

УДК 591

ЭКСПРЕССИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РЕГЕНЕРАЦИОННЫЕ ПОТЕНЦИИ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ¹

© 2007 г. **В. И. Миташов**

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: mitashov@bk.ru

Поступила в редакцию 22.01.07 г.

В статье впервые проведен сравнительный анализ ранних стадий преобразований дифференцированных клеток пигментного эпителия, эпителия цилиарных складок и мюллеровской глии в глазу позвоночных и млекопитающих в процессе регенерации сетчатки и при культивировании. При использовании клеточных, молекулярных и генетических маркеров охарактеризованы дедифференцирование и пролиферация клеток, формирование прогениторных мультипотентных клеток, которые являются источником регенерации сетчатки у взрослых тритонов. При культивировании дифференцированных клеток формируются нейросферы, в которых обнаружены прогениторные мультипотентные клетки, дифференцирующиеся в нейроны сетчатки и мозга и глиальные клетки. Сравнительный анализ изменений клеток пигментного эпителия в процессе регенерации сетчатки и при культивировании дифференцированных клеток пигментного и цилиарного эпителиев и мюллеровской глии свидетельствует о сходных преобразованиях клеток на ранних стадиях трансдифференцировки.

Ключевые слова: тритон, регенерация, сетчатка, клеточные источники, экспрессия генов.

Хорошо известно, что регенерационные потенции особенно ярко выражены у низших позвоночных животных. У амфибий в наиболее совершенной степени регенерируют конечность, хвост, хрусталик, сетчатка (Карлсон, 1986; Stocum, 1995, 2006; Tsonis, 1996; Brockes, 1997; Carlson, 1997; Eguchi, 1997; Thouveny, Tassava, 1997). Основная задача в изучении регенерации – понять механизмы восстановительных процессов. К настоящему времени накоплен достаточно большой экспериментальный материал при изучении регенерации, полученный с использованием морфологических, цитологических, иммунохимических и биохимических методов исследования. Для большинства моделей регенерации известны клеточные источники восстановления тканей и органов, изучены клеточные преобразования на разных уровнях в ходе восстановления разнообразных органов и тканей.

Цель статьи – провести сравнительный анализ клеточных преобразований на ранних стадиях трансдифференцировки клеток пигментного эпителия, эпителия цилиарных складок и мюллеровской глии в процессах регенерации хрусталика и сетчатки и при культивировании этих клеток.

Рассмотрены механизмы формирования прогениторных мультипотентных клеток и их дифференцировочные потенции, контролируемые сетью регуляторных генов и сигнальных молекул.

РЕГЕНЕРАЦИЯ СЕТЧАТКИ У ВЗРОСЛЫХ ТРИТОНОВ

Генетические исследования регенерации стали осуществимы при введении методов молекулярной биологии, которые позволили получить результаты для сравнительного анализа цитологических и молекулярно-генетических механизмов регенерации. Приближение к пониманию механизмов регенерации становится более реальным и продуктивным при изучении взаимодействия генов и их репрограммирования в процессе восстановления органов и тканей. Это направление исследований получает развитие в моделях регенерации планарий, а также конечности, хвоста, плавника, тканей глаза у позвоночных (Cellular and molecular..., 1997). Проведение таких исследований способствует объединению усилий генетиков и эмбриологов в исследованиях механизмов биологических явлений.

Очевидно, что в ходе развития или регенерации любого органа или ткани экспрессируются сотни и тысячи генов (Ahmad et al., 2004). Суще-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48502).

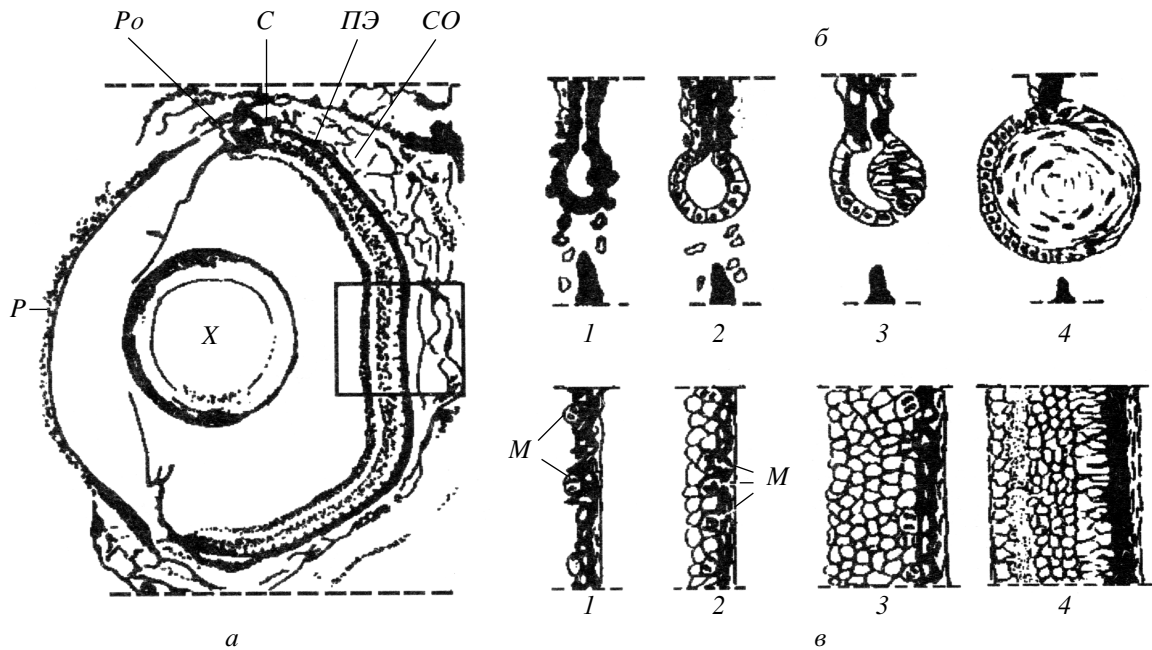


Рис. 1. Схема регенерации хрусталика и сетчатки у взрослых тритонов: *а* – поперечный срез неоперированного глаза; *б, в* – стадии регенерации (приведены вдоль дорсовентральной оси) хрусталика (*б*), сетчатки центральной области дна глаза (*в*, см. на *а*).

P – роговица; *Po* – ростовая зона; *C* – сетчатка; *ПЭ* – пигментный эпителий; *СО* – сосудистая оболочка; *X* – хрусталик; *M* – митоз.

1 – 5–10-е сут после операции, дедифференцировка (депигментация) клеток *ПЭ* и инициация их пролиферации, митозы в слое *ПЭ*; *2* – 14-е сут после операции, двухслойный зачаток сетчатки (нейроэпителий); *3* – 20-е сут после операции, многослойный недифференцированный зачаток сетчатки, митозы локализованы в наружном слое зачатка; *4* – 30–35-е сут после операции, дифференцировка клеток регенерировавшей сетчатки (из: Миташов и др., 2000).

ствуют ли среди них так называемые “регенерационные”, запускающие процесс регенерации? Наш опыт исследования при внедрении методов молекулярной биологии в изучении регенерации показывает, что ответ на этот вопрос отрицательный. Методом геновычитания нам удалось идентифицировать гены, преимущественно экспрессирующиеся в дорсальной области радужки – источнике регенерации хрусталика, но специфические “регенерационные” гены так и не были идентифицированы (Казанская и др., 1995; Маркитантова и др., 1997). Поиск генов, специфически экспрессирующихся в дорсальной области радужки, продолжается, и недавно опубликованы данные об экспрессии определенного набора генов, локализованных исключительно в дорсальной области радужки, – это гены сигнального пути *Wnt* и их рецепторов: *Wnt2b* и *Frizzled4* (Hayashi et al., 2006). Экспрессия этих генов обнаружена на стадии инициации формирования хрусталика, чему предшествует депигментация и дедифференцировка клеток дорсальной области радужки. Существенным результатом исследования являются данные о двустадийном процессе регенерации хрусталика. Первая стадия – дедифференцирование клеток дорсальной и частично вентральной области радужки, активация пролиферации кле-

ток, увеличение уровня экспрессии ранних хрусталиковых факторов транскрипции *Rax6*, *Sox2*, *MafB* по всей поверхности радужки. Для последующей второй стадии ключевым событием, определяющим, завершится ли регенерация формированием хрусталика, является активация определенного специфического набора генов *Wnt2b*, *Frizzled4*, *Sox1*, *Prox1*, β - γ -*crystallins* в результате, вероятно, дерепрессии генов в дорсальной области радужки (Mitashov et al., 1992; Del Rio-Tsonis et al., 1995; Mizuno et al., 1999, 2002; Hayashi et al., 2006). Отмеченный набор генов не экспрессируется в вентральной области радужки и хрусталик из этой зоны радужки не регенерирует (Hayashi et al., 2006).

Регенерация сетчатки и хрусталика у взрослых тритонов – одна из наиболее известных и активно разрабатываемых моделей трансдифференцировки клеток (рис. 1). Из рисунка очевидно, что, как уже отмечено, хрусталик регенерирует из дорсальной области радужки, но не регенерирует из противоположной вентральной радужки, а сетчатка регенерирует как из клеток ростовой области, так из пигментированных клеток пигментного эпителия, большая часть сетчатки образуется в результате трансдифференцировки пигментного

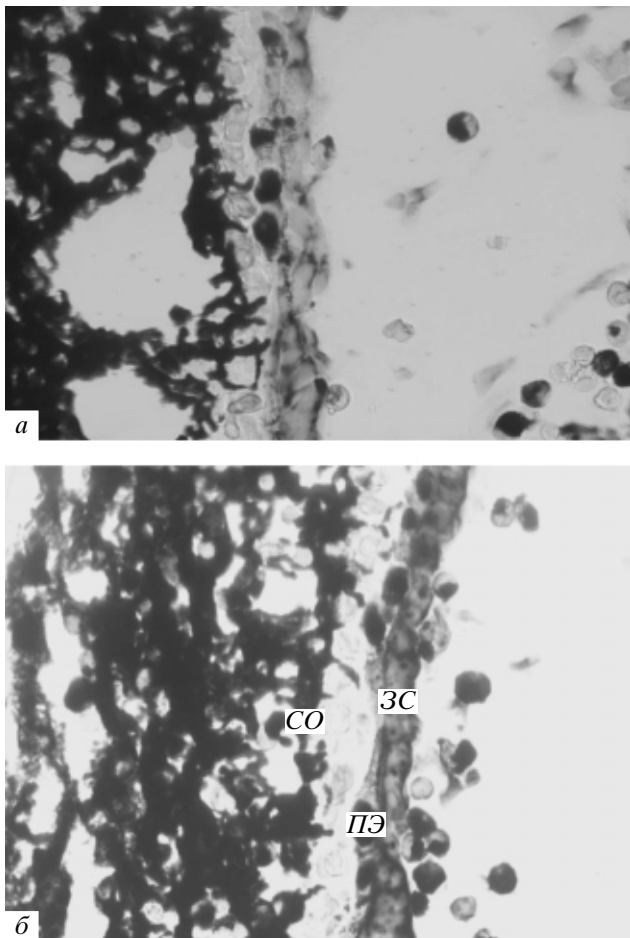


Рис. 2. Экспрессия гена *Pax6* в нейробластах зачатка сетчатки на 22-е сут после удаления сетчатки у взрослых тритонов, гибридизация *in situ*: *a* – контроль, *б* – опыт.

ЗС – зачаток сетчатки (нейробласты), ост. обозначения см. на рис. 1. Увел. $\times 200$.

эпителия. Регенерация сетчатки в результате трансдифференцировки клеток пигментного эпителия также является двустадийным процессом. На первой стадии, как и в ходе регенерации хрусталика, осуществляется дедифференцировка и активируется пролиферация клеток пигментного эпителия. Депигментирующиеся пролиферирующие клетки смещаются в полость глаза, где постепенно создается слой мультипотентных нейробластов (рис. 1; 2). На второй стадии регенерации ключевые события касаются особенностей экспрессии генов в исходных клетках пигментного эпителия и в зачатке сетчатки – в нейробластах (Макарьев и др., 2002; Маркитантова и др., 2003, 2004; рис. 1; 3). В дифференцированной сетчатке в норме выявлена экспрессия регуляторных генов *Pax6*, *Prox1*, *Six3* в клетках ганглиозного и внутреннего ядерного слоев, но она не обнаружена в пигментном эпителии – источнике регенерации, где активны гены *Mitf*, контролирующие мелано-

генную дифференцировку пигментного эпителия. На стадии формирования мультипотентных нейробластов ингибируется экспрессия генов *Mitf* в пигментном эпителии и активируется экспрессия регуляторных генов *Pax6*, *Prox1*, *Six3* в нейробластах (рис. 2). По нашим радиоавтографическим данным (Миташов, 1976), не выявлено включения предшественника синтеза меланина ^3H -ДОФА в депигментированные клетки пигментного эпителия, что свидетельствует о блокировании генов *Mitf*, контролирующих меланогенез. Антагонистические взаимодействия между генами *Pax6* и *Mitf* (Planque et al., 2001) лежат в основе формирования мультипотентных нейробластов, восстанавливающих сетчатку. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в норме в клетках пигментного эпителия ген *Pax6* не экспрессируется, и активация экспрессии этого гена происходит на стадии депигментации клеток, являющихся клеточным источником регенерации сетчатки. Эти результаты очень четко коррелируют с данными об изменении уровня экспрессии ключевых регуляторных генов на ранних стадиях развития глаз млекопитающих. Ген *Pax6* экспрессируется в пигментном эпителии на стадии формирования глазной чаши, но при активации меланогенеза в результате взаимодействия фактора транскрипции, кодируемого геном *Pax6*, с промоторной областью гена *Mitf* экспрессия гена *Pax6* резко снижается и не выявляется во взрослом глазу (Planque et al., 2001; Baumer et al., 2003). Превалирующей становится экспрессия генов *Mitf*, контролирующих меланогенную дифференцировку пигментного эпителия.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в норме в клетках пигментного эпителия ген *Pax6* не экспрессируется. Активация экспрессии этого гена происходит на стадии депигментации клеток, являющихся клеточным источником регенерации сетчатки (рис. 2).

Для понимания механизмов трансдифференцировки клеток пигментного эпителия ключевыми событиями являются изменения уровня экспрессии генов, контролирующих развитие и дифференцировку пигментного эпителия и первых образующихся из пигментного эпителия мультипотентных клеток зачатка сетчатки (рис. 1; 2, 3). К таким генам относятся *Mitf*, *tyr*, *Trp1*, *Otx2*, *RPE65*, *CRBP*, *CRALBP*, а в зачатке сетчатки – *Pax6*, *Six3*, *Six6*, *Crx*, *Chx10*, *NeuroD*, *opsin*, *rhodopsin*, *Notch1* и модуляторы сигнального пути *Notch* *Hes1*, *Hes5*.

Результаты анализа экспрессии генов *Otx2*, *RPE65*, *CRBP*, *CRALBP* в глазу тритонов в норме и при регенерации сетчатки показали следующее (Sakami et al., 2005; Chiba et al., 2006). Гомеобоксный ген *Otx2* кодирует фактор транскрипции с

молекулярной массой 36 кДа, который участвует в формировании меланосом в результате прямого взаимодействия с промоторной областью генов *tyr* или *Trp1* (tyrosinase-related protein). Гены *Otx2* в норме экспрессируются в глазу тритонов в пигментном эпителии, а в сетчатке в обоих ядерных слоях – в наружном, в фоторецепторах, и во внутреннем, в биполярах. Оказалось, что в ходе регенерации сетчатки уровень экспрессии гена *Otx2* в пигментном эпителии количественно изменяется. Уровень его экспрессии в процессе депигментации клеток пигментного эпителия снижается. В раннем зачатке сетчатки антитела равномерно окрашивают весь регенерат толщиной в два-три слоя клеток. По мере развития регенерата сетчатки экспрессия генов *Otx2* в пигментном эпителии возвращается к уровню нормы.

Другой маркер, белок RPE65, контролирующий события зрительного цикла и выявляемый в цитоплазме клеток, принадлежит к специфическим маркерам пигментного эпителия. Экспрессия этого маркера, проанализированная на транскрипционном и белковом уровнях, свидетельствует о снижении уровня его экспрессии на ранних стадиях регенерации сетчатки так же, как и гена *Otx2* в процессе депигментации исходных клеток (Chiba et al., 2006). В раннем зачатке сетчатки антитела к белку RPE65 окрашивают весь зачаток. Результаты тщательного анализа Чибы (Chiba et al., 2006) свидетельствуют о наличии этого белка в зачатке сетчатки в результате растянутого во времени процесса его деградации, но не являются показателем синтеза RPE65 в раннем зачатке сетчатки.

Таким образом, формирование зачатка сетчатки в процессе депигментации клеток пигментного эпителия осуществляется на фоне снижения в пигментном эпителии уровня экспрессии специфических регуляторных генов *Otx2*, *RPE65*, *Mitf*. При этом следует подчеркнуть, что пигментный эпителий в течение всего процесса регенерации сетчатки сохраняется в виде единого однорядного слоя клеток, а снижение как уровня пигментации клеток, так и уровня экспрессии отмеченных генов на ранних стадиях следует рассматривать в качестве критерия снижения уровня дифференцировки клеточных источников регенерации. Такая перестройка внутренних свойств клеточных источников регенерации является первой стадией изменений – ключевой и существенной для инициации трансдифференцировки клеток пигментного эпителия, репрограммирования генома и, соответственно, для инициации формирования зачатка сетчатки.

ПИГМЕНТНЫЙ ЭПИТЕЛИЙ: ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ И КЛЕТОЧНЫЕ ИСТОЧНИКИ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Регенерация сетчатки из пигментного эпителия является процессом зеркальным по отношению к нормальному развитию сетчатки и пигментного эпителия. В этой связи рассмотрим события развития глаза и экспрессию основных регуляторных генов (рис. 3). Однорядный слой пигментного эпителия сетчатки принадлежит к клеткам с ярко выраженными признаками мультифункциональной и незаменимой ткани в глазу. Информация о молекулярных механизмах развития пигментного эпителия необходима и существенна для понимания трансдифференцировки в ходе регенерации сетчатки. Идентифицировано несколько факторов транскрипции и сигнальных каскадов, контролирующих специализацию нейроэпителия глазного пузырька и дифференцировку клеток пигментного эпителия (рис. 3).

Пигментный эпителий обеспечивает поступление из сосудистой оболочки жидкости и ионов в сетчатку, создает барьер между ними, поглощает избыток солнечной энергии и свободные радикалы, предотвращает гибель фоторецепторов и фагоцитирует наружные членики фоторецепторов, обеспечивая их самообновление (Vok, 1993; Boulton, Dayhaw-Barker, 2001). Все эти свойства клеток пигментного эпителия обеспечивают гомеостаз тканей глаза.

Важным моментом, который следует подчеркнуть, является общий источник формирования пигментного эпителия и сетчатки из клеток передней области нервной пластинки (рис. 3, а). Коротко остановимся на характеристике генетической сети, которая контролирует последовательную дифференцировку клеток пигментного эпителия в глазу эмбрионов.

На стадии глазного пузыря у позвоночных нет еще деления единого глазного зачатка на пигментный эпителий и сетчатку (рис. 3) и по молекулярным маркерам клетки невозможно отличить друг от друга. В глазном пузыре экспрессируется определенный набор ранних факторов транскрипции – Pax6, Six3, Rx1, Otx2, которые необходимы для инициации развития глаза. Все клетки зрительного пузырька являются компетентными для формирования сетчатки, пигментного эпителия, зрительного тракта. На столь ранней стадии развития глаза уже известны и сигнальные молекулы, которые координируют экспрессию регуляторов транскрипции. В глазном пузырьке различают дистальную зону как проспективную сетчатку, контактирующую с поверхностной эктодермой, и дорсальную область, презумптивный пигментный эпителий, который находится в тесном контакте с периокулярной мезенхимой. Сигнальные молекулы, диффундирую-

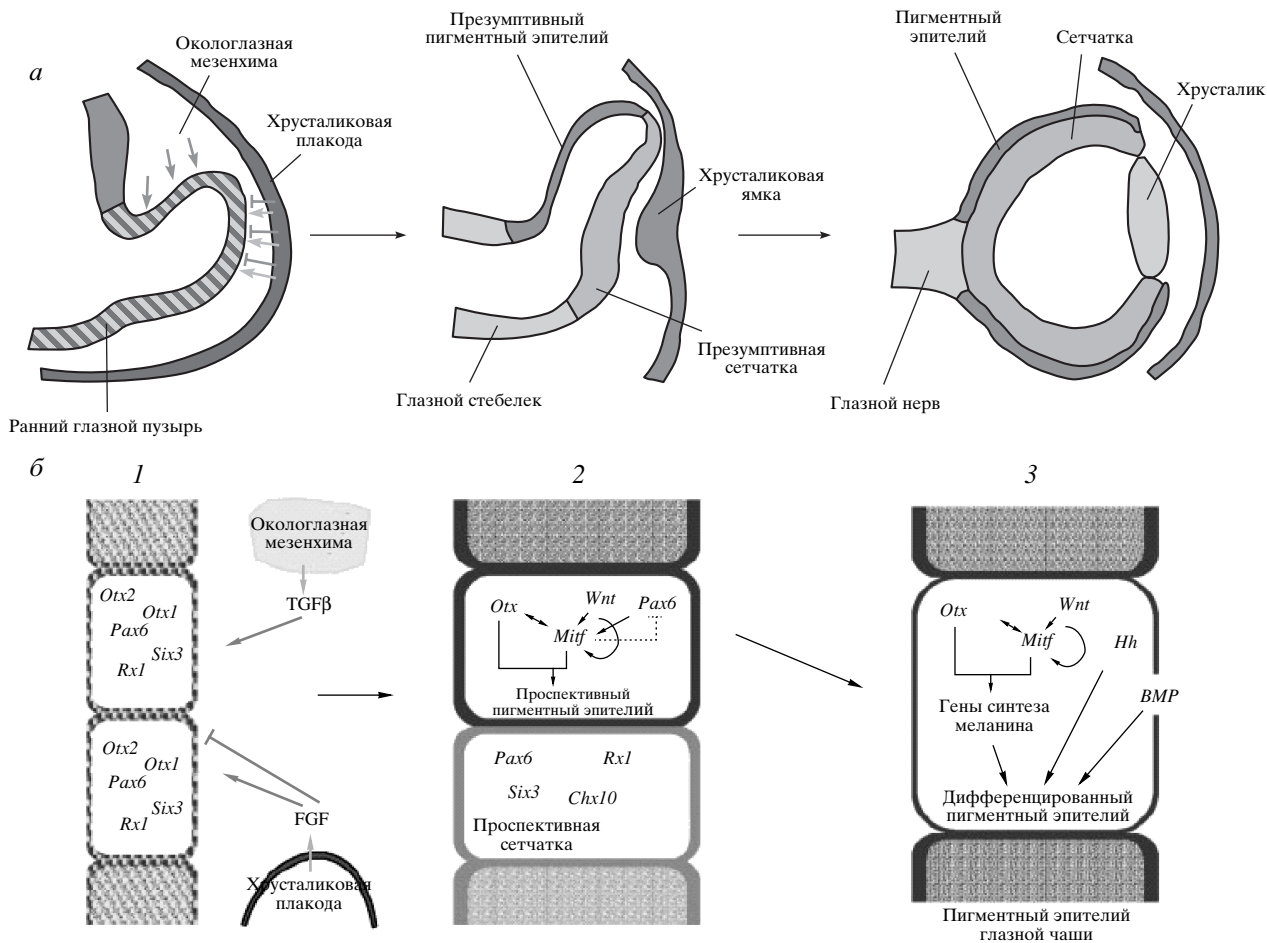


Рис. 3. Схемы ранних стадий развития глаза у млекопитающих (а) и молекулярных взаимодействий при формировании пигментного эпителия и сетчатки (б).

1 – ранний, 2 – оформленный глазной пузырек; 3 – глазная чаша (из: Martinez-Morales et al., 2004).

щие из поверхностной эктодермы (FGF1, FGF2) и из периокулярной мезенхимы (семейство TGFβ, активин и их рецепторы), регулируют соответственно развитие сетчатки и пигментного эпителия (рис. 3). В пигментном эпителии под контролем модуляторов Wnt, BMP и Hh экспрессируются гены *Otx*, *Mitf*, *Pax6*, и в результате на стадии глазной чаши осуществляется дифференцировка клеток, на этой же стадии дифференцируются клетки и в дистальной области под контролем гомеобоксных генов *Pax6*, *Six3*, *Rx*, *Chx10*, дифференцируются и нейроны сетчатки (рис. 3). Транскрипционные факторы *Six3*, *Otx1*, *Otx2* экспрессируются в ответ на специализацию глазного поля, инициируемую транскрипционными факторами *Pax6* и *Rx*. Нейробласты раннего глазного пузыря позвоночных схожи как на морфологическом, так и на молекулярно-генетическом уровнях. Они все экспрессируют ряд транскрипционных факторов, включая *Otx*, *Pax6*, *Rx*, *Six3*, необходимых для развития глаза. Сравнивая две ранние стадии развития пигментного эпителия

(рис. 3, а и б), следует обратить внимание на существенный момент, касающийся экспрессии гомеобоксного регуляторного гена *Pax6*. Он экспрессируется на ранних стадиях развития, и его экспрессия существенна для раннего периода формирования глаза. Однако активация в развивающемся глазу гена *Mitf* приводит к инактивации в пигментном эпителии генов *Pax6*, которые активируются в зачатке развивающейся сетчатки. Сходные конкурентные взаимодействия генов *Pax6* и *Mitf* показаны выше при описании ранних событий регенерации сетчатки у тритонов (рис. 2).

РЕГЕНЕРАЦИОННЫЕ ПОТЕНЦИИ КЛЕТКИ ЦИЛИАРНОГО И ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЕВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Если у взрослых тритонов клетки пигментного эпителия являются источником наиболее совершенной регенерации сетчатки, то в какой степени регенерационные потенции этих клеток

проявляются у млекопитающих? В литературе исследователи постоянно отмечают и подчеркивают обоснованный утвердившийся вывод, что у взрослых млекопитающих сетчатка действительно не регенерирует. Однако после обнаружения стволовых клеток в пигментированном эпителии цилиарной области справедливо возрос интерес к изучению этой области глаза (Горепе et al., 2000; Ahmad et al., 2000; Akagi et al., 2004; Engelhardt et al., 2004; Lord-Grignon et al., 2006). В условиях культивирования пигментированные клетки цилиарного эпителия проходят сходные стадии изменений. Они депигментируются, дедифференцируются, пролиферируют и дифференцируются в отдельные клеточные элементы сетчатки. При их культивировании были получены клональные нейросферы, клетки в которых депигментировались в течение первой недели, как и при регенерации сетчатки у тритонов, а после длительного культивирования они экспрессировали маркерные нейроспецифические белки, характерные для ганглиозных, амакриновых клеток, биполяров и фоторецепторов сетчатки (Горепе et al., 2000). Число стволовых клеток в цилиарных складках глаза взрослых млекопитающих, включая и человека, не превышает 0.2% (Coles et al., 2004). Эти клетки редко делятся, для них характерен, вероятно, асимметричный митоз, хотя экспериментально это не показано, кроме того, их не так легко стимулировать к пролиферации и очень трудно изолировать в виде отдельной субпопуляции. Однако если удастся изолировать стволовые клетки и накопить их при культивировании вне организма, то можно экспериментально трансплантировать их в полость глаза. Стволовые клетки, изолированные из цилиарной области взрослых людей, при трансплантации после предварительного культивирования в полость глаза новорожденных мышей оказались в условиях ниши, индуцировавшей дифференцировку фоторецепторов (Coles et al., 2004). Результаты таких экспериментов показали, что при культивировании стволовые и прогениторные клетки проходят две основные стадии изменений – дедифференцирование и последующее дифференцирование с активацией программы, функционировавшей в ходе нормального развития глаза (рис. 3). В условиях культивирования происходит репрограммирование генома, и на ранних стадиях процесса репрограммирования экспрессируются гены стволовых, прогениторных клеток *nestin*, *Ki67*, *bFGF α* , *CyclinD1*, *P-H3*, *Pax6*, *Six3*, *Six6*, *Rx* (Coles et al., 2004; Azuma et al., 2005; Lord-Grignon et al., 2006). На продвинутых стадиях развития в культивируемых клетках экспрессируются свидетельствующие о дифференцировке клеток гены родопсина (*rh*), опсина (*op*) и *GFAP*.

Нейросферы представляют богатый экспериментальный материал для клеточных и генетиче-

ских манипуляций. Так, ретровирусные конструкции, содержащие гены *Stx* или *Otx2*, трансфицировали в нейросферы, полученные из цилиарного эпителия или радужки взрослых крыс, и индуцировали экспрессию маркеров фототрансдукции (Akagi et al., 2004). По морфологическим признакам клетки напоминали фоторецепторы; в ходе нормального развития у позвоночных гены *Stx* и *Otx2* контролируют развитие фоторецепторов.

Нерешенным остается вопрос о происхождении стволовых клеток в эмбриогенезе, неизвестна также роль стволовых клеток в ходе развития сетчатки и неясно, возможна ли ее регенерация в условиях *in vivo* при активном участии стволовых клеток цилиарного эпителия.

В условиях культивирования нейральные потенции выявлены не только в пигментированных клетках цилиарного эпителия, но также в клетках пигментного эпителия взрослого глаза млекопитающих (Engelhardt et al., 2005). При этом клетки пигментного эпителия проходят промежуточную стадию развития, характерную для периода формирования нейробластов при регенерации сетчатки у взрослых тритонов (Миташов, 2005). Эти неожиданные результаты позволяют надеяться на продуктивность сравнительного анализа полноценной регенерации сетчатки у тритонов и ее возможной инициации у млекопитающих. Показано, что клетки пигментного эпителия взрослых крыс в условиях культивирования депигментируются, дедифференцируются, формируют нейросферы и образуют промежуточный фенотип прогениторных клеток (Engelhardt et al., 2005). При этом изменяется их морфология от эпителиальной до сферической или веретеновидной формы. В культивируемых клетках происходит репрограммирование генома клеток и активируется экспрессия генов, специфичных для ранних нейральных прогениторных клеток – *nestin*, *Ki67*, *Pax6*, *Notch1*, *Hes1*, *Musashi*, *Flk1*, и снижается экспрессия специфичных молекул, характерных для пигментного эпителия – RPE65 и цитокератинов. Наряду с малодифференцированными прогениторными были обнаружены клетки, дифференцирующиеся в нейрональном и глиальном направлениях. Об их типе судили по молекулярным маркерам: клетки экспрессировали только ранние маркеры нейронов β 3-тубулина и глиальных клеток GFAP, NG2, DCX, не удалось получить клетки, экспрессирующие маркеры биполяров и фоторецепторов. Анализ полученных данных показывает, что при культивировании клеток пигментного эпителия успех в получении продвинутых стадий дифференцирующихся клеток сетчатки зависит от подбора факторов среды культивирования. Основные манипуляции связаны с выделением клеток пигментного эпителия, использованием наборов

ферментов и с тестированием разнообразных ростовых факторов.

РЕГЕНЕРАЦИОННЫЕ ПОТЕНЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК МЮЛЛЕРОВСКОЙ ГЛИИ

Еще одна модель трансдифференцировки в глазу позвоночных и млекопитающих – продукция нейронов и линзовых клеток из дифференцированных клеток мюллеровской глии (Moscona, 1986; Fischer et al., 2002, 2004; Fischer, Reh, 2003a; Ooto et al., 2004; Das et al., 2006; Raymond et al., 2006). Клетки мюллеровской глии под влиянием инъецированных в полость глаза кур инсулина и ростовых факторов (FGF2) экспрессируют нейрофиламенты и β 3-тубулин (Fischer et al., 2004). Этот эффект обнаружен среди клеток сетчатки периферийной области, где локализованы менее дифференцированные клетки. Ответная реакция глиальных клеток на инъекцию ростовых факторов – это проявление глиозиса в сетчатке и при этом сохранение стабильности большей части клеток мюллеровской глии. Однако при травме глаз нейротоксином (N-methyl-D-aspartate, NMDA), приводящей к гибели амакриновых, ганглиозных клеток и биполяров, клетки мюллеровской глии дедифференцируются, пролиферируют, включая BrdU, PCNA, и смещаются из внутреннего в наружный ядерный слой, где делятся. Меченные BrdU мюллеровские клетки проявляют признаки прогениторных, экспрессируя гомеобоксдоменные и нейрогенные факторы транскрипции *Pax6*, *Chx10*, *CASH1* (Fischer, Reh, 2003b). Пролиферирующие клетки делятся один раз. Активированные мюллеровские клетки перераспределяются между внутренним и наружным ядерными слоями сетчатки и сохраняются в ней несколько недель. Большая часть клеток остается в недифференцированном состоянии и экспрессирует гомеобокс-ные гены *Pax6* и *Chx10*. Пятая часть клеток дифференцируется как мюллеровская глия и только менее 4% клеток временно экспрессируют нейрофиламенты дифференцированных нейронов.

Сходный характер нейротрофического эффекта был обнаружен и в сетчатке глаз взрослых крыс. Инъекция нейротоксина NMDA в полость глаза приводит к гибели ганглиозных клеток и части клеток внутреннего ядерного слоя (Ooto et al., 2004). Во внутреннем ядерном слое через 2 сут после инъекции нейротоксина обнаружены редко делящиеся и включающие BrdU клетки. С помощью молекулярных маркеров эти клетки были отнесены к микроглии. Это означает, что в ответ на травму первыми активируются фагоциты, а вслед за ними маркированные глутаминсинтетазой клетки мюллеровской глии, которые включают BrdU и экспрессируют нестин и затем дифференцируются в биполяры и колбочки.

Маркерами дифференцировки служили PKC, NSE, родопсин и рековерин. Увеличить число пролиферирующих клеток мюллеровской глии при многократных инъекциях ростовых факторов не получилось, но удалось в эксплантатах сетчатки дополнительно активировать программу амакриновых, горизонтальных и фоторецепторных клеток в результате трансфекции ретровирусных конструкций, содержащих в качестве маркера кДНК зеленого флуоресцирующего белка и гены *Pax6*, *NeuroD*, *Math3*, *Crx*.

В недавно опубликованном детальном исследовании получены дополнительные данные о дифференцировочных потенциях клеток мюллеровской глии взрослых млекопитающих (Das et al., 2006). Авторам исследования удалось обогатить популяцию глиальных клеток, выделенных из глаз взрослых крыс, до 93–94%. При культивировании изолированных клеток мюллеровской глии их свойства не менялись, однако при добавлении ростовых факторов активировалась пролиферация клеток и формировались нейросферы. В нейросферах были идентифицированы клетки, экспрессировавшие маркеры стволовых клеток – BrdU, Nestin, Musashi, Sox2, Notch1. Доля таких клеток в нейросферах была удивительно высока – от 72 до 86%. В нейросферах также экспрессируются маркеры прогениторных клеток – *Pax6*, *Chx10*, *Rx*. При совместном культивировании нейросфер с клетками сетчатки куриных эмбрионов или новорожденных крыс в нейросферах дифференцировались фоторецепторы и биполяры. Предполагается, что диффундирующие из сетчатки факторы индуцируют в нейросферах нейроны сетчатки. Меченные зеленым белком диссоциированные клетки нейросфер после трансплантации в гиппокамп или в полость глаза новорожденных крыс мигрировали в разных направлениях и продуцировали нейроны гиппокампа мозга, а в глазу – фоторецепторы, биполяры и ганглиозные клетки. Полученные результаты свидетельствуют о нейрогенном потенциале клеток мюллеровской глии, который в свою очередь контролируется факторами ниши.

Таким образом, сравнительный анализ изменений дифференцированных клеток пигментного эпителия, эпителия цилиарных складок и клеток мюллеровской глии в процессе регенерации сетчатки или при культивировании показывает, что указанные клетки проходят сходные стадии морфологических и молекулярно-генетических изменений на ранних стадиях трансдифференцировки, которые приводят к совершенной регенерации сетчатки у взрослых тритонов, а также к дифференцировке нейронов или глии у млекопитающих.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о существовании единого принципа изменений дифференцированных клеток, но их

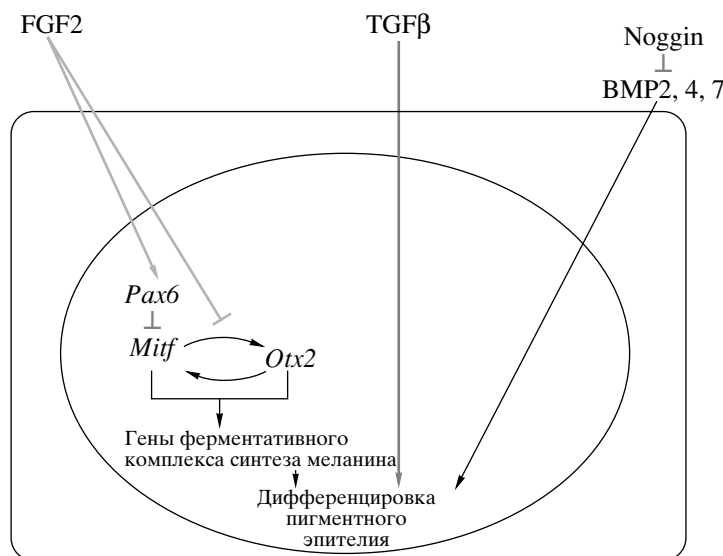


Рис. 4. Схема предполагаемых молекулярных взаимодействий между регуляторными генами и сигнальными молекулами при дифференцировке клеток пигментного эпителия и их трансдифференцировке на ранних стадиях регенерации сетчатки у взрослых тритонов.

молекулярные механизмы, учитывая специфические особенности дифференцировки клеток, должны отличаться. Можно ожидать, что механизмы, контролируемые изменениями клеток пигментного эпителия и эпителия цилиарных складок, будут близкими и сходными. На рис. 4 приведена схема предполагаемых взаимодействий между регуляторными генами и сигнальными молекулами в процессе трансдифференцировки клеток пигментного эпителия. Сигнальный путь FGF2 активирует экспрессию гена *Pax6* в дифференцированных клетках пигментного эпителия. При регенерации сетчатки основным источником ростовых факторов может быть сосудистая оболочка. Продукт экспрессии гена *Pax6* подавляет экспрессию гена *Mitf*, что в свою очередь может стать причиной снижения уровня экспрессии гена *Otx2*. Под контролем генов *Mitf* и *Otx2* находятся все компоненты биосинтеза меланина. Сходную цепь молекулярно-генетических преобразований можно ожидать и в пигментированных клетках цилиарных складок.

Цепь конкретных событий при дедифференцировке клеток мюллеровской глии, несомненно, иная, и определяется она изменениями уровня экспрессии специфичных для клеток Мюллера компонентов: глутаминсинтетазы, виментина, СА (carbonic anhydrase) и ретинальдегидсвязывающего белка (CRALBP) (Wahlin et al., 2004).

В заключение еще раз следует подчеркнуть, что нейральные потенции дифференцированных клеток пигментного эпителия, цилиарных складок и мюллеровской глии напрямую связаны с их общим нейральным происхождением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Казанская О.В., Маркитантова Ю.В., Снеговая И.Ю. и др. Идентификация новых генов и анализ их экспрессии в процессе регенерации хрусталика и сетчатки у взрослых тритонов // Изв. АН. Сер. биол. 1995. № 3. С. 276–279.
- Карлсон Б.М. Регенерация. М.: Наука, 1986. 296 с.
- Макарьев Е.О., Зиновьева Р.Д., Митаилов В.И. Экспрессия регуляторных гомеобоксодержащих генов в ходе регенерации сетчатки у взрослых тритонов // Изв. АН. Сер. биол. 2002. № 6. С. 663–667.
- Маркитантова Ю.В., Лукьянов К.А., Митаилов В.И., Лукьянов С.А. Анализ экспрессии генов, содержащих последовательности *LeR-1* и *VeR-1* в эмбриогенезе, при регенерации и в интактных тканях у тритонов // Онтогенез. 1997. Т. 28. № 4. С. 289–297.
- Маркитантова Ю.В., Макарьев Е.О., Зиновьева Р.Д. и др. Локализация экспрессии гена *Prox1* при регенерации хрусталика и сетчатки у тритонов методом гибридизации *in situ* // Докл. РАН. 2003. Т. 391. № 4. С. 570–573.
- Маркитантова Ю.В., Макарьев Е.О., Смирнова Ю.А. и др. Исследование паттерна экспрессии регуляторных генов *Pax6*, *Prox1* и *Six3* в ходе регенерации структур глаза тритона // Изв. АН. Сер. биол. 2004. № 5. С. 522–531.
- Митаилов В.И. Радиоавтографическое исследование синтеза меланина в клетках пигментного эпителия сетчатки у взрослых тритонов после хирургического удаления сетчатки // Онтогенез. 1976. Т. 7. № 5. С. 495–501.
- Митаилов В.И. Генетические механизмы трансдифференцировки клеток // Там же. 2005. Т. 36. № 4. С. 292–299.

- Миташов В.И., Арсанто Ж.-П., Тувени И.* Экспрессия глиальных, нейроспецифических и внеклеточных антигенов в процессе регенерации сетчатки у взрослых тритонов // *Изв. АН. Сер. биол.* 2000. № 3. С. 294–301.
- Ahmad I., Tang L., Pham H.* Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000. V. 270. P. 517–521.
- Ahmad I., Das A.V., James J. et al.* Neural stem cells in mammalian eye: types and regulation // *Sem. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 15. P. 53–62.
- Akagi T., Mandai M., Ooto S. et al.* Otx2 homeobox gene induces photoreceptor specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45. P. 4570–4575.
- Azuma N., Tadokoro K., Asaka A. et al.* Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. P. 1059–1068.
- Baumer N., Marquardt T., Stoykova A. et al.* Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6 // *Development.* 2003. V. 121. P. 2903–2915.
- Bok D.* The retinal pigment epithelium: a versatile partner of version // *J. Cell Sci. Suppl.* 1993. V. 17. P. 189–195.
- Boulton M., Dayhaw-Barker P.* The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and aging changes // *Eye.* 2001. V. 15. P. 384–389.
- Brockes J.P.* Progenitor cells for regeneration: origin by reversal of the differentiated state // *Cellular and molecular basis of regeneration* / Eds Ferretti P., Geraudie J. Chichester et al.: J. Wiley & Sons, 1997. P. 63–77.
- Carlson B.M.* Development and regeneration, with special emphasis on the amphibian limb // *Ibid.* 1997. P. 45–61.
- Cellular and molecular basis of regeneration* / Eds Ferretti P., Geraudie J. Chichester et al.: J. Wiley & Sons, 1997. 342 p.
- Chiba C., Hoshino A., Nakamura K. et al.* Visual cycle protein RPE65 persists in new retinal cells during retinal regeneration of adult newt // *J. Comp. Neurol.* 2006. V. 495. P. 391–407.
- Coles B.L.K., Angenieux B., Inoue T. et al.* Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 15 772–15 777.
- Das A.V., Mallya K.B., Zhao X. et al.* Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: Regulation by Notch and Wnt signaling // *Devel. Biol.* 2006 V. 299. P. 283–302.
- Del Rio-Tsonis K., Washabaugh C.H., Tsonis P.A.* Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 5092–5096.
- Eguchi G.* Transdifferentiation as a basis of eye lens regeneration // *Cellular and molecular basis of regeneration* / Eds Ferretti P., Geraudie J. Chichester et al.: J. Wiley & Sons, 1997. P. 207–228.
- Engelhardt M., Wachs F.-P., Couillard-Despres S., Aigner L.* The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina *in vitro* // *Exp. Eye Res.* 2004. V. 78. P. 1025–1036.
- Engelhardt M., Bogdahn U., Aigner L.* Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neural precursor protein doublecortin // *Brain Res.* 2005. V. 1040. P. 98–111.
- Fischer A.J., Reh T.A.* Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body // *Devel. Biol.* 2003a. V. 259. P. 225–240.
- Fischer A.J., Reh T.A.* Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells // *Glia.* 2003b. V. 43. P. 70–76.
- Fischer A.J., McGuire C.R., Dierks B.D., Reh T.A.* Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina // *J. Neurosci.* 2002. V. 22(21). P. 9387–9398.
- Fischer A.J., Omar G., Eubanks J. et al.* Different aspects of gliosis in retinal Muller glia can be induced by CNTF, insulin, and FGF2 in the absence of damage // *Mol. Vis.* 2004. V. 10. P. 973–986.
- Hayashi T., Mizuno N., Takada R. et al.* Determinative role of Wnt signals in dorsal-iris derived lens regeneration in newt eye // *Mech. Devel.* 2006. V. 123. P. 793–800.
- Lord-Grignon J., Abdouh M., Bernier G.* Identification of genes expressed in retinal progenitor/stem cell colonies isolated from the ocular ciliary body of adult mice // *Gene Express. Patterns.* 2006. V. 6. P. 992–999.
- Martinez-Morales J.R., Rodrigo I., Bovolenta P.* Eye development: a view from the retina pigmented epithelium // *BioEssays.* 2004. V. 26. P. 766–777.
- Mitashov V.I., Kasanskaya O.V., Luk'yanov S.A. et al.* Activation of genes coding for gamma-crystallins during lens regeneration in the newt // *Keys for regeneration* / Eds Taban C.H., Boilly B. Basel et al.: Karger, 1992. P. 139–145.
- Mizuno N., Mochii M., Yamamoto T.S. et al.* Pax-6 and Prox-1 expression during lens regeneration from *Cynops* iris and *Xenopus* cornea: evidence for a genetic program common to embryonic lens development // *Differentiation.* 1999. V. 65. P. 141–149.
- Mizuno N., Agata K., Sawada K. et al.* Expression of crystalline genes in embryonic and regeneration newt lenses // *Devel. Growth Differ.* 2002. V. 44. P. 251–256.
- Moscona A.A.* Conversion of retina glia cells into lense-like phenotype following disruption of normal lens contacts // *Curr. Topics Devel. Biol.* 1986. V. 20. P. 1–18.
- Ooto S., Akagi T., Kageyama R. et al.* Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 13 654–13 659.
- Planque N., Leconte L., Coquelle F.M. et al.* Specific Pax-6 / microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 29330–29337.
- Raymond P.A., Barthel L.K., Bernardos R.L., Perkowski J.J.* Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish // *BMC Devel. Biol.* 2006. V. 6. P. 1–17.
- Sakami S., Hisatomi O., Sakakibara S., Liu J.* Downregulation of Oxt2 in the dedifferentiated RPE cells of regenerating newt retina // *Devel. Brain Res.* 2005. V. 155. P. 49–59.

Stocum D.L. Wound repair, regeneration and artificial tissues. N.Y. et al.: Springer-Verlag, 1995. 230 p.

Stocum D.L. Regenerative biology and medicine. Amsterdam et al.: Academic Press, 2006. 448 p.

Thouveny Y., Tassava R. Regeneration through phylogenesis // Cellular and molecular basis of regeneration / Eds Ferretti P., Geraudie J. Chichester et al.: J. Wiley & Sons, 1997. P. 9–43.

Tropepe V., Coles B.L.K., Chiasson B.J. et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye // Science. 2000. V. 287. P. 2032–2036.

Tsonis P.A. Limb regeneration. Cambridge: Univer. Press, 1996. 241 p.

Wahlin K.J., Lim L., Grice E.A. et al. A method for analysis of gene expression in isolated mouse photoreceptor and Muller cells // Mol. Vis. 2004. V. 10. P. 366–375.

Expression of Regulatory and Tissue-Specific Genes Controlling Regenerative Potencies of Eye Tissues in Vertebrates

V. I. Mitashov

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

E-mail: mitashov@bk.ru

Abstract—Comparative analysis of the early transformations of differentiated cells of the pigment epithelium, ciliary fold epithelium, and Muller glia in the eye of lower vertebrates and mammals during retina regeneration and cultivation was performed for the first time. Dedifferentiation and proliferation of cells and formation of progenitor multipotent cells, which are a source of retina regeneration in adult newts, were characterized using cell, molecular, and genetic markers. Neurospheres were formed during cultivation of the differentiated cells, in which progenitor multipotent cells were found that transformed into neurons of retina and brain and into glial cells. Comparative analysis of changes in the pigment epithelium cells during retina regeneration and during cultivation of differentiated cells of the pigment and ciliary epithelia and Muller glia suggests similar cell transformations at the early stages of transdifferentiation.

Key words: newt, regeneration, retina, cell sources, gene expression.