

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(12–13 ДЕКАБРЯ 2011 г.)**

**АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ В ОПУХОЛЯХ
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА:
СВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ**

© 2012 г. Ю. В. Богомякова

Лаборатория биохимии

Исследование молекулярных механизмов злокачественной трансформации клеток и роста опухолей до сих пор остается одной из самых актуальных проблем биологии и медицины. В связи с этой проблемой наиболее перспективным представляется изучение многофункциональных ферментативных систем. К их числу относятся протеасомы, мультисубъединичные мультипротеазные комплексы, регулирующие клеточные процессы путем гидролиза белков и/или образования пептидов – участников этих процессов. По набору протеолитических субъединиц протеасомы можно разделить на четыре типа: протеасомы, содержащие конститутивные субъединицы X, Y, Z; протеасомы, содержащие иммунные субъединицы LMP7, LMP2, LMP10, протеасомы, содержащие субъединицы X, LMP2, LMP10, и протеасомы, содержащие субъединицы LMP7, Y, Z. При этом субъединицы X и LMP7 проявляют химотрипсин-подобную активность, субъединицы Y и LMP2 – каспаза-подобную активность, субъединицы Z и LMP10 – трипсин-подобную активность. Изменение соотношения указанных типов протеасом приводит к изменению активностей общего пула протеасом. Цель настоящего исследования – изучить изменения каспаза-подобной активности протеасом в различных опухолях щитовидной железы человека по сравнению с контрольными тканями и выявить их возможную

связь с клинико-морфологическими параметрами. В работе использовали послеоперационный материал: фолликулярную аденому и папиллярную карциному на стадиях T₃N₀M₀ и T₂N₁M₀. Каспаза-подобную активность оценивали по гидролизу флуорогенного коммерческого субстрата Z-Leu-Leu-Glu-AMC. Обнаружено, что каспаза-подобная активность протеасом в фолликулярной аденоме (доброкачественной опухоли) достоверно не изменяется по сравнению с прилегающей тканью (условным контролем). Однако она возрастает в 2.5 раза в папиллярной карциноме на стадии T₃N₀M₀ (неметастазирующей опухоли) и в 14 раз – на стадии T₂N₁M₀ (метастазирующей опухоли). Таким образом, выявлена связь изменений каспаза-подобной активности протеасом в опухолях с клинико-морфологическими параметрами. С помощью Вестерн-блоттинга показано, что увеличение каспаза-подобной активности в злокачественных опухолях сопровождается изменением соотношения субъединиц, проявляющих эту активность: содержание субъединицы LMP2 увеличивается, в то время как содержание субъединицы Y уменьшается или не изменяется. Дальнейшая разработка данной проблемы может быть полезна для диагностики злокачественных новообразований щитовидной железы человека и для прогнозирования степени их агрессивности.

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙРОНОВ
ТУБЕРОИНФУНДИБУЛЯРНОЙ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ В МОЗГУ МЫШЕЙ**

© 2012 г. Е. А. Дегтярева, Т. С. Пронина, М. В. Угрюмов

Лаборатория гормональных регуляций

Одним из наиболее широко распространенных нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона (БП), которая развивается в первую очередь в результате гибели дофаминергических (ДА-ергических) нейронов нигростриктной системы мозга, участвующей в регуляции

двигательной (моторной) активности. В последние годы показано, что нейродегенеративный процесс не ограничивается этими нейронами, а распространяется и на другие популяции нейронов, причем расположенные не только в мозгу, но и на периферии, что обуславливает системный

характер БП. Так, в гипоталамусе при БП обнаружены тельца Леви — маркеры дегенерации нейронов и отмечено уменьшение содержания DA и норадреналина (НА), участвующих в норме в ингибиторном контроле секреции пролактина гипофиза. Дефицит этих химических сигналов приводит к развитию гиперпролактинемии, что и было обнаружено у ряда больных при БП. Совокупность приведенных фактов позволяет предположить, что при БП подвергаются дегенерации и DA-ергические нейроны тубероинфундибулярной DA-ергической системы (ТИДА) гипоталамуса. Однако до сих пор не ясно, в какой степени и на каком этапе развития БП страдают DA-ергические нейроны ТИДА.

Целью данной работы явилась проверка гипотезы авторов, согласно которой развитие паркинсонизма в результате дегенерации DA-ергических нейронов nigrostriatной системы сопровождается развитием функциональной недостаточности DA-ергических нейронов ТИДА и гиперпролактинемии. В этом контексте предполагалось охарактеризовать морфо-функциональное состояние DA-ергических нейронов ТИДА на мышцах линии C57Bl/6, у которых с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) вызывали

развитие паркинсонизма в досимптомной и ранней симптомной стадиях. Для этого самцам мышей вводили подкожно с двухчасовым интервалом раствор МФТП на 0.9%-ном NaCl в дозе 12 мг/кг двукратно или четырехкратно. На 14-ый день после последней инъекции МФТП определяли уровень катехоламинов в ТИДА с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией и морфологические изменения нейронов ТИДА с помощью иммуноцитохимии.

Проведенное нами исследование не показало изменений в содержании DA на досимптомной стадии, однако, выявило биохимические изменения (снижение уровня DA на 50% и увеличение “оборота” DA на 149% по сравнению с контролем) в ТИДА на экспериментальной модели ранней симптомной стадии паркинсонизма. Однако, при использовании данных моделей досимптомной и ранней симптомной стадий паркинсонизма в ТИДА не были выявлены изменения в числе нейронов и аксонов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ-офи 09-04-12106-офи_м, РГНФ 09-06-00543а, РФФИ-офи 09-04-13851-офи_ц.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ У МЫШЕЙ

© 2012 г. Л. С. Зиневич

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Целью настоящей работы является определение уровня экспрессии гена ростового фактора ИФР-1 при химическом канцерогенезе печени мышей линии C57Bl6, вызванном введением диэтилнитрозамина. Методом ПЦР в реальном времени показано, что на переходной стадии от аденомы печени к гепатоцеллюлярной карциноме (ГК) и на стадии ГК экспрессия ИФР-1 в опухолевой ткани снижена по сравнению с окружающей ее тканью в 8 ($p < 0.05$) и 10 раз ($p < 0.001$), соответственно, а с тканью печени здоровых мышей стадия ГК различается в 5 раз на ($p < 0.005$). Экспрессия ИФР-1 в ткани, окружающей опухоль, имеет тенденцию к повышению на стадии ГК по

сравнению с тканью печени здоровых мышей ($p < 0.1$). Снижение экспрессии ИФР-1 в опухоли может быть связано с утратой способности к синтезу и секреции этого фактора в кровь, что свойственно нормальным гепатоцитам, а повышение экспрессии ИФР-1 в окружающей ткани может свидетельствовать о паракринной стимуляции роста опухоли ее микроокружением. ИФР-1 имеет изоформы — продукты альтернативного сплайсинга — секретлируемую, выделяемые в кровотоки, и локально-активные, вырабатываемые во многих тканях, в том числе в печени. Получены предварительные данные об экспрессии изоформ ИФР-1 при химическом канцерогенезе печени мышей.

ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ: КАК “ВЫКРУТИТЬСЯ” В РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СИТУАЦИЯХ

© 2012 г. Я. Д. Карпова

Лаборатория биохимии

Ежедневно организм млекопитающих подвергается многим опасностям: атакам чужеродных микробов, вирусов, кроме того, собственные клетки могут претерпевать злокачественные преобразования, которые представляют не меньшую угрозу. Миссию по защите организма выполняет

специализированная сложноустроенная система — иммунная система. Она имеет тонкую настройку, поскольку должна не только избавить организм от неприятностей, направив на них полноценный иммунный ответ, но и не навредить, вовремя включив механизм толерантности

к “своему”. Многие работы посвящены поиску ответа на вопрос, каким же образом происходит регуляция иммунной системы? Ясный ответ до сих пор не получен. Мы решили подойти к проблеме, исследуя иммунные протеасомы, особой функцией которых является образование антигенных эпитопов, в различных иммунологических ситуациях: в процессе становления иммунной системы, когда происходит переход от “знакомства со своим” к возможности развития иммунных реакций; в условиях индуцированной донор-специфической портальной толерантности, когда организм становится иммунологически невосприимчивым и не развивает иммунный ответ на чужеродные донорские антигены; в развитии иммунитета против опухоли Walker 256, привитой крысам линии Brattleboro, и при неэффективности иммунной системы против этой опухоли у крыс линии WAG. Методом Вестерн-блоттинга показано, что при становлении иммунной системы в раннем развитии увеличивается экспрессия иммунных протеасом в печени (теряющей статус иммунного органа в неонатальный период) и селезенке (вторичном лимфоидном органе). Причем иммунные протеасомы экспрессируются в этих органах уже в эмбриональном развитии, а при индукции воспаления у матери введением липополисахарида на 12-й день беременности уровень иммунной субъединицы LMP2 увеличивается на фоне падения уровня иммунной субъединицы LMP7 в печени плодов через 5 дней, через 7 дней увеличивается уровень LMP7 на фоне падения уровня LMP2. Таким образом, уже в эмбриональный период возможно вызвать изменение экспрессии иммунных протеасом, что свидетельствует о пластичности моле-

кулярных компонентов развивающейся иммунной системы. Методом иммунофлуоресценции показана связь увеличения количества иммунных протеасом в печени с увеличением их экспрессии в гепатоцитах, а в селезенке — с ее наполняемостью лимфоцитами, обогащенными иммунными протеасомами. Обнаруженные изменения содержания иммунных протеасом сопровождаются изменением химотрипсин- и каспаза-подобной активности протеасом.

Индукция донор-специфической портальной толерантности и последующая трансплантация овариальной ткани под капсулу почки от того же донора приводят к увеличению количества LMP2 в печени и прижившемся трансплантате по сравнению с контрольными образцами и уменьшению количества LMP7 в печени по сравнению с контролем и в прижившемся трансплантате по сравнению с отторгающимся трансплантатом. Показано распределение этих субъединиц по клеткам на срезах трансплантатов.

При исследовании регрессирующей опухоли Walker 256 у крыс Brattleboro выявлено увеличение содержания обеих иммунных субъединиц между 7 и 14-м днями после инъекции опухолевых клеток, что может способствовать обнаружению опухоли иммунной системой. Напротив, в опухоли, развивающейся у крыс WAG и приводящей крыс к гибели, уровень иммунных протеасом не отличается от их уровня в инъецируемых опухолевых клетках.

Таким образом, все исследуемые иммунологические ситуации сопровождаются уникальными изменениями в пуле иммунных протеасом. Соотношение типов иммунных протеасом определяет развитие иммунного ответа или толерантности.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В РАЗВИТИИ СОМАТИЧЕСКИХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

© 2012 г. Д. С. Костюшев, Н. В. Лифанцева, О. Ф. Гордеева

Лаборатория гистогенеза

Раково-тестикулярные антигены млекопитающих являются обширным семейством высокоомологичных генов с неизвестной функцией, располагающихся преимущественно на X-хромосоме. Раково-тестикулярные антигены имеют специфический паттерн экспрессии в клетках раковых опухолей различных гистологических типов, тогда как в норме их экспрессия выявлена только в некоторых эмбриональных тканях и семенниках взрослых животных. Среди 250 генов раково-гаметных антигенов, известно около 20 генов семейства MAGE (melanoma antigen) у человека, подразделяющиеся в зависимости от степени гомологии и расположения на X-хромосоме на четыре различных класса. Гены семейства Mage, об-

наруженные в геноме мыши, имеют 60–90% гомологию с генами MAGE человека. Однако на данный момент практически отсутствует информация о функциях генов семейства Mage и их роли в нормальном развитии млекопитающих. Наши предыдущие исследования, а также данных других авторов, показали, что гены семейства MAGE экспрессируются в плюрипотентных клетках и ранних предшественниках соматических и половых клеток человека и мыши. В связи с отсутствием данных об экспрессии генов Mage мыши в литературе и базе данных Mouse Genome Informatics, мы исследовали паттерны экспрессии генов семейства Mage-a и Mage-b в зачатках органов, происходящих из трех зародышевых листков,

и в половых клетках на разных стадиях развития. С помощью методов RT-PCR и real-time RT-PCR были идентифицированы транскрипционные профили генов *Mage-a2*, *-a4*, *-a6*, *-a10* и *Mage-b1*, *-b3*, *-b4*, *-b5* в эпибласте (стадия E 7.5), гонадах, мозге, печени и мышцах (E 10.5, E 13.5). В указанных зачатках органов мышцы был проведен количественный анализ экспрессии изучаемых генов на разных стадиях развития. В результате сравни-

тельного анализа экспрессии генов семейств *Mage-a* и *Mage-b* в разных органах в ходе развития мышцы были получены новые приоритетные данные, которые вносят вклад в понимание роли уникальных семейств генов раково-тестикулярных антигенов в индивидуальном развитии млекопитающих. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ТРАНСПОЗИЦИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГРУППЫ *gypsy*

У *Drosophila melanogaster*

© 2012 г. А. Р. Лавренов, Ф. А. Урусов

Лаборатория молекулярной биологии развития, лаборатория генетики животных кафедры генетики
Биологического факультета МГУ

Мобильные генетические элементы (МГЭ) группы *gypsy* *Drosophila melanogaster* являются ретротранспозонами с длинными концевыми повторами, содержащими три открытые рамки считывания. Высокая транспозиционная активность МГЭ опасна для организма, и потому контролируется геномом хозяина при помощи локуса *flamenco*, локализованного в гетерохроматиновом районе X-хромосомы. В основе подавления транспозиций МГЭ группы *gypsy* используется механизм РНК-интерференции. По-видимому, ген *flamenco* является источником малых РНК, участвующих в сайленсинге МГЭ.

На первых этапах настоящей работы, при помощи метода ОТ-ПЦР, была оценена экспрессия 11 МГЭ группы *gypsy* (*gypsy*, *ZAM*, *Idefix*, *Tirant*, *Quasimodo*, *opus*, *17.6*, *297*, *rover*, *springer*, *Transpac*) в линии с аллелем дикого типа (ДТ) локуса *flamenco* (413) и линиях с генотипом *flamenco* (SS (7K), MS (145), oregon (OreR)). В пределах возможностей метода ОТ-ПЦР мы наблюдали сниженную экспрессию МГЭ группы *gypsy* в линии ДТ по сравнению с линиями с генотипом *flamenco*. Также, более высокий уровень экспрессии МГЭ группы *gypsy* по сравнению с линией ДТ регистрировали в гибридах, полученных от скрещи-

вания линии ДТ с мутантными линиями *dicer* и *piwi*, характеризующимися нарушениями процесса РНК-интерференции (SM5, Cy/*dicer*^{G173E} и SM5, Cy/*piwi*¹). Гибриды от скрещивания самок линии SS с самцами линии *piwi*¹: с генотипами *flamenco/flamenco*+; *piwi*¹/*piwi*¹+ и *flamenco/Y*, *piwi*¹/*piwi*¹+ имели повышенную экспрессию некоторых МГЭ группы *gypsy* (все кроме *gypsy*, *ZAM*, *Tirant*, *rover*) по сравнению с мухами того же потомства с генотипом *flamenco/flamenco*+, *Curly*/+ и *flamenco/Y*, *Curly*/+. В сумме эти данные демонстрируют влияние генов *piwi*, *dicer* и локуса *flamenco* на экспрессию МГЭ группы *gypsy*.

Далее для оценки их возможного взаимодействия в механизме контроля экспрессии МГЭ мы использовали метод ПЦР в реальном времени. Для этого были проанализированы гибриды *flamenco/Y*, *piwi*¹/+ и линия SS (7K). Уровень экспрессии *gypsy* у гибрида *flamenco/Y*, *piwi*¹/+ оказался выше, чем у линии SS (7K), что указывает на комплементарное взаимодействие гена *piwi* и локуса *flamenco* в механизме регуляции транспозиции мобильных генетических элементов группы *gypsy* *Drosophila melanogaster*.

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *d4* У *Drosophila melanogaster*

© 2012 г. С. Ю. Лафуткина

Лаборатория генетических основ морфогенеза

Ранее нами были исследованы два новых гена дрозофилы — *drosophila-d4* (*dd4*) и *toothrin* (*tth*), кодирующих белки гомологичные членам *d4*-семейства млекопитающих. Геном позвоночных содержит 3 гена семейства *d4*: *neuro-d4*, *ubi-d4/requiem* и *cer-d4*, дифференциально экспрессирующихся в центральной и периферической нервной системе. Белки, кодируемые *neuro-d4* и *cer-d4*, были обнаружены в хроматин-ремодели-

рующих комплексах VAF в нейронах головного мозга мыши. Ген *cer-d4* участвует в эпигенетической регуляции развития сердечной и скелетной мускулатуры позвоночных животных. Белковые последовательности этих генов у дрозофилы в сравнении с гомологичными белками Ubi-d4 и Neuro-d4 млекопитающих имеют наиболее консервативный N-конец (2/3 домен). Центральная часть молекул не содержит доменов Kruppel и

Acidic, характерных для белков млекопитающих и птиц. Кроме того, в отличие от гена *dd4*, ген *tth* не кодирует цинк-связывающий домен, характерный для генов семейства *d4*, однако, в нем присутствуют последовательности, гомологичные N-концевому мотиву, кодируемому геном *neuro-d4* млекопитающих (2/3 домен). Поскольку не известно ни одной мутации генов семейства *d4*, что осложняет их исследование, в лаборатории была разработана удобная модель для продолжения изучения генов семейства *d4* на *D. melanogaster*.

Мы применили новый, получивший распространение в последнее время, подход — направленную инактивацию исследуемых генов с помощью РНК-интерференции, или “нокдаун гена”. Для проведения эксперимента была использована двухкомпонентная система экспрессии UAS/GAL4, разработанная Брэндом и Перимо-

ном (Brand, Perrimon, 1993). В результате генетического нокдауна *dd4* и *tth* были получены мухи с одинаковыми фенотипическими нарушениями, заключающимися в разрастании жилок крыла и появлении дополнительных жилок. У дрозофилы неправильное жилкование предполагает нарушение сигнальных путей Notch и EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) во время формирования периферической нервной системы.

Таким образом, эксперименты по нокдауну генов-ортологов позвоночных животных у дрозофилы — *dd4* и *tth* — выявили доминантно-негативные фенотипы исследованных особей, которые позволили нам предварительно отнести данную группу генов к регуляторам транскрипции, вовлеченным в морфогенетические процессы, контролируемые сигнальными путями Notch и EGFR (рецептор фактора роста эпидермиса).

РОЛЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА TGFbeta В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТЕРАТОКАРЦИНОМНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Н. В. Лифанцева, О. Ф. Гордеева

Лаборатория гистогенеза

Регуляция самообновления и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток осуществляется с помощью сигнальной сети, обеспечивающей строгий контроль пролиферативных и антипролиферативных стимулов. Нарушения в функционировании и взаимодействиях сигнальных путей приводят к дисбалансу процессов пролиферации и дифференцировки в трансформированных аналогах плюрипотентных стволовых клеток — тератокарциномных клетках. Целью нашего исследования являлся анализ функциональной активности и роли сигнальных путей, инициируемых факторами семейства TGFbeta (ACTIVINA, NODAL, LEFTYB, GDF3, TGFβ1 и BMP4), в плюрипотентных эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) человека линии ESM01 и тератокарциномных клетках (ЭТК) человека линии PA-1. Изучение роста и дифференцировки клеток ESM01 и PA-1 в различных системах культивирования показало, что недифференцированные ЭСК человека являются резистентными к митогенной стимуляции факторами сыворотки, тогда как рост трансформированных клеток усиливался в присутствии факторов сыворотки. Эти данные указывают на различную функциональную активность ERK/MEK и PI3/AKT сигнальных путей в этих клеточных линиях, что приводит к усилению пролиферативной активности ЭТК. Исследования регуляции процессов спонтанной и индуцированной дифференцировки ЭСК и ЭТК человека показали, что функционирование в них сигнальных путей факторов семейства TGF beta

также значительно различаются. Анализ экспрессии генов-компонентов сигнальных путей факторов семейства TGFbeta показал, что в процессе спонтанной и индуцированной дифференцировки ЭСК существенно изменяется экспрессия эндогенных лигандов ACTIVINA, NODAL, LEFTYB и GDF3. В ЭТК уровень экспрессии ACTIVINA, NODAL и GDF3 был значительно ниже, чем в ЭСК и не изменялся при стимуляции дифференцировки. Анализ функциональной активности сигнальных путей факторов TGFbeta в ЭСК и ЭТК показал, что воздействие экзогенного фактора BMP4 не приводит к изменениям роста и дифференцировки в ЭТК, однако стимулирует дифференцировку ЭСК и приводит к снижению экспрессии NODAL, LEFTYB и GDF3. Напротив, стимуляция ЭСК и ЭТК экзогенным фактором ACTIVINA приводила к существенному ингибированию роста обеих клеточных линий, но индуцировала дифференцировку только в ЭСК. Кроме того, обнаружены принципиальные различия в экспрессии эндогенных факторов семейства TGFbeta в ЭСК и ЭТК при их стимуляции факторами ACTIVINA и BMP4. На основании полученных данных мы предполагаем, что снижение функциональной активности сигнальных путей факторов ACTIVINA, NODAL и GDF3 приводят к дисбалансу пролиферации и дифференцировки в ЭТК. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379).

ЭКСПРЕССИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ И РЕТИНАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ В ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Л. А. Милюшина, Б. И. Вердиев,
А. В. Кузнецова, М. А. Александрова

Лаборатория проблем регенерации и лаборатория экспериментальной нейробиологии

Известно, что клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) человека в определенных условиях *in vivo* и *in vitro* могут проявлять мультипотентность и трансдифференцироваться в другие типы клеток. Однако механизмы трансдифференцировки ПЭС человека мало изучены, поскольку основными объектами исследований являются клетки амфибий, грызунов и цыпленка. Данная работа направлена на изучение пластичности клеток ПЭС глаза взрослого человека при помощи иммунопероксидазного и молекулярно-генетического анализа клеточных культур, что позволит расширить фундаментальные представления о процессах их дедифференцировки и индукции в клетки стабильного нейрального пула

Проведенные исследования показали, что в условиях *in vitro* клетки ПЭС претерпевают морфогенетические изменения. В течение культивирования клетки утрачивают экспрессию тканеспецифического гена *RPE65*, и начинают экс-

прессировать маркеры стволовых клеток: *Oct4* (POU5F1), *Nanog*, *Prox1*, *Musashi 1* и *Pax6*, что указывает на их дедифференцировку. Экспрессия генов *Musashi 1* и *Pax6* свидетельствует о дифференцировке клеток РПЭ по нейральному пути. Это подтверждается экспрессией β III-tubulin, маркера нейробластов, и синтезом белков – маркеров дифференцированных нейрональных клеток, рековерина, тирозингидроксилазы и нейрофиламентов. Полученные данные указывают на способность клеток ПЭС глаза взрослого человека к трансдифференцировке в нейральном направлении, что делает их интересным объектом клеточной терапии при нейродегенеративных заболеваниях глаза и мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00510) и Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 16.512.11.2158).

КАНАЛЫ СЕМЕЙСТВА TRP В МИОТУБУЛАХ – ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФУНКЦИЙ И МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ

© 2012 г. Э. Р. Муслихов

Лаборатория общей физиологии

Установлено, что в скелетных мышечных клетках реализуются механизмы входа ионов Ca^{2+} , независимые от потенциалуправляемых каналов. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в депозависимом входе Ca^{2+} в скелетных миотубулах участвует канал *Orail* (Авдонин и соавт., 2008). Поступление Ca^{2+} в электронеовозбудимых клетках происходит также через каналы семейства TRP.

Целью моей работы было изучение возможной роли каналов TRP в кальциевом обмене в скелетных миотубулах.

Исследования проводили на культурах клеток линии C2C12 (скелетные миобласты, полученные из бедра задней конечности мыши, коллекция ATCC) и *edl mdx* (миобласты, полученные из мышечной линии *mdx* с дефицитом белка дистрофина). Дифференцировку вызывали заменой среды культивирования (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, на среду, содержащую 2% лошадиной сыворотки. Измерения уровней экспрессии белков исследуемых каналов проводились при помощи метода количествен-

ной полимеразной цепной реакции. Также проводились количественные измерения поступления ионов Ca^{2+} в цитоплазму в миотубулах при помощи изотопа кальций-45. Оценка содержания активной формы тирозиновой киназы Src проводилось при помощи Western-гибридизации.

Было показано, что экспрессия каналов TRPC1, TRPV2, TRPV4 и TRPM7 возрастает, либо остается на постоянном уровне в процессе дифференцировки миобластов в миотубулы. Функции их до конца неизвестны, однако имеются данные о том, что каналы TRPV2 являются механочувствительными, а увеличение их активности является одной из основных причин нарушения кальциевого обмена при миодистрофиях. Мы синтезировали siRNA, подавляющую экспрессию TRPV2 и исследовали роль этих каналов во входе ионов кальция, вызванном гипосмотическим шоком. Проведено изучение возможного участия тирозиновой киназы Src в регуляции активности механочувствительных каналов в дифференцирующихся миотубулах.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА ДО ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ

© 2012 г. И. А. Мучкаева

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Плюрипотентные стволовые клетки обладают бесконечной способностью к самообновлению, а также к генерации всех клеточных типов трех зародышевых листков. Так как потенциальное клиническое применение эмбриональных стволовых клеток неосуществимо ввиду практических и этических проблем, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) могут быть полезным материалом при разработке лекарственных средств и для заместительной клеточной терапии (регенеративной медицины). В качестве исходной культуры мы использовали стволовые клетки амниотической жидкости человека (СК АЖ) ввиду их доступности (клетки получают для пренатальной диагностики пороков развития плода), а также исходя из литературных данных о большей эффективности репрограммирования СК АЖ в сравнении с клетками, выделенными из тканей взрослого. Цель работы заключалась в получении и характеристике иПСК из СК АЖ человека. СК АЖ были трансфицированы лентивирусными

векторами, кодирующими гены плюрипотентного состояния Oct4, Sox2 и Nanog. Первые колонии репрограммированных клеток были обнаружены уже на 5-е сутки после инфицирования. С помощью иммуноцитохимического анализа было выявлено, что исследуемые колонии клеток экспрессировали транскрипционные факторы плюрипотентности: OCT4, SOX2, NANOG, а также поверхностный антиген SSEA-4. Все клоны были положительны по экспрессии щелочной фосфатазы – одного из маркеров плюрипотентного статуса клеток. Было обнаружено, что в исследуемых клетках присутствовала активная теломераза, что говорит о реактивации фермента при репрограммировании. ОТ-ПЦР-анализ показал наличие транскриптов некоторых генов плюрипотентности. Полученные клоны были способны образовывать эмбриоидные тельца и дифференцироваться в производные трех зародышевых листков при индукции дифференцировок *in vitro*.

КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ДОНЕРВНОЙ СЕРТОНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Xenopus laevis И *Xenopus tropicalis*

© 2012 г. Д. А. Никишин

Лаборатория проблем регенерации, группа эмбриофизиологии

Серотонин (5-НТ), наряду с синаптической передачей, участвует в целом ряде важнейших процессов донервного эмбрионального развития. Однако молекулярно-биологические сведения о донервной серотонергической системе неполны и до сих пор ограничиваются разрозненными исследованиями. Наши предшествующие работы, ставшие первым комплексным исследованием эмбриональной 5-НТ-системы, показали, что на ранних стадиях развития *Xenopus laevis* (от оплодотворения до гаструляции) экспрессируются как рецепторы 5-НТ – HTR2C и HTR7, так и его транспортеры VMAT2 и SERT.

На следующем этапе работы методом ПЦР в реальном времени количественно исследована динамика относительной экспрессии этих генов по отношению к гену орнитиндекарбоксилазы. Относительная экспрессия HTR2C постоянно уменьшается в ходе развития, к стадии нейрулы приближаясь к нулю. HTR7 экспрессируется примерно на одном уровне по крайней мере до стадии нейрулы. Относительная экспрессия VMAT2 существенно не изменяется до стадии ранней гаструлы, после чего резко уменьшается к

стадии нейрулы. Для выяснения пространственной локализации транскриптов были проведены ПЦР в реальном времени на фрагментах ранних зародышей и гибридизация *in situ*. Экспрессия HTR2C и HTR7 распределена равномерно, тогда как VMAT2 имеет выраженный анимально-вегетативный градиент экспрессии. Для того чтобы подтвердить экспрессию этих генов на уровне трансляции, проведена ОТ-ПЦР на пробах полисомной и информсомной фракций РНК, полученных на стадии гаструлы. Оказалось, что транскрипты HTR2C и VMAT2 присутствуют в обеих фракциях, тогда как РНК HTR7 полностью локализована в информосомах, т. е. не транслируется.

Анализ экспрессии ферментов синтеза и деградации серотонина с помощью ОТ-ПЦР показал, что в ходе раннего развития *X. laevis* экспрессируются оба фермента синтеза – триптофангидроксилаза 2 и декарбоксилаза ароматических аминокислот, тогда как основной фермент деградации серотонина моноаминоксидаза А не экспрессируется.

Также был проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии компонентов серотонергической системы в

раннем развитии шпорцевой лягушки *Xenopus tropicalis*. Показано, что на ранних стадиях развития *X. tropicalis* помимо HTR2C и HTR7, экспрес-

сируются также HTR1E, HTR3B и HTR5. Эти рецепторы охватывают все основные механизмы трансдукции 5-НТ-сигнала.

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФРОНТАЛЬНЫХ ФИЛАМЕНТОВ ЛИЧИНОК УСОНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ (Crustacea: Cirripedia)

© 2012 г. А. Л. Обухова

Лаборатория сравнительной физиологии

Взрослые особи усоногих ракообразных (Cirripedia, Thoracica) — прикрепленные животные, личинки же — планктонная расселительная стадия. Оседание личинок одного вида усоногих происходит в непосредственной близости от взрослых особей того же вида, и в меньшей степени около взрослых особей близкородственных видов. В последнюю очередь заселяются участки свободные от взрослых усоногих, причем при заселении личинки одного вида будут образовывать скопления. Подобное поведение указывает на наличие химической коммуникации между личинками и взрослыми особями усоногих, а также у личинок между собой.

Предполагается, что основной хеморецепторной структурой у личинок усоногих являются фронтальные филаменты (ФФ). Это небольшие “усики”, образующиеся во время первой линьки и расположенные впереди антенн I над лабрумом. Наши исследования с применением сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии и гистохимии показали, что у двух исследованных нами видов *Hesperibalanus hesperius* и *Verruca stroemia* ФФ подразделены на широкую короткую базальную и тонкую длинную дистальную части. У

науплиусов *H. hesperius* сочленение между этими частями имеет вид гармошки, в отличие от науплиусов *V. stroemia*, где оно представлено четкой границей. В ходе личиночного развития форма ФФ не меняется, они растут пропорционально телу личинки. Кутикула ФФ в 4 раза тоньше кутикулы на внешней стороне лабрума, и в 2 раза тоньше кутикулы щетинки, имеющей такой же диаметр, как и филамент. К основаниям ФФ подходят собственные мускулы, видеозапись показала, что ФФ являются весьма подвижными структурами. На кончике филаментов обнаруживаются выросты и ямки различной формы. Часто кончик ФФ разделен на две части, одна из которых представляет собой вырост, а на втором имеется ямка. Кроме того, у большей части исследованных науплиусов вдоль всей дистальной части ФФ проходит борозда.

Полученные нами морфологические данные подтверждают предположение о хеморецепторной функции ФФ. Для проверки их участия во внутривидовой коммуникации планируется провести эксперименты в условиях лабораторной культуры.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЭНТОДЕРМЫ

© 2012 г. О. С. Петракова, Е. С. Черниогло, А. В. Васильев, В. В. Терских

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

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

Целью работы является изучение способности клеток слюнной железы мыши к трансдифференцировке *in vitro* в гепатоцитарном направлении для изучения фенотипической пластичности клеток в пределах одного зародышевого листка.

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. Сравнительная оцен-

ка культур проводилась в 2d и 3d условиях на 1–2 пассажах. Была оценена скорость удвоения клеточной популяции, морфологические и иммуноцитохимические характеристики (CD49f, наличие цитокератинов 7, 14, 18, 19, ядерных белков HNF4b, HNF3b, альбумина, альфафетопротеина, цитохромов P450), ОТ-ПЦР клеток, реакция клеток на воздействие деметилирующих агентов (5-азациитидина и вальпроевой кислоты). Затем проводилась дифференцировка клеток слюнной железы в гепатоцитарном направлении.

Результаты. Выделенные клетки проявляли свойства эпителиальных клеток энтодермального происхождения, обладали высокой пролиферативной активностью. В 3d условиях способность к дифференцировке увеличивалась. При воздействии деметилирующих агентов изменение про-

филя экспрессии клеток было различным: в клетках слюнной железы увеличивалась экспрессия некоторых гепатоцитарных маркеров (альфафетопротейна, цитохрома P450, альбумина), в то время как в печеночных клетках-предшественниках экспрессия этих маркеров либо не изменялась (альфафетопротейн), либо снижалась (цитохром P450). После дифференцировки клеток слюнной железы в гепатоцитарном направлении повышалась экспрессия альбумина и альфафетопротейна. Экспрессия цитокератина 19 снижалась, что

говорит о дифференцировке в гепатоцитоподобные клетки.

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

МЕХАНИЗМЫ ПОСТУПЛЕНИЯ Ca^{2+} В САТЕЛЛИТНЫЕ КЛЕТКИ, ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ НА МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКНАХ КРЫСЫ

© 2012 г. В. А. Почаев

Лаборатория биофизики развития

Сателлитные клетки являются резидентными стволовыми клетками скелетных мышц и активно участвуют в процессах репарации и регенерации синцитиальных мышечных волокон в течение всей жизни организма. Особенностью мышечной ткани является ее способность к возбуждению (и передаче возбуждения) и сокращению. Оба этих процесса тесно связаны с регуляцией кальциевого обмена посредством ацетилхолиновых и дигидропипридиновых рецепторов.

Целью работы было изучение регуляции потоков Ca^{2+} в сателлитных клетках, тесно прилегающих к плазмолемме мышечного волокна. Объектом исследования были мышечные волокна крысы, изолированные из мышц конечности (*m. flexor digitorum brevis* – короткий сгибатель пальцев) методом энзиматического расщепления и культивируемые на полистирольном пластике. Из полученных ранее данных следует, что потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа обнаруживаются в миобластах линии C2C12 (Красный, Озернюк, 2010, 2011). Вместе с тем известно, что ацетилхолиновые рецепторы, основные активаторы L-каналов, присутствуют на поверхности не только терминально дифференцированных волокон, но и пролиферирующих миобластов уже после нескольких часов культивирования. Экспонирование этих рецепторных комплексов на поверхности сателлитных клеток, локализованных непосредственно на волокне и находящихся в состоянии пролиферативного покоя, ранее не было показано. Напротив, получен-

ные нами данные отчетливо свидетельствуют, что эти клетки экспрессируют никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Сателлитные клетки отвечают на воздействие карбахола (до 0.1–1 мМ), синтетического более селективного аналога ацетилхолина, мощным входом Ca^{2+} внутрь клетки. Этот процесс – следствие сопряжения эффекта деполяризации плазмолеммы с активацией ионотропных ацетилхолиновых рецепторов и потенциалчувствительных кальциевых каналов. В опытах с применением селективных ингибиторов L-каналов – верапамиллом и амлодипином, в концентрациях 10–100 мкМ, наблюдаемый выше эффект практически отсутствует. Адреналин (1–10 мкМ), неселективный активатор всех адренергических рецепторов, также вызывал вход Ca^{2+} через каналы L-типа предположительно по цАМФ-зависимому пути. Таким образом, как минимум два вышеописанных пути активации кальциевых каналов L-типа характерны для сателлитных клеток. При этом волна деполяризации на данной клетке индуцирует волну деполяризации на прилегающем волокне с максимальным входом Ca^{2+} в области контакта волокна с сателлитной клеткой. Поступление Ca^{2+} в точке соприкосновения моментально приводит к частичной контракции и перегибу волокна. При этом действие дантролена, селективного ингибитора рианодинового рецепторов (RyR1, RyR3), в концентрации 250 мкМ не отменяет контрактильного эффекта.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРОМОТОРНОГО УЧАСТКА ГЕНА *Dras1* В ГРУППЕ ВИДОВ *Drosophila virilis*

© 2012 г. П. А. Прошаков, М. И. Барсуков, А. И. Чекунова

Лаборатория генетики

Группа *Drosophila virilis* обладает широким спектром самых разнообразных изолирующих

механизмов и представляет собой удобную модель для описания процессов молекулярной эво-

люции на начальных стадиях дивергенции. Нами исследована изменчивость нуклеотидной последовательности промоторного и 5'-нетранслируемого (5'-UTR) районов гена *Dras1* у близкородственных видов дрозофил группы *virilis*.

Продукт изучаемого гена — белок Ras1 — является важной сигнальной молекулой, выполняющей функции трансмиттера в каскадах, запускающих клеточное деление. Семейство Ras белков участвует в регуляции и координации многих ключевых процессов жизни клеток, что объясняет высокую интенсивность исследований генов этого семейства. Ген *Dras1* активно функционирует на важнейших этапах онтогенеза у всех эукариот и, в частности, у дрозофил — в эмбриогенезе и на стадии куколки при метаморфозе, когда необходимо обеспечить массовые процессы пролиферации клеток.

Мы провели секвенирование ДНК гена *Dras1* близкородственных видов *Drosophila* группы *virilis* (*D. virilis*, *D. americana*, *D. americana-texana*, *D. lummei*, *D. ezoana*, *D. kanekoi*, *D. lacicola*, *D. montana*) из коллекции лаборатории генетики Инсти-

тута биологи развития им. Н.К. Кольцова РАН. Средняя длина секвенированных участков гена по каждому виду составила примерно 1000 н.п. Для аналитических работ было использовано программное обеспечение LaserGene и MEGA 5. Последовательности гена *Dras1* выравнивали методом Clustal W.

Выполнен сравнительный анализ последовательностей гена *Dras1* между собой и с последовательностями *D. melanogaster*, *D. simulans* и *D. mauritiana*. Анализ последовательностей промоторной области и 5'-UTR в геномах различных видов дрозофил группы *virilis* показал, что эти области характеризуются значительным полиморфизмом, быстро нарастающим по мере роста генетической дистанции между видами. Для группы видов *virilis* выявлены групповые и видоспецифические особенности первичных последовательностей гена *Dras1*, включая единичные замены, инсерции и делеции. Обнаруженный нами полиморфизм подобен наблюдаемому в группе *melanogaster* (Gasperini, Gibson, 1999).

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ХВОСТА ТРИТОНА В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ

© 2012 г. Е. А. Радугина

Лаборатория проблем регенерации

Представители отряда Хвостатые амфибии известны своими уникальными регенерационными способностями. В ходе эпиморфной регенерации хвоста *Pleurodeles waltl* полностью морфологически и функционально воспроизводятся спинной мозг, скелетные структуры и мышцы хвоста, что позволяет использовать эту модель для изучения механизмов морфогенеза при регенерации. 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. Изменение морфогенеза хвоста при содержании на субстрате было показано и в последующих лабораторных экспериментах. Эксперимент 2010 года, в котором дополнительно к аквариальным (low g) и субстратным (1 g) условиям содержания создавались условия перегрузки 2g, показал сходный эффект в группах 1g и 2g. Изображения полученных регенератов были проанализированы морфометрическими методами, а

для группы на субстрате и аквариального контроля была получена динамика изменения морфометрических параметров в течение 50-ти дней регенерации. Достоверное изменение формы хвоста в группах 1g и 2g регистрировалось с III стадии регенерации 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 бласты. С помощью иммунохимического определения включения БрДУ на срезах регенератов были визуализированы делящиеся клетки, и произведен их подсчет в разных зонах регенератов. В группе на субстрате по сравнению с контролем достоверно большее число клеток входило в S-фазу в апикальной зоне эпидермиса. Также в группе на субстрате наблюдалась тенденция к повышению доли меченых клеток на дорсальной стороне эпидермиса и подлежащей мезенхимы. Методом TUNEL в эпидермисе и бласте через 7 и 14 п/оп. были визуализированы клетки, претерпевающие апоптоз. Таким образом, апоптоз не

только, наравне с некрозом, участвует в перестройке тканей вскоре после повреждения, но также присутствует в пролиферирующей бластеме. В дальнейшем планируется провести количественный анализ соотношения пролиферации,

гибели и миграции клеток, что позволит охарактеризовать клеточные механизмы регуляции морфогенеза и получить необходимые данные для изучения стоящих за ними молекулярных механизмов.

ИНТЕГРИНЫ И БЕЛКИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В НОРМАЛЬНОМ МОРФОГЕНЕЗЕ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl6

© 2012 г. А. Л. Риппа

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом играют существенную роль в морфогенезе волосяного фолликула (ВФ). Их изучение позволит не только продвинуться в понимании клеточных механизмов фолликулогенеза, но и облегчить создание более совершенных систем культивирования для индукции формирования ВФ *in vitro*. Целью нашего исследования является изучение экспрессии белков внеклеточного матрикса и рецепторов к ним в процессе формирования ВФ у мышей линии C57Bl6. В норме в развитии ВФ выделяют 8 стадий. Ранним свидетельством начала морфогенеза ВФ является образование эпителиальных плакод и нижележащих дермальных конденсатов. Далее эпителиальная плакода инвагинирует и окружает дермальный конденсат, который впоследствии называется дермальной папиллой (ДП).

Проведенные нами исследования показали, что эпидермальные плакоды отличаются пролиферативной активностью, судя по экспрессии маркера пролиферирующих клеток Ki67. На 18.5 сутки эмбрионального развития мышей развивающиеся ВФ характеризуются экспрессией кератина 5 и заметной ассиметричной экспрессией E-кадгерина. Дермальная составляющая была нами четко идентифицирована по эндогенной экспрессии щелочной фосфатазы и p75, рецепто-

ра к нейротропинам. Базальные кератиноциты интерфолликулярного эпидермиса, плакоды будущих ВФ и наружные корневые влагалиты экспрессируют $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 1\beta 1$ интегрин. Вышеперечисленные интегрин интенсивно экспрессируются эмбриональными дермальными клетками, прилегающими к зоне базальной мембраны и клетками ДП. Ламинин 5 экспрессируется в интерфолликулярной базальной мембране, а также в базальной мембране окружающей формирующиеся ВФ. Коллаген IV типа экспрессируется дермальными клетками, прилегающими к базальной мембране. Фибронектин экспрессируется эмбриональными дермальными фибробластами. Витронектин экспрессируется базальными кератиноцитами, эмбриональными дермальными клетками и эндотелиальными клетками кровеносных сосудов.

Полученные данные позволяют охарактеризовать морфогенез ВФ мышей линии C57Bl6 с точки зрения экспрессии белков внеклеточного матрикса и матрикс-клеточных взаимодействий. Начато сравнительное изучение морфогенеза ВФ между линией C57Bl6 и мутантами (двойными гомозиготами *we/we wal/wal*), имеющими к 21 суткам постнатального развития четко выраженную алопецию, дегенерацию ВФ и гипертрофированные сальные железы.

ИЗМЕНЕНИЕ СУБЪЕДИНИЧНОГО СОСТАВА ПРОТЕАСОМ В РАЗВИТИИ ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У КРЫС ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2012 г. А. А. Степанова

Лаборатория биохимии

Молекулярные механизмы развития портальной толерантности (отсутствия иммунной реакции на аллогенный трансплантат после введения клеток донора в портальную вену печени реципиента) до настоящего времени остаются неизвестными. Возможными участниками этого явления

могут быть протеасомы — мультисубъединичные комплексы, предназначенные для избирательной деградации клеточных белков. Разнообразие форм протеасом определяется, во-первых, способностью коровой 20S частицы присоединять различные регуляторы (РА700, РА28 и др.), во-

вторых, возможностью встраивания в коровую частицу различных β -субъединиц, конститутивных или иммунных. Цель данной работы – выяснить, какие изменения происходят на уровне экспрессии различных форм протеасом у крыс с аллогенной трансплантацией ткани щитовидной железы при индукции донор-специфической толерантности (ДСТ). Эксперименты проводили на 3–4 месячных самках крыс Вистар (доноры) и Август (реципиенты). Исследовали 3 группы животных: 1 – интактный контроль, 2, 3 – животные, у которых удаляли собственную щитовидную железу и через 7 сут проводили трансплантацию щитовидной железы донора под капсулу почки. Одной из опытных групп за 7 дней до трансплантации вводили спленоциты донора в портальную вену печени, у другой группы не вызывали ДСТ. Через 30 сут после трансплантации в печени (органе, где индуцируется толерантность), селезенке (вторичном лимфоидном органе) и трансплантате щитовидной железы методом иммуноблоттинга определяли уровень экспрессии субъединиц протеасом: смеси α -субъединиц – маркера тотального пула протеасом, иммунных субъединиц LMP2 и LMP7; Rpt6 – маркера 19S (PA700) регуляторного комплекса, и PA28 α – маркера 11S (PA28) активатора протеасом.

У животных, которым проводили трансплантацию, в ткани щитовидной железы увеличивается экспрессия иммунных субъединиц протеасом

LMP2 и LMP7 на фоне снижения тотального пула протеасом и активатора PA700 по сравнению с контрольной группой животных. При этом у крыс с индукцией ДСТ в ткани щитовидной железы экспрессия иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP2, вдвое превышает таковую в ткани щитовидной железы, трансплантированной крысам без индукции ДСТ. Экспрессия иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP7, напротив, вдвое выше в ткани щитовидной железы, трансплантированной крысам без индукции ДСТ. Как и в ткани щитовидной железы, в печени животных, которым проводили трансплантацию, наблюдается снижение уровня экспрессии тотального пула протеасом и активатора PA700. В селезенке животных, которым трансплантировали ткань щитовидной железы, обнаружено увеличение уровня активатора PA28 протеасом как в условиях с индукцией ДСТ, так и в условиях без индукции ДСТ, что может отражать развитие иммунной реакции на трансплантат во вторичном лимфоидном органе.

На основании этих результатов сделано заключение о возможной неиммунной функции иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP2, важной для приживания трансплантата, и об иммунной функции иммунных протеасом, содержащих субъединицу LMP7, важной для отторжения трансплантата.

КОНСТРУИРОВАНИЕ мРНК ГЕНОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ *Oct4*, *Sox2 in vitro*, ДЛЯ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2012 г. Р. Р. Файзуллин, Э. Б. Дашинимаев

Лаборатория проблем пролиферации

Репрограммирование клеток человека является бурно развивающимся направлением клеточной биологии с перспективой использования в регенерационной биомедицине. Полагают, что при помощи данных методов станет возможным получение культур пациент-специфических клеток самого широкого спектра. Так, например, в 2007 г. были проведены первые работы по получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи человека (Takahashi et al., 2007). Самым распространенным методом репрограммирования клеток в настоящее время является метод вирусной трансфекции генов транскрипционных факторов, управляющих путями развития клеток. Однако данный метод обладает рядом недостатков, таких как неуправляемая модификация генома клеток-мишеней и относительно низкая эффективность, что представляет собой серьезное препятствие на пути к практическому использованию. Одним из возможных путей решения этой проблемы явля-

ется использование метода трансфекции мРНК репрограммирующих генов, позволяющего избежать каких-либо модификаций генома. Как было показано в недавних работах (Warren et al., 2010) метод обладает высокой эффективностью.

Цель нашей работы состоит в разработке метода репрограммирования соматических клеток человека до плюрипотентного состояния, при помощи введения мРНК генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*. В ходе проведения работы была освоена методика синтеза зрелой мРНК *in vitro*. С целью придания устойчивости мРНК к воздействию рибонуклеаз и уменьшению цитотоксического действия, использовали модифицированные рибонуклеотиды – псевдоуридин и 5'-метил-цитозин. При помощи введения мРНК гена флуоресцентного белка EGFP с последующим анализом на проточном цитофлуориметре, были отработаны методы введения мРНК в фибробласты кожи человека. Было показано, что модификация мРНК значительно повышает уровень экспрессии белка. Были опре-

делены оптимальное количество мРНК для трансфекции, соотношение мРНК/липофетамин и период распада вводимой мРНК. Сконструированы модифицированные мРНК генов плюрипотентности *Oct4* и *Sox2*, эффективность

которых была проверена при помощи иммуноцитохимии. В дальнейшей работе предстоит проведение экспериментов по репрограммированию соматических клеток человека до плюрипотентного состояния.

СТРОЕНИЕ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И ДЕЙСТВИЕ СЕРОТОНИНА НА ЛОКОМОЦИЮ У АРХИААННЕЛИД СЕМЕЙСТВА *DINOPHILIDA*

© 2012 г. Е. Г. Фофанова

Лаборатория сравнительной физиологии

Общепризнанно, что серотонин (5-НТ) активирует биение ресничек самых разных ресничных структур как у взрослых беспозвоночных и позвоночных животных, так и у всех изученных личинок беспозвоночных. Архианнелиды семейства *Dinophilida* представляют в этом отношении особый интерес, так как в результате педоморфоза половозрелое животное одновременно обладает многими чертами личинки. В своей работе мы провели сравнительное изучение строения 5-НТ системы у двух видов: *Dinophilus gyrociliatus* и *Dinophilus taeniatus*, а также исследовали влияние 5-НТ на ресничную скользкую локомоцию ювенилей и взрослых особей *D. gyrociliatus*.

Совместное иммуноцитохимическое маркирование нервных и ресничных структур выявило отличия в строении 5-НТ системы у двух видов, в то время как ресничные локомоторные структуры были принципиально сходны. Так, у *D. taeniatus* в головном отделе тел нейронов не выявляется, есть сплетение отростков, образующее нейропил. В туловищном отделе вдоль всего тела проходят 5 продольных вентральных стволов, сеть отростков с варикозами расположена непосредственно под вентральной ресничной полоской. На границах между сегментами стволы соединены коннективами, в местах их отхождения выяв-

ляются скопления тел нейронов. У *D. gyrociliatus* антитела к 5-НТ маркируют около десятка тел нейронов в церебральном ганглии. В туловищном отделе выявляется мощный плексус с телами нейронов и их отростками под вентральной ресничной полоской. В каждом сегменте от плексуса отходит кольцевой нерв, расположенный под ресничным кольцевым шнуром. Разницы в строении 5-НТ системы у ювенильных и взрослых особей обнаружено не было. Под действием низких концентраций 5-НТ (10^{-7} – 10^{-12} М) скорость скользкой локомоции у ювенильных особей *D. gyrociliatus* повышалась в 2–3 раза, в то время как добавление тех же концентраций 5-НТ взрослым животным концентрационно-зависимо замедляло локомоцию, вплоть до полной остановки.

Таким образом, установлено существенное различие в базовом строении 5-НТ системы у двух близких видов *Dinophilus*, а также показано парадоксальное (замедляющее) действие 5-НТ на ресничную скользкую локомоцию взрослых особей *D. gyrociliatus*. Выяснение причин и механизмов обнаруженного парадоксального действия серотонина на локомоцию архианнелид является задачей наших дальнейших исследований.

КОМПЕНСАТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

© 2012 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 снижение обратного захвата дофамина (ДА) нейронами нигростриатной системы из внеклеточной среды.

Цель: оценить величину обратного захвата ДА из внеклеточной среды в нейроны нигростриатной системы при моделировании различных стадий паркинсонизма у мышей.

Материалы и методы: работа проведена на двух моделях болезни Паркинсона (досимптомной и ранней симптомной), получаемых путем системного введения по различным схемам самцам мышей линии C57BL/6 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в дозе 12 мг/кг. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института биологии развития РАН, находящимся в соответствии с на-

циональными и международными законами и правилами.

Из срезов мозга выделяли компактную часть черной субстанции (ЧС) и стриатум, переносили в инкубационные камеры, заполненные Krebs-Рингер буфером. В часть камер перед добавлением H^3 -ДА вносили ингибитор дофаминового транспортера (ДАТ) – номифензин. Специфический захват ДА (через ДАТ) определяли как разницу между общим захватом (камеры с H^3 -ДА) и неспецифическим (камеры с H^3 -ДА и номифензином).

Результаты: модель досимптомной стадии паркинсонизма характеризуется 26%-м уровнем дегенерации ДА-ергических нейронов и 59%-м – ДА-ергических волокон нигростриатной системы; ранняя симптомная – 43 и 68%-м уровнем соответственно.

После введения МФТП в обеих моделях в срезах ЧС не происходит изменений в величине захвата экзогенного ДА. В срезах стриатума в модели досимптомной стадии наблюдается небольшое, но статистически достоверное повышение специфического захвата ДА. Однако при перерасчете на тело одного нейрона или одного волокна оказалось, что величина специфического захвата ДА на обеих моделях значительно увеличена по сравнению с контролем.

Выводы: дегенерация ДА-ергических нейронов в досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма сопровождается увеличением обратного захвата ДА сохранившимися нейронами – волокнами и телами.

Работа проведена при поддержке грантов: РФФИ-офи 09-04-12106-офи_м, ФНМ.

ИНДУЦИРОВАННОЕ УСКОРЕНИЕ РАЗВИТИЯ ЛИЧИНОК МИДИИ *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia)

© 2012 г. А. К. Чабан, Е. Г. Ивашкин, М. Ю. Хабарова

Лаборатория сравнительной физиологии

Двустворчатые моллюски семейства Mytilidae имеют большое экологическое и практическое значение как объекты промысла, аквакультуры и обрастатели подводных частей судов и сооружений. Ранее нами было показано, что при добавлении в среду культивирования модулятора FMRFамидергической системы неомидина выживаемость личинок увеличивается в 8–10 раз и около 6% личинок достигают в 1.5–2 раза больших размеров, чем самые крупные в контроле. В настоящей работе проводилось подробное исследование морфологии личинок аномально крупных размеров для выяснения вопроса, находятся ли они на более поздней стадии развития или просто увеличены в размерах.

Иммуноцитохимическое исследование мышц показало, что у более крупных личинок, появляющихся в воде с добавлением неомидина, происходит существенное изменение морфологии мышечной системы по сравнению с остальными личинками, а именно: деградация мышц вельюма, формирование жаберных мышц и мышц обоих ад-

дукторов. Сканирующая электронная микроскопия таких особей выявила появление характерных колец роста на раковине, отсутствующее у контрольных животных и присущее раковинам взрослых особей. Выявленные морфологические характеристики означают, что у личинок аномально большого размера начался процесс метаморфоза и они, действительно, находятся на более продвинутой стадии развития – стадии педивелигера, готового к оседанию. Подобные изменения проявлялись на 10–14 день после оплодотворения, то есть личинки достигали стадии педивелигера в 2 раза быстрее, чем в норме. Эти выводы также подтверждает наблюдаемая смена способа передвижения этих личинок с ресничного на мышечный.

Таким образом, наши данные демонстрируют, что FMRFамидергическая система задействована в регуляции личиночного развития и ее направленная модуляция позволяет значительно ускорить процессы развития и метаморфоза в культуре личинок мидии.

СВЯЗЬ МИТОХОНДРИЙ С ВИМЕНТИНОМ ЛЕЖИТ В ОСНОВЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ МИГРИРУЮЩИХ КЛЕТОК

© 2012 г. И. С. Черноиваненко

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Виментиновые промежуточные филаменты (ПФ) является одним из важнейших компонентов мигрирующих клеток. Однако до сих пор функции виментина в мигрирующих клетках остаются неясными.

Одним из главных свойств мигрирующих клеток является их полярированность, которая определяет направление движения. Поляризация клетки заключается в формировании асимметричной морфологии с выраженным лидирующим и отстаю-

шим (задним) краем. На переднем крае происходит полимеризация сети актина, а на заднем — сокращение акто-миозиновых стресс-фибрил и подтягивание тела клетки к переднему краю.

Недавно было показано, что в мигрирующих клетках наблюдается неравномерное распределение пероксида водорода. На лидирующем крае его концентрация выше, чем в задней части клетки. Считается, что такое распределение пероксида водорода в клетках определяет направление миграции. Одним из важных источников пероксида водорода являются митохондрии. Разное содержание перекиси может быть связано с тем, что в митохондриях, находящихся в разных частях клетки, образуется разное ее количество.

Мы предлагаем гипотезу о возможном участии виментиновых ПФ и митохондрий в определении поляризованного фенотипа мигрирующих клеток. Эта гипотеза основана на том, что митохондрии в разных частях мигрирующей клетки обладают разным потенциалом и, соответственно, могут производить разное количество пероксида

водорода. Такие различия в свойствах митохондрий наблюдаются только в клетках содержащих виментин. Это обусловлено тем, что связь виментиновых ПФ с митохондриями меняет их потенциал. В передней части мигрирующей клетки митохондрии слабее связаны с виментином, поэтому они обладают меньшим потенциалом и образуют больше пероксида водорода, чем митохондрии в задней части клетки, которые сильнее связаны с виментином.

Таким образом, в мигрирующих клетках взаимодействие виментиновых ПФ с митохондриями может обеспечивать асимметричное распределение митохондрий, обладающих разным потенциалом и производящих разное количество пероксида водорода, участвуя в определении поляризованного фенотипа мигрирующих клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук, РФФИ (грант № 06-04-48452-а и № 10-04-00414-а) и программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

РЕЦЕПТОРЫ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ МИГРАЦИИ НЕЙРОНОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ ГОРМОН, У МЫШЕЙ

© 2012 г. В. С. Шарова

Лаборатория гистогенеза

Инфицирование в период беременности оказывает влияние на формирование и дальнейшее функционирование различных систем мозга. Стимуляция иммунной системы матери бактериальными эндотоксинами может затрагивать дифференцировку нейронов, синтезирующих гонадотропин-релизинг гормон (ГРГ-нейронов). Возможными медиаторами этого воздействия могут быть провоспалительные цитокины. Ранее нами было показано, что в сыворотке крови матери концентрации цитокинов таких, как ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО α , ЛИФ и белка хемотаксиса моноцитов (MCP-1), значительно увеличиваются после введения липополисахарида (ЛПС) уже через 1.5 ч. В биологических жидкостях плода также наблюдается 2–7-кратное увеличение уровня отдельных цитокинов воспаления. Целью данной работы явилось исследовать влияние ЛПС на миграцию ГРГ-нейронов у мышей, а также из смеси различных цитокинов выявить цитокины воспаления и экспрессию их рецепторов, влияющих на развитие ГРГ-нейронов. Гормон в нейронах определяли у 15- и 19-дневных плодов мышей на сагиттальных срезах мозга иммуногистохимически с помощью иммуно-флуоресцентного мечения.

Показано, что внутрибрюшинное введение ЛПС самке мышей (45 мкг/кг) на 12-й день беременности приводит к снижению общего количества ГРГ-нейронов в переднем мозгу 15-дневных плодов на 46% и 19-дневных плодов на 15%, сравнимое с таковыми у крыс. Для выявления цитокинов воспаления использовали двойное иммунофлуоресцентное мечение на ГРГ и рецепторы цитокинов к ИЛ-6 и MCP-1 на сагиттальных срезах мозга у 12–13-дневных плодов мышей. Показана экспрессия рецепторов к цитокину ИЛ-6 на миграционном пути ГРГ-нейронов в назальной области головы, а именно на обонятельных и вомероназальных нервах. Экспрессия рецепторов к ИЛ-6 в переднем мозгу была выявлена в областях, где мигрирующие ГРГ-нейроны не обнаруживались. Таким образом, нарушение интраназальной миграции ГРГ-нейронов на ранних сроках развития у плодов мышей регулируется экспрессией рецепторов к цитокину воспаления ИЛ-6. По нашим предварительным данным в реализации данного эффекта участвует также MCP-1. По-видимому, внутримозговая миграция ГРГ-нейронов контролируется другими механизмами. Исследования в данном направлении продолжаются.