирование Lrp5/6. Будучи связанными с мембранными рецепторами Fz/Lrp5/6, белки Dsh и аксин передают сигналы Wnt нижележащим мишеням, что может быть опосредовано гетеродимеризацией при взаимодействии их доменов DIX (Dsh-axin) (см. цв. вклейку, рис. 8.6).

При формировании рецепторного комплекса Wnt–Fz–Lrp5/6 активность деструктивного комплекса снижается. В результате нефосфорилированный β -катенин накапливается в цитоплазме, транслоцируется в ядро, где он связывает транскрипционные факторы семейства LEF/TCF (лимфоидный инхансерный фактор/Т-клеточный фактор) (рис. 8.8). Рентгеноструктурный анализ белков, входящих в состав деструктивного комплекса, показал, что центральная область β -катенина состоит из 12 повторов, называемых armadillo, и в комплексе с транскрипционным фактором Lef/Tcf принимает форму суперспирали с основной бороздкой, тянущейся вдоль оси молекулы β -катенина. Арс, белок межклеточных контактов Е-кадхерин, аксин и транскрипционные факторы семейства

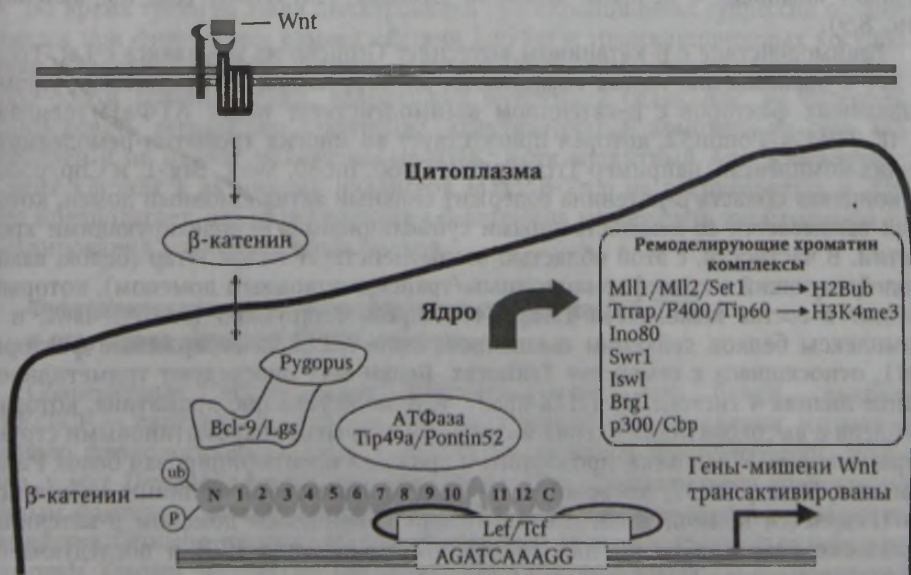


Рис. 8.8. Активный β -катенин образует комплексы с белками семейства LEF/TCF (Willert K., Jones K. A., 2006)

Lef/Tcf связывают центральную часть основной бороздки β -катенина во взаимноисключающей манере. Вероятно, основная функция Арс при формировании комплекса β -катенина с Lef/Tcf заключается в удалении фосфорилированного β -катенина из активированного комплекса.

Механизмы транскрипционной активации и супрессии сигналами Wnt/ β -катенин

В ответ на образование рецепторных комплексов Wnt—Fz—Lrp5/6, β -катенин транслоцируется в ядро. В случае активации транскрипции, β -катенин функционирует как скелетный белок, объединяющий в один функциональный комплекс белки Lef/Tcf, комплексы, ремоделирующие хроматин, белки Bcl-9/Lgs и Pygopus, необходимые для ядерной локализации β -катенина. Bcl-9/Lgs является адапторным белком, связывающим Pygopus с N-концом β -катенина, способствуя формированию комплекса, важного для сохранения β -катенина в ядре (см. рис. 8.8).

У позвоночных продуцируются 4 белка семейства LEF/TCF, которые связывают специфический сайт ДНК с последовательностью AGATCAAAGG в необычной манере: взаимодействие происходит в мелкой бороздке спирали ДНК, вызывая ее изгиб на 90°. Репортерные векторы для экспериментальной оценки активности сигнального пути Wnt, такие как pTOPflash, содержат в минимальном промотере от 3 до 10 сайтов связывания Lef/Tcf. Активность белков Lef/Tcf может регулироваться их фосфорилированием киназой Nlk/Nemo, родственной киназам MAPK, что снижает их аффинитет к ДНК и тормозит транскрипционную регуляцию генов-мишеней Wnt. В отсутствие сигналов Wnt белки семейства LEF/TCF действуют как транскрипционные ингибиторы, формируя репрессорный комплекс с белками семейств Groucho/TLE-HDAC (см. цв. вклейку, рис. 8.9).

Взаимодействие с β -катенином вытесняет Groucho из комплекса с Lef/Tcf и ведет к образованию новых комплексов, активирующих транскрипцию. Кроме названных факторов с β -катенином взаимодействует также АТФаза/геликаза ДНК Tip49a/Pontin52, которая присутствует во многих хроматин-ремоделирующих комплексах, например Ttgr/p400/Tip60, Ino80, Swr1, Brg-1, и Cbp/p300. С-концевая область β -катенина содержит сильный активационный домен, который связывается со множественными субъединицами, ремоделирующими хроматин. В частности, с этой областью взаимодействует белок Ttgr (белок, взаимодействующий с трансформационным/транскрипционным доменом), который входит в состав комплексов Ttgr/p400/Tip60, Ttgr/Gcn5 (SAGA), Isw1, и в комплексы белков лейкемии смешанного типа MLL1/2, содержащие факторы Set1, относящиеся к семейству Trithorax. Белки Set1 опосредуют триметилирование лизина 4 гистона H3 (H3K4me3), т. е. модификацию хроматина, которая найдена в высокоактивных генах и связана с открытыми хроматиновыми структурами *in vivo*. У человека, дрозофилы и дрожжей идентифицирован белок Paf1bromin/Hyrax/Cdc37, который в качестве обязательной единицы комплекса Paf1 является прямой мишенью активации С-концевым доменом β -катенина. Комплекс Paf1 необходим для убиквитинации гистона H2B и последующего триметилирования H3K4 (см. рис. 8.8).

Белки Lef/Tcf конститутивно связывают инхансеры Wnt, тогда как связывание с ДНК коактиваторных и корепрессорных белков изменяется циклически в

течение активной транскрипции. Циклирование корегуляторных комплексов также наблюдается в других быстроиндуцированных генах, например в генах, регулируемых ядерными рецепторами семейства NF κ B. Циклирование компонентов транскрипционных комплексов на инхансерах Wnt, вероятно, регулируется путем их посттрансляционной модификации, например убиквитинации в ходе транскрипции. Этот периодический цикл позволяет активным генам быстро отменять репрессивное состояние, чтобы быть готовым к новым циклам передачи сигналов.

Схематично циклирование коактиваторных и корепрессорных комплексов на инхансерах Wnt можно разделить на 3 этапа (см. цв. вклейку, рис. 8.9).

На первом этапе β -катенин связывает коактиваторные комплексы типа Pygopus с комплексами, ремоделирующими хроматин, что приводит к активации транскрипции.

На втором этапе происходит дислокация β -катенина с инхансеров Wnt и замена его на Арс, который приобретает более высокий аффинитет к Lef/Tcf, чем β -катенин. Повышение аффинитета Арс и уменьшение аффинитета β -катенина к Lef/Tcf происходит, вероятно, путем их фосфорилирования киназой Ck1 α . Арс транспортирует в ядро не только β -катенин, но и белки β -Tcrp и Ctbp (С-концевой связывающий белок), которые играют важную роль в супрессии транскрипции, хотя и не показывают стабильной связи с инхансерами Wnt. Убиквитинирующая лигаза β -Tcrp способна вызывать деградацию связанного с инхансерами β -катенина, что способствует освобождению Lef/Tcf, который приобретает возможность связывать Арс. Известным корепрессором Wnt является Ctbp, который опосредует модификацию хроматина путем взаимодействия с белками семейства Polycomb (PcG), а также с супрессорными факторами Groucho/Tle1, которые физически связываются с транскрипционными факторами Lef/Tcf.

Во время третьего этапа циклирования транскрипционная супрессия осуществляется при физическом взаимодействии Lef/Tcf и транскрипционных косупрессоров Groucho/Tle1-Hdac. В клетках линии HT29—CRC, происходящих от большого раком прямой кишки, содержащих мутантный белок Арс, не способный опосредовать деградацию β -катенина, коактиваторный комплекс на гене MYC стабилен и не меняет положения на ДНК. Хотя мутантный Арс рекрутируется в этих клетках к активному инхансеру MYC, β -Tcrp не рекрутируется к ДНК. Это предполагает, что убиквитинация β -катенина может быть необходимой для циклирования коактиваторных белков.

Функциональная активность факторов семейства LEF/TCF в отсутствие сигналов Wnt/ β -катенин

Современные исследования свидетельствуют, что белки семейства LEF/TCF — партнеры β -катенина по транскрипционной регуляции, играют активную физиологическую роль в отсутствие сигналов Wnt/ β -катенин. Например, у мух *Drosophila* взаимодействие белка dTcf, гомологичного транскрипционным факторам млекопитающих Lef/Tcf, с транскрипционными репрессорами семейства Groucho противодействует сигналам Wnt. Аналогично у эмбрионов лягушки *Xenopus* экспрессия репрессоров семейства Groucho/TLE препятствует активации генов-мишеней β -катенина, необходимой для формирования оси тела.

В клетках млекопитающих белок Lef1 вместе с транскрипционными репрессорами физически связан с инхансерной областью на промоторе гена MYC, что поддерживает структуру хроматина в неактивном состоянии. Активированный β -катенин смещает репрессорный комплекс с промотора гена MYC и кооперирует с Lef1 в активации транскрипции. Отсутствие Tcf3 у эмбрионов мышей приводит к возникновению врожденных дефектов в периоде гастрюляции, которые напоминают таковые в случае гиперактивации сигналов Wnt. У плодов и новорожденных мышей белок Tcf3 экспрессируется в стволовых клетках эпидермиса, расположенных в луковиче волосяного фолликула, в отсутствие сигналов Wnt/ β -катенин (см. цв. вклейку, рис. 10.2). Tcf3 поддерживает в неактивном состоянии терминальные линейные дифференцировочные программы, активация которых необходима для образования трех различных линий дифференцированных клеток: межфолликулярного эпидермиса, сальной железы и волосяного мешочка.

При стимулированной экспрессии в клетках эпидермиса трансгенных мышей фактора Tcf3, они начинают продуцировать, подобно стволовым клеткам в луковиче волосяного фолликула нормальных плодов и новорожденных мышей, повышенный уровень белков, маркирующих стволовые клетки: интегрин $\alpha 6$, CD34 и цитокератин 14 (K14), т. е. приобретают фенотип $\alpha 6^{\text{high}}$ CD34+K14+ (рис. 8.10).

Направленная экспрессия Tcf3 в эпидермисе трансгенных мышей тормозит дифференцировку тканеспецифических стволовых клеток во всех трех направлениях. В основе молекулярных механизмов такой ингибиции лежит строгая супрессия транскрипционных факторов, активирующих дифференцировку ство-

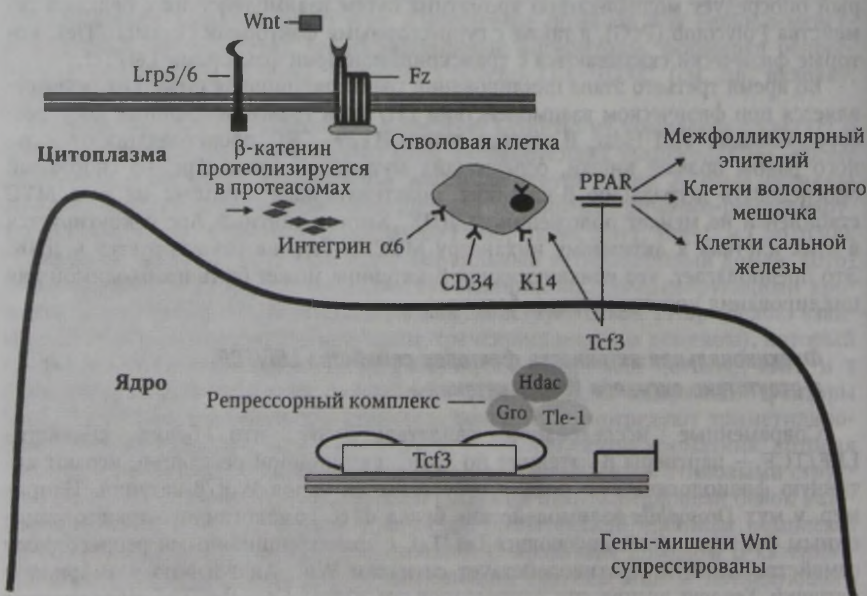


Рис. 8.10. В отсутствие сигналов Wnt/ β -катенин белок Tcf3 ингибирует дифференцировку стволовых клеток волосяных фолликулов (Nguyen H. [et al.], 2006)

ловых клеток луковицы, в частности факторов семейства PPAR (Pparg, δ , α — peroxisome proliferator-activated receptors).

В промотере каждого гена PPAR обнаружены сайты связывания белков Lef/Tcf. Экспрессия Tcf3 транскрипционно супрессирует некоторые гены клеточного цикла (циклин D2) и белки сигнального пути Wnt (аксин2, Dkk1). При анализе структуры кожи у трансгенных мышей с повышенной экспрессией Tcf3 отмечается отсутствие цитокератинов 1 и 10 в шиповатом слое, снижение продукции белков лорикрина и инволюкрина в поверхностных слоях эпидермиса. В сальной железе снижается количество клеток, содержащих жировые включения, волосяные мешочки подвергаются дегенерации, и в них не экспрессируются линейные специфические маркеры, например маркеры внутреннего корневого слоя и волосяного ствола, выявляемые специфическими антителами. В условиях нарушения многолинейной дифференцировки, стволовые клетки луковицы экспрессируют маркер стволовых клеток Sox9.

Эти результаты предполагают, что усиленная экспрессия Tcf3 в дифференцированных эпидермальных клетках в постнатальном развитии сопровождается появлением у них фенотипа, напоминающего фенотип стволовых клеток, что происходит при репрограммировании эпидермальных клеток в клетки, подобные стволовым. Вероятно, в нормальных условиях Tcf3 играет активную функциональную роль в поддержании недифференцированного фенотипа стволовых клеток эпидермиса.

Мишени Wnt

Общепринятая точка зрения приравнивает функцию сигнального пути Wnt/ β -катенин к активации самоподдержания клеток-предшественников. Действительно, сигналы Wnt/ β -катенин поддерживают стволовые свойства в СК различных тканей (рис. 8.11). В ЭСК сверхэкспрессия Wnt1, стабилизированного β -катенина или отсутствие Арс ведет к ингибции нейральной дифференцировки и к активации нижележащих мишеней Wnt, включая циклины и с-Мус. Обработка ЭСК синтетическим фармакологическим ингибитором киназы Gsk3 β активирует канонический сигнальный путь Wnt и поддерживает стволовые свойства ЭСК.

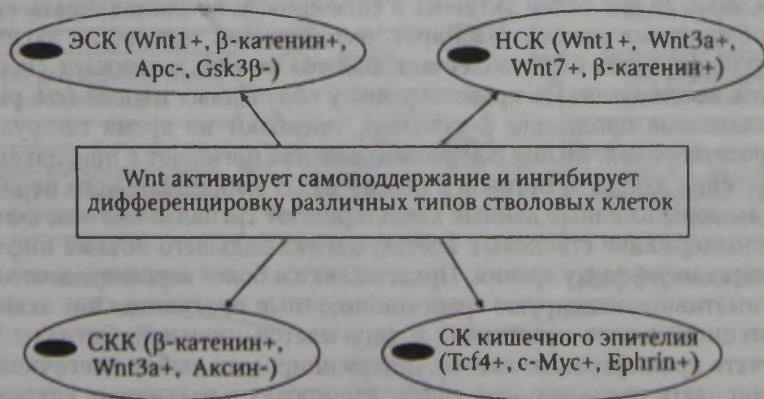


Рис. 8.11. Стволовые клетки различных типов являются мишенями сигнального пути Wnt/ β -катенин (Kleber M., Sommer L., 2004)

Мутации APC, которые связаны с повышенным риском заболевания раком, увеличивают внутриклеточный уровень β -катенина, препятствуют дифференцировке ЭСК во все три зародышевые линии. Сигнальный путь Wnt необходим для самоподдержания кишечных эпителиальных СК. У мышей, лишенных продукции белка Tcf4, отсутствуют пролиферирующие клетки в кишечных криптах. Вероятно, существует несколько нижележащих сигнальных путей, которые опосредуют влияние сигналов Wnt, регулирующих самоподдержание эпителиальных СК в кишечнике. Два таких сигнальных пути включают семейство адгезионных молекул ephrin, которые контролируют миграцию клеток из крипт, и с-Мус, который способствует пролиферации эпителия кишечника. Те же самые молекулы активируются при раке прямой кишки.

Мутации, которые активируют сигнальный путь Wnt, вызывают гиперпролиферацию клеток-предшественников в криптах. Это способствует образованию доброкачественных полипов. Доминантно-негативная форма Tcf4 способствует в опытах *in vitro* остановке клеточного цикла и экспрессии маркеров кишечной эпителиальной дифференцировки в клетках, происходящих от пациентов с раком прямой кишки. Молекулы рецепторов EphB2 и EphB3 экспрессируются в ответ на сигналы Wnt в клетках крипт, тогда как лиганды ephrinB1 экспрессируются в клетках ворсин.

Мутации генов EPHB2 и EPHB3 нарушают правильное расположение клеток вдоль оси ворсина/крипта. Это свидетельствует о том, что рецепторы и лиганды данного семейства контролируют установление границы между отделами пролиферирующих и дифференцирующихся клеток в тонком кишечнике (см. рис. 8.11).

Самоподдержание СКК также облегчается путем передачи сигналов Wnt. Сверхэкспрессия β -катенина в долгосрочной культуре клеток костного мозга мышей увеличивает число СКК, по крайней мере, в 100 раз при определении их способности восстанавливать кроветворную систему облученных мышей. Очищенный белок Wnt3a способствует самоподдержанию и ингибирует дифференцировку СКК в культуре. При культивировании в среде, обогащенной белком Wnt3a, пролиферативная активность кроветворных клеток, приобретающих фенотип Thy1^{low}Sca1+c-Kit+, в 6 раз превышает таковую в исходных клетках. В присутствии Wnt3a клетки менее активны в экспрессии дифференцировочных маркеров, но в 25 раз более активны в способности восстанавливать кроветворение у облученных мышей. Наоборот, эктопическая экспрессия актина ингибирует пролиферацию СКК, облегчает апоптоз *in vitro* и снижает способность этих клеток восстанавливать кроветворение у облученных мышей (см. рис. 8.11). Мыши, лишенные продукции β -катенина, погибают во время гастрюляции до начала кроветворения. Мыши с дефицитом Wnt3a погибают с признаками тяжелого нарушения закладки органов в стадии E12.5 эмбрионального периода.

Хотя вышеизложенные данные характеризуют сигналы Wnt как активирующие самоподдержание стволовых клеток, оценка большего объема информации поддерживает иную точку зрения. Представляется более вероятным, что сигналы Wnt ультимативно активируют транскрипционные программы вне зависимости от их функционального назначения и типа клеток-мишеней. Сигналы Wnt могут облегчать пролиферацию клеток, детерминировать выбор клеточной судьбы или активировать терминальную дифференцировку в различных клетках.

В некоторых случаях сигналы Wnt активируют такие альтернативные события, как пролиферация и терминальная дифференцировка в различных клеточ-

ных линиях одних и тех же тканей, например в волосяных фолликулах и кишечных криптах. Хотя в качестве примеров мишеней Wnt обычно называются гены циклина D1 и MYC, количество генов-мишеней Wnt, содержащих сайты связывания транскрипционных факторов Lef/Tcf, очень велико и постоянно обновляется на специальном сайте <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>. Конечный эффект действия сигналов Wnt/ β -катенин зависит в большей степени от спецификации клетки, чем от природы сигнала.

8.3. Сигналы Wnt/ β -катенин регулируют выбор клеточной судьбы в стволовых клетках

Wnt облегчает дифференцировку НСК в неокортексе в ущерб их размножению (рис. 8.12). При повреждении мышц Wnt облегчает миогенную спецификацию и регенерацию мышц, тогда как стволовые клетки волосяных фолликулов, не экспрессирующие β -катенин, не способны дифференцироваться в фолликулярные кератиноциты и вместо этого принимают эпидермальную судьбу. Нейрональные стволовые клетки гребешка, образующие большинство структур периферической нервной системы, показывают различное направление дифференцировки в зависимости от исходного уровня β -катенина. В случае отсутствия β -катенина из таких клеток *in vivo* не возникают сенсорные ганглии и меланоциты. В культуре *in vitro* НСК гребешка в отсутствие β -катенина не способны приобретать сенсорную нейрональную судьбу.

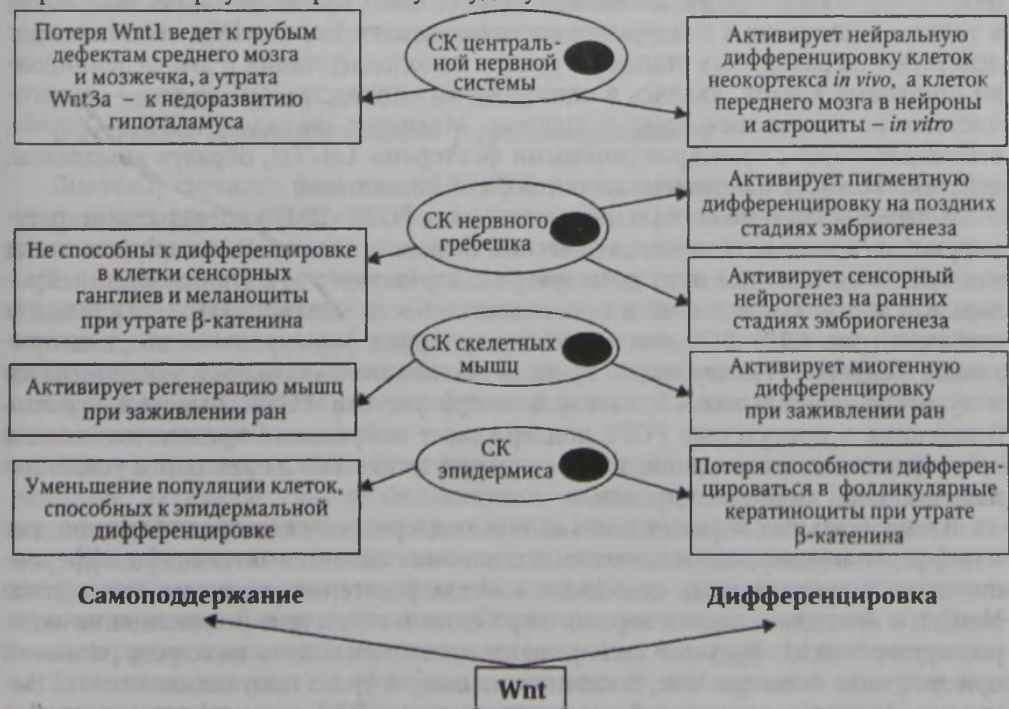


Рис. 8.12. Сигнальный путь Wnt/ β -катенин регулирует выбор клеточной судьбы в стволовых клетках (Kleber M., Sommer L., 2004)

Конечный результат действия Wnt определяется внутриклеточными различиями клеток-мишеней

Каким образом белки канонического сигнального пути Wnt могут выполнять разнообразные функции в СК? Тот факт, что СК различных тканей по-разному воспринимают один и тот же сигнал Wnt, очевидно, отражает активацию различных генетических программ в ответ на один и тот же сигнал. Тогда как гены циклина D1 и c-MYC являются прямыми мишенями сигналов пути LEF/TCF в ходе прогрессии клеточного цикла в различных клеточных типах, пронеуральные гены (нейрогенины) являются мишенями сигналов LEF/TCF в ходе нейрогенеза. Активация специфических групп генов-мишеней Wnt, вероятно, опосредуется специфическими факторами данного клеточного типа, приходу которых во многих случаях только предстоит распознать.

Изменения внутренних свойств СК могут также возникать в процессе их развития. Например, такие различия позволяют сигналам Wnt облегчать сенсорный нейрогенез в нейральных клетках гребешка в раннем эмбриональном периоде, тогда как на поздних стадиях они вызывают дифференцировку этих клеток в меланоциты (см. рис. 8.12).

Модуляция сигнального пути Wnt внеклеточным окружением

Белки сигнального пути Wnt взаимодействуют с передатчиками других сигнальных путей вне и внутри клетки, в результате чего образуется конечный сигнал, определяющий физиологический эффект таких взаимодействий. Например, в тонком кишечнике и эпидермисе сигнальные пути Notch и Wnt тесно взаимодействуют на различных этапах регуляции самоподдержания и дифференцировки стволовых клеток, являясь в одних случаях агонистами, в других — антагонистами по отношению один к другому. Медиатор сигналов TGF β — Smad4, взаимодействует с транскрипционными факторами Lef/Tcf, образуя комплексы, действие которых направлено на специфические мишени.

В нервной системе сигнальные пути Wnt и TGF β (BMP) кооперативно регулируют экспрессию тканеспецифических белков в заднем Telencephalon, тогда как эти же сигнальные пути действуют антагонистически в становлении нейрональной и глиальной линий в противоположность меланоцитам в нейральном гребешке (рис. 8.13). FGF вместе с Wnt регулируют формирование поздних признаков заднего Telencephalon. Уровень активного β -катенина увеличивается в культуре нейральных СК ганглиев в присутствии FGF2. Высокий уровень β -катенина в присутствии FGF2 поддерживает нейральные предшественники в пролиферативном состоянии, тогда как в отсутствие FGF2 приводит к усилению нейрональной дифференцировки.

В кортикальных нервных клетках Wnt поддерживает как пролиферацию, так и дифференцировку, однако, итогом его влияния является активация дифференцировки. В кроветворных стволовых клетках β -катенин усиливает экспрессию Notch1, а стволовые клетки нервного гребешка в отсутствие β -катенина не экспрессируют Notch1. Будущие эксперименты позволят понять механизм различий при действии сигналов Wnt/ β -катенин на одну и ту же популяцию клеток. Например факторы, противодействующие влиянию Wnt в индукции сенсорного нейрогенеза, эффективны только во время миграции стволовых клеток из дорсальной нервной трубки. Это позволяет понять, почему не вся популяция ство-



Рис. 8.13. Модуляция эффектов Wnt/ β -катенин внеклеточными факторами (Kleber M., Sommer L., 2004)

ловых клеток, на которую действует Wnt, принимает сенсорную судьбу. Вероятно, Wnt не связывается с регуляторными элементами в некоторых НСК из-за их модификации другими регуляторными молекулами.

Роль сигналов Wnt/ β -катенин в тканях с активным самоподдержанием у зрелых организмов

Значение сигналов β -катенин/LEF/TCF в специализации и поддержании эпителиальных стволовых клеток было установлено в опытах с инактивирующими и активирующими мутациями соответствующих генов. У мышей с дефицитом Lef1 не развиваются волосяные фолликулы, молочная железа и зубы. При дефиците Tcf4 кишечный эпителий у мышей заполнен в криптах дифференцированными клетками в ущерб делящимся клеткам-предшественникам. Инактивация β -катенина также сопровождается потерей морфогенеза фолликулов кожи у новорожденных мышей с утратой функций фолликулярных ниш стволовых клеток в постнатальной жизни.

Эпителий тонкого кишечника наряду с клетками крови представляет собой наиболее активную самообновляющуюся систему у взрослых позвоночных, в которой эпителиальные клетки полностью сменяются за 2–5 дней. Интенсивная пролиферация в криптах тонкого кишечника компенсируется активным апоптозом на верхушке ворсин. Пролiferация клеток-предшественников в криптах кишечника поддерживается активным состоянием сигналов Wnt/ β -катенин и прекращается у новорожденных мышей в случае утраты продукции белка Tcf4, тогда как отдел дифференцированных клеток ворсин в этих условиях не изменяется (см. рис. 10.6).

Сверхэкспрессия ингибитора сигнального пути Wnt/ β -катенин белка Dkk1 сопровождается потерей пролиферации клеток в криптах кишечника, утратой

морфогенеза волосяных фолликулов и терминальных концевых почек молочной железы. И наоборот, трансгенная экспрессия агониста сигналов Wnt — белка R-spondin1 сопровождается активной пролиферацией клеток кишечных крипт. Белки сигнального пути Wnt участвуют не только в усилении пролиферации клеток-предшественников крипт, но и в активации дифференцировки клеток Paneth.

Эпидермальные стволовые клетки, постоянно находящиеся в области луковицы волосяного фолликула, способны дифференцироваться в зрелые клетки волосяного мешочка, сальной железы и межфолликулярного эпидермиса. Для формирования волоса такие стволовые клетки мигрируют из луковицы по внешнему корневому листку вниз, в область зародышевого матрикса, где происходит формирование временно амплифицирующихся клеток, которые затем подвергаются дифференцировке в клетки волоса (см. цв. вклейку, рис. 10.2).

Стабилизация уровня β -катенина или Lef1/Tcf стимулирует покоящиеся стволовые клетки луковицы волосяного фолликула к пролиферации и активирует регенерацию волосяных фолликулов. Изучение транскрипционного профиля генов СК, активирующихся при стабилизации уровня β -катенина, показало, что при этом происходит избирательная активация дифференцировочных генов, например повышение экспрессии генов волосяных кератинов. Многие гены кератинов содержат сайты связывания Tcf в своих промоторах, показывая, что сигналы β -катенина и Lef1 контролируют не только пролиферацию стволовых клеток, но и терминальную дифференцировку клеток волосяного мешочка.

Стволовые клетки луковицы волосяных фолликулов в условиях дефицита сигналов Wnt входят в длительную фазу покоя, тогда как у трансгенных мышей с экспрессией недеградируемой формы β -катенина отмечается усиление образования новых волосяных фолликулов и увеличение их количества на единицу поверхности кожи (см. цв. вклейку, рис. 10.2). Как в коже, так и в молочной железе при активации сигнального пути Wnt/ β -катенин отмечается преждевременный вход в регенеративную фазу образования функциональных единиц этих тканей, соответственно волосяных фолликулов и терминальных концевых почек. Недавние исследования показали, что некоторые факторы Tcf могут быть функционально активны в условиях низкого уровня или даже полного отсутствия β -катенина. Например, Tcf3 экспрессируется в стволовых клетках фолликулов у зрелых животных во всех стадиях цикла волосяного фолликула. В условиях постнатальной экспрессии Tcf3 дифференцировка всех трех линий клеток эпидермиса (жировой железы, волосяного фолликула и межфолликулярной ткани) репрессируется, предполагая, что экспрессия Tcf3 необходима для поддержания стволовых клеток кожи в недифференцированном состоянии (см. рис. 8.10). Повышение и стабилизация уровня β -катенина в клетках кожи сопровождается отменой репрессии, вызванной Tcf3, и способствует дифференцировке стволовых клеток.

В культуре *in vitro* белки Wnt поддерживают пролиферацию и ингибируют дифференцировку СКК у мыши и человека (см. рис. 8.11). Активация самоподдержания СКК усиливает их способность восстанавливать кроветворение у летально облученных животных. Транскрипционные факторы Tcf1 и Lef1 вовлечены в детерминацию дифференцировки Т-лимфоцитов, а мыши, у которых отсутствует продукция этих факторов, показывают недостаток образования Т-клеток предшественников в тимусе.

Формирование кости у зрелых животных зависит от активности остеобластов и остеокластов, способствующих, соответственно, формированию и разрушению костной ткани. Сигнальный путь Wnt/ β -катенин является позитивным регулятором активности остеобластов. У людей с природной активирующей мутацией гена LRP5, продукт которого формирует вместе с белками Frizzled функциональный рецепторный комплекс для лигандов Wnt, также как и у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный ген LRP5, отмечается увеличение числа остеобластов и повышение плотности кости. Наоборот, у мышей, не экспрессирующих белок Lrp5, отмечается нарушение пролиферации и дифференцировки остеобластов и уменьшение массы костей.

Активация сигнального пути Wnt может вызывать злокачественные заболевания кишечника, легких, кожи, крови и нервной системы

В нормальных условиях транскрипционные факторы семейства LEF/TCF могут оказывать функционально значимую супрессию, контролируя состояние покоя в стволовых клетках. Увеличение уровня β -катенина отменяет супрессию и приводит к активной пролиферации стволовых клеток. Нарушения сигнального пути Wnt являются характерной чертой многих злокачественных заболеваний у человека и наблюдаются при карциноме прямой кишки, легких, кожи, молочной железы и меланоме (рис. 8.14).

Сверхэкспрессия Wnt-2, Dsh2, 3, β -катенина, мутации генов APC или аксина ведут к возникновению рака различных локализаций. Например, белок Dsh3 сверхэкспрессирован у 75 % больных немелкоклеточным раком легких

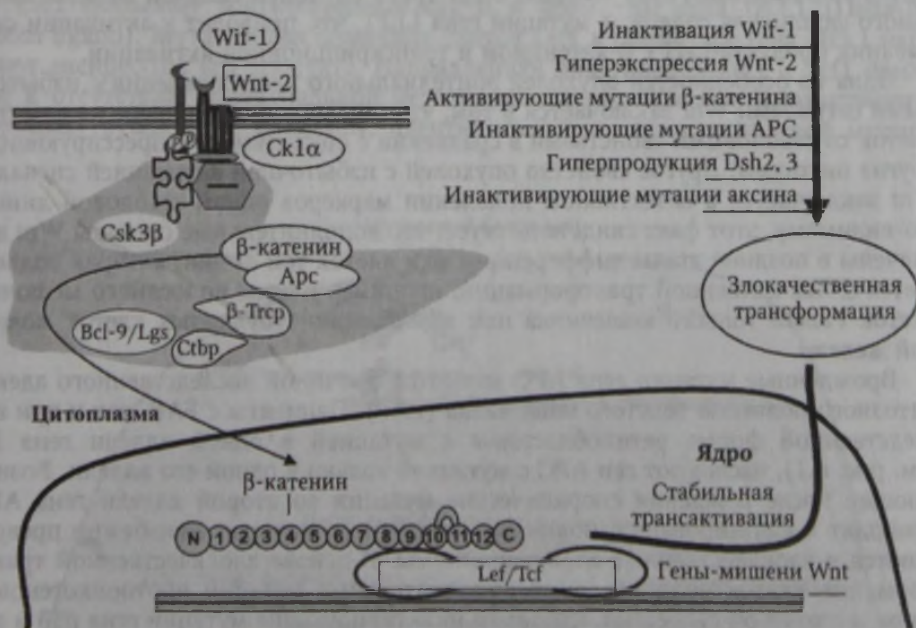


Рис. 8.14. Схема нарушений сигнального пути Wnt/ β -катенин, сопровождающихся возникновением опухолевого роста (Mazieres J. [et al.], 2005)

(NSCLC). При трансфекции миРНК, специфически снижающей уровень Dsh1–3, в эпителиальные клетки линии H1703, обладающие опосредованной β -катенином Tcf-зависимой активностью, в них происходит снижение экспрессии Dsh и β -катенина, снижение зависимой от сигналов LEF/TCF транскрипционной активности и ингибция клеточной пролиферации. В другом случае, когда причиной возникновения NSCLC является сверхэкспрессия Wnt-2, моноклональные антитела, полученные против Wnt-2, вызывают апоптоз раковых клеток, снижение уровня цитозольного β -катенина и транскрипционной активности, зависимой от Tcf. Обработка NSCLC линии A549 специфической миРНК против Wnt-2 вызывает понижение уровня цитозольного β -катенина и апоптоз.

Подавляющее количество аденом и карцином прямой кишки содержат спорадические или наследственные делеции в опухолевом супрессоре APC или онкогенные стабилизирующие мутации в β -катенине, что сопровождается постоянной индукцией c-MYC и других генов-мишеней Wnt. Наиболее часто онкогенные мутации APC включают утрату C-концевой части белка, в которой находится сайт связывания актина и сигнал ядерного экспорта. Такие мутации лишают APC способности удерживать β -катенин в деструктивном комплексе и сопровождаются потерей его свойства супрессировать опухолевый рост.

В нормальных условиях APC способен секвестрировать избыток β -катенина в ядре, предотвращая его связывание с факторами Lef/Tcf и ингибируя транскрипционную активность генов-мишеней. Стабилизирующие мутации β -катенина возникают при потере его N-концевого домена, содержащего сайты фосфорилирования Ser/Thr. Стабилизация β -катенина может быть причиной пилломатриком — опухолей, возникающих из клеток волосяного мешочка, а также аденокарцином молочной железы. Одна треть опухолей сальной железы волосяного фолликула содержит мутации гена LEF1, что приводит к активации связывания продукта Lef1 с β -катенином и транскрипционной активации.

Одна из особенностей опухолей эпителиального происхождения с избыточными сигналами Wnt заключается в том, что они содержат большое количество клеток со стволовыми свойствами в сравнении с опухолями, экспрессирующими другие онкогены. Другое свойство опухолей с избыточной активацией сигналов Wnt заключается в селективном появлении маркеров одной стволовой линии. По-видимому, этот факт свидетельствует, что дополнительные сигналы Wnt вовлечены в поздние этапы дифференцировки клеток той линии, которая подвергается злокачественной трансформации, например клеток волосяного мешочка, клеток Paneth тонкого кишечника или альвеолярно-тубулярных клеток молочной железы.

Врожденные мутации гена APC являются причиной наследственного аденоматозного полипоза толстого кишечника (FAP). Пациенты с FAP, как и при наследственной форме ретинобластомы с мутацией в одной аллели гена RB (см. рис. 6.1), наследуют ген APC с мутацией только в одной его аллели. Возникающие после рождения спорадические мутации во второй аллели гена APC приводят к формированию полипов в кишечнике, которые неизбежно превращаются в злокачественные аденокарциномы. В основе злокачественной трансформации клеток полипов лежат дополнительные мутации протоонкогенов и генов опухолевой супрессии, например инактивирующие мутации гена p53 и активирующие мутации гена K-RAS. Существует несколько экспериментальных моделей FAP, например модель множественной кишечной неоплазии у мышей со стоп-кодоном в гене APC (APC^{min}). В отличие от пациентов с FAP, у мышей

с APC^{min} полипы формируются в тонком кишечнике. На другой модели с тканеспецифической инактивацией APC у взрослых мышей ворсины тонкого кишечника в течение нескольких дней полностью заселяются активно делящимися клетками.

Примеры взаимодействия белков сигнального пути Wnt/ β -катенин с эффекторными молекулами других сигнальных путей

Каноническая активность сигнального пути Wnt может быть изменена на нескольких разных стадиях передачи сигналов молекулами других сигнальных путей, включая Notch, HOX, TGF β , FGF, и Shh. Более того, вследствие двойственной функции β -катенина в передаче сигналов Wnt и межклеточных взаимодействиях, зависящих от кадхеринов, активация сигнального пути Wnt/ β -катенин может прямо влиять на клеточную адгезию. Межклеточные взаимодействия могут изменяться при увеличении уровня клеточных адгезионных молекул, вызванном сигналами Wnt, что может, в свою очередь, негативно регулировать канонический сигнальный путь Wnt. Интересно, что экспериментальное удаление β -катенина не нарушает кроветворение и лимфопоэз при условии, что популяция молекул β -катенина может восполняться за счет родственных ему молекул. Направленная мутация LEF1, которая отменяет его функцию и повреждает активность коэкспрессирующихся факторов Tcf, влияет на закладку сомитов и экспрессию компонентов сигнального пути Notch (сомиты представляют собой блоки мезодермальных клеток, которые образуются из несегментированной параксиальной мезодермы в хвостовой части эмбриона) (рис. 8.15).

Lef1 связывает множественные сайты в промоторе гена DLL1 (Delta-like Notch ligand). Мутации связывающих сайтов Lef1 в промоторе гена DLL1 нарушают экспрессию его продукта. Направленная инактивация Lef1 и Tcf1 приводит к отсутствию параксиальной мезодермы и к образованию множественных нервных трубок, т. е. фенотипу, идентичному таковому при нулевой мутации

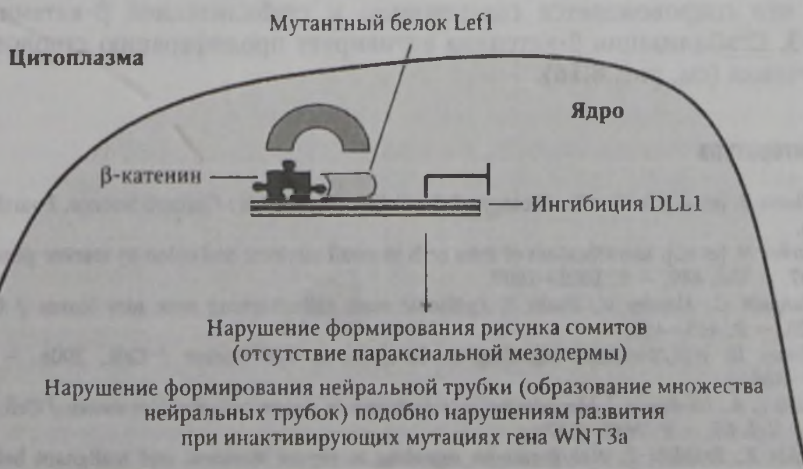


Рис. 8.15. Мутации сайта связывания Lef1 в промоторе гена DLL1 ведут к нарушениям эмбрионального развития, схожим с нарушениями при мутациях WNT3a (Galceran J. [et al.], 2004)

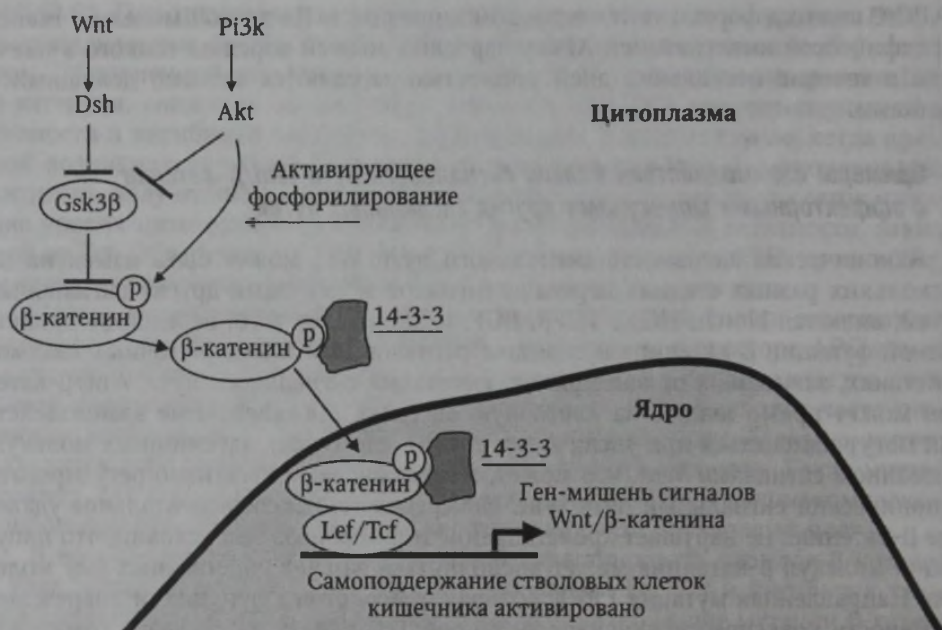


Рис. 8.16. Белок 14-3-3 стабилизирует β -катенин, фосфорилированный киназой Akt (Tian Q. [et al.], 2004)

WNT3a. Мутации гена LEF1 также сопровождаются нарушением взаимодействия между его продуктом и медиатором сигнального пути TGF β — белком Smad4.

Изоформа белка 14-3-3 усиливает транскрипцию, зависимую от β -катенина, путем поддержания высокого уровня β -катенина в цитоплазме (рис. 8.16). Белок 14-3-3 облегчает активацию β -катенина киназой Akt и колокализуется с активной киназой Akt в СК кишечника. По-видимому, Akt фосфорилирует β -катенин, что сопровождается связыванием и стабилизацией β -катенина белком 14-3-3. Стабилизация β -катенина активирует пролиферацию стволовых клеток кишечника (см. рис. 8.16).

Литература

- Alberts B. [et al.]. *Molecular Biology of the Cell*. — New York : Garland Science, Fourth Ed., 2004. — 1463 p.
- Barker N. [et al.]. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5* / *Nature*, 2007. — Vol. 449. — P. 1003–1007.
- Blanpain C., Horsley V., Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves / *Cell*, 2007. — Vol. 128. — P. 445–458.
- Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease / *Cell*, 2006. — Vol. 127. — P. 469–480.
- Davis L. A., Nieten N. I. Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch / *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008. — Vol. 65. — P. 2658–2674.
- Fodde R., Brabletz T. Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2007. — Vol. 19. — P. 50–158.
- Galceran J. [et al.]. LEF1-mediated regulation of Delta-like1 links Wnt and Notch signaling in somitogenesis / *Genes Dev.*, 2004. — Vol. 18. — P. 2718–2723.

- Huelsken J., Behrens J. The Wnt signalling pathway / *J. Cell. Sci.*, 2002. — Vol. 115. — P. 3977–3978.
- Kawano Y., Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway / *JCS*, 2003. — Vol. 116. — P. 2627–2634.
- Kleber M., Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2004. — Vol. 16. — P. 681–687.
- Logan C. Y., Nusse R. The Wnt signaling in development and disease / *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2004. — Vol. 20. — P. 781–810.
- Mazieres J. [et al.]. Wnt signaling in lung cancer / *Cancer. Lett.*, 2005. — Vol. 222. — P. 1–10.
- Nelson W. J., Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways / *Science*, 2004. — Vol. 303. — P. 1483–1487.
- Nguyen H., Rendl M., Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin / *Cell.*, 2006. — Vol. 127. — P. 171–183.
- Reya T., Clevers H. Wnt signaling in stem cells and cancer / *Nature*, 2005. — Vol. 434. — P. 843–850.
- Sierra J. [et al.]. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes / *Genes Dev.*, 2006. — Vol. 20. — P. 586–600.
- Tian Q. [et al.]. Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation / *Akt. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004. — Vol. 101. — P. 15370–15375.
- Tolwinski N. S., Wieshaus E. Rethinking Rethinking WNT signaling / *Trends Genet.*, 2004. — Vol. 20. — P. 177–181.
- Uematsu K. [et al.]. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression / *Oncogene*, 2003. — Vol. 22. — P. 7218–7221.
- Veeman M. T. [et al.]. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling / *Dev. Cell.*, 2003. — P. 5367–377.
- Wharton K. A. Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction / *Dev. Biol.*, 2003. — Vol. 253. — P. 1–17.
- Willert K., Jones K. A. Wnt signaling: is the party in the nucleus? / *Genes Dev.*, 2006. — Vol. 20. — P. 1394–1404.

ГЛАВА 9 || МОЛЕКУЛЯРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, НИШИ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК

9.1. Роль сигнальных путей Jak-STAT, МАРК и PI3K в регуляции самоподдержания и дифференцировки ЭСК

Сигнальный путь Jak-STAT в регуляции самоподдержания ЭСК

В 1981 г. были опубликованы результаты опытов, которые свидетельствовали, что клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты мыши могут расти неопределенно долго вне организма на так называемых питающих (фидерных) клетках. Поскольку клетки ВКМ в культуре *in vitro* сохраняли свои основные свойства (плюрипотентность и иммортальность), в последующем их стали называть *эмбриональными стволовыми клетками* (ЭСК). Если при культивировании такие клетки переносили с фидерного слоя на чашки с желатиной, они начинали дифференцироваться. Эти результаты дали возможность предположить, что клетки фидерного слоя выделяют в культуральную среду фактор, необходимый для самоподдержания мышиных ЭСК. Такие наблюдения были расширены в опытах, в которых удалось успешно поддерживать рост недифференцированных мышиных ЭСК без фидерных клеток в среде, кондиционированной клетками крыс линии Buffalo (среда Баффало). Из среды Баффало был выделен растворимый белок с молекулярной массой 20–35 кДа, способный поддерживать рост ЭСК при их культивировании *in vitro*. Биохимическая характеристика этого белка позволила идентифицировать его как ингибирующий лейкемию фактор (Lif), член семейства цитокинов IL-6. Lif взаимодействует с гетеромерным рецепторным комплексом, состоящим из рецептора Lif (Rlif) и gp130 (см. цв. вклейку, рис. 9.1).

При связывании лиганда этот рецепторный комплекс активирует тирозиновые киназы семейства Jak (Janus associated tyrosine kinases), которые фосфорилируют взаимодействующие с ними цитоплазматические участки рецепторного димера. Фосфорилированные остатки тирозинов рецепторного комплекса служат сайтами связывания белков семейства STAT (signal transducers and activators transcription), которое опосредовано доменами SH2 (Src homology region 2) молекул Stat. Киназы семейства STAT являются ключевыми субстратами киназ Jak. Связывание молекул Stat3 с рецепторным комплексом Rlif/gp130 сопровождается фосфорилированием молекул Stat по тирозиновым остаткам и одновременно способствует их освобождению из рецепторного комплекса. Затем фосфорилированные молекулы Stat3 димеризуются, благодаря взаимодействиям между доменом SH2 одной молекулы Stat3 и фосфотирозином другой молекулы димера. Образование димеров Stat3 инициирует их транслокацию в ядро и связывание со специфическими сайтами в промоторах генов-мишеней, активация которых необходима для самоподдержания ЭСК. Экспрессия мутантных молекул Stat3 или ингибиторов белков Stat3 в ЭСК активирует их дифференцировку.

Опыты с химерными молекулами Stat3, содержащими сайт связывания эстрадиола, которые вводились в ЭСК и активировались добавлением в культуральную среду эстрадиола, показали, что активация Stat3 не только необходима, но может быть и достаточной для ингибиции дифференцировки ЭСК. Активация этих химерных молекул усиливает самоподдержание ЭСК *in vitro* без фидерного слоя. Lif необходим для самоподдержания ЭСК, но он проявляет активность только в присутствии фетальной бычьей сыворотки, что указывает на необходимость другого фактора фетальной сыворотки, опосредующего действие Lif, для самоподдержания ЭСК. Такой фактор был идентифицирован недавно как член семейства TGF β — белок Wnt, который вызывает экспрессию транскрипционного фактора Id, ингибирующего нейральную дифференцировку путем функциональной инактивации нейрогенных тканеспецифических факторов семейства bHLH.

Сигнальный путь MAPK препятствует самоподдержанию ЭСК и активирует их дифференцировку

Связывание Lif с рецепторным комплексом Rlif/gp130 активирует не только сигнальный путь Jak-STAT, но и сигнальный путь MAPK (mitogen activated protein kinase), в котором роль эффекторной киназы выполняет Erk. Сигнальный путь MAPK облегчает дифференцировку ЭСК. Известны две киназы Erk с молекулярной массой 42 кДа (p42) и 44 кДа (p44), которые регулируют много различных клеточных ответов в соматических клетках и играют документированную роль в пролиферации и дифференцировке ЭСК. В самой простой форме сигнальный путь MAPK вовлекается в регуляцию функций ЭСК благодаря рекрутированию к цитозольной части рецепторного комплекса Rlif/gp130 адапторной молекулы Grb2 и фактору обмена гуаниновых нуклеотидов Sos, которые способствуют образованию рецепторного комплекса Rlif/gp130—Grb2—Sos (рис. 9.2).

Расположение Sos на мембране облегчает активацию белка Ras. Фосфорилирование рецепторных тирозиновых киназ и последующая активация белка Ras широко используется клеткой для передачи сигналов ростовых факторов, обладающих митогенной активностью. Например, при связывании рецепторных тирозиновых киназ с митогенными ростовыми факторами, Ras может активироваться для передачи сигналов с поверхностной мембраны к внутриклеточной сигнальной машине с помощью адапторного белка Grb2 и фактора обмена гуаниновых нуклеотидов Sos.

Фосфорилирование тирозинов и активация Ras являются кратковременными событиями. Для последующего функционального ответа, например активации пролиферации или дифференцировки клеток, Ras конвертирует свою активность в фосфорилирование серин/треониновых киназ. Состояние активации этих киназ является более продолжительным и передается в ядро. Например, Ras активирует киназу Erk, которая у млекопитающих является эффекторной киназой сигнального пути MAPK и активируется путем фосфорилирования тирозинового и треонинового мотивов, разделенных между собой одним аминокислотным остатком (см. рис. 7.7). Фосфорилирование Erk осуществляется киназой Mek, которая, в свою очередь, фосфорилируется киназой Raf. Активированная Erk фосфорилирует цитоплазматические мишени и транслоцируется в ядро, что позволяет ей модулировать активность транскрипционных регуляторов, таких как Elk, Ets, c-Myc и фактор сывороточного ответа (Srf). В течение

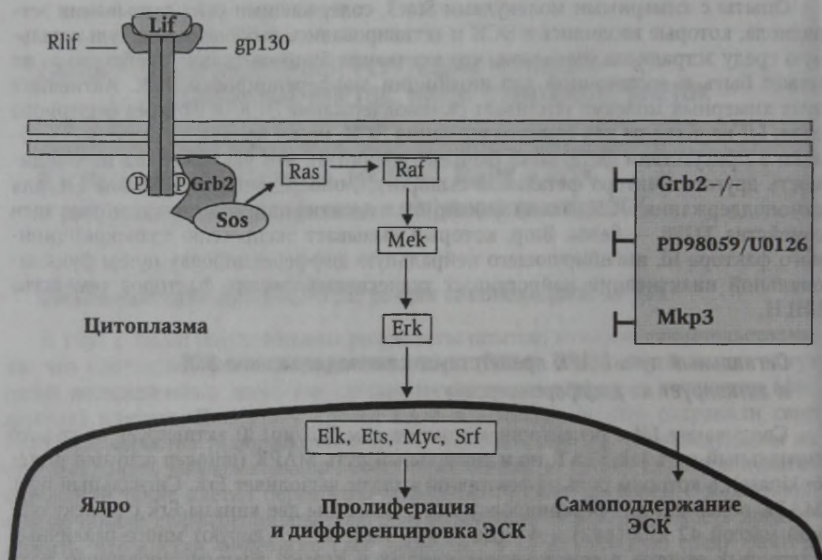


Рис. 9.2. Сигнальный путь MAPK/ERK облегчает дифференцировку ЭСК (Burdon T. [et al.], 2002)

нескольких минут Erk вызывает активацию генов немедленного ответа клетки, включая с-MYC. В зависимости от идентичности лиганда активность MAPK киназы может продолжаться от нескольких минут до нескольких часов. Инактивация киназы Erk осуществляется специфической фосфатазой.

Рекрутирование комплекса Grb2–Sos к рецептору Rlif/gp130 может быть непрямым (рис. 9.3). В этом случае ключевым посредником в рекрутировании является белковая тирозиновая фосфатаза Shp2. При фосфорилировании Shp2 в ее структуре образуется сайт связывания адапторного белка Grb2. Shp2 также взаимодействует с другим белком — Gab1 (Grb2-associated binder protein). В свою очередь, белок Gab1 рекрутирует липидную киназу Pi3k и, связывая образующийся фосфолипидный продукт через его N-концевой «гомологичный плекстрину» домен (PH), стабилизирует положение комплекса Shp2–Gab1–Grb2 на мембране и усиливает взаимодействие с Ras. Удаление сайта связывания Shp2 в химерном рецепторе gp130 нарушает его взаимодействие с Ras, но усиливает самоподдержание ЭСК. Специфическое ослабление сигналов Erk фармакологическим ингибированием активности Mek или усиленной экспрессией фосфатазы, ингибирующей Erk, также облегчает самоподдержание ЭСК, но тормозит их дифференцировку. Свидетельством того, что активация Erk имеет положительное влияние на дифференцировку и антагонистично самоподдержанию ЭСК, является нарушение дифференцировки ЭСК в случае генетической инактивации Grb2 или Shp2. Обратное введение в ЭСК с фенотипом Grb2-/- химерной молекулы Grb2/Sos или активированной формы Ras восстанавливает дифференцировку ЭСК.

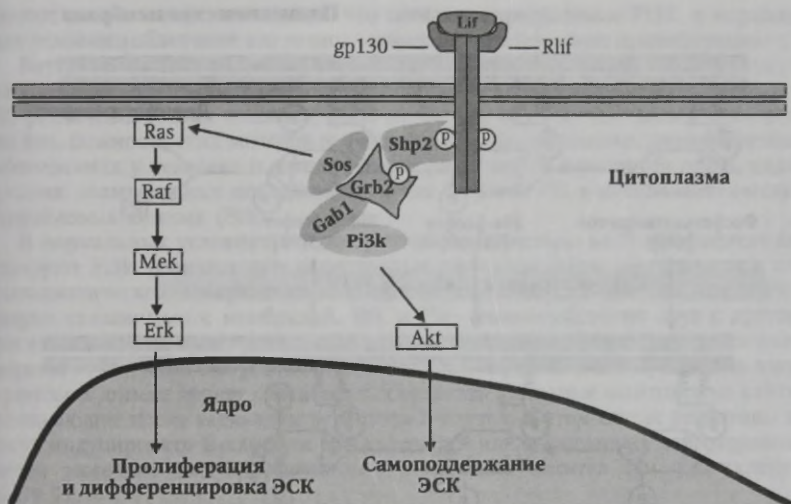


Рис. 9.3. Непрямой путь активации сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK в эмбриональных стволовых клетках (Burdon T. [et al.], 2002).

Сигнальный путь PI3K и его роль в регуляции функций ЭСК

Сигнальный путь, опосредованный киназой PI3k, передает сигналы, которые регулируют рост, выживание и деление клетки. В отличие от большинства киназ, PI3k фосфорилирует не белки, а инозитольные фосфолипиды. PI3k действует внутри клетки, передавая сигналы, которые воспринимаются многими типами клеточных рецепторов, например тирозиновыми киназами. Субстраты PI3k — фосфатидилинозиты (PI) являются уникальными среди мембранных липидов, так как они могут подвергаться обратимому фосфорилированию по многим сайтам и образуют множество различных инозитольных фосфолипидов. В активном состоянии PI3k фосфорилирует инозитольные фосфолипиды в положении 3' инозитольного кольца и образует липиды, которые называются фосфатидилинозитдифосфат PI(3, 4)P2 и фосфатидилинозиттрифосфат PI(3, 4, 5)P3 (рис. 9.4). PI(3, 4)P2 и PI(3, 4, 5)P3 прикрепляются к цитозольной стороне плазматической мембраны и служат в качестве сайтов связывания для внутриклеточных регуляторных белков, способствуя образованию молекулярных комплексов (см. цв. вклейку, рис. 9.5).

Важно различать использование инозитольных фосфолипидов в сигнальном пути PI3K от их использования в других сигнальных путях. Например, фосфатидилинозитол 4, 5 дифосфат — PI(4, 5)P2, протеолизуется белковой липазой C-β (Plc-β) (при передаче сигналов рецепторов, связанных с белками G, или Plcγ (при передаче сигнала от рецепторных тирозиновых киназ), образуя растворимый инозитол 1, 4, 5 трифосфат (IP3) и связанный с мембраной диаглицерол. Функция IP3 заключается в освобождении ионов Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, тогда как диаглицерол активирует белковую киназу C (Pkc). Напротив, PI(3, 4)P2 и PI(3, 4, 5)P3 не протеолизуются Plc (см. цв. вклейку,

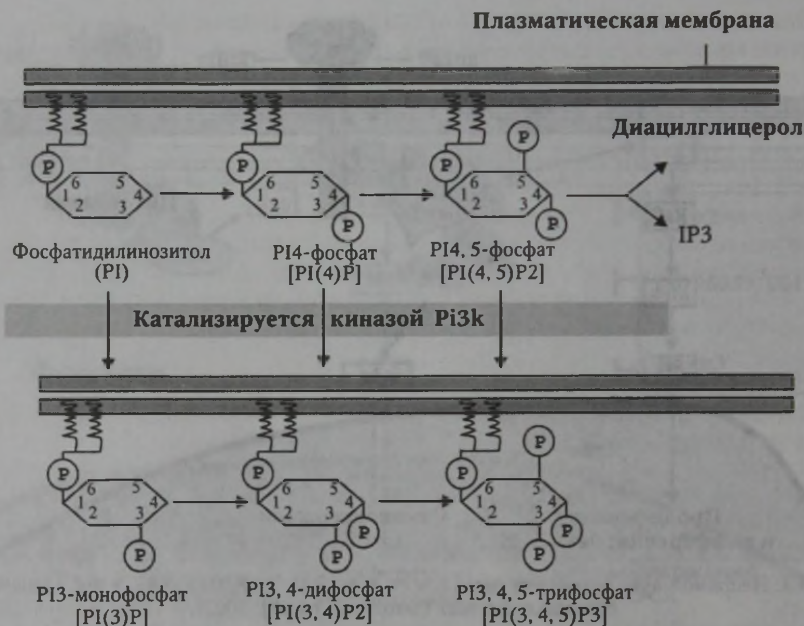


Рис. 9.4. Киназа Pi3k катализирует образование 3'-фосфоинозитов, служащих сайтами связывания молекул, содержащих плекстриновые домены (Alberts B. [et al.], 2004)

рис. 9.5). Эти продукты Pi3k остаются в плазматической мембране до дефосфорилирования специфической инозитолфосфолипидной фосфатазой Pten, которая удаляет фосфат из положения 3' инозитольного кольца (рис. 9.6).

Мутации, которые инактивируют Pten, пролонгируют сигналы Pi3k и облегчают развитие рака, найдены во многих опухолях человека. Такие мутации уд-

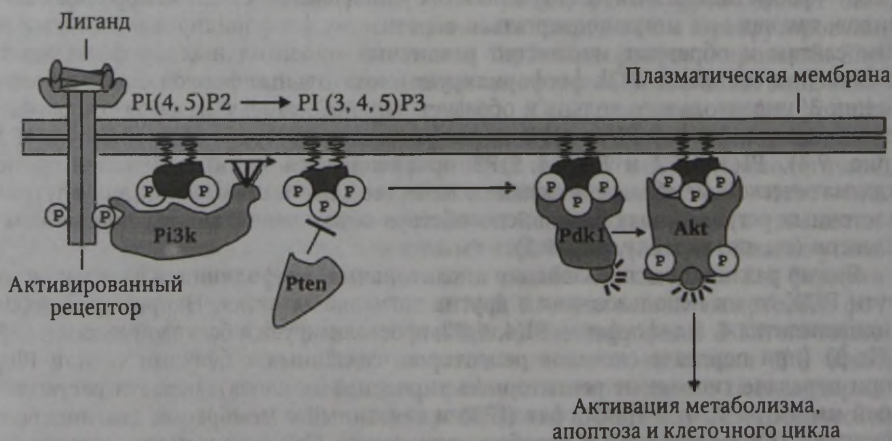


Рис. 9.6. Схема активации киназы Akt в сигнальном пути Pi3k, роль фосфатазы Pten (Downward J., 1998; Leivers S. L. [et al.], 1999)

линяют жизнь клеток, показывая, что сигналы, передаваемые PI3K, в нормальных условиях облегчают клеточное выживание и клеточную пролиферацию.

Внутриклеточные регуляторные белки связываются с PI(3, 4)P₂ и PI(3, 4, 5)P₃ через домен, гомологичный плекстрину (РН), который найден более чем в 200 различных белках человека, включая фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Sos. Важность этих доменов выявляется при некоторых иммунодефицитных заболеваниях у человека и мыши, характеризующихся мутациями генов, кодирующих полипептидные последовательности доменов РН в цитоплазматических тирозиновых киназах (Btk).

В нормальных условиях, когда антигенные рецепторы на В-лимфоцитах активируют PI3k, возникающие акцепторные липидные сайты рекрутируют к цитоплазматической поверхности плазматической мембраны как Btk, так и Plc γ . Будучи связанными с мембраной, Btk и Plc γ взаимодействуют друг с другом, при этом Btk фосфорилирует и активирует Plc γ , которая затем протеолитически разрезает PI(4, 5)P₂ с образованием IP₃ и диацилглицерола. Btk с мутацией в плекстриновом домене теряет способность связывать липидные акцепторные сайты, возникающие после активации рецептора В-клеток. В этом случае рецепторы не могут индуцировать В-клетку к пролиферации или выживанию, что сопровождается тяжелым иммунодефицитом в продукции антител (см. цв. вклейку, рис. 9.5).

Другими передатчиками сигналов PI3k являются фосфатидилинозит-зависимая киназа I (Pdk1) и протеинкиназа В (Pkb или Akt), содержащие домены РН. Координированная локализация этих киназ на внутренней стороне плазматической мембраны облегчает опосредованное Pdk1 фосфорилирование Akt (см. рис. 9.6). Фосфорилированная Akt модулирует активность ключевых регуляторов апоптоза, клеточного цикла и метаболизма в клетках различных типов, включая ЭСК (рис. 9.7).

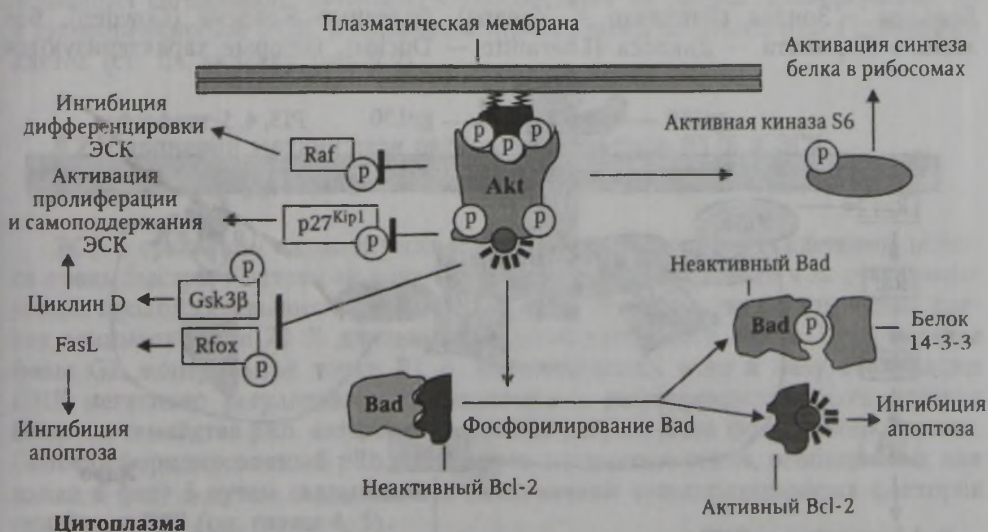


Рис. 9.7. Сигнальный путь PI3K активирует пролиферацию и самоподдержание ЭСК. FasL — лиганд белков Fas; Rfox — рецептор белков семейства FOX; остальные обозначения — в тексте (Downward J., 1998; Leever S. L. [et al.], 1999)

Сигнальный путь PI3K также связан с клеточной трансформацией. С помощью инактивации гена PTEN у мышей в эмбриональном периоде (эмбрионального нокаута) можно получить ЭСК, не экспрессирующие этот опухолевый супрессор. Такие ЭСК показывают усиленную жизнеспособность и увеличенную скорость пролиферации. Улучшение клеточного выживания модифицированных ЭСК коррелирует с увеличением количества PI(3, 4, 5)P₃, усиленным фосфорилированием Akt, и инактивацией проапоптозного белка Bad. Ускоренный переход через фазу G1 клеточного цикла в ЭСК, не экспрессирующих Pten, вероятно, является следствием увеличения скорости деградации ингибитора Cdk — p27^{Kip1}, который замедляет прогрессию клеточного цикла (см. рис. 9.7).

Отмечено, что ускорение клеточного деления более выражено в PTEN^{-/-} ЭСК, чем в фибробластах с тем же генотипом. Вероятно, сигналы, зависимые от Pi3k, могут иметь большее значение в регуляции клеточного цикла в ЭСК, чем в фибробластах. ЭСК также экспрессируют большое количество модифицированного белка Gab1, в котором отсутствует N-концевой плекстриновый домен, что может приводить к ослаблению связывания активированных рецепторов с каскадом Ras/Erk и опосредовать активацию самоподдержания ЭСК (рис. 9.8).

Фосфатаза Shp является изоформой Shp2-инозитол 5'-фосфатазы, не содержащей домена SH2. В нормальных условиях этот фермент удаляет 5'-фосфат из PIP3 и в некоторых типах клеток ингибирует передачу сигналов, опосредованных Akt. Присутствие в ЭСК новых изоформ нескольких различных регуляторных молекул показывает, что сигнальное окружение в ЭСК отличается от такового в клетках других типов.

Pten был идентифицирован как ген опухолевой супрессии, локализованный на хромосоме 10 в банде q22–24. Потеря гетерозиготности в этом локусе была найдена при нескольких спонтанных опухолях у человека, включая глиобластомы, опухоли эндометрия, молочной железы и простаты. Мутации PTEN в клетках зародышевых линий наблюдаются более чем у 80 % пациентов с болезнью Баньяна — Зонана (Bannayan — Zonana), болезнью Ковдена (Cowden), болезнью Лермитта — Даклоса (Lhermitte — Duclos), которые характеризуются

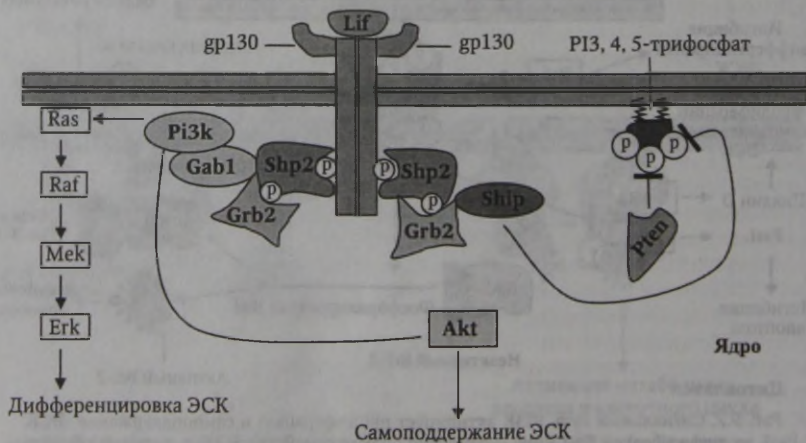


Рис. 9.8. Уникальные адапторные молекулы ЭСК (Burdon T. [et al.], 2002)

возникновением доброкачественных и злокачественных опухолей. Мыши, у которых PTEN инактивирован, погибают между 6,5 и 9,5 днями эмбрионального развития с признаками нарушения закладки мезодермального и эктодермального зародышевых слоев и избыточным разрастанием тканей головного мозга вследствие усиленной пролиферации нейроэпителия. Гетерозиготные мыши с различными мутациями гена PTEN жизнеспособны, но проявляют гиперпластические и диспластические нарушения в простате, коже, прямой кишке и высокую частоту возникновения спонтанных опухолей. Макроцефалия при мутациях PTEN является, по-видимому, результатом сочетанного увеличения числа и размера нейронов и уменьшения уровня их программированной смерти. Нейральные стволовые клетки мышей с отсутствием обоих аллелей гена PTEN показывают более выраженную способность к самоподдержанию, чем нормальные стволовые клетки. В таких клетках нарушается функция выбора судьбы.

Сопряжение самоподдержания и дифференцировки ЭСК путем согласованной регуляции передачи сигналов через сигнальные пути Jak/STAT, MAPK и PI3K

Регуляция самоподдержания стволовых клеток достигается путем сопряжения деления клетки с ее терминальными функциями, такими как клеточное старение, дифференцировка и апоптоз. Ингибция такого сопряжения сохраняет способность СК к самоподдержанию и, наоборот, активация сопряжения сопровождается утратой самоподдержания и выходом СК в популяцию временных клеток-предшественников, которые не обладают бессмертием и после нескольких делений индуцируются к терминальной дифференцировке, апоптозу или старению (см. рис. 1.1). Регуляция самоподдержания ЭСК осуществляется путем взаимодействия сигнальных путей Jak/STAT, MAPK и PI3K. Активация передачи сигналов через Jak/STAT и PI3K усиливает самоподдержание ЭСК, тогда как активация сигнального пути MAPK способствует не только пролиферации, но и дифференцировке ЭСК, в процессе которой клетки покидают отдел стволовых клеток (см. цв. вклейку, рис. 9.9).

9.2. Сравнение механизмов регуляции перехода G1/S в ЭСК и дифференцирующихся соматических клетках

ЭСК в сравнении с соматическими дифференцирующимися клетками делятся очень быстро. Клеточный цикл ЭСК составляет всего 11–16 ч за счет уменьшения продолжительности фазы G1, которая у большинства соматических клеток занимает более 70 % длительности всего клеточного цикла. Прохождение фазы G1, контрольной точки R1 и, соответственно, вход в фазу репликации ДНК негативно регулируется в соматических дифференцирующихся клетках белками семейства pRb, активность которых регулируется фосфорилированием. Гипофосфорилированный pRb ингибирует экспрессию генов, необходимых для входа в фазу S путем связывания и инактивации транскрипционных факторов семейства E2F (см. главы 4, 5).

В соматических дифференцирующихся клетках в ходе фазы G1 pRb последовательно фосфорилируется различными комплексами циклины—Cdk (рис. 9.10). Фосфорилирование pRb комплексами циклин D—Cdk4/6 вызывает частичное

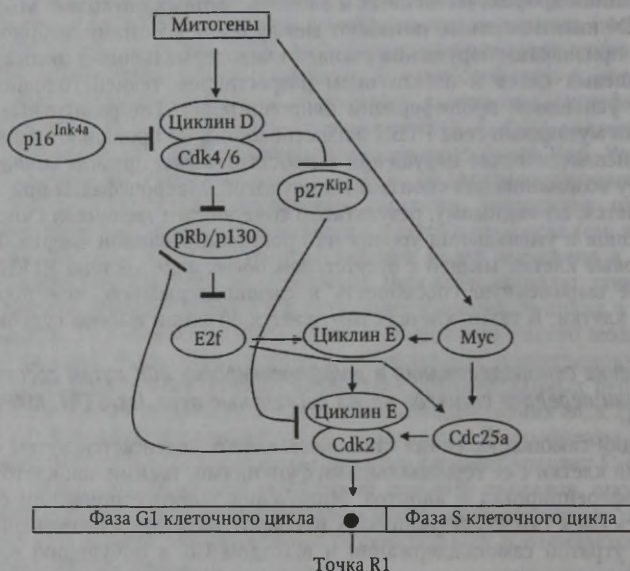


Рис. 9.10. Регуляция перехода G1/S в дифференцирующихся соматических клетках (Burdon T. [et al.], 2002)

освобождение E2f, достаточное для того, чтобы активировать транскрипцию генов циклина E и CDC25A. Фосфатаза Cdc25a удаляет ингибиторный фосфат в молекуле Cdk2, что приводит к активации комплекса циклин E–Cdk2, который фосфорилирует белки семейства pRb, способствует полному освобождению E2f и входу ЭСК в фазу S клеточного цикла (см. рис. 9.10).

Второй сигнальный путь, важный для активации перехода G1/S, включает протоонкоген c-MYC, который прямо стимулирует транскрипцию генов, кодирующих циклин E и Cdc25a. Последующая продукция циклина E и Cdc25a в соматических дифференцирующихся клетках ведет к формированию активного комплекса циклин E–Cdk2. Сигнальные пути Myc и pRb/E2F рассматриваются как два параллельных и взаимодействующих пути, контролирующих переход G1/S, которые сходятся на киназе циклин E–Cdk2. Активность этой киназы может служить критерием входа клетки в фазу S клеточного цикла.

Мутации в генах передаточных белков одного или обоих указанных сигнальных путей часто встречаются при опухолях, отражая фундаментальную роль c-Myc и pRb/E2F в контроле клеточного цикла. Опухолевые супрессоры p16^{Ink4a} и p27^{Kip1} являются ингибиторами циклина D–Cdk4/6 и циклина E–Cdk2 соответственно. Эти супрессоры активируются в ответ на различные сигналы, ингибирующие пролиферацию, включая клеточное старение, контактную ингибицию пролиферации и терминальную дифференцировку.

В противоположность соматическим дифференцирующимся клеткам, клеточный цикл ЭСК характеризуется короткой фазой G1, занимающей около 1,5 ч, тогда как 75 % времени клеточного цикла занимает фаза S. В целом

характерные особенности клеточного цикла ЭСК суммированы (Orford K. W., Scadden D. T., 2008):

- 1) очень короткая фаза G1 — 1,5 ч;
- 2) pRb гиперфосфорилирован;
- 3) p130 не экспрессируется;
- 4) киназная активность Cdk4 не определяется;
- 5) рефрактерность к ингибции деления при действии CdkI p16^{Ink4a};
- 6) ЭСК подобно клеткам с инактивацией всех членов семейства pRb (ТКО) не способны останавливать деление в фазе G1 в условиях насыщающей плотности роста;
- 7) ЭСК не проявляют репликативного старения;
- 8) ЭСК не останавливают прогрессию клеточного цикла в рестрикционной точке R1 после повреждения ДНК;
- 9) ЭСК конститутивно экспрессируют циклин D1, который может фосфорилировать pRb и секвестрировать CdkI p27^{Kip1}.

В ходе прогрессии клеточного цикла в ЭСК гипофосфорилированный pRb не определяется и рестрикционная точка R1 отсутствует. pRb рефосфорилируется в ЭСК немедленно после митоза в противоположность дифференцирующимся типам клеток. Поэтому существует важный вопрос: являются ли ЭСК мишенью регуляции pRb и других членов его семейства в фазе G1 клеточного цикла или pRb функционально инактивирован в этих клетках путем конститутивного гиперфосфорилирования?

ЭСК экспрессируют p107, но не p130, который регулирует выход клеток из фазы G1. Эти данные свидетельствуют о том, что семейство pRb не регулирует клеточный цикл в ЭСК. Такое предположение подтверждается следующими данными:

1) ЭСК рефрактерны к ингибирующему деление действию p16^{Ink4a}, активность которого в дифференцирующихся клетках опосредована pRb (см. рис. 9.10). Устойчивость к ингибции деления, опосредованной p16^{Ink4a}, является общей чертой опухолевых клеток, в которых инактивирован pRb. Удаление *Lif* и последующая дифференцировка ЭСК сопровождаются повышением чувствительности к ингибции пролиферации, опосредованной p16^{Ink4a}, что указывает на эффективность опосредованного pRb контроля фазы G1 при дифференцировке ЭСК;

2) инактивация всех трех генов семейства pRb (p107, p130, pRb) не компрометирует пролиферацию ЭСК, но нарушает дифференцировку клеток тератокарцином, происходящих из ЭСК. Это предполагает, что зависимость от pRb проявляют только те ЭСК, которые подвергаются дифференцировке;

3) в регуляции пролиферации ЭСК показывают подобие мышинным эмбриональным фибробластам (МЭФ), у которых инактивированы все три члена семейства продукта гена ретинобластомы (тройной нокаут, ТКО). Например, ЭСК, как и МЭФ с ТКО, не прекращают деление в условиях насыщающей плотности, т. е. показывают отсутствие феномена контактной ингибции пролиферации. В нормальных фибробластах этот феномен связан с увеличением количества CdkI p16^{Ink4a}, p27^{Kip1} и накоплением гипофосфорилированного pRb, что приводит к остановке деления клеток в фазе G1 клеточного цикла. ЭСК и МЭФ с ТКО избегают репликативного старения и демонстрируют иммортажность, в отличие от клеток дифференцирующихся типов, в которых репликативное старение и остановка деления в фазе G1 связаны с накоплением гипофосфорилированного pRb и ингибцией Cdk, опосредованной p16^{Ink4a} и p21^{Cip1}. Как ЭСК,

так и МЭФ с ТКО не останавливают деление в фазе G1 после повреждения ДНК, но сохраняют механизм остановки деления в контрольной точке G2/M, независимой от pRb. ЭСК, подобно МЭФ с ТКО, не подвержены контактной ингибции деления, но проявляют иммортальность и отсутствие контроля клеточного цикла в рестрикционной точке G1.

Приведенные данные показывают, что ЭСК не контролируются сигнальным путем семейства pRb в фазе G1.

Экспрессия и функции циклинов в фазе G1 в ЭСК

Какой механизм лежит в основе функциональной инактивации pRb в ЭСК? В определенных типах опухолевых клеток со структурно нормальным геном RB его продукт функционально инактивирован будучи гиперфосфорилированным вследствие конститутивной экспрессии циклина D, Cdk4/6, циклина E, циклина A или Cdk2. Циклины D1/D3 присутствуют в небольшом количестве в ЭСК, в то время как циклин D2 в них не экспрессируется (см. цв. вклейку, рис. 9.11). Связанная с Cdk4 киназная активность, по существу, не определяется, а небольшое количество циклинов D в ЭСК соответствует таковому в клетках внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты, которые не экспрессируют определяемое количество циклинов D, пока не наступает гастрюляция. Начало дифференцировки в клетках ВКМ ведет к увеличению экспрессии циклинов D и появлению связанной киназной активности, что означает вступление в силу регуляторного контроля фазы G1.

Регуляция фоновой экспрессии циклина D1 отличается в ЭСК по сравнению с соматическими клетками. Во-первых, передача сигналов через Ras/Erk, которая играет наиболее важную роль в транскрипционной активации экспрессии циклина D1, в соматических клетках стимулируется ростовыми факторами (см. рис. 9.10), которые не играют роли в регуляции экспрессии циклина D1 в ЭСК (см. цв. вклейку, рис. 9.11).

Во-вторых, уровень циклина D1 в ЭСК зависит от сигнального пути PI3K, активность которого не связана с митогенной стимуляцией.

Эти факты соответствуют данным, что ни активность Pi3k, ни экспрессия циклина D1 не снижаются в условиях сывороточного голодания ЭСК, когда уменьшается уровень митогенной активности. Взятые вместе, эти данные показывают, что в ЭСК базальная экспрессия циклина D1 не зависит от митогенных сигналов, передаваемых рецепторными тирозиновыми киназами. Хотя и незначительная, конститутивная экспрессия циклина D1 в ЭСК может вносить вклад в фосфорилирование pRb.

Комплексы циклин D—Cdk4 в ЭСК могут связывать CdkI p27^{Kip1} и предотвращать его ингибирующее влияние на киназный комплекс циклин E—Cdk2. Нечувствительность ЭСК к CdkI p16^{Ink4a} означает, что активность p16^{Ink4a} несущественна для пролиферации ЭСК. В коммитированных к дифференцировке клетках индуцированная экспрессия циклина E является достаточной для того, чтобы преодолеть остановку пролиферации, которая опосредована p16^{Ink4a} (см. рис. 9.10). Конститутивная активность циклина E—Cdk2 в фибробластах зависит от их прикрепления к пластику, что отличается от активности этой киназы в ЭСК. В дифференцирующихся клетках циклин E является мишенью для активной формы pRb, но в ЭСК сигнальный путь pRb не оперирует. Поэтому в ЭСК активная форма pRb не определяется, а активность циклина E—Cdk2 является конститутивной.

Передача сигналов *Lif*, их роль в контроле клеточного цикла в ЭСК

В ЭСК переход G1/S, по-видимому, контролируется только киназой циклин E—Cdk2. Пока не ясно, является ли конститутивная активность циклина E—Cdk2 внутренним свойством ЭСК или она зависит от передачи сигналов через рецептор Rlrf/gp130 и Stat3. Удаление из ростовой среды *Lif* вызывает активацию дифференцировки и потерю самоподдержания ЭСК, а не остановку их клеточного цикла. Возможно, Stat3 регулирует в ЭСК экспрессию ключевых регуляторов клеточного цикла и входа в фазу S, а отсутствие Stat3 вызывает замедление клеточного цикла и связанную с ним активацию дифференцировки. Stat3 может влиять на переход G1/S и в некоторых типах дифференцированных клеток. Например, в лимфоидных клетках линии BAF-03 Stat3 активирует экспрессию специфических регуляторов клеточного цикла, включая циклины D, CdkI p27^{Kip1}, с-Мус и Pim1. Pim1 является серин/треониновой киназой, которая фосфорилирует и активирует Cdc25a, таким образом усиливая накопление активной киназы циклин E—Cdk2.

Индукцированная экспрессия с-Мус и Pim1 является достаточной для преодоления остановки клеточного цикла, опосредованной удалением IL-6, свидетельствуя, что с-Мус и Pim1 относятся к важным мишеням Stat3. Этот сигнальный путь может вызывать фосфорилирование pRb и вход клеток в фазу S в присутствии минимальных количеств циклина D—Cdk4/6.

Возможно, что сигналы, опосредованные Rlrf/gp130, могут активировать переход G1/S путем рекрутирования Pi3k через фосфатазу Shp2 и адапторный белок Gab1. Этот путь был найден активным в клеточной линии T47D, полученной от больной раком молочной железы.

Используя клеточную линию T47D, было показано, что IL-6 контролирует клеточную миграцию путем активации сигналов MAPK и PI3K через сигнальный путь gp130/Shp2/Gab1. В ЭСК активация Pi3k, зависящая от *Lif*, вероятно, поддерживается циклином D1 при позитивной регуляции скорости его синтеза через киназу p70S6 и негативной регуляции деградации циклина D1 киназой Gsk3 β . Опыты на ЭСК, не экспрессирующих PTEN, показывают, что сигнальный путь PI3K может также облегчать деградацию ингибитора циклинзависимых киназ p27^{Kip1} (см. цв. вклейку, рис. 9.9). Такой эффект может вести к снижению количества p27^{Kip1} до уровня, при котором этот белок эффективно секвестрируется комплексом циклин D—Cdk4, таким образом создавая условия для конститутивной активации комплекса циклин E—Cdk2.

9.3. Понятие о нишах стволовых клеток.

Регуляция состояния покоя и активации СК в нише различными сигнальными путями

Различные факты позволяют предположить, что после формирования тканеспецифической популяции стволовых клеток в определенном участке ткани взрослого организма этот участок ткани надолго становится обиталищем СК, т. е. играет роль специфической ниши. В нише соматические и зародышевые СК находятся в состоянии покоя, т. е. в фазе G0/G1. Что удерживает СК в такой нише?

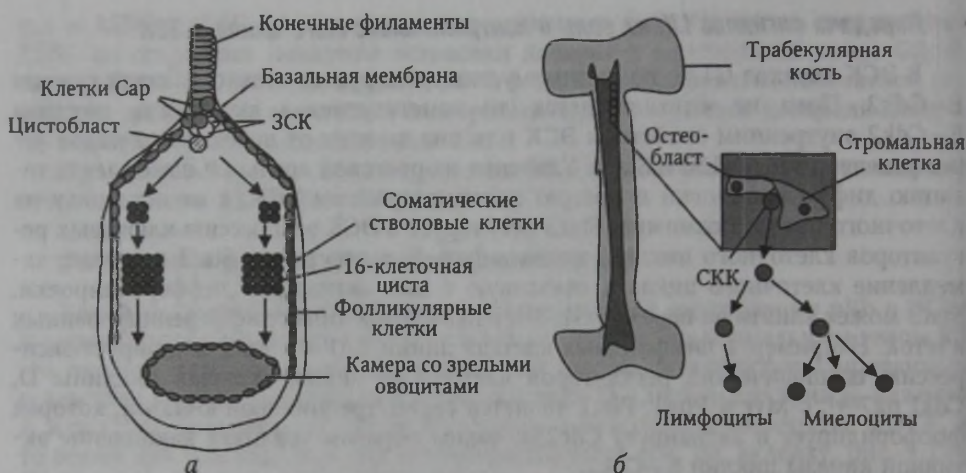


Рис. 9.12. Схема ниш стволовых клеток в германии яичника дрозофилы и костном мозге мыши:

а — сагиттальный разрез германия яичника дрозофилы;
б — продольный разрез трабекулярной кости мыши (Fuchs E. [et al.], 2004)

Многие факты, которые формируют наши сегодняшние знания о нишах СК, пришли из опытов по изучению ЗСК мухи *Drosophila*. Прямые физические контакты между СК и их «нестволовыми» клетками-соседями в нише являются критическим фактором для того, чтобы удерживать СК в нише и поддерживать их функциональные свойства. У взрослой самки *Drosophila*, в германии, локализованном на переднем конце каждой овариолы, обнаруживаются группы из 2–3 ЗСК (рис. 9.12).

В концевой части германия находятся клетки Сар, которые устанавливают прямые физические контакты с окружающими их ЗСК. При делении ЗСК, не теряющие физические контакты с клетками Сар, сохраняют свойства ЗСК. ЗСК, которые теряют указанные контакты, начинают дифференцировку и инициируют овогенез. Молекулярный «клей», который прикрепляет ЗСК к их нишам, по крайней мере отчасти, представлен белками кадхеринами, которые вместе с их партнером — белком β -катенином концентрируются на границах расположения ЗСК (рис. 9.13; 9.14).

Кадхерины и катенины принимают участие в образовании специализированных межклеточных соединений, которые могут быть ремоделированы в контексте их взаимодействия с актиновым цитоскелетом (см. рис. 9.14). Важность кадхериновых соединений в удержании ЗСК клетками Сар была доказана в опытах, в которых мутации DE-кадхерина или β -катенина приводили к неспособности клеток Сар рекрутировать ЗСК и удерживать их в нише.

Способность СК удерживаться в нише является эволюционно консервативным феноменом, поэтому не удивительно, что основные молекулярные черты удержания СК в нише широко утилизируются у эукариотов. Хотя генетические детали этого феномена еще не раскрыты даже на наиболее хорошо изученной модели *Drosophila*, элементы такого консерватизма найдены и в соматических СК позвоночных. В качестве одного из примеров можно назвать СКК, которые передвигаются вдоль внутренней поверхности кости, содержащей костный мозг,

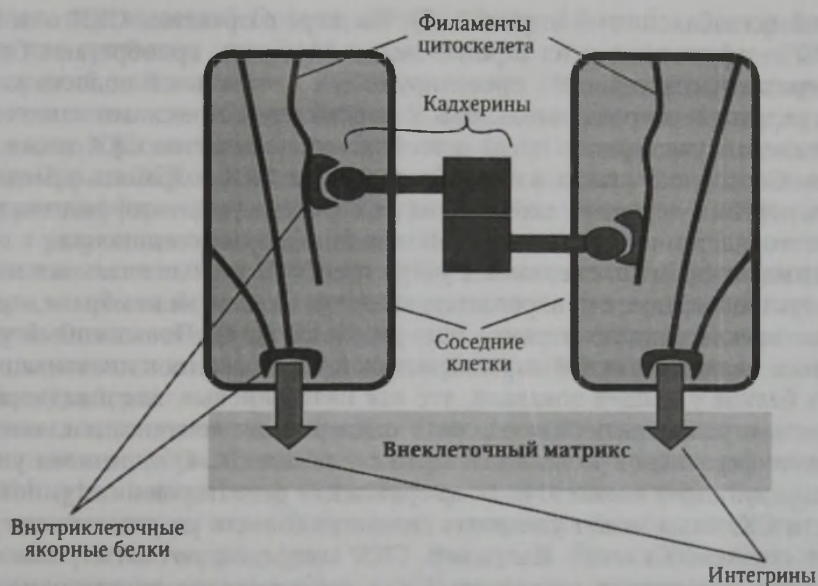


Рис. 9.13. Схематическое расположение кадхеринов и интегринов в соседних клетках (Alberts B. [et al.], 2004)

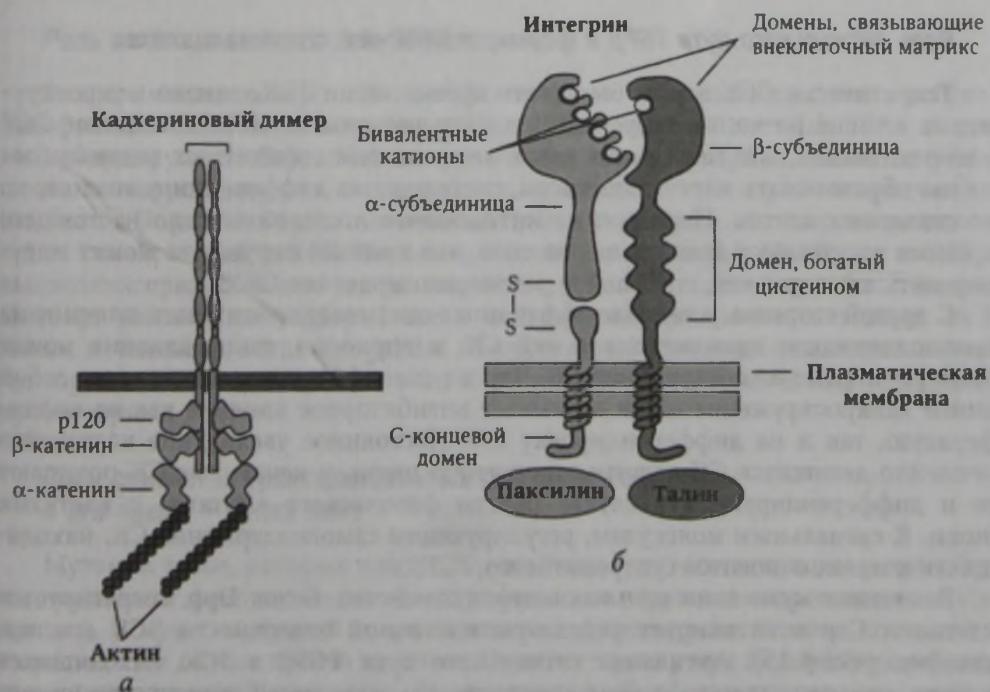


Рис. 9.14. Схема строения кадхеринов и интегринов:

а — схема взаимодействия кадхеринов с внутриклеточным актиновым цитоскелетом;
б — схема структуры интегрин (Alberts B. [et al.], 2004)

покрытой остеобластами (см. рис. 9.12). По мере созревания СКК они теряют контакты с окружающими их стромальными клетками, приобретают большую пролиферативную активность, ориентируются к центральной полости костного мозга и переходят в кровяные сосуды. У мышей с генетическими изменениями, приводящими к увеличению числа остеобластов, количество СКК также увеличивается. Способность таких вновь образованных СКК сохранять замедленную скорость деления, вероятно, основана на их свойстве физически взаимодействовать с остеобластами через N-кадхериновые контактные соединения.

Другими важными элементами в удержании ЗСК в нише являются интегрины, которые опосредуют прикрепление клеток к базальной мембране, происходящей из внеклеточного матрикса (см. рис. 9.13, 9.14). Повышенный уровень интегринов является важной характеристикой СК, а опыты с инактивацией отдельных белков у мышей показали, что как интегриновые, так и кадхериновые соединения играют критическую роль в поддержании локализации, адгезивности и пролиферативной активности эпителиальных СК. Обеспечивая уникальный состав лигандов внеклеточного матрикса для рецепторов интегринов на поверхности СК, ниша может усиливать свою способность удерживать эти клетки в отделе стволовых клеток. Например, СКК экспрессируют интегрины $\alpha 4 \beta 1$ и $\alpha 5 \beta 1$, которые являются рецепторами для фибронектина внеклеточного матрикса и облегчают адгезию СКК к костномозговой строме. Обработка СКК антителами против этих интегринов нарушает кроветворение в долгосрочных культурах костномозговых клеток.

Роль сигнального пути TGF β в формировании ниш стволовых клеток

Теоретически ССК могли бы занять пустые ниши ЗСК, однако микроокружение в нише не конвертирует ССК в функциональные ЗСК. Вне ниши ССК млекопитающих, инъецированные под кожу иммунодефицитных мышей, способны образовывать клеточные массы, состоящие из дифференцирующихся, но не стволовых клеток. Несмотря на интенсивные исследования, до настоящего времени отсутствуют доказательства того, что внешнее окружение может индуцировать всестороннее, стабильное репрограммирование ССК.

С другой стороны, установлено, что ниша оказывает критическое влияние на самоподдержание находящихся в ней СК, и априорно, такое влияние может быть расширено на посторонние СК. Что же специфического представляет собой ниша? Микроокружение ниши оказывает ингибиторное влияние как на пролиферацию, так и на дифференцировку СК. Постоянное увеличение количества медленно делящихся СК ведет к заполнению ниши, и некоторые СК покидают ее и дифференцируются в случае потери физического контакта с клетками ниши. К сигнальным молекулам, регулирующим самоподдержание СК, находящихся в нише, относится суперсемейство TGF β .

В яичнике мухи один из членов этого семейства, белок Dpp, секретируется клетками Сар и активирует рецепторы клеточной поверхности ЗСК (см. цв. вклейку, рис. 9.15). Активация сигнального пути TGF β в ЗСК, находящихся в нише, сопровождается фосфорилированием и активацией транскрипционного корепрессора, который в этом случае опосредует супрессию гена *bag-of-marbles* (BAM), кодирующего одноименный транскрипционный фактор, необходимый для дифференцировки ЗСК.

Сигнал, передаваемый Dpp, вероятно, действует на небольшом расстоянии, поэтому для супрессии гена VAM и поддержания стволовых свойств ЗСК необходим прямой контакт между ЗСК и клетками Cap, продуцирующими белок Dpp. Когда плотность ЗСК увеличивается настолько, что вновь образующиеся клетки теряют физические контакты с клетками Cap, эффективность действия сигналов Dpp на ЗСК снижается, что вызывает экспрессию в них белка Vam и активирует дифференцировочную программу. Суперсемейство TGF β также вовлечено в регуляцию самоподдержания СКК.

В отличие от яичников мухи, где ЗСК получают сигнал Dpp от клеток Cap, в костном мозге мыши сигнал, контролирующей экспрессию Vam, получают остеобласты. Они отвечают негативно на этот сигнал и опосредованно влияют на СКК, наделяя их способностью прикрепляться к своей поверхности и сохранять стволовые свойства.

В яичках млекопитающих гомолог Dpp белок Vmр8b играет важную роль в инициации и поддержании ЗСК, а в сперматогенезе мух подобную роль играет белок Gbb (glass bottom boat). Подобно передаче сигналов через Dpp, результатом передачи сигналов через Gbb является супрессия Vam и ингибция дифференцировки (см. цв. вклейку, рис. 9.15). Возможно, белки Gbb и Dpp образуют гетеродимер при передаче сигнала в ЗСК в яичках, предотвращая продукцию белка Vam и последующую активацию дифференцировки. Таким образом, сигнальный путь TGF β необходим, но не достаточен для поддержания функций ниш СК.

Роль сигнального пути Jak-STAT

Эксперименты на мухах *Drosophila* позволяют предположить, что в регуляции функций ЗСК яичек важную роль играет сигнальный путь Jak-STAT. Клетки, продуцирующие белок Hub в сперматогенезе мух *Drosophila*, являются функционально аналогичными клеткам Cap в яичниках мух *Drosophila* и продуцируют белок Unpaired (Upd), сигнальный лиганд, который активирует рецептор киназ семейства Jak в ЗСК. Вероятно, сигнальный путь Jak-STAT, как и TGF β , высококонсервативен в передаче сигналов в СК. Активация белка Stat3, по-видимому, важна для поддержания в недифференцированном состоянии ЭСК мыши и человека, тогда как Jak2 с комплементарными тирозинкиназными рецепторами c-Kit или Flt3 вовлечен в регуляцию самоподдержания стволовых кроветворных клеток.

Роль семейства транскрипционных факторов Polycomb и его члена — белка Bmi1

Мутации генов, которые контролируют план тела и сегментацию у дрозофилы, вызывают фенотипически катастрофические нарушения строения тела. Например, у мух с мутацией генов комплекса Antennapedia нижние конечности вырастают на голове вместо антенны. Гены, которые у мух *Drosophila* контролируют переднезадний план тела, были названы гомеотическими селекторными генами (homeotic selector genes). Все члены этого семейства у мух родственны друг другу и расположены в двух комплексах генов — Bithorax и Antennapedia, происходящих из одного комплекса генов NOX. Продуктами таких генов явля-

ются регуляторные белки, имеющие в своей структуре ДНК-связывающий гомеодомен размером 60 аминокислотных остатков.

Участки ДНК, кодирующие гомеодомены белков Нох, называются гомеобоксами. Трехмерная структура гомеодомена представляет собой мотив HtH «спираль-поворот-спираль», характерный для структуры последовательности, связывающей ДНК в транскрипционных факторах, встречающихся во всех эукариотических организмах. Многие гены НОХ активируют собственную транскрипцию. Гены НОХ тесно связаны с двумя большими группами транскрипционных регуляторов, которые называются Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG). При мутациях генов этих семейств рисунок экспрессии гомеотических селективных генов семейства НОХ вначале не нарушается, но не может поддерживаться на нормальном уровне длительное время в процессе развития эмбриона. Направленность действия названных групп регуляторных генов противоположна.

Гены группы TrxG необходимы для поддержания транскрипции генов НОХ в тех клетках, где их транскрипция была предварительно активирована. Наоборот, продукты генов Polycomb формируют стабильные комплексы, которые связывают хроматин и поддерживают супрессивное состояние в клетках, в которых гены НОХ не были активированы в критическое время.

Поскольку эпигенетические события, такие как модификация гистонов, вовлечены в регуляцию клеточной судьбы и самоподдержание, существует предположение, что члены семей Polycomb и Trithorax прямо вовлечены в регуляцию самоподдержания и дифференцировки стволовых клеток.

В настоящее время идентифицированы два различных многокомпонентных белковых комплекса, относящихся к семейству Polycomb: иницирующий комплекс 2 (PRC2) и репрессивный комплекс 1 (PRC1) (см. рис. 6.11). Комплекс PRC2 вовлечен в инициацию состояния «молчания» (сайленсинг) хроматина и содержит гистоновые деацетилазы и гистоновые метилтрансферазы. Комплекс PRC1 вовлечен в стабильное поддержание репрессии генов.

Белки Mel-18, Rae-28 и Bmi1 являются компонентами комплекса PRC1 и участвуют в регуляции функций СК, однако принципиально отличаются друг от друга по влиянию на самоподдержание СК. Мыши с инактивированным геном MEL-18 демонстрируют усиление самоподдержания СКК, вероятно, вследствие увеличения экспрессии гена НОХВ4, который является активатором самоподдержания СКК (см. рис. 1.3). Наоборот, мыши с инактивацией гена RAE-28 проявляют сниженную способность к самоподдержанию СКК при нормальной функции продукта гена НОХВ4.

СКК и нейральные СК экспрессируют высокий уровень белка Bmi1. Мыши, у которых отсутствует Bmi1, постнатально проявляют дефекты кроветворения, образования скелета, неврологические расстройства и нарушения в эмбриональном развитии мозжечка. Показано, что Bmi1 необходим для эффективного самоподдержания СКК и СК периферической и центральной нервной систем зрелого организма, но менее критичен для образования дифференцированных клеток-потомков. Bmi1 необходим также для поддержания НСК в периферической и центральной нервной системе.

Как и в случае со СКК, снижение функции самоподдержания в дефицитных по Bmi1 НСК приводит к истощению их популяции в постнатальном периоде, тогда как выживание коммитированных клеток не нарушается. Учитывая широкий ряд фенотипических нарушений у мышей с дефицитом Bmi1 и его широкое

тканевое распределение, было сделано заключение, что Bmi1 регулирует самоподдержание и в других типах соматических клеток.

Изучение профиля регуляторных генов в стволовых клетках предполагает, что Bmi1 модулирует самоподдержание СКК путем регуляции генов, участвующих в выборе клеточной судьбы, генов выживания и анти-пролиферативных генов. Мишень Bmi1 — локус Ink4a, кодирует p16^{Ink4a} и p19^{Arf}, активация которых ведет соответственно к клеточному старению и апоптозу (см. рис. 6.14). Дефицит p16^{Ink4a} в НСК частично восстанавливает способность СК, дефицитных по Bmi1, к самоподдержанию. Мыши, у которых не экспрессируется Bmi1, показывают индукцию p16^{Ink4a} и p19^{Arf} в различных кроветворных и нервных тканях.

Роль сигнального пути, опосредованного фибробластными ростовыми факторами

Семейство FGF включает более 20 различных белков и более 4 типов рецепторов. Белки FGF связывают рецепторные тирозинкиназы в форме кластеров, которые формируются путем объединения отдельных лигандов FGF с помощью протеогликанов (см. рис. 7.2). Факторы семейства FGF вызывают широкий ряд клеточных ответов, таких как пролиферация, миграция, дифференцировка и остановка клеточного цикла. Инициация таких разнообразных ответов может быть объяснена, отчасти, изменчивой природой взаимодействия между лигандами и рецепторами семейства FGF. Рецепторы этого семейства имеют множество изоформ, которые возникают в результате альтернативного сплайсинга генов. Тканевая специфичность, степень клеточной зрелости и взаимодействие с другими сигнальными путями также играют важную роль в передаче сигналов FGF.

FGF2 (basic FGF) играет существенную роль в регуляции самоподдержания ЭСК человека *in vitro*. Его удаление из культуральной среды сопровождается дифференцировкой ЭСК и потерей экспрессии маркерных белков Tral-60 и Oct3/4. Современные исследования предполагают, что белки FGF активируют самоподдержание ЭСК путем ингибции сигнального пути TGFβ, что вызывает супрессию Smad1 и последующую ингибцию дифференцировки. Однако при замещении эффекта FGF ингибиторами белков Bmp, такими как noggin, дифференцировка ЭСК усиливается, показывая существование других путей регуляции самоподдержания ЭСК, опосредованных FGF.

Одной из потенциальных мишеней FGF является сигнальный путь PI3K, который активируется при связывании лигандов FGF и облегчает самоподдержание ЭСК через ингибцию сигналов MEK/ERK и активацию экспрессии молекул внеклеточного матрикса. Регуляция ростовыми факторами FGF сигнального пути TGFβ может быть не однонаправленным феноменом. Опосредованная FGF передача сигналов PI3K может регулироваться членом семейства TGFβ — белком Bmp2, который препятствует деградации опухолевого супрессора Pten — негативного регулятора сигналов PI3K.

Роль клеточного цикла в механизме выбора клеточной судьбы в различных типах стволовых клеток

ССК, в противоположность ЭСК, находятся в состоянии пролиферативного покоя. Например, 75 % СКК находятся в фазе G0, но большинство СК выходят из этого состояния в течение жизни. Активация пролиферации может приво-

доть к уменьшению популяции СК, что наблюдается у мышей с эмбриональным нокаутом белка $p21^{Cip1}$. Оценка числа СКК у таких животных показывает, что уменьшение числа СК сочетается у них с увеличением количества временно амплифицирующихся клеток. Подобные изменения в отделе СКК происходят также в случае инактивации транскрипционных факторов семейства FOX (FoxO 1, 3, 4) и транскрипционного супрессора Pten.

В отличие от белка $p21^{Cip1}$, другой CdkI — $p18^{Ink4c}$, как и транскрипционный фактор семейства НОХ — Hoxb4, обладает способностью регулировать пролиферацию СКК, не влияя на их способность к самоподдержанию. Мыши с инактивацией обеих аллелей $p18^{Ink4c}$ ($p18^{Ink4c-/-}$) показывают увеличение числа СКК, функциональная активность которых возрастает. Эти данные позволяют предположить, что $p18^{Ink4c}$ способствует переходу СКК через специфическую точку клеточного цикла, в которой клетки не чувствительны к индукции убиквитарных клеточных программ: дифференцировки, апоптоза или клеточного старения. С другой стороны, действие на клеточный цикл СКК белков $p21^{Cip1}$, FoxO 1, 3, 4, Pten или сигнального пути МАРК сопряжено с прохождением клетками точки клеточного цикла, в которой происходит активация терминальных клеточных функций (рис. 9.16).

Период клеточного цикла, в котором СК оказываются чувствительны к индукции убиквитарных клеточных функций, вероятно, находится в ранней фазе G1. FoxO 1, 3, 4, $p21^{Cip1}$, Pten и сигналы МАРК контролируют пролиферацию СКК в ранней фазе G1, изменяя вероятность активации терминальных клеточ-

МАРК, Мус, циклины D, Pten, $p16^{Ink4a}$, $p19^{Ink4d}$, $p21^{Cip1}$, FoxO 1, 3, 4



Рис. 9.16. Роль клеточного цикла в механизме выбора клеточной судьбы в стволовых клетках (Orford K. W., Scadden D. T., 2008)

ных функций. Наоборот, белки Bmi1, Nohb4 и p18^{Ink4c} контролируют функции СК вне зависимости от продолжительности ранней фазы G1. Переход из G0 в G1, вероятно, может происходить близко к рестрикционной точке R1, что позволяет СК избегать прохождения ранней фазы G1 и риска быть индуцированной к дифференцировке, апоптозу или клеточному старению (см. рис. 9.16).

Ниша влияет на выбор клеточной судьбы СК путем поддержания состояния покоя и предотвращения коммитирования. Например, Cdc42 — ГТФаза семейства Rho — регулирует функциональную активность клетки путем полимеризации актина и изменения клеточной адгезии. Кондиционный нокаут Cdc42 приводит к увеличению пролиферативной активности СКК и уменьшению числа медленно пролиферирующих СКК. Уменьшение экспрессии интегринов, их лигандов и кадхеринов также способствует потере влияния ниши на СК и их коммитированию.

Другим способом сохранения состояния покоя СК является ингибция дифференцировки. Большинство сигналов, активирующих пролиферацию клетки, например сигналы MAPK, активация циклинов или с-Мус вызывают сопутствующее коммитирование СК. Различные типы СК избегают коммитирования различными путями. Например, в активно делящихся ЭСК в нормальных условиях отсутствует ранняя фаза G1, и эти клетки в ходе клеточного цикла не подвергаются риску индукции терминальных функций в ранней фазе G1. В отличие от ЭСК, ССК в случае индукции пролиферации проходят раннюю фазу G1, однако сигнальные пути Wnt, Notch, Hedgehog и PcG облегчают прохождение этой фазы и помогают избежать влияния сигнального пути MAPK и сопутствующего коммитирования клеток.

Литература

- Alberts B., Johnson A., Lewis J. [et al.]. *Molecular Biology of the Cell*. — New York : Garland Science, Fourth Ed., 2004. — 1463 p.
- Babaie Y. [et al.]. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells / *Stem. Cells*, 2007. — Vol. 25. — P. 500–510.
- Burdon T., Smith A., Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells / *Trends Cell. Biol.*, 2002. — Vol. 12. — P. 432–438.
- Cai J., Weiss M. L., Rao M. S. In search of «stemness» / *Exp. Hematol.*, 2004. — Vol. 32. — P. 585–598.
- Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B /Akt. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1998. — Vol. 10. — P. 262–267.
- Fluckiger A. C. [et al.]. Cell cycle features of primate embryonic stem cells / *Stem. Cells*, 2006. — Vol. 24. — P. 547–556.
- Fuchs E., Tumber T., Gnasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche / *Cell.*, 2004. — Vol. 116. — P. 769–778.
- Huang S., Engber D. E. From stem cells to functional tissue architecture / «Stem Cells Handbook». Ed by Stewart Sell. — New Jersey : Humana Press, Totowa. — P. 45–56.
- Leevers S. L., Vanhaesebroeck B., Waterfield M. D. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1999. — Vol. 11. — P. 219–225.
- Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells / *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1981. — Vol. 78. — P. 7634–7638.
- Molofsky A. V., Pardoll R., Morrison S. J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal / *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2004. — Vol. 16. — P. 700–707.
- Orford K. W., Scadden D. T. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation / *Nat Rev. Genet.*, 2008. — Vol. 9. — P. 115–128.
- Penninger J. M., Woodgett J. Stem cells. PTEN — coupling tumor suppression to stem cells? / *Science*, 2001. — Vol. 294. — P. 2116–2118.

Sato N. [et al.]. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor / *Nat. Med.*, 2004. — Vol. 10. — P. 55–63.

Smith A. G., Hooper M. L. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells / *Dev. Biol.*, 1987. — Vol. 121. — P. 1–9.

Stewart R. [et al.]. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells / *Eur. J. Cancer.*, 2006. — Vol. 42. — P. 1257–1272.

Valk-Lingbeek M. E. [et al.]. Stem cells and cancer; the polycomb connection / *Cell.*, 2004. — Vol. 118. — P. 409–418.

Widmann C. [et al.]. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human / *Physiol. Rev.*, 1999. — Vol. 79. — P. 143–180.

ГЛАВА 10 || СОМАТИЧЕСКИЕ И ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

10.1. Классификация соматических стволовых клеток

Соматические стволовые клетки (ССК) зрелого организма постоянно «проживают» в нишах той ткани, поддержание клеточного состава которой является их функцией, то есть ССК являются тканеспецифическими. ССК классифицируются по тканевому или органному происхождению, например СК центральной нервной системы, печени, легких, сердца, крови, эпидермиса и т. д. Теоретически можно считать, что число стволовых клеток соответствует числу тканей, однако в настоящее время ССК не всех тканей идентифицированы и охарактеризованы.

ССК могут быть мультипотентными или унипотентными. Например, овальные клетки печени и пневмоциты 2-го типа эпителия легких способны дифференцироваться только в соответствующие тканеспецифические клетки, тогда как СК крови образуют все множество линий клеток этой ткани. Существование специализированных СК в каждой ткани не исключает возможности изменения их тканеспецифического фенотипа, т. е. стволовые соматические клетки обладают *пластичностью*.

Пластичность основана на трансдифференцировочном потенциале, который может отличаться даже в ССК одного типа. Например, мезенхимальные СК (МСК) эндохондрия обладают значительно более широким трансдифференцировочным потенциалом, чем МСК костного мозга.

10.2. Стволовые клетки кожи

Структура волосяного фолликула и цикл его регенерации

В коже мультипотентные стволовые клетки постоянно обнаруживаются в области луковицы волосяного фолликула, которая локализована под сальной железой (см. цв. вклейку, рис. 10.1). СК луковицы образуют все линии клеток волосяного мешочка, сальной железы и межфолликулярного эпидермиса. В ходе цикла регенерации волосяного фолликула период роста сопровождается фазой дегенерации, во время которой область волосяного фолликула, расположенная ниже луковицы, подвергается разрушению.

В ходе восстановления волосяного фолликула СК мигрируют из луковицы по внешнему корневому слою в направлении основания волосяного фолликула. В области основания волоса СК образуют отдел временно амплифицирующихся клеток, который называется зародышевой матрицей. В этом отделе временно амплифицирующиеся клетки коммитируются к дифференцировке и затем мигрируют в область внутреннего корневого слоя. При получении сигнала репарации эпидермиса СК покидают область луковицы и мигрируют в базальный слой эпидермиса, формируя СК его базального слоя. Волосяной фолликул окружен

базальной мембраной, покрытой слоем соединительной ткани. Клетки зародышевого матрикса окружены слоем специализированных мезенхимальных клеток, кожным сосочком, обладающим способностью индуцировать рост волоса (см. цв. вклейку, рис. 10.1).

Структура кожного эпителия и роль СК в его поддержании

Межфолликулярный эпидермис представляет собой многослойный эпителий, состоящий в основном из кератиноцитов (см. цв. вклейку, рис. 10.2). Это название клетки приобрели по их характерной черте — синтезу белков промежуточных филаментов, которые называются кератинами и придают эпидермису прочность. Кератиноциты изменяют свою форму от одного слоя к другому. Клетки самого внутреннего слоя, прикрепленные к базальной мембране, называются *базальными клетками*. Клетки, способные к делению, располагаются только в базальном слое эпидермиса, выше которого расположено несколько слоев больших шиповатых клеток. Многочисленные выросты представляют собой десмосомы — места прикрепления толстых пучков кератиновых филаментов, видимых под световым микроскопом как тонкие шипы вокруг клеточной поверхности. Выше клеток шиповатого слоя лежит тонкий слой гранулярных клеток. В этом слое клетки тесно спаяны и формируют водонепроницаемый барьер, способствующий удержанию воды в организме, что является наиболее важной функцией эпидермиса. Мыши, не способные формировать этот барьер вследствие генетических дефектов, погибают вскоре после рождения в результате быстрой потери жидкости, хотя их кожа представляется нормальной во всех других отношениях. Клетки самых внешних слоев эпидермиса кератинизированы и превращаются в плоские чешуйки, заполненные плотно упакованными кератинами. Плазматическая мембрана чешуйчатых и внешних гранулярных клеток укреплена с внутренней стороны тонким, но плотным слоем белков, поперечно «сшитых» ферментом — трансглутаминазой, и включающих цитоплазматический белок инволюкрин.

Деление клеток базального слоя, при котором происходит увеличение размеров их популяции, по существу, представляет собой первый шаг к переходу таких клеток в шиповатый слой. При достижении гранулярного слоя клетки начинают терять ядра и цитоплазматические органеллы благодаря механизму деградации, который включает частичную активацию апоптоза. Следуя этому пути, клетки постепенно превращаются в чешуйки кератинизированного слоя. В итоге такие чешуйки слущиваются с поверхности кожи. Время от появления новой клетки в базальном слое кожи человека до ее слущивания с поверхности составляет 1 мес.

Кератиноциты базального слоя могут быть выделены из эпидермиса и помещены в культуру *in vitro*, где они делятся, давая начало новым базальным и терминально дифференцированным клеткам. В базальном слое присутствуют два типа кератиноцитов:

- 1) медленно делящиеся СК с неопределенно длительным потенциалом самоподдержания и способностью дифференцироваться во все другие кератиноциты;
- 2) временно амплифицирующиеся, активно пролиферирующие, коммитированные к дифференцировке клетки с ограниченной способностью к самоподдержанию.

СК базального слоя экспрессируют несколько биохимических маркеров: интегрин $\beta 1$ и $\alpha 6$, поверхностный антиген CD34, транскрипционные факторы Tcf3 и dN-p63 α , кератины 5 и 14, тогда как временно амплифицирующиеся клетки теряют экспрессию интегринов $\beta 1$ и $\alpha 6$ и продуцируют кератины 15 и 19.

Идентификация СК эпидермиса может быть сделана на основании оценки экспрессии нескольких или всех названных маркерных молекул. В нормальных условиях существует динамическое равновесие популяций СК, временно амплифицирующихся клеток и клеток, которые обратимо коммитированы к дифференцировке. Баланс клеток в этих популяциях контролируется на различных этапах дифференцировки, которая зависит от микроокружения, формирующего нишу СК эпидермиса.

При дифференцировке кератиноциты теряют контакт с базальной мембраной, что связано с уменьшением экспрессии на их поверхности интегринов $\beta 1$ и $\alpha 6$, цитокератинов 5 и 14 и в последующем сопровождается миграцией таких клеток в шиповатый слой. Клетки шиповатого слоя экспрессируют два дифференцировочно специфических кератина: 1 и 10. Они также продуцируют белки оболочки, богатые лизином, которые поперечно «сшиты» эпидермальной трансглутаминазой и локализуются на внутренней поверхности клеточной мембраны, формируя сверхплотную оболочку. В надлежащем гранулярном слое клетки приобретают гранулы, содержащие липиды, которые предназначены для освобождения во внеклеточное пространство. Кератиноциты гранулярного слоя синтезируют белки филагрин и лорикрин, которые способствуют еще большему уплотнению оболочки самых внешних эпидермальных слоев.

В культуре *in vitro* в среде с низким содержанием кальция кератиноциты проявляют свойства клеток базального слоя, включая постоянную пролиферацию, экспрессию кератинов 5 и 14 и интегринов $\beta 1$ и $\alpha 6$. Добавление к таким клеточным культурам кальция индуцирует многие структурные и биохимические изменения, которые появляются в верхних слоях эпидермиса *in vivo*. Эти изменения включают уменьшение экспрессии интегринов, образование межклеточных контактов, остановку деления и экспрессию биохимических маркеров терминальной дифференцировки.

Пролиферация и дифференцировка первичных культур кератиноцитов может быть также модулирована некоторыми фармакологическими агентами, которые, однако, не способны вызывать тонкие структурные и клеточные адгезионные события, вызываемые ионами кальция. Обработка форболовым эфиром TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) вызывает остановку пролиферации клеток и способствует экспрессии терминальных маркеров дифференцировки, например инволюкрина, лорикрина и филагрина. Ретиноевая кислота и витамин D3 также модулируют рост и дифференцировку кератиноцитов. Возникновение контактов между кератиноцитами в суспензии может быть достаточным условием для индукции поздних биохимических маркеров дифференцировки.

Поддержание клеточного состава эпидермиса регулируется сигналами внешней среды

Деление и дифференцировка клеток различных слоев в эпидермисе регулируется сигналами внешней среды, которые влияют на скорость деления стволовых клеток, число делений временно амплифицирующихся клеток, время выхода клеток из базального слоя и продолжительность их присутствия в эпидермисе.

се до завершения дифференцировки. Контроль этих процессов позволяет эпидермису отвечать на внешние стимулы. Сигнальные пути с участием белков семейств EGF, FGF, Wnt, Hedgehog, Notch, TGF β и интегринов вовлечены в регуляцию поведения кератиноцитов. Мутации компонентов сигнальных путей Hedgehog или Wnt могут вести к развитию эпидермальных опухолей. Компоненты сигнальных путей Hedgehog, Notch, TGF β и Wnt при их неправильной экспрессии препятствуют образованию волос или вызывают рост волос в неправильном месте.

Сигналы Wnt активируют самоподдержание СК эпидермиса и ингибируют их переход во временно амплифицирующиеся клетки, тогда как сигнальный путь Notch в эпидермисе оказывает противоположное влияние, ингибируя соседние СК от сохранения стволовых свойств. Сигнальный путь TGF β играет ключевую роль в дермальном слое при репарации ран, облегчая формирование богатых коллагеном рубцовых тканей, а интегрины эпидермиса не просто маркируют клетки, но регулируют их судьбу. Например, трансгенные мыши, которые экспрессируют в верхних эпидермальных слоях интегрины, продуцирующиеся в нормальных условиях только в базальном слое, проявляют признаки заболевания, напоминающего болезнь человека — псориаз. У таких мышей резко возрастает пролиферативная активность базальных клеток, эпидермис утолщается, и клетки слущиваются с поверхности кожи уже через неделю после их перехода из базального слоя, не успевая полностью кератинизироваться.

10.3. Стволовые клетки молочной железы

Строение молочной железы

Специализированный эпителий молочной железы в процессе развития формируется из эктодермальных клеток, которые инструктируются подлежащей специализированной мезенхимой, называемой жировой подушкой, при выборе их последующей судьбы. В постнатальной жизни функциональные единицы молочной железы внешне напоминают деревообразные структуры, состоящие из полых ответвлений, которые называются терминальными концевыми почками (ТКП). Эти структуры покрыты люминальными эпителиальными клетками, обращенными внутрь протока, а снаружи — внешним слоем миоэпителиальных клеток, секрет которых образует базальную мембрану, отделяющую паренхиму молочной железы от ее стромы (рис. 10.3).

Клетки протоков молочной железы выстланы эпителием, состоящим из дуктальных эпителиальных клеток. Лобулярные клетки формируют секреторные дольковые структуры в конце каждого отдела ТКП, а во время беременности и лактации превращаются в альвеолярные клетки. Таким образом, в молочной железе существуют две различные популяции эпителиальных клеток: миоэпителиальная и люминальная. Последняя включает дуктальные и альвеолярные клетки. Альвеолярные клетки секретируют белки молока, тогда как сокращение миоэпителиальных клеток позволяет вывести грудное молоко во внешнее пространство во время лактации.

Способность восстанавливать структуру молочной железы в ходе циклов беременности, лактации и инволюции зависит от тканеспецифических стволовых клеток молочной железы (MaСК). Эти клетки выполняют три функции:

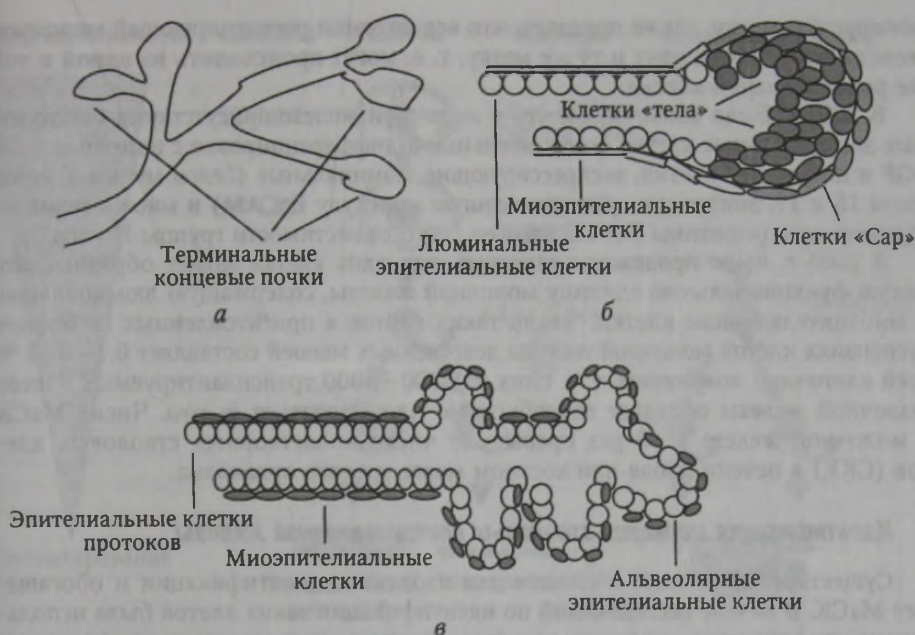


Рис. 10.3. Схема строения терминальных концевых почек молочной железы: схема расположения (а) и клеточный состав (б) терминальных концевых почек молочной железы в нормальных условиях; схема и клеточный состав терминальных концевых почек во время беременности (в). (Woodward W. A. [et al.], 2005)

- 1) образуют ткань молочной железы взрослого организма в процессе развития;
- 2) отвечают за массивное увеличение ткани органа при повторяющихся циклах беременности, лактации и инволюции;
- 3) служат источником репарации при тканевом повреждении.

В начале периода полового созревания незрелая молочная железа подвергается быстрому росту, что сочетается с дифференцировкой клеток в концах терминальных концевых почек. Клетки слоя «Сар», окружающие ТКП, могут превращаться в миоэпителиальные или люминальные эпителиальные клетки, поэтому рассматриваются как мультипотентные МаСК (см. рис. 10.3).

Доказательства существования стволовых клеток молочной железы

Существование *стволовых клеток молочной железы* зрелого организма было продемонстрировано в конце 1950-х гг. путем опытов с трансплантацией клеток молочной железы в лимитирующих разведениях. В опытах на мышах было показано, что трансплантация клеток, полученных из любого сегмента ТКП, в *жировую подушку молочной железы* сопровождается образованием функционально полноценных выростов ткани грудной железы, содержащих все типы эпителиальных клеток и продуцирующих белки молока.

В последующем было доказано, что в молочной железе человека присутствуют МаСК, посредством демонстрации клеток различных ТКП, содержащих одну и ту же инактивированную хромосому, что предполагает их происхождение из одной и той же клетки-предшественника. Трансплантация клеток, несущих рет-

ровирусную метку, также показала, что все потомки регенерирующей молочной железы могут нести одну и ту же метку, т. е. могут происходить из одной и той же родоначальной клетки.

В 2001 г. было обнаружено, что в молочной железе присутствуют бипотентные эпителиальные клетки, индуцибельные к дифференцировке с помощью EGF, FGF и инсулина в клетки, экспрессирующие люминальные (белок муцин-1, кератины 18 и 19, эпителиальную адгезионную молекулу EpcAM) и миоэпителиальные маркеры (кератины 5 и 14, антиген гистосовместимости группы H типа 2).

В 2006 г. было продемонстрировано, что одна клетка может образовывать целую функциональную единицу молочной железы, содержащую люминальные и миоэпителиальные клетки. Число таких клеток в приготовленных *ex tempore* суспензиях клеток молочной железы девственных мышей составляет 0,1–0,02 % всей клеточной популяции, т. е. одна из 1000–5000 трансплантируемых клеток молочной железы обладает способностью клонироваться *in vivo*. Число MaСК в молочной железе в 10 раз превышает число кроветворных стволовых клеток (СКК) в печени плода или костном мозге зрелого организма.

Идентификация маркеров стволовых клеток молочной железы

Существует несколько подходов для изоляции, идентификации и обогащения MaСК. В начале исследований по идентификации таких клеток была использована информация, полученная при изучении кроветворных, нейральных и эпидермальных СК. Например, белок Sca1 (Stem cell antigen 1) является маркером СКК мышей, но также используется для изоляции и обогащения клеток-предшественников молочной железы.

Связывание ДНК красителем Hoechst 33342 широко используется для идентификации СК различных органов, включая костный мозг, сердце, легкие, скелетные мышцы, глаза и поджелудочную железу. Слабое поглощение красителя Hoechst 33342 используется для формирования так называемой краевой популяции «side population» (SP) из исходной популяции клеток, экспрессирующих Sca1 (Sca1+), но не экспрессирующих маркеры дифференцированных клеток (Lin-SP+). Активное выведение красителя Hoechst 33342 выполняется белками семейства множественной лекарственной устойчивости, такими как Mdr1 или гликопротеин «Р».

Большинство клеток молочной железы с фенотипом SP+ экспрессируют цитокератины 18 и 14, являющиеся маркерами соответственно люминальных (K18+) и миоэпителиальных (K14+) клеток. Таким образом, клетки SP+ обогащены бипотенциальными клетками, которые превращаются в люминальные клетки, экспрессирующие K18, и миоэпителиальные клетки, экспрессирующие K14 (рис. 10.4).

Локализация MaСК в ТКП была охарактеризована на основании их свойства долгое время находиться в состоянии покоя, т. е. не проявлять пролиферативной активности. В таких условиях MaСК могут включать предшественники ДНК, например BrdU или ^3H -TdR только при условии длительного (пульсового) введения метки в организм животного. В течение последующего мониторинга (преследования, chase) можно установить распределение метки из исходной материнской клетки при ее делении. Клетки, находящиеся в состоянии покоя, сохраняют метку более продолжительное время и называются «сохраняющие мет-

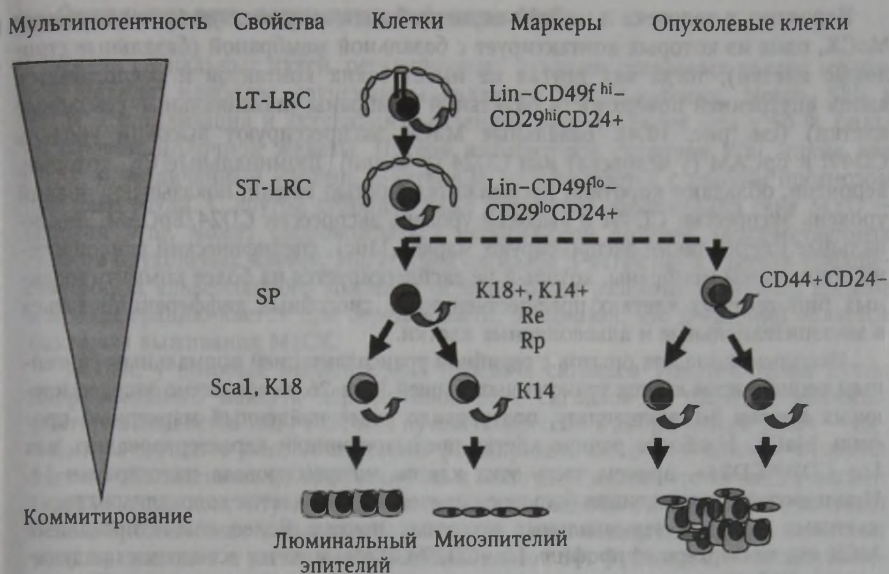


Рис. 10.4. Схема дифференцировки стволовых клеток молочной железы (Shackleton M. [et al.], 2006)

ку клетки» (label retaining cells, LRC+). LRC+ располагаются вдоль базальной мембраны в терминальных концевых почках.

При мечении 4-недельных девственных мышей BrdU в течение 2 нед. (период жизни, в течение которого ТКП максимально активны) и последующем контроле метки в течение 9 нед. (период жизни, в котором завершается морфогенез ТКП) в общей популяции эпителиальных клеток была идентифицирована маленькая фракция клеток BrdU+LRC+. Очень немногие клетки этой популяции экспрессируют маркер дифференцированных клеток — рецептор прогестерона (Pr), и наоборот, они двукратно обогащены по клеткам SP+ по сравнению с популяцией Scal+. В общем, популяция SP+ представлена более примитивными клетками-предшественниками, чем большинство клеток Scal+. Но поскольку примерно 75 % популяции SP+ экспрессируют маркер Scal, можно предположить существование клеток, которые несут оба маркера (см. рис. 10.4).

Использование антител к различным маркерам СК крови при флуоресцентно-активированной сортировке клеток молочной железы показало, что эти клетки не экспрессируют специфические маркеры кровяных клеток (CD45, гликофорин A, Ter119) и эндотелиальных (CD31) клеток. Антитела к таким маркерам зрелых клеток были использованы для удаления экспрессирующих их клеток и обогащения оставшейся популяции по МаСК. В результате были получены эпителиальные клетки молочной железы, которые клонировались *in vitro* и не несли маркеров зрелых клеток (Lin-). Дальнейший анализ показал, что МаСК экспрессируют следующие маркеры: CD29 (β1-интегрин), CD24 (белок, устойчивый к нагреванию) и CD49f (α6-интегрин) (см. рис. 10.4). Экспрессия CD49f на МаСК снижается в культуре *in vitro*, что связано с потерей контактов клеток с базальной мембраной.

Вероятно, у человека и мыши в молочной железе существуют две популяции МаСК, одна из которых контактирует с базальной мембраной (базальные стволовые клетки), тогда как другая не имеет таких контактов и располагается вдоль внутренней поверхности базальной мембраны (люминальные стволовые клетки) (см. рис. 10.4). Базальные МаСК экспрессируют высокий уровень CD49f и EpCAM (у человека) или CD24 (у мыши). Люминальные СК, которые, вероятно, обладают короткой продолжительностью жизни, показывают низкий уровень экспрессии CD49f и высокий уровень экспрессии CD24/EpCAM. Люминальные клетки также экспрессируют маркер Muc1, специфический гликопротеин апикальной мембраны, который не экспрессируется на более коммитированных бипотентных клетках-предшественниках, способных дифференцироваться в миоэпителиальные и альвеолярные клетки.

Использование для опытов с серийной трансплантацией нормальным сингенным реципиентам клеток трансгенных мышей Rosa-26, повсеместно экспрессирующих маркер β -галактозидазу, подтвердило ранее найденный маркерный профиль МаСК. Наиболее ранние клетки-предшественники характеризовались как Lin-CD29^{hi}CD24⁺, причем часть этих клеток экспрессировала цитокератин 14. При иммунофлюоресценции большое количество этих клеток колокализовалось с клетками «Сар» в терминальных концевых почках. Более коммитированные МСК имели маркерный профиль Lin-CD29^{lo}CD24⁺, и почти все клетки продуцировали K18. В культуре *in vitro* эти клетки продуцируют белки молока. По мере коммитирования МСК переходят в отдел временно амплифицирующихся клеток, которые характеризуются способностью активно выводить краситель Hoechst (SP⁺). Эти клетки экспрессируют бипотенциальные маркеры, такие как K18+K14⁺, эстрогеновые (Er) и прогестероновые рецепторы (Pr). Клетки SP⁺ последовательно переходят в более коммитированные потомки, продуцирующие Scf1. Популяция клеток Scf1⁺ дифференцируется в люминальные и миоэпителиальные клетки, маркированные соответственно K18 и K14 (см. рис. 10.4).

Опухолевые стволовые клетки молочной железы

Мутации, инициирующие рак молочной железы, накапливаются в клетках, которые существуют в течение всей жизни, что подтверждается увеличением числа опухолевых заболеваний с возрастом, а также увеличением числа заболевших среди женщин, подвергшихся радиационному облучению за 20–30 лет до возникновения заболевания. Было предположено, что долгая отсрочка в возникновении опухолей у облученных связана с тем, что при облучении повреждаются покоящиеся клетки с неограниченным потенциалом к самоподдержанию, которые неизбежно превращаются в опухолевые клетки в ответ на неизвестный пролиферативный стимул. Клетки молочной железы с фенотипом CD44⁺CD24[–] показывают повышенную способность формировать опухоли при инъекции в жировую подушку молочной железы иммунодефицитных мышей линии NOD/SCID. Введения 100 клеток с фенотипом CD44⁺CD24[–] достаточно для формирования опухоли, тогда как перенос 10 000 клеток другого фенотипа этой же опухоли не вызывает ее развития. Клетки с фенотипом CD44⁺CD24[–] могут жить неопределенно долго, воспроизводя опухолевые и неопухолевые клетки, т. е. они имеют свойства МаСК (см. рис. 10.4).

Сигнальные пути, регулирующие функции MaСК

Среди сигнальных путей, регулирующих функции стволовых клеток молочной железы, наиболее изученными являются Wnt/ β -катенин, Notch, Shh и PTEN. Стабилизация и активация β -катенина найдена более чем у 50 % больных раком молочной железы. Потеря ингибиторов сигналов Wnt, таких как sFrp1, и увеличенный уровень β -катенина ассоциируются с плохим прогнозом при раке груди. С другой стороны, даже временная инактивация гена MYC — мишени Wnt, может сопровождаться необратимой потерей злокачественных свойств опухолевых клеток. Ингибция сигналов β -катенина в клетках-предшественниках альвеолярного эпителия останавливает развитие молочной железы и пролиферацию клеток при беременности, показывая, что β -катенин является фактором выживания MaСК.

Мыши, у которых ингибирована передача сигналов Wnt/ β -катенин путем эмбрионального нокаута передатчиков этих сигналов — транскрипционных факторов семейства LEF/TCF, или путем экспрессии в эмбриогенезе Dkk1 — ингибитора сигналов Wnt, не способны формировать молочную железу. Фракция клеток, обогащенных по SP, увеличена в молочной железе трансгенных мышей MMTV/Wnt1, конститутивно экспрессирующих одноименный рекомбинантный белок. Эктопическая экспрессия белка Wnt3a в эпителиальных клетках молочной железы приводит к увеличению фракции клеток SP. Фракция клеток SP увеличивается также в культуре эпителиальных клеток молочной железы, подвергнутых облучению, и этот эффект значительно усиливается, если используются клетки от трансгенных мышей MMTV/Wnt1. В результате активации сигнального пути Wnt/ β -катенин при помощи стабильной экспрессии рекомбинантного белка MMTV/Wnt1 у мышей отмечается повышенная частота возникновения рака молочной железы. Количественная оценка экспрессии фенотипа Lin-CD29^{hi}CD24⁺ в популяции клеток молочной железы показывает, что число таких клеток в молочной железе трансгенных мышей в стадии предрака увеличивается в 6 раз.

Потеря гетерозиготности по опухолевому супрессору PTEN отмечается в опухолях, возникающих у трансгенных мышей MMTV/Wnt1, спаренных с мышами с генотипом PTEN^{+/–}. Потеря гетерозиготности по PTEN найдена в люминальных и миоэпителиальных клетках молочной железы, имеющих фенотип K14⁺K18⁺, что указывает на бипотентность клеток-предшественников, подвергающихся злокачественной трансформации. Опухолевый супрессор PTEN взаимодействует с несколькими сигнальными путями, важными для развития клеток молочной железы. В частности, уменьшение его экспрессии может влиять на стабилизацию и активацию β -катенина.

Экспрессия белка Notch4 необходима для развития молочной железы, а его ген может служить инсерционным сайтом для вируса MMTV при возникновении опухолей молочной железы у мышей. Трансгенные мыши, которые конститутивно экспрессируют активный белок Notch4, склонны к развитию опухолей молочной железы. Ингибция активности белка Notch4 антителами полностью отменяет формирование *маммосфер* молочной железы, которые происходят из MaСК.

Сигнальный путь Shh участвует в эмбриональном развитии молочной железы, а компоненты этого сигнального пути подвергаются мутациям или сверхэкспрессируются при многих видах рака, включая рак молочной железы. Изучение морфогенеза молочной железы дает основание утверждать значимость сигналов Shh для взаимодействия между стромой и эпителиальными клетками в развитии

этого органа. Сигнальный путь Shh активируется в большинстве опухолей молочной железы человека, что является результатом сверхэкспрессии медиаторов сигналов Shh — белков Ptc и Gli (см. рис. 6.17). Ингибитор сигнального пути Shh — циклопамин, тормозит рост нескольких линий опухолевых клеток молочной железы *in vitro*. Вероятно, сигнальный путь Shh вовлечен в регуляцию самоподдержания MaСК.

10.4. Стволовые клетки кишечника

Структура и функции желудочно-кишечного тракта

Желудочно-кишечный тракт состоит из тонкого и толстого кишечника, эпителий которых выполняет функции переваривания и всасывания питательных веществ, защиты и выведения ненужных и токсичных продуктов. Эпителий тонкого кишечника состоит из чередующихся выпячиваний — ворсин и прилежащих к ним инвагинаций — крипт, которые погружены в мезенхиму (рис. 10.5). В прямой кишке нет ворсин и эпителий имеет плоскую поверхность. Стволовые и коммитированные к дифференцировке временно амплифицирующиеся клетки кишечника расположены в криптах, тогда как эпителий ворсин состоит из функционально зрелых неделящихся клеток четырех типов: энтероцитов, энтероэндокринных клеток, кубковидных клеток и клеток Paneth.

Функция энтероцитов заключается во всасывании и транспорте питательных веществ через кишечную стенку. Кубковидные клетки секретируют слизистые вещества (муцины), которые необходимы для продвижения пищи вдоль

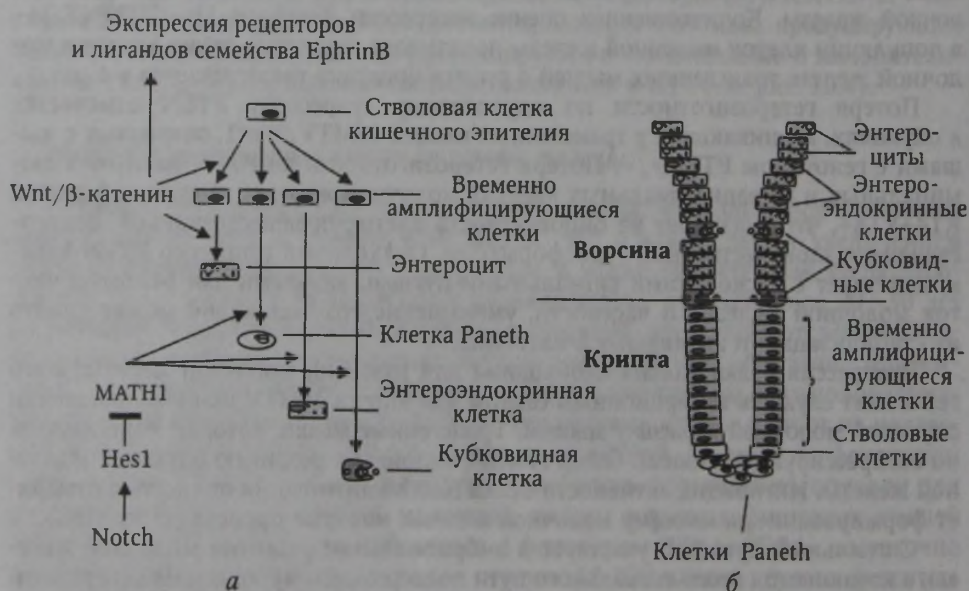


Рис. 10.5. Схема строения и сигнальной регуляции в криптах и ворсинах кишечника:

а — схема дифференцировки клеток тонкого кишечника;

б — структура эпителия тонкого кишечника (Van Es J. H., Clevers H., 2005)

кишечника, диффузии питательных веществ, защиты против стресса и химических повреждений. Энтероэндокринные клетки координируют функции кишечника, печени и поджелудочной железы путем секреции гормонов. Эти гормоны регулируют секрецию пищеварительных ферментов, желчи и жидкости, богатой бикарбонатами. Энтероциты, кубковидные и энтероэндокринные клетки продолжают дифференцироваться и созревать в ходе миграции клеток-предшественников из крипты к ворсинке и в конце жизненного цикла обязательно подвергаются апоптозу. Продолжительность такой миграции составляет 2–3 дня. Клетки Paneth секретируют антимикробные вещества, такие как дефенсины, криптидины и лизоцим для контроля микробного содержимого кишечника. В противоположность другим дифференцированным клеткам, клетки Paneth мигрируют к основанию крипты, где они находятся около 2 нед. до замещения вновь образованными клетками.

Клеточная система желудочно-кишечного тракта полностью самообновляется за 2–7 дней. Самообновление зависит от сложных взаимодействий между процессами клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции, адгезии и клеточной смерти. Клеточные взаимодействия регулируются несколькими сигнальными путями, включая TGF β , Shh, Notch и Wnt/ β -катенин. Нарушения в этих путях служат источником различных заболеваний, например опухолей кишечника, в возникновении которых важная роль принадлежит сигналам Wnt/ β -катенин.

Передача сигналов Wnt/ β -катенин в кишечнике

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин у зрелых организмов ассоциируется с регуляцией функций соматических стволовых клеток в различных органах. В отсутствии сигналов Wnt цитоплазматический белок β -катенин, который опосредует передачу сигналов Wnt в ядро, разрушается многокомпонентным белковым комплексом (см. цв. вклейку, рис. 8.6; рис. 8.7). Инициация сигналов вследствие связывания белков Wnt с рецепторным комплексом Fz—Lrp5/6 сопровождается накоплением в цитоплазме β -катенина и переносом его в ядро. В ядре β -катенин связывается с транскрипционными факторами семейства LEF/TCF на промоторах генов-мишеней β -катенина и способствует освобождению репрессорного комплекса, который тормозит активность генов-мишеней Wnt. Образование активного комплекса β -катенин—Lef/Tcf трансктивирует гены-мишени Wnt (см. рис. 8.8; 8.9).

В криптах кишечника у мышей экспрессируется Tcf4 — член семейства транскрипционных факторов LEF/TCF, а также β -катенин. У новорожденных мышей с эмбриональным нокаутом гена TCF4 крипты, заполненные в нормальных условиях клетками-предшественниками, выглядят опустошенными. Уменьшение числа клеток-предшественников в криптах является следствием инактивации сигналов Wnt/ β -катенин, которые в нормальных условиях поддерживают популяцию СК кишечника (см. рис. 10.5). Такое заключение подтверждается и другими опытами, в которых экспрессия в клетках кишечника экзогенного белка Dkk1, ингибитора сигналов Wnt, сопровождается ингибированием пролиферации в криптах взрослого животного. Градиент сигналов Wnt контролирует экспрессию белков семейства EphrinB, которые играют роль лигандов и рецепторов и контролируют как правильное расположение эпителиальных клеток в градиенте Wnt/ β -катенин вдоль оси ворсина-крипта, так и правильное расположение кле-

ток Paneth в основании крипты. Рецепторы семейства EphrinB активно супрессируют развитие рака прямой кишки, а сигналы Wnt необходимы для поддержания популяции не только недифференцированных клеток-предшественников, но также и клеток Paneth, что опосредовано экспрессией белков семейства EphrinB.

Сигнальный путь Wnt при раке толстого кишечника

Высокая частота рака толстого кишечника имеет в своей основе высокую скорость делений в отделе стволовых клеток кишечника. Почти всегда возникновение опухолей кишечника сопряжено с активирующими мутациями в сигнальном пути Wnt, мишенью которых являются APC, аксин или β -катенин. Потеря аллелей или соматические мутации опухолевого супрессора APC являются наиболее частыми событиями при раке толстого кишечника. APC был клонирован как ген, врожденные мутации которого наблюдаются при семейном аденоматозном полипозе толстого кишечника (FAP). Все опухоли при FAP и 80 % спорадических опухолей толстого кишечника несут инактивирующие мутации гена APC.

Обычно мутации APC представлены делециями центрального его домена, который содержит сайт связывания β -катенина, что сопровождается увеличением уровня ядерного β -катенина. Около 10 % опухолей толстого кишечника несут активирующие мутации в высококонсервативных остатках серин/треонин, которые фосфорилируются Gsk3 β и необходимы для последующего распознавания и фосфорилирования β -катенина убиквитиновой лигазой β -Tgcr. В результате, мутантный β -катенин становится стабилизированным. Мутации адапторного белка аксин также наблюдаются при некоторых раках печени и толстого кишечника, вызванных нарушениями системы репарации ДНК. Инактивирующая мутация аксина предотвращает нормальное функционирование деструктивного комплекса и подобно мутациям APC ведет к конститутивному повышению уровня β -катенина.

Общим звеном в механизме опухолей кишечника является образование ядерных комплексов Tcf4/ β -катенин и последующая неконтролируемая транскрипция генов-мишеней Tcf4, что сопровождается появлением доброкачественных аденом и полипов. Прогрессия от доброкачественных к злокачественным аденокарциномам включает появление нескольких дополнительных мутаций.

Направленная коррекция сигнального пути Wnt/ β -катенин

Конститутивная активация сигнального пути Wnt/ β -катенин при опухолях толстого кишечника делает этот путь привлекательной мишенью с целью ингибции активности β -катенина путем предотвращения его накопления в ядре или путем предотвращения его взаимодействия с Tcf4. Надежность этого подхода была доказана в экспериментах в культуре ткани. Разрушение комплексов Tcf4/ β -катенин или делеция мутантной аллели β -катенина в клетках, происходящих от больных раком прямой кишки, ведет к остановке пролиферации в этих клетках независимо от присутствия дополнительных мутаций. Для торможения сигнального пути β -катенин/Tcf4 успешно используются несколько различных подходов, включая ингибцию экспрессии β -катенина, индукцию его деградации, изменение внутриклеточной локализации, активацию онколитических вирусов или индукцию апоптоза в злокачественных клетках.

Сигнальный путь Notch в кишечнике

Сигнальный путь Notch, как и сигнальный путь Wnt, в зрелом организме ассоциируется с регуляцией функций соматических СК. Многие компоненты сигнального пути Notch экспрессированы в клетках крипт и вовлечены в контроль клеточного состава кишечника. Например, ген HES1, известная мишень сигналов Notch, экспрессируется в кишечных криптах. Анализ кишечника плода мыши, у которой ген HES1 инактивирован (фенотип *Hes1*^{-/-}), выявил относительное увеличение секретирующих муцин и энтероэндокринных клеток в ущерб энтероцитам. Ген, кодирующий фактор Math1, транскрипционно репрессируется белком *Hes1* (см. рис. 10.5). В кишечнике мышей, дефицитных по белку Math1, не изменяется число энтероцитов потому, что белок Math1 играет важную роль в дифференцировке СК в клетки секреторного ряда (кубковидные и энтероэндокринные клетки, клетки Paneth), но не энтероциты. Этот фенотип в какой-то степени альтернативен тому, который наблюдается у мышей с отсутствием обеих аллелей гена HES1. Белки *Hes1* и Math1 участвуют в регуляции судьбы временно амплифицирующихся клеток при их дифференцировке в энтероциты или секреторные клетки. Таким образом, сигнальный путь Notch регулирует альтернативную дифференцировку СК в энтероциты или секреторные клетки.

Понимание отдельных деталей роли сигнального пути Notch было получено при использовании мышей с тканеспецифической делецией гена CSL, опосредующего передачу сигналов Notch. В течение нескольких дней после генетической ингибиции сигнального пути Notch у мышей отмечалась дерепрессия гена MATH1 и усиленная экспрессия его продукта — белка Math1 на всей протяженности крипт (в нормальных условиях белок Math1 присутствует только в секреторных клетках кишечника). Гистологический анализ кишечника мышей на 5-й день после инактивации CSL выявил полное замещение временно амплифицирующихся клеток неделящимися, дифференцированными кубковидными клетками.

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин в этом случае не изменился, что следует из присутствия ядерного β -катенина в клетках с фенотипом *Hes1*^{-/-}. Более того, реципрокное повышение экспрессии внутриклеточного цитоплазматического домена Notch (Ncd) в эпителии кишечника мыши препятствовало дифференцировке секреторных клеток в условиях повышенной пролиферации клеток-предшественников. Таким образом, в нормальных условиях роль сигнального пути Notch в кишечнике заключается в поддержании недифференцированного пролиферативного состояния клеток-предшественников в криптах (см. рис. 10.5).

Направленная регуляция сигнального пути Notch в эпителии кишечника

Непрямые доказательства участия сигнального пути Notch в патогенезе болезни Альцгеймера были получены при использовании ингибиторов фермента γ -секретазы. Этот фермент после активации выполняет третье протеолитическое деление рецептора Notch (см. рис. 7.17). Ингибиция сигналов Notch, в частности, путем применения ингибиторов γ -секретазы, активно используется для лечения болезни Альцгеймера, при которой отмечается гиперактивация сигнального пути Notch. При таком лечении в кишечнике происходит значительное увеличение числа кубковидных клеток, секретирующих муцины. В случае применения больших доз ингибиторов γ -секретазы в кишечном эпителии отме-

Клетки крови включают три основных класса: красные клетки (эритроциты), белые клетки (лейкоциты) и тромбоциты, происходящие от мегакариоцитов. Функция эритроцитов заключается в переносе кислорода и углекислоты; функция лейкоцитов — в поддержании стабильности антигенного состава организма путем защиты от внешних воздействий с помощью фагоцитоза, выработки антител или прямого цитопатогенного воздействия на чужеродные клетки. Тромбоциты представляют собой безъядерные фрагменты больших клеток — мегакариоцитов, они участвуют в свертывании крови и продуцируют ростовые факторы. Дифференцировка СКК до образования функционально зрелых клеток осуществляется путем нескольких последовательных шагов, на каждом из которых происходит прогрессивное ограничение их дифференцировочного потенциала (см. рис. 10.6).

Способность к самоподдержанию в системе кроветворения изменяется по другим законам. В отделе СКК найдено 3 разных типа клеток:

- 1) клетки с неограниченно длительным потенциалом самоподдержания;
- 2) клетки с ограниченной способностью к самоподдержанию;
- 3) клетки, не обладающие способностью к самоподдержанию (см. рис. 10.6).

Начальный этап дифференцировки СК называют коммитированием, подчеркивая необратимый характер выбора судьбы дочерними клетками. На первом шаге коммитирования СКК выбирает лимфоидную или миелоидную судьбу, т. е. образуются общие лимфоидные и миелоидные клетки-предшественники, которые обладают способностью к самоподдержанию и дают начало всем соответствующим линиям кроветворных клеток.

На втором этапе из общих лимфоидных клеток-предшественников образуются клетки-предшественники Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, или НК-клеток, а также дендритные клетки. Из общих миелоидных клеток-предшественников образуются клетки-предшественники гранулоцитарно-макрофагального и мегакариоцитарно-эритроидного ряда.

На третьем этапе коммитирования лимфоидные клетки приобретают способность к взаимодействию со специфическим антигеном. При этом они проходят сложный процесс «обучения» в различных органах: Т-клетки — в тимусе; В-клетки — в костном мозге. Зрелые Т- и В-лимфоциты в форме клеток памяти живут неопределенно долго, т. е. они обладают способностью к длительному самоподдержанию, подобно СКК.

Гранулоцитарно-макрофагальные и мегакариоцитарно-эритроидные клетки-предшественники на следующем этапе дифференцировки дают начало, соответственно, функционально зрелым гранулоцитам, моноцитам, дендритным клеткам, мегакариоцитам и эритроидным клеткам, которые не обладают способностью к самоподдержанию.

Регуляция продукции лейкоцитов в костном мозге

При воспалении в ткани освобождается много сигнальных молекул, которые путем различных механизмов привлекают клетки крови к месту воспаления. Некоторые вещества, выделяемые при воспалении, способствуют сокращению эндотелиальных клеток и увеличению их адгезивных свойств, важных для взаимодействия с лейкоцитами крови. Начальное взаимодействие клеток крови с эндотелиальными клетками опосредуется рецепторами хоуминга, которые называются селектинами. Более прочные контакты этих клеток опосредуются

интегринами. Хемокины, выделяющиеся эндотелиальными клетками, многими типами клеток поврежденной ткани, а также инфекционные частицы действуют как аттрактанты для лейкоцитов крови, вызывая их выход из сосудов в поврежденную ткань.

Механизм хемоаттракции включает изменение мембраны и цитоскелета клеток крови. Другие сигнальные молекулы, распространяясь с кровью, достигают костного мозга и активируют его к продукции лейкоцитов и освобождению их в кровяное русло. Такая активация может носить узкоспецифический характер, например, способствуя увеличению образования эозинофильных гранулоцитов при инфекции паразитами и простейшими или нейтрофильных гранулоцитов — при бактериальной инфекции.

В условиях снижения содержания кислорода в воздухе увеличивается продукция эритроцитов. В костном мозге кроветворные предшественники созревают, находясь во взаимодействии со стромальными клетками, внеклеточным матриксом, клетками сосудов и кости. Сигналы с периферии достигают СКК или элементов их ниш, способствуя активации дифференцировки СКК и их миграции в кровеносное русло.

При рентгеновском облучении летальной дозой животное погибает вследствие гибели клеток крови и инфекционных заболеваний, причиной которых является дефицит клеток крови, осуществляющих противоинфекционную защиту организма. Облученное животное можно спасти путем трансплантации ему костного мозга сингенного, т. е. иммуносовместимого, донора. Механизм восстановления кроветворной системы реципиента основан на репопуляции его костного мозга СКК донора.

СКК дифференцируются во все типы клеток крови

Введение ретровирусного вектора, который включается в геном практически всех клеток крови, дало возможность пометить СКК, число которых в общей популяции кроветворных клеток невелико и составляет примерно 10^{-6} от общего числа кроветворных клеток. Векторная ДНК включается в геном СКК и при их дифференцировке передается клеткам-потомкам, являясь уникальной меткой и предоставляя возможность оценивать происхождение дифференцированных клеток из меченых СКК. Схема подобного опыта включает перенос меченых ретровирусом кроветворных клеток летально облученному сингенному животному. Дефицит собственных клеток крови вызывает в организме реципиента активную регенерацию и дифференцировку трансплантированных СКК в клетки различных кроветворных линий.

Плюрипотентность СКК можно оценить путем рестрикционного анализа и гибридизации ДНК, полученной из различных линий кроветворных клеток спасенной мыши-реципиента, которой трансплантировали клетки, помеченные ретровирусной меткой. Поскольку вирусные векторы обладают высокой эффективностью проникновения в клетки, они инфицируют и СКК, число которых в общей популяции кроветворных клеток очень невелико. В этом можно убедиться на основании того факта, что клетки различных кроветворных линий несут один и тот же уникальный ретровирусный маркер, т. е. все они происходят из одной и той же трансплантированной СКК (см. цв. вклейку, рис. 10.7).

Восстановление кроветворной системы пациентов после облучения, направленного на удаление лейкозных клеток, а также при генотерапии пациентов

в медицинских клиниках происходит по такому же сценарию. Трансплантированные и гистосовместимые СКК донора обеспечивают восстановление и полноценное функционирование всех кроветворных линий реципиента. В случае генотерапии донорские или аутологичные СКК модифицируются путем генетической коррекции гена-мишени, экспрессия которого обеспечивает репарацию генетического дефекта у реципиента.

Сигнальные пути, регулирующие самоподдержание и дифференцировку СКК

Существует определенная спецификация сигнальных путей в контроле того или иного типа линейной дифференцировки. Например, белок Gata-1 необходим для эритроидной дифференцировки. У животных, лишенных продукта гена *Rax5*, нарушается образование зрелых В-клеток. Клетки-предшественники с дефицитом продукта гена *RAX5* при наличии соответствующих индукторов проявляют способность к дифференцировке в гранулоциты, макрофаги и Т-лимфоциты. Эти результаты показывают, что продукт гена *RAX5* необходим как для активации генов В-лимфоцитарной дифференцировки, так и для ингибции дифференцировки СКК в других направлениях.

Наличие коммитированных клеток-предшественников с ограниченным потенциалом самоподдержания предохраняет СКК от лишних воздействий внешней среды и гарантирует их стабильность. Такая особенность соответствует и особенностям регуляции в различных отделах кроветворной системы. Например, коммитированные предшественники регулируются с помощью растворимых циркулирующих в крови факторов, которые способствуют быстрой пролиферации и мобилизации клеток в циркуляцию для поддержания их количества. Напротив, СКК находятся в состоянии покоя и регулируются короткодистантными воздействиями, которые осуществляются при непосредственном контакте с клетками ниши, например сигналами, опосредованными интегринами.

Физиологической основой регуляции функций СКК при их контакте с элементами ниши являются специфические сигналы, активирующие выживание, деление или дифференцировку СКК. В отсутствие таких сигналов СКК погибают. Например, в культуре *in vitro* СКК способны активно функционировать длительный срок при культивировании на специальных «фидерных клетках» или при наличии в ростовой среде факторов типа *Lif*, которые выделяются клетками фидерного слоя. Установлено, что СКК экспрессируют рецептор *Notch1* и тирозинкиназный рецептор *C-kit*, которые связываются, соответственно, с лигандами *Notch* и *Scf* (*stem cell factor*, кодируется геном *Steel*) стромальных клеток (рис. 10.8).

Мутации генов *c-KIT* или *Steel* ведут к аплазии костного мозга, что свидетельствует о значимости этих факторов для выживания СК, тогда как сигналы *Notch1* важны для регуляции их дифференцировки. При потере такой связи, дочерняя клетка начинает коммитироваться к дифференцировке или погибает в зависимости от наличия или отсутствия соответствующих сигналов (см. рис. 10.8).

Гуморальные ростовые факторы, которые регулируют пролиферацию и дифференцировку коммитированных клеток-предшественников, могут быть идентифицированы и изучены в культуре *in vitro*, которая дает возможность добавлять их в среду и следить за поведением клеток-мишеней с помощью различных подходов. Таким образом, были идентифицированы колониестимулирующие факторы (CSF).

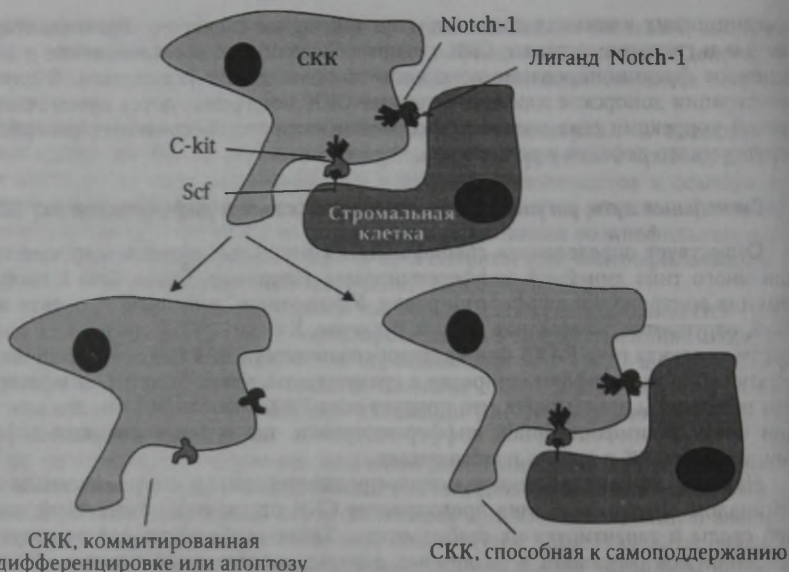


Рис. 10.8. Роль сигналов Notch и C-kit/Scf в регуляции функций СКК (Alberts B. [et al.], 2004)

Действие CSF может быть направлено на одну или несколько разных мишеней. Например, эритропоэтин действует на CFU-E (erythrocyte colony-forming unit). Другой колониестимулирующий фактор — интерлейкин-3 (IL-3) действует на клетки-предшественники разных кроветворных линий. В случае эритроидной дифференцировки его мишенью являются BFU-E (erythroid burst-forming unit), менее коммитированная по сравнению с CFU-E клетка-предшественник эритроцитов. BFU-E, как и CFU-E, обладает способностью образовывать колонии, которые содержат только клетки эритроидной линии. IL-3 действует на множество мишеней, включая мультипотентные стволовые клетки, коммитированные клетки-предшественники и терминально дифференцированные клетки (табл. 10.1).

Существует около 10 различных CSF, которые, подобно эритропоэтину, действуют более избирательно на определенный тип клеток-предшественников. CSF являются гликопротеинами, относятся к семейству локальных медиаторов, называемых цитокинами, и действуют в очень низкой концентрации, примерно 10^{-12} М. Цитокины передают сигнал внутрь клетки путем взаимодействия с рецепторами субсемейства цитокинов, которые по своей химической природе являются рецепторными тирозиновыми киназами (см. табл. 10.1). Цитокиновые рецепторы воспринимают сигнал как от цитокинов, так и от других лигандов, например гормона роста и пролактина. Передача сигнала цитокиновыми рецепторами внутрь клетки основана на их взаимодействии с киназами семейств Jak и STAT и подробно обсуждалась в главе 9 на примере передачи сигнала фактором Lif (см. цв. вклейку, рис. 9.1).

Таблица 10.1

Колонистимулирующие факторы, регулирующие образование клеток крови
(Alberts B. [et al.], 2004)

Фактор	Клетка-мишень	Продуцирующие клетки	Семейство рецепторов
Эритропоэтин	CFU-E	Клетки почки	Рецепторы цитокинов
Интерлейкин-3 (IL-3)	СКК, большинство клеток-предшественников (BFU-E), многие терминально дифференцированные клетки	Т-лимфоциты, эпидермальные клетки	Рецепторы цитокинов
Гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF)	Клетки-предшественники макрофагов/гранулоцитов	Т-лимфоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты	Рецепторы цитокинов
Гранулоцитарный CSF (G-CSF)	Клетки-предшественники макрофагов/гранулоцитов и гранулоцитов	Макрофаги, фибробласты	Рецепторы цитокинов
Макрофагальный CSF (M-CSF)	Клетки-предшественники макрофагов/гранулоцитов и макрофагов	Фибробласты, макрофаги и эндотелиальные клетки	Рецепторные тирозиновые киназы
Стальной фактор (Steel factor)	СКК	Стромальные клетки костного мозга	Рецепторные тирозиновые киназы

Маркеры СКК, изоляция и концентрация СКК

Как у мыши, так и у человека изоляция СКК начинается с негативной иммунной селекции, в процессе которой из популяции костномозговых клеток удаляются все клетки, несущие маркеры различных кроветворных линий, экспрессирующиеся на дифференцированных клетках. Для негативной селекции СКК используются антитела против следующих маркеров: CD11b, специфичного для макрофагов и гранулоцитов; CD3 — для Т-лимфоцитов; B220 — для В-клеток; Ter119 — для клеток эритроидного ряда (см. цв. вклейку, рис. 10.10).

Оставшиеся в популяции клетки определяются как Lin[−], т. е. клетки, не экспрессирующие линейные маркеры. Негативная иммунная селекция позволяет сконцентрировать СКК в 10–100 раз. Последующая концентрация СКК из популяции клеток Lin[−] может выполняться с использованием нескольких подходов. Оказалось, что в клетках Lin[−], которые активно выводят красители ДНК — родамин и хекст (hoechst) и содержат небольшое (lo) количество этих красителей (hoechst-lo, rhodamine-lo), значительно увеличено число СКК. Эти клетки были названы «side population» (SP), так как они показывают уникальную способность выводить красители ДНК и в результате слабо окрашиваются этими красителями. Клетки SP экспрессируют транспортный белок ABCG2, который активно выводит краситель Hoechst.

Другим подходом к концентрации СКК является позитивная селекция клеток Lin[−] с помощью антител к поверхностным маркерам, например, к CD34, Sca1, C-kit и другим. Таким образом, фенотип СКК мыши, полученных в резуль-

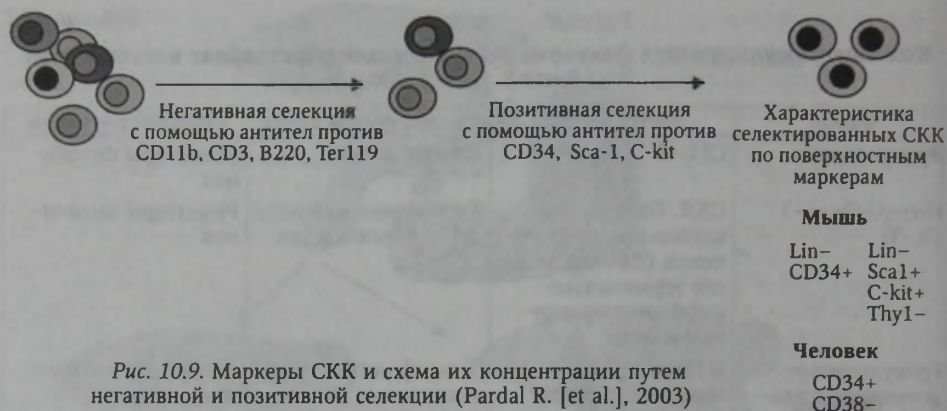


Рис. 10.9. Маркеры СКК и схема их концентрации путем негативной и позитивной селекции (Pardal R. [et al.], 2003)

тате негативной и позитивной селекции, можно определить как Lin⁻CD34⁺, или Lin⁻Sca1⁺C-kit⁺Thy1^{lo} (рис. 10.9). У человека такой фенотип может быть определен как CD34⁺CD38⁻SP⁺.

Существуют доказательства, что выделенная из костного мозга мыши одиночная клетка с фенотипом CD34⁺ может полностью восстановить летально облученную мышь. При этом трансплантируемая клетка костного мозга участвует в репарации паренхиматозных тканей внутренних органов, имеющих различное эмбриональное происхождение. Эти данные предполагают, что в костном мозге содержатся СК, которые имеет более широкий дифференцировочный потенциал по сравнению со СКК.

10.6. Мезенхимальные стволовые клетки

Получение мезенхимальных стволовых клеток, их свойства и маркеры

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) привлекают сегодня все больше внимания благодаря их мультипотентности, пластичности, простоте получения и использования. Основные черты МСК включают:

- 1) способность поддерживать пролиферативный и дифференцировочный потенциал *in vitro* после 50 удвоений, т. е. после предельного количества делений, принятого для нормальных первичных диплоидных клеток;
- 2) способность дифференцироваться в клетки мезодермального (кость, хрящ, жир, мышцы и т. д.) и эктодермального (нейроны) происхождения;
- 3) пластичность, определяемая как способность принимать при определенных условиях необычный функциональный фенотип, например эпителиальный фенотип множественной тканевой специфичности, включая фенотип клеток эпителия легких, кишечника, прямой кишки, поджелудочной железы, печени и т. д.;
- 4) способность расплываться и расти на твердой поверхности, что облегчает процедуру выделения и культивирования МСК (см. цв. вклейку, рис. 10.10).

МСК костного мозга получают с помощью стандартной процедуры, которая включает следующие этапы: вымывание клеток из трубчатых костей, ресуспензирование и фильтрацию через нейлоновые фильтры, культивирование на



Рис. 10.11. Схема, иллюстрирующая биологическую роль мезенхимальных стволовых клеток. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают способностью дифференцироваться в костные, хрящевые, мышечные, жировые и другие типы клеток соединительнотканного происхождения. МСК также секретируют растворимые факторы, способствующие восстановлению тканей, возникших из любого зародышевого слоя (Phinney D. G., 2007)

пластиковой поверхности в стандартной культуральной среде с 10 % фетальной бычьей сывороткой. Нераспластанные на твердой поверхности клетки удаляют, а распластанные — многократно пассируют путем их пересева после достижения насыщающей плотности роста в новые чашки с меньшей плотностью роста (рис. 10.11).

МСК не являются гомогенной популяцией, только 10 % всей популяции МСК проявляют клоногенные свойства. Характеристика поверхностных маркеров показала, что МСК экспрессируют CD29 (интегрин $\beta 1$), CD44 (рецептор для гиалуроновой кислоты и фибронектина), CD90 (Thy-1 антиген), CD105 (эндотелин), CD106 (VCAM), CD166 (ALCAM), HLA класса I. МСК не экспрессируют маркеры кроветворных клеток, например CD45. Таким образом, по экспрессии маркеров МСК характеризуются как клетки, подобные фибробластам. Пока не найдено никаких маркеров, специфических для МСК.

Дифференцировка и пластичность мезенхимальных стволовых клеток

Открытие МСК принадлежит нашему соотечественнику А. Я. Фриденштейну и его сотрудникам. Подобные клетки обладают свойством дифференцировки в костную и хрящевую линии. МСК человека и животных разных видов, включая обезьяну, свинью, кролика, мышь, крысу, обладают широким дифференцировочным потенциалом и могут специализироваться в клетки почти всех возмож-

ных мезодермальных линий (исключая кроветворные клетки), а также в нейроны, которые имеют эктодермальное происхождение (см. рис. 10.11).

Хотя в опытах *in vitro* МСК, полученные в стандартных условиях, не выявляют способности дифференцироваться в клетки энтодермального происхождения, например в эпителиальные клетки внутренних органов, костный мозг содержит такие МСК. При культивировании в среде с низким содержанием сыворотки в присутствии определенных ростовых факторов из костного мозга, головного мозга и поперечнополосатых мышц удалось выделить мультипотентные клетки-предшественники зрелого организма, которые в опытах *in vitro* и *in vivo* показывали способность дифференцироваться в клетки всех известных фенотипов.

В научной литературе возрастает число доказательств того, что в специфических дифференцировочных условиях *in vivo* МСК способны экспрессировать маркеры клеток печени, кишечника и поджелудочной железы. Расширение дифференцировочного потенциала МСК было названо *пластичностью*. При определенных условиях МСК индуцибельны в экспериментах *in vivo* и *in vitro* к дифференцировке в клетки энтодермального происхождения. Тканевое повреждение, вероятно, создает благоприятные условия для трансдифференцировки МСК в клетки с фенотипом поврежденной ткани. Возможно, что при повреждении ткани выделяют цитокины, молекулы внеклеточного матрикса, которые способствуют их трансдифференцировке в клетки нового фенотипа.

В начале широкого изучения функций МСК предполагалось, что МСК являются стволовыми клетками соединительной ткани. Это предположение наиболее точно соответствует результатам современных исследований, свидетельствующих, что лишь незначительная часть популяции МСК обладает свойством трансдифференцировки в клетки энтодермального и эктодермального происхождения. Эффективность терапевтического применения МСК при восстановительном лечении органов и тканей энтодермального и эктодермального происхождения намного превышает их способность к регенерации путем прямой дифференцировки в клетки пораженной ткани реципиента. Вероятно, эффективность терапевтического использования МСК не является результатом их интеграции в ткани реципиента, а основана на секреции МСК растворимых факторов, которые ингибируют апоптоз, воспаление, супрессию специфического иммунного ответа и стимулируют пролиферацию эндогенных стволовых клеток. Эти свойства в большей степени соответствуют способности МСК поддерживать кроветворение в костном мозге, чем их мультипотентному дифференцировочному потенциалу (см. рис. 10.11).

10.7. Опухолевые стволовые клетки

Приложение принципов биологии стволовых клеток к возникновению рака

В течение продолжительного времени проводились параллели между СК и раковыми клетками. Оба типа клеток самоподдерживаются, хотя СК обладают способностью точно изменять свое поведение в зависимости от регуляторных сигналов окружения, тогда как опухолевые клетки в той или иной степени утрачивают чувствительность к внешним сигналам, регулирующим самоподдер-

жание СК. Сравнение свойств нормальных стволовых клеток и опухолевых клеток приведено ниже.

1. СК и опухолевые клетки способны к неограниченно долгому самоподдержанию.

2. СК и опухолевые клетки мультипотентны.

3. СК и опухолевые клетки способны клонироваться.

4. Примерно 0,1 % опухолевых клеток способны переносить опухоль другим животным.

5. СК и опухолевые клетки экспрессируют одни и те же маркеры.

6. Активация одних и тех же сигнальных путей (Wnt/ β -катенин, Notch, TGF β , PcG/Bmi1, Shh) необходима для поддержания СК и опухолевых клеток.

7. Нарушение клеточного старения, апоптоза и дифференцировки характерно для рака, разобщение самоподдержания и дифференцировки, апоптоза и клеточного старения увеличивает число нормальных СК.

8. СК — наиболее вероятные мишени опухолевой трансформации, так как они имеют активную машину самоподдержания и являются долгоживущими.

9. Короткоживущие клетки-предшественники можно трансформировать в злокачественные клетки путем активации сигнальных путей, регулирующих самоподдержание, например Wnt/ β -катенин.

Оба типа клеток также обладают способностью к дифференцировке. Однако СК образуют нормальные, зрелые клетки, тогда как опухолевые клетки часто показывают ненормальную дифференцировку. Например, тератокарцинома содержит хрящевые и костные клетки, но при определенных условиях, например при пересадке в бластоцисту, ее клетки трансформируются в нормальные функционально активные потомки практически любой тканевой специфичности (см. цв. вклейку, рис. 1.14). Опухоль, происходящая из мозжечка (медуллобластомы), содержит клетки, которые напоминают нейроны и глиальные клетки. Клетки миелоидного лейкоза дифференцируются в несколько линий кроветворных клеток.

Соответствие между СК и опухолевыми клетками становится очевидным при обсуждении трех вопросов:

1) подобия в механизмах регуляции самоподдержания нормальных СК и опухолевых клеток;

2) гипотезы возникновения опухолевых клеток из нормальных СК;

3) предположения, что опухоли могут содержать «опухолевые СК» — небольшую популяцию клеток с неопределенно длительным пролиферативным потенциалом, которые отвечают за образование и рост опухоли.

1. Поскольку нормальные СКК и опухолевые клетки способны к самоподдержанию, можно предположить, что вновь появляющиеся опухолевые клетки могут утилизировать машину самоподдержания нормальных СК. Существуют доказательства, что многие сигнальные пути, которые связаны с опухолевым ростом, могут регулировать развитие нормальных СК. Например, предотвращение апоптоза путем усиленной экспрессии онкогена Bcl-2 приводит к увеличению числа СКК *in vivo*, свидетельствуя, что клеточная смерть играет важную роль в регуляции активности СКК.

Другие сигнальные пути, связанные с онкогенезом, такие как Notch, Shh и Wnt, также могут регулировать самоподдержание СК. Активация сигналов Notch в культуре СКК с использованием лиганда Jagged-1 увеличивает количество примитивных клеток-предшественников, что наблюдается как *in vitro*, так

и *in vivo*. Эти результаты доказывают, что активация пути Notch облегчает самоподдержание СКК. В популяции обогащенных СКК человека (CD34+CD38-) увеличивается число самоподдерживающихся клеток после стимуляции сигнального пути Shh в опытах *in vitro*. Белки сигнального пути Wnt регулируют развитие множества организмов и при нарушении регуляции способствуют возникновению рака.

Сверхпродукция β -катенина в долгосрочных кроветворных культурах способствует увеличению числа клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток (Lin-Thy1^{lo}Scal+C-kit+), и повышает способность таких клеточных культур восстанавливать кроветворение у летально облученных реципиентов. Ингибция сигнального пути Wnt/ β -катенин сопровождается торможением пролиферации СКК и активирует их апоптоз *in vitro*.

2. Для большинства опухолей клетки-мишени злокачественной трансформации не известны, однако существуют доказательства, что определенные типы лейкозов возникают в результате мутаций, которые накапливаются в СКК. Клетки человека, способные инициировать острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) у иммунодефицитных мышей NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency), имеют фенотип CD34+CD38-, который подобен фенотипу нормальных СКК. Это предполагает, что нормальные СКК, а не коммитированные клетки-предшественники являются мишенью для лейкемической трансформации.

Наиболее частая хромосомная мутация при ОМЛ включает транслокацию с 8-й на 21-ю хромосому (8; 21), которая сопровождается продукцией рекомбинантного химерного транскрипта AML1-ETO в лейкемических клетках. У пациентов, находящихся в стадии ремиссии ОМЛ, транскрипты AML1-ETO были найдены во фракции нормальных СКК в костном мозге. Будучи изолированными, эти СКК и их потомки не проявляли свойств лейкемических клеток и могли дифференцироваться *in vitro* в нормальные миелоидные клетки. Эти результаты показывают, что транслокация AML1-ETO появляется в функционально нормальных СКК, в которых в дальнейшем происходит дополнительная мутация, ведущая к возникновению лейкоза.

Нормальные СКК имеют фенотип CD34+CD38-Thy1+, тогда как лейкемические клетки — CD34+CD38-Thy1-. Хотя транслокация AML1-ETO происходит в нормальных СКК, последующая трансформирующая мутация может появляться или в потомках клеток с фенотипом Thy1-, или в СКК с фенотипом CD34+CD38-Thy1+. Идея, что СК являются очевидными мишенями прелейкемических событий или лейкемической трансформации, также соответствует данным, что при лимфоидной и хронической миелоидной лейкемии хромосомные перестройки происходят в клетках с фенотипом стволовых клеток (CD34+CD38-).

В некоторых случаях короткоживущие клетки-предшественники или даже дифференцированные клетки могут подвергаться злокачественной трансформации (рис. 10.12). Например, при направленной экспрессии в миелоидных клетках-предшественниках протоонкогена Bcl-2 происходит увеличение выживаемости этих клеток путем ингибции апоптоза. Таким образом, экспрессируя в мышиных миелоидных клетках ген Bcl-2, можно создать экспериментальную модель, при которой миелоидный лейкоз возникает из клеток-предшественников, не обладающих способностью к самоподдержанию.

Индукция дополнительных мутаций, повышающих выживаемость кроветворных клеток подобно гиперпродукции Bcl-2, способствует развитию ОМЛ.

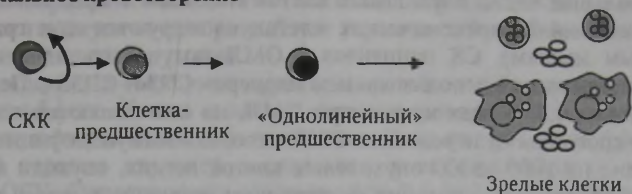
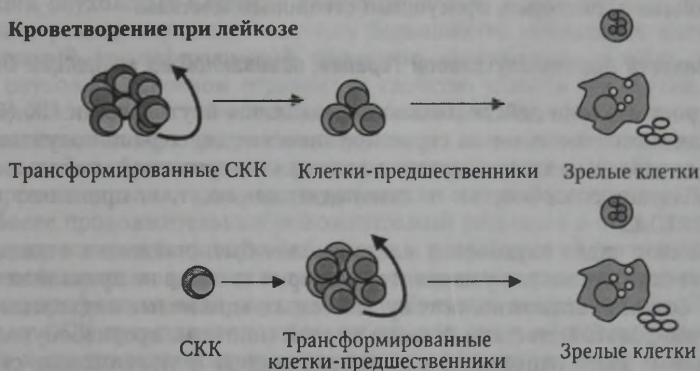
Нормальное кроветворение**Кровотворение при лейкозе**

Рис. 10.12. Сравнение способности к самоподдержанию в нормальных СКК и лейкозных кроветворных клетках. В нормальных условиях только СКК обладают способностью к длительному самоподдержанию. При лейкозах способность к самоподдержанию могут приобретать клетки-предшественники, которые наравне со СКК могут служить мишенями злокачественной трансформации (Pardal R. [et al.], 2003)

Например, если трансгенных мышей с экспрессией экзогенного Bcl-2 скрестить с мышами, дефицитными по белку Fas, который опосредует апоптоз, то рождаются животные со значительно более частым возникновением ОМЛ. Подобные результаты показывают, что накопление трансформирующих онкогенных мутаций может происходить не только в СК, но и клетках-потомках с ограниченной способностью к самоподдержанию.

Может возникнуть вопрос, почему ОМЛ возникает не у всех мышей с гиперэкспрессией Bcl-2 и отсутствием продукции Fas. Вероятно, такие мыши должны приобретать дополнительные мутации, которые необходимы для активации самоподдержания СК. Например, дополнительная мутация может быть связана с гиперпродукцией стабилизированного β -катенина, который активирует самоподдержание СКК. Кроме СКК, способность к длительному самоподдержанию проявляют два других дифференцированных типа клеток крови — Т- и В-лимфоциты (см. рис. 10.6). Они подвергаются клональному размножению в ответ на стимуляцию антигеном и продуцируют клетки памяти, которые повторно подвергаются клональному размножению всякий раз, когда распознают специфический антиген. Поэтому понятно, почему некоторые формы лейкозов возникают из Т- или В-лимфоцитов, в которых трансформирующие факторы могут стимулировать опосредованные антигенными рецепторами сигнальные пути, поддерживающие программу самоподдержания в стабильно активном состоянии.

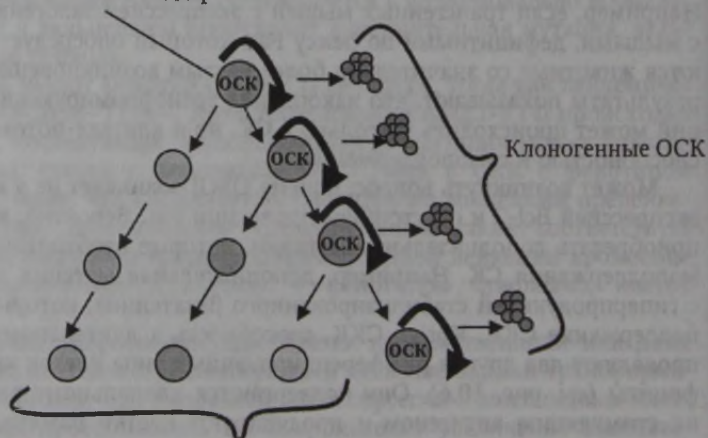
3. Небольшое число опухолевых клеток способны к продолжительной пролиферации (1–4 % лейкоэмических клеток клонируются при трансплантации облученным мышам). СК пациентов с ОМЛ могут быть идентифицированы и сконцентрированы с использованием маркеров CD34+CD38–. Подобные клетки составляют 0,2 % всех клеток при ОМЛ, но они являются единственными клетками, способными переносить ОМЛ человека иммунодефицитным мышам. Только одна из 1000–5000 опухолевых клеток легких, опухоли яичников или клеток нейробластомы способна формировать колонии в агаре, т. е. обладает клоногенными свойствами, присущими стволовым клеткам.

Особенности противоопухолевой терапии, основанной на концепции ОСК

Если рост опухоли действительно определяется опухолевыми СК (ОСК), то этот вывод может иметь очень серьезное значение для терапии опухолей. В популяции опухолевых клеток, которая является гетерогенной, небольшое число клеток обладает способностью к самоподдержанию, т. е. проявляет свойства ОСК (рис. 10.13).

Небольшое число опухолевых клеток может быть найдено в отдаленных от первичной опухоли местах у пациентов, которые никогда не проявляли метастатической болезни, возможно, потому что только единичные опухолевые клетки могут формировать метастазы. Исходя из этой гипотезы, противоопухолевая терапия должна быть направлена на идентификацию и уничтожение стволовых опухолевых клеток. Если бы СК опухоли могли быть идентифицированы и изолированы, тогда противоопухолевую терапию следовало бы направить против клеток, экспрессирующих маркеры ОСК. С другой стороны, если опухолевый

Опухолевые стволовые клетки,
обладающие способностью к самоподдержанию



Дифференцированные опухолевые клетки,
не обладающие способностью к самоподдержанию

Рис. 10.13. Модель, демонстрирующая гетерогенность клеток опухоли. Лишь небольшая популяция опухолевых клеток представляет собой опухолевые стволовые клетки (ОСК), которые клонируются и могут формировать новую опухоль при переносе другим животным (Pardal R. [et al.], 2003)

рост и метастазирование зависят от небольшой популяции ОСК, то эта гипотеза может объяснить неудачи при разработке терапии, направленной на эффективное удаление солидных опухолей.

Хотя имеющиеся в настоящее время лекарства способны уменьшить размер опухоли, этот эффект обычно является временным и не может существенно увеличить продолжительность жизни пациентов. Одна из причин неэффективности современной терапии опухолей заключается в ее неспособности эффективно уничтожать ОСК. Существующая терапия опухолей направлена против основной популяции опухолевых клеток, а ее эффективность оценивается по способности уменьшать размер опухоли. Поскольку большинство опухолевых клеток имеют ограниченный пролиферативный потенциал, способность терапии уменьшать размер опухоли в основном отражает ее свойство убивать эти клетки, тогда как ОСК являются более устойчивыми к подобным воздействиям. Даже терапия, которая вызывает полную регрессию опухоли, но не уничтожает единичные ОСК, оставляет возможность для повторного роста опухоли (рис. 10.14).

Напротив, терапия, которая специфически направлена против ОСК, может иметь более продолжительный положительный результат и быть успешной при лечении метастатических опухолей. С целью разработки эффективной противоопухолевой терапии нужно использовать микрочипы для определения экспрессионного профиля не всей опухоли, но небольшой популяции СК. Это важно, поскольку ОСК представляют собой небольшую часть общей популяции клеток опухоли и анализ экспрессионного профиля всей популяции опухолевых клеток не может выявить ключевых белков, которые могут служить маркерами и мишенями противоопухолевой терапии.

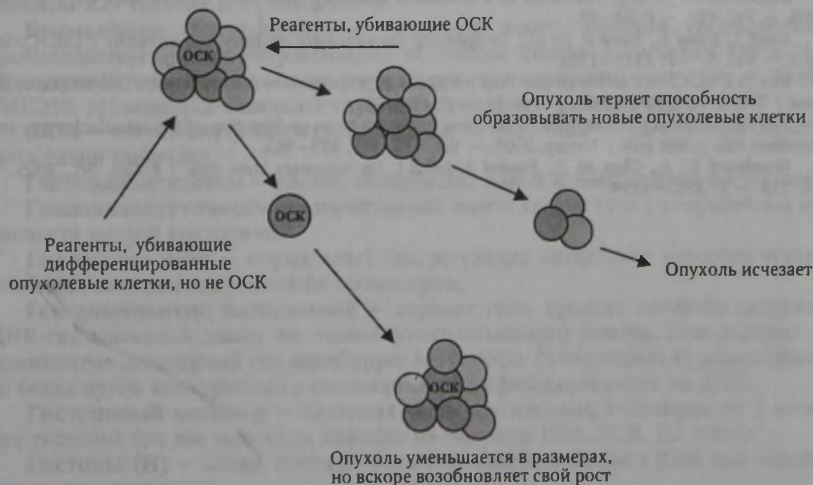


Рис. 10.14. Схема противоопухолевой терапии, основанной на концепции опухолевых стволовых клеток. Терапевтический подход, основанный на гипотезе клоногенности каждой опухолевой клетки, оказывается неэффективным при лечении большинства солидных опухолей. Гипотеза, предполагающая, что только опухолевые стволовые клетки (ОСК) обладают клоногенными свойствами, может служить основой для эффективного лечения (Reya T. [et al.], 2001)

Литература

- Гистология, цитология и эмбриология / под ред. Ю. И. Афанасьева, С. Л. Кузнецова, Н. А. Юриной. — 6-е изд. — М. : Медицина, 2004. — 766 с.
- Фриденштейн А. Я., Лурия И. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. — М. : Медицина, 1980. — 210 с.
- Чертков И. Л., Гуревит О. А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. — М. : Медицина, 1984. — 236 с.
- Alberts B. [et al.]. *Molecular Biology of the Cell*. — New York : Garland Science, Fourth Ed., 2004. — 1463 p.
- Blanpain C., Hosley V., Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves / *Cell.*, 2007. — Vol. 128. — P. 445–458.
- Burdon T., Smith A., Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells / *Trends Cell. Biol.*, 2002. — Vol. 12. — P. 432–438.
- Fuchs E., Tumber T., Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche / *Cell.*, 2004. — Vol. 116. — P. 769–778.
- Hennighausen L., Robinson G. W. Information networks in the mammary gland / *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005. — Vol. 6. — P. 1117–1121.
- Jones P. A., Baylin S. B. The epigenomics of cancer / *Cell.*, 2007. — Vol. 128. — 683 p.
- Nguyen H., Rendi M., Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin / *Cell.*, 2006. — Vol. 127. — P. 171–183.
- Pardoll R., Clarke M., Morrison S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer / *Nature Reviews*, 2003. — Vol. 3. — P. 895–902.
- Phinney D. G. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy / *Cell. Cycle*, 2007. — Vol. 6. — P. 2884–2889.
- Popov B. V. [et al.]. Lung epithelial cells A549 induce epithelial differentiation in mouse mesenchymal BM stem cells by paracrine mechanism / *Tissue Engin.*, 2007. — Vol. 13. — P. 2441–2450.
- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F. [et al.]. Stem cells, cancer, and cancer stem cells / *Nature*, 2001. — Vol. 114. — P. 105–111.
- Shackleton M. [et al.]. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell / *Nature*, 2006. — Vol. 439. — P. 84–88.
- Stingl J., Raouf A., Eirew P. [et al.]. Deciphering the mammary epithelial cell hierarchy / *Cell. Cycle.*, 2006. — Vol. 5. — P. 1519–1522.
- Van Es J. H., Clevers H. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for interstitial neoplastic disease / *Trends Mol. Med.*, 2005. — Vol. 11. — P. 496–502.
- Van Es J. H. [et al.]. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells / *Nature*, 2005. — Vol. 435. — P. 959–963.
- Woodward W. A., Chen M. S., Benhoad F. [et al.]. On mammary stem cells / *J. Cell. Sci.*, 2005. — Vol. 118. — P. 3585–3594.

СЛОВАРЬ

14-3-3 — семейство консервативных регуляторных белков, которые экспрессируются во всех эукариотических клетках и связывают более 100 функционально различных сигнальных молекул, включая киназы, фосфатазы и трансмембранные рецепторы. Название «14-3-3» связано с характерным рисунком белков этого семейства при электрофорезе. Известно семь генов, кодирующих белки семейства 14-3-3 у большинства млекопитающих.

Альцгеймера болезнь — широко распространенное возрастное заболевание, основным проявлением которого является старческое слабоумие. Возникает вследствие нарушений в сигнальном пути Notch.

Апоптоз — запрограммированная клеточная смерть, которая вызывается путем последовательной активации специфических клеточных протеаз (каспаз). Апоптоз характеризуется конденсацией хроматина, деградацией белков и ДНК, потерей асимметрии липидных мембран и дезинтеграцией клетки на фрагменты, содержащие участки мембран.

Бивалентные домены — участки хроматина, меченные двойной гистоновой меткой: присущим активному хроматину триметилированному лизину K4 гистона H3 (H3K4me3) и связанным с неактивным хроматином триметилированным лизин K27 гистона H3 (H3K27me3).

Бромодомен (bromodomain) — белковый домен, который специфически взаимодействует с ацетилированными остатками лизина в гистонах H3 и H4. Присутствует во многих белках-регуляторах транскрипции, например в белке TafiI250, субъединице базального транскрипционного фактора TfiId.

ВКМ — клетки внутренней клеточной массы бластоцисты, из которых образуются ткани эмбриона.

Гаплоидные клетки — клетки, обладающие одной копией каждой хромосомы.

Гаплонедостаточность — инактивация одной аллели гена с сохранением активности второй его аллели.

Ген дикого типа — нормальный ген, регуляция активности которого осуществляется немодифицированным промотером.

Ген доминантно негативный — вариант гена, продукт которого содержит ДНК-связывающий домен, но лишен функционального домена. При экспрессии доминантно негативный ген ингибирует активность функционально полноценного белка путем конкурентного связывания специфического сайта на ДНК.

Гистоновый октамер — белковая часть нуклеосомы, состоящая из 8 молекул гистонов (по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4).

Гистоны (H) — белки, специфически взаимодействующие с ДНК при образовании хроматина.

Гомологичные рекомбинации — процесс замены последовательности гена на хромосоме близкородственными последовательностями или искусственной плазмидной ДНК.

Диплоидные клетки — клетки, обладающие двумя копиями гомологичных хромосом. Соматические клетки большинства многоклеточных организмов являются диплоидными.

Жировая подушка молочной железы — область в основании молочной железы, в которой располагаются тканеспецифические мезенхимальные клетки, вызывающие формирование эпителия молочной железы.

Зигота — диплоидная клетка, образующаяся при слиянии женской и мужской половых клеток с гаплоидным набором хромосом.

Интерлейкин 1 (IL-1) — секретируемый белок, который поддерживает взаимодействие между лейкоцитами в ходе воспаления и иммунного ответа.

β -катенин (armadillo у беспозвоночных) — белок, передающий сигналы Wnt из цитоплазмы в ядро в каноническом сигнальном пути Wnt/ β -катенин.

Кинетохоры — белковые комплексы в центромерах хромосом, к которым прикрепляются микротрубочки веретена в ходе митоза.

Клеточная линия — генетически гомогенная клеточная популяция, обладающая способностью к иммортальности (бессмертию), что позволяет производить неограниченно долгое ее культивирование *in vitro* без изменения свойств составляющих ее клеток.

Клеточный цикл — последовательность событий, которые ведут к воспроизведению живой клетки.

«**Лейциновая застежка**» — аминокислотный мотив в димеризационном домене некоторых транскрипционных факторов, который способствует взаимодействию с родственными белковыми молекулами и образованию функционально активных димеров.

Маммосферы — клоны, возникающие при размножении стволовых клеток молочной железы (MaСК) в культуре *in vitro* на неадгезивной поверхности. В маммосферах, подобно нейросферам, MaСК пролиферируют, но не дифференцируются.

Машина клеточного цикла (контрольная система клеточного цикла) — комплекс биохимических реакций, которые образуют и регулируют последовательность отдельных событий клеточного цикла.

Микрочип — твердый носитель с нанесенными пробами для анализа с помощью молекулярного дисплея.

миРНК (siRNA, small interfering RNA) — маленькая интерферирующая РНК; имеет размер 21–25 пар оснований, образуется из экзогенной или эндогенной двухцепочечной РНК, вызывает сайленсинг генов путем формирования комплексов RISC.

Митоз — деление ядра; включает разделение удвоенного числа хромосом и их упаковку в ядро дочерних клеток.

мкРНК (miRNA, micro RNA) — микроРНК, которая имеет размер 21–25 пар оснований, образуется из эндогенной одноцепочечной РНК, вызывает сайленсинг генов путем формирования комплексов RISC.

Молекулярный дисплей (микродисплей) — метод автоматической оценки активности множества генов.

Нейросферы — колонии в культуре *in vitro*, происходящие из одиночных нейральных стволовых клеток.

Нуклеосома — основная единица структуры хроматина эукариотической клетки, состоящая из нити ДНК в 147 пар оснований, обернутой вокруг гистонового октамера.

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) — небольшая популяция клеток опухоли, обладающих некоторыми свойствами нормальных стволовых клеток и поддерживающих воспроизведение ткани опухоли.

Опухолевые супрессоры — белки, потеря которых способствует возникновению опухолей.

Первичная культура клеток — популяция клеток, полученных из нормальной ткани для культивирования вне организма. Клетки первичной культуры со-

держат нормальный кариотип и способны совершать ограниченное число делений.

Пластичность — способность соматических стволовых клеток одной ткани трансдифференцироваться в зрелые клетки иной тканевой специфичности.

Потеря гетерозиготности (LOH, loss of heterozygosity) — потеря второй аллели одного и того же гена в форме делеции, которая может быть определена цитогенетически. Потеря гетерозиготности часто сопровождается полной инактивацией гена опухолевой супрессии и ведет к возникновению опухоли.

Проксимальные и дистальные сайты в промоторах генов определяются по их расположению относительно точки инициации транскрипции. Проксимальные сайты расположены ближе, дистальные — дальше от точки инициации транскрипции.

Протеасома — многокомпонентный ферментный комплекс, расположенный в цитозоле и катализирующий деградацию белков в короткие пептиды.

Ремоделирующие хроматин комплексы — многокомпонентные белковые комплексы, которые благодаря выделению энергии при гидролизе АТФ вызывают изменения в структуре нуклеосом и, таким образом, регулируют доступ к ДНК белков, влияющих на транскрипцию, репарацию и репликацию ДНК.

Рестрикционные (контрольные) точки (checkpoints) клеточного цикла — точки перехода из одной фазы клеточного цикла в другую, в которых прогрессия клеточного цикла может быть остановлена регуляторными негативными сигналами. Термин «контрольная точка» включает сигнальные механизмы, которые отслеживают события клеточного цикла и передают информацию эффекторным элементам машины клеточного цикла

РНК-полимераза I — фермент, участвующий в транскрипции рибосомальных РНК.

РНК-полимераза III — фермент, участвующий в транскрипции РНК, осуществляющий транспорт белков в рибосомы.

Презенилин-1 и -2 (Presenilin-1, 2, Ps-1, 2) — протеиназы, входящие в состав комплекса γ -секретазы. С мутацией гена PS-1, сопровождающейся его активацией и отложением продуктов протеолиза предшественника β -амилоида, связывают патогенез болезни Альцгеймера.

Сайленсинг — временная инактивация гена, возникающая в результате модификаций его регуляторной области, например путем метилирования остатков цитозина в сайтах связывания белков — транскрипционных регуляторов.

Секвестрирование — функциональная инактивация белка путем образования комплекса, в котором данный белок не может проявить свою активность.

Секретаза j (j-secretase) — многокомпонентный белковый комплекс, выполняющий третье ферментативное разрезание молекулы Notch в липидном слое мембраны. Комплекс j-секретазы включает протеазы презенилин-1 и -2.

Стромелизин-1 (stromelysin-1) — ген, кодирующий металлопротеиназу, вызывающую деградацию внеклеточного матрикса и ремоделирование тканей при клеточном старении.

Убиквитин — белок с небольшой молекулярной массой, обладающий способностью полимеризоваться на белках-мишенях и опосредовать их деградацию в протеасомах.

Факторы выживания — факторы, которые препятствуют активации апоптоза и таким образом предотвращают гибель клетки.

Фоллистатин (follistatin) — антагонист белков семейства активина.

Херегулины (heregulins) — семейство ростовых факторов, подобных эпидермальному фактору роста, которые накапливаются в тканях при клеточном старении.

Хромодомен (chromodomain) — белковый домен, который специфически связывает метилированные остатки лизина в гистонах H3 и H4. Хромодомены найдены в некоторых негистоновых регуляторных белках, например в белках семейства HP-1.

Центросомы — белковые органеллы, которые служат в качестве организующих центров микротрубочек митотического веретена в большинстве животных клеток.

Цитокинез — окончание процесса клеточного деления. Включает разделение цитоплазматических компонентов и формирование двух дочерних клеток.

Шванновские клетки (по имени Т. Шванна, немецкого биолога, основоположника клеточной теории) — клетки, которые образуют оболочку периферических нервных волокон, выполняют опорную и трофическую функции.

Эмбриональный нокаут — полная функциональная инактивация белка в эмбриональном периоде путем генетической модификации обеих аллелей кодирующего его гена.

Эпигенетическое наследование — тип наследования, при котором передача наследственных свойств зависит не от последовательности ДНК, а от изменения ее формы или структуры хроматина.

Akt — семейство белковых киназ, члены которого также называются протеинкиназами B (Pkb). У человека известно 3 гена семейства АКТ: АКТ1, АКТ2 и АКТ3. Эти гены кодируют ферменты — серин/треониновые киназы, участвующие в регуляции деления, роста, апоптоза и выживания в различных клеточных популяциях, включая стволовые клетки. Akt содержат домен PH (Pleckstrin homology), который связывает с высоким аффинитетом PIP3 — продукт киназы Pi3k. Связанный на мембране с PIP3, Akt фосфорилируется киназой Pdk1 (phosphoinositide dependent kinase 1) по Thr308, а mTorc2 (mammalian target of rapamycin complex 2) по Ser473. Фосфорилирование Akt активирует ее и дает возможность вызывать разнообразные клеточные «ответы».

ANT (altered nuclear transfer — перенос измененных ядер) — метод формирования бластоцисты с использованием ядер соматических клеток, несущих мутацию (например, мутацию гена CDX2), которая исключает возможность формирования эмбриона, но сохраняет способность клеток бластоцисты превращаться в нормальные ЭСК.

Ap1 (activator protein 1) — активаторный белок 1, транскрипционный фактор, представляющий собой гетеромерный комплекс, включающий мономерные белки семейства c-Fos, c-Jun, ATF или JDP. Ap1 изменяет экспрессию генов в ответ на разнообразные стимулы, включая цитокины и ростовые факторы, и участвует в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Связывает специфический сайт ДНК с помощью мотива «лейциновая застеежка».

Apaf1 (apoptotic protease activating factor 1) — адапторный белок, взаимодействующий с цитохромом С и прокаспазой 9, что способствует образованию апоптосомы и активации внутриклеточного апоптоза.

APC* (anaphase promoting complex) — комплекс, способствующий анафазе. Убиквитиновая лигаза, известная также как фермент E3, представляет собой многокомпонентный белковый комплекс, который катализирует распознавание белка-мишени и его убиквитинацию. Наиболее значительную роль APC* играет при прохождении клеткой фазы М. APC* распознает специфический мотив в субстра-

те (например, деструктивный мотив или мотив KEN), что является сигналом для его убиквитинации.

APC (*Adenomatous polyposis coli*) — ген, мутированный при аденоматозном полипозе толстого кишечника. Мутации APC играют ведущую роль в возникновении семейного аденоматозного полипоза толстого кишечника (FAP).

App — белок-предшественник β -амилоида. Экспрессируется в нейронах, активно протеолизирован презенилином-1 при болезни Альцгеймера, вызывая образование бляшек, играющих патогенетическую роль при этом заболевании.

Argonaute (AGO) — семейство белков, взаимодействующих с мРНК или миРНК с образованием комплексов RISC, ингибирующих активность мРНК.

Atf-1 (*activating transcription factor-1*) — член семейства транскрипционных факторов ATF/CREB, которые содержат домен типа «лейциновая застеежка», взаимодействующий с консенсусным элементом цАМФ (CRE). Связывает ДНК как гетеродимер с транскрипционными факторами Creb1 или Crem.

Atm/Atr — (*ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia Rad 3 related*) — киназы, мутации генов которых найдены при заболевании «атаксия телеангиэктазия». Эта болезнь характеризуется преждевременным старением и повышенной склонностью к развитию злокачественных новообразований. Киназы Atm/Atr играют важную роль в механизме контрольной точки повреждения ДНК.

Aurora — серин/треонин белковые киназы, которые активируются в начале фазы М клеточного цикла и участвуют в процессах конденсации хромосом, сборке митотического веретена, прикреплении хромосом к кинетохорам, разделении сестринских хроматид и цитокинезе.

Axin (аксин) — белок, играющий роль скелетного белка в комплексе, способствующем разрушению β -катенина.

BCC (*basal cell carcinoma*) — базальная клеточная карцинома, опухоль, происходящая из клеток базального слоя эпидермиса.

Bcl-9/Lgs — транскрипционный коактиватор белков семейства Wnt. Опосредует физическое взаимодействие между белком Pygopus и β -катенином в ядре.

BFU-E (*erythroid burst-forming unit*) — эритроидная единица, формирующая крупную колонию эритроидных клеток, менее дифференцированных по сравнению с клетками, образующимися из эритроцитарной колониеформирующей единицы (CFU-E). BFU-E, как и CFU-E, обладает способностью образовывать колонии, которые содержат только клетки эритроидной линии.

BH (*Bcl homology*) — домены гомологии с Bcl, консервативные белковые последовательности, впервые обнаруженные в структуре белка Bcl-2, а затем найденные у всех членов семейства Bcl, участвующих в регуляции апоптоза.

bHLH (*basic helix-loop-helix*) — семейство транскрипционных регуляторов, содержащих ДНК-связывающий домен (*basic*) и димеризационный домен (*helix-loop-helix*). В активном состоянии белки семейства bHLH образуют между собой димеры, которые влияют на активность генов, регулируя клеточные функции, например мышечную дифференцировку. (Подробно разбираются в гл. 7.)

Bmi1 — член семейства транскрипционных факторов Polycomb (PcG), регулирующих активность хроматина (рассматривается в гл. 6).

BMP (*bone morphogenetic proteins*) — семейство транскрипционных факторов, которые входят в суперсемейство белков TGF β (рассматриваются в гл. 7).

Bmp antagonists — антагонисты белков семейства BMP. Белки этого семейства взаимодействуют с лигандами Bmp, препятствуют активации их рецепторов и передаче сигналов внутрь клетки. К антагонистам Bmp относятся noggin, chordin и белки семейства Dan (см. гл. 7). В нормальных условиях антагонисты Bmp ре-

гулируют процессы органогенеза, участвуют в регуляции функций эмбриональных и соматических стволовых клеток. Например, белок Gremlin из семейства Dap ингибирует Bmp 2, 4, 7, что у мышей активирует экспрессию FGF и Shh. Гиперактивация Gremlin найдена при саркомах и многих видах карцином, включая рак шейки матки, легких, яичников, почек, молочной железы, толстого кишечника и поджелудочной железы.

Bptf (bromodomain and PHD finger transcription factor) — транскрипционный фактор, содержащий бромодомен и растительный пальцеподобный гомеодомен. Является компонентом ремоделирующего хроматин комплекса NURF.

BRG1 (brahma-related gene 1) — ген 1, родственник brahma. Продукт гена BRG1 — АТФаза, которая является компонентом семейства комплексов SWI/SNF человека, ремоделирующих хроматин. Обладает способностью физически взаимодействовать с pRb.

Bub1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog) — гомолог 1, который не ингибируется бензимидазолом в процессе почкообразования у дрожжей; киназа, участвующая в регуляции контрольной точки митотического веретена. Фосфорилирует белок, входящий в состав комплекса контрольной точки митотического веретена, и активирует выход из митоза. Мутации гена BUB1 являются причиной анэуплоидии и возникновения различных форм рака.

Cak (Cdk-activating kinase) — белковая киназа, которая активирует Cdk при фосфорилировании треонинового остатка (Thr160 в Cdk2 человека) в ее Т-петле.

c-Abl — тирозиновая киназа, активность которой регулируется в клеточном цикле путем взаимодействия с pRb. Функциональная активность c-Abl связана с ее способностью фосфорилировать тирозиновые остатки С-концевого домена (CTD) РНК-полимеразы II. Фосфорилирование CTD способствует переключению полимеразы II со стадии инициации на стадию элонгации транскрипции.

CamKII — киназа II, зависящая от кальция и кальмодулина, передает сигналы в сигнальном пути Wnt/Ca²⁺.

Cbf- α 1 (core binding factor α 1) — основной связывающий фактор α 1, транскрипционный фактор костной дифференцировки.

ССААТ — мотив в промоторе генов, связывает транскрипционный фактор Nf- γ .

CD24 — белок, устойчивый к нагреванию.

CD29 — β 1-интегрин, одна из цепей интегрина рецептора клетки, взаимодействующего с лигандами внеклеточного матрикса.

CD34 — гликопротеин с молекулярным весом 34 кДа, маркер СКК и других клеток-предшественников различной тканевой специфичности.

CD38 — маркер поверхности лимфоцитов.

CD44 — рецептор для гиалуроновой кислоты и фибронектина.

CD49f — α 6-интегрин, одна из цепей интегрина рецептора клетки, взаимодействующего с лигандами внеклеточного матрикса.

CD95 (Fas/Apo1), Tnfr1 и Dr3 (Apo3/Ws11) — рецепторные молекулы, принадлежащие семейству фактора некроза опухоли/фактора роста нервов TNF/NGF (tumor necrosis factor/nerve growth factor).

Cdc6 — белок, входящий в состав пререпликационного комплекса.

Cdc20 — активаторная субъединица комплекса APC*, наиболее важная роль которой заключается в инициации метафазно-анафазного перехода.

CDE-CHR (cell cycle dependent element-cell cycle homology region) — олигонуклеотидная последовательность в промоторах генов клеточного цикла, которая

регулирует их активность путем связывания супрессорных белков семейства E2F и других пока не идентифицированных факторов.

Cdh1 — активаторная субъединица комплекса APC*, наиболее важная роль которой заключается в поддержании активности APC* в позднем митозе и фазе G1.

Cdk (Cyclin dependent kinase) — циклинзависимые киназы; ферменты, активность которых зависит от их регуляторных составляющих — циклинов, синтезирующихся и разрушающихся в клеточном цикле с определенной периодичностью.

CdkI (Cyclin dependent kinase inhibitors) — ингибиторы циклинзависимых киназ; белки, взаимодействующие с Cdk или с комплексами циклин — Cdk и ингибирующие их активность.

CDX — семейство транскрипционных факторов, эволюционно консервативных по структуре и функции. В различных организмах они играют важную роль в формировании переднезаднего рисунка тела и кишечного эпителия. Гены семейства CDX необходимы для экспрессии тканеспецифических кишечных генов и регуляции пролиферации, адгезии, апоптоза в клетках кишечника. В зависимости от специфического микроокружения продукты генов CDX могут проявлять свойства опухолевых супрессоров или протоонкогенов.

C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) — семейство CCAAT/инхансерсвязывающих белков, транскрипционных факторов, взаимодействующих с CCAAT-боксом в промотерной области генов-мишеней. Содержат распознающий ДНК основной домен, N-концевой трансактивационный домен и спиральную структуру типа «лейциновой застёжки», обеспечивающую димеризацию белков этого семейства. Белки семейства C/EBP вовлечены в контроль клеточной пролиферации, роста, жировой дифференцировки и иммунного ответа.

Cep-1 — гомолог опухолевого супрессора p53 у червей *C. elegans*, действует на мишени подобно dp53 у мух *Drosophila*.

Cer (Cerberus) — группа белков-антагонистов сигнальных путей Wnt и BMP.

CFU-E (erythrocyte colony-forming unit) — эритроцитарная колониеформирующая единица, клетка-предшественник, дающая начало эритроидным элементам крови.

CGNP (cerebellum granular neural precursors) — гранулярные нейральные клетки-предшественники мозжечка. Являются мишенями белков Shh и Bmi1, которые активируют их пролиферативную активность.

Chibby — ядерный белок, который физически взаимодействует с β -катенином и тормозит его транскрипционную активность. Chibby убиквитарно экспрессируется на ранних стадиях дифференцировки ЭСК, его уровень повышается в ходе кардиогенной специализации. Промотор гена Chibby содержит множественные сайты связывания кардиоспецифического фактора Nkx2.5 и позитивно регулируется Nkx2.5. Повышенная экспрессия Chibby усиливает, а инактивация — нарушает кардиомиоцитарную специализацию ЭСК.

ChIP (chromatin immunoprecipitation) — иммунопреципитация хроматина, метод оценки взаимодействия ДНК с белками *in vivo*.

Chk1/Chk2 (checkpoint kinases) — киназы контрольных точек клеточного цикла, инициируют активацию механизма контрольной точки повреждения ДНК.

Cip/Kip — семейство белков-ингибиторов Cdk в клетках животных; включает p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, которые взаимодействуют с обеими единицами комплекса циклин — Cdk.

C-kit (CD 117) — тирозинкиназный рецептор, который связывается с лигандом SCF (stem cell factor), кодируется геном Steel.

Cmf1 — член семейства белков LEK, которые вовлечены в регуляцию митоза. Cmf1 экспрессируется в сердечных и скелетных миоцитах. В клетках эмбриона и плода Cmf1 находится в ядре, а в дифференцирующихся миобластах — в цитоплазме. Функция Cmf1, возможно, заключается в регуляции накопления миозина в дифференцирующихся миоцитах.

Cntf — цилиарный нейротрофический фактор, активирующий киназу семейства Jak. Действие Cntf ограничено нервной системой, где он облегчает синтез нейротрансмиттера и рост отростков нейронов в определенных клеточных популяциях.

CREB (cAMP response element-binding proteins) — семейство транскрипционных факторов, связывающих мотив ДНК, называемый (CRE), и изменяющих транскрипцию генов. Белки Creb родственны по структуре и функциям факторам Crem (cAMP response element modulator) и Atf-1 (activating transcription factor-1). Белки Creb проявляют активность у человека и многих животных, действуют в клеточном ядре, где образуют транскрипционно активные комплексы с белками p300/Cbp.

Crm1 — белок, опосредующий экспорт из ядра транскрипционных факторов E2f4–5 путем взаимодействия с сигнальной экспортной последовательностью в их структуре.

CSF (colony stimulating factor) — колониестимулирующий фактор, поддерживает рост кроветворных колоний различных линий.

Csl (suppressor of hairless) — супрессор фактора hairless, транскрипционный фактор, взаимодействующий с Nidc в регуляции транскрипции, изменяет свою исходную супрессорную активность на активаторную после образования комплексов с Nidc.

Ctbp (C-terminus binding protein) — белок, связывающий С-концевой участок E1a аденовируса, взаимодействует со множеством транскрипционных факторов и опухолевых супрессоров, например с факторами семейства LEF/TCF, pRb; функциональная активность соответствует опухолевой супрессии.

Ctip — супрессор транскрипции, действие которого опосредовано взаимодействием с белком Ctbp. Ctip связывается с «покетным» доменом pRb.

Cullin — одна из основных субъединиц комплексов SCF и APC*.

Daam (Dishevelled-associated activator of morphogenesis) — активатор морфогенеза, связанный с Dishevelled, опосредует взаимодействие Dsh с белками семейства Rho.

DAPI — краситель, используемый для окраски ДНК при иммунофлуоресценции.

Dapt — ингибитор γ -секретазы, который препятствует протеолитическому разделению молекулы Notch ферментом Ps-1.

D-box (destruction box) — специфическая аминокислотная последовательность — мотив (RXXLXXXXN) в белках-мишенях комплекса APC*.

Delta — семейство белков, выполняющих функцию лигандов Notch, включая белки Dll 1, 3, 4 (Delta-like ligand 1, 3, 4) — лиганды 1, 3, 4, подобные Delta.

Dishevelled (Dsh) — белки, опосредующие передачу сигналов лигандов Wnt с плазматической мембраны в цитозоль во всех сигнальных путях, активируемых сигнальным путем Wnt.

Dkk (Dickkopf) — семейство антагонистов сигнального пути Wnt, препятствующих образованию рецепторного комплекса Fz-Lrp5/6.

DNA damage checkpoint (DNA damage response) — контрольная точка повреждения ДНК, комплекс биохимических реакций, которые активируются при

повреждении или нарушении репликации ДНК, способствуя остановке клеточного цикла и репарации ДНК.

Dnmt (DNA methyltransferases) — метилтрансферазы ДНК; метилируют остатки цитозина в динуклеотиде CpG, что облегчает долгосрочный сайленсинг генов.

dp53 — гомолог опухолевого супрессора p53 у мух *Drosophila*; трансактивирует промотер гена, который содержит консенсусный связывающий сайт p53 человека.

Dsh — см. Dishevelled.

E1a — онкопротеин аденовируса.

E2F — семейство транскрипционных факторов, регулирующих прогрессию клеточного цикла путем участия в различных механизмах, опосредующих репликацию, репарацию и митоз (подробно рассматриваются в гл. 5).

E2f1 — белок семейства транскрипционных факторов E2F, опосредующий инициацию апоптоза, активируется в переходе G1/S.

E7 — онкопротеин вируса папилломы человека (HPV).

E47 — убиквитарный белок семейства bHLH, образующий функционально активные димеры с одними транскрипционными факторами, например MyoD, и нефункциональные димеры — с другими, например с Hes1.

EGF (epidermal growth factor) — эпидермальный ростовой фактор, играет важную роль в регуляции клеточного роста, пролиферации, дифференцировки путем связывания со специфическими рецепторами и активации внутриклеточных протеинкиназ. EGF человека — полипептид с ММ 6,045 кДа, включающий 53 аминокислотных остатка и 3 внутримолекулярные дисульфидные связи.

EGL (external germinal layer) — внешний зародышевый слой мозжечка, в котором располагаются мозжечковые гранулярные нейральные клетки-предшественники (CGNP).

E1f-1 — лимфоидный транскрипционный фактор, родственник Ets. Подобно белкам семейства E2F, связывает гипофосфорилированные формы pRb через домен, опосредующий транскрипционную активацию.

Elk — транскрипционный фактор, входящий в семейство ETS и опосредующий немедленный клеточный ответ на митогенную стимуляцию. Активируется сигнальным путем MAPK и формирует комплекс с Srf (фактором сывороточного ответа). Этот комплекс конститутивно связывается со специфической последовательностью ДНК, названной SRE (serum response element), которая обнаружена в промотерах гена FOS и других генов немедленного ответа.

EMGA (electrophoresis mobility gel shift assay) — метод сдвига электрофоретической подвижности в геле; применяется для идентификации белков, связывающих специфические нуклеотидные последовательности в промотерах генов.

Emi1 — ингибитор белка Cdc20, активатора APC*. Предотвращает действие APC* путем образования комплексов с его субстратами. Инактивируется в начале митоза.

EphrinB (EphB) — семейство белков тирозинкиназной природы, которые играют роль лигандов и рецепторов, контролирующих расположение эпителиальных клеток в градиенте Wnt/ β -катенин вдоль оси ворсина—крипта и клеток Ранетх в основании крипты (подробно охарактеризованы в гл. 7).

ER (endoplasmic reticulum) — эндоплазматический ретикулум, органелла эукариотических клеток, которая образует взаимосвязанную сеть трубок, пузырьков и цистерн внутри клетки. ER выполняет несколько функций: трансляцию белков; сборку и транспорт белков, функционирующих в клеточной мембране (например, трансмембранных рецепторов); секрецию белков из клетки (например, пищева-

рительных ферментов); секвестрацию кальция; продукцию и хранение гликогена, стероидов и других макромолекул.

Erk (extracellular signal-regulated kinase) — киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; эффекторная киназа сигнального пути MAPK, которая активируется фосфорилированием киназы Mek, опосредует активацию генов немедленного ответа (c-JUN, c-FOS, c-MYC), одним из результатов действия которых является синтез циклинов фазы G1, инициирующих деление клетки.

Fadd (Fas receptor-associated death domains) — домены смерти, ассоциированные с рецептором Fas; адапторный белок, опосредующий передачу сигналов, активирующих апоптоз.

Fak (focal adhesion kinase) — фокальная адгезионная киназа, активирует внутриклеточные сигнальные пути, облегчающие выживание, рост и деление клетки.

FAP (familial adenomatous polyposis of the colon) — семейный аденоматозный полипоз толстого кишечника, наследственное заболевание, возникающее вследствие мутаций в гене APC.

Fast (fusion-associated small transmembrane proteins) — трансмембранные белки (ММ 10 кДа), вызывающие слияние клеток; кодируются реовирусами. Содержат в структуре консервативные домены, включая расположенный в центре молекулы трансмембранный домен, цитоплазматический домен, гидрофобный мотив в N-концевом домене и четыре консервативных цистеиновых остатка.

F-box protein — белок, содержащий F-box, одна из 3 основных субъединиц комплекса SCF, ответственная за распознавание белка-мишени.

FGF (fibroblast growth factors) — семейство фибробластных ростовых факторов, которое включает более 20 различных белков и более 4 типов рецепторов тирозинкиназной природы.

Flk1/Kdr/Vegfr2 (fetal liver kinase 1/kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 — фетальная печеночная киназа 1/рецептор киназного инсерционного домена/рецептор 2 типа сосудистого эндотелиального ростового фактора) — рецептор тирозинкиназной природы, опосредующий большинство известных клеточных ответов на VEGF. Один из мезодермальных маркеров в эмбриогенезе и наиболее ранний дифференцировочный маркер эндотелиальных клеток. Экспрессируется на сердечных клетках-предшественниках эндотелия и гладких мышцах сосудов (рассматривается в гл. 1).

FOX (Forkhead box proteins) — семейство транскрипционных факторов, которые действуют путем фосфорилирования и ацетилирования мишеней и облегчают доступ к хроматину других транскрипционных факторов. Содержат в структуре мотив «forkhead», состоящий из 80–100 аминокислот и опосредующий связывание с ДНК. Продукты генов FOX относятся к семейству белков HtH (helix-turn-helix). Участвуют в регуляции разнообразных клеточных функций, включая дифференцировку, рост, пролиферацию и выживание.

Fringe — семейство белков, которые селективно ингибируют ответ рецепторов Notch к лигандам, подобным Serrate.

Frizzled (Fz) — семейство рецепторных белков, которые распознают лиганды семейства Wnt путем образования рецепторных комплексов с различными рецепторами.

sFrp (serum Frizzled related proteins) — сывороточные белки, подобные по строению рецепторам Frizzled, функциональные антагонисты Wnt. Благодаря своему подобию рецепторам Frizzled, взаимодействуют с белками Wnt и секвестрируют их.

Furin — протеаза, которая в аппарате Гольджи осуществляет первое протеолитическое разделение молекул рецептора Notch.

Gab1 (Grb2-associated binder protein) — адапторный белок, ассоциированный с Grb2, взаимодействует с тирозиновой фосфатазой Shp2, с липидной киназой Pi3k и стабилизирует положение комплекса Shp2/Gab1/Grb2, связанного с активированным тирозинкиназным рецептором.

Gal4 — белок дрожжевых клеток, играющий роль транскрипционного регулятора. В структуре белка выделяют 2 домена, один из которых опосредует связывание ДНК (ДБД), а другой — транскрипционную активацию (ТАД).

GATA — семейство транскрипционных факторов, включающее шесть различных белков. Факторы Gata содержат 2 высококонсервативных домена типа «цинковые пальцы». С-концевой «цинковый палец» опосредует связывание фактора Gata с ДНК, а N-концевой — способствует взаимодействию с транскрипционным фактором Fog (Friend of Gata). В свою очередь, Fog взаимодействует с различными транскрипционными факторами, формируя комплексы, которые изменяют структуру хроматина и активность генов. Специфическая активность факторов семейства GATA заключается в регуляции энтодермальной и кроветворной дифференцировки как на уровне стволовых клеток, так и с помощью активации терминальных дифференцировочных программ в детерминированных кроветворных клетках. (Роль транскрипционных факторов Gata-4, -6 в регуляции функций ЭСК рассматривается в гл. 1.)

Gfap — глиальный фибриллярный кислый протеин, маркер нейральных стволовых клеток.

gp130 (гликопротеин 130) — белок семейства цитокиновых рецепторов; при взаимодействии с Rlf формирует димерный рецептор, который связывает лиганд Lif и передает его активирующее действие киназам семейства Jak.

Grb2 — адапторный белок, связывающий рецепторные тирозиновые киназы с сигнальным путем, опосредуемым Ras. В клетках млекопитающих Grb2 взаимодействует с помощью домена SH2 со специфическими фосфотирозинами на активированных рецепторных тирозиновых киназах, а с помощью домена SH3 (Src homology region 3) — с богатым пролином мотивом в белке Sos. Мыши с инактивированным белком Grb2 погибают в раннем эмбриональном периоде.

Groucho (TLE у млекопитающих) — семейство транскрипционных репрессоров, ингибирующих активность нескольких функционально различных семейств транскрипционных активаторов, например Wnt и Notch. Не обладают собственной ДНК-связывающей способностью.

Gsk3 β (glycogen synthase kinase 3 β) — киназа 3 β гликоген синтазы, гомолог у беспозвоночных называется shaggy/zeste white 3. Принимает участие в фосфорилировании β -катенина, которое придает ему специфический сигнал для убиквитинации.

Gsn5 — гистоновая ацетилтрансфераза, переносит ацетильную группу на лизины K9, K14, K18 гистона H3, является субъединицей ацетилтрансферазных комплексов ADA и SAGA.

HAT (histone acetyltransferases) — семейство гистоновых ацетилтрансфераз, ацетилирующих гистоны, что облегчает доступ к ДНК транскрипционных активаторов и повышает активность различных генов.

Hbp1 — транскрипционный супрессор, принадлежащий семейству белков с высокой мобильностью, содержит два мотива LxCxE и взаимодействует с pRb или p130, опосредуя репрессию генов (например гена N-MYC).

HDAC (histone deacetylases) — семейство гистоновых деацетилаз, которые путем удаления ацетильных групп гистонов вызывают конденсацию хроматина и ингибируют транскрипционную активность генов.

HGF (hepatocyte growth factor) — фактор роста гепатоцитов, относится к паракринным факторам, секретируется мезенхимальными клетками и действует преимущественно на эпителиальные и эндотелиальные клетки, регулирует клеточный рост и подвижность путем активации тирозинкиназного сигнального пути после связывания рецептора протоонкогенного фактора с-Met. Секретируется в форме одной неактивной полипептидной цепи, которая затем расщепляется сериновыми протеазами на α -цепь с ММ 69 кДа и β -цепь с ММ 34 кДа.

Hedgehog (HH) — сигнальный путь, активирующийся при взаимодействии лигандов Sonig Hedgehog (Shh), Indian или Disert с рецепторами Patched (Ptc). Лиганды HH являются секреторными внеклеточными молекулами. HH участвует в регуляции функций различных видов СК.

Herp (Hes related proteins) — семейство белков, родственных Hes.

HES (Hairy/Enhancer of Split) — ген-мишень сигнального пути Notch.

HEY, CHF, HRT — гены-мишени Notch, родственные генам HES.

Hmt (histone methyltransferases) — гистоновые метилтрансферазы, модифицируют гистоны путем переноса метильных групп.

HOX — группа гомеотических селекторных генов, которые впервые были открыты у мух *Drosophila*. В эмбриональном периоде регулируют формирование рисунка тела, а у взрослых животных вовлечены в регуляцию функций стволовых клеток. Белки семейства HOX содержат гомеодомен (HD) — высококонсервативную ДНК-связывающую последовательность типа helix-turn-helix, включающую 60 аминокислот и найденную у всех эукариотических организмов.

Hoxb4 — член семейства транскрипционных факторов HOX.

HP-1 (heterochromatin proteins-1) — семейство белков, участвующих в образовании гетерохроматина. Взаимодействуют с метилированным лизином 9 гистона H3 (H3K9me) и опосредуют сайленсинг генов путем привлечения «покетных» белков.

HPV (human papilloma virus) — вирус папилломы человека.

Human cloning, animal cloning (клонирование человека, клонирование животных) — клонирование целых организмов, основанное на технике переноса ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer). В процессе клонирования ядро соматической клетки зрелого организма, например клетки кожи или слизистой оболочки рта, переносят в яйцеклетку, лишенную ядра, таким образом формируя зиготу. После превращения *in vitro* зиготы в бластоцисту последнюю переносят в матку приемной матери до рождения нового организма.

ICAT (interacting β -catenin proteins) — взаимодействующие с β -катенином белки, семейство белков с ММ 9 кДа, селективно ингибирующих *in vivo* связывание β -катенина с транскрипционными факторами Tcf, но не нарушающих взаимодействие β -катенина с кадхерином в межклеточных соединениях. Уровень белков Icat не изменяется при активации или ингибции сигнального пути Wnt. В клетках с повышенным уровнем Wnt определяется β -катенин, взаимодействующий с белками Icat.

Id (Inhibitors of differentiation) — ингибиторы дифференцировки, относятся к транскрипционным регуляторам суперсемейства bHLH, не экспрессируют домен «b». При взаимодействии с гомологичными белками формируют димеры, которые действуют как доминантно негативные регуляторы, ингибируя дифференцировку клеток, но активируя их пролиферацию.

IGF-1 (insulin-like growth factor) — ростовой фактор, подобный по молекулярной структуре инсулину. Регулирует рост, деление и дифференцировку клеток, состоит из одной 79-аминокислотной полипептидной цепи с ММ 7649 Да.

IκB (Inhibitor of IκB) — ингибитор сигналов NF-κB.

IL-1 — см. Интерлейкин 1.

INF (*in vitro fertilization* — фертилизация *in vitro*) — слияние вне организма женской и мужской половых клеток с образованием зиготы, формированием *in vitro* бластоцисты и ее пересадкой в матку приемной матери.

Ink4 — семейство CdkI млекопитающих, включающее белки p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d}. Белки p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a} связывают Cdk4/6 и ингибируют их способность взаимодействовать с циклинами D.

Ino80 — АТФаза, входящая в состав многокомпонентного комплекса, содержащего актин и несколько родственных ему белков; обладает ремоделирующей хроматин активностью и 3'—5' ДНК-геликазной активностью.

Isl1 (Isl1 — «островок 1») — транскрипционный фактор, содержащий домены LIM и HD. Играет критическую роль в развитии сердца, нервной системы и поджелудочной железы. Он получил название «островок 1», так как вначале его экспрессия была найдена в островковых клетках поджелудочной железы. Дефицит или нарушение продукции Isl1 являются причиной нарушений развития, в частности, развития сердца. Экспрессируется на клетках-предшественниках различных линий сердечных клеток (рассматривается в гл. 1).

Iswi — нуклеосомная АТФаза, входящая в состав комплекса WSTF—ISWI, ремоделирующего хроматин.

Jagged — семейство белков, выполняющих функцию лигандов Notch.

Jak (Janus associated tyrosine kinases) — семейство тирозиновых киназ, названных по имени двуликого римского бога Janus. Передают сигналы, инициированные цитокинами, с клеточной поверхности в ядро путем фосфорилирования и активации белков семейства STAT.

Jnc^{MARK} (Jun N-terminal kinase) — одна из эффекторных киназ сигнального пути MARK.

KEN-box — специфическая аминокислотная последовательность, мотив (KENXXXN) в белках-мишенях комплекса APC*.

Ki67 — ядерный антиген, экспрессирующийся во всех фазах клеточного цикла делящихся клеток (G1, S, G2, M), но отсутствующий в покоящихся клетках (фаза G0). Используется для оценки количества делящихся клеток в нормальных и злокачественно трансформированных тканях.

Klh (Keyhole limpet hemocyanin) — гемоцианин моллюска, высокомолекулярный белок, широко используемый в качестве белка-носителя при получении антител; обладает свойством передавать иммуногенность связанному с ним низкоиммуногенному антигену.

Кнурек — белок, по биохимической природе относящийся к гепаринсульфат-протеогликанам. Кнурек является модулятором неканонического сигнального пути Wnt и усиливает передачу сигналов белком Wnt11a, играя важную роль в регуляции планарной клеточной полярности и конвергентного расхождения. Мутации гена КНУРЕК у полосатых рыбок (zebrafish) ведут к сужению тела и удлинению его от головы к хвосту, но не влияют на выбор клеточной судьбы.

Krm (Kremen) — семейство рецепторных белков, связывающих лиганды Dkk.

Kuzbanian — фермент семейства металлопротеиназ Adam, у мух *Drosophila* выполняет второе протеолитическое разделение молекулы Notch.

LEF/TCF (Lymphoid enhancer factors/T-cell factors) — семейство транскрипционных факторов, опосредующих передачу сигналов Wnt/β-катенин в ядре.

LEK — семейство белков, повсеместно экспрессирующихся в тканях мышцы в эмбриональном периоде. Белки Lek обладают способностью связываться с «по-

кетным» доменом белков семейства pRb и рассматриваются как универсальные регуляторы их активности. Инактивация белков Lek ингибирует клеточную пролиферацию и вызывает апоптоз. Функция белков Lek заключается, вероятно, в регуляции взаимодействия «пocketных» белков с их мишенями.

Lif (leukemia inhibitory factor) — фактор, ингибирующий лейкемию, белок семейства цитокинов IL-6, поддерживает рост эмбриональных стволовых клеток мыши при их культивировании *in vitro* в присутствии фетальной бычьей сыворотки.

LIM homeodomain proteins (гомеобоксные белки, содержащие домен LIM) — семейство транскрипционных факторов, название которых произошло от первых букв трех генов семейства HOX, кодирующих структурно подобные белки Lin 11, Isl1 и Msc-3. Эти белки содержат в дополнение к гомеодомену две копии консервативного мотива Cys-His типа «цинковый палец».

Lkb1/Stk1 — серин/треониновая киназа, которая регулирует клеточную полярность, относится к опухолевым супрессорам. Мутации гена LKB1/STK1 и дефицит его продукта вызывают синдром Peutz-Jeghers, аутосомально-доминантное заболевание, характеризующееся полипами желудочно-кишечного тракта, пигментированными пятнами на коже, слизистых рта и склонностью к другим неоплазиям.

Lrp5/6 (receptor related proteins) — белки, родственные рецепторам, выполняют функцию корецепторов Fz при образовании комплексов, распознающих лиганды Wnt.

MAM-L (Mastermind-like — подобный Mastermind) — семейство белков, транскрипционных коактиваторов Ncd (цитоплазматического домена Notch).

MAPK (mitogen activated protein kinases) — белковые киназы, активируемые митогенами. Сигнальный путь, активирующий деление клетки путем передачи в ядро сигналов с рецепторных тирозинкиназных рецепторов, взаимодействующих с митогенами.

MASH1 (mammalian achaete-scute homolog 1) — ген нейрогенеза млекопитающих, является мишенью белков семейства Hes.

MATH1 — ген сигнального пути Notch, продукт которого супрессирует дифференцировку клеток-предшественников в клетки секреторного ряда кишечного эпителия: нейроэндокринные, кубковидные клетки и клетки Paneth.

Mcm — семейство белков, входящих в состав пререпликационного комплекса.

Mcm7 — белок семейства Mcm, физически взаимодействующий с N-концевым участком pRb.

M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) — макрофагальный колониестимулирующий фактор, секретируемый цитокин, стимулирует деление и дифференцировку СКК в макрофаги.

Mdm2 (mouse double minute 2) — убиквитиновая лигаза, инактивирующая p53.

Mef2c (myocyte enhancer factor 2c) — транскрипционный фактор семейства MEF2. Функция белков этого семейства заключается в контроле экспрессии тканеспецифических генов, в частности генов кардиогенной и скелетно-мышечной дифференцировки. Функциональная активность Mef2c регулируется pRb.

Mel-18 — член семейства транскрипционных факторов PcG, регулирующих активность хроматина.

MGC — глиальные тканеспецифические клетки Мюллера, расположенные в зрительной оболочке глаза.

MLL1/2 — ремоделирующие хроматин комплексы, выявляемые при лейкемии смешанного типа; содержат гистоновые метилтрансферазы семейства SET1.

MMTV (mouse mammary tumor virus) — вирус опухоли молочной железы мышей.

Mpl — ацетилтрансфераза, вызывающая ацетилирование и активацию p53.

Msk1 (mitogen- and stress-activated protein kinase) — белковая киназа, активируемая митогенами и стрессорными факторами, например Erk и p38^{МАРК}.

mTor (mammalian target of rapamycin) — мишень рапамицина у млекопитающих; серин/треониновая киназа, которая регулирует клеточный рост, пролиферацию, подвижность и выживание клеток.

MYC, FOS, JUN — так называемые гены «немедленного клеточного ответа», которые индуцируются в клетке в течение первых 15 мин после действия ростовых факторов в условиях отсутствия синтеза белка. Индукция этих генов сопровождается активацией внутриклеточного каскада фосфорилирования различных белков, функциональным следствием которого является усиление пролиферации и роста клетки.

Nanog — транскрипционный фактор, экспрессия которого необходима для самоподдержания эмбриональных стволовых клеток (см. гл. 1).

Nf-at (nuclear factor of activated T-cells) — ядерный фактор активированных Т-клеток; семейство транскрипционных факторов, играющих важную роль в иммунном ответе, развитии сердца, скелетных мышц, нервной системы и регуляции различных функций стволовых и соматических клеток зрелого организма. Активность факторов Nf-at1—4 опосредована сигналами, вызываемыми ионами Ca²⁺ и передаваемыми кальмодулин-зависимой киназой и Pkc.

NF-κB — семейство убиквитарных ядерных факторов, контролирующих экспрессию генов, продукты которых участвуют в иммунном ответе, апоптозе и воспалительной реакции. Семейство NF-κB состоит из 5 белков, приобретающих функциональную активность после образования димеров. Активность белков Nf-κb индуцируется различными стимулами, включая Tnfα и IL-1, Т- и В-клетки, белки вирусов и стрессорные факторы. Нарушение регуляции в семействе NF-κB может быть причиной воспаления, аутоиммунных и вирусных болезней, опухолей.

Nicd (Notch intracellular domain) — внутриклеточный домен Notch, эффекторная часть молекулы Notch, образующаяся при его протеолитическом разделении и передающая сигналы внутрь клетки.

NKX2.5 — ген, кодирующий белок семейства гомеобоксных транскрипционных факторов, который экспрессируется в сердечной мышце у эмбрионов, плодов и зрелых организмов. NKX2.5 был вначале клонирован у мышей, а затем идентифицирован как ключевой регулятор развития сердца у позвоночных и более простых организмов. У мышей с инактивацией обеих аллелей NKX2.5 развитие сердца останавливается на стадии примитивной линейной трубки. Гомолог NKX2.5 у мух *Drosophila* (*tinman*) абсолютно необходим для образования мышечных структур, подобных сердцу. Ген NKX2.5 находится на вершине генетической иерархии, ответственной за развитие сердца у позвоночных (см. гл. 1).

Nlk/Nemo — серин/треониновая киназа; активируется в неканоническом сигнальном пути Wnt/Ca²⁺ белком Wnt5a, фосфорилирует белки семейства LEF/TCF и ингибирует их активность в каноническом сигнальном пути Wnt/β-катенин.

NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) — нежировая диабетическая/тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, включает дефицит врожденного и приобретенного иммунитета. Мыши с такой формой иммунодефицита используются для переноса опухолей, экспрессирующих чужеродные антигены гистонесовместимости, включая опухоли человека.

Notch — сигнальный путь, участвующий в регуляции функций различных СК.

NSCLC (non-small-cell-lung carcinoma) — немелкоклеточный рак легких, происходящий из легочного эпителия.

NURF (nucleosome remodeling factor) — один из комплексов, ремоделирующих хроматин. Содержит белок Bptf, который распознает трижды метилированный лизин 4 гистона H3 (H3K4me3). Регулирует экспрессию генов семейства NOX и генов белков температурного шока.

Oct3/4 — транскрипционный фактор, экспрессия которого необходима для самоподдержания эмбриональных стволовых клеток (описывается в гл. 1).

ORC (origin recognition complex) — комплекс, распознающий точки инициации репликации ДНК. Белковый комплекс, который связывает точки инициации репликации и рекрутирует другие белки, способствуя раскручиванию спирали ДНК и репликации.

p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} — продукты генов локуса Ink4, обладающие активностью ингибиторов циклин-зависимых киназ (CdkI) (см. гл. 2, 3).

p19^{Arf} — продукт локуса Ink4, ингибитор Cdk4/6, опухолевый супрессор, мРНК p19^{Arf} транскрибируется путем сдвига рамки считывания с гена, который служит матрицей для образования p16^{Ink4a}, поэтому p19 часто называют Arf (alternative reading frame). У человека имеет молекулярную массу 14 кДа, у мыши — 19 кДа.

p21^{Cip1/Waf1} — CdkI, регулирует активность киназы Cdk2 (см. гл. 2, 3).

p300/Cbp (Creb binding protein) — p300/связывающий Creb белок. Семейство, образованное двумя близкородственными белками, которые содержат гистонацетилтрансферазный домен, бромодомен, домен, опосредующий взаимодействие с белками Creb и Myb и являются коактиваторами многих транскрипционных факторов. Creb играет критическую роль в эмбриональном развитии, контроле роста и гомеостазе путем сопряжения ремоделирования хроматина и распознавания транскрипционных факторов. Белки этого семейства обладают способностью ацетилировать гистоны и негистоновые белки и стабилизировать взаимодействия дополнительных регуляторных белков с транскрипционными комплексами. Мутации генов p300/CREB обнаружены при различных злокачественных образованиях, включая лейкозы, карциномы кишечника, молочной, поджелудочной и предстательной желез.

p38^{MAPK} — одна из эффекторных киназ семейства MAPK.

p48 — адапторный белок, распознающий N-концевой домен pRb и опосредующий взаимодействие pRb с транскрипционными факторами, например с белками семейства E2F, Мус и др.

p53 — опухолевый супрессор, негативный регулятор деления клетки.

Par-1, Par-6, aPkc (атипичная протеинкиназа C) — члены семейства Par (partitioning-defective), которое включает семь негомологичных по структуре белков. Гены, кодирующие эти белки, были идентифицированы при скрининге материала, полученного из зиготы червей *C. elegans* с нарушением асимметричного деления. Члены семейства Par и их гомологи вовлечены в регуляцию клеточной полярности у червей *C. elegans*, мух *Drosophila* и позвоночных.

Parafibromin (Нурах — у мух *Drosophila*, Cdc73p — у дрожжей) — компонент комплекса PAF1 (polymerase associated factor 1). Уменьшение продукции Parafibromin ингибирует активацию сигнального пути Wnt, индуцированную β-катенином. N-концевой домен Parafibromin способен физически взаимодействовать с C-концевой областью β-катенина. Рекрутирование комплекса PAF1 к β-катенину, связанному с транскрипционными факторами Lef/Tcf, необходимо для инициации и элонгации транскрипции РНК-полимеразой II.

Patched (Ptc) — рецептор лигандов семейства Hedgehog.

Pax — семейство транскрипционных факторов, которые в процессе эмбрионального развития участвуют в формировании глаз, нервной системы, а в зрелом организме регулируют дифференцировку клеток различных тканей. Например, белок Pax5 необходим для образования В-лимфоцитов.

P/Caf (p300/Cbp-associated factor) — фактор, взаимодействующий с p300/Cbp, гистоновая ацетилтрансфераза, переносящая ацетильную группу на гистоны и активирующая транскрипционную активность.

PCP-CE (planar cell polarity — convergent extension — планарная клеточная полярность — конвергентное расхождение) — процесс в эмбриональном развитии, регулирующий положение клеток относительно оси тела и играющий ключевую роль в ее формировании.

Pcna (proliferating cell nuclear antigen) — ядерный белок пролиферирующих клеток; участвует в контроле репарации ДНК. Синтез Pcna регулируется факторами семейства E2F.

PDGF (platelet derived growth factor) — тромбоцитарный ростовой фактор.

PH (Pleckstrin homology — домен, гомологичный плекстрину) — аминокислотный мотив, впервые обнаруженный в тромбоцитарном белке Pleckstrin, а затем найденный более чем в 200 регуляторных белках человека, например в Sos, атипичных белковых киназах (aPkc), киназах Akt, Pdk1 и др. Функциональная роль PH заключается в распознавании локализованных на мембране PI(3, 4)P2 и PI(3, 4, 5)P3 — фосфатидилинозитол-2- и 3-фосфатов, продуктов киназы PI3k, играющих роль сайтов связывания киназ.

Pch1, Rnf2, Suz12, Eed — белки семейства Polycomb (PcG), участвующие в эпигенетических модификациях хроматина.

PHD (plant homeodomain — растительный гомеодомен) — специализированный аминокислотный мотив для связывания метилированных гистонов.

PI3k (phosphatidylinositol 3 kinase — фосфатидилинозитол-3 киназа) — липидная киназа, фосфорилирующая 3'-гидроксильную группу инозитольного кольца фосфолипидов. Передает сигналы от тирозиновых рецепторов цитоплазматической мембраны внутрь клетки, регулирует клеточный рост, клеточное деление и выживание, играет важную роль в регуляции функций ЭСК.

Pim1 — серин/треониновая киназа; фосфорилирует и активирует фосфатазу Cdc25a, усиливая накопление активной киназы — циклин E—Cdk2.

Pkc (protein kinase C) — серин/треониновая киназа; активируется ионами Ca^{2+} , которые освобождаются из эндоплазматического ретикулума под действием инозитол 1, 4, 5-трифосфата (IP3). В активном состоянии связывается на цитозольной стороне плазматической мембраны с диаглицеролом, образующимся, как и IP3, под действием Plc. В активном состоянии Pkc действует на множество мишеней, отличающихся в клетках различных линий.

Plc (phospholipase C) — внутриклеточный передатчик внеклеточных сигналов. Локализуется на цитозольной стороне клеточной мембраны и при активации внеклеточным сигналом протеолитически делит инозитольные фосфолипиды в цитозольном слое плазматической мембраны на 2 фрагмента, один из которых остается в мембране, способствуя активации Pkc, тогда как другой освобождается в цитозоль и стимулирует освобождение ионов Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума.

Plk1 (Polo kinase 1) — киназа, активирующая M-Cdk в ходе митоза путем фосфорилирования фосфатазы Cdc25c.

Polycomb (PcG) — семейство белков, регулирующих активность генов путем модификации хроматина. Формируют стабильные комплексы, которые связывают хроматин и поддерживают супрессивное состояние генов семейства NOX

в клетках, в которых гены *HOX* не были активированы. Играют важную роль в эмбриональном развитии, в регуляции самоподдержания эмбриональных и соматических стволовых клеток.

Porcupine (mot-1 — у червей, hWls — у человека) — белок, катализирующий пальмитилирование и активацию факторов семейства *Wnt*.

Pp2a (Protein phosphatase 2a — белковая фосфатаза 2a) — серин/треониновая фосфатаза с широкой субстратной специфичностью и разнообразными клеточными функциями. Pp2a состоит из 3 субъединиц, при взаимодействии которых формируются голоферменты с разными функциями и характеристиками. К мишеням Pp2a относятся белки *Raf*, *Mek* и *Akt*, гиперактивация которых вызывает онкогенные заболевания.

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) — семейство регуляторных белков, известных, прежде всего, как тканеспецифические транскрипционные регуляторы жировой дифференцировки. Вместе с белками семейства *C/EBP* активируют и поддерживают дифференцировку фибробластов в жировые клетки путем регуляции синтеза различных тканеспецифических ферментов.

PPP(S/T)P (пролин-пролин-пролин-(серин/треонин)-пролин) — сайт фосфорилирования в цитоплазматическом домене *Lgp5/6* и других белках.

pRb — продукт гена ретинобластомы, опухолевый супрессор, играющий ключевую роль в регуляции клеточного цикла и дифференцировки. Является основателем семейства *pRb*, в которое входят также белки *p130* и *p107*.

PRC1, PRC2 (Polycomb repressive complex) — репрессивные комплексы, формирующиеся белками семейства *Polycomb*; иницируют и поддерживают сайленсинг генов, в частности генов семейства *HOX*.

Pre-RC (pre-replication complex — пререпликационный комплекс) — комплекс, служащий основой для инициации репликации ДНК.

Prickle — белок, участвующий в сигнальном пути *Wnt*, регулирующем планарную клеточную полярность и конвергентное расхождение. У позвоночных найдено 2 гена, родственных гену *Prickle* мых *Drosophila*. У мышей белок *Prickle-2* обнаружен в нейронах головного мозга в тех же участках, где и белок *Dishevelled*. *Prickle* рекрутируется к клеточной мембране белком *Strabismus* и обладает способностью взаимодействовать с белком *Dishevelled*, таким образом участвуя в передаче сигналов *Wnt*, контролирующих клеточную полярность.

Pten — опухолевый супрессор, липидная фосфатаза; действует как негативный регулятор сигнального пути *PI3K* путем удаления 3'-фосфатной группы фосфоинозитов — продуктов *Pi3k*, *PI(3, 4)P3* и *PI(3, 4, 5)P3* (рассматривается в гл. 9).

Pugopus (*Pugo*) — транскрипционный коактиватор белков *Wnt*, конститутивно локализуется в ядре и служит в качестве якоря для ядерной локализации β -катенина.

Pu.1 — транскрипционный активатор, член семейства *Ets*; обладает свойством взаимодействовать с основными транскрипционными факторами *Tbp* и *TfIIId*. *pRb* распознает трансактивирующий домен *Pu.1* и отменяет его взаимодействие с основными транскрипционными факторами.

PSTAIR — α -спираль в аминоконцевом домене *Cdk*, названная по высококонсервативной аминокислотной последовательности ее первичной структуры, известная также как $\alpha 1$ -спираль. Опосредует взаимодействие *Cdk2* с циклином и вызывает молекулярную перестройку молекулы *Cdk*, играющую важную роль в ее активации.

Rad21 — белок, кодируемый геном *RAD21*, гомологичным одноименному гену дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, который вовлечен в репарацию двуните-

вых разрывов ДНК. Rad21 фосфорилируется в фазе М клеточного цикла. Связан с митотическим хроматином в центромерной области, что предполагает его участие в контроле слияния сестринских хроматид в митотических клетках.

Ras — суперсемейство гуанозиновых трифосфатаз (ГТФаз), содержащих ковалентно связанную липидную группу, опосредующую прикрепление белков семейства к внутренней стороне цитоплазматической мембраны. Функционируют как переключатели, переходя из активного состояния, в котором они связывают ГТФ, к неактивному состоянию, в котором они связывают ГДФ. Функции белков Ras заключаются в передаче сигналов, активирующих клеточное деление, дифференцировку и подвижность, с плазматической мембраны в различные части клетки.

Rbf — гомолог опухолевого супрессора pRb у мух *Drosophila*.

Rbp1, Rbp2 — белки, супрессирующие трансактивацию E2f и пролиферацию клеток в случае сверхэкспрессии. Связывают «покетный» домен pRb, содержат два репрессорных домена, один из которых связывает Hdac с «покетным» доменом pRb, что необходимо для активной репрессии, зависимой от Hdac.

Replication origin — точки инициации репликации, последовательности на хромосоме, в которых иницируется синтез ДНК путем раскручивания ее спирали и сборки машины репликации.

Rex-1 — транскрипционный фактор, имеющий в структуре домены типа «цинковые пальцы», является маркером ЭСК и экспрессируется в клетках ВКМ. Rex-1 обнаружен также в сперматоцитах и первичных овоцитах, в мезенхимальных стволовых клетках, нормальных и трансформированных эпителиальных клетках. Экспрессия Rex-1 регулируется продуктами генов SOX2, OCT3/4 и Nanog.

Rho — семейство белков типа G, включающее три ГТФазы: Cdc42, Rac и Rho; опосредуют связь активированных рецепторов клеточной мембраны с разнообразными сигнальными путями, связанными с активацией клеточной подвижности и опосредованными киназой Jun.

RING finger — домен в структуре комплексов SCF и APC*, связывающий ионы цинка и опосредующий взаимодействие убиквитиновых лигас с ферментом E2, катализирующим перенос убиквитина на белок-мишень.

RISC (RNA induced silencing complex) — комплекс, вызывающий сайленсинг генов путем инактивации мРНК гена-мишени. Регуляторную роль в комплексе RISC выполняет миРНК или мкРНК.

Rlif (рецептор ростового фактора Lif) — белок семейства цитокиновых рецепторов; при взаимодействии с gp130 формирует димерный рецептор, который связывает лиганд Lif и передает его активирующее действие киназам семейства Jak.

Rsk-2 — киназа, передающая сигналы EGF.

R-spondin 1 — агонист сигналов Wnt, который имеет в своей структуре домены тромбоспондина.

RUNX (Runt-related proteins) — семейство белков, родственных Runt, которые локализируются в ядерном матриксе, взаимодействуют с Groucho и Hes1, ингибируют взаимодействие между ними и отменяют транскрипционную репрессию, опосредованную Hes1.

SAHF (senescence associated heterochromatin foci) — фокусы гетерохроматина, связанные со старением.

Sa- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) — β -галактозидаза, ассоциированная с клеточным старением, которая экспрессируется в клетках, подвергающихся клеточному старению.

SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase) — один из наиболее хорошо изученных ремоделирующих хроматин комплексов, модифицирует гистоны H3 и H2B, обладает ацетилирующей и деубиквитинирующей активностью, регулирует активность PHK-полимеразы II.

Sca1 (Stem cell antigen 1) — антиген 1 стволовых клеток, маркер стволовых кроветворных клеток мыши, который также экспрессируется в клетках-предшественниках другой тканевой специфичности.

SCF — убиквитиновая лигаза, представляющая собой белковый комплекс, состоящий из 3 основных субъединиц: F-box, cullin и Skp-1. Опосредует деструкцию многих регуляторных белков фазы G1 и S клеточного цикла.

SCF/β-Trcp — убиквитиновая лигаза, включающая в качестве компонента F-box — β-Trcp; опосредует протеасомную деградацию некоторых белков, в частности, β-катенина, ингибитора APC* белка Emi1 (принято приводить название субъединицы F-box после SCF, чтобы показать специфичность комплекса SCF).

SCF/Skp2 — убиквитиновая лигаза, включающая в качестве компонента F-box — Skp2; опосредует деградацию ингибиторов Cdk1 — p27^{Kip1}, p21^{Cip1} и способствует входу клетки в фазу S клеточного цикла.

Sel-10 — убиквитиновая лигаза, процессирующая молекулу Notch, фосфорилированную в домене PEST.

Serrate — семейство белков, выполняющих функцию лигандов Notch.

SET — группа метилтрансфераз, вызывающих триметилирование лизина 4 гистона H3 (H3K4Me3), относятся к семейству генов Trithorax.

Shh (Sonig hedgehog) — один из трех членов семейства транскрипционных факторов Hedgehog (Hh) у млекопитающих. Сигнальный путь HH играет ключевую роль в развитии животных различных видов от мух до человека. Название Hedgehog (еж) происходит от гена, мутация которого у мух *Drosophila* ведет к появлению на поверхности тела личинки иглообразных отростков. В эмбриогенезе сигналы HH регулируют активность генов полярности тела и влияют на формирование плана тела. У мышей с нарушением передачи сигналов HH возникают дефекты формирования головного мозга, скелета, мускулатуры, желудочно-кишечного тракта и легких. В зрелых организмах белки Hh участвуют в регуляции активности CCK, поддержании клеточного состава и регенерации различных тканей. Нарушение в передаче сигналов HH сопровождается возникновением BCC, происходящей из стволовых клеток базального слоя эпидермиса.

Shp1, Shp2 — цитоплазматические тирозиновые фосфатазы, содержат в своей структуре домены SH2, взаимодействуют с тирозинкиназными рецепторами и регулируют их активность путем удаления активных фосфатных групп. Shp2 обладает способностью связывать адапторные белки Grb2 и Gab1 и усиливать взаимодействие активированного тирозинкиназного рецептора с сигнальными путями Ras и PI3K.

Sir (Sirtuins) — семейство белков, вовлеченных в организацию гетерохроматина в теломерах дрожжей; участвуют в эпигенетической форме передачи наследственных свойств, в частности структуры гетерохроматина. Белок Sir2 обладает деацетилазной активностью.

Sl1 — фактор селективности 1, транскрипционный фактор, усиливающий транскрипцию PHK-полимеразой I.

Smoothered (Smo) — трансмембранный белок, активирующий передачу сигналов Shh внутрь клетки.

Smurf — семейство убиквитиновых лигаз, инактивирующих белки Smad, которые передают сигналы транскрипционных факторов суперсемейства TGFβ.

SnoN — убиквитиновая лигаза, которая ингибирует активность сигнального пути TGF β , препятствуя образованию ингибиторов киназ — p21^{Cip1}, p15^{Ink4b}. Активность SnoN ингибируется комплексом APC*—Cdh1, что используется клеткой для негативной регуляции прогрессии клеточного цикла.

SOX — семейство транскрипционных факторов, содержащих домены высоко-подвижных групп (HMG). Белки Sox связывают маленькую бороздку ДНК и вызывают изгибы нити ДНК. Функция белков Sox заключается в изменении трехмерной структуры регуляторной области генов и придании ДНК конформации, в которой она может физически взаимодействовать с транскрипционными факторами далеко от сайта связывания белков Sox.

Sox9 — белок семейства SOX, который играет критическую роль в регуляции хондрогенеза, остеогенеза и детерминации мужского пола.

SP (side population) — популяция клеток, активно выводящих красители ДНК и поэтому слабо окрашивающихся такими красителями. Содержит больше тканеспецифических СК относительно нефракционированных клеток той же ткани.

Src (Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck и Blk) — суперсемейство цитоплазматических тирозиновых киназ, основателем которой является протоонкоген SRC, входящий в состав вируса, вызывающего саркомы у птиц. Киназы этого суперсемейства включают два домена, содержащих гомологичные последовательности и впервые обнаруженные в белке Src — SH2 и SH3 (Src homology region 2 и 3).

STAT (signal transducers and activators of transcription) — семейство белковых транскрипционных активаторов, которые после фосфорилирования и активации киназами семейства Jak транслицируются в ядро и активируют группу специфических генов-мишеней. Содержат домен SH2, который наделяет их способностью взаимодействовать со специфическими фосфорилированными сайтами тирозина на рецепторных тирозинкиназах, минуя взаимодействие с киназами семейства Jak.

Stbm (Strabismus) — белок, который модулирует сигналы планарной клеточной полярности и конвергентного расхождения (PCP-CE).

Suv39h1-2 — гистоновые метилтрансферазы, опосредующие формирование комплекса «пocketных» белков с белками семейства HP-1 и формирование гетерохроматина.

SWI/SNF (SWItch/Sucose NonFermentable) — семейство комплексов, ремоделирующих нуклеосомы у дрожжей, которые включают несколько белков-продуктов генов SWI и SNF (Swi1, Swi2/Snf2, Swi3, Swi5, Swi6), а также несколько других белков. Комплексы SWI/SNF обладают АТФазной активностью, стимулирующей ДНК, и способны дестабилизировать взаимодействие между ДНК и гистонами в нуклеосомах в обратимой манере.

SWR1 — комплекс, ремоделирующий хроматин путем зависимой от АТФазы замены гистонового димера H2A-H2B в нуклеосомах на димер, содержащий вариант гистон H2Z1 (в клетках млекопитающих называется H2Az). Комплекс SWR1 содержит АТФазу Tip49a/Pontin52.

Tag — металлопротеиназа, модифицирующая белок Tnf α , осуществляет протеолиз Notch на стадии S2.

Tfe3 (transcription factor binding to IGHM enhancer 3) — транскрипционный фактор, связывающийся с инхансером 3 IGHM, член семейства транскрипционных факторов HLH. Связывает мотив mu-E3 в инхансере гена тяжелой цепи иммуноглобулинов, экспрессируется во многих клеточных типах.

TGF β (transforming growth factor β) — суперсемейство ростовых факторов, участвующих в регуляции функций различных СК (см. гл. 7).

Thy1 (CD90) — гликопротеин, экспрессирующийся на клетках тимуса и ССК различной тканевой специфичности.

Tip49a/Pontin52 — АТФаза/геликаза ДНК, которая представляет собой каталитическую единицу в нескольких комплексах, ремоделирующих хроматин у различных видов животных, например Ttrp/p400/Tip60, Ino80, SWRCAP/SWR1, Brg-1 и Cbp/p300.

TIP60 — белок, принадлежащий к семейству гистоновых ацетилтрансфераз. Функционирует как линейно-специфический транскрипционный регулятор, обладает способностью рекрутировать дополнительные тканеспецифические кофакторы.

ТКО — тройной нокаут всех трех членов семейства продукта гена ретинобластомы. Эмбриональные фибробласты с ТКО получают от плодов мышей после скрещивания линий с генотипом RB-/+ и p107-/- p130-/-.

T-loop (Т-петля) — подвижный участок аминокислотной последовательности С-концевой части Cdk, получивший свое название из-за наличия треонинового остатка Thr160, фосфорилирование которого необходимо для активации Cdk.

Tle (transducin-like enhancer of split) — транскрипционный супрессор, гомологичный белку Groucho у млекопитающих.

Tnf- α (tumor necrosis factor- α) — α -фактор некроза опухолей, белок семейства цитокинов. Вызывает острую фазу воспалительной реакции, апоптоз, ингибирует туморогенез и репликацию вирусов. Сверхпродукция Tnf- α у человека может вызвать возникновение опухолей.

TR — РНК-овый компонент теломеразного комплекса.

Trithorax (TrxG) — многокомпонентный белковый комплекс, поддерживающий в активном состоянии экспрессию генов семейства HOX в эмбриональном периоде и вместе с семейством PcG регулирующий самоподдержание и выбор судьбы в эмбриональных и соматических стволовых клетках.

Ttrp (transformation/transcription domain-associated protein) — белок, взаимодействующий с трансформационным/транскрипционным доменом. Адапторный белок, входящий в состав различных многокомпонентных комплексов с активностью гистоновых ацетилтрансфераз и придающий этим комплексам специфическую метку, означающую их участие в эпигенетической транскрипционной активации. Играет центральную роль в активации и трансформации, опосредованной Мус, опосредует транскрипционную активацию, вызываемую p53, E2f1, E2f4, β -катенином и другими белками.

Ubf (upstream-binding factor) — фактор, усиливающий транскрипцию РНК-полимеразой I. Содержит мотив LxCxE, с помощью которого он взаимодействует с pRb в регуляции транскрипции.

UTR (untranslated region) — нетранслируемая область гена или мРНК.

VEGF (vascular endothelial growth factor) — сосудистый эндотелиальный ростовой фактор. Представляет семейство ростовых факторов, родственных PDGF, сигнальных белков, регулирующих рост сосудов путем активации тирозинкиназных рецепторов.

Xkid — белок, подобный кинезину, который способствует движению хромосом от полюсов веретена к экватору метафазной пластинки, препятствуя расхождению хромосом.

Yy1 — убиквитарный транскрипционный фактор, содержащий домен типа «цинковый палец». Участвует в репрессии и активации множества промоторов. Yy1 способен опосредовать взаимодействие белков семейств NAT и HDAC с промоторами генов, активируя или супрессируя их активность.

Wif1 (Wnt inhibiting factor 1) — фактор 1, ингибирующий активацию сигнального пути Wnt; физически связывает лиганды Wnt, препятствуя их взаимодействию с рецепторами Fz.

Wig1 — белок, связывающий двухцепочечную РНК. Ингибирует рост опухолей *in vitro*, опосредует функцию p53 при повреждении ДНК.

Wnt/ β -катенин — сигнальный путь, участвующий в регуляции функций различных типов СК (рассматривается в гл. 8).

Wntless/evenness interrupted (WLS/EVI) — ген, продукт которого регулирует секрецию белков Wnt во внеклеточное пространство.

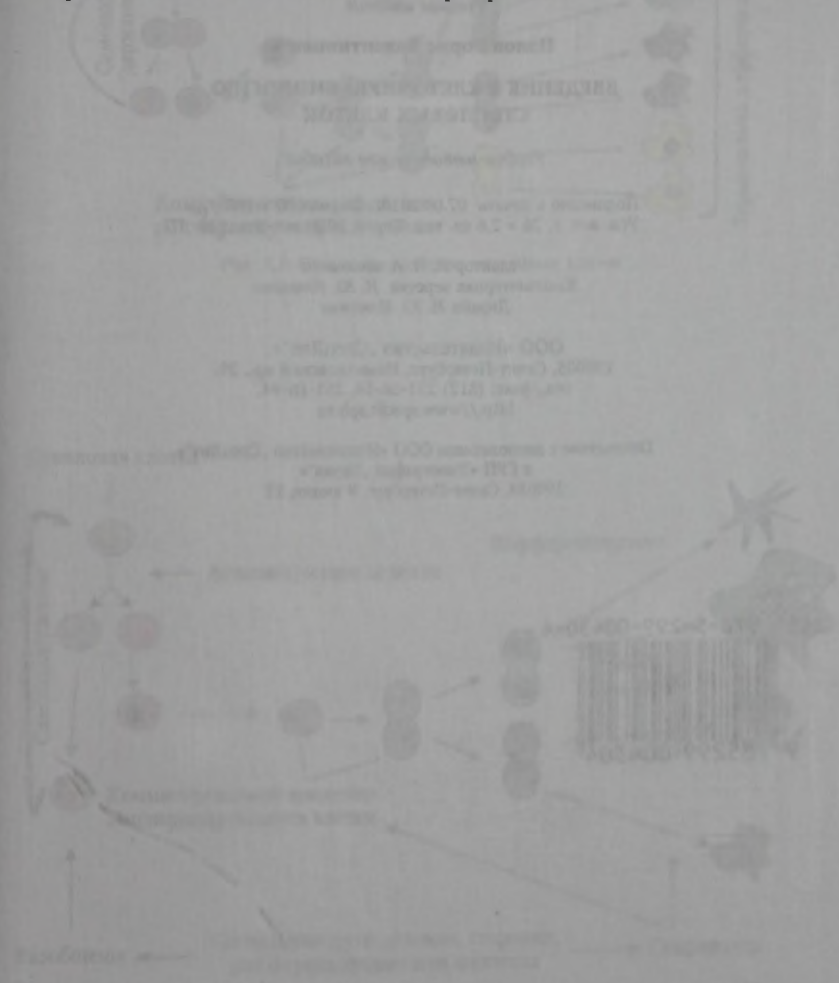


Рис. 1.2. Механизмы действия Wnt-сигнального пути. Wnt-лиганды связываются с рецепторами Fz, что приводит к активации сигнального пути. Wif1 ингибирует активацию Wnt-сигнального пути, связывая лиганды Wnt. Wig1 ингибирует рост опухолей *in vitro*. WLS/EVI регулирует секрецию белков Wnt во внеклеточное пространство.

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 № 172

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



Рис. 1.1. Основные свойства стволовых клеток

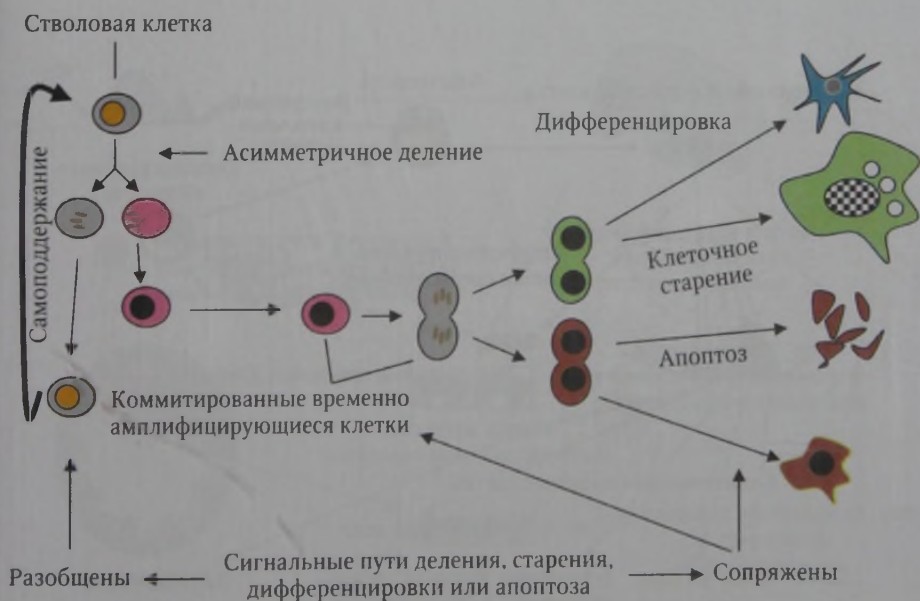


Рис. 1.2. Иммуальность и дифференцировочный потенциал стволовых клеток регулируется путем сопряжения самоподдержания с убиквитарными функциями клеток

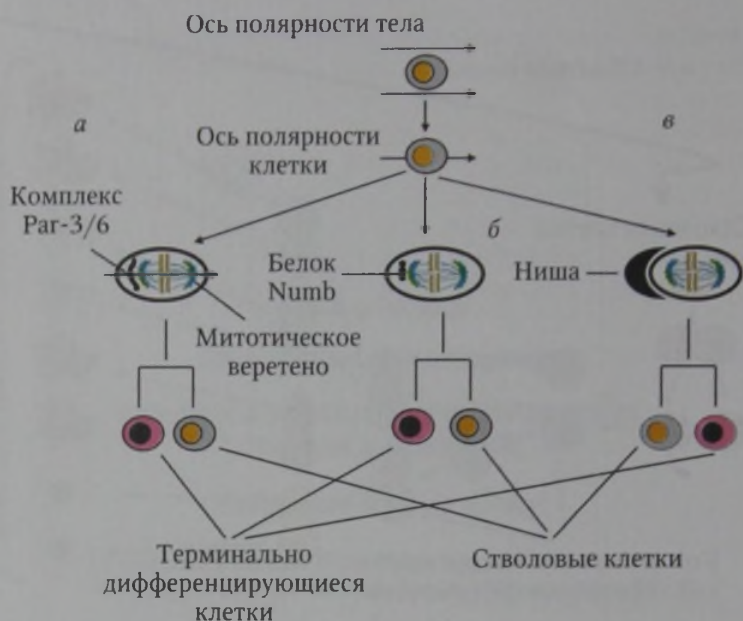


Рис. 1.7. Различные механизмы контроля асимметричного деления стволовых клеток: а — асимметричное деление регулируется путем асимметричной локализации белкового комплекса Par-3/6; б — белок Numb локализуется в той дочерней клетке, которая дифференцируется; в — дочерние клетки наследуют различную судьбу благодаря действию факторов ниши (Betschinger J., Knoblich J. A., 2004)



Рис. 1.9. Классификация стволовых клеток

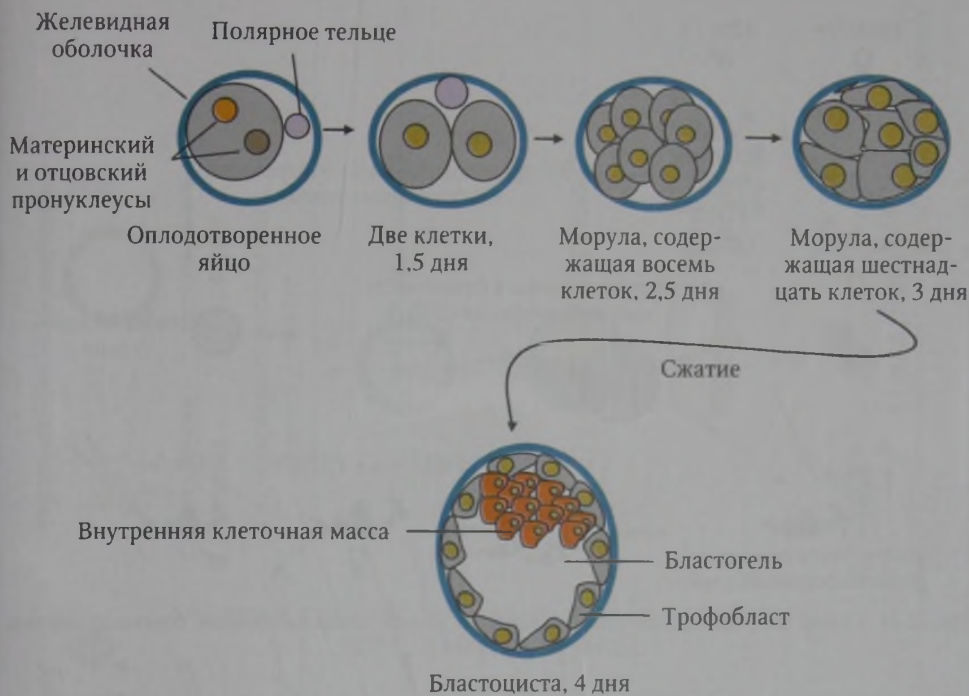


Рис. 1.11. Ранние стадии развития мыши

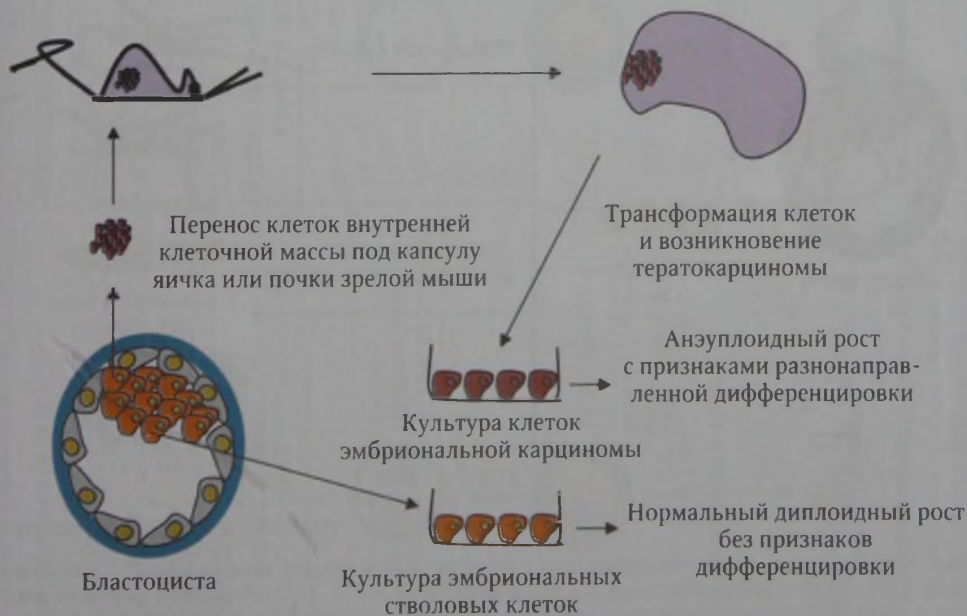


Рис. 1.13. Схема получения эмбриональных стволовых клеток и клеток эмбриональной тератокарциномы

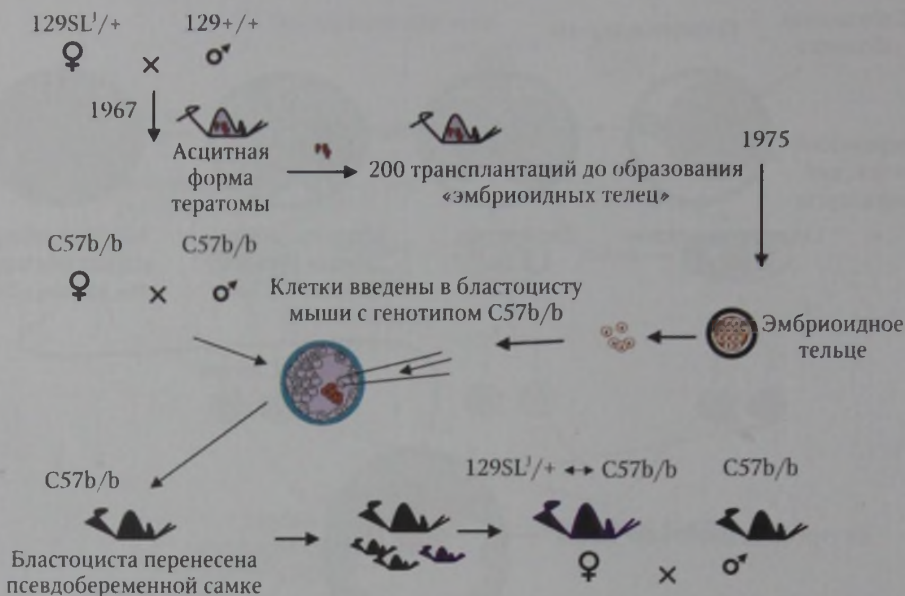
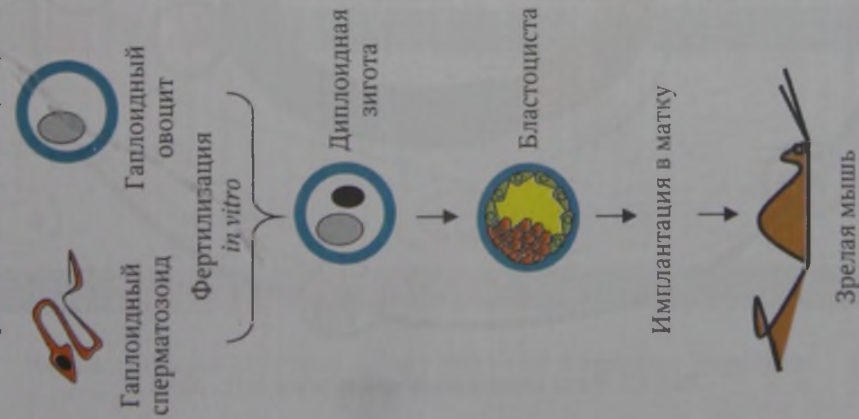


Рис. 1.14. Схема получения химерных мышей из клеток злокачественной тератокарциномы (Mintz B., Illmensee K., 1975)

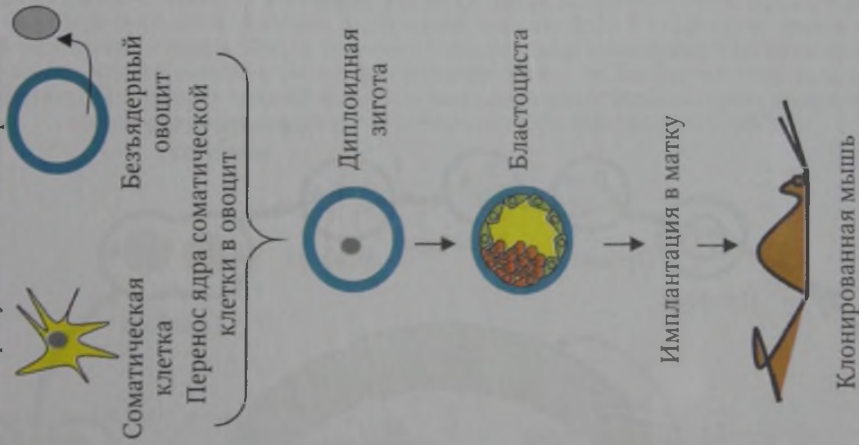


Рис. 1.19. Получение тканеспецифических клеток из ЭСК в опытах *in vitro*: cAMP — циклический AMP; FGF — фибробластный ростовой фактор, FGF-2 — фибробластный ростовой фактор 2. EGF — эпидермальный ростовой фактор, PDGF — тромбоцитарный ростовой фактор, M-CSF — макрофагальный колониестимулирующий фактор, IL-1 — интерлейкин-1, IL-3 — интерлейкин-3 (Alberts B. [et al.], 2004)

Фертилизация *in vitro* (IVF)



Репродуктивное клонирование



Терапевтическое клонирование

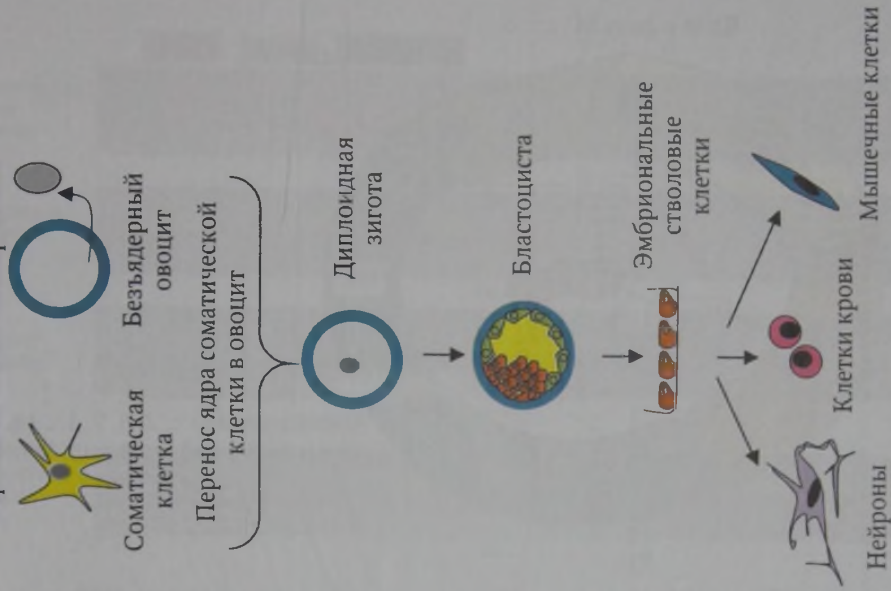


Рис. 1.20. Схема образования диплоидных организмов при фертилизации *in vitro* и клонировании (Jaenisch R., 2004)

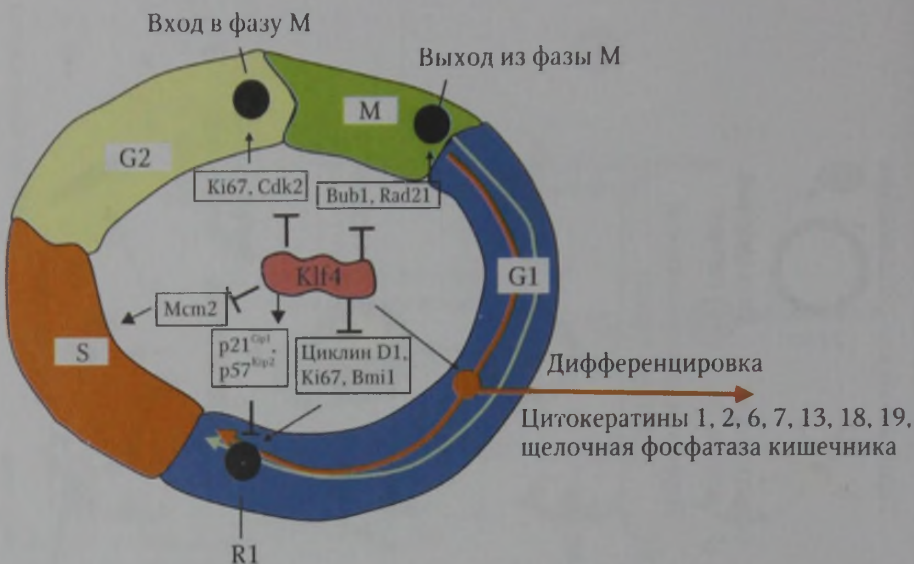


Рис. 1.24. Klf4 ингибирует клеточный цикл и активирует эпителиальную дифференцировку (Chen X. [et al.], 2003)

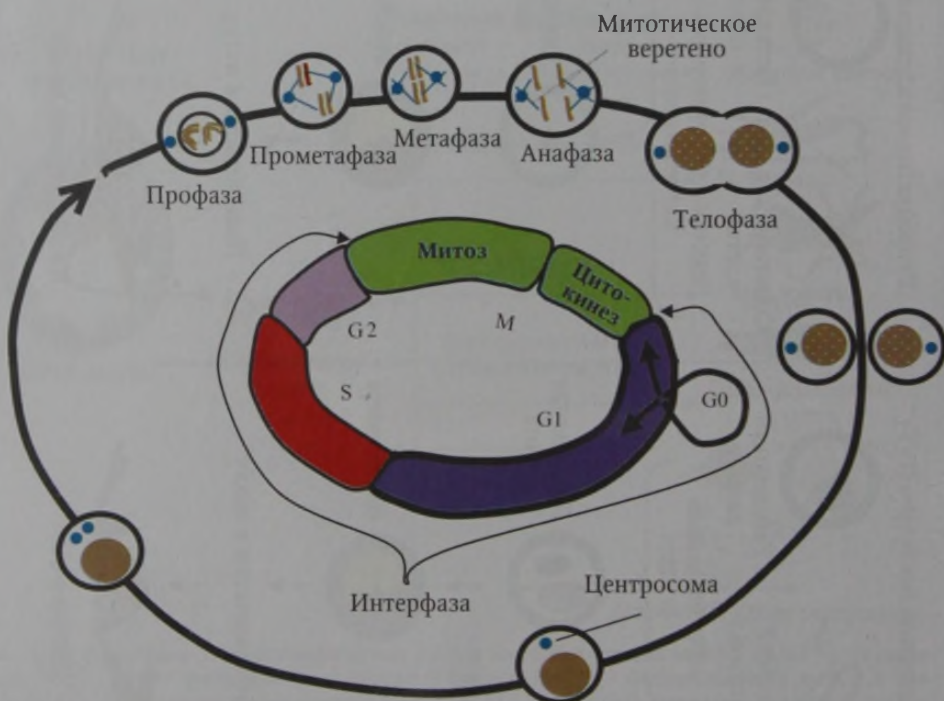


Рис. 2.2. Фазы клеточного цикла (Morgan D.O., 2007)

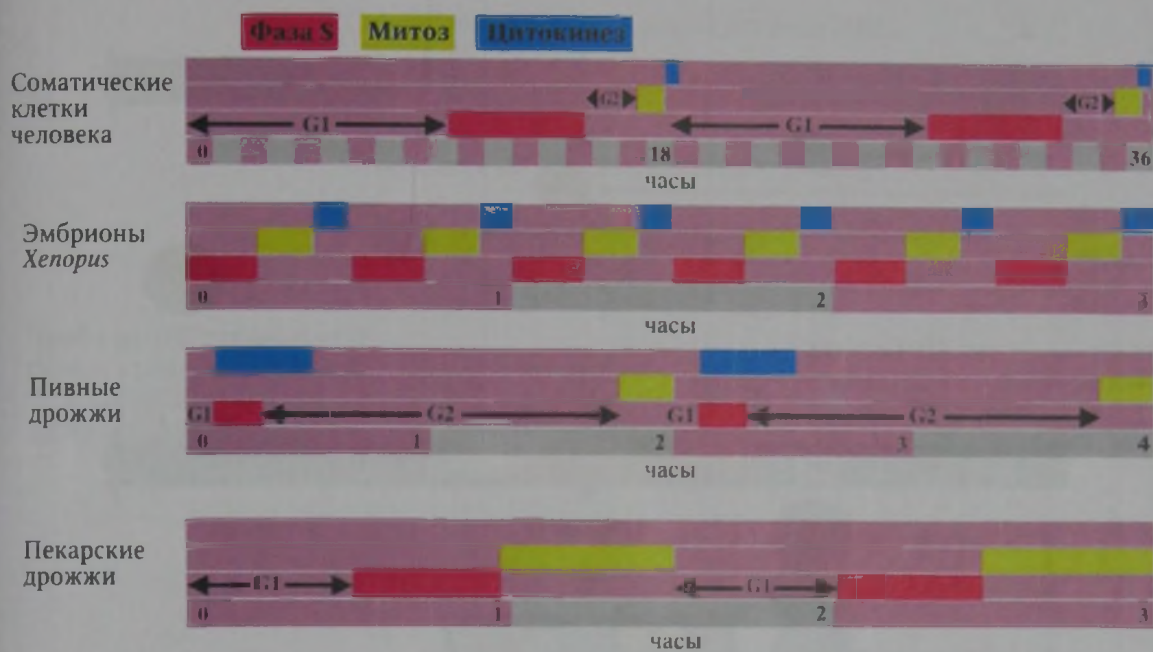


Рис. 2.3. Различия в структуре клеточного цикла в клетках различных типов. Продолжительность фаз клеточного цикла показана различными цветами: фазы S — красным, митоза — зеленым, цитокинеза — синим. Шкала времени в часах показана ниже каждого клеточного типа. У пекарских дрожжей цитокинез не показан для упрощения, так как клетки этого типа начинают формировать почку в поздней фазе G1 и завершают разделение дочерних клеток после первой половины следующего клеточного цикла (Morgan D.O., 2007)

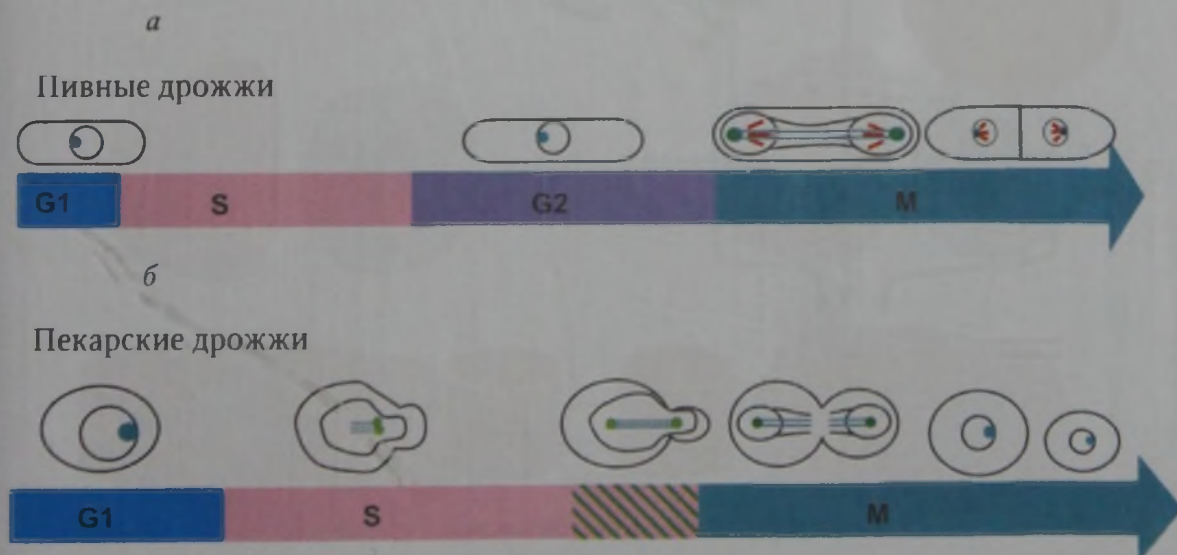


Рис. 2.4. Сравнение клеточного цикла у пивных (а) и пекарских (б) дрожжей (Alberts B. [et al.], 2004)

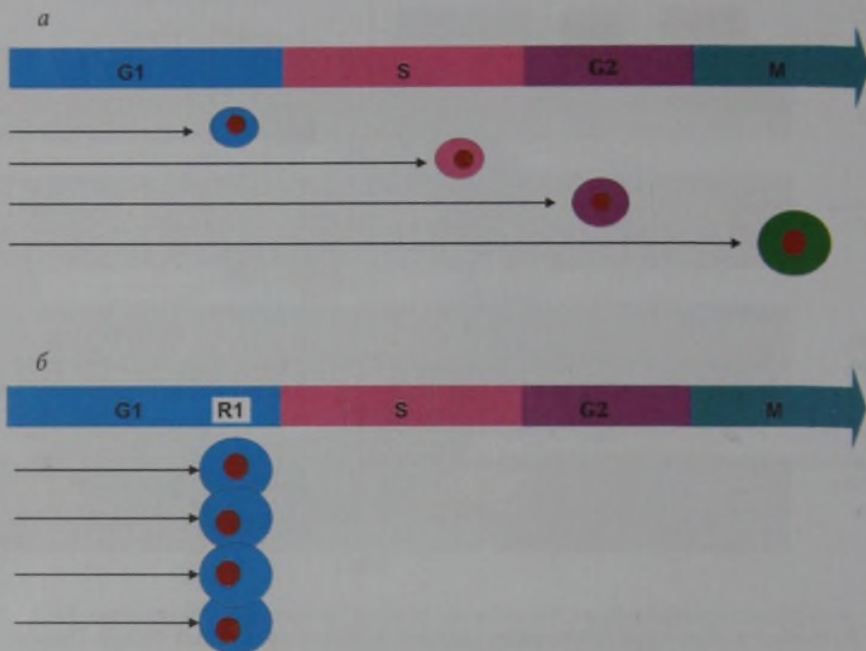


Рис. 2.5. Изучение клеточного цикла у дрожжей с помощью температурно-чувствительных мутантных генов:

a — в перmissive условиях клетки с мутантным геном CDC делятся нормально и проходят все фазы клеточного цикла; *b* — в рестриктивных условиях клетки останавливаются в той точке клеточного цикла, для прохождения которой необходим нормальный продукт мутантного гена, например в точке R1 (Alberts B. [et al.], 2004)



Митотический цикл в бесклеточной системе длится 40–60 мин

Рис. 2.7. Воспроизведение клеточного цикла в бесклеточной системе (Alberts B. [et al.], 2004)



Рис. 2.23. Использование молекулярного дисплея для анализа роли транскрипционной активации генов, связанных с клеточным циклом (Alberts B. [et al.], 2004)



Рис. 3.1. Схема опыта, доказывающего существование механизма контроля инициации репликации ДНК. G1, G2, S – клетки, находящиеся в одноименных фазах клеточного цикла (Alberts B. [et al.], 2004)

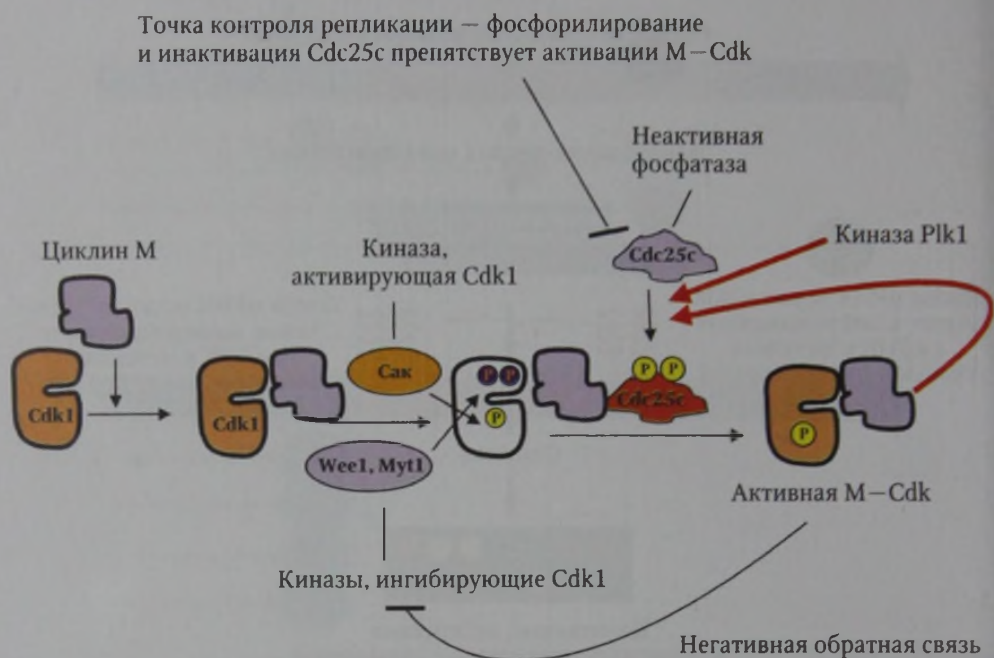


Рис. 3.5. Механизм активации М-Cdk (Alberts B. [et al.], 2004)

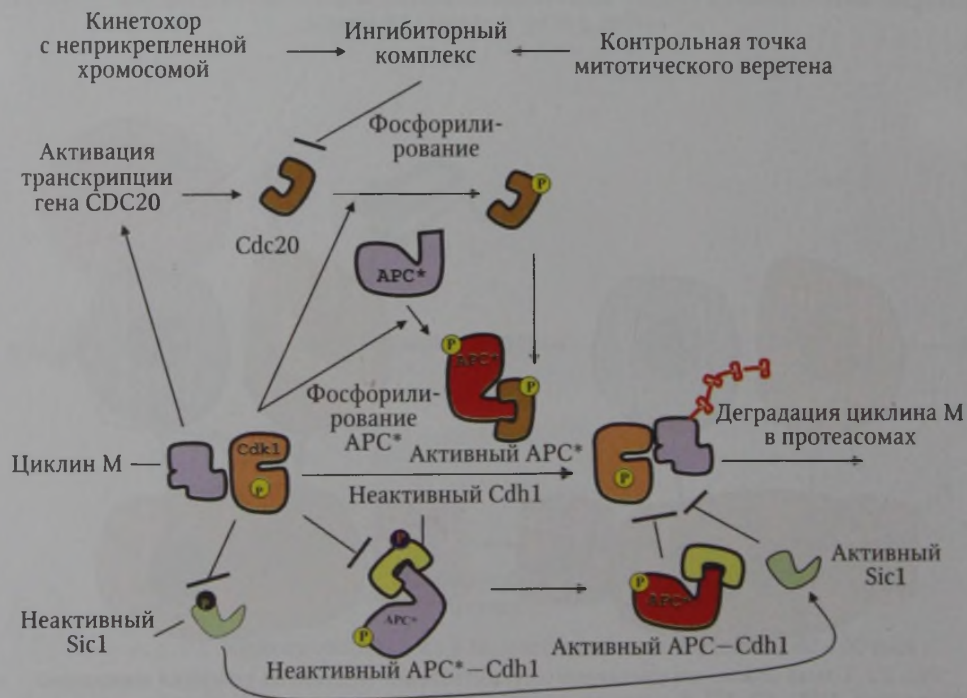


Рис. 3.8. Механизм активации APC* и инаktivации М-Cdk в ходе митоза (Peters J. M., 2002)

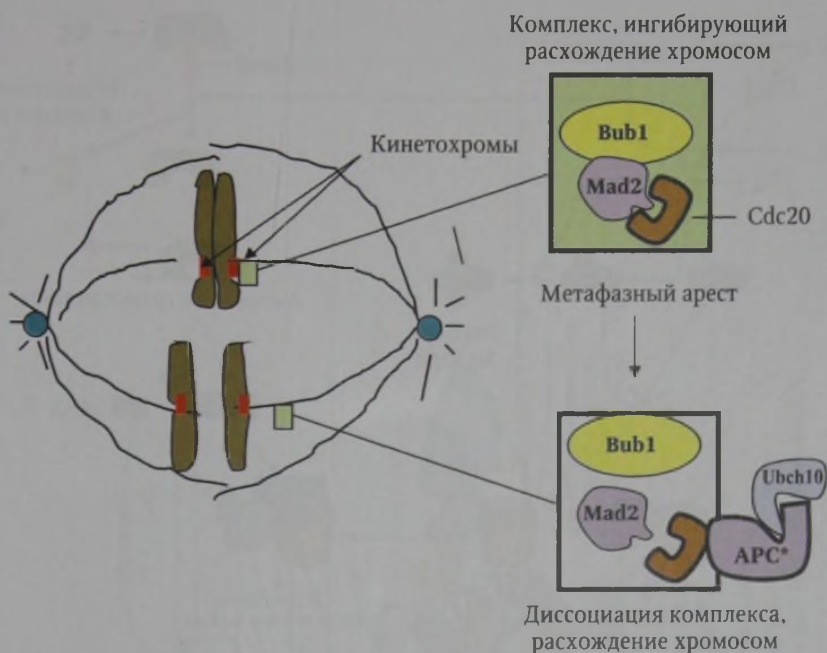


Рис. 3.10. Механизм контрольной точки митотического веретена (May K. M., Hardwick K. J., 2006)

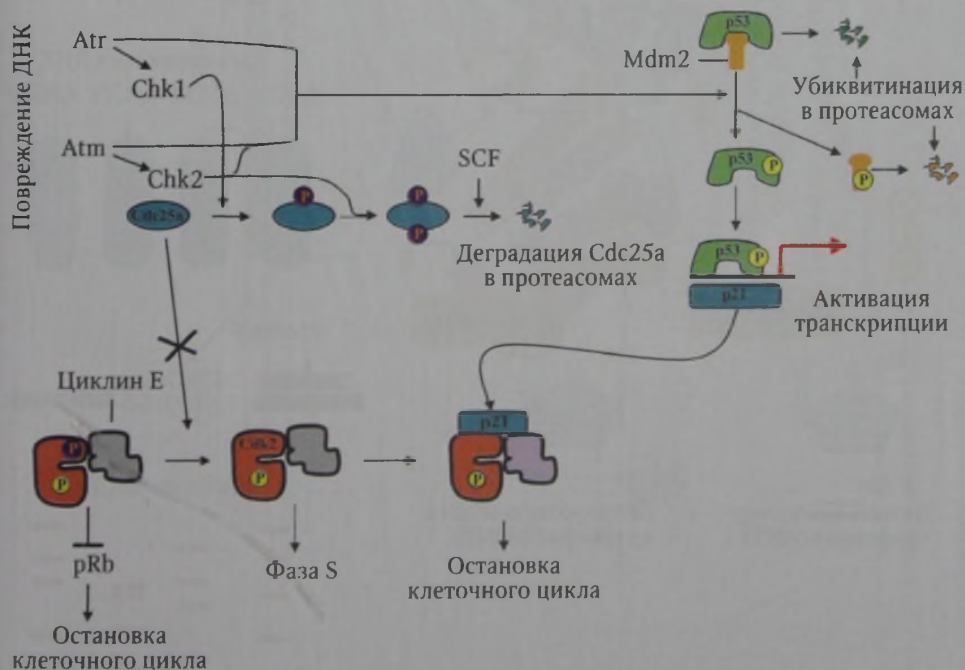


Рис. 3.14. Механизм остановки клеточного цикла в фазе G1 при повреждении ДНК (Morgan D. O., 2007)

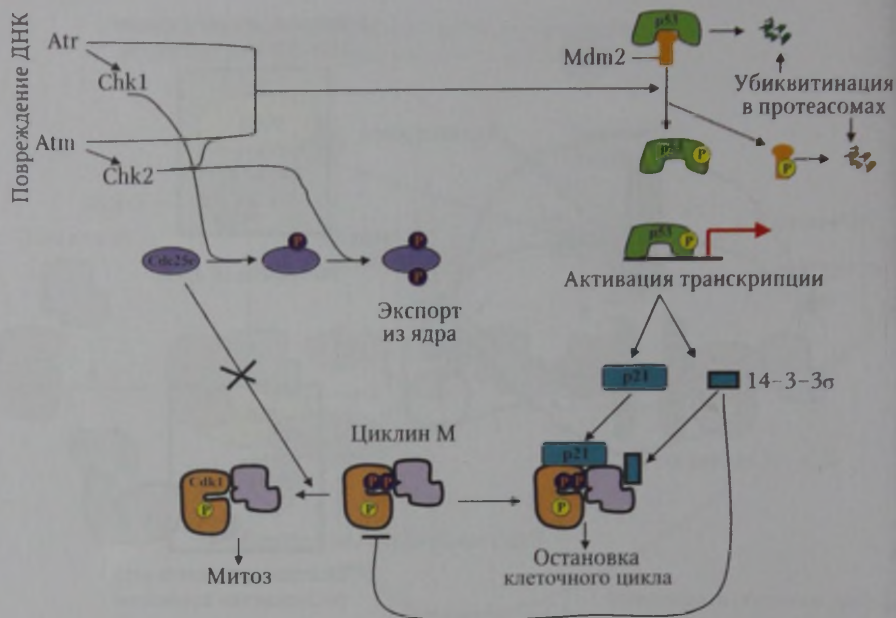


Рис. 3.15. Механизм остановки клеточного цикла в фазе G2/M при повреждении ДНК (Morgan D. O., 2007)

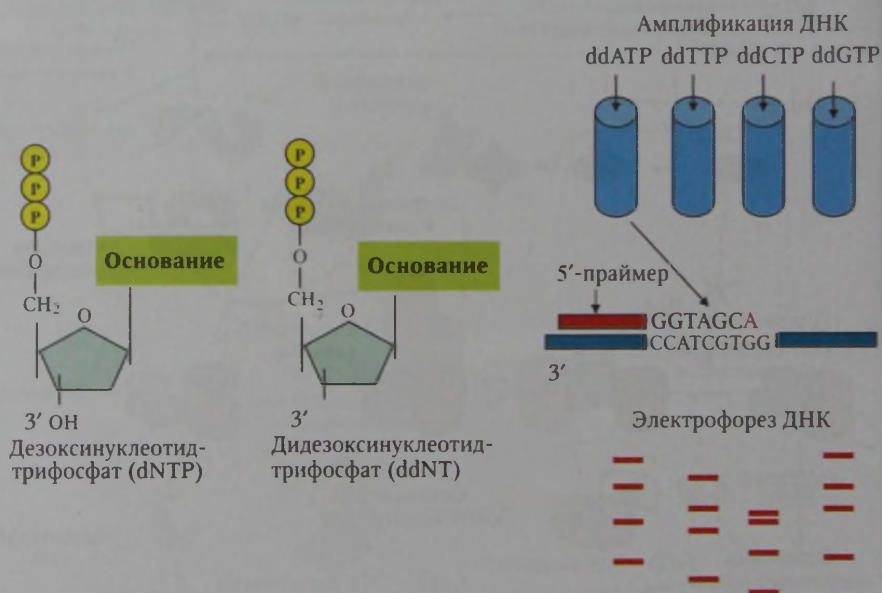


Рис. 4.4. Схема секвенирования ДНК по Сэнджеру (Sanger F. [et al.], 1977)

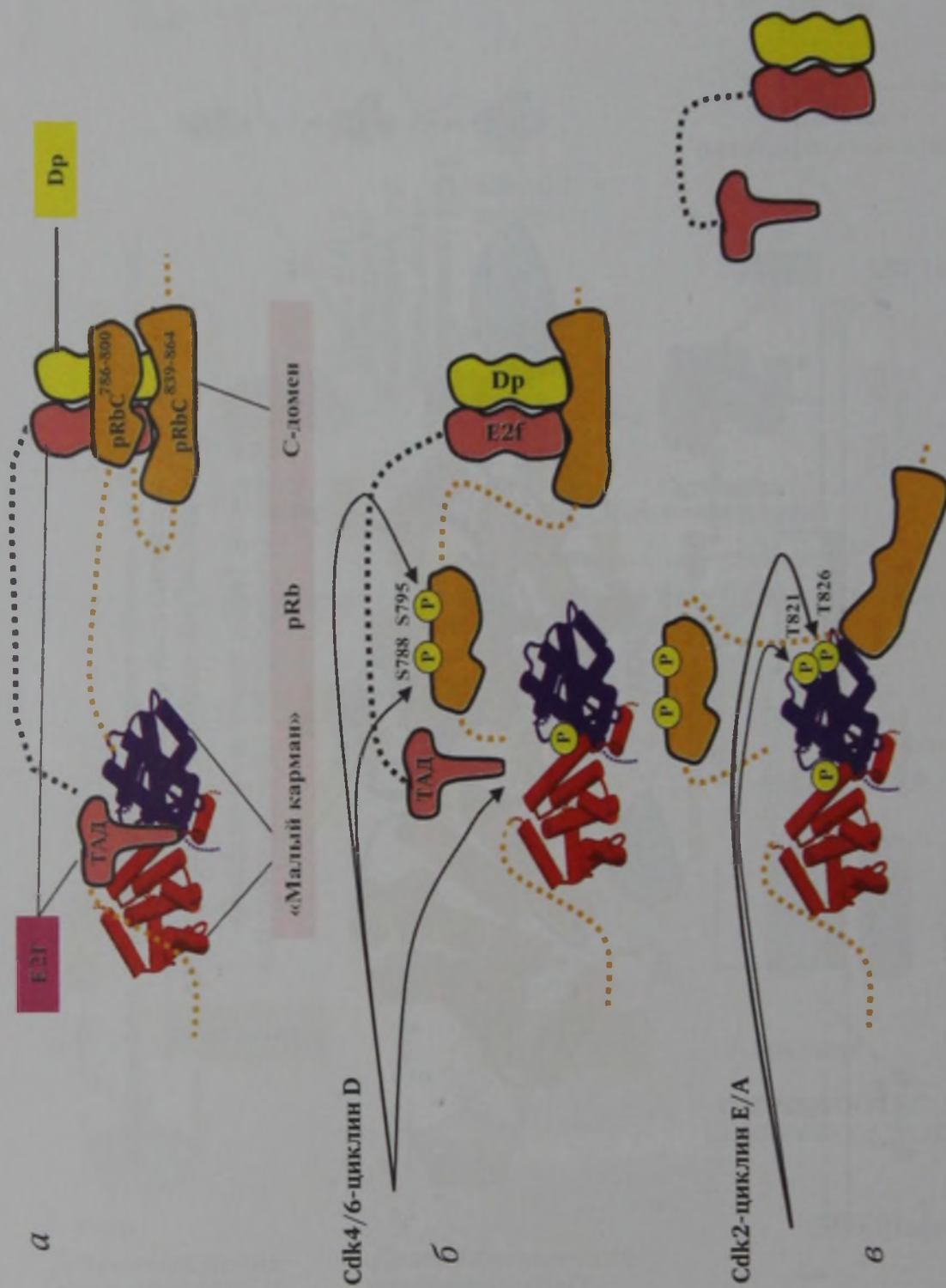


Рис. 4.7. Модель регуляции взаимодействия pRb с E2f путем фосфорилирования pRb:

а – домен «малый карман» pRb физически взаимодействует с трансктивирующим доменом E2f (TAD); **б** – последовательности pRb⁷⁸⁶⁻⁸⁰⁰ и pRb⁸³⁹⁻⁸⁶⁴ опосредуют физическое взаимодействие pRb с E2f; **в** – взаимодействие pRb⁸³⁹⁻⁸⁶⁴ с E2f/Dp ингибируется путем фосфорилирования фосфатных групп Thr821/826 (Rubin S. M. [et al.], 2005)

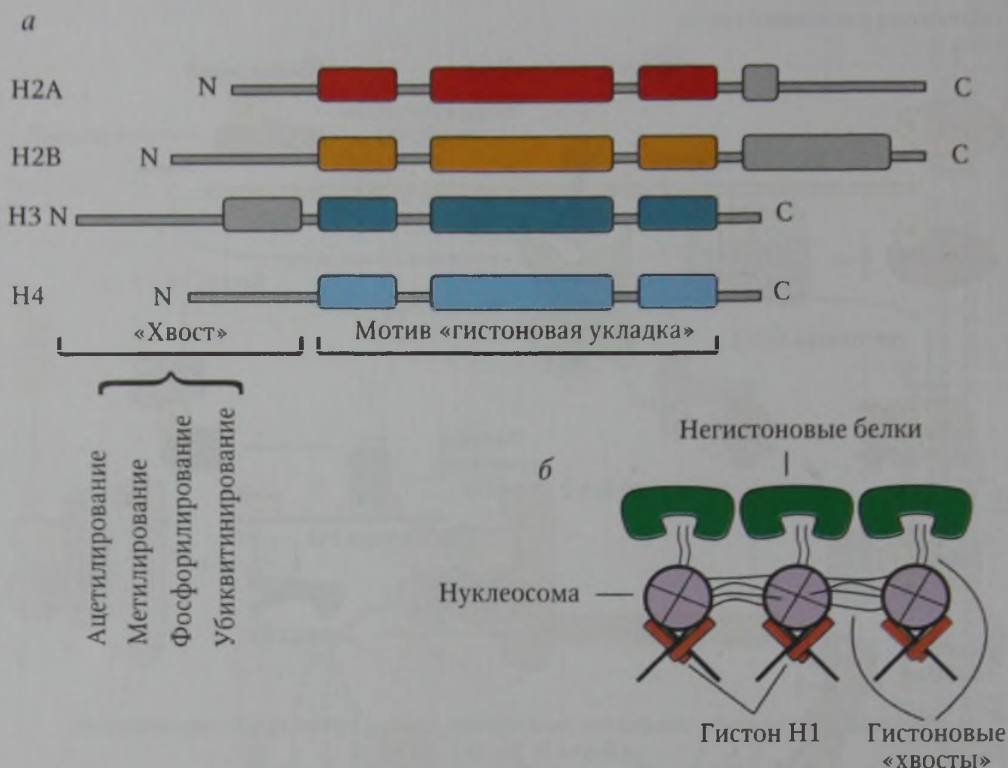


Рис. 5.2. Схема строения основных гистонов и их взаимодействие между собой в 30-нанометровой нити хроматина:

a — схема строения гистонов;

б — схема формирования 30-нанометровой структуры хроматина (Morgan D. O., 2007)

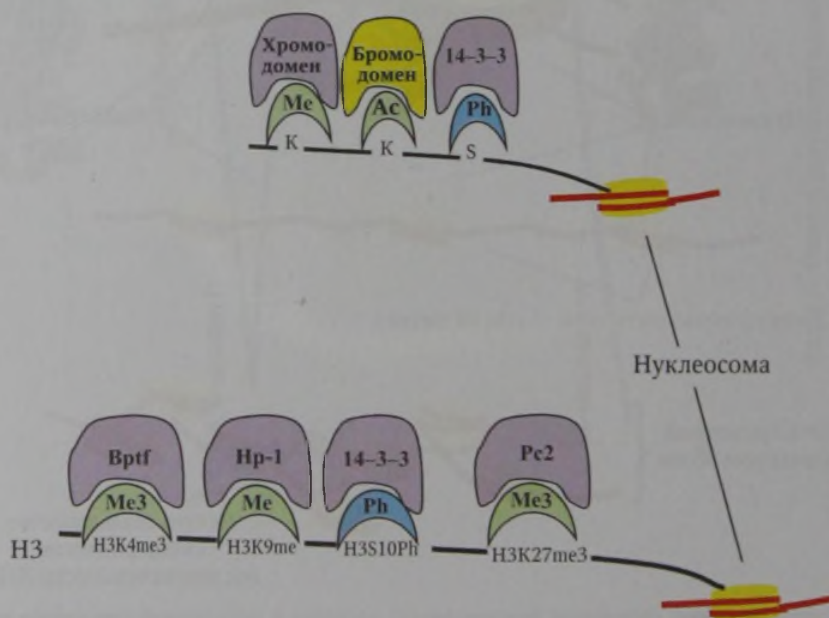


Рис. 5.3. Механизмы специфического взаимодействия регуляторных белков с нуклеосомами (Kouzarides T., 2007)

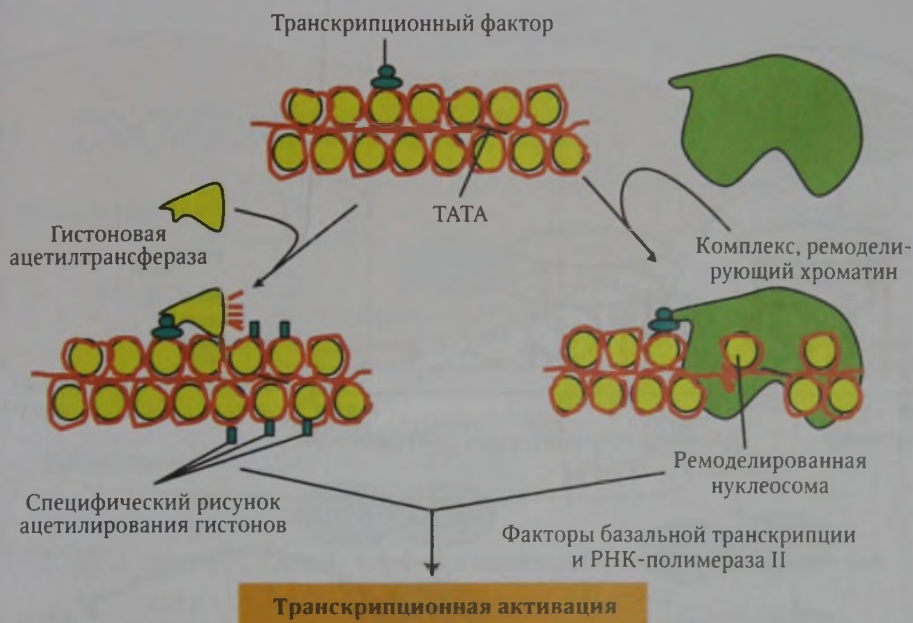


Рис. 5.4. Белки, регулирующие активность генов, вызывают локальные изменения структуры хроматина (Alberts B. [et al.], 2004)

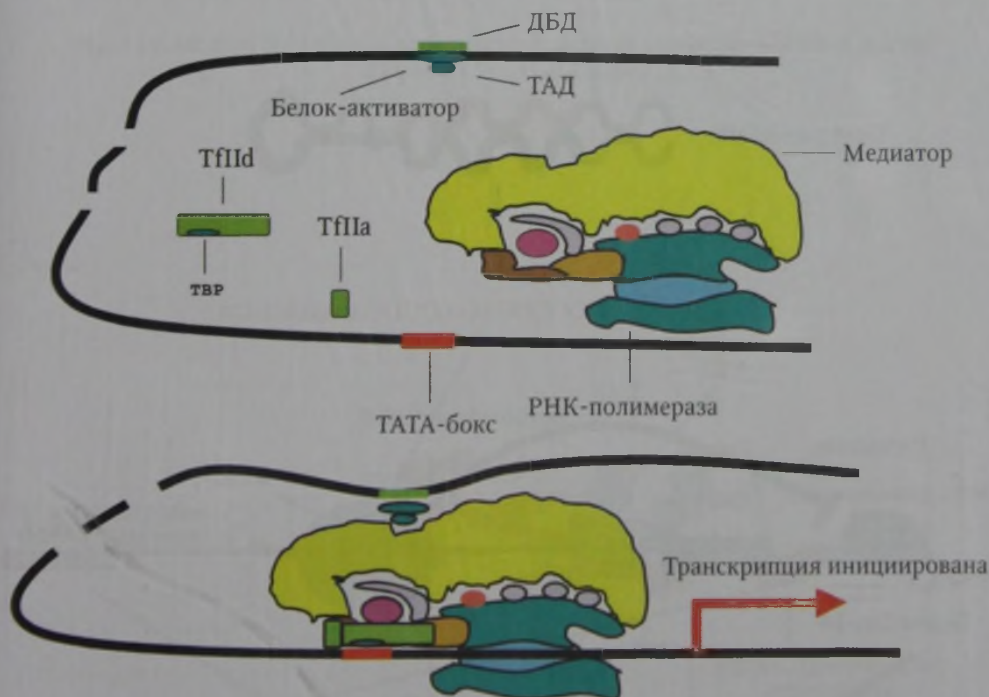


Рис. 5.8. Схема инициации транскрипции у эукариот с помощью РНК-полимеразы:
 а — область контроля гена включает последовательность ДНК, вовлеченную в регуляцию его транскрипции;
 б — транскрипция инициируется после привлечения к промоторной области гена комплекса РНК-полимеразы (Alberts B. [et al.], 2004)

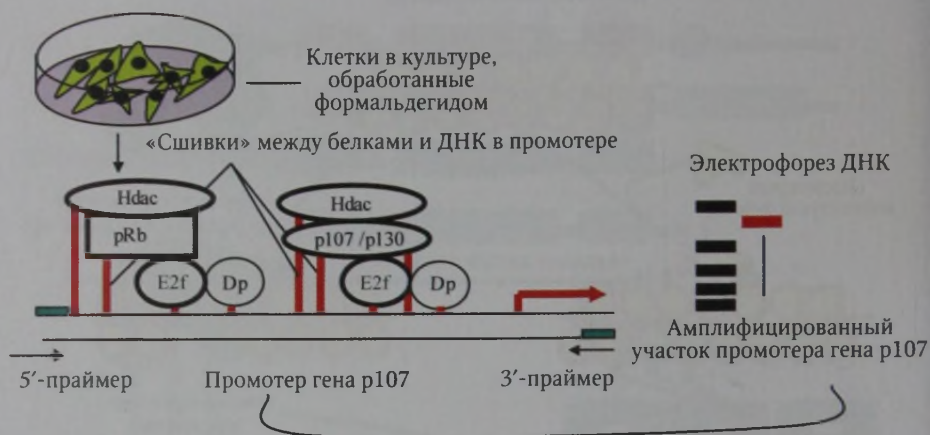


Рис. 5.16. Метод иммунопреципитации хроматина (Hatzis P., Talianidis I., 2002)

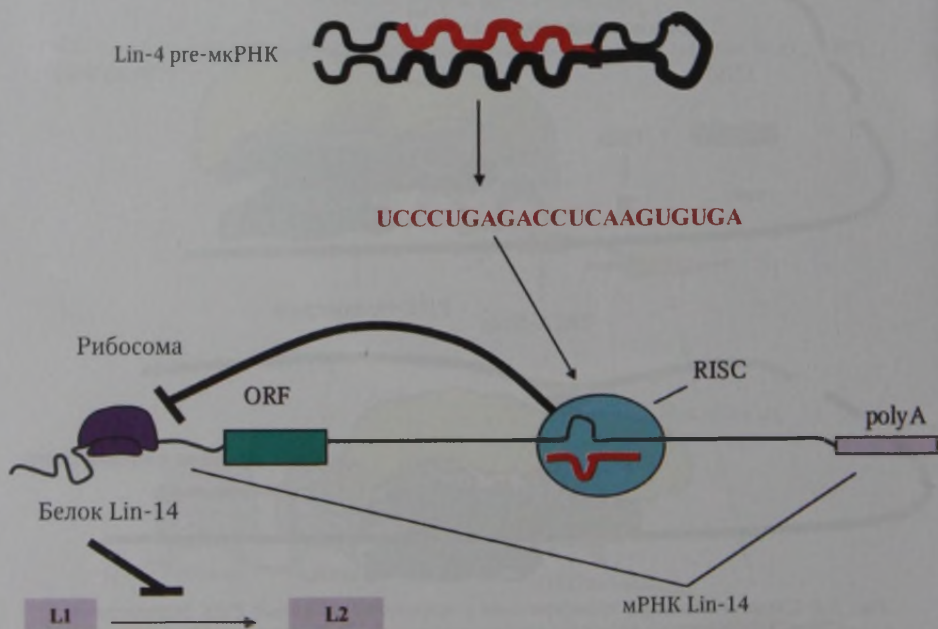


Рис. 5.18. Молекулярная характеристика Lin-4, основателя семейства мкРНК (He L., Hannon G. J., 2004)

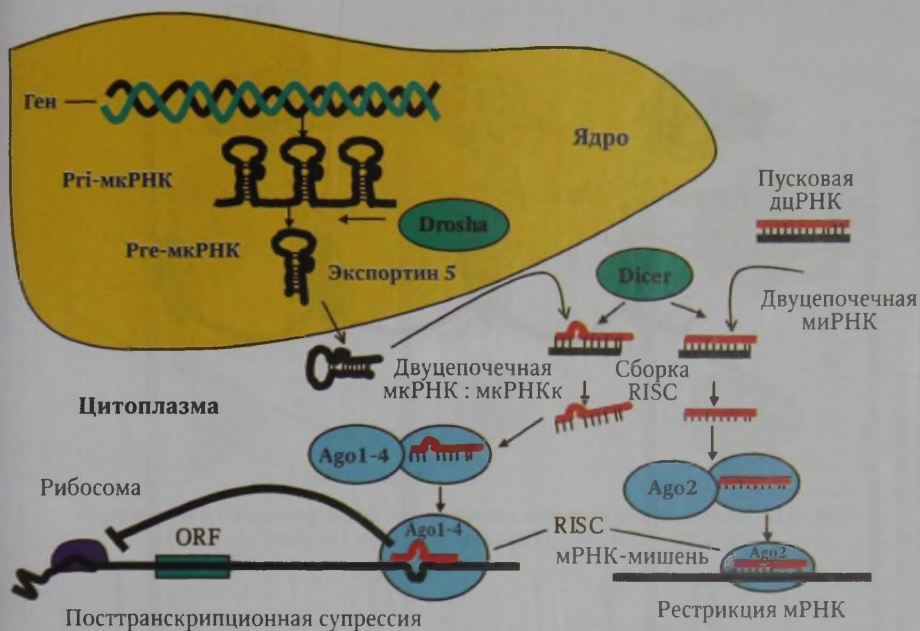


Рис. 5.19. Модель биогенеза и посттранскрипционной супрессии мкРНК и миРНК (Filipowicz W. [et al.], 2008)

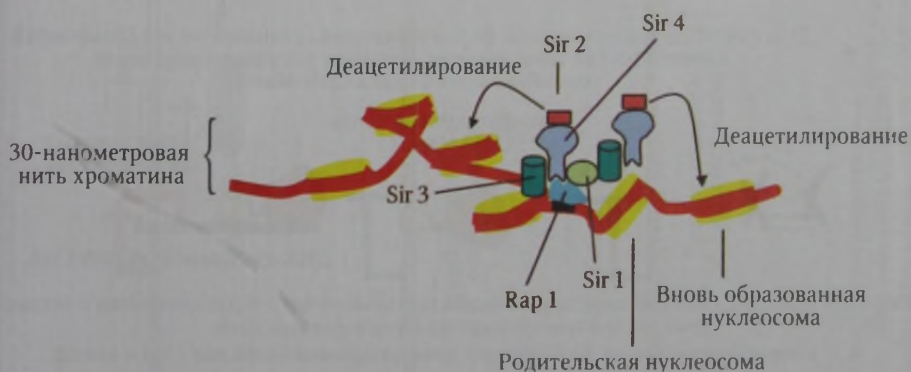


Рис. 6.4. Механизм формирования структуры гетерохроматина в теломерах пекарских дрожжей (Morgan D. O., 2007)

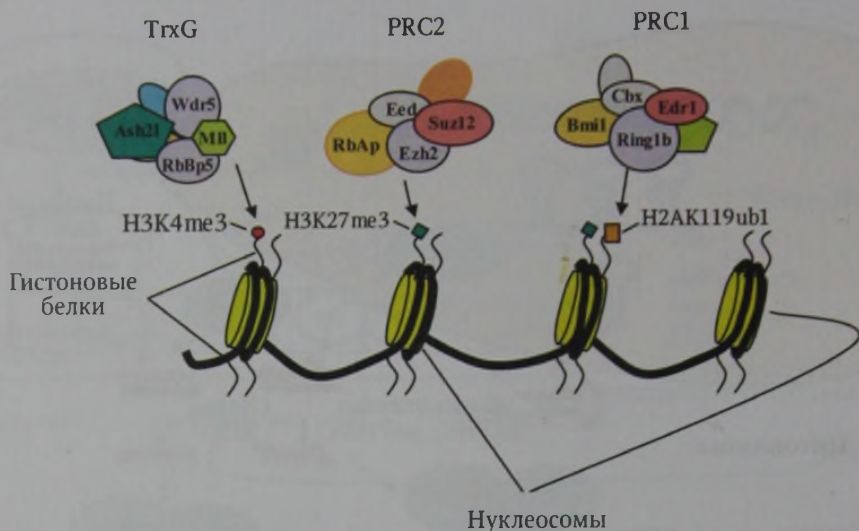


Рис. 6.12. Модификации гистонов комплексами, формирующимися из факторов семейств PcG и TrxG (Pietersen A. M., van Lohuizen M., 2008)

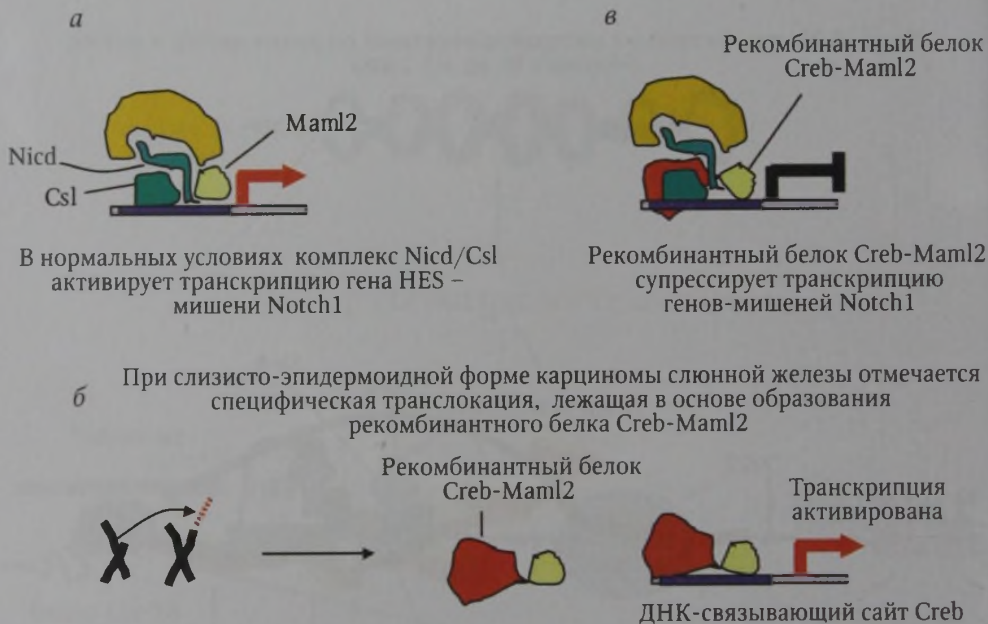


Рис. 7.24. При раке слюнной железы ингибция сигнального пути Notch сочетается с активацией экспрессии транскрипционного фактора Creb:

- а – в нормальных условиях Nicd образует транскрипционный комплекс с Csl и Maml2;
- б – рекомбинантный белок Creb-Maml2 активирует транскрипцию с промотора гена, содержащего сайт связывания Creb;
- в – образование рекомбинантного белка Creb-Maml2 ингибирует экспрессию генов-мишеней Notch1 (Lefort K., Dotto G. P., 2004)

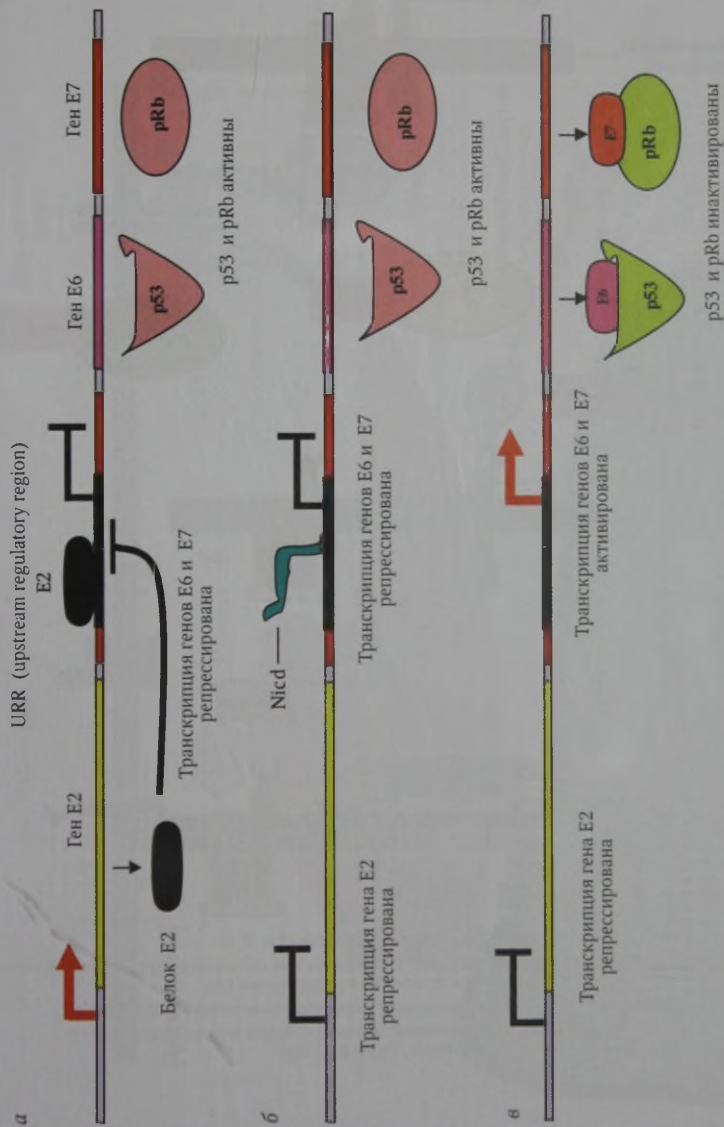


Рис. 7.25. Роль сигналов Notch в возникновении рака шейки матки, индуцированного вирусом папилломы человека:

а — в эпизомальном состоянии вирус не проявляет своего супрессивного действия;

б — экспрессия генов E6 и E7 вируса в инфицированных кератиноцитах может быть ингибирована активной формой белка Notch1 — NcId;

в — активация транскрипции белков E6 и E7 сопровождается функциональной инактивацией p53 и pRb и клеточной трансформацией (Lefort K., Dotto G. P., 2004)

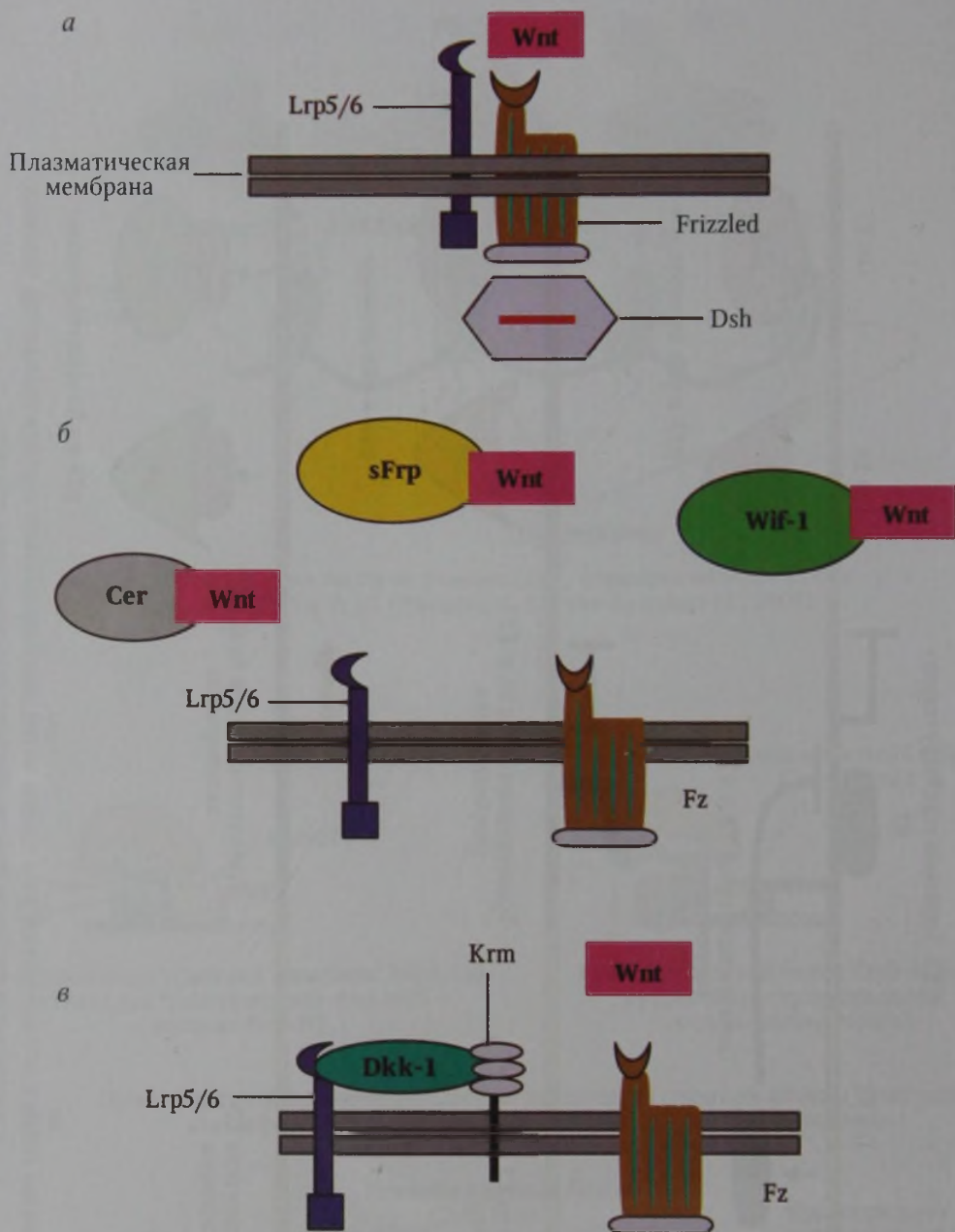


Рис. 8.5. Рецепторы и антагонисты Wnt:

a — белки Wnt инициируют передачу сигналов в каноническом сигнальном пути путем связывания с рецепторами Frizzled и корецепторами Lrp;

б — антагонисты Wnt, предотвращающие взаимодействие между Wnt и Frizzled;

в — антагонисты Wnt, предотвращающие взаимодействие между Frizzled и Lrp
(Kawano Y., Kypta R., 2003)

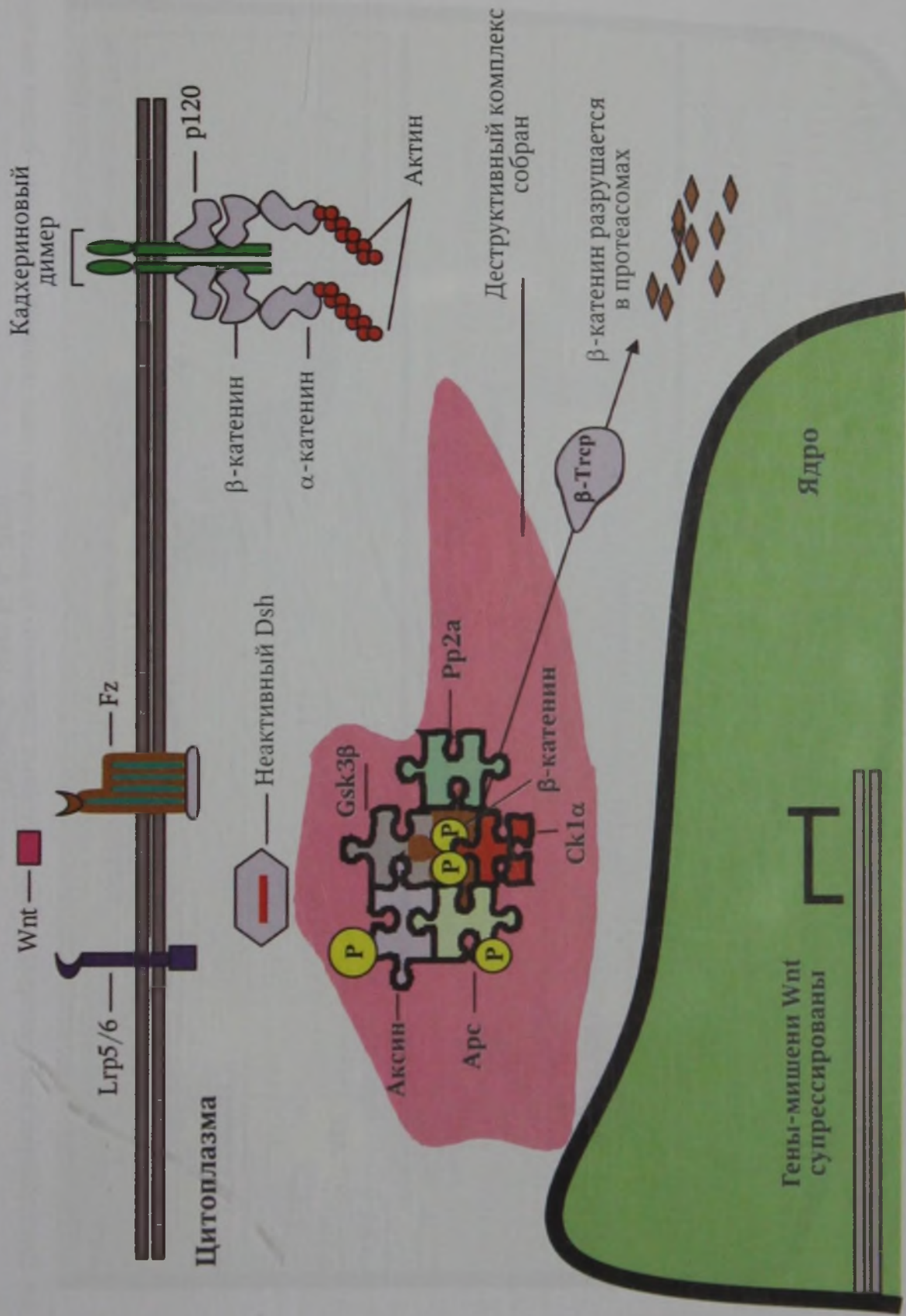


Рис. 8.6. β-катенин фосфорилируется и инактивируется специальным деструктивным комплексом в отсутствие сигналов Wnt (Nelson W. J., Nusse R., 2004)

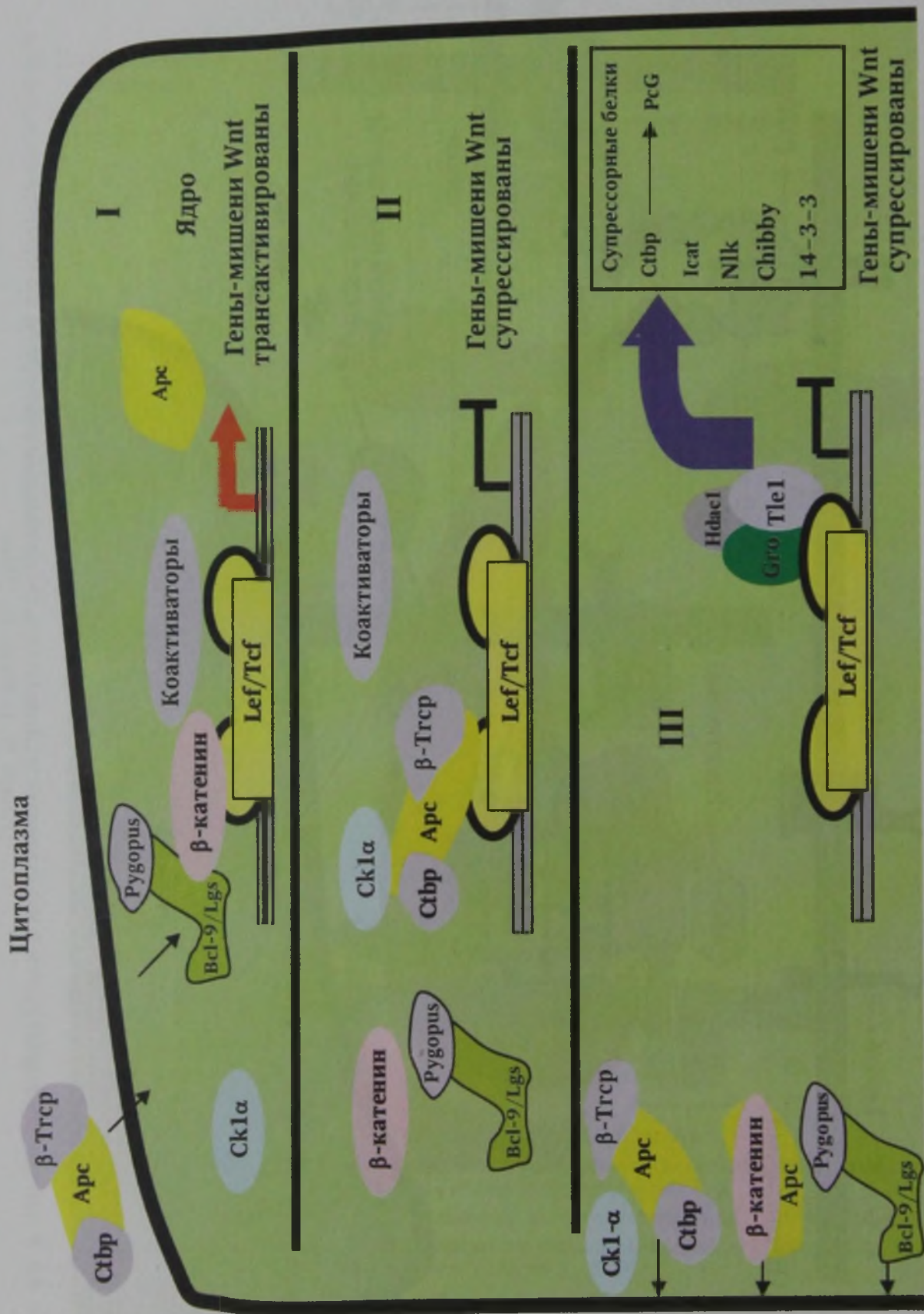


Рис. 8.9. Циклирование коактиваторных и корепрессорных комплексов на инхансерах генов-мишеней Wnt: I–III – стадии циклирования (Willert K., Jones K. A., 2006)

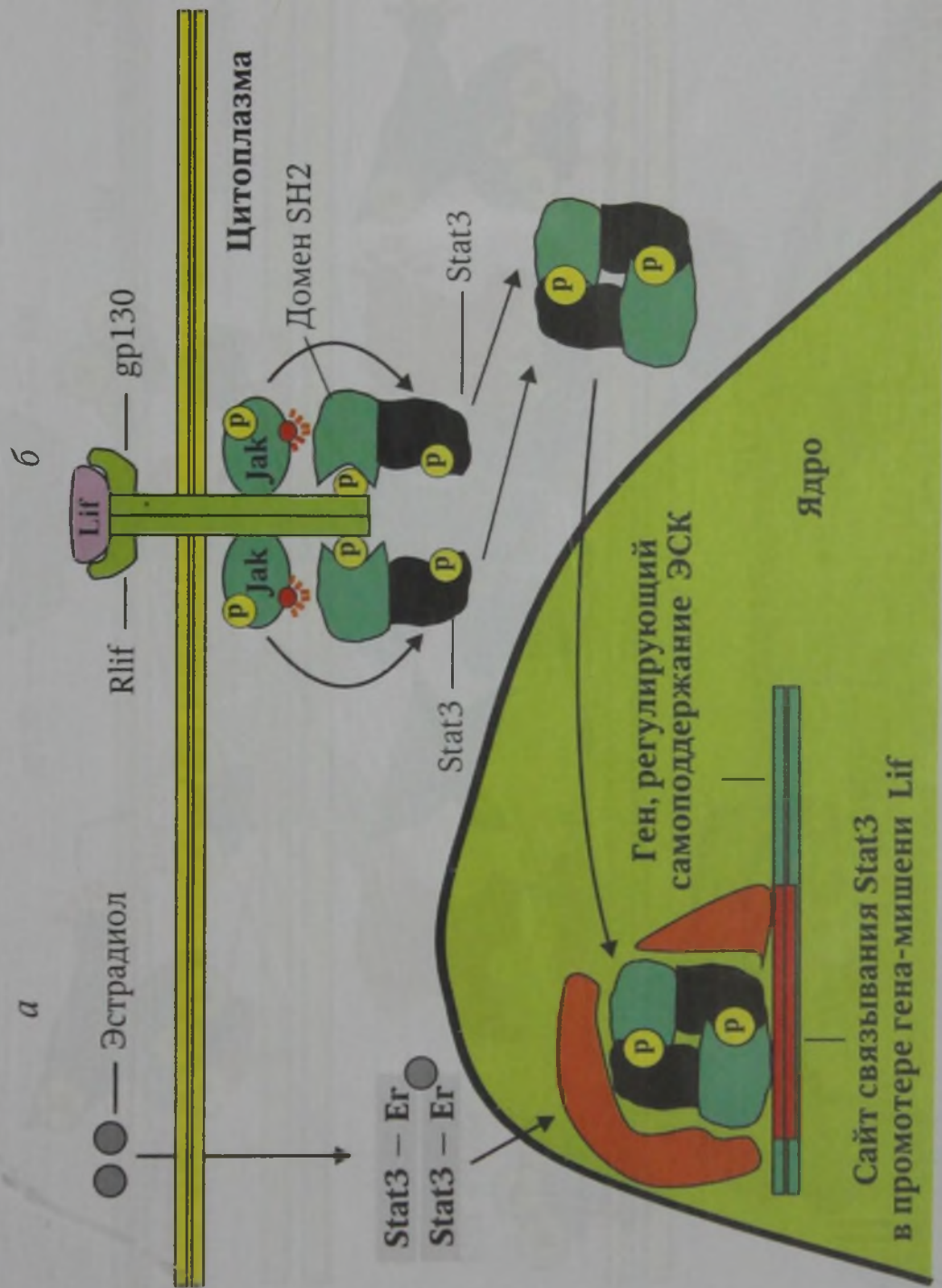


Рис. 9.1. Активация самоподдержания эмбриональных стволовых клеток опосредуется ростовым фактором Lif и сигнальным путем Jak/Stat:
a — экспрессия в ЭСК рекомбинантных молекул Stat3 замещает фактор Lif в активации его генов-мишеней;
б — Lif связывает цитокинные рецепторы Rlif/gp130 и активирует молекулы Stat3 (Burdon T. [et al.], 2002)

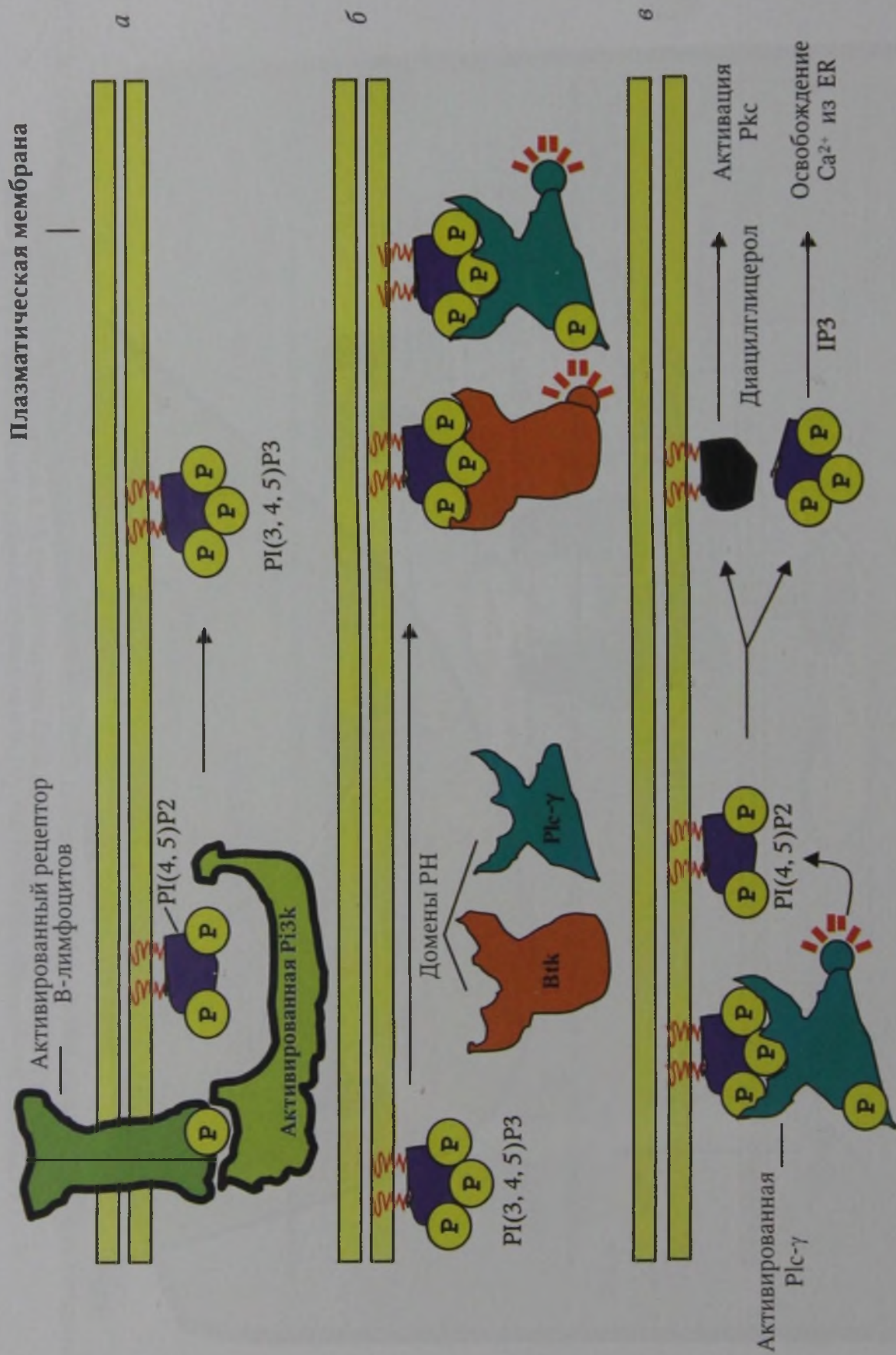


Рис. 9.5. Роль плекстриновых доменов внутриклеточных киназ в активации В-лимфоцитов:

а — активированная $\text{PI}3\text{K}$ способствует образованию $\text{PI}(3, 4, 5)\text{P}_3$; **б** — $\text{PI}(3, 4, 5)\text{P}_3$ служит связывания для киназ Btk и $\text{PLC-}\gamma$, способствуя их взаимодействию между собой; **в** — активированная $\text{PLC-}\gamma$ протеолитически делит $\text{PI}(4, 5)\text{P}_2$ с образованием диацилглицерола и IP_3 (Alberts B. [et al.], 2004)

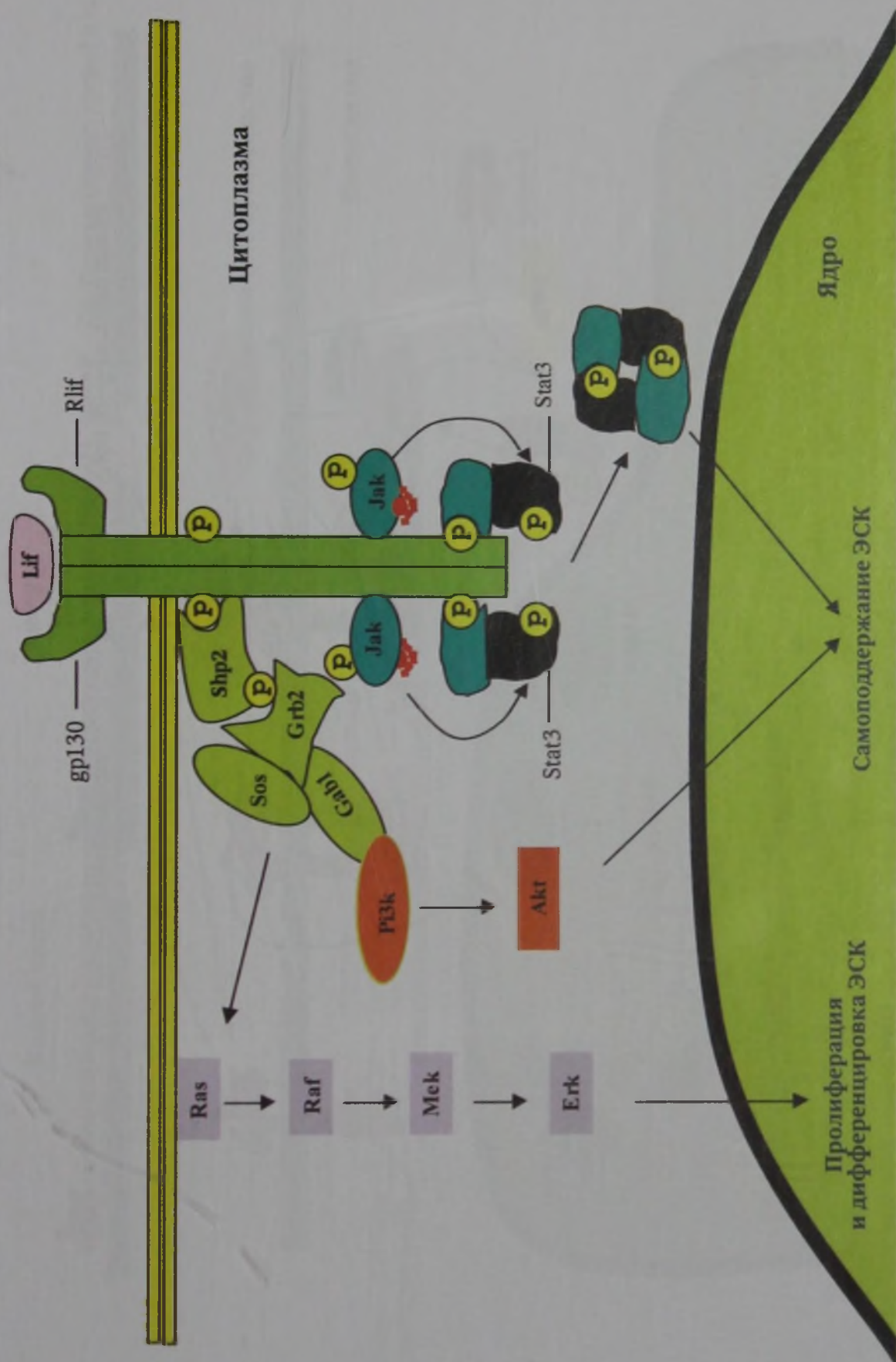


Рис. 9.9. Взаимодействие сигнальных путей Jak/STAT, PI3K и MAPK способствует сопряжению самоподдержания и дифференцировки в ЭСК (Orford K. W., Scadden D. T., 2008)

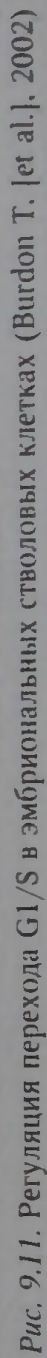


Рис. 9.11. Регуляция перехода G1/S в эмбриональных стволовых клетках (Burdon T. [et al.], 2002)

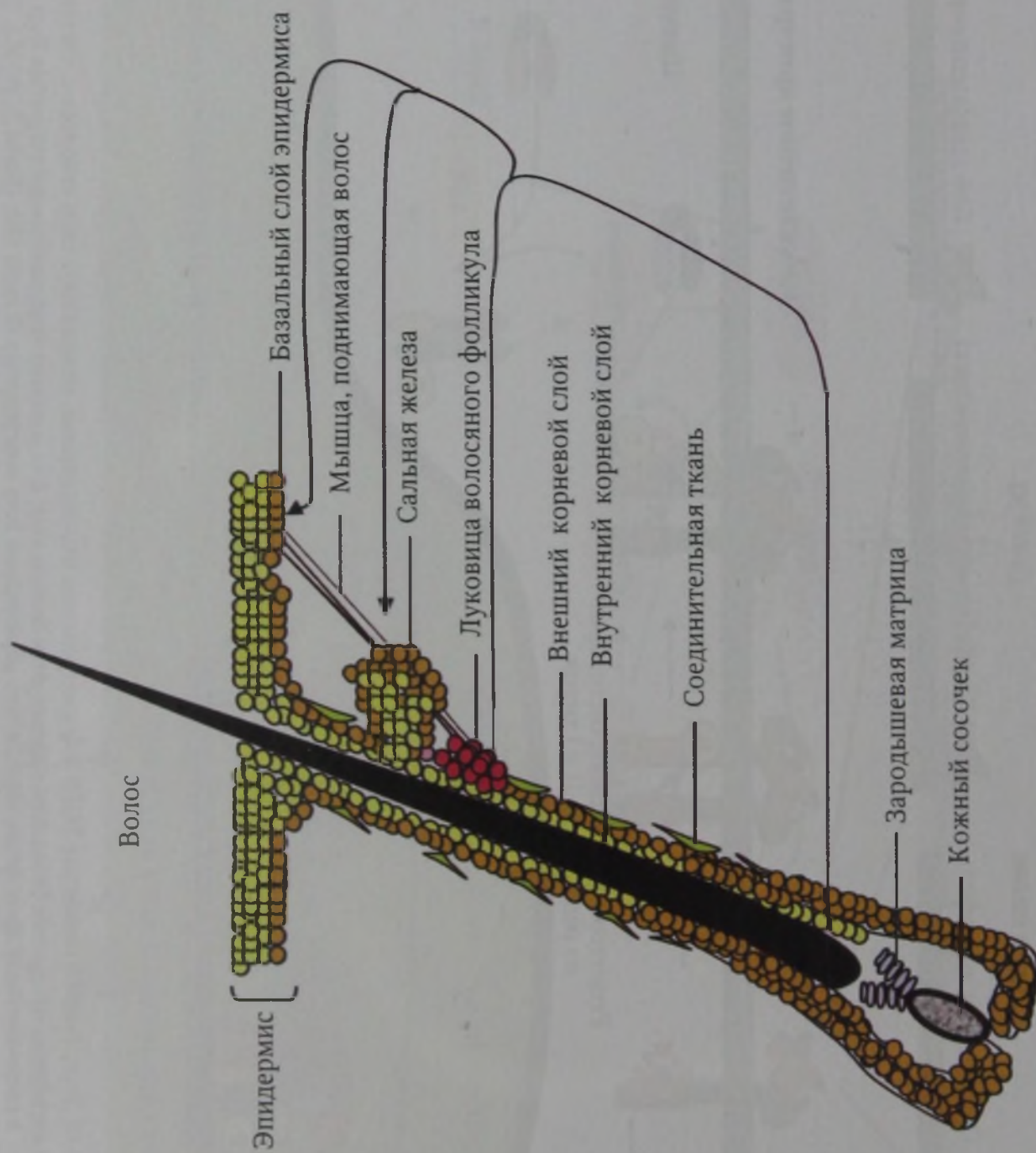


Рис. 10.1. Схема строения волосяного фолликула кожи. Стрелками показано направление движения стволовых клеток (Nguyen H. [et al.], 2006)

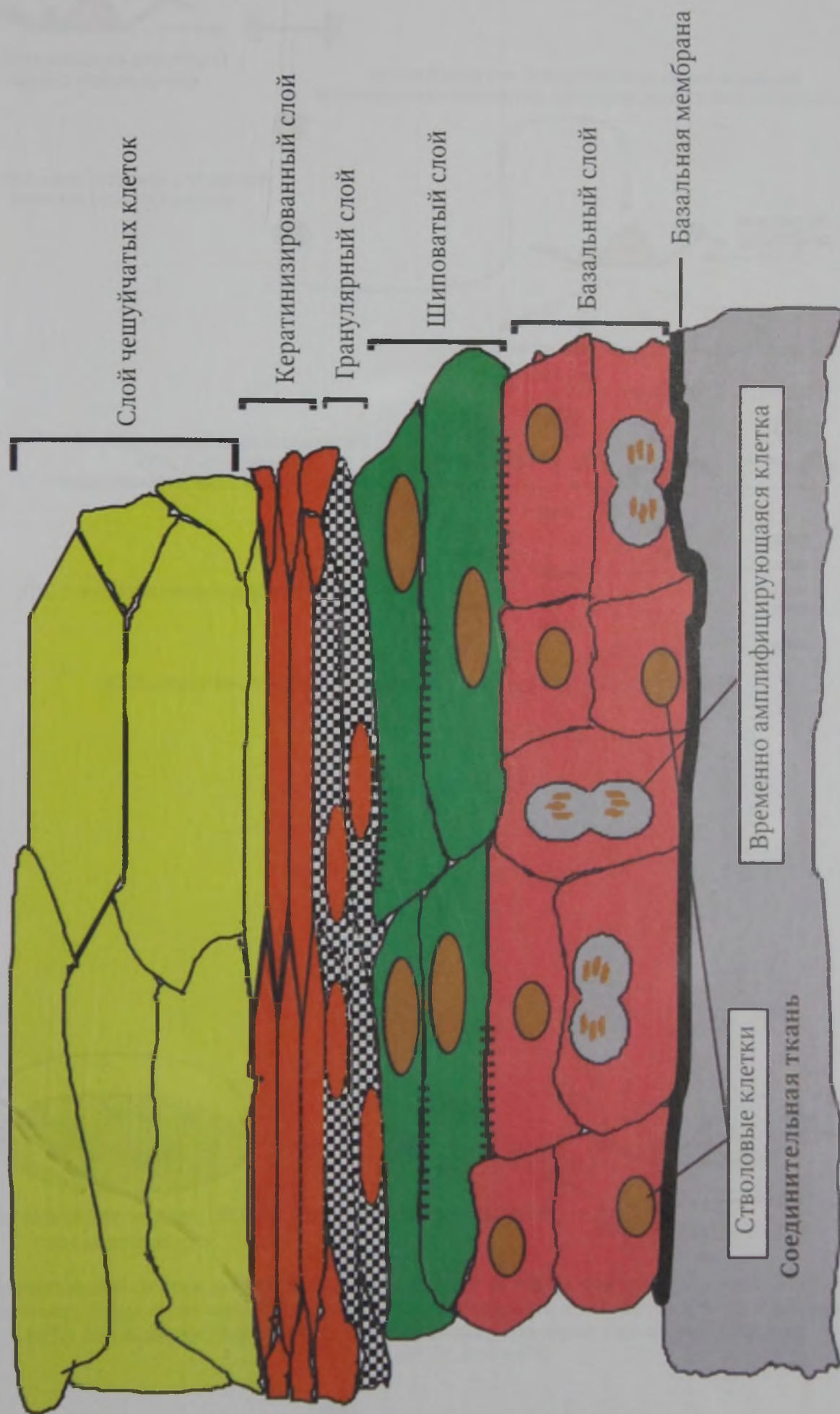


Рис. 10.2. Схема строения эпидермиса (Alberts B. [et al.], 2004)



Рис. 10.7. Схема опыта, доказывающего мультипотентность СКК

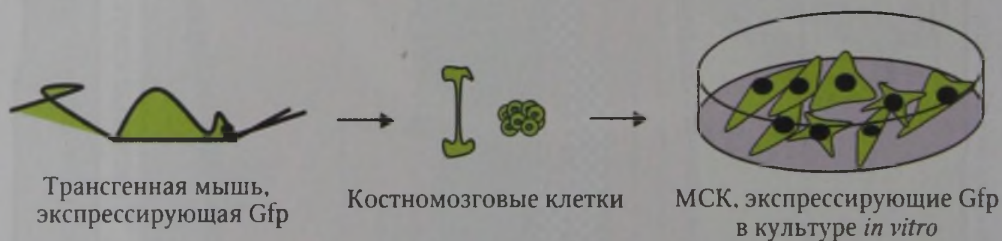


Рис. 10.10. Схема получения и свойства мезенхимальных стволовых клеток. Мезенхимальные стволовые клетки получают с помощью культивирования клеток костного мозга трансгенных мышей, повсеместно экспрессирующих зеленый флюоресцирующий белок (Gfp) (Popov B. V. [et al.], 2007)

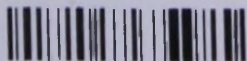


Борис Валентинович Попов — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института цитологии Российской академии наук, имеет врачебное образование. Круг профессиональных интересов — клеточная биология соматических стволовых клеток и направленная регуляция их функций, в рамках которой разработал и читает специальный курс лекций на кафедре биохимии биолого-почвенного факультета и на медицинском факультете Санкт-Петербургского государственного университета.

Автор известных в нашей стране и за рубежом научных публикаций; работал и совершенствовал свое биологическое образование в таких известных научных центрах, как Госпиталь для больных детей, г. Торонто, Канада; Датское общество по изучению рака, г. Копенгаген, Дания; Оксфордский университет, г. Оксфорд, Великобритания. В Северо-Западном университете г. Чикаго, США, основал лабораторию по получению гибридных клеточных линий и моноклональных антител, являющихся перспективными инструментами изучения нормальных и опухолевых стволовых клеток, эффективными диагностическими и лечебными средствами.

интернет-магазин

OZON.ru



1018367194