

УДК 591

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(12–13 ДЕКАБРЯ 2007 г.)**

**РЕГУЛЯТОРНЫЕ ГЕНЫ *FGF2*, *Pax6*, *Otx2*, *Six3*
В РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ ТРИТОНА**

© 2008 г. П. П. Авдонин

Лаборатория проблем регенерации

Регенерация сетчатки из клеток пигментного эпителия глаза взрослого тритона находится под контролем координированной работы высоко консервативных регуляторных генов *FGF2*, *TGFb2*, *Vmp4*, *Pax6*, *Otx2*, *Six3*, *Prox1*, *Rx*, *Mitf*, *Noggin*, кодирующих сигнальные и транскрипционные факторы. Этим генам также принадлежит определяющая роль в регуляции дифференцировки клеток пигментного эпителия и сетчатки в процессе нормального развития глаза у представителей разных систематических групп. Мы впервые провели сравнительное исследование экспрессии регуляторных генов *Pax6*, *Otx2*, *Six3* и гена сигнальных молекул *FGF2* в ходе регенерации сетчатки взрослых тритонов с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Анализировали библиотеки кДНК, синтезированные на мРНК из клеток нативных пигментного эпителия и сетчатки, регенератов сетчатки на 20-е и 50-е сут после ее удаления и пигментного эпителия на 50-е сут регенерации сетчатки. Дифференцировку клеток оценивали с использованием гена-маркера пигментного эпителия *RPE65*, а также генов-маркеров сетчатки – тубулина (*βII-tubulin*) и родопсина (*Rho*). Обнаружено значительное снижение уровня экспрессии регуляторного гена *Otx2* и гена-маркера

RPE65 на ранней стадии формирования зачатка сетчатки из трансдифференцирующихся клеток пигментного эпителия. Позднее, в мультипотентных нейробластах регенерата сетчатки выявлена активация экспрессии генов нейроспецифических транскрипционных факторов *Pax6*, *Six3* и гена ростового фактора *FGF2*. Экспрессия генов *Pax6*, *Six3*, *FGF2* сохраняется и на более поздней стадии – в процессе дифференцировки вновь образованной сетчатки, где параллельно инициируется экспрессия генов-маркеров *βII-tubulin* и *Rho*. На позднем этапе регенерации также выявляется экспрессия генов *Otx2* и *RPE65*, что указывает на редифференцировку клеток пигментного эпителия. Данные иммуноцитохимического анализа экспрессии *FGF2* находятся в соответствии с результатами ПЦР. Предполагается участие анализируемых регуляторных генов не только в контроле трансдифференцировки клеток пигментного эпителия – ключевой стадии регенерации сетчатки, но и в контроле последующих стадий ее восстановления.

Работа поддержана РФФИ (проекты № 05-04-48502, 05-04-48026), Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и Швейцарским национальным научным фондом (SCOPES № IB 74 AO-110940).

**НОВЫЕ ДАННЫЕ О РАЗВИТИИ МАММИЛЛО-ТАЛАМИЧЕСКОГО
ТРАКТА У КРЫС**

© 2008 г. Е. В. Алпеева, И. Г. Макаренко

Группа оптических методов исследования

Основными эфферентными системами миллиарных тел (МТ) заднего гипоталамуса являются крупные миелинизированные маммилло-теgmentальный и маммилло-таламический тракты (МТатр). Известно, что МТатр формируется коллатеральными аксонами маммилло-теgmentального тракта и участвует в процессах образования пространственной памяти. Развитие МТатр описано в единичных работах, а информация о процессе формирования его аксонами иннервации передних ядер таламуса отсутствует. Целью настоящей работы было изучение развития МТатр

с помощью метода диффузии флуоресцентных липофильных карбоцианиновых красителей по мембранам нейронов. Это один из немногих подходов, позволяющих изучать внутримозговые связи у эмбрионов и новорожденных животных. Исследование проводили на фиксированном мозгу крыс с 14.5-го дня эмбрионального (Э14.5) по 21-е сут постнатального развития (П21). Маркер наносили на МТ и покрывку среднего мозга и после инкубации в фиксаторе выявляли тела нейронов и нервные волокна на коронарных и сагиттальных срезах мозга с помощью флуоресцентного и конфо-

кального микроскопов ("Leica", Германия). Было показано, что МТатр начинает развиваться гораздо позднее мамилло-теgmentального тракта. Впервые он был обнаружен на Э18 в виде короткого пучка аксонов, отделившихся от мамилло-теgmentального тракта в ростродорсальном направлении. На Э20 МТатр прослеживался вплоть до вентральной области переднего таламуса, а на Э21 его терминали обнаруживались в переднемедиальном ядре таламуса. На П1-П2 терминальные ветвления аксонов МТатр распределялись в переднемедиальном и передневентральном ядрах таламуса. Некоторые волокна тракта следовали на контралатеральную сторону таламуса, образуя перекрест дорсальнее переднемедиального ядра, но еще не достигая переднедорсального ядра таламуса. На П3 волокна МТатр оканчивались терминальными ветвлениями во всех трех ядрах перед-

него таламуса. На П8-П10 меченые терминали заполняли весь объем ядер переднего таламуса, делая границы ядер очень четкими. В переднедорсальном ядре плотность терминальных ветвлений была самой высокой. Обнаружение терминальных ветвлений и синаптических бляшек в передних ядрах таламуса на П5-П6 совпадало с иммуноцитохимическим выявлением синапсина в этих ядрах, что свидетельствует о функциональной активности формирующихся синапсов. Таким образом, было впервые последовательно описано развитие МТатр, являющегося звеном "круга Пэйпеца". Полученные данные помогают сформировать представление об интеграции гипоталамуса в работу лимбических нервных цепей переднего мозга.

Работа поддержана РФФИ (проект № 07-04-00798-а).

ВЛИЯНИЕ ВАЗОПРЕССИНА И СЕРОТОНИНА НА СОЗРЕВАНИЕ Т-СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС

© 2008 г. М. А. Афанасьева

Лаборатория гистогенеза

Известно, что нейрогормоны и нейромедиаторы в раннем онтогенезе млекопитающих могут выполнять функции регуляторов развития. Однако данные о роли этих медиаторов в формировании иммунной системы практически отсутствуют. Целью настоящей работы являлось исследование влияния аргинин-вазопрессина (АВП) и серотонина на развитие и функционирование Т-системы иммунитета в онтогенезе крыс.

Изучение роли АВП в развитии иммунной системы проводили на крысах линии Brattleboro, генетически неспособных синтезировать и секретировать в кровь этот гормон. Функциональную активность Т-системы иммунитета оценивали по индуцированному Кон А пролиферативному ответу Т-лимфоцитов тимуса и селезенки животных в возрасте 1, 3, 6, 8 и 12 мес. Анализ полученных данных показал, что у мутантных крыс всех изученных возрастов отсутствие гипоталамического АВП приводит к снижению пролиферативного ответа лимфоцитов тимуса и селезенки в два-три раза по сравнению с нормальными крысами WAG. В то же время характер возрастной динамики пролиферативной активности

Т-лимфоцитов у крыс Brattleboro и WAG не отличался. Сниженный пролиферативный ответ в тимусе и селезенке крыс Brattleboro, вероятно, обусловлен уменьшением количества созревающих Т-лимфоцитов, происходящим в результате ранней инволюции этих органов.

Для исследования морфогенетической роли серотонина проводили фармакологическое подавление его синтеза у плодов крыс путем введения самкам с 13-го по 17-й дни беременности пара-хлорфенилаланина. Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов тимуса и селезенки, активированных Кон А, оценивали у родившихся животных в возрасте 2 мес. Оказалось, что снижение уровня серотонина в период активного формирования органной структуры тимуса и заселения его первыми предшественниками Т-лимфоцитов приводит к 4-5-кратному увеличению пролиферативного ответа Т-лимфоцитов в селезенке взрослых крыс.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что АВП и серотонин контролируют развитие Т-системы иммунитета в ходе онтогенеза.

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

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК И МИОБЛАСТОВ В КУЛЬТУРЕ. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МИОГЕННЫХ МАРКЕРОВ

© 2008 г. О. В. Балан

Лаборатория биофизики развития

Сателлитные клетки как тканеспецифичные стволовые клетки мышц взрослого организма образуют стабильный самообновляющийся клеточный пул и принимают участие в восстановлении мышечной ткани в норме и при повреждении. Дифференцировка сателлитных клеток по миогенному пути включает несколько этапов: активацию; асимметричное деление, в результате которого одна клетка остается недифференциро-

ванной и сохраняет статус стволовости, а другая дает начало клеткам миогенного ряда; слияние миобластов с образованием многоядерных миотуб; синтез специфических мышечных белков на терминальной стадии дифференцировки и образование зрелых миофибрилл.

Высокая концентрация Ca^{2+} – необходимый компонент культуральной среды для дифференцировки клеток. Для изучения роли Ca^{2+} в про-

цессах дифференцировки сателлитные клетки и миобласты, полученные из скелетных мышц взрослых крыс, культивировали в среде с различной концентрацией Ca^{2+} . Было показано, что культивирование сателлитных клеток, идентифицируемых по наличию специфического маркера транскрипционного фактора *Rax7*, и миобластов, экспрессирующих десмин, только в среде с повышенным содержанием Ca^{2+} (2.0 мМ) приводило к дифференцировке этих клеток по миогенному пути. При этом наблюдались активация сателлитных клеток с последующим их делением и слияние миобластов с образованием многоядерных миотуб. Помимо иммуноцитохимического определения был проведен ПЦР-анализ экспрессии гена *Rax7*. ПЦР-фрагменты со специфическими к *Rax7* праймерами были получены на мРНК из клеток

культивируемых в условиях низкой (0.2 мМ) и высокой (2.0 мМ) концентрации Ca^{2+} . Различий в экспрессии гена *Rax7* при культивировании сателлитных клеток в среде с низким и высоким содержанием Ca^{2+} не выявлено.

В нашей работе с использованием иммуноцитохимического метода впервые была выявлена экспрессия тяжелых и легких цепей миозина на очень ранней стадии миогенеза – в одноядерных миоблестах. Локализация миозина в миоблестах напоминала распределение элементов цитоскелета в клетке; это дает основание предполагать, что на этих стадиях миозин локализован в тех же структурах. В многоядерных миотубах, как и в дефинитивных миофибриллах, миозин входит в состав миофибрилл.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР НЕРАВНОНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ (Кл. Crustacea, ОТР. Amphipoda) ПОНТО-КАСПИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2008 г. Е. Ю. Брагин

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Проводившиеся ранее исследования структуры поверхности неравноногих ракообразных показали, что хемо- и механорецепцию у них осуществляют сенсиллы разнообразного строения. Наиболее часто встречаются сенсиллы, имеющие волосок, который выходит из углубления кутикулы и образует на вершине два выроста. У основания этого волоска имеется бугорок, представляющий собой несколько покрытых кутикулой хемо- и механорецепторных клеток.

Задача исследования – попытка анализа с помощью сканирующей электронной микроскопии тонких морфологических отличий разных видов бокоплавов и возможности использования этих отличий для выяснения особенностей приспособления животных к различающимся факторам внешней среды.

С помощью сканирующей электронной микроскопии мы исследовали бокоплавов понто-каспийского происхождения – *Pontogammarus aralensis*, *Pontogammarus robustoides*, *Pontogammarus maoticus*, *Dikerogammarus haemobaphes*, *Dikerogammarus caspius* и *Gmelina pusilla*, а также вид *Orchestia montaqui*, не являющийся понто-каспийским, однако за счет полусухопутного образа жизни представляющий интерес для исследования влияния внешних факторов на строение сенсилл.

Были выявлены некоторые межвидовые отличия как в строении сенсилл, так и в их расположении. У *Gmelina pusilla* и *Orchestia montaqui* ямка у основания сенсиллы не была обнаружена, что, возможно, связано со сходной экологией видов; у вида *P. robustoides* поверхность ямки более гладкая, чем у особей других видов; у *D. haemobaphes* и *P. maoticus* поверхность ямки целиком гранулярная; у вида

P. aralensis большая часть ямки гладкая, однако имеются две области с гранулярной поверхностью, обладающие четко очерченной полукруглой формой и лежащие по обе стороны от сенсорного волоска. Остальные межвидовые отличия двураздельных сенсилл касаются их длины, степени изогнутости и формы верхушечной части волоска.

Мы обнаружили также, что у большинства исследованных видов гаммарид число сенсилл в центре сегментов туловища значительно ниже, чем в областях, прилегающих к краям сегментов. В некоторых случаях вдоль края сегмента проходит четкая линия из сенсилл, особенно часто такие линии наблюдаются вдоль задних краев сегментов. Возможно, подобные структуры способны не только определять наличие сигнала, но и в какой-то степени определять расстояние до объекта, породившего этот сигнал, а также приблизительное направление, откуда этот сигнал испускается. У видов *D. haemobaphes* и *P. maoticus* повышенная концентрация сенсилл наблюдается вокруг глаз амфипод. Возможно, функциональное значение этого явления состоит в лучшем взаимодополнении сенсорных органов, воспринимающих разные сигналы.

Помимо этого были обнаружены межвидовые отличия в строении участков поверхности кутикулы, лишенной сенсорных органов, которые заключались в расположении пор и в степени их открытости, а также в числе и форме кутикулярных выростов.

Таким образом, обнаружены различия в строении поверхностных структур разных видов бокоплавов и показана возможность использования этих различий для оценки приспособления к тем или иным факторам внешней среды: связь мор-

фологии сенсилл с сухопутным образом жизни и повышенное значение сенсорной сигнализации у отдельных видов.

Работа поддержана РФФИ (проект № 05-04-48975).

ВЫЯВЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ ДВУХ МУТАЦИЙ, НАРУШАЮЩИХ СТРУКТУРУ РАЗНЫХ ДОМЕНОВ ГЕНА *lawc/trf2* У *Drosophila melanogaster*

© 2008 г. Н. В. Бурдина, И. Б. Мерцалов, Д. А. Куликова, О. Б. Симонова

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Дрозофила является удобной модельной системой для исследования роли нейроспецифических факторов транскрипции в регуляции эмбрио- и морфогенеза.

Мутация в *транс*-регуляторном гене дрозофилы – *leg-arista-wing complex (lawc^{pl})* – обладает широким плейотропным эффектом и приводит к гомеозисной трансформации аристы в тарзус, нарушению сегментации торакальных ног, формированию обрезанных расставленных крыльев и изменению паттерна макрочет (щетинок). Эта мутация имеет инсерцию Р-элемента в регуляторной зоне гена. Другой аллель этого гена (*lawc⁵²⁰*), полученный с помощью этилметансульфаната, является эмбриональной леталью, нарушающей поляризацию и сегментацию эмбрионов.

Анализ компьютерной базы данных, содержащей сиквенс генома дрозофилы, показал, что часть клонированной последовательности гена *lawc* находится на расстоянии примерно 10 т. п. н. от открытой рамки считывания (ОРС) недавно обнаруженного гомолога гена человека, кодирующего фактор базовой транскрипции (TBP related

factor 2, TRF2) и принадлежащего к семейству генов *TATA-box Binding Protein* (ТВР). В результате экспериментов по спасению мутантных фенотипов (*rescue*) было показано, что мутации *lawc* влияют на экспрессию гена *trf2*. Мы исследовали нуклеотидную последовательность ОРС гена *trf2* размером около 6 т. п. н. у мутантов жизнеспособной мутации *lawc^{pl}* и летального аллеля *lawc⁵²⁰* с помощью метода ПЦР, чтобы проверить, нарушается ли ОРС у этого гена. Были обнаружены делеции: размером 54 н.п. в 3'-районе ОРС у мутации *lawc^{pl}* и размером 9 н.п. в 5'-районе ОРС у аллеля *lawc⁵²⁰*. Таким образом, мы установили разную функциональную значимость доменов белка LAWС/TRF2, так как отсутствие 18 аминокислот в N-концевом районе белка не приводит к гибели мутантных особей в отличие от делеции трех аминокислот в С-концевом районе, которая вызывает гибель мутантных особей на ранних стадиях развития.

Работа поддержана РФФИ (проекты № 07-04-00701-а, 05-04-49246-а) и Программой Президиума РАН "Биоразнообразие и динамика генофондов" (подпрограмма "Динамика генофондов").

СРАВНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА И СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ И В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

© 2008 г. Б. И. Вердиев

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

Мозг и сетчатка глаза развиваются из нейроэпителиальных стволовых клеток нервной трубки. Сетчатка, являясь частью центральной нервной системы, формируется как выпячивание вентролатеральной области нейроэпителия переднего мозга и остается тесно связанной с ним посредством зрительного нерва. Процессы развития переднего мозга (неокортекса в частности) и сетчатки глаза имеют много общего, но их трудно сопоставлять из-за того, что традиционно принято исследовать мозг и сетчатку независимо друг от друга.

Цель работы – проведение сравнительного анализа экспрессии ряда тканеспецифических и регуляторных генов в ходе нормального развития и в культуре клеток мозга и сетчатки с помощью методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимии.

Анализ нативных сетчатки и мозга на стадии 9.5 нед развития (начальный период нейрогенеза) показал сходство паттернов экспрессии регуляторных факторов *Pax6*, *PROX1*, *NANOG*, *Oct4* и маркеров дифференцировки нестина, виментина, β -тубулина III. В конце нейрогенеза (18-20 нед) выявлены различия: в сетчатке сохраняется экспрессия исследованных регуляторных факторов, а в мозгу выявляются только *Pax6* и *PROX1*.

В адгезивных и суспензионных (нейросферы) культурах из сетчатки и мозга во всех случаях обнаружена экспрессия гена *Pax6*, *Oct4* не детектировался, а экспрессия *NANOG* выявлена только в одной культуре сетчатки. Во всех культурах сохранилась экспрессия маркеров дифференцировки, свойственных нативной ткани: в культурах мозга – нестина, виментина, β -тубулина III, ГФКБ, MAP2, в культурах сетчатки – нестина, виментина, рековерина.

Таким образом, в начале нейрогенеза кора мозга и сетчатка глаза эмбриона человека сходны по паттерну экспрессии исследованных регуляторных факторов. В конце нейрогенеза в переднем мозгу уже не выявляются регуляторные гены плюрипотентного статуса, а в сетчатке прежний паттерн сохраняется. В культуре клетки теряют экспрессию

регуляторных факторов *NANOG*, *Ost4* и сохраняют экспрессию *Raxb* и генов клеточной дифференцировки; это свидетельствует о том, что они хорошо переносят условия культивирования.

Работа поддержана РФФИ (проект № 08-04-00081a).

МУТАЦИИ ГЕНА *lawc* НАРУШАЮТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ДЕЛЕНИЕ СТВОЛОВЫХ ГЕРМИНАТИВНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ Фолликулярных Клеток в репродуктивной системе САМОК ДРОЗОФИЛЫ

© 2008 г. Ю. Е. Воронцова, О. Б. Симонова

Лаборатория генетических основ морфогенеза

В настоящее время старение предположительно связывают с нарушением самовоспроизведения стволовых клеток в репродуктивной системе. Поэтому изучение генетической регуляции этих процессов предполагает исследование стерильных и слабофертильных мутантов у хорошо изученных модельных организмов.

Некоторые мутации гена дрозофилы *leg-arista-wing complex (lawc)* вызывают стерильность самок, а слабофертильные аллели приводят к раннему старению организма. Анализ репродуктивной системы таких самок показал, что стерильность *lawc*-мутантов вызвана нарушением либо дифференцировки, либо самовоспроизведения стволовых герминативных клеток. У слабофертильных мутантов нарушается формирование цитоскелета, обеспечивающего транспорт ооцитспецифичного белка *Orb*, а также дифференцировка соматических фолликулярных клеток (формирование перемычек между фолликулами).

Исследование гомозиготных по летальным *lawc*-мутациям клонов клеток обнаружило у них ряд нарушений. В яичниках таких мозаичных самок с частотой 25% наблюдалась дезорганизация клеток цисты с формированием цист, состоящих из меньшего, чем в норме (16), числа клеток. Известно, что формирование “малоядерных фолликулов” происходит у мутантов по генам, контролирующим формирование органеллы цитоскелетно-

го матрикса – фьюсомы. На всех этапах деления цистобласта фьюсома контролирует митоз, ориентируя веретено деления, и участвует в образовании цитоплазматических мостиков (“кольцевых каналов”) между клетками цисты. Возможно, сильные аллели могут приводить к полной (или почти полной) деградации фьюсомы, в результате чего происходит нарушение митоза и дезорганизация клеток цисты. Реже (10.3%) встречались цисты, состоящие из большего, чем в норме, числа цистоцитов, которые, вероятно, возникли в результате дополнительного раунда митоза во время формирования герминативных цист. Также с частотой 4.4% в яйцевой камере встречались несколько псевдооцитов. Фенотипы “многоядерные яйцевые камеры” и “формирование 2–3 клеток, имеющих ооцитоподобные ядра” характерны для мутантов, нарушающих регуляцию клеточного цикла.

Таким образом, было показано, что *lawc*, возможно, участвует в контроле циклического деления стволовых герминативных клеток, дифференцировке соматических клеток и необходим при формировании цитоскелета в репродуктивной системе дрозофилы.

Работа поддержана РФФИ (проекты № 7-04-00701a, 05-04-49246a) и Программой Президиума РАН “Биоразнообразие и динамика генофондов” (подпрограмма “Динамика генофондов”).

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТУБУЛОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2008 г. К. Ю. Гнедева

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

У позвоночных трубчатые органы имеют сложное строение, в их состав входит множество клеточных типов. Формирование таких структур часто включает в себя фазы активного роста и клеточной пролиферации, сменяющиеся периодами покоя и даже регрессии, которая сопровождается запрограммированной клеточной смертью – апоптозом.

Хотя начальные процессы образования тубулярных структур схожи для разных органов, стратегии такой сборки для разных тканей отличаются

ся. Цель нашей работы – выявление клеточных механизмов тубулогенеза в культуре кератиноцитов человека. Для этого мы разработали модель выращивания таких структур *in vitro*, которая заключалась в помещении крупных конгломератов эпидермальных клеток в коллагеновый гель. Для индукции образования кожных придатков использовали кондиционированную фибробластами человека среду. На 3–5-е сут культивирования

наблюдали образование растающих в гель многоклеточных образований. Они достигали своего максимального развития на 8–10-е сут, после чего постепенно регрессировали, начиная с внутренних слоев клеток. Для определения состава этих образований и степени дифференцировки клеток в них было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии эпидермальных кератинов (10, 14 и 19) и маркера пролиферирующих клеток Ki 67. Было показано, что клетки, экспрессирующие кератин 10, т.е. более дифференцированные, располагаются снаружи придатка. Экспрессия маркера базальных клеток кератина 14, напротив, обнаруживалась внутри. Такое распределение дифференцированных клеток характерно для структур волоса.

Также важным представлялось выявление механизмов образования кожных придатков и распределения в них клеточных контактов и полостей. Для

этого было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии белков клеточных контактов (zo-1 – белков плотных контактов, интегринов – белков десмосом и коннексинов – белков щелевых контактов) и электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов. Было выявлено, что решающую роль в образовании данных структур играет формирование контактов типа десмосом и что вращение структуры в гель происходит за счет миграции клеток с использованием кератиноцитов в качестве субстрата, а не матрикса, как можно было предположить. Полости внутри данных структур образуются нерегулярно и имеют небольшие размеры. Мы полагаем, что их наличие связано с движением клеток.

Учитывая распределение клеточных маркеров и строение исследованных структур, можно предположить, что мы получили модель образования волосяного фолликула, в связи с чем наша работа представляет значительный интерес.

ИММОРТАЛИЗАЦИЯ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ВВЕДЕНИЯ ГЕНА КАТАЛИТИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА ТЕЛОМЕРАЗЫ

© 2008 г. Э. Б. Дашинимаев, Х. С. Вишнякова*, И. Н. Сабурин**, Е. Е. Егоров*

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

**Институт молекулярной биологии
им. В.А.Энгельгардта РАН*

***Институт биологии гена РАН*

Одним из перспективных направлений в клеточной биологии сегодня являются исследования стволовых клеток человека. Получение иммортализованных линий стволовых клеток может помочь в изучении механизмов их дифференцировки, полученные клетки также могут служить экспериментальной моделью для исследований в области тканевой инженерии.

Первичную культуру фетальных нервных стволовых клеток человека (НСК) получали из лобных долей коры головного мозга 11-недельного эмбриона человека. При помощи лентивирусной трансфекции в клетки НСК вводили ген, кодирующий каталитический компонент теломеразы человека *hTERT*. Полученные клетки наблюдали в культуре в течение года. За это время трансформированные клетки совершили свыше 65 циклов удвоения популяции. Исходная культу-

ра перестала расти и приобрела все признаки стареющей уже после 43 удвоений.

Клетки НСК-*hTERT*, как и исходная линия НСК, продолжали экспрессировать маркер нейтральных стволовых клеток – белок нестин, а также сохраняли способность к дифференцировке в нейральном и глиальных направлениях, что было подтверждено не только морфологически, но и с помощью маркеров: по появлению β -тубулина III и глиального фибриллярного кислого белка.

Культура клеток была способна расти в двух вариантах: в виде монослойной или с образованием плавающих нейросфер. При добавлении 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки нейросферы прикреплялись к субстрату, образующие их клетки выползали и распластывались, переходя в дальнейшем к дифференцировке.

КОМПЕНСАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА У ГРЫЗУНОВ

© 2008 г. Л. К. Дильмухаметова

Лаборатория гормональных регуляций

Дофаминпродуцирующая система медиобазального гипоталамуса участвует в нейроэндокринной регуляции репродуктивной функции,

влияя на секрецию пролактина в передней доле гипофиза. Гибель дофаминергических нейронов при патологии приводит к развитию гиперпро-

лактинемии, которая со временем компенсируется. В работе изучали компенсаторные реакции, развивающиеся при гиперпролактинемии, вызванной недостаточностью дофаминпродуцирующей системы в аркуатном ядре гипоталамуса. Исследования проводили на половозрелых самцах крыс Wistar. Недостаточность дофаминергических нейронов вызывали стереотаксическим введением нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ГДА) с аскорбиновой кислотой в боковой желудочек мозга после внутрибрюшинного введения дезипрамина. Животным из контрольных групп в боковой желудочек вводили раствор аскорбиновой кислоты после внутрибрюшинного введения дезипрамина или физиологического раствора. Дезипрамин ис-

пользовали для ингибирования захвата 6-ГДА норадренергическими нейронами. На 14-е сут после введения токсина уровень пролактина в крови у экспериментальных животных увеличивался вследствие недостатка дофамина, а в гипофизе не изменялся по сравнению с крысами из контрольных групп. Уровень катехоламинов в аркуатном ядре и гипоталамусе определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Изменение числа рецепторов к дофамину в гипофизе определяли методом количественной ПЦР в реальном времени. По предварительным данным, к 14-м сут развивается дофаминергическая недостаточность гипоталамуса, тогда как проявление компенсаторных реакций в этот период еще не выражено.

ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ В ФОРМИРУЮЩИХСЯ СЕЛЕЗЕНКЕ И ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

© 2008 г. Я. Д. Карпова

Лаборатория биохимии

Иммунные протеасомы играют важную роль в Т-клеточном иммунитете млекопитающих, участвуя в процессах запуска сигнала на уничтожение дефектных клеток, активации наивных Т-CD8⁺-лимфоцитов и отрицательной селекции тимоцитов. Знание динамики появления иммунных протеасом в тех или иных клетках в онтогенезе необходимо для понимания механизмов становления иммунитета. В нашей работе исследовано изменение содержания иммунных протеасом в селезенке (вторичном лимфоидном органе) и печени (нелимфоидном органе) крысы в постнатальном развитии. С помощью Вестерн-блоттинга выявлено незначительное число иммунных протеасом в селезенке в первую неделю жизни. К 7-м сут оно возрастает примерно в два раза, а к 18-м – еще в два раза. В печени же иммунные протеасомы практически не выявляются в первые две недели жизни крыс и обнаруживаются в заметном количестве только к 18-м сут.

Исследовано также распределение иммунных протеасом в клетках селезенки и печени крысы в раннем постнатальном развитии. С помощью двойного иммунофлуоресцентного мечения показано, что иммунные протеасомы содержатся как в В-, так и в Т-лимфоцитах селезенки. Прослежена миграция этих клеток в процессе формирования селезенки. В частности, продемонстрировано, что

В- и Т-лимфоциты, содержащие иммунные протеасомы, располагаются в красной пульпе в течение первой недели; к 8-м сут В-лимфоциты заселяют маргинальную зону белой пульпы, в то время как Т-лимфоциты в этот период группируются у белой пульпы; лишь к 18-м сут они заселяют ее периартериальное пространство, формируя функциональные зоны. Кроме того, с помощью иммунофлуоресцентного мечения и последующего анализа клеток селезенки с помощью конфокального микроскопа иммунные протеасомы обнаружены в макрофагах и ретикулоцитах. Иммунофлуоресцентное мечение клеток печени позволило выявить наличие значительного числа иммунных протеасом в гепатоцитах к 19-м сут.

Таким образом, печень способна “показывать” свои дефектные клетки иммунной системе с 18–19-х постнатальных сут. Именно в этот период селезенка приобретает способность “посылать” в печень с кровью и/или лимфой Т-лимфоциты-киллеры для уничтожения дефектных клеток. Наша работа позволяет понять, как складываются взаимоотношения между нелимфоидными и вторичными лимфоидными органами в процессе становления иммунитета.

Работа поддержана РФФИ (проект № 06-04-48229).

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ДЕФИНИТИВНЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ

© 2008 г. М. Н. Кожевникова, А. С. Микаелян, В. И. Старостин

Лаборатория гистогенеза

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в настоящее время рассматриваются как мультипотентные родоначальные клетки, локализующиеся в органах миелоидного кроветворения в пре- и

постнатальном периодах. Изучение иммунофенотипических и функциональных характеристик МСК из дефинитивных и транзиторных кроветворных органов в сравнительном плане позволя-

ет оценить их мультипотентный статус и выявить возможное гистогенетическое родство между популяциями МСК из этих двух источников. С точки зрения практического использования, существенно выяснить, МСК какого происхождения наиболее перспективны для применения в клеточной и тканевой инженерии. Таким образом, цель нашего исследования – иммунофенотипическая и функциональная характеристика популяций МСК из костного мозга и печени зародышей крысы в сравнительном аспекте.

Сравнительный анализ экспрессии ряда поверхностных маркеров МСК из костного мозга и печени зародышей проведен с использованием метода иммуноцитохимии и ПЦР-анализа. В обеих популяциях не выявлено экспрессии маркеров кроветворных и лимфоидных клеток (CD45, CD34, CD19, CD11b), идентифицирована экспрессия трех специфических поверхностных антигенов – CD73, CD90 и CD105, наличие которых является одним из обязательных критериев МСК. Однако степень экспрессии специфических для МСК маркеров в клетках из разных источников, равно как и в клетках в соста-

ве одной популяции, неодинакова. Такая гетерогенность культур МСК, возможно, связана с неодинаковым дифференцировочным статусом клеток.

При оценке остеогенных потенциалов популяций МСК из разных источников было показано, что во всех культурах МСК из костного мозга количество клеток, экспрессирующих остеокальцин и щелочную фосфатазу, увеличивалось в ответ на остеогенные стимулы по сравнению с контролем, где доля клеток, экспрессирующих остеогенные маркеры, была существенно ниже. МСК из печени зародышей имели неотчетливо выраженные остеогенные потенциалы. Признаки дифференцировки появлялись, но были выражены в слабой степени. Некоторые клетки давали положительную реакцию на щелочную фосфатазу. Выявлялись также коллагеновые волокна. Однако морфологию типичных остеобластов МСК из печени зародышей не приобретали, отложения кальция в них отсутствовали или были минимальными.

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

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2008 г. Л. А. Милюшина, **В. И. Миташов**, М. А. Александрова*

Лаборатория проблем регенерации

**Лаборатория экспериментальной нейробиологии*

В глазу взрослых млекопитающих клетки ретинального пигментного эпителия (ПЭ) не способны генерировать клетки нейрального пула. Однако размноженные в культуре ткани, они могут служить интересной моделью для изучения процессов пролиферации и дедифференцировки. Цель нашей работы – получение культур ПЭ из глаз эмбрионов и взрослого человека и их анализ на разных сроках культивирования с использованием различных сред.

Клетки ПЭ глаза эмбриона и взрослого человека культивировали на различных средах: 1) DMEM/F12 с 10% FBS; 2) DMEM/F12 с 1% FBS и добавками FGF-b, EGF и 3) Neurocult (“Stem Cell Tech.”, Канада). Культуры анализировали на разных пассажах, используя антитела против нестина, β -тубулина III, GFAP, *Cx43*, N-кадгерина, фибронектина, виментина, *Oct4*, *Nanog*, *Pax6*.

Все культуры были адгезивными и образовывали монослой, в котором наблюдались две субпопуляции клеток: эпителиальные структуры и активно пролиферирующие веретеновидные клетки. В культуре ПЭ эмбрионального глаза выявлен пе-

реход клеток эпителиальной морфологии к веретеновидной со снижением пигментации. Эти клетки активно пролиферируют и экспрессируют нестин, что свидетельствует об их дедифференцировке.

Культуру ПЭ взрослого глаза человека анализировали на трех пассажах (П). На 2-й и 3-й средах в течение 0-П клетки постепенно теряли пигментацию и активно пролиферировали. Все клетки экспрессировали виментин, большинство совместно экспрессировали нестин и виментин, единичные клетки экспрессировали β -тубулин III и *Pax6*. Экспрессия *Cx43* и N-кадгерина сохранялась в группах клеток с эпителиальной морфологией. Однако к 4-П пролиферация и экспрессия всех маркеров в депигментированных клетках снижалась.

Таким образом, при культивировании ПЭ выявляется два пула клеток, одни из которых быстро дедифференцируются, а вторые сохраняют эпителиальную морфологию. Эти популяции клеток находятся в разной зависимости от факторов среды культивирования.

Работа поддержана РФФИ (проект № 08-04-00081a).

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ МЕЖВИДОВЫХ РАЗЛИЧИЙ У ДВУХ ЛИНИЙ *Drosophila*

© 2008 г. С. С. Михайловский, В. И. Тюкмаева

Лаборатория генетики

Микросателлиты являются одной из наиболее быстро эволюционирующих последовательностей ДНК, что связано с большим числом ошибочных

инсерций и делеций, происходящих при репликации генома. Эти свойства позволяют использовать микросателлиты в качестве генетических марке-

ров при различных исследованиях молекулярной генетики.

Для *Drosophila* группы *virilis* известно более 40 микросателлитов, обладающих специфическим полиморфизмом. Они представляют собой 2–5-нуклеотидные повторы в числе до 28 копий.

Из всего набора микросателлитов четкие межвидовые различия были обнаружены для 20 микросателлитных локусов. Мы разработали метод выделения ДНК из одной мухи, который позволяет проводить до 500 полимеразных цепных реакций, что эффективнее описанных ранее подходов в 15–20 раз. Оценку длины фрагментов микросателлитных последовательностей определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Этот метод дает возможность фиксировать

различия по длине микросателлитных последовательностей до 2–4 нуклеотидов.

В работе были использованы линия *Drosophila virilis* 160 и *Drosophila lummei* 200. Из полученных данных следует, что по 15 микросателлитным маркерам исследуемые виды различаются одним фрагментом, еще по 5 маркерам – двумя. Также был проведен генетический анализ наследования этих признаков. Для первого поколения гибридов показано строгое совместное доминирование генетических признаков. В настоящий момент ведется работа по изучению генетического материала, полученного от возвратных скрещиваний *D. virilis* и *D. lummei*. Эта работа является частью исследования по локализации количественных признаков у видов *Drosophila* группы *virilis*.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РОСТОВЫМ ФАКТОРАМ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО АДГЕЗИИ К ПЛАСТИКУ

© 2008 г. Е. А. Молчанова

Лаборатория гистогенеза

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) из эмбриональных и дефинитивных органов миелоидного кроветворения представляют собой гетерогенную популяцию родоначальных клеток. Интерес к этому типу клеток связан с их способностью к пролиферации и дифференцировке в различных направлениях. Адгезия к поверхности культурального пластика является свойством МСК и используется для их выделения из взвеси кроветворных клеток и дальнейшего роста в культуре. В работе изучали действие EGF – эпидермального фактора роста, PDGF – фактора роста, выделенного из тромбоцитов, и bFGF – основного фактора роста фибробластов на МСК, выделенные из костного мозга и печени эмбрионов, в первичных культурах и полученных из неадгезивных популяций при длительном культивировании. Проанализировано влияние указанных факторов на эффективность клонирования, размеры колоний, морфологию, а также на потенции клеток к остеогенной дифференцировке.

PDGF в концентрации 2.5 и 10 нг/мл практически не влияет на эффективность клонирования МСК в первичных адгезивных культурах (11 сут *in vitro*). В концентрации 10 нг/мл он увеличивает пролиферативную активность клеток в колониях

костного мозга из неадгезивной популяции и стимулирует колониеобразование МСК из печени эмбрионов на разных сроках адгезии. EGF (1 и 10 нг/мл) увеличивает число колоний, образуемых клетками костного мозга и печени эмбрионов как в первичных адгезивных культурах, так и в культурах на более поздних сроках адгезии. Рост колоний под действием EGF имеет тенденцию к увеличению. PDGF и EGF не оказывают значительного влияния на остеогенные потенции МСК из костного мозга и печени эмбрионов. Фактор bFGF (5 нг/мл) подавляет клоногенный рост МСК костного мозга и увеличивает долю более крупных по площади колоний МСК из печени эмбрионов. Под действием данного фактора в концентрации 5 нг/мл доля остеогенных предшественников в культуре клеток из костного мозга увеличивается, а в культуре клеток из печени эмбрионов уменьшается. Таким образом, МСК из костного мозга и печени эмбрионов в первичных культурах и из неадгезивных популяций МСК из этих органов различны по чувствительности к ростовым факторам.

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

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ РЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА У НИЗШИХ И ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ *in vitro*

© 2008 г. Ю. П. Новикова

Лаборатория проблем регенерации

В настоящее время значительный вклад в поиск потенциальных клеточных источников восстановления сетчатки у высших позвоночных

вносят работы с использованием различных способов культивирования *in vitro* либо *in vivo* с применением различных повреждающих сетчатку аген-

тов и способов травмирования. В нашем исследовании использовали новый подход в попытке индуцировать пролиферацию и изменение фенотипа клеток в сетчатке взрослых позвоночных. Применяли органное ротационное культивирование изолированной сетчатки, содержащей в том числе и клетки ее периферии. Этот способ сохраняет для клеток окружение, сходное с таковым *in vivo*, разрешает долговременное культивирование и открывает простор для манипуляций. Для сравнения пролиферативных возможностей клеток сетчатки низших и высших позвоночных выбраны два объекта – взрослые тритон и крыса, обладающие полярным потенциалом к изменениям дифференцировки и пролиферации.

При культивировании сетчатки тритона в сформированных ею сфероидедах мы наблюдали активную миграцию клеток с периферии сетчатки (зона *oга serrata*) вовнутрь и их пролиферацию. Митотической активностью обладали и клетки отдельных популяций во внутреннем и наружном ядерных слоях. Отметим, что ранее в экспериментах с отслойкой сетчатки *in vivo* и при других способах культивирования *in vitro* не удавалось регистрировать митозы в сетчатке, несмотря на обнаружение разными методами синтеза ДНК. Морфологические и иммунохимические исследования предварительно позволяют отнести пролиферирующие клетки в сетчатке к прогенитор-

ным ростовой зоны, к макро- и микроглии и предшественникам во внутреннем ядерном слое.

Иммунохимическое исследование с использованием антител против фоторецепторного и глиального белков (реверина и GFAP соответственно) продемонстрировало жизнеспособность фоторецепторов и глии. Однако было замечено, что паттерн экспрессии обоих маркеров отличался от такового, описанного ранее в норме *in situ*. Изменение паттерна распределения в сетчатке GFAP⁺-глиальных клеток в совокупности с данными по пролиферации свидетельствуют об умножении числа этих клеток, их миграции и участии в реорганизации и регенерации сетчатки *in vitro*.

При органном роллерном культивировании сетчатки взрослой крысы на фоне клеточной миграции и частичной гибели были выявлены как минимум две клеточные популяции, обладающие митотической активностью. В фазе *M* мы наблюдали резидентные макрофагальные клетки, а также клетки внутреннего ядерного слоя. Последние отличались от гистиоцитов меньшими размерами и локализацией. Впервые разработанные нами подходы оказались хорошим инструментом для активации клеток – возможных источников регенерации сетчатки у взрослых низших и высших позвоночных.

РЕГУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ КОСТНОЙ ТКАНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ХРЯЩЕВУЮ ТКАНЬ *in vitro*

© 2008 г. Е. Ю. Рыбакова, С. А. Битко*, Б. Б. Березин*, М. С. Краснов, В. П. Ямскова, И. А. Ямсков*

Группа регуляторных белков

*Лаборатория физиологически активных биополимеров Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

Был изучен биологически активный в сверхмалых дозах (СМД) регуляторный белок, выделенный из костной ткани крыс Wistar. Препарированные бедренные кости после удаления эпифизов и костного мозга экстрагировали в физиологическом растворе при 4 °С в течение 2 ч. Тканевой экстракт высаливали серноокислым аммонием, осадок примесных белков удаляли центрифугированием, а фракцию супернатанта разделяли с помощью ионообменной хроматографии; биологическая активность (метод биотестирования) соответствовала фракции кислых белков. Данную фракцию исследовали методами обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрофореза в ПААГ, а также методом кругового дихроизма. Полученные данные показали, что регуляторный белок, выделенный из костной ткани млекопитающих, представляет собой низкомолекулярный кислый белок, вторичная структура которого

преимущественно состоит из β-структур и статистического клубка. Таким образом, по физико-химическим свойствам и характеру мембранотропной активности, проявляемой в СМД (10^{-14} – 10^{-17} мг/мл) регуляторный белок костной ткани можно отнести к группе биорегуляторов, ранее обнаруженных в различных тканях животных и растений, которые характеризуются проявлением биологической активности в СМД. Для изучения специфического действия регуляторного белка костной ткани была разработана модель роллерного органного культивирования регенерантов хвостов тритонов *Pleurodeles waltl in vitro*. Было показано, что культивирование в присутствии регуляторного белка, выделенного из костной ткани млекопитающих, в концентрации 10^{-14} М способствовало поддержанию гистоструктуры хрящевой ткани в регенеранте хвоста тритона по сравнению с контролем.

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ КАК ПОДХОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

© 2008 г. К. В. Сурков

Лаборатория общей физиологии

Цель работы – изучение возможности применения метода РНК-интерференции к культивируемым мышечным клеткам млекопитающих. Предполагается, что использование малых интерференционных РНК (миРНК) может стать сравнительно недорогим и удобным методом для изучения функций отдельных белков в исследуемых типах клеток. Объектами исследования служили миобласты и миотубулы клеток C2C12 скелетной мускулатуры мыши, а также культура гладкомышечных клеток аорты крысы. Необходимо было подобрать наилучшие условия и реагенты для проведения трансфекции исследуемых клеток, используя в качестве критериев их выживаемость и эффективность переноса миРНК через клеточную мембрану. Были протестированы подвергнутые трансфекции реагенты на липидной основе: Lipofectamine[™]2000 (“Invitrogen”, США), Metafectine[™]PRO (“Biontech”, Германия) – и на основе полиэтилениминов: jetPEI[™] (“Polyplus transfection”, Франция), DreamFect[™] (“OZ Biosciences”, Франция). Наилучшая выживаемость показана при использовании реагента jetPEI при проведении обратной трансфекции гладкомышечных клеток и прямой трансфекции миобластов и миотубул. Для оценки эффективности трансфекции использовали флуоресцентно-меченную двухцепочечную

РНК (siGLORiscFree RNA, “Dharmacon”, США), поступление которой в клетки регистрировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP, Германия. Эффективность трансфекции составляла около 100% для всех исследованных видов клеток – гладкомышечных, миобластов и миотубул C2C12. Показана принципиальная возможность специфического подавления в исследуемых клетках уровня мРНК интересующих белков. Была использована последовательность миРНК, направленная на подавление в исследуемых клетках экспрессии белка-мишени глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ). Проведя трансфекцию с этой миРНК, удалось снизить уровень мРНК ГАФДГ в скелетных миобластах и миотубулах в 10–20 раз. Для оценки уровня мРНК был применен метод количественной полимеразной цепной реакции. Проведенная работа показывает возможность эффективного транспорта коротких двухцепочечных миРНК в мышечные клетки с целью подавления уровня мРНК исследуемых белков-мишеней и определения их функциональной роли во время прижизненного исследования клеток.

Работа поддержана РФФИ (проект № 08-0401466) и Швейцарским национальным научным фондом (SCOPES № IB74A0-110940).

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ В ХОДЕ МОРФОГЕНЕЗА ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2008 г. Н. В. Фирсова

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Регуляторные факторы играют важную роль в морфогенезе глаза и необходимы для его нормального функционирования. Согласованная работа множества регуляторных факторов, к которым относятся транскрипционные факторы и сигнальные белки, с самых ранних этапов эмбриогенеза определяет формирование и специализацию структур глаза. Среди известных регуляторов морфогенеза глаза важное место занимают сигнальный белок TGFb2 и транскрипционные факторы PITX2, FOXC1, принадлежащие к общему сигнальному пути. Структурно-функциональные исследования регуляторных факторов в ходе развития глаза человека необходимы для понимания молекулярно-генетических механизмов пролиферации и дифференцировки.

Цель работы – сравнительные исследования экспрессии и локализации генов PITX2, FOXC1 и TGFb2 в тканях глаза человека с 9.5-й до 22-й нед пренатального развития. С помощью ПЦР-анализа изучен паттерн экспрессии генов Pax6,

PITX2, FOXC1 и TGFb2 в препарированных тканях глаза человека – роговице, хрусталике, сетчатке, цилиарно-радужном комплексе и пигментном эпителии – в ходе развития глаза. На стадиях активной пролиферации и дифференцировки клеток глаза (9.5 и 15 нед) выявлен высокий уровень экспрессии генов Pax6, PITX2, FOXC1 и TGFb2 во всех исследуемых тканях. На более поздней стадии, 18–19 нед, уровень экспрессии анализируемых генов снижается. К 22-й нед, когда сформированы практически все структуры глаза, обнаружен дифференциальный паттерн экспрессии генов FOXC1 и TGFb2. Впервые мы показали, что гены PITX2 и FOXC1 экспрессируются не только в тканях переднего сегмента глаза, но и в сетчатке. Результаты по локализации экспрессии генов, кодирующих исследуемые регуляторные факторы, получены с помощью гибридизации *in situ* и иммунохимии и находятся в соответствии с данными ПЦР-анализа.

Таким образом, наши результаты и литературные данные, полученные на других видах позво-

ночных, свидетельствуют об участии регуляторных факторов *TGF β* -сигнального пути в ключевых процессах морфогенеза глаза человека.

Работа поддержана РФФИ (проект № 05-04-48026) и Программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология".

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ НА ПЛАСТИКЕ И ФИБРОНЕКТИНЕ: ОЦЕНКА АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ И ОСТЕОГЕННЫХ ПОТЕНЦИЙ КЛОНОГЕННЫХ КЛЕТОК

© 2008 г. О. Н. Хныкова

Лаборатория гистогенеза

Изучение адгезии мезенхимных стромальных клеток к разным субстратам в настоящее время представляется очень важным. Матриксные белки влияют на клеточную адгезию, миграцию и дифференцировку, и их все чаще используют в качестве подложек при культивировании клеток. Отдельное внимание в последнее время уделяется неадгезивным популяциям мезенхимных стромальных клеток (МСК), т.е. клеткам, остающимся в суспензии дольше времени, считавшегося необходимым для адгезии.

В работе проведен сравнительный анализ адгезивности МСК, определяемых как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф) из костного мозга половозрелой крысы и печени 16-суточных зародышей крысы к культуральному пластику и фибронектину. Суспензию клеток из обоих источников инкубировали в пластиковых культуральных флаконах, покрытых или не покрытых фибронектином, в течение 1 или 7 сут, после чего проводили смену среды и продолжали культивирование до образования колоний. Старую среду, содержащую неприкрепившиеся клетки, переносили в новый флакон (соответственно с фибронектином или без него) и также культивировали до образования колоний. Затем культуры фиксировали и для выявления остеогенных клеток проводили гистохимическую реакцию на щелочную фосфатазу.

При культивировании на пластике значительная часть КОЕ-Ф костного мозга как через 1, так и 7 сут инкубации с субстратом оставалась в суспензии, сохраняя клоногенную способность и образуя колонии при переносе в новый флакон. Со-

отношение численности прикрепившихся и неприкрепившихся КОЕ-Ф варьировало от опыта к опыту, но во всех случаях доля неприкрепившихся КОЕ-Ф была достаточно велика. Клетки из эмбриональной печени демонстрировали более высокую адгезивность к пластику, чем костно-мозговые. Возможно, это связано с особой важностью адгезивных взаимодействий в эмбриональном развитии. Покрытие поверхности фибронектином значительно повышало адгезивность клеток из обоих органов.

Оценка активности щелочной фосфатазы в колониях, образованных прикрепившимися и неприкрепившимися за 7 сут клетками, показала, что на обоих субстратах большинство колоний, полученных из костного мозга, обнаруживали активность этого фермента. При этом в большинстве колоний на фибронектине щелочная фосфатаза экспрессировалась лишь немногими клетками, тогда как доля колоний с положительной реакцией в большинстве клеток и интенсивность реакции были существенно ниже по сравнению с пластиком. В колониях из печени, выращенных как на пластике, так и на фибронектине, реакция была отмечена лишь в единичных клетках отдельных колоний.

Для выяснения причин различий в адгезивных свойствах МСК, а также оценки влияния белков матрикса на дифференцировку требуются дальнейшие исследования.

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

ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *leg-arista-wing complex/TVP related factor 2* У *Drosophila melanogaster*

© 2008 г. Р. О. Черезов, Е. А. Модестова, О. Б. Симонова

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Нейроген *lawc* является *транс*-регуляторным. Мутации в нем обладают широким *плейотропным* эффектом, включающим *гомеозисную трансформацию* дистальных сегментов антенны в соответствующие элементы тарзуса.

Установлено, что ген *lawc* участвует в *нейро-, органо- и эмбриогенезе* дрозофилы. Анализ компьютерной базы данных, содержащей *сиквенс генома* дрозофилы, показал, что часть клонированной последовательности гена *lawc* лежит на рас-

стоянии примерно 10 т.п.н. от открытой рамки считывания гена, кодирующего фактор базовой транскрипции TBP Related Factor 2 (TRF2), принадлежащего семейству генов *TATA-box Binding Protein* (TBP) и гомологичного гену человека.

Регуляторная зона гена *lawc-trf2* занимает около 10 т.п.н. и представляет собой уникальную модель для исследования. Эта область насыщена трансгенными инсерциями, позволяющими получать локальные перестройки, в том числе делеции различных размеров, которые позволяют исследовать роль отдельных зон гена. Мы разработали две схемы скрещиваний для получения делеций в регуляторной зоне *lawc-trf2*. Принцип схемы основан на способности фермента транспозазы вызывать хромосомные перестройки между двумя инсерциями Р-элементов, находящимися в гомологичных хромосомах, в результате чего образуются делеции. Мы использовали три линии дрозофилы, содержащие различные инсерции, локализованные в разных районах регуляторной зоны.

В результате было получено 336 производных линий, в 96 из которых произошло вырезание двух фланкирующих Р-элементов, в пяти произошла инверсия участка, фланкированного инсерциями, а в девяти вырезался только один Р-элемент. Результаты были подтверждены в генетических (дупликационное картирование и анализирующие скрещивания) и молекулярных (гибридизация по Саузерну, ПЦР-генотипирование) экспериментах.

Таким образом, в нашем эксперименте частота возникновения локальных перестроек с одновременным вырезанием двух фланкирующих Р-элементов после их дестабилизации составила 30%. В настоящее время проводится детальный анализ размеров полученных делеций.

Работа поддержана РФФИ (проекты № 07-04-00701-а, 05-04-49246-а) и Программой Президиума “Биоразнообразие и динамика генофондов” (подпрограмма “Динамика генофондов”).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА И ИХ ИНДУКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА В КУЛЬТУРЕ

© 2008 г. Э. С. Черных

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Клетки дермальной папиллы волосяного фолликула играют важную роль в эмбриональном развитии волосяного фолликула, обеспечивая его дальнейшее функционирование и контроль цикла роста волоса. Мы разработали метод выделения клеток дермальной папиллы, охарактеризовали клетки по известным критериям и изучили их индукционные свойства в культуре.

Одним из отличительных свойств клеток дермальной папиллы является способность к синтезу специфических компонентов внеклеточного матрикса, таких как кислые и нейтральные мукополисахариды. Эти компоненты выявляются красителями толуидиновым синим и альциановым синим. Еще одним свойством клеток дермальной папиллы является повышенная активность щелочной фосфатазы. Выделенные по нашему методу клетки положительно окрашивались альциановым синим, проявляли метахроматические свойства при окрашивании толуидиновым синим и демонстрировали повышенную активность щелочной фосфатазы. Таким образом, выделенные клетки действительно являются клетками дермальной папиллы.

В культуре клетки дермальной папиллы продемонстрировали ряд отличительных свойств. В первую очередь мы исследовали способность клеток дермальной папиллы дифференцироваться в клетки костной и жировой ткани при культивирова-

нии в индукционных средах. В качестве положительного контроля использовали индуцированные к адипо- и остеогенезу клетки стромы жировой ткани. Сравнительный анализ окраски клеточных популяций показал, что клетки стромы жировой ткани и дермальной папиллы человека обладают схожими адипо- и остеогенными дифференцировочными потенциальными. Однако степень выраженности дифференцировки клеток дермальной папиллы ниже, чем у популяции клеток стромы жировой ткани.

Индуктивные способности выделенных клеток дермальной папиллы мы впервые изучили *in vitro* на модели живого эквивалента кожи. При помещении клеток дермальной папиллы волосяного фолликула человека в коллагеновый гель мы наблюдали инвазию коллагенового геля кератиноцитами, культивируемыми на поверхности геля, и формирование кератиноцитами тубулярных выростов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки дермальной папиллы являются особой популяцией полипотентных клеток, которая имеет ряд отличий от других популяций мезенхимных клеток. После выделения и культивирования клетки дермальной папиллы сохраняют функциональные свойства, в частности, способны индуцировать тубулогенез эпидермальных клеток.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (госконтракт № 02.512.11.2096).