

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 577.24, 612.64.

№ ИС ГЗ 0108-2015-0066



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК В НОРМЕ
И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ

Программы Президиума РАН I.29П «Биоразнообразие природных систем»

(отчет за 2016 г.)

Руководитель темы, д.б.н., проф. зав. лаб.

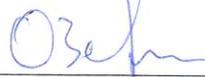
подпись, дата

Н.Д. Озернюк

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, д-р биологических наук,
профессор



Н.Д. Озернюк (раздел 1)

подпись, дата

Исполнители:
Доктор биол. наук, профессор



Б.А. Кузин (раздел 2)

подпись, дата

Кандидат биол. наук



О.Б. Симонова (раздел 2)

подпись, дата

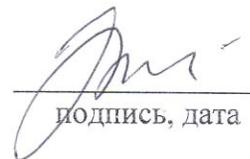
Доктор биол. наук, профессор



Р.Д. Зиновьева (раздел 1)

подпись, дата

Доктор биол. наук



Э.Н. Григорян

подпись, дата

Доктор биол. наук



М.В. Глазков

подпись, дата

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	4
Обозначения и сокращения	4
Результаты	5
Раздел 1. Молекулярно-генетические механизмы направленной дифференцировки клеток и воздействие на этот процесс факторов роста и других регуляторных факторов	5
Раздел 2. Изучение специфичности лиганд-зависимой активации целевых генов АНР человека, участвующих в регуляции пролиферации клеток, апоптоза и реакции на оксидативный стресс	5
Раздел 3. Изучение генома тритона <i>Pleurodeles waltl</i> как основа для понимания молекулярно-генетических механизмов регенерации	7
Раздел 4. Молекулярно-генетические механизмы развития глаз позвоночных	8
Раздел 5. Изучение роли участков прикрепления хромосом к ядерной оболочке в функционировании генов при дифференцировке эмбриональных стволовых клеток	9
Заключение	9
Публикации по теме	10

Реферат

Отчет 10 с., 5 ч., 2 рис., 7 источников (5 публикаций)

Реферат

Молекулярно-генетические механизмы дифференцировки клеток служат эффективным инструментом анализа процессов развития. В данном проекте представлен комплексный подход к исследованию молекулярно-генетических механизмов дифференцировки клеток, включающий изучение: -направленной дифференцировки клеток под воздействием регуляторных факторов; - специфичности лиганд-зависимой активации целевых генов арил гидрокарбонowego (диоксинового) рецептора (AHR) человека, участвующих в регуляции пролиферации клеток, апоптоза и реакции на оксидативный стресс; -генома тритона (*Pleurodeles waltl*) как основы для понимания молекулярно-генетических механизмов регенерации; -молекулярно-генетических механизмов развития глаза позвоночных; -роли участков прикрепления хромосом к ядерной оболочке в функционировании генов при дифференцировке эмбриональных стволовых клеток.

Ключевые слова:

направленная дифференцировка клеток, эпителио-мезенхимный переход, факторы роста EGF и TGF β , кератиноциты человека; ксенобиотики, оксидативный стресс, клеточная пролиферация, апоптоз, генная экспрессия, арил гидрокарбоновой (диоксиновой) рецептор, дрозофила; хромосома, регуляция экспрессии генов, ядерная оболочка, дифференцировка клеток, трансгеноз ; гены, транскрипционные факторы, регенерация тканей, низшие позвоночные

Обозначения и сокращения:

AHR – арил гидрокарбоновой рецептор
яоДНК – ядрышковый организатор ДНК
ЭПМ - эпителио-мезенхимный переход
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

Раздел 1. Молекулярно-генетические механизмы направленной дифференцировки клеток и воздействие на этот процесс факторов роста и других регуляторных факторов. Рук. Н.Д. Озернюк (лаб. эволюционной биологии развития)

Перспективной моделью для изучения направленной дифференцировки клеток служит эпителио-мезинхимный переход, осуществляемый под воздействием на кератиноциты определенных факторов роста. При этом под эпидермальные клетки приобретают мезинхимоподобный фенотип: меняется не только морфология клеток, но и их молекулярно-генетические параметры. Целью данной работы является изучение динамики изменения спектра иммунохимических маркеров, специфических для данных клеточных фенотипов, и экспрессии генов, кодирующих эти маркеры, в процессе эпителио-мезинхимного перехода. Будет изучен переход кератиноцитов человека от эпидермального фенотипа к мезинхимному при воздействии на клеточную культуру эпителиального фактора роста (EGF) и трансформирующего фактора роста β (TGF β). Для этого планируется изучение морфологии клеточных пластов, включая изменение цитоскелета; изменение спектра специфических иммунохимических маркеров: виментина, кодгерина-Е, SD44 и HAS2 (синтазы гиалуроновой кислоты); особенности экспрессии генов, кодирующих виментин, HAS2 и кодгерин-Е; влияние гиалуроновой кислоты - компонента внеклеточного матрикса, на эпителио-мезинхимный переход.

Установлено, что при эпителио-мезинхимном переходе (ЭМП), индуцированном воздействием ростовых факторов TGF- β и EGF, обнаружено усиление экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы Snail, Slug, Zeb1. Эти транскрипционные факторы принимают участие в регуляции ЭМП. Воздействие TGF- β и EGF приводит также к усилению экспрессии генов, кодирующих синтез виментина – белка промежуточных филаментов, а также генов E- и N-кадгеринов, являющихся маркерами эпителиальных и мезинхимных клеток, соответственно. Переключение генетической программы в ходе ЭМП с эпителиального паттерна на мезинхимоподобный сопровождается изменениями клеточного фенотипа, что связано с потерей межклеточных контактов, дезинтеграцией эпителиального пласта, появлением способности клеток к миграции.

Раздел 2. Изучение специфичности лиганд-зависимой активации целевых генов АНР человека, участвующих в регуляции пролиферации клеток, апоптоза и реакции на оксидативный стресс. Рук.: Б.А. Кузин, О.Б. Симонова (лаб. регуляции морфогенеза)

Продолжались исследования по изучению тканеспецифичности действия гена, кодирующего арил гидрокарбонный (диоксиновый) рецептор (АНР) человека, в условиях *in vivo*, на созданных

авторами гуманизированных дрозофилах, в геном которых интегрирован ген АНР человека. Получены результаты, характеризующие действие агонистов и антогонистов АНР человека на активацию целевых генов, участвующих в регуляции пролиферации клеток, апоптоза и контроле реакции на оксидативный стресс, а также на развитие глазных структур, генеративных органов и нервной системы.

Разработана тест-система для выявления и изучения специфичности действия ксенобиотиков, включая фармакологические средства, способные активировать транскрипционный фактор человека - Арил Гидокарбоновый Рецептор (АНР) в условиях *in vivo*. Основой тест-системы является созданная нами линия мух дрозофилы, трансформированная геном АНР человека. Ген АНР человека поставлен под контроль регулятора, обеспечивающего управляемость его экспрессии, что позволяет тестировать действие ксенобиотиков на онкогены в определённых органно-тканевых структурах.

Созданная тест-система оформлена в виде патента на изобретение и подана для регистрации в Федеральную службу по интеллектуальной собственности: «Способ оценки фармакологических и токсических свойств веществ – потенциальных лигандов АНР человека».



Рисунок 1. Фотографии глазных, крыловых и ножных структур дрозофил UAS>AhR, выросших на стандартной среде (верхний ряд – контроль – нормально развитые органы) и на среде с бета-Нафтофлавоном (нижний ряд – эксперимент – видны нарушения в развитии глаз, крыльев и конечностей мух, вызванные активацией Арил Гидрокарбонового Рецептора человека).



Рисунок 2. Повышение уровня экспрессии генов-мишеней Арил Гидрокарбонового Рецептора человека после его активации в организме мухи, измеренный ПЦР в реальном времени. По оси абсцисс - целевые гены Арил Гидрокарбонового Рецептора. По оси ординат – относительный уровень экспрессии. Синие столбики – контроль – экспрессия генов в особях, развивавшихся на стандартной среде. Красные столбики – экспрессия генов в особях, развивавшихся на среде с бета-Нафтофлавоном.

Раздел 3. Изучение генома тритона *Pleurodeles waltl* как основа для понимания молекулярно-генетических механизмов регенерации. Рук. Э.Н. Григорян (лаб. проблем регенерации)

Выявлены новые последовательности ДНК, кодирующие транскрипционные факторы и сигнальные молекулы, которые могут участвовать в регуляции регенерации тканей. Проведен скрининг библиотек кДНК, полученных для тритона *P. waltl*, с целью получения информации о нуклеотидных последовательностях, в том числе полноразмерных, для изучаемых нами ассоциированных с регенерацией генов.

Исследовалась экспрессия нескольких регуляторных факторов, предположительно определяющих способность клеток ретинального пигментного эпителия и пигментного эпителия радужки к восстановлению сетчатки и хрусталика глаза у тритона (*Oct4*, *Nanog*, *Klf4*, *Gnl3*, *Sox2*, *c-Myc* и др), конкретно исследовалась экспрессия генов и белков теплового шока (*hsp70*, *hsp90*) при регенерации тканей хвоста у тритонов - спинного мозга, позвоночника, мышц для определения их роли в процессе морфогенеза тканей этой структуры.

Завершен скрининг библиотек кДНК данного вида для изучаемых ассоциированных с регенерацией генов.

Полученные результаты позволяют подвести значительные итоги в представлениях о ключевых механизмах (каскадах) регуляторных путей, задействованных в процессе регенерации у модельного объекта низших позвоночных животных.

Накопленный потенциал исследований регенеративных процессов в тканях низших позвоночных в этом году был применен при исследовании протекания процессов регенерации в костном ложе в условиях влияния трансплантата.

Раздел 4. Молекулярно-генетические механизмы развития глаз позвоночных. Рук. Р.Д. Зиновьева (лаб. проблем регенерации, группа молекулярно-генетических механизмов онтогенеза)

Цель работы - комплексные исследования пространственных и временных особенностей экспрессии регуляторных генов из семейств PAX, PROX, PITX, VSX при развитии глаза позвоночных. Задачей работы является сравнение данных о пространственных и временных особенностях экспрессии генов, регуляторов развития глаза, из семейств Vsx у позвоночных животных и человека. Исследования этих генов необходимы для понимания генетического контроля формирования сетчатки позвоночных и причин возникновения аномалий развития глаза. Для характеристики степени дифференцированности клеток были использованы маркеры различных типов клеток глаза эмбрионов кур.

Исследовалась экспрессия маркеров малодифференцированных прогениторных клеток в тканях глаза позвоночных, в частности GNL3, PCNA и других, при формировании сетчатки глаза и изучалась внутриядерная локализация GNL3 и колокализацию с другими регуляторными белками, что позволило понять роль этого белка в ядерных механизмах контроля клеточных процессов. В глазу человека в пренатальном развитии нами идентифицированы транскрипционные факторы OCT4, NANOG, PAX6 (Фирсова и др., 2008, 2009), а в сетчатке глаза - белок ядрышка нуклеостемин, GNL3, которые принято считать маркерами плюрипотентного статуса ЭСК (Маркитантова, Зиновьева, 2012).

В подразделе по изучению молекулярно-генетических механизмов развития глаза позвоночных проведено сравнение пространственных и временных особенностях экспрессии генов, регуляторов развития глаза, из семейств Vsx у позвоночных животных и человека. Исследовалась роль ключевых транскрипционных факторов в регуляторных механизмах, связанных с дифференцировкой и самообновлением мультипотентных клеток, обнаруженных в различных отделах эмбрионального и взрослого глаза. По полученным результатам планируется публикация в специализированном журнале Molecular Vision.

Раздел 5. Изучение роли участков прикрепления хромосом к ядерной оболочке в функционировании генов при дифференцировке эмбриональных стволовых клеток. Рук. Глазков М.В. (лаб. регуляции морфогенеза, группа структурно-функциональной организации эукариотических хромосом)

Содержание работы: Изучение роли участков прикрепления хромосом к ядерной оболочке в функционировании (транс)генов при дифференцировке эмбриональных стволовых клеток в нейральные клетки. Задачи: - исследовать способность фрагментов яоДНК создавать в хромосомах мыши домен независимой (от места интеграции) экспрессии (транс)гена; - исследовать способность фрагментов яоДНК обеспечивать правильность «включения» экспрессии трансгена (в соответствии с его регуляторными элементами) при дифференцировке ЭСК в нейральные клетки; - исследовать способность фрагментов яоДНК обеспечивать эпигенетический статус трансгена в активном (нейральные клетки) и неактивном (ЭСК) состояниях.

В отчетном году исследовалась роль участков прикрепления хромосом к ядерной оболочке в функционировании генов при дифференцировке эмбриональных стволовых клеток: получены линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши, трансформированные конструкциями трансгена, определена эффективность данной трансформации ЭСК, уровень копийности и характер интеграции трансгена (тандемность, дисперсность) в каждой из трансгенных линий ЭСК.

Заключение

В рамках работы по данной Программе Президиума РАН реализовывалось несколько перспективных задач, характеризующих с разных позиций и методических подходов молекулярно-генетические механизмы дифференцировки клеток в норме и при воздействии различных факторов.

Получены перспективные к дальнейшему изучению закономерности эпителио-мезенхимного перехода (раздел 1).

Разработана тест-система для выявления и изучения специфичности действия ксенобиотиков, включая фармакологические средства, способные активировать транскрипционный фактор человека - арил гидрокарбонный рецептор (AHR) в условиях *in vivo* (раздел 2).

Получены результаты о ключевых механизмах (каскадах) регуляторных путей, задействованных в процессе регенерации у модельного объекта низших позвоночных животных (раздел 3), которые базируются на скрининг-анализе библиотек кДНК, полученных для тритона *P1. Waltl*.

Продолжалось комплексное исследование пространственных и временных особенностей экспрессии регуляторных генов из ряда семейств, актуальных для процесса развития глаза позвоночных (раздел 4).

На основе использования метода трансформационного конструктора, выявлены существенные закономерности, определяющие дифференцировку эмбриональных стволовых клеток (раздел 5).

В целом, по всем разделам исследований есть как экспериментальные, так и методические заделы для продолжения исследований в 2017 году.

Публикации по теме

Количество научных публикаций в журналах, индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования Web of Science (единиц):

- 1 Волгина Н.Е., Щипицына В.С., Хилькевич Е.Г., Чупрынин В.Д., Адамян Л.В., **Красный А.М.** Исследование роли окислительного стресса и уровня П-6 в перитонеальной жидкости в развитии эндометриоза // Иммунология. 2016. Т. 37. № 3. С. 181–184. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-3-181-184.
- 2 Шайхалиев А.И., Краснов М.С., Ильина А.П., Ямскова О.В., **Рыбакова Е.Ю.**, Свентская Н.В., Белецкий Б.И., **Ямскова В.П.**, Ямсков И.А. Влияние химической природы имплантационных материалов на протекание регенеративных процессов в костном ложе // Биофизика. 2016. Т. 61. №4. С. 813-822. DOI:10.1134/s0006350916040199

Прочие публикации

- 3 **Zotin A., Ozernyuk N.** Comparative study of aerial and aquatic respiration in periwinkles littorina // Nauka i studia. 2016. Т. 1. С. 8-18.
- 4 **Красный А.М.**, Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А., Волгина Н.Е., Сергунина О.А., Тютюнник Н.В., Беднягин Л.А. Окислительный стресс при преэклампсии и при нормальной беременности // Акушерство и гинекология. 2016. № 5. С. 90-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.5.90-94>.
- 5 Сыркашева А.Г., **Красный А.М.**, Майорова Т.Д., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. Изучение числа копий митохондриальной днк в ооцитах человека с различными морфологическими аномалиями // Молекулярная медицина. 2016. Т. 14. № 5. С. 37-41. /

Запланированный в ГЗ на 2016 год показатель, характеризующий объем работ, выполнен.

Отчет по Программе Президиума РАН утвержден решением Ученого совета ИБР РАН « 27 »
декабря 2016 г., протокол № 14