

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Направление «Медицина»

Кафедра патологии

Допускается к защите
Заведующий кафедрой
Чурилов Л.П.
«__»_____2017 г.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ (ДИПЛОМНАЯ) РАБОТА
НА ТЕМУ: «ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
НЕЙРОГЕНЕЗА У ПЛОДОВ»**

Выполнила:
студентка 11.С10-М группы
Перминова Анастасия Аркадьевна

Научный руководитель:
д.м.н., проф.
Цинзерлинг Всеволод Александрович

Санкт-Петербург
2017 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	4
1.1 Эмбриональное развитие центральной нервной системы.....	4
1.2 NeuN.....	8
1.3 Ki67	14
1.4 PCNA.....	20
1.5 SOX2	26
1.6 Nestin (Нестин).....	31
1.7 Musashi 1	37
1.8 Коэкспрессия.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1 Объем и характеристика исследуемого материала	43
2.2 Методы исследования головного мозга плодов.....	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	45
3.1 Обзорная окраска гематоксилином и эозином	45
3.2 Иммуногистохимическая реакция на NeuN	47
3.3 Иммуногистохимическая реакция на Ki67.....	53
3.4 Иммуногистохимическая реакция на PCNA	57
3.5 Иммуногистохимическая реакция на SOX2.....	60
3.6 Иммуногистохимическая реакция на Nestin	65
3.7 Иммуногистохимическая реакция на Musashi1	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	69
ВЫВОДЫ.....	71
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	72

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CDK – cyclin dependent kinase

GFAP – glial fibrillary acidic protein

IDCLs – interdomain-connecting loops

Msi1 – musashi 1

PABP – poly(A)-binding protein

PAX6 – paired box protein 6

PCNA – proliferating cell nuclear antigen

PIP-box – PCNA-interacting peptide box

SOX2 – sex determining region Y box 2

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Обнаружение возможности образования новых нейронов и межнейронных связей, а также пула нейральных стволовых клеток в ткани взрослого мозга привело к настоящей революции в нейронауках [232, 112]. Благодаря этим открытиям появилась возможность разрабатывать принципиально новые способы лечения многих инвалидизирующих заболеваний нервной системы [132]. Однако, несмотря на активное изучение постнатального нейрогенеза, необходимо признать, что на сегодняшний день не до конца исследованы многие аспекты формирования нервной системы в пренатальном периоде. Это, в свою очередь, создает немалые трудности для понимания процессов репаративного нейрогенеза. Остается много неясного и в патогенезе разнообразных по этиологии внутриутробных поражений головного мозга, что необходимо для разработки способов лечения заболеваний нервной системы.

До сих пор остается практически неизученным профиль экспрессии маркеров пролиферирующих, созревающих и уже дифференцированных нервных клеток в ткани мозга плода. Тем временем, это представляет собой значительный интерес, поскольку, во-первых, существенно дополняет представления о нейрогенезе, протекающем в физиологических условиях, а, во-вторых, дает возможность более точно соотносить между собой процессы, происходящие при физиологическом нейрогенезе и при разнообразных поражениях нервной ткани.

Таким образом, всестороннее изучение процессов нейрогенеза в формирующемся в период внутриутробного развития мозге в дальнейшем позволит понять как сами механизмы регенерации нейронов, так и особенности восстановления нервной ткани в головном мозге людей разного возраста, что, в свою очередь, необходимо для разработки эффективных методов коррекции неврологических нарушений, связанных с гибелью нервных клеток в результате патологического процесса.

Цель исследования.

Изучение процессов нейрогенеза в мозге плода с помощью метода иммуногистохимии.

Задачи исследования:

1. Изучение распределения белков NeuN, Ki67, PCNA, SOX2, Nestin и Musashi1 в клетках нервной ткани в коре, белом веществе и герминативном центре мозга плода.
2. Выявление особенностей пролиферации, миграции и последующей дифференцировки (прежде всего в нейробласты и нейроны) нейральных стволовых клеток.
3. Составление иммуногистохимической характеристики нейрогенеза (у плодов).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эмбриональное развитие центральной нервной системы

Эмбриональное развитие центральной нервной системы начинается с процесса нейруляции. Нейруляция – процесс образования нервной трубки у хордовых (в том числе и у человека). Нейруляция начинается на 19-й день эмбрионального развития с формирования нервной пластинки, являющейся утолщением участка эктодермы. Следует отметить, что у эмбрионов человека головной регион нервной пластинки значительно больше, чем закладка спинного мозга. Затем на границе нервной пластинки возникают нервные валики, посередине между которыми появляется углубление – нервный желобок.

Из нервных валиков формируются нервные складки, которые, соединяясь друг с другом, образуют нервную трубку. Нервная трубка начинает формироваться на 22-23-й день эмбриогенеза, причем вначале смыкание нервных складок происходит на границе среднего и заднего мозга, откуда начинается движение роstralной и каудальной волн замыкания нервной трубки. В конечном итоге нейроэктодерма (клетки, выстилающие нервную

трубку), погружаясь, окончательно отшнуровывается от эктодермы. При этом клетки, располагавшиеся на границе нервной пластинки, формируют нервный гребень (из которого впоследствии развиваются спинальные и вегетативные ганглии, шванновские клетки, меланоциты, хромоаффинные клетки надпочечников и др.) [7, 11, 13].

На большей части длины нервная трубка замыкается к 24-25-м суткам. Замыкание нервной трубки окончательно завершается при закрытии переднего и заднего нейропоры. С закрытием заднего нейропора оканчивается процесс нейруляции [11].

Нервная трубка дает начало мозгу. Поначалу клетки, выстилающие нервную трубку, представлены медуллобластами, которые впоследствии дифференцируются в двух направлениях: нейробласты (предшественники нейронов) и спонгиобласты (предшественники нейроглии). В дальнейшем в стенке нервной трубки можно выделить три слоя: эпендимный (из него в дальнейшем возникает эпендима), плащевой (содержит нейробласты) и краевую вуаль (зачаток белого вещества) [7].

Головной отдел нервной трубки в связи с неравномерностью роста образует следующие друг за другом расширения – мозговые пузыри. На 3-й неделе внутриутробного развития формирующийся головной мозг представлен тремя мозговыми пузырями – передним (prosencephalon), средним (mesencephalon) и ромбовидным (rhombencephalon). Из полости ромбовидного мозгового пузыря впоследствии возникнет четвертый желудочек (ventriculus quartus), а из полости среднего – водопровод мозга (aqueductus cerebri). На 5-й неделе внутриутробного развития (стадия пяти мозговых пузырей) из переднего мозга развивается конечный (telencephalon) и промежуточный (diencephalon) мозг, а из ромбовидного мозга – продолговатый (myelencephalon) и задний (metencephalon) мозг (рис. 1.1). Из полости промежуточного мозга возникает третий желудочек (ventriculus tertius), а из полости конечного – боковые желудочки (ventriculi laterales). Вследствие усиленного роста в головном отделе нервной трубки образуется три изгиба – два вентральных

(теменной на уровне среднего мозгового пузыря и затылочный на уровне перехода спинного мозга в продолговатый) и один дорсальный (мостовой) [7, 12, 13].

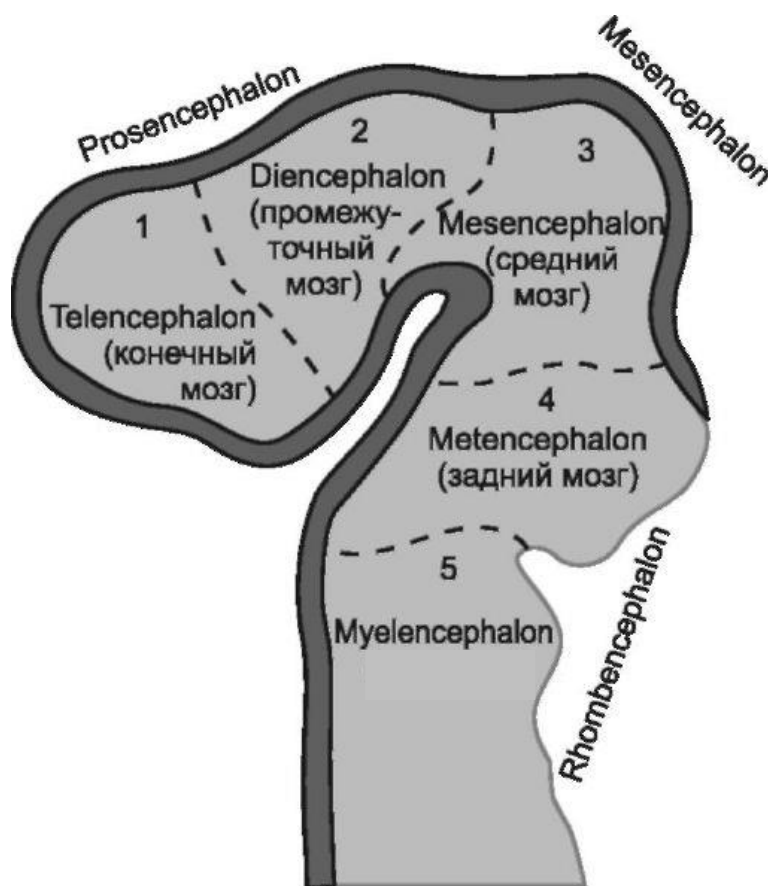


Рис. 1.1. Развитие головного мозга. Стадия пяти мозговых пузырей [12]

Дальнейшее преобразование отделов головного мозга заключается в неравномерном росте отдельных частей его стенки, формировании складок, а также в дифференцировке клеток, выстилающих мозговые пузыри. В головном мозге, в отличие от спинного, серое вещество образуется не только внутри, но и снаружи от белого вещества. Впоследствии кора головного мозга приобретает слоистое строение [7].

На 50-51-е сутки эмбрионального развития начинается цитологическая дифференцировка в полушариях переднего мозга: между клетками закладки полушарий возникают синапсы, дифференцируются волокна, соединяющие ядра перегородки и обонятельной луковицы. На 52-53-и сутки формируется закладка неокортекса – нейробласты из перивентрикулярной герминативной зоны мигрируют по клеткам радиальной глии в область будущей коры [11].

При гистологическом исследовании на 8-й неделе внутриутробного развития в больших полушариях головного мозга можно выделить 5 зон: вентрикулярная герминативная зона (состоит из активно делящихся бластных клеток), белое вещество, субкортикальный слой, кортикальная пластинка (состоит из дифференцирующихся нейронов), краевой сетчатый слой. С увеличением срока гестации вентрикулярная герминативная зона уменьшается в размерах и к 32-33-й неделям встречается в виде островков в перивентрикулярных областях [13].

Развитие центральной нервной системы во втором триместре беременности проявляется интенсивным ростом и дифференцировкой всех отделов головного мозга. При этом на 2-4-м месяце гестации наблюдается пик нейрональной пролиферации (приводит к увеличению объема ткани головного мозга), а на 5-6-м месяце – пик миграции созревающих клеток (является причиной усложнения структуры головного мозга). Полушария головного мозга заканчивают формирование к 27-й неделе внутриутробного развития [11, 13].

На 22-27-й неделях гестации в неокортексе можно идентифицировать слои с I по III. I-й слой – молекулярный, с 23-й недели внутриутробного развития разделяется на два подслоя – наружный (густоклеточный, в нем располагаются клетки Кахаля-Ретциуса) и внутренний (редкоклеточный, представлен в основном нервными отростками). II-й слой – наружный зернистый, представлен густо расположенными и упорядоченными в вертикальные колонки нейронами. III-й слой – наружный пирамидный, на 23-24-й неделе гестации состоит из округло-овальных нейронов, имеющих незначительный объем цитоплазмы. С 25-й недели гестации в этом слое можно наблюдать единичные пирамидные нейроны (особенно в области прецентральной извилины). IV-й, или внутренний зернистый, слой можно обнаружить начиная с 27-й недели внутриутробного развития только в области прецентральной извилины. С 27-й недели гестации намечается разграничение

V-го и VI-го (внутренний пирамидный и мультиморфный) слоев неокортекса [11, 13].

Белое вещество представлено по большей части отростками нейронов, между которыми располагаются сосуды, небольшое количество глиальных клеток, а также клетки, мигрирующие из герминативного центра по направлению к коре.

Вентрикулярная герминативная зона представлена множеством нейро- и глиобластов, среди которых можно выделить клетки с эу- и гетерохроматичными ядрами. Между бластными клетками расположены сосуды капиллярного типа с широким просветом и тонкими стенками.

Граница между вентрикулярной герминативной зоной и полостью желудочков выстлана эпендимой. Среди клеток эпендимы выделяют E-, B-, C- и A-клетки. [] E-клетки модулируют пролиферацию субвентрикулярной зоны и экспрессируют S100 β и CD24. B-клетки (подразделяются на подтипы B1 и B2) – предшественники астроцитов, они экспрессируют GFAP (glial fibrillary acidic protein), GLAST (astrocyte-specific glutamate-aspartate transporter), BLBP (brain lipid binding protein), нестин. B1-клетки дифференцируются в быстро делящиеся C-клетки. Для выявления последних используют маркеры Mash1 (mammalian achaete-scute complex homolog-1), EGFR (epidermal growth factor receptor). Из C-клеток возникают A-клетки – нейробласты, экспрессирующие даблкортин [37, 81, 122, 176].

1.2 NeuN

NeuN (neuronal nuclear protein) был открыт в 1992 году, когда группе исследователей удалось получить моноклональные антитела (клон А60) к неизвестному ранее растворимому ядерному белку [156]. В настоящее время антитела к белку NeuN широко используются как в научных исследованиях (в области неврологии, биологии развития, гистологии, биологии стволовых клеток), так и в гистологической диагностике (преимущественно в

нейроонкологии) в качестве универсального нейронспецифичного маркера при изучении процесса дифференцировки стволовых клеток [215].

NeuN – белок, локализующийся в ядрах и, в меньшей степени, перинуклеарной цитоплазме и проксимальной части отростков большинства нейронов ЦНС у позвоночных [156]. В дистальной части аксонов и ветвях дендритов белок NeuN не обнаруживается. Преимущественная локализация этого маркера в ядре не создает трудностей для его детекции в том числе и в клетках с малым количеством цитоплазмы (нейробласты, мелкие нейроны). Кроме того, NeuN высоко консервативен у позвоночных и стабильно экспрессируется у них на различных стадиях развития [53]. Однако были обнаружены некоторые типы нейронов, в которых реакция на NeuN была положительна в цитоплазме, но отсутствовала в ядре (зернистые нейроны мозжечка, клетки Догеля II типа в симпатических ганглиях энтеральной нервной системы) [160]. Кроме того, при исследовании мозга пациентов с ВИЧ-ассоциированным нейрокогнитивным расстройством белок NeuN выявлялся преимущественно в цитоплазме и аксонах, хотя были обнаружены и нейроны с положительной реакцией на NeuN как в ядре, так и в цитоплазме [137].

Комплексное иммуногистохимическое исследование позволило заключить, что белок NeuN на протяжении всего онтогенеза ассоциирован исключительно с нервной тканью (NeuN не выявлялся ни в каких других тканях), в отличие от других маркеров нейрональной дифференцировки, таких как, например, MAP-2 (который помимо нервной ткани обнаруживается также в скелетных мышцах и эпителии), синаптофизин (положительную реакцию дают не только нервные, но и нейроэндокринные клетки) и нейрон-специфическая енолаза (может выявляться в астроцитах) [9]. Кроме того, NeuN никогда не был обнаружен в глиальных клетках, что позволило сделать вывод о его нейронспецифичности.

Белок NeuN был обнаружен в нейронах спинного мозга, коры головного мозга, гиппокампе, дорсальном таламусе, в базальных ядрах (nucleus caudatus, putamen) и мозжечке. [156, 182].

По данным литературы, реакция на белок NeuN положительна в опухолях нейрального происхождения (нейроцитомы, ганглиоцитомы, медуллобластомы) [224, 194].

Однако в некоторых типах нейронов NeuN не выявляется. В частности, к ним относятся клетки Кахаля-Ретциуса в неокортексе, ряд клеток мозжечка (клетки Пуркинье, звездчатые и корзинчатые клетки, клетки Гольджи и др.), нейроны нижних олив, митральные клетки обонятельных луковиц, клетки внутреннего ядерного слоя сетчатки [156, 224], γ -мотонейроны спинного мозга [190], нейроны ганглиев симпатического ствола [224]. Причины отсутствия выявления NeuN в этих клетках остаются до сих пор невыясненными. Небезынтересно заметить, что в нейронах основания моста на протяжении практически всего онтогенеза выявляется NeuN, в то время как в нейронах нижних олив (имеющих общее происхождение с нейронами основания моста) белок NeuN отсутствует [182].

Следует также учитывать, что экспрессия NeuN может сильно отличаться в зависимости от вида: в нейронах черной субстанции (в *pars reticulata*) крыс обнаружена сильная экспрессия NeuN, в то время как у песчанок в тех же нейронах экспрессия NeuN отсутствует [124].

Принято считать, что NeuN появляется на ранних этапах эмбрионального развития в постмитотических нейробластах и на протяжении всего онтогенеза сохраняется в дифференцирующихся и терминально дифференцированных нейронах [2]. Белок NeuN начинает синтезироваться в постмитотических нейробластах на довольно поздних стадиях дифференцировки и знаменует собой выход из клеточного цикла [10].

Существует две изоформы белка NeuN – 46 и 48 кДа (предположительно различаются короткой аминокислотной последовательностью). При этом изоформа с массой 48 кДа всегда преобладает в перинуклеарной цитоплазме, в то время как в ядре в приблизительно равной степени представлены обе изоформы этого белка (изоформа 46 кДа представлена в несколько большем количестве) [133].

В ядре NeuN располагается преимущественно в областях с низкой плотностью хроматина и отсутствует в участках с плотно упакованной ДНК [156]. Большая часть NeuN, расположенного в ядре, связана с ядерным матриксом [49]. Было показано, что белок NeuN играет определенную роль в нейроспецифическом альтернативном сплайсинге [115], который вносит значительный вклад в регуляцию дифференцировки нейронов позвоночных животных [116], для чего NeuN постоянно перемещается между нуклеоплазмой и ядерным матриксом [49].

In vitro было показано, что NeuN способен связываться с ДНК (неизвестно, насколько специфично это связывание), что, в свою очередь, позволило предположить, что белок NeuN является регуляторной молекулой, функционирующей на уровне ядра [156]. Однако в настоящее время считается более важной способностью белка NeuN связываться не с ДНК, а с РНК, выполняя регуляторную функцию при альтернативном сплайсинге (на данный момент неизвестно, в регуляции экспрессии каких генов задействован NeuN) [48]. Таким образом, NeuN может быть постоянным регулятором нейронального фенотипа (предполагается, что в тех клетках, где NeuN не экспрессируется, есть другой белок, выполняющий аналогичную функцию) [2].

Экспрессия белка NeuN (как в ядре, так и в цитоплазме нейронов) может различаться даже в пределах клеток одного типа – в частности, у человека среди нейронов черного вещества были обнаружены как слабо иммунопозитивные, так и иммунонегативные клетки. Кроме того, в нервных клетках анатомически близко расположенного красного ядра концентрация NeuN значительно выше, чем в нейронах черного вещества [15].

Однако до сих пор не удается выявить четкой корреляции между уровнем экспрессии NeuN (и, соответственно, между уровнем NeuN-иммунореактивности) и определенным типом нервных клеток. При этом различия в экспрессии NeuN могут быть обусловлены как конститутивными особенностями нейрона, так и его функциональным состоянием [2]. В частности, ишемическое повреждение [6], травма головного мозга и гипоксия

[97] приводят к утрате положительной реакции на NeuN в нейронах, что можно объяснить не только гибелью нервных клеток, но и временным прекращением синтеза белка NeuN в жизнеспособных, но поврежденных нейронах, а также потерей способности белка NeuN связываться со своими антителами [213].

Следует также учитывать, что при повреждении нервной системы, в частности, аксональном повреждении мотонейронов лицевого нерва, происходит почти полная утрата NeuN-иммунореактивности в этих нейронах (однако в течение 7 дней после повреждения начинается постепенное восстановление экспрессии NeuN, которое завершается к 18-му дню). В то же время пересечение руброспинального тракта вызывает только небольшое снижение NeuN-иммунореактивности в нервных клетках красного ядра [149].

Таким образом, потеря нейронами NeuN-иммунореактивности говорит лишь о наличии повреждения в нейронах, а не об их гибели, что, в свою очередь, необходимо учитывать при обработке данных.

Отрицательная иммуногистохимическая реакция на белок NeuN может быть обусловлена отсутствием экспрессии NeuN в клетках (например, многие дофаминергические нейроны черной субстанции при болезни Паркинсона перестают экспрессировать NeuN [39]), слишком малым количеством этого белка в нейронах, а также отсутствием фосфорилированных форм белка NeuN (показано, что нефосфорилированные формы белка NeuN не связываются с антителами). [133]. Предполагается, что нефосфорилированные формы NeuN участвуют в белок-белковых взаимодействиях, что мешает им связываться с антителами [146]. Снижением иммуногенности обусловлена, скорее всего, отрицательная реакция на NeuN у жизнеспособных нейронов при ишемическом повреждении [213].

Долгое время оставалась неизвестной нуклеотидная последовательность, кодирующая белок NeuN. В ходе исследований, опубликованных в 2009 году [114] было доказано, что белок NeuN является продуктом гена Fox-3 (этот ген у млекопитающих является гомологом гена Fox-1 *C. elegans*). В частности, было показано, что, во-первых, характер окрашивания при проведении

иммуногистохимической реакции с антителами к Fox-3 полностью идентичен реакции на NeuN. Во-вторых, оказалось, что Fox-3, как и NeuN экспрессируется только в нервной ткани. И, наконец, в-третьих, выяснилось, что при использовании малых РНК, которые образуют шпильки против Fox-3 (РНК-интерференция), наблюдается уменьшение экспрессии белка NeuN. Кроме того, в ходе этого исследования была установлена первичная структура белка Fox-3: в его состав входят 374 аминокислоты, белок может существовать в четырех изоформах, которые, в свою очередь, образуются при альтернативном сплайсинге мРНК. Было также установлено, что эпитоп, с которым связываются антитела к NeuN, располагается в N-концевом домене [146]. Кроме того, Fox-3 способен негативно регулировать работу Fox-2 (тоже является гомологом Fox-1, регулирующим альтернативный сплайсинг) [52].

Семейство генов Fox-1 (известное также как Rbfox-1), к которому принадлежит ген Fox-3 (он же Rbfox-3), является членом семейства факторов сплайсинга. Ген Fox-3 у человека расположен в 17-й хромосоме, содержит 15 экзонов. Нуклеотидная последовательность гена Fox-3 на 89% идентична у мыши и человека и на 90% – у крысы и человека (Fox-3 белок – на 98,9% и 83,9% соответственно) [191]. Известно, что мутации в гене Fox-3 вовлечены в развитие таких заболеваний как идиопатическая эпилепсия, синдром дефицита внимания, задержка умственного развития [26, 57, 125].

Экспрессия NeuN редко встречается у не начавших мигрировать нейробластов, чаще всего NeuN начинает активно экспрессироваться в последних только после миграции. В 19-22-недельной коре NeuN выявляется только в глубоких слоях – в клетках предшественниках, из которых впоследствии образуется IV-VI слои коры. После 24-й недели уже большинство нейронов обнаруживают положительную реакцию на NeuN (кроме II слоя коры). В мозжечке не начавшие мигрировать клетки внешнего гранулярного слоя экспрессируют NeuN начиная с 24-й недели или даже раньше, в то время как мигрировавшие клетки внутреннего гранулярного слоя не экспрессируют NeuN [156, 224]. В гиппокампе первые клетки, экспрессирующие NeuN

начинают выявляться в маргинальной зоне уже с 9-й недели гестации. После 14-й недели NeuN-позитивные клетки обнаруживаются и в пластинке гиппокампа. Плотность NeuN-позитивных клеток в гиппокампе достигает максимума к 22-й неделе (причем в *cornu ammonis* их намного больше, чем в *gyrus dentatus*) [229].

Небезынтересно заметить, что существует перекрестная реактивность с синапсином I (нейроноспецифичный белок, ассоциированный с синаптическими везикулами) при проведении иммуноблоттинга (но не иммуногистохимического исследования) с использованием антител к NeuN клона А60, которая, вероятнее всего, обусловлена наличием у обоих белков фрагмента из 14 гомологичных аминокислотных остатков. Возможно, часть этого фрагмента участвует в формировании эпитопа, который распознается антителами к NeuN (клон А60) [2, 114]. Однако следует заметить, что структура этого эпитопа и условия связывания с ним антител клона А60 остаются до сих пор плохо изученными.

С практической точки зрения следует учитывать, что при длительной (в течение нескольких месяцев или лет) фиксации в формалине NeuN-иммунореактивность снижается. Кроме того, при использовании NeuN для исследования клеточных культур было обнаружено, что положительную реакцию на этот маркер дают не только нейроны, но и астроциты и фибробласты линии 3Т3 [47].

1.3 Ki67

Белок Ki67 – один из наиболее широко используемых маркеров пролиферации (как в нормальных, так и в опухолевых клетках) [71]. Название этого антигена связано с местом синтеза первых антител к нему (Киль), а также с номером лунки, где эти антитела были получены (67-я).

Белок Ki67 выявляется в ядрах клеток во все активные фазы клеточного цикла: G1, S, G2, M. Следует учитывать, что распределение и количество белка Ki67 различается в зависимости от конкретной фазы клеточного цикла. От

фазы G1 к фазе M количество антигена Ki67 неуклонно увеличивается, достигая максимума во время метафазы митоза [32]. В самом начале фазы G1 локализация Ki67 совпадает с локализацией сателлитной ДНК, которая локализуется в центромерах и теломерах хромосом. Однако при прогрессии фазы G1 эта колокализация исчезает [36], и уже в середине фазы G1 белок Ki67 начинает обнаруживаться в ядрышках, а в фазу G2 – как в ядрышках, так и в кариоплазме [70, 189]. Заметное перераспределение локализации белка Ki67 в клетке происходит во время митоза. В профазу он образует тонкую сеть, ассоциированную с конденсированным хроматином. В метафазу сетчатая структура, образованная белком Ki67, окружает отдельные хромосомы. После разрушения ядерной мембраны часть белка Ki67 распределяется диффузно по цитоплазме. В анафазу и телофазу митоза количество Ki67 в клетках начинает быстро снижаться [32, 216].

В случае же перехода клетки после митоза в фазу G0, антиген Ki67 быстро подвергается катаболизму и перестает выявляться в ядрах интерфазных клеток [148]. Однако было показано, что белок Ki67 выявляется не только в активно пролиферирующих клетках, но и в клетках, у которых присутствует гиперэкспрессия p53 и p21, вызванная блокировкой репликации или повреждением ДНК [162].

Повышение уровня Ki67 в клетках в период от G1 вплоть до метафазы митоза нельзя объяснить простым накоплением этого белка, синтезированного в течение этого отрезка времени, поскольку период полураспада белка Ki67 слишком короткий (около 90 минут [83]). Таким образом, увеличение количества белка Ki67 в клетках должно быть связано с его четко отрегулированным синтезом *de novo* и эффективным процессом деградации [186].

Весь локус гена Ki67 представлен 29965 парами оснований, локализованных в длинном плече 10-й хромосомы (10q25-ter). Этот ген состоит из 15 экзонов (размером от 67 до 6845 пар оснований) и 14 интронов (размером от 87 до 3569 пар оснований). Интересно заметить, что экзон 13 содержит

«центр» гена *Ki67*. Этот «центр», в свою очередь состоит из 16 гомологичных сегментов по 366 пар оснований (*Ki67* повторы). Каждый из этих гомологичных сегментов содержит высококонсервативный мотив из 66 пар оснований (*Ki67* мотив) [55].

У белка *Ki67* есть две изоформы массой 345 и 395 кДа, возникающие в результате альтернативного сплайсинга (эти изоформы отличаются друг от друга наличием либо отсутствием фрагмента, кодируемого экзоном 7) [55]. В N-конце молекулы протеина *Ki67* находится фосфопептид-связывающий FNA (Forkhead-associated) домен [91] и сайт связывания для протеиновой фосфатазы I (PP1) [30]. Далее следует 31-аминокислотный консервативный домен (CD-домен) с неизвестной функцией и *Ki67* домен, состоящий из 16-ти повторов. С-конец молекулы *Ki67* обогащен парами остатков лейцина и аргинина (LR-домен) (рис. 1.2) [201]. *Ki67* обладает амфифильной структурой: его короткий С-конец имеет сродство к хроматину, а длинный N-конец, в свою очередь, отталкивается от хроматина и имеет сродство к цитоплазме [45].

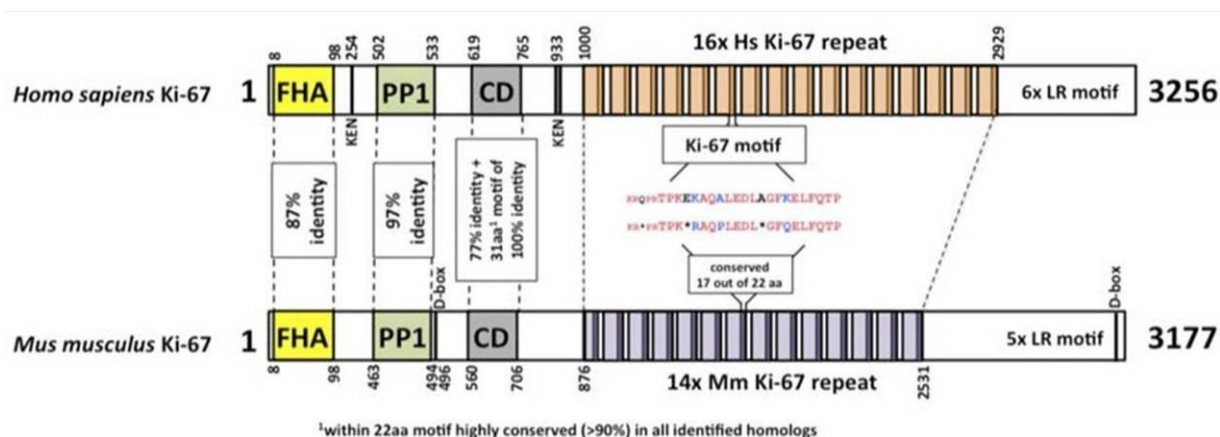


Рис. 1.2. Структурные элементы белка *Ki67* у человека и мыши [192]

Несмотря на то, что первичная структура антигена *Ki67* к настоящему времени изучена довольно хорошо, функция этого белка до сих пор остается неясной [185]. Это связано, в частности, с тем, что у *Ki67* нет гомологичных белков с известной функцией, а также с тем, что у белка *Ki67* большая молекулярная масса и высокая чувствительность к действию протеаз. *Ki67* обладает рядом структур, характерных для белков, участвующих в регуляции клеточного цикла. К таким структурам относятся потенциальные сайты для

фосфорилирования (143 сайта для протеинкиназы С, 89 сайтов для казеинкиназы II, 2 сайта для тирозинкиназы [186]), пролин-глутамин-серин-треонин (PEST)-последовательности (имеются в составе многих короткоживущих белков), домен для связывания с вилкой репликации [54].

Было обнаружено, что при инкубации клеточной культуры (линия IM-9) с олигонуклеотидами, комплементарными мРНК белка Ki67, происходит ингибирование синтеза ДНК, что говорит в пользу того, что Ki67 может являться новым негистоновым белком, ассоциированным с клеточным циклом [185].

Показано, что Ki67 претерпевает посттрансляционные модификации путем фосфорилирования, которые при митозе сопровождаются перераспределением Ki67 из нуклеоплазмы в перихромосомный слой и обратно. Процесс фосфорилирования и дефосфорилирования белка Ki67 контролируется ключевыми регуляторными механизмами клеточного цикла и происходит во время митоза при распаде и реорганизации ядра [147]. Ki67 – прямой субстрат циклин-зависимой киназы 1 (CDK-1) [27]. Протеин Ki67 взаимодействует и с рядом других белков, среди которых: ядерный белок NIFK [202], протеиновая фосфатаза 1 [30], 5 субъединиц гистонового метилазного комплекса (HCF1, HSPA8, MATRIN3, RBBP5 и WDR5) [68].

Хотя не похоже, что Ki67 является частью внутренней структуры митотических хромосом, его недостаток приводит к дефектам сборки ядрышка после митоза (но не вызывает при этом ингибирование процессинга пре-рРНК) [30] и дезорганизации интерфазного гетерохроматина. В случае же гиперэкспрессии Ki67 в клетках человека формируются эктопические участки, содержащие гетерохроматин. Белок Ki67 участвует не только в формировании гетерохроматина, но и в биогенезе рибосом и в РНК-полимераза-I-зависимом синтезе рРНК [173, 192].

Недавние исследования [45] показали, что белок Ki67 во время митоза выполняет ряд функций. В частности, Ki67 в профазу митоза обеспечивает прикрепление хромосом к ядерной мембране (в случае его недостатка

хромосомы конденсируются в отдельно лежащие тельца). Кроме того, белок Ki67 предотвращает склеивание хромосом в единую хроматиновую массу после растворения ядерной мембраны, обеспечивая таким образом независимое движение каждой хромосомы и точное ее взаимодействие с веретеном деления. При нехватке Ki67 нарушается формирование метафазных пластинок, и клетки практически никогда не входят в анафазу. Следует, однако, заметить, что хотя при нехватке Ki67 хромосомы и образуют единый конгломерат, их внутренняя структура остается интактной [30]. При этом функция разделения хромосом протеином Ki67 не ограничена каким-либо определенным доменом этого белка (любая часть белка Ki67 способна выполнять эту функцию при условии наличия LR-домена, отвечающего за связывание Ki67 с хромосомой), а коррелирует с суммарным зарядом и размером молекулы (Ki67 обладает очень большим положительным зарядом и является крупной молекулой), а также с наличием определенной вторичной структуры. Это говорит в пользу того, что Ki67 формирует стерический и электростатический барьер (наподобие поверхностно-активного агента – сурфактанта), препятствующий «склеиванию» хромосом друг с другом. В подтверждение этого с помощью флюоресцентной спектроскопии была обнаружена высокая плотность Ki67 на поверхности хромосом, а при нанесении двойной метки на обоих концах белка Ki67 выявлялась протяженная кистеподобная (brush-like) молекулярная конформация, характерная для полимерных сурфактантов [45].

Однако было показано, что клетки млекопитающих могут пролиферировать даже при отсутствии в них определяемого уровня белка Ki67 [192].

В настоящее время иммуногистохимическая реакция на белок Ki67 широко используется при анализе пролиферативной активности клеток, в особенности в опухолевых образованиях, что позволяет, в свою очередь, определить как гистологическую стадию конкретной опухоли, так и прогноз заболевания [14, 189]. При этом нельзя забывать, что оценка количества экспрессируемого Ki67 дает представление только о состоянии, но не о

скорости пролиферации. Следует также заметить, что иммуногистохимическое исследование на Ki67 более чувствительно для оценки пролиферативной активности, чем подсчет фигур митоза, поскольку позволяет выявлять клетки во всех активных фазах клеточного цикла [186].

Белок Ki67 можно использовать и для оценки процесса нейрогенеза у взрослых. Этот маркер, в отличие от бромдезоксипуридина не является токсичным и экспрессируется во все активные фазы клеточного цикла, а не только в S-фазу [110].

При исследовании эмбрионального развития гиппокампа было обнаружено, что Ki67-позитивные клетки присутствуют в нем в течение всего периода наблюдения (с 9-й по 32-ю неделю гестации). При этом наибольшее количество Ki67 выявлялось на 9-й неделе в *cornu ammonis*, а на 14-й неделе – в *gyrus dentatus*. На 9-й неделе Ki67 располагался в основном в вентрикулярной и интермедиальной зонах *cornu ammonis* гиппокампа, существенно уменьшаясь к 32-й неделе. В *gyrus dentatus* распределение Ki67-позитивных клеток на 9-й неделе было похоже на таковое в *cornu ammonis*, однако число Ki67-позитивных клеток резко увеличивалось в гранулярном слое к 14-й неделе, впоследствии уменьшаясь вплоть до 32-й недели [229].

Чаще всего к белку Ki67 используют антитела клонов MIB-1 (для работы с материалом, полученным от человека, крупного рогатого скота, собак, овец и лошадей) и MIB-5 (для работы с материалом, полученным от крыс и других грызунов) [73, 186, 195]. Раньше также широко применялись антитела клона Ki67, которые получали путем иммунизации мышей с помощью ядер клеток лимфомы Ходжкина клеточной линии L428 [72]. В настоящее время они используются редко, так как выявляют неустойчивый к формалиновой фиксации эпитоп антигена Ki67 [4].

1.4 PCNA

PCNA (proliferating cell nuclear antigen – ядерный антиген пролиферирующих клеток) наряду с Ki67 используется для выявления клеток, находящихся в состоянии пролиферации.

PCNA – высококонсервативный белок архебактерий и эукариот [198]. Исследования всех известных белков PCNA показали, что они консервативны в своей структуре и функции, а также в кодирующей их последовательности нуклеотидов [34, 171, 204]. Изначально PCNA был описан как фундаментальный вспомогательный белок, задействованный в процессах репликации и репарации ДНК. PCNA работает как передвижная платформа («скользящая скрепка» – sliding clamp), стабилизируя тем самым взаимодействие других белков с ДНК [111]. Небезынтересно заметить, что PCNA по своей структуре напоминает β -субъединицу прокариотической ДНК-полимеразы III, которая выполняет сходную функцию [167].

В своей структуре белок PCNA содержит три домена: N-концевой домен (аминокислоты 1-117), междоменные связующие петли (interdomain-connecting loops – IDCLs) (аминокислоты 118-135) и C-концевой домен (аминокислоты 136-261). IDCLs являются связующим звеном между N- и C-концевыми доменами [79, 167]. Было также показано, что домен IDCL – это большой сайт для связывания различных белков, таких как ДНК-полимераза δ , p21, ДНК-цитозин-5-метилтрансфераза (MeCTr), ДНК-лигаза 1 (LIG1), flap-эндонуклеаза 1 (FEN1) (LIG1 и FEN1 необходимы для сшивания фрагментов Оказаки), циклин D и др [66, 139]. При этом известно, что многие (но не все) белки и пептиды связываются с IDCL-доменом PCNA при помощи содержащегося в их структуре высококонсервативного мотива – так называемого PIP-бокса (бокса пептида, взаимодействующего с PCNA – PCNA-interacting peptide (PIP) box) [86, 103, 159]. Некоторые белки способны связываться с PCNA через N-концевой (циклин D) и C-концевой (ДНК-полимераза ϵ , циклин-зависимая киназа 2 (CDK2), фактор репликации C (RFC), GADD45) домены [167, 168].

Белок PCNA подвержен различным посттрансляционным модификациям, таким как: убиквитинирование, сумоилирование (SUMO – small ubiquitin-like modifier), метилирование, ацетилирование, фосфорилирование [167]. В частности, моноубиквитинирование PCNA по 164-у остатку лизина участвует в активации синтеза ДНК на поврежденной матрице (TLS) [212]. Сумоилирование PCNA по 164-у (и, в меньшей степени, по 127-у) остатку лизина приводит к ингибированию взаимодействия PIP-бокса белка и PCNA, а также привлекает Srs2-хеликазу, ингибирующую процесс рекомбинации (описано только у дрожжей) [167, 220]. Показано также, что метилирование PCNA ассоциировано с раком молочной железы [90].

Три PCNA-мономера, взаимодействуя по принципу «голова к хвосту» (head to tail), образуют гомотримерное кольцо (рис. 1.3) [123, 197]. Внутренняя поверхность кольца PCNA состоит из 12-и положительно заряженных α -спиралей, которые взаимодействуют с ДНК. В то же время снаружи гомотримера PCNA располагаются 54 β -складчатости и междоменные петли для белок-белковых взаимодействий [155, 217]. Наружная поверхность молекулы PCNA заряжена отрицательно, а внутренняя – положительно за счет остатков лизина и аргинина [79].

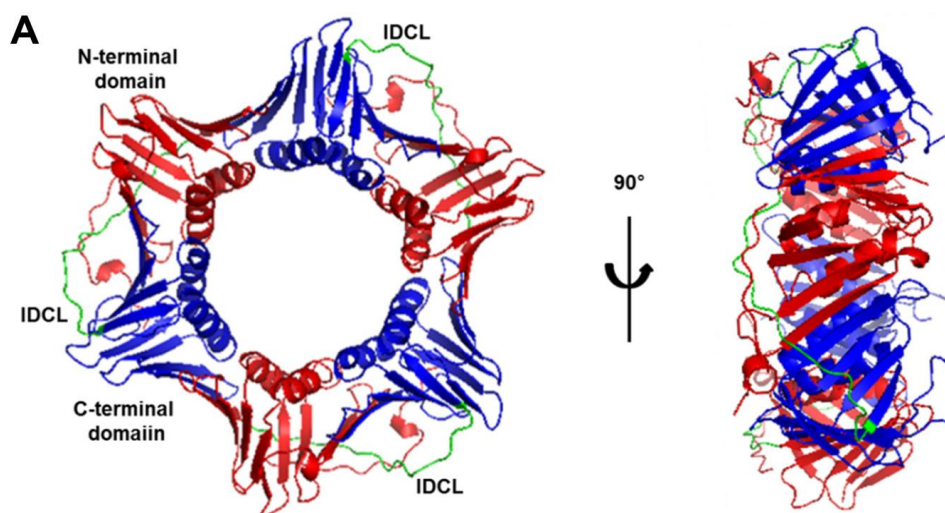


Рис. 1.3. Структура гомотримера PCNA. N-концевой, IDCL и C-концевой домены обозначены соответственно красным, зеленым и синим [167].

Белок PCNA садится на ДНК посредством АТФ-зависимого действия шапероноподобного фактора репликации C (RFC), который, в свою очередь, участвует в открывании и закрывании тримерного PCNA-кольца в процессе репликации и репарации [140]. Благодаря кольцевидной форме PCNA-гомотример окружает двуспиральную ДНК и обеспечивает тем самым репликацию, являясь сайтом связывания для ДНК-полимераз (в частности, ДНК-полимераз δ и ϵ [171, 204]). Таким образом, с помощью PCNA, который функционирует как «скользящая скрепка» (sliding clamp), ДНК-полимераза удерживается на цепи ДНК. Интересно заметить, что отсутствие белка PCNA замедляет процесс репликации в 10-100 раз [4].

Однако участие PCNA в репликации не ограничивается только лишь удержанием ДНК-полимеразы. При синтезе ДНК на поврежденной матрице (translesion synthesis – TLS) моноубиквитинированный тример PCNA играет роль платформы (scaffold) для связывания TLS-полимераз (полимеразы η , ι , κ , ζ), обеспечивая этим полимеразам доступ к поврежденному фрагменту и возможность продолжить репликацию [170].

Кроме того, будучи каркасным белком, PCNA принимает участие не только в репликации ДНК, но и в ремоделировании хроматина, установлении связи между сестринскими хроматидами, репарации ДНК и регуляции клеточного цикла [155, 172].

Участие PCNA в репарации ДНК весьма важно. В частности, при наличии значительных повреждений (вследствие действия некоторых химических агентов, ультрафиолетового облучения) репарация ДНК осуществляется с помощью эксцизионной репарации нуклеотидов (NER – nucleotide excision repair). При этом процессе PCNA связывается с эндонуклеазой (недостаток которой приводит к развитию пигментной ксеродермы группы G – XPG) и содействует ресинтезу поврежденного фрагмента ДНК, происходящему после ряда химических реакций, катализируемых этой эндонуклеазой [69]. Было показано также участие PCNA в эксцизионной репарации оснований (BER – base excision repair): PCNA

способен связываться с AP-эндонуклеазой 1 и 2 (APE1 и APE2), урацил-ДНК-гликозилазой 2 (UNG2), метилпурин-ДНК-гликозилазой (MPG), человеческим гомологом MutY (HMYH), эндонуклеаза-III-подобным белком 1 (NTHL1) и XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) [159]. Кроме того, белок PCNA нужен на начальных стадиях распознавания повреждения и репаративного синтеза при репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR – mismatch repair): PCNA напрямую взаимодействует с MutS-гомологами 3 и 6 (MSH3 и MSH6), MutL-гомологом 1 (MLH1) и экзонуклеазой 1 (EXO1) [127].

Взаимодействующие с PCNA белки играют большую роль в регуляции клеточного цикла. Помимо всего прочего, белок PCNA сам по себе функционирует как циклин [159]: количество PCNA значительно увеличивается в S-фазу клеточного цикла, кроме того, PCNA способен связываться как с p21 (ингибитор циклин-зависимых киназ – CDK) [79], так и с комплексами циклин-CDK [225]. Белок PCNA задействован в регуляции апоптоза через взаимодействие с белками GADD45A (growth-arrest and DNA-damage-inducible alpha), MYD118 (он же GADD45B) и ING1 (inhibitor of growth 1 – ингибитор роста 1). Связывание PCNA с вышеуказанными белками приводит к негативной регуляции клеточного роста [167]. Однако, по данным других авторов, взаимодействие PCNA с GADD45A и ING1, а также с CDK2 очень слабое либо вообще отсутствует [25].

Дисрегуляция работы PCNA является отличительным признаком многих пролиферативных заболеваний, что позволяет использовать этот маркер, в частности, в онкологической диагностике при определении прогноза заболевания [119]. Таким образом, белок PCNA является ценным маркером для клинической практики.

Роль PCNA в ремоделировании хроматина изучена недостаточно. В частности, известно, что фактор сборки хроматина 1 (CAF1 – chromatin assembly factor 1) обладает PIP-боксом и взаимодействует через него с PCNA [197].

Помимо вышеназванного, имеются данные, что белок PCNA вовлечен в установление связи между сестринскими хроматидами. Доказано, что участвующий в комплексе когезина (удерживает вместе сестринские хроматиды) белок человека ESCO2 (Establishment of cohesion 2) посредством PIP-бокса напрямую взаимодействует с PCNA. Следовательно, существует явная связь между двумя функциями PCNA – установлением связи между сестринскими хроматидами и продвижением вилки репликации [155, 197, 214].

Таким образом, PCNA играет ключевую роль в репликации и репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптозе, для чего взаимодействует со многими другими белками, участвующими в этих процессах.

При проведении иммуногистохимического исследования PCNA обнаруживается в ядрах клеток в S-фазу клеточного цикла, а также в интерфазных клетках, в которых осуществляются процессы репарации ДНК [4, 34, 43]. Однако в фазу S уровень PCNA в клетках увеличивается всего лишь в 2-3 раза (по сравнению с покоящимися клетками) [159]. Недостатком в использовании PCNA в качестве маркера пролиферации является его медленный катаболизм после завершения S-фазы клеточного цикла, что, однако, может быть использовано для более полного выявления пролиферирующих клеток в медленно обновляющихся тканях [4, 34]. Для обнаружения антигена PCNA чаще всего используют антитела клона PC10. При этом, как правило, не требуется проведение процедуры демаскирования антигена, что позволяет получать препараты высокого качества [4].

Данные об экспрессии белка PCNA в развивающемся головном мозге эмбрионов и плодов крайне скудны.

В частности, при проведении иммуногистохимического исследования в развивающемся головном мозге эмбрионов 6-8-й недели гестации было установлено, что положительную реакцию на белок PCNA в дорсолатеральной части стенки переднего мозгового пузыря имеют ядра подавляющего большинства клеток вентрикулярной зоны и единичных клеток маргинальной зоны. Причем в клетках внутреннего слоя вентрикулярной зоны, находящихся в

метафазе митоза, PCNA не выявлялся. Что касается латеральных участков стенки переднего мозгового пузыря, то в них можно обнаружить промежуточную зону, представленную преимущественно PCNA-негативными клетками. Кроме того, было замечено, что иммуногистохимическое окрашивание на PCNA распределяется диффузно в ядрах клеток, при этом фоновое цитоплазматическая реакция отсутствует [8].

Изучение экспрессии PCNA на эмбрионах мышей показало, что гибридизация *in situ* выявляет белок PCNA практически исключительно в синтетической зоне; иммуногистохимия с антителами к PCNA клона 19F4 – в синтетической и митотической зонах, а с антителами клона PC10 – в синтетической, митотической, субвентрикулярной и промежуточной зонах. При этом реакция на PCNA в кортикальной пластинке на стадии E14 при исследовании любым из вышеуказанных методов была отрицательной, в то время как на стадии E16 – уже слабоположительной. (Нейроэпителий эмбрионов грызунов подразделяется на митотическую, синтетическую, субвентрикулярную, промежуточную зоны и кортикальную пластинку по направлению от просвета латерального желудочка к коре.) Авторы пришли также к выводу, что антитела клона 19F4 выявляют клетки-предшественники, в то время как антитела клона PC10 обнаруживают не только непосредственно готовящиеся к пролиферации клетки, но и постмитотические [99]. Исследование экспрессии PCNA в развивающейся коре головного мозга крыс с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга выявило, что, начиная со стадии E14 эмбрионального развития, начинается резкое снижение плотности PCNA-позитивных клеток, которое продолжается вплоть до ранних стадий постнатального развития [60]. Помимо всего прочего, существуют исследования, довольно подробно описывающие распределение PCNA в развивающемся мозге лягушек [175].

1.5 SOX2

SOX2 (или SRY-box 2 – sex determining region Y box 2) – белок семейства SOX. Белки SOX-семейства, будучи транскрипционными факторами, регулируют многие стадии развития млекопитающих. Как и любой транскрипционный фактор, SOX2 связывается с определенными участками ДНК, регулируя тем самым уровень экспрессии отдельных генов. Ген, кодирующий белок SOX2 находится в длинном плече третьей хромосомы, не содержит интронов [142, 221].

В состав белка SOX2 входит 317 аминокислот. У всех белков SOX-семейства есть высококонсервативный ДНК-связывающий домен (домен группы белков с высокой подвижностью – high mobility group box domain – HMG), который состоит приблизительно из 80 аминокислот [221]. Исходя из структуры ДНК-связывающего домена, белки семейства SOX подразделяются на подгруппы. В частности, SOX2 относится к подгруппе B1, куда входят также SOX1 и SOX3 [183].

SOX2 играет ключевую роль в поддержании самообновления и плюрипотентности недифференцированных эмбриональных и нейральных стволовых клеток [24, 177]. Кроме того, SOX2 необходим для поддержания динамического равновесия с другими транскрипционными факторами, такими как OCT4 и NANOG (которые тоже участвуют в регуляции плюрипотентности и нужны для пролиферации эмбриональных стволовых клеток). Вдобавок было установлено, что эти транскрипционные факторы тесно взаимосвязаны друг с другом – общей мишенью для действия SOX2, OCT4 и NANOG являются по меньшей мере 353 гена [31, 142].

Совместно белки SOX2 и OCT4 напрямую активируют экспрессию генов плюрипотентности (NANOG, а также собственно гены SOX2 и OCT4) и, вместе с тем, подавляют экспрессию ключевых генов (таких, как PAX6 – paired box protein 6, GBX2 – gastrulation brain homeobox 2), ответственных за дифференцировку и дальнейшее развитие [31, 42]. Однако есть данные, что SOX2, OCT4 и NANOG, будучи своего рода спецификаторами, участвуют в

регуляции дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в определенные клеточные линии (в частности, SOX2 подавляет мезоэнтодермальную и активирует нейроэктодермальную дифференцировку) [207, 219]. Белок SOX2 в нейральных стволовых клетках активирует экспрессию гена сурвивина (survivin), который, будучи членом IAP (inhibitor of apoptosis)-семейства, предотвращает апоптоз и регулирует клеточное деление [18, 64]. Кроме того, SOX2 напрямую влияет на экспрессию SOX6 в развивающейся центральной нервной системе, ингибируя преждевременное созревание нервных клеток [126]. Помимо всего прочего, было показано, что в нейральных стволовых клетках белок SOX2 напрямую взаимодействует с ингибирующими транскрипцию факторами семейства Groucho (собственно Groucho – корепрессоры у *Drosophila*, у человека ему гомологичен трансдукцин-подобный энхансер (TLE – transducin-like enhancer)), вследствие чего происходит подавление экспрессии определенных генов. Неспособность белка SOX2 (вследствие мутации) связываться с факторами семейства Groucho приводит к отсутствию ингибирования процессов дифференцировки нейральных стволовых клеток [135].

Белок SOX2 начинает определяться в эмбриональных клетках начиная со стадии морулы. На более поздних стадиях эмбрионального развития выраженная экспрессия SOX2 выявляется во внутренней клеточной массе бластоцисты и в эпибласте. Следует также заметить, что делеция гена SOX2 на стадии зиготы является летальной для эмбриона из-за невозможности формирования плюрипотентного эпибласта, в то время как влияние этой делеции на развитие трофэктодермы незначительно [22]. Таким образом, SOX2 – необходимый фактор для формирования плюрипотентных клеток на ранней стадии эмбрионального развития и, в конечном счете, для эмбрионального развития в целом [231]. Недостаток белка SOX2 в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека приводит к потере экспрессии этими клетками маркеров плюрипотентности и их дифференцировке в трофэктодерму. Вместе с тем, в опытах на эмбриональных стволовых клетках мыши, в которых

отсутствовал белок SOX2, было показано, что усиление экспрессии OCT4 способно поддерживать плюрипотентность этих клеток. Этот факт говорит в пользу того, что действие SOX2 на стволовые клетки в данном случае реализуется через поддержание достаточного уровня экспрессии OCT4 [65, 145]. Интересно заметить, что не только низкий, но и слишком высокий уровень SOX2 приводит к потере эмбриональными стволовыми клетками их плюрипотентных свойств. Это может быть связано с тем, что как слишком высокий, так и слишком низкий уровень экспрессии SOX2 влечет за собой снижение активности промоторов/энхансеров генов-мишеней транскрипционных факторов SOX2 и OCT4 [29, 120].

После гаструляции SOX2 экспрессируется преимущественно в тканях формирующейся центральной нервной системы (экспрессия SOX2 в процессе развития обнаруживается также в тканях кожи, глаз, зубов, внутреннем ухе, кишке и других тканях – его нехватка в соответствующих органах приводит к потере слуха, анофтальмии [80]) [222]. SOX2 индуцирует и поддерживает процесс нейральной дифференцировки путем подавления регуляторов других клеточных линий (в частности, белок brachyury, который, среди прочего, отвечает за формирование мезодермы) [207, 219, 233]. Кроме того, SOX2 обеспечивает сохранение способности к самообновлению нейральных стволовых клеток. Замечено, что SOX2 сильно экспрессируется в пролиферирующих нейральных клетках-предшественниках, в то же время его количество в клетках снижается вплоть до неопределяемых количеств по мере их дифференцировки в постмитотические нервные или глиальные клетки. Недостаток SOX2 в нейральных стволовых клетках препятствует их пролиферации и самообновлению и обуславливает ранний выход из клеточного цикла, а избыток этого транскрипционного фактора, наоборот, ингибирует дифференцировку клеток (что, в свою очередь, может быть важно при развитии онкологического процесса) [38, 78, 231]. Впоследствии экспрессия SOX2 ограничивается вентрикулярным слоем коры (где локализуются нейральные стволовые клетки), а затем – субвентрикулярной и субгранулярной зонами

зубчатой извилины. Во взрослом мозге экспрессия SOX2 практически отсутствует, за исключением небольшой экспрессии в клетках таламуса, субвентрикулярной зоны латерального желудочка, субгранулярной зоны гиппокампа и ствола мозга, что связывают с наличием нейральных стволовых клеток и незрелой глии в этих областях [19, 142]. Кроме того, во взрослом мозге экспрессия SOX2 выявлялась и в астроглии [117].

Помимо всего прочего, SOX2 (наряду с другими транскрипционными факторами, такими как OCT4, KLF4 и c-Myc) путем эпигенетического перепрограммирования способен превращать различные соматические клетки в индуцированные стволовые клетки [203].

Несмотря на многочисленные исследования, вплоть до настоящего времени молекулярные механизмы, с помощью которых SOX2 участвует в контроле плюрипотентности и дифференцировки, остаются до конца неизученными. Как и у других транскрипционных факторов, экспрессия SOX2 регулируется как внутренними (другие транскрипционные факторы), так и внешними (факторы роста, цитокины) сигнальными путями [231].

Установлено, что в локусе гена SOX2 есть регионы, ответственные за контроль уровня экспрессии SOX2, среди которых сердцевинный промотор SOX2 (SOX2 core promoter) [129], а также некоторое число энхансеров, расположенных в хромосоме как до, так и после гена SOX2 [152, 153, 211]. Следует заметить, что все эти регуляторные регионы высококонсервативны у разных видов [211]. В некоторых исследованиях были получены данные, что в эмбриональных стволовых клетках SOX2 взаимодействует с OCT4, формируя регуляторный комплекс, который активирует транскрипцию SOX2 путем связывания с SOX2-регуляторным регионом 2. Таким образом, экспрессия SOX2 положительно регулируется комплексом SOX2-OCT4 [31, 42]. Кроме того, на мышцах показано, что такие транскрипционные факторы как NANOG, SMAD1, STAT3 тоже способны активировать транскрипцию SOX2 в эмбриональных стволовых клетках [42]. В нейральных стволовых клетках экспрессия SOX2 поддерживается на высоком уровне благодаря

транскрипционным факторам AP-2, PROX-1, PAX6, E2F3b (E2F3b привлекает РНК-полимеразу к ее промотору). Интересно заметить, что при этом E2F3a подавляет экспрессию SOX2, стимулируя терминальную дифференцировку. Есть также данные, что ингибитор циклин-зависимой киназы p21 понижает уровень экспрессии SOX2 в нейральных стволовых клетках, напрямую связываясь с SOX2-энхансером [102, 129, 144].

Помимо всего прочего, обнаружено, что экспрессия гена SOX2 активируется через следующие внутриклеточные сигнальные пути: Shh (индуцирует пролиферацию в развивающихся клетках ЦНС), Wnt (гиперактивация этого пути наблюдается при опухолевых процессах), FGFR (через каскады Ras/MAPK и PI3K) и TGF- β (в норме этот каскад обладает онкосупрессорным действием) [141, 142].

Что касается регуляции активности SOX2 на посттранскрипционном уровне, то она осуществляется с помощью микроРНК. В частности, в нейральных стволовых клетках связывание miR-200c с сайтом SOX2, находящемся в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR), приводит к подавлению экспрессии SOX2 и, в конце концов, к выходу клетки из клеточного цикла и дифференцировке. В дифференцирующихся же клетках наблюдается высокая активность miR-9 и комплементарной ей цепи miR-9*, в отличие от постепенно снижающейся активности miR-200c [169]. Таким образом, возможно, что miR-9 и miR-200c, регулируя вместе экспрессию SOX2, участвуют в определении направления дифференцировки нейральных стволовых клеток в сторону нейронов или глии [142]. При исследовании опухолевых клеток было показано, что экспрессия SOX2 может регулироваться еще с помощью miR-126, miR-140, miR-145, miR-638, miR-126 и miR-429 [142].

Активность же самого белка SOX2 модулируется путем метилирования, ацетилирования, сумоилирования и фосфорилирования. У белка SOX2 обнаружено 3 сайта для фосфорилирования (S249, S250, S251). Фосфорилирование SOX2 по этим сайтам стимулирует сумоилирование SOX2, что, в свою очередь, ингибирует связывание белка SOX2 с ДНК [94, 210]. На

эмбриональных стволовых клетках показано, что ацетилирование белка SOX2 по остаткам лизина в области ДНК-связывающего домена индуцирует экспорт SOX2 из ядра, вследствие чего происходит убиквитинирование и протеасомная деградация этого белка [23]. Мометилирование тоже приводит к ингибированию активности SOX2, его убиквитинированию и дальнейшей деградации. Фосфорилирование (по T118) наоборот, стабилизирует белок SOX2, препятствуя его разрушению в протеасомах [63].

Известно, что SOX2 регулирует активность четко определенных генов при эмбриогенезе и нейральной дифференцировке. Важную роль в «отборе» генов, на которые действует белок SOX2, могут играть белки, с которыми SOX2 взаимодействует (interacting partners), формируя комплексы [118]. Среди белков, с которыми связывается SOX2, обнаружены, в частности, вышеупомянутый OCT4 [209], а также OCT1 (регулирует экспрессию PAX6) [51], PAX6 (участвует в развитии хрусталика) [104], BRN2 (регулирует работу гена Nestin в зародышевых нейральных клетках) [205], CHD7 (участвует в регуляции активности нейральных стволовых клеток) [59]. Возможно, в разных нейральных клетках-предшественниках белку SOX2 требуются различные партнеры, которые регулируют экспрессию разного набора генов, что, в конечном итоге, приводит к формированию разных типов клеток в нервной системе в процессе развития [231].

1.6 Nestin (Нестин)

Нестин – белок промежуточных филаментов VI-го класса, который экспрессируется преимущественно в быстро делящихся клетках развивающихся или регенерирующих тканей [128, 151]. Промежуточные филаменты используют для специфического выявления клеток, принадлежащих к разным гистогенетическим линиям. В частности, белок нестин пробуют использовать для идентификации нейральных стволовых клеток [1].

Ген нестина располагается в длинном плече 1-й хромосомы, представляет собой высококонсервативную последовательность нуклеотидов, практически идентичную у человека и других млекопитающих (в частности, мышей и крыс). Однако в гене нестина у человека обнаружено только 3 интрона, а не 4, как у мышей и крыс. Кроме того, предполагается, что ген нестина и три гена нейрофиламентов (IV-й класс промежуточных филаментов) в ходе эволюции произошли от общего предшественника путем генной дупликации, поскольку два интрона гена нестина гомологичны таковым в генах нейрофиламентов и находятся в той же позиции [1, 46, 151]. Небезынтересно заметить, что экспрессия гена нестина во взрослом и развивающемся мозге регулируется разными энхансерами [101].

Нестин – достаточно большой белок, в его состав входит более 1600 аминокислот, а его масса составляет 240 кДа [128]. По своей структуре нестин аналогичен другим белкам промежуточных филаментов (N-концевой домен, состоящий из 300-330 аминокислот, центральный домен (α -спираль), C-концевой домен с блоком консервативных семикратных повторов – conservative heptad repeat unit), однако при этом в его строении присутствует ряд особенностей [1]. В частности, нестин из-за очень короткого N-конца не может образовывать гомодимеры для формирования промежуточных филаментов, а только лишь гетеродимеры и гетеротетрамеры (особенно часто с белками промежуточных филаментов III-го класса виментином и IV-го класса α -интернексином) [1, 46, 58]. Процесс частичной разборки нестин-содержащих промежуточных филаментов регулируется путем фосфорилирования нестина циклин-зависимой киназой 2 (CDK2, участвует в переходе из фазы G2 в фазу M клеточного цикла) по треонину, который находится в C-конце в 316-м положении аминокислотной последовательности рядом с регионом, ответственным за сборку промежуточных филаментов. Интересно заметить, что изменения в этом регионе, вызванные мутациями, приводят к развитию различных заболеваний, в частности простого буллезного эпидермолиза [130, 178]. В общем и целом, при сборке промежуточных филаментов наблюдается

низкий уровень фосфорилирования нестина, а при их диссоциации (во время митоза) – высокий уровень фосфорилирования [1, 178]. Молекула нестина обладает длинным С-концом (1306 аминокислот), который, возможно, принимает участие во взаимодействии промежуточных филаментов с микротрубочками и микрофиламентами [87, 88]. Кроме того, в С-конце нестина содержится большое количество серина, фосфорилирование которого может влиять на способность нестина взаимодействовать с другими компонентами цитоскелета. Исходя из вышеприведенных данных, предполагается, что нестин участвует в стабилизации внутриклеточной структуры и координации изменения внутриклеточной динамики, что, в свою очередь, важно для мигрирующих и делящихся клеток [1, 85, 151]. В частности, есть данные, что способность нейральных стволовых клеток к передвижению может повышаться за счет увеличения активности киназы легких цепей миозина путем прямого связывания с нестином [228]. Помимо всего прочего, высказываются предположения, что высокая экспрессия нестина в делящихся клетках может оказывать влияние на транспортировку молекул по цитоплазме и обуславливать асимметричное распределение цитоскелета и органоидов между дочерними клетками (что необходимо, например, при делении клеток развивающейся нервной трубки – дочерняя вентрикулярная клетка продолжает делиться, в то время как дочерняя дифференцирующаяся клетка мигрирует) [151].

До сих пор до конца не ясно, можно ли считать нестин маркером нейральных стволовых клеток. С одной стороны, нестин выявляется в клетках формирующейся нервной ткани в период эмбриогенеза [46], причем экспрессия этого белка наблюдается как в нейрональных [67] и глиальных [158] клетках, так и в их общих предшественниках [46]. Кроме того, иммунопозитивные к нестину клетки можно обнаружить в головном и спинном мозге после различных повреждений (в частности, ишемического и травматического) [109, 131], что, в свою очередь, связывают с наличием репаративных процессов в пораженных областях [96]. Есть также многочисленные данные, что нестин

экспрессируется в ткани различных опухолей нервной системы (нейроцитомы, нейробластомы, глиобластомы, астроцитомы, эпендимомы, медуллобластомы, шванномы и др.) [1, 184]. Однако, с другой стороны, некоторыми авторами показано, что не все клетки, в которых обнаруживается нестин, относятся к нейральным стволовым/плюрипотентным клеткам, в частности, среди нестин-иммунопозитивных клеток встречаются дифференцированные астроциты [44, 56], эндотелий сосудов мозга (при отсутствии повреждения нервной ткани нестин в эндотелии выявляется преимущественно пренатально) [17, 154]. Более того, в период эмбрионального развития нестин выявляется, хотя и в меньшем количестве, не только в пределах нервной системы, но и в других развивающихся органах и тканях: в поперечно-полосатых мышцах, сердце, коже и ее производных, зубах, печени, почках, поджелудочной железе, сетчатке, надпочечниках, яичках и др [1, 223].

В тканях развивающейся нервной системы у мышей нестин начинает появляться на ранних стадиях эмбриогенеза: с 7-х суток экспрессия нестина обнаруживается в нейроэктодерме, с 10,5 суток – в ростральной и каудальной частях нервной трубки и конечном мозге [46, 113], с 11-х суток – в спинном мозге (выявляется до 6-х суток постнатальной жизни) [89], в 15-е сутки нестин-иммунопозитивные клетки появляются в стволе головного мозга [234], с 15,5 суток – в мозжечке (до 21-х суток после рождения) [89]. При этом на ранних стадиях эмбриогенеза экспрессия нестина обнаруживается в разных типах клеток, таких как: клетки радиальной глии, вентрикулярной зоны, общие нейрональные и глиоцитарные предшественники [20, 89], нейроэпителиальные клетки [206]. Вместе с тем, в двух пролиферирующих областях развивающегося мозга (обонятельный эпителий и клетки-предшественники гранулярных нейронов гиппокампа) экспрессию нестина выявить не удалось [46]. Известно также, что при переходе клетки в фазу G0 клеточного цикла происходит быстрое уменьшение экспрессии нестина [46]. В исследованиях на эмбрионах мышей показано, что нокаутирование гена нестина не приводит к явным дефектам пролиферации и дифференцировки, однако вызывает

увеличение количества апоптотирующих клеток и уменьшение способности клеток к самообновлению. При этом следует заметить, что недостаток нестина не оказывает видимого влияния на целостность цитоскелета [166]. Кроме того, обнаружено, что высокий уровень экспрессии нестина коррелирует с активацией PI3K/Akt сигнального пути, в то время как малое количество нестина в клетках связано с низкой активностью этого сигнального пути [50, 134, 226].

При изучении с помощью иммуногистохимии экспрессии нестина в гиппокампе эмбрионов человека установлено, что на 9-й неделе гестации скопления нестин-позитивных клеток локализуются преимущественно в интермедиальной, маргинальной зонах, фимбриях и, в относительно небольшом количестве в вентрикулярной зоне. Кроме того, отдельные клетки, содержащие нестин, обнаруживаются по всему гиппокампу. В ходе эмбриогенеза количество клеток, экспрессирующих нестин, постепенно снижается. Интересно заметить, что на 32-й неделе гестации количество нестин-позитивных клеток в зубчатой извилине было больше, нежели в аммониевом роге [229].

В то время как в процессе дифференцировки экспрессия нестина в нервной ткани прогрессивно снижается [136, 235], в дифференцирующихся клетках начинают выявляться специфические маркеры для глии (GFAP) и нейронов (нейрофиламенты – промежуточные филаменты IV-го класса) [196]. При этом исследования мозга плодов человека показали, что в большинстве дифференцирующихся глиальных клеток в определенный период времени наблюдается коэкспрессия нестина и GFAP, в то время как в дифференцирующихся нейронах коэкспрессия MAP-2 и нестина выявляется редко [150]. В мозге взрослых здоровых животных нестин можно выявить только в герминативных зонах – зубчатой извилине гиппокампа (в ней обнаруживают 2 типа экспрессирующих нестин клеток: ранний предшественник – морфологически похож на радиальную глию, экспрессирует астроцитарный маркер GFAP; и поздний предшественник – округлой формы,

содержит маркер незрелых нейронов PSA-NCAM) [67] и субвентрикулярной зоне боковых желудочков (в частности, обнаруживаются нестин-иммунопозитивные эпендимоциты с длинными отростками, округлые клетки в субэпендимальной зоне) [61, 121]. Обнаружено, что во взрослом мозге крысы и человека есть 4 класса клеток, экспрессирующих нестин. Клетки I-го класса – одни из самых маленьких нервных клеток, они широко распространены в мозге. Клетки II-го класса локализуются в стенках водопровода и третьего желудочка. Клетки III-го класса обнаружены только в базальных отделах переднего мозга, в области гиппокампа и стриатума, а также в других участках мозга. Причем эти клетки не являются постмитотическими, а представляют собой зрелые нейроны, которые, наряду с нестином, экспрессируют маркеры нервных клеток NeuN, β III-тубулин, ChAT и EAAC1. Что касается клеток IV-го класса, то они выявляются в переднем мозге и располагаются смежно с NeuN⁺-нейронами [84].

Показано, что клетки взрослого мозга начинают экспрессировать нестин при различных патологических процессах и состояниях, сопровождающихся реактивным нейрогенезом. К такого рода процессам и состояниям относятся: травма [92], ишемия [56, 131], эпилепсия [28], воспаление [41, 143], экспериментальная деполяризация [93] и т. д. В частности, при травматическом повреждении головного мозга нестин-иммунопозитивные клетки (преимущественно астроциты, участвующие в формировании рубца, и микроглия) начинают выявляться в зон повреждения уже через 1 сутки [100, 109]. В свою очередь, ишемическое повреждение головного мозга приводит к появлению экспрессирующих нестин клеток в промежуток от 6-и часов до 4-х недель с момента воздействия (максимальный уровень экспрессии наблюдается на 7-е сутки). К клеткам, в которых выявляется нестин после ишемии, относятся астроциты, олигодендроциты, нейроны, эндотелиоциты, а также клетки субгранулярной зоны гиппокампа и субвентрикулярной зоны [82, 131].

1.7 Musashi 1

Musashi 1 (Msi1) – высококонсервативный РНК-связывающий белок, участвующий в регуляции трансляции. Msi1 экспрессируется во многих тканях, в частности в стволовых клетках мозга и нейральные клетки-предшественники, в волосяных фолликулах, эпителиальных клетках кишки, в матке и др. [21, 76, 77, 180, 199]. Кроме того, высокий уровень экспрессии обнаруживается также в некоторых опухолях: глиоме, медуллобластоме, астроцитоме, ретинобластоме, аденокарциноме толстой кишки и эндометрия. Есть данные, что большое количество Msi1 в опухолевых клетках ассоциировано с неблагоприятным прогнозом для пациента [138, 181, 188, 193, 200].

У человека ген MSI1 локализован в длинном плече 12-й хромосомы. В состав гена MSI1, помимо интронов, входит 15 экзонов [76].

Семейство белков Musashi у позвоночных включает в себя 2 гомологичных белка – Msi1 и Msi2. Белок Msi1 у человека состоит из 362 аминокислот. Msi1 содержит в N-конце 2 узнающих РНК мотива (RNA recognition motifs – RRM) [76, 157], а в С-конце – РАВР-связывающий домен (РАВР – poly(A)-binding protein). Считается, что РАВР-связывающий домен белка Msi1 участвует в блокировке трансляции. Сначала Msi1 посредством RRM связывается с 3'-нетранслируемой области таргетной мРНК, а затем РАВР-связывающий домен Msi1 взаимодействует с белком РАВР (который одновременно связан с полиадениловым хвостом мРНК), что, в свою очередь, препятствует связыванию РАВР с эукариотическим иницирующим фактором 4G (eIF4G) и, в конечном итоге, формированию 80S-рибосомы и замкнутой петлевой структуры, необходимой для трансляции (рис. 1.4) [106, 107].

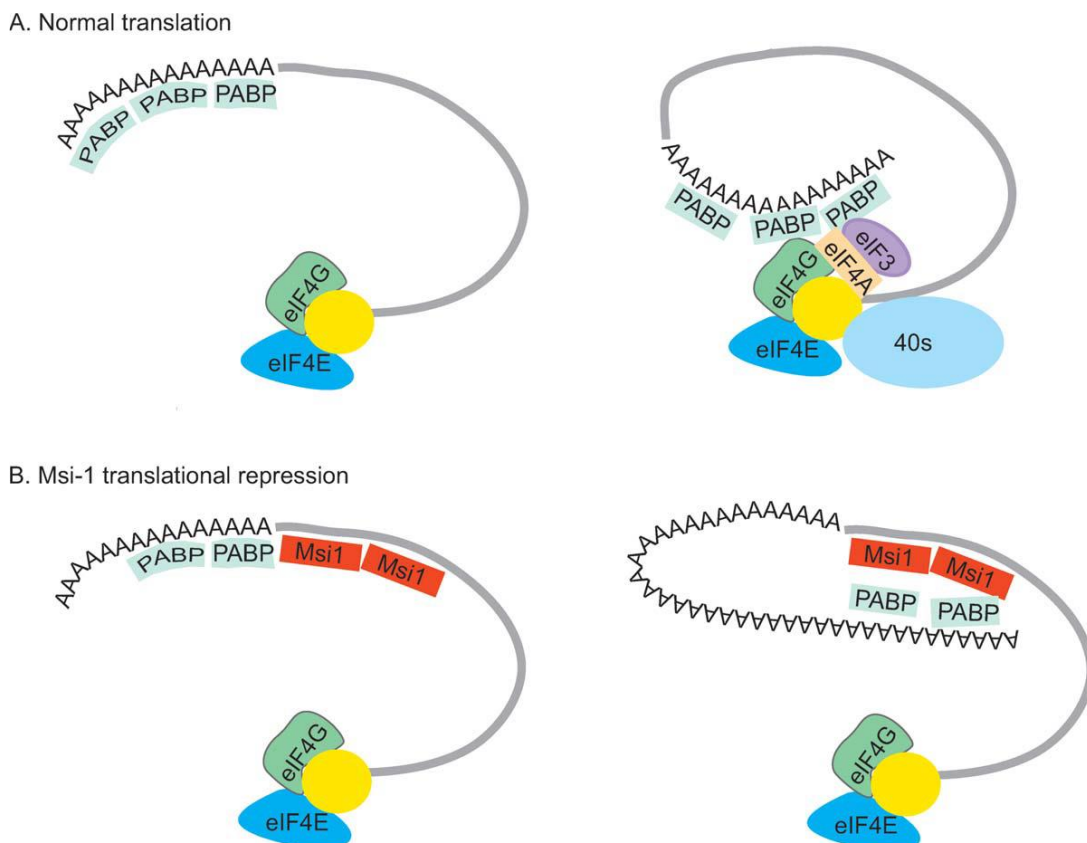


Рис. 1.4. Подавление трансляции при связывании Msi1 с мРНК [106]

В начале нейрогенеза сигнальный путь Notch необходим для стимуляции пролиферации, впоследствии его активность подавляется белком Numb, что, в свою очередь, приводит к активации нейральной дифференцировки. Таким образом, сигнальный путь Notch играет важную роль в регуляции эмбрионального развития [187]. Белок Msi1, в свою очередь, блокирует трансляцию NUMB, негативного регулятора сигнального пути Notch, путем связывания с действующим в цис-положении репрессорным мотивом (cis-acting repressor motif) в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК NUMB [98, 164]. Таким образом, Msi1 поддерживает пролиферацию мультипотентных нейральных стволовых клеток и клеток-предшественников [163]. In vitro показано, что Msi1 способен связываться с 3'-UTR мРНК даблкортина, подавляя в конечном итоге его трансляцию [95]. Замечено, что активность белка Msi1 быстро подавляется в постмитотических нейронах [179], в то время как в опухолевых клетках центральной нервной системы активность Msi1, наоборот, повышается [208, 230]. Кроме того, на клетках-предшественниках молочной железы показано, что Msi1 повышает секрецию ростового фактора

пролиферина (PLF1) (который через G_i-белок сопряженный рецептор IGF2 опосредует активацию ERK и ингибирует активность GSK) и через неизвестный механизм блокирует экспрессию онкосупрессора DKK3, ингибитора сигнального пути Wnt (что, в свою очередь, приводит к повышению активности β-катенина) (рис. 1.5). Интересно заметить, что GSK, ингибируемая белком Msi1, вызывает протеасомную деградацию β-катенина и внутриклеточного домена Notch, препятствуя тем самым пролиферации [62, 75, 218].

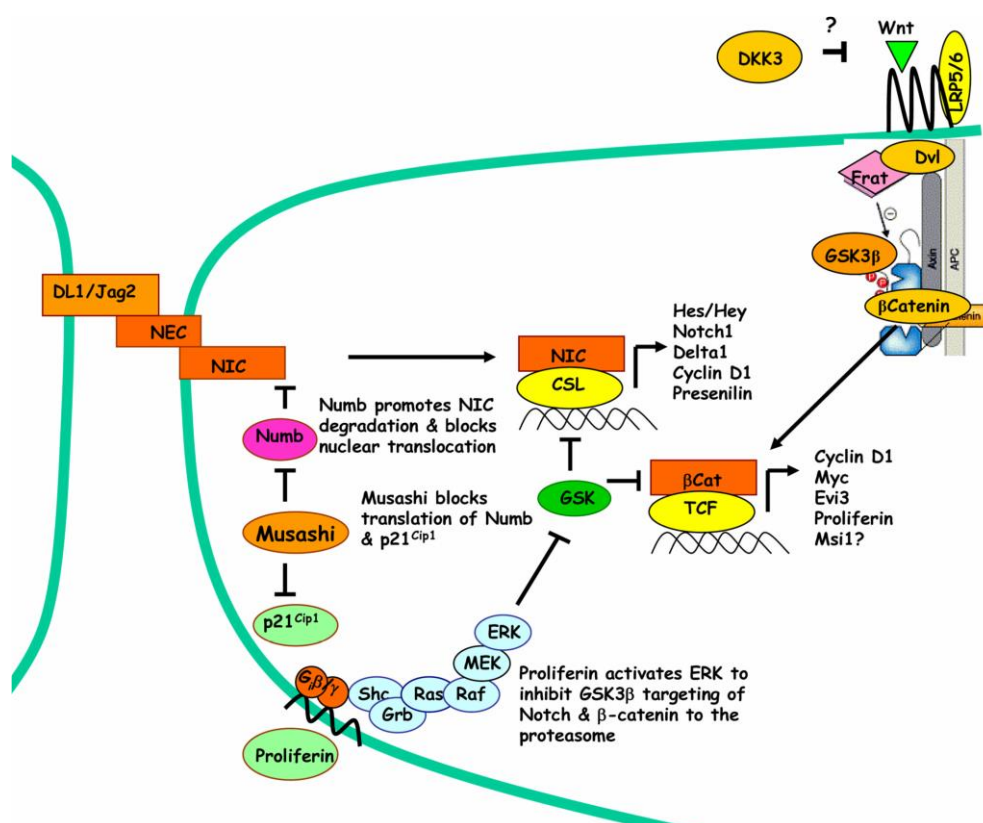


Рис. 1.5. Механизмы действия Musashi1 [75]

Экспрессия Msi1 усиливается благодаря РНК-связывающим белкам HuB, HuC и HuD, которые, связываясь с AU-богатыми элементами 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК Msi1, стабилизируют последнюю [174]. Кроме того, есть данные, что микроРНК miR-23a и miR-125b сдерживают экспрессию Msi1 в процессе перехода от нейральных клеток-предшественников к дифференцированным астроцитам [74]. Помимо всего прочего, экспрессия Msi1 в нейральных стволовых клетках и клетках-предшественниках активируется регуляторным фактором X (RFX) [108].

Msi1-иммунопозитивные клетки выявляются как в мозге плода, так и взрослого человека [76]. Антитела к Msi1 выявляют в мозге преимущественно пролиферирующие недифференцированные клетки (нейральные стволовые клетки, нейральные клетки-предшественники, астроглиальные клетки-предшественники, астроциты). Однако следует заметить, что и в «юных» постмитотических нейронах можно обнаружить следовые количества Msi1. При этом клетки олигодендроглиальной линии дифференцировки давали отрицательную реакцию на Msi1. Иммуногистохимическое окрашивание на Msi1 в стволовых клетках ЦНС локализуется преимущественно в перинуклеарной области, не захватывая при этом отростки и область синапсов [105]. В исследованиях на мышах показано, что экспрессия Msi1 в период эмбрионального развития наблюдается в вентрикулярной зоне нервной трубки в нейральных стволовых клетках и нейральных клетках-предшественниках, а у взрослых животных – в перивентрикулярной зоне в эпендиме и астроцитах [164]. При изучении развивающегося мозга человека было установлено, что на 12-й неделе гестации экспрессия Msi1 выявляется в округлых, плотно прилежащих друг к другу клетках субвентрикулярной зоны латеральных желудочков. Кроме того, обнаруживаются ранние признаки миграции Msi1+-клеток по направлению к развивающейся коре больших полушарий. К 20-й неделе эмбрионального развития наблюдалась более широкая экспрессия Msi1 в клетках герминативного матрикса, причем особенно интенсивной была иммуногистохимическая реакция на границе с просветом желудочка, что объясняется формированием эпендимы в этой зоне. На этом сроке по-прежнему продолжается миграция Msi1+-клеток через белое вещество. К 24-й неделе гестации экспрессия Msi1 начинает снижаться, хотя наблюдается активная миграция Msi1+-клеток. Начиная с 27-й недели эмбрионального развития, Msi1-иммунореактивность снижается уже как в эпендиме, так и в герминативном матриксе [40]. Несмотря на то, что Msi1 считается маркером преимущественно нейральных стволовых клеток и клеток-предшественников, были получены данные, что положительную иммуногистохимическую реакцию

на Msi1 дают также нейроны ядра поводка, эпендимоциты боковых желудочков, третьего желудочка и водопровода. При этом не отмечалось концентрации Msi1+-клеток в субгранулярном слое зубчатой извилины. Все эти данные свидетельствуют в пользу того, что правомерность использования Msi1 в качестве маркера недифференцированных клеток в головном мозге может быть поставлена под сомнение [3].

1.8 Коэкспрессия

Nestin u Musashi1

Как было описано выше, Msi1 выявляется в нейральных стволовых клетках, в нейральных и глиальных клетках-предшественниках и астроцитах. При этом практически все нейральные стволовые клетки экспрессируют как Msi1, так и нестин. Msi1 экспрессируется в продолжение всей дифференцировки нейральных стволовых клеток в GFAP(+)-астроциты (рис. 1.6). При этом в процессе дифференцировки этих клеток в астроциты в них последовательно исчезает экспрессия сначала RC2-антигена, затем нестина, а в конце – GLAST. Предполагается, что Msi1(+)/Nestin(-)/RC2(-)/GFAP(-)-клетки могут быть протоплазматическими астроцитами. Следует заметить, что клетки олигодендроглиальной линии дифференцировки не экспрессируют ни Msi1, ни нестин [105].

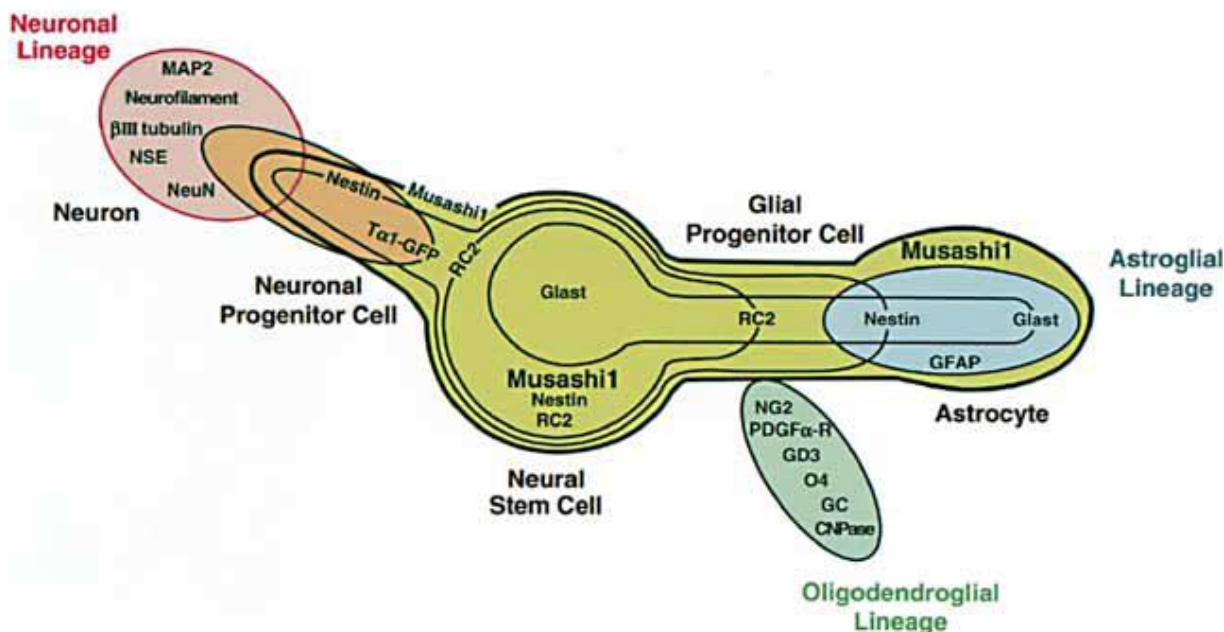


Рис. 1.6. Экспрессия *Msi1* и других маркеров (*Nestin*, *GFAP*, *MAP2*) в процессе дифференцировки нейральных стволовых клеток [105]

Было также установлено, что в интактном мозге взрослой крысы нет клеток, которые экспрессировали бы одновременно нестин и *Msi1*. В то же время, после ишемического повреждения клетки, коэкспрессирующие нестин и *Msi1*, начинали выявляться в клетках субвентрикулярной зоны и эпендимocyтaх. Причем в случае ишемического повреждения изменяется интенсивность экспрессии *Msi1*, но, в отличие от нестина, не происходит инициация экспрессии этого маркера в клетках, в которых он в обычных условиях не обнаруживается [5]. При исследовании экспрессии *Msi1* и нестина в гиппокампе крыс после ишемического повреждения было обнаружено, что реактивные астроциты начинают экспрессировать как *Msi1*, так и нестин вплоть до 35-и дней после ишемии. В субгранулярной зоне гиппокампа *Msi1(+)*-клетки не экспрессировали *GFAP*, но при этом метились бромдезоксисуридином. В то же время лишь небольшое количество нестин-позитивных клеток (эти клетки еще и не экспрессировали *GFAP*) в этой зоне метилось бромдезоксисуридином, что, в свою очередь, говорит о том, что нейральным клеткам-предшественникам в субгранулярной зоне гиппокампа свойственно экспрессировать *Msi1*, но не нестин [227]. Помимо всего прочего,

интересно заметить, что у мышей с фокальной ишемией мозга было замечено, что как Msi1(+), так и нестин(+)-клетки располагались в периинфарктной области, причем Msi1(+)/нестин(+)-клетки были локализованы намного ближе к центру повреждения, чем Msi1(+)/нестин(-)-клетки [165].

Изучение экспрессии Msi1 и нестина в герминативном матриксе плодов человека показало, что в незрелых клетках этой области присутствует коэкспрессия Msi1 и нестина, а также Msi1 и Ki67. Кроме того, при увеличении срока эмбрионального развития уровень экспрессии Msi1 и Ki67 снижался, однако вместе с тем увеличивалась экспрессия GFAP. Авторы также предполагают, что наличие Msi1(+)/Ki67(-) и Msi1(+)/нестин (-) клеток может быть связано с наличием покоящихся клеток-предшественников [40].

SOX2 и нестин

Исследование нейрогенеза в дофаминергических нейронах у взрослых мышей показало, что восполнение нейронов черной субстанции происходит благодаря нестин(+)/SOX2(-)-клеткам-предшественникам [16]. Есть данные, что все SOX2(+)-клетки коэкспрессируют нестин [35].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объем и характеристика исследуемого материала

Материалом для исследования служила ткань мозга (большие полушария) двух (МН5 и МН7) мертворожденных 23-24 недель гестации, родившихся в 2014-м году, смерть которых наступила от внутриутробной асфиксии связанной с декомпенсированной хронической плацентарной недостаточностью.

Критерии включения: новорожденные 22-27 недель гестации без видимых пороков развития

Критерии исключения: новорожденные с врожденными пороками развития мозга, новорожденные с внутриутробной инфекцией, новорожденные 28 и более недель гестации.

2.2 Методы исследования головного мозга плодов

Полученная ткань мозга была исследована гистологически как с помощью обзорной окраски препаратов гематоксилином и эозином, так и иммуногистохимическим методом.

Окрашивание препаратов гематоксилином и эозином производилось по стандартной методике. Фиксированные в течение суток в 10%-м формалине фрагменты больших полушарий мозга с целью обезвоживания и обезжиривания в течение 4-х часов проводили в этиловом спирте возрастающей концентрации, потом в течение 20 минут в смеси этилового спирта и ацетона, а затем – в ацетоне. После заливки ткани мозга парафином были изготовлены на микротоме срезы толщиной 5 мкм, которые помещались на предметные стекла. Полученные микропрепараты после депарафинации в ксилоле были окрашены гематоксилином (основный краситель, выявляет базофильные структуры, в частности, ядро, окрашивая его сине-фиолетовым цветом) и эозином (кислый краситель, выявляет оксифильные структуры, в частности цитоплазму, окрашивая ее в красно-розовый цвет). Готовые срезы были заключены в бальзам.

Для проведения иммуногистохимического исследования фрагменты больших полушарий мозга были зафиксированы в нейтральном формалине в течение суток. После промывки дистиллированной водой материал был обезвожен и обезжирен в спиртах возрастающей концентрации (три смены 70% этанола по одному, двум и одному часам соответственно, три смены 96% этанола по 30 минут), потом в течение 20 минут в смеси этилового спирта и ксилола (1:1), а затем – в ксилоле (тремякратно по 20 минут при температуре 37°C). Заливка тканей парафином осуществлялась при 56°C, после чего на микротоме были изготовлены срезы толщиной 5 мкм. Помещенные на предметные стекла срезы были депарафинированы в ксилоле при температуре 60°C. Далее была произведена иммуногистохимическая реакция, которая была начата с инкубации микропрепаратов в 1%-м растворе перекиси водорода в течение 5 минут для блокирования действия эндогенной пероксидазы. После

промывки в двух сменах фосфатного буфера (pH 7,4) и блокировки неспецифического связывания (с помощью 5%-го раствора бычьего сывороточного альбумина) стекла были инкубированы с первичными антителами при комнатной температуре в течение 30 мин. В качестве первичных антител были использованы моноклональные мышьиные антитела к белкам NeuN (клон А60), Ki67 (клон М1В-1), SOX2, Nestin (клон SP103), а также поликлональные кроличьи антитела к белкам PCNA и Musashi1. Первичные антитела наносились на препараты в рекомендованных производителем рабочих разведениях. Затем для удаления несвязавшихся с субстратом антител микропрепараты были промыты в фосфатном буфере. После этого стекла в течение 30 минут при комнатной температуре были инкубированы с вторичными антителами. Далее микропрепараты были докрашены гематоксилином. Готовые срезы были заключены в бальзам.

Препараты исследовали в световом микроскопе Leica DMR при увеличении объектива x10 и окуляра x1,6. В каждом препарате изучали три зоны: кору, белое вещество и герминативный центр. В каждой из этих зон просматривали по 5 полей зрения, изучая в них профиль экспрессии того или иного маркера. Подсчет количества клеток в поле зрения производился по фотографиям микропрепаратов с помощью программы ImageJ.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Обзорная окраска гематоксилином и эозином

При окрашивании ткани мозга плодов 23-24 недель гестации гематоксилином и эозином в неокортексе прослеживаются I-III-й клеточные слои (рис. 3.1). При этом в нейронах процессы дифференцировки еще не завершены: нервные клетки имеют крупное округлое ядро с 1-2 ядрышками и минимальное количество цитоплазмы. В I-м (молекулярном) слое отчетливо видны два подслоя: наружный густоклеточный с крупными горизонтально ориентированными клетками Кахаля-Ретциуса и внутренний редкоклеточный, где располагаются преимущественно нервные отростки, а также небольшие

группы нейронов. Наружный зернистый (II-й) слой образован компактно расположенными, начинающими упорядочиваться в вертикальные колонки нейронами. III-й (наружный пирамидный) слой в данном препарате практически невозможно вычленивать, пирамидные нейроны в нем отсутствуют.

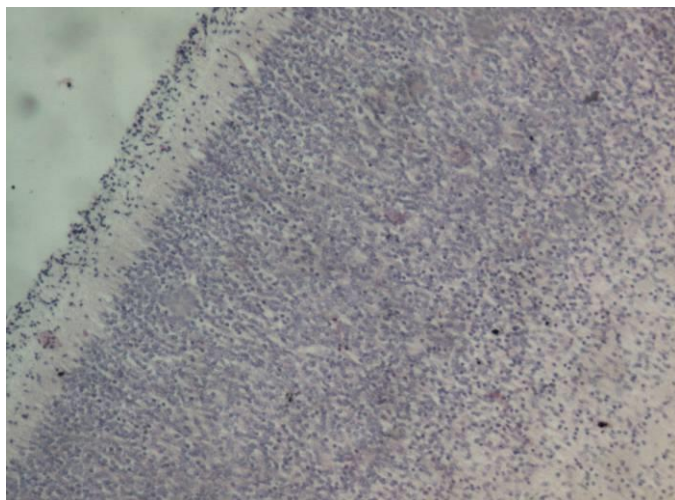


Рис. 3.1. Плод МН7, кора, окраска гематоксилином и эозином, объектив x5, окуляр x1.6

Белое вещество лежит между корой и герминативным матриксом. Белое вещество (рис. 3.2) состоит из переплетающихся между собой аксонов и дендритов нейронов. Между отростками располагается большое количество мигрирующих из герминативного матрикса по направлению к коре дифференцирующихся нервных клеток, а также макро- и микроглия. Кроме того, в белом веществе между отростками клеток находятся капилляры синусоидного типа.

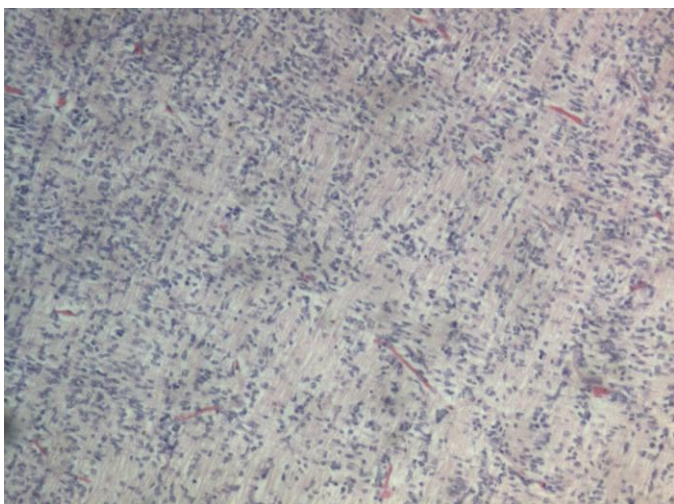


Рис. 3.2. Плод MN7, белое вещество, окраска гематоксилином и эозином, объектив x5, окуляр x1.6

Герминативный матрикс снаружи граничит с белым веществом, а изнутри – с полостью желудочка. Герминативный матрикс (рис. 3.3) состоит из плотно расположенных, равномерно распределенных в толще герминативного слоя нейро- и глиобластов. Нейро- и глиобласты имеют мономорфное строение. Внутренняя поверхность герминативной зоны выстлана однослойным однорядным эпителием – эпендимоцитами, которые имеют цилиндрическую или кубическую форму.

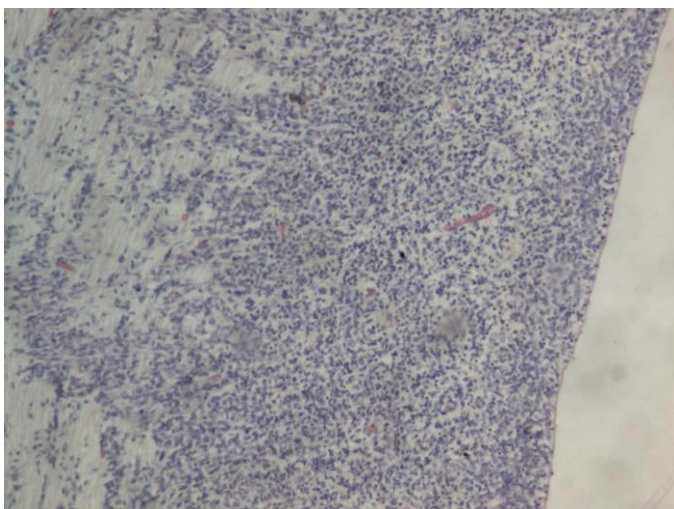


Рис. 3.3. Плод MN7, герминативный матрикс, окраска гематоксилином и эозином, объектив x5, окуляр x1.6

3.2 Иммуногистохимическая реакция на NeuN

Экспрессия белка NeuN выявляется во всех слоях мозговой ткани. В таблицах 3.1 и 3.2, а также на диаграмме 3.1 представлены результаты изучения уровня экспрессии NeuN у плодов МН5 и МН7 в коре, белом веществе и герминативном матриксе.

№ поля зрения	МН5			МН7		
	Кора	Белое вещество (рядом с герминативным матриксом)	Герминативный матрикс	Кора	Белое вещество (рядом с корой)	Герминативный матрикс
1	559	15	8	120	213	5
2	596	9	0	285	226	4
3	628	14	68	207	239	4
4	474	15	52	246	224	18
5	584	10	11	146	208	34
М	568,2	12,6	27,8	200,8	222	13
σ	58,22	2,88	30,20	68,38	12,10	13,15
<i>m</i>	29,11	1,44	15,10	34,19	6,05	6,58

Таблица 3.1. Экспрессия NeuN в клетках коры, белого вещества и герминативного матрикса у плодов МН5 и МН7. Условные обозначения: М – среднее арифметическое, σ – среднее квадратическое отклонение, *m* – средняя ошибка среднего арифметического

Достоверность разности М между:	МН5		МН7	
	t	p	t	P
корой и белым веществом	19,06	0,001	0,61	не достоверно
белым веществом и герминативным матриксом	1,00	не достоверно	23,39	0,001
корой и герминативным матриксом	16,48	0,001	5,39	0,01

Таблица 3.2. *t*-критерий. Достоверность разности средних величин (количество NeuN-позитивных клеток в поле зрения). М – среднее арифметическое

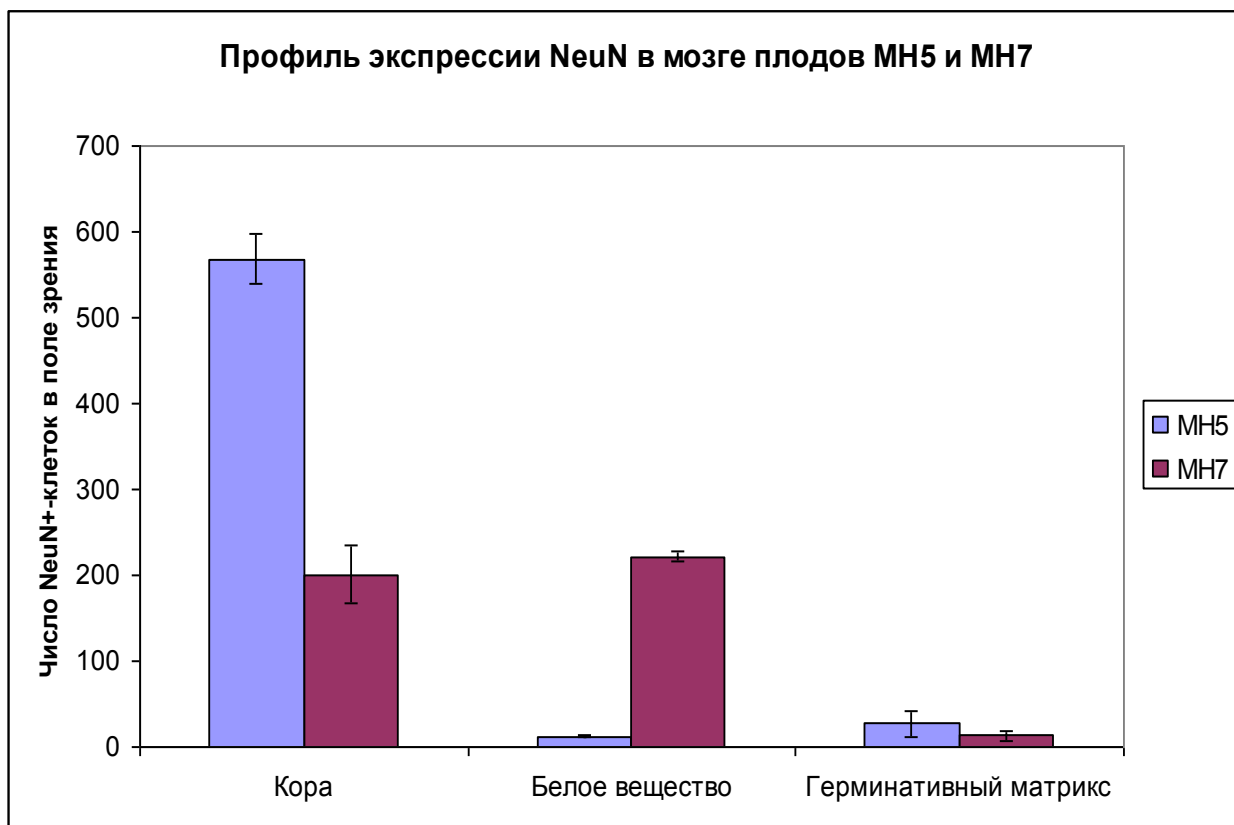


Диаграмма 3.1. Профиль экспрессии NeuN в мозге плодов МН5 и МН7

Во всех клетках, имеющих положительную иммуногистохимическую реакцию на NeuN, окрашивание обнаруживается в ядре и, в меньшей степени, в перинуклеарной области. Интересно заметить, что ядра прокрашиваются равномерно, ядрышки не визуализируются. Поскольку, по данным литературы [9], белок NeuN является специфичным маркером нейроцитов (которые уже вышли из клеточного цикла), то вполне закономерно, что количество экспрессирующих его клеток увеличивается по направлению от герминативного матрикса к коре: в герминативной зоне лишь единичные клетки слабо экспрессируют NeuN, в то время как в практически любом поле зрения в коре количество таких клеток превышает несколько сотен (568±58 и 201±68 у МН5 и МН7 соответственно). При этом у плода МН5 экспрессия NeuN в коре достоверно больше, чем в герминативном матриксе и белом веществе, в то время как у плода МН7 экспрессия NeuN в герминативном матриксе достоверно меньше, чем в коре и белом веществе (диаграмма 3.1, таблица 3.2). Большая разница в количестве NeuN+-клеток в белом веществе у плодов МН5 и МН7 объясняется тем, что у плода МН5 анализировались

участки белого вещества, расположенные ближе к герминативному матриксу, а у плода МН7 – к коре.

В коре (рис. 3.4) белок NeuN экспрессируется подавляющим большинством клеток, причем в одних клетках (их большинство) наблюдается яркая, а в других (их незначительное количество) – слабая степень окрашивания. При этом в молекулярном слое коры (в клетках Кахаля-Ретциуса) белок NeuN не обнаруживается. Объяснение этому феномену (а равно как и отсутствию реакции на NeuN в некоторых других нейронах) в литературе на данный момент отсутствует.

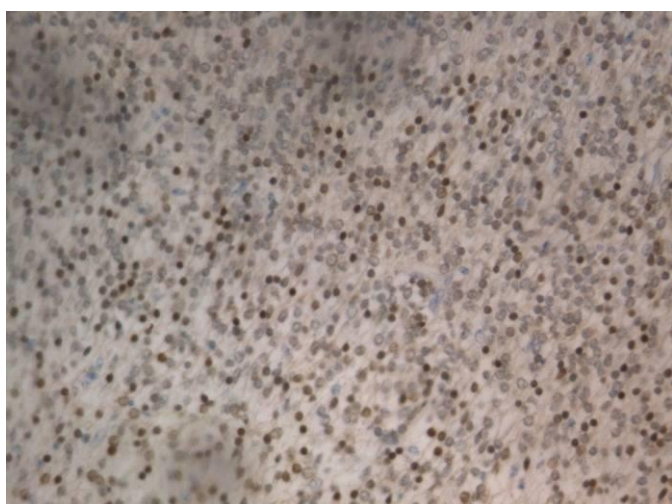


Рис. 3.4. Плод МН7, кора, реакция на NeuN, объектив x10, окуляр x1.6

Что касается белого вещества (рис. 3.5) то в той половине белого вещества, которая прилежит к коре, наблюдается значительное (рис. 3.6) количество экспрессирующих NeuN клеток с ярко окрашенными ядрами (в среднем 222 ± 12 у МН7), в то время как в другой половине (рис. 3.7), которая граничит с герминативным матриксом, выявляются лишь единичные клетки, имеющие положительную реакцию на NeuN (в среднем 13 ± 3 у МН5).

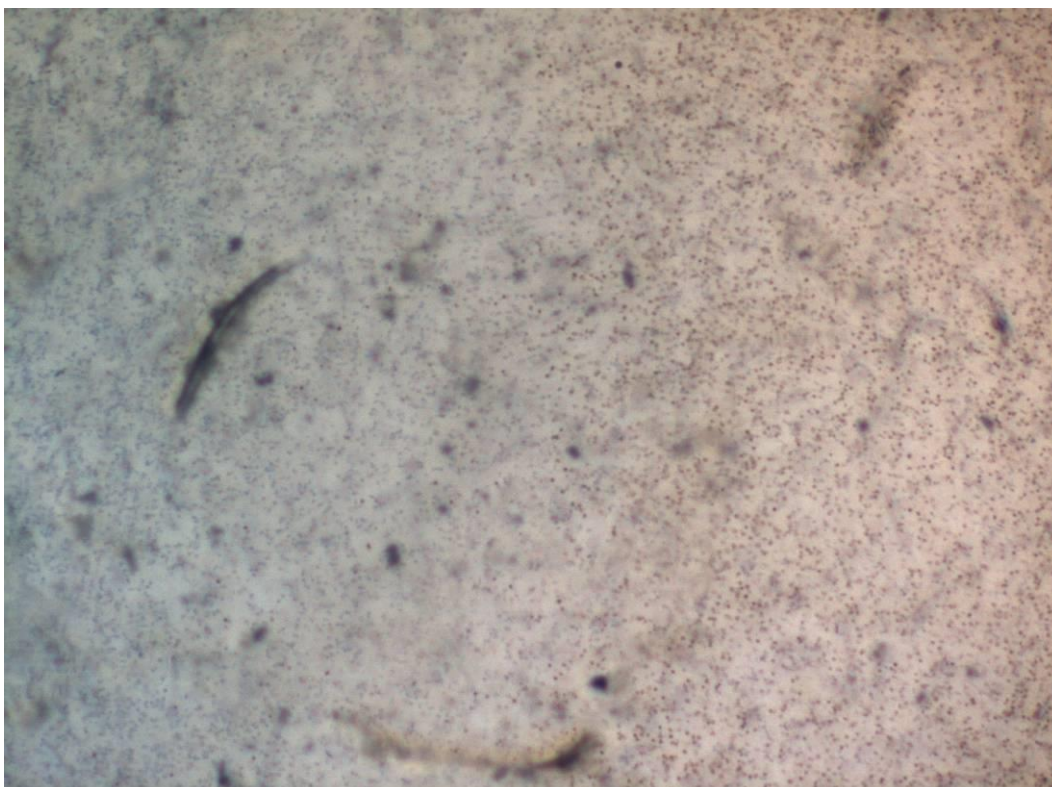


Рис. 3.5. Плод МН7, общий вид белого вещества, реакция на NeuN, объектив x2,5, окуляр x1.6

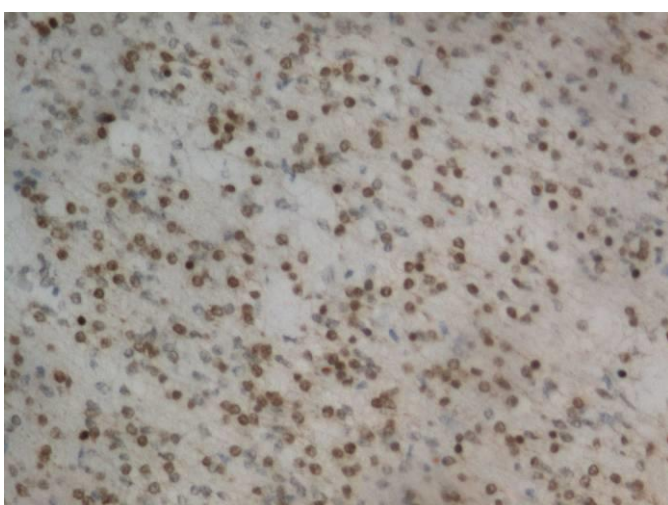


Рис. 3.6. Плод МН7, белое вещество (ближе к коре), реакция на NeuN, объектив x10, окуляр x1.6

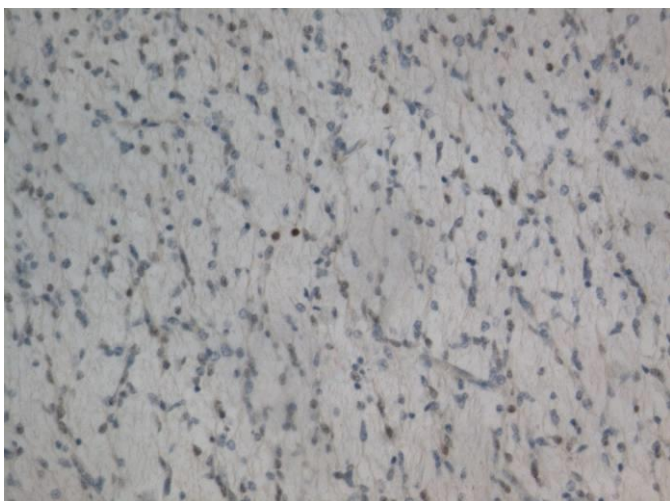


Рис. 3.7. Плод МН5, белое вещество (ближе к герминативному матриксу), реакция на NeuN, объектив x10, окуляр x1.6

На протяжении всего герминативного матрикса, в котором содержатся по большей части нейро- и глиобласты, обнаруживаются лишь единичные клетки, преимущественно слабо экспрессирующие NeuN (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Плод МН5, герминативный матрикс, реакция на NeuN, объектив x10, окуляр x1.6

Таким образом, созревающие нервные клетки, мигрируя по направлению от герминативного матрикса к коре, по мере продолжающейся дифференцировки начинают активнее экспрессировать NeuN: при этом увеличивается как само количество NeuN-позитивных клеток, так и яркость их окрашивания. В коре уровень экспрессии NeuN максимален, что четко коррелирует с количеством в ней дифференцированных нейронов.

3.3 Иммуногистохимическая реакция на Ki67

Экспрессия белка Ki67 выявляется во всех слоях мозговой ткани. В таблицах 3.3, 3.4 и диаграмме 3.2 представлены результаты изучения уровня экспрессии Ki67 у плодов МН5 и МН7 в коре, белом веществе и герминативном матриксе.

№ поля зрения	МН5			МН7		
	Кора	Белое вещество	Герминативный матрикс	Кора	Белое вещество	Герминативный матрикс
1	3	68	249	1	93	212
2	0	82	226	0	107	195
3	5	112	248	0	99	199
4	2	97	226	0	110	175
5	2	98	220	1	81	215
М	2,4	91,4	233,8	0,4	98	199,2
σ	1,82	16,85	13,65	0,55	11,62	15,94
<i>m</i>	0,91	8,42	6,82	0,27	5,81	7,97

Таблица 3.3. Экспрессия Ki67 в клетках коры, белого вещества и герминативного матрикса у плодов МН5 и МН7. Условные обозначения: М – среднее арифметическое, σ – среднее квадратическое отклонение, *m* – средняя ошибка среднего арифметического

	МН5		МН7	
	t	p	t	p
Достоверность разности М между: корой и белым веществом	10,51	0,001	16,78	0,001
белым веществом и герминативным матриксом	13,14	0,001	10,26	0,001
корой и герминативным матриксом	33,62	0,001	24,92	0,001

Таблица 3.4. *t*-критерий. Достоверность разности средних величин (количество Ki67-позитивных клеток в поле зрения). М – среднее арифметическое

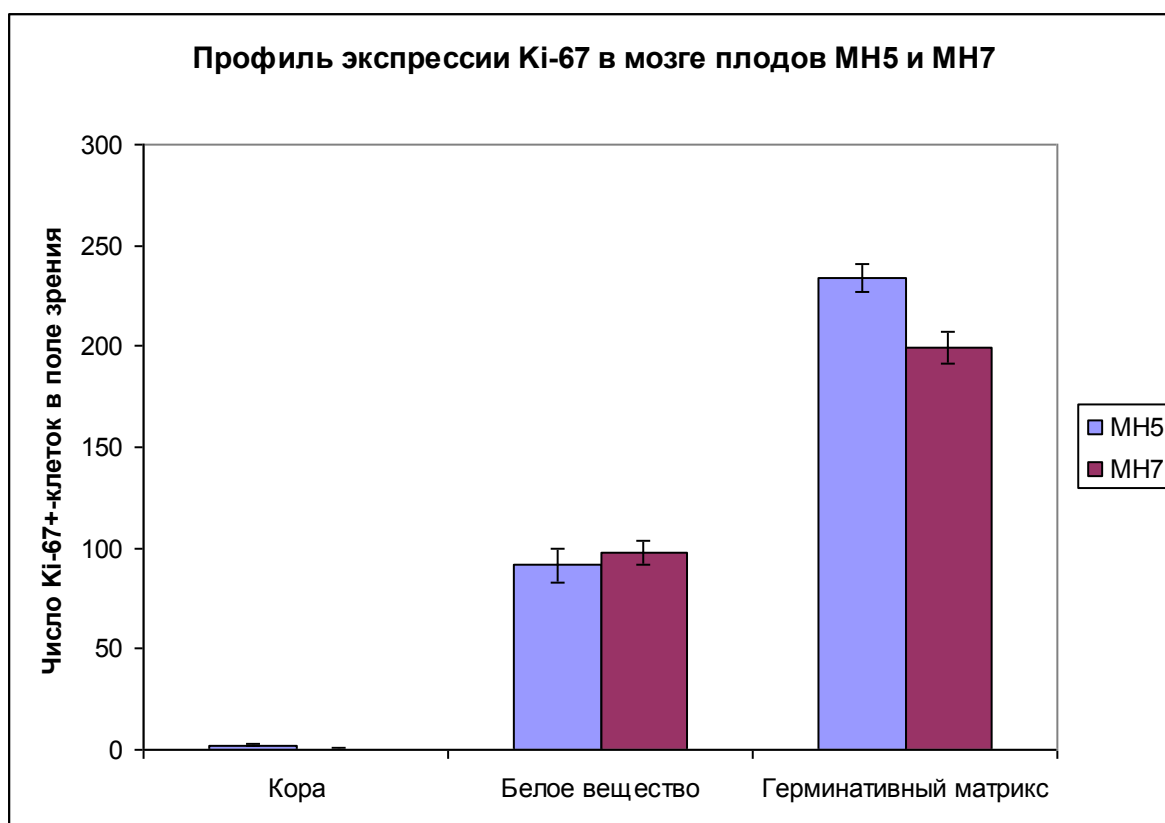


Диаграмма 3.2. Профиль экспрессии Ki67 в мозге плодов МН5 и МН7

Во всех клетках, имеющих положительную иммуногистохимическую реакцию на Ki67, окрашивание обнаруживается в ядре. При этом в некоторых клетках прокрашивается всё ядро (фаза G2 клеточного цикла), а в некоторых – только ядрышко (фаза G1 клеточного цикла) [70, 189]. В большинстве полей зрения выявляется как яркая, так и слабая (чаще, когда прокрашивается только ядрышко) степень окрашивания. По данным литературы [32] известно, что белок Ki67 является маркером клеток, находящихся в активных фазах клеточного цикла (G1, S, G2, M), при этом уровень экспрессии Ki67 неуклонно растёт от фазы G1 к фазе M. Таким образом, вполне закономерно, что количество экспрессирующих его клеток достоверно (таблица 3.4) уменьшается по направлению от герминативного матрикса к коре (диаграмма 3.2): в герминативной зоне, где преобладают пролиферирующие нейро- и глиобласты, в поле зрения Ki67 экспрессирует в среднем 199 ± 16 (у МН7) и 234 ± 14 (у МН5) клеток, в то время как в коре (где в основном находятся созревающие и терминально дифференцированные нейроны и глиоциты) Ki67 выявляется лишь в единичных клетках (0-5 в поле зрения) (рис. 3.9).

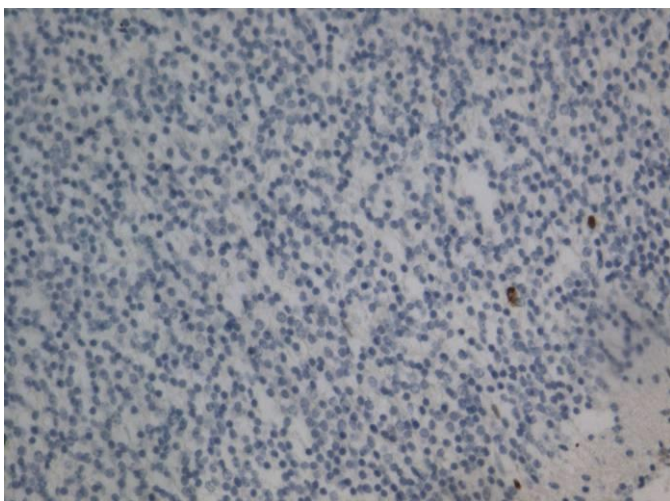


Рис. 3.9. Плод МН5, кора, реакция на Ki67, объектив x10, окуляр x1.6

Что касается белого вещества (рис. 3.10) то в той половине белого вещества, которая прилежит к герминативному матриксу, наблюдается значительное (рис. 3.11) количество экспрессирующих Ki67 клеток с ярко окрашенными ядрами (91 ± 17 и 98 ± 12 клеток в поле зрения у МН5 и МН7 соответственно), в то время как в другой половине, которая граничит с корой, выявляются лишь единичные клетки, имеющие положительную реакцию на Ki67.

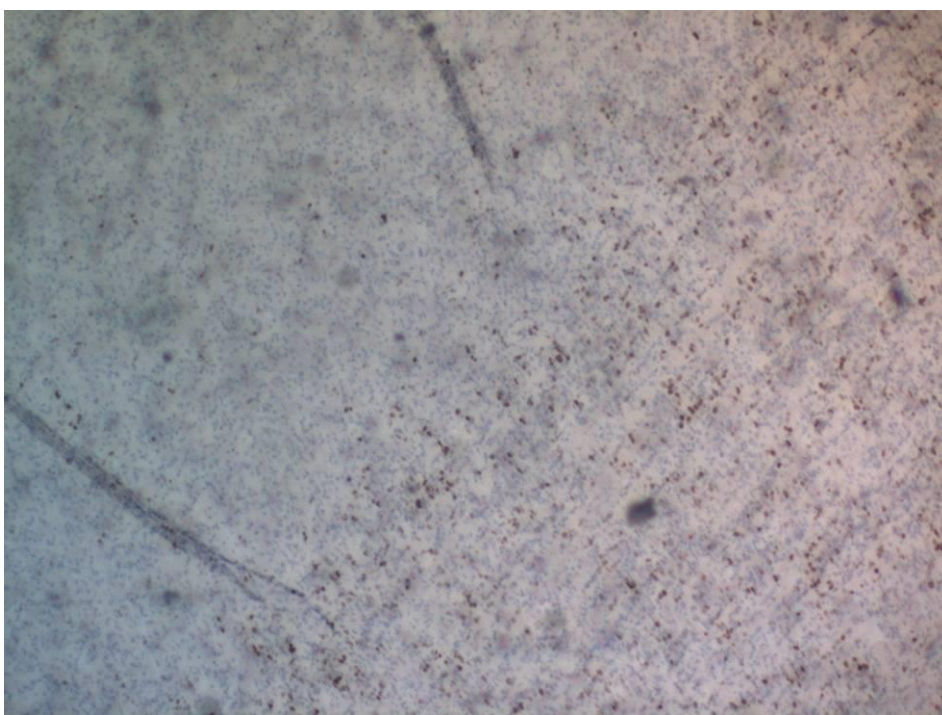


Рис. 3.10. Плод МН7, белое вещество (общий вид), реакция на Ki67, объектив x2,5, окуляр x1.6

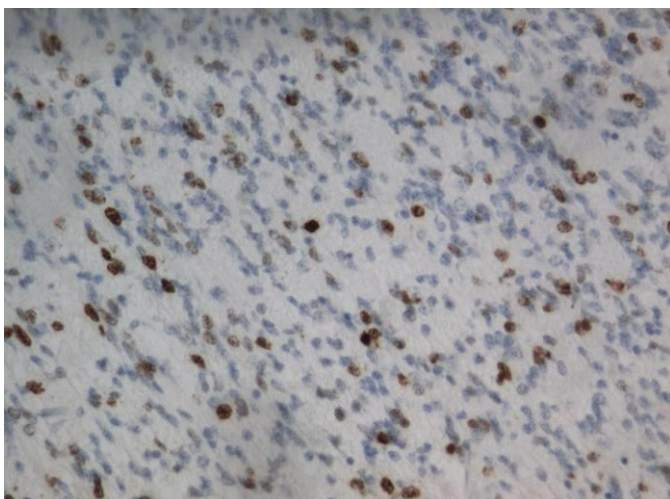


Рис. 3.11. Плод MN5, белое вещество (ближе к герминативному матриксу), реакция на Ki67, объектив x10, окуляр x1.6

В герминативном матриксе (рис. 3.12) экспрессия Ki67 еще более выраженная, чем в прилежащем белом веществе: 220-249 и 175-215 клеток в поле зрения у MN5 и MN7 соответственно, причем количество Ki67-позитивных клеток заметно больше около эпендимы.

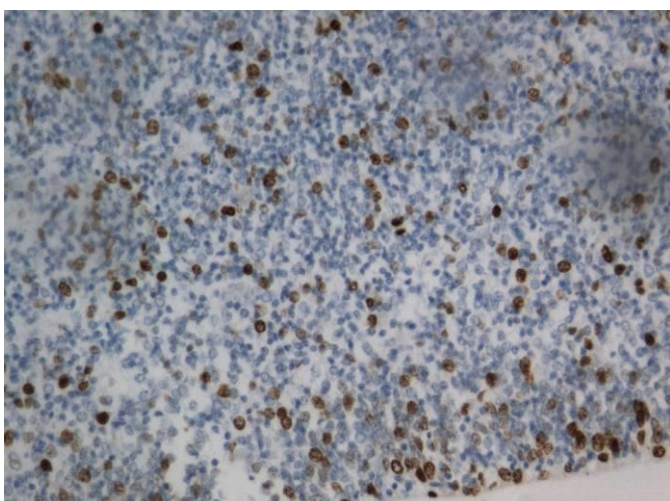


Рис. 3.12. Плод MN5, герминативный матрикс, реакция на Ki67, объектив x10, окуляр x1.6

Таким образом, с уменьшением числа низкодифференцированных клеток и, соответственно, с уменьшением количества клеток, находящихся в активных фазах клеточного цикла, по направлению от герминативного матрикса к коре наблюдается и снижение уровня экспрессии маркера Ki67.

3.4 Иммуногистохимическая реакция на PCNA

Экспрессия белка PCNA выявляется, в основном, в белом веществе и герминативном матриксе мозговой ткани. В таблицах 3.5 и 3.6, а также в диаграмме 3.3 представлены результаты изучения уровня экспрессии PCNA у плодов МН5 и МН7 в коре, белом веществе и герминативном матриксе.

№ поля зрения	МН5			МН7		
	Кора	Белое вещество	Герминативный матрикс	Кора	Белое вещество	Герминативный матрикс
1	2	17	56	0	23	54
2	1	17	41	1	34	57
3	1	25	29	0	28	51
4	1	9	37	0	29	-
5	0	21	45	0	30	63
М	1	17,8	41,6	0,2	28,8	56,25
σ	0,71	5,93	9,99	0,45	3,96	5,12
<i>m</i>	0,35	2,97	4,99	0,22	1,98	2,56

Таблица 3.5. Экспрессия PCNA в клетках коры, белого вещества и герминативного матрикса у плодов МН5 и МН7. Условные обозначения: М – среднее арифметическое, σ – среднее квадратическое отклонение, *m* – средняя ошибка среднего арифметического

	МН5		МН7	
	t	p	t	p
Достоверность разности М между:				
корой и белым веществом	5,62	0,01	14,34	0,001
белым веществом и герминативным матриксом	4,10	0,05	8,48	0,01
корой и герминативным матриксом	8,11	0,01	21,80	0,001

Таблица 3.6. *t*-критерий. Достоверность разности средних величин (количество PCNA-позитивных клеток в поле зрения). М – среднее арифметическое

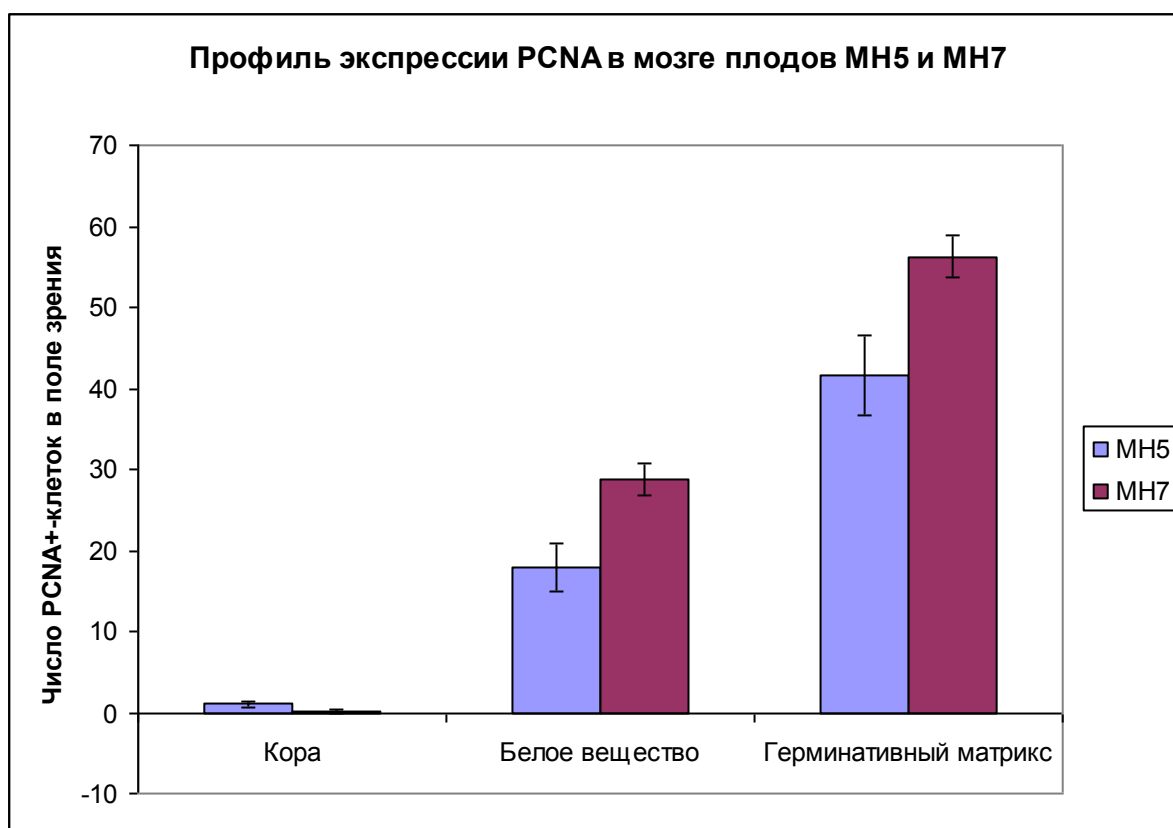


Диаграмма 3.3. Профиль экспрессии PCNA в мозге плодов МН5 и МН7

Во всех клетках, имеющих положительную иммуногистохимическую реакцию на PCNA, окрашивание обнаруживается в ядре. При этом практически во всех участках мозговой ткани наблюдается слабое фоновое прокрашивание цитоплазмы, которое максимально хорошо заметно в белом веществе (рис. 3.14). В практически всех полях зрения в положительных на PCNA клетках выявляется окрашивание слабой степени.

В коре (рис. 3.13) белок PCNA можно наблюдать в единичных клетках лишь в некоторых полях зрения.

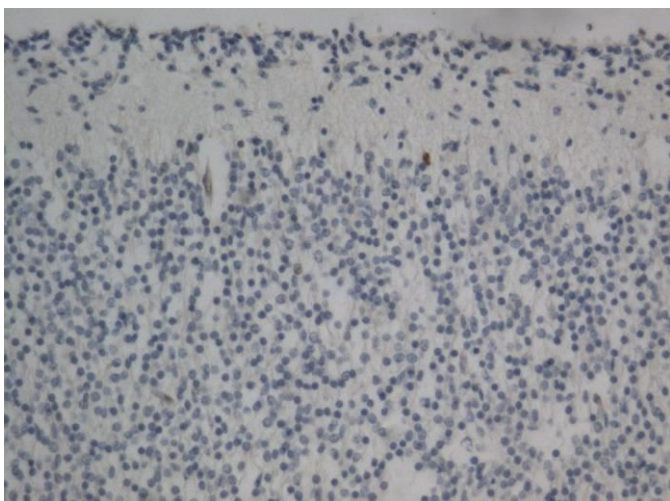


Рис. 3.13. Плод МН5, кора, реакция на PCNA, объектив x10, окуляр x1.6

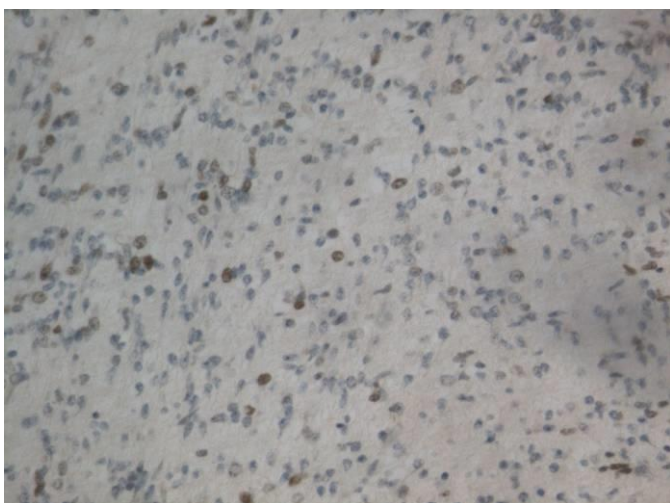


Рис. 3.14. Плод МН7, белое вещество, реакция на PCNA, объектив x10, окуляр x1.6

По данным литературы известно, что белок PCNA, участвующий в процессах репликации и репарации [155, 172], является маркером клеток, находящихся в фазе S клеточного цикла либо интерфазных клеток, в которых происходят процессы репарации [79]. Таким образом, вполне закономерно, что количество экспрессирующих PCNA клеток максимально в герминативной зоне и белом веществе, где много пролиферирующих нейро- и глиобластов. При этом среднее количество PCNA-позитивных клеток достоверно больше в герминативном матриксе по сравнению с белым веществом (таблицы 3.5 и 3.6).

В белом веществе (рис. 3.14) PCNA экспрессируют 18 ± 6 и 29 ± 4 клеток в поле зрения у МН5 и МН7 соответственно, а в герминативном матриксе – 42 ± 10 и 56 ± 5 клеток (рис. 3.15). Обилие PCNA-позитивных клеток в белом

веществе может быть связано не только с большим количеством находящихся в S-фазе клеток, но и с относительно медленным катаболизмом этого белка [4, 34]. В то же время в коре (где PCNA может обнаруживаться лишь в интерфазных клетках, в которых происходит репарация) этот маркер выявляется лишь в единичных клетках (от 0 до 2 в поле зрения) (рис. 3.13).

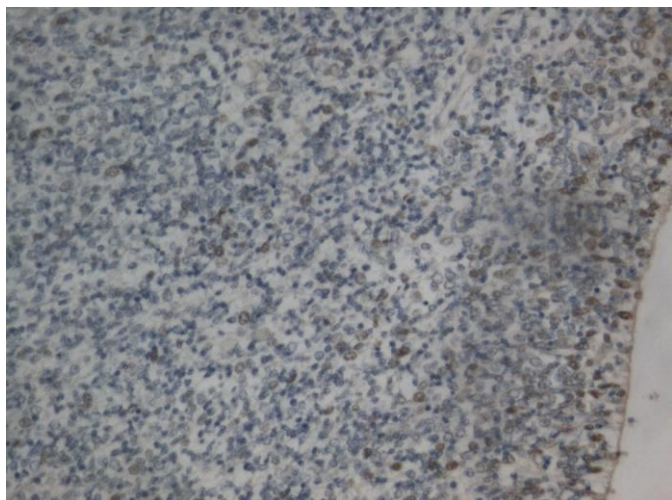


Рис. 3.15. Плод МН7, герминативный матрикс, реакция на PCNA, объектив x10, окуляр x1.6

Таким образом, по мере уменьшения числа низкокодифференцированных клеток и, соответственно, по мере уменьшения количества клеток, в которых идут процессы подготовки к митозу (в частности, репликация в фазу S клеточного цикла), по направлению от герминативного матрикса к коре наблюдается и снижение уровня экспрессии маркера PCNA. Следует также заметить, что даже в герминативном матриксе, где белка PCNA выявляется больше, чем в остальных участках мозговой ткани, уровень экспрессии этого маркера остается очень слабым по сравнению с другим маркером пролиферации – белком Ki67.

3.5 Иммуногистохимическая реакция на SOX2

Экспрессия белка SOX2 выявляется во всех слоях мозговой ткани. В таблицах 3.7 и 3.8, а также в диаграмме 3.4 представлены результаты изучения уровня экспрессии SOX2 у плодов МН5 и МН7 в коре, белом веществе и герминативном матриксе. Во всех клетках, имеющих положительную

иммуногистохимическую реакцию на SOX2, окрашивание обнаруживается в ядре. Ядро в SOX2-позитивных клетках окрашивается неравномерно. Кроме того, практически во всех участках мозговой ткани наблюдается слабое фоновое прокрашивание цитоплазмы, которое максимально хорошо заметно в белом веществе (рис. 3.18).

№ поля зрения	МН5			МН7		
	Кора	Белое вещество	Герминативный матрикс	Кора	Белое вещество	Герминативный матрикс
1	46	157	713	68	268	1075
2	44	186	617	61	291	1048
3	45	176	702	64	329	1064
4	40	273	759	74	265	1070
5	43	254	653	83	292	1016
М	43,6	209,2	688,8	70	289	1054,6
σ	2,30	51,10	55,06	8,75	25,64	23,85
<i>m</i>	1,15	25,55	27,53	4,37	12,82	11,92

Таблица 3.7. Экспрессия SOX2 в клетках коры, белого вещества и герминативного матрикса у плодов МН5 и МН7. Условные обозначения: М – среднее арифметическое, σ – среднее квадратическое отклонение, *m* – средняя ошибка среднего арифметического

	МН5		МН7	
	t	p	t	p
Достоверность разности М между: корой и белым веществом	6,48	0,01	16,17	0,001
белым веществом и герминативным матриксом	12,77	0,001	43,73	0,001
корой и герминативным матриксом	23,42	0,001	77,52	0,001

Таблица 3.8. *t*-критерий. Достоверность разности средних величин (количество PCNA-позитивных клеток в поле зрения). М – среднее арифметическое

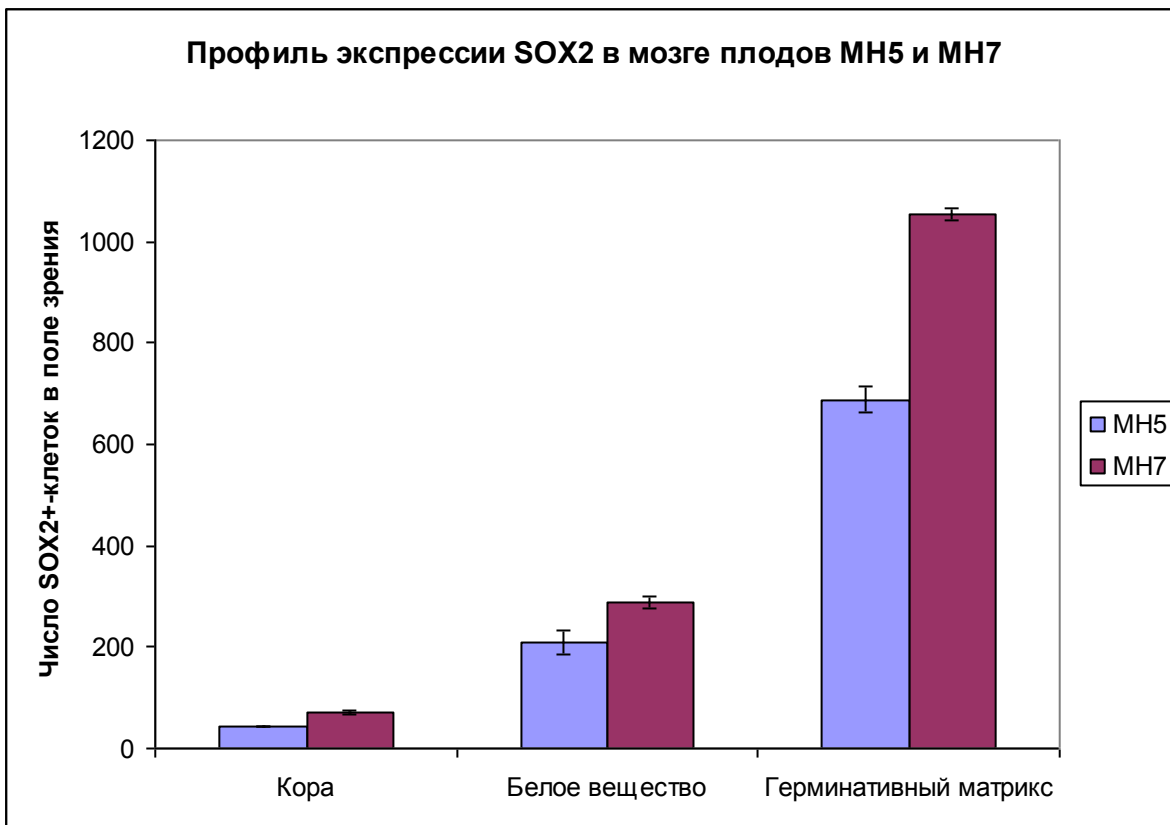


Диаграмма 3.4. Профиль экспрессии PCNA в мозге плодов МН5 и МН7

По данным литературы [31, 42] известно, что белок SOX2 является транскрипционным фактором, участвующим в поддержании плюрипотентности. Таким образом, вполне закономерно, что количество экспрессирующих его клеток достоверно уменьшается по направлению от герминативного матрикса к коре (диаграмма 3.4, таблица 3.8): в герминативной зоне, где преобладают недифференцированные нейро- и глиобласты, практически все клетки в поле зрения экспрессируют SOX2 (689±55 и 1055±24 клеток в поле зрения у плодов МН5 и МН7 соответственно), причем практически в каждой SOX2-позитивной клетке наблюдается яркая степень окрашивания (рис. 3.16).

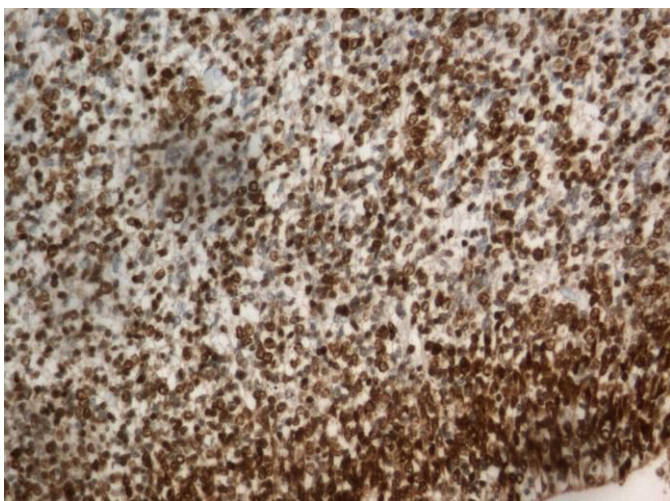


Рис. 3.16. Плод МН7, герминативный матрикс, реакция на SOX2, объектив x10, окуляр x1.6

Что касается белого вещества (рис. 3.17), то в той половине белого вещества, которая прилежит к герминативному матриксу, наблюдается значительное (рис. 3.18) количество (209 ± 51 и 289 ± 26 клеток в поле зрения у МН5 и МН7 соответственно) экспрессирующих SOX2 клеток как с ярко окрашенными ядрами, в то время как в другой половине, которая граничит с корой, выявляется существенно меньшее количество клеток, имеющих положительную реакцию на SOX2.

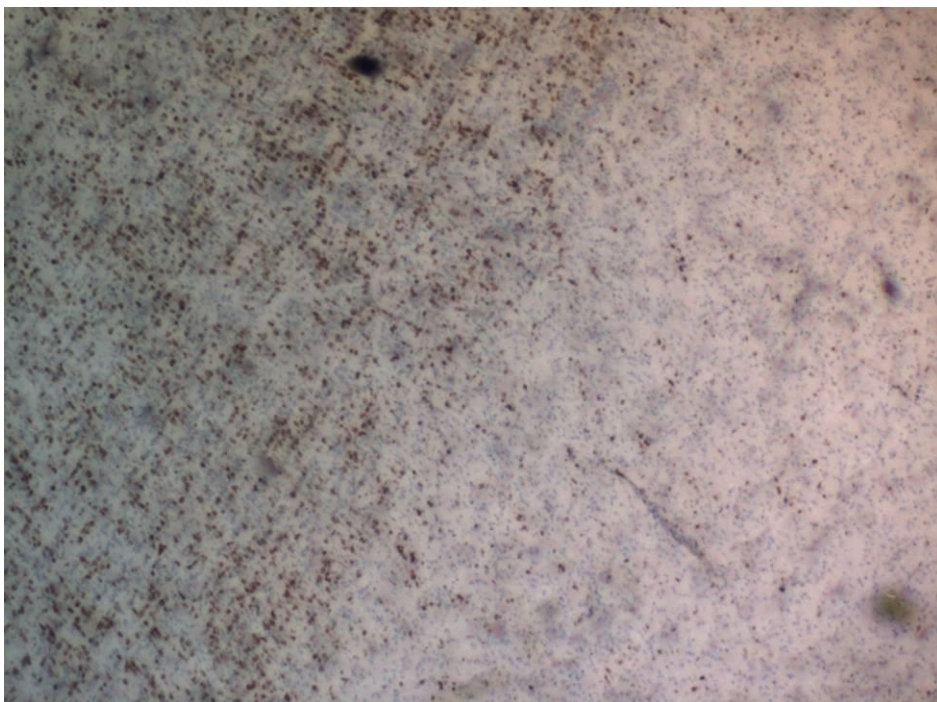


Рис. 3.17. Плод МН7, белое вещество (общий вид), реакция на SOX2, объектив x2.5, окуляр x1.6

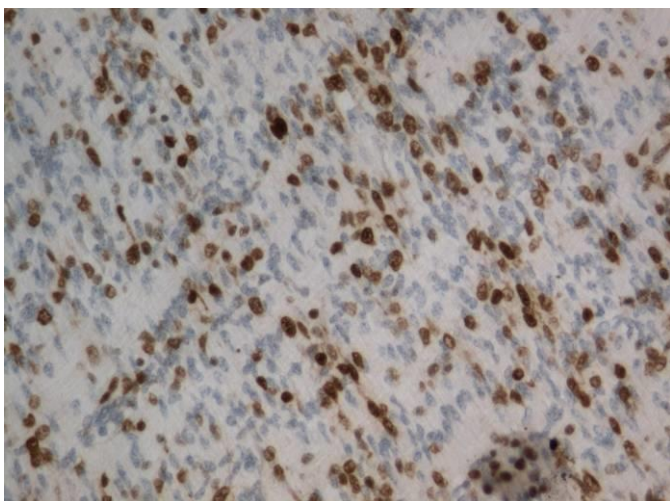


Рис. 3.18. Плод МН7, белое вещество (ближе к герминативному матриксу), реакция на SOX2, объектив x10, окуляр x1.6

В коре (рис. 3.19), где в основном содержатся в той или иной степени дифференцированные нейроны и глиоциты, лишь небольшое количество клеток (в среднем, 44 ± 2 и 70 ± 9 в поле зрения у МН5 и МН7 соответственно) дает положительную реакцию на SOX2, причем практически все SOX2-позитивные клетки имеют слабо окрашенные ядра. Однако, всё обстоит иначе в молекулярном слое коры: там практически все клетки имеют ярко выраженную положительную реакцию на SOX2. Объяснение этому феномену в литературе на данный момент отсутствует.

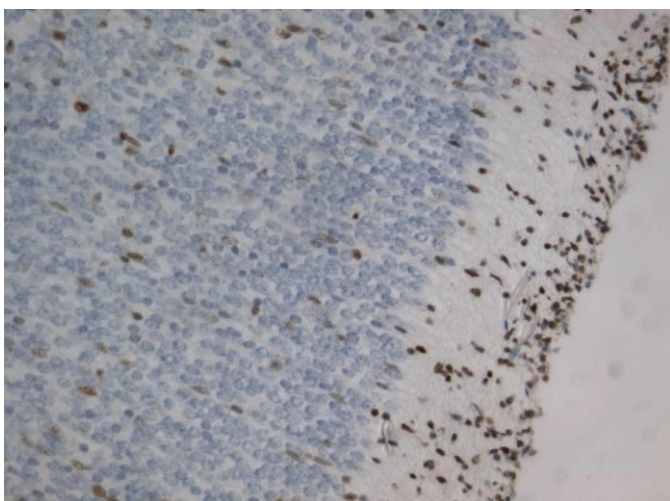


Рис. 3.19. Плод МН7, кора, реакция на SOX2, объектив x10, окуляр x1.6

Таким образом, по мере уменьшения количества плюрипотентных клеток (по направлению от герминативного матрикса к коре), наблюдается снижение уровня экспрессии маркера SOX2.

3.6 Иммуногистохимическая реакция на Nestin

Уровень экспрессии нестина был изучен у плодов МН5 и МН7 в коре, белом веществе и герминативном матриксе. Нестин выявляется во всех слоях мозговой ткани. Во всех клетках, имеющих положительную иммуногистохимическую реакцию на нестин, окрашивание обнаруживалось в отростках (в подавляющем большинстве случаев) либо в цитоплазме (только в некоторых клетках). Максимально большое количество отростков окрашивалось в белом веществе (рис. 3.20), несколько меньшее – в герминативном матриксе (рис. 3.21). В коре (рис. 3.22) реакция на нестин была выражена в наименьшей степени – прокрашивались отростки лишь некоторых клеток. При этом в коре плода МН5 (рис. 3.22 а) реакция на нестин была заметно более выраженной, чем у плода МН7 (рис. 3.22 б). Следует также заметить, что в герминативном матриксе и белом веществе окрашивание было преимущественно ярким, а в коре – слабым.

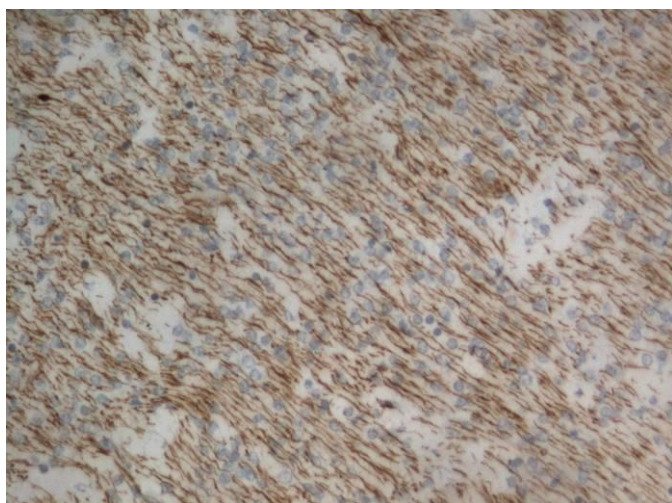


Рис. 3.20. Плод МН7, белое вещество, реакция на Nestin, объектив x10, окуляр x1.6

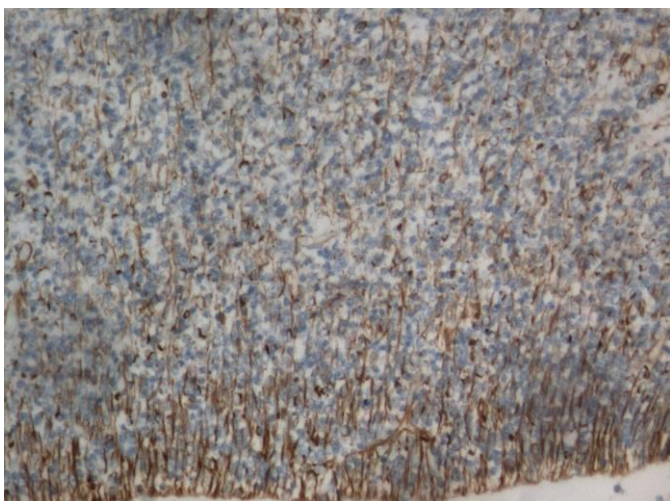
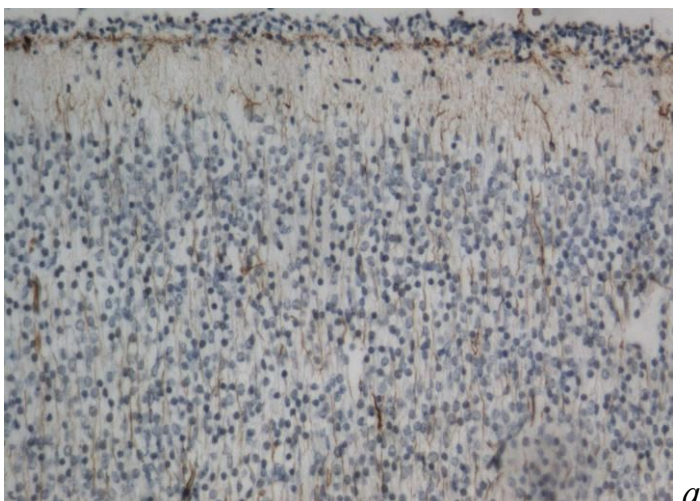
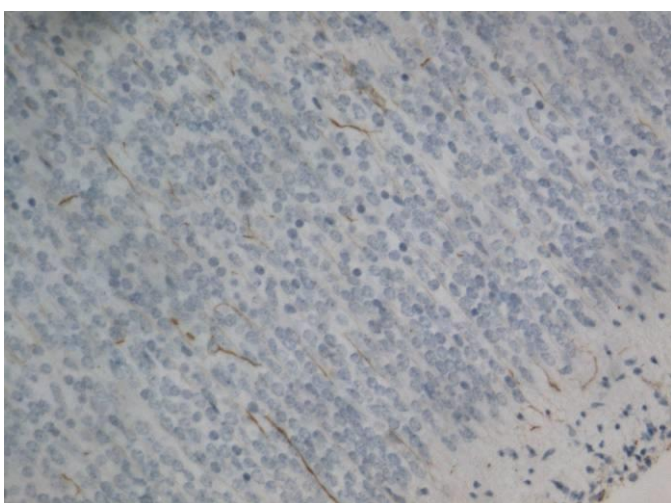


Рис. 3.21. Плод МН7, герминативный матрикс, реакция на Nestin, объектив x10, окуляр x1.6



а



б

Рис. 3.22. а – плод МН5, б – плод МН7. Кора, реакция на Nestin, объектив x10, окуляр x1.6

По данным литературы известно, что белок нестин относится к промежуточным филаментам VI-го класса. Нестин экспрессируется

преимущественно в быстро делящихся клетках развивающихся или регенерирующих тканей [128].

Таким образом, значительное количество нестина в герминативном матриксе обуславливается сосредоточением в этой зоне недифференцированных и пролиферирующих клеток. Еще более выраженную положительную реакцию на нестин в белом веществе можно (хотя бы отчасти) объяснить тем, что дифференцирующиеся клетки мигрируют через белое вещество к коре. При этом нестин может быть нужен для обеспечения стабилизации внутриклеточной структуры у мигрирующих клеток (путем взаимодействия с микротрубочками и микрофиламентами) [1, 85, 87, 88, 151]. Наличие реакции на нестин в коре, возможно, связано с созревающими глиоцитами: некоторое время GFAP-положительные клетки продолжают экспрессировать нестин [150].

3.7 Иммуногистохимическая реакция на Msi1

Иммуногистохимическая реакция на Msi1 была изучена у плодов МН5 и МН7 в коре, белом веществе и герминативном матриксе. Во всех участках мозговой ткани (у обоих плодов) наблюдалось слабое фоновое окрашивание цитоплазмы и отростков (рис. 3.23, 3.24, 3.25). Кроме того, в отдельных участках коры, белого вещества и герминативного матрикса в единичных случаях выявлялось «островковое» окрашивание цитоплазмы отдельных групп клеток (рис. 3.23, 3.24 – стрелки).

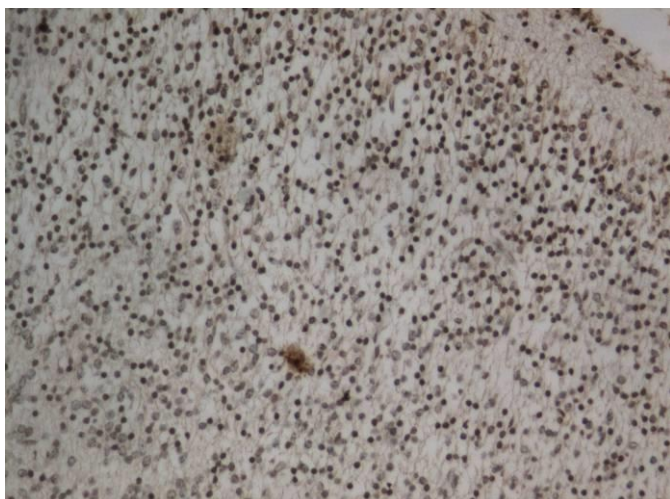


Рис. 3.23. Плод МН5, кора, реакция на Msi1, объектив x10, окуляр x1.6



Рис. 3.24. Плод МН5, белое вещество, реакция на Msi1, объектив x10, окуляр x1.6

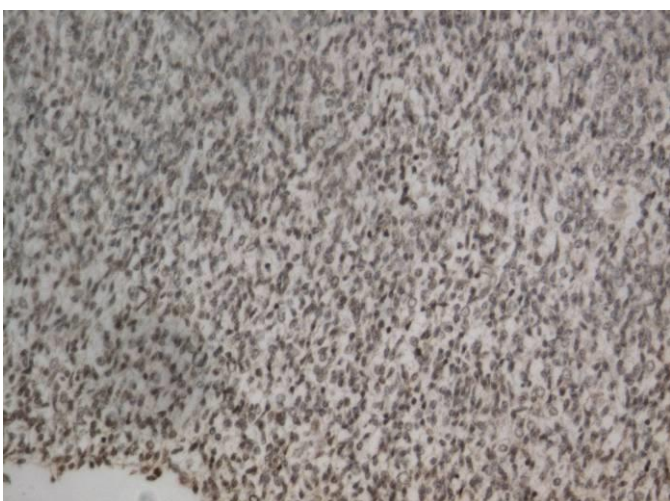


Рис. 3.25. Плод МН5, герминативный матрикс, реакция на Msi1, объектив x10, окуляр x1.6

Msi1 – РНК-связывающий белок, участвующий в регуляции трансляции [21, 76, 77, 180, 199]. Msi1 поддерживает пролиферацию мультипотентных нейральных стволовых клеток и клеток-предшественников [163]. По данным литературы [105], Msi1 экспрессируется преимущественно в пролиферирующих недифференцированных клетках герминативного матрикса (нейральные стволовые клетки, нейральные клетки-предшественники, астроглиальные клетки-предшественники), а в следовых количествах – и в постмитотических нейронах. При этом клетки олигодендроглиальной линии дифференцировки всегда давали отрицательную реакцию на Msi1.

Полученные результаты плохо согласуются с имеющимися литературными данными, что говорит о необходимости дальнейшего изучения профиля экспрессии этого маркера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы были получены данные, требующие адекватной интерпретации.

Некоторые из полученных в данной работе результатов вполне согласуются с предшествующими исследованиями. Следует заметить, что количество литературных данных, описывающих выявление различных белков в разных областях мозга плода/эмбриона человека иммуногистохимическим методом, крайне скудно. Одной из таких работ является статья Р. Yang и соавторов [229], которые исследовали экспрессию NeuN, Ki67 и нестина в клетках развивающегося гиппокампа у плодов. Нами было показано, что экспрессия NeuN возрастает по направлению от герминативного матрикса к коре, что, в свою очередь, связано с увеличением в этом направлении числа дифференцированных нейронов [156, 224, 229]. Что касается белка Ki67, то в полученных нами данных количество Ki67-позитивных клеток уменьшается по направлению от герминативного матрикса к коре, что является следствием выхода всё большего числа клеток из активных фаз клеточного цикла в связи с их дифференцировкой [32]. Полученные нами данные о том, что по

направлению от герминативного матрикса к коре уменьшается количество выявляемого в клетках нестина, можно тоже объяснить тем, что в герминативном матриксе и белом веществе содержится больше быстро делящихся недифференцированных клеток-предшественников, чем в коре [128, 151].

Некоторые данные были получены впервые. В частности, иммуногистохимическая реакция на белок PCNA в развивающемся мозге была ранее исследована у человека только на ранних стадиях эмбрионального развития (6-8 нед. гестации) [8]. Вдобавок к этому существует несколько статей, описывающих экспрессию PCNA в развивающемся мозге мышей, крыс и лягушек [60, 99, 175]. Нами было показано, что экспрессия PCNA уменьшается по направлению от герминативного матрикса к коре, что, вероятно, связано с уменьшением количества клеток, находящихся в активной фазе клеточного цикла (а именно в S-фазе). Эти данные хорошо укладываются в современные представления о нейрогенезе. В литературе на сегодняшний день практически отсутствуют данные об иммуногистохимическом исследовании экспрессии SOX2 в ткани развивающегося головного мозга. Полученные нами данные об уменьшении уровня экспрессии транскрипционного фактора SOX2 по направлению от герминативного матрикса к коре хорошо согласуются с представлениями о том, что SOX2 – маркер плюрипотентных клеток [24, 31, 42, 177], количество которых закономерно уменьшается по направлению к коре.

Кроме того, были получены результаты, которые плохо согласуются с имеющимися литературными данными. А именно, маркер Msi1 экспрессировался в некоторых участках коры, белого вещества и герминативного матрикса в виде окрашивания цитоплазмы отдельных групп клеток в виде «островков» (рис. 3.23 и 3.24). Полученные результаты иммуногистохимического окрашивания плохо согласуются с имеющимися литературными данными, согласно которым Msi1 выявляется преимущественно в цитоплазме пролиферирующих недифференцированных

клеток герминативного матрикса, а в коре положительную реакцию на Msi1 дают лишь единичные постмитотические нейроны [105].

Несмотря на многочисленные и многолетние исследования нейрогенеза, многие аспекты этого процесса остаются невыясненными. В частности, требуют дальнейшего изучения следующие вопросы: физиологический нейрогенез во взрослом мозге, нейрогенез при травматическом, ишемическом, инфекционном поражении головного мозга и т. д. Полученные данные позволят в дальнейшем разработать принципиально новые подходы к лечению неврологической патологии. Кроме того, нельзя сказать, что полностью исследован нейрогенез (а особенно его иммуногистохимические аспекты) у эмбрионов и плодов. Все вышеназванные вопросы требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. При окрашивании ткани мозга плодов 23-24 недель гестации гематоксилином и эозином в неокортексе прослеживаются I-III-й клеточные слои, причем в нейронах процессы дифференцировки еще не завершены: нервные клетки имеют крупное округлое ядро с 1-2 ядрышками и минимальное количество цитоплазмы. Белое вещество состоит из переплетающихся между собой аксонов и дендритов нейронов, между которыми располагается большое количество мигрирующих из герминативного матрикса по направлению к коре дифференцирующихся нервных клеток, а также макро- и микроглия. Герминативный матрикс представлен мономорфными, плотно расположенными, равномерно распределенными в толще герминативного слоя нейро- и глиобластами.

2. По мере уменьшения числа низкодифференцированных клеток и, соответственно, по мере уменьшения количества клеток, находящихся в активных фазах клеточного цикла, по направлению от герминативного матрикса к коре наблюдается снижение уровня экспрессии маркеров делящихся (Ki67, PCNA) и плюрипотентных (SOX2, Nestin) клеток.

3. Созревающие нервные клетки, мигрируя по направлению от герминативного матрикса к коре, по мере продолжающейся дифференцировки начинают активнее экспрессировать NeuN: при этом увеличивается как само количество NeuN-позитивных клеток, так и яркость их окрашивания. В коре уровень экспрессии NeuN максимален, что четко коррелирует с количеством в ней дифференцированных нейронов.

4. Согласно полученным данным, Msi1 экспрессировался в некоторых участках коры, белого вещества и герминативного матрикса в виде окрашивания цитоплазмы отдельных групп клеток в виде «островков». Полученные результаты иммуногистохимического окрашивания плохо согласуются с имеющимися литературными данными, согласно которым Msi1 выявляется преимущественно в цитоплазме пролиферирующих недифференцированных клеток герминативного матрикса, а в коре положительную реакцию на Msi1 дают лишь единичные постмитотические нейроны [105]. Такое расхождение между полученными результатами и данными литературы говорит о необходимости дальнейшего изучения профиля экспрессии этого маркера.

Подпись автора дипломной работы:

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гиляров А.В. Нестин в клетках центральной нервной системы // Морфология. – 2007. – Т.131. – №1. – С. 85-90.
2. Гусельникова В.В., Коржевский Д.Э. NeuN – нейрональный ядерный антиген и маркер дифференцировки нервных клеток // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2015. – Т. 7. – № 2 (25). – С. 46-51.
3. Кирик О.В., Алексеева О.С., Коржевский Д.Э. Экспрессия маркера нейральных стволовых клеток Msi-1 в конечном мозгу крысы // Морфология. – 2011. – Т. 139. – № 2. – С. 77-79.

4. Кирик О.В., Безнин Г.В., Коржевский Д.Э. Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях // Морфология. – 2009. – Т. 136. – №6. – С. 95-100.
5. Кирик О.В., Власов Т.Д., Коржевский Д.Э. Маркеры нейральных стволовых клеток нестин и Musashi-1 в клетках конечного мозга крысы после транзиторной фокальной ишемии // Морфология. – 2012. – Т. 142. – № 4. – С. 19-24.
6. Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д., Коржевский Д.Э. // Морфология. – 2009. – Т. 135. – № 2. – С. 80–82.
7. Кнорре А.Г. Краткий очерк эмбриологии человека с элементами общей, сравнительной и экспериментальной эмбриологии / – Л.: Медгиз, 1959. – 224с.
8. Коржевский Д.Э. Использование моноклональных антител к ядерному белку PCNA для выявления пролиферирующих клеток в развивающемся головном мозге эмбриона человека // Морфология. – 2000. – Т. 118. – №5. – С. 68–70.
9. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С., Карпенко М.Н., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Колос Е.А. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии / Ред. Коржевский Д.Э., 2-е изд. – СПб.: СпецЛит, 2014. – 119 с.
10. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В. [и др.] Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуноцитохимического выявления даблкортина // Морфология. – 2008. – Т. 133. – С. 7-10.
11. Милованов А.П., Савельев С.В. Внутриутробное развитие человека. Руководство для врачей / Под ред. проф. А.П. Милованова, проф. С.В. Савельева. – М.: МДВ, 2006. – 384 с.
12. Никифоров А.С., Гусев Е.И. Общая неврология. Учебное пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.

- 13.Пальчик А.Б. Введение в неврологию развития – СПб.: Коста, 2007. – 368 с.
- 14.Петров С.В., Райхлин. Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина., 3-е изд. – Казань: Титул, 2004. – 456 с., с ил.
- 15.Сухорукова Е.Г. Ядерный белок NeuN в нейронах черного вещества головного мозга человека // Морфология. – 2013. – Т. 143. – № 2. – С. 78–80.
- 16.Albright J.E., Stojkovska I., Rahman A.A., Brown C.J., Morrison B.E. Nestin-positive/SOX2-negative cells mediate adult neurogenesis of nigral dopaminergic neurons in mice // Neuroscience Letters. – 2016. – Vol. 615. – P. 50-54.
- 17.Alondo G., Galibert E., Duvoid-Guillou A., and Vincent A. Hyperosmotic stimulus induces reversible angiogenesis within the hypothalamic magnocellular nuclei of the adult rat: a potential role for neuronal vascular endothelial growth factor // BMC Neurosci. – 2005. – Vol. 6. – No. 1. – P. 20.
- 18.Altieri D. C. Survivin and IAP proteins in cell death mechanisms // Biochem J. – 2010. – Vol. 430. – P. 199–205.
- 19.Alvarez-Buylla A. and Lim D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain // Neuron. – 2004. – Vol. 41. – P. 683-686.
- 20.Andressen C., Stocker E., Klinz F.J. et al. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation // Stem Cells. – 2001. – Vol. 19. – No. 5. – P. 419–424.
- 21.Asai R., Okano H. and Yasugi S. Correlation between Musashi-1 and c-hairy-1 expression and cell proliferation activity in the developing intestine and stomach of both chicken and mouse // Dev. Growth Differ. – 2005. – Vol. 47. – P. 501–510.
- 22.Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function // Genes Dev. – 2003. – Vol. 17. – P. 126-140.

23. Baltus G.A., Kowalski M.P., Zhai H., Tutter A.V., Quinn D., Wall D., Kadam S. Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells // *Stem Cells*. – 2009. – Vol. 27. – P. 2175-2184.
24. Behbahaninia M., Ramey W.L., Sindhwani M.K., Kalani M.Y. Differential expression of pluripotency factors Sox2 and Oct4 regulate neuronal and mesenchymal lineages // *Neurosurgery*. – 2011. – Vol. 69. – No. 4. – P. 19.
25. Biasio de A., Blanco F.J. Proliferating Cell Nuclear Antigen Structure and Interactions: Too Many Partners for One Dancer? // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. – 2013. – Vol. 91. – P. 1-36.
26. Bill B.R., Lowe J.K., Dybuncio C.T., Fogel B.L. Orchestration of neurodevelopmental programs by RBFOX1: implications for autism spectrum disorder // *Int. Rev. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 113. – P. 251–267.
27. Blethrow J.D., Glavy J.S., Morgan D.O., Shokat K.M.. Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals Cdk1-cyclin B substrates // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – P. 1442–1447.
28. Blumcke I., Schewe J.C., Normann S. et al. Increase of nestinimmunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy // *Hippocampus*. – 2001. – Vol. 11. – No. 3. – P. 311–321.
29. Boer B., Kopp J., Mallanna S., Desler M., Chakravarthy H., Wilder P.J., Bernadt C., Rizzino A. Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2: Oct-3/4 target genes // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – P. 1773-1786.
30. Booth D.G. et al. Ki67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery // *eLife*. – 2014. – Vol. 3. – e01641.
31. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells // *Cell*. – 2005. – Vol. 122. – P. 947-956.

32. Braun N., Papadopoulos T., Müller-Hermelink H.K. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki67 antigen in human embryonic lung cells // *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* – 1988. – Vol. 56. – P. 25–33.
33. Bravo R., Frank R., Blundell P.A., Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ // *Nature.* – 1987. Vol. 326. – P. 511-528.
34. Bravo R. and Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites // *Cell Biol.* – 1987. – Vol. 105. – No. 4. – P. 1549–1554.
35. Brazel C.Y., Limke T.L., Osborne J.K. et al. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain // *Aging Cell.* – 2005. – Vol. 4. – No. 4. – P. 197–207.
36. Bridger J.M., Kill I.R., Lichter P. Association of pKi67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells // *Chromosome Res.* – 1998. – Vol. 6. – P. 13–24.
37. Britanova O., Alifragis P., Junek S., Jones K., Gruss P., Tarabykin V. A novel mode of tangential migration of cortical projection neurons // *Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 298. – No. 1. – P. 299-311.
38. Bylund M., Andersson E., Novitsch B.G., Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity // *Nat Neurosci.* – 2003. – Vol. 6. – P. 1162-1168.
39. Cannon J.R., Greenamyre J.T. NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra // *Neurosci Lett.* – 2009. – Vol. 464. – No. 1. – P. 14–17.
40. Chan Ch., Moore B.E., Cotman C.W., Okano H., Tavares R., Hovanesian V., Pinar H., Johanson C.E., Svendsen C.N., Stopa E.G. Musashi1 antigen expression in human fetal germinal matrix development // *Experimental Neurology.* – 2006. – Vol. 201. – P. 515–518.

41. Cheeran M.C., Hu S., Ni H.T. et al. Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways // *Neurosci. Res.* – 2005. – Vol. 82. – No. 6. – P. 839–850.
42. Chen X., Xu H., Yuan P., Fang F., Huss M. et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells // *Cell.* – 2008. – Vol. 133. – P. 1106-1117.
43. Celis J.E. and Madsen P. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair // *FEBS Lett.* – 1986. – Vol. 209. – P. 277–283.
44. Clarke S.R., Shetty A.K., Bradley J.L. and Turner D.A. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin // *Neuroreport.* – 1994. – Vol. 5. – P. 1885-1888.
45. Cuylen S., Blaukopf C., Politi A.Z., Müller-Reichert T., Neumann B., Poser I., Ellenberg J., Hyman A.A. and Gerlich D.W. Ki67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes // *Nature.* – 2016. – Vol. 535. – No. 7611. – P. 308-312.
46. Dahlstrand J., Lardelli M. and Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system // *Devl. Brain Res.* – 1995. – Vol. 84. – P. 109–129.
47. Darlington P.J., Goldman J.S., Cui Q.L., Antel J.P., Kennedy T.E. Widespread immunoreactivity for neuronal nuclei in cultured human and rodent astrocytes // *Neurochem.* – 2008. – Vol. 104. – No. 5. – P. 1201-1209.
48. Darnell R.B. RNA protein interaction in neurons // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2013. – Vol. 36. – P. 243–270.
49. Dent M.A., Segura-Anaya E., Alva-Medina J., Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584. – No. 13. – P. 2767–2771.

50. Di C.G., Xiang A.P. et al. Involvement of extracellular factors in maintaining self-renewal of neural stem cell by nestin // *NeuroReport*. – 2014. – Vol. 25. – P. 782–787.
51. Donner A.L., Ko F., Episkopou V., Maas R.L. Pax6 is misexpressed in Sox1 null lens fiber cells // *Gene Expr Patterns*. – 2007. – Vol. 7. – P. 606-613.
52. Dredge B.K., Jensen K.B. (2011) NeuN/Rbfox3 nuclear and cytoplasmic isoforms differentially regulate alternative splicing and nonsense-mediated decay of Rbfox2 // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – No. 6. – P. e21585.
53. Duan W., Zhang Y.P., Hou Z. et al. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator revealed // *Mol Neurobiol*. – 2016. – Vol. 53. – No. 3. – P. 1637-1647.
54. Duchrow M., Schlüter C. et al. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 1995. – Vol. 43. – No. 2. – P. 117–121.
55. Duchrow M., Schlüter C., Wohlenberg C. et al. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki67 // *Cell Prolif.* – 1996. – Vol. 29. – No.1. – P. 1–12.
56. Duggal N., Schmidt-Kastner R. and Hakim A.M. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats // *Brain Res.* – 1997. – Vol. 768. – P. 1-9.
57. Elia J., Glessner J.T., Wang K., Takahashi N., Shtir C.J., Hadley D., Sleiman P.M., Zhang H. et al. Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder // *Nat. Genet.* – 2012. – Vol. 44. – No. 1. – P. 78–84.
58. Eliason C., Sahlgren C., Berthold C. et al. Intermediate filament protein partnership in astrocytes // *Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 23996–24006.
59. Engelen E., Akinci U., Bryne J.C. et al. Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes // *Nat. Genet.* – 2011. – Vol. 43. – P. 607-611.

- 60.Englander E.W. Brain capacity for repair of oxidatively damaged DNA and preservation of neuronal function // *Mech. Ageing Dev.* – 2008. – Vol. 129. – No. 7-8. – P. 475–482.
- 61.Ernst C. and Christie B.R. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 22. – No. 12. – P. 3059-3066.
- 62.Espinosa L., Ingles-Esteve J., Aguilera C., Bigas A. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 32227-32235.
- 63.Fang L., Zhang L., Wei W. et al. A methylationphosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation // *Mol. Cell.* – 2014. – Vol. 55. – No. 4. – P. 537-551.
- 64.Feng, R., Zhou S., Liu Y., Song D., Luan Z., Dai X., Li Y., Tang N., Wen J. and Li L. Sox2 protects neural stem cells from apoptosis via up-regulating survivin expression // *Biochem.* – 2013. – Vol. 450. – P. 459–468.
- 65.Fong H., Hohenstein K.A., Donovan P.J. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26. – P. 1931-1938.
- 66.Freudenthal B.D., Gakhar L., Ramaswamy S., Washington M.T. A charged residue at the subunit interface of PCNA promotes trimer formation by destabilizing alternate subunit interactions // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2009. – Vol. 65. – P. 560-566.
- 67.Fukuda S., Kato F., Tozuka Y., Yamaguchi M. et al. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus // *Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – No. 28. P. 9357–9366.
- 68.Garapaty S., Xu C.F., Trojer P., Mahajan M.A., Neubert T.A., Samuels H.H. Identification and characterization of a novel nuclear protein complex involved in nuclear hormone receptor-mediated gene regulation // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2009. – Vol. 284. – P. 7542–7552.

69. Gary R., Ludwig D.L., Cornelius H.L., MacInnes M.A., Park M.S. The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 // *Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 24522-24529.
70. Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U., Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67 // *Immunol.* – 1984. – Vol. 133. – P. 1710–1715.
71. Gerdes J., Li L., Schlueter C. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki67 // *Am. J. Pathol.* – 1991. – Vol. 138. – P. 867–873.
72. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation // *Int. J. Cancer.* – 1983. – Vol. 31. – P. 13–20.
73. Gerlach C., Golding M., Larue L. et al. Ki67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat // *Lab. Invest.* – 1997. – Vol. 77. – No. 6. – P. 697–698.
74. Gioia U., Di Carlo V., Caramanica P., Toselli C., Cinquino A., Marchioni M., Laneve P., Biagioni S., Bozzoni I., Cacci E. and Caffarelli E. Mir-23a and mir-125b regulate neural stem/progenitor cell proliferation by targeting Musashi1 // *RNA Biology.* – 2014. – Vol. 11. – No. 9. – P. 1105–1112.
75. Glazer R.I., Wang X.-Y., Yuan H. and Yin Y. Musashi1: a stem cell marker no longer in search of a function // *Cell Cycle.* – 2008. – Vol. 7. – No. 17. – P. 2635–2639.
76. Good P., Yoda A., Sakakibara S., Yamamoto A., Imai T. et al. The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells // *Genomics.* – 1998. – Vol. 52. – P. 382–384.

77. Gotte M., Wolf M., Staebler A., Buchweitz O., Kelsch R. et al. Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma // *Pathol.* – 2008. – Vol. 215. – P. 317–329.
78. Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity // *Neuron.* – 2003. – Vol. 39. – P. 749-765.
79. Gulbis J.M., Kelman Z., Hurwitz J., O'Donnell M., Kuriyan J. Structure of the C-terminal region of p21 WAF1/CIP1 complexed with human PCNA // *Cell.* – 1996. – Vol. 87. – P. 297-306.
80. Hagstrom S.A., Pauer G.J., Reid J., Simpson E., Crowe S., Maumenee I.H. and Traboulsi E.I. SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies // *American Journal of Medical Genetics.* – 2005. – Vol. 138A. – No. 2. – P. 95–98.
81. Hansen D.V., Lui J.H., Parker P.R., Kriegstein A.R. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex // *Nature.* – 2010. – Vol. 464. – No.7288. – P. 554-561.
82. He Z., Cui L., Meschia J.F. et al. Hippocampal progenitor cells express nestin following cerebral ischemia in rats // *Neuroreport.* – 2005. – Vol. 16. – No. 14. – P. 1541-1544.
83. Heidebrecht H.J., Buck F., Haas K., Wacker H.H., Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the “Ki67” proteins // *Cell Prolif.* – 1996. – Vol. 29. – P. 413–425.
84. Hendrickson M.L., Rao A.J., Demerdash O.N., Kalil R.E. Expression of Nestin by Neural Cells in the Adult Rat and Human Brain // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6. – No. 4. P. e18535.
85. Herrmann H. and Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 12. – P. 79-90.
86. Hingorani M.M., O'Donnell M. Sliding clamps: a (tail)ored fit // *Curr. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – No. 1. – P. R25-R29.

- 87.Hirokawa N., Glicksman N. and Willard M. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton // *Cell. Biol.* – 1984. – Vol. 98. – P. 1523–1536.
- 88.Hisanaga S. and N. Hirokawa Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing // *Mol. Biol.* – 1988. – Vol. 202. – P. 297–305.
- 89.Hockfield S. and McKay R.D. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system // *Neurosci.* – 1985. – Vol. 5. – P. 3310-3328.
- 90.Hoelz D.J., Arnold R.J., Dobrolecki L.E., Abdel-Aziz W., Loehrer A.P., Novotny M.V. et al. The discovery of labile methyl esters on proliferating cell nuclear antigen by MS/MS // *Proteomics.* – 2006. – Vol. 6. – P. 4808-4816.
- 91.Hofmann K. and Bucher P. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – Vol. 20. – P. 347–349.
- 92.Holmin S., Almqvist P., Lendahl U. and Mathiesen T. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury // *Eur. J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 9. – P. 65–75.
- 93.Holmin S., von Gertten C., Sandberg-Nordqvist A.C. et al. Induction of astrocytic nestin expression by depolarization in rats // *Neurosci. Lett.* – 2001. – Vol. 314. – No. 3. – P. 151–155.
- 94.Hoof D. van, Muñoz J., Braam S.R., Pinkse M.W., Linding R., Heck A.J., Mummery C.L., Krijgsveld J. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2009. – Vol. 5. – P. 214-226.
- 95.Horisawa K., Imai T., Okano H., Yanagawa H. 30-Untranslated region of doublecortin mRNA is a binding target of the Musashi1 RNA-binding protein // *FEBS Letters.* – 2009. – Vol. 583. – P. 2429–2434.
- 96.Horner P.J. and Gage F.H. Regenerating the damaged central nervous system // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – P. 963–970.

97. Igarashi T., Huang T.T., Noble L.J. Regional vulnerability after traumatic brain injury: gender differences in mice that overexpress human copper, zinc superoxide dismutase // *Exp. Neurol.* – 2001. – Vol. 172. – P. 332–341.
98. Imai T., Tokunaga A., Yoshida T., Hashimoto M., Mikoshiba K., Weinmaster G., Nakafuku M., Okano H. The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA // *Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 21. – P. 3888–3900.
99. Ino H., Chiba T. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and developing mouse nervous system // *Molecular Brain Research.* – 2000. – Vol. 78. – P. 163–174.
100. Itoh T., Satou T., Hashimoto S. and Ito H. Isolation of neural stem cells from damaged rat cerebral cortex after traumatic brain injury // *Neuroreport.* – 2005. – Vol. 16. – No. 15. – P. 1687–1691.
101. Johansson C., Lothian C., Molin M., Okano H. and Lendahl U. Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS // *Neurosci. Res.* – 2002. – Vol. 69. – P. 784-794.
102. Julian L.M., Vandenbosch R., Pakenham C.A., Andrusiak M.G., Nguyen A.P., McClellan K.A., Svoboda D.S., Lagace D.C., Park D.S., Leone G., Blais A., Slack R.S. Opposing regulation of Sox2 by cell-cycle effectors E2f3a and E2f3b in neural stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2013. – Vol. 12. – P. 440-452.
103. Jynsson Z.O., Hindges R., Hübcher U. Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen // *EMBO.* – 1998. – Vol. 17. – P. 2412-2425.
104. Kamachi Y., Uchikawa M., Tanouchi A., Sekido R., Kondoh H. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development // *Genes Dev.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1272-1286.
105. Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T., Suzuki A., Nakamura Y. et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells // *Dev. Neurosci.* – 2000. – Vol. 22. – P. 139–153.

106. Gunter K.M. and McLaughlin E.A. Translational control in germ cell development: a role for the RNA-binding proteins Musashi-1 and Musashi-2 // *IUBMB Life*. – 2011. – Vol. 63. – No. 9. – P. 678–685.
107. Kawahara H., Imai T., Imataka H., Tsujimoto M., Matsumoto K., et al. Neural RNA-binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP // *Cell Biol*. – 2008. – Vol. 181. – P. 639–653.
108. Kawase S., Kuwako K., Imai T., Renault-Mihara F., Yaguchi K., Itohara S. and Okano H. Regulatory factor X transcription factors control Musashi1 transcription in mouse neural stem/progenitor cells // *Stem cells and development*. – 2014. – Vol. 23. – No. 18. – P. 2250-2261.
109. Kaya S.S., Mahmood A., Li Y. et al. Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain // *Brain Res*. – 1999. – Vol. 840. – P. 153–157.
110. Kee N., Sivalingam S., Boonstra R., Wojtowicz J.M. The utility of Ki67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2002. – Vol. 115. – P. 97-105.
111. Kelman Z, O'Donnell M. 1995. Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps // *Nucleic Acids Res*. – 1995. – Vol. 23. – P. 3613-3620.
112. Kempermann G., Jessberger S., Steiner B. and Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus // *Trends in Neurosciences*. – 2004. – Vol. 27. – No. 8. – P. 447-452.
113. Khelifaoui M., Guimiot F. and Simonneau M. Early neuronal and glial determination from mouse E10.5 telencephalon embryonic stem cells: an in vitro study // *Neuroreport*. – 2002. – Vol. 13. – No. 9. – P. 1209–1214.
114. Kim K.K., Adelstein R.S., Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors // *J. Biol. Chem*. – 2009. – Vol. 284. – No. 45. – P. 31052–31061.

115. Kim K.K., Kim Y.C., Adelstein R.S., Kawamoto S. Fox-3 and PSF interact to activate neural cell-specific alternative splicing // *Nucl. Acids Res.* – 2011. – Vol. 39. – No. 8. – P. 3064–3078.
116. Kim K.K., Nam J., Mukoyama Y.S., Kawamoto S. Rbfox3-regulated alternative splicing of Numb promotes neuronal differentiation during development // *Cell Biol.* – 2013. – Vol. 200. – No. 4. – P. 443–458.
117. Komitova M., Eriksson P.S. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain // *Neuroscience Letters.* – 2004. – Vol. 369. – P. 24–27.
118. Kondoh H., Kamachi Y. SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 42. – P. 391-399.
119. Kontopidis G., Wu S.Y., Zheleva D.I., Taylor P., McInnes C., Lane D.P. et al. Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 102. – P. 1871-1876.
120. Kopp J.L., Ormsbee B.D., Desler M., Rizzino A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26. – P. 903-911.
121. Korzhevskii D.E., Lentsman M.V., Gilyarov A.B. et al. Induction of nestin synthesis in a proportion of rat brain cells by ischemic lesioning // *Morfologiya.* – 2007. – Vol. 131. – No. 1. – P. 23–26.
122. Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 32. – P. 149-184.
123. Krishna T.S., Kong X.P., Gary S., Burgers P.M., Kuriyan J. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA // *Cell.* – 1994. – Vol. 79. – P. 1233-1243.

124. Kumar S.S., Buckmaster P.S. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata // *Brain Res.* – 2007. – Vol. 1142. P. 54–60.
125. Lee J.A., Tang Z.Z., Black D.L. An inducible change in Fox-1/ A2BP1 splicing modulates the alternative splicing of downstream neuronal target exons // *Genes Dev.* – 2009. – Vol. 23. – No. 19. – P. 2284–2293.
126. Lee K.E., Seo J., Shin J., Ji E.H., Roh J., Kim J.Y., Sun W., Muhr J., Lee S. and Kim J. Positive feedback loop between Sox2 and Sox6 inhibits neuronal differentiation in the developing central nervous system // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2014. – Vol. 111. – P. 2794-2799.
127. Lee S.D. and Alani E. Analysis of interactions between mismatch repair initiation factors and the replication processivity factor PCNA // *Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 355. – P. 175–184.
128. Lendahl U., Zimmerman L. and McKay R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein // *Cell.* – 1990. – Vol. 60. – No. 4. – P. 585–595.
129. Lengler J., Bittner T., Münster D., Gawad Ael-D, Graw J. Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 AND Six3 in the regulation of Sox2 expression // *Ophthalmic Res.* – 2005. – Vol. 37. – P. 301-309.
130. Letai A., Coulombe P. and Fuchs E. Do the ends justify the mean? Proline mutations at the ends of the keratin coiled-coil rod segment are more disruptive than internal mutations // *Cell Biol.* – 1992. – Vol. 116. – P. 1181-1195.
131. Li Y. and Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat // *Brain Res.* – 1999. – Vol. 838. – P. 1–10.
132. Lie D.C., Song H., Colamarino S.A., Ming G.L. and Gage F.H. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases // *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology.* – 2004. – Vol. 44. – P. 399-421.

133. Lind D., Franken S., Kappler J., Jankowski J., Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – Vol. 79. – No. 3. – P. 295–302.
134. Liu J., Ji X., Li Z. et al. Nestin overexpression promotes the embryonic development of heart and brain through the regulation of cell proliferation // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1610. – P. 1-11.
135. Liu Y.R., Laghari Z.A., Novoa C.A., Hughes J., Webster J.R., Goodwin P.E., Wheatley S.P. and Scotting P.J. Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells // *BMC Neuroscience.* – 2014. – Vol. 15. – P. 95.
136. Lothian C. and Lendahl U. An evolutionary conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells // *Eur. J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 9. – P. 452–462.
137. Lucas C.H., Calvez M., Babu R., Brown A. Altered subcellular localization of the NeuN/Rbfox3 RNA splicing factor in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND) // *Neurosci. Lett.* – 2014. – Vol. 558. – P. 97–102.
138. Ma Y.H., Mentlein R., Knerlich F., Kruse M.L., Mehdorn H.M. and Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades // *Neurooncol.* – 2008. – Vol. 86. – P. 31–45.
139. Maga G., Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners // *J. Cell Sci.* – 2003. – Vol. 116. – P. 3051-3060.
140. Majka J., Burgers P.M. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 78. – P. 227-260.
141. Manoranjan B., Venugopal C., Mcfarlane N. et al. Medulloblastoma stem cells: where development and cancer cross pathways // *Pediatr. Res.* – 2012. – Vol. 71. – P. 516–522.

142. Mansouri S., Nejad R., Karabork M., Ekinci C., Solaroglu I., Aldape K.D. and Zadeh G. Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors // *CNS Oncol.* – 2016. – Vol. 5. – No. 3. – P. 159-173.
143. Marle G. van, Antony J.M., Silva C. et al. Aberrant cortical neurogenesis in a pediatric neuroAIDS model: neurotrophic effects of growth hormone // *AIDS.* – 2005. – Vol. 19. – No. 16. – P. 1781–1791.
144. Marqués-Torrejón M.Á., Porlan E., Banito A., Gómez-Ibarlucea E., Lopez-Contreras A.J., Fernández-Capetillo O., Vidal A., Gil J., Torres J., Fariñas I. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression // *Cell Stem Cell.* – 2013. – Vol. 12. – P. 88-100.
145. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 625-635.
146. Maxeiner S., Glassmann A., Kao H.T., Schilling K. The molecular basis of the specificity and cross-reactivity of the NeuN epitope of the neuron specific splicing regulator, Rbfox3 // *Histochem. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 141. – No. 1. – P. 43–55.
147. McCallum D.E. and Hall P.A. Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding // *Exp Cell Res.* – 1999. – Vol. 252. – No. 1. – P. 186–198.
148. McCormick D., Chong H., Hobbs C. et al. Detection of the Ki67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1 // *Histopathology.* – 1993. – Vol. 22. – No. 4. – P. 355–360.
149. McPhail L.T., McBride C.B., McGraw J., Steeves J.D., Tetzlaff W. Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons // *Exp. Neurol.* – 2004. – Vol. 185. – P. 182–190.

150. Messama C.A., Houa J., Bermanb J.W., Majora E.O. Analysis of the temporal expression of nestin in human fetal brain derived neuronal and glial progenitor cells // *Developmental Brain Research*. – 2002. – Vol. 134. – P. 87–92.
151. Michalczyk K. and M. Ziman Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization // *Histol. Histopathol.* – 2005. – Vol. 20. – P. 665–671.
152. Miyagi S., Nishimoto M., Saito T., Ninomiya M., Sawamoto K., Okano H., Muramatsu M., Oguro H., Iwama A., Okuda A. The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cellspecific enhancer in the telencephalon // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 13374-13381.
153. Miyagi S., Saito T., Mizutani K., Masuyama N., Gotoh Y., Iwama A., Nakauchi H., Masui S., Niwa H., Nishimoto M., Muramatsu M., Okuda A. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 4207-4220.
154. Mokry J., Cizkova D., Filip S. et al. Nestin expression by newly formed human blood vessels // *Stem Cell. Dev.* – 2004. – Vol. 13. – No. 6. – P. 658–664.
155. Moldovan G.L., Pfander B., Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork // *Cell*. – 2007. – Vol. 129. – P. 665-679.
156. Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates // *Development*. – 1992. – Vol. 116. – No. 1. – P. 201–211.
157. Nakamura M., Okano H., Blendy J.A. and Montell C. Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development // *Neuron*. – 1994. – Vol. 13. – P. 67–81.
158. Nakamura T., Xi G., Hua Y. et al. Nestin expression after experimental intracerebral hemorrhage // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 981. – P. 108–117.
159. Naryzhny S.N. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65. – P. 3789-3808.

160. Nassauw L. van, Wu M., De Jonge F., Adriaensen D., Timmermans J.P. Cytoplasmic, but not nuclear, expression of the neuronal nuclei (NeuN) antibody is an exclusive feature of Dogiel type II neurons in the guinea-pig gastrointestinal tract // *Histochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 124. – No. 5. – P. 369–377.
161. Niu W., Zang T., Smith D.K. et al. SOX2 reprograms resident astrocytes into neural progenitors in the adult brain // *Stem Cell Reports.* – 2015. – Vol. 4. – No. 5. – P. 780–794.
162. Oijen M.G. van, Medema R.H., Slootweg P.J., Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki67 in noncycling cells // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1998. – Vol. 110. – P. 24–31.
163. Okano H., Imai T., Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fate // *J. Cell Sci.* – 2002. – Vol. 115. – P. 1355–1359.
164. Okano H., Kawahara H., Toriya M., Nakao K., Shibata S., Imai T. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells // *Experimental Cell Research.* – 2005. – Vol. 306. – P. 349–356.
165. Oki K., Kaneko N., Kanki H., Imai T., Suzuki N., Sawamoto K., Okano H. Musashi1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia // *Neuroscience Research.* – 2010. – Vol. 66. – P. 390–395.
166. Park D., Xiang A.P., Mao F.F. et al. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells // *Stem Cells.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2162–2171.
167. Park S.Y., Jeong M.S., Han C.W., Yu H.S. and Jang S.B. Structural and functional insight into proliferating cell nuclear antigen // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 26. – No. 4. – P. 637–647.
168. Parsons J.L., Nicolay N.H., Sharma R.A. Biological and therapeutic relevance of nonreplicative DNA polymerases to cancer // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18. – P. 851–873.
169. Peng C., Li N., Ng Y.K. et al. A unilateral negative feedback loop between miR-200 microRNAs and Sox2/E2F3 controls neural progenitor cell-

- cycle exit and differentiation // *J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 32. – No. 38. – P. 13292–13308.
170. Prakash S., Johnson R.E., Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function // *Annu. Rev. Biochem.* – 2005. – Vol. 74. – P. 317-353.
171. Prelich G., Tan C.K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey K.M., Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein // *Nature.* – 1987. – Vol. 326. – P. 517-520.
172. Punchihewa C., Inoue A., Hishiki A., Fujikawa Y., Connelly M., Evison B. et al. Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 14289-14300.
173. Rahmzadeh R., Hüttmann G., Gerdes J., Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis // *Cell Prolif.* – 2007. – Vol. 40. – No. 3. – P. 422-430.
174. Ratti A., Fallini C., Cova L., Fantozzi R., Calzarossa C., Zennaro E., Pascale A., Quattrone A., Silani V. A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of Msi1 mRNA // *J Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119. – P. 1442–1452.
175. Raucci F., Fiore M.M., Pinelli C., D’Aniello B., Luongo L., Polese G., Rastogi R.K. Proliferative activity in the frog brain: a PCNA-immunohistochemistry analysis // *Journal of Chemical Neuroanatomy.* – 2006. – Vol. 32. – P. 127–142.
176. Reillo I., de Juan Romero C., García-Cabezas M.Á., Borrell V. A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex // *Cereb. Cortex.* – 2011. – Vol. 21. – No. 7. – P. 1674-1694.
177. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 1. – No. 2. – P. 228–236.

178. Sahlgren C., Mikhailov A., Hellman J. et al. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 16456–16463.
179. Sakakibara S., Imai T., Hamaguchi K., Okabe M. et al. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell // *Dev Biol.* – 1996. – Vol. 176. – P. 230–242.
180. Sakakibara S., Nakamura Y., Yoshida T., Shibata S., Koike M. et al. RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99. – P. 15194–15199.
181. Sanchez-Diaz P.C., Burton T.L., Burns S.C., Hung J.Y. and Penalva L.O. Musashi1 modulates cell proliferation genes in the medulloblastoma cell line Daoy // *BMC Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – P. 280.
182. Sarnat H.B., Nochlin D., Born D.E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system // *Brain Dev.* – 1998. – Vol. 20. – No. 2. – P. 88–94.
183. Schepers G.E., Teasdale R.D., Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families // *Dev. Cell.* – 2002. – Vol. 3. – P. 167-170.
184. Schiffer D., Manazza A., Tamagno I. Nestin expression in neuroepithelial tumors // *Neuroscience Letters.* – 2006. – Vol. 400. – P. 80–85.
185. Schlüter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M.H., Key G., Flad H.-D., Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins // *J. Cell Biol.* – 1993. – Vol. 123. – P. 513–522.
186. Scholzen T., Gerdes J. The Ki67 protein: from the known and the unknown // *J. Cell. Physiol.* – 2000. – Vol. 182. – No. 3. – P. 311–322.

187. Schwanbeck R., Martini S., Bernoth K., Just U. The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency // *European Journal of Cell Biology*. – 2011. – Vol. 90. – P. 572–581.
188. Seigel G.M., Hackam A.S., Ganguly A., Mandell L.M. and Gonzalez-Fernandez F. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma // *Mol. Vis.* – 2007. – Vol. 13. – P. 823–832.
189. Seigneurin D. and Guillaud P. Ki67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker // *Pathol. Biol.* – 1991. – Vol. 39. – No. 10. – P. 1020–1028.
190. Shneider N.A., Brown M.N., Smith C.A. et al. Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival // *Neural Development*. – 2009. – Vol. 4, No 1. – P. 42-62.
191. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. // *Mol. Syst. Biol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 539.
192. Sobecki M. et al. The cell proliferation antigen Ki- 67 organises heterochromatin // *eLife*. – 2016. – Vol. 5. – P. e13722.
193. Sousa A. de, Sanchez-Diaz R., Vogel P.C. et al. Genomic analyses of musashi1 downstream targets show a strong association with cancer-related processes // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 12125–12135.
194. Soylemezoglu F., Onder S., Tezel G.G., Berker M. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a new tool in the diagnosis of central neurocytoma // *Pathol. Res. Pract.* – 2003. – Vol. 199. – P. 463–468.
195. Spyrtos F., Ferrero-Pous M., Trassard M. et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implication of the MIB-1 cutoff value // *Cancer*. – 2002. – Vol. 94. – P. 2151–2159.
196. Steinert P. and Liem R. Intermediate filament dynamics // *Cell*. – 1990. – Vol. 60. – P. 521-523.

197. Stoimenov I. and Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – Vol. 37. – P. 605–613.
198. Strzalka W., Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation // *Ann. Bot.* – 2011. – Vol. 107. – P. 1127-1140.
199. Sugiyama-Nakagiri Y., Akiyama M., Shibata S., Okano H. and Shimizu H. Expression of RNA-binding protein Musashi in hair follicle development and hair cycle progression // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 168. – No. 1. – P. 80-92.
200. Sureban S.M., May R., George R.J., Dieckgraefe B.K., McLeod H.L. et al. Knockdown of RNA binding protein Musashi-1 leads to tumor regression in vivo // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 134. – P. 1448–1458.
201. Takagi M., Matsuoka Y., Kurihara T. and Yoneda Y. Chmadrin: a novel Ki67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure // *J. Cell Sci.* – 1999. – Vol. 112. – P. 2463–2472.
202. Takagi M., Sueishi M., Saiwaki T., Kametaka A., Yoneda Y. A novel nucleolar protein, NIFK, interacts with the forkhead associated domain of Ki67 antigen in mitosis // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2001. – Vol. 276. – P. 25386–25391.
203. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – P. 861-872.
204. Tan C.K., Castillo C., So A.G., Downey K.M. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261. – P. 12310-12316.
205. Tanaka S., Kamachi Y., Tanouchi A., Hamada H., Jing N., Kondoh H. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 8834-8846.

206. Taylor J.P., Sater R., French J. et al. Transcription of intermediate filament genes is enhanced in focal cortical dysplasia // *Acta Neuropathol.* – 2001. – Vol. 102. – No. 2. – P. 141–148.
207. Thomson M., Liu S.J., Zou L.N., Smith Z., Meissner A., Ramanathan S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers// *Cell.* – 2011. – Vol. 145. – P. 875-889.
208. Toda M., Iizuka Y., Yu W., Imai T., Ikeda E., Yoshida K., Kawase T., Kawakami Y., Okano H., Uyemura K. Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas // *Glia.* – 2001. – Vol. 34. – P. 1–7.
209. Tomioka M., Nishimoto M., Miyagi S., Katayanagi T., Fukui N., Niwa H., Muramatsu M., Okuda A. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – P. 3202-3213.
210. Tsuruzoe S., Ishihara K., Uchimura Y., Watanabe S. et al. Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 351. – P. 920-926.
211. Uchikawa M., Ishida Y., Takemoto T., Kamachi Y., Kondoh H. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals // *Dev. Cell.* – 2003. – Vol. 4. – P. 509-519.
212. Umar A., Buermeier A.B., Simon J.A., Thomas D.C., Clark A.B., Liskay R.M., Kunkel T.A. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis // *Cell.* – 1996. – Vol. 87. – P. 65-73.
213. Unal-Cevik I., Kilinc M., Gursoy-Ozdemir Y., Gurer G., Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 1015. – No. 1-2. – P.169–174.
214. Vega H., Waisfisz Q., Gordillo M., Sakai N., Yanagihara I., Yamada M., van Gosliga D., Kayserili H., Xu C., Ozono K. et al. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is

- essential for the establishment of sister chromatid cohesion // *Nat. Genet.* – 2005. – Vol. 37. – P.468–470.
215. Verdiev B.I., Poltavtseva R.A., Podgornyi O.V., Marei M.V., Zinovyeva R.D., Sukhikh G.T., Aleksandrova M.A. Molecular genetic and immunophenotypical analysis of Pax6 transcription factor and neural differentiation markers in human fetal neocortex and retina in vivo and in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 148. – No. 4. – P. 697–704.
216. Verheijen R., Kuijpers H.J., van Driel R., Beck J.L., van Dierendonck J.H., Brakenhoff G.J., Ramaekers F.C. Ki67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes // *J. Cell Sci.* – 1989. – Vol. 92. – P. 531–540.
217. Wang S.C. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2014. – Vol. 35. – P. 178-186.
218. Wang X.Y., Yin Y., Yuan H., Sakamaki T., Okano H., Glazer R.I. Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways // *Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 28. – No. 11. – P. 3589-3599.
219. Wang Z., Oron E., Nelson B., Razis S., Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2012. – Vol. 10. – P. 440-454.
220. Watts F. Sumoylation of PCNA: wrestling with recombination at stalled replication forks // *DNA Repair.* – 2006. – Vol. 5. – P. 399–403.
221. Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – No. 6. – P. 1409–1420.
222. Wegner M., Stolt C.C. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development // *Trends Neurosci.* – 2005. – Vol. 28. – P. 583-588.
223. Wiese C., Rolletschek A., Kania G., Blyszczuk P., Tarasov K.V. et al. Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? // *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61. – P. 2510–2522.

224. Wolf H. K., Buslei R., Schmidt-Kastner R. et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology// *J. Histochem. Cytochem.* – 1996. – Vol. 44, No 10. – P. 1167-1171.
225. Xiong Y., Zhang H., Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA // *Cell.* – 1992. – Vol. 71. – P. 505-514.
226. Xue X.J., Yuan X. Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells // *Molecular and Cellular Neuroscience.* – 2010. – Vol. 45. – P. 26–36.
227. Yagita Y., Kitagawa K., Sasaki T., Miyata T., Okano H., Hori M. and Matsumoto M. Differential expression of Musashi1 and Nestin in the adult rat hippocampus after ischemia // *Journal of Neuroscience Research.* – 2002. – Vol. 69. – P. 750–756.
228. Yan S., Li P., Wang Y. et al. Nestin regulates neural stem cell migration via controlling the cell contractility // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 78. – P. 349-360.
229. Yang P., Zhang J., Shi H., Zhang J., Xu X., Xiao X., Liu Y. Developmental profile of neurogenesis in prenatal human hippocampus: an immunohistochemical study // *Int. J. Devl. Neuroscience.* – 2014. – Vol. 38. – P. 1–9.
230. Yokota N., Mainprize T.G., Taylor M.D., Kohata T., Loreto M., Ueda S., Dura W., Grajkowska W., Kuo J.S., Rutka J.T. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23. – P. 3444–3453.
231. Zhang S., Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation // *World J. Stem Cells.* – 2014. – Vol. 6. – No. 3. – P. 305-311.
232. Zhao C., Deng W., Gage F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis // *Cell.* – 2008. – Vol. 132. – No. 4. – P. 645-660.

233. Zhao S., Nichols J., Smith A.G., Li M. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells // *Mol. Cell Neurosci.* – 2004. – Vol. 27. – P. 332-342.
234. Zhou F.C., Sari Y., Powrozek T. et al. Moderate alcohol exposure compromises neural tube midline development in prenatal brain // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 2003. – Vol. 144. – No. 1. – P. 43–55.
235. Zimmerman L., Parr B., Lendahl U. et al. Independent regulatory elements in the nestin gene direct trans gene expression to neural stem cells or muscle precursors // *Neuron.* – 1994. – Vol. 12. – P. 11–24.