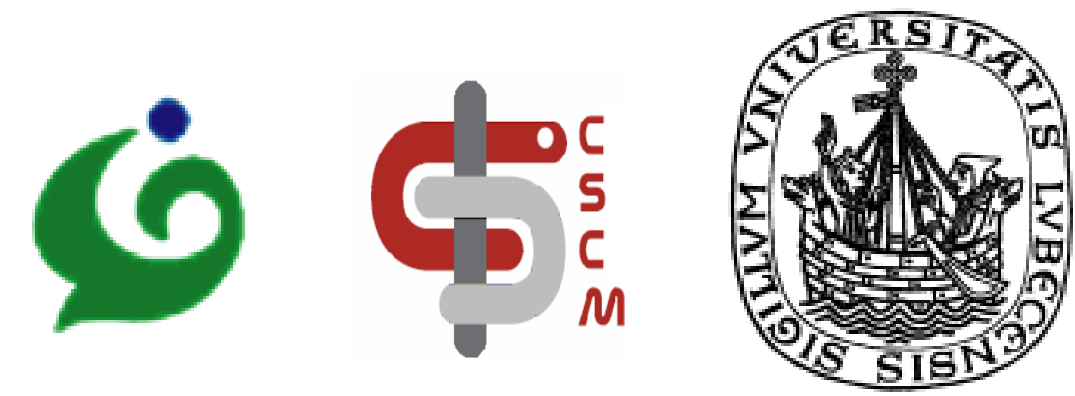




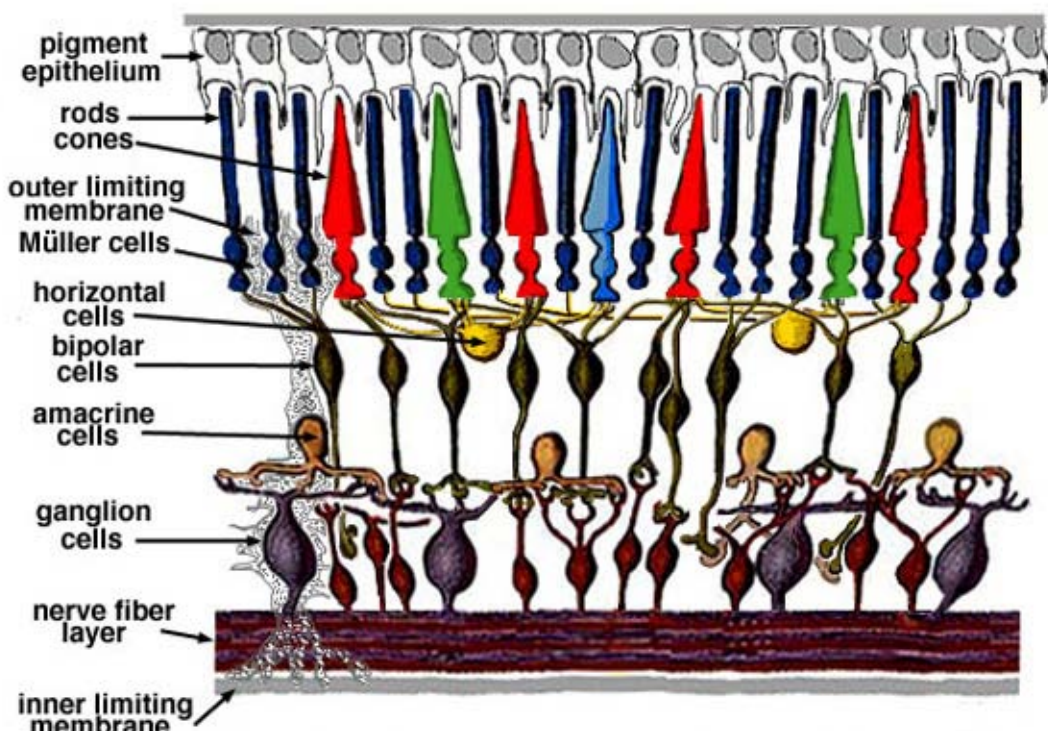
МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ СЕТЧАТКИ

Вадим Рогачевский¹, Tomoaki Shirao², Enno Hartmann³, Rainer Duden³, Irina Majoul¹



¹ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия; ² Высшая школа медицины, Университет Ганма, Маибаши, Япония; ³ Центр структурной и клеточной биологии в медицине, Институт биологии, Университет Любека, Любек, Германия

Не смотря на то, что в эмбриональном периоде новообразованная сетчатка представлена группой неспециализированных клеток (Рис. 1а), вскоре после рождения сетчатка быстро развивается в высшей степени организованную структуру нервной системы, состоящую из нескольких основных слоев (Рис. 1б). При этом распределенные по слоям клетки остаются специфично связанными межклеточными щелевыми контактами, которые различаются по проницаемости к ионам, включая Ca^{2+} , к цАМФ, IP3 и другим вторичным посредникам. Функциональная значимость такой организации в том, что она обеспечивает проведение мощного потока зрительной информации в мозг. Сигналы от фоторецепторных клеток (ФК), расположенных во внешнем слое сетчатки, через биполярные клетки (БК) среднего слоя сетчатки проходят напрямую к ганглионарным клеткам (ГК), расположенных во внутреннем слое сетчатки. Количественное соотношение этих типов клеток ФК:БК:ГК в сетчатке взрослых животных соотносится почти как 10:5:1, что в геометрическом смысле представляет строгую пирамидную иерархию с вершиной на ганглионарных клетках.



Упрощенная схема организации сетчатки. Источник: <http://webvision.med.utah.edu/>.

Интересно, что перед тем как вся эта пирамидная структура вступит в действие, появляются два других типа клеток, которые разделяют пул митотических и постмитотических клеток (Рис. 1а). Эти слои сетчатки содержат также горизонтальные клетки, которые практически четко разделяют всю массу нейронов на две части, отделяя, таким образом, фоторецепторные клетки от клеток биполярных. Почти в это же время амакриновые клетки (АК) начинают контролировать область, в которой БК клетки образуют основные входы на клетках ганглионарных.

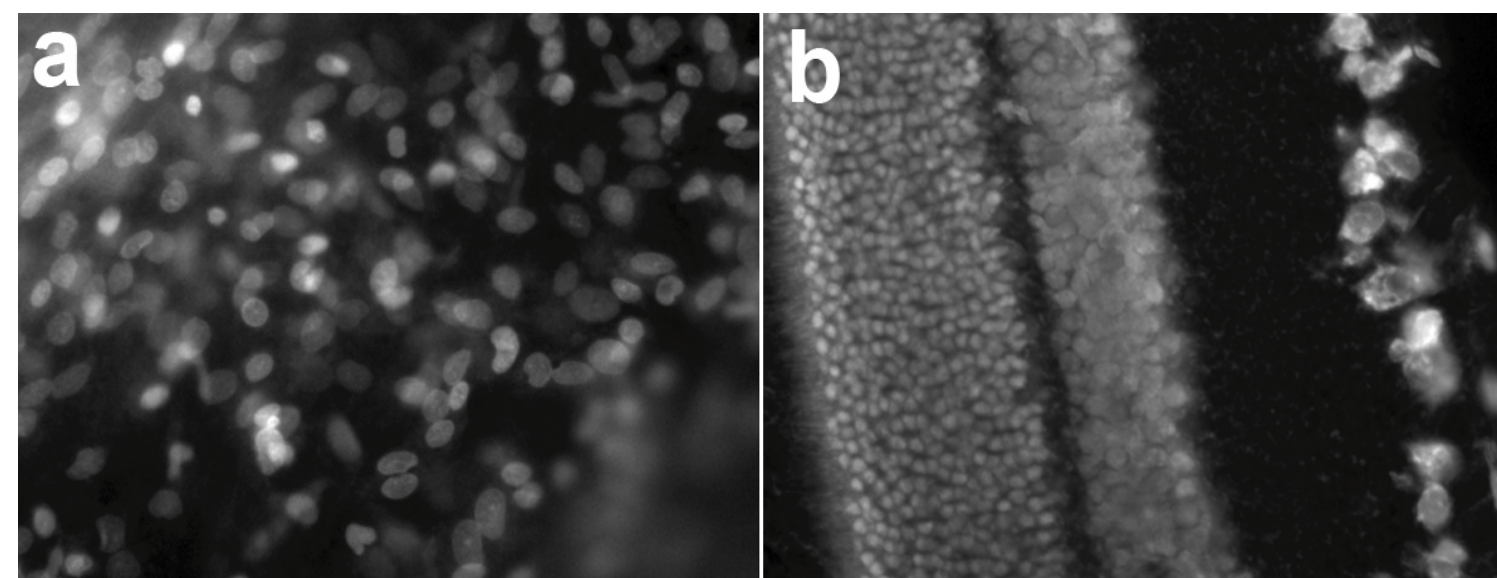
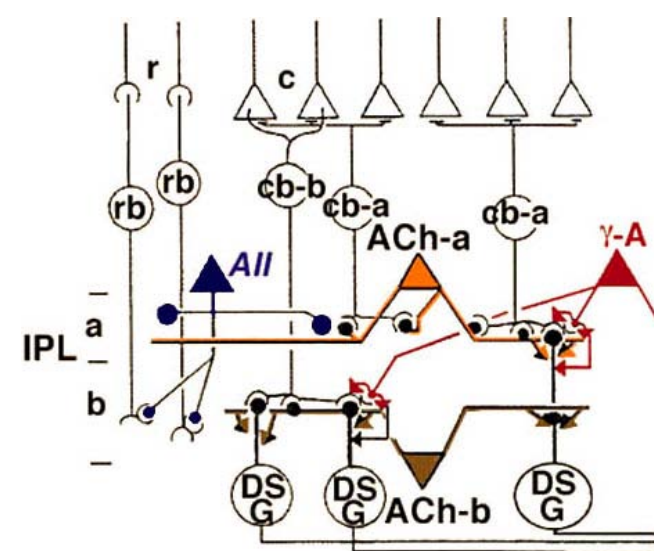
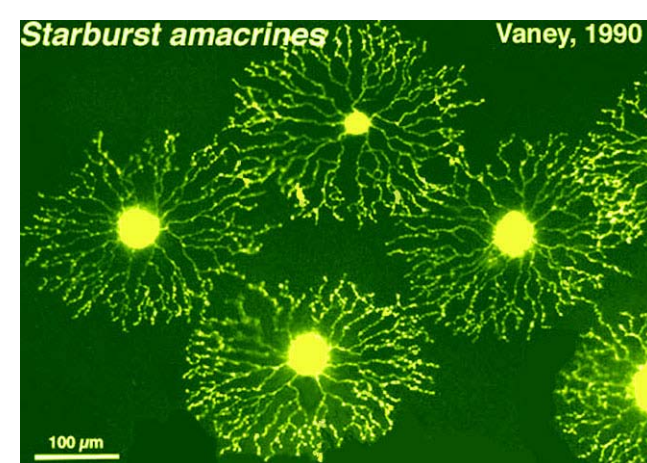


Рис.1. а) недифференцированная сетчатка эмбриона крысы (E19); б) постнатальная дифференцировка клеток сетчатки крысы (P30); три слоя клеток: ФК, БК и ГК, слева направо.

Эти два внутренних слоя менее исследованы и, возможно, являются наиболее интересными для изучения сигнализации и контроля проведения потока информации. Ключевым аспектом и наиболее интригующей особенностью в регуляции сигнализации между этими клетками и в регуляции пространственной организации их контактов является способность этих контактов к тонкой подстройке, во-первых, в период развития, и, во-вторых, при светоадаптации.

Недавно мы показали, что в новообразованных слоях горизонтальных и амакриновых клеток наблюдается высокий уровень экспрессии дребрин – белка, экспрессия которого изменяется в онтогенезе [1]. Мы также показали, что коннексин Cx43 непосредственно связывается с дребрином; детально это проанализировано в наших предыдущих работах [2, 3]. Здесь мы представляем результаты *in vivo* и *in vitro* исследований роли дребрин, который экспрессируется в двух сплайс-вариантах: дребрин Е (embryonic) – в эмбриональном периоде, и дребрин А (adult) – у взрослых. Наша идея заключается в том, что дребрин может быть необходим в межклеточной сигнализации посредством коннексинов в ходе быстрой реструктуризации межклеточных контактов и при установлении спецификации слоев сетчатки. Также известно, что как горизонтальные клетки, так и АК экспрессируют целый спектр нейрональных коннексинов: Cx36, Cx45, Cx57 [4]. Функциональная роль взаимодействия дребрин и коннексинов остается неясной. Щелевые контакты, по-видимому, участвуют в регуляции диффузионного сопряжения в новообразующемся слое сетчатки, между близлежащими горизонтальными клетками и между АК, но не между ГК. Несмотря на то, что на наиболее ранних стадиях диффузионное сопряжение в слое горизонтальных и в слое амакриновых клеток не показано, это может быть связано реструктуризацией контактов между клетками в ходе их миграции при созревании сетчатки. В этот эмбриональный период (E15-20), различные комбинации антагонистов глутамата, или ГАМК-рецепторов не влияют на межклеточное сопряжение. Конкретную роль коннексинов в слоях горизонтальных и амакриновых клеток более детально пока лишь предстоит исследовать. Одна из идей состоит в том, что сопряжение между горизонтальными и между амакриновыми клетками (возможно холинэргическими АК) посредством щелевых контактов является переходной – ранней фазой нейротрансмиссии, которая предшествует формированию химических синапсов.



АСн-эргические амакриновые клетки (люцифер-желтый, сетчатка кролика) и схема связей холинэргических клеток в сетчатке. Источник: <http://webvision.med.utah.edu/>.

Интересно то, что полностью сформированная нейротрансмиссия и генерация электрических волн возбуждения в сетчатке у млекопитающих могут происходить посредством щелевых контактов, до того как сформирована химическая нейротрансмиссия. Известно, что коннексины проницаемы для цАМФ [5, 6]. Этот вторичный посредник может модулировать цитоплазматические волны цАМФ в кластерах смежных клеток и существенно влиять на распространение волн ионов Ca^{2+} . Таким образом, щелевые контакты играют очень важную роль в распределении слоев, до того как вступит в действие химическая нейротрансмиссия.

Для того чтобы лучше понять роль ранней экспрессии дребрин мы совместили внутриутробную электропорацию иРНК дребрин в мозг эмбрионов с клеточными *in vitro* методами и экспрессировали дребрин с нейрональными коннексинами в нейронах и других клетках (Рис. 2). Наши *in vitro* эксперименты по реконструкции проявили удивительную роль дребрин в стабилизации нейрональных коннексинов в областях контактов между клетками (Рис. 2б). Для проверки полученных данных мы также использовали иРНК дребрин и показали, что в отсутствие дребрин нейрональные коннексины не транспортируются к плазматической мембране (Рис.2а) и клетки не образуют контактов друг с другом.

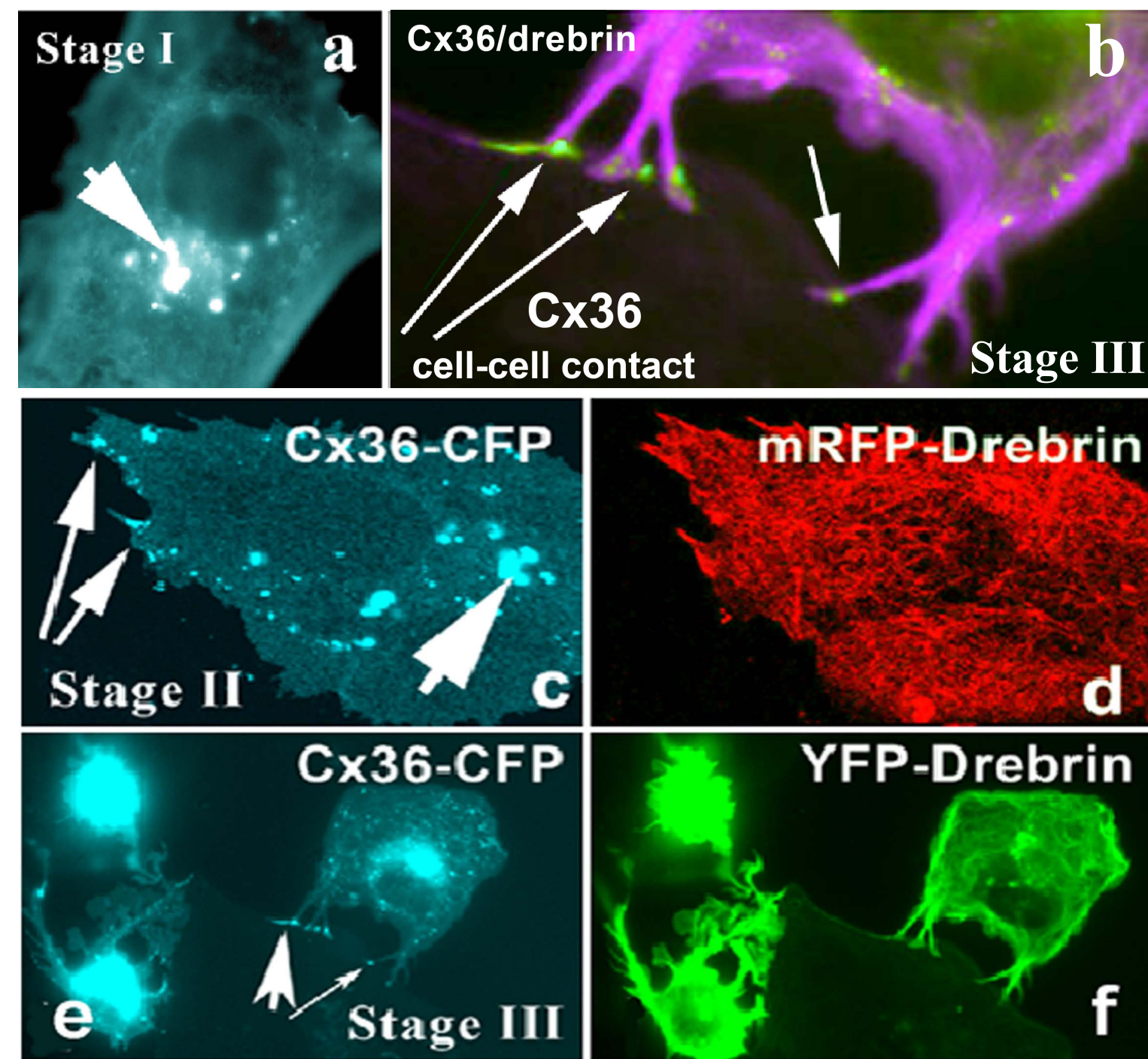


Рис.2. а) деградация коннексина Cx36 в лизосомах клеток трансфицированных иРНК дребрин; б, е-г) экспрессия дребрин значительно увеличивает количество Cx36 в области контактов между клетками, и предотвращает его деградацию; г-д) в присутствии дребрин Cx36 движется к плазматической мембране.

Наблюдение за одиночными фибробластами, несущими иРНК дребрин, с использованием высокоразрешающей прижизненной микроскопии проявляет то, каким образом в отсутствие дребрин нарушаются как доставка Cx36 к плазматической мембране, так и образование межклеточных контактов. Согласно данным иммунофлуоресцентного анализа, наблюдается колокализация Cx36 с лизосомными маркерами, а на вестерн-блоттах проявляются дополнительные полосы деградации коннексина. Таким образом, вместо того чтобы двигаться к плазматической мембране несвязанный с субмембранными скаффолд-белками Cx36 подвергается деградации.

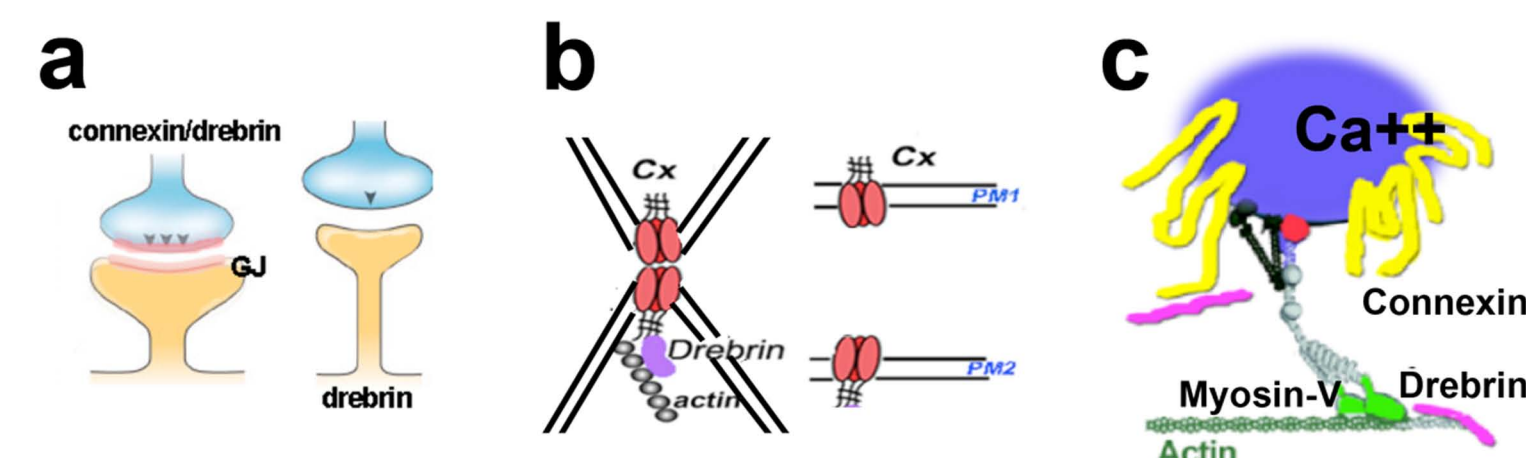


Рис.3. а) дребрин – высоко морфогенетически активный белок способен изменять форму дендритных шипиков; б) опосредованная коннексинами стабилизация синапса придает ему большую пластичность, и в критических случаях (напр. болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и т.д.) не позволяет терять раз образованного контакта между пре- и постсинапсом; без дребрин в ходе миграции или при других пластических процессах клетки не могут поддерживать установленное взаимодействие; в) возможные молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования межклеточных контактов.

Полученные результаты подтверждают способность высоко морфогенетически активного белка дребрин стабилизировать и пространственно регулировать перестройку межклеточных контактов обеспечивая, таким образом, быструю настройку межклеточной сигнализации. Эти неожиданные результаты не просто углубляют понимание сложности регуляции процессов протекающих в ходе развития, но показывают (Рис. 3) как двустороннее взаимодействие между цитоскелетом и межклеточными контактами может влиять на

комплексные процессы сигнализации и передачи зрительной информации, как в сетчатке, так и в мозге в целом. Известно, что среди других коннексинов Cx36 наиболее проницаем для цАМФ, при этом он экспрессируется в самых различных тормозных ГАМК-эргических интернейронах. Таким образом, индуцируемая дребрином реструктуризация межклеточных контактов может регулировать не только возбуждающие связи идущие от ФК, но также обеспечивать комплексную тормозную регуляцию ганглионарных клеток. Остается открытым вопрос о том, как регулируется экспрессия самого дребрин в ходе развития и при каких локальных условиях.

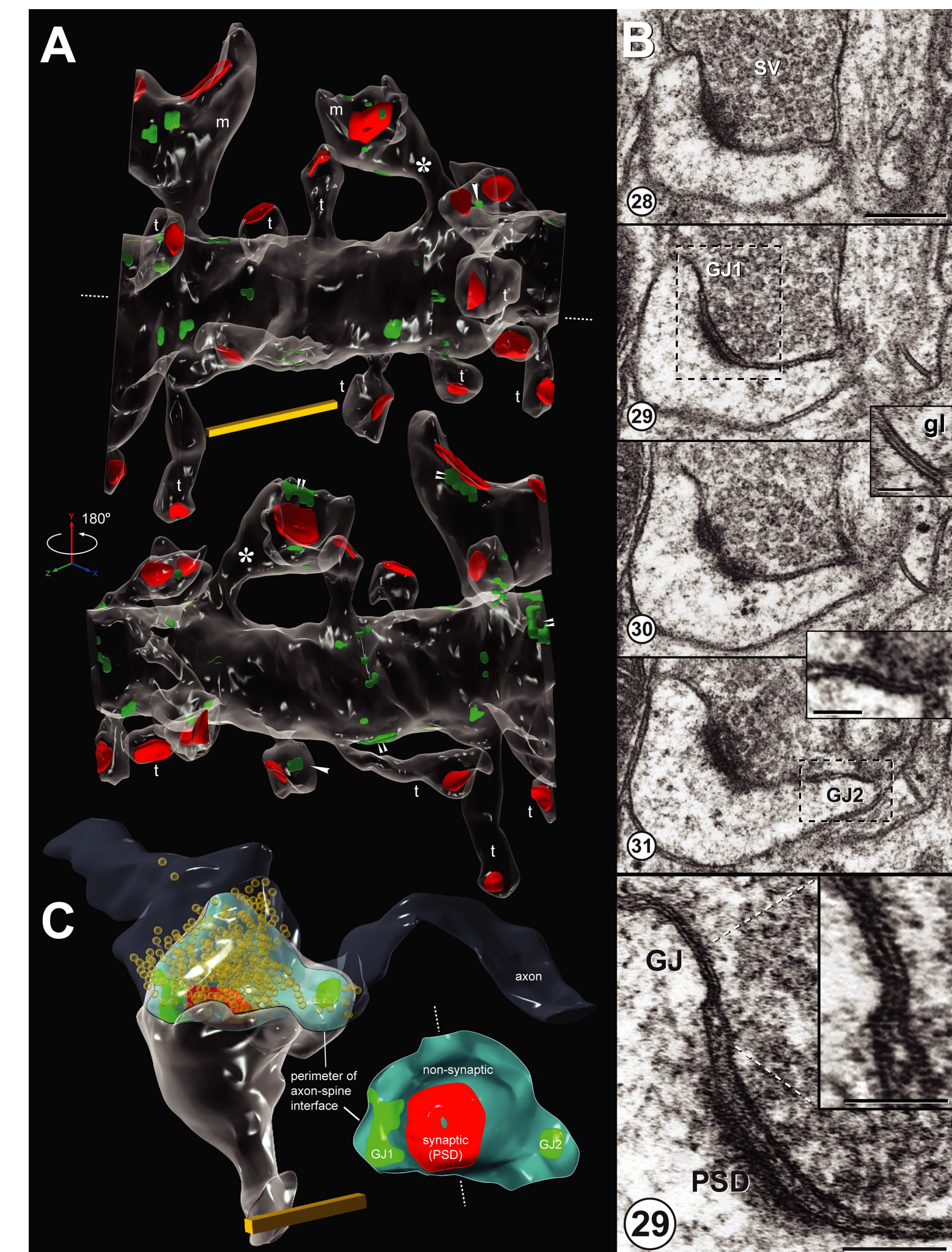


Рис. 4. Расположение щелевых контактов на дендритах и шипиках в среднем молекулярном слое зубчатой фасции гиппокампа крысы. А. 3D реконструкция короткого сегмента дендрита, несущего 53 щелевых контакта (GJ, зеленый), занимающих 2.4% площади плазматической мембраны. Красным выделены постсинаптические уплотнения – области химической нейротрансмиссии. В. На четырех последовательных срезах показан синапс на дендритном шипике отмеченный звездочкой на реконструированном дендрите. Пресинаптический бутон и шипик образуют смешанный тип синапса (mixed synapse). С. 3D реконструкция синапса на грибовидном шипике показанном на рис. В. Справа развернута область занимаемая контактом пре- и постсинапса, занимающая 20% поверхности шипика. В свою очередь 20% этой области занято собственно синаптической частью (активная зона химической передачи); при этом 2 щелевых контакта занимают 5% области контакта аксонального бутона с шипиком. Шкалы = 2 мкм на рис.А; 0.5 мкм на рис.В (срезы 28-31) и 0.1 мкм на рис.С. Дополнительный материал доступен по адресу <http://www.synapsis.ru/vem.html>.

ЛИТЕРАТУРА

1. Majoul I., Butkevich E., Onichtchouk D., Wenzel D., Thorlby G., Chailakhyan L.M., Duden, R. (2009). Limiting transport steps and novel interactions of Connexin-43 along the secretory pathway (submitted).
2. Butkevich E., Hulsman S., Wenzel D., Shirao T., Duden R., Majoul I. // Curr. Biol. (2004) 14: 650-658.
3. Majoul I., Shirao T., Sekino, Y., Duden, R. // Histochem. Cell Biol. (2007) 127: 355-361.
4. Söhl G., Maxeiner S., Willecke K. // Nat. Rev. Neurosci. (2005) 6(3): 191-200.
5. Hampson E.C., Vaney D.I., Weiler R. // J Neurosci. (1992) 12(12): 4911-4922.
6. Mills S.L., Massey S.C. // Nature (1995) 377(6551): 676-677.