

На правах рукописи

УДК 612.036:576.314.547.915.5

**Муркин Евгений Васильевич**

**Влияние трансгенного фактора роста нервов млекопитающих на  
рост и морфологию клеточных систем**

Специальность 03.00.26 – молекулярная генетика

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Москва**

**2007**

Работа выполнена в лаборатории нейрогенетики и генетики развития

Института биологии гена РАН

Научные руководители: чл.- корр. РАН, доктор медицинских наук,  
профессор Л.И.Корочкин  
кандидат биологических наук Г.В.Павлова

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор Л.П.Сащенко  
доктор биологических наук,  
профессор Ю.К.Доронин

Ведущая организация: Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

Защита диссертации состоится «12» апреля 2007 года., в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, г.Москва, ул.Вавилова д.34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г.Москва, ул.Вавилова д.32

Автореферат разослан «\_\_» марта 2007 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Кандидат фармацевтических наук

Грабовская Л.С.

## Общая характеристика работы

### *Актуальность проблемы*

Трансплантация эмбриональной нервной ткани или клеток является одним из способов улучшения функционального дефицита, возникающего в результате гибели нейронов в центральной нервной системе (ЦНС).

Существенное значение при этом имеет жизнеспособность трансплантированных нейронов – часть пересаженных клеток отмирает в течение раннего посттрансплантационного периода. На этот процесс влияют многие факторы: неполный обмен кислорода и углекислого газа, питательных веществ и метаболитов вследствие отека, отсутствия васкуляризации и последующего дефицита трофической поддержки и ростовых факторов, а так же влияния клеточного стресса и воздействия свободных радикалов и иммунных медиаторов.

Один из возможных путей усилить жизнеспособность и дифференцировку пересаженных клеток состоит в воздействии на ткани нейротрофическими факторами, такими, например, как NGF (фактор роста нервов). Одна из возможностей экспериментального исследования этого пути состоит в использовании модельной системы – кокультивации клеток плодовой мушки *D.melanogaster*, трансфицированной геном *ngf*, со срезом мозга. Более предпочтителен метод, заключающийся в использовании для ксенотрансплантации клеток *D.melanogaster*, несущих в своем геноме гены нейротрофических факторов, находящихся под контролем регуляторных элементов генома *D.melanogaster*. Наиболее подходящим из них является промотор белка теплового шока HSP70, который позволяет влиять на экспрессию гена, стоящего под контролем этого промотора, повышением температуры до 37° С.

В этом случае нейротрофические факторы должны будут автоматически экспрессироваться в трансплантате, т.к. температура тела млекопитающих (около 37° С)

будет являться активатором регуляторных элементов *D.melanogaster* и контролируемых ими генов.

### ***Цель работы и задачи исследования***

Целью данной работы было изучение возможности применения генов нейротрофических факторов под контролем регуляторных элементов генома *D.melanogaster* для улучшения приживаемости ксенотрансплантата. При этом, прежде всего, необходимо было установить, будут ли жизнеспособны клетки *D.melanogaster*, пересаживаемые млекопитающим и как долго они смогут экспрессировать чужеродные для них белки в нетипичных для них условиях. В связи с этим, в этом исследовании, были поставлены следующие задачи: получить линию мух *D.melanogaster*, содержащую в геноме ген флуоресцентного белка DsRed под контролем промотора белка теплового шока HSP70 и проверить выживание её клеток при кокультивации со срезом мозга млекопитающих. После чего вывести линию мух *D.melanogaster*, содержащую в геноме ген фактора роста нервов (*ngf*) под тем же промотором, и проверить воздействие экспрессирующегося гена *ngf* на ксенотрансплантат при кокультивации их со срезом мозга крыс.

### ***Научная новизна и практическая ценность работы***

В данной работе были получены линии мух *D.melanogaster*, содержащих ген красного флуоресцентного белка (*DsRed*) и ген фактора роста нервов (*ngf*) под контролем промотора белка теплового шока HSP70 *D.melanogaster*. Было показано, что при кокультивации со срезом мозга крыс клетки этих линий выживают и продуцируют трансгенный белок как минимум два дня. NGF, экспрессируемый клетками трансгенной линии *D.melanogaster*, кокультивированными со срезом мозга крыс усиливает рост и изменяет морфологию нейральной ткани (в том числе ускоряет образование связей между нервными клетками хозяина и кокультивированными клетками). Кроме того,

трансгенный NGF изменяет морфологию самих клеток *D.melanogaster*, в которых он экспрессируется.

Работа предлагает новый метод для улучшения выживания ксенотрансплантата и образования связей между клетками донора и реципиента.

### ***Апробация работы***

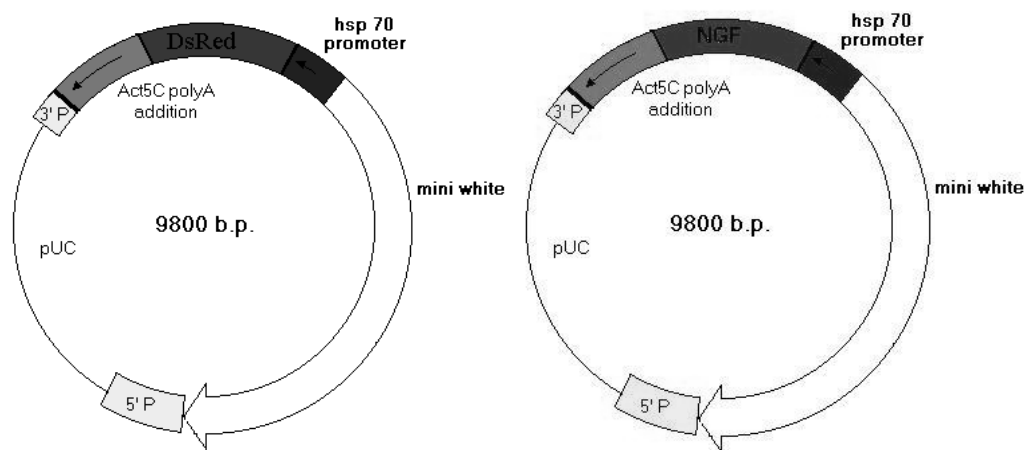
Материалы работы были представлены на международных конференциях «*Genes, Genes Families and Isozymes*» (Берлин, Германия, 2003г); «*Прогресс научной технологии для здоровья человека*» (Кара-Даг, Украина, 2003г); «*Progress in biotechnology and neurobiology – Integrative medicine*» (Хургада, Египет, 2004г); «*Прогресс в биотехнологии и нейробиологии – интегративная медицина*» (Судак, Украина, 2004г.); «*Биотехнология: состояние и перспективы развития*» (Москва, Россия, 2005г) и на международной школе-конференции молодых ученых «*Системная биология и биоинженерия*» (Звенигород, Россия, 2005г). **Публикации:** на тему диссертации опубликованы две статьи в научных журналах и глава в книге.

### ***Структура и объем диссертации***

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение результатов, выводы, список литературы. Работа изложена на 103 страницах машинописного текста и содержит 27 рисунков. Библиография включает 170 источников.

### ***Материалы и методы, используемые в работе***

В данной работе были использованы полученные нами генно-инженерные конструкции на основе вектора *pCaSper-hs /act/*, содержащие ген флуоресцентного белка (*DsRed*) и ген фактора роста нервов (*ngf*) под контролем промотора белка теплового шока *D.melanogaster* (**Рис. 1**).



**Рис. 1** Схема полученных конструкций на базе вектора *pCaSper*, содержащих гены *DsRed* и *ngf* под промотором белка теплового шока *hsp70*. *DsRed* – ген красного флуоресцентного белка; *ngf* – ген фактора роста нервов; *hsp70 promoter* – промотор белка теплового шока HSP70; *mini white* – ген, ответственный за красную окраску глаз трансгенных мух; *pUC* – последовательность вектора *pUC-19*, содержащая ген устойчивости к ампициллину; *5'P*, *3'P* – последовательности *P*-элемента, ответственные за встраивание последовательностей, расположенных между ними, в геном мух; *Act5C polyA* – сайт полиаденилирования гена актина.

Линии мух выводились по стандартным генетическим схемам (**Рис. 2, Рис. 3**). Для этого использовали линию *Df(1) w<sup>67c23(2)</sup>* (содержащая делецию гена *white* в X-хромосоме) и линию, несущую доминантные летали *Curly* (Cu-загнутые вверх крылья), *Dichaete* (D-Расставленные крылья), *Lobe* (L-Маленькие глаза), *Stubble* (Sb-Короткие щетинки).

Контроль наличия вставки осуществлялся методом Саузерн-блот гибридизации, контроль экспрессии осуществлялся методом Нозерн-блот гибридизации, Whole-mount – гибридизацией и Вестерн-блот гибридизацией. Флуоресценция белков *DsRed* и *GFP* наблюдалась с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CX 41 при длине волны возбуждения 485 нм.

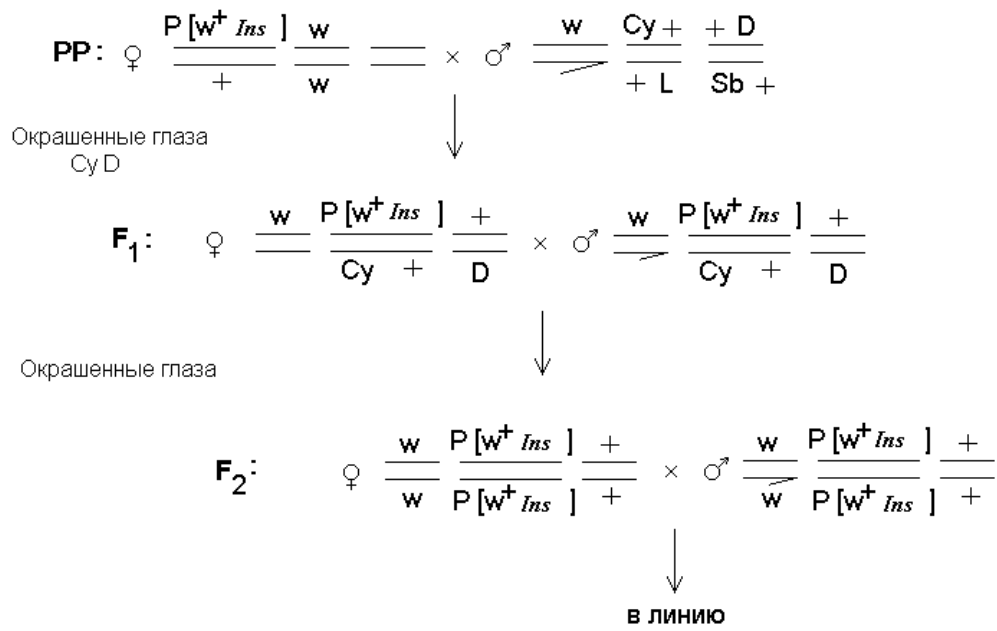


Рис. 2 Схема выведения линий, несущих гены *DsRed* и *ngf* под контролем промотора белка теплового шока HSP70. *Ins* – вставка (*DsRed* или *ngf*).

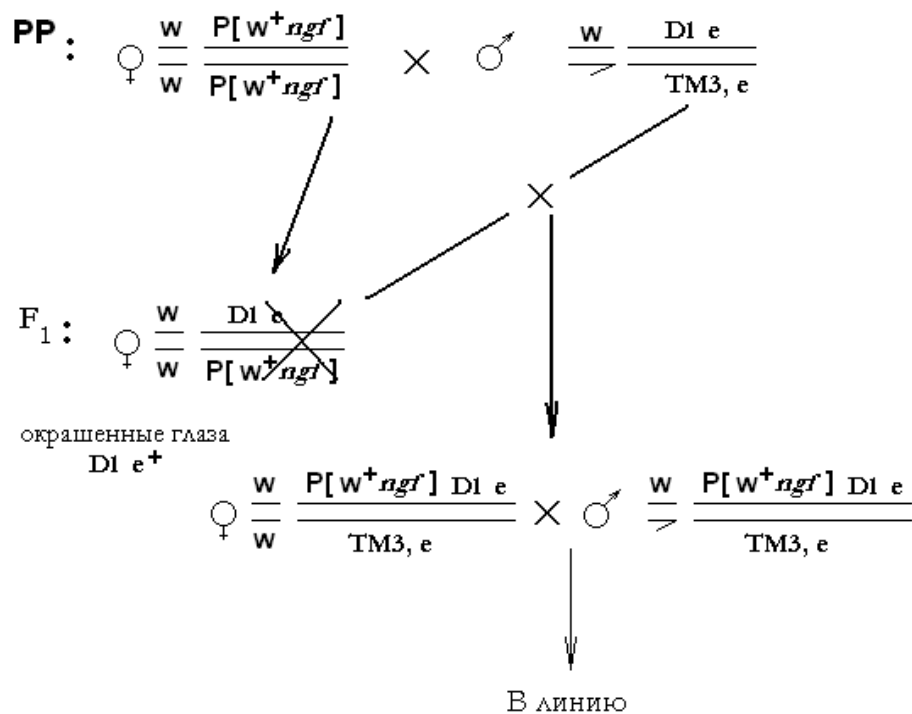


Рис. 3 Схема выведения линии, несущей гены *ngf* и *lac Z*, а также мутацию *Delta*, которая вызывает трансформацию вентральной нейроэктодермы в нейральном направлении.

## Результаты исследований

### *Исследование выживания клеток мух *D.melanogaster*, кокультивированных со срезом мозга млекопитающих с помощью флуоресцентного белка DsRed.*

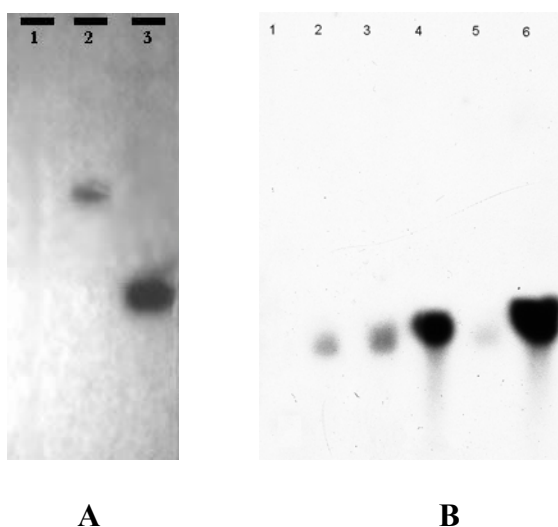
Для изучения возможности использования человеческих нейротрофических факторов при ксенотрансплантации, прежде всего, необходимо, установить, будут ли жизнеспособны клетки *D.melanogaster*, пересаживаемые млекопитающим и как долго они смогут экспрессировать чужеродные для них белки в нетипичных для них условиях. Для этого была создана конструкция на основе вектора *pCaSper-hs /act/*, несущая ген красного флуоресцентного белка *DsRed* под контролем промотора белка теплового шока. Промотор *hsp70* активирует экспрессию сцепленного с ним гена при 37° С, являющейся нормальной температурой тела млекопитающих, тем самым наработка чужеродного белка должна активироваться в пересаженных клетках трансплантата, тогда как в самих мухах (культивируемых при 25° С) трансгенный белок не должен экспрессироваться. Таким образом, клетки, пересаженные в мозг млекопитающих должны экспрессировать флуоресцентный белок, что позволит их детектировать. Кроме того, наличие экспрессии флуоресцентного трансгенного белка в ксенотрансплантате, будет свидетельствовать о жизнеспособности пересаженных клеток.

Полученная конструкция методом микроинъекции была введена в эмбрионы мух линии Df (1) w<sup>67c23(2)</sup> и были выведены гомозиготная линия мух *D.melanogaster*, трансгенная по гену красного флуоресцентного белка *DsRed* под контролем промотора белка теплового шока HSP70.

С помощью Саузерн-блот и Нозерн-блот гибридизаций (**Рис. 4**) было показано, что в эмбрионах трансфицированных мух содержится конструкция с геном флуоресцентного белка и с этого гена при температуре 37° С идёт транскрипция мРНК.



Из пяти выведенных трансгенных линий, была взята для дальнейшей работы линия 5 (дорожка 6).

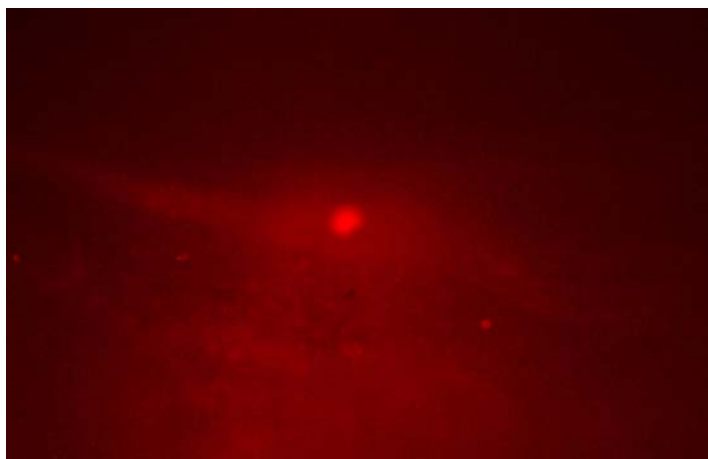


**Рис. 4 Молекулярный анализ трансгенных линий мух, содержащих в геноме ген *DsRed* под контролем промотора белка теплового шока *hsp70*. (А). Саузерн-блот гибридизация с ДНК-зондом к гену *DsRed*. (1) хромосомная ДНК из мух исходной линии Df (1)  $w^{67c23(2)}$ ; (2) хромосомная ДНК из мух линии, трансгенной по гену *DsRed*; (3) положительный контроль – плаزمида *pDsRed1-N1*, несущая ген *DsRed*. (В). Нозерн-блот гибридизация с ДНК-зондом к гену *DsRed*. тотальная РНК из инкубированных 1 час при 37° С мух исходной линии Df (1)  $w^{67c23(2)}$  (1) и мух линий, трансгенных по гену *DsRed*(2)-(6).**

При температуре 37° С (которая является для мух *D.melanogaster* тепловым шоком), в эмбрионах трансгенной линии, происходит экспрессия белка DsRed, флуоресценцию которого детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CX 41 при длине волны возбуждения 485 нм. (Рис. 5).

В эмбрионе трансгенной линии видна четко выраженная флуоресценция красного белка, локализованная преимущественно в мидгуге. Возможно, это связано с тем, что клетки этого отдела обладают повышенной чувствительностью к тепловому воздействию, и в этих клетках идёт интенсивная наработка белка HSP70. В эмбрионах





**Рис. 6** Флуоресценция эмбриональной нейроэктодермы мух *D.melanogaster*, трансгенной по гену *Ds Red*. кокультивируемой со срезом головного мозга крысы. Второй день кокультивации.

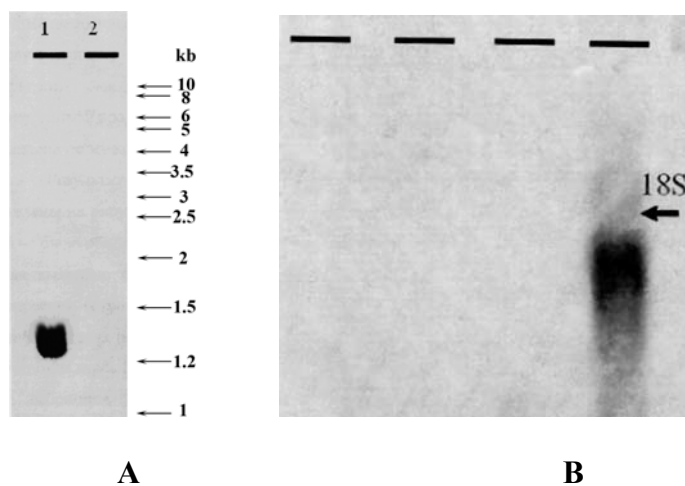
Таким образом, была получена линия, трансгенная по гену *DsRed* под контролем промотора белка теплового шока. Показано, что клетки этой линии, кокультивированные со срезом мозга млекопитающих выживают и продуцируют чужеродный белок DsRed как минимум два дня. Этот результат позволяет создать систему доставки нужного белка (в нашем случае нейротрофического фактора) в определённое место при ксенотрансплантации.

***Исследование возможности применения фактора роста нервов, экспрессирующегося в клетках D.melanogaster, для улучшения выживания ксенотрансплантата.***

По методике, аналогичной получению *DsRed*-трансгенной линии, была выведена линия *D.melanogaster*, содержащая ген *ngf* человека под промотором белка теплового шока HSP70. Для того чтобы получить большое количество нервных клеток, продуцирующих белок NGF человека, полученная линия мух была скрещена с линией,

содержащей мутацию по гену *Delta*, у гомозиготных эмбрионов которой эктодерма трансформируется в нейральном направлении.

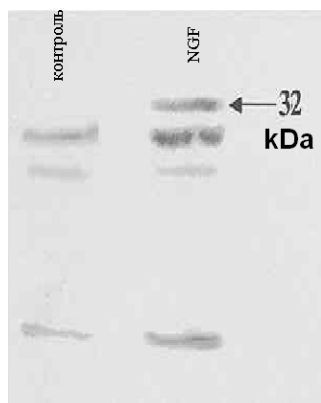
С помощью Саузерн-блот и Нозерн-блот гибридизаций (**Рис. 7**) было показано, что в эмбрионах трансфицированных мух содержится конструкция с геном нейротрофического фактора и с этого гена при температуре 37° С идёт транскрипция мРНК.



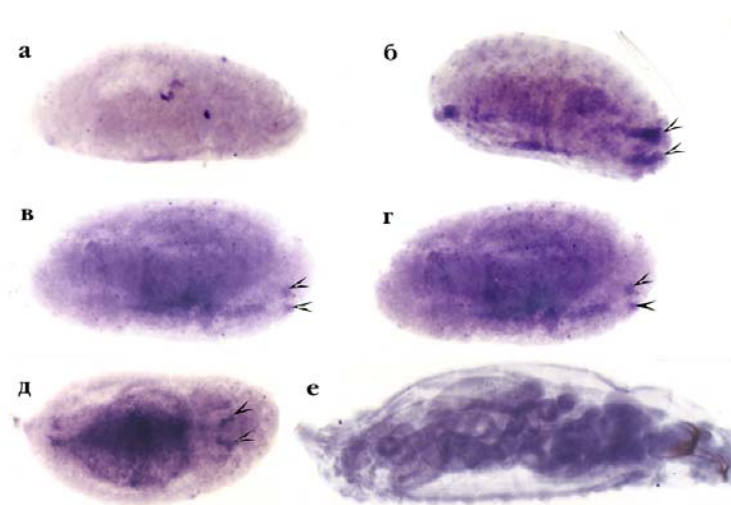
**Рис. 7 Молекулярный анализ трансгенных линий мух, содержащих в геноме ген *ngf* под контролем промотора белка теплового шока HSP70. (А) Саузерн-блот гибридизация с ДНК-зондом к гену *ngf*. (1) totalная ДНК из мух трансгенной линии; (2) totalная ДНК из мух линии Df (1)  $w^{67c23(2)}$ . (В) Нозерн-блот гибридизация с ДНК-зондом к гену *ngf*. Totalная РНК, выделенная из эмбрионов мух исходной линии Df (1)  $w^{67c23(2)}$  (1) без теплового шока, (2) после теплового шока. Totalная РНК, выделенная из эмбрионов мух трансгенной линии (3) без теплового шока, (4) после теплового шока.**

С помощью Вестерн-блота была показана экспрессия человеческого NGF при тепловом шоке клетками мух трансгенной линии (**Рис. 8**). Кроме трёх линий, соответствующих собственному NGF *D.melanogaster*, появилась полоса, отсутствующая

в контроле и соответствующая массе 32 кDa. Данная полоса соответствует NGF человека, индуцированному тепловым шоком.



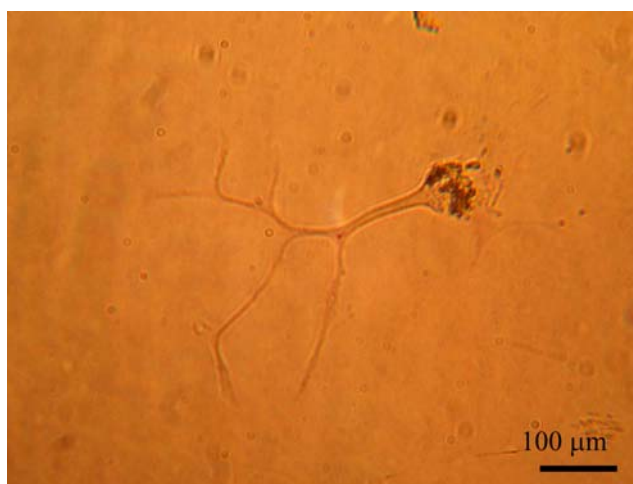
**Рис. 8** Результаты Вестерн-блот анализа трансгенной линии с антителами к белку NGF человека. Контроль – клеточный лизат, полученный из исходной линии, подвергнутой тепловому шоку; NGF – клеточный лизат, полученный из линии, трансгенной по гену *ngf* человека.



**Рис 9.** Экспрессия гена *ngf* в эмбрионах трансгенных мух *D.melanogaster* при тепловом шоке. Whole-mount – гибридизация с использованием в качестве зонда ДНК гена *ngf* человека. (а) эмбрион исходной линии Df (1) w<sup>67c23(2)</sup> на 10-й стадии эмбриогенеза; (б)-(д) эмбрион линии трансгенных мух на 10-й (б), 7-й (в), 8-й (г), 12-й (д) стадиях эмбриогенеза; (е) личинка мух трансгенной линии.

С помощью Whole-mount гибридизации была определена локализация мРНК гена *ngf* в эмбрионах мух трансгенной линии на разной стадии развития при температуре 37° С (Рис. 9). На стадии синцитиальной и клеточной бластодермы окраска была умеренно положительной, равномерно распределённой по поверхности эмбриона. По ходу сегментации повышенная транскрипция генов была отмечена по парасегментам с формированием «тигрового» рисунка окраски. С развитием нейральных элементов у эмбрионов была обнаружена интенсивная окраска в области головного ганглия. В контрольной линии Df(1)w<sup>67c23(2)</sup> не была обнаружена гибридизация с мРНК гена *ngf*.

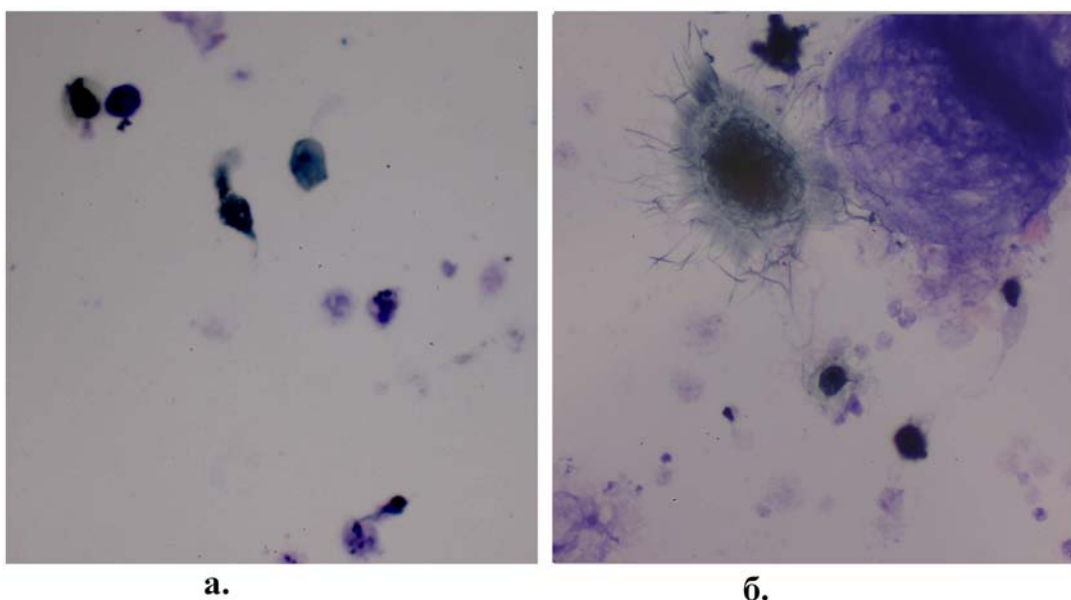
В культуре эмбриональных нервных клеток полученной линии *D.melanogaster*, трансгенной по гену *ngf* человека, обнаружена аномально большая нервная клетка с активно ветвящимся аксоном (Рис. 10).



**Рис. 10** Нервная клетка трансгенной по *ngf* линии *D.melanogaster* под световым микроскопом. Культура эмбриональных нервных клеток *D.melanogaster*, содержащих мутацию гена *Delta* и ген *ngf* человека под промотором *hsp70*. Инкубация при 37° С.

По-видимому, это связано с влиянием гиперэкспрессии человеческого фактора роста нервов, экспрессирующегося в клетке трансгенной линии при тепловом шоке, на саму хозяйскую клетку.

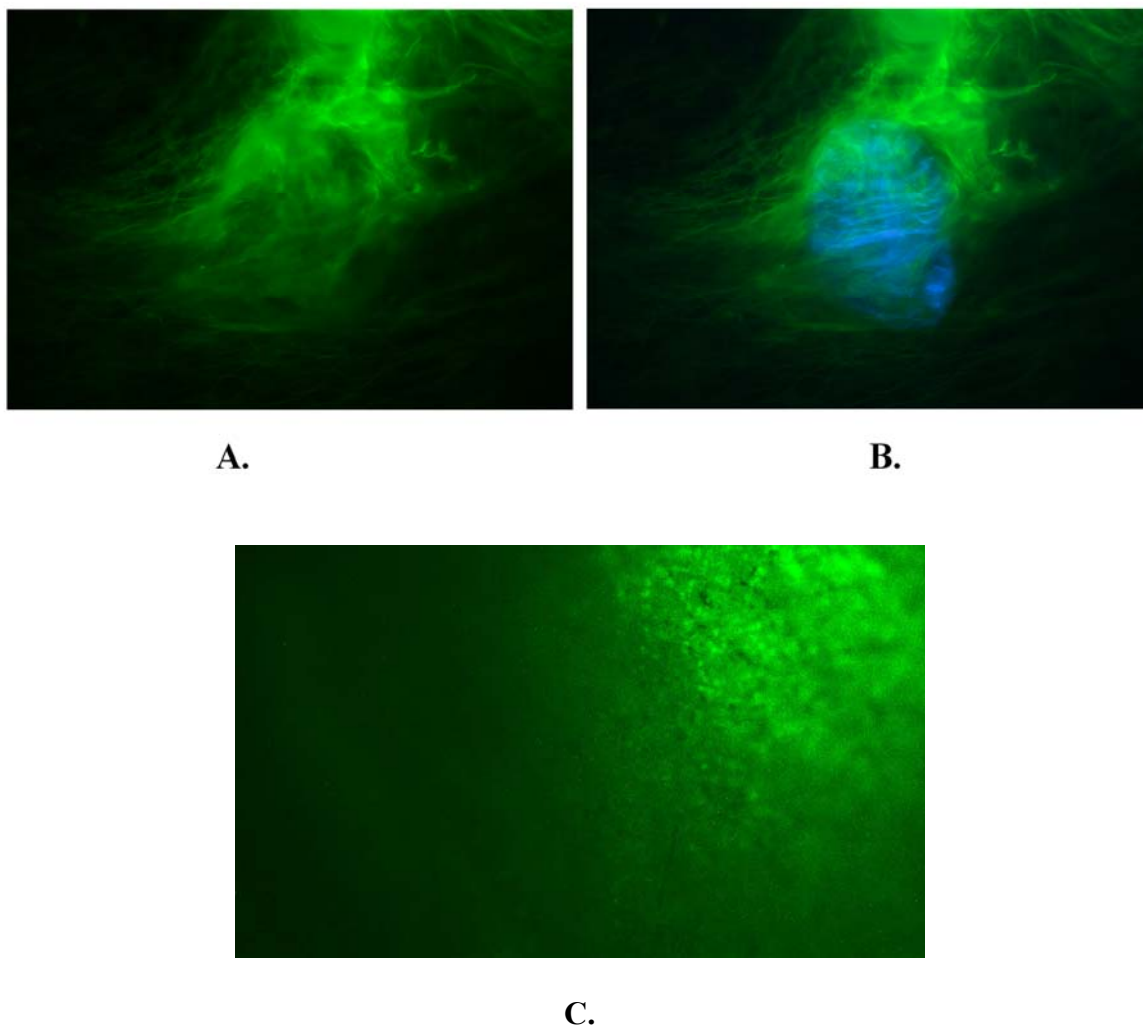
Культура трансгенных по гену *ngf* клеток *D.melanogaster*, инкубированная при 37° С, проявляла характерные для нервных клеток свойства (**Рис. 11**). Было видно явное образование отростков и связей между клетками. Клетки трансгенной линии имеют четко выраженную нейральную морфологию и активно образуют связи своими отростками с соседними клетками, тогда как в контроле (исходная линия  $Df(1)w^{67c23(2)}$ , **Рис. 11а**) клетки остаются недифференцированными и связи друг с другом не образуют. Вместе с предыдущим фактом (появление аномально большой нервной клетки с активно ветвящимся аксоном **Рис. 10**) это показывает, что чужеродный ген *ngf*, экспрессирующийся в клетках трансгенной линии, оказывает нейротрофический эффект на хозяйские клетки.



**Рис. 11** Культура клеток линии *D.melanogaster*, трансгенных по гену *ngf* при 37° С. (а) контроль – исходная линия  $Df(1)w^{67c23(2)}$ ; (б) линия *D.melanogaster* трансгенная по гену *ngf* человека.

В результате кокультивации эмбриона мух *D.melanogaster*, трансгенных по гену *ngf* человека, со срезом мозга эмбрионов крыс было обнаружено быстрое (через 1 час) вращание отростков нервных клеток мыши в нейроэктодерму *D.melanogaster*,

продуцирующую белок NGF. В контроле (с добавлением эмбриона  $Df(1)w^{67c23(2)}$ ) проращение отростков нервных клеток обнаруживается на 6-7-й день культивирования (Рис 12).



**Рис. 12** Проращение сенсорных волокон клеток крысы в эмбриональную нейроэктодерму эмбриона линии мух *D.melanogaster*, трансгенной по гену *ngf*. (A), (B) Кокультивация эмбриона *D.melanogaster*, трансгенного по гену *ngf*, со срезом мозга крысы, клетки которого экспрессируют GFP, 1 час культивирования; (A) при длине волны возбуждения 396 нм; (B) при длине волны возбуждения 476 нм добавляется автофлуоресценция (голубое свечение) клеток эмбриона трансгенной линии *D.melanogaster*; (C) кокультивация с эмбрионом мух исходной линии  $Df(1)w^{67c23(2)}$ . Третий день культивирования.



На основании полученных данных мы можем сказать, что клетки *D.melanogaster*, инкубированные при температуре тела млекопитающих, нормально продуцируют чужеродный белок под контролем промотора белка теплового шока HSP70 *D.melanogaster* как в культуре, так и в ксенотрансплантате.

Таким образом, было показано, белок NGF человека, экспрессирующийся в клетками *D.melanogaster*, оказывает активное нейротрофическое влияние на собственные клетки и на клетки окружения, усиливая рост и изменяя морфологию нейральной ткани.

Полученная линия *D.melanogaster*, трансгенная по гену *ngf*, может использоваться при ксенотрансплантации для улучшения приживаемости трансплантата.

## Выводы

1. Показано, что клетки *D.melanogaster*, инкубированные в стрессовых для них условиях, выживают как минимум два дня, при этом, чужеродный ген, находящийся под контролем промотора белка теплового шока *D.melanogaster*, может активироваться при температуре тела млекопитающих (37° С).

2. Показано, что в культуре эмбриональных клеток *D.melanogaster*, трансгенных по гену фактора роста нервов млекопитающих (NGF) под контролем промотора белка теплового шока HSP70 дрозофиллы, при температуре 37° С экспрессируется трансгенный белок, оказывающий влияние на рост и морфологию клеток, в которых он экспрессируется.

3. Показано, что NGF млекопитающих, экспрессирующийся в клетках эмбриональной нервной ткани трансгенной линии *D.melanogaster* при инкубировании в условиях для культивации клеток млекопитающих, оказывает влияние на окружающие нервные клетки млекопитающих, инкубированные вместе с эмбрионом трансгенной линии. При этом оказываемый эффект заключается в направленном росте отростков нейронов млекопитающих в сторону эмбриональной нервной ткани *D.melanogaster* с образованием контактов между отростками и клетками эмбриональной нервной ткани трансгенной линии.

4. Клетки полученной линии *D.melanogaster*, трансгенной по гену *ngf*, могут быть использованы при ксенотрансплантации для улучшения приживаемости трансплантата.

## Список статей, опубликованных по теме диссертации

1. Г.В. Павлова, **Е.В. Муркин**, А.В. Ревещин, М.А. Александрова, Е.А. Модестова, Л.И. Корочкин (2003). Активность нейрогенов человека в стволовых клетках трансгенных линий дрозофилы. *Цитология*, т. 45, № 9, с. 909.
2. Pavlova G.V., Manuilova E.S., Arsen'eva E.L., Grivennikov I.A., **Murkin E.V.**, Kanaikina N.N., Revischin A.V., Tarantul V.N., Korochkin L.I. (2005) BFP protein expression in transfected embryonic stem cells Bull. Exp. Med., Apr., 139 (4) 514-516

### Глава в книге:

3. L.I. Korochkin, M.A. Alexandrova, G.V. Pavlova, A.V. Revischin, E.A. Modestova, O.P. Mirochnikova, T.V. Bragina, **E.V. Murkin**, M.B. Evgeniev, E.A. Zelentzova, E.A. Nikitina, E.V. Tokmacheva, A.V. Medvedeva, A.V. Popov, E.V. Savvateeva-Popova (2004). Genetic engineering methods of the regulation of stem cells differentiation. *Biotechnology and Medicine*, Nova Science Publishers, ch.17, p. 119–134.

### Тезисы в конференциях по теме диссертации:

4. G. Pavlova, L. Korochkin, M. Aleksandrova, V. Bashkirov, A. Revischin, O. Alexenko, **E. Murkin**, M. Evgeniev (2003). Hsp70 family proteins seem to facilitate allo- and xenotransplantation in the rat brain. // *Genes, Genes Families and Isozymes*, Berlin, p. 61.
5. Г.В. Павлова, **Е.В. Муркин**, А.В. Ревещин, М.А. Александрова, Е.А. Модестова, Л.И. Корочкин (2003). Активность генов человека в стволовых клетках трансгенных линий дрозофилы. // *Прогресс научной технологии для здоровья человека*, Феодосия, Украина, с. 113.
6. O. Mirochnikova, G. Pavlova, **E. Murkin**, E. Titova, T. Bragina, L. Korochkin (2004). The synthesis of genetical constructs to transform the human stem cells. // *Progress in biotechnology and neurobiology – Integrative medicine*, Hurtada, Egypt, p. 111.
7. G. Pavlova, Revischin, O. Mirochnikova, E. Titova, **E. Murkin**, A. Enblom, M. Sandelin, E. Kozlova, L. Korochkin (2004). The influence of donor age, nerve growth

factor and cografting with *Drosophila* cells on survival of peripherically grafted embryonic or fetal rat dorsal root ganglia. // *Progress in biotechnology and neurobiology – Integrative medicine*, Hurtada, Egypt, p. 121.

8. Л.И. Корочкин, И.А. Гривенников, Е.С. Мануилова, В.З. Тарантул, А.В. Ревущин, Е.А. Титова, О.А. Мирошникова, Т.В. Брагина, **Е.В. Муркин**, Н.Н. Канайкина, Г.В. Павлова (2005). // Трансформация стволовых клеток генами нейротрофических факторов. *Биотехнология: состояние и перспективы развития*, Москва, Россия, с. 64.