

УДК 591

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (29 НОЯБРЯ 2006 г.)

### ФОРМИРОВАНИЕ СВЯЗЕЙ МАММИЛЛЯРНЫХ ТЕЛ В ПРОЦЕССЕ ПЕРИНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ У КРЫС

© 2007 г. Е. В. Алпеева, И. Г. Макаренко

*Группа оптических методов исследования*

Маммиллярные тела (МТ), расположенные в вентральной части заднего гипоталамуса, являются важным компонентом круга Пейпеца, что обеспечивается их многочисленными связями с лимбическими структурами мозга. У взрослых грызунов подробно описаны крупные миелинизированные эфферентные тракты: маммилло-таламический и маммилло-теgmentальный. Волокна ядер покрышки среднего мозга, иннервирующих МТ, образуют маммиллярную ножку. Аfferентные и эfferентные волокна МТ проходят в составе свода и продольного пучка переднего мозга, однако сведения о развитии этих проводящих систем немногочисленны и не систематизированы. Цель настоящего исследования – выявить, на каких стадиях онтогенеза происходит формирование основных проводящих путей, связывающих МТ с лимбическими структурами мозга.

Исследование проводили на фиксированном мозгу крыс с 14,5 дня эмбрионального (Э14,5) по 11-е сут постнатального (П11) развития с помощью метода диффузии карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлората (DiI) по мембранам нейронов. Маркер наносили на МТ и покрышку среднего мозга и после инкубации в фиксаторе

выявляли в мозгу тела нервных клеток и нервные волокна, содержащие флуоресцентную метку.

Маммилло-теgmentальный тракт обнаруживается уже на Э14,5. Маммилло-таламический тракт, волокна которого являются коллатеральными аксонов маммилло-теgmentального тракта, начинает развиваться позже и к Э21 подрастает к передней группе ядер таламуса, где обнаруживаются первые меченые терминали. На П10 аксоны маммилло-таламического тракта образуют густую сеть терминальных ветвлений в ядрах переднего таламуса: переднемедиальном, передневентральном и переднедорсальном. Нейроны покрышки среднего мозга, посылающие аксоны в МТ, выявляются на Э20, а к П8 они группируются в виде двух ядер покрышки: вентрального и дорсального. Меченые волокна выявляются на П11 в составе свода, однако DiI-положительные нейроны в гиппокампе на более поздних сроках постнатального развития не обнаруживаются, что является неожиданным фактом и требует дополнительных исследований.

*Работа поддержана РФФИ (проект № 04-04-48073).*

### ОСОБЕННОСТИ СЕЛЕКЦИИ ТИМОЦИТОВ НА РАННИХ ЭТАПАХ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС

© 2007 г. М. А. Афанасьева

*Лаборатория гистогенеза*

Предшественники Т-лимфоцитов на ранних этапах дифференцировки в тимусе подвергаются позитивной и негативной селекции. Не прошедшие селекцию предшественники подвергаются апоптозу. При негативной селекции элиминируются клетки, распознающие аутоантигены. Механизмы представления аутоантигенов в тимусе до настоящего времени мало изучены, а данные о становлении этого процесса в раннем онтогенезе практически отсутствуют. В отличие от тимуса в периферических органах и тканях иммунной системы происходит представление чужеродных

антигенов, и в этом процессе участвуют иммунные протеасомы.

Цель нашей работы – проверка предположения об участии иммунных протеасом в представлении аутоантигенов в тимусе, а также изучение становления процесса негативной селекции в раннем онтогенезе. Количественную оценку экспрессии субъединиц иммунных протеасом LMP7 и LMP2 в тимусе проводили с помощью Вестерн-блоттинга в пре- и постнатальном онтогенезе у крыс. Распределение иммунных протеасом в клетках тимуса анализировали с помощью имму-

ногистохимии. Параллельно оценивали динамику уровня апоптоза в тимусе на тех же этапах онтогенеза с помощью проточной цитофлуориметрии. Иммуногистохимически показано, что экспрессия иммунных протеасом наблюдается не в тимоцитах, а вероятнее всего, в эпителиальных и дендритных клетках тимуса, которые являются антигенпредставляющими для Т-клеток. Этот факт дает основание полагать, что негативная селекция в тимусе происходит с участием иммунных протеасом. Обе иммунные субъединицы иммунных протеасом обнаруживаются в тимусе, начиная с 18-го эмбрионального (Э) дня развития. Причем количество этих субъединиц на Э18 невелико и возрастает к Э21, а затем остается на том же уровне до 19-х сут постнатального (П19) развития. В то же время на Э18 в тимусе регистрируется высокий уровень апоптоза, который снижается к Э21 и далее остается неизменным до П30.

Полученные данные свидетельствуют о том, что негативная селекция в тимусе может происходить у плодов уже на Э18, а к Э21 усиливается до уровня, характерного для постнатальных животных. Высокий уровень апоптоза, наблюдаемый на Э18, связан, по-видимому, не столько с процессами негативной селекции, сколько с активной миграцией предшественников Т-лимфоцитов в тимус в этот период, а как известно, количество локусов для мигрирующих предшественников в тимусе ограничено. Таким образом, впервые была показана экспрессия иммунных протеасом в тимусе, участвующих в представлении аутоантигенов при негативной селекции, в перинатальном онтогенезе. Становление процесса негативной селекции у крыс происходит еще в пренатальном онтогенезе.

Работа поддержана РФФИ (проект № 05-04-48830).

## ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ ГАММАРИД БАССЕЙНОВ РЕК ВОЛГА И ДОН

© 2007 г. Ю. Брагин, Н. С. Мюге

Лаборатория биохимической эмбриологии

На протяжении, по крайней мере, 10 тыс. лет существовала изоляция между амфиподами Каспийского и Азовско-Черноморского бассейнов и, соответственно, рек, в них впадающих. Многие виды амфипод, обитающие в обоих бассейнах, оказались разделены на две изолированные популяции. Для видов амфипод, ареалы которых включают в себя большую часть нижнего течения Волги и Дона, эта изоляция прервалась после строительства Волго-Донского канала.

Без помощи молекулярно-генетических методов было обнаружено проникновение в Дон вида *Dikerogammarus caspius*, а также расширение ареала (по сравнению с ранее описанным) вида *Gmelina pusilla*. С помощью секвенирования митохондриального гена *COI* было выявлено проникновение в Дон из Волги особей видов *Pontogammarus crassus*, *Pontogammarus robustoides*, *Pontogammarus (Euxinia) maeoticus* и *Dikerogammarus*

*haemobaphes*. Для видов *Pontogammarus crassus* и *Dikerogammarus haemobaphes* было показано совместное обитание особей с каспийским и азовско-черноморским типами строения гена *COI*, что, по-видимому, свидетельствует об отсутствии репродуктивной изоляции между аборигенными и экзогенными особями. Все особи вида *Pontogammarus maeoticus*, отобранные из Дона, обладали каспийским типом строения гена *COI*. Также было обнаружено, что строение этого гена у каспийской и азовско-черноморской популяций этого вида отличается значительно сильнее, чем у других исследованных нами видов – на 6% нуклеотидных замен. Это указывает на существование репродуктивной изоляции между каспийской и азовско-черноморской формами этого вида.

Работа поддержана РФФИ (проект № 04-04-48949а).

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТАЛЬНЫХ ЭМБРИОНОВ, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ *leg-arista-wing complex* У *Drosophila melanogaster*

© 2007 г. Н. В. Бурдина

Лаборатория молекулярной биологии развития

Мутации в *транс*-регуляторном гене дрозофилы *leg-arista-wing complex (lawc)* обладают широким плейотропным эффектом и приводят к гомеозисной трансформации аристы в тарзус, нарушению сегментации торакальных ног, формированию обрезанных расставленных крыльев и изменению паттерна механосенсорных ор-

ганов. Анализ компьютерной базы данных, содержащей сиквенс генома дрозофилы, показал, что часть клонированной последовательности гена *lawc* лежит на расстоянии примерно 10 т.п.н. от *ORF* – недавно обнаруженного гомолога гена человека, кодирующего фактор базовой транскрипции *TBP related factor 2 (trf2)*.

В лаборатории Ю.Г. Ильина (ИМБ РАН) были установлены реальные границы и экзон-интронная структура гена *trf2* и показано, что этот ген входит в состав гена *lawc*. Таким образом, наличие гомолога у человека делает актуальным исследование функций гена *lawc/trf2* у дрозофилы. Для конкретизации функции гена очень важно получение его мутаций с экстремальным фенотипическим проявлением, поэтому в лаборатории была создана коллекция летальных мутаций этого гена, нарушающих структуру его регуляторного района (инверсии, делеции, инсерции), а также получены (Bloomington Stock Center, США) трансгенные инсерционные линии, имеющие летальные мутации в районе гена *lawc*. Установлены стадии летальности лабораторных и музейных

*lawc*-леталей, проведен морфологический анализ кутикулы погибших эмбрионов, исследован паттерн экспрессии генов-маркеров сегментации и периферической нервной системы у мутантных эмбрионов.

В результате были установлены четыре основных класса морфологических аномалий эмбрионального развития у *lawc*-мутантов: нарушение поляризации, морфогенетические дефекты, нарушение сигнальных путей в эпидермисе и нарушение органогенеза. Высказано предположение об участии гена *lawc/trf2* в процессах межклеточной адгезии и формирования клеточного матрикса.

*Работа поддержана РФФИ (проект № 05-04-49246).*

## **АНАЛИЗ АДИПОГЕННОЙ И ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ РОДОНАЧАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ *in vitro***

© 2007 г. М. Н. Кожевникова, В. И. Старостин\*, А. С. Микаелян

*Лаборатория молекулярно-генетических основ онтогенеза*

*\*Лаборатория гистогенеза*

Мезенхимные родоначальные клетки, присутствующие в кроветворной строме на разных этапах онтогенеза, обладают статусом полипотентных стволовых клеток. По своим потенциям к дифференцировке мезенхимные стволовые клетки близки к клеткам эмбриональной мезенхимы. Они способны осуществлять адипо-, остео- и хондрогенную дифференцировку. Культура мезенхимных родоначальных клеток является экспериментальной моделью для изучения механизмов самоподдержания и направленной дифференцировки.

Цель нашей работы – анализ экспрессии маркеров адипогенной и остеогенной дифференцировки мезенхимных родоначальных клеток разного происхождения: эмбрионального и дефинитивного. В качестве клеток эмбрионального происхождения использована печень эмбрионов крыс в период активного миелоидного кроветворения (17-й день пренатального онтогенеза), а дефинитивного – костный мозг половозрелой крысы. При изучении потенций к дифференцировке в остеогенном направлении в клетках эмбриональной печени уже на 4-е сут инкубирования в индукционной среде методом ОТ-ПЦР идентифициро-

вана экспрессия раннего маркера остеогенеза *cbfa-1*. Иммуноцитохимическое окрашивание таких клеток на 11-е сут культивирования выявило активный синтез коллагена I типа.

При иммуноцитохимическом анализе адипогенной дифференцировки клеток культуры костного мозга был выявлен ранний маркер такой дифференцировки PPAR $\delta$  уже на 4-е сут инкубации этих клеток в индукционной среде. Важно отметить, что положительная реакция на PPAR $\delta$  наблюдалась не только на ранних (2-й), но и на более поздних (4-й) пассажах. Гистохимическое окрашивание красителем Oil Red O на жировые включения выявило на разных стадиях накопления жира наличие в культуре клеток костного мозга не только адипоцитов, но и целых кластеров из зрелых адипоцитов. В дальнейшем планируется продолжение экспериментов по выявлению и анализу различных дифференцировочных потенций в культурах эмбриональной печени и костного мозга.

*Работа поддержана РФФИ (проект № 06-04-48209) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.*

## **РОСТ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СЕТЧАТКИ И ЦИЛИАРНОЙ ОБЛАСТИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ БЕРЕМЕННОСТИ**

© 2007 г. Л. А. Милюшина, О. В. Подгорный\*, И. Г. Панова, М. А. Александрова\*

*Лаборатория проблем регенерации*

*\*Лаборатория экспериментальной нейробиологии*

Изучали рост и развитие сетчатки (*pars optica retinae*) и эпителиев цилиарного тела (*pars ciliaris*)

на ранних стадиях эмбрионального (8–11/12 нед.) и плодного (12–20 нед.) периодов развития чело-

века с применением методов гистологии (серийные поперечные срезы, окрашенные азокармином, с докраской по Маллори) и иммуноцитохимии с использованием антител против  $\beta$ 3-тубулина, виментина, рековерина, нейрофиламентов-200, нестина, Ki-67, коннексина-43. На ранних стадиях эмбрионального развития митозы обнаружены во всех зонах глазного бокала (центрально-экваториальная, периферическая, краевая). После 12 нед. (с началом плодного периода) число митозов убывает. Применение Ki-67 выявляет пролиферирующие клетки, которые расположены вблизи наружной пограничной мембраны. Начиная с ранних стадий развития четко выявляется градиент дифференцировки сетчатки от центра к периферии, что хорошо прослеживается с помощью мечения на  $\beta$ 3-тубулин, рековерин, нейрофиламенты-200. Первоначально свечение наблюдается в самом центре сетчатки, затем постепенно распространяется на периферию и на более поздних стадиях заканчивается в области зубчатого края (*ora serrata*), т.е. на границе зрительной части сетчатки и формирующейся цилиарной области. Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител против коннексина-43

локализуется на протяжении всего пигментированного эпителия сетчатки вдоль наружной пограничной мембраны, а также в области непигментированного и пигментированного эпителиев развивающегося цилиарного тела. Судя по всему, метятся промежуточные контакты клеток пигментного эпителия. В области края глазного бокала свечение распространяется на внутренний непигментированный листок и заканчивается строго на границе зубчатой линии, что соответствует реальным границам развивающегося цилиарного эпителия. Иммуноцитохимическое окрашивание против коннексина-43 также было обнаружено в области переднего эпителия хрусталика, в то время как тубулином метилась центральная часть – хрусталиковые волокна. В развивающейся сетчатке было выявлено мечение на нестин и виментин, которые являются специфическими маркерами нейральных прогениторных клеток.

*Работа поддержана РФФИ (проекты № 05-04-48026, 05-04-48031, 05-04-48502) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.*

## ДОМЕНЫ БЕЛКОВ-АНТИФРИЗОВ ДРОЗОФИЛ ГРУППЫ *virilis*

© 2007 г. С. С. Михайловский

*Лаборатория генетики*

Группа дрозофил *virilis*, насчитывающая в настоящее время 12 видов, существуют не менее 10 млн лет. Предковый вид, наиболее близкий к *D. virilis*, обитал, вероятно, в тропических условиях в Юго-Восточной Азии. В ходе четвертичного оледенения, начавшегося 3 млн. лет назад, сформировались новые климатические области северной Голарктики, включающие зоны умеренного, субарктического и арктического климата. Адаптации к низким температурам, таким образом, становятся главной задачей для осваивающих данные зоны видов и решаются ими комплексно – как на уровне метаболизма, так и путем экспрессии специфических белков, повышающих устойчивость организма к замерзанию. Два основных класса этих белков – нуклеаторы и антифризы. Если первые способствуют формированию так называемых “эмбриональных ледяных ядер”, отбирающих из жидкости излишки переохлажденной воды и препятствующих образованию крупных кристаллов льда, травмирующих ткани, то вторые препятствуют самому процессу образования ледяных кристаллов, снижая неравновесную точку замерзания жидкости.

Для дрозофил, как и для других насекомых, характерен комплексный характер используемых механизмов адаптации. Лабораторные эксперименты по локализации генов количественных

признаков выявили ряд генов-кандидатов на роль контролирующих устойчивость к замерзанию у *D. melanogaster*. Это – *Fst* и *Sas*, содержащие антифризные домены AFP-like, шаперон *Trap1*, экспрессирующийся в ответ на стресс, ферменты *Desat2* и *Ddc* и белок *pickrocket*, контролирующий активность натриевых каналов. Ген *HIF* (гипоксияиндуцибельный фактор), принимающий участие в формировании стресс-индуцибельных сигнальных комплексов, у родственных дрозофилидам видов двукрылых также принимает участие в формировании устойчивости к переохлаждению.

Тем не менее проводившиеся работы с дрозофилами имеют существенный недостаток – во всех случаях использовались тропические и синантропные виды, для которых адаптация к пониженным температурам не является базовым признаком. Мы использовали в экспериментах четыре вида группы *virilis* – тропический и синантропный *D. virilis*, *D. lummei*, *D. littoralis* и *D. montana*, обитающие в условиях умеренного и субарктического климата и обладающие признаком диапауза. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что эффективный ответ на охлаждение формируется за сравнительно короткий промежуток времени – несколько часов. Поэтому интерес вызывают высокоспецифичные механизмы формирования такой устойчивости, свя-

занные с интенсивной экспрессией белков-антифризов и нуклеаторов. Поиск по геномным банкам данных позволил выявить, кроме упомянутых выше генов *Fst* и *Sas*, гены *CG5232-PA* (Neu5Ac synthase) и *Dumpy*. Особенно пристальное внимание мы уделили последнему гену. Обладая огромным размером (длина кодирующей последовательности составляет более 65500 п.н.), он содержит два домена AFP (Insect antifreeze protein) и еще 16 сходных доменов, обладающих более слабой гомологией. Кроме этого, примерно шестую часть кодирующей последовательности составляют 40 высококонсервативных повторов, включающих домен V1pA-repeat, характерный для стресс-индуцибельных белков. Хотя

для гена *Dumpy* неизвестны альтернативные сплайс-варианты, оценка 30 EST из базы данных NCBI-nucleotide позволила выявить фрагмент РНК, являющийся результатом альтернативного сплайсинга (EC053302.1). Для 12 экзонов гена, содержащих домен AFP, были подобраны праймеры по геному *D. virilis*. Сравнение анализируемых последовательностей показало значительную дивергенцию видов *D. montana* и *D. littoralis* от *D. virilis* и *D. lummei*.

*Работа поддержана Государственной программой "Динамика генофондов популяций растений, животных, человека".*

## РОЛЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ

© 2007 г. О. Е. Некрасова, А. В. Кулик\*, А. А. Минин\*

*Лаборатория биохимической эмбриологии*

*\*Группа клеточной биологии Института белка РАН*

Митохондрии занимают особое место в физиологии клетки. Для нормального их функционирования важное значение имеет внутриклеточное распределение, которое обеспечивается благодаря цитоскелетным структурам и моторным белкам, транспортирующим органеллы. В предыдущей работе мы показали, что фибриллярный актин, полимеризующийся в результате действия белков семейства форминов, специфически взаимодействует с митохондриями и ограничивает их транспорт. Однако пока неясно, какие белки или структуры обеспечивают это взаимодействие.

Для изучения возможной роли промежуточных филаментов мы использовали линию клеток MFT-16, в которых отсутствует ген виментина (основной белок промежуточных филаментов). Видеомикроскопический анализ движения митохондрий проводили на живых клетках, экспрессирующих флуоресцентный маркер. Известно, что разрушение полимерного актина приводит к значительному увеличению доли подвижных митохондрий. Но в клетках без виментина деполимеризация актина не приводила к изменению их подвижности. Это свидетельствует в пользу того, что связь митохондрий с актиновыми филаментами обеспечивается посредством промежуточных филаментов.

Следующий шаг в нашем исследовании – выяснить, регулируется ли связь митохондрий с промежуточными филаментами. Было установлено, что обработка клеток форболовым эфиром, который активирует протеинкиназу С, вызывает увеличение доли подвижных митохондрий. Этот эффект наблюдался и в клетках с разрушенными актиновыми филаментами. Таким образом, действие протеинкиназы С на подвижность митохондрий в этом случае не было связано с перестройками в актиновом цитоскелете. Одной из возможных ее мишеней являются виментиновые промежуточные филаменты. Действительно, при обработке безвиментиновых клеток форболовым эфиром подвижность митохондрий не изменялась. Таким образом, активация протеинкиназы С приводит к ослаблению связи митохондрий с промежуточными филаментами и тем самым опосредованно нарушает их связь с актиновыми структурами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что промежуточные филаменты играют важную роль во взаимодействии митохондрий с актиновым цитоскелетом и тем самым обеспечивают их точное распределение в клетке.

*Работа поддержана РФФИ (проект № 06-04-48452-а).*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЯДА РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КОЖЕ И КОСТИ ПОЗВОНОЧНЫХ *in vitro* И *in vivo*

© 2007 г. Е. Ю. Рыбакова

*Группа регуляторных белков*

Ранее было показано, что в тканях животных и растений присутствуют регуляторные белки

(РБ), биологически активные в сверхмалых дозах. РБ оказывают влияние на важнейшие биоло-

гические процессы, такие как клеточная адгезия, миграция, пролиферация и дифференцировка. Установлено, что РБ стимулируют процессы восстановления и репарации в травмированных и в патологически измененных тканях. Они имеют внеклеточную локализацию, их биологическая активность характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности. В настоящей работе было изучено влияние РБ, выделенных из сыворотки крови и костной ткани млекопитающих, на репаративные процессы в коже и кости тритонов *in vitro*, а также на процессы заживления ран у мышей *in vivo*.

РБ выделяли и очищали по ранее разработанной методике. Изучение специфической биологической активности РБ было проведено на новых экспериментальных моделях *in vitro*: роллерное органное культивирование кожи и регенерата хвоста взрослых особей тритонов *Pleurodeles waltl*. Кроме того, исследование РБ, выделенного из сыворотки крови, было проведено также на модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo*. Биологическое действие изучаемых РБ исследовали в сверхмалых дозах ( $10^{-10}$ – $10^{-12}$  мг белка/мл). Было показано, что РБ, выделенный

из сыворотки крови млекопитающих, оказывал протекторное действие на кожу амфибий при длительном роллерном органном культивировании *in vitro*, которое выражалось в поддержании гистоструктуры и увеличении жизнеспособности клеток всех слоев кожи по сравнению с контролем. Этот РБ эффективно стимулировал восстановительные и репаративные процессы в коже мышей после экспериментально нанесенной раны *in vivo*: увеличение подкожной жировой ткани, образование волосяных фолликулов, интенсивную эпителизацию в области травмы. РБ, выделенный из костной ткани млекопитающих, способствовал поддержанию гистоструктуры хрящевой ткани в регенерате хвоста тритона при культивировании его *in vitro* по сравнению с контролем. Таким образом, на новых экспериментальных моделях заживления ран кожи мыши *in vivo* и роллерного органного культивирования кожи и регенерата хвоста тритона *in vitro* соответственно было продемонстрировано протекторное действие изучаемых РБ, которое выражалось в поддержании гистоструктуры тех тканей, из которых они были выделены.

## НЕЗАВИСИМЫЕ ОТ ПРОТЕИНКИНАЗЫ А МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИМОСТИ СЕРДЦА И КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ЦИКЛИЧЕСКОЙ АМФ. РОЛЬ БЕЛКОВ Ерас

© 2007 г. И. Ф. Суханова

Лаборатория общей физиологии им. Х.С. Коштоянца

Большинство физиологических ответов клеток на гормоны обусловлено изменением внутриклеточной концентрации вторичных мессенджеров, таких как  $Ca^{2+}$  и цАМФ. Известно, что белки Ерас (exchange protein directly activated by cAMP) экспрессируются во всех типах клеток организма млекопитающих, активируют ГДФ/ГТФ-обмен на низкомолекулярных G-белках Rap, участвуют в некоторых процессах секреции и в передаче синаптического сигнала. В экспериментах на клетках линии НЕК293 было показано, что данные белки сопряжены с фосфолипазой С и кальциевым обменом, поэтому важно было проверить их участие в кальцийзависимых клеточных реакциях. С этой целью мы выбрали следующие объекты: аорту крысы, тромбоциты человека и сердце виноградной улитки. Известно, что действие форсколина (активатора аденилатциклазы) на предсокращенную аорту крысы приводит к ее расслаблению. Мы показали, что на препарате изолированной аорты селективный активатор белков Ерас 8-рМеОПТ-2'-О-Ме-сАМР и селективный активатор протеинкиназы А Sp-8-Вг-сАМПС вызывают ее дозозависимое расслабление с полумаксимальными эффектами  $64 \pm 7$  и

$17.0 \pm 0.6$  мкм соответственно. Полученные данные свидетельствуют о существовании нового механизма регуляции сосудистой сократимости.

Известно, что увеличение концентрации цАМФ блокирует увеличение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме тромбоцитов и подавляет их агрегацию. По данным наших экспериментов, активация эндогенной протеинкиназы А при помощи Sp-8-Вг-сАМПС полностью блокировала индуцированную 5 мкМ АДФ агрегацию тромбоцитов. Однако селективный активатор белков Ерас 8-рМеОПТ-2'-О-Ме-сАМР в концентрации 200 мкМ не оказывал влияния на данный процесс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что белки Ерас не принимают участия в ингибировании АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов под действием цАМФ. Литературных данных о влиянии цАМФ на сократимость сердца улитки нет. Используя изолированный желудочек сердца виноградной улитки в качестве экспериментальной модели, мы обнаружили модулирующее действие активатора протеинкиназы А Sp-8-Вг-сАМПС и селективного активатора белков Ерас 8-рМеОПТ-2'-О-Ме-сАМР на амплитуду сокращения сердца, вызванного введением серотонина. На основании

полученных данных можно предположить наличие нового механизма регуляции сократимости сердца.

*Работа поддержана РФФИ (проекты № 05-04-49166, 04-04-49054) и SCOPES (проект IB74A0-110940).*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ TGF $\beta$ 2 И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ *Raxb*, *Pitx2*, *Foxc1* В ХОДЕ РАЗВИТИЯ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2007 г. Н. В. Фирсова, Ю. В. Маркитантова\*, И. Г. Панова\*, Р. Д. Зиновьева, **В.И. Миташов\***

*Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза*

*\*Лаборатория проблем регенерации*

Дифференцировка клеток в ходе развития глаза зависит от индуктивных сигналов и транскрипционных факторов. Сигнальный белок TGF $\beta$ 2 и транскрипционные факторы *Raxb*, *Pitx2*, *Foxc1* играют важную роль в формировании глаза млекопитающего (в том числе человека). Работа посвящена изучению молекулярно-генетических механизмов дифференцировки клеток глаза человека в ходе пренатального развития (9.5–24.0 нед.) с использованием молекулярно-биологических и морфологических методов. Проведен анализ экспрессии регуляторных генов *Raxb*, *Pitx2*, *Foxc1* и сигнального белка TGF $\beta$ 2. Материалом служили препарированные ткани глаза – роговица, хрусталик, сетчатка, пигментный эпителий и цилиарная область глаза плодов человека 9.5 и 24.0 нед. развития. ПЦР-анализ проводили на матрицах нормированных кДНК, синтезированных на мРНК из соответствующих тканей. Показано, что сигнальный белок TGF $\beta$ 2 и транскрипционные фак-

торы *Raxb*, *Pitx2* и *Foxc1* на сроке 9.5 нед. развития экспрессируются во всех анализируемых тканях глаза. Полученные данные по экспрессии *Pitx2* и *Foxc1* во всех исследуемых тканях глаза на этой стадии получены впервые. На 24-й нед. развития характер экспрессии исследуемых генов полностью меняется. Экспрессия генов *Pitx2* и *Foxc1* приобретает специфичность для переднего сегмента глаза (роговица, хрусталик, цилиарное тело). Мы впервые получили данные по экспрессии *Pitx2* и *Foxc1* в суммарном препарате пигментного эпителия и сосудистой оболочки. Результаты исследований в целом согласуются с гистологическими и литературными данными об участии этих генов в дифференцировке клеток переднего сегмента глаза.

*Работа поддержана РФФИ (проекты № 05-04-48502, 05-04-48026) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.*

## МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ КОНСПЕЦИФИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА РАЗВИТИЕ ЛЕГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ

© 2007 г. А. К. Чабан

*Лаборатория сравнительной физиологии*

Недавно был обнаружен новый механизм регуляции личиночного развития моллюсков химическими сигналами со стороны конспецифичных особей. Показано, что развитие пресноводных моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Helisoma trivolvis* модулируется действием специфического вещества, которое выделяется взрослыми особями, содержащимися в условиях голодания. Это вещество было названо RED-фактором (Retarding Embryonic Development). Мы показали, что RED-фактор: 1) оказывает комплексное влияние на эмбриональное развитие, в том числе на реализацию наиболее значимых моторных программ зародышей: локомоцию, жевание и сердечную активность; 2) действует разнонаправленно на разные стадии развития: замедляет развитие и реализацию моторных программ на ранних этапах эмбриогенеза (стадии трохофоры-велигера) и ускоряет их на поздних стадиях (от стадии позднего велигера до вылупления); 3) не является строго видоспецифичным и действует также на эмбрионы близкородственного вида, занимающего схожую экологическую нишу.

Известно, что RED-фактор действует через активацию транзиторных сенсорных серотонинергических нейронов личиночного апикального органа. Изученное нами действие агонистов (8-OH-DPAT, 5-CT и RS 67333) и антагонистов (SB 269970, S-WAY 100135, GR 113808) серотониновых (5-HT) рецепторов позволяет предположить, что в регуляции личиночного развития *Helisoma* участвуют несколько типов таких рецепторов. При этом активация 5HT4- и 5HT7-подобных рецепторов приводит к торможению развития, в то время как активация 5HT1- и 5HT5-подобных – к ускорению. Иммуноцитохимическое окрашивание эмбрионов с последующим анализом препаратов с помощью конфокального микроскопа показало, что под действием всех использованных агонистов 5-HT-рецепторов происходит снижение концентрации серотонина и/или уменьшение количества отростков апикальных нейронов. Таким образом, через реакцию зародышей на RED-фактор происходит реализация адаптивных приспособительных программ личинок. Нейротрансмиттер серотонин участвует в передаче сигнала из окружающей среды на различ-

ные органы и ткани личинки, при этом за счет активации разных серотониновых рецепторов обеспечивается комплексная скоординированная реакция личинки в зависимости от степени ее зрелости. Мы

предполагаем, что на основе описанного нами механизма реализуется эволюционное преимущество двухфазного жизненного цикла – повышенная выживаемость и лучшая расселяемость потомков.

## ТУБУЛОГЕНЕЗ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2007 г. Э. С. Черных

*Лаборатория проблем клеточной пролиферации*

Большинство эпителиальных органов человека образовано системой сферических и тубулярных структур. Формирование таких структур является важной стадией в развитии почек, легких, слюнных, молочных и поджелудочной желез. Морфогенез покровного эпителия также сопровождается формированием трубчатых структур (придатков кожи). Цель нашей работы – изучение клеточных механизмов тубулогенеза эпидермальных кератиноцитов в культуре. Считается, что в развитии эпителиальных органов участвуют растворимые факторы, секретируемые фибробластами. Индуктивный эффект мезенхимной ткани может быть воссоздан *in vitro* путем совместного культивирования эпителиальных клеток и фибробластов. Для исследования морфогенетических потенциалов кератиноцитов мы помещали сфероиды клеток в коллагеновый гель в разных условиях: без и в присутствии эмбриональных, постнатальных фибробластов; с добавлением среды, кондиционированной фибробластами или HGF.

Показано, что эпителиальные клетки кожи сохраняют морфогенетические потенциалы и в культуре. Для формирования эпителиальных трубок кератиноцитам необходимы коллагеновый гель и индуктивный сигнал. Таким индуктивным сигналом является эпителиальный морфоген(ы), продуцируемый эмбриональными фибробластами человека (ФЭЧ). Постнатальные фибробласты не индуцируют инвазию и тубулогенез. Кондиционированная эмбриональными

фибробластами среда также индуцировала формирование тубулярных структур кератиноцитами. При добавлении в среду культивирования HGF сфероиды формировали трубчатые отростки, они были короче таковых, индуцированных в кондиционированной эмбриональными фибробластами среде и при совместном культивировании с ФЭЧ, но длиннее, чем контрольные. Чтобы определить структуру трубочек, агрегаты клеток окрашивали маркером пролиферирующих клеток Ki-67 и ядерным красителем пропидием иодидом. Было показано, что трубчатое образование не является отростком одной клетки, а формируется благодаря пролиферации краевых клеток. При помещении первичной культуры кератиноцитов в коллагеновый гель только агрегаты клеток способны формировать тубулярные структуры независимо от их размера. Одиночные клетки не имели морфогенетических потенциалов. При помещении в коллагеновый гель разобщенных базальных кератиноцитов наблюдалось объединение клеток в единые трубчатые структуры, однако формирование таких структур происходило по разным механизмам. Разработанная нами модель и полученные результаты являются предпосылкой для изучения механизмов формирования волосяного фолликула и исследования эпителиомезенхимных взаимодействий в процессе роста волоса и при его развитии.

*Работа поддержана РФФИ (проект № 04-04-49336).*

### Abstracts of Papers at the Conference of Young Scientists, Kol'tsov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences (November 29, 2006)

Сдано в набор 15.03.2007 г.

Подписано к печати 28.05.2007 г.

Формат бумаги 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>

Цифровая печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 1.7 тыс.

Уч.-изд. л. 10.0

Бум. л. 5.0

Тираж 162 экз.

Зак. 389

Учредители: Российская академия наук,  
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Издатель: Академиздатцентр "Наука", 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90  
Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"  
Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099 Москва, Шубинский пер., 6