

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

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

УДК 612.017.1

№ НИОКР 01201351268

№ ИС ГЗ 0108-2014-0002



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 2. КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ
В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

(заключительный отчет)

Руководитель темы, д.б.н., зав. лаб.

Н.П. Шарова

подпись, дата

Москва, 2017 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

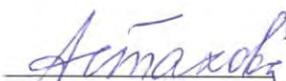
Руководитель темы, д-р
биологических наук



Н.П. Шарова (введение, раздел 1
заключение)

подпись, дата

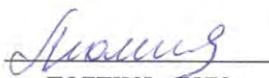
Ведущие исполнители темы:
Кандидат биол. наук



Ю.В. Люпина (раздел 2)

подпись, дата

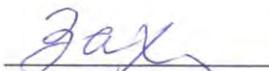
Кандидат биол. наук



Т.М. Астахова (раздел 3)

подпись, дата

Доктор биол. наук, профессор



Л.А. Захарова (раздел 4)

подпись, дата

УДК 612.017.1

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Определения, обозначения и сокращения	4
Введение	5
Раздел 1. Регулируемая деградация белков протеасомами и развитие иммунной и центральной нервной систем в раннем онтогенезе млекопитающих	8
Раздел 2. Функционирование протеасом при злокачественной трансформации клеток и развитии злокачественных опухолей	20
Раздел 3. Протеасомы в развитии донор-специфической иммунологической толерантности у крыс	24
Раздел 4. Взаиморегуляция развития нервной и иммунной систем	28
Заключение	35
Публикации по теме	36

Реферат

Отчет 39 с., 4 раздела, 36 публикаций, 1 табл., 25 рис.

Ключевые слова: онтогенез, молекулярные механизмы развития, иммунная система, центральная нервная система, репродуктивная система, протеасомы, диагностика онкологических заболеваний, онкогенез, стресс, липополисахарид, донор-специфическая толерантность, тимус, селезенка, печень, головной мозг, ГРГ-нейроны, интерлейкины, аргинин-вазопрессин.

Полученные результаты указывают на иммунные протеасомы как на важнейших участников развития не только иммунной системы, но и центральной нервной системы в норме и в стрессовых условиях, вызванных отсутствием молекул ГКГ I. Получены также результаты, полезные для практической медицины. Во-первых, высокое содержание субъединицы LMP2 и сниженное соотношение PA700/PA28 могут быть маркерами приживления трансплантатов. Во-вторых, иммунные субъединицы протеасом и активатор PA700 можно рассматривать как новые потенциальные мишени противоопухолевой терапии для пациенток с опухолями, не содержащими рецепторы эстрогена. В-третьих, разработан новый интраоперационный способ диагностики рака щитовидной железы на основании определения активности протеасом.

Показана значимая морфогенетическая роль моноаминов и ГРГ в формировании тимуса. Иммунная система, в свою очередь, оказывает регуляторное влияние на развитие ГРГ-продуцирующей и репродуктивной систем. Пренатальное воздействие ЛПС нарушает развитие этих систем у плодов и имеет отдаленные неблагоприятные последствия, в т.ч. структурные и морфологические нарушения гонад у самцов. Введение антагониста эстрадиола в этот период полностью восстанавливает вызванные у самцов нарушения. Полученные результаты имеют значение для разработки новых подходов к коррекции мужской фертильности.

Обозначения и сокращения:

АВП – аргинин-вазопрессин

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости

ГРГ – гонадотропин-рилизинг гормон

ДСТ – донор-специфическая толерантность

ИЛ – интерлейкины

ЛПС – липополисахарид

РА – активатор протеасом

ФНО α – фактор некроза опухоли

B2m – бета2-микроглобулин

Введение

Исследование механизмов развития иммунной, нервной и эндокринной систем имеет большое значение не только для фундаментальной науки, но и для понимания причин возникновения различных патологий и, как следствие, для применения полученных знаний в практической медицине. Для разработки данной проблемы актуально изучение функционирования убиквитин-протеасомной системы деградации белков, регулирующей клеточные процессы. Имеющиеся в мировой литературе сведения об особенностях функционирования протеасом в раннем развитии органов иммунной системы млекопитающих являются разработками авторов темы. Кроме того, были обнаружены изменения в функционировании протеасом, связанные со злокачественной трансформацией клеток экспериментальных животных и человека. Дальнейшие исследования в данной области являются крайне важными для создания новых противоопухолевых лекарств и инновационных способов диагностики онкологических заболеваний.

Пристального внимания заслуживает также проблема изучения протеасомных механизмов развития донор-специфической (ДСТ) толерантности. Поиск отдельных форм протеасом, участвующих в развитии ДСТ, а также форм, запускающих иммунный ответ, может быть актуален для выявления новых маркеров приживления трансплантатов и разработки инновационных терапевтических подходов, направленных на улучшение приживаемости трансплантатов.

Еще одним направлением в рамках темы является актуальное в последнее время исследование механизмов взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем в перинатальном онтогенезе. Цитокины, синтезируемые после перинатальной стимуляции иммунной системы бактериальной или вирусной инфекцией, программируют развитие этих систем, что увеличивает риск возникновения неврологических и психических заболеваний у потомков в постнатальный период. Индуцируя иммунный ответ у матери, ЛПС способен изменять уровень цитокинов в различных органах плода. Получены первые данные о морфогенетическом влиянии бактериального токсина липополисахарида (ЛПС) и провоспалительных цитокинов на гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ)-продуцирующую систему новорожденных. Экспериментально впервые проверяется гипотеза о том, что развитие ГРГ-нейронов и всей нейроэндокринной системы может подвергаться драматическим изменениям при активации иммунной системы матери во время беременности и может отразиться на функционировании репродуктивной системы половозрелых особей.

В русле этого направления изучается регуляторное влияние моноаминов на функционирование иммунной системы. Нет данных о наличии рецепторов к серотонину на клетках иммунокомпетентных органов, в частности тимуса плодов. Данные о морфогенетическом эффекте дофамина на иммунную систему также неизвестны. Все это делает данную проблему

актуальной и крайне перспективной. Планируемые исследования позволят расширить наши представления о механизмах регуляции процессов становления и функционирования нейроэндокринной и иммунной систем на протяжении всей жизни, включая пренатальное развитие.

Теоретическая новизна работ очевидна, поскольку исследования убиквитин-протеасомной системы в раннем онтогенезе центральной нервной и иммунной систем млекопитающих, в развитии ДСТ, а также при росте злокачественных новообразований млекопитающих и человека являются приоритетными для Института.

Изменения нормального уровня ГРГ и моноаминов, а также иммунологический стресс, индуцированный бактериальным инфицированием, на развивающийся плод, могут вызвать нарушения программирования регуляторных механизмов как репродуктивной, так и иммунной систем на длительный срок. Планируемые исследования позволят получить принципиально новые данные о механизмах взаимной регуляции процессов становления и функционирования нейроэндокринной и иммунной систем на ранних этапах онтогенеза в норме и при патологии.

Решение выдвинутых задач связано с одновременным исследованием активности протеасом, экспрессии различных субъединиц протеасом, влияющих на эту активность, и формирования структур головного мозга, лимфоидных и эндокринных органов млекопитающих в норме, при патологических состояниях и в развитии ДСТ.

Известно, что стимуляция иммунной системы половозрелых особей бактериальными эндотоксинами, вызывающими воспаление, приводит к подавлению активности ГРГ-системы. Развитие воспалительных реакций сопровождается секрецией клетками иммунной системы различных про- и противовоспалительных цитокинов. Для активации иммунной системы в лабораторных исследованиях часто применяют эндотоксин ЛПС, являющийся основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Эта модель широко используется для изучения механизмов, определяющих влияние бактериальной инфекции на иммунные и нейроэндокринные процессы у млекопитающих. В ответ на бактериальное воспаление увеличивается синтез провоспалительных цитокинов: интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-1 β , ЛИФ, фактор некроза опухоли (ФНО α), МСР-1. Взаимодействия ГРГ- и иммунной систем у половозрелых животных дают основание предположить, что иммунная система может оказывать влияние не только на функционирование, но и на развитие ГРГ-нейронов. В представленной модели будут выявлены конкретные цитокины, а также их рецепторы, влияющие на развитие ГРГ-системы у плодов.

Кроме того, в условиях дефицита моноаминов, вызванного введением ингибиторов их синтеза, и дефицита ГРГ, вызванного введением антагониста его рецепторов плодам крыс, будут исследованы развитие иммунокомпетентных органов тимуса и селезенки, их клеточный состав, а

также функциональная активность иммунной системы у половозрелых потомков. Функциональная активность иммунной системы будет оцениваться по гуморальному и клеточному иммунному ответу. В тимусе нормально развивающихся плодов при помощи ПЦР будет проведена оценка экспрессии рецепторов к моноаминам и ГРГ. Исследования будут проведены в моделях *in vivo* и в культуре клеток с применением современных молекулярно-биологических, иммунологических и цитофизиологических подходов.

Раздел 1. Регулируемая деградация белков протеасомами и развитие иммунной и центральной нервной систем в раннем онтогенезе млекопитающих

Иммунные протеасомы в развитии селезенки и печени. Исследована динамика экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 протеасом в эмбриональном и раннем постнатальном развитии селезенки и печени крысы в сравнении с динамикой химотрипсинподобной и каспазаподобной активностей протеасом и динамикой экспрессии молекул ГКГ (главного комплекса гистосовместимости) класса I. Проанализировано также распределение иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 по клеткам селезенки и печени в процессе развития. Обнаружена общая для обоих органов тенденция к повышению экспрессии как субъединицы LMP7, так и субъединицы LMP2 на 21-й постнатальный день (П21) по сравнению с эмбриональным периодом при постоянном общем уровне протеасом (Рис. 1 и 2).

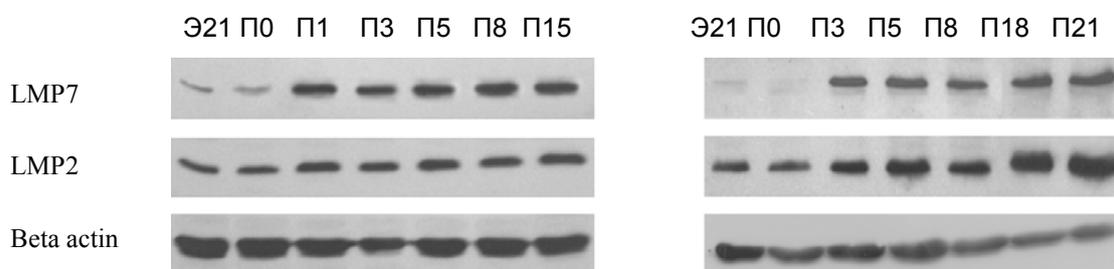


Рис. 1. Экспрессия иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 протеасом в селезенке крысы в разные периоды раннего развития.

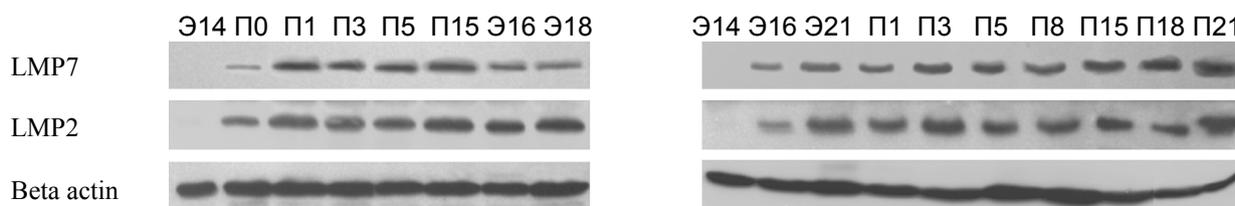
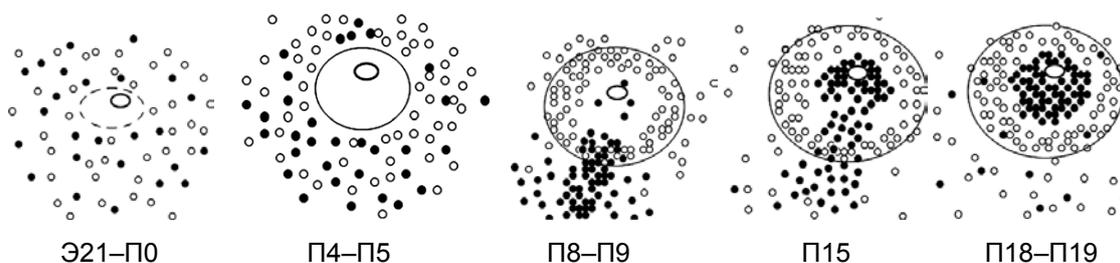


Рис. 2. Экспрессия иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 протеасом в печени крысы в разные периоды раннего развития.

При этом в отдельные периоды развития динамика экспрессии иммунных субъединиц в селезенке и печени отличалась. Если в селезенке наблюдалось постепенное увеличение количества обеих иммунных субъединиц на П1, П18 и П21, то в печени период постепенного повышения на 16-й и 18-й эмбриональный день (Э16 и Э18) сменялся периодом падения уровня иммунных субъединиц на П5. Этот уровень достоверно не изменялся до П18 и повышался на П21. Выявленные изменения сопровождалось увеличением химотрипсинподобной активности и падением каспазаподобной активности протеасом в селезенке к П21 по сравнению с эмбриональным периодом, что свидетельствует о повышении способности протеасом к

образованию антигенных эпитопов для молекул ГКГ класса I. В печени обе активности возрастали к П21 по сравнению с эмбриональным периодом. Подобную динамику каспазаподобной активности можно объяснить не только сменой протеолитически активных конститутивных и иммунных субъединиц, но и дополнительными регуляторными механизмами. Кроме того, обнаружено, что повышение экспрессии иммунных субъединиц протеасом в раннем развитии селезенки связано с процессом последовательного формирования белой пульпы В- и Т-лимфоцитами, обогащенными иммунными субъединицами (Рис. 3).



Т-лимфоциты – заполненные кружки, В-лимфоциты – незаполненные кружки

Рис. 3. Схема миграции Т- и В-лимфоцитов, обогащенных иммунными протеасомами, из красной пульпы в белую пульпу развивающейся селезенки крысы.

В печени же повышение уровня иммунных субъединиц к П21 сопровождалось повышением их экспрессии в гепатоцитах, в то время как падение их уровня к П5 может быть связано с утратой печенью функции первичного лимфоидного органа иммунной системы к этому периоду и исчезновением из нее В-лимфоцитов, обогащенных иммунными протеасомами. В селезенке и печени выявлялись молекулы ГКГ класса I в периоды повышения уровня иммунных субъединиц протеасом (Рис.4).

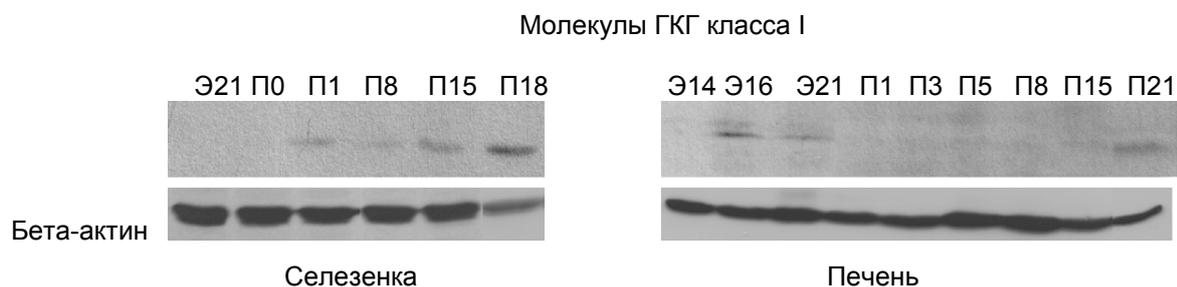


Рис. 4. Экспрессия молекул ГКГ класса I в селезенке и печени крысы в разные периоды раннего развития.

На Э21 печень была обогащена нейрональной NO-синтазой (nNOS), уровень которой падал после рождения и повышался к П18. (Рис. 5). Этот факт указывает на возможность индукции экспрессии иммунных субъединиц LMP7 и LMP2 в гепатоцитах по сигнальному пути с участием nNOS. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что Т-клеточный иммунный ответ,

развивающийся в селезенке по отношению к клеткам печени, у крыс возможен начиная с периода П19–П21. Во-первых, в этот период сформирована Т-зона белой пульпы селезенки. Во-вторых, повышенный уровень иммунных протеасом и молекул ГКГ класса I в гепатоцитах может обеспечить образование антигенных эпитопов из чужеродных белков и доставку их на поверхность клеток для предъявления цитотоксическим Т-лимфоцитам.

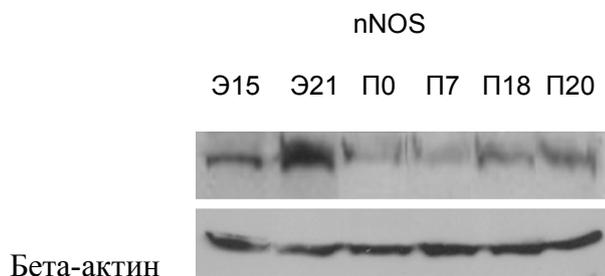


Рис. 5. Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов печени крыс в разные периоды эмбрионального и постнатального развития.

Помимо этого, нас интересовал вопрос о распределении в клетках печени иммунных протеасом, обеспечивающих развитие иммунологической толерантности. К их числу относятся эндотелиальные клетки синусоидов печени, тканевые макрофаги и другие клетки. Они обладают свойствами антигенпредставляющих клеток, но вырабатывают цитокины не провоспалительного, а супрессорного действия. Представление антигена эндотелиальными клетками синусоидов печени наивным CD4⁺-Т-лимфоцитам направляет их дифференцировку не в провоспалительные эффекторные клетки, а в сторону развития Т-лимфоцитов иммуносупрессорного регуляторного фенотипа CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. В случае представления антигена наивным CD8⁺-Т-лимфоцитам происходит ингибирование их развития в эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты, а взаимодействие тканевых макрофагов с активированными Т-лимфоцитами приводит к угнетению пролиферации последних. Мы выявили эндотелиальные клетки синусоидов и тканевые макрофаги в печени как в эмбриональном, так и в постнатальном развитии. На рисунке 6 приведены результаты двойного иммунофлуоресцентного мечения мононуклеарных клеток печени антителами к субъединице LMP7 или LMP2 и антителами к белкам-маркерам эндотелиальных клеток синусоидов печени или тканевых макрофагов на Э21.

Как и следовало ожидать, оба типа антиген-представляющих клеток содержали иммунные субъединицы LMP7 и LMP2. Однако распределение этих субъединиц в макрофагах различалось. Субъединица LMP7 обнаружена во всей толще цитоплазмы, в то время как субъединица LMP2 выявлена в околочембранной цитоплазме, в выростах и псевдоподиях макрофага. Разная внутриклеточная локализация иммунных субъединиц указывает на различие функций, выполняемых в макрофагах печени протеасомами, содержащими эти субъединицы. Протеасомы с субъединицей LMP7, по-видимому, продуцируют антигенные эпитопы, в то время как протеасомы

с субъединицей LMP2, возможно, участвуют в формировании межклеточных взаимодействий в результате образования ими пептидов, обладающих адгезионными свойствами.

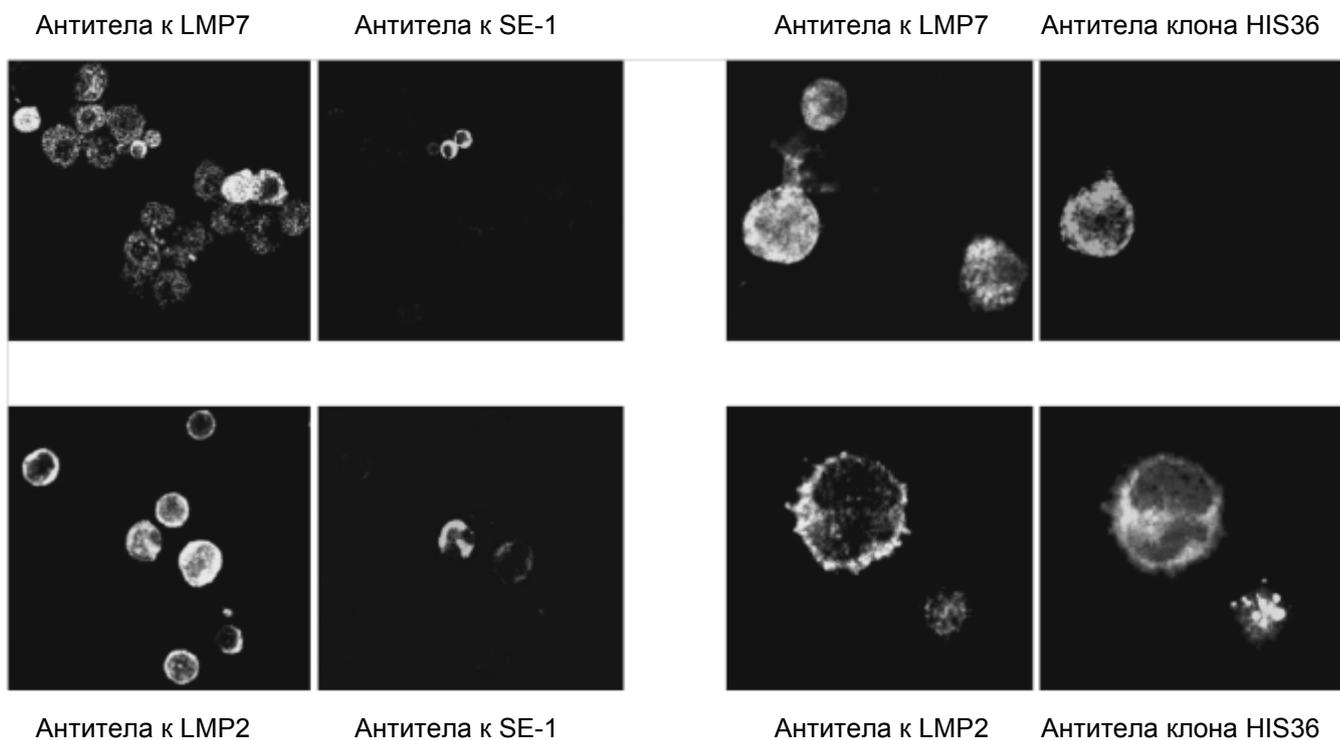


Рис. 6. Двойное иммунофлуоресцентное мечение мононуклеарных клеток печени крысы на Э21.

Обнаруженный нами факт разной локализации иммунных субъединиц протеасом в цитоплазме макрофагов печени важен для дальнейшего исследования молекулярных механизмов, обеспечивающих тонкую регуляцию развития иммунных реакций или иммунологической толерантности в печени крыс.

Пул протеасом в головном мозге мышей, нокаутных по бета2-микроглобулину. Молекулы ГКГ I играют важную роль в синаптической пластичности нервной системы млекопитающих. Протеолитические комплексы, протеасомы, образуют олигопептиды, презентруемые на поверхности клеток в составе молекул ГКГ I, и, помимо этого, регулируют многочисленные клеточные процессы. Целью настоящей работы были исследование особенностей функционирования протеасом и связанных с ними сигнальных путей и оценка экспрессии NeuN и gFAP в различных отделах головного мозга у мышей, нокаутных по β 2-микроглобулину, составной части молекул ГКГ I. Обнаружено, что фронтальная кора и ствол, структуры с разным соотношением экспрессии NeuN и gFAP, характеризуются противоположными изменениями в пулах протеасом при постоянном общем уровне протеасом у B2m (бета2-микроглобулин)-нокаутных мышей по сравнению с контрольными животными. В коре B2m-нокаутных мышей

повышены химотрипсин-подобная активность, экспрессия иммунной субъединицы LMP7 и регулятора PA28 протеасом, в то время как в стволе эти показатели снижены (Рис. 7 и 8).

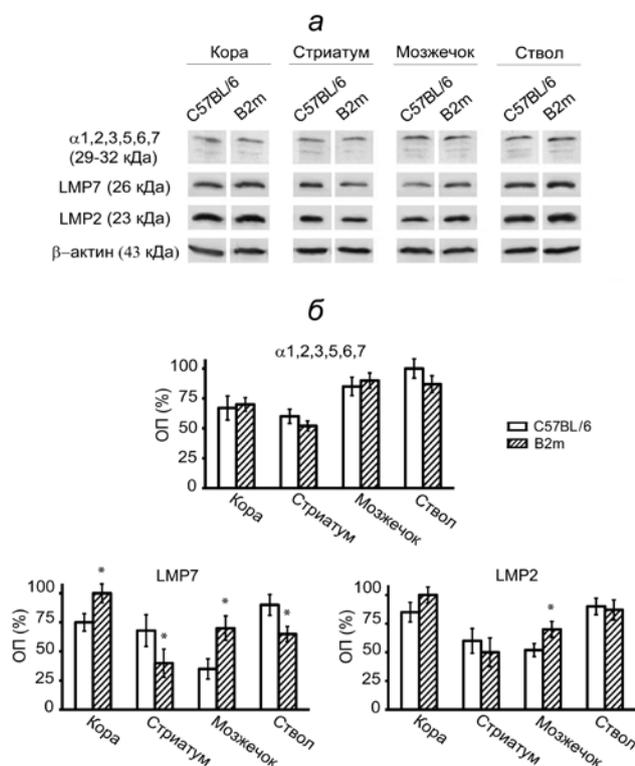


Рис. 7 Экспрессия субъединиц $\alpha 1,2,3,5,6,7$, LMP7 и LMP2 в различных отделах головного мозга мышей C57BL/6 и B2m-нокаутных мышей. *а* – Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов с использованием антител к субъединицам $\alpha 1,2,3,5,6,7$, LMP7 и LMP2. *б* – Относительное количество (оптическая плотность блотов) субъединиц $\alpha 1,2,3,5,6,7$, LMP7 и LMP2, нормализованное на содержание β -актина. За 100% принято содержание $\alpha 1,2,3,5,6,7$ в стволе мозга мышей C57BL/6 и содержание LMP7 и LMP2 в коре мозга B2m-нокаутных мышей. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего, *достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$, $n \geq 4$.

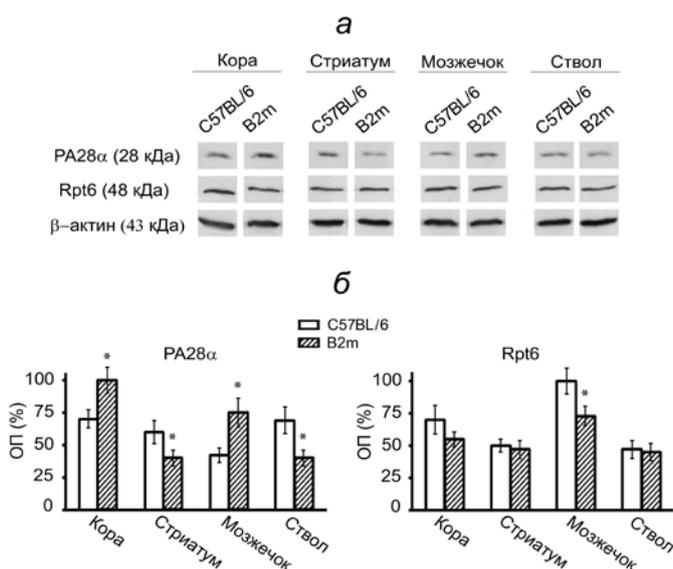


Рис. 8. Экспрессия субъединиц PA28 α и Rpt6 в различных отделах головного мозга мышей C57BL/6 и B2m-нокаутных мышей. *а* – Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов с использованием антител к PA28 α и Rpt6. *б* – Относительное количество (оптическая плотность блотов) субъединиц PA28 α и Rpt6, нормализованное на содержание β -актина. За 100% принято содержание PA28 α в коре мозга B2m-нокаутных мышей и содержание Rpt6 в мозжечке мозга мышей C57BL/6. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего, *достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$, $n \geq 4$.

Содержание сигнальных молекул pNOS и HSP70 в коре B2m-нокаутных мышей также повышено, а в стволе – снижено, что указывает на возможное контролирование ими экспрессии субъединицы LMP7 и регулятора PA28. Изменения в пуле протеасом стриатума B2m-нокаутных мышей сходны с таковыми в стволе. Вместе с тем, мозжечок характеризуется отличной от всех

структур картиной функционирования протеасом. В нем повышена экспрессия иммунных субъединиц LMP7, LMP2 и регулятора PA28, но понижена экспрессия регулятора PA700. В большинстве отделов головного мозга B2m-нокаутных мышей обнаружен дефицит NeuN и gFAP (рис. 9).

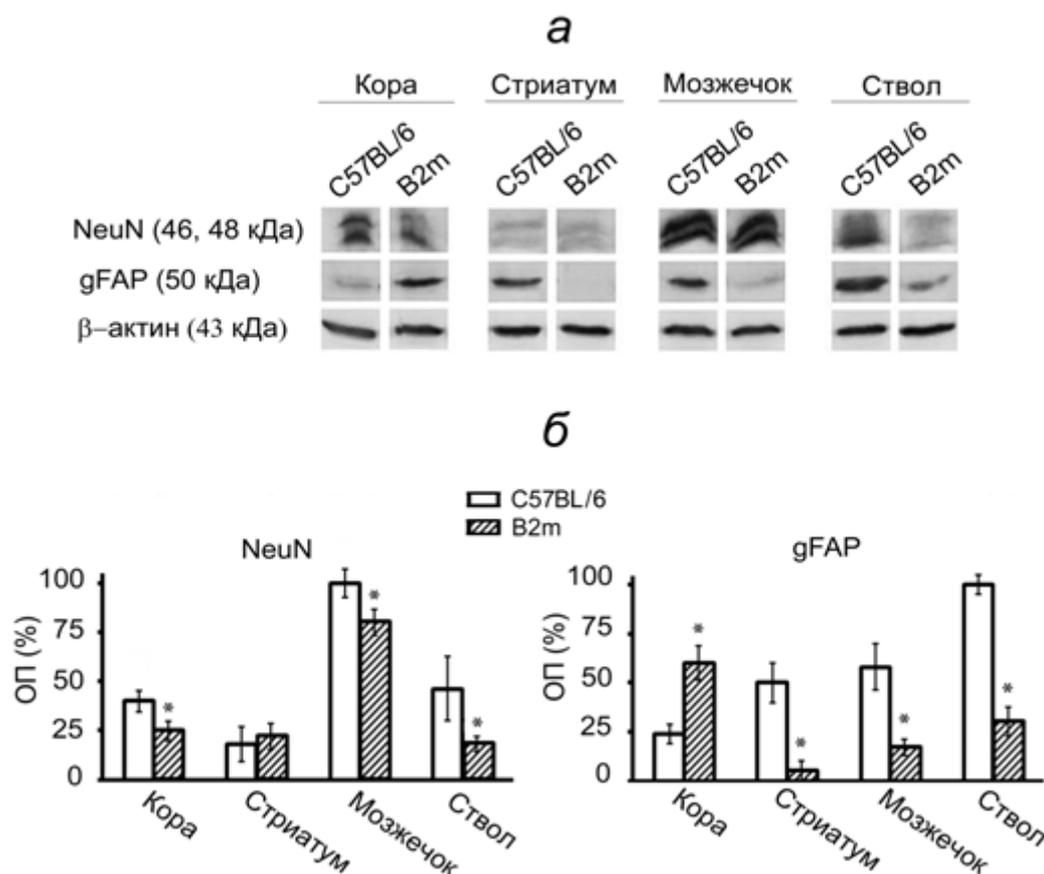


Рис. 9. Экспрессия белков NeuN и gFAP в различных отделах головного мозга мышей C57BL/6 и B2m-нокаутных мышей. *а* – Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов с использованием антител к NeuN и gFAP. *б* – Относительное количество (оптическая плотность блотов) белков NeuN и gFAP, нормализованное на содержание β-актина. За 100% принято содержание NeuN в мозжечке и содержание gFAP в стволе мозга мышей C57BL/6. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего, *достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$, $n \geq 4$.

Таким образом, выявленные нарушения в структурах головного мозга, а также отсутствие в нем молекул ГКГ I компенсируются повышенной экспрессией иммунных субъединиц и регулятора PA28 протеасом в коре и мозжечке. По-видимому, это способствует образованию пептидов, важных для межклеточных взаимодействий, и поддержанию пластичности нервной системы у B2m-нокаутных мышей.

Полученные в данной работе результаты позволили предложить схему компенсаторных механизмов, развивающихся в коре головного мозга и обеспечивающих поддержание

синаптической пластичности у мышей в отсутствие молекул ГКГ I (Рис. 10). Отсутствие молекул ГКГ I приводит к нарушениям межнейронных взаимодействий, что, в свою очередь, вызывает стрессовое состояние нейронов, которое подтверждается повышенным содержанием pNOS и HSP70. Эти молекулы участвуют в сигнальных путях, приводящих к увеличению экспрессии иммунных протеасом и регулятора PA28. Вероятно, иммунные протеасомы в совокупности с регулятором PA28 в нейронах коры головного мозга B2m-нокаутных мышей создают определенный «молекулярный паспорт», свой для каждого нейрона, путем образования специфического набора олигопептидов. Последние, попадая на клеточную поверхность тем или иным способом, обеспечивают адгезивные взаимодействия с другими нейронами и компенсируют нарушения во взаимодействиях, создаваемых молекулами ГКГ I у контрольных животных.

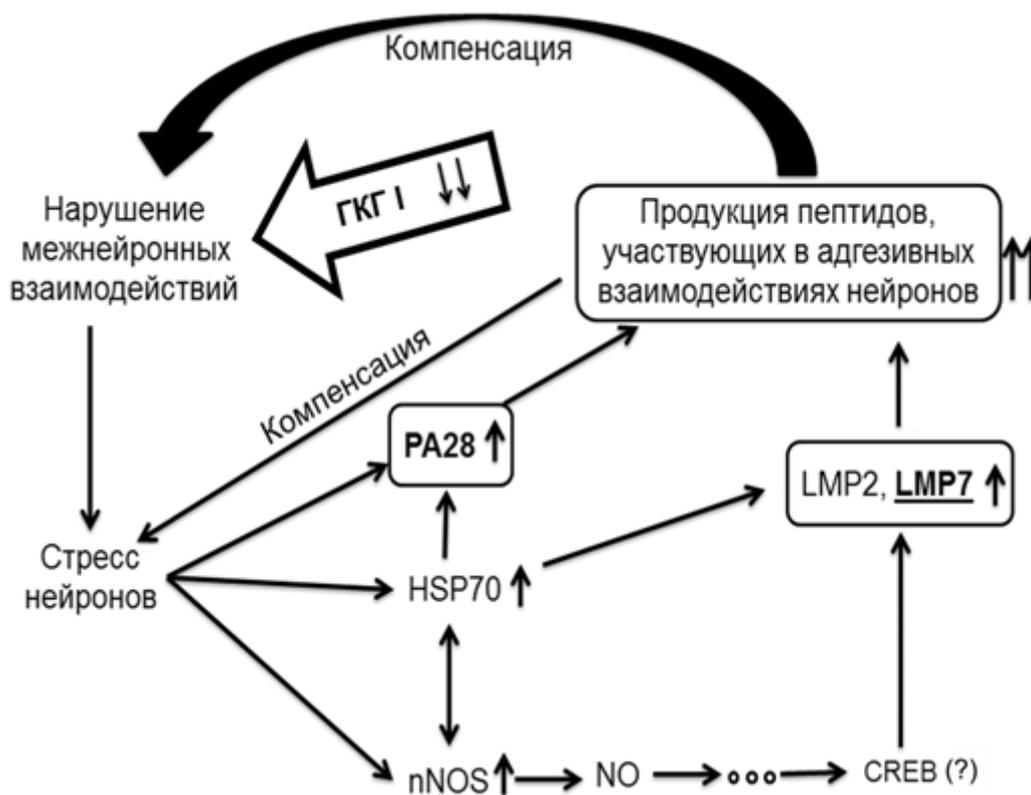


Рис. 10. Гипотетическая схема компенсаторных механизмов синаптической пластичности, развивающихся во фронтальной коре головного мозга мышей в отсутствие молекул ГКГ I.

Особенности экспрессии иммунных протеасом в развитии центральной нервной системы у крыс. Формирование центральной нервной системы в онтогенезе и ее функционирование во взрослом организме млекопитающих находятся под контролем универсальной протеолитической

убиквитин-протеасомной системы. Цель настоящей работы – изучение динамики экспрессии иммунных протеасом в сравнении с динамикой химотрипсинподобной и каспазаподобной активностей протеасом и экспрессией транскрипционного фактора Zif268 в структурах головного мозга (коре, гиппокампе и стволе мозга) в эмбриональном (Э19 и Э21 дни эмбрионального развития) и раннем постнатальном (П1, П3, П4, П5, П7 и П15 дни постнатального развития) развитии у крыс.

Химотрипсин-подобную и каспазаподобную активности в осветленных гомогенатах структур головного мозга крыс определяли по результатам гидролиза коммерческих флуорогенных олигопептидов Suc-LLVY-AMC и Z-LLG-AMC соответственно. Содержание конститутивных – $\beta 1$, $\beta 5$, и иммунных – LMP7, LMP2 субъединиц протеасом, а также их регуляторов PA700 и PA28, и транскрипционного фактора Zif268 оценивали с помощью Вестерн-блоттинга.

В коре и гиппокампе мозга отмечено повышение экспрессии иммунной субъединицы LMP7 в период активного формирования биохимической медиаторной структуры нейронов П7–П15 (Рис. 11).

Оказалось, что в коре мозга в этот период повышались обе активности. Во всех изученных структурах мозга содержание иммунной субъединицы LMP2 значительно увеличивалось в период П7–П15. Содержание протеолитической конститутивной субъединицы $\beta 1$ во всех структурах снижалось на П4 относительно П1 и повышалось на П15 до уровня П1. Вместе с тем, уровень экспрессии протеолитической конститутивной субъединицы $\beta 5$ протеасом в коре, гиппокампе и стволе увеличивался начиная с Э21 и достигал максимальных значений на П3, П5 и П1, соответственно, с резким снижением на П7 во всех структурах. Экспрессия иммунной LMP2 и конститутивной $\beta 1$ -субъединиц в период резкого скачка на П15 во всех структурах повышалась одновременно с содержанием иммунной субъединицы LMP7. Кроме того, показана положительная взаимосвязь повышенной экспрессии регулятора PA28 и конститутивной субъединицы $\beta 5$ в гиппокампе в период П3–П5 и в стволе мозга в период П1–П5. В период постнатального развития П7–П15 в изученных отделах мозга увеличение экспрессии иммунных LMP2 и LMP7-субъединиц и ХПА протеасом сопряжено с экспрессией транскрипционного фактора Zif268. Вероятно, иммунные протеасомы играют важную роль в регуляции ключевых биохимических процессов раннего онтогенеза центральной нервной системы и необходимы для возникновения и реализации синаптической пластичности в изученных структурах головного мозга у крыс.

Осознание важности и понимание тонких механизмов работы протеасомной системы в развитии головного мозга дает исследователям ключ к поиску новых звеньев в патологических

процессах ЦНС млекопитающих на уровне регуляции работы синаптических структур и межклеточных взаимодействий в целом.

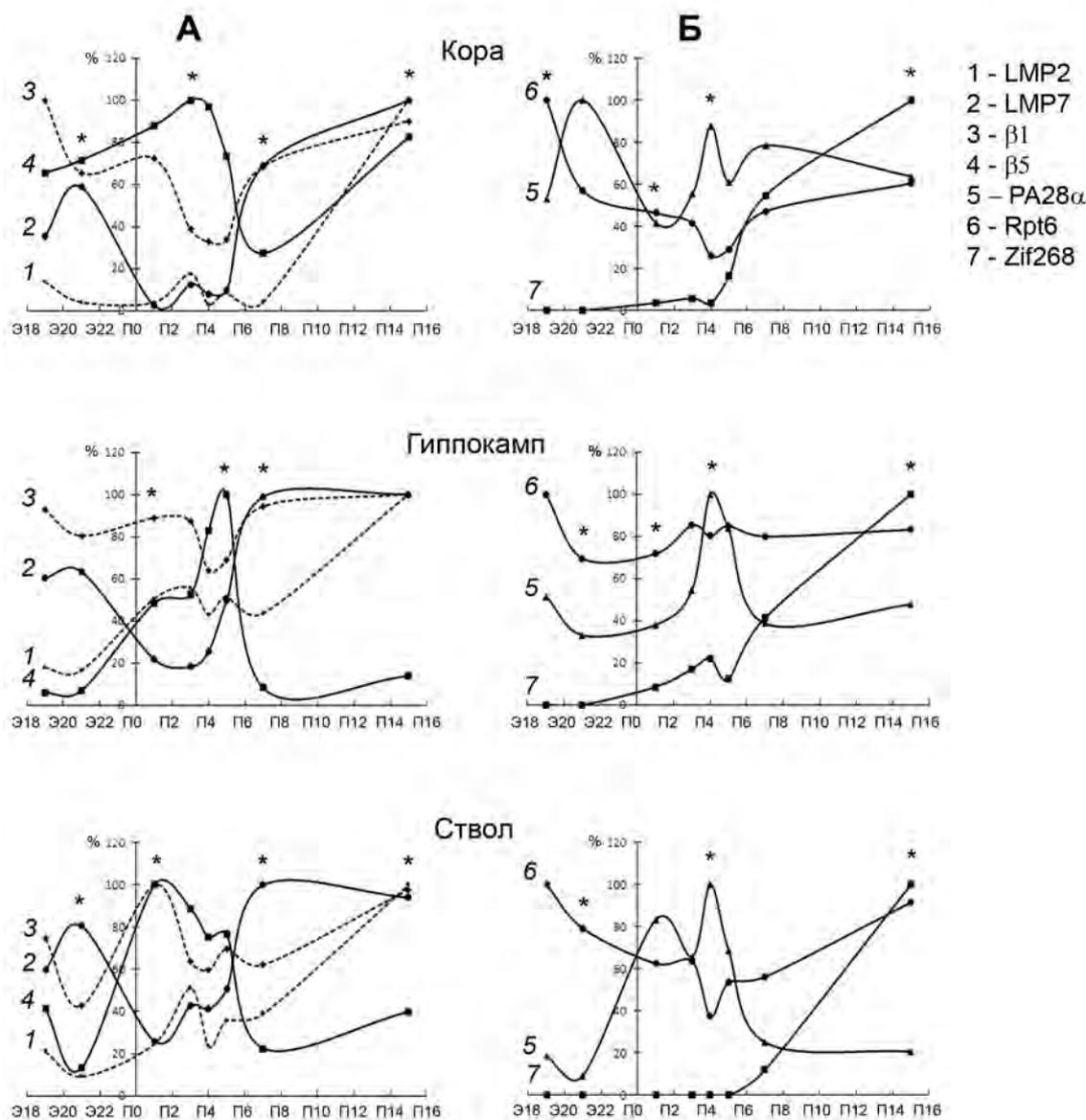


Рис. 11. Динамика изменения содержания иммунных субъединиц LMP2 (1) и LMP7 (2), конститутивных субъединиц β 1 (3) и β 5 (4) (а); субъединиц PA28 α (5), Rpt6 (6) регуляторов PA28 и PA700 протеасом и транскрипционного фактора Zif268 (7) (б). Содержание указанных белков в коре, гиппокампе и стволе головного мозга крыс в период раннего развития (дни): Э19, Э21, П1, П3, П4, П5, П7, П15, определено по данным Вестерн-блоттинга. Приведены средние значения и стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$, $n \geq 4$, где p – доверительная вероятность, n – количество независимых экспериментов.

Нативная структура иммунных протеасом печени крысы. Ответ на этот вопрос, с какими именно структурами протеасом связаны иммунные субъединицы, важен для понимания

механизмов функционирования иммунных протеасом на молекулярном уровне. Целью настоящей работы явилось исследование нативной структуры активных форм иммунных протеасом печени крысы.

Использована печень двухмесячных крыс Вистар в связи с высокой экспрессией иммунных протеасом в этом органе. Эксперименты выполнены в соответствии с Перечнем требований ИБР РАН по этике работы с лабораторными животными. Протеасомы исследовали с помощью метода двумерного электрофореза. Первый этап – электрофорез в нативных условиях – был модифицирован для неочищенных фракций протеасом в сравнении с известным методом, применяемым для очищенных препаратов протеасом. После нативного электрофореза в одной из дорожек выявляли химотрипсинподобную активность протеасом в геле с помощью флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC (Sigma, США) в буфере, содержащем 0,5 М Bis-Tris-HCl, pH 7,0, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 37°C, после чего фотографировали гель через трансиллюминатор при длине волны возбуждающего света 365 нм.

Для второго направления электрофореза дорожку геля уравнивали буфером (0,0625 М Tris, 10% Глицерин, 2% Ds-Na) при 25°C и постоянном перемешивании. Электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу Лэммли в разделяющем 12,5%-ном ПААГ при концентрирующем агарозном геле (1%).

В нативном геле обнаружено 5 зон активных протеасом: 2 зоны с высокой молекулярной массой (зоны I, II) и 3 зоны с более низкой молекулярной массой (зоны III–V) (Рис. 12). Электрофорез в денатурирующих условиях и последующий иммуноблоттинг выявили, что эти зоны содержат α -субъединицы (α 1,2,3,5,6,7), являющиеся маркерами всех форм протеасом. При этом иммунные субъединицы LMP7 и LMP2 обнаружены только в III, IV и V зонах активных протеасом. Следует отметить, что третья иммунная субъединица MECL1 встраивается в протеасомы совместно с субъединицей LMP2, что позволяет сделать заключение о наличии всех трех иммунных субъединиц в зонах III, IV и V. Примечательно, что в зонах III и IV присутствует субъединица PA28 α , маркирующая активатор PA28 $\alpha\beta$, но в них нет субъединицы Rpt6, входящей в состав активатора PA700. В то же время в зоне V отсутствуют оба активатора. Субъединица Rpt6 (следовательно, и активатор PA700) выявляется в высокомолекулярных активных I и II зонах.

Кроме того, α -субъединицы и иммунные субъединицы протеасом, а также субъединица PA28 α обнаруживаются в низкомолекулярной неактивной зоне геля. По-видимому, они отражают наличие половинок структуры 20S и несвязанного с протеасомами активатора PA28 $\alpha\beta$. В неактивной зоне геля, между II и III зонами, выявляется субъединица Rpt6.

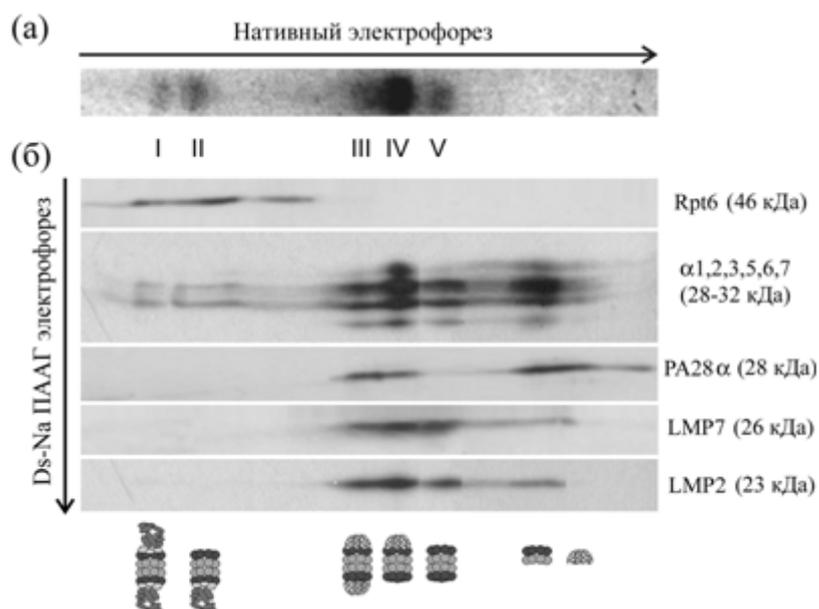


Рис. 12. Химотрипсинподобная активность протеасом в геле после электрофореза в нативных условиях (а) и Вестерн-блоты субъединиц протеасом после электрофореза в денатурирующих условиях (б). Используются комбинированные моноклональные антитела мыши к субъединицам $\alpha 1,2,3,5,6,7$ 20S-протеасом, поликлональные антитела кролика к субъединице PA28 α активатора PA28 $\alpha\beta$ и иммунной субъединице LMP7, моноклональные антитела мыши к субъединице Rpt6 активатора PA700 и иммунной субъединице LMP2 протеасом («Biomol», Великобритания). Разведение антител 1 : 1500. Представлены репрезентативные изображения, n=5.

Очевидно, здесь локализован активатор PA700 либо в свободной форме, либо в связи с низкомолекулярными белками. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о наличии в печени крысы следующих активных структур протеасом: PA700-20S-PA700, PA700-20S, PA28 $\alpha\beta$ -20S-PA28 $\alpha\beta$, PA28 $\alpha\beta$ -20S, 20S. При этом иммунные протеолитические субъединицы функционируют в печени в составе структур PA28 $\alpha\beta$ -20S-PA28 $\alpha\beta$, PA28 $\alpha\beta$ -20S и 20S, в то время как активные структуры PA700-20S-PA700 и PA700-20S связаны с конститутивными протеолитическими субъединицами. Это неожиданный и необычный результат, так как он не согласуется с устоявшимся представлением о том, что иммунные субъединицы могут входить в состав протеасом, связанных как с активатором PA28 $\alpha\beta$, так и с активатором PA700. В частности, приводятся сведения об одинаковой скорости гидролиза убиквитинированных субстратов конститутивными и иммунными 26S-протеасомами. Вместе с тем, в указанной работе отсутствует строгое доказательство исследования авторами именно иммунных 26S-протеасом.

Активные структуры PA700-20S-PA700, PA700-20S, PA28 $\alpha\beta$ -20S-PA28 $\alpha\beta$, PA28 $\alpha\beta$ -20S были выявлены ранее в лизатах ретикулоцитов кролика. Кроме того, активные структуры PA700-20S-PA700 и PA700-20S обнаружены при исследовании очищенной фракции 26S-протеасом коры головного мозга крысы. Однако в этих работах не изучались иммунные протеасомы. Таким

образом, нами впервые обнаружен важный факт, указывающий на то, что иммунные протеасомы не связаны с активатором PA700 и, следовательно, не способны гидролизовать убиквитинированные белки, по крайней мере, в печени крысы. Обнаруженный факт представляется логичным, поскольку для устранения белков не обязателен их гидролиз по специфическим пептидным связям, осуществляемый иммунными протеасомами. Полученные результаты указывают на возможность функционирования иммунных субъединиц как в составе отдельных 20S-субчастиц, так и в более сложных структурах, связанных с одним или двумя активаторами PA28 $\alpha\beta$, что, очевидно, обуславливает их участие в тонких регуляторных механизмах.

Раздел 2. Функционирование протеасом при злокачественной трансформации клеток и развитии злокачественных опухолей

Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в развитии карцином молочной и щитовидной желез человека. Выявлена сложная динамика изменения химотрипсинподобной активности протеасом в развитии карциномы молочной железы. Эта динамика носит волнообразный характер при росте опухоли как в отсутствие лимфогенных метастазов, так и при их наличии (Рис. 13).

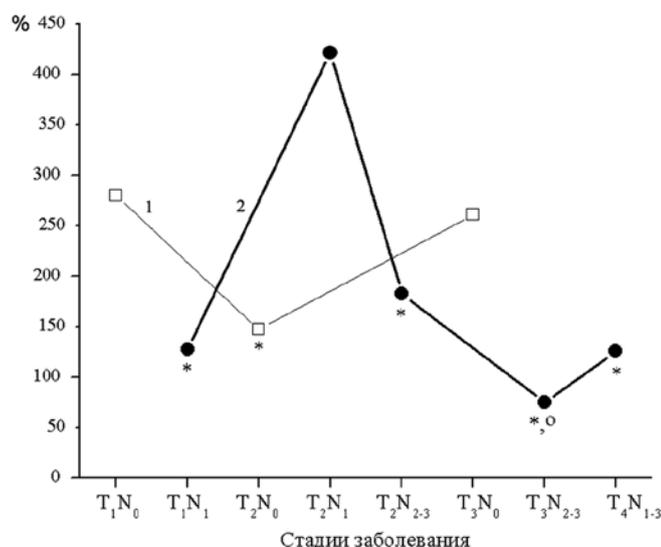


Рис. 13. Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в тканях карциномы молочной железы в зависимости от распространенности опухолевого процесса. 1 – развитие опухоли без метастазов; 2 – развитие опухоли при наличии лимфогенных метастазов. Активность в опухолевой ткани выражена в процентах по отношению к активности в прилежащей ткани, которая принята за 100%. *Различия достоверны по сравнению с группой больных со стадией T₂N₁, p≤0,05; °Различия достоверны по сравнению с группой больных со стадией T₁N₀, p≤0,07.

В отсутствие метастазов минимальное изменение активности в опухоли по отношению к условно контрольной ткани приходится на стадию T₂N₀, однако в опухоли того же размера при наличии региональных метастазов с показателем N₁ увеличение активности протеасом характеризуется максимальным значением в сравнении со всеми изученными образцами. Дальнейшее распространение процесса метастазирования на региональные лимфоузлы (стадии T₂N₂₋₃) сопровождается менее интенсивным увеличением активности протеасом. На стадиях T₃N₂₋₃ и T₄N₁₋₃ волнообразность изменения активности протеасом в опухоли затухает таким образом, что активность в опухоли становится достоверно неотличимой от активности в условно контрольной ткани.

Анализ изменения ХТП активности протеасом в опухоли по отношению к прилежащей ткани был проведен также для папиллярной карциномы щитовидной железы на стадиях $T_2N_0M_0$, $T_2N_1M_0$ и $T_3N_0M_0$ (Рис. 14). Обнаружен удивительный факт сходства характера изменения ХТП активности в карциномах щитовидной и молочной желез на этих стадиях: на всех трех стадиях активность в опухоли выше, чем в условно контрольной ткани, при этом увеличение максимально на стадии T_2N_1 (Рис. 13 и 14). Тем не менее, выявлено и отличие, которое заключается в том, что степень изменения ХТП активности в карциноме щитовидной железы превосходит таковую в карциноме молочной железы.

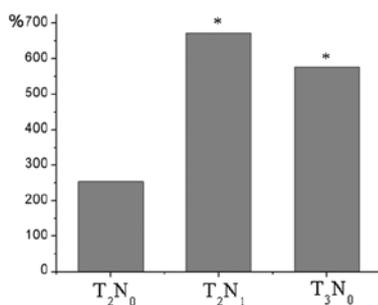


Рис. 14. Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в тканях папиллярной карциномы щитовидной железы на разных стадиях. Активность в опухолевой ткани выражена в процентах по отношению к активности в прилежащей ткани, которая принята за 100%. *Различия достоверны по сравнению с группой больных со стадией T_2N_0 , $p \leq 0,05$.

Полученные результаты объясняют причину неэффективности бортезомиба – пока единственного противоопухолевого лекарства, действие которого направлено на подавление ХТП активности протеасом. Очевидно, что в периоды низкой активности протеасом это соединение не может приводить к желаемому эффекту.

Важнейший результат данного исследования заключается в обнаружении факта, что развитие карцином молочной и щитовидной желез связано с общими закономерностями изменения ХТП активности протеасом в первичной опухоли, по крайней мере, на изученных стадиях. Причем показано, что выявленные закономерности уникальны для процесса роста опухолей при наличии региональных метастазов и в их отсутствие. В целом, полученные результаты перспективны для разработки методов оценки агрессивности опухолей молочной и щитовидной желез.

Функционирование протеасом в злокачественных опухолях молочной железы. Связь с клиничко-патологическими факторами. Проанализированы характеристики протеасом в злокачественных опухолях молочной железы 106 пациенток (88 образцах инвазивной дуктальной карциномы, 11 образцах инвазивной лобулярной карциномы и 7 образцах редких видов рака – медуллярной и мукозной карцином) на стадиях $T_{1-4}N_{0-3}M_0$. Показано, что химотрипсинподобная активность протеасом выше в опухолях, чем в условно нормальной прилежащей ткани, у 76 из 106

пациентов. В отсутствие рецепторов эстрогена рост опухоли был связан с экспрессией иммунной субъединицы LMP2 и активатора PA700 в опухолевых клетках. (Рис. 15).

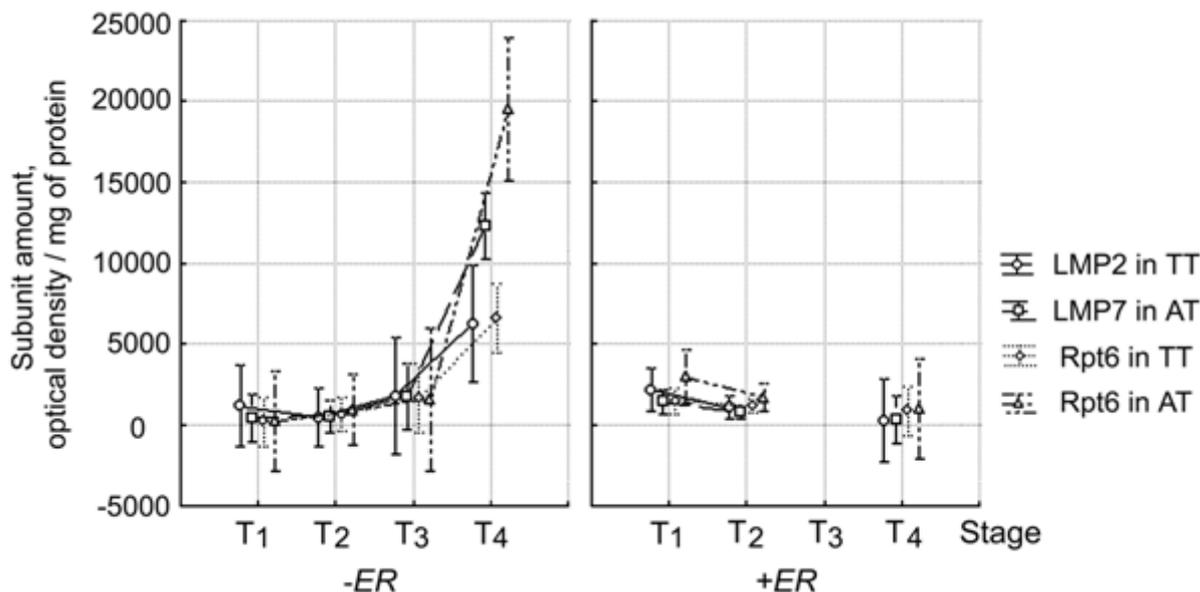


Рис. 15. Зависимость количества субъединиц протеасом в образцах молочной железы от одновременного влияния двух факторов. ТТ – опухолевая ткань, АТ –прилежащая ткань. Факторы: стадия заболевания (показатель Т) и наличие или отсутствие рецептора эстрогена (ER). Rpt6 – субъединица активатора PA700. Указаны средние значения и доверительный интервал.

Кроме того, обнаружен интересный феномен связи опухолевого роста в отсутствие рецепторов эстрогена с повышенной экспрессией иммунной субъединицы LMP7 и активатора PA700 в прилежащей ткани (Рис. 15). Поэтому иммунные субъединицы протеасом и активатор PA700 можно рассматривать как новые потенциальные мишени противоопухолевой терапии для пациенток с опухолями, не содержащими рецепторы эстрогена. Это очень важно, так как именно данная категория пациенток имеет наиболее неблагоприятный прогноз восстановления здоровья.

Протеасомы в папиллярной карциноме щитовидной железы. Детально исследованы характеристики протеасом папиллярной карциномы щитовидной железы человека, которая существенно отличается от злокачественных новообразований других локализаций тем, что на всех изученных стадиях в ней увеличивается экспрессия общего пула протеасом, иммунных протеасом и активатора PA700 по сравнению с условно нормальной тканью. Эти изменения приводят к существенному возрастанию химотрипсинподобной активности протеасом, причем минимальное отличие от активности в условно-нормальной прилежащей ткани составляет 150%. Совокупность изменений в пуле протеасом папиллярной карциномы щитовидной железы представлена на Рис. 16.

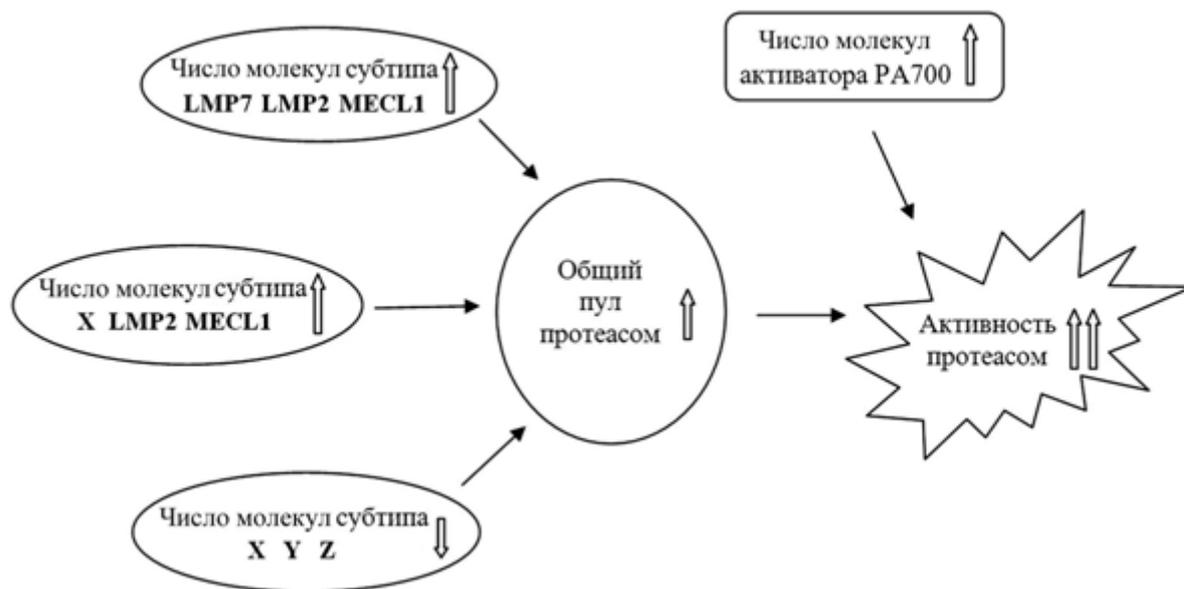


Рис. 16. Изменения, происходящие в пуле протеасом папиллярной карциномы щитовидной железы по сравнению с условно-нормальной тканью.

Следует отметить, что детальный анализ экспрессии протеолитических конститутивных и иммунных субъединиц протеасом позволил сделать заключение о динамике экспрессии отдельных субтипов протеасом в опухоли по сравнению с условно нормальной тканью. Такой подход применен впервые и может быть полезен для многих лабораторий, изучающих убиквитин-протеасомную систему гидролиза белков.

Кроме того, полученные результаты могут быть важны для разработки нового метода диагностики рака щитовидной железы и инновационных подходов к лечению этого онкологического заболевания.

Раздел 3. Протеасомы в развитии донор-специфической иммунологической толерантности у крыс

Исследован пул протеасом печени крыс Август (RT1^c) через 30 дней после аллотрансплантации ткани щитовидной железы крыс Вистар (RT1^u) под капсулу почки с предшествующей индукцией донорспецифической толерантности интрапортальным введением спленоцитов донора или в ее отсутствие. Определен уровень общего пула протеасом, иммунных протеасом, содержащих субъединицы LMP2 и/или LMP7, 19S- и 11S-регуляторов протеасом. В качестве контрольных групп использовали интактных и ложнооперированных крыс. Показано увеличение уровня иммунных протеасом всех типов и 11S-регулятора и уменьшение уровня общего пула протеасом и 19S-регулятора в печени экспериментальных животных по сравнению с контрольными группами, что указывает на изменение функционального состояния печени после трансплантации (Рис. 17 и 18).

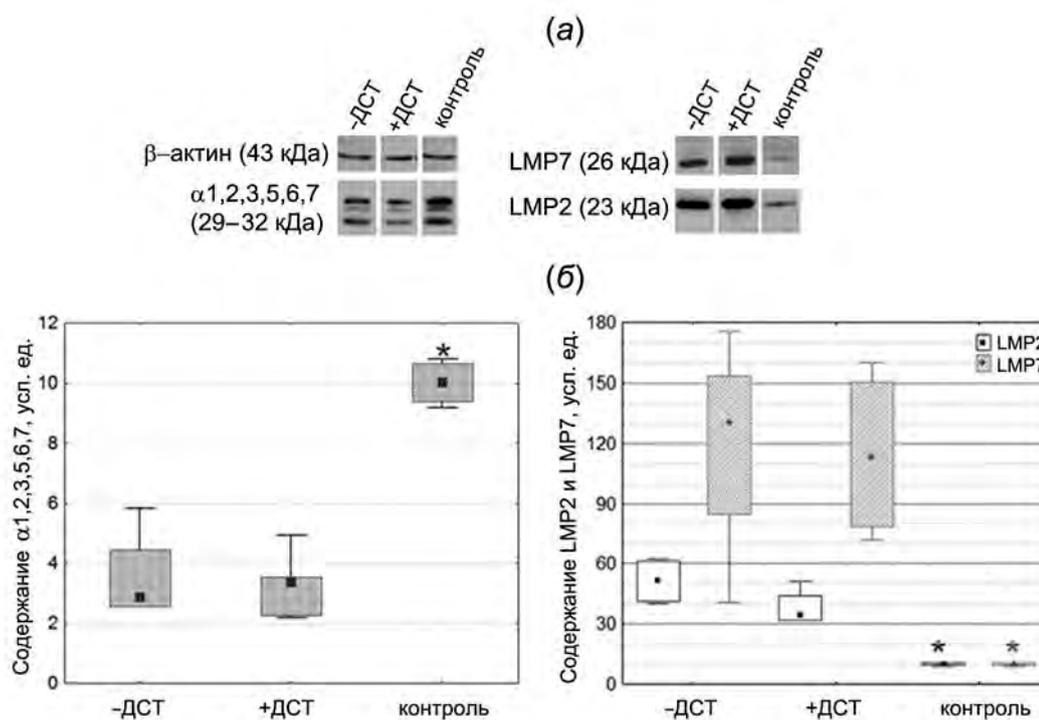


Рис. 17. Экспрессия субъединиц α 1,2,3,5,6,7 и иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом в печени крыс после трансплантации ткани щитовидной железы. (а) Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов печени крыс с использованием антител к субъединицам α 1,2,3,5,6,7 и иммунным субъединицам LMP2 и LMP7. (б) Относительные величины интегрального поглощения белковых полос, нормированные на уровень β -актина, за 10 принята величина в контрольной группе животных. «-ДСТ» – группа без индукции донорспецифической толерантности, «+ДСТ» – группа с индукцией донорспецифической толерантности. Указано значение медианы, столбик ограничивает интерквартильный размах (25%-75%), планки погрешностей – доверительный интервал медианы при уровне значимости $\alpha = 0,05$, $n \geq 5$. * $p < 0,01$.

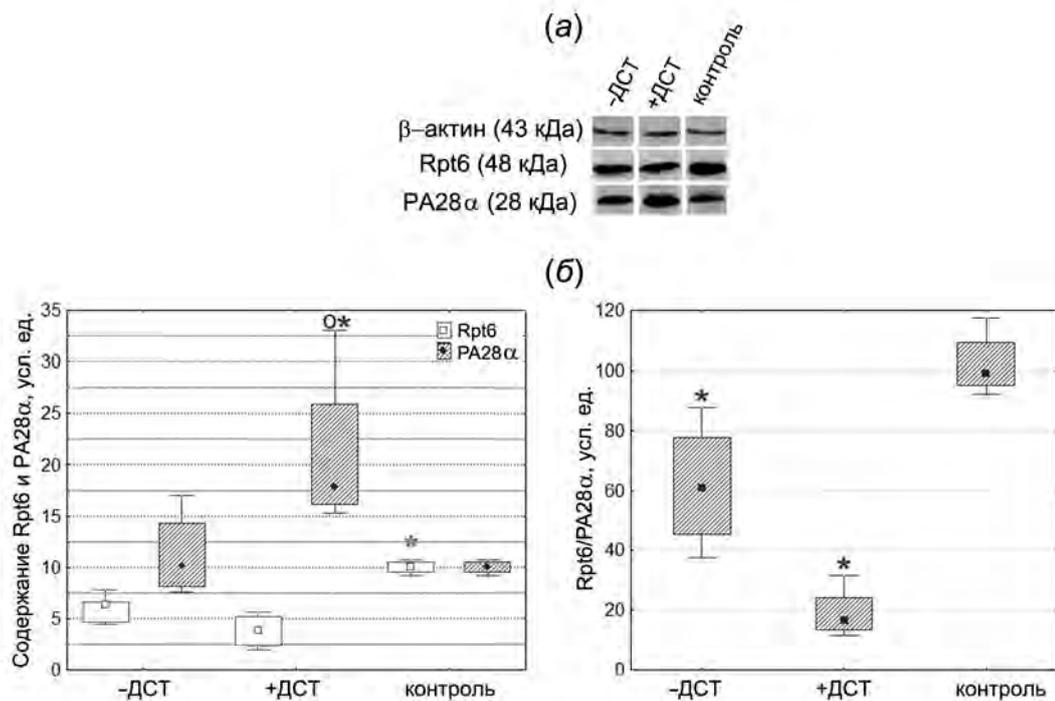


Рис. 18. Экспрессия регуляторов протеасом в печени крыс после трансплантации ткани щитовидной железы. (а) Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов печени крыс с использованием антител к субъединице Rpt6 19S-регулятора и субъединице PA28α 11S-регулятора. (б) Относительные величины интегрального поглощения белковых полос, нормированные на уровень β-актина, за 10 принята величина в контрольной группе животных; справа – отношение величин экспрессии регуляторов протеасом 19S/11S. «-DST» – группа без индукции донорспецифической толерантности, «+DST» – группа с индукцией донорспецифической толерантности. Указано значение медианы, столбик ограничивает интерквартильный размах (25%-75%), планки погрешностей – доверительный интервал медианы при уровне значимости $\alpha = 0,05$, $n \geq 5$. Показаны статистически значимые отличия при $p < 0,01$ (*) и $p < 0,05$ (°).

В печени крыс без индукции толерантности происходит увеличение соотношения регуляторов 19S/11S по сравнению с толерантными животными. В печени толерантных крыс с прижившимися трансплантатами значительно возрастает количество мононуклеарных клеток, экспрессирующих иммунную субъединицу LMP2, по сравнению с животными без индукции толерантности и контрольными животными (Рис. 19).

При исследовании ткани прижившихся трансплантатов обнаружено увеличение в ней соотношения иммунных субъединиц LMP2/LMP7 и регуляторов 19S/11S по сравнению с тканью, замещающей отторгнутые трансплантаты. В контрольной интактной ткани щитовидной железы практически отсутствуют иммунные протеасомы, а соотношение 19S/11S в ней максимально. Таким образом, развитие иммунной реакции или ее подавление сопровождается изменением баланса различных форм протеасом. Иммунная субъединица LMP7 и регулятор 11S связаны с запуском иммунного ответа против чужеродной ткани, а иммунная субъединица LMP2 и

регулятор 19S, очевидно, важны для развития иммунологической толерантности и функционирования прижившейся ткани.

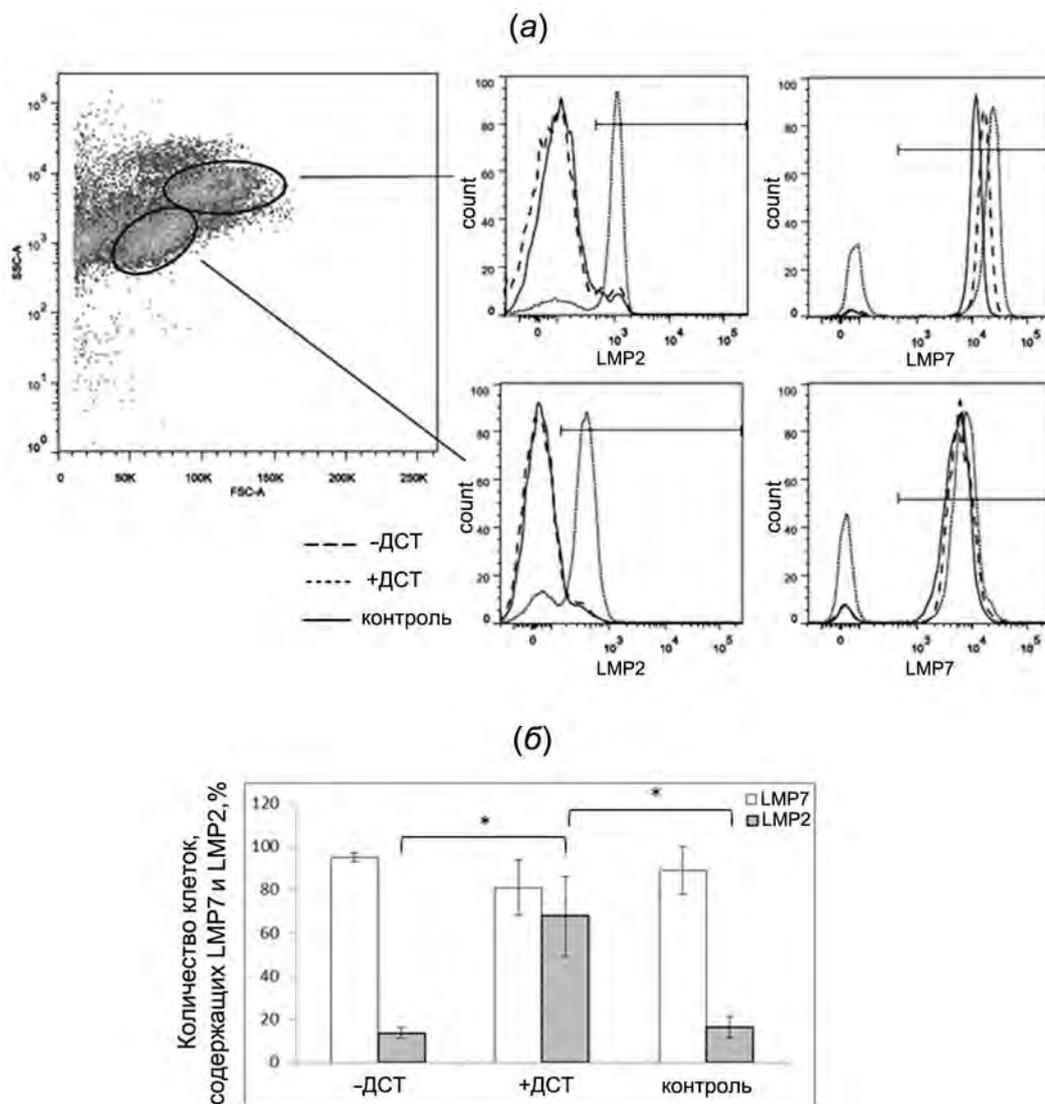


Рис. 19. Цитофлуориметрический анализ экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 в мононуклеарных клетках печени крыс. (а) В левой части представлен точечный график прямого и бокового светорассеяния мононуклеарных клеток печени, овалами выделены две популяции клеток. В правой части представлены соответствующие гистограммы экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 в обеих популяциях мононуклеарных клетках печени трех исследуемых групп животных. Представлены репрезентативные данные отдельных экспериментов. (б) Процентное содержание мононуклеарных клеток, экспрессирующих субъединицы LMP2 и LMP7, в печени крыс трех исследуемых групп животных. Представлено суммарное количество LMP7⁺- и LMP2⁺-клеток в обеих выделенных популяциях. Указано значение медианы и доверительный интервал медианы при уровне значимости $\alpha = 0,05$, * $p < 0,01$.

Иммунофлуоресцентное исследование трансплантатов выявило низкое содержание иммунных протеасом в тироцитах сохранившихся фолликулов. Это может быть показателем отсутствия иммунного ответа против клеток, продуцирующих гормоны, поскольку при низком

содержании иммунных протеасом в цитоплазме затруднено образование антигенных эпитопов для молекул ГКГ класса I.

Начальный этап развития донорспецифической толерантности введением спленоцитов донора в портальную вену реципиента – активный процесс, характеризующийся двумя фазами, в ходе которых изменяется уровень иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом в мононуклеарных клетках печени, включая клетки Купфера, а также количество клеток Купфера. Первая фаза длится до 5 суток после начала индукции толерантности, вторая – с 5 по 14 сутки. В обеих фазах возрастает уровень субъединиц LMP2 и LMP7 как в общем пуле мононуклеарных клеток, так и в клетках Купфера, с максимумами на 1 и 7 сутки. Кроме того, со сдвигом в несколько суток в обеих фазах увеличивается общее количество клеток Купфера. При этом наиболее выраженные изменения приходятся на вторую фазу.

Интересен факт уменьшения количества мононуклеарных клеток, содержащих иммунные протеасомы, на 3-и сутки не только в сравнении с 1-ми сутками после начала индукции ДСТ, но и относительно их базального уровня у контрольных животных 1-й группы. Если учесть, что иммунопротеасомы экспрессируются в основном в АПК и иммунокомпетентных клетках, то данный факт косвенно указывает на уменьшение их количества в печени на 3-и сутки после начала индукции. Это может быть связано с апоптозом активированных Т-лимфоцитов, который наблюдается в печени при инициации и поддержании толерогенного статуса. Однако, какие бы механизмы ни были задействованы, количество мононуклеарных клеток, обогащенных иммунопротеасомами, в печени на данный срок минимально, что может являться своеобразным «окном возможностей» для последующего заполнения пустующей ниши клетками разных субпопуляций, и в зависимости от этого развития аллоспецифической толерантности либо отторжения.

Полученные результаты ставят новые задачи поиска способов воздействия на клеточный состав печени и экспрессию иммунных протеасом на третьи сутки после начала индукции ДСТ для блокирования развития отторжения.

Раздел 4. Взаиморегуляция развития нервной и иммунной систем.

Исследования за период 2013-2016 г.г. были направлены на изучение возможных механизмов взаиморегуляции развития иммунной и репродуктивной систем у млекопитающих (крыс и мышей). Нами было исследовано влияние моноаминов и нейропептида гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) на развитие иммунной системы, а также влияние гипоталамического аргинин-вазопрессина (АВП) на противоопухолевый иммунитет, с одной стороны, и влияние иммунологического стресса, вызванного бактериальным эндотоксином ЛПС, на развитие гипоталамо-гипофизарной и репродуктивной систем, с другой стороны.

Влияние нейрогормонов на развитие тимуса и противоопухолевый иммунитет. Известно, что в раннем развитии нейрогормоны начинают синтезироваться в тканях плода задолго до формирования нервной передачи и обнаруживаются в высоких концентрациях в общей циркуляции крови. Все это предполагает их участие в регуляции развития периферических органов и тканей. Нами было исследовано влияние дефицита моноаминов – серотонина и дофамина, а также нейропептида ГРГ на функциональную активность иммунной системы в онтогенезе крыс. В качестве экспериментальной модели использовали фармакологическое подавление синтеза серотонина и дофамина в пренатальном периоде с последующим изучением отдаленных последствий у взрослых животных. Для подавления синтеза серотонина у плодов беременным самкам крыс линии Вистар внутрибрюшинно вводили пара-хлорофенилаланин (п-ХФА) на 13-17-е сутки беременности, а для подавления синтеза катехоламинов вводили α -метил-*n*-тирозин (α -МПТ) на 16-е и 17-е сутки беременности в дозе 100 мг/кг массы тела. Функциональную активность иммунной системы оценивали по пролиферативному ответу лимфоцитов, активированных, митогеном Конканавалином А (Кон А, 2,5 мкг/мл) и по количеству антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана. У взрослого потомства проводили также количественную оценку субпопуляций Т-лимфоцитов в тимусе. Согласно полученным данным, пренатальный дефицит серотонина приводит к существенным изменениям в Т- и В-системе иммунитета в постнатальном периоде. У 3-х дневных крысят п-ХФА вызывал снижение Кон А-индуцированного пролиферативного ответа тимоцитов в 2 раза по сравнению с животными, не получавшими п-ХФА, в то время как во все последующие сроки наблюдалось достоверное увеличение этого параметра (Рис. 20).

Митогенный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов селезенки также увеличивался у взрослого потомства. Подавление синтеза серотонина у половозрелых животных, в отличие от плодов, оказывало либо обратимое регуляторное влияние, либо не оказывало никакого влияния на функцию Т-лимфоцитов. Оценка содержания АОК в селезенке показала, что пренатальный

дефицит серотонина приводит к достоверному увеличению АОК к эритроцитам барана в 10 раз у половозрелого потомства (Рис. 21).

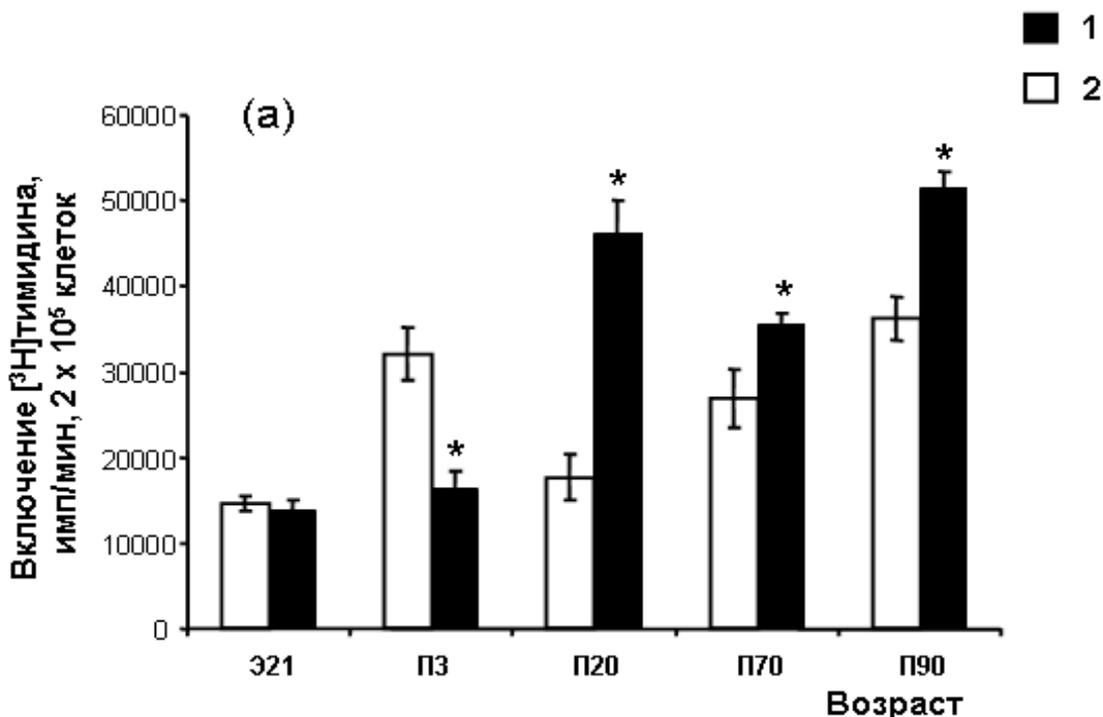


Рис. 20. Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов тимуса крыс, индуцированный Кон А (2,5 мкг/мл), которым вводили в/б ингибитор синтеза серотонина пХФА (100 мг/кг веса) с 13-го по 17-й эмбриональный день. Контрольным животным вводили 0,9% р-р NaCl. Пролиферативную активность лимфоцитов оценивали на 21-й эмбриональный день (Э21), и 3-й, 18-й, 70-й и 90-й дни постнатального развития (П3, П18, П70, П90). * $p < 0.05$.

Изменение функциональной активности Т-клеток связано, по-видимому, с тем, что дефицит серотонина в пренатальном периоде развития приводит к стойким морфогенетическим изменениям стромальных элементов тимуса, взаимодействующих с тимоцитами. Это, в свою очередь, приводит к нарушениям в дифференцировке Т-лимфоцитов CD4 фенотипа, осуществляющих функцию клеток-помощников в кооперации с В-лимфоцитами селезенки при ответе на тимус-зависимый антиген - эритроциты барана.

Фармакологическое подавление синтеза дофамина в критический период формирования тимуса также приводит к долгосрочным изменениям в Т-системе иммунитета, обусловленным усилением продукции в тимусе естественных регуляторных Т-лимфоцитов. Однако, в отличие от серотонина, дефицит дофамина вызывал подавление пролиферативного ответа Т-лимфоцитов тимуса, активированных Кон А, у половозрелого потомства. В тимусе крыс, начиная с 16-го дня

эмбрионального развития (Э16), при помощи ОТ-ПЦР обнаружена мРНК рецепторов к дофамину типов Д1, Д3, Д5, но не типа Д2 (Рис. 22).

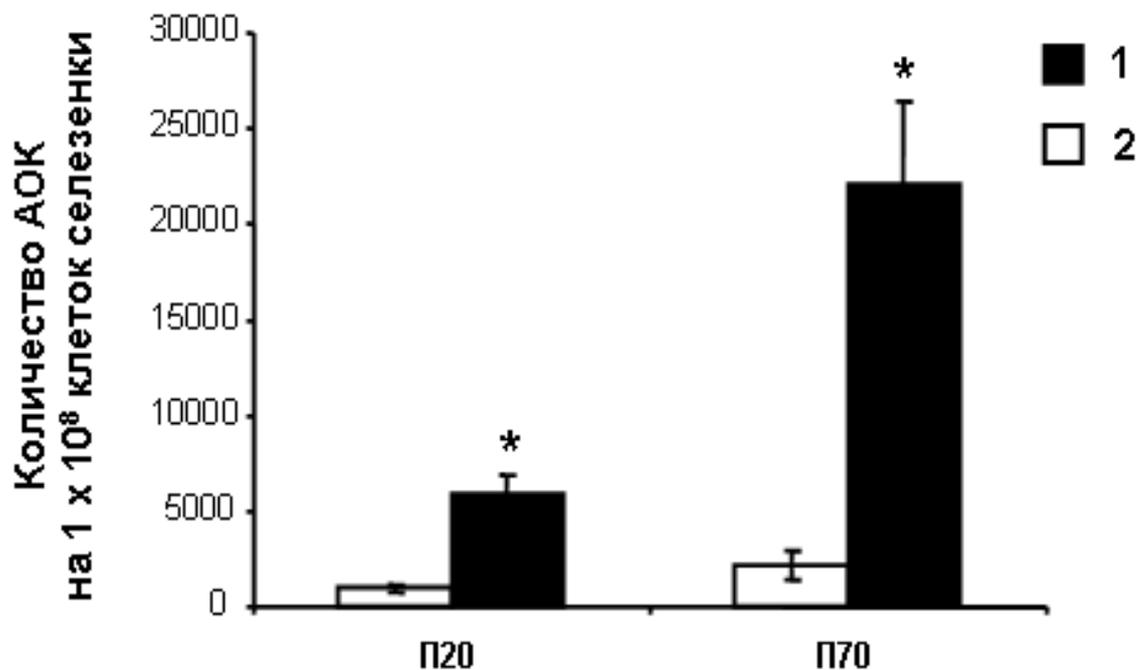


Рис. 21. Количество антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана в селезенке 20-ти и 70-ти дневных крыс, получавших инъекции пХФА с 13-го по 17-й дни эмбрионального развития (2) по сравнению с животными, получавшими 0,9% р-р NaCl (1).

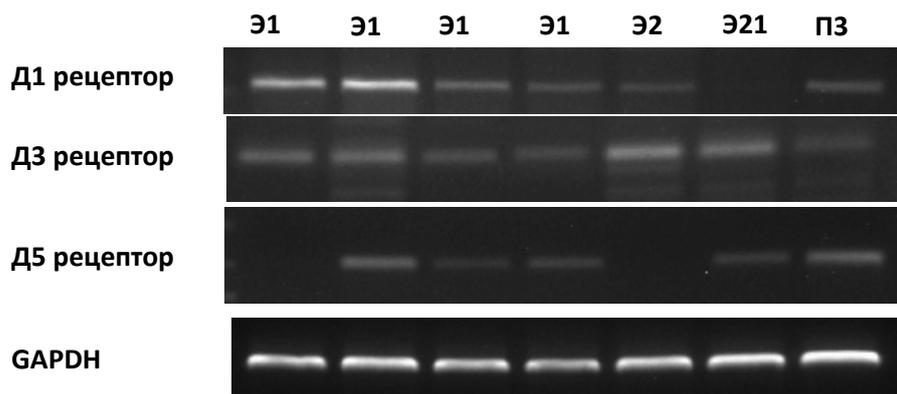


Рис. 22. Экспрессия рецепторов к дофамину в развивающемся тимусе крыс. мРНК рецепторов Д1, Д3 и Д5 в тимусе с 16-го дня эмбрионального развития (Э16) по 3-й день постнатального периода (ПЗ), выявленная с помощью ПЦР-анализа.

Дофамин в концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} М подавлял ответ тимочитов плодов на митоген, что подтверждает функциональность рецепторов и возможность прямого влияния дофамина на развивающийся тимус. Присутствие и функциональная активность в тимусе плодов рецепторов к дофамину свидетельствует о его возможности влиять на развитие иммунитета в процессе онтогенеза крыс.

Важной сигнальной молекулой, контролирующей развитие тимуса, является также ГРГ, основная функция которого связана с репродуктивной системой. ГРГ был выявлен нами ранее и в тимусе плодов. При помощи ОТ-ПЦР и Вестерн-блоттинга экспрессия рецепторов к ГРГ обнаружена у плодов на тимочитах и стромальных элементах тимуса с Э16, с максимальной их выраженностью на Э17, подобно рецепторам к дофамину. Двойным мечением с помощью проточной цитометрии показано, что на Э17 рецепторы к ГРГ экспрессируют около 60% тимочитов и лишь незначительное количество - стромальные элементы эмбрионального тимуса. Одноразовая внутриутробная блокада рецепторов к ГРГ на пике их экспрессии в тимусе плодов ГРГ-антагонистом приводит к необратимому двукратному подавлению пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на митоген Кон А у половозрелого потомства. В то же время введение антагониста 3-х дневным крысятам не оказывало влияние на Т-систему иммунитета у взрослых особей. Высокий уровень экспрессии рецепторов к ГРГ на Э17, а также отсутствие отдаленных последствий при введении антагониста ГРГ постнатальным крысам свидетельствуют о важном значении ГРГ в регуляции формирования тимуса именно в конце второй декады внутриутробного развития. ГРГ играет значимую роль в пренатальном и постнатальном программировании клеток иммунной системы. Совместное культивирование ГРГ с тимусами 18-дневных плодов в модели *ex vivo* вызывало 2-кратное увеличение численности CD4+Т клеток-хелперов в тимусе плодов. Совокупность этих данных подтверждает наше предположение о том, что моноамины и нейропептид ГРГ контролируют развитие тимуса и формирующейся в нем Т-системы иммунитета, и что критическим периодом ее развития у крыс является Э17.

Кроме того, было исследовано влияние дефицита АВП на противоопухолевый иммунитет после имплантации асцитной гепатомы Зайделя крысам Brattleboro с генетическим дефектом синтеза АВП в гипоталамусе и его отсутствием в периферической крови и крысам линии WAG с нормально экспрессирующимся геном АВП. Показано, что врожденный дефицит АВП у крыс Brattleboro приводит к увеличению экспрессии иммунных протеасом, преимущественно субъединицы LMP7, и основных молекул ГКГ класса I в гепатоме Зайделя и, как следствие, к повышению иммуногенности и уничтожению опухоли. При помощи Вестерн-блоттинга в гепатоме Зайделя выявлено десятикратное увеличение иммунной субъединицы LMP7 и двукратное увеличение содержания основной молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I – RT1A на 10-й день после ее имплантации крысам Brattleboro, по сравнению с

крысами WAG. С помощью проточной цитометрии показано увеличение численности цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток помощников в селезенке крыс Brattleboro по сравнению с крысами WAG после имплантации им опухоли, что может способствовать ее регрессии у крыс Brattleboro системой адаптивного иммунитета. В то же время уменьшение численности субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке крыс WAG после имплантации гепатомы сопровождалось развитием спленомегалии и ростом опухоли.

Влияние иммунологического стресса, вызванного бактериальным эндотоксином ЛПС, на развитие гипоталамо-гипофизарной и репродуктивной систем. Иммунная система, в свою очередь, оказывает влияние на развитие нейроэндокринной системы. Ранее нами было показано, что введение бактериального эндотоксина ЛПС (*E.coli*, 18мкг/кг) самкам крыс и мышей на Э12 приводит к снижению темпов интраназальной миграции нейронов, синтезирующих ГРГ, в передний мозг. Мы предположили, что появление ГРГ нейронов в мозге с опозданием может вызвать изменения в формировании необходимых аксональных связей в гипоталамусе и привести к нарушениям в ключевых точках развития гипоталамо-гипофизарной и репродуктивной систем. Нами было исследовано влияние пренатального иммунологического стресса, вызванного ЛПС, на функционирование этих систем у половозрелого потомства, а также на уровень провоспалительных цитокинов в биологических жидкостях беременных самок и их плодов. ЛПС, введенный мышам на Э10,5 индуцирует воспаление, приводящее к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин (ИЛ)-6, белок хемотаксиса моноцитов (MCP-1), фактор некроза опухоли (ФНО α) и лейкопения ингибирующий фактор (ЛИФ), в крови матери и плодов, а также в амниотической и спинномозговой жидкостях плодов. Содержание провоспалительных цитокинов в крови матери повышалось через 1,5 ч после инъекции ЛПС. Концентрация ИЛ-6 и MCP-1 достоверно увеличивалась в 25-30 раз, ФНО α в 13 раз, ЛИФ в 20 раз. В крови плодов и амниотической жидкости концентрация ИЛ-6 была увеличена в 45 и 12 раз, MCP-1 в 9 и 2 раза, ЛИФ в 6 и 4 раза, соответственно. В спинномозговой жидкости плодов наблюдалось достоверное увеличение концентрации ИЛ-6 и MCP-1 в 2-3 раза и снижение концентрации ФНО α и ЛИФ в 1,5 раза. На Э12 в области формирования гипофиза и назальной мезенхимы плодов мышей двойным иммуногистохимическим мечением выявлены рецепторы к ЛИФ, а на Э14,5 на обонятельных и вомероназальных нервах - к ИЛ-6 и белку промежуточных филаментов – периферину, выстилающего путь миграции ГРГ-нейронов (Рис. 23). На основании полученных данных мы заключили, что эти цитокины и их рецепторы контролируют миграцию ГРГ нейронов из назальной области в мозг

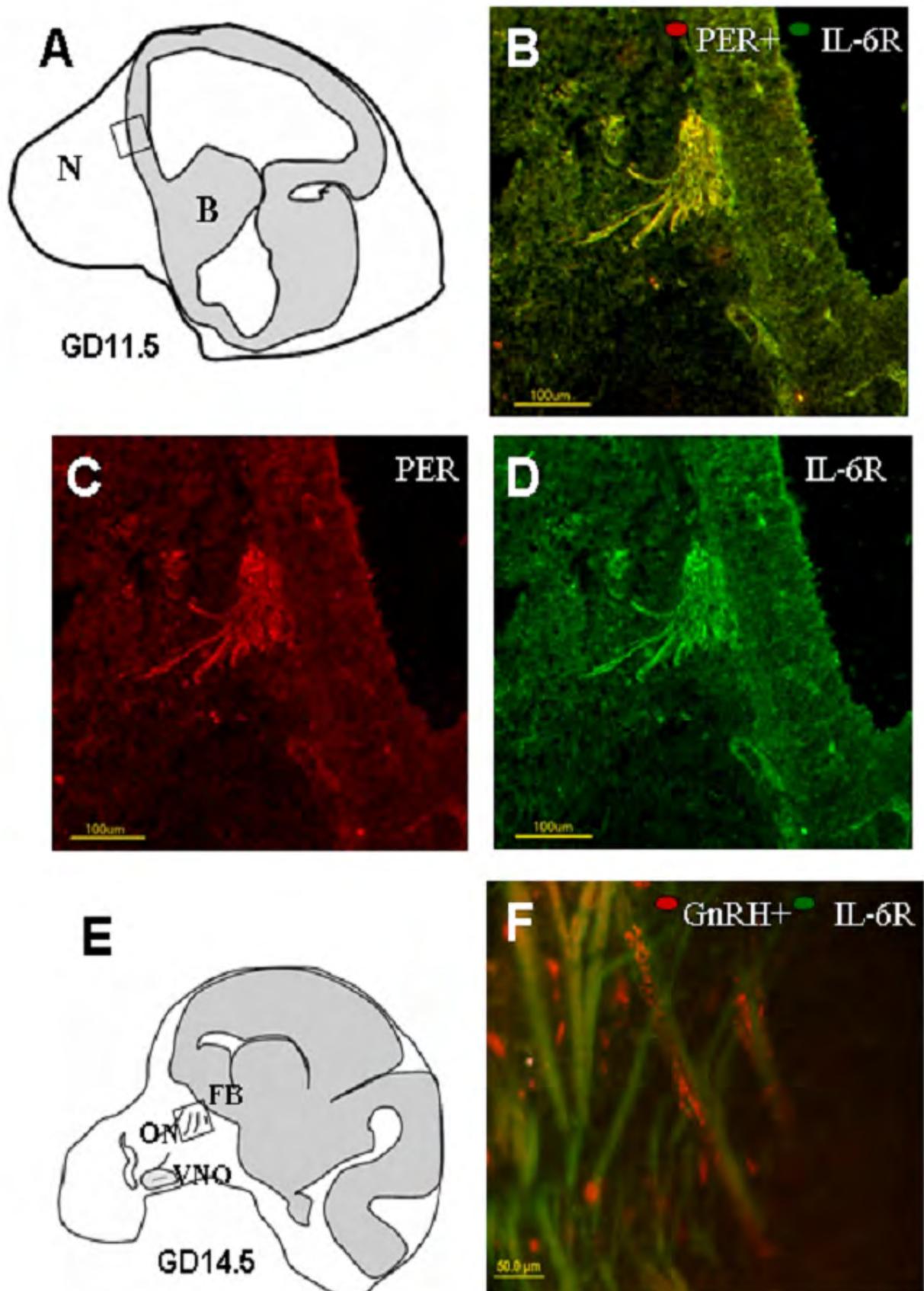


Рис. 23. Иммуногистохимическое мечение периферина (С, красный, PER) и рецептора к ИЛ-6 (D, зеленый, IL-6R) на Э11,5. Двойное иммуногистохимическое мечение периферина + рецептора к ИЛ-6 (B, PER + IL-6R)) и ГРГ + рецептора к ИЛ-6 (F, GnRH красный + IL-6R зеленый). На схеме (A) - В мозг, N нозальная область, на схеме (E) - ON ольфакторные нервы, VNO вомероназальный орган, FB передний мозг, CD эмбриональные дни.

Пренатальное инфицирование крыс ЛПС вызывало также нарушения в функционировании гипоталамо-гипофизарной и репродуктивной систем самцов и самок в постнатальный период онтогенеза. У половозрелого потомства наблюдалось снижение концентрации ГРГ в гипоталамусе, гонадотропинов и половых стероидов в периферической крови, тогда как содержание эстрадиола достоверно увеличивалось в ювенильном периоде с 5 по 14 дни постнатального развития (P5-P14). Кроме того, у половозрелого потомства самцов наблюдались структурные и морфологические нарушения гонад, и как следствие, снижение репродуктивной способности. Введение на P5-P14 антагониста эстрадиола фульвестранта (1,5 мк/кг, в шею) самцам, подвергавшихся пренатальному воздействию ЛПС, полностью восстанавливало вызванные в репродуктивной системе нарушения. Таким образом, бактериальное инфицирование матери на ранних сроках беременности приводит к нарушениям развития гипоталамо-гипофизарной и репродуктивной систем и их функционирования у половозрелого потомства.

Заключение

В целом задачи, поставленные в рамках темы, по всем разделам выполнены. Полученные данные и их анализ важны для дальнейшего развития данной тематики, посвященной исследованию регуляторного потенциала протеасом в онтогенетическом развитии иммунной и центральной нервной систем, роли протеасом в развитии и особенностях донор-специфической иммунологической толерантности и онкологическом статусе, а также регуляторному взаимодействию иммунной и нервной систем в развитии.

Представленная работа внесла существенный вклад в понимание неиммунных функций иммунных протеасом, связанных с ранним развитием центральной нервной системы и адаптивными механизмами к стрессу в головном мозге млекопитающих.

Отметим, что полученные результаты важны не только для фундаментальной науки, но имеют также большое практическое значение. Во-первых, разработанные нами подходы к исследованию субтипов протеасом могут быть применимы во многих лабораториях. Во-вторых, в ряде случаев трудно диагностируемых опухолей щитовидной железы с помощью известных дооперационных или интраоперационных подходов к диагностике разработанный нами метод может стать единственным корректным методом, ориентирующим хирурга на нужный объем оперативного вмешательства.

В рамках новой концепции становления иммунной и нейроэндокринной систем в онтогенезе млекопитающих выявлено неизвестное ранее морфогенетическое влияние нейрого르몬ов (ГРГ, серотонина, дофамина) на развитие тимуса и иммунологического стресса, индуцированного эндотоксином ЛПС, на развитие гипоталамо-гипофизарной и репродуктивной систем. Получены новые данные о механизмах развития репродуктивной системы самцов млекопитающих. Впервые показано, что вызванные инфицированием нарушения – это следствие повышенного содержания цитокинов воспаления у плодов и гормона эстрадиола в раннем постнатальном периоде. Антагонист эстрадиола восстанавливает все нарушения до нормы. Исследования открывают новые горизонты понимания и времени коррекции мужской фертильности.

Публикации по теме за 2013–2016 годы

- 1 Шашова Е.Е., Астахова Т.М., Плеханова А.С., Богомягкова Ю.В., Люпина Ю.В., Сумеди И.Р., Слонимская Е.М., Ерохов П.А., Абрамова Е.Б., Родоман Г.В., Кузнецов Н.А., Кондакова И.В., Шарова Н.П., Чойнзонов Е.Л. Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в развитии карцином молочной и щитовидной желез человека // Бюлл. эксп. биол. мед. 2013 г. Т.155. № 8. С. 209-211.
- 2 Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Астахова Т.М., Степанова А.А., Ерохов П.А., Абрамова Е.Б., Шарова Н.П. Иммунные протеасомы в развитии иммунной системы крысы // Биоорганическая химия. 2013 г. Т. 39. № 4. С 400-410.
- 3 Люпина Ю.В., Богатырев М.Е., Орлова А.Ш., Марьохнич Е.В., Казанский Д.Б., Шарова Н.П. Протеасомы в головном мозге мышей, нокаутных по $\beta 2$ -микроглобулину // Биохимия. 2013. Т. 78. Вып. 10. С. 1436-1447.
- 4 Мельникова В.И., Хегай И. И., Афанасьева М.А., Иванова Л. Н., Захарова Л. А. Экспрессия RT1A-молекулы ГКГ I класса в опухоли WALKER 256 после трансплантации крысам Brattleboro с генетическим дефектом синтеза аргинин-вазопрессина // Известия РАН. Серия биол. 2013. № 1. С. 99-102.
- 5 Шарова В.С., Извольская М.С., Захарова Л.А. Влияние пренатального инфицирования мышей бактериальным эндотоксином на миграцию нейронов, синтезирующих гонадотропин-рилизинг гормон // Докл. РАН. 2013. Т. 452. № 1. С. 273-276.
- 6 Степанова А.А., Карпова Я.Д., Божок Г.А., Устиченко В.Д., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Вагида М.С., Казанский Д.Б., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. Протеасомы при аллотрансплантации ткани щитовидной железы в условиях индукции донорспецифической толерантности у крыс // Биоорганическая химия. 2014 г. Т. 40. № 1. С. 42-54.
- 7 Люпина Ю.В., Орлова А.Ш., Горностаев Н.Г., Карпова Я.Д., Михайлов В.С., Шарова Н.П. Пластичность нервной и иммунной систем у различных организмов: возможная роль протеасом // Журнал общей биологии. 2014. Т.75. № 1. С. 3-24.
- 8 Шарова Н.П., Сумеди И.Р., Астахова Т.М., Плеханова А.С., Люпина Ю.В., Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Родоман Г. В. Диагностика рака щитовидной железы: ограничения существующих методов и перспективы будущих разработок // Известия Ран. Сер. Биол. 2014. №4. С. 348-354

- 9 Орлова А.Ш., Люпина Ю.В., Абатурова С.Б., Шарова Н.П. Особенности экспрессии иммунных протеасом в развитии центральной нервной системы у крыс // Биоорганическая химия. 2014 г. Т. 40. № 6. С. 703-711.
- 10 Shashova E.E., Lyupina Yu.V., Glushchenko S.A., Slonimskaya E.M., Savenkova O.V., Kulikov A.M., Gornostaev N.G., Kondakova I.V., Sharova N.P. Proteasome Functioning in Breast Cancer: Connection with Clinical-Pathological Factors // Plos One. 2014. V. 9. No 10. P. 1-11. Published: October 17, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0109933.
- 11 Orlova A., Lyupina Y., Sharova N. Differences of expression of transcription factor Zif268, proteasome subunits and regulators in the brain stem and frontal cortex of two rat strains. Abstracts of the 30th International Congress of Clinical Neurophysiology (ICCN) of the IFCN, March 20–23, 2014, Berlin, Germany // Clinical Neurophysiology. 2014. V. 125. Supplement 1. P. S230.
- 12 Хегай И.И., Мельникова В.И., Попова Н.А., Захарова Л.А., Иванова Л.Н. Зависимость роста гепатомы Зайделя от уровня экспрессии гена вазопрессина у крыс // Докл. РАН. 2014. Т.457. № 1. С. 222-224.
- 13 Мельникова В.И., Захарова Л.А., Хегай И.И., Иванова Л.Н. Особенности экспрессии RT1A молекулы ГКГ класса I и протеасом в клеточных фракциях асцитной гепатомы Зайделя // Докл. РАН. 2014. Т. 457. № 1. С. 152-154.
- 14 Мельникова В.И., Хегай И.И., Попова Н.А., Лифанцева Н.В., Иванова Л.Н., Захарова Л.А. Особенности экспрессии иммунных протеасом в асцитной гепатоме Зайделя, имплантированной крысам Brattleboro // Биоорганическая химия, 2014. Т. 40, № 6. С. 712–719.
- 15 Шарова В.С., Извольская М.С., Тие И., Воронова С.Н., Захарова Л.А. Морфогенетический эффект бактериального эндотоксина липополисахарида на функционирование репродуктивной системы крыс // Докл. РАН. 2014. Т. 455. №. 1. С. 79-82.
- 16 Захарова Л.А. Пластичность нейроэндокринной и иммунной систем в раннем развитии // Известия РАН. Серия биол. 2014. № 5. С. 437–447.
- 17 Belogurov A. Jr., Kuzina E., Kudriaeva A., Kononikhin A., Kovalchuk S., Surina Ye., Smirnov I., Lomakin Y.a, Bacheva A., Stepanov A., Karpova Ya., Lyupina Yu., Kharybin O., Melamed D., Ponomarenko N., Sharova N., Nikolaev E., Gabibov A. Ubiquitin-independent proteosomal degradation of myelin basic protein contributes to development of neurodegenerative autoimmunity // The FASEB Journal. 2015. V. 29, No 5. P. 1901-1913. fj.14-259333. Published online January 29, doi: 10.1096/fj.14-259333.

- 18 Бродский В.Я., Шарова Н.П., Мальченко Л.А., Конченко Д.С., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д.** Блокирование активности протеасом нарушает ритм синтеза белка – маркера прямых межклеточных взаимодействий // *Онтогенез*. 2015. Т. 46. № 1. С. 44-52.
- 19 Рендаков Н.Л., Лысенко Л.А., Люпина Ю.В., Шарова Н.П., Сельверова Н.Б., Немова Н.Н.** Роль лизосомальных протеиназ и эстрадиола в нейродегенерации, индуцированной бета-амилоидом // *Доклады АН (Биохимия, биофизика, молекулярная биология)*. 2015. Т. 463, № 1, С. 112-115.
- 20 Захарова Л.А.** Перинатальный стресс в программировании мозга и патогенезе психоневрологических заболеваний // *Известия РАН. Серия биол.* 2015. № 1. С. 1–10.
- 21 Мельникова В.И., Лифанцева Н.В., Воронова С.Н., Захарова Л.А.** Отдаленные последствия пренатальной блокады рецепторов к гонадотропин-рилизинг гормону в тимусе крыс // *Доклады АН*. 2015. Т. 462. №5, С. 613–615.
- 22 Sharova V.S., Izvolskaia M.S., Zakharova L.A.** Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation affects the Gonadotropin-Releasing Hormone neuron development in fetal mice // *Neuroimmunomodulation*. 2015. V. 22(4). P. 222–232.
- 23 Ivashkin E., Khabarova M., Melnikova V. Et al.** Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // *Cell Repots*. 2015. V.12. P. 1-15
- 24 Лифанцева Н.В., Конеева Ц.О., Воронова С.Н., Захарова Л.А., Мельникова В.И.** Подавление синтеза дофамина у плодов изменяет паттерн созревания Т-лимфоцитов в тимусе половозрелых крыс // *Доклады АН (биохимия, биофизика и молекулярная биология)*. 2016. Т. 470. № 3. С. 357-359. DOI: 10.7868/S0869565216270268.
- 25 Становова М.В., Ерохов П.А., Горностаев Н.Г., Михайлов В.С., Люпина Ю.В.** Роль протеасом в неспецифическом иммунном ответе у морских аннелид // *ДАН- биохимия, биофизика, молекулярная биология*, 2016, Т. 471, № 4, С. 492-494.
- 26 Степанова А.А., Люпина Ю.В., Шарова Н. П., Ерохов П. А.** Нативная структура иммунных протеасом печени крысы // *Доклады АН (биохимия, биофизика, молекулярная биология)*. 2016.Т. 468. № 3.С. 339–341
- Izvolskaia M.S., Tillet Y., Sharova V.S., Voronova S.N. Zakharova L.A.** Disruptions in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis in rat offspring following prenatal maternal exposure to lipopolysaccharide // *Stress, Early Online*: 1–8. 2016. Taylor&Francis. DOI: 10.3109/10253890.2016.1149695. // *Stress*. 2016. V. 19. №(2). P. 198-205. DOI: 10.3109/10253890.
- 27 Morozov A.V., Kulikova A.A., Astakhova T.M., Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Adzhubei A.A., Erokhov P.A., Evgen'ev M.B., Sharova N.P., Karpov V.L., Makarov A.A.** Amyloid- β increases activity of proteasomes capped with 19S and 11S regulators // *J. Alzheimer Dis*. 2016. V. 54. No 2. P. 763-776. DOI: 10.3233/JAD-160491.

- 28 **Stepanova A.**, Shurubor Ye., Valsecchi F., Manfredi G., Galkin A. Differential susceptibility of mitochondrial complex II to inhibition by oxaloacetate in brain and heart // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2016. V. 1857. P. 1561-1568. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.06.002.
- 29 **Становова М.В., Ерохов П.А., Косевич И.А., Михайлов В.С., Люпина Ю.В.** Роль протеасом в развитии воспаления у *Arenicola Marina* (Annelida: Polychaeta) // Acta Naturae. 2016. Спецвыпуск. Т. 1. С. 210.
- 30 **Шарова Н.П., Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Ерохов П.А., Астахова Т.М.** Иммунные протеасомы в раннем онтогенезе иммунной системы крысы // Acta Naturae. 2016. Спецвыпуск. Т. 2. С. 192.

Запланированный в ГЗ на 2013-2016 годы показатель, характеризующий объем работ, выполнен.

Прочие публикации

- 31 **Астахова Т.М., Шарова Н.П., Сумеди И.Р., Плеханова А.С., Родоман Г.В., Люпина Ю.В., Карпова Я.Д., Горелова В.С., Богомяккова Ю.В.** Способ интраоперационной диагностики рака щитовидной железы. Патент на изобретение № 2521239 от 29 апреля 2014 г. РФ. (Регистр. № 2013108352 от 26.02.2013).
- 32 Родоман Г.В., Сумеди И.Р., Шалаева Т.И., Плеханова А.С., **Шарова Н.П., Астахова Т.М.** Новый тест дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей щитовидной железы // Лечебное дело. 2015. № 3. С. 72-76.
- 33 **Мельникова В.И., Шарова В.С., Извольская М.С., Воронова С.Н., Захарова Л.А.** Отдаленные последствия пренатального дефицита гонадотропин-рилизинг гормона (ГРГ) на функционирование иммунной и репродуктивной систем крыс // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9. № 1. С.132-134.
- 34 **Захарова Л.А., Лифанцева Н.В., Шарова В.С., Извольская М.С., Воронова С.Н., Мельникова В.И.** Нейрогормональная регуляция развития иммунной и репродуктивной систем крыс // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10. (19), № 2 (1). С. 196-198
- 35 **Извольская М.С., Игнатюк В.М., Воронова В.Н., Захарова Л.А.** Половые стероиды в развитии аномалий полового созревания у крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию липополисахаридом // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10. (19), № 2 (1). С. 198-200
- 36 **Карпова Я.Д., Устиченко В.Д., Божок Г.А., Степанова А.А., Люпина Ю.В., Шарова Н.П.** Особенности иммунного ответа при трансплантации щитовидной железы крыс и индукции донорспецифической толерантности // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10. № 2. С. 88-90.

Отчет утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «27» декабря 2016 г., Протокол № 14