

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(16–17 ДЕКАБРЯ 2010 г.)**

**ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ В ЦНС У МЫШЕЙ,
НОКАУТНЫХ ПО β_2 -МИКРОГЛОБУЛИНУ**

© 2011 г. М. Е. Богатырев

Лаборатория биохимии

В клетках млекопитающих иммунные протеасомы, внутриклеточные мультисубъединичные протеазные комплексы, образуют из белков антигенные эпитопы для представления их вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГ I) Т-лимфоцитам. Присутствие ГКГ I было установлено в клетках ЦНС, в том числе и в нейронах. В нейронах ГКГ I локализован постсинаптически и регулирует функцию синаптической структуры в ответ на изменение нейрональной активности. Изучение особенностей экспрессии иммунных протеасом в развитии ЦНС и при нарушенной экспрессии ГКГ I важно для понимания механизмов пластичности в ЦНС. Исследованы химотрипсин-подобная активность (ХПА), общий уровень протеасом и содержание субъединиц LMP2($\beta 1i$) и LMP7($\beta 5i$) иммунных протеасом в различных отделах ЦНС мышей, нокаутных по β_2 -микроглобулину ГКГ I ($\beta 2m$): фронтальной коре (коре), стриатуме, медиобазальном гипоталамусе, мозжечке и стволе мозга. При анализе содержания иммунных протеасом в ЦНС мышей оказалось, что количество иммунных субъединиц LMP7($\beta 5i$) в коре увеличивается, а в стриатуме уменьшается у нокаутных $\beta 2m$ животных. В стриатуме нокаутных $\beta 2m$ мышей снижен уровень конститутивных субъединиц $\beta 1$ и $\beta 5$

протеасом. Обнаружено снижение содержания регуляторной субъединицы PA28 α и тотального пула протеасом в стриатуме, стволе мозга и увеличение регуляторной субъединицы PA28 α в коре нокаутных $\beta 2m$ мышей. ХПА снижена в стриатуме и стволе нокаутных $\beta 2m$ мышей. В коре, мозжечке и стволе мозга нокаутных $\beta 2m$ мышей снижена экспрессия NeuN (нейронального ядерного белка). В каудальных отделах мозга снижена, а в коре отмечено достоверное увеличение экспрессии gFAP (глиального фибриллярного кислого белка). Таким образом, изменения в пуле протеасом и снижение экспрессии NeuN и gFAP отражают особенности ЦНС у нокаутных $\beta 2m$ мышей. Были выявлены возможные регуляторные пути изменения содержания иммунных протеасом. Показано, что количество белка теплового шока 70 – активатора экспрессии иммунных протеасом, и количество *n*NO-синтазы, запускающей этот сигнальный путь, увеличивается в коре и снижается в стволе мозга нокаутных животных. Изменение содержания иммунных протеасом в исследованных структурах ЦНС у нокаутных $\beta 2m$ мышей связано с процессами нейрогенеза и дифференцировки в этих структурах.

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

**МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ПРОТЕАСОМ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ**

© 2011 г. Ю. В. Богомягкова

Лаборатория биохимии

Протеасомы, мультисубъединичные протеазные комплексы, регулируют клеточные процессы путем устранения белков или образования пептидов, в этих процессах участвующих, в нужный для клетки момент времени. У млекопитающих протеасомы представлены наибольшим разнообра-

зием форм по сравнению с другими эукариотами. Только у млекопитающих обнаружены иммунные протеасомы, которые получили свое название из-за участия в Т-клеточных иммунных реакциях – первой открытой для них функции. Иммунные протеасомы отличаются от конститутивных набо-

ром протеолитически активных субъединиц. В процессе гидролиза чужеродных белков иммунными протеасомами образуется в несколько раз больше антигенных эпитопов, способных встраиваться в щель Бюркмана молекул главного комплекса гистосовместимости класса I для последующего их представления Т-лимфоцитам. Кроме того, иммунные протеасомы участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации некоторых клеточных популяций и представляют собой необходимое звено сигнального пути, гасящего окислительный стресс в эндотелиальных клетках. Как иммунные, так и конститутивные протеасомы входят в состав пулов 26S- и 20S-протеасом. Признаком 26S-протеасом является наличие в их составе одной или двух 19S-субчастиц-активаторов, осуществляющих связывание с убиквитинированными белками-мишенями, их расплетание и проталкивание в протеолитическую камеру АТФ-зависимым образом. 20S-протеасомы гидролизуют белки, поврежденные окислительным

стрессом, и некоторые вирусные белки независимо от убиквитина и АТФ.

Все клеточные популяции характеризуются строго определенным соотношением множественных форм протеасом. Так, например, клетки лимфоидных органов обогащены иммунными протеасомами, в то время как клетки головного мозга — конститутивными протеасомами. Очевидно, что изменение соотношения множественных форм протеасом может привести к патологическим состояниям. Поэтому изучение пула протеасом при различных заболеваниях важно как для понимания причин возникновения этих заболеваний, так и для поиска новых лекарств. Недавно в лаборатории получены первые данные об изменениях в пуле протеасом в развитии папиллярной карциномы щитовидной железы человека. Перспективы связаны с выявлением мишени среди множественных форм протеасом этой опухоли для разработки новой противоопухолевой терапии.

Работа поддержана РФФИ (грант № 09-04-00077а) и ФЦП (госконтракт № 02.512.12.2047).

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЯДА РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ И МАРКЕРОВ НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В КЛЕТКАХ СЕТЧАТКИ И ПЕРЕДНЕГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В РАЗВИТИИ И КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

© 2011 г. Б. И. Вердиев

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

Источником всех типов нейральных клеток центральной нервной системы позвоночных животных являются нейральные стволовые клетки (НСК). НСК и прогениторные клетки можно выделять из эмбрионального и взрослого мозга и сетчатки, размножать в культуре ткани, и они способны спонтанно дифференцироваться во все три типа нейральных клеток.

Важную роль в регуляции пластичности НСК в ходе эмбрионального развития играют гены, кодирующие специфические транскрипционные факторы. Мы сконцентрировались на генах *PAX6*, *PROX1*, *OCT4* и *NANOG*. Считается, что *PAX6* в неокортексе и сетчатке является маркером НСК. К таким маркерам может быть отнесен и *PROX1*, который экспрессируется в субпопуляции прогениторов сетчатки и мозга. Поскольку имеются данные об экспрессии генов плюрипотентного статуса *OCT4* и *NANOG* в стволовых клетках ряда опухолей мозга и сетчатки, было важно определить их участие в поддержании пластичности НСК в ходе развития.

Впервые показано, что экспрессия *PAX6* в исследованный период нейрогенеза (на 8–12 и 18–20 нед. развития) находится на постоянном уровне как в неокортексе, так и сетчатке глаза. Уровень экспрессии *PAX6* в сетчатке значительно выше, чем в неокортексе. В клеточных культурах неокортекса мозга и сетчатки глаза при стандартных условиях культивирования уровень экспрессии *PAX6* такой же, как в нативных тканях.

Впервые обнаружена экспрессия *PROX1* в неокортексе мозга плода человека. В клеточной культуре сетчатки глаза экспрессия этого гена сохраняется, а в культуре неокортекса мозга отсутствует.

Впервые проведено сравнение характера экспрессии *OCT4* и *NANOG* в неокортексе мозга и в сетчатке глаза в ходе нейрогенеза на 8–12 и 18–20 нед. развития. В культуре клетки сетчатки сохраняют сходство с нативной тканью по экспрессии *OCT4* и *NANOG*, в то время как клетки неокортекса его теряют.

РОЛЬ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ В ФОРМИРОВАНИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

© 2011 г. К. Ю. Гнедева

Лаборатория проблем пролиферации

Первичная ресничка – органелла, присутствующая на поверхности большинства клеток тела. Нокаут реснички приводит к драматическим дефектам развития, включая ингибирование морфогенеза волосяных фолликулов на ранних стадиях.

IFT20 – транспортный белок, необходимый для сборки первичной реснички. Мы получили трансгенных мышей генотипа IFT20^{flox}:Wnt1-Cre для изучения роли первичной реснички в судьбе клеток нервного гребня (НГ). Известно, что по крайней мере часть клеток дермальной папиллы (ДП) волосяных фолликулов головы и вибрисс происходят из мигрирующих клеток НГ. Мы показали, что отсутствие реснички в клетках ДП не останавливает морфогенез вибрисс на ранних стадиях. Более того, мы наблюдали увеличение числа вибрисс, а также нарушения в паттерне их распределения и морфологии. Мы показали, что ассоциированный с первичной ресничкой Shh митогенный сигнальный путь активирован у животных с нокаутом по гену IFT20. Мы предпола-

гаем, что увеличение числа вибрисс может быть вызвано усилением пролиферации в клетках дермы. Мы предположили, что аномальный паттерн расположения вибрисс может быть связан с дефектами адгезии в клетках НГ, не имеющих первичной реснички. Мы обнаружили, что Shh повышает экспрессию Noggin, который играет роль в конденсации ДП и индукции анагена.

Мы также разработали модель для изучения роли клеток НГ в морфогенезе волосяного фолликула не только у мыши, но и у человека. Используя протокол, разработанный в нашей лаборатории, мы дифференцировали эмбриональные стволовые клетки человека в клетки НГ, а затем в ДП-подобные клетки *in vitro*. Мы показали, что последние экспрессируют маркеры, характерные для клеток ДП взрослого человека. Более того, мы показали, что меченые GFP ДП-подобные клетки, полученные из ЭСК, индуцируют *de novo* рост волосяных фолликулов, будучи пересаженными под кожу иммунодефицитным мышам NUDE.

ГЕНЫ РАННЕГО РАЗВИТИЯ В ХИМИЧЕСКОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ

© 2011 г. Л. С. Зиневич

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Показано, что уровень экспрессии транскрипционных факторов Klf6 и Ets2, которые являются одними из регуляторов активности гена *p21*, повышен в тканях гепатоцеллюлярной карциномы мыши. Целью настоящей работы было исследование роли Klf6 и Ets2 в регуляции экспрессии *p21* на самых ранних этапах повреждения печени мыши канцерогеном диэтилнитрозамином (DEN), а также при развитии гепатоцеллюлярной карциномы.

Через 4 ч после внутрибрюшинной инъекции взрослой мыши (3–4 мес.) DENA в дозе 100 мг/кг уровень экспрессии Klf6 повышался в 5 раз по сравнению с контролем (нормальной печенью и печенью мыши после инъекции физиологического раствора), уровень экспрессии *p21* тоже возрастал, но в значительно большей степени – в 90 раз. В то время как уровень экспрессии Ets2 не отличался от контроля. Динамика изменения экспрессии Klf6 и *p21* после

введения DENA также была сходной – она значительно снижалась к 18-ти часам после воздействия, достигая контрольного уровня (18 ч после инъекции физиологического раствора), а уровень экспрессии Ets2 не изменялся. Таким образом, можно сделать заключение, что Klf6 может являться одним из основных регуляторов экспрессии *p21* в печени мыши при воздействии химического канцерогена DENA.

Полученные ранее с помощью микроаррей-анализа результаты об экспрессии транскрипционных факторов Klf6 и Ets2 были подтверждены методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Показано повышение уровня экспрессии Klf6 и Ets2 в опухлевой ткани печени мыши по сравнению с нормальной тканью печени, а также по сравнению с тканью, окружающей опухоль.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-01559.

БАЛАНС СЕРОТОНИНА ВНУТРИ И СНАРУЖИ КЛЕТКИ: НОВЫЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОЛЛЮСКОВ?

© 2011 г. Е. Г. Ивашкин, М. Ю. Хабарова, Е. Е. Воронежская

Лаборатория сравнительной физиологии

Несмотря на обилие фактов о важной роли серотонина (5-НТ) в регуляции раннего развития животных, механизмы его действия до сих пор остаются спорными. Наиболее полно изучена ранняя серотониновая система позвоночных животных. Однако отсутствие эффективных моделей делает крайне затруднительной систематизацию существующих данных. Большинство исследований на беспозвоночных животных сводятся к феноменологическим описаниям. Целью нашей работы было комплексное исследование механизмов действия 5-НТ на модели раннего развития моллюсков.

Ранее мы показали, что инкубация в предшественнике 5-НТ (5-гидрокситриптофан) зародышей большого прудовика *Lymnaea stagnalis* на начальных стадиях дробления приводит к экзогастрюляции (ЭГ) на 3-й день развития. Мы использовали этот эффект как модельную систему для изучения функциональных взаимосвязей между различными компонентами ранней серотониновой системы. Фармакологический анализ показал, что к ЭГ приводит только одновременное повышение уровня 5-НТ снаружи и внутри клетки. Раздельное повышение вне- или внутриклеточного уровня 5-НТ не вызывает такого эф-

фекта. Ингибиторы серотонинового транспортера (SERT) снижают процент ЭГ в предшественнике 5-НТ, уменьшают выделение зародышами 5-НТ в среду и повышают внутриклеточную концентрацию 5-НТ. Процесс ЭГ задействует 5-НТ-рецептор смешанного типа, который экспрессирован начиная с самых ранних стадий развития. По фармакологическому профилю этот рецептор близок к 5-НТ₂-рецепторам позвоночных, но действует через активацию аденилатциклазы. Дальнейший анализ показал, что возможным механизмом, приводящим к ЭГ, является серотонилирование — ковалентная модификация белков 5-НТ с помощью трансглутаминаз.

Таким образом, нами было показано, что баланс 5-НТ внутри и снаружи клетки является новым, не описанным ранее механизмом регуляции раннего развития. Продемонстрирована принципиальная возможность SERT-зависимого выброса 5-НТ без фармакологического воздействия. Впервые показано серотонилирование у беспозвоночных животных и в раннем развитии.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-01326 и 10-04-10134.

ПРОТЕАСОМНЫЕ МЕХАНИЗМЫ В РАЗВИТИИ ПЕЧЕНИ И ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

© 2011 г. Я. Д. Карпова

Лаборатория биохимии

Печень является уникальным органом в иммунологическом аспекте. С одной стороны, при инфицировании вирусами в печени развивается защитная иммунная реакция, с другой стороны, в ответ на индукцию антигеном, поступающим через портальную вену печени, как правило, развивается иммунологическая толерантность. Механизмы поддержания равновесия между этими процессами могут быть связаны с особенностями функционирования иммунных протеасом, играющих важную роль в Т-клеточном иммунном ответе. Цель данной работы — выявить особенности экспрессии иммунных протеасом в раннем онтогенезе печени в процессе становления иммунной системы и в развитии донор-специфической толерантности (ДСТ) у взрослых крыс при трансплантации неонатальных тканей яичника под капсулу почки. Кроме того, исследовано измене-

ние активностей и уровня тотального пула протеасом в этих процессах. Обнаружено, что экспрессия иммунных протеасом, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, увеличивается в печени в раннем онтогенезе вплоть до середины третьей постнатальной недели — времени формирования вторичных лимфоидных органов. Эти изменения сопровождаются возрастанием каспазаподобной (КП) и химотрипсинподобной (ХТП) активностей на фоне постоянного уровня тотального пула протеасом. КП-активность, но не ХТП-активность, возрастает также в печени крыс с индукцией ДСТ в сравнении с контрольными группами животных. Кроме того, для печени крыс с индукцией ДСТ характерно увеличение количества клеток, обогащенных LMP2, и уменьшение количества клеток, обогащенных LMP7. Различия в экспрессии иммунных протеасом выявлены так-

же для клеток трансплантатов яичника у разных групп животных. Иммунные протеасомы, содержащие LMP7, преобладают в отторгающихся трансплантатах, в прижившихся трансплантатах их количество снижено. По-видимому, увеличение их содержания связано с активным участием этого типа иммунных протеасом в представлении антигена и развитии полноценной иммунной реакции на чужеродную ткань. Иммунные протеасомы, содержащие LMP2, напротив, преоблада-

ют в приживающихся трансплантатах. Можно полагать, что этот тип иммунных протеасом важен для успешного приживления ткани. Таким образом, соотношение между различными типами иммунных протеасом является одним из ключевых факторов, которые определяют развитие иммунных реакций или иммунологической толерантности.

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

СТАНОВЛЕНИЕ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ СЕЛЕКЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ ТИМУСЕ

© 2011 г. Е. В. Маслова

Лаборатория гистогенеза

В тимусе в ходе дифференцировки Т-лимфоциты подвергаются процессам положительной и отрицательной селекции. Лимфоциты, не прошедшие селекцию, элиминируются из тимуса апоптозом, обеспечивая тем самым нормальное функционирование иммунной системы. При отрицательной селекции удаляются Т-лимфоциты, распознающие аутоантигены, генерация которых осуществляется в антигенпредставляющих клетках тимуса иммунными протеасомами. Ранее с помощью Вестерн-блоттинга было показано, что иммунные протеасомы экспрессируются в тимусе уже в раннем онтогенезе. Целью настоящей работы явилось выявление типов клеток, экспрессирующих иммунные протеасомы, и выявление зон локализации процесса отрицательной селекции в тимусе в перинатальном периоде развития крыс. Распределение иммунных протеасом в клетках тимуса анализировали с помощью иммуногистохимии и проточной цитометрии у крыс Wistar с 21-го эмбрионального дня по 30-й постнатальный день. В качестве маркеров дендритных клеток использовали антитела к OX-62, эпителиальных клеток – антитела к кератинам 18 и 19, макрофагов и нейтрофилов – антитела к CD68. С

помощью двойного иммунофлуоресцентного мечения было показано, что большинство дендритных и эпителиальных клеток в кортикальной и медуллярной зонах тимуса экспрессируют иммунные протеасомы на протяжении всего изученного периода развития. Дендритные клетки, представляющие собой гетерогенную популяцию, отличаются по уровню экспрессии иммунных протеасом, что может быть связано с их различной функцией в тимусе. Иммунные протеасомы были обнаружены также в макрофагах, функция которых в селекции сводится, в основном, к фагоцитированию тимоцитов, ушедших в апоптоз. Различий в распределении субъединиц LMP7 и LMP2 не выявлено на всех анализируемых этапах онтогенеза. Таким образом, становление процесса отрицательной селекции в тимусе крыс, зависимое от активности иммунных протеасом, может происходить уже в пренатальном онтогенезе. Экспрессия иммунных протеасом в антигенпредставляющих эпителиальных и дендритных клетках кортикальной и медуллярной зон свидетельствует о возможности отрицательной селекции не только в медуллярной зоне, как это считалось ранее, но и в обеих зонах тимуса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *in vitro*

© 2011 г. И. А. Мучкаева, Э. Б. Дашинимаяев, А. В. Васильев

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки представляют собой уникальный материал ввиду способности к генерации всех клеточных типов трех зародышевых листков. Эти свойства делают их перспективным объектом для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. Получение эффективных и безопасных для клинического применения методов репрограммирования соматических клеток явля-

ется одной из самых актуальных проблем современных клеточных технологий.

Целью нашего исследования является оптимизация существующих методик репрограммирования дифференцированных клеток в культуре, а в перспективе также разработка новых подходов.

На первом этапе работы нами был проведен ряд экспериментов с целью исследования усло-

вий репрограммирования, которые включали в себя введение ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности, а также использование малых молекул, увеличивающих эффективность репрограммирования. В работе использованы иммортализованные клеточные линии: 3T3NIH (эмбриональные фибробласты мыши), 1608-hT (фибробласты кожи человека), HaCaT (кератиноциты кожи человека).

Было показано, что под действием деметилирующих агентов в культуре кератиноцитов повышается экспрессия нейральных маркеров – нестина и бета-3-тубулина, в то время как экспрессия маркеров базальных кератиноцитов сохраняется. Также было показано, что обработка вальпроевой кислотой и 5-азациитидином спо-

собствует возрастанию пролиферативной активности клеток.

При помощи лентивирусных конструкций pLVT-Oct4 и pLVT-Sox2, нами были получены клеточные культуры 3T3NIH-OS, 1608-hT-OS, HaCaT-OS отличающихся по морфологии и экспрессии маркеров плюрипотентности от исходных клеток. В данных культурах мы наблюдали появление колоний с фенотипом эмбриональных стволовых клеток.

Полученные результаты позволяют предположить, что на основе предложенного нами подхода к репрограммированию соматических клеток возможно дальнейшее усовершенствование используемых экспериментальных методик.

ПРОБЛЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ

© 2011 г. Е. П. Мягкова

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Дермальная папилла (ДП) – мезенхимный компонент волосяного фолликула, управляющий его формированием и циклом регенерации. Индуцирующие свойства клеток ДП снижаются при пассировании. Продление времени культивирования возможно разными способами, в частности путем использования различных сред для культивирования, добавления факторов роста в среду и изменения условий культивирования. Используемыми базовыми средами были DMEM с добавлением 10% FBS и Amniotax C-100. В качестве условий культивирования были выбраны стандартная общеиспользуемая монослойная культура и культура 3D в висячей капле.

Было показано, что обе базовых среды рационально использовать до 3 пассажа культивирования. С четвертого пассажа индуцирующие способности клеток значительно снижаются. Если культивировать клетки в висячей капле, происходит частичное восстановление индуцирующих способностей клеток ДП, выражающееся в восстановлении интенсивности окраски на щелочную фосфатазу. Однако при высаживании полу-

ченных сфероидов обратно на пластик эта особенность снова теряется.

В монослойной культуре добавление белков BMP6 и FGF, а также витамина D3 позволяло увеличить число пассажей при сохранении индуцирующих свойств культуры. Однако при добавлении данных факторов в суспензию клеток в висячей капле сфероиды формировались в течение большего времени, чем в контроле. Похожие результаты были получены для среды, кондиционированной кератиноцитами. Данная среда позволяла поддерживать индуцирующие свойства 2D культуры на более высоком уровне до 5 пассажа, однако при использовании ее в 3D культивировании формирование полноценных сфероидов не происходило.

Сферические 3D культуры плохо изучены для клеток ДП, хотя эта культура по своим характеристикам ближе к *in vivo*, чем монослойная. Различия в восприимчивости и ответе клеток на различные факторы в условиях 2D и 3D нуждаются в объяснении, поскольку это поможет раскрыть некоторые аспекты метаболизма клеток ДП и решить проблемы, связанные с их культивированием.

ЭКСПРЕССИЯ КОМПОНЕНТОВ СЕРОТОНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *Xenopus laevis*

© 2011 г. Д. А. Никишин

Лаборатория проблем регенерации, группа эмбриофизиологии

Серотонергическая система взрослых организмов включает в себя ферменты синтеза, семь типов рецепторов, системы везикулярного транспорта, обратного захвата и деградации серотонина. Само это вещество является классическим

нейротрансмиттером, нейромодулятором и локальным гормоном, но также участвует в регуляции многообразных процессов эмбрионального развития (оогенез, деления дробления, установление лево-правой асимметрии тела, различные

морфогенетические процессы), что продемонстрировано на различных объектах, в том числе морских беспозвоночных, амфибиях и млекопитающих. Однако на данный момент молекулярно-генетические исследования элементов серотонергической системы на ранних стадиях онтогенеза чрезвычайно малочисленны и неполны. Данная работа является первой частью систематического исследования трансмиттерных систем в эмбриогенезе шпорцевой лягушки.

Методом ОТ-ПЦР была исследована экспрессия известных рецепторов и транспортеров серотонина в эмбриогенезе *Xenopus laevis*. Экспрессия рецепторов серотонина HTR1A, HTR2B и HTR3A выявляется только после стадии нейрулы. HTR2C и HTR7 экспрессируются на всех стадиях эмбриогенеза, включая его ранние стадии. На всех стадиях эмбриогенеза слабо экспрессируется предполагаемый транспортер серотонина SERT. Везикулярный транспортер моноаминов VMAT1 выявляется после нейруляции, а VMAT2 экспрес-

сируется на всех стадиях развития, причем уровень экспрессии на догастрюляционных стадиях гораздо выше, чем на постгастрюляционных. Таким образом, получены свидетельства того, что на донервных стадиях развития экспрессируются рецепторы серотонина, сопряженные как с диацилглицерин-инозитолтрифосфатной (HTR2C), так и аденилатциклазной (HTR7) системами вторичных мессенджеров. Кроме того, на ранних стадиях развития экспрессируются VMAT2 и SERT, осуществляющие везикулярный транспорт и обратный захват серотонина. Зиготический геном у *Xenopus* включается лишь на стадии средней бластулы, следовательно, эти гены входят в состав материнской мРНК, что говорит об их функционировании на ранних стадиях развития. Таким образом, с учетом присутствия самого серотонина, можно констатировать наличие в ранних эмбрионах *X. laevis*, по крайней мере, части основных функциональных компонентов серотонергической системы.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТОДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *in vitro*

© 2011 г. О. С. Петракова*, Е. Н. Черниогло, А. В. Васильев*

*Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Актуальной проблемой современной клеточной биологии является изучение пластичности клеток, возможности трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка и разработка методов направленной клеточной дифференцировки в условиях *in vitro*.

Целью данной работы является характеристика постнатальных культур клеток слюнной железы мыши в сравнении с постнатальными прогениторными клетками печени в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Работа проводилась на самцах мышей линии ROSA26-LacZ 2–5-месячного возраста. Эпителиальные протоковые клетки подчелюстной слюнной железы и печеночные клетки-предшественники были выделены по оптимизированной методике и затем культивировались до 10 и 5 пассажей соответственно. Оценка культур проводилась в 2d (на пластике) и 3d (в коллагеновом геле) условиях на 1–2 пассажах. Было оценено время удвоения клеточной популяции, морфологические и иммуноцитохимические характеристики (наличие CD49f, цитокератинов 7, 14, 18, 19, ядерных белков HNF4-альфа, HNF3-бета, альбумина, альфафетопротеина, цитохромов P450), реакция клеток на воздействие деметилирующих агентов (5-азациитидина и вальпроевой кислоты). Также проводилась сравнительная оценка клеточных культур в 2d условиях на 5 пассаже.

Результаты. Выделенные клетки слюнной железы и печени проявляли иммунофенотипические свойства эпителиальных клеток эндодермального происхождения, обладали высокой пролиферативной активностью, способностью к спонтанной дифференцировке в крупные многоядерные клетки. В 3d условиях способность к дифференцировке увеличивалась. При воздействии деметилирующих агентов изменение профиля экспрессии клеток было различным: в клетках слюнной железы увеличивалась экспрессия ряда гепатоцитарных маркеров (альфафетопротеина, цитохрома P450, альбумина), в клетках-предшественниках печени повышалась экспрессия цитохрома P450, уровень экспрессии других маркеров не изменялся. К 5 пассажу происходила некоторая дедифференцировка клеток с частичной потерей экспрессии ряда цитокератинов (7, 18) и уменьшением способности к дифференцировке в крупные многоядерные клетки.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о значительном сходстве протоковых клеток слюнной железы мыши и печеночных клеток-предшественников. Данные клетки, по всей видимости, являются родственными по своему гистогенетическому происхождению и имеют общего энтодермального предшественника.

НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ МОРФОГЕНЕЗ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ У URODELA

© 2011 г. Е. А. Радугина

Лаборатория проблем регенерации

Взрослые тритоны *Pleurodeles waltl*, как и другие хвостатые амфибии, обладают уникальными регенерационными способностями, в частности, полностью восстанавливают хвост после ампутации. Молекулярные механизмы морфогенеза при регенерации имеют отличия от работающих в эмбриональном развитии и требуют собственных подходов для изучения. В процессе экспериментов по регенерации на борту российских спутников Фотон М2, М3 (2005, 2007 гг.) выяснилось, что у тритонов, содержащихся на субстрате, в отличие от животных в глубокой воде в аквариуме или на орбите в условиях невесомости, происходит изменение формы регенерирующего хвоста, а именно его изгиб в дорсовентральной плоскости. Оказалось, что этот феномен воспроизводим в лаборатории и имеет необратимый характер. Морфометрическими методами с помощью программ компьютера было показано статистически достоверное изменение формы хвоста при содержании на подложке, регистрирующееся с 21-го дня регенерации (III ст. по Iten, Bryant, 1976). Были показаны отличия в гистологическом строении таких регенератов в сравнении с контролем, обуславливающие изменение формы хвоста, а именно изгиб осевых структур (хорды и эпендимной трубки) и направленная конденсация клеток дорсальной бластемы. Более того, на стадиях, предшествующих внешнему проявлению обсуждаемого эффекта, гистологическими

методами была выявлена большая пролиферативная активность клеток эпидермиса на дорсальной стороне. Предварительные данные иммуногистохимии с использованием специфических маркеров пролиферации свидетельствуют о том, что уже на ранних стадиях регенерации в опыте наблюдается иной паттерн пролиферации, нежели в контроле, что, по-видимому, и обеспечивает изменение формы хвоста. Сигнальные пути, опосредующие влияние гравитации и субстрата на проявление морфогенетического эффекта у животных при содержании их на подложке, представляются чрезвычайно интересными для изучения. Предполагается, что они задействуют как ключевые морфогенетические *Shh*, *BMP* и *FGF* пути, так и эпигенетические регуляторы генной экспрессии. В качестве дополнительных кандидатов на роль посредников между воздействием условий регенерации и его эффектом рассматриваются белки теплового шока. В последнее время открываются новые аспекты их функционирования, а именно: регуляция соотношения апоптоза и пролиферации, участие в морфогенезе в раннем развитии. Это позволяет предполагать важную потенциальную роль белков теплового шока и в эпиморфной регенерации. Дальнейшие исследования с использованием разрабатываемой нами новой модели позволят внести вклад в понимание эпигенетических механизмов морфогенеза при регенерации органов и тканей.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЭНДОКРИННОЙ ФУНКЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗГА У КРЫС В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

© 2011 г. Ю. Ю. Сайфетярова, А. Я. Сапронова, М. В. Угрюмов

Лаборатория гормональных регуляций

Работа посвящена проверке нашей гипотезы о том, что дофамин (ДА) в отсутствие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в перинатальном периоде развития у крыс поступает из мозга в кровь и оказывает влияние на развитие периферических мишеней и самого мозга.

Учитывая, что ДА синтезируется, и возможно, выделяется в общую систему циркуляции не только из мозга, но и из периферических органов (орган Цукеркандля, почки, надпочечники и др.) нам необходимо оценить вклад ДА, синтезирующегося именно в развивающемся мозгу, в его общее содержание в периферической крови.

С этой целью нами впервые была разработана специфическая фармакологическая модель максимального ингибирования синтеза ДА в мозгу при сохранении его уровня в периферических источниках с помощью α -метил-п-тирозина (α МПТ) – ингибитора ключевого фермента синтеза ДА – тирозингидроксилазы. В предварительных экспериментах по системному введению α МПТ (200, 100, 80 и 50 мкг) нами была выбрана доза 50 мкг, которая позволила исключить влияние ингибитора на метаболизм ДА в периферических органах. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института биологии развития РАН, находящимся

ся в соответствии с национальными и международными законами и правилами. В последующих экспериментах 3-дневным крысам в латеральные желудочки мозга стереотаксически вводили 50 мкг α МПП, после чего уровень катехоламинов оценивали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией в мозгу, органе Цуккеркандля, надпочечниках, почках и плазме.

Показано, что через 4 часа после введения α МПП в дозе 50 мкг происходит снижение уровня ДА в мозгу на 54% и в плазме на 74% при неизменном его уровне в периферических органах. Кроме того, происходит достоверное снижение концен-

трации норадреналина и дигидроксифенилуксусной кислоты в мозгу и плазме у животных, в то время как в органе Цуккеркандля, почках и надпочечниках их концентрация не меняется.

Таким образом, разработанная нами модель позволила получить прямые доказательства поступления дофамина из мозга в общую систему циркуляции до формирования ГЭБ. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу о том, что в данном постнатальном периоде мозг функционирует как эндокринный орган, внося существенный вклад в поддержание высокой концентрации физиологически активных веществ в крови.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТОВ

© 2011 г. К. К. Сухинич

Лаборатория экспериментальной нейробиологии

Одной из важнейших задач современной нейробиологии является коррекция патологических состояний мозга. Это связано с тяжелыми последствиями при заболеваниях и травмах головного и спинного мозга. Одним из перспективных подходов является нейротрансплантация эмбриональной нервной ткани. Однако до сих пор не ясно, какой материал (клеточные суспензии, полученные путем диссоциации тканей эмбрионального мозга, или фрагменты эмбриональной нервной ткани) предпочтительнее использовать для нейротрансплантации. Целью данного исследования было проведение сравнительного анализа приживления и развития клеточных и тканевых аллотрансплантатов эмбриональной нервной ткани мозга мышей 14-дневного развития, в клетках которых синтезируется белок GFP.

Методика проведения эксперимента была следующей. Фрагмент либо клеточную суспензию неокортекса эмбриона мыши 14-дневного развития трансплантировали в стриатум взрослого животного. Животных фиксировали через 7 и 30 сут после трансплантации. Мозг извлекали и резали на микротоме с замораживающим столиком. Затем проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов антителами против GFAP, NeuN, PCNA, Tyrosine Hydroxylase (TH).

Через 7 и 30 сут после трансплантации по флуоресценции GFP у экспериментальных животных удалось обнаружить трансплантаты. Тканевые трансплантаты, как правило, имели четкие границы и к 30-м суткам значительно увеличивались в размерах, тогда как клеточные трансплантаты не имели четких границ и изменение их размеров было менее выражено. Миграция клеток трансплантата происходила в обоих случаях.

Наиболее обширная миграция клеток была обнаружена вдоль нервных волокон мозолистого тела. Кроме того, было обнаружено, что отростки клеток тканевых трансплантатов прорастали в контралатеральное полушарие вдоль волокон мозолистого тела. Окраска антителами против GFAP – маркера астроцитов, выявила глиальную реакцию мозга реципиента, дифференцировку клеток тканевых и клеточных трансплантатов в глиальном направлении, а также миграцию астроцитов реципиента в трансплантат. С помощью окраски антителами против NeuN – маркера зрелых нейронов, было обнаружено, что часть клеток трансплантатов дифференцировалась в нейроны. Наблюдалось полное прекращение пролиферации как в клеточных, так и тканевых трансплантатах на 30-е сутки после операции, что было выявлено с помощью антител против PCNA – маркера пролиферирующих клеток. По окраске антителами против TH было обнаружено вращание отростков дофаминергических нейронов реципиента в трансплантат.

Таким образом, как тканевые, так и клеточные трансплантаты способны переживать не менее 30 суток без отторжения, при этом клетки в них дифференцируются в нейроны и глию. Однако тканевые трансплантаты демонстрируют большую способность к росту. Это, по-видимому, связано с более длительным сохранением эмбрионального микроокружения в тканевых трансплантатах в сравнении с трансплантатами диссоциированных клеток.

РАЗВИТИЕ *Mytilus trossilus* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СОЛЕННОСТИ: ИЗМЕНЕНИЕ ТЕМПОВ РОСТА ЛИЧИНОК И УРОВНЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ

© 2011 г. Е. Г. Фофанова, М. Ю. Хабарова, Е. Г. Ивашкин

Лаборатория сравнительной физиологии

Известно, что у личинок пресноводных моллюсков серотонин (5-НТ), продуцируемый ранними нейронами, регулирует темпы развития, тогда как FMRFамид (FMRFa) вовлечен в процесс осморегуляции. Ранее нами было показано, что неомицин влияет на уровень FMRFa в ранних нейронах личинок гастропод. Мы исследовали темпы роста и изменение уровня FMRFa и 5-НТ в клетках личиночной нервной системы *Mytilus trossilus* при развитии в условиях различной солености (8, 33 и 40‰) со стадии трохофоры до стадии велигера в присутствии неомицина и без него. Для оценки ненейтрального действия антибиотика был использован ампициллин.

Иммуноцитохимическое окрашивание показало более низкий уровень FMRFa в нейронах личиночной нервной системы в 8‰ по сравнению с 33 и 40‰. Инкубация в неомицине повышает общий уровень FMRFa во всех случаях, тогда как ампициллин не оказывает такого эффекта. Выживаемость в опыте отрицательно коррелировала

с уровнем 5-НТ в апикальных нейронах: была минимальной при солености 33‰ (максимальный уровень 5-НТ) и максимальной при 8‰ с неомицином (минимальный уровень 5-НТ). Сравнение средних размеров велигеров в разных вариантах опыта показало, что личинки достоверно крупнее при выращивании в воде с повышенной соленостью. Однако в 8‰ с неомицином 3.6% животных имели аномально крупную раковину.

Наши эксперименты показали, что темпы роста личинок *Mytilus trossilus* увеличиваются при возрастании уровня солености, а соответствующее повышение уровня FMRFa, скорее всего, связано с приспособлением личинок к этому фактору среды. Роль 5-НТ в регуляции роста в условиях переменной солености и его связь с FMRFамидной системой является одной из задач наших дальнейших исследований.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 09-04-01326 и 10-04-10134.

СКОРОСТЬ СИНТЕЗА ДОФАМИНА В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ И СТРИАТУМЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАРКИНСОНИЗМА У МЫШЕЙ

© 2011 г. Г. Р. Хакимова, Е. А. Козина, А. Я. Сапронова, М. В. Угрюмов

Лаборатория гормональных регуляций

Считается, что одним из возможных компенсаторных механизмов, обеспечивающих длительный период бессимптомного течения болезни Паркинсона, является увеличение скорости синтеза дофамина (ДА) сохранившимися нейронами нигростриатной системы.

Цель: оценить скорость синтеза ДА в нигростриатной системе при моделировании паркинсонизма у мышей.

Задачи: определить активность тирозингидроксилазы – скорость-лимитирующего фермента в процессе синтеза ДА – в телах и терминалях аксонов ДА-ергических нейронов.

Материалы и методы: работа проведена на двух моделях паркинсонизма (досимптомной и ранней симптомной), получаемых путем системного введения по различным схемам самцам мышей 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Перед декапитацией животным внутривентриально вводили ингибитор декарбоксилазы ароматических аминокислот – 3-гидроксибензилгидразин дигидрохлорид (NSD-

1015). Содержание предшественника ДА – L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА) в черной субстанции и стриатуме определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.

Результаты: после введения МФТП и NSD-1015 в обеих моделях в черной субстанции уровень L-ДОФА остается без изменений. В стриатуме в досимптомной модели концентрация L-ДОФА снижается на 37%, ранней симптомной – на 51%. При пересчете полученных значений на количество выживших ДА-ергических нейронов в черной субстанции как в досимптомной, так и в ранней симптомной моделях болезни Паркинсона активность тирозингидроксилазы в сохранившихся телах ДА-ергических нейронов увеличивается. В терминалях ДА-ергических аксонов стриатума в досимптомной модели также активность тирозингидроксилазы увеличивается, тогда как в ранней симптомной активности фермента не изменяется.

Выводы: деградация нигростриатной системы на досимптомной стадии паркинсонизма сопровождается увеличением скорости синтеза ДА в сохранившихся телах и терминалях аксонов ДА-ергических нейронов. На ранней симптом-

ной стадии также наблюдается увеличение синтеза ДА в сохранившихся телах ДА-ергических нейронов, однако, на скорости синтеза отсутствуют, что, вероятно, является одной из причин появления симптомов болезни Паркинсона.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.) АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫМ СПОСОБОМ

© 2011 г. Н. Ю. Хозьбаба

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Агробактериальная трансформация и биологическая баллистика — два самых широко используемых метода для генетической трансформации растений.

Возможность введения гетерологичных генов в двудольные растения путем использования *Agrobacterium tumefaciens* была впервые показана в 1983 году тремя группами исследователей одновременно (Mary-Dell Chilton et al., 1983; J. Schell et al., 1983; Horsch et al., 1983). Ранее считалось, что однодольные растения, включая важнейшие зерновые культуры, устойчивы к агробактериальному переносу генов, но в течение 17 лет эти проблемы были преодолены. Агробактериальная трансформация показана на рисе (Chan et al., 1992, 1993), кукурузе (Ishida et al., 1996; Komari et al., 1996) и ячмене (Tingay et al., 1997). Большинство исследователей трансформации пшеницы использовали биологическую баллистику и другие методы трансформации до первой публикации Cheng et al. (1997), доложивших об успешной агробактериальной трансформации пшеницы. Авторы использовали незрелые зародыши и эмбриогенный каллус для производства фертильных трансгенных растений.

В настоящее время генетическая трансформация посредством *Agrobacterium tumefaciens* используется чаще, чем биологическая баллистика. Этот метод обладает несколькими преимуществами перед другими формами трансформации, включая способность переносить большие сегменты ДНК с минимальными перестройками, низкое число трансгенных копий, более стабильное наследование трансгенов с меньшим умалчением и более низкая стоимость.

На данном этапе процесс создания трансгенных растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) методом агробактериальной трансформации некоторыми авторами объявлен рутинным, однако эффективность трансформации пшеницы не превышает 0.1–4% и показана для нескольких высокоотзывчивых генотипов, в том числе и для

модельного сорта Bobwhite и его производных. Поэтому, основываясь на фундаментальных знаниях о трансформации посредством агробактерии, мы оптимизируем параметры агробактериальной трансформации мягкой пшеницы для широко возделываемых сортов.

Нами исследуются следующие факторы, влияющие на эффективность агробактериальной трансформации: выбор экспланта (зрелые и незрелые зародыши), генотип растения (сорта Злата и Эстер), штаммы агробактерии (LBA4404, AGL0, ENA105), векторные конструкции (pVec035, pCAMBIA1304), срок прекультивации культуры (0, 6, 12, 24 дней), длительность инокуляции (20, 40, 60 минут), плотность суспензии агробактерии для инокуляции ($OD_{600} = 0.3; 0.6$) и условия сокультивации (десикация — высушивание растительных тканей).

Оптимизация всех перечисленных процессов имеет существенное значение для увеличения эффективности системы трансформации (повышения частоты трансформации и уменьшения трудоемкости).

На данный момент нами исследовано влияние десикации и были получены следующие данные: зарост эксплантов агробактерией через 14 дней после сокультивации без воздействия десикации — $19.44 \pm 1.82\%$, с воздействием десикации — $0.57 \pm 0.37\%$.

Полученные данные позволяют предположить, что десикация растительных тканей после инокуляции значительно подавляет рост агробактерии, что увеличивает выживаемость растительных клеток, таким образом, увеличивается количество стабильных трансформантов и эффективность трансформации пшеницы в целом.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ТРАНСКРИПТОВ ГЕННОГО КОМПЛЕКСА *lawc/Trf2* У *Drosophila melanogaster*

© 2011 г. Р. О. Черезов

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Ген *Trf2* кодирует фактор базовой транскрипции, участвующий в процессах морфогенеза у дрозофилы. Нами было показано, что ген *Trf2* перекрывается с другим геном — *leg-arista-wing complex (lawc)*, и зона перекрытия двух генов входит в состав 9 разнонаправленных транскриптов, два из которых принадлежат гену *lawc*. Мы решили использовать модельную систему *lawc/Trf2* для исследования особенностей экспрессии перекрывающихся генов *in vivo*.

Анализ картины экспрессии генов *lawc* и *Trf2* в развитии проводили с помощью Нозерн-блот гибридизации и ПЦР в реальном времени. Оказалось, что экспрессия этих генов не является убиквитарной, т.е. количество транскриптов и их уровень экспрессии меняется в зависимости от стадии развития. Самый высокий уровень экспрессии обоих генов наблюдается в эмбрионах. Далее мы провели гибридизацию *in situ* на целых эмбрионах и показали, что транскрипты *Trf2* и *lawc* экспрессируются практически во всех тканях, но с разной интенсивностью. Исследование того, как сочетается экспрессия двух разнонаправленных перекрывающихся генов в одной клетке, станет нашей дальнейшей задачей.

Нозерн-блот анализ мутантов *lawc^{p1}* показал, что в состав некоторых транскриптов входит Р-элемент, который встроился в район перекрытия генов *lawc* и *Trf2*. Результаты генетического анализа по взаимодействию *lawc^{p1}* с мутациями генов семейства *Argonaute*, ответственного за деградацию РНК-мишени по механизму РНК-интерференции, показал, что падению экспрессии TRF2 в линии *lawc^{p1}* способствует эндорибонуклеаза AGO2, которая активирует РНК-интерференционное подавление Р-элемент-содержащих

транскриптов. Более того, в этих экспериментах мы показали, что TRF2 может контролировать процесс РНК-интерференции во время созревания яйца, участвуя в регуляции экспрессии *aubergine* — другого гена семейства *Argonaute*. Самки линии *lawc^{u3}* стерильны из-за нарушения самовоспроизведения стволовых клеток яичников. Нозерн-блот гибридизация не выявила у них ни одного транскрипта *Trf2* (у самцов они были). ПЦР-РВ показал, что экспрессия *Trf2* у самок этой линии есть, но сильно снижена. Мы предполагаем, что стерильность самок *lawc^{u3}* вызвана нарушением регуляторной зоны, специфически контролирующей экспрессию *Trf2* в оогенезе, поскольку тотальное снижение экспрессии *Trf2* приводило бы к гибели особей. Возможно, эта зона находится в районе второго интрона *Trf2*, так как в этом районе нами обнаружены хромосомные перестройки. Линия *lawc⁵²⁰* характеризуется летальностью на эмбриональной стадии. Результат Нозерн-блот анализа показал наличие в этой линии укороченного транскрипта *Trf2*.

Очевидно, что функционирование регуляторной зоны генов *lawc/Trf2* и взаимодействие перекрывающихся транскриптов этих генов требуют дальнейшего изучения. Для этого мы планируем анализ экспрессии генов *lawc/Trf2* в других мутантных линиях и исследование возможности образования дуплексов между перекрывающимися транскриптами *in vivo*.

Работа финансировалась грантами РФФИ № 10-04-01120-а и 08-04-01768-а и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие” (Подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”).

КАК ВИМЕНТИНОВЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ РЕГУЛИРУЮТ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ?

© 2011 г. И. С. Черноиваненко

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Митохондрии играют центральную роль в различных важнейших клеточных процессах, таких как синтез АТФ и снабжение клетки энергией, продукция активных форм кислорода, регуляция концентрации Ca^{+2} в цитоплазме и запрограммированная клеточная смерть — апоптоз. Многие функции митохондрий связаны с их способностью генерировать и поддерживать потенциал на внутренней мембране при помощи аэробного дыхания. Уровень потенциала митохондрий контро-

лируется различными внешними и внутренними факторами, механизмы действия которых изучены недостаточно. Важную роль в функционировании митохондрий играет их внутриклеточное распределение, которое достигается в результате их взаимодействия с различными структурами цитоскелета.

При помощи потенциал-зависимого красителя нами обнаружено, что потенциал стационар-

ных митохондрий, прикрепленных к цитоскелету, выше, чем потенциал подвижных митохондрий, транспортируемых вдоль микротрубочек. Однако ни увеличение подвижности митохондрий при разрушении фибриллярного актина, ни ее уменьшение при разборке микротрубочек не влияет на потенциал митохондрий. Наши данные показывают, что уровень потенциала митохондрий определяется их взаимодействием с виментиновыми промежуточными филаментами. Настоящее исследование посвящено изучению регуляции потенциала митохондрий малой ГТФазой Rac1. При экспрессии в безвиментиновых клетках мутантного виментина с заменой Ser56 на Ala

регуляция потенциала митохондрий с участием ГТФазы Rac1 не наблюдается. Наши результаты показывают, что в результате активации ГТФазы Rac1 и ее эффектора p21-активируемой киназы (PAK1) происходит фосфорилирование остатка Ser56 виментина, а это, в свою очередь, приводит к нарушению связи митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами и снижению их мембранного потенциала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук, РФФИ (грант № 10-04-00414-а).

ЦИТОКИНЫ ВОСПАЛЕНИЯ В МИГРАЦИИ НЕЙРОНОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ ГОРМОН

© 2011 г. В. С. Шарова

Лаборатория гистогенеза

Известно, что бактериальная инфекция у матери индуцирует продукцию цитокинов воспаления, вызывающую нарушения развития мозга у плода. Введение бактериального эндотоксина липополисахарида (ЛПС) беременной самке приводит к повышению в крови уровня таких цитокинов, как фактор некроза опухоли (ФНО α), интерлейкин 1 (ИЛ-1 β) и лейкоemia ингибирующий фактор (ЛИФ), которые наряду с ЛПС, в свою очередь, стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов плодной частью плаценты. Ранее нами было показано, что введение ЛПС беременной самке приводит к подавлению миграции нейронов, синтезирующих гонадотропин-релизинг гормон (ГРГ-нейронов) у плодов крыс. Мы предположили, что провоспалительные цитокины являются связующим звеном между внутриматочной инфекцией матери и последующим нарушением миграции и дифференцировки ГРГ-нейронов. Целью данной работы являлось исследование уровня цитокинов воспаления в сыворотке крови матери и плода, а также в цереброспинальной (ЦСЖ) и амниотической жидко-

сти (АЖ) плода, после инфицирования матери ЛПС. Уровень цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ФНО α , интерферона (ИФ γ), ЛИФ и белка хемотаксиса моноцитов (MCP-1), оценивали при помощи проточной цитометрии и иммуноферментного анализа у мышей через 1.5 часа после внутрибрюшинного введения ЛПС (45 μ g/kg). Анализ полученных данных показал, что после введения ЛПС в крови матери уровень цитокинов достоверно повышается: ЛИФ в 38 раз, ИЛ-6 в 23 раза, MCP-1 в 12 раз, ФНО α в 4 раза, ИЛ-10 в 5 раз. В крови и ЦСЖ плода также отмечено достоверное повышение MCP-1 в 2–2.5 раза, ИЛ-6 в 7 раз и 3 раза, соответственно. Кроме того, в АЖ наблюдалось возрастание уровня MCP-1 в 1.5 раза и ЛИФ в 3 раза. Уровень других цитокинов через 1.5 часа после введения ЛПС не изменялся. Таким образом, воспаление, вызванное ЛПС, индуцирует повышение уровня провоспалительных цитокинов в крови беременной самки, а затем в организме плода, что в конечном итоге приводит, по-видимому, к нарушению интраназальной миграции ГРГ-нейронов в мозг.

МИОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ИЗ ЗАРОДЫШЕВОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

© 2011 г. О. Н. Шевелева, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина, В. И. Старостин

Лаборатория гистогенеза

В последние годы особое развитие получили исследования, связанные с поиском альтернативных источников миогенеза в немышечных тканях. Большой интерес представляют работы по исследованию эктопических миогенных предшественников и индуцированной миогенной дифференцировки плюрипотентных и мультипотент-

ных стволовых и родоначальных клеток, например, мезенхимных стромальных клеток (МСК). В связи с этим объектом данного исследования была выбрана зародышевая печень, которая содержит как эктопические миогенные клетки, что было показано нами ранее, так и МСК. Основными задачами работы было изучить миогенные потен-

ции клеток из зародышевой печени в зависимости от стадии онтогенеза и сроков культивирования, соотнести обнаруженные в нативной печени миогенные предшественники с гистогенетическим рядом нормальных скелетных мышц и получить индуцированную миогенную дифференцировку пассированных клеток из зародышевой печени. Было показано, что в первичных культурах стромальных клеток из печени 15-, 17- и 20-суточных зародышей, в отличие от 14-суточных, наблюдается спонтанное образование миосимпласмов. На криостатных срезах печени этих сроков развития были обнаружены единичные клетки, экспрессирующие миогенный маркер *MyoD*. Анализ антигенного профиля миогенных элементов в первичных культурах клеток из зародышевой печени методами иммуноцитохимии и ПЦР однозначно свидетельствует об их принадлежности к скелетным мышцам. Сравнительное изучение экспрессии генов, кодирующих маркеры основных этапов миогенеза (*Pax3*, *MyoD*, *Myf5*, *Myf6*, *m-кадгерина*), показало зависимость миогенных потенциалов клеток из печени от срока развития зародыша и длительности культивирова-

ния и позволило обнаружить корреляцию между миогенными потенциалами и активностью гемопоеза в печени. Отсутствие экспрессии *Pax7* в культурах клеток из печени и присутствие в нативной печени клеток, экспрессирующих *MyoD*, позволяет предположить, что спонтанно образующиеся в первичной культуре мышечные структуры развиваются не из сателлитоподобных клеток, а из клеток, по-видимому, соответствующих покоящимся миообластам. В экспериментах по направленной миогенной дифференцировке клеток в составе популяции МСК зародышевой печени показано образование немногочисленных миотуб в индукционной среде, содержащей 5-азацидин. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о присутствии в строме зародышевой печени как предсуществующих, так, видимо, и индуцибельных скелетных миогенных предшественников.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 09-04-00002).

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ АССОРТАТИВНОГО СКРЕЩИВАНИЯ В ГРУППЕ *Drosophila virilis*

© 2011 г. Д. М. Щепетов

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Этология размножения плодовых мушек рода *Drosophila* достаточно хорошо изучена, однако генетические основы механизмов распознавания представителей своего вида и гены, лежащие в основе реализации механизма распознавания “своей-чужой” при конспецифическом спаривании остаются практически неизвестны. Для *D. melanogaster* ранее была показана роль при спаривании вкусового рецептора *Gr68a*, ген, кодирующий который экспрессируется в нескольких хемочувствительных щетинках передних лапок самца. Секвенирование генов, гомологичных *Gr68a D. melanogaster* у группы видов *D. virilis*, а также сплайс-формы, гомологичной гену *Gr32a* у *D. melanogaster*, показало чрезвычайно высокий уровень аминокислотных замен в экстраклеточных доменах рецептора. Основываясь на приведенных фактах, мы предположили, что на близкородственных видах группы *D. virilis* различия в последовательности гена *Gr32a/Gr68a* будут отражать способность самцов отличать самок своего вида от всех прочих, обеспечивая таким образом репродуктивную изоляцию. Проведенный нами анализ не выявил значимой корреляции между формой рецептора у F2 гибридных (*virilis* × *lumeii*) самцов и предпочтения F2 самца к самке одного из двух родительских видов. По-

лученные результаты свидетельствуют, что, по всей видимости, в группе видов *D. virilis* соответствующую функцию на себя берет другой/другие рецепторы. Для поиска кандидата на роль гена, создающего репродуктивную изоляцию, мы провели QTL анализ с использованием микросателлитных локусов выбором самцом самки для спаривания у самцов второго поколения межвидовых гибридов *Drosophila virilis* и *Drosophila lumii*. На данный момент по данным QTL анализа не было выявлено значительной связи ни одного локуса с выбором гибридным самцом чистого вида. С целью расширить панель генетических маркеров для проведения QTL анализа, а также для оценки роли имеющегося репертуара вкусовых рецепторов в видообразовании, нами проводится секвенирование большого числа вкусовых рецепторов. Полученные данные позволяют идентифицировать как минимум еще два гена, находившихся под строгим движущим отбором в процессе видообразования, что косвенно указывает на то, что эти рецепторы могут отвечать за видоспецифичное предпочтение к субстрату питания или субстрату для откладки яиц, либо являются кандидатными при изучении ассортативного скрещивания.