

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2018-0004

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690135-7

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН
А.В. Васильев
«27» декабря 2018 г.



ОТЧЕТ

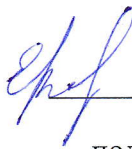
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В МОРФОГЕНЕЗЕ И ПРОЦЕССАХ
ВОССТАНОВЛЕНИЯ

по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»
Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

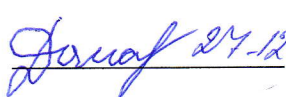
(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научн. сотр.,
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

 24.12.18
подпись, дата

Е.А. Воротеляк

Руководитель НИР,
главный научн. сотр.,
д-р биол. наук

 24.12.2018
подпись, дата

Е.И. Домарацкая

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный
сотрудник, доктор биологических наук,
член-корр. РАН

 27.12.18
подпись, дата

Е.А. Воротеляк
(Введение, раздел 3)

Руководитель, главный научный
сотрудник, доктор биологических наук

 27.12.18
подпись, дата

Е.И. Домарацкая (раздел
4)

Исполнители:

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор

 27.12.18
подпись, дата

В.В Терских (раздел 1)

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук

 27.12.18
подпись, дата

Э.Б. Дашинимаев (раздел
2)

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук

 27.12.18
подпись, дата

М.А. Александрова
(раздел 5)

Старший научный сотрудник, кандидат
мед. наук

 27.12.18
подпись, дата

А.В Кузнецова (раздел 5)

Старший научный сотрудник, кандидат
биол. наук

 27.12.18
подпись, дата

Я.Р. Мусинова (раздел 6)

Ведущий научный сотрудник, доктор
биол. наук

 27.12.18
подпись, дата

Е.С. Васецкий (раздел 6)

Главный научный сотрудник, доктор
биол. наук

 27.12.18
подпись, дата

В.Я. Бродский (раздел 7)

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических
наук

 27.12.18
подпись, дата

Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчёт 133 с., 7 разд., 37 рис., 6 таблиц, 156 источников, 22 публикации по теме
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, РЕГЕНЕРАЦИЯ, МОРФОГЕНЕЗ,
ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА, РАЗВИТИЕ, КОЖА, ВОЛОСЯНОЙ ФОЛЛИКУЛ,
ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ, НЕЙРАЛЬНАЯ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА, МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, НЕЙРАЛЬНЫЕ
ПРОГЕНИТОРЫ, ПЛАСТИЧНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ФЕНОТИПА, СИГНАЛЬНЫЕ
ПУТИ, ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА, КУЛЬТУРА
ГЕПАТОЦИТОВ, ЯДРЫШКО, ДЕРМАЛЬНАЯ ПАПИЛЛА, КЕРАТИНОЦИТЫ,
ЭПИГЕНЕТИКА, ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА, СИНДРОМ
ДАУНА, CRISPR/CAS9, ГЕННЫЙ НОКАУТ.

Целью данной работы является определение ключевых регуляторов (факторов) клеточной дифференцировки и морфогенеза, пластичности и перепрограммирования в моделях развития и регенерации.

Объектом исследования являются кожа человека и животных и ее придатки, а также культура клеток кожи, индуцированные плюрипотентные клетки с нормальным кариотипом и трисомией по 21 хромосоме (синдром Дауна), клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ), мезенхимные стромальные клетки (МСК) и кондиционированная ими культуральная среда, мышечная ткань, тканевые фрагменты и суспензия клеток эмбрионального неокортекса мыши, головной мозг мыши, культура клеток HeLa.

С использованием широкого спектра методических подходов и экспериментальных моделей проведены исследования механизмов регуляции клеточной дифференцировки, пластичности и морфогенеза в контексте онтогенеза и регенерации. Разработан протокол получения линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с нокаутированными генами для решения широкого круга задач. Проведён дозированный нокаут гена RCAN1 в культуре ИПСК человека с трисомией по 21-й хромосоме, показано, что уменьшение дозы гена RCAN1 в нейронах человека с трисомной 21-й хромосомой увеличивает экспрессию генов – маркеров нейральных стволовых клеток и дифференцированных нейронов. В культуре клеток РПЭ человека показано, под действием факторов роста клетки РПЭ репрограммироваться в сторону нейроэпителия, что аналогично процессам в сетчатке глаза человека, приводящим к дегенерации нейронов. При изучении механизмов дифференцировки эпидермальных кератиноцитов получены данные по пространственному взаимодействию генов кератинов и их энхансерных зон в кератиновом локусе, что перспективно для определения патогенеза заболеваний, связанных с нарушениями процессов дифференцировки в эпидермисе (ихтиоз, псориаз и др.). Продemonстрировано положительное действие паракринных факторов, выделенных из МСК, на регенерацию мышечной ткани. Показана стимуляция миграции эпителия в кожную рану под действием мелатонина. Полученные результаты создают предпосылки для развития новых технологий в биологии развития и биомедицине.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ.....	2
РЕФЕРАТ	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	9
Раздел 1. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза кожи и ее придатков. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток.....	9
1.1 Введение	9
1.2 Материалы и методы.....	9
1.3 Результаты и обсуждение	11
1.4 Заключение.....	16
1.5 Список использованных источников.....	17
Раздел 2 Нейральная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека.....	18
2.1 Введение	18
2.2 Материалы и методы.....	19
2.3 Результаты и обсуждение	25
2.4 Заключение.....	35
2.5 Список использованных источников.....	35
Раздел 3. Управляемое изменение дифференцировочного статуса клеток, в том числе с помощью генетического манипулирования и с использованием систем для микроманипулирования	37
3.1 Введение	37
3.2 Материалы и методы.....	38
3.3 Результаты и обсуждение	41
3.4 Заключение.....	66
3.5 Список использованных источников.....	67
Раздел 4. Стволовые и родоначальные клетки в индивидуальном развитии. Роль стволовых и родоначальных клеток в формировании и восстановлении тканей	69
4.1. Введение	69
4.2. Материалы и методы.....	71
4.3. Результаты и обсуждение	73
4.4. Заключение.....	82
4.5 Список использованных источников.....	83
Раздел 5. Механизмы пластичности стволовых и прогениторных клеток в процессах регенерации различных структур нервной системы	87
5.1 Введение.....	87

5.2 Материалы и методы.....	88
5.3 Результаты и обсуждение	91
5.4 Заключение.....	103
5.5 Список использованных источников.....	104
Раздел 6. Биогенез ядерных структур.....	107
6.1 Введение	107
6.2 Материалы и методы.....	108
6.3 Результаты и обсуждение	109
6.4 Заключение.....	113
6.5 Список использованных источников.....	115
Раздел 7. Изучение цитологических, биохимических и физиологических механизмов прямых межклеточных взаимодействий	120
7.1 Введение	120
7.2 Материалы и методы.....	120
7.3 Результаты и обсуждение	122
7.4 Заключение.....	126
7.5 Список использованных источников.....	127
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ.....	130

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчёте применяют следующие термины, обозначения и сокращения с соответствующими определениями:

АГМ – аорто-гонадо-мезонефральный район
ВКМ - внеклеточный матрикс
ДМСО – диметилсульфоксид
ДП – дермальная папилла
ИПСК – индуцированные плюрипотентные клетки
ИЦХ - иммуноцитохимия
КС – кондиционированная среда
ГКП - губка коллагеновая пористая
м-РНК - матричная рибонуклеиновая кислота
МСК – мезенхимные стромальные клетки
ЛП – латентные прогениторы
НСК – нейральные стволовые клетки
ПЦР - полимеразная цепная реакция
РПЭ - ретинальный пигментный эпителий
СКК – стволовые кроветворные клетки
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
DSCR – Downsyndromecriticalregion (критическая область синдрома Дауна)
FGF2 - фактор роста фибробластов 2
GFP – greenfluorescentprotein (зеленый флюоресцирующий белок)
SIS - децеллюляризированный подслизистый слой тонкой кишки
VEGF - фактор роста сосудистого эндотелия

ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ

Дифференцировка, регенерация и морфогенез охватывают широчайший спектр биологических явлений в процессе онтогенеза живых организмов. Тканевая дифференцировка и морфогенез становятся в последнее время одними из центральных задач клеточной биологии и биологии развития. Особое значение изучение этих проблем приобретает в связи с развитием клеточных технологий. Реализация результатов исследований позволит добиться качественно нового уровня лечения многих социально значимых заболеваний, таких как травмы (ожоги, трофические язвы, дефекты опорно-двигательного аппарата, недостаток тканей после удаления опухолей и др.), сахарный диабет, цирроз печени. Биология стволовых клеток и клеточные технологии, основанные на применении стволовых клеток в медицинской практике, занимают ведущее место в современных биомедицинских исследованиях. В то же время, исследования в области гисто- и морфогенеза, а также регенерации, клеточной пластичности, перепрограммирования и других современных подходов клеточной и молекулярной биологии позволяют получить принципиально новые данные по фундаментальным механизмам развития и регенерации.

Для исследований в области дифференцировки, регенерации и морфогенеза используются самые различные экспериментальные модели. В данной работе в качестве объектов исследования использовали кожу человека и животных и ее придатки, а также культуру клеток кожи, систему дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток с нормальным кариотипом и трисомией по 21 хромосоме (синдром Дауна) в нейральном направлении, клетки ретинального пигментного эпителия, мезенхимные стромальные клетки и кондиционированная ими культуральная среда, мышечная ткань, тканевые фрагменты и суспензия клеток эмбрионального неокортекса мыши, головной мозг мыши, культура клеток HeLa.

Использованные подходы, в целом, можно разделить на две группы – в первой группе исследовали внутриклеточные механизмы влияния генетических и эпигенетических изменений на процессы дифференцировки. Это, прежде всего, разработка протоколов генетического редактирования клеток, в том числе нокаутирования генов с помощью системы CRISPR/Cas9, создания модельных систем для изучения функций ядрышковых белков, исследование эпигенетической регуляции кератиновых локусов в клетках эпидермиса, индукция репрограммирования клеток ретинального пигментного эпителия человека с помощью факторов роста. Вторая группа работ связана с изучением морфогенеза и регенерации с использованием моделей органов

(культивирование волосяных фолликулов человека) или тканевой регенерации *in vivo* (заживление кожной раны, регенерация мышц, трансплантация в мозг).

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности и актуальности выбранного направления работ.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Раздел 1. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза кожи и ее придатков. Дифференцировочный и морфогенетический потенциал эпителиальных стволовых клеток

1.1 Введение

В настоящее время культивирование клеток и тканевых эксплантов *in vitro* находит широкое практическое применение в фармацевтике и медицине. Органные культуры в некоторых случаях являются незаменимым объектом для широчайшего спектра исследований на молекулярном и биохимическом уровнях, в том числе и для изучения влияния пролиферативных и цитотоксических эффектов различных химических веществ и фармацевтических препаратов. Такие методы позволяют помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования новых химических препаратов на стадии их доклинических исследований. Одним из типов органических культур является культивирование волосяных фолликулов человека, позволяющее наблюдать рост и функционирование фолликула. Для широкого спектра исследований используют также культуры выделенных из волосяного фолликула человека клеток – в частности, культуру клеток дермальной папиллы (ДП). В качестве модельного препарата в данном исследовании использовали миноксидил – один из двух зарегистрированных препаратов для лечения алопеции.

Одним из классических объектов для изучения морфогенеза и клеточной дифференцировки является эпидермис. Эпидермальные кератиноциты в зависимости от степени дифференцировки экспрессируют различные типы кератинов. Дифференцировка, в частности, регулируется путем регуляции транскрипции мРНК. В ходе дифференцировки кератиноцитов происходит переключение программы экспрессии генов с кератинов 5 и 14 на кератины 1 и 10. Механизмы этого переключения на сегодняшний день, во многом, остаются не ясными.

1.2 Материалы и методы

Клеточные и органические культуры

В работе использовали экспланты волосяных фолликулов и эпителиальные клетки кожи (кератиноциты) человека. Клетки и экспланты получали из кожи пациентов, проходящих операции по косметической кожной пластике (круговая подтяжка лица), каждый тип культуры был получен минимум от трех доноров, женщин, в возрасте от 42 до 61 года.

Разработка модели эксплантов волосяного фолликула

Получение органной культуры волосяных фолликулов.

Биоптаты кожи были получены от 3 доноров (донор 4 – 51 год, донор 5 – 50 лет, донор 9 – 60 лет; все доноры – женского пола, европеоидной расы, цвет волос - русый). С помощью скальпеля вырезали отдельные фолликулы, сохраняя ДП и эпителий фолликула. Каждый изолированный фолликул помещали в лунку 24-луночного плата с площадью дна лунки 1,9 см² и добавляли 0,5 мл рабочего раствора опытных веществ, приготовленных на среде Вильямса (Gibco), с добавлением 2mM L-глутамин (GlutaMAX), 250 нг/мл гидрокортизона, 10 мкг/мл инсулина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Волосы культивировали в течение 4 недель, смену среды производили через день, фотографировали каждые 3-7 дней. От каждого донора использовали 4 экспланта на экспериментальную группу.

Морфометрический анализ роста волос в культуре.

Для фотографирования волосяных фолликулов использовали цифровую камеру ЦК-3.0, которую устанавливали на бинокляр, такая система позволила захватывать более широкое поле зрения, достаточное для обозрения волосяного фолликула человека, по сравнению с инвертированным микроскопом. Длину волоса измеряли по фотографиям с помощью аналитической программы ImageJ.

Приготовление растворов миноксидила.

Миноксидил растворяли в среде Вильямса. Сначала готовили стоковые растворы (0,25% миноксидила), из которых непосредственно перед экспериментом готовили рабочие растворы, разводя до необходимой концентрации стоковые растворы средой.

1.2.1.4 Статистическая обработка результатов. При обработке результатов оценивали значение средней величины, стандартное отклонение от значения средней величины (SD) в эксперименте с клетками ДП и значение стандартной ошибки среднего (SEM) в эксперименте с эксплантами. Построение графиков проводили в программе Excel (Microsoft). Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$ (t-тест), что является мерой достаточной надежности результатов. Для сравнения данных проводили корреляционный анализ, коэффициент корреляции Пирсона рассчитывали в программе EXCEL.

Исследование эпигенетической регуляции кератинового локуса

Подготовка клеток

Эпидермальные кератиноциты, полученные в результате ферментативной обработки кожи человека, фиксировали (10 млн клеток 2% формальдегидом 10 мин при комнатной температуре) и инкубировали с антителами к кератину 5 и кератину 10. С

помощью сортера популяции кератин 14 – и кератин 10 – положительных клеток разделяли.

Карта топологически ассоциированных доменов хроматина локуса кератинов II типа (12q13.13) получена с использованием метода обогащения фрагментов Hi-C библиотеки по протоколу C-TALE [1]. В этом протоколе для приготовления зондов используется бакмидная ДНК (ДНК одной или нескольких бакмид, перекрывающих интересующий регион генома), дробленая ультразвуком. К смеси таких фрагментов ДНК лигируются адапторы. Для мечения полученной библиотеки зондов используется ПЦР с биотинилированными праймерами. Биотинилированные ПЦР-продукты в дальнейшем гибридизуются с Hi-C или 3C-seq библиотеками. Для достижения максимальной эффективности обогащения используются в C-TALE дополнительный раунд гибридизации. Для построения Hi-C карт с высоким разрешением в областях обогащения протяженностью до полутора миллионов п.о. требуется всего порядка 10 миллионов парноконцевых прочтений. На полученных методом C-TALE Hi-C картах довольно четко различимы топологические домены и петли.

1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1. Разработка модели и оценка динамики удлинения стержней волосяных фолликулов при их культивировании в присутствии миноксидила.

Полноценные волосяные фолликулы, включающие эпителиальную часть, волосяную воронку и луковицу могут быть получены микрохирургической техники. Фотографии волосяного фолликула могут быть получены с помощью цифровой камеры ЦК-3.0, которая устанавливается на бинокляр, позволяя захватить широкое поле зрения, достаточное для обозрения всего волосяного фолликула человека (Рисунок 1.1).

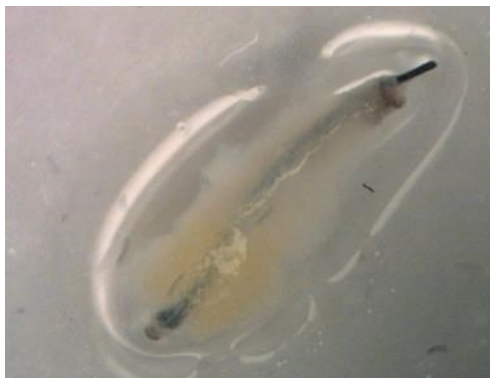


Рисунок 1.1 - Волосяной фолликул, полученный из кожи человека

Волосяные фолликулы, полученные из волосистой части головы, помещали в 24-луночное плато (один фолликул на лунку, 4 лунки на экспериментальную группу) и

культивировали в течение 4 недель. В выборе концентрации миноксидила принимали во внимание данные литературы о том, что при системном приеме миноксидила в плазме крови его концентрация достигает 775 μM через час после приема, что примерно соответствует 0,02% раствору миноксидила [2], и данные статьи, в которой наблюдали наибольшее удлинение стержня волоса при концентрации миноксидила 1mM (соответствует 0,02% раствору) [3].

Снимали показания длины стержня волоса на 0 (исходная длина стержня волоса), 5, 8, 14, 21 и 28 сутки. Проводя подсчеты по всем группам, мы обнаружили, что рост стержня волоса наблюдается только первые 5 дней (Рисунок 1.2), при последующем культивировании длина стержня не изменяется или регрессирует, что может свидетельствовать о переходе волосяного фолликула в стадию катаген, эти данные согласуются с данными других исследований [4].

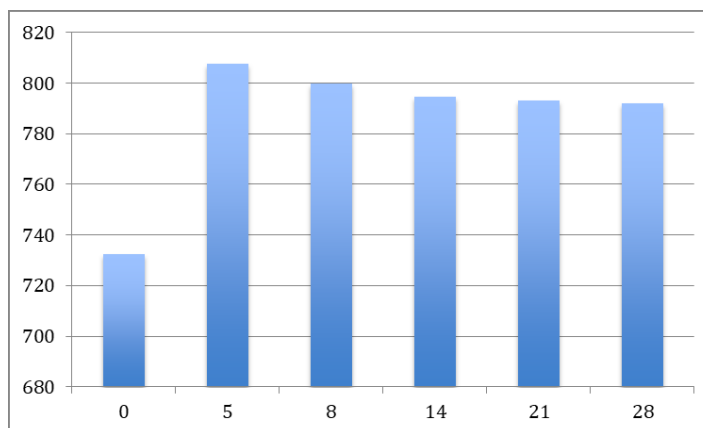


Рисунок 1.2 – Динамика роста стержня волоса во времени. На 5 сутки наблюдается наибольший прирост длины стержня волоса, при дальнейшем культивировании рост останавливается. По оси Y – значения прироста длины стержня волоса в относительных единицах; по оси X – сутки

Мы проанализировали прирост стержня волоса на 5 и 28 сутки при культивировании эксплантов в контрольной среде и в среде, содержащей 0,02% миноксидила. Результаты варьировали внутри групп и между донорами, статистически значимый положительный эффект по стимулированию роста волоса миноксидилом не был выявлен.

Был проведен дополнительный эксперимент на эксплантах волос с концентрацией миноксидила, уменьшенной в 10 раз (0,002% раствор миноксидила). Было выявлено увеличение длины стержня в группе миноксидила, различия статистически незначимы (Рисунок 1.3).

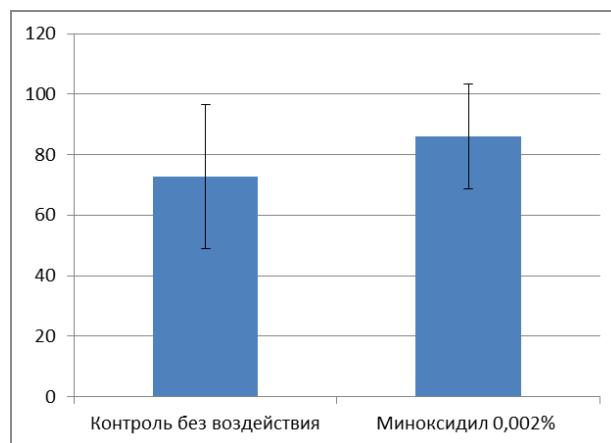


Рисунок 1.3 – Оценка динамики роста волос при культивировании эксплантов в присутствии миноксидила 10-кратной уменьшенной концентрации в течение 5 суток. По оси Y – значения прироста длины стержня волоса в относительных единицах. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM

Полученные результаты свидетельствуют, во-первых, о большой зависимости получаемых в этой модели данных от индивидуальных особенностей донора и конкретных волосяных фолликулов и, во-вторых, о необходимости дополнительных исследований по подбору оптимальной концентрации препарата.

Для дальнейшего развития исследований в области волосяного фолликула ведутся также работы по получению клеток дермальной папиллы из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [5]. Выделенные из волосяного фолликула клетки (клетки дермальной папиллы и постмигранторные клетки нервного гребня) изучаются в плане их возможного использования в регенеративной медицине в качестве компонентов дермальных эквивалентов для лечения кожных ран [6, 7] и трансплантатов для стимуляции регенерации нервной системы [8]. В обзорах литературы, выполненных за отчетный год, рассматриваются вопросы, касающиеся биологии стволовых клеток, в том числе эпителиальных – роль внеклеточного матрикса в регуляции судьбы стволовых клеток [9], а также исторический обзор, рассматривающий истоки появления концепции стволовой клетки и ее развитие в XX веке [10]. Прослежено изменение трактовки термина «стволовая клетка» в ходе развития биологической науки в XIX веке и возникновения клеточной биологии во второй половине XX века.

1.3.2. Исследование эпигенетической регуляции кератинового локуса

В соответствии с рядом эпигенетических профилей (приведены под картами на Рисунок 1.4), полученных в рамках проекта ENCODE для близкородственной клеточной линии нормальных эпидермальных кератиноцитов, в исследуемом районе были выявлены две потенциальные энхансерные области (Enh1 и Enh2, выделены голубым). C-TALE-

анализ показывает, что на обеих стадиях дифференцировки данные области контактируют друг с другом с высокой частотой (участок карты #3), тем самым изолируя локус кератиновых генов в протяжённой хроматиновой петле. Интересно, что конфигурация пространственных взаимодействий внутри петли отличается на двух стадиях дифференцировки. В клетках, экспрессирующих кератин-5, этот ген контактирует с обеими энхансерными зонами (участки карты #1 и #4), в то время как ген кератина-1, неактивный в этих клетках, не образует контакта с энхансерами (участки карты #2 и #5). Переключение экспрессии с кератина-5 на кератин-1 сопровождается реконfigurацией пространственных контактов внутри петли: ген кератина-1 теперь формирует контакты с Enh1 и Enh2, в то время как для гена кератина-5 эти контакты утрачиваются.

Полученные данные позволяют предположить, что участки Enh1 и Enh2 являются регуляторными элементами, управляющими экспрессией внутри локуса кератиновых генов. Дальнейшее исследование архитектуры этих областей, а также пространственной организации и эпигенетического статуса локуса (в том числе в других линиях кератиноцитов) позволит раскрыть механизмы переключения экспрессии кератиновых генов и идентифицировать белковые факторы, ответственные за этот процесс.

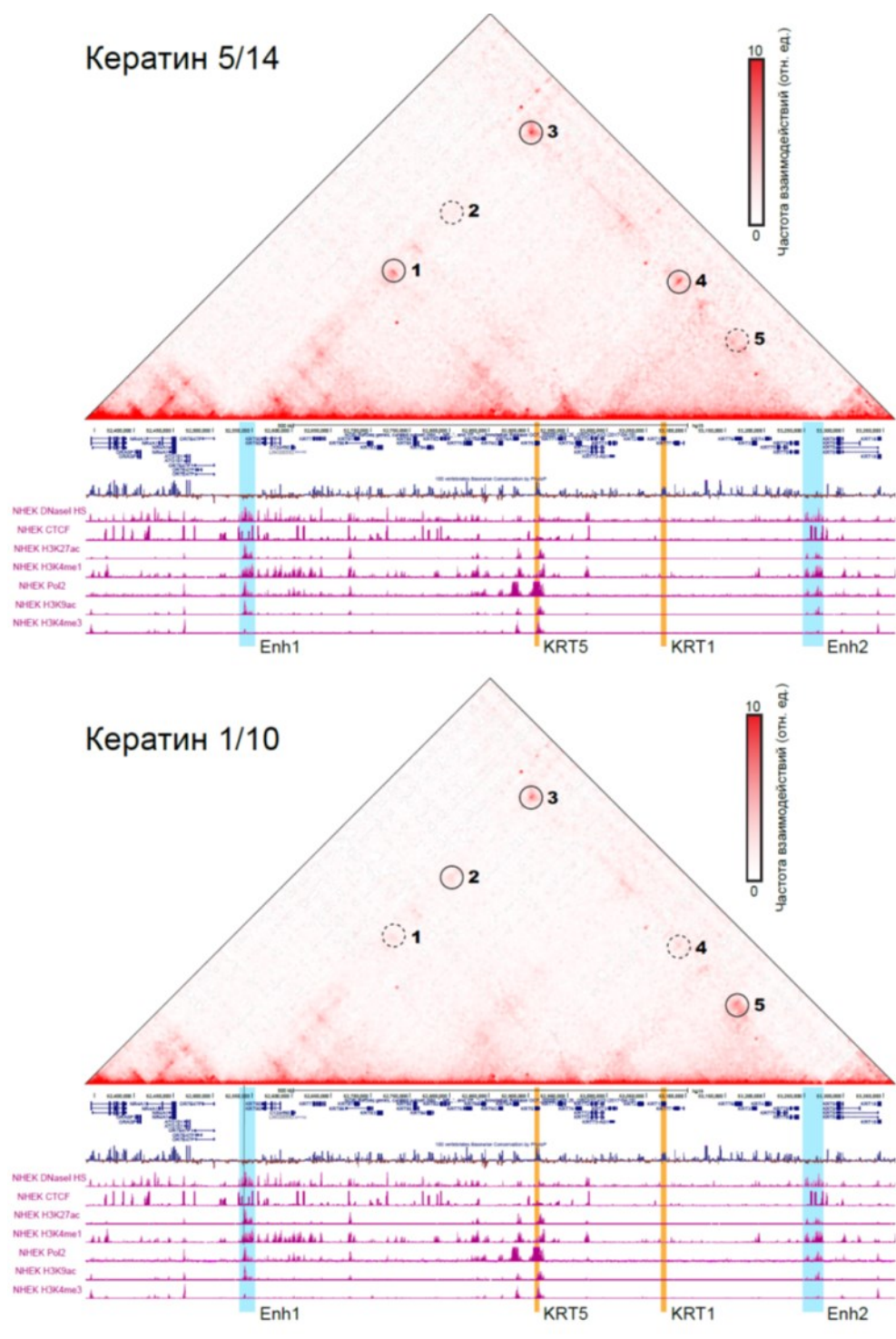


Рисунок 1.4 - Представлена тепловая карта пространственных взаимодействий участков хроматина внутри геномного региона 52.339.230-53.365.366 на хромосоме 12 на двух стадиях дифференцировки нормальных кератиноцитов кожи человека. Карта получена с использованием метода обогащения фрагментов Hi-C библиотеки по протоколу C-TALE (Ulianov et al. 2017). Разрешение - 5 т.п.н. Интенсивность цвета пикселей карты пропорциональна частоте взаимодействий между соответствующими участками хромосомы.

1.4 Заключение

Исследования дерматологических и косметологических препаратов на культуре клеток человека стало золотым стандартом доклинических исследований. Это связано с запретом в Европейском союзе тестирования подобных веществ на лабораторных животных, а также существенными различиями в строении и физиологии кожи лабораторных грызунов, обычно используемых для такого рода тестов, и человека. Препараты, разрабатываемые для стимуляции и поддержания роста волос, оказывают свое влияние, прежде всего, на специализированные клетки волосяных фолликулов. В настоящее время имеется возможность культивирования специализированных клеточных типов кожи и волосяных фолликулов человека. Для интегральной оценки действия разрабатываемых препаратов на активность волосяного фолликула использовали метод эксплантов. Поскольку в культуре клетки непосредственно и интенсивно взаимодействуют с вносимыми в культуральную среду веществами, эффект последних оказывается зачастую гораздо сильнее, чем можно предположить, исходя из имеющихся или предполагаемых эффектов использования на организме. В эксперименте с эксплантами наблюдали большую зависимость получаемых данных от индивидуальных особенностей донора и конкретных волосяных фолликулов. Выделенные из волосяного фолликула клетки изучаются в плане их возможного использования в регенеративной медицине.

Полученные данные по эпигенетической регуляции кератинового локуса позволяют предположить, что участки Enh1 и Enh2 являются регуляторными элементами, управляющими экспрессией внутри локуса кератиновых генов. Дальнейшее исследование архитектуры этих областей, а также пространственной организации и эпигенетического статуса локуса (в том числе в других линиях кератиноцитов) позволит раскрыть механизмы переключения экспрессии кератиновых генов и идентифицировать белковые факторы, ответственные за этот процесс.

1.5 Список использованных источников

- 1 Ulianov S.V., Galitsyna A.A., Flyamer I.M., Golov A.K., Khrameeva E.E., Imakaev M.V., Abdennur N.A., Gelfand M.S., Gavrilov A.A., Razin S.V. Activation of the alpha-globin gene expression correlates with dramatic upregulation of nearby non-globin genes and changes in local and large-scale chromatin spatial structure//Epigenetics Chromatin. - 2017. – V. 10. P. 35.
- 2 Boyera N., Galey I., Bernard B.A. Biphasic effects of minoxidil on the proliferation and differentiation of normal human keratinocytes//Skin Pharmacol. - 1997. – Vol. 10(4). P. 206-20.
- 3 Han J.H., Kwon O.S., Chung J.H., Cho K.H., Eun H.C., Kim K.H. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle//J Dermatol Sci. - 2004. – Vol. 34(2). P. 91-8.
- 4 Thuangtong R., Maneeprasopchoke P., Srisawat C., Vatanashevanopakorn C., Hanamornroongruang S., Junnu S., Suvanasuthi S. In vitro Culture and Histological Characterization of Extracted Human Hair Follicles//J Clin Exp Dermatol Res. -2013. - 4:182.
- 5 Chermnykh E.S., Kalabusheva E.P., Sharobaro V.I., Vorotelyak E.A. Generation of folliculogenic human dermal papilla cells from induced pluripotent stem cells//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 153 - 153. WOS:000437674102148.
- 6 Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. Hair follicle dermal papilla cells as a potential novel source for diabetic wound healing // Wound Rep Reg. 2018. A8. DOI: 10.1111/wrr.12643. (WoS) WOS:000448193100108
- 7 Meleshina A.V., Rogovaya O.S., Dudenkova V.V., Sirotkina M.A., Lukina M.M., Bystrova A.S., Krut V.G., Kuznetsova D.S., Kalabusheva E.P., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A., Zagaynova E.V. Multimodal label-free imaging of living dermal equivalents including dermal papilla cells//Stem Cell Research and Therapy. - 2018. - Vol. 9, N 1. P. 84. DOI: 10.1186/s13287-018-0838-9.
- 8 Kosykh A.V., Beilin A.K., Sukhinich K.K., Vorotelyak E.A. Postnatal neural crest stem cells from hair follicle interact with nerve tissue *in vitro* and *in vivo*//Tissue and Cell. - 2018. - Vol. 54. P. 94-104. DOI: 10.1016/j.tice.2018.08.005.
- 9 Chermnykh E., Kalabusheva E., Vorotelyak E. Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate//International Journal of Molecular Sciences (IJMS). -2018. - Vol. 19, N 4. P. 1003. DOI: 10.3390/ijms19041003.
- 10 Суханов Ю.В., Воротеяк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. 150 лет концепции «стволовая клетка»//Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2018. - Т. 104, № 1 - 12. С. 18 - 30.

Раздел 2 Нейтральная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека

2.1 Введение

Синдром Дауна – широко распространённая форма геномной патологии (как правило трисомия 21-й хромосомы), ведущая к тяжёлым порокам развития. Частота синдрома Дауна среди новорожденных в среднем равна 1:700. Синдром Дауна является острой медицинской и социальной проблемой, так как люди с синдромом Дауна требуют повышенного внимания и медицинского ухода, поскольку помимо ярко выраженного снижения когнитивных способностей, пациенты имеют высокий риск врождённых пороков сердца, миелоидных лейкозов (самая крупная популяция людей с наследственной предрасположенностью), ранним развитием болезни Альцгеймера, катарактой, пороками ЖКТ, снижением иммунитета [1]. Синдром Дауна активно изучается и наблюдаемый при нём фенотип широко описан, однако остаются неясными многие молекулярные аспекты этого состояния. Так, например, до сих пор не выяснены многие сигнальные и метаболические нарушения, появляющиеся в следствие трисомии 21-й хромосомы.

Наиболее часто встречающаяся форма синдрома Дауна – это стандартная трисомия по 21 хромосоме (85% всех случаев), возникающая из-за нерасхождения материнских хромосом в созревающей яйцеклетке [2]. 21 хромосома содержит более 300 генов, большинство из которых считаются дозозависимыми, то есть их признаки проявляются тем ярче, чем выше количество данных генов в кариотипе клетки. Увеличение дозы генов только одной хромосомы вызывает сложные перегруппировки различных молекулярных каскадов экспрессии, поскольку продукты транскрипции некоторых генов 21 хромосомы оказывают регулирующее влияние на экспрессию генов других хромосом, приводя в конечном итоге к общему дисбалансу экспрессии генов [3]. Помимо трисомии 21-й хромосомы, к синдрому Дауна могут приводить другие хромосомные аномалии, заключающиеся в трипликации некой части 21-хромосомы и ее транслокации на другие хромосомы. Развитие методов молекулярного кариотипирования и анализ случаев с транслоцированными частями, позволило предположить, что лишь ограниченный участок 21 хромосомы может быть ответственен за проявление фенотипа синдрома Дауна. В результате изучения корреляции экспрессии конкретных генов с определёнными аспектами болезни, была выделена наименьшая хромосомная область, обязательно встречающаяся среди индивидуумов с синдромом Дауна, названная «критической областью синдрома Дауна» (DSCR). Данный участок находится в локусе 21q22.12, содержит около 33 генов и, как было показано, связан с такими особенностями синдрома

Дауна, как черепно-лицевые аномалии, низкий рост, гипотония и умственная отсталость [4,5].

Один из генов, лежащих в DSCR – ген RCAN1 кодирует белок-ингибитор кальциневрин-зависимых сигнальных путей. Хроническая избыточная экспрессия этого гена может приводить к появлению нейрофибриллярных клубков, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Так же было показано, что избыточная экспрессия RCAN1 при синдроме Дауна приводит к ингибированию фактора роста нервных клеток NGF через рецептор симпатических нейронов TrkA, что в свою очередь приводит к нарушению нейротрофической поддержки нейронов, резко ухудшает их выживаемость и может являться причиной дефицита нервной системы при синдроме Дауна [6]. Важность дозы гена RCAN1 отмечалась при изменении поведенческих реакций у *Drosophila melanogaster* и умственной отсталости у мышей, избыточная экспрессия гомолога RCAN1 приводили к увеличению в нейронах уровней активных форм кислорода и числа митохондрий, а также снижению уровней АТФ и содержания митохондриальной ДНК. Эти результаты предполагают, что RCAN1 также участвует в регуляции нейронального окислительного стресса и процесса нейротрансмиссии в синапсах [7]. Было замечено, что чрезмерная экспрессия RCAN1 также изменила способность клеток нервного гребня генерировать пропорционально меньшее количество нейронов и увеличенное количество астроцитов и олигодендроцитов в культурах клеток, полученных от мышинных моделей синдрома Дауна Ts65Dn и Ts1Cje [8,9].

В связи с этим, в нашем исследовании мы попытались изучить влияние гена RCAN1 на такие характеристики нейральных стволовых клеток человека, как их дифференцировочный потенциал и экспрессия нейральных маркеров. Для этого, мы использовали модель нервной ткани синдрома Дауна *in vitro*, выполненной на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках с трисомией 21-й хромосомы (T21) дифференцированных в нейральном направлении. При помощи системы редактирования генома CRISPR/Cas9 мы сделали дозированный нокаут гена RCAN1 в этих клетках, и попытались оценить, как это повлияло на их характеристики.

2.2 Материалы и методы

Культура клеток.

Линия клеток hiPSC-KYOU с нормальным кариотипом была куплена в клеточном банке ATCC, линия hiPSC-dyp0730 от донора с синдромом Дауна (трисомия 21-й хромосомы). Обе линии культивировали в среде mTeSR1 (#85850, Stem Cell Technologies, Канада) в культуральной посуде с покрытием Matrigel (#356234, BD Bioscience, США) при

37°C, 5% O₂, 5% CO₂. Для пассажа клетки обрабатывали Dispase (1 мг / мл, SCT), ресуспендировали в PBS, осаждали центрифугированием (200g, 5мин, RT), осадок ресуспендировали в mTeSR1, и рассевали в необходимой плотности.

Дифференцировка в нейральном направлении.

После посева клетки поддерживали в среде mTeSR1, дополненной 5-кратной добавкой 5 мкМ ROCKi (Y27632, Abcam ab120129 при 37°C, 5% O₂ и 5% CO₂ в течение трёх суток. Затем клетки переводили на среду NIK (PSC Neural Induction Medium, ThermoFisher #A1647801), состоящую из Neurobasal medium (1x), NIK supplement (50x), Glutamax (100x), PenStrep (100x) для дифференцировки в нейральные стволовые клетки. После трёх пассажей на среде NIK культуру клеток поддерживали на среде NPM Neural Proliferation Medium (#05751, Stem Cell Technologies, Канада), состоящую из DMEM + DMEM / F12 (Gibco, 21331020) в равной пропорции, B27 supplement (1x), 1 мМ GlutaMax (Gibco, 35050038), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, 1160039), PenStrep (100x), 100 нг / мл EGF, bFGF (PeproTech, США). После трёх пассажей на NPM, клетки вводили в терминальную нейрональную дифференцировку - на среде N2B27, состоящую из DMEM / F12 (Gibco, 21331020) + Neurobasal Medium (Stem Cell Technologies, Канада) в равной пропорции, N2- supplement (Gibco, США), B27- supplement (Gibco, США), β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, США), 1 мМ GlutaMax (Gibco, 35050038), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, 1160039), PenStrep (100x) в течении 14-21 дней.

Получение нейросфер.

Клеточные сфероиды получали методом «висячей капли». Монослойные клеточные культуры на 3-м пассаже снимали с чашек при помощи Диспазы (1мг/мл в DMEM/F12), подсчитывали количество клеток, осаждали центрифугированием 5 мин при 1500 об/мин, ресуспендировали осадок в среде NIK до конечной концентрации 750000 клеток/мл. Для получения «висячих капель» из полученной суспензии на крышку 100-мм чашки Петри (Corning) наносили капли объемом 20 мкл. Для предотвращения испарения в чашку добавляли 5 мл среды DMEM / F12. Клетки культивировали в «висячих каплях» в стандартных условиях CO₂ -инкубатора (5% CO₂, 37°C) в течение 1 сут. На следующие сутки сформировавшиеся сфероиды переносили в 60-мм чашки Петри и культивировали в среде NIK, среду меняли раз в два дня. Для получения вторично прикрепленных культур сфероиды после 5 суток культивирования в суспензионном состоянии помещали на пластик, обработанный Матригелем и переводили на среду N2B27.

Иммуноцитохимия

Перед окраской антителами, клетки промывали один раз раствором PBS, после чего фиксировали 4%-м параформальдегидом 15 мин при комнатной температуре. Далее

промывали 3 раза раствором PBS и окрашивали последовательно первичными и вторичными антителами, растворенными в блокирующем растворе (PBS + 10%FBS + 0,1% Tryton-X-100). После каждой окраски клетки трижды промывали PBS. Перед съемкой препараты докрашивали раствором DAPI (1 мкг/мл в PBS). Изображения были получены с помощью флюоресцентной микроскопии на приборе EVOS FL Auto («Life Technologies»)

Выделение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК использовали порядка $1-3 \cdot 10^6$ клеток. Клетки снимали с чашек трипсином, центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (1 М Tris, 5 М NaCl, 0,5 М EDTA, 10% SDS, 100x Proteinase K, pH=8.0) и инкубировали при +37°C в течение 1-2 ч для прохождения лизиса клеток. Лизат клеток экстрагировали фенолом, центрифугировали 2 мин 10 тыс.об/мин, затем экстрагировали хлороформом, повторяли центрифугирование 2 мин 10 тыс.об/мин, затем мягко экстрагировали изопропанолом (в этот момент геномная ДНК выпадает из раствора в виде полупрозрачного клубка нитей) и повторяли центрифугирование 2 мин 10 krpm. Выделенную ДНК подсушивали и растворяли в чистой воде свободной от нуклеаз.

Выделение тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК из исследуемых клеток применяли набор «Rneasy Mini Kit» (Cat# 74106) фирмы «Qiagen» для выделения тотальной РНК на колонках согласно инструкции производителя. Для выделения тотальной РНК использовали порядка 10^6 клеток. Примеси геномной ДНК удаляли с помощью «RNase free DNase Set» (Cat# 79254) фирмы «Qiagen». Концентрацию РНК в полученном растворе измеряли с помощью спектрофотометрического анализа с использованием спектрофотометра «BioPhotometer plus» фирмы «Eppendorf».

Обратная транскрипция

Для обратной транскрипции полученной РНК использовали набор «Обратная транскриптаза MMLV» (Cat# SK022) фирмы «Евроген» согласно инструкции производителя. В качестве праймеров использовались olig(dT)-праймеры. В реакцию синтеза кДНК вносили 1,8 микрограмм полученной ранее РНК.

ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали 5x реакционную смесь «HS-SYBR+ROX» (Cat# PK149L) фирмы «Евроген». ПЦР-анализу подвергалась кДНК, полученная в ходе обратной транскрипции. В данной работе использовали амплификатор «BioRad термоциклер CFX96» фирмы «BioRad». Праймеры подбирались с помощью программы PrimerBlast. Эффективность ПЦР определяли с помощью построения

стандартной кривой, специфичность амплификации по кривой плавления. Для определения относительных уровней экспрессии исследуемых генов использовался $\Delta\Delta C_t$ метод.

Нокаутирование генов RCAN1 и RUNX1

Для геномного редактирования ИПСК с T21 мы использовали систему CRISPR/Cas9, гидовые РНК подбирались с помощью он-лайн ресурсов pubmed.gov, ensembl.org, csispr.mit.edu (в настоящий момент не работает, приемлемой заменой может служить crispor.tefor.net). Гидовые РНК клонировали в вектор pU6-BbsI-gRNA (данная плазмида была любезно предоставлена в наше использование профессором Скрыбиным Б.В., Университет г.Мюнстер, Германия). Синтез плазмиды кодирующей белок Cas9 вместе с флуоресцентным белком EGFP была заказана нами в компании «Евроген». Доставка генетических конструкторов, кодирующих элементы системы редактирования осуществлялась с помощью электропорации на приборе (BioRad Gene Pulser X Cell). После электропорации, клетки высевали на чашки, покрытые матригелем. Эффективность трансфекции составляла в среднем 2%. Через 48 часов проводился клеточный сортинг на приборе BioRad S3e Cell sorter, на котором отбирали популяцию клеток с зеленой флуоресценцией. После сортирования клеточную культуру подвергали клонированию малым разведением. Для этого в 6-см чашку Петри, покрытую матригелем высевали порядка 500-1000 клеток в среде mTesr1. Через две недели клоны изолировали и проводили скрининг. Для первичной детекции делеций проводился ПЦР анализ наличия делетированных ампликонов, а также T7E1 анализ, который также позволяет оценить наличие мутантных аллелей. Наличие мутаций подтверждалось также с помощью HRM-анализа и цифрового капельного ПЦР. Далее для выбранных клонов проводили секвенирование аллелей. Для этого проводили клонирование ампликонов полученных в результате ПЦР в TA-вектор (Евроген, № TA002), после чего отдельные плазмиды полученные от разных бактериальных клонов отдавались на секвенирование в компанию Евроген.

ПЦР анализ

Для проведения ПЦР использовали амплификатор «Термоциклер C100 Touch» компании «BioRad». ПЦР проводили в микропробирках на 200 мкл; для амплификации использовали готовые наборы «ScreenMix» производства компании «Евроген». Температуру отжига для каждого праймера определяли с помощью программы PrimerBlast, а также опытным путем. Температурно-временные параметры амплификации для праймеров включали предварительную денатурацию при 95°C (5 мин.), 30 циклов, состоящих из денатурации при 95°C (30 с.), отжига праймеров при соответствующей для

них температуре (Таблица 2.1) – 30 сек., элонгации 72°C (50 с.); финальный досинтез 72°C (5 мин.).

Таблица 2.1 - Используемые в работе праймеры для анализа результатов работы системы CRISPR/Cas9

Название	Последовательность 5'-3'	Температураотжига
RCAN1-FW	TCAACTCCTTTTATTTTAT	53 °C
RCAN1-RV	ACTTCATTTTCCTTTCCCAGA	

Результаты амплификации регистрировали после электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в геле-документирующей системе «Chemi Doc™ MP ImagingSystem» компании «BioRad». Размер продукта ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса FastRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder 10-200 п.н. (Thermo Scientific). Для проверки контаминации реакционной смеси и эффективности ПЦР в каждый эксперимент включали отрицательный контроль (вода, свободная от ДНК и РНК).

T7E1 анализ

Для проведения T7E1 анализа была выполнена амплификация интересующего локуса фрагмента гена RCAN1 по праймерам: 5'-TCAACTCCTTTTATTTTAT-3', 5'-ACTTCATTTTCCTTTCCCAGA-3'. Использовалась 5x реакционная смесь «ScreenMix» (Cat#PK041S) фирмы «Евроген». ПЦР-анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из клеток после процедуры редактирования генома. Далее проводили денатурацию ампликонов при 95°C 2 минуты, затем быструю ренатурацию, снижая температуру на 1°C каждые 10 секунд до 85°C, затем медленную ренатурацию охлаждением до 25 °C. Ренатурированные ампликоны подвергались рестрикции с 1 ед. T7E1 эндонуклеазы (#M0302LNewEnglandBiolabs) в течение 30 мин при 37°C. Далее проводился электрофорез в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия для детекции делеций. Факт редактирования фиксировали по появлению дополнительных полос при электрофорезе, идущих ниже основного ампликона дикого типа.

HRM анализ

Амплификацию и HRM-анализ геномной ДНК редактированных клеток проводили на амплификаторе «BioRad термоциклер CFX96» фирмы «BioRad» с использованием реагента PrecisionMeltSupermix (BioRad, США). Использовались праймеры на ген RCAN1: 5'-TCAACTCCTTTTATTTTAT-3', 5'-ACTTCATTTTCCTTTCCCAGA-3'. Реакции проводили в объеме 10 мкл, количество геномной ДНК составляло 50 нг на реакцию, количество каждого праймера — 10 пмоль. Амплификацию проводили по следующей программе: 96 °C — 5 мин; далее 40 циклов (96 °C – 15 с, Тотжиг – 30 с, 72 °C – 50 с);

затем 72 °C — 5 мин. Плавление продуктов амплификации проводили в диапазоне 65–95 °C с увеличением температуры на 0.2 °C каждые 10 с. Анализ кривых плавления с высоким разрешением проводили в программной среде Precision Melt Analysis Software (Bio-Rad). Факт редактирования фиксировали по отличию кривой плавления ампликонов от кривой плавления ампликона дикого типа – в случае наличия значимой делеции, кривая плавления опускается ниже (т.к. ампликоны плавятся быстрее).

Клонирование ПЦР-продуктов исследуемого гена в ТА-вектор

Для проведения процедуры ТА-клонирования из мутантных клонов выделяли геномную ДНК и амплифицировали интересующий локус гена RCAN1 с использованием праймеров, указанных в табл. 1. Сам метод ТА-клонирования основан на свойстве taq-полимеразы добавлять на 3'-конец ПЦР продукта неспецифический аденин (образуя выступающий «липкий» конец в одну букву). Клонирование продуктов ПЦР осуществляли в вектор pAL-2T Cat#TA002 фирмы «Евроген», представляющего линейизованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Клонирование продуктов ПЦР состояло из нескольких этапов: подготовка продуктов ПЦР (очистка), лигирование, трансформация E.coli линии XL1-Blue химическим. Для лигирования использовали свежеприготовленные ПЦР-продукты, представленных четкой единичной полосой на электрофоретическом геле. Перед лигированием ПЦР-продукты очищали от праймеров и примесей с помощью набора CleanUp Standart (Евроген). Для лигирования использовали реактивы производства «Евроген» – pAL2-T вектор, Quick – ТА Т4 ДНК лигаза, 10x буфер для лигирования (Таблица 2.2). Смесь инкубировали 16 ч при 14°C.

Таблица 2.2 - Состав смеси для лигирования

10x буфер для лигирования	1 мкл
pAL-ТА-вектор	1 мкл
Quick – ТАТ4 ДНКлигаза	1 мкл
ПЦР продукт	50 – 100 нг
MQ	до 10 мкл

Первичный скрининг клонов осуществляли с помощью сине-белой селекции, отбирали белые колонии. Для определения клонов с нужной вставкой проводили амплификацию со стандартными M13-праймерами. Затем продукты амплификации анализировали на электрофореze. Клоны, несущие вставку, соответствовали размеру

клонированного продукта плюс 220 п.н. из фланкирующих участков вектора. Такие клоны подвергались секвенированию по Сенгеру для уточнения характера мутации.

Цифровой капельный ПЦР анализ

Для приготовления реакционной смеси для цифрового ПЦР использовалась готовая реакционная смесь ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (#1864120, Bio-Rad, США), концентрация праймеров (Таблица 2.1) в реакционной смеси составляла 800 нМ, концентрация флуоресцентных зондов (Таблица 2.3) составляла 250 нМ. В реакцию вносили от 200 пг до 600 пг геномной ДНК. Приготовление капель для цифровой капельной ПЦР проводилось с использованием автоматического генератора капель AutoDG (Bio-Rad, США), амплификация проводилась согласно рекомендованному производителем протоколу. Для анализа флуоресценции капель использовали QX200 Droplet Reader (Bio-Rad, США) и программу QuantaSoft (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя.

Таблица 2.3 - Последовательность флуоресцентных зондов для детекции делеции методом ddPCR:

RCAN1-MT-FAM [FAM]CTCTTTAGGACGTATGACAAGG[BHQ1]
RCAN1-WT-R6G [R6G]CAACCCCTTCTCCGCA[BHQ2]

2.3 Результаты и обсуждение

2.3.1. Подбор и получение гидовых РНК для нокаута гена RCAN1

Для уточнения вклада сверхэкспрессии гена RCAN1 в общий генный дисбаланс мы провели дозированный нокаут этого гена в клетках культуры hiPSC-DYP0730 (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека с трисомией по 21-й хромосоме). Для этого мы решили воспользоваться стратегией создания запланированной делеции в протеин-кодирующей последовательности геномной ДНК при помощи системы CRISPR/Cas9.

Для этого с помощью он-лайн ресурса *CRISPR.MIT.EDU* нами было подобраны и потестированы две пары гидовых РНК для создания делеции во втором экзоне гена RCAN1 (Таблица 2.4). Второй экзон был выбран, так как его транскрипт встречается практически во всех основных изоформах продукта гена интереса, и соответственно создание значимой делеции, приводящей к сдвигу рамки считывания должен приводить к нокауту гена. Обе гидовые РНК располагаются близко друг к другу, вызывая делецию 11 нуклеотидов (не кратно 3-м, сдвиг рамки).

Таблица 2.4 - Последовательности олигонуклеотидов для клонирования гидовых РНК в pU6-gRNA (для создания мутации в гене RCAN1).

gRNA-1-RCAN1 Fw	5'-CACCGCTCTTTAGGACGTATGACA-3'
gRNA-1-RCAN1 Rv	5'-AAACTGTCATACGTCCTAAAGAGC-3'
gRNA-2-RCAN1 Fw	5'-CACCGCTTGTCATACGTCCTAAAG -3'
gRNA-2-RCAN1 Rv	5'-AAACCTTTAGGACGTATGACAAGC -3'

TTTGTTACCGTAAGTAGTGTCTATGTATTGGCAACTGTTCTGCTGATTGATGAATGTAATAAATCATACC
 TTCTTACCTTCTTGTAATAATCACCTGCATTGGGACTAAAGGCCATAGTCCCCTAAGAGGGGAAAGGCTTT
 TCTCTAAGAAAGAAGTTAGGAGTTCTTGAAAGGATTGATGATCCACTTCCTCAGTAAAAAATGTATTGAG
 GAGGCCAGGCACGGTGGCTCATGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGGATCACCTGAGGAC
 AGGAGCTTGAGACCAGCCTTGCCAACATGGCAAAGCCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAG
 GTGTGCTGGCAGGCACCTGTAACCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCTGG
 GAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAAAAGTGCACCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGCAAGACTCT
 GTCTCGAAGAAAAAAGTAATGACATCATCTAGTCAAGGGTCATATGCAGGTAAATTTCAACTC
 CTTTTATTTTATTGTTATTTTTCAGGCCAAATTTGAGTCCCTCTT**TT**AGGACGTAT**GAC**AAGGACATCACCTT
 TCAGTATTTTAAGAGCTTCAAACGAGTCAGAATAAACTTCAGCAACCCCTTCTCCGCAGCAGATGCCAGG
 CTCCAGCTGCATAAGACTGAGTTTCTGGGAAAGGAAATGAAGTTATATTTTGCTCAG

Рисунок 2.1 - Первичная структура второго экзона гена RCAN1. Места разрезания отмечены красными буквами. Планируемая делеция 11 букв, приводящая к сдвигу рамкисчитывания.

Гидовые РНК были фосфорилированы с помощью Т4 полинуклеотидкиназы (NEB) и клонированы в вектор pU6-BbsI-gRNA, предварительно обработанный рестриктазой BbsI (NEB). Принципиальная схема клонирования и карта вектора pU6-BbsI-gRNA отражены на Рисунках 2.1 и 2.2.

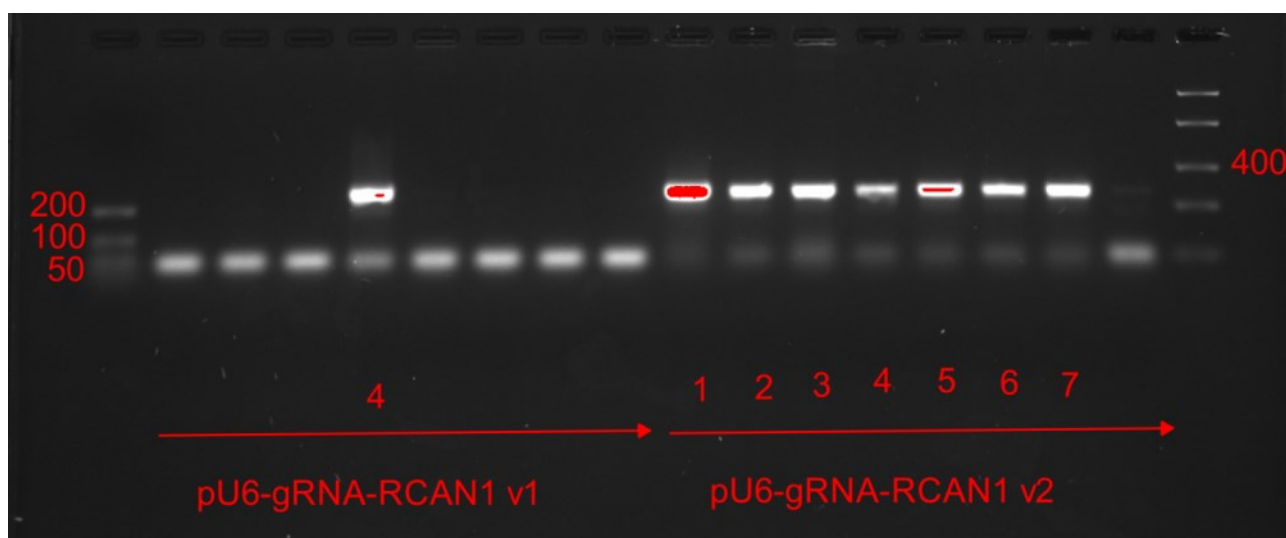


Рисунок 2.3 - Результаты скрининга бактериальных колоний после трансформации плазмидами pU6-BbsI-gRNA-RCAN1-v1 и pU6-BbsI-gRNA-RCAN1-v2

2.3.2 Дозированный нокаут гена RCAN1

Далее нами была осуществлена единовременная котрансфекция в клетки hiPSC-DYP0730 сразу трех векторов, кодирующих гидовые РНК и белок spCas9 и зелёный флуоресцентный белок EGFP. Котрансфекцию осуществляли при помощи электропорации на приборе Bio-RadXPulser, по протоколу – три прямоугольных импульса напряжением 155в, шириной 5мс, в стандартных 4-мм кюветах. Через 48 часов после трансфекции мы провели клеточный сортинг на приборе Bio-RadS3. По результатам сортинга было выявлено, что эффективность трансфекции составляла в среднем 2% (выявляли по свечению зеленого флуоресцентного белка). После сортинга обогащённая таким образом, трансфецированную культуру клеток подвергли клонированию предельным разведением. Для этого в чашки Петри d=60мм, покрытые матригелем высаживали по 5001-1000 клеток. Через 15-18 дней, в чашках вырастали индивидуальные колонии (примерно по 10-20 штук на чашку), которые затем механическим способом были перенесены в индивидуальные лунки 24-лун плато и проанализированы. В общем итоге мы выделили более 48 моноклональных клеточных линий и с каждой из них провели анализ наличия мутации. Подтверждение наличия значимых делеций в исследуемом гене проводилось с помощью T7E1 анализа и анализа кривых плавления с высоким разрешением – HRM анализ (Рисунок 2.2, 2.3). Результаты T7E1 анализа в общей смеси после трансфекции, показали продукты расщепления для ампликонов RCAN1, что подтверждает, что сконструированная нами система CRISPR/Cas9 может эффективно генерировать нокаут данного гена в человеческих iPSC. На графиках плавления с высоким разрешением кривые плавления для нокаутированных линий клеток достоверно отличаются от контроля

«дикого типа»), однако наибольшее различие демонстрировал четвёртый клон, который и был отобран для дальнейших экспериментов.



Рисунок 2.4 - Результаты T7E1 анализа при оценке наличия мутаций в общей смеси клеток (не индивидуальных клонках). Стрелкой отмечен продукт расщепления T7 эндонуклеазой I, который указывает на наличие мутантных ампликонов в общей смеси.

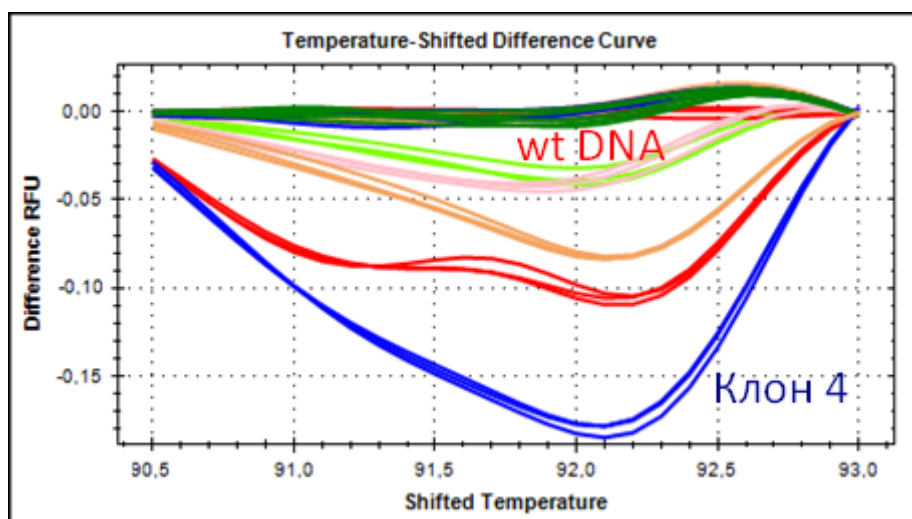


Рисунок 2.5 - Результаты HRM анализа. Разными цветами показаны кривые плавления для нескольких изолированных клонов, наибольшее отличие показал Клон 4.

Для более детального изучения и дополнительного подтверждения наличия мутаций в изолированных клонках, нами был проведён анализ при помощи цифровой

капельный ПЦР (Рисунок 2.6). Данный вид анализа базируется на мультиплексной флуоресцентной ПЦР в индивидуальных каплях, в каждой из которых находится порядка одной копии матрицы (мутантной или контрольной, «дикого типа»). Один флуоресцентный зонд с красителем FAM отжигается на место предполагаемой мутации, второй с красителем HEX служит нормировочным – отжигается на краю ампликона, далеко от места предполагаемой мутации. В случае ПЦР с матрицы «дикого типа», капля окрашивается двумя красителями, в случае ПЦР с мутантной матрицы, капля окрашивается только HEX. Метод позволяет измерить количество флуоресцентных капель в штуках, после чего найдя их соотношение можно судить о соотношении мутантных/диких аллелей.

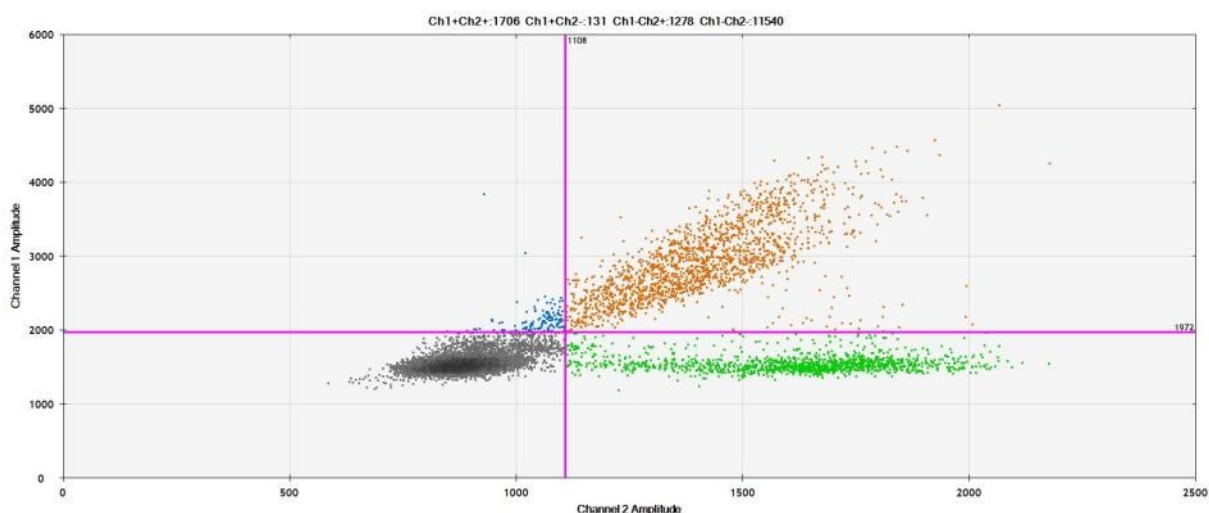


Рисунок 2.6 - Результат цифровой капельной ПЦР для hiPSC-DYP0730 knockout RCAN1 клон 4. По оси ординат – метка FAM, по оси абсцисс – метка HEX. Черный кластер внизу слева – пустые капли. Зеленый кластер – мутантные аллели, Оранжевый – дикого типа.

После проведения данного анализа мы обнаружили в клоне 4 наличие неполного (дозированного) нокаута гена RCAN1, один аллель совпал с аллелем дикого типа, два других оказались мутантные.

Для проверки полученных результатов, мы отсековировали интересующий участок гена при помощи метода «ТА-клонирования». Результаты анализа подтвердили наличие делеций в двух аллелях и сохранение одного целого аллеля дикого типа. Таким образом нами была получена уникальная линия ИПСК человека с трисомной 21-й хромосомой, с дозированным нокаутом гена RCAN1 (два аллеля гена RCAN1 из трех «выключены»).

2.3.3 Нейральная дифференцировка трисомных ИПСК сдвинута в глиальном направлении

Далее мы предприняли попытку посмотреть, каким образом отразится дозированный нокаут гена RCAN1 в трисомных нейронах человека. Для этого мы взяли несколько линий ИПСК - hIPS-KYOU (линия с нормальным кариотипом), hIPS-DYP0730 (линия с трисомной 21-й хромосомой), hiPS-DYP0730 dk/o RCAN1 (линия с трисомной 21-й хромосомой с дозированным нокаутом гена RCAN1) и дифференцировали их в нейральном направлении. После получения культур нейральных стволовых клеток далее они культивировались в виде нейросфер в виде свободно плавающих агрегатов. За день до начала терминальной нейрональной дифференцировки нейросферы переносили в чашки Петри, покрытым матригелем и культивировали в среде N2B27 в прикрепленном виде в течении 14 дней. Также часть мы оставили часть свободноплавающих нейросфер в среде N2B27 в чашках Петри без матригеля.

Было проведено иммуноцитохимическое окрашивание прикрепленных нейросфер на маркеры нейронов и глиальных клеток (Рисунок 2.7). В целом, все без исключения культуры клеток - N-KYOU (нейроны с нормальным кариотипом), N-DYP0730 (нейроны с трисомной 21-й хромосомой), N-DYP0730 dk/o RCAN1 (нейроны с трисомной 21-й хромосомой с дозированным нокаутом гена RCAN1) окрашивались на нейрональные маркеры TUBB3, NCAM SYN, SYP, NeuN, MAPT. Небольшой процент клеток окрашивался на глиально-астроцитарный маркер GFAP. Некоторые нейросферы полностью окрашивались на маркер дофаминэргических нейронов TH. Достоверных различий в характере и качестве окрашивания на вышеуказанные маркеры во всех исследованных культурах клеток, мы не наблюдали. Таким образом мы показали, что дозированный нокаут гена RCAN1 не болкирует дифференцировку ИПСК с T21 в нейральном направлении.

Далее, при помощи метода ОТ-ПЦР в реальном времени, мы провели анализ уровня экспрессии генов различных нейрональных и глиальных маркеров (Рисунок 2.8) в исследуемых культурах клеток. Результаты показали достоверное увеличение экспрессии маркера олигодендроцитарных глиальных клеток (S100B) в нейронах и нейросферах дифференцированных из трисомных по 21-й хромосоме клеток по сравнению с клетками с нормальным кариотипом. Кроме того, ряд генов (APP, DYRK1A, RCAN1), расположенных на 21-й хромосоме в нейронах и нейросферах трисомных по 21-й хромосоме клеток также показал повышение экспрессии по сравнению со здоровым контролем. Также мы наблюдали снижение уровня экспрессии маркера нейральных предшественников PAX6 в трисомных нейронах по сравнению со здоровым контролем.

Эти показатели, возможно, могут отражать ситуацию с замедленным образованием нейронов в развивающемся мозге людей с синдромом Дауна и сниженную нейрональную пластичность.

Удивительно, но мы детектировали достоверное увеличение экспрессии RCAN1 в клетках N-DYP0730 dk/o RCAN1 как по сравнению со здоровым контролем, так и по сравнению с клетками N-DYP0730 (их «прародителями»), в то время как ожидали увидеть понижение экспрессии. Данный эффект может объясняться одновременно двумя причинами – во-первых, может сработать компенсаторный механизм обратной связи, когда нехватка белка RCAN1 вызывает усиление экспрессии гена, и во-вторых – синтез мРНК укороченного мутантного белка по-прежнему дают вклад в уровень экспрессии (хотя теоретически мутантные мРНК должны разрушаться по механизму NMD = nonsense-mediated mRNA decay, нонсенс-опосредованный распад мРНК — одна из систем клетки, осуществляющих контроль качества мРНК.). С большой вероятностью, обе этих причины работают одновременно, для изучения данного эффекта в настоящий момент мы разрабатываем систему отдельной детекции мутантных и нормальных мРНК гена RCAN1.

Также мы наблюдали достоверное повышение экспрессии ряда генов нейральных маркеров в нейронах N-DYP0730 dk/o RCAN1, по сравнению с клетками N-DYP0730 – в генах Nestin, CREB, TUBB3, MAP2, MAPT – что может указывать на то, что уменьшение дозы гена RCAN1 в T21 клетках положительно влияет на увеличение экспрессии нейральных маркеров, отвечающих в том числе за нейральные стволовые клетки и нейральную пластичность (Nestin, CREB), так и за терминальную дифференцировку в нейроны (TUBB3, MAP2, MAPT).

В настоящий момент мы продолжаем изучение данного эффекта, для чего провели еще одну серию экспериментов по получению T21 ИПСК человека с дозированным нокаутом гена RCAN1, надеясь получить вариант с двумя работающими копиями гена. В настоящий момент времени мы получили ряд клонов ИПСК и анализируем их генотип.

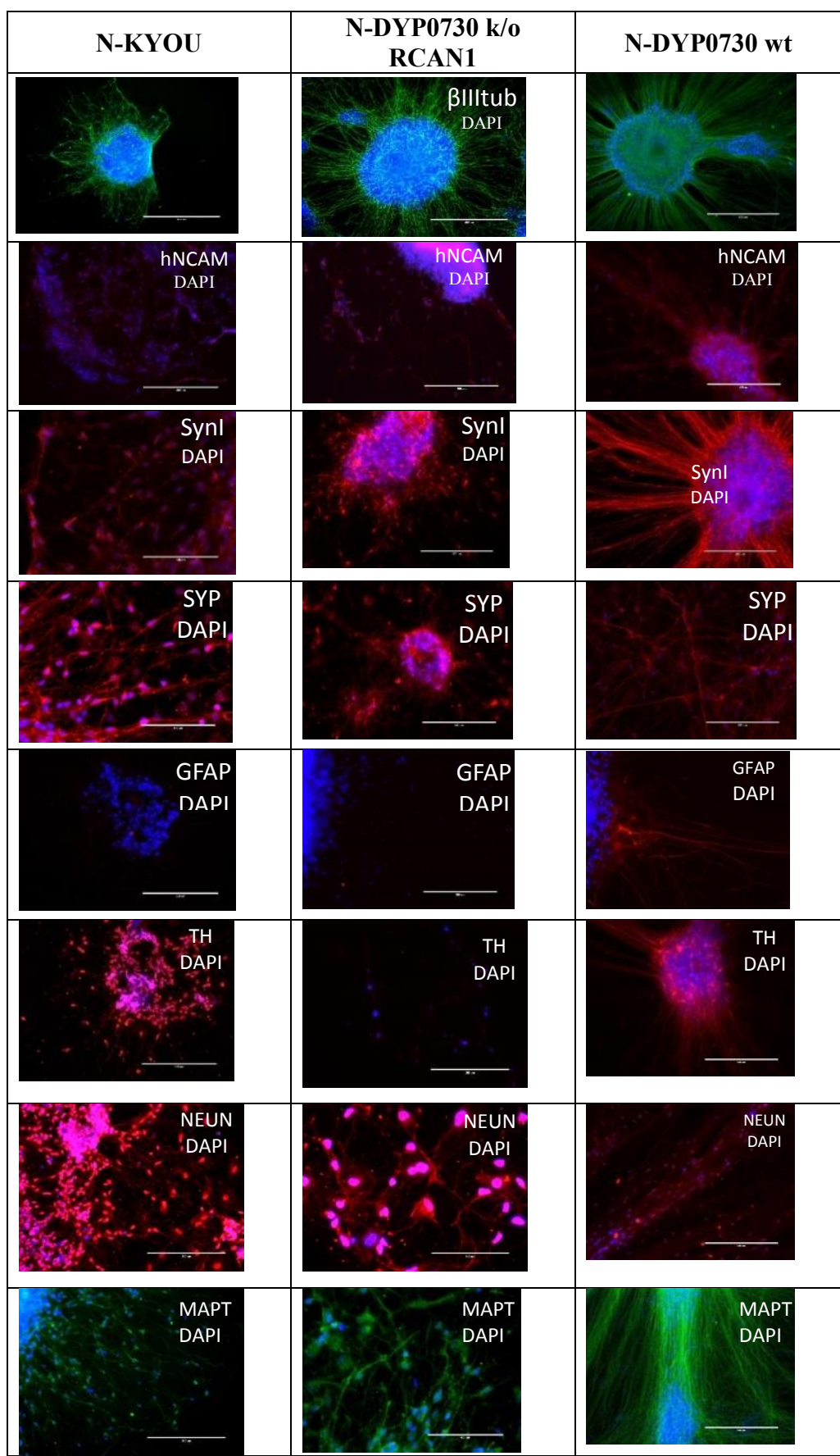


Рисунок 2.7 - Иммунофлуоресцентное окрашивание. Масштабные бары – 100 мкм

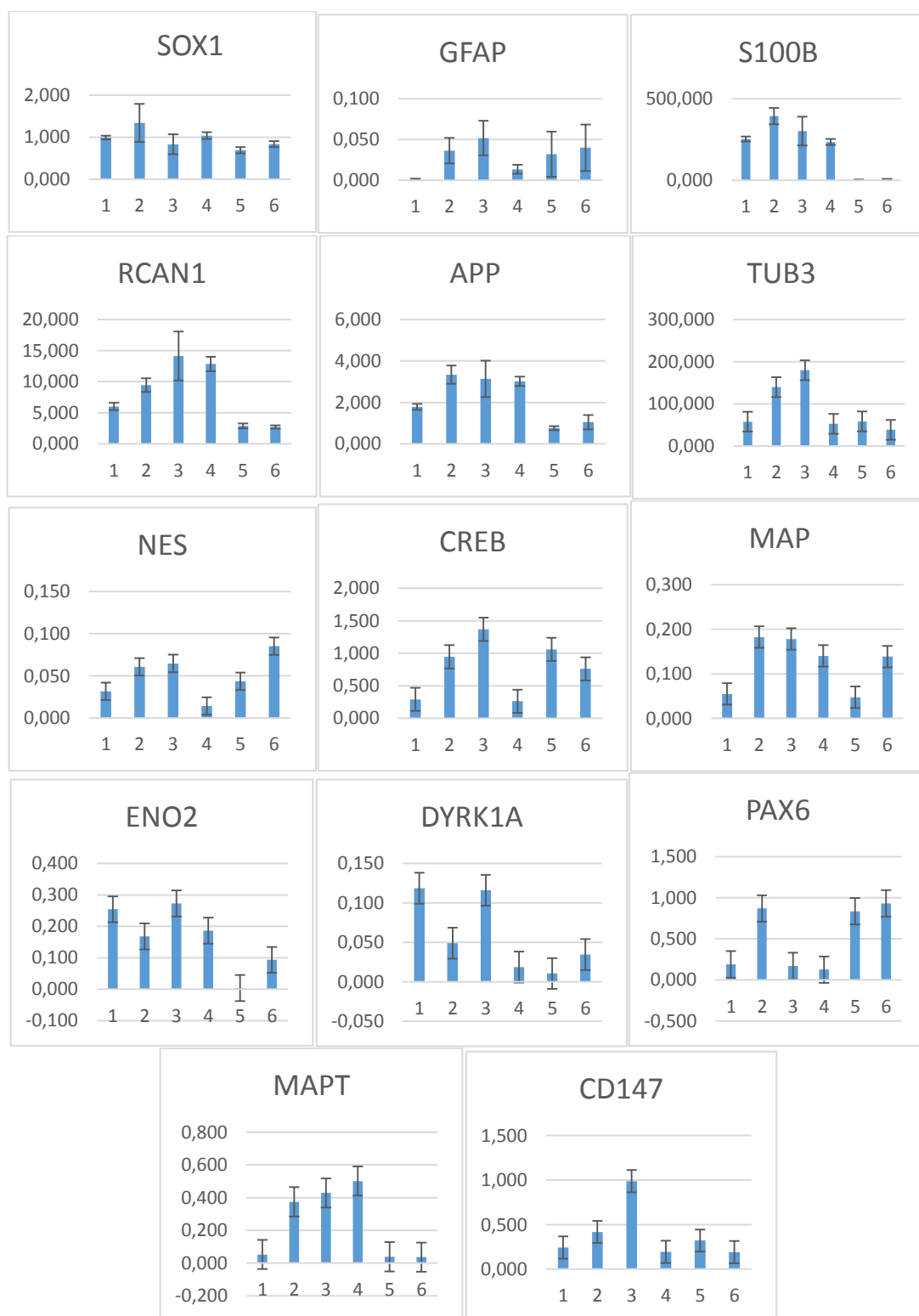


Рисунок 2.8 - Уровни экспрессии мРНК различных генов маркеров нейронов и глии.
 1 - Прикреплённые нейроны N-DYP0730, 2 - нейросферы NS-DYP0730,
 3 - Прикреплённые нейроны N-DYP0730 dk/o RCAN1, 4 - нейросферы NS-DYP0730 dk/o RCAN1, 5 – Прикреплённые нейросферы N-KYOU, 6 – нейросферы N-KYOU

2.4 Заключение

Таким образом, при помощи системы CRISPR/Cas9 был успешно проведён дозированный нокаут гена RCAN1 в культуре человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клетках hIPS-DYP0730 с трисомной 21-й хромосомой. Полученные клетки являются хорошей изогенной моделью для изучения величины вклада дозы гена RCAN1 в патологические механизмы нервной ткани при синдроме Дауна, поскольку ИПСК могут быть дифференцированы в различные типы клеток *in vitro*, в т.ч. в нейроны. При помощи этой изогенной модели показали, что уменьшение дозы гена RCAN1 в нейронах человека с трисомной 21-й хромосомой увеличивает экспрессию генов – маркеров нейральных стволовых клеток и дифференцированных нейронов, что может указывать на важную роль гена RCAN1 (его сверх-экспрессии) в патологических механизмах в нервной ткани людей с синдромом Дауна.

По результатам работы в 2018 году опубликованы статьи [11, 12].

2.5 Список использованных источников

- 1 Van Cleve S.N., Cohen W.I. Part I: Clinical Practice Guidelines for Children With Down Syndrome From Birth to 12 Years//J. Pediatr. Heal. Care. - 2006. - Vol. 20, N 1. P. 47 – 54.
- 2 Hassold T., Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21//Clin. Genet. - 2000. - Vol. 57, N 2. P. 95 – 100.
- 3 Antonarakis S.E. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance//Nat. Rev. Genet. -2017. -Vol. 18, N 3. P. 147 – 163.
- 4 Delabar J.M. et al. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21//Eur. J. Hum. Genet. - 1993. - Vol. 1, N 2. P. 114 – 124.
- 5 Nikolaienko O. et al. Human chromosome 21/Down syndrome gene function and pathway database //Gene. - 2005. - Vol. 364. P. 90 – 98.
- 6 Patel A. et al. RCAN1 links impaired neurotrophin trafficking to aberrant development of the sympathetic nervous system in Down syndrome//Nat. Commun. Nature Publishing Group.- 2015. - Vol. 6. P. 10119.
- 7 Park J., Oh Y., Chung K.C. Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1//BMB Rep. - 2009. - Vol. 42, N 1. P. 6 – 15.
- 8 Martin K.R. et al. Over-expression of RCAN1 causes Down syndrome-like hippocampal deficits that alter learning and memory//Hum. Mol. Genet. - 2012. - Vol. 21, N 13. P. 3025 – 3041.
- 9 Hewitt C.A. et al. Gene Network Disruptions and Neurogenesis Defects in the Adult

Ts1Cje Mouse Model of Down Syndrome//PLoS One / ed. Aziz S.A. Public Library of Science, - 2010. - Vol. 5, N 7. P. e11561.

10 von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus//Cell Tissue Res. - 2011. - Vol. 345, N 1. P. 1 – 19.

11 Puzanov G.A., Dashinimaev E.B., Krasnov G.S., Beniaminov A.D., Vishnyakova K.S., Afanasyeva M.A., Kondratieva T.T., Senchenko V.N., Yegorov Y.E. Serine phosphatases of the CTDSP/SCP family show tumor-suppressing activity for kidney tumors: bioinformatic approach, study of clinical samples and experiments in vitro//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 320 - 320. WOS:000437674104031.

12 Puzanov G.A., Krasnov G.S., Dashinimaev E.B., Beniaminov A.D., Vishnyakova K.S., Afanasyeva M.A., Kurevlev S.S., Braga E.A., Kondratieva T.T., Yegorov Y.E., Senchenko V.N. Serine phosphatases of the CTDSP/SCP family suppress the proliferation of lung tumor cells by reduction of the Rb phosphorylation level//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 313 - 313. WOS:000437674104008.1.

Раздел 3. Управляемое изменение дифференцировочного статуса клеток, в том числе с помощью генетического манипулирования и с использованием систем для микроманипулирования

3.1 Введение

В настоящее время, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека рассматриваются в качестве перспективного источника разных типов клеток в регенеративной биомедицине для клеточно-заместительной терапии. ИПСК хорошо пролиферируют, их можно наращивать в больших масштабах, и они способны дифференцироваться практически в любой тип клеток взрослого организма. Так, например, из ИПСК уже были получены аутологичные нейроны [1,2], клетки сетчатки [3–5], клетки ретинального пигментного эпителия [4–6], гепатоциты [7,8], и много других типов клеток, которые невозможно получить из тканей взрослого организма в количествах необходимых для трансплантаций. Данное свойство можно также использовать в различных областях фундаментальной клеточной биологии, например, для изучения процессов дифференцировки и развития. В связи с бурным развитием систем редактирования генома, а именно CRISPR/Cas9, стали актуальны методы нокаутирования различных генов в культурах клеток, в том числе и в ИПСК. Спектр приложений, для которых могут понадобиться линии ИПСК с нокаутированными генами, чрезвычайно широк. Так, например, нокаут различных генов в ИПСК и ЭСК поможет выявить роль этих генов в процессах развития и дифференцировки [9–11]. В некоторых случаях ИПСК с нокаутированными генами могут рассматриваться в качестве ресурса клеток для лечения различных заболеваний [12]. Однако, учитывая ряд особенностей культивирования ИПСК *in vitro*, получение отдельных клонированных линий ИПСК с нужной мутацией представляет собой определенную проблему. Такие особенности культивирования ИПСК *in vitro* по сравнению с «обычными» линиями клеток, включают в себя:

- ИПСК – это «капризная» и «дорогая» культура клеток – клетки балансируют между апоптозом и спонтанной дифференцировкой, культивирование требует дорогостоящих ростовых сред и добавок.
- ИПСК имеют обычно низкую эффективность трансфекции, независимо от метода (липофекция, электропорация или трансдукция вирусными конструктами).
- ИПСК имеют крайне низкую способность к клонированию малым разведением, только порядка 1% клеток способны дать начало новым клонам.
- ИПСК растут плотными колониями эпителиального типа и будучи пассаженными в моноклеточной суспензии, имеют тенденцию к образованию смешанных колоний из-за миграции по субстрату для группирования.

В данной работе мы разработали детальный протокол получения линий ИПСК с нокаутированными генами, включающий разные методические приемы (электропорация, клеточный сортинг, скрининг клонов, в т.ч. при помощи цифрового капельного ПЦР).

3.2 Материалы и методы

Материалы

Реагенты

- BD Matrgiel (BD Biosciences, Cat#356234)
- mTeSR1 (Stem Cell Technologies, Cat#85850)
- Рок-ингибитор Y-27632 dihydrochloride (Abcam, Cat#ab120129)
- Диспаза Dispase II (Life Technologies, Cat#17105041)
- Аккутаза ACCUTASE™ (Stem Cell Technologies, Cat#07920)
- DMEM/F12 (ПанЭко, Cat#C470п)
- PBS (ПанЭко, Cat#P060п)
- 5-кратный ПЦР Мастер-микс ScreenMix-HS (Евроген, Cat#PK143L)
- FresR (Stem Cell Technologies, Cat#05859)
- Gene Pulser® Electroporation Buffer (Bio-Rad, Cat#1652677)
- Пенициллин/стрептомицин 100-кратный (Gibco, Cat#15140-122)
- Вода свободная от нуклеаз (Qiagen, Cat#129114)
- Калибровочные частицы для сортера (Bio-Rad, Cat#1451081)
- 2-кратный ПЦР Мастер-микс для HRM Precision Melt SuperMix (Bio-Rad, Cat#1725112)
- 2-кратный ПЦР Мастер-микс для цифровой ПЦР, ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad, Cat##1863010)
- Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Cat#BC021)
- Набор для очистки ДНК Cleanup Standard (Евроген, Cat#BC022)

Расходные материалы

- Клеточный фильтр для шприцов 50мкм BDSyringeFilcons (BD, Cat#340601),
- Шприцы на 5мл, стерильные (ООО «Эскулап»)
- Чашки Петри культуральные 35х10 мм (Corning, Cat#430165)
- Чашки культуральные 60х15мм стерильные (Corning, Cat#430166)
- Пробирки центрифужные 50 мл (Corning, Cat#430828)
- Пробирки центрифужные 15 мл (Corning, Cat#430791)
- Пробирки для сортера, 4мл (GreinerBio-one, Cat#115262)
- Криопробирки объемом 2,0 мл. (Corning, Cat#430488)

- Планшет 24-луночный плоскодонный (Corning, Cat#3524)
- Пипетки серологические Costar® Stripette® 5 мл (Corning, Cat# 4487)
- Пипетки серологические Costar® Stripette® 10 мл (Corning, Cat# 4488)
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл (Axygen Cat#PCR-02-C)
- Микропробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл.(GenFollower Cat#MCTB015p)
- Наконечники универсальные для дозаторов объемом до 200 мкл (Axygen, Cat#TE-204-Y-L),
- Наконечники универсальные для дозаторов объемом до 1000 мкл (Axygen, Cat# T-1000-C-L)
- Наконечники Vertex на 10 мкл (SSI, Cat#4117N00S)
- Кюветы 4-мм для электропорации Gene Pulser Electroporation Cuvettes (Bio-Rad, 1652081)
- Планшеты 96-луночные для ddPCR и фольга для запаивания планшетов (Bio-Rad, #10023379)
- Кюветы для генерации капель для ddPCR (Bio-Rad, #1864109)
- Планшет 96-луночный для HRM (Bio-Rad, HSP9601)
- Пленка для заклеивания планшетов для HRM (Bio-Rad, #MSB1001)

Вектора

pCas9-IRES-EGFP. Синтез данной генетической конструкции был осуществлен на заказ в компании Евроген (Россия).

pU6-gRNA. Данная генетическая конструкция была любезно предоставлена в наше пользование профессором Скрыбиным Б.В. (Центр трансгенных животных, университета г.Мюнстера)

Оборудование

- Проточный цитофлуориметр с функцией сортировки BioRadS3 (Bio-Rad, Cat#1451006)
- Амплификатор C1000 Touch (Bio-Rad, Cat#1851196)
- Электропоратор Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (Bio-Rad, Cat#1652660)
- Система для цифрового ПЦР QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, Cat#1864001)
- Система для ПЦР в реальном времени CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Cat#1864001)
- Система капиллярного электрофореза ABI Genetic Analyzer 3500 (Thermo Fisher Scientific, Cat#4406017)

- Счетчикклеток TC20 (Bio-Rad, Cat#1450102)
- Системагель-документации Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad, Cat#1708195)
- Системадляагарозногогель-электрофореза Sub-Cell Model 96 Cell and PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, Cat#1640305)
- Спектрофотометр Nanophotometer P360 (Implen, Cat#P360)
- Криохранилищедляклеток Locator 6 plus (Thermo Fisher Scientific, Cat#CY509109)
- Центрифугакультуральная Eppendorf 5702 R (Eppendorf Cat#5703000012)
- Центрифугамаленькая Eppendorf Minispin (Eppendorf Cat#5452000018)
- Ламинарныйбокс 2-гоуровнябиозащиты NuAire LabGard® ES (NuAire, Cat#NU-540)
- ПЦР бокс БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" («Ламинарные системы» Cat#1R-F.001-10.0)
- Микроскопинвертированный Zeiss Primovert (Zeiss, Cat#Primovert)

Подготовка реагентов

mTesR1. Разморозьте бутылку с 5-кратным сапплементом к базовой среде (сапплемент храниться при -20°C), смешайте с базовой средой (которая храниться при +4°C), добавьте антибиотик пенициллин-стрептомицин (5мл на 500мл среды). Хранить готовую полную ростовую среду при +4°C не более месяца. При желании можно аликвотить сапплемент и готовить небольшие объемы полной среды.

Матригель. Разморозьте на льду бутылочку с 5 мл BD матригеля (храниться при -20°C), и сразу же, не допуская нагрева матригеля до комнатной температуры размешайте в 245 мл чистой холодной среды DMEM/F12 (при +4°C), далее тщательно перемешайте, разделите по аликвотам по 40 мл (в 50 мл центрифужных пробирках), далее хранить аликвоты при -20 °C. Разморозив одну аликвоту, ее не следует перезамораживать, хранить и использовать при +4°C.

Рок-ингибитор Y-27632. Растворите вещество Y-27632 в чистой стерильной воде до концентрации стокового раствора 5мМ (это будет 1000-кратный раствор). Разделите по аликвотам по 50-100 мкл, далее хранить аликвоты при -20 °C. Разморозив одну аликвоту, ее не следует перезамораживать, хранить и использовать при +4°C.

Диспаза. Растворите вещество в чистой среде DMEM/F12 до концентрации 1мг/мл, профильтруйте раствор через стерильные фильтры 0,22мкм. Разделите по аликвотам по 10 мл, далее хранить аликвоты при -20 °C. Разморозив одну аликвоту, ее не следует перезамораживать, хранить и использовать при +4°C.

Лизис-буфер для скрининга. Добавьте протеиназу К в буфер ТЕ, до конечной концентрации 0,2мг/мл. Разделите по аликвотам по 500 мкл, далее хранить аликвоты при -

20 °C. Разморозив одну аликвоту, ее не следует перезамораживать, хранить не более 3 суток при +4°C.

3.3 Результаты и обсуждение

Настоящий раздел построен в виде набора протоколов, описывающих выполнение методик, которые были опробованы в лаборатории и модифицированы с учетом проводимой работы по генетическому манипулированию с целью изменения дифференцировочного статуса клеток.

3.3.1. Разморозка и культивирование ИПСК

Для культивирования ИПСК человека можно использовать как условия выращивания на фидерном слое из инактивированных фибробластов, так и безфидерные условия выращивания на пластиковом субстрате, покрытом Матригелем. Мы рекомендуем использовать безфидерные условия, поскольку это менее трудозатратный и более воспроизводимый метод.

1) За 1 час до разморозки клеток, налейте в чашки Петри раствор Матригеля из расчета 500 мкл на 10 см² (т.о. на одну чашку Петри Ø3,5 см уходит 500 мкл, на 1 чашку Петри Ø5,5 см уходит 1мл) и покачайте чашку для того чтобы раствор покрыл всю поверхность тонким слоем. Далее инкубируйте чашку в CO₂-инкубаторе или суховоздушном термостате при +37°C в течении 1 часа.

2) Соблюдая все меры предосторожности достаньте ампулу с замороженными клетками из жидкого азота и разморозьте содержимое до полностью жидкого состояния. Для этого можно использовать как водяную баню, нагретую до +37°C, так и простое инкубирование ампулы в открытом и работающем ламинарном боксе 2-го уровня биобезопасности в течении 5-7 минут. Центрифугируйте клетки в течении 5 минут при 200-250g (это примерно соответствует 1000об/мин на стандартных культуральных центрифугах с радиусом ротора 20см). Убедившись в наличии осадка клеток на дне криопробирки, аккуратно удалите супернатант (для этих целей лучше использовать обычный автоматический дозатор на 1 мл, а не насос-аспиратор), при этом для большей сохранности клеток можно оставить небольшое количество жидкости, порядка 50-100мкл.

3) Ресуспендируйте осадок клеток в 1 мл полной ростовой среды mTeSR1, при этом не допуская излишнего пипетирования (т.е. достаточно 10-15 итераций), поскольку это снижает количество живых клеток. Удалите раствор Матригеля из подготовленной чашки Петри, и без дополнительных отмывок сразу залейте суспензию клеток. После этого, долейте 1мл mTeSR1 (в сумме будет 2 мл), добавьте 2 мкл раствора Рок-ингибитора Y-27632, перемешайте суспензию осторожным покачиванием чашки. Далее инкубируйте

клетки в CO₂-инкубаторе при условиях +37°C, 5%CO₂, 100% влажности в течении 1 суток. Условия с пониженным содержанием кислорода (т.е. 3-5%O₂), которые можно достичь в инкубаторах с подавлением содержания кислорода при помощи азота – являются опциональными и предпочтительными, поскольку в целом это позволяет достигать большей выживаемости клеток на всех этапах.

4) На следующий день, убедившись в наличии живых клеток, прикрепившихся к субстрату, поменяйте полностью культуральную среду (в которой будет плавать масса мертвых клеток) на свежую среду также с содержанием Рок-ингибитора Y-27632 в конечной концентрации 5мкМ. Несмотря на указания производителя среды о ежедневной смене среды, пока клеток мало, и они только начинают делиться, мы допускаем смену среду примерно 1 раз в 2-3 суток, при этом сменяя ее на 75% и не отменяя Рок-ингибитор Y-27632. Далее, когда колонии ИПСК достигнут устойчивого размера (т.е. содержащие порядка 40-50 клеток, это обычно должно занять 4-6 суток) рок-ингибитор Y-27632 можно отменить, и по мере увеличения количества клеток следует увеличить частоту смены среды до ежедневной.

5) После того как колонии ИПСК выросли до необходимого размера (порядка 1-2 мм в диаметре), либо достигли конфлюентности 40-50% от общей площади чашки, их следует спассировать. Даже если общее количество колоний небольшое (после не слишком удачной разморозки их может быть 3-10 на чашку), мы не рекомендуем ждать, когда колонии вырастут до гигантских размеров, поскольку это часто провоцирует клетки в середине колоний на спонтанную дифференцировку. Пассирование следует производить при помощи раствора аккутазы либо диспазы. Использование раствора 0,05% Трипсин-ЭДТА также возможно, но не желательно.

6) Для пассирования ИПСК удалите полную ростовую среду и добавьте раствор аккутазы из расчета 500 мкл на 10 см² (т.о. на одну чашку Петри Ø3,5 см уходит 500мкл, на 1 чашку Петри Ø5,5 см уходит 1мл). Поскольку среда mTeSR1 является бессывороточной средой с полностью определенным составом, в ее составе нет ингибиторов протеаз, что позволяет не отмывать клетки. Через 5-10 минут, клетки открепятся от пластика и начнут плавать в растворе в виде кластеров. Долейте 1 мл чистой среды DMEM/F12 и ресуспендируйте клетки, избегая излишнего пипетирования и пенообразования. Залейте 1,5 мл суспензии клеток в 15 мл центрифужную пробирку, в которой уже есть 8,5-13,5 мл чистой среды DMEM/F12 и перемешайте содержимое переворачиванием пробирки (3-5 раз). Центрифугируйте клетки в течении 5 минут при 200-250g, удалите супернатант, ресуспендируйте осадок клеток в 1 мл полной ростовой среды mTeSR1. Возьмите необходимую долю клеток (мы обычно рассаживаем в

диапазоне 1/5 - 1/50), посадите клетки на новые, подготовленные чашки Петри (покрытые матригелем), в полной ростовой среде mTeSR1, обязательно с содержанием Rock-ингибитора Y-27632. На следующий день следует сменить среду, удалив мертвые неприкрепленные клетки.

3.3.2. Дизайн генетических конструктов, подбор и валидация гидовых РНК системы CRISPR/Cas9

В данном протоколе мы не будем останавливаться на описании механизмов работы системы CRISPR/Cas9 и характеристик ее компонентов, поскольку данных по этому поводу в литературе вполне достаточно. Поэтому описание формирования дизайна эксперимента начнем сразу с описания стратегии подбора последовательностей гидовых РНК.

Для нокаута того или иного гена (в этой статье мы будем говорить о протеин-кодирующих генах), в теории достаточно вызвать сдвиг рамки считывания кодирующей последовательности гена, который можно соответственно вызвать делецией участка гена или инсерцией некой последовательности в ген, длина которой будет не кратна трем (т.е. в принципе достаточно потери или добавки 1 нуклеотида). Поэтому достаточно много исследователей разрабатывают стратегию нокаута, рассчитывая на случайный мутагенез в зоне разрыва ДНК, который возникает за счет негомологичного сшивания (NHEJ – non-homologous end joining) после работы системы репарации. Возникающий спектр мутаций при этом достаточно широк, действительно в случае хорошо подобранной и работающей гидовой РНК, часто возникают делеции, вплоть до 20-30 нуклеотидов (хотя все-таки чаще это 3-5 нуклеотида). И по теории вероятности, 2/3 этих мутаций будет не кратна трем и будет вызывать желаемый нокаут гена. Однако, по нашему опыту, будет правильнее и быстрее использовать стратегию заданной делеции, которая будет достаточно большой (30-70 нуклеотидов), и при этом будет заведомо не кратна трем. Для этого надо подобрать две гидовых РНК, точки разрыва которых и будут фланкировать заданную делецию. Это может показаться удивительным, но получающиеся спектр вариантов мутации при этом резко сужается. Более 90% мутантов несут именно заданную делецию, и соответственно менее 10% составляет вероятность получить нежелательную плюс-минус несколько букв делецию (здесь нужно отметить, что для достижения этих показателей нужно обеспечить одинаковую эффективную работу обеих гидовых РНК в одной клетке. Как это можно сделать – далее).

В каком именно месте гена лучше вызывать делецию? Для этого необходимо изучить структуру гена, определить наличие и последовательности всех изоформ, и понять какие экзоны входят в состав максимально большого количества изоформ. Обычно

это экзоны которые кодируют самые «важные» части белка – активный центр, места связывания и т.д. Статистически эти экзоны находятся обычно в центре распределения (то есть, если экзонов всего 10, то искомый экзон будет в диапазоне 3-7). Помогает также поиск по уже описанным в научной литературе случаям мутаций данного гена, которые уже доказано приводят к потере его функции. Полезные онлайн ресурсы, помогающие осуществить всю эту работу: Pubmed.org ;Ensembl.org ; Deskgen.com . После того как будет определен желаемый экзон и примерное место делеции, нужно подобрать несколько вариантов гидовых РНК. Существует множество онлайн ресурсов, которые могут помочь в этом, но мы пользуемся в основном ресурсом crispr.mit.edu , который позволяет сразу распределить оптимальные варианты по убыванию опасности работы с нецелевыми сайтами в геноме, т.н. off-target сайтам. Обычно мы находим 2-3 пары гидовых РНК качества «good», которые будут вызывать делеции в районе 40-50 нуклеотидов, не кратные трем.

Далее нужно осуществить клонирование последовательностей гидовых РНК в соответствующие плазмидные конструкторы, предназначенные для экспрессии в эукариотических клетках. Существует огромное количество таких конструкторов в свободном доступе, в депозитории addgene.org. Наибольшую популярность среди исследователей получили конструкторы «all-in», которые несут сразу U6-промотор с гидовой РНК и кассету для экспрессии Cas9 белка (иногда вместе с геном селекции или геном маркерного флуоресцентного белка, таким как EGFP). Это действительно удобно в случаях использования одной гидовой РНК для разрезания в одном месте, но это не совсем удобно, когда необходимо обеспечить наличие двух гидовых РНК в клетке. Поэтому мы предпочитаем использовать стратегию с котрансфекцией нескольких плазмид одновременно. Самый большой конструктор (8,3 т.п.н.) в нашем случае несет кассету для экспрессии Cas9 белка и зеленого флуоресцентного белка EGFP (через IRES2 переход), остальные две плазмиды малого размера (3,5 т.п.н.) несут U6-промотор с гидовой РНК, каждая свой вариант (Рисунок 3.1). При контрансфекции всех трех плазмид методом электропорации, с последующим клеточным сортированием по наличию флуоресценции EGFP, с большой вероятностью (более 80%) оказывается, что среди таких клеток большинство имеют сразу все три конструктора. Соображение, почему это происходит, очень простое – при сортировании мы отбираем только те варианты клеток, в мембране которых возникли поры достаточной емкости, чтобы впустить значительное количество «большого» конструктора, и соответственно в эти же поры «маленькому» конструктору попасть гораздо легче, что он и делает.

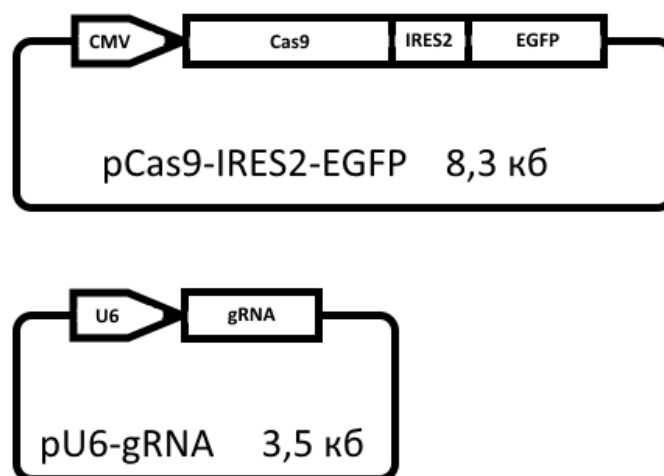


Рисунок 3.1 - Генетические конструкции для нокаута генов в ИПСК. Плазмида pCas9-IRES2-EGFP экспрессирует в клетках нуклеазу Cas9 и маркерный белок EGFP. Плазмида pU6-gRNA экспрессирует в клетках гидовую РНК, направляя Cas9 на целевой сайт. Преимущество такого дизайна в том, что можно со-трансфицировать несколько разных плазмид pU6-gRNA кодирующих разные гидовые РНК и вызывать множественные разрывы в геномной ДНК

Валидацию последовательности и работоспособности каждой из гидовой РНК удобно проводить на модельной референсной линии клеток с постоянной сильной экспрессией белка Cas9. Для этого достаточно трансфицировать в эти клетки только один конструкт, кодирующий гидовую РНК, после чего выделить геномную ДНК и оценить степень мутагенеза в выбранном сайте, при помощи стандартного T7E1 анализа. В данной статье мы не будем останавливаться отдельно на этапах клонирования гидовых РНК в плазмиды, валидации гидовых РНК, поскольку это требует своих отдельных протоколов. Мы будем считать, что на момент начала экспериментов уже есть готовые генетические конструкты.

3.3.3 Электропорация ИПСК

Существует несколько способов доставки генетических конструктов в желаемые клетки. В основном это липофекция, электропорация и трансдукция лентивирусными частицами. Лентивирусные частицы обладают высокой эффективностью трансфекции, однако нуждаются во встраивании в геном (куда встраиваются случайным образом) и обеспечивают в дальнейшем постоянную экспрессию компонентов CRISPR/Cas9, которая в нашем случае не нужна. Метод с использованием липофильных частиц самый простой из трех, поскольку не требует специального оборудования и трудозатратной упаковки частиц, и при должном подборе условий обеспечивает значительную эффективность. Однако одной из отрицательных особенностей липофекции является значительный и растянутый по времени цитотоксический эффект, что для ИПСК может быть критическим

фактором. Мы обнаружили, что ИПСК после такой трансфекции чрезвычайно плохо переносят дальнейший клеточный сортиг (что само по себе значительное травмирующее событие) через 48-72 часа после трансфекции. Поэтому мы рекомендуем использование электропорации, поскольку эта технология зарекомендовала себя как простая, относительно дешевая, быстрая и хорошо воспроизводимая техника доставки плазмид в клетки.

7) Плазмиды перед электропорацией необходимо дополнительно очищать после выделения из бактерий. Мы рекомендуем использование готовых наборов для выделения плазмидной ДНК на колонках. При этом обязательно использование РНКазы в лизирующем буфере, т.к. присутствие бактериальной РНК в растворе с плазмидами является значительным цитотоксическим фактором. После элюирования плазмид с колонок, их можно стандартно переосадить этанолом доведя концентрацию до желаемой, либо очистить еще раз на колонках. Оптимальная концентрация плазмидной ДНК – 0,5-1,5 мкг/мкл.

8) Снимите ИПСК с чашек Петри, используя аккутазу (либо 0,05% Трипсин-ЭДТА). Для этого удалите полную ростовую среду, налейте в чашки Петри раствор аккутазы, исходя из расчета 500 мкл на 10 см², аккуратным покачиванием добейтесь того чтобы раствор равномерно покрыл дно чашки. Поместите клетки на +37С и через 3-5 минут клетки открепятся от пластика. Добавьте примерно 2 мл раствора PBS или среды DMEM/F12, ресуспендируйте получившуюся суспензию, избегая чрезмерного пипетирования. Перенесите клетки в 15мл центрифужную пробирку, в которой должно быть примерно 7-10 мл раствора PBS или среды DMEM/F12, перемешайте суспензию, подсчитайте концентрацию и общее количество клеток при помощи камеры Горяева или автоматического счетчика. Электропорацию в стандартных 4мм-куветах можно проводить в широком диапазоне, от 1 млн до 8 млн клеток. В среднем мы используем на одну трансфекцию 4-5 млн клеток. Центрифугируйте клетки в течении 5 минут при 200-250g, удалите супернатант и ресуспендируйте клетки в растворе PBS или чистой среде DMEM/F12 исходя из соотношения 200 мкл раствора на 1 порцию клеток на 1 трансфекцию (то есть если общее количество клеток примерно 8 млн, то этого хватит на две трансфекции, соответственно нужно ресуспендировать в 400 мкл). Также мы рекомендуем вместо PBS или DMEM/F12 использовать готовые покупные растворы для электропорации (например, Electroporationbuffer от компании Bio-Rad), поскольку это повышает эффективность трансфекции и выживаемость клеток.

9) Добавьте генетические конструкции в готовую суспензию клеток исходя из расчета 5-15 мкг «большой» плазмиды с Cas9 и EGFP, и по 3-7 мкг «маленьких» плазмид с

гидовыми РНК на одну трансфекцию в 200 мкл раствора. Общее количество плазмидной ДНК на одну трансфекцию должно быть не более 30 мкг, т.к. дальнейшее увеличение дозы вызывает чрезмерный цитотоксический эффект. Перемешайте смесь и аккуратно добавляйте клетки на дно стандартной 4 мм кюветы для электропорации с алюминиевыми электродами (кюветы такого формата продают разные фирмы, в т.ч. Bio-Rad), стараясь при этом избегать пузырей и пены.

10) Незамедлительно (до того, как клетки начнут оседать на дно) поместите кювету в электропоратор и пропустите импульсы через кювету по заранее заданной программе — три прямоугольных импульса, с высотой (напряжение) 155 В, шириной (время импульса) 5 мс, расстоянием между импульсами 0,1с. В целом можно сказать, что эти параметры могут быть не оптимальными, поскольку разные электропораторы могут выдавать разные реальные характеристики импульсов, поэтому мы рекомендуем перед проведением основных экспериментов поставить пробные тесты, на которых уже подобрать оптимальные условия. Эффективность трансфекции ИПСК в нашем случае редко, когда достигала больше 5% (в основном это значения 1-3%), по сравнению с линиями клеток типа НЕК293 в которых эффективность (на своем протоколе) может быть больше 70%.

11) Сразу после электропорации переместите суспензию клеток в готовую чашку Петри Ø5,5 см (покрытую Матригелем) с полной ростовой среды mTeSR1, обязательно с содержанием 5мкМ Rock-ингибитора Y-27632. На следующий день следует сменить среду (также с 5мкМ Y-27632), удалив мертвые неприкрепленные клетки, которых будет очень много.

3.3.4 Обогащение трансфецированных клеток при помощи клеточного сортирования и клонирование малым разведением

Учитывая низкую эффективность трансфекции ИПСК, для увеличения вероятности нахождения мутантных клонов необходимо отделить интактные клетки от целевых трансфецированных клеток. В противном случае, надо будет скринировать большое количество клонов, подавляющее количество из которых будет интактными клетками дикого типа. Отбор необходимых клеток легко произвести, используя клеточный проточный сортирование, по наличию белка EGFP, который появляется в клетках из-за временной экспрессии с плазмиды. Временная экспрессия достигает своего пика примерно через 48 часов после трансфекции, хотя вполне различимый уровень сигнала можно определить в промежутке 24-96 часов. Клеточный сортирование можно проводить в любое время в этом промежутке.

12) Снимите трансфецированные ИПСК с чашек Петри, используя аккутазу (либо 0,05% Трипсин-ЭДТА). Для этого удалите полную ростовую среду, налейте в чашки

Петри раствор аккумуля, исходя из расчета 500 мкл на 10 см², аккуратным покачиванием добейтесь того чтобы раствор равномерно покрыл дно чашки. Поместите клетки на +37С и через 3-5 минут клетки открепятся от пластика. Добавьте примерно 2 мл раствора PBS или среды DMEM/F12, ресуспендируйте получившуюся суспензию, добиваясь в конце моноклеточной смеси. Необходимо проконтролировать отсутствие комков, «строенных» и «сдвоенных» клеток в суспензии под микроскопом, т.к. основным источником загрязнения фракции трансфецированных клеток является агрегация с интактными клетками дикого типа.

13) Профильтруйте смесь через клеточный фильтр с размером пор не более 100 мкм (желательно 30-50 мкм). На самом деле это не удалит «сдвоенные» или «строенные агрегаты» клеток, но поможет избавиться от крупного мусора, который может забить сопло сортера. Удобно для этого использовать небольшой фильтр для шприцов (BDSyringeFilcons) и шприц на 5 мл. Без лишних промедлений отнесите клеточную смесь на сортер и приступите к сортированию.

14) Разные приборы класса проточных цитофлуориметров с функцией сортирования клеток предлагают широкий спектр возможностей детекции различных характеристик клеток, однако для данной процедуры необходимо самая базовая функция детекции прямого/бокового светорассеяния и детекции флуоресценции в двух каналах – «зеленый» (EGFP, 495-555нм) и «ближне-красный» (TagRFP, 590-640нм). Как правило данные возможности предоставляют практически любой сортер клеток, даже самого экономичного класса, такие как Bio-RadS3. Предварительно, перед проведением основных экспериментов, необходим как минимум один тестовый прогон интактных ИПСК через сортер, для того чтобы подобрать оптимальные параметры детекции и записать оптимальные протоколы сортирования. Для детекции необходимой фракции клеток с флуоресцентным сигналом EGFP мы предлагаем использовать плот-график с осями $X=EGFP$ / $Y = TagRFP$ (Рисунок 3.2), на которой отчетливо видна популяция интактных клеток с низким уровнем аутофлуоресценции (отмечена черной стрелкой) и видна минорная популяция клеток с флуоресценции в зеленом канале (отмечена белой стрелкой). Необходимо выделить эту группу клеток соответствующим регионом для сортирования и послать на сортирование в приемную пробирку.

(R1)

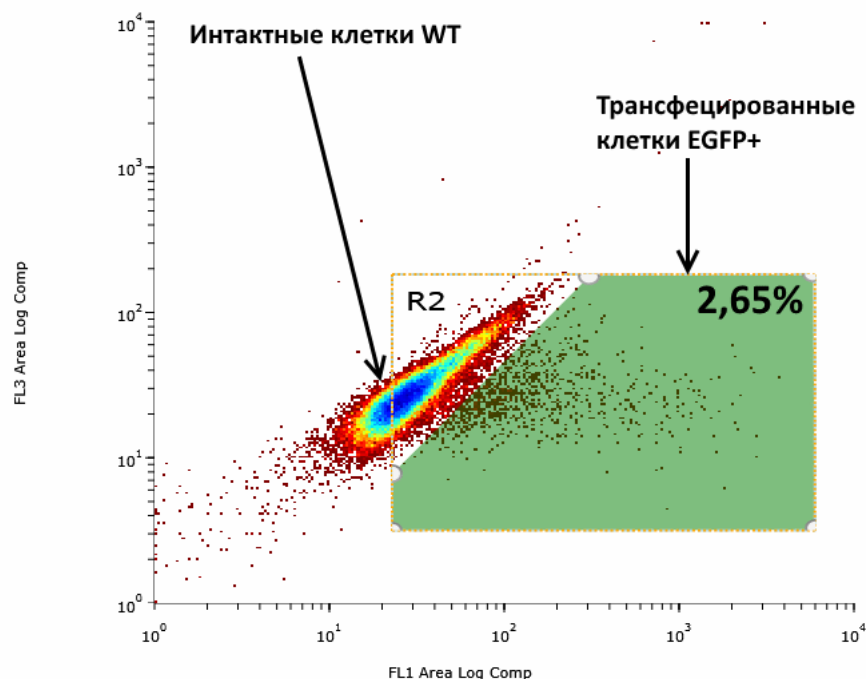


Рисунок 3.2 - Плот-диаграмма анализа трансфецированных клеток при помощи проточного цитофлуориметра с функцией сортировки клеток Bio-Rad S3. По оси абсцисс – интенсивность сигнала в «зеленом» канале (EGFP), по оси ординат – интенсивность канала в «красном» канале (TagRFP). Шкала логарифмическая. Большая часть клеток (97,35%) – осталась интактной, и только 2,65% показывают наличие зеленой метки EGFP

15) Как правило, ввиду низкой эффективности трансфекции ИПСК, а также токсического эффекта электропорации на выходе после сортировки получается довольно малая доля клеток. Так, например, по нашим усредненным данным после трансфекции 4-5 млн. ИПСК, на выходе мы получаем в среднем от 5 тыс. до 25 тыс. клеток. Таким образом потери клеток достигают 99,5-99,9%. Однако несмотря на это, даже 1-2 тысяч клеток вполне достаточно, чтобы получить ощутимый набор клонов для дальнейшего скрининга.

16) После окончания сортировки необходимо посеять клетки в чашки Петри Ø5,5 см (покрытые Матригелем) с полной ростовой средой mTeSR1, обязательно с содержанием 5мкМ Rock-ингибитора Y-27632. Однако их нужно посеять в такой концентрации, которая будет достаточно редкой для клонирования малым разведением и в то же время будет достаточно наполненной, чтобы не плодить огромное количество чашек, что приведет к перерасходу дорогостоящих культуральных сред. Данный параметр необходимо подобрать самостоятельно исходя из имеющихся условий, так как по нашему опыту, даже при одинаковых растворах, средах и пластике у разных исследователей этот параметр получается разным. В наших экспериментах достаточно посадить 500-1000 клеток в одну чашку Петри Ø5,5 см, для того чтобы получить 15-30 клонов хорошего качества (с нормальной морфологией и без признаков слияния двух колоний). В первых

самостоятельных экспериментах мы рекомендуем сажать несколько чашек, с шагом в 1000-3000 клеток (то есть если общее количество полученных клеток 10 тысяч клеток, то варианты посадки будут: 1000 кл., 3000 кл, 6000 кл.). Подсчитать концентрацию полученных клеток после сортирования при помощи классического метода (на счетчике или камере Горяева) будет сложно из-за низких значений. Но это и не требуется, так как сортер дает на выходе количество событий, которые он отправил в приемную пробирку. При этом нужно учитывать, что далеко не все клетки, отправленные сортером в пробирку, оказываются там. По нашим подсчетам только порядка 80% клеток в конечном итоге оказываются в пробирке, хотя конечно же для разных сортеров и разных режимов сортирования эта цифра будет варьировать. Мы рекомендуем провести пробные эксперименты по сортированию клеток (необязательно ИПСК) чтобы оценить этот параметр и в дальнейшем учитывать эту ошибку.

17) После посадки клеток на клонирование малым разведением, ввиду их малой плотности можно осуществлять смену среды 1 раз в 2-3 суток, примерно на 70-80%. В течении следующих 6-7 дней следует добавлять Rock-ингибитор Y-27632 в каждую смену среды, до тех пор, пока на микроскопировании вы не убедитесь в том, что клоны есть, и они уже состоят из 30-50 клеток. Только тогда можно отменить Rock-ингибитор Y-27632.

3.3.5 Отбор клонов путем механического переноса

18) Примерно через 15-20 дней после сортирования колонии становятся достаточно большими для расклонирования. С одной стороны, чем больше колония клеток, тем больше вероятность удачного переноса клеток, с другой стороны часть клонов уже может начать сливаться своими краями, что грозит кроссконтаминацией разных клонов. К этому моменту времени исследователь должен каждый день наблюдать за клетками и сам оценить оптимальный момент для переноса. Мы рекомендуем начинать переносить клоны тогда, когда они достигли в диаметре не менее 1 мм (Рисунок 3.3). В день переноса клеток следует подготовить 24-луночный планшет (или два) и залить Матригелем часть лунок, по числу клонов планируемых для переноса. Количество клонов необходимое для успешного поиска мутантов каждый исследователь должен решить сам для себя, исходя из своих ресурсов и возможностей. Мы рекомендуем, в первых экспериментах брать на скрининг не менее 24 клонов (оптимально 24-48). В наших настоящих экспериментах мы ограничиваемся 12-18 клонами, т.к. в этом случае достигнув эффективности появления делеции в 40-50%, мы в среднем получаем 3-9 мутантных клонов (с одинаковой мутацией) из одного эксперимента, что вполне достаточно для дальнейших исследований. Также следует приготовить ряд пробирок-эппендорфов для ПЦР (на 200мкл) по числу клонов, в которые необходимо залить 100 мкл полной ростовой среды mTesR1 с 5мкМ Y27632.

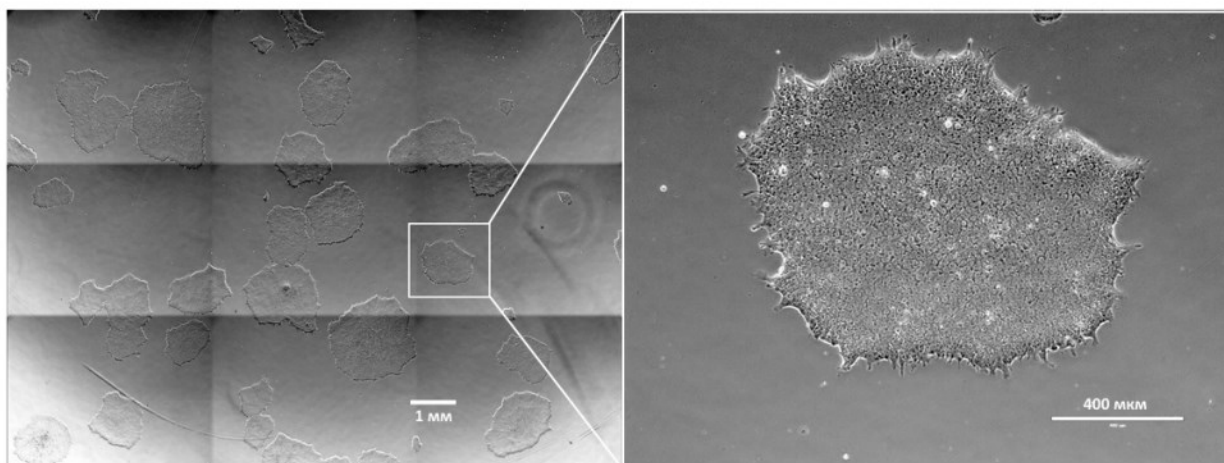


Рисунок 3.3 - Вид колоний ИПСК после клонирования предельным разведением, перед механическим переносом. Колонии должны быть минимум 1 мм в диаметре

19) Подготовьте клетки для механического переноса. Для этого удалите полную ростовую среду, налейте в чашки Петри раствор диспазы с чистой средой DMEM/F12 в пропорции 1:1, 1:2 до конечной концентрации 0,3-0,5 мг/мл (в чашке Петри Ø5,5 см должно быть в итоге 2-3 мл), аккуратным покачиванием добейтесь того чтобы раствор равномерно покрыл дно чашки. Поместите клетки на +37°C и через 5-10 минут клетки начнут отходить от пластика. Раствор диспазы обладает способностью разрушать слой матригеля, но при этом не разрушать межклеточные связи, в результате колония ИПСК будет отходить от пластика не в виде отдельных клеток, а как единое целое. На начальном этапе процесса (который как раз нам и нужен), в микроскопе это будет похоже на блюдо – края колонии начнут загибаться внутрь, образуя кайму (Рисунок 3.4). Как только вы увидите, что края колоний только начали отходить от пластика – можно начинать перенос.

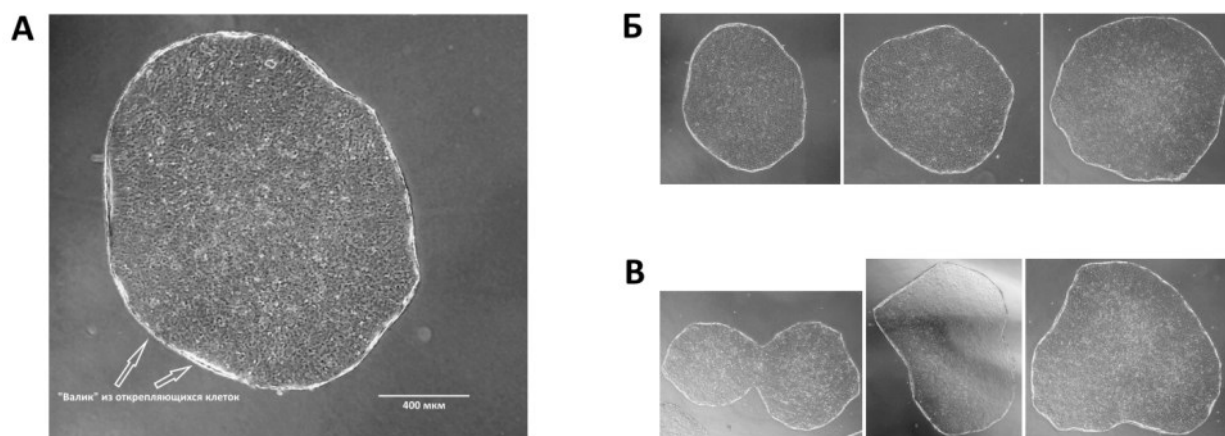


Рисунок 3.4 - Вид колоний ИПСК после инкубации с диспазой 0,3 мг/мл в течении 5-10 минут при +37°C. А – образование «валика» из открепляющихся клеток по краю колонии является сигналом к тому, что можно начинать перенос. Б – примеры «хорошей» морфологии колоний, стремящейся по форме к кругу, при которой можно надеяться на то, что колония является потомком одной клетки (клоном). В – примеры «плохой» морфологии колоний, которых по возможности следует избегать

20) Поместите чашку Петри под микроскоп и при помощи носика на 10 мкл на соответствующем дозаторе начните забирать отдельный клон. Для этого следует аккуратными движениями - толчками (которые вы контролируете, глядя в микроскоп) начав с «нижнего» края, соскрести колонию с пластика, по возможности, не допуская разрывов тела колонии. При этом в конце такой процедуры колония будет плавать в растворе в виде бесформенного комка. Заберите колонию в носик, по возможности минимизировав количество лишней жидкости (обычно для забора средней колонии требуется забрать в носик 2-3 мкл). Перенесите колонию клеток в 200мкл пробирку со средой, контролируя визуально, что она точно перенеслась, а не прилипла к внутренней стенке носика (что регулярно случается). Приступите к следующему клону. При выборе клонов для переноса - следует обращать внимание на форму колонии, крайне желательно чтобы она напоминала ровную окружность и при этом среднего размера, характерного для этой чашки Петри. Следует избегать чрезмерно больших колоний (выбывающихся из общего правила) или имеющих форму эллипсов и восьмерок, т.к. с большой вероятностью они получены из нескольких клонов (Рисунок 3.4).

Касаемо стерильности рабочего места при переносе. Идеальным является вариант с установкой микроскопа в ламинарный бокс 1-го или 2-го уровня и осуществлением всех процедур там. Однако не всегда это представляется возможным, поэтому часто эту процедуру приходится выполнять «на воздухе». В таком случае достаточно протереть 70% этиловым спиртом все рабочие поверхности микроскопа, постараться одеть чистый или одноразовый халат, медицинскую шапочку, маску, перчатки и тщательно

минимизировать время нахождения стерильных растворов открытыми. Если комната (клеточный бокс) в которой проходит процедура оборудована установкой чистого воздуха (через HEPA фильтры), это существенно поможет. Также желательно перед процедурой обеззаразить воздух в комнате при помощи ультрафиолета в течении 15-30 минут.

21) После того как все планируемые колонии собраны и перенесены в 200мкл пробирки, необходимо половину клеток каждого клона отсадить на дальнейшее культивирование, тогда как другая половина пойдет на анализ по генотипированию (скрининг). Для этого удалите матригель из лунок 24-луночного планшета и залейте туда по 500 мкл полной ростовой средой mTeSR1, с 5мкМ Y-27632. Далее при помощи носика на 100 мкл ресуспендируйте каждый клон по отдельности, избегая чрезмерного пипетирования (обычно хватает 20-30 пипетирований средней интенсивности). Наблюдайте визуально как колония разрушается до состояния неразличимых глазу комков, раствор становится слегка мутным. Перенесите 50 мкл получившейся суспензии в лунку 24-луночного плато со средой, перемешайте аккуратным покачиванием. Приступите к следующему клону. После окончания поместите клетки в CO₂-инкубатор.

22) Осадите оставшиеся клетки в пробирках при помощи центрифугирования 1000-5000g в течении 5 минут. Обычно, если колония была достаточно большой, то осадок можно увидеть невооруженным глазом. Аккуратно удалите супернатант, по возможности забрав почти всю жидкость. Ресуспендируйте тщательно клетки в 10-20 мкл лизирующего буфера (буфер TE + протеиназа K). Далее поместите пробирки в амплификатор, настроенный на следующую программу:

- +56°C – 2 часа
- +95°C – 10 минут
- +4°C - ∞

Примерно через 2 часа 10 минут образцы будут готовы для дальнейшего генотипирования. При желании их можно заморозить на -20°C.

Основной смысл использования такого усеченного протокола выделения геномной ДНК (а не стандартного протокола с очисткой на фенол-хлороформе), это необходимость проведения быстрого скрининга клонов в течении 1-3 дней, с последующим отбором нужных мутантов, до того, как все отобранные клоны вырастут и будут требовать большого количества дорогостоящей среды и времени. Поэтому приходится работать с небольшим количеством клеток.

В дальнейшем, для скрининга клонов и поиска нужных мутантов можно применять несколько методов, каждый из которых обладает рядом своих преимуществ и недостатков, поэтому для надежного скрининга мы рекомендуем совмещать как минимум два разных

метода (например, обычный ПЦР анализ и HRM-анализ, или обычный ПЦР и цифровой капельный ПЦР). Данные полученные от двух независимых тест-анализов как правило можно считать надежными. В дальнейших пяти частях протокола мы постараемся кратко описать эти основные методы и наши рекомендации по их проведению.

3.3.6 Дизайн праймеров и зондов для генотипирования при помощи ПЦР (в т.ч. цифрового капельного ПЦР)

Определение успешности процесса редактирования нуклеотидной последовательности того или иного гена можно осуществить разными способами — как качественными (анализ продуктов ПЦР с помощью эндонуклеазы T7E1 или анализ кривых плавления продуктов ПЦР в высоком разрешении (HRM)), так и количественными (цифровой капельной ПЦР, ПЦР в реальном времени). Все эти способы предполагают амплификацию редактируемого участка нуклеотидной последовательности, которая должна быть ограничена парой специфических праймеров. Подбор такой пары праймеров можно осуществлять с помощью систем PrimerBlast и Primer3Plus. При использовании PrimerBlast мы стараемся выбирать праймеры, для которых значения параметров Self Complementarity и Self 3' Complementarity минимально. При использовании метода HRM компания Bio-Rad рекомендует использовать праймеры, ограничивающие ампликон не длиннее 250 пар оснований. Это связано с тем, что в коротких ампликонах даже незначительные изменения в его нуклеотидной последовательности влияют на температуру плавления. Для таких приложений, как цифровая капельная ПЦР возможно использование праймеров, амплифицирующих значительно больший участок ДНК, но в целом удобнее выбирать универсальные праймеры, пригодные для использования сразу во всех необходимых приложениях. Поэтому в своей работе мы стараемся использовать праймеры, ограничивающие участок ДНК не более 250 пар нуклеотидов. Это накладывает определенные ограничения на доступный для выбора праймеров фрагмент ДНК. Поэтому, если это возможно, подбор праймеров стоит проводить сразу вместе с выбором гидовых РНК.

В случае использования цифровой капельной ПЦР или ПЦР в реальном времени предполагается использование двух различных флуоресцентных ДНК-зондов, один из которых связывается непосредственно с редактируемым участком ДНК, в то время как второй связывается с интактным участком ДНК. Для наглядности проиллюстрируем расположение зондов на Рисунке 3.5. Редактируемый участок ДНК отмечен красным, флуоресцентные зонды отмечены синим и зеленым, праймеры показаны желтым.

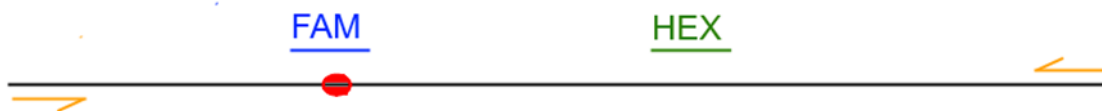


Рисунок 3.5 - Положения зондов FAM и HEX на ампликоне. Красным отмечено место предполагаемой делеции. В случае ПЦР с интактной аллели дикого типа, мы увидим присутствие обоих меток FAM и HEX. В случае ПЦР с мутантной аллели мы увидим только присутствие только метки HEX

Положение зонда, связывающегося с редактируемым участком ДНК (зонд FAM), определяется возможным размером делеции, возникающей при двуцепочечном разрыве ДНК. Судя по нашему опыту, расстояние между праймерами и местом двуцепочечного разрыва должно быть не менее 50 нуклеотидов. Расстояние между зондами так же должно быть желательно не менее 50 нуклеотидов. По отношению к праймерам положение зонда HEX более свободно — важно лишь, чтобы расстояние между зондом и праймером было не менее 5 нуклеотидов.

В случае использования цифровой капельной ПЦР особенно важно, чтобы зонды имели одинаковую температуру отжига (в нашей работе мы стремимся к тому, чтобы расчетная разница температур отжига была не более 0,5°C). Температура отжига праймеров должна быть на 1-3°C ниже температуры отжига флуоресцентных зондов. При изготовлении зондов для цифровой капельной ПЦР важно, чтобы очистка олигонуклеотидов была проведена как можно качественнее. В противном случае разделение кластера капель спроедшей ПЦР и негативного кластера может быть затруднено из-за низкой флуоресценции и высокого фона.

3.3.7 Скрининг клонов при помощи стандартного ПЦР-анализа

Самым простым и быстрым способом определения делеции в желаемом участке гена является классический ПЦР и электрофорез в агарозном геле. Для этого дизайн гидовых РНК и дизайн праймеров для генотипирования должны позволять увидеть делецию в обычном 2% агарозном геле с окраской бромистым этидием. Для этого мы рекомендуем закладывать делецию не менее 30 нуклеотидов (при длине ампликона не более 250 п.н). До проведения основных экспериментов мы рекомендуем проведение тестовых ПЦР с градиентом температуры отжига праймеров, для определения оптимальной температуры, при которой идет амплификация специфичного продукта, и нет вторичных неспецифичных продуктов. Определив оптимальную температуру, приготовьте несколько реакционных смесей (по числу клонов + несколько контрольных реакций) по следующей схеме:

- 5-кратный Мастермикс ScreenMix-HS - 4 мкл

- Прямой праймер, 10мкМ - 1мкл
- Обратный праймер, 10мкМ - 1мкл
- Вода, свободная от нуклеаз – 13 мкл
- Клеточный лизат - 1 мкл
- Всего, общий объем - 20 мкл

В числе контрольных реакций мы рекомендуем включать контроль без матрицы (no template control, NTC), негативный контроль матрицы дикого типа (wild type, WT), положительный контроль с необходимой мутацией (при ее наличии, например, с прошлых экспериментов). После приготовления необходимо тщательно перемешать реакционные смеси и поместить пробирки в амплификатор, запустив следующую программу:

Цикл, номер	Температура, °C	Длительность
1	95	5 мин
1-35	95	30 сек
1-35	T _m (подобранная температура отжига)	30 сек
1-35	72	30 сек
36	72	2 мин
4		∞

После проведения ПЦР, перенесите по 5-10 мкл продукта из каждой пробирки в индивидуальные лунки в 2% агарозном геле содержащем бромистый этидий (использование окрашенного 5-кратного Мастермикса ScreenMix позволяет не смешивать предарительно пробу с буфером для нанесения, а непосредственно наносить продукт в гель). Проведите электрофорез при 100В в течении 30-40 мин. Получившуюся картину можно пронаблюдать либо на трансиллюминаторе, либо системой гель-документации Gel Doc (Рисунок 3.6). При наличии мутантных клонов (аллелей) и в случае значительной делеции (30-40 нуклеотидов) их будет четко видно на фоне контролей с матрицей дикого типа и интактных клонов.

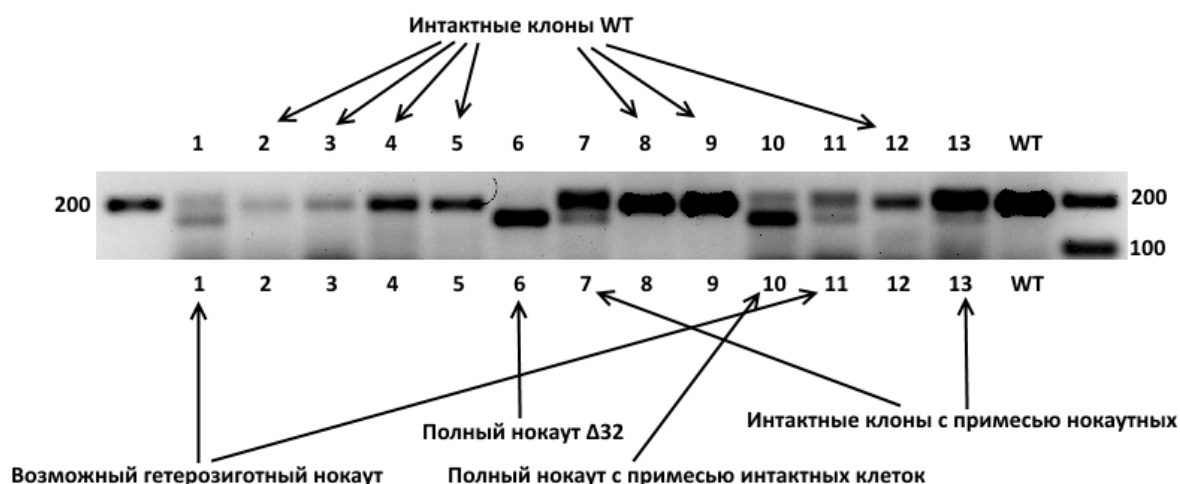


Рисунок 3.6 - Результаты скрининга клонов ИПСК на присутствие мутации $\Delta 32$. Из 13-и клонов, 6 клонов оказались интактными, аналогичными контролю дикого типа WT. Образец №6 соответствует полному нокауту $\Delta 32$, образец №10 - полному нокауту $\Delta 32$ с небольшой примесью интактных клеток, образцы №1 и №11 – возможно гетерозиготный нокаут, и образцы №7 и 13 – интактные клетки с примесью мутантных аллелей

Одним из основных минусов данного метода скрининга является низкая разрешающая способность – чаще всего невозможно достоверно разделить два бенда с разницей 1-15 нуклеотидов. В случае использовании стратегии с одной гидовой РНК, когда спектр делеций сдвинут в сторону мелких делеций (3-5 п.н.) такой метод скорее всего не поможет найти мутантные клоны. Определенным выходом в этом случае может стать проведение полиакриламидного гель-электрофореза (ПААГ), который в случае идеально подобранных условий может дать разрешение 3-5 нуклеотидов, однако учитывая, что этот метод более трудоемкий и больше зависит от качества реагентов чем агарозный гель-электрофорез, такой подбор условий редко кому удастся сделать (особенно «с нуля»). Чаще всего разрешение ПААГ составляет те же 15-20 нуклеотидов.

3.3.8 Скрининг клонов при помощи плавления высокого разрешения (HRM)

Также, относительно простым и быстрым способом скрининга является метод анализа кривой плавления ампликонов в высоком разрешении (High Resolution Melting). Суть метода заключается в том, что короткие ампликоны с делециями с повышением температуры начинают плавиться раньше, чем ампликоны дикого типа, и это можно отследить при помощи флуоресценции насыщающих красителей интеркалирующего типа (на основе Eva Green) и соответствующих амплификаторов, в которых есть данная опция (например, Bio-Rad CFX96). После проведения ПЦР и плавления, специализированное программное обеспечение позволяет обработать кривые плавления, сравнить их друг с другом и с контролями, и по результатам определить какие клоны имеют делеции.

Для проведения HRM анализа приготовьте ряд реакционных смесей (по числу клонов в триплетах или дуплетах + несколько контрольных реакций также в триплетах или дуплетах) по следующей схеме:

- 2-кратный Мастермикс Precision Melt SuperMix - 10 мкл
- Прямой праймер, 10мкМ - 1мкл
- Обратный праймер, 10мкМ - 1мкл
- Вода, свободная от нуклеаз – 3 мкл
- Раствор ДНК - 5 мкл
- Всего, общий объем - 20 мкл

Для избежания ошибок пипетирования рекомендуется вносить в реакцию предварительно разбавленный раствор ДНК в объеме не менее 5 мкл. Требования к количеству ДНК соответствуют требованиям для проведения обычного ПЦР в реальном времени. Однако, существенным является примерно одинаковое количество ДНК, образующееся в ходе реакции. Необходимо, чтобы амплификационные кривые для каждой лунки успели выйти на плато к концу реакции. Так же желательно, чтобы амплификационные кривые для всех анализируемых образцов «укладывались» в диапазон шириной 3 цикла. (Количество исходной ДНК отличается не более, чем в 10 раз). При использовании не очищенных клеточных лизатов в качестве матрицы для ПЦР, когда определение количества ДНК в растворе затруднено, мы добавляем их в реакцию в объеме от 1 до 3 мкл.

В числе контрольных реакций мы рекомендуем включать контроль без матрицы (NTC), негативный контроль матрицы дикого типа (этих вариантов лучше сделать несколько лунок, лучше всего 4-5), положительный контроль с необходимой мутацией (при ее наличии, например, с прошлых экспериментов). После приготовления необходимо тщательно перемешать реакционные смеси и поместить пробирки в амплификатор, запустив следующую программу:

Цикл, номер	Температура, °C	Длительность
1	98	2 мин
1-40	95	15 сек
1-40	Tm(подобранная температура отжига)	1 мин
41	95	1 мин
41	70	1 мин
41	Построение кривой плавления в высоком разрешении (изменение температуры с шагом от 0,1 до 0,2 °C)	10 сек на шаг

После проведения ПЦР и плавления, обработайте кривые плавления, разделите их на кластеры по триплетам (или дуплетам), взяв кластер кривых дикого типа в качестве

референсного (Рисунок 3.7). Кривые делетированных ампликонов после обработки будут выглядеть как «ямы». Основным фактором доверия к результатам является повторяемость попадания вариантов в одном кластере внутри триплета друг в друга.

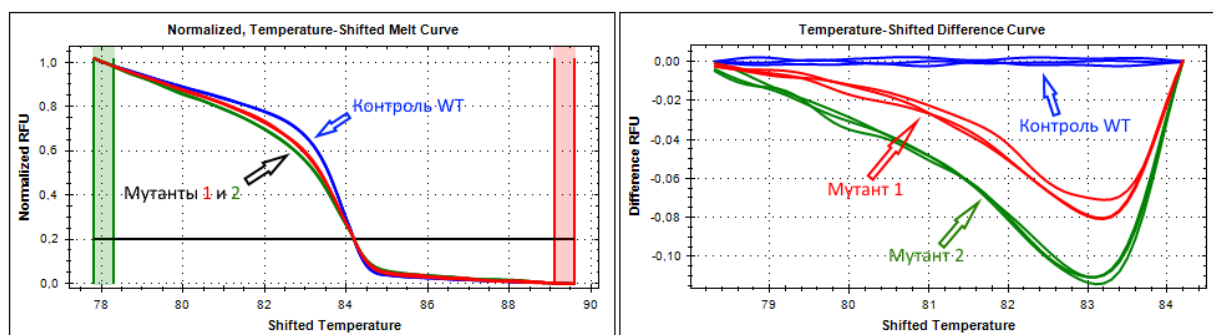


Рисунок 3.7 - Кривые плавления ампликонов при анализе плавлением высокого разрешения (HRM). Слева представлены нормализованные кривые плавления, справа представлен результат обработки, в котором кластер контроля дикого типа (WT) взят в качестве референсного. Видно значительное отличие кривых мутантов №1 и №2 от контроля. В данном случае можно сказать, что в образце №2 есть ампликоны со значительной делецией, которая больше чем в №1. Также возможны варианты, что в №2 – это гомозиготная делеция, а в №1 – гетерозиготная делеция, или что образец №1 загрязнен ампликонами дикого типа менее чем №2

Разрешение данного метода, в случае хорошо подобранным праймеров и условий ПЦР позволяет выявить делеции 3-5 нуклеотидов. К недостаткам следует отнести более высокую стоимость метода (как правило наборы для HRM анализа следует покупать у производителя прибора) и необходимость наличия самого прибора с данной опцией. Также к недостаткам следует отнести то, что это опосредованный метод наблюдения делеций, и высокий риск наблюдения ложноположительных результатов. Так, например, в случае плохо пройденного ПЦР с низкой эффективностью, из-за попадания в смесь неких ингибиторов, полученный ампликон (несмотря на то что он получен с WT матрицы) – будет показывать наличие делеции. По нашему опыту перед анализом кривых плавления необходимо обязательно провести анализ собственно самих амплификационных кривых и отбросить те варианты, в которых кривые показывают низкую эффективность (не имеют вид S –образных логарифмических кривых).

3.3.9 Скрининг клонов при помощи цифрового капельного ПЦР (ddPCR)

Достаточно информативным и быстрым способом скрининга может стать анализ генотипа при помощи цифрового капельного ПЦР (droplet digital PCR, ddPCR). Суть метода заключается в том, что реакционная смесь разделяется на несколько тысяч изолированных капель (20 мкл смеси на 15-20 тысяч капель) и ставится обычный ПЦР. При попадании молекулы матрицы в такую каплю, там успешно проходит ПЦР, что может быть

зарегистрировано либо по красителю EvaGreen, либо по флуоресцентной краске с ДНК-зонда. После ПЦР распределение капель (положительные/отрицательные) анализируются на специальном приборе, который работает по принципу аналогичному проточному цитофлуориметру. При использовании дизайна написания праймеров и зондов для скрининга, описанных в части 6 данного протокола, анализируя результаты можно с легкостью определить мутантный клон или нет, и самое главное определить точное соотношение мутантных и интактных аллелей, в случае их смешанного наличия в клоне. Дело в том, что одной из существенных проблем нокаута генов именно в ИПСК заключается в том, что часто колонии бывают загрязнены небольшой долей клеток с другим генотипом. Особенно это часто происходит, в случае неправильно поставленного клонирования малым разведением. В этом случае можно постараться получить чистый мутантный клон путем повторного клонирования и скрининга, однако для этого важно понять какой из клонов наиболее подходит для этого. В настоящий момент времени, на российском рынке существует несколько производителей, предлагающих несколько приборов для цифрового ПЦР, работающих на немного различающихся принципах, поэтому дальнейшие рекомендации мы предлагаем для прибора QX200 Bio-Rad с генератором капель AutoDGBio-Rad, на котором были получены наши результаты.

Для проведения цифрового капельного ПЦР приготовьте ряд реакционных смесей (по числу клонов в триплетах или дуплетах + несколько контрольных реакций также в триплетах или дуплетах) по следующей схеме:

- 2-кратный Мастермикс для проб - 11 мкл
- Прямой праймер, 10мкМ - 1,8 мкл
- Обратный праймер, 10мкМ - 1,8 мкл
- Зонд 1, 10 мкМ - 0,5 мкл
- Зонд 2, 10 мкМ - 0,5 мкл
- Вода, свободная от нуклеаз – 1,4 мкл
- Раствор ДНК - 5 мкл
- Всего, общий объем - 22 мкл

Во избежание ошибок пипетирования рекомендуется вносить в реакцию предварительно разбавленный раствор ДНК в объеме не менее 5 мкл. Компания Био-Рад рекомендует вносить в одну реакцию от 10 пикограмм до 350 нанограмм геномной ДНК. При использовании не очищенных клеточных лизатов в качестве матрицы для ПЦР, когда определение количества ДНК в растворе затруднено, мы добавляем их в реакцию в объеме от 1 до 3 мкл. В числе контрольных реакций мы рекомендуем включать контроль без

матрицы (NTC), негативный контроль матрицы дикого типа (этих вариантов лучше сделать несколько лунок, лучше всего 4-5), положительный контроль с необходимой мутацией (при ее наличии, например, с прошлых экспериментов). После приготовления необходимо тщательно перемешать реакционные смеси и поместить пробирки в прибор запускающий генерацию капель.

После генерации капель перенесите реакционные смеси в 96-луночный планшет (предварительно запаяв планшет фольгой в течении 5 секунд при 180°C) в обычный амплификатор, запустив следующую программу:

Цикл, номер	Температура, °C	Длительность
1	95	10 мин
1-40	94	30 сек
1-40	Tm(подобранная температура отжига)	1 мин
1	98	10 мин
36	72	2 мин
	4	∞

Важной особенностью проведения амплификации при работе с каплями является скорость изменения температуры. Био-рад рекомендует устанавливать значение Ramp Rate равным 2°C/сек. После прохождения ПЦР, перенесите плашку с каплями в прибор считывания сигнала с капель и запустите программу считывания. В результате проведенного анализа программа прибора выдаст результат в виде нескольких диаграмм, по считанным параметрам (количество капель, количество негативных капель, количество позитивных капель в канале FAM, количество позитивных капель в канале HEX) (Рисунок 3.8). В случае использования двух зондов (один на мутацию, второй на интактный участок), самым информативным будет анализ по двухмерной плот-диаграмме (X=HEX, Y=FAM), в которой положение мутантных и интактных капель становится наиболее очевидным (Рисунок 3.8).

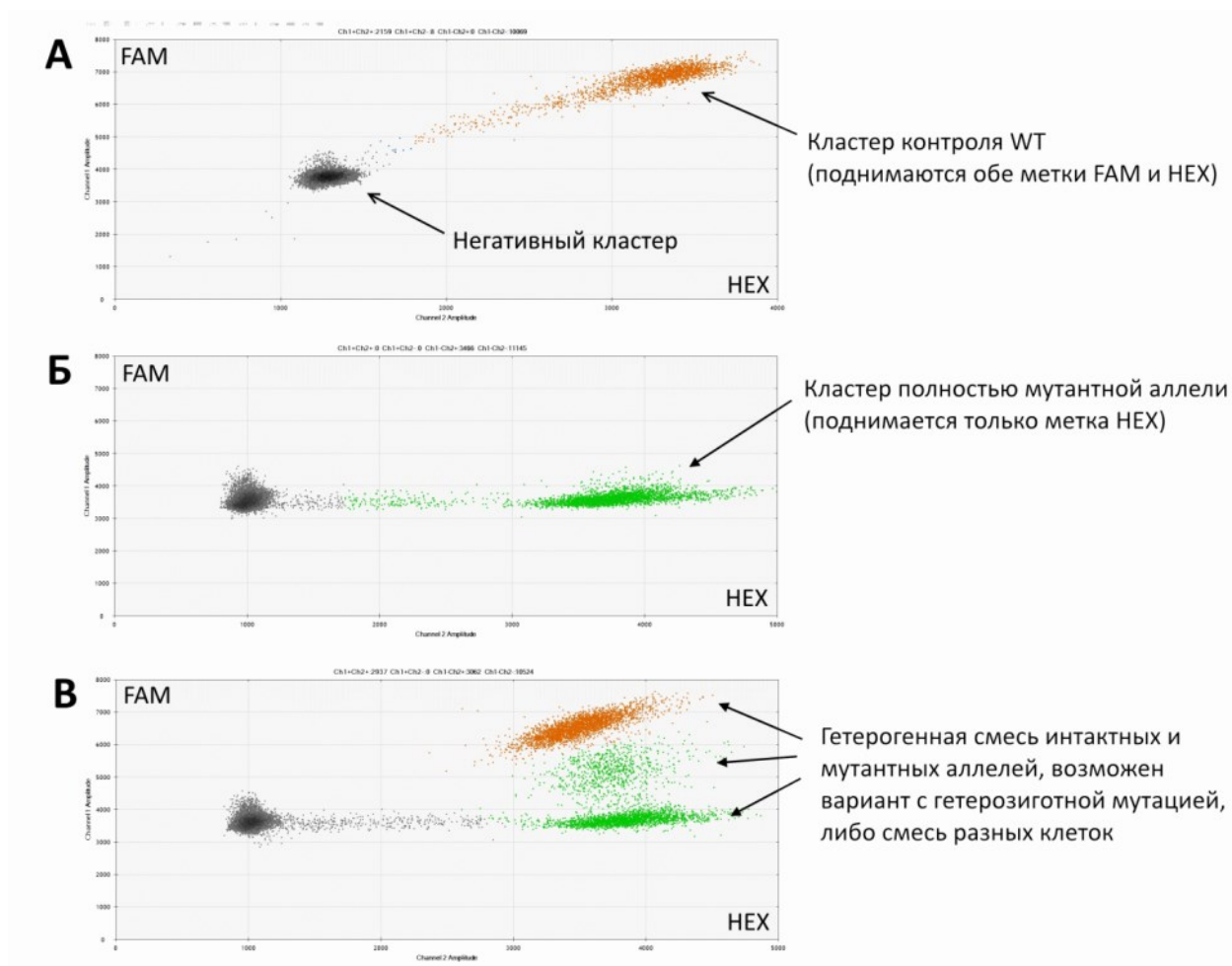


Рисунок 3.8 - Результаты анализа трех образцов при помощи цифрового капельного ПЦР.

А – В образце присутствует только аллель контроля дикого типа. **Б** – в образце присутствует только мутантная аллель с делецией. **В** – в образце присутствует смесь из аллелей обоих типов, возможно присутствие аллели третьего типа (промежуточная делеция)

Таким образом, цифровой капельный ПЦР является мощным средством для скрининга клонов ИПСК, основными преимуществами является: точный количественный результат (можно достоверно определить разницу в количестве ДНК в 5%, что невозможно при использовании ПЦР в реальном времени) соотношения мутантных/интактных аллелей в пробе и способность работы с ультранизкими значениями матрицы (достаточно 30-40 молекул матрицы в 1 мкл, для достоверного анализа). К основным недостаткам следует отнести: значительная цена анализа (в 10 раз выше чем ПЦР в реальном времени), необходимость доступа к дорогостоящим приборам (комплект стоит в 3-4 раза дороже амплификатора для ПЦР в реальном времени) и узкий динамический диапазон допустимых концентраций матрицы (в случае концентрированной ДНК-матрицы требуется сильное разведение и «пристрелочные» измерения).

3.3.10 Скрининг клонов при помощи капиллярного электрофореза

Также достаточно информативным способом скрининга клонов может стать капиллярный электрофорез ампликонов, получившихся в результате обычного ПЦР-анализа описанного в части 7 настоящего протокола. Как правило капиллярный электрофорез позволяет с высоким разрешением измерить длину получившегося ампликона, а также относительно измерить его количество. Существует также несколько приборов для проведения капиллярного электрофореза, работающих по немного отличающимся принципам. Поэтому дальнейшие рекомендации мы предлагаем для прибора ABI Genetic Analyzer 3500, на котором были получены наши результаты. Для проведения анализа в этом случае необходимо присутствие флуоресцентного маркера в анализируемом ампликоне, для этого достаточно заказать прямой или обратный праймер, на 5'-конце которого будет флуорофор FAM.

Для проведения скрининга клонов при помощи капиллярного электрофореза, проведите стандартный ПЦР, в котором один из праймеров будет с FAM меткой. Далее полученные ампликоны разведите бидистиллированной водой в 150-300 раз (для каждого локуса необходимо будет подобрать свои условия в зависимости от выхода реакции амплификации и длины получаемых фрагментов). 1,5 мкл полученного раствора очистите переосаждением этанолом с добавлением ацетата аммония. Высушенный осадок растворите в деионизованном формамиде, содержащем маркер молекулярного веса (в подходящем для изучаемого фрагмента диапазоне и также меченый флуорофором, отличным от метки на ампликоне). Для завершения процедуры проведите для образца капиллярный электрофорез по протоколу для фрагментного анализа на используемом генетическом анализаторе. В случае присутствия мутантных клонов, вы легко определите их наличие по отличию измеряемой длины ампликонов для исходного клона и клонов с делециями (Рисунок 3.9).

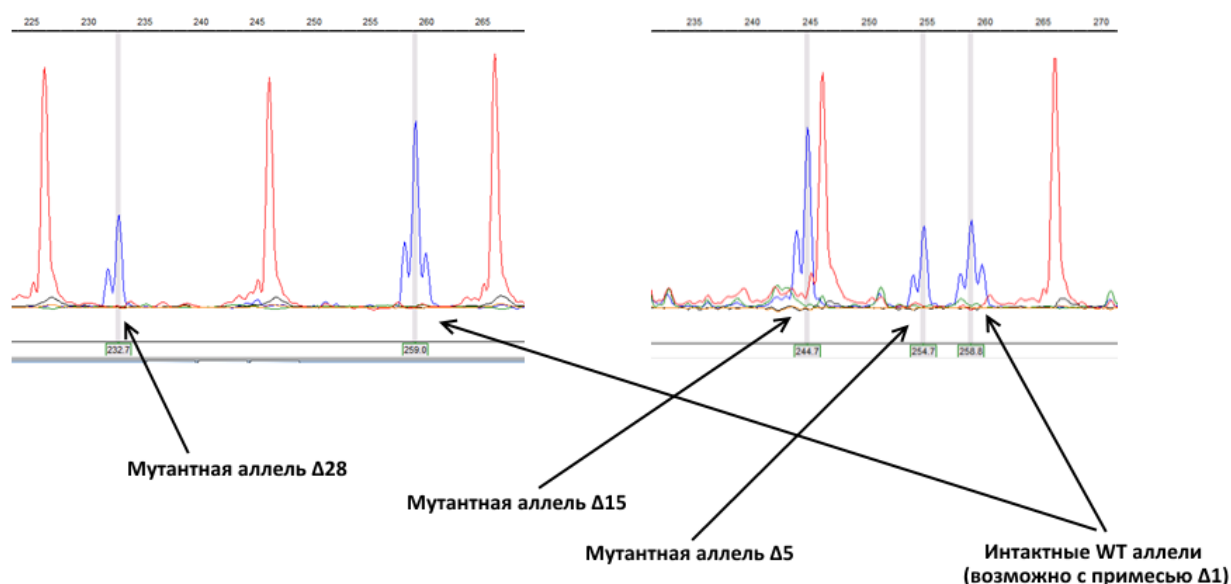


Рисунок 3.9 - Результаты капиллярного электрофореза двух образцов, в каждом из которых присутствует смесь из интактных ампликонов, соответствующих контролю дикого типа WT и мутантных ампликонов с делециями Δ28, Δ15, Δ5. С небольшой долей вероятности можно утверждать также, что возможно присутствуют аллели с делецией Δ1, которые сливаются с интактными

Главным преимуществом этого метода скрининга является высокое разрешение, достигающее в пределе 1 нуклеотида (на самом деле в нашем случае это 2-3 нуклеотида, учитывая ряд особенностей, например, то что обычная Taq-полимераза добавляет с большой вероятностью нуклеотид А на 3'-конец ампликона), что позволяет в итоге найти самые мелкие делеции (которые, тем не менее, с таким же успехом могут привести к нокауту гена, также, как и большие делеции). Также положительной стороной метода может служить возможность полуколичественного (по высоте пика) определения соотношения мутантного/интактного ампликона, если таковые окажутся в одной пробе. К минусам метода следует отнести необходимость доступа к достаточно редким приборам и узкий динамический диапазон концентрации образцов, что требует тщательно рассчитанных разведений.

3.3.11 Нарращивание и заморозка ИПСК

Итак, после проведения скрининга тем или способов (в течении 2-3 суток), из числа вышеописанных методов, вы можете определить какие клоны из вашего набора представляют интерес. Обычно в наших условиях мы получаем 40-50% мутантных аллелей из общего числа, таким образом, из 12-24 клонов мы в среднем получаем 3-9 гомозиготных мутантов с планируемой делецией и 3-9 гетерозиготных мутантов. Этого количества вполне достаточно для надежного выведения нескольких мутантных линий ИПСК. Мы рекомендуем взять в наращивание для дальнейшего анализа как можно больше интересующих вас клонов, поскольку клонирование является серьезным фактором

«бутылочного горлышка», в результате которого часть клонов ИПСК могут не подойти для исследований (например, иметь хромосомные aberrации). При дальнейших анализах следует обязательно провести секвенирование по Сенгеру интересующего участка гена, при этом желательно выделить геномную ДНК стандартным методом с очисткой на фенол-хлороформе. Для этого следует нарастить достаточно больше количество клеток и заодно заморозить в жидком азоте несколько аликвот клеток для создания точки «сохранения» работы.

23) После того как ИПСК в лунках 24-луночного планшета доросли до состояния 30-50% конфлентности их можно переселять для дальнейшего наращивания и заморозки. За 1 час до пересадки клеток, приготовьте 2 чашки Петри Ø5,5 см покрытые Матригелем. Удалите полную ростовую среду из лунки, добавьте 150 мкл раствора аккутазы и поставьте планшет на +37°C. Через 5-10 минут, клетки открепятся от пластика и начнут плавать в растворе в виде кластеров. Долейте 1 мл стерильного PBS или чистой среды DMEM/F12 и ресуспендируйте клетки, избегая излишнего пипетирования и пенообразования. Залейте 1,15 мл суспензии клеток в 1,5 мл пробирку-эппендорф и перемешайте содержимое переворачиванием пробирки (3-5 раз). Центрифугируйте клетки в течении 5 минут при 200-250g (примерно 2000об/мин в маленькой центрифуге размера Eppendorf Minispin), тщательно удалите супернатант, ресуспендируйте осадок клеток в 1 мл полной ростовой среды mTeSR1. Посадите клетки по 0,5 мл в чашки Петри, в полной ростовой среде mTeSR1 (4 мл), обязательно с содержанием Rock-ингибитора Y-27632.

24) На следующий день, убедившись в наличии живых клеток, прикрепившихся к субстрату, поменяйте полностью культуральную среду с мертвыми клетками, на свежую среду также с содержанием Рок-ингибитора Y-27632 в конечной концентрации 5мкМ. Далее наращивайте клетки со сменой среды примерно 1 раз в 2 суток. Когда колонии ИПСК достигнут устойчивого размера (т.е. содержащие порядка 40-50 клеток, это обычно должно занять 4-6 суток) рок-ингибитор Y-27632 можно отменить, и по мере увеличения количества клеток следует увеличить частоту смены среды до ежедневной.

25) После того как колонии ИПСК вырастут до необходимого размера (порядка 1-2 мм в диаметре), либо достигли конфлюентности 40-50% от общей площади чашки можно спассировать для заморозки. Снимите клетки с пластика при помощи раствора аккутазы, по вышеописанной методике. Посчитайте концентрацию и общее количество клеток в полученной суспензии при помощи камеры Горяева либо автоматического счетчика клеток. Какое-то количество клеток (1/40-1/50) можно оставить для дальнейшего наращивания, часть (желательно, не менее 500*103) – пустить на выделение геномной ДНК, остальное заморозить. Для успешной заморозки ИПСК к сожалению, требуются

покупные среды и растворы, такие как FresR (Stem Cell Technologies) или Vambanker (Bulldog Bio), поскольку использование стандартной процедуры с 10% ДМСО в ростовой среде, не обеспечивает надежный процент выживших клеток. Использование сыворотки при этом также крайне нежелательно, поскольку может вызвать спонтанную дифференцировку ИПСК.

26) Ресуспендируйте клетки в крио-среде, исходя из соотношения 10⁶ клеток на одну ампулу в 300 мкл. Разлейте клетки по крио-ампулам (подпишите их заранее), и поместите на низкотемпературный холодильник на -70°C - -80°C на 24 часа. Через сутки, соблюдая все меры предосторожности переместите клетки в жидкий азот.

Изменение дифференцировочного статуса клеток возможно не только с помощью генетического манипулирования, но также с использованием подходов прямого и цитокин-опосредованного репрограммирования. Эти подходы, так же как и генетическое манипулирование планируется использовать для разработки технологий в регенеративной медицине на основе разработанных моделей заболеваний [13] и клеточных технологий диагностики и методов клеточной терапии [14, 15, 16].

3.4 Заключение

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека являются удобным и перспективным ресурсом клеток, поскольку ИПСК можно дифференцировать практически во все типы стволовых и прогениторных клеток взрослого организма. Данное свойство можно использовать в различных областях регенеративной медицины и фундаментальной клеточной биологии. В связи с бурным развитием систем редактирования генома, а именно CRISPR/Cas9, стали актуальны методы нокаутирования различных генов в культурах клеток, в том числе и в ИПСК. В данной работе мы разработали детальный протокол получения линий ИПСК с нокаутированными целевыми генами, сочетающий разные методические приемы (электропорация, клеточный сортинг, скрининг клонов, в т.ч. при помощи цифрового капельного ПЦР).

3.5 Список использованных источников

- 1 Chambers S.M. et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling//Nat. Biotechnol. - 2009. - Vol. 27, N 3. P. 275 – 280.
- 2 Muratore C.R. et al. Comparison and Optimization of hiPSC Forebrain Cortical Differentiation Protocols//PLoS One / ed. Dottori M. - 2014. - Vol. 9, N 8. P. e105807.
- 3 Zhong X. et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs//Nat. Commun. - 2014. - Vol. 5, N 1. P. 4047.
- 4 Rowland T.J. et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to retinal pigmented epithelium in defined conditions using purified extracellular matrix proteins//J. Tissue Eng. Regen. Med. - 2013. - Vol. 7, N. 8. P. 642 – 653.
- 5 Gong J. et al. Differentiation of Human Protein-Induced Pluripotent Stem Cells toward a Retinal Pigment Epithelial Cell Fate//PLoS One / ed. Lewin A.S. - 2015. - Vol. 10, N 11. P. e0143272.
- 6 Leach L.L. et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium: A Comparative Study Between Cell Lines and Differentiation Methods//J. Ocul. Pharmacol. Ther. - 2016. - Vol. 32, N 5. P. 317 – 330.
- 7 Roy-Chowdhury N. et al. Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells//Hepatol. Int. - 2017. - Vol. 11, N 1. P. 54 – 69.
- 8 Kaserman J.E., Wilson A.A. Protocol for Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) to a Hepatic Lineage//Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). - 2017. - Vol. 1639. P. 151 – 160.
- 9 Lu C. et al. Role of circadian gene Clock during differentiation of mouse pluripotent stem cells//Protein Cell. - 2016. - Vol. 7, N 11. P. 820 – 832.
- 10 Jeong M.-H. et al. A Shh coreceptor Cdo is required for efficient cardiomyogenesis of pluripotent stem cells//J. Mol. Cell. Cardiol. - 2016. - Vol. 93. P. 57 – 66.
- 11 Wang P. et al. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in neurodevelopment//Mol. Autism. - 2015. - Vol. 6, N 1. P. 55.
- 12 Ye L. et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, - 2014. - Vol. 111, N 26. P. 9591 – 9596.
- 13 Gvazava I.G., Rogovaya O.S., Borisov M.A., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and rodent experimental models//Acta Naturae. -2018. - Vol. 10, N 1. P. 24 - 33).- Гвазава И.Г., Роговая О.С., Борисов М.А., Воротеляк Е.А., Васильев А.В. Патогенез сахарного диабета 1 типа и экспериментальные модели на

лабораторных грызунах//Acta Naturae. - 2018. - Т. 10, № 1 (36). P. 25 - 35.

14 Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Skryabin N.A., Nikitina T.V., Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Lopatkina M.E., Salyukova O.A., Chechetkina N.N., Vorotelyak E.A., Kalabusheva E.P., Fishman V.S., Kzhyshkowska J., Graziano C., Magini P., Romeo G., Lebedev I.N. A mosaic intragenic microduplication of LAMA1 and a constitutional 18p11.32 microduplication in a patient with keratosis pilaris and intellectual disability//American Journal of Medical Genetics, Part A. - 2018. DOI: 10.1002/ajmg.a.40478.

15 Chermnykh E.S., Kiseleva E.V., Rogovaya O.S., Rippa A.L., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A. Tissue-engineered biological dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue//Histol Histopathol. - 2018. - Vol. 33. e:18006. May 30:18006. DOI: 10.14670/HH-18-006.

16 Зубрицкий В.Ф., Ивашкин А.Н., Загородний Н.В., Артемьев А.А., Фоминых Е.М., Васильев А.В., Лебедева Ю.Н. Реимплантация криоконсервированных жизнеспособных аутодермотрансплантатов при тяжелой травме опорно-двигательного аппарата//Медицинский вестник МВД. - 2018. - Т. ХСIII, № 2 (93). С. 15 - 17.

Раздел 4. Стволовые и родоначальные клетки в индивидуальном развитии. Роль стволовых и родоначальных клеток в формировании и восстановлении тканей

4.1. Введение

Открытие стволовых клеток (СК) - одно из важнейших событий в биологии прошедшего века, знаменует новую эпоху в исследовании таких фундаментальных проблем биологии развития, как морфогенетические преобразования тканей и органов, закономерности клеточной пролиферации и дифференцировки, восстановление тканей. Тканеспецифические стволовые клетки, образуют несколько типов клеток в пределах одного вида ткани и ответственны за развитие и регенерацию органов и тканей в течение всей жизни организма. Основные свойства СК – способность к самоподдержанию и неограниченно долгой продукции дифференцированных клеток, служат теоретической и экспериментальной базой для разработки принципиально новых методов клеточной терапии и тканевой инженерии и вызвали к жизни новую отрасль медицины – медицину регенеративную.

4.1.1. Роль мезенхимных стромальных клеток (МСК) в формировании мышечной ткани и ее восстановлении после повреждения.

В настоящее время МСК рассматриваются в качестве наиболее перспективного ресурса для клеточной терапии, выступая как короткодистантные универсальные регуляторы физиологической и репаративной регенерации. Они присутствуют практически во всех органах и тканях, где создают микроокружение для тканеспецифических стволовых клеток, регулируют жизнедеятельность клеток и поддерживают гомеостаз тканей [1] Биологически активные факторы, выделяемые МСК стимулируют ангиогенез, митотическую активность клеток, подавляют образование рубца и апоптоз [2-5].

Полученные в последние годы экспериментальные данные свидетельствуют о том, что стимуляция регенерации поврежденных мышц может быть достигнута с помощью введения МСК [6-9].

Целью работы было исследование влияния МСК и их секреторных продуктов на восстановление мышечной ткани после повреждения. Это было сделано на моделях подкожного введения измельченных мышц и механического повреждения скелетных мышц.

4.1.2. Влияние мезенхимных стромальных клеток и кондиционированной ими среды на заживление кожных ран

Различные повреждения кожи - порезы, ожоги, раны, полученные в ходе боевых действий, в том числе длительно незаживающие раны на фоне диабета и облучения являются актуальной медицинской проблемой.

В этой связи особый интерес для экспериментальной биологии и практической медицины представляет участие МСК в регенерации кожных повреждений. В случае острой раны или раны на фоне диабета у экспериментальных животных введение МСК способствует ее закрытию [10, 11]. Гистологический анализ показал, что МСК ускоряет эпителизацию, увеличивает образование грануляционной ткани и ангиогенез [12]. У человека также уменьшается размер хронически незаживающих ран при использовании в терапии аутологичных МСК [13].

С помощью двойного мечения GFP и соответствующими специфическими маркерами кератиноцитов (панкератин), эндотелия (CD31) и перицитов (α -SMA) показано, что МСК в ране могут дифференцироваться в эти клеточные типы [14]). Однако малочисленность и короткий срок жизни донорских клеток делают маловероятным их существенный вклад в заживление раны. Большинство исследователей рассматривает в качестве наиболее реального механизма участия МСК в регенерации паракринную стимуляцию местных клеточных источников. Так, улучшение заживления ран происходило при введении кондиционированной МСК среды, содержащей секретируемые ими факторы роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермиса, кератиноцитов, ангиопоэтин-1 [15, 16]. Кроме того, среда, кондиционированная МСК, способствовала привлечению

макрофагов и предшественников эндотелиальных клеток, что также и ускоряло регенераторный процесс [15].

Цель работы состояла в оценке способности МСК и их секретомов стимулировать заживление полнослойного дефекта кожи у крыс.

4.1.3. Происхождение кроветворных стволовых клеток в эмбриональном развитии (обзор литературы) [17].

Костный мозг является главным источником стволовых кроветворных клеток (СКК). СКК дают все типы кроветворных клеток и обеспечивают восстановление зрелых клеток крови после их естественной гибели, а также в ходе патологических процессов или после действия различных повреждающих агентов. СКК взрослого костного мозга являются потомками СКК, которые появились в раннем онтогенезе до формирования костного мозга и не обладают полным набором свойств, характерным для СКК взрослого организма. В эмбриональном развитии кроветворение происходит в нескольких транзиторных кроветворных органах - желточном мешке, аорто-гонадо-мезонефросе (АГМ), плаценте и печени [18-21]. Хотя онтогенез кроветворной системы интенсивно

исследуется на протяжении более 100 лет, дискуссионным остается вопрос о возникновении первых кроветворных клеток, их особенностях и вкладе различных анатомических образований в дефинитивный гемопоэз.

Цель обзора - дать представление о современном состоянии проблемы происхождения кроветворных СК, свойствах кроветворных клеток из различных эмбриональных источников и их вкладе в колонизацию печени и дефинитивный гемопоэз.

4.2. Материалы и методы

4.2.1. МСК получали из костного мозга половозрелых крыс, который выделяли из бедренных и большеберцовых костей, промывая диафизы средой α -MEM (HyClone, США). Фетальные фибробласты выделяли из кожи 20-суточных плодов путем обработки тканевых фрагментов 0,075%-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) в течение 30 мин при 37°C. Клетки костного мозга и фетальной кожи культивировали в пластиковых флаконах площадью 75 см² (Greiner, Германия) при 37°C и 5% CO₂ в среде α -MEM с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика, пенициллина и стрептомицина (все – HyClone). Пассирование проводили по достижении конфлюэнтного монослоя, снимая клетки 0,25%-ным раствором трипсина с ЭДТА (HyClone) и пересекая их в соотношении 1 : 2.

Для исследования влияния МСК на миогенез *in vivo* использовали модель эктопической трансплантации измельченных мышц. Мышечную ткань задних конечностей крысы измельчали и смешивали с суспензией МСК 2-го пассажа (меченных GFP или немеченых). На спине половозрелых крыс под хлоралгидратным наркозом формировали два подкожных кармана, в один из которых помещали мышечную ткань, смешанную с МСК (7×10^5 – 1.6×10^6 клеток на каждого реципиента), в другой – только мышечную ткань. На разрез кожи накладывали швы. Спустя 5 сут животных выводили из эксперимента.

Механическое повреждение наносили половозрелым крысам под общим наркозом (бнотрибрюшинное введение раствора хлоралгидрата в дозе 100 мг/кг), делая глубокий поперечный разрез краниальной большеберцовой мышцы с последующим наложением швов на кожную рану. Непосредственно после операции либо спустя 4 сут в область повреждения инъецировали 1×10^6 МСК 2-го пассажа в 100 мкл среды DMEM. Контролем служило введение 100 мкл среды DMEM без клеток либо 1×10^6 фетальных кожных фибробластов 2-го пассажа в 100 мкл DMEM. Аналогичным образом в мышцы непосредственно после их повреждения инъецировали 100 мкл среды, кондиционированной МСК 2-го пассажа. В качестве контроля в мышцы вводили тот же

объем DMEM с 10% ФТС либо среды, кондиционированной фетальными кожными фибробластами 2-го пассажа. Часть экспериментальных животных получали четыре повторные инъекции 100 мкл кондиционированной МСК или контрольной среды через 3, 5, 7 и 10 сут после травмы. В ряде опытов кондиционированную МСК среду и контрольную среду (DMEM с 10% ФТС) перед введением в мышцы концентрировали путем лиофилизации с последующим разведением в 1/20 первоначального объема. Животных выводили из эксперимента через 5 или 14 сут после нанесения травмы.

Для оценки присутствия в регенерате МСК и их возможном участии в образовании миотуб в одном эксперименте проводили трансфекцию МСК геном зеленого флуоресцентного белка (GFP).

Мечение МСК проводили путем аденовирусной инфекции на 2-м пассаже после образования клеточного монослоя. Вирусные частицы, несущие ген GFP, были сконструированы в лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН на основе системы Ad.MAX (SignaGen Laboratories, США), включающей шатл-вектор DC311, несущий ген GFP, и геномную плазмиду pBHGloxΔE13Cre. Культуру клеток 293 (эпителиальные клетки почки эмбриона человека) дважды заражали сконструированными вирусными частицами для наращивания их количества, после чего замораживали и размораживали для лизирования клеток. Вирусные частицы отделяли от клеточного детрита центрифугированием. Во флаконы с культурой МСК после удаления среды вносили 0,5 мл суспензии вируса и 1,5 мл αMEM с 10% ФТС; спустя 2 ч добавляли свежую культуральную среду. Смену среды проводили через 1–3 сут. Эффективность трансфекции оценивали путем прижизненного наблюдения флуоресценции GFP в инвертированный микроскоп. В экспериментах использовали культуры, содержащие не менее 50% флуоресцирующих клеток, через 4–5 сут после трансфекции.

Регенерирующие мышцы и подкожные трансплантаты фиксировали 10%-ным формалином, предварительно выдержав 30 мин в физиологическом растворе, приготавливали парафиновые срезы и окрашивали их гематоксилин-эозином либо по методу Маллори согласно протоколу производителя (Bio-Optica, Италия). Площадь областей воспаления и фиброза измеряли на микрофотографиях срезов мышц с помощью программы ImageJ и выражали в процентах от общей площади среза. Эффективность ангиогенеза оценивали, подсчитывая число сосудов на 1мм² площади среза. Количественные данные обрабатывали статистически с использованием таблиц Стрелкова (Стрелков, 1999); достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

4.2.2. В работе были использованы неинбредные крысы Wistar (самки в возрасте 3-6 месяцев) и их плоды 20 суток развития. Клетки костного мозга выделяли, промывая диафизы бедренных и больших берцовых костей половозрелых крыс средой α MEM (HyClone, США), фибробласты получали путем обработки кожи плодов 0,075%-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) в течение 30 мин при 37°C. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде α -MEM с 10% ЭТС с добавлением L-глутамина, антибиотика-антимикотика и пенициллина-стрептомицина (все реактивы - HyClone, США) в течение 2 пассажей. Для подтверждения принадлежности выделенных клеток к МСК проводили иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител против CD73 (BD Pharmingen, США) и CD90 (Abcam, Великобритания) и вторых антител с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США), а также индуцировали остео- и адипогенную дифференцировку, культивируя клетки в индукционных средах, как было описано ранее.

На спину половозрелых крыс под хлоралгидратным наркозом наносили по две полнослойные кожные раны диаметром 2 см., после чего в раневое ложе инъецировали МСК костного мозга либо фибробласты кожи в 100 мкл среды α MEM. Доза вводимых клеток составляла 1×10^6 для МСК костного мозга и 1×10^6 либо 3×10^6 для фибробластов кожи. Контролем служили раны, в которые было введено 100 мкл среды α MEM. При исследовании заживления под влиянием секреторных продуктов МСК в опытные раны вводили 100 мкл среды, кондиционированной клетками из костного мозга или кожи, в контрольные – 100 мкл α MEM с 10% ЭТС. В части экспериментов введение кондиционированной и контрольной среды в раны проводили пятикратно (непосредственно после ранения, через 3, 5, 7 и 10 суток). Через 14 суток после нанесения ран проводили их биопсию. Материал фиксировали формалином, парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Число сосудов в поле зрения подсчитывали под микроскопом при увеличении $\times 100$, результаты обрабатывали статистически. Достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

4.3. Результаты и обсуждение

4.3.1.1. Влияние МСК на миогенез *in vivo* при подкожной трансплантации мышечной ткани.

При трансплантации измельченной мышечной ткани и МСК, меченных GFP, спустя 5 сут после операции в трансплантате обнаруживались флуоресцирующие клетки, расположенные главным образом вблизи фрагментов мышечных волокон или прилежащих к их поверхности, но не сливающихся с миообластами (Рисунок 4.1).

Добавление МСК к трансплантируемой ткани приводило к активации миогенеза, что выражалось в большем числе и размере вновь образованных миотуб по сравнению с контрольными образцами (трансплантация измельченных мышц без введения МСК) и в более раннем их образовании (на 2 сут раньше, чем в контроле). Процесс ангиогенеза также усиливался. Число кровеносных сосудов при введении МСК и в контроле составляло соответственно 6.3 ± 1.1 и 2.1 ± 0.2 на 1 мм² площади (различия достоверны при $p < 0.01$).

Таким образом, добавление МСК к трансплантируемым миогенным клеткам стимулировало ранние стадии восстановительного процесса.

Модель подкожного введения измельченных мышц (ранние стадии миогенеза)

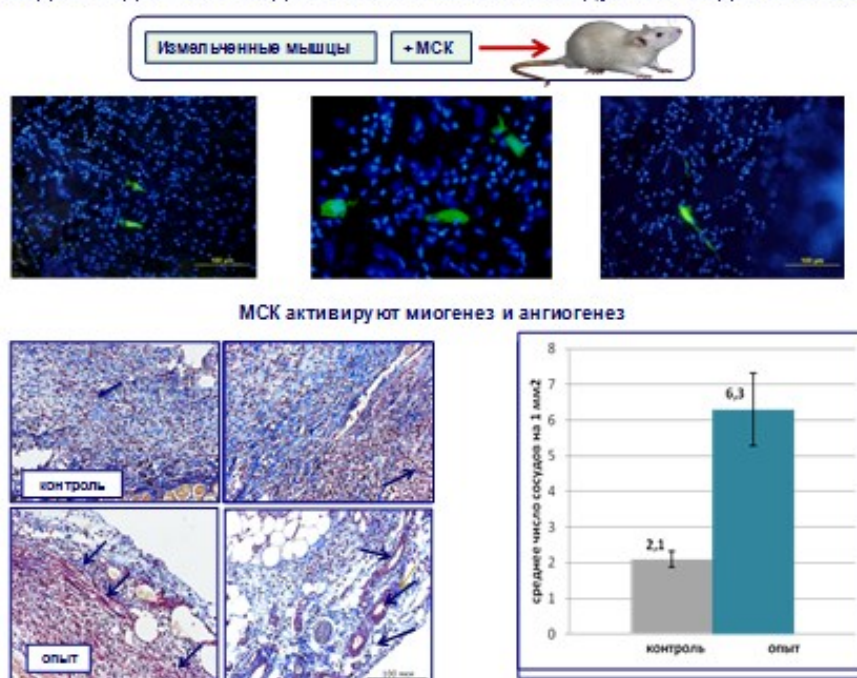


Рисунок 4.1 - 5-е сутки после подкожной трансплантации измельченных мышечных клеток совместно с МСК, меченными GFP.

4.3.1.2. Влияние МСК на регенерацию механически поврежденных мышц.

Для оценки влияния МСК на регенерацию скелетных мышц в более поздние сроки была использована модель механического повреждения мышц. На краниальную большеберцовую мышцу наносили глубокий поперечный разрез после чего на кожную рану накладывали шов. МСК инъецировали в область травмы; контролем служило введение фибробластов фетальной кожи или культуральной среды.

Гистологический анализ состояния мышц через 5 сут после повреждения показал, что МСК, введенные непосредственно после травмы, не влияли на раннюю стадию регенерации: как в контрольных, так и в опытных образцах наблюдались обширные зоны

разрушения мышечной ткани и выраженное воспаление (Рисунок 4.2). Через 5 сут после повреждения и введения МСК как в контрольных, так и в опытных образцах наблюдались обширные зоны разрушения мышечной ткани и выраженное воспаление.

МСК введены непосредственно после травмы.

5 сутки после повреждения

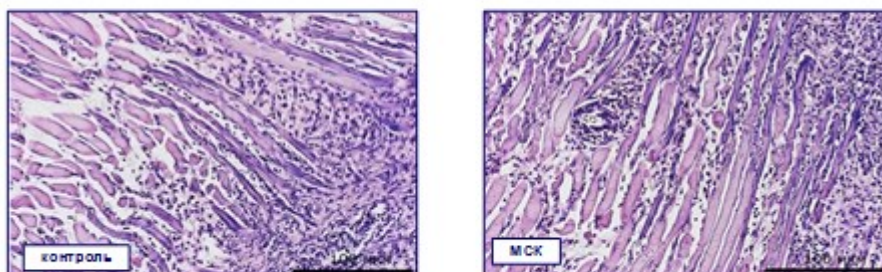


Рисунок 4.2 - 5-е сутки после повреждения и введения МСК в область травмы

Через 14 сут после повреждения регенерация как в контроле, так и в опыте была еще не завершена. При этом если при введении в мышцу культуральной среды или кожных фибробластов на месте повреждения в 80–100% случаев формировался соединительнотканый рубец (Рисунок 4.3), то при введении МСК частота его образования составляла около 50%. В то же время площадь фиброзной ткани после введения МСК была сопоставима с таковой в контроле (Рисунок 4.3).

МСК введены непосредственно после травмы.

14-е сутки после повреждения.

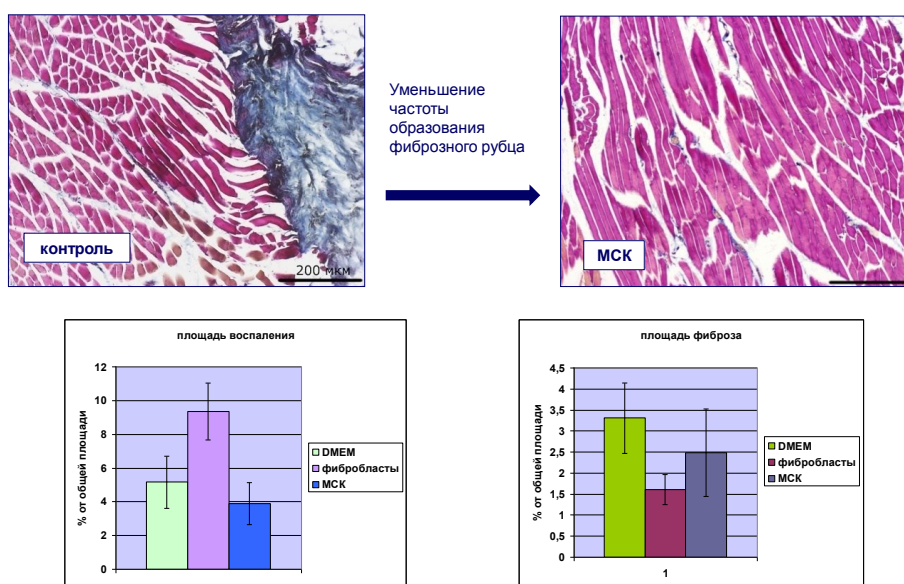


Рисунок 4.3 - 14-е сутки после повреждения и введения МСК в область травмы

Другие авторы, сообщавшие о существенном улучшении функциональной способности поврежденных мышц после введения МСК, связанном с увеличением численности и степени зрелости мышечных волокон, не обнаруживали при этом уменьшения признаков фиброгенеза [6; 9]. Введение МСК не влияло существенно на площадь зоны воспаления по сравнению с контролем (введение среды), хотя, как известно, МСК способны подавлять провоспалительные макрофаги М1 и активировать противовоспалительные макрофаги М2 [22, 23]. При введении кожных фибробластов область воспаления увеличивалась по сравнению с контрольными мышцами, в которые была введена среда, и регенерация задерживалась на макрофагальной стадии. Не исключено, что это было обусловлено секрецией фибробластами провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 [24]. Следует отметить, что при введении фибробластов большинство мышечных волокон оставались незрелыми, что свидетельствует о замедлении их формирования. Введение МСК, напротив, способствовало формированию более зрелых мышечных волокон и увеличению числа сосудов в регенерирующей ткани (Рисунок 4.4).

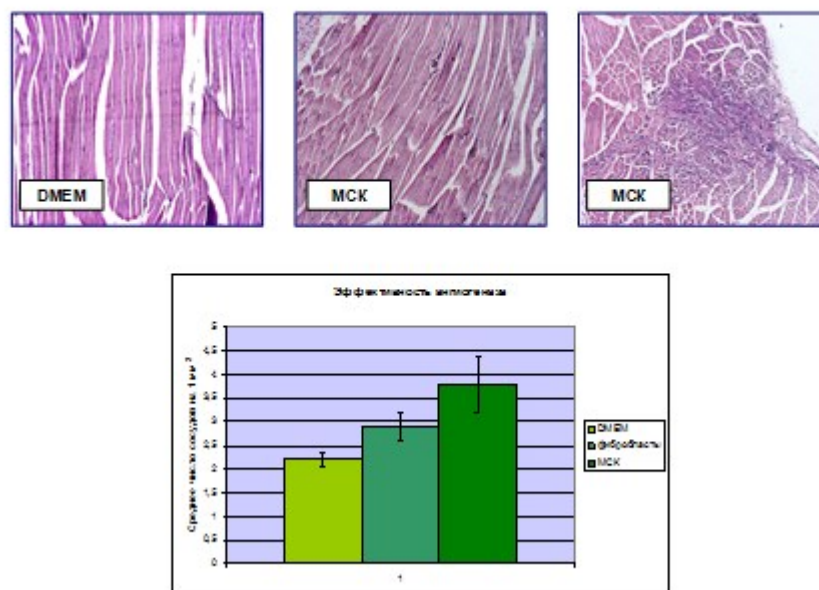


Рисунок 4.4 - 14-е сутки после нанесения травмы и введения МСК.
Формирование мышечных волокон и увеличение числа сосудов

В том случае, когда МСК вводили в мышцу через 4 сут после повреждения, наблюдали уменьшение площади фиброзной ткани и зоны воспаления по сравнению с контролем (введение среды) (Рисунок 4.5), тогда как инъекция кожных фибробластов эффекта не оказывала.

Отложенное введение МСК уменьшает площадь воспаления и площадь фиброза.

14 сутки после травмы.

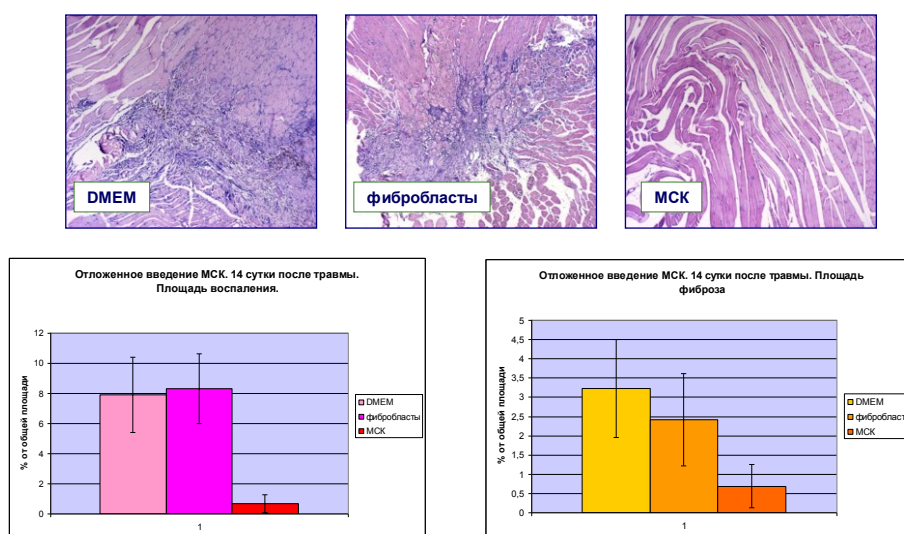


Рисунок 4.5 - МСК введены на 4-е сутки после повреждения. Отложенное введение МСК способствует уменьшению площади воспаления и фиброза.

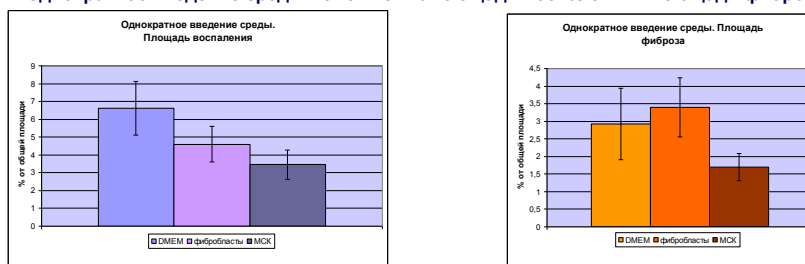
В предварительных экспериментах для доставки МСК в область повреждения были использованы скаффолды, полученные на основе коллагена SIS, белкозин и губка коллагеновая пористая (ГКП). Наилучшую васкуляризацию обеспечивала трансплантация МСК на скаффолде ГКП. Активация миогенеза была наиболее выражена при трансплантации МСК на SIS (децеллюляризированный подслизистый слой тонкой кишки).

4.3.1.3. Исследование паракринного влияния МСК на регенерацию скелетных мышц.

Однократное введение среды, кондиционированной МСК, не оказывало существенного влияния на регенерацию мышц, как и введение среды, кондиционированной кожными фибробластами. Однако при ее многократном введении площадь областей воспаления уменьшалась приблизительно в три раза по сравнению с контролем (Рисунок 4.6). Предварительные эксперименты по введению кондиционированной МСК среды, концентрация которой была повышена путем лиофилизации, выявили более активное по сравнению с контролем образование сосудов (Рисунок 4.6).

Введение среды, кондиционированной МСК.

Однократное введение среды не влияет на площадь воспаления и площадь фиброза



Многократное введение среды уменьшает площадь воспаления и площадь фиброза

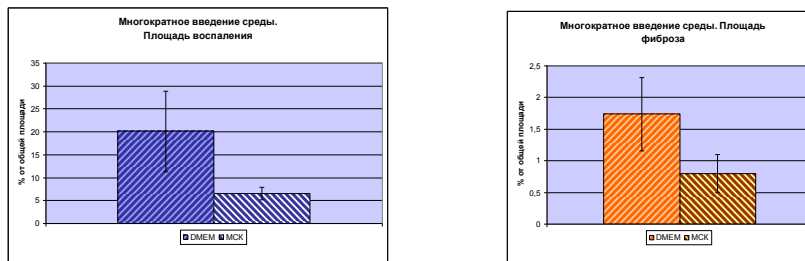


Рисунок 4.6 - Влияние однократного и многократного введения среды, кондиционированной МСК, на регенерацию мышц.

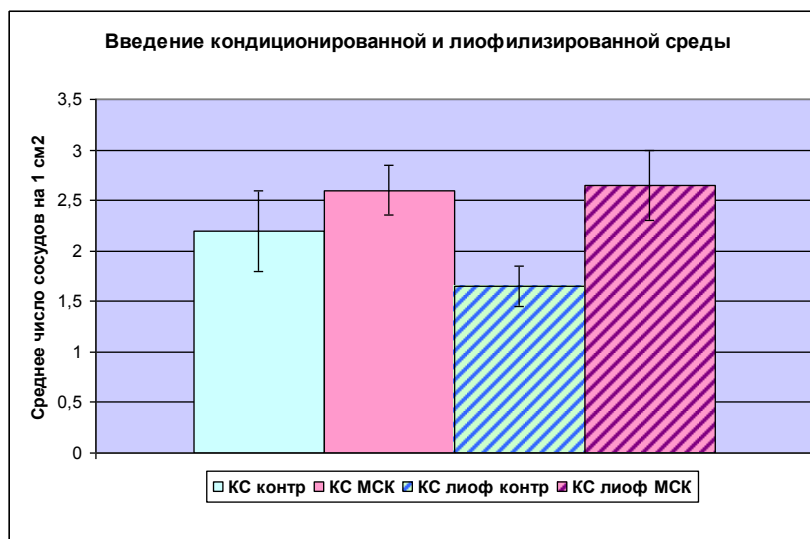


Рисунок 4.7 - Кондиционированная МСК лиофилизированная среда активирует образование сосудов в травмированной мышце.

Полученные результаты свидетельствуют, что противовоспалительное и ангиогенное действие МСК в ходе регенерации связано с продуцируемыми ими регуляторными молекулами; в частности, стимуляция образования кровеносных сосудов может быть обусловлена присутствием в секретоме МСК фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и ангиопоэтина-1 [14].

4.3.2. Анализ фенотипа и потенциалов клеток, выделенных из костного мозга, показал их выраженную способность к остеогенезу и адипогенезу в соответствующих индукционных средах, а также присутствие антигенов CD73 и CD90 на большинстве клеток. Таким образом, полученная культура удовлетворяла критериям, разработанным Международным обществом клеточной терапии для идентификации МСК [25]. В культуре фибробластов из кожи плодов CD73 несли лишь единичные клетки, а CD90 - менее 50% клеток; при инкубации в индукционных средах признаки адипогенеза были выражены слабо или умеренно, а остеогенеза – крайне слабо, что указывает на содержание в популяции лишь небольшой доли МСК.

Исследование биоптатов, взятых через 14 суток после нанесения раны, выявило в подлежащей соединительной ткани незначительное или умеренное воспаление и присутствие многочисленных сосудов, что характерно для формирования грануляционной ткани. В большинстве случаев рана была покрыта струпом, под который с краев дефекта начинал подрастать эпидермис (Рисунок 4.8, а, б). Введение МСК костного мозга не влияло существенно на степень воспаления и покрытия раны эпидермисом по сравнению с контролем. Однако в ранах, обработанных МСК, усиливалась васкуляризация грануляционной ткани: число сосудов в поле зрения повышалось, они были более крупными и разветвленными, чем в контроле (Рисунок 4.8, г, д, Таблица 4.1). Фибробласты из кожи плодов, введенные в той же дозе, что и клетки из костного мозга (1×10^6 клеток), не влияли на выраженность воспаления, васкуляризацию грануляционной ткани и полноту эпителизации. Однако при увеличении дозы вводимых фибробластов до 3×10^6 клеток отмечалась тенденция к некоторому замедлению закрытия раны и повышение числа сосудов (Таблица 4.1), вероятно, связанное с присутствием среди кожных фибробластов немногочисленных МСК.

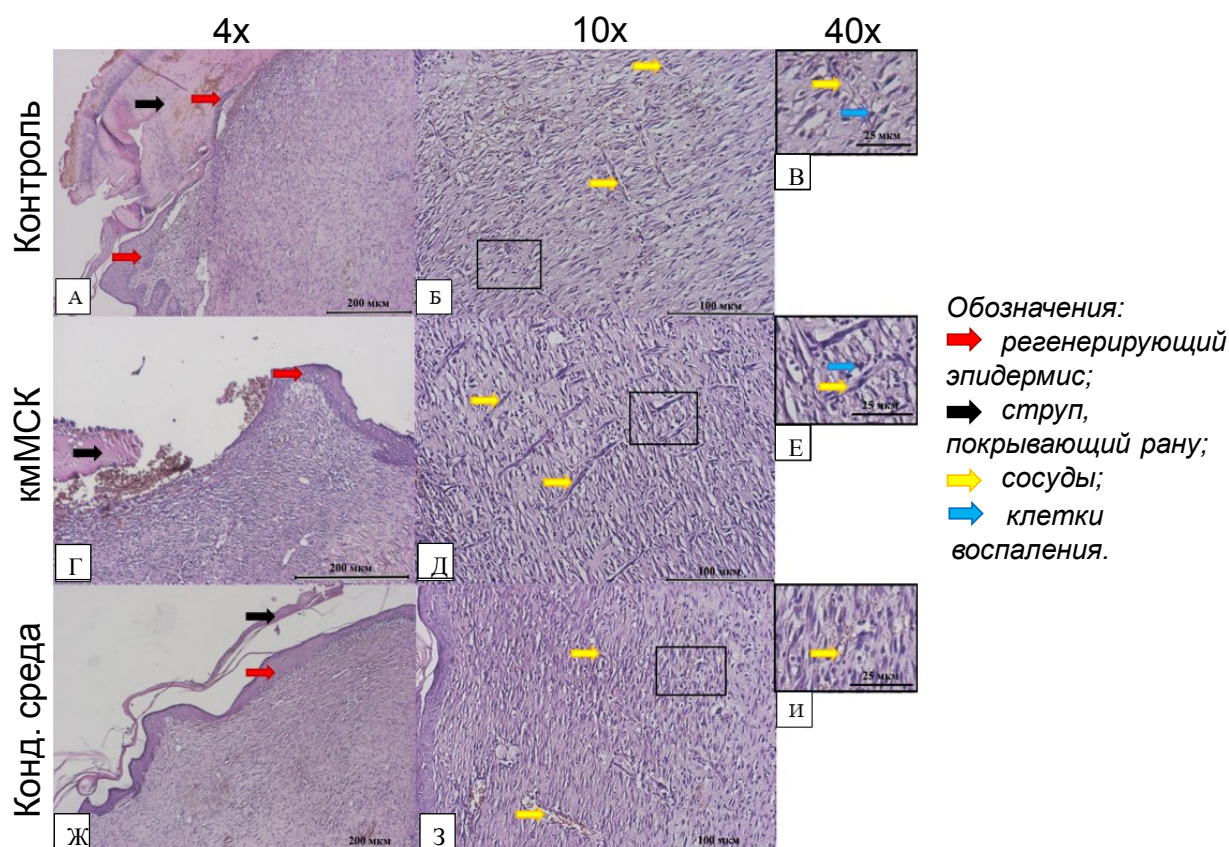


Рисунок 4.8 - 14-е сутки после нанесения раны. Регенерация кожной раны после введения суспензии костномозговых МСК и кондиционированной ими среды.

При однократном введении в рану среды, кондиционированной МСК костного мозга, эффект проявлялся в уменьшении воспаления или более полной эпителизации раны, но плотность сосудов была сопоставима с таковой в контроле (Рисунок 4.8, ж, з, Таблица 4.1), тогда как однократное введение среды, кондиционированной фибробластами кожи плодов, на состояние ран не влияло. При пятикратном введении кондиционированной МСК костного мозга среды васкуляризация ран была усилена по сравнению с введением контрольной среды (Таблица 4.1), хотя как опытные, так и контрольные раны затягивались позднее, чем при однократном введении (вероятно, из-за травмирования кожи повторными инъекциями). Очевидно, способность МСК усиливать рост сосудов в области дефекта связана с паракринной продукцией проангиогенных факторов, в частности, фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и ангиопоэтина-1 [14].

Таблица 4.1 - Число сосудов в грануляционной ткани после введения в рану клеток или кондиционированной ими среды (КС)

Источник клеток	Введено в рану	Число сосудов в поле зрения (об.х10, ок. х10)	
		контроль	опыт
Костный мозг	1х10 ⁶ клеток	35,67±5,46	69,67±6,72**
	100 мкл КС однократно	39,75±6,18	49,75±9,55
	по 100 мкл КС пятикратно	37,20±4,73	53,20±2,58*
Кожа плодов	1х10 ⁶ клеток	40,67±3,78	39,50±8,71
	3х10 ⁶ клеток	34,00±3,78	53,67±2,10**
	100 мкл КС однократно	40,80±6,02	43,80±5,59

4.3.3.В отличие от постнатального гемопоэза, происходящего в костном мозге, эмбриональный осуществляется во многих анатомических образованиях, обеспечивающих на протяжении пренатального периода разные этапы формирования и созревания кроветворных клеток [26]. Кроветворные функции этих образований частично перекрываются, однако каждое из них имеет и уникальные особенности (Рисунок 4.9). Желточный мешок служит первым местом продукции терминально дифференцированных клеток крови (примитивных эритроцитов) [27-29]. В АГМ закладываются *de novo* предшественники дефинитивного гемопоэза [21, 30-32]. В плаценте осуществляется гемопоэз *de novo*, в ней происходит размножение, но не дифференцировка СКК [19, 33-36]. Печень обеспечивает поддержание СКК и дифференцировку в множественных направлениях. В конце пренатального развития СКК перемещаются из печени в костный мозг.

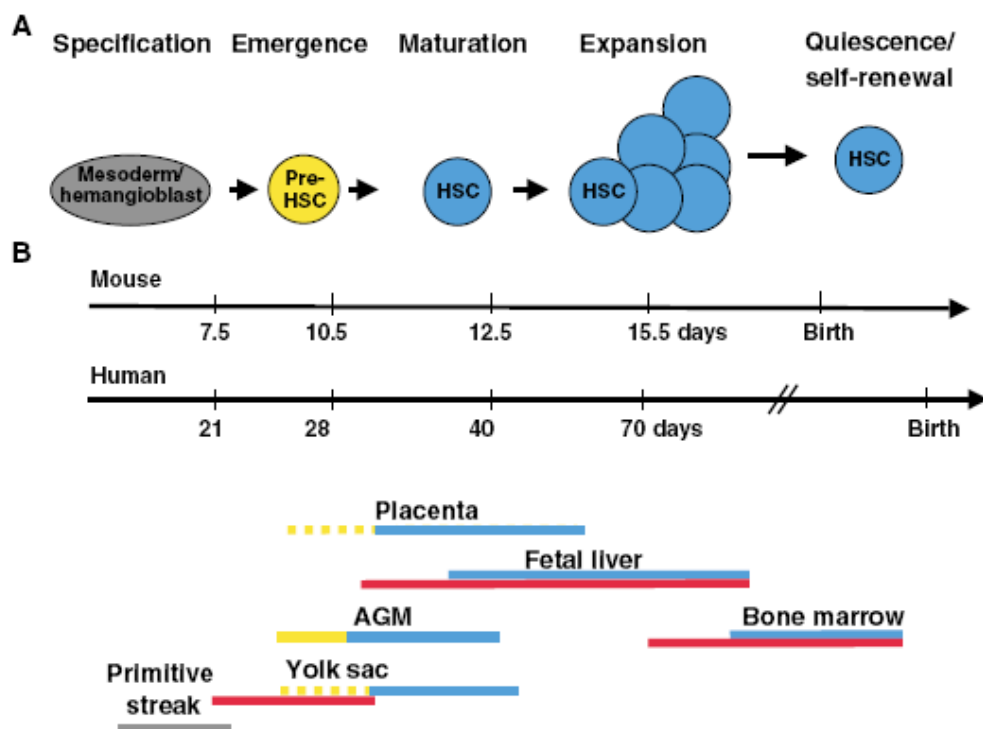


Рисунок 4.9 - Развитие пула СКК у мыши и человека. А – стадии развития кроветворных клеток, В – время активности кроветворных органов в эмбриогенезе (из Mikkola, Orkin, 2006)

Существование нескольких мест для кроветворения способствует, с одной стороны, быстрому образованию первых дифференцированных клеток крови, в которых нуждается эмбрион для выживания и роста, а с другой - созданию большого пула СКК, необходимых для постнатального кроветворения. Ведущая роль в смене мест локализации гемопоэза принадлежит МСК, формирующим кроветворное микроокружение. На разных этапах индивидуального развития, МСК претерпевают количественные и качественные изменения, отражающие процесс созревания кроветворной ниши. На пути своего перемещения пре-СКК попадают в различные ниши и подвергаются различным воздействиям, способствующим их размножению и функциональному созреванию, в результате чего приобретают фенотип и функциональные свойства СКК взрослого организма.

4.4. Заключение

4.4.1. Таким образом, введение в поврежденную мышцу МСК положительно влияет на ход восстановительного процесса:

- способствуют уменьшению частоты фиброза (а иногда и его площади),
- активируют ангиогенез,

- способствуют формированию зрелых мышечных волокон и в ряде случаев уменьшают площадь зоны воспаления.
- благотворное влияние МСК на регенерацию мышечной ткани связано с паракринной функцией, т.к. многократное введение кондиционированной ими среды или введение ее после лиофилизации, повышающей концентрацию содержимого, оказывает положительный эффект.

4.4.2. Введение в раневое ложе МСК, а также кондиционированной ими среды стимулирует ангиогенез в грануляционной ткани, что положительно сказывается на заживлении кожных ран.

4.4.3. Впервые на русском языке опубликован фундаментальный обзор современного состояния проблемы формирования дефинитивной популяции СКК в индивидуальном развитии [17]. В нем детально рассмотрены возникновение и свойства (фенотип, потенции к дифференцировке и самоподдержанию) СКК, возникающих в эмбриогенезе из разных источников. Дана подробная картина миграции кроветворных клеток и заселения ими закладок кроветворных органов и роль в этом процессе МСК, формирующих кроветворное микроокружение. Подобный обширный обзор современных представлений об особенностях формирования дефинитивной популяции СКК в онтогенезе может быть полезен широкому кругу биологов и медиков, работающих в области гематологии. Он также может быть рекомендован в качестве пособия по гематологии студентам и аспирантам ВУЗов биологического и медицинского профилей.

В отчетный период также опубликована статья по материалам проведенных ранее работ по изучению стимуляции заживления кожных ран мезенхимными стромальными клетками и кондиционированной ими средой [37].

4.5 Список использованных источников

- 1 Caplan A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight//J. Pathol. - 2009. - Vol. 217, N 2. P. 318 – 324.
- 2 Ohnishi S., Sumiyoshi H., Kitamura S., Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions//FEBS Lett. - 2007. - Vol. 581. P. 3961 - 3966.
- 3 Sassoli C., Pini A., Chellini F. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF//PLoS One. - 2012. - Vol. 7, N 7. P. e37512.
- 4 da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues//J Cell Sci.- 2006. - Vol. 1. P. 2204 - 2213.

- 5 Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M., et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts//Exp. Hematol. - 2008. - Vol. 36, N 5. P. 642 – 654.
- 6 Natsu K., Ochi M., Mochizuki Y., Hachisuka H., et al. Allogenic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers //Tissue Eng. - 2004. - Vol. 10, N 7–8. P. 1093 – 1112.
- 7 Shi D., Reinecke H., Murry Ch. E., Torok-Storbi B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells//Blood. - 2004. - Vol. 104, N 1. P. 290 – 294.
- 8 Winkler T., von Roth P., Radojewski P. et al. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats//J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2012. - Vol. 6. Suppl. 3. P. 60 – 67.
- 9 Andrade B.M., Baldanza M.R., Ribeiro K.C. et al. Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model//PLoS One. 2015. - Vol. 10, N 6. P. e0127561.
- 10 McFarlin K., Gao X., Liu Y.B., et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells accelerate wound healing in the rat//Wound Repair Regen. - 2006. - Vol. 14. P. 471 – 478.
- 11 Javazon E.H., Keswani S.G., Badillo A.T., et al. Enhanced epithelial gap closure and increased angiogenesis in wounds of diabetic mice treated with adult murine bone marrow stromal progenitor cells//Wound Repair Regen. - 2007. - Vol. 15. P. 350 – 359.
- 12 Kim J.W., Lee J.H., Lyoo Y.S., et al. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds//Vet Dermatol. - 2013. - Vol. 24(2). P. 242 – e53.doi: 10.1111/vde.12011.
- 13 Falanga V., Iwamoto S., Chartier M., et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds//Tissue Eng. - 2007. - Vol. 13. P. 1299 – 1312.
- 14 Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis//Stem Cells. - 2007. - Vol. 25, N 10. P. 2648 – 2659.
- 15 Chen L., Tredget E.E., Wu P.Y.G., Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing//PLoS ONE, - 2008, - Vol. 3, N 4. P. e1886.
- 16 Tamari M., Nishino Y., Yamamoto N., Ueda M. Acceleration of wound healing with stem cell-derived growth factors//Int. J. Oral Maxillofac. Implants. - 2013. - Vol. 28, N 6. P. e369 – e375.

- 17 Домарацкая Е.И., Паюшина О.В. Происхождение стволовых кроветворных клеток в эмбриональном развитии//Журнал общей биологии. - 2018. - Т. 79, № 5. С. 363 – 375.
- 18 Palis J., Robertson S., Kennedy M. et al. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse// Development. – 1999. - Vol. 126, N 22. P. 5073 - 5084.
- 19 Gekas C., Rhodes K.E., Van Handel B. et al. Hematopoietic stem cell development in the placenta//Int. J. Dev. Biol. - 2010. - Vol. 54, N 6-7. P. 1089 - 1098.
- 20 Ottersbach K., Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region//Dev Cell. - 2005. - Vol. 8, N 3. P. 377 - 387.
- 21 Medvinsky A., Rybtsov S., Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions// Development. - 2011. - Vol. 138, N 6. P. 1017 - 31.
- 22 Abumaree M.H., Al Jumah M.A., Kalionis B. et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages//Stem Cell Rev. - 2013. - Vol. 9, N 5. P. 620 – 641.
- 23 Le Blanc K., Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system//Nat. Rev. Immunol. - 2012. - Vol. 12. N 5. P. 383 – 396.
- 24 Vistejnova L., Safrankova B., Nesporova K. Low molecular weight hyaluronan mediated CD44 dependent induction of IL-6 and chemokines in human dermal fibroblasts potentiates innate immune response//Cytokine. - 2014. - Vol. 70, N 2. P. 97 – 103.
- 25 Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement//Cytotherapy. - 2006. - Vol.. 8, N 4. P. 315 – 317.
- 26 Mikkola H.K., Orkin S.H. The journey of developing hematopoietic stem cells//Development. - 2006. - Vol. 133. P. 3733-3744. doi:10.1242/dev.02568
- 27 Rampon C., Huber Ph. Multilineage hematopoietic progenitor activity generated autonomously in the mouse yolk sac: analysis using angiogenesis-defective embryos//Int. J. Dev. Biol. 2003. - Vol. 47. P. 273 - 280.
- 28 Moore M.A.S. Ontogeny of the hematopoietic system//Handbook of Stem Cells. – 2004. - Vol. 2. P. 159 - 170.
- 29 Samokhvalov I.M., Samokhvalova N.I., Nishikawa S. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis//Nature. – 2007. - Vol. 446, N 7139. P. 1056 - 1061.
- 30 Cumano A., Dieterlen-Lièvre F., Godin I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura//Cell. - 1996. - Vol. 86, N. 6. P. 907 - 916.

- 31 Yokomizo T., Dzierzak E. Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos//Development. - 2010. - Vol. 137, N 21. P. 3651 - 3661.
- 32 Rybtsov S., Sobiesiak M., Taoudi S. et al. Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region//J. Exp. Med. - 2011. - Vol. 208, N 6. P. 1305 - 1315.
- 33 Alvarez-Silva M., Belo-Diabangouaya P., Salaün J., Dieterlen-Lièvre F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ//Development. - 2003. - Vol. 130, N 22. P. 5437 - 5444.
- 34 Azevedo P.N., Tavares G.P., Croy B.A., Pelajo-Machado M. Localization of transient immature hematopoietic cells to two distinct, potential niches in the developing mouse placenta//Placenta. - 2016. - Vol. 47. P. 1 - 11.
- 35 Rhodes K.E., Gekas C., Wang Y. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation//Cell Stem Cell.- 2008. - Vol. 2, N 3. P. 2522 - 63.
- 36 Dzierzak E., Robin C. Placenta as a source of hematopoietic stem cells//Trends Mol. Biol. - 2010. - Vol. 16, N 8. P. 361 - 367.
- 37 Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Влияние мезенхимных стромальных клеток и кондиционированной ими среды на заживление кожных ран//Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2018. - N 2. С. 117 - 120.

Раздел 5. Механизмы пластичности стволовых и прогениторных клеток в процессах регенерации различных структур нервной системы

5.1 Введение

5.1.1 В связи с отсутствием регенерации в нервной системе млекопитающих и человека стратегической задачей является поиск путей направленной индукции регенерации, что актуально для нейробиологии и регенеративной медицины в целом. Сейчас интенсивно разрабатываются подходы, направленные на индукцию нейральных стволовых клеток (НСК), репрограммирование латентных прогениторов (ЛП) и нейротрансплантацию малодифференцированных клеток [1]. Нами разрабатывается модель получения нейронов сетчатки путем их регенерации из ЛП ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека путем направленной индукции *in vitro* и проводится анализ дифференцировки и интеграции экзогенных малодифференцированных нейральных прогениторных клеток при трансплантации в ЦНС взрослых грызунов. Ранее нами показано, что клетки постоянной линии пигментного эпителия ARPE-19 под влиянием экзогенного оФРФ приобретают ряд пронеуральных свойств [2]. Однако immortalized клеточные линии существенно отличаются по поведению и молекулярно-генетическим свойствам клеток от линий с ограниченным сроком жизни, полученных из первичного материала глаза человека [3]. В связи с этим, был проведен качественный и количественный морфологический анализ и изучены молекулярно-генетические свойства линии клеток из первичной культуры РПЭ взрослого человека под влиянием сигнального регулятора оФРФ (раздел 5.3.1) [4].

5.1.2 Клеточная регенеративная медицина в области нейропатологии ЦНС базируется на фундаментальных исследованиях, где одно из ведущих мест занимает нейротрансплантация. Нейрональные клетки предшественники или стволовые клетки, трансплантированные для регенерации в травмированный мозг способны дифференцироваться в зрелые нейроны и функционально интегрироваться в нервные сети хозяина [5, 6]. В ряде исследований на морфологическом и функциональном уровне показана полная регенерация, с прецизионным воссозданием нейронных связей между трансплантированными клетками и мозгом реципиента [7]. Несмотря на эти открытия, вопрос о регенераторном потенциале трансплантированных клеток нельзя считать разрешенным, поскольку результаты экспериментальных работ зачастую существенно различаются. Различия возникают вследствие использования клеток доноров отличных по происхождению, типу, возрасту, степени дифференцировки и др. и различий в реципиентах (вид животного, возраст, тип и степень повреждения, область трансплантации и т.д.) [8]. Ранее мы сообщили общую характеристику дифференцировки

трансплантированных неокортикальных нейронов от доноров разных возрастов эмбрионов в интактной коре мозга взрослого реципиента [9]. Целью настоящего исследования был анализ специфических особенностей в развитии каждого вида трансплантатов: индивидуальность в дифференцировке нейронов и в развитии реципрокных связей, особенности в формировании гистотипической архитектоники в контексте с реакцией мозга реципиента, различий в активации глиальной реакции (раздел 5.3.2.) [10, 11].

5.2 Материалы и методы

5.2.1 Культура клеток. Из аутопсийного материала (глаза, использованные для кератопластики, предоставленные банком Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца) в лаборатории получена первичная культура РПЭ по ранее описанной методике [12]. Первичную и пассированную культуру РПЭ вели на ростовой среде: DMEM/F12 (1:1), L-глутамин (2 мМ, Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Pan Biotech, Германия) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), при 37 °С и 5 % CO₂. В экспериментах были клетки РПЭ 4-ого пассажа, которые высаживали в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл./см². Для оценки действия оФРФ его добавляли в количестве 20 нг/мл в ростовую среду того же состава, но с 1 % сыворотки. Контролем служили клетки, культивированные без оФРФ. В течение всего срока культивирования среду не меняли.

Морфометрический анализ. После культивирования клеток в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч в присутствии оФРФ или без него (контроль) клетки фотографировали с помощью микроскопа Olympus (Япония) с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония), затем из клеток выделяли тотальную РНК (см. ниже). Оценку морфологии клеток РПЭ проводили по изображениям случайных полей зрения (формат JPEG, размер изображения 1360 × 1024 пикселей) используя программу ImageJ (WayneRasband, Nationalinstituteofmentalhealth, Bethesda, Maryland, США). Для каждого срока анализировали от 200 до 300 клеток, используя 3--5 фотографий независимых полей зрения, полученных при увеличении объектива микроскопа 10×. Программа автоматически рассчитывала площадь (Area) проекции клетки на подложке (далее площадь клетки), периметр клетки (Perimeter), большую (M) и малую (m) оси эллипса, описанного вокруг клетки. Расчет коэффициента расплывания (отношения радиуса, вычисленного по периметру клетки, к радиусу, вычисленному по площади клетки, Rp/Ra), коэффициента поляризации (вытянутости, M/m) [13] и статистических параметров выполняли в программе Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Для построения

спектров распределения линейных характеристик клеток руководствовались методами, описанными в работе [13]. Дополнительно в программе CellsCount3 (Россия) определяли процентное соотношение клеток вытянутой (удлиненной, фибробластоподобной) и полигональной (эпителиоподобной) формы к общему количеству клеток путем подсчета числа клеток соответствующей формы. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.01$ и $P < 0.05$.

Иммуноцитохимический (ИЦХ) анализ. Клетки высаживали на круглые покровные стекла (CellStar, Германия) в 24-луночные планшеты и после культивирования в отсутствие (контроль) или в присутствии оФРФ через 24, 48, 72 и 120 ч фиксировали в течение 15 мин 4%-ным параформальдегидом (Sigma-Aldrich). Дифференцировку клеток оценивали по иммунофлуоресценции, используя первичные антитела (Abcam, Великобритания) к нестину (ab22035, мышинные, 1:100), β III-тубулину (ab7751, мышинные, 1:100), и антитела (Sigma-Aldrich, США) к коннексину 43 (Cx43; C6219, 1:200), белку Otx2 (AV32439, кроличьи, 1:100), разведенные в 0.1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BCA; Sigma-Aldrich, США).

Препараты экспериментальной и контрольной групп клеток РПЭ обрабатывали одновременно, используя стандартную ИЦХ-методику. Оценку результатов и фотографирование проводили на микроскопе Olympus (Япония) с цифровой камерой DP70. Для подсчета клеток на фотографиях (при увеличении объектива 20 $\times$) использовали программу ImageJ1.48.

Оценка пролиферативной активности клеток (MTT-тест). Клетки высаживали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24, 48 и 72 ч в отсутствие (контроль) и в присутствии оФРФ. За 3 ч до окончания срока культивирования в каждую лунку добавляли маточный раствор (5 мг/мл) MTT (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:10. По окончании инкубации удаляли среду и добавляли 100 мкл ДМСО (Applichem, Германия). Анализ оптической плотности осадочного раствора проводили на планшетном анализаторе «StatFax 2100» (Awareness Technology INC, США). Для вычисления средних значений оптической плотности и стандартных отклонений использовали программное обеспечение Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Воздействие оФРФ на пролиферативную активность клеток считали выявленным при уровне значимости $P < 0.01$.

Количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР). Выделение тотальной РНК из культуры клеток РПЭ через 24, 48, 72 и 120 ч после посадки проводили с TRI® Reagent

(Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкцией фирмы производителя. Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid H Minus Kit (Fermentas, Литва). Оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов, кодирующих транскрипционные факторы, сигнальные белки и маркеры дифференцировки: *MITF*, *OTX2*, *PAX6*, *β III тубулина*, *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *NES*, *KRT18*, *COL1A1*. В качестве эндогенного контроля использовали глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназу (*GAPDH*). Программа для ПЦР: 1 цикл 95°C - 3 мин; 40 циклов 95°C - 15 сек и 60°C - 1 мин. Результаты представлены как средние значения $\pm s$ (стандартное отклонение). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,01$.

5.2.2 Все экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с требованиями комиссии ИБР РАН по биоэтике. Работу проводили на линиях мышей C57BL/6 и C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)1Osb/J [14]. Для датированной беременности самок линии C57BL/6 ссаживали с самцом линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)1Osb/J, возраст эмбриона после появления вагинальной пробки принимали за Э0.5 сут. Эмбрионов извлекали на Э12.5, Э14.5, Э19.5 и из мозга выделяли сенсомоторную часть неокортекса, который разделяли на фрагменты размером 0.5x1мм для тканевых нейротрансплантатов или диссоциировали в растворе аккутазы (Sigma-Aldrich®) с последующим осаждением клеток, после чего отмывали в растворе Хэнкса. Жизнеспособность клеток в суспензии составляла 75-80%. Трансплантация проводилась из расчета 500 тыс. клеток в 1.5 мкл раствора Хэнкса на мыш. Реципиентами служили взрослые 4-5 месячные самки мышей линии C57BL/6 ($n = 52$), которых наркотизировали хлоралгидратом (350 мг/кг) и помещали в стереотаксис и бормашиной просверливали отверстие в черепе по координатам: от брегмы +0.45 мм, латерально 2 мм. Фрагмент фронтального неокортекса с помощью шприца со стеклянной иглой стереотаксически инъецировали в мозг реципиента на 2.5 мм в глубину, так, чтобы трансплантат располагался в коре, мозолистом теле и стриатуме. Суспензию клеток вводили микрошприцом (Hamilton) в течение 3 минут, после чего иглу медленно вынимали и рану ушивали. Иммуносупрессию животным не проводили. Через 7, 30 и 60 суток после трансплантации животных усыпляли высокой дозой хлоралгидрата и проводили транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом на фосфатном буфере (0.01 М, рН 7.4). Мозг извлекали и переносили в 30% сахарозу на PBS. Сагиттальные срезы мозга 40 мкм толщиной монтировали на предметные стекла. Далее проводили рутинное гистологическое окрашивание срезов крезилвиолетом (0.2%) и ИГХ-окрашивание по стандартной

методике. Для двойного окрашивания использовали комбинацию антител Anti-GFP (1:500, Molecular Probes®) со следующей группой антител: anti-GFAP (1:600, abcam®); anti-NeuN (1:100, Chemicon®); anti-Ki67 (1:100, Abcam®); anti-DCX (1:300, Abcam®), anti-TH (1:100, Abcam®). Далее срезы докрашивали во вторичных козых антителах против кролика или мыши (1:500, Alexa fluor® 568, Molecular Probes®) и козых антителах против цыпленка (1:500, Alexa fluor® 488, Molecular Probes®). Затем срезы заключали в среду для иммунофлуоресценции с DAPI (Vectashield). Анализ проводили с помощью цифрового флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-9000E и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5. Для анализа препаратов в трехмерном пространстве применялось сканирование по Z оси. На основе полученных изображений создавалась проекция максимальной яркости, а также 3D-реконструкция препаратов.

Для контроля специфичности окраски клеток нейротрансплантатов производилось иммуногистохимическое окрашивание взрослого интактного и Э19.5 мозга на маркеры NeuN, GFAP, TH, Ki67. Для контроля возможности захвата GFP-белка клетками реципиента фрагмент неокортекса эмбриона GFP-мышей стадии Э19 подвергали пяти циклам заморозки-разморозки, после чего убитые клетки трансплантировали по вышеуказанным координатам и повторяли процедуру ИГХ-окрашивания, как указано выше.

5.3 Результаты и обсуждение

5.3.1 Морфология клеток РПЭ в первичной культуре и при субкультивировании имела сходство с клетками в культурах, полученных нами от других доноров и описанных ранее [15, 16]. Культуры клеток РПЭ 4-ого пассажа состояли из непигментированных и слабопигментированных полигональной формы эпителиоподобных и вытянутой формы фибробластоподобных клеток, что свидетельствует о дедифференцировке *in vitro*. Значимые изменения клеток культуры отмечали через 48 ч после добавления фактора, что заключалось в увеличении числа клеток вытянутой (фибробластоподобной) формы. Данные, полученные на светооптическом уровне (рисунок 5.1, а), подтверждаются результатами количественного анализа, проведенного по микрофотографиям в программе CellsCount3 (рисунок 5.1, б). Сходные морфологические изменения в культуре клеток РПЭ под влиянием оФРФ были получены в исследованиях на глазе цыпленка *in vivo* [13] и на РПЭ человека *in vitro* [13].

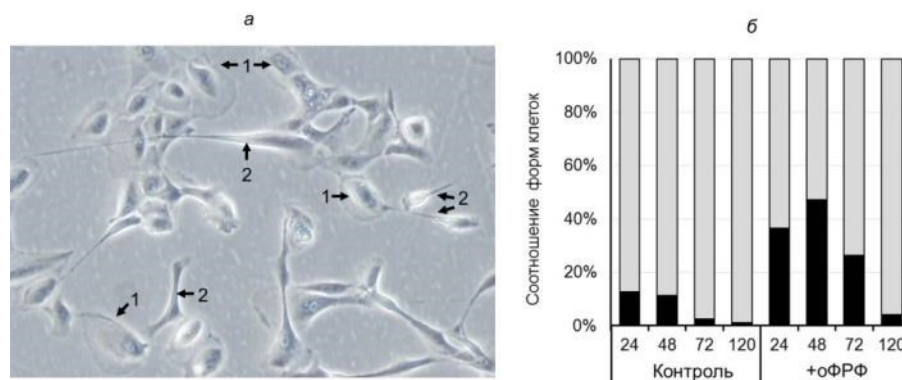


Рисунок. 5.1 – Морфологические формы клеток (а) и процентное соотношение долей клеток разной формы (б) в культуре РПЭ после добавления оФРФ. а – морфология клеток полигональной (1) и вытянутой (2) формы, фрагмент изображения культуры клеток в присутствии оФРФ, фазовый контраст, об.: 10×; б – процентное соотношение клеток вытянутой (черный цвет) и полигональной (серый цвет) форм в контроле и в присутствии оФРФ; под столбцами указано время, ч

Результаты количественного анализа представлены на Рисунке 5.2. Они показывают изменения морфометрических параметров клеток после воздействия оФРФ с течением времени по сравнению с контролем.

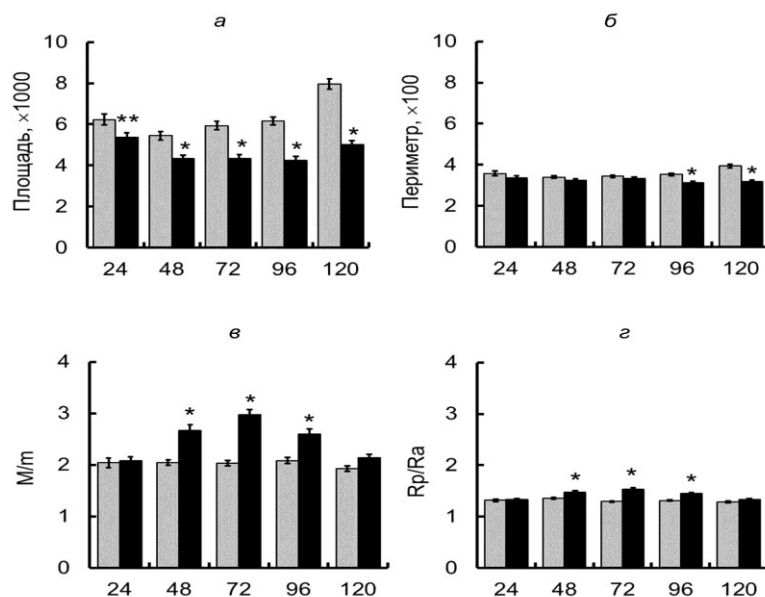


Рисунок. 5.2 – Морфометрические параметры клеток РПЭ в отсутствие (контроль, серые столбики) и в присутствии 20 нг/мл оФРФ (черные столбики) в разные временные промежутки после введения в среду оФРФ. По горизонтали – время, ч. Площадь (а) и периметр (б) клеток указаны в пикселях, М/м – коэффициент поляризации (в), Rp/Ra – коэффициент распластывания (г). Представлены средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки). Отличия от контроля достоверны при $*P < 0.01$ или $**P < 0.05$

На всех сроках средние значения площади клеток в эксперименте ниже, чем в контроле (Рисунок 5.2, а). Различия увеличиваются со временем на 14 (24 ч), 20 (48 ч), 27 (72 ч), 31 (96 ч) и 37 (120 ч) %. Уменьшение площади свидетельствует об изменении

размера или появлении субпопуляций новых клеток меньшего размера под влиянием оФРФ. В этой же группе наблюдали снижение средних значений периметра клеток через 96 и 120 ч (Рисунок. 5.2, б). Однако средние значения коэффициентов поляризации (вытянутости) и распластывания были выше в интервале 48—96 ч (Рисунок. 5.2, в, г), что говорит в пользу увеличения числа клеток вытянутой формы.

На рисунке 5.3 представлены данные, демонстрирующие частоты распределения клеток с различными значениями площади (а), периметра (б), коэффициентами поляризации (в) и распластывания (г) при культивировании после воздействия оФРФ с течением времени по сравнению с контролем. Несмотря на куполообразный вид, характерный для нормального распределения, можно идентифицировать асимметричные в той или иной степени формы кривой с пиками, соответствующими отдельным более однородным группам клеток или субпопуляциям [13]. Полученные данные свидетельствуют о появлении клеток РПЭ меньшего размера.

Впервые проведенный количественный анализ наглядно продемонстрировал гетерогенность клеток РПЭ человека по морфометрическим параметрам, что дополняет микроскопические наблюдения, представленные в ранее опубликованных работах [17 18]. Тот факт, что клетки уменьшаются в размере, может указывать на дедифференцировку клеток РПЭ в сторону нейроэпителия под влиянием оФРФ, что описано в ряде работ [19]. Кроме того, кратковременное (до 72 ч) появление клеток с вытянутыми отростками предполагает, что, по крайней мере, часть популяции клеток способна проявлять пронеуральные свойства даже при однократном воздействии фактора.

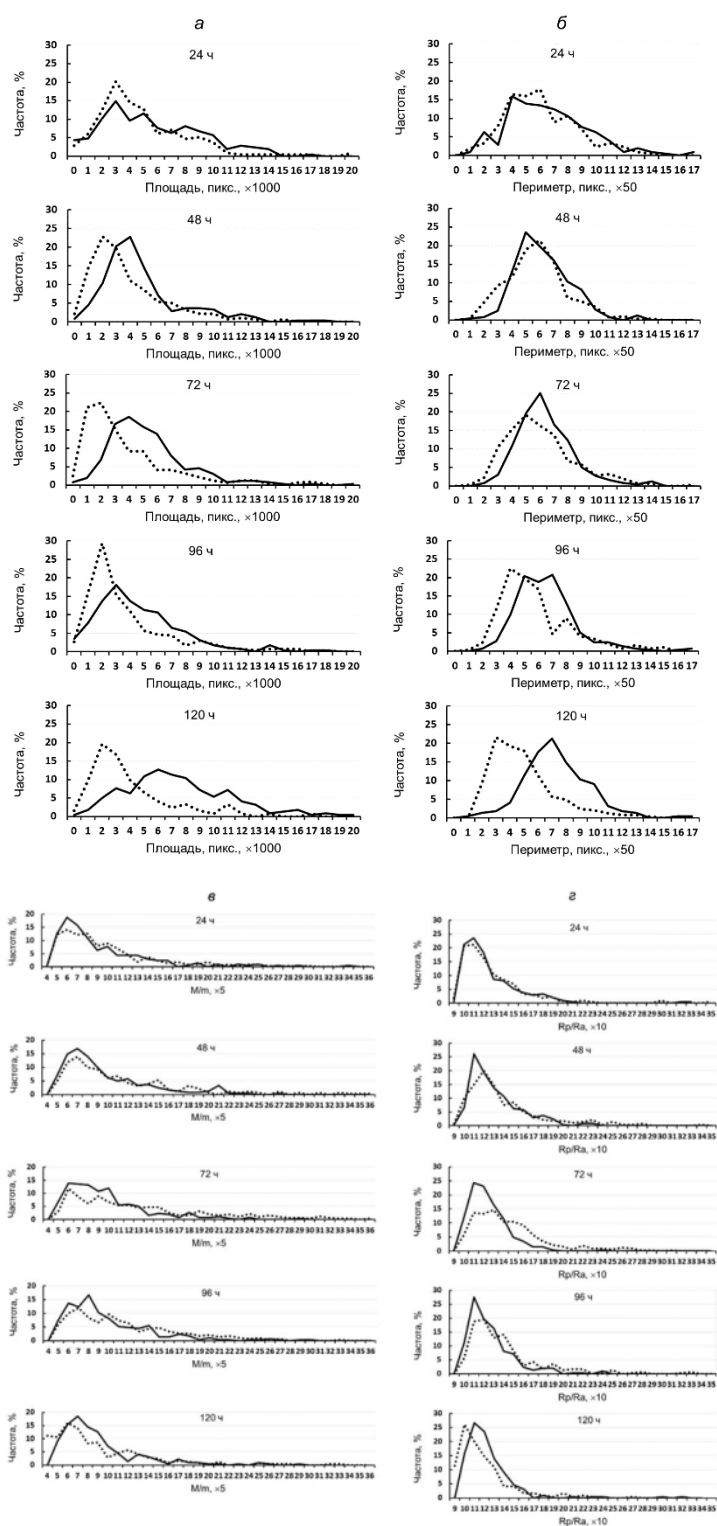


Рисунок. 5.3 – Гистограммы частот распределения клеток РПЭ по площади (а), периметру (б), коэффициенту поляризации (М/м, в) и распластывания (Rp/Ra, г) в контроле (сплошные линии) и с 20 нг/мл оФРФ (пунктирные линии) в разные временные промежутки после его введения в среду (г)

Данные количественного анализа указывают на снижение пролиферации (Рисунок 5.4 а) и совпадают с результатами МТТ-теста на сроке 48 ч (рис. 5.4, б). оФРФ при добавлении в среду культивирования понижал пролиферативную активность клеток РПЭ

взрослого человека с 24 до 48 ч, что может свидетельствовать об изменении дифференцировочного статуса. Из данных литературы [20] известно, что у эмбрионов крыс конверсия клеток РПЭ в нейроны на ранних этапах не сопряжена с пролиферацией, и считается, что оФРФ может напрямую (без деления клеток) изменять транскрипцию в клетках РПЭ. Похожие результаты получены на хвостатых амфибиях. Например, у тритонов начальные стадии трансдифференцировки РПЭ в сетчатку не сопровождаются пролиферацией клеток, хотя в дальнейшем она очень высокая [2].

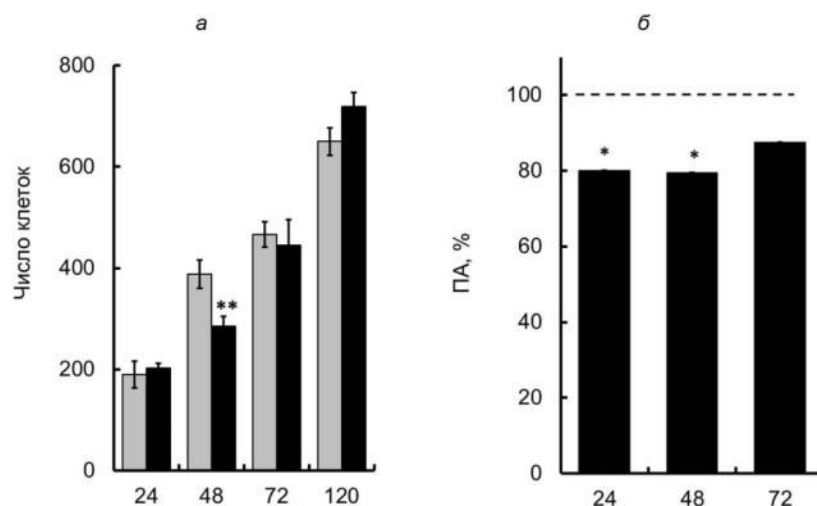


Рисунок. 5.4 – Число клеток РПЭ (а) в контроле (светлые столбики) и через разные промежутки времени после добавления оФРФ (черные столбики), а также пролиферативная активность клеток (ПА, б). По горизонтали – время, ч. Клетки считали в программе CellsCount3 на микрофотографиях независимых полей при увел.об. 400. б – ПА-активность клеток (МТТ-тест) после введения в среду оФРФ, % от контроля, принятого за 100 %, (штриховая линия).

Отличия от контроля достоверны при * $P < 0.01$ и ** $P < 0.05$

Чтобы понять основные механизмы морфологических изменений в клетках РПЭ, наблюдаемых после культивирования с оФРФ, провели ИЦХ-анализ и кПЦР. ИЦХ-анализ показал, что во всех клетках РПЭ – как контрольных, так и экспериментальных – детектировался маркер РПЭ и нейроэпителлия белок Otx2, он локализовался в ядре и имел различную интенсивность флуоресцентного сигнала – от слабой, до сильной. Под действием оФРФ через 24 (данные не показаны), 48 (Рисунок 5.5) и 72 ч интенсивность окрашивания была выше, через 120 ч – ниже, чем в контроле (данные не показаны).

Известно, что в процессе развития нервной системы Otx2 экспрессируется в нейроэпителлии переднего мозга и, соответственно, во всем глазном пузыре. Именно Otx2 совместно с транскрипционным фактором Mitf направляют дифференцировку клеток нейроэпителлия в РПЭ [21]. Оба транскрипционных фактора необходимы для развития пигментных клеток сетчатки, и они поддерживаются на высоком уровне в зрелом РПЭ.

Помимо этого, Otx2 участвует в дифференцировке фоторецепторов и биполярных нейронов и сохраняется в дефинитивных клетках. Поэтому нельзя исключить, что в процессе репрограммирования РПЭ человека транскрипционный фактор Otx2 играет двойственную роль, одновременно маркируя пронеуральную и эпителиальную популяции клеток.

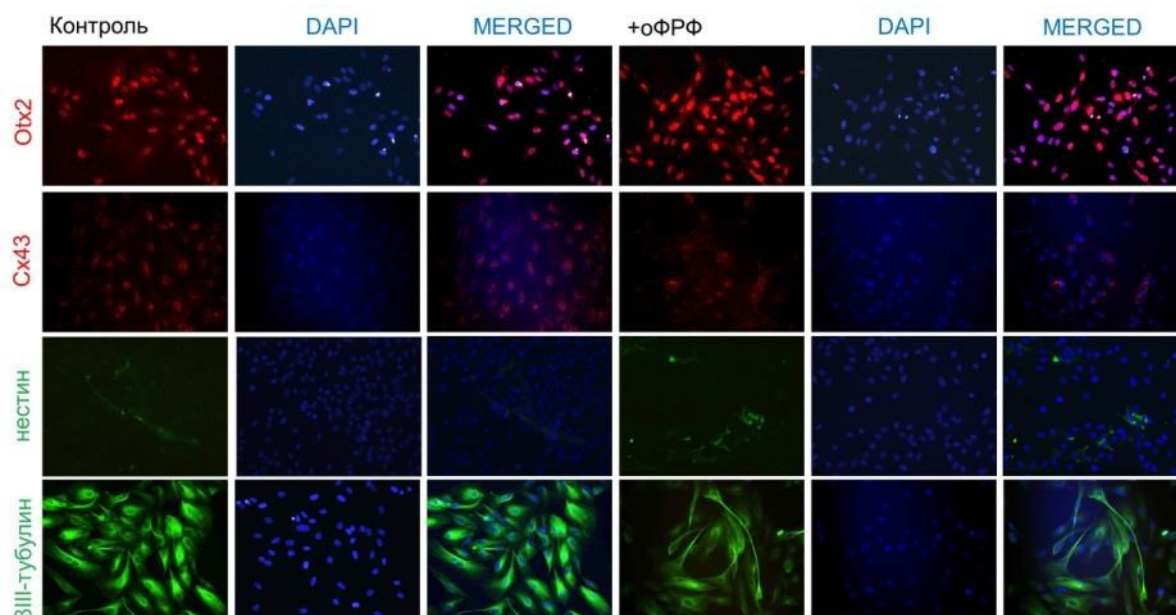


Рисунок. 5.5 – Иммунофлуоресцентный анализ клеток РПЭ на маркеры Otx2, Sx43, естин, βIII-тубулин в контроле и через 48 ч после добавления в среду 20 нг/мл оФРФ. Об.: 20□

В связи с тем, что в функционировании клеток РПЭ важную роль играют межклеточные щелевые контакты, мы изучили окраску белка щелевых контактов Sx43. После действия оФРФ через 24 (данные не показаны), 48 (Рисунок 5.5) и 72 ч интенсивность флуоресцентного сигнала в клетках была ниже по сравнению с контрольными клетками тех же сроков, что свидетельствует о потере эпителиальных свойств клеток РПЭ *in vitro*, которая ускоряется под действием оФРФ.

Окраска клеток антителами на нестин (белок-маркер нейроэпителиальных клеток) показала увеличение числа маркированных клеток через 24 (данные не показаны) и 48 ч (Рисунок 5.5) после воздействия оФРФ и затем уменьшается через 72 и 120 ч по сравнению с контролем. Это свидетельствует о том, что в культуре РПЭ изначально присутствуют нестин-позитивные клетки, число которых возрастает при воздействии оФРФ. Транзиторное увеличение их числа, вероятно, не связано с делением нестин-позитивных клеток, поскольку в данный интервал времени пролиферативная активность клеток снижена по сравнению с контролем (Рисунок 5.4, б). Результаты в значительной степени дополняют данные исследований по репрограммированию РПЭ под влиянием

оФРФ у разных видов позвоночных и человека [19].

ИЦХ-анализ выявил, что через 24 ч после воздействия оФРФ в культуре увеличивалось количество β III-тубулин клеток (маркер ранней стадии дифференцировки нейронов сетчатки) по сравнению с контролем. Однако через 48 (Рисунок 5.5), 72 и 120 ч их количество снижается, что поддерживает вышеприведенные наблюдения о понижении дифференцировки клеток.

В целом, результаты ИЦХ-анализа показывают, что однократное (кратковременное) воздействие оФРФ является достаточным для активации механизма, понижающего уровень дифференцировки клеток в сторону нейроэпителлия.

Изменения уровней экспрессии мРНК в клетках РПЭ после воздействия оФРФ по сравнению с контролем представлены на Рисунке 5.6. Понижение уровня мРНК генов-маркеров РПЭ (MITF, KRT18) совместно с увеличением уровней мРНК генов-маркеров нейральных стволовых клеток (NES), нейроэпителлия (OTX2) во временном интервале 24-72 ч свидетельствует о дедифференцировки клеток в сторону нейроэпителлия под влиянием оФРФ. В то время как повышение экспрессии генов-маркеров плюрипотентности (KLF4, OCT4 и NANOG) во временном интервале 72--120 ч, вероятно, свидетельствует об увеличении среди дедифференцированных клеток РПЭ нейральных стволовых клеток, которые их экспрессируют. Эти данные логично сопоставить с репрограммированием клеток глии Мюллера через дедифференцировку в нейроны сетчатки, которая возможна у рыб, но подавлена у мышей. Авторы обнаружили транзитное повышение экспрессии генов плюрипотентности в клетках глии Мюллера у мышей, происходящее в первые часы после травмы, и предположили, что дедифференцировку блокирует быстрое метилирование ДНК, подавляющее появление мультипотентных клеток [22]. Нельзя исключить, что подобные процессы сопровождают дедифференцировку РПЭ у человека.

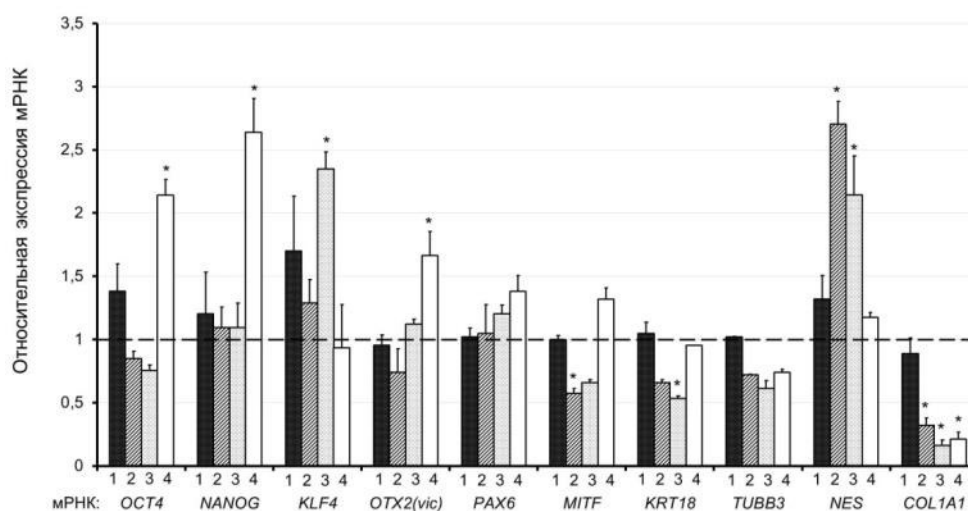


Рисунок. 5.6 – Влияние оФРФ разной длительности на экспрессию мРНК маркеров дифференцировки и плюрипотентности клеток РПЭ. Столбцы: 1 – 24 ч, 2 – 48 ч, 3 – 72 ч, 4 – 120 ч. Изменение экспрессии показано относительно контрольных клеток РПЭ (в отсутствии оФРФ) на тех же сроках культивирования. Вертикальные отрезки – ошибки среднего. Различия экспрессии мРНК генов в исследуемых образцах РПЭ по сравнению с контролем считали значимыми по t-критерию Стьюдента при * $P < 0.05$

5.3.2 В работе анализировали индивидуальные черты развития, дифференцировки, миграции клеток, роста волокон, васкуляризации на материале 52 трансплантаций 3D тканевых фрагментов и суспензий клеток эмбрионального неокортекса мыши, пересаженных по стандартным координатам в интактный мозг взрослых мышей и, одновременно реакцию мозга реципиента [10]. Полученные данные для наглядности сведены в Таблице 5.1.

Таблица 5.1 - Сводная таблица развития трансплантатов - Звездочками обозначена выраженность признаков. "-" – отсутствие признака. "*" – низкая выраженность признака. "***" – средняя выраженность признака. "****" – высокая выраженность признака. GFAP – маркер астроцитов. DCX – маркер нейробластов. NeuN – маркер нейронов. TH – маркер дофаминергических нейронов. Ki67 – маркер пролиферирующих клеток.

		Миграция клеток	Рост волокон	GFAP	Глиал рубец	DC X	NeuN	TH	Ki67
Фрагменты	Сут п/о								
Э12,5	7	**	**	**	-	****	-	-	****
	30	****	****	****	-	-	****	-	*
	60	*	****	****	-	-	-	-	-
Э14,5	7	****	****	**	-	****	-	****	****
	30	*	****	**	-	-	****	-	*
	60	*	*	**	-	-	****	-	-
Э19,5	7	**	****	**	*	**	-	-	*
	30	*	****	*	**	-	****	-	-
	60	****	****	**	****	-	****	-	-
Суспензии									
Э12,5	7	**	**	**	-	****	-	-	****
	30	*	*	**	-	-	*	-	-
	60	*	****	****	-	-	****	-	-
Э14,5	7	*	*	*	-	****	-	-	****
	30	*	**	**	-	-	****	-	*
	60	**	****	****	-	-	****	-	-
Э19,5	7	*	*	**	-	**	-	-	*
	30	*	*	**	*	-	**	-	-
	60	*	**	**	*	-	**	-	-

Несмотря на использование стандартных методов пересадки, практически все трансплантаты отличались друг от друга по форме, плотности клеток, наличию некроза и кист (Рисунок 5.7).

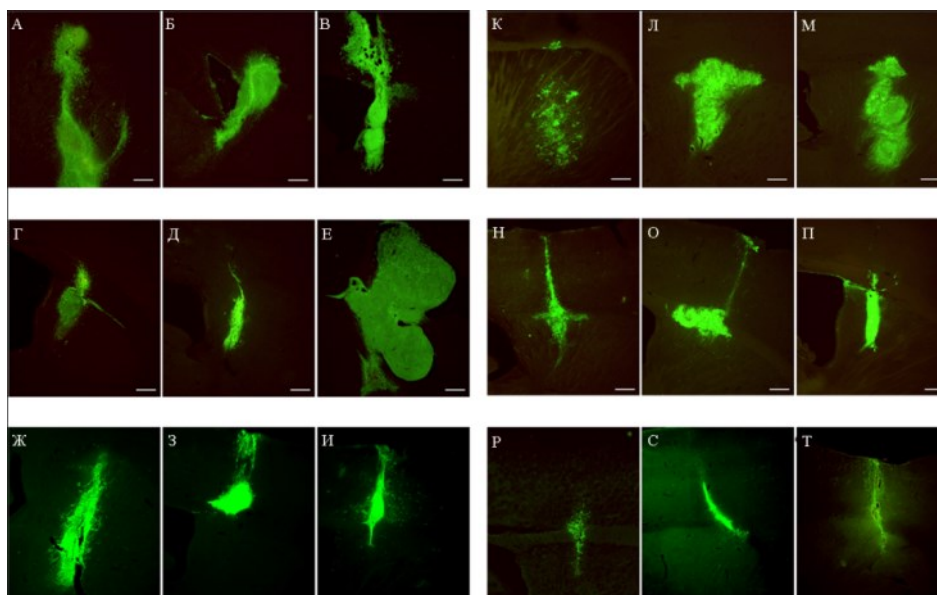


Рисунок. 5.7 - Морфология тканевых (А-И) и суспензионных (К-Т) трансплантатов ткани неокортекса эмбрионов различных стадий развития (Э12,5: А-В, К-М; Э14,5: Г-Е, Н-П; Э19,5: Ж-И, Р-Т) через разные интервалы времени (7 сут.: А, Г, Ж, К, Н, Р; 30 сут.: Б, Д, З, Л, О, С; 60 сут.: В, Е, И, М, П, Т) после операции. Окрашивание антителами к GFP. Масштабный отрезок: 300 мкм

По структуре суспензионные трансплантаты выглядели более единообразными в сравнении с 3D тканевыми трансплантатами. Последние существенно различались по размерам, что указывает на индивидуальные особенности их пролиферации и роста. Кроме того в 3D трансплантатах кисты встречаются чаще, чем в суспензионных. Среди суспензионных трансплантатов, меньшие размеры по сравнению с другими сроками имели трансплантаты от Э19,5, что подчеркивает низкую степень пролиферации их клеток.

Отдельного внимания заслуживает суспензионный трансплантат неокортекса эмбриона Э14,5, часть клеток которого развивалась в полости латерального желудочка. По гистотипической организации трансплантат напоминает органоид. Через 60 суток он представлял собой сферическую ламинарную клеточную структуру, в центре которой были дифференцированные нейроны (NeuN позитивные клетки), а по периферии слой астроцитов, которые напоминали оболочечную глию и их отростки отграничивали трансплантат от спинномозговой жидкости реципиента (Рисунок 5.8). В областях соприкосновения трансплантата со стенкой желудочка отсутствовала эпендима и через зону сращения проникали сосуды и мигрировали астроциты реципиента. Такая структура трансплантата имеет сходство с организацией неокортекса. Сходные результаты получены в других работах. При трансплантации суспензии клеток неокортекса Э12 в интактный мозг формировались розеткоподобные структуры, краевые области которых состояли из GFAP позитивных астроцитов [23]. В работе по трансплантации недиссоциированных

нейросфер переднего мозга крыс Э14 в интактный мозг показано, что внутрижелудочковые трансплантаты также образовывали агрегаты. В их центре были сосредоточены NeuN позитивные нейроны, в отростках которых была экспрессия нейрофиламентов, а по периферии трансплантата была высокая плотность GFAP положительных астроцитов, которые образовывали структуру напоминающую *membrane limitans*. Авторы отмечают, что организация трансплантата напоминала зрелую кору мозга [24, 25].

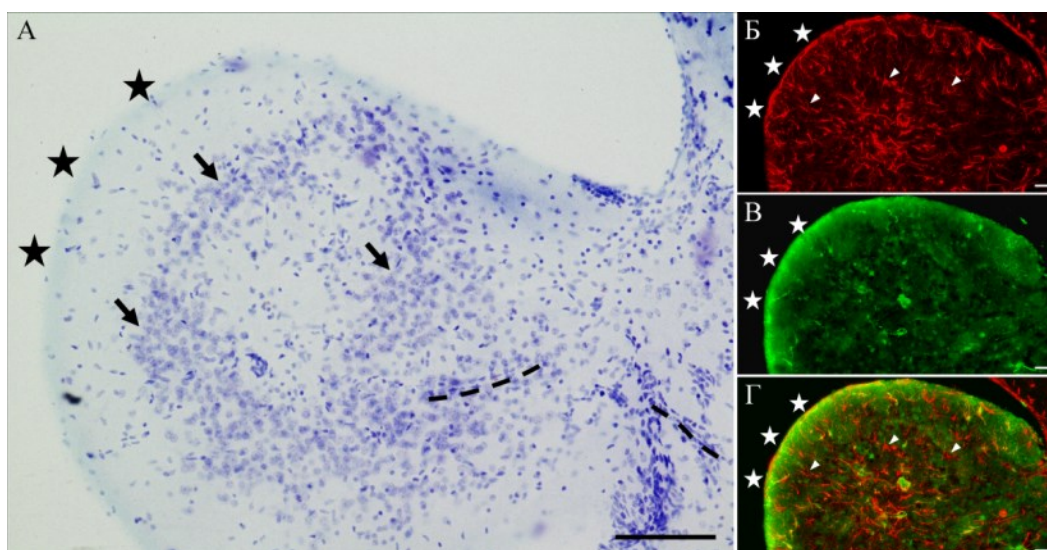


Рисунок. 5.8 - Органоид, образованный клетками суспензионного трансплантата Э14,5 через 60 суток после операции, в желудочке мозга реципиента. А: окрашивание крезилвиолетом. Стрелками отмечены нейроны внутри трансплантата. Пунктиром отмечены растущие в трансплантат сосуды. Б-Г: Образование пограничной глиальной мембраны (*membrane limitans*) клетками трансплантата, отмечена звездочками. Астроциты реципиента проникают в трансплантат, отмечены треугольниками. Окрашивание антителами к GFP и GFAP. Масштабный отрезок: А – 100мкм; Б-Г – 50 мкм

Детальное изучение трансплантатов показало, что уровень ИГХ окраски NeuN позитивных нейронов в трансплантатах отражает не только степень дифференцировки клеток, но и общее состояние ткани трансплантата. Оказалось, что в трансплантированных нейронах через 30 и даже 60 суток после трансплантации экспрессия NeuN (маркер зрелых нейронов) может быть в той или иной степени подавлена, особенно в суспензионных трансплантатах. Кроме того, в трансплантированной ткани Э19,5 через 7 сут мы не наблюдали экспрессию NeuN, хотя в интактной ткани до пересадки уже присутствуют NeuN позитивные нейроны. Вероятно, подавление экспрессии NeuN происходит вследствие повреждения клеток при их подготовке для трансплантации и в самом процессе пересадки. В других работах отмечено, что экспрессия NeuN снижается при травме мозга, и нервные клетки в этот период практически не выявляются иммуногистохимическим методом. Авторы отмечают,

что это не связано с гибелью нейронов, а является отражением общего стрессового состояния клеток [26]. Интересным фактом, является то, что в тканевых трансплантатах только от Э14.5 мы выявили дифференцировку катехоламинергических клеток, экспрессирующих тирозингидроксилазу (ТН), которые не характерны для структур взрослого неокортекса (Рисунок 5.9), а встречаются только в эмбриогенезе и раннем постнатальном периоде у грызунов.

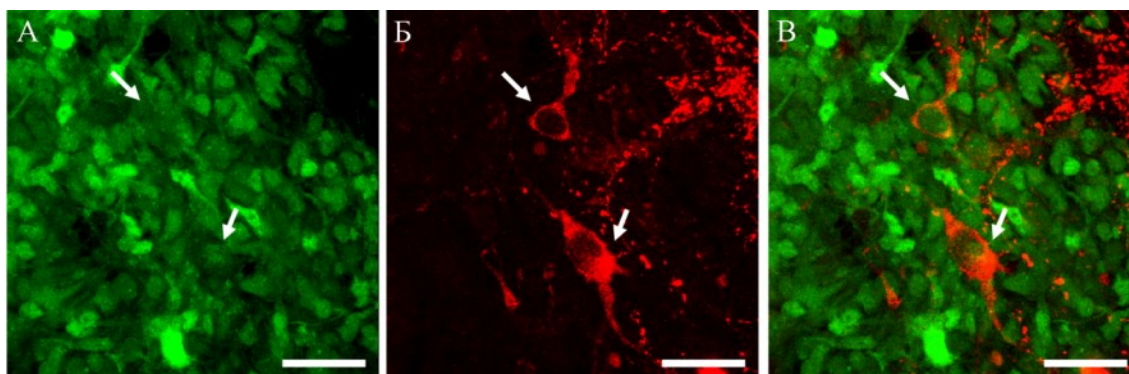


Рисунок. 5.9 - Дифференцировка клеток тканевого трансплантата неокортекса Э14,5 в дофаминергические нейроны через 7 суток после операции. Окрашивание антителами к GFP и ТН. Масштабный отрезок: А-В – 20 мкм

ТН-позитивные клетки, биполярной или звездчатой морфологии, располагались небольшими кластерами во фрагментах и суспензионных трансплантатах. Ранее подобная нетипичная дифференцировка клеток в неокортикальных трансплантатах была описана в работе [27]. Авторы обнаружили большое число ТР-позитивных нейронов в трансплантатах фрагментов неокортекса от Э12, Э14, Э17, но не Э19, полученных от эмбрионов мышей BALB/c. Авторы подчеркивали уменьшение числа ТН клеток с возрастом эмбриональной донорской ткани, взятой для трансплантации. В отличие от коллег мы обнаружили небольшое число ТН нейронов исключительно в Э14.5 трансплантатах. Значимые различия в результатах по нашему мнению, свидетельствует об индивидуальных особенностях дифференцировки нейронов эмбриональных тканей от линии мышей BALB/c в сравнении с C57BL/6, которую использовали мы. Длительное сохранение ТН нейронов указывает на незавершенную дифференцировку пересаженной ткани, что может свидетельствовать о пролонгированном регенераторном влиянии малодифференцированной ткани трансплантатов.

5.4 Заключение

5.4.1 Индукция репрограммирования клеток РПЭ человека сигнальным регулятором нейральной дифференцировки оФРФ дала следующие результаты. Сделан вывод, что пассированные клетки РПЭ человека, полученные из первичной культуры, гетерогенны по морфологическим параметрам и молекулярным свойствам. Они обладают высокой пластичностью, демонстрируя одновременно свойства стволовых клеток и клеток нейральных предшественников, при этом сохраняя маркеры дифференцированного состояния. Получена информация, что однократное воздействие нейральным индуктором оФРФ первоначально не связано с пролиферацией, а направлено на механизмы понижения дифференцировки РПЭ путем активации плюрипотентных генов (OTX2, OCT4, NANOG, KLF4) и генов нейроэпителлия (OTX2) и нейральных стволовых клеток (NES), что сопровождается уменьшением размеров клеток. Описанные процессы не являются законченным репрограммированием, поскольку клетки РПЭ человека не дифференцируются в нейроны сетчатки. Однако делается вывод, что эволюционно консервативный регулятор оФРФ активирует механизмы дедифференцировки в клетках РПЭ взрослого человека в нейроэпителиальном направлении *in vitro* [4]. В дальнейшем необходимо понять, какие сигнальные регуляторы кооперативно взаимодействуют с сигнальным путем оФРФ и могут участвовать в поддержании пластичности и пронеуральной дифференцировке клеток РПЭ взрослого человека.

5.4.2 Несмотря на стандартизованный метод и использование одинаковых типов клеток для пересадки, клетки трансплантатов демонстрировали индивидуальные особенности развития. Размеры и морфология клеток в тканевых трансплантатах более разнообразны по сравнению с суспензионными. Они выделяются индивидуальными особенностями пролиферации и роста клеток, вероятно, связанные с наличием эмбрионального внеклеточного матрикса. Делается вывод, что миграция клеток в ткань мозга реципиента в целом зависит от возраста ткани донора, чем выше возраст и, следовательно, степень дифференцировки клеток, тем меньше миграция. Несмотря на эту закономерность, в отдельных случаях наблюдалась обширная миграция клеток от тканевых трансплантатов Э19,5. В ткани ряда трансплантатов был выявлен градиент распределения дифференцированных астроцитов, что мы связываем с особенностями деформации фрагмента эмбрионального неокортекса при пересадке. Получена информация о дифференцировке катехоламинергических клеток, экспрессирующих тирозингидроксилазу (ТН), которые не характерны для взрослого неокортекса., что может указывать на сохранение малодифференцированного состояния клеток. Проанализировано развитие клеток суспензионного трансплантата в желудочке мозга, где

формировалась ламинарная клеточная структура, напоминающая кортикальный органоид. Делается вывод, что трансплантация нейральных клеток всегда сопровождается активацией астроцитарного глиоза в мозге реципиента, выраженного в меньшей или большей степени. Однако только в единичном случае вокруг тканевого трансплантата Э19,5 наблюдалось формирование плотного глиального рубца. В работе обнаружены индивидуальные особенности развития малодифференцированных клеток трансплантатов и реакции реципиента, механизмы которых необходимо выявлять в последующих экспериментах, поскольку это важно для перенесения методов нейротрансплантации в регенеративную медицину [10, 11].

5.5 Список использованных источников

- 1 Barker R.A., Götz M., Parmar M. New approaches for brain repair—from rescue to reprogramming//Nature. - 2018. - Vol. 557. P. 329 – 334.
- 2 Шафеи Е.В., Куринов А.М., Кузнецова А.В., Александрова М.А. Репрограммирование клеток ретинального пигментного эпителия человека под влиянием bFGF in vitro//Клеточные технол. биол. мед. - 2017. - N 2. С. 128 – 137.
- 3 AblonczyZ., DahroujM., TangP.H., LiuY., SambamurtiK., MarmorsteinA.D., CrossonC.E. Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo//InvestOphthalmolVisSci.– 2011. – Vol. 52, N 12. P. 8614 - 8620.
- 4 Кузнецова А.В., Куринов А.М., Ржанова Л.А., Александрова М.А. Механизмы дедифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека in vitro. Морфологический и молекулярно-генетический анализ//Цитология. – 2018. – Т. 60, № 12. С. 996 - 1007. DOI: 10.7868/S0041377118120068.
- 5 Michelsen K.A., Acosta-Verdugo S., Benoit-Marand M., Espuny-Camacho I., Gaspard N., Saha B., Gaillard A., Vanderhaeghen P. Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells//Neuron. – 2015. - Vol. 85, N 5. P. 982 - 997. doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.001.
- 6 Shetty A.K., Hattiangady B. Grafted Subventricular Zone Neural Stem Cells Display Robust Engraftment and Similar Differentiation Properties and Form New Neurogenic Niches in the Young and Aged Hippocampus//Stem Cells Transl Med. - 2016. - Vol. 5, N 9. P. 1204 - 1215. doi: 10.5966/sctm.2015-0270.
- 7 Wuttke T.V., Markopoulos F., Padmanabhan H., Wheeler A.P., Murthy V.N., Macklis J.D. Developmentally primed cortical neurons maintain fidelity of differentiation and establish appropriate functional connectivity after transplantation//Nat Neurosci. – 2018. – Vol. 21, N 4. P. 517 - 529. doi: 10.1038/s41593-018-0098-0.

8 Behrstock S., Ebert A.D., Klein S., Schmitt M., Moore J.M., Svendsen C.N. Lesion-induced increase in survival and migration of human neural progenitor cells releasing GDNF//Cell Transplant. – 2008. – Vol. 17, N 7. P. - 753 - 62.

9 Sukhinich K.K., Kosykh A.V., Aleksandrova M.A. Differentiation and Cell-Cell Interactions of Neural Progenitor Cells Transplanted into Intact Adult Brain//Bull Exp Biol Med. – 2015. – Vol. 160, N 1. P.115 - 122. doi: 10.1007/s10517-015-3111-6.

10 Sukhinich K.K., Aleksandrova M.A. Individual Peculiarities of the Development and Differentiation of Embryonic Neocortex Transplants in Intact Adult Mouse Brain//Bull Exp Biol Med. – 2018. - Nov 12. DOI: 10.1007/s10517-018-4303-7. - Сухинич К.К., Александрова М.А. Индивидуальные особенности развития и дифференцировки трансплантатов эмбрионального неокортекса в интактном мозге взрослых мышей//Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2018. - № 3. С. 164 - 175.. DOI: 10.1007/s10517-018-4303-7.

11 Aleksandrova M.A., Sukhinich K.K. Mechanisms of cellular interactions in the reconstruction of mammalian brain tissue//Neurochemical Journal. -2018. - Vol. 12, N 4. P. 4. DOI: 10.1134/S1819712418040050.

12 Кузнецова А.В., Григорян Э.Н., Александрова М.А. Ретинальный пигментный эпителий глаза взрослого человека – потенциальный источник клеток для восстановления сетчатки//Цитология. - 2011. – Т. 53, № 6. С. 505 - 512.

13 Петров Ю.П., Кухарева Л.В., Крылова Т.А. Влияние коллагена I типа и фибронектина на морфологию мезенхимных клеток стромы человека в культуре. //Цитология - 2013. – Т. 55, № 7. С. 452 - 562.

14 Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells//FEBS Lett. – 1997. – Vol. 407, N 3. P. 313 - 319.

15 Милюшина Л.А., Кузнецова А.В., Григорян Э.Н. Александрова М.А. Фенотипическая пластичность клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека in vitro//Клеточные технол. биол. мед. - 2011. - № 2. С. 71 - 77.

16 Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A., Kurinov A.M., Chentsova E.V., Makarov P.V. Plasticity of adult human retinal pigment epithelial cells//Int. J. Clin. Exp. Med. - 2016. - № 9 (11). P. 20892 – 20906. <http://ijcem.com/files/ijcem0033105.pdf>

17 Burke J.M., Hjelmeland L.M. Mosaicism of the retinal pigment epithelium: seeing the small picture//Mol. Interv. - 2005. – V. 5, N 4. P. 241 – 249. doi: 10.1124/mi.5.4.7.

18 Al-Hussaini H., Kam J.H., Vugler A., Semo M., Jeffery G. Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo//Mol. Vis. - 2008. – N 14. P. 1784 – 1791.

19 Luz-Madrigal A., Grajales-Esquivel E., McCorkle A., DiLorenzo A.M., Barbosa-Sabanero K., Tsonis P.A., Del Rio-Tsonis K. Reprogramming of the chick retinal pigmented epithelium after retinal injury//BMC Biol. - 2014. - Vol. 12, N 1. P. 28. doi: 10.1186/1741-7007-12-28.

20 Zhao S., Thornquist S.C., Barnstable C.J. In vitro transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina//Brain Res. - 1995. - Vol. 677, N 2. P. 300 – 310.

21 Martínez-Morales J., Dolez V., Rodrigo I., Zaccarini R., Leconte L., Bovolenta P., Saule S. OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation//J. Biol. Chem. - 2003. - Vol. 278, N 24. P. 21721 – 21731.

22 Reyes-Aguirre L.I., Lamas M. Oct4 methylation-mediated silencing as an epigenetic barrier preventing müller glia dedifferentiation in a murine model of retinal injury//Front. Neurosci. - 2016. - N 10. P. 523. doi: 10.3389/fnins.2016.00523.

23 Nishino H., Hida H., Takei N., Kumazaki M., Nakajima K., Baba H. Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum//Experimental neurology. - 2000. - Vol. 164, N 1. P. 209 – 214.

24 Karbanová J., Mokřý J., Kotingová L. Neural stem cells transplanted into intact brains as neurospheres form solid grafts composed of neurons, astrocytes and oligodendrocyte precursors//Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký. - 2004. - Vol. 148, N 2. P. 217 – 220.

25 Oertel J., Samii M., Walter G.F. Fetal allogeneic dopaminergic cell suspension grafts in the ventricular system of the rat: Characterization of transplant morphology and graft-host interactions//Acta Neuropathologica. - 2004. - Vol. 107, N 5. P. 421 – 427.

26 Unal-Cevik I., Kiliç M., Gürsoy-Ozdemir Y., Gurer G., Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note//Brain Research. - 2004. - Vol. 1015, N 1-2. P. 169 – 174.

27 Park J.K., Joht T.H., Ebner F.F. Tyrosine hydroxylase is expressed by neocortical neurons after transplantation//PNAS USA. - 1986. - Vol. 83. P. 7495 – 7498.

Раздел 6. Биогенез ядерных структур

6.1 Введение

Ядро эукариотической клетки представляет собой высокоорганизованную органеллу, которая содержит многочисленные домены и ядерные тела (NB), в которых накапливаются специфические белки и РНК для выполнения различных функций [1, 2]. Положение и подвижность ядерных телец и хроматиновых локусов внутри ядра играют важную роль в регуляции функций генома [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Хроматиновые локусы в клетках соматических млекопитающих относительно неподвижны, и их диффузия обычно ограничена в радиусе 0,5–1,0 мкм [3], но активные гены могут перемещаться за пределы хромосомных территорий на транскрипционные фабрики [9]; это движение может зависеть от ядерного актина и миозина [10]. Мало что известно о движении ядерных телец в межфазном ядре. Наблюдаемое движение было главным образом ограниченной диффузией [11], и было описано только несколько примеров направленного движения, например, изменение положения телец Кахаля на активные гены snRNA U2 [12], направленное движение компартментов герпесвирусной репликации к ядерным спеклам [13] и направленное движение мелких спеклов к более крупным спеклам, с которыми они сливаются [14, 15]. Что ограничивает мобильность ядерных телец? Одним из таких факторов может быть сам хроматин; действительно, было установлено, что ассоциация с хроматином ограничивает движение телец Кахаля [11]. Как тела PML, так и тела Кахаля могут быть заключены в «хроматиновые локусы», которые ограничивают их диффузию [16].

Мы исследовали механизм, лежащий в основе движения ядерных телец с использованием экспериментально индуцированных ядерных телец, межфазных преднуклеолярных телец - интерфазные проядрышки (iPNB), которые образуются в интерфазных ядрах из частично разобранных ядрышек после возвращения клеток в изотонические условия из гипотонических условий [17]. Интерфазные проядрышки содержат нуклеолярные белки NPM1 (B23 или нуклеофосмин) [17, 18, 19, 20], NCL (C23 или нуклеолин) [21] и пре-рРНК [20]. В отличие от большинства других ядерных телец, число интерфазных проядрышек внутри нуклеоплазмы велико, они равномерно распределены в ядерном пространстве, и поэтому слияния между интерфазными проядрышками часты [20]. События слияния могут быть легко оценены, и поэтому мы использовали их для анализа факторов, ограничивающих мобильность ядерных телец. Таким образом, большое количество интерфазных проядрышек в нуклеоплазме делает их удобной моделью для изучения движений ядерных телец и роли окружающих ядерных компонентов в этих движениях. Мы продемонстрировали, что ограниченная диффузия

была распространенным типом движения интерфазных проядрышек и что гетерохроматин ограничивал диффузию интерфазных проядрышек.

Движение ядерных телец, являясь регулятором генетической активности, может быть одним из участников регуляции клеточной дифференцировки.

6.2 Материалы и методы

Клеточные линии и плазмиды

Клетки HeLa выращивали в модифицированной Дульбекко среде Игла с добавлением L-глутамина, 10% эмбриональной сыворотки телят (HyClone) и раствора антибиотика / антимикотика (Gibco). Чтобы вызвать образование интерфазных проядрышек, клетки инкубировали в 20% сбалансированном солевом растворе Хэнкса (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,4 mM MgSO₄ • 7H₂O, 0,5 mM MgCl₂ • 6H₂O, 0,3 mM Na₂HPO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 6 mM глюкозы, 4 mM NaHCO₃) в течение 15 мин и затем переносили в полную культуральную среду [17]. В некоторых экспериментах полная культуральная среда содержала дополнительные компоненты (например, ингибиторы). Клетки инкубировали с 1 мкМ латрункулина А (Sigma) для ингибирования полимеризации актина или 10 mM 2,3-бутандиона (BDM, Sigma) для ингибирования зависимых от актина миозинов. Изотоническая культуральная среда была дополнена либо 160 mM сахарозой [22], либо 10 мкМ кальциевого ионофора A23187 [23], чтобы вызвать избыточную конденсацию хроматина. Плазмида EGFP-NPM1 была подарена X. W. Wang [Addgene плазида №. 17578] [24], и плазида гистона H2B-EGFP была подарена Г. М. Вальем [Addgene плазида №. 11680] [25]. Плазида NPM1-TagRFP была описана в другом месте [19].

Клеточную трансфекцию проводили с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя.

Визуализация живых клеток

Клетки выращивали в 35-мм чашках с покровным стеклом (MatTek) для экспериментов по визуализации в реальном времени. Культуральная среда в чашках была покрыта минеральным маслом, чтобы избежать испарения и изменения pH во время наблюдения.

Живые изображения выполнялись либо на конфокальном микроскопе Nikon C2 с объективом 60x Plan Apo (NA 1.4), либо на конфокальном микроскопе Nikon A1 с объективом 100x Plan Apo (NA 1.4) при 37 ° C, и была выполнена стабилизация фокуса используя систему PFS (Nikon). Лазеры с длиной волны 488 и 561 нм использовали для

возбуждения EGFP и TagRFP соответственно. Изображения были зарегистрированы на максимальной скорости.

Электронная микроскопия

Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали в 4% глutarальдегиде в 0,1 М фосфатном буфере Зеренсена, затем фиксировали в 1% OsO₄ и встраивали в Epon 812 (Fluka). Ультратонкие срезы окрашивали цитратом свинца и исследовали с помощью электронного микроскопа LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss). Полученные изображения были сегментированы в Adobe Photoshop путем ручного отслеживания контуров волокон хроматина и интерфазных проядрышек. Полученные наборы изображений были импортированы в ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) в виде z-стеков, а 3D-модели были визуализированы с использованием плагина 3D Viewer (<http://3dviewer.neurofly.de/>).

Для окрашивания иммуноголддингом клетки фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре в 3,7% формальдегиде в PBS. После пермеабилзации в 0,5% растворе Triton X-100 и отмывки в PBS клетки инкубировали в 3% бычьим сывороточном альбумине (BSA) в течение 30 минут и затем с первичными антителами против NPM1 (B0556; Sigma-Aldrich) в течение 60 минут при комнатная температура. После нескольких промывок в PBS с 0,1% BSA и 0,05% Tween 20 проводили вторичное окрашивание антител с использованием наночастиц антимиоциновых Fab-фрагментов (NanoProbe) при разведении 1: 250 в течение 16 часов при 4 ° C. Покровные стекла промывали в PBS, и клетки фиксировали в 1% глutarовом альдегиде в течение 1 часа. Усиление серебра выполняли, как описано ранее [26], с последующим внедрением в Epon 812.

6.3 Результаты и обсуждение

Чтобы проанализировать движения интерфазных проядрышек, были сняты интервальные серии изображений клеток HeLa, экспрессирующих EGFP-NPM1 (400 изображений на клетку, одно изображение в секунду). Большинство интерфазных проядрышек колебались стохастически в относительно небольшом объеме ядерного пространства. Затем мы проанализировали траектории 439 интерфазных проядрышек в девяти ячейках и вычислили кривые MSD, чтобы определить типы движения интерфазных проядрышек. Траектории были классифицированы как простая диффузия (линейно возрастающая кривая MSD; 12% отслеживаемых интерфазных проядрышек), направленная диффузия (квадратично увеличивающаяся кривая MSD; 6%) и ограниченная диффузия (платообразная кривая MSD с возрастающим запаздыванием; 82%) (Рис. 16). Средний коэффициент диффузии составлял $1,592 \times 10^{-5}$ мкм² / с (SE $9,714 \times 10^{-7}$) для интерфазных проядрышек, демонстрирующих простую диффузию, и $1,886 \times 10^{-5}$ мкм² / с

(SE $5,560 \times 10^{-7}$) для ограниченной диффузии, а среднее характерная площадь удержания составляла $5,416 \times 10^{-3}$ мкм² (SE $2,83 \times 10^{-4}$). Средний коэффициент диффузии для интерфазных проядрышек, демонстрирующих направленную диффузию, составлял $1,665 \times 10^{-5}$ мкм² / с (S.E. $1,826 \times 10^{-6}$), а средняя скорость составляла $2,326 \times 10^{-5}$ мкм / с (S.E. $2,43 \times 10^{-6}$).

Мы предположили, что движение интерфазных проядрышек может зависеть от их размера. В качестве меры размера мы оценили площадь двоичной маски интерфазных проядрышек, полученной путем сегментации интерфазных проядрышек в каждом изображении, и вычислили максимумы областей во всей последовательности изображений. Удивительно, что не было никакой корреляции между размером интерфазных проядрышек и коэффициентом диффузии (коэффициент корреляции Пирсона = 0,0334, рис. S1A) и между размером интерфазных проядрышек и областью ограничения (коэффициент корреляции Пирсона = 0,0415, рис. S1B). Возможно, что изменение размера не было достаточно существенным, чтобы повлиять на мобильность интерфазных проядрышек.

Фракция (6%) интерфазных проядрышек демонстрировала направленное движение внутри нуклеоплазмы, но гистограмма угла между вектором направления движения и линиями, соединяющими интерфазные проядрышки с центром ближайшего ядрышка, не имела заметного пика; таким образом, эти интерфазные проядрышки не имели преимущественного направления движения. Следовательно, это движение не привело к направленному переносу ядрышкового материала из нуклеоплазмы в ядрышки. Кроме того, не было обнаружено направленного движения интерфазных проядрышек по направлению к центру ядра. Интересно, что непосредственно распространяющиеся интерфазные проядрышки, по-видимому, движутся когерентно в группах по два или три. Это синхронное движение пространственно разделенных интерфазных проядрышек может быть результатом перемещения ядерных областей, которое не было компенсировано алгоритмом, использованным здесь. Следовательно, интерфазные проядрышки были преимущественно ограничены в своей диффузии, и направленная диффузия не приводила к упорядоченной передаче материала интерфазных проядрышек в ядрышки.

Слияние интерфазных проядрышек происходило часто в течение первого часа после возвращения в изотоническую среду. Частота слияний интерфазных проядрышек уменьшалась со временем: в течение первых 10 минут после возвращения в изотоническую среду наблюдали ~ 2,5 слияния / мин / клетка, в то время как после 50 мин инкубации в изотонических условиях было обнаружено менее 0,5 слияния / мин / клетка.

Сплавы были чрезвычайно редки в более поздние времена. Слияния привели к снижению количества интерфазных проядрышек, как описано в другой статье (Musinova et al. 2016)

Чтобы количественно проанализировать события слияния, мы измерили расстояния между центрами интерфазных проядрышек, которые слились в течение времени наблюдения, и обнаружили, что если интерфазные проядрышки были близки друг к другу ($<0,5$ мкм), событие слияния происходило быстро посредством скачка. Однако если расстояние между интерфазными проядрышками было больше ($0,5\text{--}1,2$ мкм), слияние интерфазных проядрышек происходило более постепенно. В большинстве случаев меньшее проядрышко двигалось к большему, и движение интерфазных проядрышек во время событий слияния казалось направленным. Следует отметить, что расстояние между центрами слияния интерфазных проядрышек никогда не превышало $1,2$ мкм ($0,86 \pm 0,14$ мкм, среднее $\pm$ стандартное отклонение), то есть расстояние между поверхностями интерфазных проядрышек было еще ниже. Было обнаружено, что направленное движение локусов хроматина или ядерных телец зависит от ядерного актина [10,12, 13]. Чтобы проверить возможность того, что ядерный актин и миозины могут быть вовлечены в слияние интерфазных проядрышек, мы исследовали эффекты BDM, ингибитора актин-зависимых миозинов, и латрункулина А, ингибитора полимеризации актина. Ни один из этих ингибиторов существенно не влиял на слияние интерфазных проядрышек, что позволяет предположить, что этот процесс не зависит от актина.

Поскольку диффузия была наиболее распространенным типом наблюдаемого движения интерфазных проядрышек, оказалось, что какой-то барьер ограничивал слияние интерфазных проядрышек. Чтобы выяснить природу этих потенциальных барьеров, мы использовали электронную микроскопию для анализа ультраструктурной организации клеток с интерфазными проядрышками. Многочисленные НБ с низкой электронной плотностью наблюдались в нуклеоплазме среди нитей конденсированного хроматина. Используя иммуноэлектронную микроскопию, мы продемонстрировали, что эти тела содержали NPM1 и, таким образом, действительно были интерфазными проядрышками. С использованием серийных ультратонких срезов была проведена трехмерная реконструкция интерфазных проядрышек и окружающих комплексов конденсированного хроматина. Конденсированный хроматин окружал интерфазные проядрышки почти со всех сторон, образуя ограничивающие «области», внутри которых были видны небольшие промежутки без хроматина.

Если мобильность интерфазных проядрышек ограничена конденсированным хроматином, движение интерфазных проядрышек во время событий слияния должно происходить через свободные от хроматина области ядерного пространства. Чтобы

проверить это, слияния интерфазных проядрышек анализировали в клетках, экспрессирующих гистон H2B-EGFP и NPM1-TagRFP. В большинстве проанализированных слияний (77%) не было видимых конденсированных комплексов хроматина между проядрышками, которые слились в течение периода наблюдения. Большинство слияний происходило между проядрышками, расположенными внутри областей, образованных конденсированным хроматином. Затем мы рассмотрели вопрос о том, является ли конденсированный хроматин барьером для слияния интерфазных проядрышек путем измерения расстояния между центрами слияния проядрышек. Удивительно, но мы не обнаружили различий между слияниями интерфазных проядрышек, разделенных хроматиновыми нитями, и теми, которые не разделены хроматином. В обоих случаях мы наблюдали как события быстрого слияния, произошедшие в результате быстрого скачка, так и события постепенного слияния. Одним из объяснений этих, казалось бы, противоречивых результатов является то, что слияния происходили через небольшие промежутки в хроматине, которые были обнаружены при исследовании с помощью электронной микроскопии; эти промежутки нельзя было визуализировать с помощью флуоресцентного микроскопа из-за ограничения оптического разрешения. В нескольких случаях мы наблюдали, что слитые интерфазные проядрышки, по-видимому, толкали нити хроматина; это может привести к образованию путей без хроматина.

Затем мы провели количественный анализ распределения хроматина вокруг слитых интерфазных проядрышек перед началом слияния. Было установлено, что минимальное угловое распределение интенсивности для 66 плавающих частиц составляет 0,13 рад, что указывает на то, что самая низкая плотность хроматина имела место между плавающими интерфазными проядрышками вдоль линии слияния. Таким образом, конденсированный хроматин действительно может ограничивать подвижность интерфазных проядрышек. Чтобы подтвердить это, мы проанализировали слияния интерфазных проядрышек в клетках с экспериментально конденсированным хроматином. Чрезмерная конденсация хроматина была вызвана либо гипертонической средой [22, 27, 28], либо ионофором кальция A23187 [23]. Для количественной оценки частоты слияния интерфазных проядрышек в этих условиях мы измерили плотность распределения интерфазных проядрышек (количество проядрышек в одном оптическом сечении для области нуклеоплазмы) через 5 и 60 минут после возвращения в изотонические условия. Плотность распределения интерфазных проядрышек значительно снижалась в течение первых часов инкубации контрольных клеток в изотонической среде. Это было не так в клетках, обработанных либо гипертоническим раствором, либо A23187. Таким образом,

конденсированный хроматин в нуклеоплазме ограничивает слияние интерфазных проядрышек и, следовательно, их подвижность.

6.4 Заключение

Предыдущие исследования показали, что ядерные тельца преимущественно перемещаются в бедных хроматином областях ядра [11, 15, 16, 29]. Действительно, это говорит о том, что плотный хроматин каким-то образом ограничивает их движение, но это не было продемонстрировано напрямую. Здесь мы разработали модель, которая позволяет непосредственно в реальном времени изучать факторы, ограничивающие мобильность ядерных телец. Мы использовали интерфазные проядрышки; их большое количество, почти равномерное распределение внутри ядра и способность к слиянию, уникальное для ядерных телец, позволили нам использовать эти ядерные тельца для «сканирования» ядерного пространства. Мы показали, что гетерохроматин действительно был фактором, ограничивающим подвижность ядерных телец.

Способ выбора движения локусов хроматина и ядерных телец считается ограниченной диффузией [11, 30, 31] или ограниченной диффузией, чередующейся со случаями быстрых скачков [29, 32]. Здесь мы наблюдали три типа движения интерфазных проядрышек: ограниченная диффузия (82%), простая диффузия (12%) и направленная диффузия (6%). Ни ограниченное, ни направленное движение интерфазных проядрышек не привело к переносу ядрышкового материала из нуклеоплазмы в ядрышки. Скорее, NPM1 удаляли из интерфазных проядрышек путем диффузии [20]. Наблюдалось два типа слияний интерфазных проядрышек: (i) быстрые скачки и (ii) постепенное движение маленьких проядрышек к большему. Размах этих движений никогда не превышал 1,2 мкм. Несколько известных случаев направленного перемещения очагов хроматина или ядерных телец на большие расстояния зависят от ядерного актина [10, 12, 13, 33]. Слияния проядрышек были нечувствительны к ингибитору миозина BDM и ингибитору полимеризации актина латрункулину, что указывало на то, что движение интерфазных проядрышек было отличным от описанного направленного движения, и что слияния интерфазных проядрышек скорее были результатом стохастического столкновения интерфазных проядрышек, свободно диффундирующих в нуклеоплазме.

Ядерные тельца и активные регуляторные элементы транскрипции расположены в интерхроматиновых компартментах [27, 34]. Наши наблюдения показывают, что конденсированный хроматин может служить препятствием для движения ядерных телец. Слияния интерфазных проядрышек друг с другом были замечены преимущественно внутри «областей» хроматина, а избыточная конденсация хроматина ингибировала слияния проядрышек, указывая на то, что конденсированный хроматин ограничивал

подвижность проядрышек, создавая физические барьеры для их движения. В случаях, когда слияние интерфазных проядрышек происходило через гетерохроматин, мы предполагаем, что это может происходить через промежутки между кластерами гетерохроматина, которые мы могли наблюдать с помощью электронной микроскопии. Наши результаты подтверждаются опубликованными данными о том, что движения ядерных телец происходили преимущественно в несодержащих хроматин областях нуклеоплазмы. Действительно, было продемонстрировано, что движение телец Кахаля состоит из двух компонентов: диффузии тельца в пределах хроматина и его транслокации в результате диффузии хроматина [16]. Кроме того, было показано, что подвижность движущихся магнитных частиц максимальна внутри ядерных областей без хроматина [29], и было показано, что тельца Кахаля чередуются между ассоциацией с хроматином и диффузией в межхроматиновом пространстве [11]. Движения ядерных спеклов происходили в истощенных по хроматину каналах [15]. Интересно, что заражение различными герпесвирусами вызывало увеличение доменов интерхроматина, что, как было предложено, позволяло капсидам распространяться неограниченно на большие расстояния [35].

Гетерохроматин также может ограничивать подвижность биологических макромолекул: было обнаружено, что энергонезависимое движение мРНК ограничено доменами с низким содержанием хроматина и ограничено барьерами для хроматина. Кроме того, было показано, что ламин А ограничивает движение ядерных телец [36, 37, 38] и динамику хроматина [37].

Таким образом, конденсированный хроматин создает узкие рамки или границы, ограничивающие подвижность интерфазных телец в интерхроматиновых компартментах. Количество и распределение конденсированного хроматина варьируют между различными типами клеток; следовательно, можно предположить, что такие ограничения подвижности будут более выраженными внутри ядер дифференцированных клеток, которые содержат много гетерохроматина, а не в раковых клетках, обедненных гетерохроматином. Таким образом, гетерохроматин может создавать различные условия, влияющие на функционирование генома, в зависимости от его количества и распределения. Основные функции хроматина заключаются в хранении, считывании и воспроизведении генетического материала, но также были описаны дополнительные негенетические функции, на которые влияет широкий спектр клеточных процессов [39]. На сегодняшний день они включают: ядерную сборку, реакцию на механические силы, миграцию клеток, внутри- и экстрануклеарную передачу сигналов и на физиологическом

уровне улучшенное ночное зрение [39]. Описанная здесь барьерная функция гетерохроматина, по-видимому, является новой негенетической функцией хроматина.

По результатам работы в 2018 году опубликованы статьи [40, 41, 42].

6.5 Список использованных источников

- 1 Dundr M Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome//Curr Opin Cell Biol. – 2012. - Vol. 24. P. 415 – 422. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.03.010>.
- 2 Ulianov SV, Gavrilov AA, Razin SV Nuclear compartments, genome folding, and enhancer-promoter communication//Int Rev Cell Mol Biol. – 2015. - Vol. 315. P. 183 – 244. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2014.11.004>.
- 3 Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions//Nat Rev Genet. – 2007. - Vol. 8. P. 104 – 115. <https://doi.org/10.1038/nrg2041>.
- 4 Soutoglou E, Misteli T Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability//Curr Opin Genet Dev. – 2007. - Vol. 17. P. 435 – 442. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.08.004>.
- 5 Dion V, Gasser SM Chromatin movement in the maintenance of genome stability//Cell. – 2013. - Vol. 152. P. 1355 – 1364. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.010>.
- 6 Iarovaia OV, Rubtsov M, Ioudinkova E, Tsfasman T, Razin SV, Vassetzky YS Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations//Mol Cancer. – 2014. - Vol. 13. P. 249. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-249>.
- 7 Shachar S, Misteli T Causes and consequences of nuclear gene positioning//J Cell Sci. – 2017. - Vol. 130. P. 1501 – 1508. <https://doi.org/10.1242/jcs.199786>.
- 8 Arifulin EA, Musinova YR, Vassetzky YS, Sheval EV Mobility of nuclear components and genome functioning//Biochem Mosc. -2018. - Vol. 83. P. 690 – 700. <https://doi.org/10.1134/S0006297918060068>.
- 9 Chambeyron S, Bickmore WA Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription//Genes Dev. – 2004. - Vol. 18. P. 1119 – 1130. <https://doi.org/10.1101/gad.292104>.
- 10 Khanna N, Hu Y, Belmont AS HSP70 transgene directed motion to nuclear speckles facilitates heat shock activation//Curr Biol. – 2014. - Vol. 24. P. 1138 – 1144. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.053>.
- 11 Platani M, Goldberg I, Lamond AI, Swedlow JR Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent//Nat Cell Biol. – 2002. - Vol. 4. P. 502 – 508. <https://doi.org/10.1038/ncb809>.

- 12 Dundr M, Ospina JK, Sung MH, John S, Upender M, Ried T, Hager GL, Matera AG Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo//J Cell Biol. – 2007. - Vol. 179. P. 1095 – 1103. <https://doi.org/10.1083/jcb.20071005>.
- 13 Chang L, Godinez WJ, Kim IH, Tektonidis M, de Lanerolle P, Eils R, Rohr K, Knipe DM Herpesviral replication compartments move and coalesce at nuclear speckles to enhance export of virallate mRNA//Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. - Vol. 108. P. E136 – E144. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103411108>.
- 14 Zhang Q, Kota KP, Alam SG, Nickerson JA, Dickinson RB, Lele TP Coordinated dynamics of RNA splicing speckles in the nucleus. J Cell Physiol. – 2016. - Vol. 231. P.1269 – 1275. <https://doi.org/10.1002/jcp>.
- 15 Kim J, Han KY, Khanna N, Ha T, Belmont AS Nuclear speckle fusion via long-range directional motion regulates the number and size of speckles//bioRxiv. -2018. 347955. <https://doi.org/10.1101/347955>.
- 16 Görisch SM, Wachsmuth M, Ittrich C, Bacher CP, Rippe K, Lichter P Nuclear body movement is determined by chromatin accessibility and dynamics//Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. - Vol. 101. P. 13221 – 13226. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402958101>.
- 17 Zatzepina OV, Dudnic OA, Todorov IT, Thiry M, Spring H, Trendelenburg MF Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells//Chromosoma. – 1997. - Vol. 105. P. 418 – 430.
- 18 Musinova YR, Lisitsyna OM, Golyshev SA, Tuzhikov AI, Polyakov VY, Sheval EV Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions//Biochim Biophys Acta. – 2011. - Vol. 1813. P. 27 – 38. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.003>.
- 19 Musinova YR, Kananykhina EY, Potashnikova DM, Lisitsyna OM, Sheval EV A charge-dependent mechanism is responsible for the dynamic accumulation of proteins inside nucleoli//Biochim Biophys Acta. – 2015. - Vol. 1853. P. 101 – 110. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.007>.
- 20 Musinova YR, Lisitsyna OM, Sorokin DV, Arifulin EA, Smirnova TA, Zinovkin RA, Potashnikova DM, Vassetzky YS, Sheval EV RNA-dependent disassembly of nuclear bodies//J Cell Sci. – 2016. - Vol. 129. P. 4509 – 4520. <https://doi.org/10.1242/jcs.189142>.
- 21 Pellar GJ, DiMario PJ Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolins carboxy GAR domain//Chromosoma. – 2003. - Vol. 111. P. 461 – 469. <https://doi.org/10.1007/s00412-003-0231-y>.

- 22 Walter A, Chapuis C, Huet S, Ellenberg J Crowded chromatin is not sufficient for heterochromatin formation and not required for its maintenance//J Struct Biol. – 2013. - Vol. 184. P. 445 – 453. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.10.004>.
- 23 Visvanathan A, Ahmed K, Even-Faitelson L, Lleres D, Bazett-Jones DP, Lamond AI Modulation of higher order chromatin conformation in mammalian cell nuclei can be mediated by polyamines and divalent cations//PLoS One. – 2013. - Vol. 8. P. e67689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067689>.
- 24 Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication//Nat Cell Biol. – 2005. - Vol. 7. P. 823 – 830. <https://doi.org/10.1038/ncb1282>.
- 25 Kanda T, Sullivan KF, Wahl GM Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells//Curr Biol. – 1998. - Vol. 8. P. 377 – 385.
- 26 Gilerovitch HG, Bishop GA, King JS, Burry RW The use of electron microscopic immunocytochemistry with silver-enhanced 1.4-nm gold particles to localize GAD in the cerebellar nuclei//J Histochem Cytochem. – 1995. - Vol. 43. P. 337 – 343.
- 27 Albiez H, Cremer M, Tiberi C, Vecchio L, Schermelleh L, Dittrich S, Küpper K, Joffe B, Thormeyer T, von Hase J, Yang S, Rohr K, Leonhardt H, Solovei I, Cremer C, Fakan S, Cremer T Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks//Chromosome Research. – 2006. - Vol. 14 (7). P. 707 – 33. doi:10.1007/s10577-006-1086-x.
- 28 Irianto J, Swift J, Martins RP, McPhail GD, Knight MM, Discher DE, Lee DA Osmotic challenge drives rapid and reversible chromatin condensation in chondrocytes//Biophys J. – 2013. - Vol. 104. P. 759 – 769. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.01.006>.
- 29 Hameed FM, Rao M, Shivashankar GV Dynamics of passive and active particles in the cell nucleus//PLoS One. – 2012. - Vol. 7. P. e45843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045843>.
- 30 Muratani M, Gerlich D, Janicki SM, Gebhard M, Eils R, Spector DL Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus//Nat Cell Biol. – 2002. 4:106–110. <https://doi.org/10.1038/ncb740>.
- 31 Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR//Cas system. Cell. – 2013. - Vol. 155. P. 1479 – 1491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>.
- 32 Levi V, Ruan Q, Plutz M, Belmont AS, Gratton E Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope//Biophys J. – 2005. - Vol. 89. P. 4275 – 4285. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066670>.

33 Mehta IS, Amira M, Harvey AJ, Bridger JM Rapid chromosome territory relocation by nuclear motor activity in response to serum removal in primary human fibroblasts//Genome Biol. 2010. - Vol. 11. P. R5. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-1-r5>

34 Cremer M, Schmid VJ, Kraus F, Markaki Y, Hellmann I, Maiser A, Leonhardt H, John S, Stamatoyannopoulos J, Cremer T Initial high-resolution microscopic mapping of active and inactive regulatory sequences proves non-random 3D arrangements in chromatin domain clusters//Epigenetics Chromatin. – 2017. - Vol. 10. P. 39. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0146-0>.

35 Bosse JB, Hogue IB, Feric M, Thiberge SY, Sodeik B, Brangwynne CP, Enquist LW Remodeling nuclear architecture allows efficient transport of herpesvirus capsids by diffusion//Proc Natl Acad Sci US A. – 2015. - Vol. 112. P. E5725 – E5733. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513876112>

36 Stixová L, Matula P, Kozubek S, Gombitová A, Cmarko D, Raška I, Bártová E Trajectories and nuclear arrangement of PML bodies are influenced by A-type Lamin deficiency//Biol Cell. – 2012. - Vol. 104. P. 418 – 432. <https://doi.org/10.1111/boc.201100053>.

37 Bronshtein I, Kepten E, Kanter I, Berezin S, Lindner M, Redwood AB, Mai S, Gonzalo S, Foisner R, Shav-Tal Y, Garini Y Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior//Nat Commun. – 2015. - Vol. 6. P. 8044. <https://doi.org/10.1038/ncomms9044>.

38 Bronshtein I, Kanter I, Kepten E, Lindner M, Berezin S, Shav-Tal Y, Garini Y Exploring chromatin organization mechanisms through its dynamic properties//Nucleus. – 2016. - Vol. 7. P. 27 – 33. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1139272>.

39 Bustin M, Misteli T Nongenetic functions of the genome//Science. – 2016. - Vol. 352. P. aad6933. <https://doi.org/10.1126/science.aad6933>.

40 Arifulin E.A., Sorokin D.V., Tvorogova A.V., Kurnaeva M.A., Musinova Y.R., Zhironkina O.A., Golyshev S.A., Abramchuk S.S., Vassetzky Y.S., Sheval E.V. Heterochromatin restricts hemobility of nuclear bodies//Chromosoma. - 2018. DOI: 10.1007/s00412-018-0683-8).

41 Shubina M.Y., Musinova Y.R., Sheval E.V. Proliferation, cancer, and aging—novel functions of the nucleolar methyltransferase fibrillarin?//Cell Biology International. - 2018. DOI: 10.1002/cbin.11044.

42 Arifulin E.A., Musinova Y.R., Vassetzky Y.S., Sheval E.V. Mobility of Nuclear Components and Genome Functioning (Review)//Biochemistry (Moscow). - Vol. 83. Is. 6. P. 690 - 700. DOI: 10.1134/S0006297918060068). - Арифупин Е.А., Мусинова Я.Р., Васецкий

Е.С., Шеваль Е.В. Подвижность компонентов клеточного ядра и функционирование генома//Биохимия. - 2018. - Т. 83, № 4. С. 629 – 641.

Раздел 7. Изучение цитологических, биохимических и физиологических механизмов прямых межклеточных взаимодействий

7.1 Введение

Проведенные ранее исследования показывают, что ганглиозиды, а также ряд нейротрансмиттеров и их производных (серотонин и мелатонин, норадреналин) организуют суммарный ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов и кератиноцитов [1-5]. В настоящей работе исследовали влияние ганглиозидов BBG, отдельно ганглиозида GM1 и мелатонина на скорость закрытия раны в условиях экспериментальной модели на культуре клеток и влияние мелатонина на скорость заживления раны в условиях *in vivo*. Было показано, что смесь ганглиозидов BBG и мелатонин достоверно ускоряет миграцию клеток в экспериментальной модели раны. Эффект присутствует как при внесении препаратов после нанесения раны, так и при предобработке ими культуры кератиноцитов до нанесения раны. При исследовании влияния мелатонина на заживление раны *in vivo* показано, что мелатонин ускоряет ее заживление, особенно на средних этапах после операции. При гистологическом исследовании выявлено усиление пролиферации эпидермиса по краям раны начиная с четвертого дня после операции.

7.2 Материалы и методы

Модель раны в культуре кератиноцитов человека

Выделение кератиноцитов человека

Фрагменты кожи, получаемые в ходе хирургических операций с информированного согласия пациентов, помещали в 0,2% раствор диспазы и инкубировали при + 4⁰С в течение 16-20 ч. После этого эпидермис отделяли пинцетом от дермы по линии базальной пластинки и пласты эпидермиса пипетировали для выделения кератиноцитов. Суспензию кератиноцитов вносили в 6-ти луночные планшеты в объеме 1,5 мл в концентрации 250 тыс/мл. В среднем через 14 дней после инокуляции в культуру кератиноциты достигали монослоя (Рисунок 7.1). За счет использования бессывороточной и низкокальциевой фирменной среды процессы дифференцировки и стратификации были подавлены, и клетки росли в один слой без образования многослойного пласта.

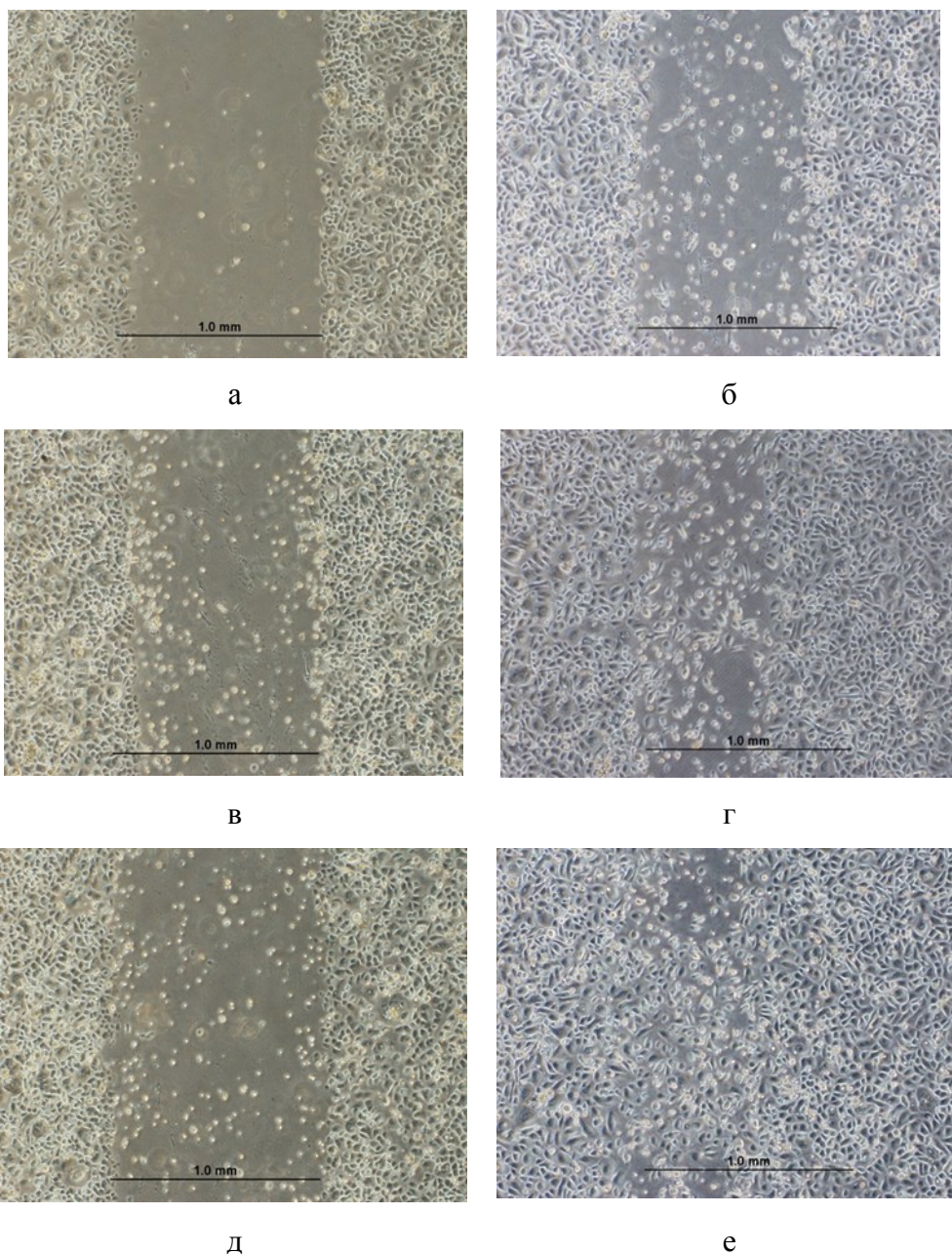


Рисунок 7.1 - Процесс эпителизации модели раны. В контроле была использована чистая среда, а в среду опытных культур после нанесения раны вносили вещества организаторы ритма синтеза белка – смесь ганглиозидов BGG в дозе 3000 нМ и мелатонин в дозе 50 нМ ; а – контроль в первый день, б – контроль через 72 часа, в – культура, в которую внесли BGG в первый день, г – аналогичная культура через 72 часа, д – культура, которую был внесен мелатонин в дозе 50 нМ на первый день, е – аналогичная культура через 72 часа.

Определение скорости миграции эпидермальных клеток в рану *in vitro*

В части экспериментов среду за 1 час до нанесения раны меняли на свежую. После этого пластмассовым шпателем удаляли часть клеточного монослоя в центре чашки. Ширина получавшейся "раны" в среднем составляла 2,5 мм. Затем культуры дважды промывали раствором Хэнкса и вносили свежую среду, содержащую ганглиозиды, мелатонин или дофамин. В другой серии экспериментов мелатонин или ганглиозиды

вносили в среду до нанесения раны. Скорость миграции клеток определяли по фотографиям культуры, измеряя ширину раны в сравнении со шкалой микроскопа.

Изучение действия мелатонина на заживление полнослойной кожной раны у мышей

Эксперимент проводили на мышах линии C57Bl6, самцах, массой тела 18-20 г. Все манипуляции с животными проводили под общим наркозом, согласно нормам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов. Рану наносили животным по центру спины, в области лопаток: хирургическими ножницами вырезали полнослойное отверстие диаметром 5-7 мм.).

Оценка размеров раны

Сразу после нанесения раны (стадия 0) и на второй, четвертый и шестой дни заживления, раны фотографировали. В Photoshop оценивали 1 см линейки в единицах Photoshop. Учитывая пересчет единиц Photoshop в стандартную размерность, можно рассчитать площадь поверхности в мм^2 . Однако, площадь корректно характеризуется произведением осей $a \times b$, поскольку остальные множители постоянны.

7.3 Результаты и обсуждение

Влияние исследуемых веществ на скорость застания раны в пласте эпидермальных кератиноцитов человека.

Целью исследования было определение действия веществ, организующих ритм синтеза белка, на скорость миграции эпидермальных клеток в рану, нанесенную на пласт в культуре (Рисунок 7.1, 7.2). Первая серия экспериментов была посвящена сравнению скорости миграции клеток в просвет раны. В контрольной культуре была использована чистая среда, в опыте в аналогичную среду вносили факторы организации ритма синтеза белка. Вещества были внесены сразу после нанесения раны. Испытывали мелатонин в концентрациях 5 нМ, 25 нМ и 50 нМ, стандартную смесь ганглиозидов из мозга быка (BBG) в концентрации 3000 нМ и ганглиозид GM1 (375 мкг/мл). По оценке ширины раны, то есть скорости миграции клеток эффективными оказались BBG и мелатонин в дозе 50 нМ (Рисунок 7.1, 7.2). Меньшие дозы мелатонина влияли слабее. Мало отличался от контроля GM1 (данные по GM1 не представлены). Скорость миграции кератиноцитов при воздействии BBG и мелатонина достоверно отличалась от контроля. В контроле размер раны к 96 часам сократился до 70% от исходной, а под действием BBG и мелатонина до 61% и 60% соответственно. В другой серии опытов мелатонин (50 нМ) или BBG (3000 нМ) вносили в среду с культурами за час до нанесения раны. В первом варианте перед нанесением раны культуру отмывали, а затем вещества вносили повторно, во втором

варианте культуры отмывали и переносили в свежую среду, не содержащую исследуемых веществ.

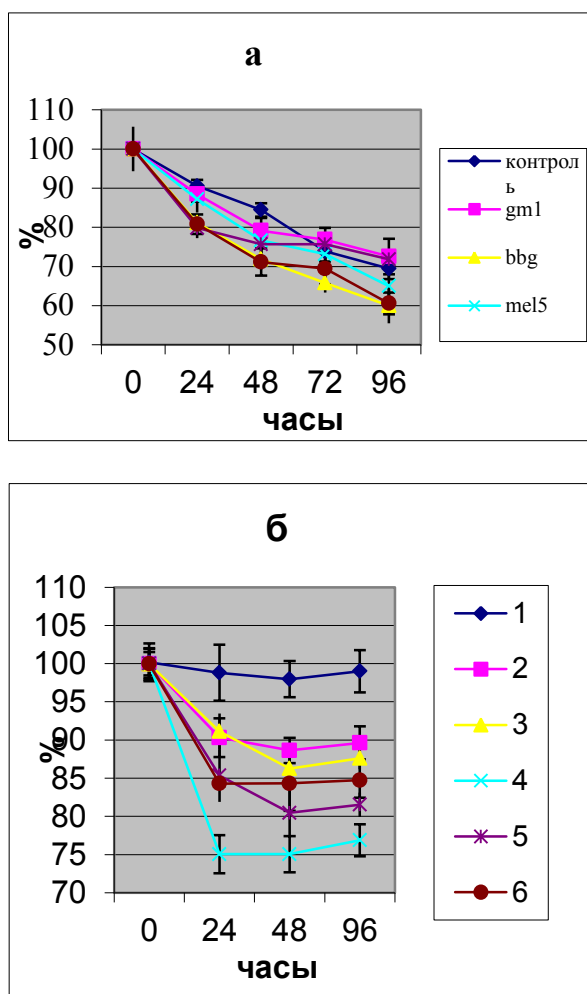


Рисунок 7.2 - Скорость миграции кератиноцитов на модели раны *in vitro*; а – эксперимент без предобработки исследуемыми веществами, то есть вещества вносили после нанесения раны. На графике представлены контроль, культура, в которую внесли ганглиозид GM1 в концентрации 375 мкг/мл, аналогичная культура, в которую внесли смесь ганглиозидов

BBG (3000 нМ) и мелатонин в концентрациях 5, 25 и 50 нМ. Видно, что достоверно отличаются от контроля только культуры, в которые были внесены BBG и мелатонин в дозе 50 нМ; б – эксперимент, в котором вещества были внесены до нанесения раны затем, после нанесения раны среду заменяли на новую и повторно вносили исследуемые вещества. На графике представлены два контроля: контроль, в котором среду не меняли после нанесения раны (1) и контроль в котором среду заменили после нанесения раны(2), и опытные культуры: культура в которую был внесен мелатонин (5нМ) после нанесения раны (3); аналогичная культура, которая была предобработана мелатонином до нанесения раны (4); культура, в которую была внесена смесь ганглиозидов BBG (5) после нанесения раны аналогичная культура, предобработанная BBG до нанесения раны (6). В данном случае наибольшая скорость миграции наблюдалась при предобработке культуры мелатонином до нанесения раны.

После предобработки культур BBG или мелатонином с последующим культивированием в среде с эффекторами, сокращение раны, т.е. миграция клеток, усиливалась через 24 часа и еще более через 48 часов и оставалась на таком уровне через 96 часа после нанесения раны. Изменения сравнительно с контролем были значимыми и для мелатонина и для ганглиозидов. В контроле размер раны мало изменился к 96 часу, до 99%. В случае с предобработкой культур bbg раны уменьшалась до 82%, а при предобработке мелатонином – до 77%.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* показано, что наибольшей эффективностью в отношении миграции эпидермальных клеток обладает мелатонин в концентрации 50 нМ. Учитывая то, что мелатонин является зарегистрированным лекарственным средством, представляется целесообразным исследовать его действие на раневое заживление *in vivo*, что и было сделано на следующем этапе работ.

Влияние мелатонина на заживление кожных ран у мышей

Размеры раны исследовали до 13 дня после операции. К этому времени у некоторых мышей видели рубец, хотя в среднем еще определяли 20-30% исходной площади раны (Рисунок 7.3а). Интерес представляет факт резкого ускорения (вдвое) заживления раны на средних стадиях – около 5 суток после операции. Исследование повторили, ограничив определение размеров раны лишь первыми 6 днями после операции. (Рисунок 7.3б). В этом опыте раны контрольных мышей на 6 дней достоверно не отличались от исходных. При действии мелатонина уже через 3 дня площадь раны уменьшалась в среднем почти в полтора раза, а через 6 дней – в два с половиной.

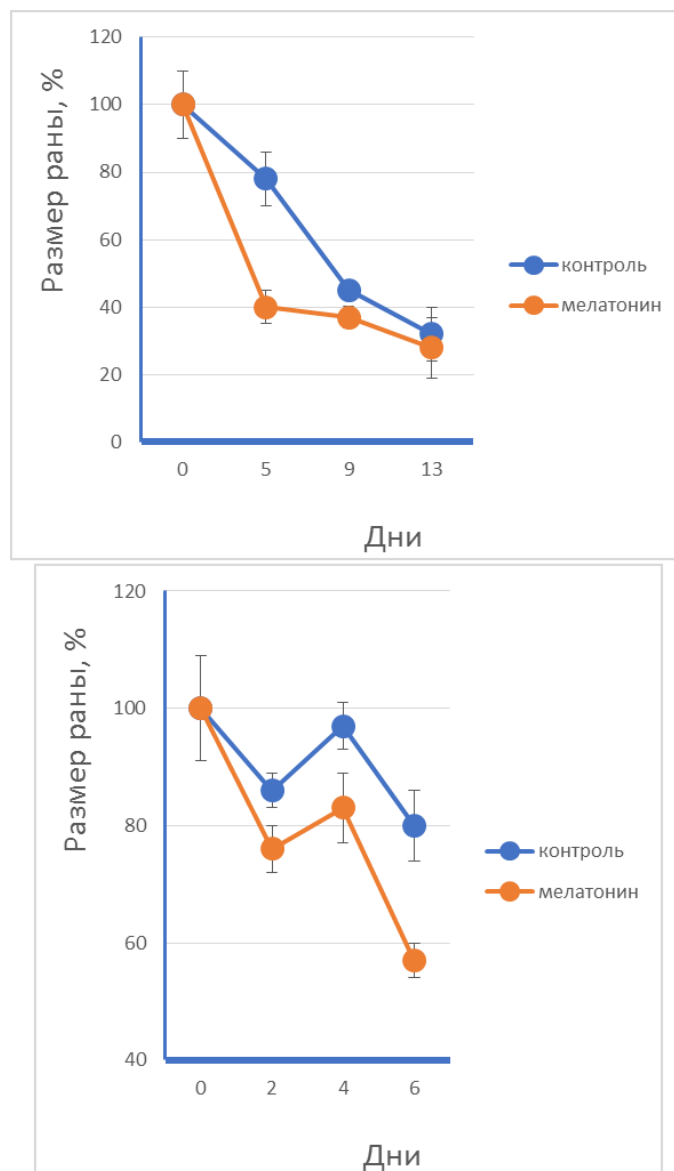
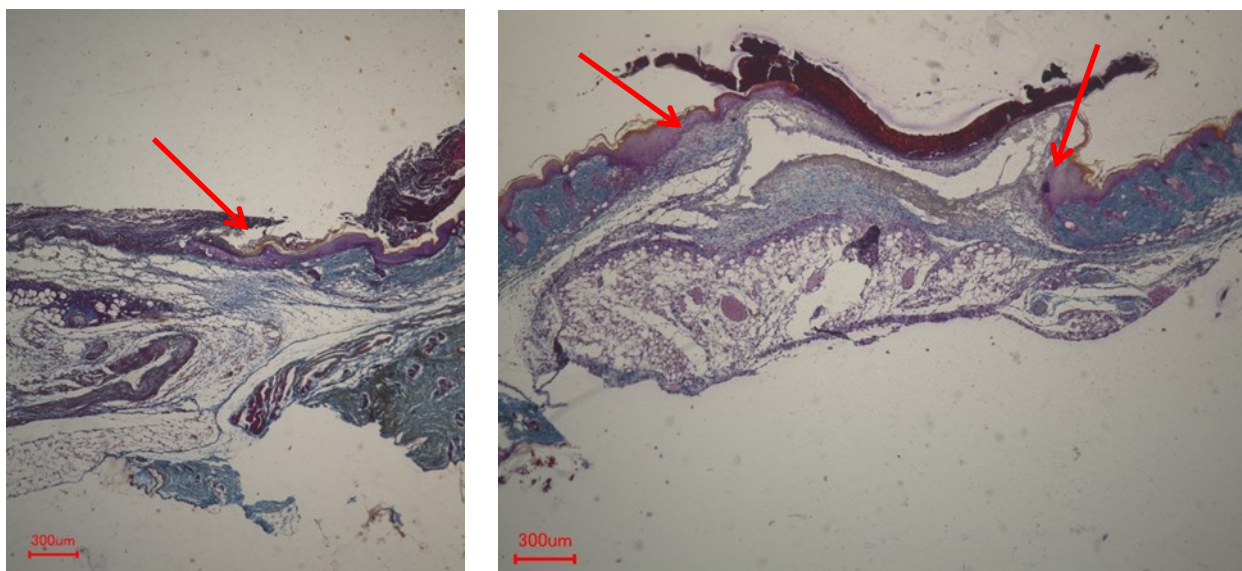


Рисунок 7.3 - Измерение размеров раны у мышей по мере заживления; а – за раной наблюдали до 13 дня. При обработке ран мелатином видно резкое ускорение заживления раны на ранних сроках по сравнению с контрольными животными; б – наблюдение вели только до шестого дня, а мелатонин вводили мышам внутривбрюшинно 6 мкг/кг, а не обрабатывали рану. При использовании мелатонина также видно ускорение заживления раны.

Для гистологического исследования были использованы препараты кожи мышей в области раны, окрашенные гематоксилин-эозином и по методу Маллори. В препаратах, полученных от мышей, которым внутривбрюшинно вводили мелатонин, было обнаружено усиление пролиферации эпидермиса по краям раны на четвертый и шестой день после нанесения раны. По краям дефекта хорошо различимы «валики» пролиферирующего эпидермиса. В контрольных препаратах пролиферация эпидермиса по краям выражена слабее. (Рисунок 7.4). Параметры количества лейкоцитов в области раны, количества слоев эпидермиса над самим дефектом, количество волосных фолликулов и сосудов в области дефекта достоверно в контроле и в опытных образцах не отличалась.



а

б

Рисунок 7.4 - Гистологическое исследование биоптатов раны у мышей. Материал взят из исследования, в котором мыши были инъецированы мелатонином внутривенно (6 мкг/кг); а – контроль, взятый на четвертый день, стрелкой показан край раны; б – материал, полученный от мыши, иъецированной мелатонином, так же на четвертый день. Стрелками указаны края раны. Видны заметные утолщения эпидермиса в виде валиков, что может свидетельствовать об ускорении пролиферации кератиноцитов.

7.4 Заключение

Влияние мелатонина на заживление ран изучается давно. Выводы работ противоречивы. Отмечено, что действие мелатонина не зависит от типа раны, а, в основном, от дозы и, соответственно, времени введения – соотношения эндогенного и инъецированного мелатонина. Эффекты мелатонина обусловлены многочисленными его функциями. Проникая в клетку, мелатонин действует как сильный антиоксидант, он участвует в организации цитоскелета, активации протеинкиназ, изменениях состояния иммунной системы. По нашим данным, мелатонин – эффективный стимулятор прямых межклеточных взаимодействий и, как одно из следствий, усилитель и синхронизатор синтеза белка. Неудивительно, что мелатонин благотворно влияет на течение многих болезней.

Показано, что при предобработке и последующем поддержании концентрации мелатонина в культуре закрытие раны происходит наиболее быстро. Это может свидетельствовать о том, что усиление межклеточных взаимодействий влияет на этот процесс. Было показано, что действие мелатонина после однократного его введения пропадает примерно на 4-е сутки. Если же мелатонин постоянно присутствует в среде, уровень межклеточных взаимодействий будет стабильно высоким, и, как следствие

высокой будет и скорость миграции клеток. Также интерес представляет и тот факт, что при смене среды после нанесения раны даже в контроле ускоряется темп заживления. Это, вероятно, связано с тем, что при смене среды удаляются погибшие клетки, части разрушенных клеток, которые могут негативно влиять на состояние культуры.

Изучение динамики заживления ран у мышей в наших опытах показало, что мелатонин не ускоряет конечный итог, но сильно влияет на начальные и средние стадии. Это может сыграть роль при лечении длительно незаживающих ран. Гистологическое исследование показывает, что инъекции мелатонина индуцируют существенное усиление пролиферации эпидермиса по краям раны, хорошо заметное на уже четвертый день от нанесения раны. Таким образом, результаты *in vivo* коррелируют с результатами *in vitro*, поскольку сокращение раны, нанесенный на клеточный пласт происходит не только за счет ускорения миграции клеток, но и за счет их пролиферации и увеличения их количества.

Опубликован обзор, посвященный биохимическим механизмам организации клеточных популяций, основанным на прямых межклеточных взаимодействиях [6].

По результатам ранее проведенных работ опубликована статья по влиянию глутаминовой кислоты на кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс [7].

7.5 Список использованных источников

- 1 Бродский В.Я. Околочасовые метаболические ритмы//Биохимия. –2014. -Т. 79, № 6. С. 621 - 634.
- 2 Бродский В.Я., Терских В.В, Васильев А.В., Звездина Н.Д., Воротеляк Е.А., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Самоорганизация ритма синтеза белка в культурах HaCaT кератиноцитов человека//Онтогенез. - 2011.– № 4. С. 312 – 319.
- 3 Бродский В.Я., Воротеляк Е.А., Терских В.В., Васильев А.В., Мальченко Л.А., Конченко Д.С., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д.. Дофамин дезорганизует прямые межклеточные взаимодействия в культурах кератиноцитов; сравнение с гепатоцитами//Онтогенез. - 2016. Т. 47, № 2. С. 92 - 98.
- 4 Васильев А.В., Воротеляк Е.А., Терских В.В. Моделирование регенерации эпидермиса *in vitro*: совместное действие сыворотки и эпидермального фактора роста//Онтогенез. – 1994. - Т. 25, № 3. С. 74 - 79.
- 5 Звездина Н.Д., Л.А. Мальченко, Д.С. Конченко, Дубовая Т.К.. Бродский В.Я. Действие сигнала, организующего ритм синтеза белка, сохраняется в течение 1 суток после однократного введения мелатонина крысе//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013.- Т. 156, № 9. С. 298 - 301.

6 Brodsky V.Y. Biochemistry of Direct Cell-Cell Interactions. Signaling Factors Regulating Orchestration of Cell Populations//Biochemistry (Moscow). – 2018. - Vol. 83, N 8. P. 890-906. DOI: 10.1134/S0006297918080035.- Бродский В.Я. Биохимия прямых межклеточных взаимодействий. Сигнальные факторы организации клеточных популяций//Биохимия. - 2018. - Т. 83, № 8. С. 1130 - 1147.

7 Brodsky V.Y., Malchenko L.A., Lazarev D.S., Butorina N.N., Dubovaya T.K., Zvezdina N.D. Glutamic Acid Signal Synchronizes Protein Synthesis Kinetics in Hepatocytes from Old Rats for the Following Several Days. Cell Metabolism Memory//Biochemistry-Moscow.- 2018. - Vol. 83, N 3. P. 294 - 298. DOI: 10.1134/S0006297918030094). – Бродский В.Я., Мальченко Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Дубовая Т.К., Звезда Н.Д. Сигнал глутаминовой кислоты синхронизирует кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс в течение нескольких дней. Память в метаболизме клеток//Биохимия. - 2018. - Т. 83. С. 429 - 435.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием широкого спектра методических подходов и экспериментальных моделей проведены исследования механизмов регуляции клеточной дифференцировки, пластичности и морфогенеза в контексте онтогенеза и регенерации. Разработан протокол получения линий ИПСК с нокаутированными генами для решения широкого круга задач. Получено несколько линий ИПСК с нокаутом генов. Проведён дозированный нокаут гена *RCAN1* в культуре ИПСК человека с трисомией по 21-й хромосоме. Показали, что уменьшение дозы гена *RCAN1* в нейронах человека с трисомией по 21-й хромосоме, увеличивает экспрессию генов – маркеров нейральных стволовых клеток и дифференцированных нейронов. В культуре клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) человека показано, что клетки РПЭ способны под действием факторов роста репрограммироваться в сторону нейроэпителия, что аналогично процессам в сетчатке глаза человека, приводящим к дегенерации нейронов. При изучении механизмов дифференцировки эпидермальных кератиноцитов получены данные по пространственному взаимодействию генов кератинов и их энхансерных зон в кератиновом локусе. Это позволяет двигаться в направлении определения патогенеза заболеваний, связанных с нарушениями процессов дифференцировки в эпидермисе (ихтиоз, псориаз и другие). Продемонстрировано положительное действие паракринных факторов, выделенных из мезенхимных стволовых клеток, на регенерацию мышечной ткани. Показана стимуляция миграции эпителия в кожную рану под действием мелатонина. Показано, что конденсированный хроматин создает узкие рамки или границы, ограничивающие подвижность интерфазных телец в интерхроматиновых компартментах. Количество и распределение конденсированного хроматина варьируют между различными типами клеток; вероятно, такие ограничения подвижности будут более выраженными внутри ядер дифференцированных клеток, которые содержат много гетерохроматина, а не в раковых клетках, обедненных гетерохроматином. Таким образом, гетерохроматин может создавать различные условия, влияющие на функционирование генома, в зависимости от его количества и распределения.

В целом, полученные данные позволят в дальнейшем на основе фундаментальных результатов о механизмах клеточной дифференцировки определить ключевые звенья патогенеза ряда социально значимых заболеваний.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ

*Отчетные публикации

Раздел 1

1 ***Chermnykh E.S., Kalabusheva E.P., Sharobaro V.I., Vorotelyak E.A.** Generation of folliculogenic human dermal papilla cells from induced pluripotent stem cells//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 153 - 153. WOS:000437674102148.

2 ***Chermnykh E., Kalabusheva E., Vorotelyak E.** Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate//International Journal of Molecular Sciences (IJMS). -2018. - Vol. 19, N 4. P. 1003. DOI: 10.3390/ijms19041003.

3. ***Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A.** Hair follicle dermal papilla cells as a potential novel source for diabetic wound healing//Wound Rep Reg. - 2018. A8. DOI: 10.1111/wrr.12643. (WoS) WOS:000448193100108

4 ***Kosykh A.V., Beilin A.K., Sukhinich K.K., Vorotelyak E.A.** Postnatal neural crest stem cells from hair follicle interact with nerve tissue *in vitro* and *in vivo*//Tissue and Cell. - 2018. - Vol. 54. P. 94 - 104. DOI: 10.1016/j.tice.2018.08.005.

5 ***Meleshina A.V., Rogovaya O.S., Dudenkova V.V., Sirotkina M.A., Lukina M.M., Bystrova A.S., Krut V.G., Kuznetsova D.S., Kalabusheva E.P., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A., Zagaynova E.V.** Multimodal label-free imaging of living dermal equivalents including dermal papilla cells//Stem Cell Research and Therapy. - 2018. - Vol. 9, N 1. P. 84. DOI: 10.1186/s13287-018-0838-9.

6 **Суханов Ю.В., Воротеяк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В.** 150 лет концепции «стволовая клетка»//Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2018. - Т. 104, № 1 - 12. С. 18 - 30.

Раздел 2

1 ***Puzanov G.A., Dashinimaev E.B., Krasnov G.S., Beniaminov A.D., Vishnyakova K.S., Afanasyeva M.A., Kondratieva T.T., Senchenko V.N., Yegorov Y.E.** Serine phosphatases of the CTDSP/SCP family show tumor-suppressing activity for kidney tumors: bioinformatic approach, study of clinical samples and experiments in vitro//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 320 - 320. WOS:000437674104031.

2 ***Puzanov G.A., Krasnov G.S., Dashinimaev E.B., Beniaminov A.D., Vishnyakova K.S., Afanasyeva M.A., Kurevlev S.S., Braga E.A., Kondratieva T.T., Yegorov Y.E., Senchenko V.N.** Serine phosphatases of the CTDSP/SCP family suppress the proliferation of lung tumor cells by

reduction of the Rb phosphorylation level//FEBS OPEN BIO. - 2018. - Vol. 8. P. 313 - 313.
WOS:000437674104008.1.

Раздел 3

1 *Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Skryabin N.A., Nikitina T.V., **Vasilyev S.A.**, Tolmacheva E.N., Lopatkina M.E., Salyukova O.A., Chechetkina N.N., **Vorotelyak E.A.**, Kalabusheva E.P., Fishman V.S., Kzhyshkowska J., Graziano C., Magini P., Romeo G., Lebedev I.N. A mosaic intragenic microduplication of LAMA1 and a constitutional 18p11.32 microduplication in a patient with keratosis pilaris and intellectual disability//American Journal of Medical Genetics, Part A. - 2018. DOI: 10.1002/ajmg.a.40478.

2 *Chermnykh E.S., Kiseleva E.V., Rogovaya O.S., Rippa A.L., Vasiliev A.V., **Vorotelyak E.A.** Tissue-engineered biological dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue//Histol Histopathol. -2018. - Vol. 33. e:18006. May 30:18006. DOI: 10.14670/HH-18-006.

3 *Gvazava I.G., Rogovaya O.S., Borisov M.A., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and rodent experimental models // Acta Naturae. -2018. - Vol. 10, N 1. P. 24 - 33).- **Гвазава И.Г., Роговая О.С., Борисов М.А., Воротеяк Е.А., Васильев А.В.** Патогенез сахарного диабета 1 типа и экспериментальные модели на лабораторных грызунах//Acta Naturae. - 2018. - Т. 10, № 1 (36). P. 25 - 35.

4 Зубрицкий В.Ф., Ивашкин А.Н., Загородний Н.В., Артемьев А.А., Фоминых Е.М., **Васильев А.В.**, Лебедева Ю.Н. Реимплантация криоконсервированных жизнеспособных аутодермотрансплантатов при тяжелой травме опорно-двигательного аппарата//Медицинский вестник МВД. - 2018. - Т. ХСIII, № 2 (93). С. 15 - 17.

Раздел 4

1 *Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. Влияние мезенхимных стромальных клеток и кондиционированной ими среды на заживление кожных ран//Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2018. - № 2. С. 117 - 120. DOI: 10.1007/s10517-018-4215-6

2 *Домарацкая Е.И., Паюшина О.В. Происхождение стволовых кроветворных клеток в эмбриональном развитии//Журнал общей биологии. - 2018. - Т. 79, № 5. С. 363 – 375. DOI 10.1134/S0044459618050056

Раздел 5

1 *Кузнецова А.В., Куринов А.М., Ржанова Л.А., Александрова М.А. Механизмы дедифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека

in vitro. Морфологический и молекулярно-генетический анализ//Цитология. – 2018. – Т. 60, № 12. С. 996 - 1007. DOI: 10.7868/S0041377118120068.

2 ***Sukhinich K.K., Aleksandrova M.A.** Individual Peculiarities of the Development and Differentiation of Embryonic Neocortex Transplants in Intact Adult Mouse Brain//Bull Exp Biol Med. – 2018. - Nov 12. DOI: 10.1007/s10517-018-4303-7. - **Сухинич К.К., Александрова М.А.** Индивидуальные особенности развития и дифференцировки трансплантатов эмбрионального неокортекса в интактном мозге взрослых мышей//Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2018. - №. 3. С. 164 - 175. DOI: 10.1007/s10517-018-4303-7.

3 **Aleksandrova M.A., Sukhinich K.K.** Mechanisms of cellular interactions in the reconstruction of mammalian brain tissue//Neurochemical Journal. -2018. - Vol. 12, N 4. P. 4. DOI: 10.1134/S1819712418040050.

Раздел 6

1 *Arifulin E.A., Sorokin D.V., Tvorogova A.V., Kurnaeva M.A., **Musinova Y.R., Zhironkina O.A., Golyshev S.A., Abramchuk S.S., Vassetzky Y.S., Sheval E.V.** Heterochromatin restricts hemobility of nuclear bodies//Chromosoma. - 2018. DOI: 10.1007/s00412-018-0683-8).

2 *Shubina M.Y., **Musinova Y.R., Sheval E.V.** Proliferation, cancer, and aging—novel functions of the nucleolar methyltransferase fibrillarin?//Cell Biology International. - 2018. DOI: 10.1002/cbin.11044.

3 *Arifulin E.A., **Musinova Y.R., Vassetzky Y.S., Sheval E.V.** Mobility of Nuclear Components and Genome Functioning (Review)//Biochemistry (Moscow). – 2018. - Vol. 83, N 6. P. 690 - 700. DOI: 10.1134/S0006297918060068). - Арифупин Е.А., **Мусинова Я.Р., Васецкий Е.С., Шеваль Е.В.** Подвижность компонентов клеточного ядра и функционирование генома//Биохимия. - 2018. - Т. 83, № 4. С. 629 – 641.

Раздел 7

1 ***Brodsky V.Y.** Biochemistry of Direct Cell-Cell Interactions. Signaling Factors Regulating Orchestration of Cell Populations//Biochemistry (Moscow). - 2018. - Vol. 83, N 8. P. 890 - 906. DOI: 10.1134/S0006297918080035. - **Бродский В.Я.** Биохимия прямых межклеточных взаимодействий. Сигнальные факторы организации клеточных популяций//Биохимия. - 2018. - Т. 83, № 8. С. 1130 - 1147.

2 ***Brodsky V.Y., Malchenko L.A., Lazarev D.S., Butorina N.N., Dubovaya T.K., Zvezdina N.D.** Glutamic Acid Signal Synchronizes Protein Synthesis Kinetics in Hepatocytes from Old Rats for the Following Several Days. Cell Metabolism Memory//Biochemistry-

Moscow.- 2018. - Vol. 83, N 3. P. 294 - 298. DOI: 10.1134/S0006297918030094). – **Бродский В.Я., Мальченко Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д.** Сигнал глутаминовой кислоты синхронизирует кинетику синтеза белка в гепатоцитах старых крыс в течение нескольких дней. Память в метаболизме клеток//Биохимия. - 2018. - Т. 83. С. 429 - 435.

Отчет о выполнении темы № 4: «Клеточные и молекулярные механизмы дифференцировки, регенерации и морфогенеза, трансдифференцировка» Государственного задания на 2018 год был рассмотрен и утвержден на Ученом совете ИБР РАН (Протокол №12 от 27.12. 2018 г.)