

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (21–22 ДЕКАБРЯ 2009 г.)

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ МОЗГА И СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА *in vivo* И *in vitro*

© 2010 г. Б. И. Вердиев

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

В эмбриогенезе млекопитающих клетки нейроэпителия возникают на стадии ранней гастролы и являются собой одну из первых клеточных дифференцировок эмбриона. Из этих нейральных стволовых клеток в эмбриогенезе образуется вся нервная система. Из нейроэпителия переднего мозгового пузыря развиваются неокортекс и сетчатка глаза, механизмы морфогенеза которых имеют сходства. Цель работы – сравнение сетчатки и неокортекса человека по экспрессии ряда регуляторных генов и маркеров нейральной дифференцировки в развитии и культуре клеток.

На 9-й нед развития в нативных тканях сетчатки и неокортекса выявлены позитивное окрашивание на нестин волокон радиальной глии (маркер нейроэпителия), β III-тубулин-позитивные клетки (маркер ранних нейробластов) и отсутствие положительной реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) (маркер астроглии). На 20-й нед развития присутствуют клетки, окрашивающиеся на нестин, β III-тубулин, ГФКБ. В культурах клеток эмбриональных сетчатки и мозга присутствуют клетки, экспрессирующие ген *Pax6*, и характерные для нативной ткани клетки нейральной дифференцировки.

По данным количественного ПЦР-анализа, в процессе нейрогенеза уровень экспрессии *Pax6* в нативной сетчатке и неокортексе практически не изменяется с 9-й по 20-ю нед развития и в сетчатке он

стабильно выше, чем в коре. Экспрессия гена *PROX1* возрастает в сетчатке и снижается в неокортексе. Уровень экспрессии транскрипционного фактора *Oct4* меняется слабо в обеих структурах. В профиле экспрессии гена *NANOG* в сетчатке наблюдается двукратное увеличение на 18-й нед развития, тогда как в неокортексе обнаруживается его трехкратное падение на 12-й нед развития. В культуре сетчатки и неокортекса на 10.5-й нед развития профиль экспрессии *Pax6* повторяет таковой нативных тканей. Характер экспрессии генов *PROX1* и *NANOG* в культуре сетчатки слабо отличается от таковой нативной ткани, тогда как в культуре неокортекса уровень экспрессии значительно снижается. В культуре сетчатки экспрессия *Oct4* на порядок выше, чем в нативной ткани, а в культуре неокортекса в два раза ниже.

Исследование показало, что нативные ткани эмбриональной сетчатки и неокортекса сходны по профилю экспрессии генов *Oct4* и *NANOG*, а динамика экспрессии *PROX1*, по-видимому, отражает процесс дифференцировки специфических нейронов. В культуре клетки сетчатки в большей степени сохраняют потенциал исходной ткани, по сравнению с клетками неокортекса.

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

РОЛЬ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ В ФОРМИРОВАНИИ И ФУНКЦИИ ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ

© 2010 г. К. Ю. Гнедева

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Клетки нервного гребня представляют собой мигрирующую популяцию, обладающую мультипотентным потенциалом. Они дают начало таким разнообразным структурам, как проводящая система сердца, дорсальный ганглий, меланоциты кожи и большей части головной мезодермы. Недавние исследования показали, что клетки дермальной папиллы волос головы также берут начало от клеток

нервного гребня. Используя генетическую модель *IFT20^{flox}/Wnt1/Cre*, мы показали, что потомки клеток нервного гребня найдены в мезодермальной составляющей волос головы и что нокаутные животные имеют ряд серьезных дефектов в паттерне и строении вибрис. Также мы продемонстрировали, что клетки дермальной папиллы волос головы, но не других участков тела, могут быть дифференцирова-

ны в нейроны, глию и гладкую мускулатуру, что является характерным для клеток нервного гребня. Основываясь на полученных данных, мы выдвинули предположение о том, что если клетки нервного гребня способны давать начало дермальной папилле волос головы в эмбриогенезе, то, возможно, они могут быть дифференцированы в эту клеточную популяцию и *in vitro*. Используя существующий протокол, из эмбриональных стволовых клеток человека линии H9 мы получили клетки нервного гребня, ко-

торые в дальнейшем были дифференцированы в клетки дермальной папиллы. Достоверность дифференцировки была подтверждена анализом клеточных маркеров и с помощью функционального критерия – способностью этого клеточного типа индуцировать формирование волоса. Последнее было продемонстрировано с помощью подкожной пересадки бестимусным мышам и гистологического анализа трансплантатов.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК ИЗ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА

© 2010 г. Д. А. Давыдова

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Амниотическая жидкость (АЖ) человека на протяжении многих лет используется для пренатальной диагностики различных генетических заболеваний. Она содержит гетерогенную популяцию клеток фетального происхождения, большая часть которых дифференцирована. В последнее время появились данные о том, что в АЖ присутствуют стволовые клетки, способные к длительной пролиферации в условиях *in vitro*. Цель нашей работы – изучение дифференцировочного потенциала клеток, выделенных из АЖ человека.

Полученные культуры клеток от трех доноров характеризуются экспрессией маркеров мезенхимного (CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD146), нейрального (β 3-тубулин, нестин, Pax6), эпителиального (кератин 19, p63) типов дифференцировки, а также экспрессией маркеров плюрипотентности (гены *Oct4*, *Nanog*, *Rex-1*). При трансплантации культивированных клеток АЖ иммунодефицитным животным не происходит образования тератом. По данным проточной цитофлуориметрии, более 90% клеток экспрессируют мезенхимные и эпителиальные маркеры, это свидетельствует о том, что значительная часть популяции может одновременно экспрессировать два типа маркеров, и подтверждается результатами двойного иммуногисто-

химического окрашивания: в клетках одновременно выявляется CD105 и кератин 19, а также CD73 и кератин 19. Анализ клонов, полученных из клеток АЖ, также выявил в клетках экспрессию и мезенхимных (CD105, CD73, CD44, CD29), и эпителиальных (кератин 19) маркеров. При культивировании клонов в среде, содержащей факторы индукции остеогенеза, происходит образование кальцификатов, окрашивающихся красителем ализариновым красным, а также выявляется экспрессия белка внеклеточного матрикса остеопонтина. При индукции миогенеза происходит образование многоядерных клеток, а также экспрессируется ранний маркер миогенной дифференцировки – Myf-6. Кроме того, выявлена способность клонов к дифференцировке в гепатоциты: в клетках возрастает экспрессия α -фетопротейна, альбумина, рецептора c-met и HNF4 α . В трехмерном коллагеновом матриксе клетки АЖ образуют тубулярные структуры и активно пролиферируют, что подтверждается включением BrdU и отличает их от мезенхимных стволовых клеток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что АЖ содержит мультипотентные клетки, способные дифференцироваться в производные разных зародышевых листков.

РЕГУЛЯЦИЯ СЕКРЕЦИИ ПРОЛАКТИНА НОРАДРЕНАЛИНОМ НА ФОНЕ ДЕФИЦИТА ДОФАМИНА

© 2010 г. Л. К. Дильмухаметова

Лаборатория гормональных регуляций

Пролактин – полипептидный гормон, синтезирующийся лактотрофами передней доли гипофиза, играет важную роль в регуляции репродуктивной функции организма. Секреция пролактина находится под ингибиторным контролем дофамина (ДА), синтезирующегося нейронами аркуатного ядра, и норадреналина (НА), синтезирующегося нейронами ствола мозга. Спонтанная прогрессирующая дегенерация ДА-ергических нейронов у челове-

ка приводит к усилению секреции пролактина и развитию так называемого синдрома гиперпролактинемии. При моделировании гиперпролактинемии используют нейротоксин 6-гидроксидофамин (6-ГДА). Однако 6-ГДА вызывает дегенерацию не только ДА-ергических нейронов, но и НА-ергических аксонов, участвующих в регуляции секреции пролактина. Поэтому цель работы – оценка роли НА в развитии гиперпролактинемии при дегенерации

ДА-ергических нейронов аркуатного ядра. Для предотвращения гибели НА-ергических аксонов применяли десметилимипрамин (ДМИ) — ингибитор обратного захвата норадреналина. На 14- и 45-е сут после инъекций определяли концентрацию пролактина в крови и гипофизе, содержание катехоламинов в стриатуме, черной субстанции и аркуатном ядре и оценивали уровень экспрессии D_2 -рецепторов в гипофизе. На 14-е сут после введения только 6-ГДА в аркуатном ядре наблюдается снижение уровня НА и ДА в 5 и 2 раза соответственно, а в крови — повышение концентрации пролактина в 2.3 раза по сравнению с контролем. При введении 6-ГДА на фоне ДМИ на 14-е сут в аркуатном ядре наблюдается снижение уровня НА и ДА в 1.2 и 4 раза соответственно. При этом концентрация пролактина в крови повышается в 2.2 раза. На 45-е сут после введения 6-ГДА в аркуатном ядре уровень НА остается сниженным в 3.5 раза, но происходит восстановление содержания ДА до контрольного уровня, а в крови — восстановление концентрации пролактина. При введении 6-ГДА на фоне ДМИ в аркуатном ядре на 45-е сут содержание НА восстанавливается, а ДА снижается в 11.5 раз по сравнению с контролем.

При этом концентрация пролактина в крови остается повышенной в 1.8 раз. Содержание мРНК D_2 -рецепторов в передней доле гипофиза на 14-е сут после введения 6-ГДА снижается, на 45-е сут восстанавливается до контрольного уровня, а при введении 6-ГДА на фоне ДМИ экспрессия D_2 -рецепторов в гипофизе в опыте по сравнению с контролем не меняется на 14-е сут и снижается на 45-е. После введения только 6-ГДА на фоне ДМИ уровень пролактина в передней доле гипофиза снижается в опыте по сравнению с контролем на всех сроках исследования. Таким образом, введение 6-ГДА приводит к снижению уровня ДА и повышению уровня пролактина. При этом гиперпролактинемия на фоне значительного снижения НА (6-ГДА без ДМИ) носит обратимый характер, а на фоне незначительного снижения НА (6рГДА с ДМИ) продолжает усиливаться в течение исследованного периода. Таким образом, НА ингибирует компенсаторный синтез ДА в нейронах аркуатного ядра и способствует развитию некомпенсируемой гиперпролактинемии, при этом ДА ингибирует сначала выделение, а затем и синтез пролактина и стимулирует экспрессию D_2 -рецепторов.

СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМА В РАННЕМ РАЗВИТИИ КОСТИСТЫХ РЫБ

© 2010 г. Е. Г. Ивашкин

Лаборатория сравнительной физиологии

Серотонин (5-НТ) вовлечен во многие регуляторные процессы вне нервной системы, в частности в регуляцию раннего развития животных. У всех исследованных на данный момент беспозвоночных и позвоночных животных разной систематической принадлежности было описано присутствие компонентов 5-НТ-системы: самого 5-НТ, его рецепторов, ферментов его синтеза и катаболизма, белков-транспортёров. Экспериментальные воздействия на эту систему (например, блокирование и активация рецепторов специфическими фармакологическими агентами, исследование мутантов с отсутствием экспрессии генов триптофангидроксилазы и 5-НТ-рецепторов) приводили к нарушениям клеточных делений, межклеточных взаимодействий, поляризации клеток, клеточных пластов и развития эмбриона в целом. Известно, что у костистых рыб 5-НТ блокирует стимулированное стероидными гормонами созревание ооцитов. Однако экспериментальных исследований серотонинассоциированных регуляторных процессов в дроблении, бластуляции и гаструляции костистых рыб не проводилось.

Мы изучили развивающуюся икру двух видов костистых рыб — данио (*Brachydanio rerio*) и выюна (*Misgurnus fossilis*) — и с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноцитохимии продемонстрировали присутствие 5-НТ в

зародышах на последовательных стадиях развития. В процессе дробления 5-НТ локализуется в бластомере, а на стадиях бластулы и начала эпиболии выделяются отдельные клетки с повышенной концентрацией 5-НТ. После инкубации с 5-гидрокситриптофаном, предшественником 5-НТ, у зародышей на стадии 8 бластомеров яркость окрашивания существенно усиливалась, а на хроматограмме наблюдались пики продукта обмена 5-НТ — 5-гидроксииндолуксусной кислоты.

Иммуноокрашивание с антителами к рецептору человека 5-НТ 1a (подобранными на основе гомологии аминокислотных последовательностей) выявило на электрофоретическом геле полосу в районе 44 кДа, что соответствует описанному для данио белку рецептора 5-НТ 1aa. Сканирование на конфокальном микроскопе реагирующих на обработку антителами тотальных препаратов зародышей на начальных стадиях дробления, показало наличие неравномерно распределенного точечного окрашивания на плазматической мембране бластомеров. Исследование с помощью РТ-ПЦР показало присутствие транскриптов гена *5-htr-1aa*.

Участок гена *5-htr-1aa* был клонирован в вектор *pGEM-T*, на основе которого синтезирован РНК-зонд. Тотальная *in situ* гибридизация этого зон-

да показала, что мРНК этих рецепторов равномерно распределена в бластодиске и клетках бластодермы.

Инкубация зародышей данио с антагонистами 5НТ-рецепторов – миансерином и ципрогептадином – приводила к нарушению целостности бластодермы на стадии бластулы. В то же время у выюна подобный эффект наблюдался только при инкубации с ципрогептадином. Введение миансерина и ципро-

гептадина внутрь зародыша не вызывало нарушений развития.

Таким образом, мы показали присутствие 5-НТ ферментов его синтеза и деградации, а также мРНК и белка 5-НТ– рецептора в клетках ранних зародышей костистых рыб и получили экспериментальное подтверждение участия серотониновой системы в регуляции раннего морфогенеза.

ЕСТЕСТВЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ У НАЗЕМНЫХ БЕЛИЧЬИХ (Sciuridae) МОНГОЛИИ

© 2010 г. С. Ю. Капустина, О. В. Брандлер, Е.А. Ляпунова

Лаборатория цитогенетики

В эволюционной биологии определение роли гибридной как отдаленной, так и современной является одной из основных проблем при изучении закономерностей видообразования. Несмотря на то что значительная роль гибридной как фактора микроэволюции у растений и животных была доказана достаточно давно, для млекопитающих ее значение долго недооценивалось. Применение молекулярно-генетических методов и кариотипирования при изучении природных популяций выявило значительно более широкое распространение этого явления в данной группе. В подсемействе наземных беличьих у сусликов рода *Spermophilus* обнаружены активно идущие процессы интрогрессивной гибридной в зонах вторичного контакта ряда видов. Имеются предварительные данные о существовании зон гибридной у других представителей этой группы – сурков. Сравнительное изучение гибридной близкородственных, но различающихся по уровню социальности форм животных позволяет выявить специфику и разнообразие механизмов поддержания целостности и обогащения их видовых генофондов.

Особенности межвидовых контактов у наземных беличьих на территории Монголии изучали в зонах симпатрии сурков *Marmota baibacina*, *M. sibirica* и сусликов *S. alashanicus*, *S. pallidicauda* с помощью

биоакустических, молекулярно-генетических и кариологических методов. Видоспецифические характеристики звукового сигнала, предупреждающего сурков об опасности, использовали для изучения пространственного распределения особей разных видов и их предполагаемых гибридов в зоне симпатрии. Секвенирование нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК (D-loop) проводили для определения видовой специфичности митохондриального генома отловленных особей. Полученные данные были нанесены на космические снимки и карты модельных участков совместного обитания двух видов сурков. Анализ пространственного распространения особей двух видов сурков в зоне симпатрии показал их неслучайное, зависимое от ландшафта распределение. У отловленных особей из этой зоны были найдены оба варианта мтДНК, специфичных для обитающих там видов. Видовая принадлежность отловленных сусликов подтверждалась на основании диплоидного числа хромосом. Анализ изменчивости 6-го интрона гена p53 яДНК применяли для выявления гибридных особей. В исследованной выборке обнаружены как гомозиготные, так и гетерозиготные особи по трем аллельным вариантам данного маркера.

Работа поддержана РФФИ (проекты № 08-04-00937, 08-04-90208) и Программой Президиума РАН “Биологическое разнообразие”.

ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ В СЕЛЕЗЕНКЕ И ПЕЧЕНИ КРЫС В ЭМБРИОНАЛЬНОМ И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ МЫШЕЙ, НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ β_2 -МИКРОГЛОБУЛИНА

© 2010 г. Я. Д. Карпова

Лаборатория биохимии

Иммунные протеасомы, мультисубъединичные внутриклеточные протеазные комплексы, образуют антигенные эпитопы из чужеродных белков у млекопитающих для представления их вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I Т-лимфоцитам. Исследование особенностей экспрессии иммунных протеасом в лимфоидных и

нелимфоидных органах в развитии важно для понимания механизмов становления иммунитета. Ранее мы обнаружили, что количество иммунных протеасом в селезенке увеличивается на 1- и 3-й нед постнатального развития, а в печени – только на 3-й. Методом иммуногистохимии было показано, что это увеличение в печени связано с повышением экс-

прессии иммунных протеасом в гепатоцитах, а в селезенке — с заполнением белой пульпы Т- и В-лимфоцитами, содержащими иммунные протеасомы.

Выявлена более детальная картина миграции Т- и В-лимфоцитов, содержащих иммунные протеасомы, в селезенке крыс в эмбриональном и раннем постнатальном развитии. Эта миграция необычна: В- и Т-лимфоциты накапливаются в красной пульпе в перинатальный период, затем В-лимфоциты занимают маргинальную зону белой пульпы (к 8-м постнатальным сут), после этого Т-лимфоциты “прорываются” сквозь зону В-лимфоцитов, но только с одной стороны, совершая миграцию в периаортальное пространство (8–18-е сут). В печени Т- и В-лимфоциты, содержащие иммунные протеасомы, выявляются с 21-х эмбриональных по 3-и постнатальные сут, что свидетельствует о функционировании печени в данный период в качестве лимфоидного органа. При этом иммунные протеасомы выявляются в основном в В-лимфоцитах, в гепатоцитах их содержание пока еще относительно невелико. Вместе с тем мы показали, что увеличение количества иммунных протеасом в печени возможно уже в эмбриональном развитии в условиях воспаления. Так, введение липополисахарида в организм матери на 12-й день беременности вызывает увеличение коли-

чества иммунных субъединиц протеасом LMP7 и LMP2 в печени плодов через 7 дней в два-три раза. Тотальный пул протеасом при этом значимо не изменяется.

Мы также проанализировали изменения в содержании иммунных протеасом в селезенке и печени мышей, нокаутных по гену β_2 -микроглобулина и вследствие этого дефектных в представлении антигенных эпитопов. Оказалось, что количество иммунных субъединиц протеасом LMP7 и LMP2 у нокаутных животных уменьшается в печени на 50 и 30% соответственно и увеличивается в селезенке на 30%. Были выявлены возможные регуляторные пути изменения содержания иммунных протеасом. В частности, показано, что количество белка теплового шока 70 — активатора экспрессии иммунных протеасом — и количество NO-синтазы, запускающей путь такой активации, у нокаутных животных уменьшается в печени и увеличивается в селезенке.

Таким образом, развитие Т-клеточного звена иммунной системы, а также дефектные в функционировании Т-клеточного иммунитета состояния связаны с изменениями в пуле иммунных протеасом в селезенке и печени.

Работа поддержана РФФИ (проект № 09-04-00077а).

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ДЕГЕНЕРАЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ И СОДЕРЖАНИЯ В НИХ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОТОКСИНА В НИЗКИХ ДОЗАХ

© 2010 г. Е. А. Козина

Лаборатория гормональных регуляций

Нарушение метаболизма нейротрансмиттеров, возникающее при гибели синтезирующих их нейронов, приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний у человека, в частности, при дегенерации дофаминергических (ДА-ергических) нейронов nigrostriatной системы мозга — к болезни Паркинсона (БП). После дегенерации 70–80% ДА-ергических нейронов, которая происходит в течение 20–30 лет, появляются первые симптомы, и заболевание переходит в клиническую стадию. Отсутствие внешних проявлений БП в процессе ее развития до достижения порогового уровня дегенерации ДА-ергических нейронов и снижения содержания дофамина (ДА) в стриатуме объясняется включением механизмов пластичности мозга, компенсирующих функциональную недостаточность nigrostriatной ДА-ергической системы. Моделирование БП осуществляли на мышах с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) — нейротоксина ДА-ергических нейронов. Через 14 сут после двукратного введения МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч в черной субстанции (ЧС) — области локализации тел ДА-ергических нейронов — наблюдали умень-

шение общего числа нейронов на 28%. При этом концентрация ключевого скоростylimитирующего фермента синтеза ДА — тирозингидроксилазы (ТГ) — в сохранившихся после действия токсина нейронах оказалось выше, чем в контроле, на 20%. Это является косвенным показателем компенсаторного усиления синтеза ДА. С помощью двойного иммунофлуоресцентного мечения было показано, что в стриатуме — области проекции ДА-ергических аксонов — на 59% снижается количество биферментных волокон, т.е. волокон, содержащих оба фермента синтеза ДА. Наряду с этим в оставшихся волокнах стриатума происходило снижение концентрации ТГ на 27%, что не сопровождалось изменением размера выживших волокон по сравнению с контролем. Через 14 сут после четырехкратного введения МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч количество ДА-ергических нейронов ЧС снизилось на 43%, а концентрация ТГ увеличилась на 24%. При этом в стриатуме снизилось количество ДА-ергических аксонов на 68% и произошло падение концентрации ТГ на 26%. Интересно отметить, что при двукратном и четырехкратном введении МФТП в выживших нейронах ЧС

происходит компенсаторное увеличение концентрации ТГ и, как следствие, увеличение уровня ДА, тогда как на уровне стриатума наблюдается противоположная картина – снижение концентрации ТГ и уровня ДА в выживших

волокнах. Опираясь на литературные данные, можно предположить, что происходят нарушения со стороны антероградного аксоплазматического транспорта, что и будет проверено в дальнейшем.

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ВХОДА Ca^{2+} В ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ МИОБЛАСТАХ МЫШИ

© 2010 г. А. М. Красный

Лаборатория биофизики развития

В работе изучены механизмы входа Ca^{2+} в делящихся миобластах мышцы линии C2C12. Было установлено, что в пролиферирующих миобластах вход Ca^{2+} регулируется β_2 -адренергическими рецепторами. Этот вывод базируется на экспериментах по влиянию фенотерола – специфического активатора β_2 -рецепторов. Фенотерол вызывает активацию Ca^{2+} , тогда как норадреналин – активатор α_1 -, α_2 - и β_1 -адренергических рецепторов – нет.

В нашей работе было также установлено, что вход Ca^{2+} в миобластах опосредуется аденилатциклазой. Этот вывод сделан на основе опытов с специфическим активатором аденилатциклазы форскалином,

который вызывает вход Ca^{2+} в клетки. Показано также, что последующее за воздействием форскалина введение адреналина входа Ca^{2+} не вызывает. Это позволяет заключить, что продукты аденилатциклической реакции активируют отрицательную обратную связь, что приводит к ингибированию действия аденилатциклазы.

Для определения типа каналов в пролиферирующих миобластах в наших экспериментах был использован верапамил – специфический ингибитор кальциевых каналов L-типа. Было показано, что верапамил полностью блокировал вход кальция в клетку. Таким образом, каналы, проводящие Ca^{2+} при активации, являются каналами L-типа.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НОКДАУН НЕЙРОГЕНА *dd4* У *Drosophila melanogaster*: АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

© 2010 г. С. Ю. Лафуткина

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Гены семейства *d4* отличаются выраженным эволюционным консерватизмом. Их экспрессия связана с функционированием нервной и репродуктивной систем. В геноме дрозофилы найден единственный гомолог этого семейства – *drosophila-d4* (*dd4*). Поскольку неизвестно ни одной мутации генов семейства *d4*, что осложняет их исследование, мы применили новый, получивший распространение в последнее время, подход – направленную инактивацию исследуемого гена с помощью метода РНК-интерференции (RNAi). В основе его лежит специфическое разрушение молекул мРНК с помощью процесса, запускаемого гомологичной двухцепочечной молекулой РНК. Результатом является так называемый нокдаун гена, с которого данная мРНК считывается, в итоге синтез соответствующего белка блокируется.

Для генетического нокдауна нейрогена *dd4* мы использовали двухкомпонентную систему экспрессии генов *UAS/GAL4*, разработанную Брэндом и Перримом в 1993 г. Ранее в лаборатории была синтезирована плазмидная конструкция *p{UAS-iРНК $dd4$ 06}*, которая кодировала фрагменты смысловой и антисмысловой последовательностей гена *dd4* под контролем *GAL4*-зависимого про-

мотора *UAS*. После инъекции этой конструкции в эмбрионы дрозофилы были получены трансгенные линии. Трансгенных дрозофил скрещивали с дрозофилами, в клетках которых экспрессируется белок *GAL4*, и таким образом получали особей, содержащих в геноме оба компонента системы *UAS/GAL4*. Трансгенная конструкция активировалась, и с нее считывалась интерференционная РНК, представленная двухцепочечной РНК-шпилькой. Анализ фенотипа таких особей обнаружил у них одну особенность – разрастание жилок крыловых пластинок. У дрозофилы мутации ряда нейрогенов, принадлежащих сигнальным путям Notch и EGFR, вызывают дефекты в развитии периферической нервной системы, сопровождаемые неправильным жилкованием. Выяснение, является ли *dd4* компонентом одного из этих путей, ляжет в основу дальнейшей работы.

В результате поиска соответствия полученного нами фенотипа крыльев фенотипам известных мутаций мы обнаружили, что он практически полностью совпадает с фенотипом мутации гена *snr1*, который кодирует один из компонентов комплекса ремоделирования хроматина *Brahma*, регулирующего работу генов через эпигенетическую активацию

хроматина. Ген *snr1* так же, как *dd4*, проявляет нейрогенный паттерн экспрессии на эмбриональной стадии развития дрозофилы. У человека специфиче-

ские инактивирующие мутации в гомологичном гене *hsnf5* найдены в большинстве злокачественных рабдоидных опухолей.

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО ДЕФИЦИТА СЕРОТОНИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ В ТИМУСЕ И СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС

© 2010 г. Е.В. Маслова

Лаборатория гистогенеза

Известно, что нейрогормоны и нейромедиаторы в раннем онтогенезе млекопитающих могут выполнять функции регуляторов развития. Одним из регуляторов развития иммунной системы является серотонин. Ранее было показано, что подавление синтеза серотонина у плодов крыс в критический период формирования тимуса приводит к необратимым изменениям клеточного и гуморального иммунного ответа у этих животных на протяжении всей жизни. Для изучения механизмов морфогенетического влияния серотонина на развитие иммунной системы исследовали влияние дефицита серотонина в пренатальный период на дифференцировку Т- и В-лимфоцитов в тимусе и селезенке крыс. Фармакологическое подавление синтеза серотонина у плодов крыс осуществляли введением самкам с 13-го по 17-й дни беременности пара-хлорофенилаланина. У потомства на 20-е сут постнатального развития оценивали: 1) массу тимуса и селезенки, 2) общее количество лимфоцитов в тимусе и селезенке, 3) количественный состав субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$ -фенотипов) в тимусе, 4) долю Т- и В-лимфоцитов в популяции клеток селезенки.

Анализ полученных данных показал, что дефицит серотонина в пренатальный период развития приводит к достоверному снижению массы тимуса и селезенки и уменьшению общего количества лимфоцитов в этих органах у трехнедельных крыс. У этих животных увеличено процентное содержание В-клеток в общей популяции лимфоцитов в селезенке, тогда как в тимусе наблюдалось незначительное, но статистически достоверное снижение доли зрелых Т-лимфоцитов (фенотипов $CD4^+$ и $CD8^+$) и увеличение доли незрелых тимоцитов (двойные позитивы фенотипа $CD4^+CD8^+$). Наблюдаемые изменения в клеточном составе популяций Т- и В-лимфоцитов связаны с необратимыми морфогенетическими изменениями, скорее всего, в стромальных элементах иммунокомпетентных органов, которые в свою очередь определяют дифференцировку лимфоцитов в онтогенезе. Полученные результаты свидетельствуют, что серотонин контролирует развитие Т- и В-систем иммунитета.

Работа поддержана РФФИ (проект № 08-04-00276).

ПЛАСТИЧНОСТЬ КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА *in vitro*

© 2010 г. Л. А. Милушина, А. В. Кузнецова, А. С. Микаелян*, М. А. Александрова**

Лаборатория проблем регенерации

**Лаборатория молекулярно-генетических исследований*

***Лаборатория экспериментальной нейробиологии*

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) сетчатки глаза взрослого человека представлен монослоем пигментированных гексагональных клеток, лежащих между сетчаткой и сосудистой оболочкой. Этот монослой не однороден: клетки различаются по размерам, форме, степени пигментации, количеству ядер и по экспрессии ряда маркеров дифференцировки. Эта гетерогенность определяет различное поведение клеток при культивировании.

Мы культивировали клетки РПЭ в средах, содержащих 10% сыворотки, а также в средах, содержащих 1% сыворотки и факторы роста FGF и EGF. Не-

зависимо от условий культивирования образовывались адгезивные культуры, в которых наблюдались клетки эпителиального и фибробластоподобного типов. Клетки первых пассажей теряли способность экспрессировать характерные для РПЭ дифференцировочные маркеры RPE65 и CRALBP и дедифференцировались, на что указывала экспрессия генов *Pax6*, *Oct4* и *Nanog*, выявленная с помощью ПЦР и иммуногистохимического анализа. Одновременно часть культивированных клеток начинала экспрессировать гены *Pitx2*, β -тубулин-III и *Musashi*, что указывало на их дифференцировку по нейронально-

му пути. Дедифференцировка и приобретение способности экспрессировать нейральные маркеры клетками РПЭ так же были показаны с помощью методов иммуногистохимии.

В ходе работы мы получили четыре типа культур клеток РПЭ глаза взрослого человека: смешанного типа из тотальной ткани РПЭ; эпителиального и фибробластоподобного типов, полученные с помощью селективной трипсинизации культуры смешанного типа, а также субпопуляцию клеток РПЭ в виде свободноплавающих нейросфер, полученную при переводе смешанной культуры на бессывороточную среду, содержащую факторы FGF и EGF.

Последняя обладала максимальной в сравнении с другими полученными типами культур способностью к дифференцировке в нейральном направлении. Таким образом, показано, что популяция клеток РПЭ глаза взрослого человека гетерогенна, следствием чего является различающееся поведение клеток в условиях *in vitro*, зависимость характера дифференцировки от условий культивирования и взаимовлияния отдельных субпопуляций друг на друга.

Работа поддержана РФФИ (проект № 08.04.00081) и Контрактом Федерального агентства по науке и инновациям (№ 02.512.12.2008).

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ IP_3 -ЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ ОБМЕНА ИОНОВ Ca^{2+} В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СКЕЛЕТНЫХ МИОБЛАСТОВ В МИОТУБУЛЫ

© 2010 г. Э. Р. Муслихов

Лаборатория общей физиологии

Ранее считалось, что в зрелых скелетных мышцах повышение уровня цитоплазматического кальция происходит только при активации потенциалуправляемых каналов L-типа и рианодинчувствительных каналов саркоплазматического ретикула. Однако в мышечных клетках выявлены также сигнальные системы, присущие электроневозбудимым клеткам, — каналы ретикула, активируемые инозитолтрифосфатом (IP_3 -рецепторы), и кальциевые каналы плазматической мембраны семейства TRP (TRPC1 и TRPV2). Цель работы — оценить изменения данных потенциалнезависимых систем обмена ионов Ca^{2+} в процессе дифференцировки миобластов и их значимость в зрелых многоядерных клетках скелетной мускулатуры.

Исследования проводили на культуре клеток линии C2C12. Дифференцировку вызывали заменой среды культивирования, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (DMEM), на среду, содержащую 4% лошадиной сыворотки. Измерения уровней экспрессии белков исследуемых каналов проводили в четыре этапа дифференцировки методом количественной полимеразной цепной реакции. Также определяли кинетику увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме в ответ на дей-

ствие АТФ в дифференцирующихся миотубулах и недифференцированных миобластах при помощи флуоресцентного кальциевого зонда Fluo-4.

Было показано, что количество мРНК всех трех типов рецепторов IP_3 , а также каналов TRPC1 и TRPV2 в процессе дифференцировки миобластов и формирования миотубул заметно возрастает по отношению к мРНК эндогенного контроля (β -актина). С повышением уровня экспрессии IP_3 -рецепторов, возможно, связано увеличение амплитуды кальциевого сигнала дифференцирующихся миотубул в ответ на АТФ по сравнению с реакцией миобластов, а увеличение экспрессии каналов TRPC1 и TRPV2, по-видимому, приводит к удлинению в миотубулах кальциевого сигнала, обусловленного током Ca^{2+} через плазматическую мембрану. Таким образом, повышение экспрессии указывает на возрастание участия исследуемых систем в развивающейся скелетной мускулатуре и подтверждает их физиологическую значимость в поперечнополосатой мускулатуре.

Работа поддержана РФФИ (проекты № 08-04-01466, SCOPES № IB 74AO-110940).

ГЕН *GST* ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ *Arabidopsis thaliana* КАК ФАКТОР УСТОЙЧИВОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

© 2010 г. Е. А. Попова, А. К. Гапоненко

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Известно, что глутатион является важным компонентом аскорбатно-глутатионового цикла и обеспечивает устойчивость растений к различным биотическим и абиотическим стрессам. Метаболизм как глутатиона, так и ряда сопря-

женных веществ регулируется множеством генов; наиболее перспективным в создании растений, толерантных к стрессам, является использование гена *gst*, кодирующего фермент глутатион-S-трансферазу (GST).

Экспрессия гена *gst* стимулируется в основном окислительным стрессом, являющимся неотъемлемой частью любого стрессового воздействия. Ген *gst* является одним из ключевых элементов цикла реакций глутатиона и, очевидно, запускает сигнальную систему защиты растительного организма. Антис-трессовые действия фермента GST в чем-то сходны со свойствами глутатион-пероксидазы и связаны с детоксикацией свободных радикалов органического происхождения, образующихся в результате стресса. Фермент GST также играет важную роль в защите клеточных мембран от перекисного окисления липидов и, как следствие, от воздействия активных форм кислорода. В ряде исследований установлено, что GST является потенциальным регулятором ультрафиолетозависимого апоптоза клетки; установлено также активность изоформ этого фермента при деактивации гербицидов.

Показано, что сверхэкспрессия гетерологичных генов, обуславливающая поддержание определенной концентрации продуктов аскорбатно-глутатионного цикла и соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона в трансгенных растениях, увеличивает их толерантность к окислительному стрессу. В настоящее время клонированы гены семейства *gst* многих модельных растений. Используемый в работе ген клонирован из *Arabidopsis thaliana* и принадлежит к межклассовой группе семейства генов *gst* (stress related protein). В настоящее время начата работа по получению трансгенных растений пшеницы с конститутивной и стрессоиндуцибельной экспрессией гена *gst*, а также по оценке устойчивости трансгенных растений к абиотическим стрессам: хлоридно-натриевому засолению и дефициту воды.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВЫКЛЮЧЕНИЯ СИНТЕЗА ДОФАМИНА В МОЗГУ У КРЫС В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ

© 2010 г. Ю. Ю. Сайфетярова

Лаборатория гормональных регуляций

Работа является продолжением предыдущих исследований эндокринных функций мозга в процессе нормального развития организма. В частности, она посвящена проверке гипотезы о том, что дофамин (ДА) в отсутствие гемато-энцефалического барьера в перинатальном периоде развития у крыс поступает из мозга в кровь и оказывает влияние на развитие периферических мишеней и самого мозга.

Учитывая, что ДА может синтезироваться и выделяться в общую систему циркуляции развивающегося организма не только из мозга, но и из периферических источников (орган Цукеркандля, предсердия, надпочечники) нам необходимо оценить вклад ДА, синтезирующегося именно в развивающемся мозгу, в его общее содержание в периферической крови. Примененная ранее с этой целью модель внутриутробной энцефалэктомии (удаление переднего мозга) плодов крыс, хотя и позволила нам предположить, что развивающийся мозг секретирует ДА в общую систему циркуляции, является мало-специфичной и высокотравматичной из-за разрушения большей части мозга с содержащимися в нем многочисленными популяциями специфических нейронов.

Для выключения синтеза именно ДА нам необходимо было разработать специфическую фармакологическую модель, которая позволила бы направленно заблокировать синтез ДА с максимальным эффектом в мозгу при минимальном изменении уровня ДА в периферических источниках. С этой целью в дальнейшем будет проводиться стереотаксическое внутрижелудочковое введение α -метил-*n*-тирозина (аМПТ) (ингибитора ключевого фермента синтеза ДА — тирозингидроксилазы). А пока мы предварительно провели серию экспериментов по внутрибрюшинному введению ингибитора для подбора дозы, которая не оказывала бы влияния на уровень ДА в мозгу и крови, в таком случае доза будет считаться эффективной. Показано, что через 20 ч после введения 3-суточным крысам аМПТ в дозах 350, 300, 200, 100 и 80 мкг происходит снижение концентрации ДА, измеренного с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, в мозгу и плазме крови, тогда как в концентрации 50 мкг этот препарат не вызывал достоверных изменений. Таким образом, подобрана доза, которая будет использоваться в последующих экспериментах для ингибирования синтеза ДА в мозгу крыс.

ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ КАНАЛОВ *Orai1* В КЛЕТКАХ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

© 2010 г. К. В. Сурков

Лаборатория общей физиологии

Классическим механизмом, вызывающим повышение уровня цитоплазматического кальция ($[Ca^{2+}]_{цит}$) в скелетных мышечных клетках, является деполяризация мембран Т-системы и последующее

высвобождение Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума через рианодинчувствительные каналы. Основные пути транспорта ионов кальция в электроневозбудимых клетках — это активация ре-

цепторов инозитолтрифосфата, выброс кальция из ретикулума, а также следующий за этим процесс восполнения запасов кальция за счет его входа из внеклеточной среды (депозависимый вход ионов кальция). В последние пять лет появились данные, свидетельствующие о наличии в скелетных мышечных клетках систем обмена ионов кальция, характерных для электроневоозбудимых клеток. Цель работы — исследовать такие альтернативные механизмы кальциевого обмена в мышечных клетках, а также выявить белки, участвующие в депозависимом входе кальция. С помощью метода ОТ-ПЦР мы показали наличие в скелетных миоцитах и миотубулах линии C2C12 канального белка Orai1, который обеспечивает вход ионов кальция в электроневоозбудимые клетки. Была исследована функциональная роль канала Orai1 в скелетных мышечных клетках. Поскольку его фармакологические ингибиторы отсутствуют, были подобраны и синтезированы последовательности коротких интерферирующих РНК (siRNA) для ингибирования синтеза белка Orai1 и найдены оптимальные условия трансфекции миоцитов и миотубул siRNA. В клетках с подавленным синтезом Orai1 исследовали динамику изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$ с помощью флуоресцентных каль-

циевых зондов. Депозависимый вход Ca^{2+} активировали при помощи тапсигаргина (блокатор Ca^{2+} — АТФазы ретикулума). В миотубулах, подвергнутых трансфекции siRNA против Orai1, амплитуда кальциевого ответа уменьшалась вдвое по сравнению с контрольными клетками. Известно, что АТФ вызывает подъем уровня Ca^{2+} в скелетных мышцах, а также является важным сигналом для слияния миоцитов. При действии АТФ кальциевый ответ у миотубул с пониженным синтезом Orai1 заметно меняется относительно контроля, причем происходит уменьшение второй фазы ответа, что можно объяснить участием белка Orai1 в процессе транспорта ионов кальция в цитоплазму из внешней среды. Таким образом, показано наличие в скелетных миоцитах и миотубулах линии C2C12 канального белка Orai1 и доказано его участие в депозависимом входе ионов кальция в клетки скелетной мускулатуры. Есть основания предполагать, что белок Orai1 является необходимым фактором для дифференцировки и слияния миоцитов в миотубулы и поддержания жизнедеятельности последних.

Работа поддержана РФФИ (проекты № 08-04-01466, SCOPEs № IB 74A0-110940).

БИОЛОГИЯ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ НЕРВНОЙ И МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМ МОРСКОЙ АРХИАННЕЛИДЫ *Dinophilus*

© 2010 г. Е. Г. Фофанова

Лаборатория сравнительной физиологии

Использование иммунохимических методов и лазерной конфокальной микроскопии позволило накопить значительный массив данных по развитию нервной системы и описать ее формирование на уровне одиночных идентифицированных нейронов у различных представителей Lophotrochozoa. АрхиаANNELИДЫ семейства Dinophilidae представляют особый интерес для сравнительно-морфологического изучения, так как взрослая особь фактически является неотенической трохофорой.

Dinophilus gyrotilatus с легкостью содержится в лабораторных условиях. Мы наблюдали за культурой в течение двух лет, а ежедневные наблюдения за отдельными особями, кладками и группами особей из одной кладки — в течение 6 мес. Подсчитывали число отложенных кладок и яиц в кладке. Полный жизненный цикл от зиготы до откладки первых коконов происходит за 11–12 сут. Период эмбрионального развития составляет 4–5 сут. В течение 1.5 сут ювенильные животные плавают, затем оседают, начинают ползать и активно питаться. При индивидуальном содержании первые кладки появляются на 6-е сут после вылупления и содержат одно-два яйца. В среднем каждая особь откладывает по кладке в сутки, при этом число яиц в кладке варьирует от 1 до 9, причем число больших (будущие самки) и ма-

леньких (карликовые самцы) яиц разное. При содержании особей в группах изменяется как число яиц в кладке, так и частота их откладывания, что говорит о наличии химической коммуникации между половозрелыми особями. Продолжительность жизни у них составляет 1.5–2 мес, за 1–2 нед до смерти особь перестает питаться, кишечник ее резко утоньшается, а сам червь в большинстве случаев становится крупнее нормальных размеров.

Мы использовали антитела против тубулина для выявления нейротубул нервных клеток и ресничек, серотонина и FMRF-амида для выявления тел и отростков нейронов, а также мечение фаллоидином мышечных структур у особей разных стадий жизненного цикла. Ресничные структуры оказались удобными для маркирования ранних стадий эмбрионального развития, мышечные — для маркирования поздних. Антитела к FMRF-амиду выявляют тела нейронов в церебральном ганглии, вентральную нервную цепочку, окологлоточное и каудальное кольцо. Антитела к серотонину маркируют около десятка тел нейронов в церебральном ганглии и единичные тела нейронов по ходу вентральной нервной цепочки. В строении мышечной системы выявляются кольцевая, продольная и диагональная мускулатуры, особо мощный глоточный бульбус и каудальная

мышца. Сегментация выражена только в распределении ресничных шнуров на поверхности тела и протонефридиев и не отмечается в строении нервной и мышечной систем. Перед смертью у особей наблюдается редукция ресничных и мышечных структур.

Описанные особенности биологии и морфологии *Dinophilus gyrociliatus* делают его удобным объектом для сравнительно-морфологических, экологических и фармакологических исследований.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ПРИ ДЕГЕНЕРАЦИИ НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЫ

© 2010 г. Г. Р. Хакимова

Лаборатория гормональных регуляций

Цель работы — изучение функциональной активности дофаминергических нейронов при моделировании различных стадий паркинсонизма у мышей.

Исследовали две модели паркинсонизма, получаемые путем двукратного (для бессимптомной модели) и четырехкратного (для ранней симптомной модели) подкожного введения 12 мг/кг 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) с двухчасовым интервалом 2-3-месячным самцам мышей линии C57BL/6. Контрольным мышам вводили 0.9%-ный NaCl. Через 2 нед из правой половины мозга выделяли компактную часть черной субстанции (ЧС) и стриатум. В них с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) определяли содержание дофамина (ДА) и его метаболитов: L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА), 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК). Левую половину мозга использовали для приготовления срезов мозга толщиной 300 мкм, содержащих компактную часть ЧС и стриатум. Полученные срезы перфузировали буфером Кребса-Рингера и собирали 10-минутные фракции для определения спонтанного и K⁺-стимулированного выделения. В собранных образцах с помощью ВЭЖХ-ЭД определяли содержание ДА.

Через 2 нед после введения МФТП в ткани ЧС уровни ДА, НА и ДОФУК оставались без изменений в обеих моделях. Содержание ГВК в бессимптомной модели увеличивалось по отношению к контролю, а в ранней симптомной — снижалось. Не обнаружили различий между контролем и опытом как при спонтанном выделении ДА из срезов ЧС, так и в ответ на стимуляцию.

В ткани стриатума наблюдалось снижение содержания ДА и его метаболитов в обеих моделях, причем в ранней симптомной это снижение было более выражено. В ответ на стимуляцию содержание ДА в перфузионной среде в бессимптомной модели было выше, чем в контроле, а в ранней симптомной — ниже.

В обеих исследуемых нами моделях паркинсонизма наблюдали изменения в функционировании ДА-ергических нейронов, направленные на компенсацию работы недостающих звеньев нигростриатной системы. В бессимптомной модели система в ответ на стимуляцию способна выполнить работу по обеспечению надлежащего уровня ДА во внеклеточной среде, а в ранней симптомной — не способна. Последнее, по-видимому, и обуславливает наличие симптомов болезни Паркинсона.

ВЛИЯНИЕ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *gly I Brassica juncea* И *gly II Oryza sativa* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ У ТРАНСГЕННОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2010 г. Н. Ю. Хозьбаба, А. К. Гапоненко

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Известно, что поддержание уровня глутатиона — природного антиоксиданта — является одним из механизмов, обеспечивающих устойчивость растений к различным абиотическим стрессам, в частности к засолению. Показано, что в трансгенных растениях сверхэкспрессия гетерологичных генов, поддерживающих уровень глутатиона, увеличивает толерантность растений к окислительному стрессу. Например, подобную устойчивость можно достигнуть сверхэкспрессией генов, кодирующих ферменты глиоксалазы I и II, которые катализируют реакции метаболизма глутатиона.

Глиоксалаза I и II составляют глиоксалазную систему. Глиоксалаза I превращает метилглиоксаль и восстановленный глутатион в лактоилглутатион, а глиоксалаза II гидролизует лактоилглутатион на глутатион и лактат (молочную кислоту).

Показано, что трансгенные растения табака *Nicotiana* со сверхэкспрессией гена *gly I*, выделенного из горчицы сарептской *Brassica juncea*, обладают значительной устойчивостью к высокой концентрации NaCl и маннитола в отличие от контрольных растений. Сравнение растений с высокой и низкой степенью экспрессии гена *gly I* показало, что толерантность к различным концентрациям солей коррели-

рует со степенью экспрессии этого гена. Эти результаты подтверждают важную роль *gly I* в устойчивости растений к стрессовым условиям.

Получение трансгенных растений пшеницы, экспрессирующих эти гены, базируется на способности клеток незрелых зародышей давать морфогенный каллус, который в дальнейшем используется для получения целого растения используемых сортов (генотипов) *in vitro*. Мы исследовали регенера-

ционный потенциал широкораспространенных сортов пшеницы. При равных условиях получены следующие частоты индукции морфогенного каллуса: сорт Ростовчанка 5 – 42.82, Дон 93 – 33.33, Донской янтарь – 0, Танаис – 12.84, Ермак – 11.25, Дон 107 – 0, Заря – 59, 58, Эстер – 30.03%.

Полученные данные свидетельствуют о возможности получения трансгенных растений пшеницы сортов Ростовчанка 5, Дон 93, Заря и Эстер.

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ТРАНСКРИПТОВ ГЕННОГО КОМПЛЕКСА *lawc/Trf2* У *Drosophila melanogaster*

© 2010 г. Р. О. Черезов

Лаборатория генетических основ морфогенеза

К настоящему моменту известно, что многие гены высших эукариот перекрываются. Большинство исследований таких генов проводится на основе крупномасштабных анализов баз данных, однако экспериментальных подтверждений влияния перекрытия генов на их функционирование очень мало. Чаще всего такие работы носят предположительный характер.

Ранее в нашей лаборатории был открыт ген *leg- arista-wing complex (lawc)* у *Drosophila melanogaster*. Мы показали, что его 5'-область пересекается со вторым экзоном гена, кодирующего гомолог фактора транскрипции человека *Tbp-related factor 2 (Trf2)* и участвующего в регуляции морфогенеза. Таким образом, систему этих генов удобно использовать в качестве модели для исследования особенностей работы перекрывающихся генов, контролирующих развитие.

Сначала мы охарактеризовали размер и количество транскриптов, принадлежащих каждому гену. Нозерн-блот-анализ мРНК взрослых *D. melanogaster* дикого типа показал, что перекрывающаяся зона двух генов входит в состав девяти транскриптов, два из которых принадлежат гену *lawc*, а остальные – *Trf2*. Таким образом, впервые установлена реальная картина экспрессии разнонаправленных транскриптов комплекса *lawc/Trf2*.

Для исследования взаимодействия прямых и обратных транскриптов мы получили конструкцию *3'-lawcRNAi (Ri)* для инактивации экспрессии всех

lawc-транскриптов. Далее были получены трансгенные по этой конструкции линии *D. melanogaster*, которых использовали в генетических экспериментах по активированию ее в дрожжевой двух-компонентной системе UAS/GAL4. Активация конструкции *Ri* привела к резкому снижению жизнеспособности самцов. Исследование фенотипа погибших эмбрионов показало наличие у них ряда аномалий, характерных для зародышей со сниженной экспрессией *Trf2*. Введение дополнительных конструкций, экспрессирующих *Trf2*, восстанавливало жизнеспособность мух, подтверждая тот факт, что эмбриональная гибель в трансгенных линиях является результатом снижения уровня экспрессии этого гена. Количественная ПЦР в реальном времени показала, что у мух, несущих активированную конструкцию *Ri*, экспрессия гена *lawc* увеличена в три раза, в то время как уровень экспрессии *Trf2* в четыре раза снижен. Очевидно, что такое поведение разнонаправленных перекрывающихся транскриптов не случайно и, возможно, осуществляется по механизму РНК-интерференции. Дальнейшие эксперименты будут направлены на выяснение роли этого процесса в регуляции работы комплекса *lawc/Trf2*. Для этого мы планируем серию генетических экспериментов по созданию компаундов различных аллелей *lawc/Trf2* с мутациями генов семейства *Argonaute*, кодирующих белки комплекса, которые регулируют РНК-интерференцию.

РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ

© 2010 г. И. С. Черноиваненко, А. А. Минин*

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

*Институт белка РАН

Многие функции митохондрий зависят от их способности генерировать и поддерживать на определенном уровне трансмембранный электрохимический потенциал. Благодаря трансмембранному потенциалу эти органеллы являются основным ис-

точником АТФ в клетке, регулятором концентрации Ca^{+2} в цитоплазме, а также влияют на развитие апоптоза. Трансмембранный потенциал митохондрий находится под контролем многих внешних и внутренних факторов, одним из которых является их

взаимодействие с цитоскелетом. Настоящая работа посвящена выяснению роли цитоскелета в регуляции потенциала митохондрий, который анализировали при помощи потенциалзависимого красителя. Оказалось, что стационарные митохондрии обладают более высоким мембранным потенциалом, чем подвижные, в тех же клетках. По полученным нами ранее данным, взаимодействие митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами (ПФ) ингибирует подвижность этих органелл и участвует в их расщеплении. Мы решили проверить, как взаимодействие митохондрий с ПФ влияет на трансмембранный потенциал митохондрий. Наши данные свидетельствуют о том, что восстановление ПФ в клетках, лишенных гена виментина, приводит к значительному увеличению потенциала митохондрий. Этот эффект обусловлен взаимодей-

ствием митохондрий с ПФ, а не снижением их подвижности, так как разрушение микротрубочек в клетках подавляет их движение, но не влияет на потенциал. Восстановление в клетках ПФ при помощи форм виментина с мутациями в N-концевой части молекулы, лишенных способности связываться с митохондриями, не влияло на их потенциал, что указывало на роль в этом процессе прямого взаимодействия виментина с митохондриями. Действительно, искусственный белок, состоящий из флуоресцентного белка Dendra2, сшитого с фрагментом виментина, который способен связываться с митохондриями, также увеличивал их потенциал при экспрессии в клетках. Таким образом, наши данные показывают, что виментиновые ПФ являются еще одним фактором, контролирующим трансмембранный потенциал митохондрий.

РОЛЬ УЧАСТКОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОМОСОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ

© 2010 г. А. Н. Шабарина

Лаборатория генетических основ морфогенеза

На стадии интерфазы хромосомы прикреплены к ядерной оболочке, что обуславливает высокоупорядоченную организацию хромосом в объеме ядра. Это в свою очередь играет важную роль в “правильном” функционировании генома, в том числе в процессе индивидуального развития организма. Данные последних лет свидетельствуют о том, что пространственная организация хромосом в ядре является еще одним элементом регуляции экспрессии генов. Важную роль в этом играет ассоциация (взаимодействие) интерфазных хромосом с ядерной оболочкой через специфические участки хромосомной ДНК (яДНК).

Изучали функциональные характеристики участков хромосомной ДНК, которые осуществляют

прикрепление хромосом к ядерной оболочке на стадии интерфазы. Созданы генетические конструкции, позволяющие исследовать влияние участков яДНК на экспрессию трансгена. Проведена серия экспериментов по Р-опосредованной трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* трансгенной конструкцией, в которой гены *yellow* и *white* фланкированы последовательностями яДНК. Получены данные, свидетельствующие о том, что яДНК, фланкирующие трансген, способствуют поддержанию высокого уровня его экспрессии независимо от места интеграции в “хозяйские” хромосомы. Также проанализирована регуляторная функция фрагмента яДНК с использованием метода рекомбинации *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА МИГРАЦИЮ ГРГ-НЕЙРОНОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС

© 2010 г. В.С. Шарова

Лаборатория гистогенеза

Гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ) необходим, в первую очередь, для обеспечения репродуктивных ритмов и функций. Этот декапептид синтезируется небольшой популяцией нейронов (800–2000), расположенных у большинства млекопитающих диффузно в септо-преоптической области гипоталамуса. У позвоночных большая часть ГРГ — нейронов образуется в пренатальный период вне мозга из эпителиальных обонятельных плакод и затем мигрирует в составе прорастающих к переднему мозгу обонятельных, терминальных и вомероназальных нервов. Наряду с репродуктивной функцией в по-

следнее десятилетие получены данные о влиянии ГРГ на становление и функционирование иммунной системы млекопитающих. В свою очередь медиаторы иммунной системы (цитокины, гормоны тимуса и др.) могут влиять на развитие нейронов, продуцирующих ГРГ, и становление их функциональной активности. Для индукции иммунной системы и синтеза в ней провоспалительных цитокинов в экспериментальных моделях был использован бактериальный эндотоксин грамотрицательных бактерий липополисахарид (ЛПС). Цель работы — изучение влияния ЛПС на миграцию нейронов,

продуцирующих ГРГ, в онтогенезе крыс. Исследования проводили на крысах Вистар с датированной беременностью, которым на 12-й день беременности внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозе 10000 ед/кг или 18 мг/кг. В качестве контроля самкам по той же схеме вводили 0.9%-ный раствор NaCl (500 мкл). Нейроны, содержащие ГРГ, выявляли у 17- и 19-дневных плодов крыс (Э17, Э19) при помощи иммуногистохимии и подсчитывали их количество в трех различных областях миграции: назальной, в области обонятельных луковиц и переднем мозгу. У животных контрольной группы основная часть ГРГ — нейронов располагалась в переднем мозгу, также они обнаруживались в назальной области и области обонятельных луковиц. После введения

ЛПС количество ГРГ-нейронов на Э17 в переднем мозгу снижалось на 50%, на Э19 — на 30%, в назальной области на Э17 и Э19 их количество увеличилось на 40%, а в области обонятельных луковиц на Э17 увеличилось на 20%, а на Э19 практически не менялось. Были зафиксированы достоверные различия между группами на стадиях Э17 и Э19. У животных опытной группы было отмечено одиночное расположение нейронов в переднем мозгу, в то время как в роstralных отделах ГРГ-нейроны располагались группами по три-четыре. Таким образом, ЛПС, введенный беременным самкам, подавляет миграцию ГРГ-нейронов в передний мозг у плодов на 17- и 19-й дни эмбрионального развития.

ЭКТОПИЧЕСКИЕ МИОГЕННЫЕ КЛЕТКИ В СОСТАВЕ СТРОМЫ ПЕЧЕНИ ЗАРОДЫШЕЙ КРЫСЫ

© 2010 г. О. Н. Шевелева, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина,
М. Н. Кожевникова, В. И. Старостин

Лаборатория гистогенеза

Одна из важнейших функций стромальных клеток зародышевой печени — создание микроокружения для кроветворных клеток. В связи с этим клеточный состав стромы печени варьирует в зависимости от стадии онтогенеза. Мы обнаружили, что первичная культура стромальных клеток печени зародышей крысы гетерогенна и среди различных по морфологии клеток в ней спонтанно формируются миосимпласты. Работа посвящена выяснению природы этих миосимпластов и их возможного происхождения. Методами иммуноцитохимического анализа мы показали, что миосимпласты экспрессируют основные маркеры скелетных мышц, такие как *MyoD*, м-кадгерин, десмин и миозин. С помощью иммуноцитохимического окрашивания доказано присутствие *MyoD* в первичной культуре печени 17-дневных зародышей крысы уже на 3-и сут культивирования. Динамика развития миогенных структур в печени *in vitro* в целом соответствует наблюдаемой нами в культурах клеток из скелетных мышц зародышей. Отмеченные небольшие различия в сроках формирования миотуб могут быть связаны с разной плотностью и скоростью роста клеток из зародышевой печени и из мышечных тканей зародыша. ПЦР-анализ не выявил в стромальных клетках печени мРНК *Rax7* — фактора транскрипции, характерного для миосателлитов. Это указывает на развитие мышечных структур в первичной культуре печени не из сателлитоподобных клеток, а из более поздних предшественников. Интересно, что формирование миотуб происходит только в первичной культуре клеток из зародышевой печени и не наблю-

дается при пассировании. Индукция миогенной дифференцировки на четвертом пассаже культуры клеток из зародышевой печени с помощью 5-азациитидина не дала положительных результатов. Исходя из этого представляется сомнительным происхождение наблюдаемых нами миосимпластов из мезенхимных стромальных клеток, присутствующих в зародышевой печени. Выдвинута гипотеза о происхождении миосимпластов в первичной культуре из миогенных предшественников, входящих в состав стромы зародышевой печени. Иммуноцитохимический анализ срезов нативного органа показал наличие экспрессии *MyoD* в зародышевой печени *in situ*. Кроме того, методом ПЦР-анализа удалось продемонстрировать, что *MyoD* экспрессируется не только в первичной культуре, но и в свежeweделенных клетках зародышевой печени.

Первые результаты сравнения спонтанного миогенеза в культуре клеток печени на разных сроках эмбриогенеза показали, что клетки печени 14- и 20-дневных зародышей (в отличие от 17-дневных) миотуб в культуре не формируют.

Дальнейшая работа будет направлена на подбор оптимальных условий для получения миогенной дифференцировки в культуре клеток зародышевой печени и на исследование печени зародышей разных сроков *in situ* на предмет обнаружения миогенных предшественников.

Работа поддержана РФФИ (проект № 09-04-00002).