

Д.Э. Коржевский, М.Н.Карпенко и О.В. Кирик

БЕЛКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С МИКРОТРУБОЧКАМИ, КАК ПОКАЗАТЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Настоящая работа посвящена характеристике белков бета-тубулина III, MAP2 и даблкортина, которые участвуют в организации, стабилизации и функционировании микротрубочек цитоскелета нервной клетки. Благодаря своим структурно-функциональным особенностям эти клетки могут рассматриваться в качестве дифференцировочных маркеров, ассоциированных с нейрогенезом, а также показателей функционального состояния нервной клетки в норме и при патологии. Приведенные сведения показывают, что указанные белки выполняют важные структурные и транспортные функции в нервной клетке и необходимы для осуществления нейроспецифических внутриклеточных процессов. Однако имеющиеся знания о функциональной роли этих белков в нервных клетках недостаточны и нуждаются в существенных дополнениях, без которых невозможно однозначно трактовать результаты исследований.

Ключевые слова: *нервные клетки, микротрубочки, даблкортин, тубулин*

Одним из ключевых направлений современной нейробиологии является изучение процессов, связанных с формированием новых нейронов (нейрогенезом, или нейрогенезом) [9]. Нейрогенез наблюдается в органах нервной системы не только в период эмбрионального развития организма, но и в постнатальном периоде онтогенеза. При нейрогенезе происходит образование нейробластов (непосредственных предшественников нейронов) и дифференцировка их в зрелые нейроны, устанавливающие связи со своими мишенями иннервации. Источником для образования нейробластов служат нейральные стволовые и прогениторные клетки [3, 36, 60, 62], которые в разные периоды онтогенеза и в различных областях мозга могут обладать неодинаковыми морфологическими и цитохимическими особенностями. Расшифровка механизмов реализации нейрональной дифференцировки неспециализированных прогениторных клеток и установление факторов среды, способных повлиять на нейрогенез, лежат в основе дальнейшего прогресса науки на пути управления восстановительными процессами в ЦНС.

Исследованиями последних лет установлено, что большинство нервных клеток, в связи с особенностями своей структурно-функциональной организации, содержат ряд специфических белков, ассоциированных с органеллами цитоскелета — микротрубочками (МТ) и промежуточными филаментами, которые не характерны для глиальных клеток и большинства иных клеток организма.

Таким образом, появление этих белков в постмитотических клетках может свидетельствовать об их нейрональной дифференцировке, а применение методов их иммуноцитохимического выявления должно обеспечивать селективное обнаружение нейробластов и дифференцирующихся нейронов как *in vivo*, так и *in vitro*. Помимо этого, изменения концентрации и внутриклеточного распределения этих нейроспецифических белков могут указывать на особенности функционального состояния нейронов. К сожалению, новые иммуноморфологические методики пока недостаточно стандартизированы и поэтому результаты их применения неоднозначны, что, в свою очередь, указывает на необходимость дальнейшего совершенствования методов выявления известных нейроспецифических белков и поиска новых маркеров нейрональной и глиальной дифференцировки. Тем не менее, современный уровень развития биохимии, генетики и функциональной нейроморфологии позволяет оценить перспективы применения многих из этих маркеров, а широкое обсуждение результатов исследований, проведенных с их применением, должно способствовать определению места новых иммуноцитохимических подходов в методическом арсенале нейроморфолога.

Цель настоящей работы состоит в характеристике белков, участвующих в организации, стабилизации и функционировании МТ (нейротрубочек) цитоскелета нервной клетки, которые, благодаря своим структурно-функциональным

особенностям, могут рассматриваться в качестве дифференцировочных маркеров, ассоциированных с нейрогенезом, а также использоваться в качестве показателей функционального состояния нервной клетки в норме и при патологии.

Бета-тубулин III (БТIII)

Тубулин является главным структурным белком МТ. Он представляет собой гетеродимер, состоящий из альфа- и бета-субъединиц [15]. В клетках млекопитающих бета-тубулин представлен 8 изоформами, которые являются продуктами разных генов [46]. Все изоформы бета-тубулина имеют высокую степень гомологии. Единственной вариативной областью в их составе является С-концевой домен протяженностью в 15–20 аминокислот. Этот домен лежит на поверхности МТ, образуя сайт связывания с белками, ассоциированными с МТ (МАР-белками), и содержит участки посттрансляционных модификаций [39].

БТIII по своему аминокислотному составу отличается от остальных представителей семейства бета-тубулинов, продуцирующихся клетками нервной системы, не более чем на 10% [71]. Степень межвидовой гомологии БТIII также достаточно велика, например, гомология между БТIII человека и крысы составляет 99,1% [23]. Это указывает на эволюционную консервативность и универсальность его физиологической роли.

При изоэлектрическом фокусировании БТIII, выделенный из мозга взрослых млекопитающих, разделяется на 7 зон, что свидетельствует о наличии посттрансляционных модификаций. Действительно, в вариативном С-концевом домене БТIII были выявлены участки полиглутаминирования и фосфорилирования [12]. Возможно, именно благодаря наличию данных модификаций БТIII обладает отличными от других бета-тубулинов свойствами и функциями.

Недавно была определена минимальная промоторная область гена БТIII, который содержит участки связывания транскрипционных факторов AP-2 и SP-1, а в проксимальной части имеет элемент CNE (central nervous system enhancer) [23], что определяет преимущественную экспрессию БТIII клетками нервной системы.

Ранее считалось, что БТIII специфичен для дифференцирующихся нейронов [28]. Однако было показано, что он также может экспрессироваться астроцитами [27] и некоторыми другими клетками вне ЦНС [55]. По мере старения организма экспрессия БТIII в нейронах головного мозга понижается [52]. В клетках периферической нервной системы (ПНС) наблюдается проти-

воположная динамика. Так, в нейронах чувствительного узла спинномозгового нерва с возрастом содержание БТIII увеличивается [42]. Эти данные указывают на функциональные различия БТIII в нейронах центральной и периферической нервной системы.

В нейронах БТIII обнаруживают как в перикарионах, так и в отростках [13]. В исследованиях, выполненных на клетках нейробластомы человека линии SK-N-SH, дифференцирующихся в нейроны, было показано, что БТIII локализуется преимущественно в нейритах, а редукция БТIII с помощью коротких интерферирующих РНК (siРНК) приводит к уменьшению их длины, но не сказывается на жизнеспособности клеток [38]. Следовательно, БТIII необходим для формирования нейронами длинных отростков.

При исследовании экспрессии БТIII в ЦНС половозрелых крыс нами было обнаружено, что наибольшая концентрация этого белка характерна для отростков и перикарионов крупных нейронов, расположенных в различных областях головного и спинного мозга (рис. 1, а, б). Аналогичные данные ранее были получены при исследовании ганглиозного слоя сетчатки глаза [67]. По-видимому, в постнатальном периоде онтогенеза уменьшение экспрессии БТIII в различных популяциях нейронов происходит не одновременно, что снижает ценность этого белка как маркера вновь образованных нервных клеток.

Иммуноцитохимические исследования нейрогенеза в развивающемся головном мозгу человека показали высокую селективность БТIII как раннего нейронального маркера [17]. Нами было обнаружено, что высокая селективность экспрессии БТIII в отростках нейронов различной локализации характерна и для эмбрионов лабораторных млекопитающих (рис. 2, а, б). Поэтому БТIII часто используют для верификации нейрональной дифференцировки нейральных стволовых клеток в исследованиях, проводимых *in vitro* [2]. По нашим данным, в противоположность эмбриогенезу у крыс в постнатальном периоде онтогенеза реакция на БТIII в пролиферативных зонах конечного мозга недостаточно контрастна. Она маскируется сильной реакцией на БТIII, которую дают отростки крупных нейронов. Не исключено, что это связано и с видовыми особенностями экспрессии БТIII. Таким образом, существуют сомнения в перспективности применения БТIII в качестве универсального маркера нейрональной дифференцировки в постнатальном периоде онтогенеза. Возможно, более надежными дифференцировочными маркерами окажутся модифицированные (фосфорилированная, полиглутаминированная)

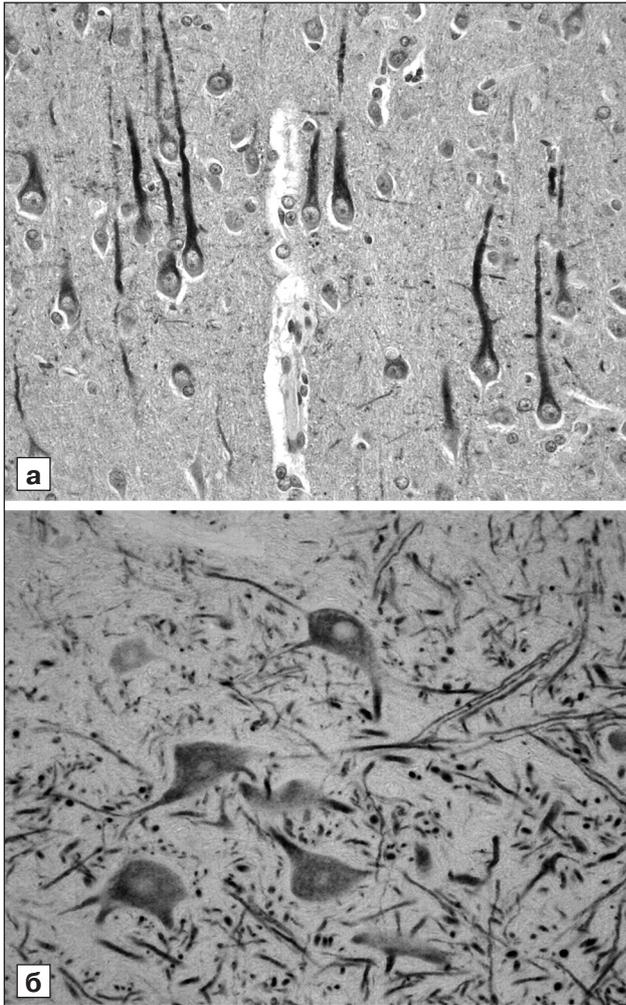


Рис. 1. Крупные нейроны головного (а) и спинного (б) мозга крысы, дающие интенсивную реакцию на бета-тубулин III (БТШ).

а — V слой неокортекса, б — двигательные нейроны спинного мозга. Иммуноцитохимическая реакция на БТШ (клон TU-20) с докраской гематоксилином (а) и без докраски (б). Об. 40, ок. 10.

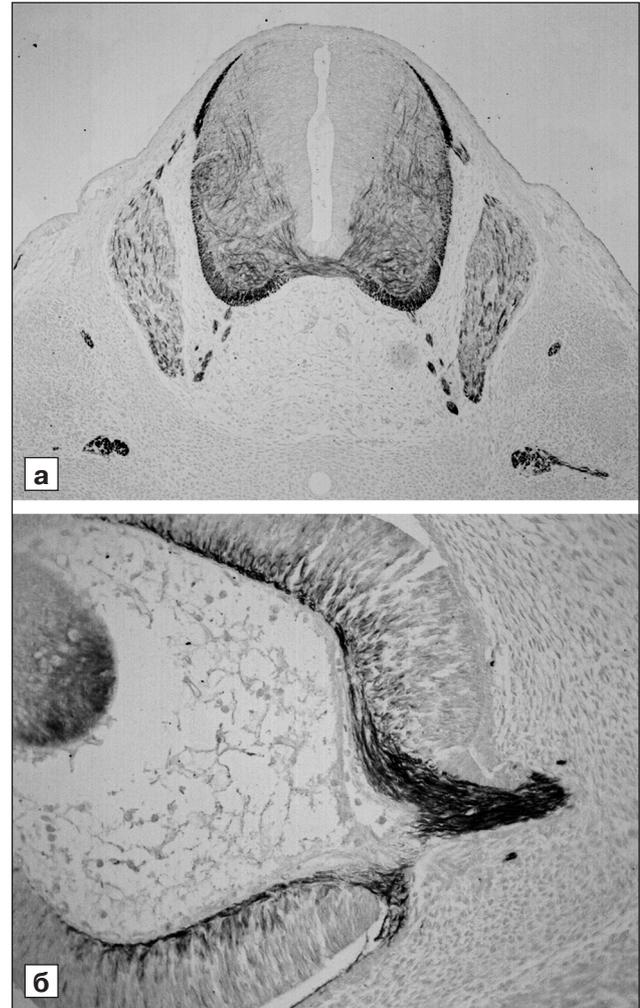


Рис. 2. Структуры нервной системы 14-дневного зародыша крысы, дающие положительную реакцию на бета-тубулин III (БТШ).

а — спинной мозг, чувствительные узлы спинномозговых нервов, фрагменты корешков спинномозговых нервов и нервных стволов; б — нервные волокна ганглиозных нейронов сетчатки глаза и фрагмент зрительного нерва. Иммуноцитохимическая реакция на БТШ (клон TU-20) с докраской гематоксилином (а) и без докраски (б). а — об. 10, ок. 10; б — об. 20, ок. 10.

формы БТШ, однако данное предположение требует проверки.

Помимо исследований нейрогенеза, БТШ может быть использован как функциональный маркер для оценки степени повреждения нейронов неокортекса. Недавно было показано, что гипоксия вызывает значимое снижение концентрации БТШ в нейронах префронтальной коры как в культуре, так и *in vivo* [68]. При травмах головного мозга в крови пациентов часто выявляют аутоантитела к БТШ [70], что свидетельствует о «забарьерной» локализации этого антигена в интактном головном мозгу и вовлечении этого белка в аутоиммунные реакции при повреждении гематоэнцефалического барьера.

Белок MAP2

Белок MAP2 (microtubule-associated protein 2) относится к семейству MAP-белков, которые связываются с тубулином и стабилизируют структуру МТ за счет изменения продолжительности их сборки [21, 29, 66].

MAP2 экспрессируется преимущественно в нейронах, однако, обнаруживается в некоторых тканевых элементах иного происхождения (скелетные мышечные волокна, эпителиоциты), но в значительно меньшем количестве [54, 74]. У млекопитающих выделяют 2 группы изоформ MAP2: высокомолекулярные (MAP2a и MAP2b с молекулярной массой 280 и 270 килодальтон соответственно) и низкомолекулярные (MAP2c и

MAP2d с молекулярной массой 70 и 75 килодальтон соответственно), которые являются продуктами альтернативного сплайсинга. Все изоформы имеют сходные N- и C-концевые домены; содержат домен, богатый пролином (PRD); 3–4 повтора по 18 аминокислот в C-концевой части молекулы, которые образуют домен связывания с тубулином (TBD). Различия в молекулярной массе высоко- и низкомолекулярных изоформ объясняются отсутствием у последних протяженного центрального домена [66].

В нервных клетках белок MAP2 представлен всеми изоформами, причем в развивающихся нейронах обнаруживаются преимущественно MAP2b, MAP2c и MAP2d, а в мозгу взрослых млекопитающих — MAP2a и MAP2d [16, 32, 73]. MAP2c во взрослом организме выявляется лишь в клетках сетчатки глаза и обонятельных луковиц [73, 75]. Низкомолекулярные изоформы MAP2 также обнаружены в клетках глии [56].

Существует определенная закономерность во внутриклеточном распределении изоформ MAP2. Так, высокомолекулярные изоформы преимущественно локализуются в дендритах и теле нейрона и лишь в незначительном количестве обнаруживаются в аксонах [10, 51]. Низкомолекулярные — напротив, присутствуют в одинаковом количестве во всех компартментах нервной клетки [10].

Основная функция белка MAP2 — стабилизация МТ — реализуется за счет связывания PRD и TBD доменов с C-концевой областью тубулина. Результатом такого взаимодействия является увеличение жесткости МТ, что дает возможность нейронам формировать протяженные отростки [31, 43]. MAP2 также может связываться с актиновыми микрофиламентами. Взаимодействие MAP2 и актина осуществляется через TBD-домен, причем на культуре клеток нейронов гиппокампа крысы и на клетках нейробластомы было показано, что возможен переход из состояния тубулин-MAP2 в состояние актин-MAP2 [49, 50]. Кроме этого, MAP2 взаимодействует с нейрофиламентами [18]. Таким образом, MAP2 выполняет роль «интегратора», взаимодействуя со всеми основными компонентами цитоскелета нервной клетки.

Помимо перечисленного, MAP2 способен регулировать скорость транспорта органелл вдоль МТ, конкурируя с динеином и кинезином за сайт связывания с МТ [53]. Также MAP2 способствует связыванию МТ с мембранами органелл [30]. Кроме этого, MAP2 взаимодействует с некоторыми сигнальными молекулами, например, с RII-субъединицей cAMP-зависимой протеинкиназы А (РКА) [65]. О важности этого взаимодействия свидетельствует тот факт, что «нокаут» гена

MAP2 приводит к снижению содержания РКА в дендритах и уменьшению скорости их удлинения [40]. Следовательно, MAP2 участвует в пластических процессах еще и за счет регуляции ориентированного распределения сигнальных белков.

MAP2 является субстратом ряда протеинкиназ — РКА, РКС, кальмодулиновой протеинкиназы II (САМКII), киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK) и др. В многочисленных работах, проведенных на лабораторных животных, показано изменение статуса фосфорилирования белка MAP2 в онтогенезе, что свидетельствует о его особом функциональном значении [66]. Действительно, фосфорилирование некоторых участков в молекуле MAP2 существенным образом изменяет функции белка, поскольку внесение дополнительного отрицательного заряда, например, в PRD-домен предотвращает ассоциацию MAP2 с C-концевым доменом тубулина, что приводит к неспособности MAP2 стабилизировать МТ [66]. Фосфорилирование РКА снижает степень связывания MAP2 с тубулином и актином, а также ингибирует протеолиз MAP2 кальпаином [11]. Таким образом, в зависимости от статуса фосфорилирования MAP2 может либо стабилизировать цитоскелет (в дефосфорилированной форме), либо способствовать его перестройке (в гиперфосфорилированной форме).

Важные данные о функциях белка MAP2 были получены при исследовании последствий повышенной/сниженной экспрессии MAP2 в клетках различного происхождения. Установлено, что предотвращение продукции MAP2 в клетках эмбриональной карциномы с помощью антисмысловых олигонуклеотидов приводило к неспособности формировать нейриты [26]. Сверхэкспрессия MAP2 в COS7-клетках, напротив, способствовала образованию и удлинению отростков [43], что свидетельствует об участии MAP2 в процессах инициации и удлинения нейритоподобных выростов. Однако в экспериментах *in vivo* на мышях с «нокаутом» гена MAP2 было показано, что у таких животных не наблюдается нарушений в развитии нервной системы, вероятно, за счет включения компенсаторных механизмов, опосредованных белком MAP1 [72]. Таким образом, белок MAP2, несомненно, участвует в процессах регуляции строения нервной клетки, однако, его роль не является исключительной.

В экспериментах по моделированию различных хронических заболеваний нервной системы и при анализе аутопсийного материала, полученного от пациентов с такими заболеваниями, в нейронах выявлено изменение выработки MAP2. Так, на различных моделях ишемического пора-

жения мозга у лабораторных животных показано значительное снижение содержания MAP2 в зоне повреждения и в прилегающих областях [33]. На модели «умеренного» травматического поражения коры большого мозга у мышей линии C57BL/6 через несколько минут после повреждения продемонстрировано уменьшение содержания MAP2 ипсилатерально в коре и зубчатой извилине гиппокампа. Однако уже через 1 сут после повреждения содержание MAP2 в этих областях частично восстанавливалось [41]. При восстановлении функционального состояния нервных клеток после повреждения, вызванного ишемией головного мозга, наблюдается увеличение продукции MAP2 [76]. Эти данные позволяют рассматривать белок MAP2 в качестве раннего и очень чувствительного маркера повреждения нейронов.

Даблкортин (DCX)

DCX был открыт как продукт гена, мутации которого у человека вызывают аномалии развития и стратификации неокортекса [24]. Установлено, что DCX представляет собой белок с молекулярной массой 40 килодальтон (360 аминокислотных остатков у человека и 365 — у мыши), который взаимодействует с МТ цитоскелета нейрона [64]. Он содержит два так называемых DCX-домена (по 11 килодальтон), локализованных на N-конце молекулы, и имеет глобулярную структуру с убиквитин-подобной трехмерной организацией [47]. Участок связывания DCX с МТ располагается между их протофиламентами, что способствует стабилизации последних [58].

У человека ген DCX локализован в X-хромосоме (Xq22.3–Xq23). Его экспрессия необходима для обеспечения направленной миграции нейробластов в период развития коры. Мутации в данном гене приводят к дезорганизации миграции нейронов неокортекса и вызывают X-зависимую лизэнцефалию (агирию, синдром гладкой коры) у мужчин и субкортикальную ламинарную гетеротопию (синдром двойной коры) у женщин [20].

У мыши подавление активности гена DCX не вызывает нарушения формирования коры [14], однако блокировка его транскрипции с помощью siRNA вызывает субкортикальную ламинарную гетеротопию, аналогичную обнаруживаемой у человека при синдроме двойной коры [63], что свидетельствует о возможности компенсаторного дублирования функции DCX. Позже было установлено, что существует другой белок — DCLK (даблкортин-подобная киназа, doublecortin-like kinase), который имеет аналогичный DCX DCX-домен. Именно DCLK может частично компенсировать утрату DCX, выполняя его функции [25,

48]. Мутации, затрагивающие оба гена, сопровождаются высокой летальностью животных и приводят к грубой дезорганизации коры, а также к нарушению цитоархитектоники гиппокампа [35, 45].

DCX обнаружен в дифференцирующихся и мигрирующих нейронах ЦНС и ПНС в период эмбрионального и постнатального развития [5, 7]. Установлено, что он принимает активное участие в реорганизации цитоскелета и процессе транслокации ядра (одного из ключевых процессов, происходящих в ходе миграции нейронов), участвует в везикулярном аксональном и дендритном транспорте [57].

DCX фосфорилируется по Ser-297 *in vitro* и *in vivo* циклин-зависимой киназой 5 (cdk-5). Дефекты cdk-5 также вызывают нарушения миграции и формирования слоев коры [37]. DCX может быть фосфорилирован и другими киназами в различных участках фосфорилирования. Предполагается, что именно фосфорилирование и дефосфорилирование DCX обеспечивает регуляцию миграции [44, 69].

DCX интенсивно экспрессируется в постмитотических нейробластах и накапливается в дистальной части нейритов, в проксимальных отделах конусов роста [34]. DCX необходим растущим отросткам [61], где он, предположительно, участвует в сложных процессах, опосредуемых мембранными рецепторами и молекулами адгезии, обеспечивая правильный выбор пути для роста аксона и для миграции клетки [34]. Предполагается, что DCX участвует и в синаптогенезе [59]. В пользу этого предположения свидетельствуют и наши данные о наличии DCX-иммунопозитивных структур в нейропиле гиппокампа (рис. 3, а) — области, где формируются новые синапсы в течение всего постнатального периода онтогенеза.

В отношении экспрессии DCX в пролиферирующих прогениторных клетках существуют противоречивые мнения. Одни исследователи считают, что DCX не экспрессируется в пролиферирующих клетках, а только в постмитотических незрелых нейронах, включая тангенциально мигрирующие нейроны (нейробласты) эмбриональной коры, нейробласты кортикальной пластинки, клетки рострального миграционного пути у взрослых животных [34]. Однако в субвентрикулярной зоне нами были обнаружены единичные делящиеся клетки, проявляющие интенсивную реакцию на DCX (см. рис. 3, б), что противоречит данному мнению. Возможно, эти противоречия связаны с региональной функциональной специализацией DCX, верификация которой требует

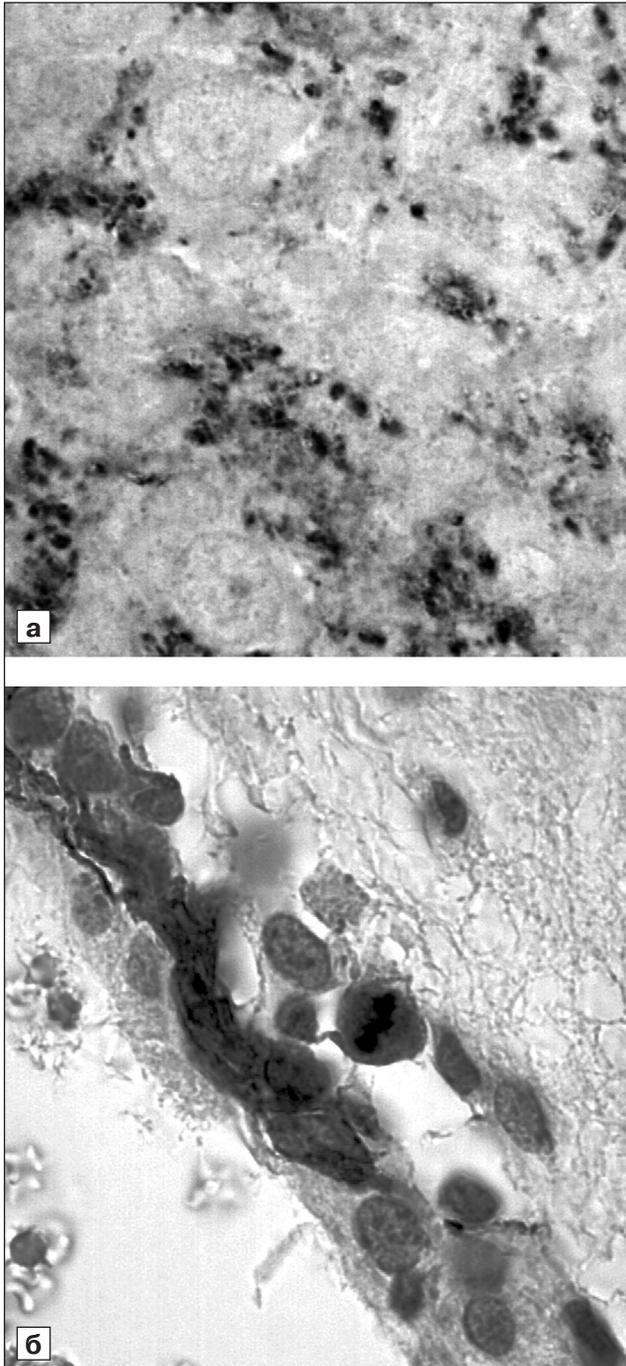


Рис. 3. Даблкортин-иммунопозитивные структуры области СА4 гиппокампа крысы (а) и митотически-делящаяся клетка субвентрикулярной зоны конечного мозга крысы, дающая интенсивную реакцию на даблкортин (б).

Иммуноцитохимическая реакция на даблкортин [7] без докраски (а) и с докраской гематоксилином (б). Об. 100, ок. 10.

проведения специальных исследований. Косвенно существование особой функциональной специализации DCX в различных структурах нервной системы подтверждается выявленными особенностями коэкспрессии этого маркера с другими нейроспецифическими белками. Так, часть DCX-

иммунопозитивных (DCX⁺) клеток пириформной коры и супрахиазматического ядра гипоталамуса коэкспрессируют маркер зрелых нейронов — нейрональный ядерный антиген (NeuN) [22]. В узле тройничного нерва у крыс DCX⁺-клетки не синтезируют нейрон-специфическую енолазу [22]. В чувствительных узлах спинномозговых нервов часть зрелых нейронов содержат DCX но не содержат ядерный белок NeuN [22], характерный для зрелых нейронов ЦНС [1, 4].

DCX⁺-клетки обнаружены в мозолистом теле [59], что может свидетельствовать о локальном нейрогенезе или более вероятно, о миграции вдоль волокон белого вещества нейробластов из других участков мозга. DCX экспрессируется клетками опухолей центральной и периферической нервной системы человека, преимущественно тех, которые обладают высокой способностью к инвазии (глиобластомы, анапластические астроцитомы, олигоастроцитомы) [19, 57].

Приведенные сведения о MAP-белках показывают, что они выполняют важные структурные и транспортные функции в нервной клетке и необходимы для осуществления специфических (характерных для нейронов) внутриклеточных процессов (установление связей с отдаленными мишенями, формирование синаптических контактов). Один из этих белков — DCX — необходим дифференцирующимся нейробластам для ориентации в межклеточном пространстве и правильной оценки микроокружения при миграции — одном из ключевых процессов в становлении пластинчатой структуры коры мозга. В связи с этим широкое использование иммуноцитохимического маркирования этих белков при изучении процессов дифференцировки нервных клеток и миграции нейробластов представляется закономерным. Тем не менее, следует признать, что знания о функциональной роли этих белков в нервных клетках недостаточны и нуждаются в существенных дополнениях, без которых невозможно однозначно трактовать результаты проведенных исследований. Имеющиеся разногласия в представлениях о специфичности экспрессии анализируемых белков вынуждают с осторожностью относиться к выводам из работ, в которых выявление БТШ, MAP2 и DCX трактуется как несомненное свидетельство принадлежности клетки к нейрональной популяции. В особенности это касается исследований, проведенных *in vitro*, когда отсутствуют дополнительные критерии (наличие характерных морфологических признаков, определенная анатомическая локализация), помогающие идентифицировать выявляемые клетки.

Ряд исследований свидетельствуют, что БТШ и MAP2 могут быть использованы как чувствительные показатели раннего повреждения нейронов, наряду с другим нейроспецифическим белком — NeuN [1, 6, 8]. Это направление исследований перспективно в плане разработки новых диагностических подходов для раннего выявления скрытых повреждений нейронов и может оказаться востребованным при изучении хронических нейродегенеративных заболеваний и травм головного мозга.

Таким образом, иммуноцитохимические реакции на белки, ассоциированные с МТ нервной клетки, являются ценным инструментом, расширяющим методический арсенал нейроморфологических исследований. Однако при трактовке результатов, полученных с их применением, необходимо проявлять определенную осторожность, что обусловлено недостаточной полнотой знаний о биохимических процессах, в которых принимают участие выявляемые белки.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 10-04-00180а, 10-04-00676а) и Правительства РФ — грант МК-1383.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева О.С., Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и др. Преадаптация к азотному наркозу и нарушения структуры коры головного мозга крыс при гипоксии. Журн. эволюц. биохим., 2010, т. 46, № 4, с. 311–315.
- Вердиев Б.И., Полтавцева Р.А., Подгорный О.В. и др. Молекулярно-генетический и иммунотипический анализ транскрипционного фактора Pax6 и маркеров нейрональной дифференцировки в неокортексе и сетчатке плодов человека *in vivo* и *in vitro*. Клеточн. технол. биол. мед., 2009, № 4, с. 206–213.
- Гиляров А.В. Нестин в клетках центральной нервной системы. Морфология, 2007, т. 131, вып. 1, с. 85–90.
- Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Зинькова Н.Н. и др. Иммунохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 76–78.
- Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Иммуноцитохимическое выявление тканевых антигенов после длительного хранения объектов в метилсалицилате. Морфология, 2008, т. 134, вып. 6, с. 76–78.
- Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В. и др. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2010, т. 5, № 3, с. 1–7.
- Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В. и Отеллин В.А. Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуноцитохимического выявления дабл-кортина. Морфология, 2008, т. 133, вып. 4, с. 7–10.
- Коржевский Д.Э., Хожай Л.И., Гилерович Е.Г. и др. Современные морфологические методы оценки деструктивных процессов, развивающихся в головном мозге в ответ на повреждающие воздействия. В кн.: Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга. М., ИЗПЦ «Информкнига», 2006, с. 139–142.
- Сосунов А.А. и Чельшев Ю.А. Стволовая нервная клетка мозга. Успехи физиол. наук, 2002, т. 33, № 1, с. 17–28.
- Albala J.S., Kress Y., Liu W.K. et al. Human microtubule-associated protein-2c localizes to dendrites and axons in fetal spinal motor neurons. J. Neurochem., 1995, v. 64, № 6, p. 2480–2490.
- Alexa A., Tompa P., Baki A. et al. Mutual protection of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and cyclic AMP-dependent protein kinase II against mu-calpain. J. Neurosci. Res., 1996, v. 44, № 5, p. 438–445.
- Alexander J.E., Hunt D.F., Lee M.K. et al. Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, v. 88, № 11, p. 4685–4689.
- Avwenagha O., Campbell G. and Bird M.M. Distribution of GAP-43, beta-III tubulin and F-actin in developing and regenerating axons and their growth cones *in vitro*, following neurotrophin treatment. J. Neurocytol., 2003, v. 32, № 9, p. 1077–1089.
- Bai J., Ramos R.L. and Ackman J.B. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. Nat. Neurosci., 2003, v.6, № 12, p. 1277–1283.
- Banerjee A., Roach M.C., Trcka P. and Luduena R.F. Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin. J. Biol. Chem., 1990; v. 265, № 3, p.1794–1799.
- Binder L.I., Frankfurter A., Kim H. et al. Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 17, p. 5613–5617.
- Bystron I., Rakic P., Molnar Z. and Blakemore C. The first neurons of the human cerebral cortex. Nat. Neurosci., 2006, v. 9, № 7, p. 880–886.
- Cunningham C.C., Leclerc N., Flanagan L.A. et al. Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. J. Cell Biol., 1997, v. 136, № 4, p. 845–857.
- Daou M.C., Smith T.W., Litofsky N.S. et al. Doublecortin is preferentially expressed in invasive human brain tumors. Acta Neuropathol., 2005, v. 110, № 5, p. 472–480.
- De Wit M.C., Lequin M.H., de Coo I.F. et al. Cortical brain malformations: effect of clinical, neuroradiological, and modern genetic classification. Arch. Neurol., 2008, v. 65, № 3, p. 358–366.
- Dehmelt L. and Halpain S. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? J. Neurobiol., 2004, v. 58, № 1, p. 18–33.
- Dellarole A. and Grilli M. Adult dorsal root ganglia sensory neurons express the early neuronal fate marker doublecortin. J. Comp. Neurol., 2008, v. 511, № 3, p. 318–328.
- Dennis K., Uittenbogaard M., Chiaramello A. and Moody S.A. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III beta-tubulin gene. Gene, 2002, v. 294, № 1–2, p. 269–277.
- Des Portes V., Pinaud J.M., Billuart P. et al. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. Cell, 1998, v. 92, № 1, p. 51–61.

25. Deuel T.A., Liu J.S. and Corbo J.C. Genetic interaction between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron*, 2006, v.49, № 1, p. 41–53.
26. Dinsmore J.H. and Solomon F. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell*, 1991, v. 64, № 4, p. 817–826.
27. Dráberová E., Del Valle L., Gordon J. et.al. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2008, v. 67, № 4, p. 341–354.
28. Fanarraga M.L., Avila J. and Zabala J.C. Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *Eur. J. Neurosci.*, 1999, v. 11, № 2, p. 516–527.
29. Farah C.A. and Leclerc N. HMWMAP2: new perspectives on a pathway to dendritic identity. *Cell Motil. Cytoskeleton.*, 2008, v.65, № 7, p. 515–527.
30. Farah C.A., Liazoghli D., Perreault S. et.al. Interaction of microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons. *J. Biol. Chem.*, 2005, v. 280, № 10, p.9439–9449.
31. Felgner H., Frank R., Biernat J. et.al. Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J. Cell Biol.*, 1997, v. 138, № 5, p. 1067–1075.
32. Ferhat L., Represa A., Ferhat W. et.al. MAP2d mRNA is expressed in identified neuronal populations in the developing and adult rat brain and its subcellular distribution differs from that of MAP2b in hippocampal neurones. *Eur. J. Neurosci.*, 1988, v.10, №1, p. 161–171.
33. Folkerts M.M., Berman R.F., Muizelaar J.P. and Rafols J.A. Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 1998, v. 15, № 5, p. 349–363.
34. Friocourt G., Koulakoff A., Chafey P. et.al. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb. Cortex*, 2003, v. 13, № 6, p. 620–626.
35. Friocourt G., Liu J.S., Antypa M. et al. Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *J. Neurosci.*, 2007, v. 27, № 14, p. 3875–3883.
36. Gonzalez-Perez O., Quinones-Hinojosa A. Dose-dependent effect of EGF on migration and differentiation of adult subventricular zone astrocytes. *Glia*, 2010, v. 58, № 8, p. 975–983.
37. Graham M.E., Ruma-Haynes P., Capes-Davis A.G. et al. Multisite phosphorylation of doublecortin by cyclin-dependent kinase 5. *Biochem. J.*, 2004, v. 381, Pt 2, p.471–481.
38. Guo J., Walss-Bass C. and Ludueña R.F. The beta isotypes of tubulin in neuronal differentiation. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2010, v. 67, № 7, p. 431–441.
39. Hammond J.W., Cai D. and Verhey K.J. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008, v. 20, № 1, p. 71–76.
40. Harada A., Teng J., Takei Y. et.al. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J. Cell Biol.*, 2002, v. 158, № 3, p. 541–549.
41. Huh J.W., Raghupathi R., Laurer H.L. et.al. Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. *J. Neurotrauma*, 2003, v. 20, № 10, p. 975–984.
42. Jiang Y.Q. and Oblinger M.M. Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development. *J. Cell Sci.*, 1992, v. 103, Pt 3, p. 643–651.
43. Kalcheva N., Rockwood J.M., Kress Y. et al. Molecular and functional characteristics of MAP-2a: ability of MAP-2a versus MAP-2b to induce stable microtubules in COS cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1998, v. 40, № 3, p. 272–285.
44. Kappeler C., Saillour Y., Baudoin J.P. et.al. Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum. Mol. Genet.*, 2006, v. 15, № 9, p. 1387–1400.
45. Kerjan G., Koizumi H., Han E.B. et.al. Mice lacking doublecortin and doublecortin-like kinase 2 display altered hippocampal neuronal maturation and spontaneous seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2009, v. 106, № 16, p. 6766–6771.
46. Khan I.A. and Ludueña R.F. Phosphorylation of beta III-tubulin. *Biochemistry*, 1996, v. 35, № 12, p. 3704–3711.
47. Kim M.H., Cierpicki T., Derewenda U. et al. The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase. *Nat. Struct. Biol.*, 2003, v. 10, № 5, p. 324–333.
48. Koizumi H., Tanaka T. and Gleeson J.G. Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron*, 2006, v. 49, № 1, p. 55–66.
49. Kozireski-Chuback D., Wu G. and Ledeen R.W. Upregulation of nuclear GM1 accompanies axon-like, but not dendrite-like, outgrowth in NG108-15 cells. *J. Neurosci. Res.*, 1999, v. 55, № 1, p. 107–118.
50. Kwei S.L., Clement A., Faissner A. and Brandt R. Differential interactions of MAP2, tau and MAP5 during axogenesis in culture. *Neuroreport*, 1998, v. 9, № 6, p. 1035-1040.
51. Langnaese K., Seidenbecher C., Wex H. et.al. Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1996, v. 42, № 1, p. 118–122.
52. Liu L., Geisert E.E., Frankfurter A. et al. A transgenic mouse class-III beta tubulin reporter using yellow fluorescent protein. *Genesis*, 2007, v. 45, № 9, p. 560–569.
53. Lopez L.A. and Sheetz M.P. Steric inhibition of cytoplasmic dynein and kinesin motility by MAP2. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1993, v. 24, № 1, p. 1–16.
54. Loveland K.L., Hayes T.M., Meinhardt A. et al. Microtubule-associated protein-2 in the rat testis: a novel site of expression. *Biol. Reprod.*, 1996, v. 54, № 4, p. 896–904.
55. Ludueña R.F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.*, 1998, v. 178, p. 207–275.
56. Matsunaga W., Miyata S. and Kiyohara T. Redistribution of MAP2 immunoreactivity in the neurohypophysial astrocytes of adult rats during dehydration. *Brain Res.*, 1999, v. 829, № 1–2, p. 7–17.
57. Messi E., Florian M.C., Caccia C. et al. Retinoic acid reduces human neuroblastoma cell migration and invasiveness: effects on DCX, LIS1, neurofilaments-68 and vimentin expression. *BMC Cancer*. 2008, v. 8, № 30, p. 1–12.
58. Moores C.A., Perderiset M., Francis F. et.al. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol. Cell*, 2004, v. 14, № 6, p. 833–839.
59. Nacher J., Crespo C. and McEwen B.S. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.*, 2001, v. 14, № 4, p. 629–644.

60. Nakagomi T., Taguchi A., Fujimori Y. et al. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *Eur. J. Neurosci.*, 2009, v. 29, № 9, p. 1842–1852
61. Pietranera L., Lima A., Roig P. and De Nicola A.F. Involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in oestradiol neuroprotection of the hippocampus of hypertensive rats. *J. Neuroendocrinol.*, 2010, v. 22, № 10, p. 1082–1092.
62. Prajerova I., Honsa P., Chvatal A. and Anderova M. Neural stem/progenitor cells derived from the embryonic dorsal telencephalon of D6/GFP mice differentiate primarily into neurons after transplantation into a cortical lesion. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2010, v. 30, № 2, p. 199–218.
63. Ramos R.L., Bai J. and LoTurco J.J. Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. *Cereb. Cortex*, 2006, v. 16, № 9, p. 1323–1331.
64. Reiner O., Coquelle F.M., Peter B. et al. The evolving doublecortin (DCX) superfamily. *BMC Genomics*, 2006, v. 7, № 188, p. 1–16.
65. Rubino H.M., Dammerman M., Shafit-Zagardo B. and Erlichman J. Localization and characterization of the binding site for the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase on MAP2. *Neuron*, 1989, v. 3, № 5, p. 631–638.
66. Sánchez C., Díaz-Nido J. and Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.*, 2000, v. 61, № 2, p. 133–168.
67. Sharma R.K. and Netland P.A. Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res.*, 2007, v. 1176, p. 11–17.
68. Shen Y. and Yu L.C. Potential protection of curcumin against hypoxia-induced decreases in beta-III tubulin content in rat prefrontal cortical neurons. *Neurochem. Res.*, 2008, v. 33, № 10, p. 2112–2117.
69. Shmueli A., Gdalyahu A., Sapoznik S. et al. Site-specific dephosphorylation of doublecortin (DCX) by protein phosphatase 1 (PP1). *Mol. Cell Neurosci.*, 2006, v. 32, № 1–2, p. 15–26.
70. Skoda D., Kranda K., Bojar M. et al. Antibody formation against beta-tubulin class III in response to brain trauma. *Brain Res. Bull.*, 2006, v. 68, № 4, p. 213–216.
71. Sullivan K.F. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1988, v. 4, p. 687–716.
72. Teng J., Takei Y., Harada A. et al. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J. Cell Biol.*, 2001, v. 155, № 1, p. 65–76.
73. Tucker R.P. and Matus A.I. Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Dev. Biol.*, 1988, v. 130, № 2, p. 423–434.
74. Valdivia M.M., Avila J., Coll J. et al. Quantitation and characterization of the microtubule associated MAP2 in porcine tissues and its isolation from porcine (PK15) and human (HeLa) cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, v. 105, № 4, p. 1241–1249.
75. Viereck C., Tucker R.P. and Matus A. The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *J. Neurosci.*, 1989, v. 9, № 10, p. 3547–3557.
76. Yamanouchi H., Jay V., Otsubo H. et al. Early forms of microtubule-associated protein are strongly expressed in cortical dysplasia. *Acta. Neuropathol.*, 1998, v. 95, № 5, p. 466–470.

Поступила в редакцию 15.09.10

MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS AS MARKERS OF NERVE CELL DIFFERENTIATION AND FUNCTIONAL STATUS

D.E. Korzhevskiy, M.N. Karpenko and O.V. Kirik

This paper is aimed at the characterization of beta-III-tubulin, MAP2 and doublecortin, the proteins which participate in the organization, stabilization and function of the microtubules of nerve cell cytoskeleton. Due to the structural and functional features, these proteins may be regarded as differentiation markers, associated with neurogenesis and as the indicators of nerve cell functional status under normal and pathological conditions. The data presented show that these proteins perform important structural and transport functions in nerve cells and are essential for some neurospecific intracellular processes. However, current knowledge of the functional role of these proteins in nerve cells is insufficient and requires significant supplementation indispensable for unequivocal interpretation of the studies results.

Key words: *microtubules, neural cells, doublecortin, tubulin*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg