

НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Эмбриональный нейрогенез у млекопитающих: роль centrosom в асимметричном делении стволовых клеток

Эмбриональный нейрогенез у млекопитающих сопровождается активной пролиферацией клеток радиальной глии — полярных нейроэпителиальных клеток, тела которых расположены в вентрикулярной зоне коры развивающегося головного мозга. Эти глиальные клетки-предшественники (ГКП) — стволовые клетки головного мозга зародыша — делятся асимметрично, давая начало дифференцирующимся нейронам, которые затем мигрируют в направлении кортикальной пластинки, где происходит образование слоев неокортекса. Но что определяет способность стволовых клеток к асимметричному делению?

Накопленные данные свидетельствуют о том, что асимметричное деление обусловлено неравномерным распределением молекулярных факторов, которые определяют дальнейшую судьбу клетки [1]. Этими факторами могут быть как поверхностные, так и внутриклеточные молекулы. Так, показано, что асимметричное деление нейрогенных глиальных клеток у позвоночных связано с концентрированием мембранных белков (в частности, промиелина-1) на апикальной поверхности клетки, что определяет дальнейшую асимметричную сегрегацию внутриклеточных факторов (Numb, Minibrain, PTEN) [2]. Таким образом, в случае асимметричного деления клеток радиальной глии ключевым событием является наследование апикальной мембраны, контактирующей с полостью желудочка. Это, в свою очередь, во многом зависит от пространственной ориентации веретена деления, которое контролирует плоскость разделения дочерних клеток. Поэтому логично предположить, что centrosomы — центры организации клеточного цитоскелета, в том числе веретена деления — могут быть вовлечены в процесс асимметричного деления глиальных клеток-предшественников.

Особо интересным оказалось то, что сами centrosomы могут расходиться асимметрично. Это было зафиксировано в некоторых стволовых клетках беспозвоночных, например, в сперматогенных стволовых клетках и нейробластах дрозофилы [3–6]. Асимметрия наследования обусловлена различиями в структуре и функции двух центриолей, из которых состоят centrosomы [7]. Так, более старая, «материнская» центриоль имеет дополнительные сателлитные комплексы (appendages/satellites), в которые входят специфические белки, в частности, центексин (ODF2) и нинеин. Именно сателлиты «материнских» центриолей обеспечивают закрепление микротрубочек цитоскелета и цилиогенез (образование

ресничек). «Дочерние» же центриолы, которые синтезируются во время S-фазы клеточного цикла, подобных структур не содержат. Таким образом, когда centrosomы удваиваются, то одна из двух получает «материнскую» центриоль, а другая — «дочернюю», которая лишь через полтора клеточных цикла приобретет сателлитные комплексы и тоже станет зрелой «материнской» центриолью.

Исследовательская группа под руководством Song-Hai Shi (Нью-Йорк) задалась вопросом о роли centrosom в асимметричном делении глиальных клеток-предшественников млекопитающих. Согласно результатам, опубликованным в октябрьском номере журнала Nature, centrosomы в глиальных клетках мышинных эмбрионов способны к асимметричной сегрегации, при этом «материнская» centrosoma удерживается в ГКП, а «дочерняя» наследуется нейральными клетками, коммитированными к дальнейшей дифференцировке.

Вначале авторы решили выяснить, различается ли локализация centrosom в глиальных клетках-предшественниках и дифференцирующихся клетках. Для этого авторы поместили центриолы флуоресцентным маркером, внедрив в ткани эмбриона плазмиду, кодирующую ген центрина-1 (CETN1; основной компонент центриолей), «слитый» с геном белка-репортера EGFP. Введение плазмиды осуществлялось путем электропорации in utero на 13,5-й сут. эмбрионального развития, когда отмечается активный нейрогенез. Поскольку ГКП и дифференцирующиеся нейрональные клетки различаются по своей морфологии, авторы электропорировали в ткани эмбрионов еще одну плазмиду с геном флуоресцентного белка DsRedex, который накапливается в цитоплазме, что позволило увидеть форму клеток. В биполярных клетках радиальной глии centrosomы располагались в дистальной части отростка, контактирующего с поверхностью желудочка, слева), в то время как дифференцирующиеся мультиполярные клетки субвентрикулярной и промежуточной зон содержали centrosomы в теле нейрона. Со временем все больше CETN1–EGFP центриолей выявлялось в субвентрикулярной и промежуточной зонах, что говорит о миграции в эти зоны дифференцирующихся клеток.

Различается ли структура centrosom в ГКП и дифференцирующихся нейрональных клетках? Чтобы ответить на этот вопрос, авторы аналогичным образом поместили как центрин-1 (DsRedex–CETN1), так и нинеин (EGFP–Nin) — один из компонентов сателлитных комплексов.

Это позволило проследить за судьбой «материнской» (Nin^+) и «дочерней» (Nin^-) центриолей. Важно, что Nin -экспрессирующие центриоли в ГКП концентрировались преимущественно в одной из centrosом, что свидетельствует о неидентичности centrosом в клетках радиальной глии. Далее, сравнивая распределение «материнских» и «дочерних» центриолей спустя два дня после электропорации плазмид, авторы обнаружили, что зрелые Nin^+ центриоли в основном остаются в клетках вентрикулярной зоны, где концентрируются ГКП. Напротив, «дочерние» центриоли, содержащие только CETN1, распределяются по промежуточной зоне и кортикальной пластинке, где локализованы нейрональные клетки на разных стадиях дифференцировки. Таким образом, авторы получили весомое свидетельство в пользу асимметричного распределения centrosом в глиальных клетках мышиных эмбрионов: centrosома, содержащая зрелую «материнскую» центриоль, удерживается в ГКП, а centrosома с «дочерней» центриолью наследуется клеткой, коммитированной к дальнейшей дифференцировке.

Чтобы провести наблюдение за асимметричной сегрегацией centrosом непосредственно *in situ*, был разработан оригинальный подход, позволяющий определить возраст центриоли. Для мечения центрин-1⁺ центриолей в качестве флуоресцентного репортера использовали белок Kaede, который изменяет свою флуоресценцию с зеленой на красную под действием фиолетового света (длина волны — 350–400 нм). Фотоконверсия Kaede необратима, а сам белок высоко стабилен, что позволяет пометить все центриоли одного возраста коротким световым импульсом и затем проследить за их судьбой. Поскольку при удвоении центриолью молекулы центрина-1 синтезируются *de novo*, все «дочерние» центриоли, образовавшиеся после фотоимпульса, будут содержать зеленый неконвертированный CETN1–Kaede. Фотоконверсию проводили также *in utero* через сутки после электропорации плазмиды, несущей CETN1–Kaede, а затем анализировали судьбу центриолей в развивающемся неокортексе через различные временные промежутки.

Через 1 сут. после фотоконверсии около 95% centrosом включали «красные» и «зеленые» центриоли, что говорит о прохождении клетками одного цикла деления. На 2-е сут. около 30% centrosом содержали только «зеленые», «дочерние» центриоли (второе деление). В то же время приблизительно 4% centrosом несли только «красные» центриоли, т.е. принадлежали еще не поделившимся клеткам. Отметим, что авторы не обнаружили обмен молекулами центрина между центриолями и его диффузию в цитоплазму, что исключает вклад данных процессов в результаты экспериментов.

Авторы подтвердили, что большинство (более 76%) «зеленых» centrosом, образовавшихся уже после фотоконверсии маркера, принадлежат дифференцирующимся клеткам промежуточной зоны и кортикальной пластинки. Большинство таких клеток экспрессируют TUJ1 — маркер дифференцирующихся нейронов. В свою очередь, около 78% centrosом, содержащих первичную «материнскую» («красную») центриоль, находились в глиальных клетках вентрикулярной и субвентрикулярной зон и ассоциировались с экспрессией Pax6, молекулярного маркера ГКП.

Чтобы увидеть, как происходит распределение центриолей в делящихся глиальных клетках *in situ*, S.-H. Shi с коллегами подготовили тканевые культуры кортикальных срезов, предварительно проведя трансфекцию

CETN1–Kaede и mPlum — еще одного флуоресцентного белка для визуализации клеточной морфологии. Через сутки после фотоконверсии CETN1–Kaede в культивируемых тканевых срезах авторы наблюдали, что в 6 из 7 делящихся клеток радиальной глии centrosома, содержащая «материнскую» центриоль, удерживается у поверхности вентрикулярной зоны, а centrosома с «дочерними» («зелеными») центриолями мигрирует в сторону кортикальной пластинки. Таким образом, авторы работы убедительно продемонстрировали асимметричное распределение centrosом при делении глиальных клеток-предшественников в развивающемся головном мозге млекопитающих.

Наконец, было выяснено, насколько значимо избирательное наследование зрелой «материнской» центриоли для локализации и функционирования глиальных клеток-предшественников. Угнетение экспрессии нинеина — компонента, необходимого для созревания центриолей, — с помощью антисмысловой РНК (shRNA или siRNA) приводило к нарушению асимметричной сегрегации centrosом. Более того, ингибирование нинеина вызывало утрату клеток в вентрикулярной зоне, где расположены глиальные предшественники. Действительно, отмечалось выраженное снижение относительного количества Pax6⁺ и GLAST⁺ клеток (маркеры ГКП) и увеличение доли TUJ1-позитивных дифференцирующихся нейрональных клеток. Это свидетельствует о том, что асимметричное распределение centrosом играет ключевую роль в поддержании недифференцированного состояния клеток-предшественников радиальной глии. При нарушении направленной сегрегации зрелых и «дочерних» центриолей ГКП утрачивают способность к самообновлению и запускают программу нейрональной дифференцировки.

Каким образом результаты, полученные S.-H. Shi и его коллегами, вписываются в общую картину регуляции асимметричного деления глиальных предшественников в эмбриональном головном мозге? Поскольку «материнские» центриоли являются центром прикрепления микротрубочек, можно полагать, что сигналы от апикальной поверхности клетки могут напрямую, через изменение локализации centrosомы, регулировать положение веретена деления, а, значит, судьбу клетки. Кроме того, «материнские» центриоли необходимы для образования первичных (сенсорных) ворсинок, которые участвуют в проведении сигналов, например, от рецепторов SHH (Sonic Hedgehog) и ростового фактора тромбоцитов (PDGF). Вероятно, что рецепторы, ассоциированные с первичными ворсинками, могут играть важную роль в восприятии и проведении сигналов от апикальной поверхности клетки и определять положение веретена деления. Наконец, микротрубочки, соединенные с «материнской» центриолью, могут служить «направляющими» для транспорта везикул с молекулами, определяющими судьбу клетки.

Если предположить, что одна из центриолей постоянно удерживается в глиальных клетках-предшественниках, то выходит, что «время жизни» такой центриоли становится чрезвычайно долгим по сравнению с другими белками в клетке. Здесь хочется провести аналогию с гипотезой «бессмертной» цепи ДНК, предложенной J. Cairns в 1975 г. Согласно этой гипотезе, при асимметричном делении расхождение хромосом в стволовых клетках также происходит асимметрично [8]. В результате одна из цепей ДНК, называемая «бессмертной» цепью, всегда остается в стволовой клетке, в то время как вторая цепь попадает в дочернюю клетку, коммити-

рованную к дальнейшей дифференцировке. Таким образом, «бессмертная» цепь рассматривается как идеальная матрица, хранящаяся в стволовой клетке на протяжении всей жизни организма. Хотя асимметричная сегрегация ДНК была обнаружена лишь в некоторых стволовых клетках беспозвоночных и позвоночных животных, а значение этого явления до конца не ясно, интересным представляется вопрос о том, как соотносятся между собой оба процесса — удержание «бессмертной» генетической матрицы и сохранение «бессмертной» центриоли [9]. Хотя первые свидетельства такой взаимосвязи уже получены (например, [10]), окончательный ответ на этот вопрос — дело дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Morrison S.J., Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441(7097): 1068–74.
2. Wodarz A., Huttner W.B. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech. Dev.* 2003; 120(11): 1297–309.
3. Cheng J., Turkel N., Hemati N. et al. Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature* 2008; 456(7222): 599–604.
4. Yamashita Y.M., Mahowald A.P., Perlin J.R., Fuller M.T. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 2007; 315(5811): 518–21.
5. Rebollo E., Sampaio P., Januschke J. et al. Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell.* 2007; 12(3): 467–74.
6. Rusan N.M., Peifer M. A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J. Cell Biol.* 2007; 177(1): 13–20.
7. Bettencourt-Dias M., Glover D.M. Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

В заключение следует отметить, что значимость центросомных компонентов в регуляции процессов эмбрионального нейрогенеза у млекопитающих, детальное молекулярное обоснование которой предложено в работе Wong с соавт., также согласуется со сведениями о генетических нарушениях нейрогенеза у человека. Действительно, гены, вовлеченные в развитие ауто-сомно-рецессивной формы первичной микроцефалии (наследственного заболевания, характеризующегося уменьшением объема головного мозга в результате дефектов эмбрионального нейрогенеза; MIM 251200), кодируют центросомные белки, среди которых MCPH1, CDK5RAP2, ASPM, CENPJ и STIL [11–13].

2007; 8(6): 451–63.

8. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975; 255(5505): 197–200.

9. Tajbakhsh S., Gonzalez C. Biased segregation of DNA and centrosomes: moving together or drifting apart? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10(11): 804–10.

10. Shinin V., Gayraud-Morel B., Gomes D., Tajbakhsh S. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8(7): 677–87.

11. Bond J., Roberts E., Springell K. et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* 2005; 37(4): 353–5.

12. Zhong X., Liu L., Zhao A., Pfeifer G.P., Xu X. The abnormal spindle-like, microcephaly-associated (ASPM) gene encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle* 2005; 4(9): 1227–9.

13. Zhong X., Pfeifer G.P., Xu X. Microcephalin encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle* 2006; 5(4): 457–8.

Подготовил А.В. Леявский

По материалам: Wang X., Tsai J.W., Imai J.H. et al. *Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. Nature* 2009; 461 (7266): 947–55

Nanog — ключевой фактор на финальных стадиях формирования плюрипотентного статуса

Ученые из Великобритании — Остин Смит (Austin Smith) и Ян Чемберс (Ian Chambers) несколько лет плодотворно сотрудничают, исследуя плюрипотентные клетки и, в частности, роль гомеобоксного белка Nanog. Шесть лет назад они вместе с коллегами из Эдинбургского университета впервые охарактеризовали этот транскрипционный фактор [1]. Независимо и одновременно с ними показали особую роль Nanog в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) японские исследователи во главе с Синъя Яманака (Shinya Yamanaka) [2]. Хотя приоритета в открытии Nanog у британцев нет, своим необычным названием этот фактор обязан шотландцу по происхождению Яну Чемберсу. Ян Чемберс назвал его Nanog в честь кельтской мифической земли вечной юности — Tír na nóg.

Экспрессия Nanog является специфичной для плюрипотентных клеток. Кроме клеток внутренней клеточной массы и эмбриональных стволовых клеток Nanog обнаружен только в развивающихся герминативных тканях млекопитающих. Делеция Nanog приводит к ранней доимплантационной гибели эмбриона, а его сверхэкспрессия в мышечных ЭСК — к автономии от цитокина LIF при культивировании [2]. Согласно устоявшемуся мнению,

Nanog наряду с такими факторами, как Oct4 и Sox2, находится в центре транскрипционной сети плюрипотентной клетки [3]. Повышение экспрессии Nanog делает более эффективным перепрограммирование путем слияния ЭСК и нейральных стволовых клеток [4]. Несмотря на это, Nanog не входит в каноническую четверку транскрипционных факторов Oct4, Sox2, c-Myc, и Klf4, трансфекция которыми приводит к перепрограммированию соматических клеток и получению клеток с индуцированной плюрипотентностью (iPS клетки). Некоторым противоречием является и тот факт, что, занимая одно из ключевых мест в иерархии регуляторных генов плюрипотентности, Nanog экспрессируется в ЭСК со значительной вариабельностью — вплоть до полного отсутствия экспрессии в отдельных клетках. Более того, делеция гена Nanog в ЭСК не приводит к переключению к дифференцировке, а лишь к получению линии ЭСК, имеющей повышенную склонность «уходить» в дифференцировку, но в норме обладающих всеми признаками плюрипотентности [5].

В осеннем номере журнала *Cell* опубликованы результаты исследования, проведенного с участием трех первооткрывателей Nanog Остина Смита, Яна Чемберса