

УДК 611-013.3:576.3

Получение и характеристика линии эмбриональных стволовых клеток мыши, трансфицированных геном нейротрофического фактора глии, слитым с геном зеленого флуоресцентного белка

Е. Л. Арсеньева¹, И. В. Кузьмин¹, Е. С. Мануилова¹, Е. В. Новосадова¹, Е. В. Муркин²,
Г. В. Павлова², В. З. Тарантул¹, И. А. Гривенников^{1#}

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва

² Институт биологии гена РАН, Москва

e-mail: igorag@img.ras.ru

РЕФЕРАТ Изучено влияние экспрессии гена нейротрофического фактора глии (*gdnf*) человека на морфологию и пролиферативную активность эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши линии R1, а также на их способность формировать эмбрионидные тела (ЭТ). Предварительно методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, было показано, что в этой линии ЭС клеток осуществляется экспрессия генов рецепторов для нейротрофического фактора глии RET и GFR α 1. Получена линия ЭС клеток мыши, трансфицированных геном *gdnf* человека, слитым с геном «зеленого» флуоресцентного белка (*gfp*). Наличие экспрессии гена *gdnf* человека в этих клетках показано с помощью Нозерн-гибридизации, а синтез его белкового продукта – иммуноцитохимическим окрашиванием с использованием специфических антител. Показано достоверное торможение образования эмбрионидных тел ЭС клетками, трансфицированными геном *gdnf*. При этом не обнаружено заметного влияния экспрессии гена *gdnf* на морфологию и пролиферативную активность трансфицированных ЭС клеток по сравнению с контрольными.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, нейротрофический фактор глии, трансфекция, пролиферация, иммуноцитохимия, эмбрионидные тела.

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофический фактор глии (GDNF, glial derived neurotrophic factor) относится к семейству GDNF-подобных лигандов (GFL), которое также включает в себя ньюртулин (NRTN), персифин (PSPN) и артемин (ARTN). Все они необходимы для выживания дофаминергических нейронов среднего мозга, а также, за исключением PSPN, периферических сенсорных и симпатических нейронов [12, 14]. Кроме

того, GDNF выполняет ряд важных функций вне нервной системы: он регулирует дифференцировку сперматогониев и необходим для эмбрионального развития почек [14].

Все представители семейства GFL осуществляют свое действие на клетки путем связывания с гетерорецепторным комплексом, содержащим рецептор RET и корцептор GFR α [14]. Специфичность активации рецептора RET в отношении различных факторов семейства GFL зависит

от типа GFR α , имеющегося в клетках. GDNF, NRTN, ARTN и PSPN обладают высокой аффинностью к корцепторам GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 и GFR α 4 соответственно. Связывание GFL с «чужим» GFR α возможно, но с меньшей эффективностью. Было показано, что GDNF специфически повышает выживаемость дофаминергических нейронов эмбрионального среднего мозга крыс, усиливает метаболизм дофамина, а также повышает уровень дифференцировки тирозингидроксилаза-положительных клеток (TH $^+$), усиливая рост аксонов, увеличивая размеры тела клетки. Аналогичные эффекты наблюдались и в культуре дофаминергических нейронов среднего мозга крыс [12]. Сходные результаты были получены и на трансгенных линиях дрозофилы. Оказалось, что в линиях дрозофилы, несущих ген *gdnf*, в дифференцирующихся нервных клетках обнаружен выраженный синтез тирозингидроксилазы, а клетки дрозофилы, несущие ген *ngf*, активно продуцировали ацетилхолинэстеразу [2, 3].

Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в производные всех трех первичных зародышевых листков, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Важным является тот факт, что в ходе дифференцировки ЭС клеток последовательность экспрессии тканеспецифических генов соответствует последовательности этих процессов при развитии организма *in vivo* [7].

Способность ЭС клеток дифференцироваться в определенных направлениях в условиях *in vitro* дает возможность изучать на этой модели клеточные и молекулярные механизмы раннего развития, а также получать разные типы донорских клеток для трансплантации. Преимущественная дифференцировка ЭС клеток в определенном направлении достигается только в специфических условиях культивирования [9], после воздействия экзогенных факторов роста и дифференцировки [7], путем их генетических модификаций [1, 10, 11, 13]. Первые работы по исследованию направленной дифференцировки ЭС клеток были проведены в основном на ЭС клетках мыши, дифференцировку которых с помощью вышеуказанных подходов удалось направить в гемопоэтические клетки [16], кардиомиоциты [11], инсулин-секретирующие клетки [15], нейроны и клетки глии [4, 6]. Использование метода сочетания генетических манипуляций с культивированием ЭС клеток мыши на фидерном слое стромальных клеток показало значительное увеличение количества дофаминергических нейронов (примерно в 2 раза) в опытном варианте по сравнению с контролем. Результаты опытов по трансплантации таких клеток показали эффективную интеграцию TH $^+$ клеток в стриатум мыши [10]. Индукция дофаминергической дифференцировки была показана на ЭС клетках человека при условии их культивирования на стромальных клетках P06 [18]. Важным является вопрос сохранения жизнеспособности дофаминергических нейронов при их трансплантации. В работе Buytaert-Ноепен с соавторами [5] было продемонстрировано, что для повышения жизнеспособности дофаминергических нейронов необходимо присутствие такого фактора, как GDNF, или астроцитов из стриатума. Японские исследователи [17], используя методику кокультивирования ЭС клеток приматов на клетках Сертоли, которые секретируют GDNF,

не только обнаружили увеличение количества индуцированных дофаминергических нейронов по сравнению с контролем, но и успешно осуществили трансплантацию этих клеток в стриатум мышей с патологией, сходной с болезнью Паркинсона у человека. ЭС клетки, полученные в результате определенных экспериментальных манипуляций, включая генетические, обладающие определенным типом направленной дифференцировки, могут быть, в перспективе, использованы в клеточной терапии ряда тяжелых заболеваний человека.

В связи с этим представляет существенный интерес изучение ЭС клеток с повышенной экспрессией гена *gdnf*. Для этого в настоящей работе были получены поликлональные культуры ЭС клеток мыши, трансфицированных геном *gdnf* человека, слитым с геном, кодирующим «зеленый» флуоресцентный белок (GFP), и проведена их характеристика.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭС КЛЕТОК МЫШИ. Культивирование ЭС клеток проводили при 37 °C и 5 % CO $_2$ в среде альфа-МЕМ (Sigma, США), содержащей 15 % фетальной сыворотки коровы (ФСК) (Gibco, США), 0.1 mM 2-меркаптоэтанол, 2 mM L-глутамин, заменимые аминокислоты (Gibco, США), нуклеозиды, витамины и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). В качестве питающего (фидерного) слоя для ЭС клеток использовали первичные фибробласты, полученные от мышей 11-12 дней эмбрионального развития, пролиферация которых была блокирована митомицином С (3 мкг/мл). Ростовой средой для первичной культуры фибробластов служила среда ДМЕМ (Sigma, США), содержащая 10 % ФСК, 2 mM L-глутамин и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). При культивировании ЭС клеток без фидерного слоя в среду добавляли LIF (фактор, ингибирующий лейкемию) (Sigma, США) в конечной концентрации 10 нг/мл, который блокировал спонтанную дифференцировку этих клеток. Пересев клеток со сменой среды осуществляли каждые 3 дня.

Оценка уровня экспрессии генов рецепторов RET и GFR α 1 с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Тотальную РНК из недифференцированных ЭС клеток, которые культивировали без фидерного слоя в присутствии LIF, выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с использованием набора «YellowSolve» (Clonogen, США), следуя рекомендациям производителя. Процедуру обратной транскрипции проводили с использованием набора фирмы «Силекс» (Россия), согласно протоколу и рекомендациям производителя. Синтез кДНК проводили на 2 мкг тотальной РНК в течение 1 ч при 37 °C в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 0.05 мкг случайных гексапраймеров и 100 ед. обратной транскриптазы MMLV (moloney murine leukemia virus). После остановки реакции (инкубация 10 мин при 70 °C) образцы кДНК хранили при – 20 °C.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоящей из Taq-буфера, 1.5 mM смеси dNTP, 1.25 ед. «colored» Taq полимеразы («Синтол», Россия), 0.5 мкг образца кДНК и 10 пмоль каждого праймера.

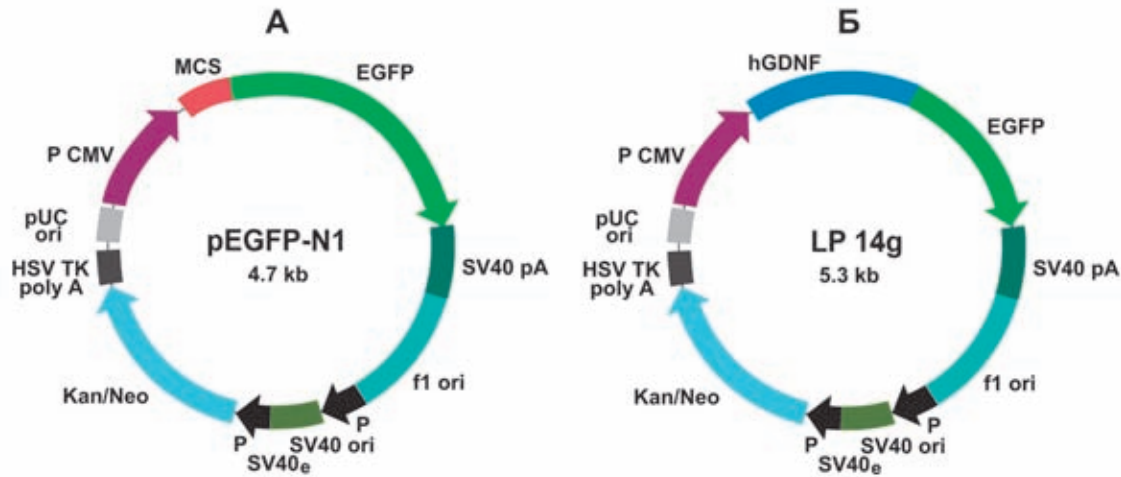


Рис. 1. Схемы строения плазмид *pEGFP-N1* и *LP14g* для трансфекции ЭС клеток. Kan/Neo – ген, обеспечивающий устойчивость к антибиотикам, EGFP – ген «зеленого белка», MCS – последовательность, содержащая сайты рестрикции, hGDNF – вставка гена *gdnf* человека

Ниже приведены последовательности праймеров, использованных в экспериментах [8].

Для гена RET: 5'-CCTCCGTGACAGCCGCAAGA-3' (прямой), 5'-GGGAATCCGGCCSTTGTCTTT-3' (обратный); размер продукта 297 п.н.

Для гена GFR α 1: 5'-TCATTGGCAGAAACATCGTAG-3' (прямой), 5'-GCTCAGCTTGCTTTACAGTCC-3' (обратный); размер продукта 285 п.н.

Условия ПЦР были одинаковы для обоих фрагментов: старт: при 52 °С – 5 мин, при 95 °С – 5 мин, далее 35 циклов, включающих при 95 °С 30 сек.; при 68 °С – 30 сек, при 72 °С – 30 сек, при 72 °С – 10 мин. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1.5 % агарозном геле с визуализацией с помощью бромистого этидия.

ГИБРИДИЗАЦИЯ ПО НОЗЕРНУ. мРНК выделяли из ЭС клеток, используя TRI REAGENT (Sigma, США) по протоколу фирмы-производителя, и разделяли электрофорезом в 1.5 % агарозном геле. Затем мРНК переносили на нейлоновую мембрану. Мечение зонда на ген *gdnf* осуществляли альфа-³²P АТФ с помощью набора «Random Prime Labelling» (Promega, США) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Предгибридизацию проводили в гибридизационном буфере (X5 SSPE, 0.1 % SDS, X5 р-р Денхардта) в течение 1 ч при 65 °С. Меченый зонд денатурировали 5 мин при 100 °С и добавляли к гибридизационному буферу.

Гибридизацию проводили 16-20 ч при 65 °С на водяной бане. Затем фильтр промывали 3 раза по 15 мин в растворе X0.1 SSC, 0.1 % SDS, заворачивали в водонепроницаемую пластиковую пленку и закладывали в кассету с фотопленкой. Экспонировали при -70 °С от 1 до 5 дней.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДЫ. Для трансфекции клеток использовались следующие генно-инженерные конструкции. Контрольная плазмида *pEGFP-N1* (рис. 1а) содержала ген *gfp* под промотором цитомегаловируса (CMV) и ген устойчивости к антибиотику неомцину *neo*. Размер плазмиды 4.7 т.п.н. Плазмида *LP14g* (рис. 1б), несущая ген *gdnf* человека, слитый с геном *gfp*, была сконструирована на основе *pEGFP-N1*. Размер плазмиды 5.3 т.п.н.

Структуры плазмид представлены на рис. 1.

Трансфекция ЭС клеток и селекция. Введение плазмидной ДНК в ЭС клетки осуществляли с помощью электропорации на приборе СУМ4 (производство Института молекулярной биологии РАН им. В. А. Энгельгардта) при следующих экспериментально подобранных параметрах: продолжительность импульса – 1.5 мс, напряжение 400 В. Для трансфекции 1 000 000 клеток использовали 6-8 мкг плазмидной ДНК. Трансфицированные клетки рассеивали по 300 000 на чашки Петри диаметром 35 мм, покрытые желатином (0.01 %), в 2 мл стандартной среды для ЭС клеток с добавлением LIF (10 нг/мл). Селекцию начинали на вторые сутки после посева добавлением в среду антибиотика G418 (200 мкг/мл). Смену селективной среды проводили каждые 3-4 сут. Поликлональные культуры каждого варианта трансфекции снимали с чашек на 10 день селекции в виде суммарного пула G418-резистентных клонов. Трансфицированные клетки анализировали визуализацию под микроскопом Аксиоскоп-2 (Carl Zeiss, Германия). Средняя эффективность трансфекции составила около 10⁻⁴.

Определение пролиферативной активности ЭС клеток. Оценку пролиферативной активности клеток контрольной и трансфицированной линий проводили на третьи сутки после посева прямым подсчетом клеток под микроскопом Olympus CKX41 (Olympus, Япония) в камере Горяева.

Получение эмбрионных тел. Для индукции дифференцировки с образованием эмбрионных тел (ЭТ) ЭС клетки изолировали от фибробластов фидерного слоя. Для этого клетки обрабатывали трипсином, центрифугировали, а затем полученную суспензию инкубировали в чашке Петри (d = 60 мм) (Nunc, Дания) в течение 15-30 мин. За это время основная масса фибробластов прикрепляется ко дну чашки, в то время как ЭС клетки остаются в суспензии. Для формирования ЭТ суспензию ЭС клеток переносили на чашку Петри (d = 35 мм) (Nunc, Дания) в количестве 500 000 или на 96-луночную иммунологическую плашку (по 1000 клеток на лунку) и затем помещали в CO₂-инкубатор (5 % CO₂). Подсчет количества образованных ЭТ проводили на 3-4 сут культивирования.

Для формирования единичных ЭТ был применен метод «висячей капли» [7]. Для этого использовали ЭС клетки,

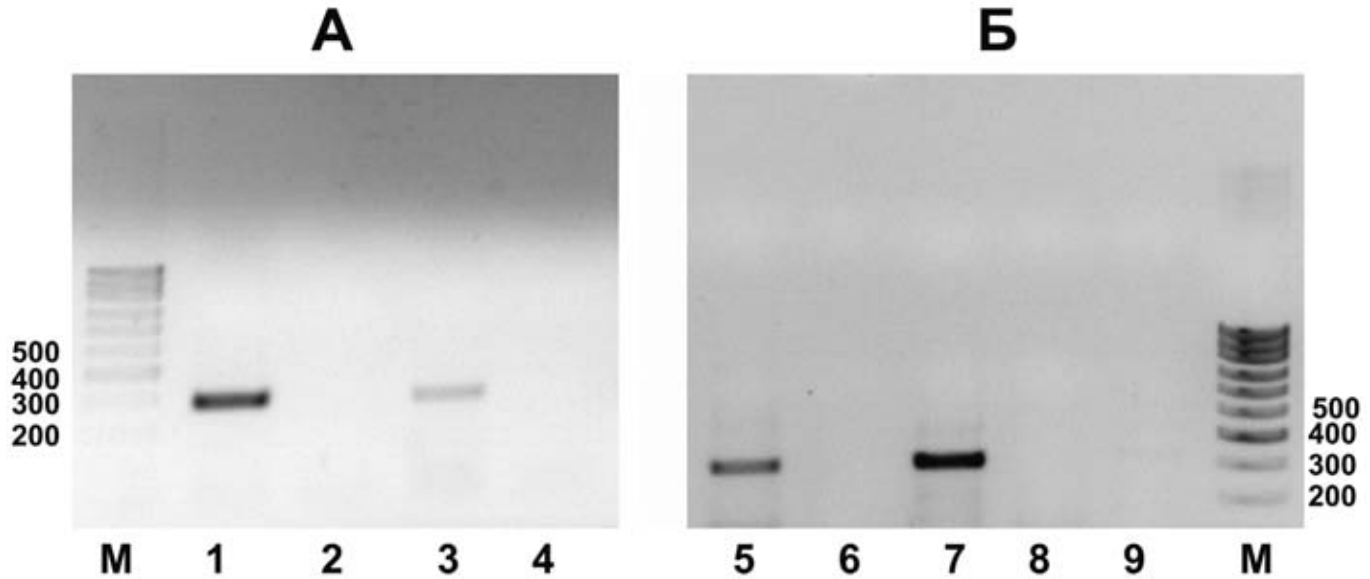


Рис. 2 Анализ экспрессии рецепторов GFR α 1 и RET в ЭС клетках мыши линии R1. А – экспрессия рецептора GFR α 1. М – маркер длин фрагментов, 1 – гиппокамп мыши (положительный контроль), 2 – гиппокамп мыши (контроль на загрязнение геномной ДНК), 3 – ЭС клетки линии R1, 4 – ЭС клетки линии R1 (контроль на загрязнение геномной ДНК). Длина продукта 285 п.н. Б – экспрессия рецептора RET. 5 – гиппокамп мыши (положительный контроль), 6 – гиппокамп мыши (контроль на загрязнение геномной ДНК), 7 – ЭС клетки линии R1, 8 – ЭС клетки линии R1 (контроль на загрязнение геномной ДНК), 9 – вода. Длина продукта 297 п.н.

культивируемые на желатиновой подложке в среде с добавлением LIF (Sigma, США). Клетки обрабатывали трипсином и готовили суспензию с концентрацией 25000 клеток/мл. На крышку чашки Петри диаметром 60 мм (Nunc, Дания) наносили по 50 капель объемом 20 мкл, содержащих по 500 клеток. Для создания влажной атмосферы в чашки наливали по 2 мл раствора Хенкса и затем помещали в CO₂-инкубатор (5 % CO₂). На третьи сутки культивирования образовавшиеся ЭТ переносили в четырехлуночные плашки (диаметр лунки 15 мм), предварительно покрытые желатином, для дальнейшей дифференцировки.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАЛИЧИЯ БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА ГЕНА *gdnf* ЧЕЛОВЕКА В ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ЛИНИЯХ ЭС КЛЕТОК. Трехдневные ЭТ культивировали в четырехлуночном план-

шете с диаметром лунки 15 мм (Nunc, Дания) (3-4 тела на лунку), обработанном 0.01 % желатином, в 700 мкл среды для культивирования ЭС клеток, не содержащей LIF. На 7 сут культивирования дифференцированные клетки фиксировали 4 % параформальдегидом в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. После трехкратной отмывки PBS клетки преинкубировали в растворе PBS, содержащем 0.1 % Тритон X-100 и 5 % FBS в течение 15 мин при комнатной температуре. В качестве первичных антител использовали поликлональные куриные антитела против GDNF человека (Promega, США) в разведении 1:30 в растворе PBS-0.1 % Тритон-5 % FBS. Инкубацию проводили в течение ночи при +4 °С. После трехкратной отмывки PBS наносили вторичные биотинилированные антитела кролика против иммуноглобулинов курицы («Имтек»,

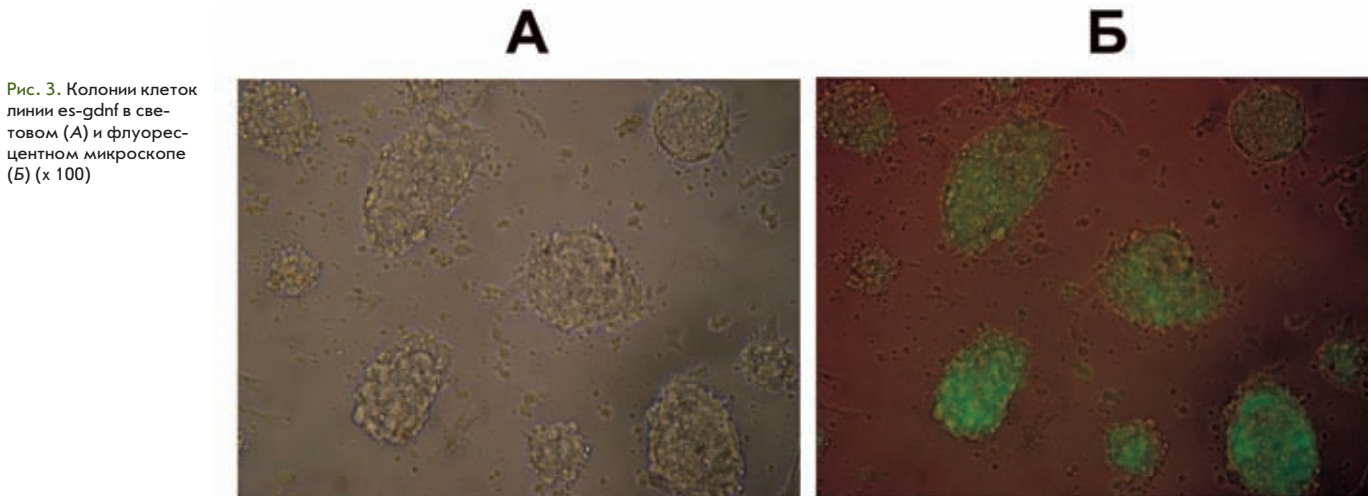


Рис. 3. Колонии клеток линии *es-gdnf* в световом (А) и флуоресцентном микроскопе (Б) (x 100)

Россия) в разведении 1:500 и инкубировали 2 ч при комнатной температуре, а затем обрабатывали конъюгатом пероксидазы со стрептавидином («Имтек», Россия) в разведении 1:400 в течение 1 ч при комнатной температуре. Проявляли реакцию с использованием 0.015 % раствора 3-амино-9-этилкарбазола (Sigma, США) в 50 мМ Трис-цитратном буфере, pH 7.0, содержащем 0.06 % H₂O₂. Визуальный контроль за развитием окраски осуществляли под микроскопом Olympus СКХ41 (Olympus, Япония). Реакцию останавливали трехкратным промыванием клеток дистиллированной водой.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ. Результаты обрабатывались с помощью программы «Sigma Plot» (Jandel Scientific, США). Достоверности различий групповых средних значений оценивались с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Результаты представлялись в виде стандартной ошибки среднего (mean ± SEM). Достоверными считались значимости различий при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальных этапах работы в ЭС клетках мыши исходной линии R1 с помощью ОТ-ПЦР определяли наличие экспрессии рецепторов для GDNF – RET и GFRα1 на уровне мРНК. Полученные результаты представлены на (рис. 2А, Б). Из этих данных видно, что ЭС клетки экспрессируют как GFRα1, так и RET, хотя и с разной эффективностью.

В результате трансфекции соответствующими рекомбинантными плазмидами и последующей селекции ЭС клеток были получены две линии: es-gdnf (линия, несущая ген *gdnf*, слитый с геном «зеленого белка») и es-gfp (контрольная линия только с геном «зеленого белка»). Наличие вставки гена *gfp* облегчает выявление колоний клеток после проведения трансфекции, а также исследование путей и закономерностей дифференцировки ЭС клеток, особенно в опытах *in vivo*. В полученных клеточных линиях зеленое свечение наблюдалось более чем у 80 % трансфицированных клеток (рис. 3Б). С помощью Нозерн-гибридизации с использованием меченого фрагмента гена *gdnf* была показана его экспрессия в клетках линии es-gdnf (рис. 4). Кроме того, как видно из этого рисунка, в ЭС клетках происходит экспрессия и эндогенного гена *gdnf*. Для выявления син-

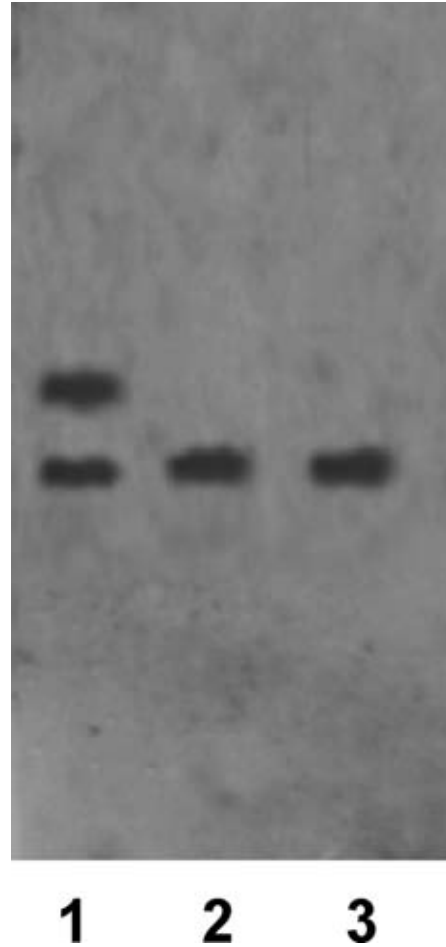


Рис. 4. Анализ экспрессии гена *gdnf* в ЭС клетках с помощью Нозерн-гибридизации. 1. РНК из ЭС клеток, трансфицированных плазмидой LP14g, несущей ген *gdnf* человека, слитый с геном *gfp*. 2. РНК из ЭС клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1, несущей ген *gfp*. 3. РНК из нетрансфицированных ЭС клеток

теза белкового продукта этого гена дифференцированные клетки линий es-gdnf и es-gfp были окрашены с помощью поликлональных антител к GDNF человека. Результаты проведенных экспериментов представлены на (рис. 5А, Б). Слабая розовая окраска (рис. 5А) обусловлена тем, что ЭС клетки, по-видимому, в небольшом количестве синтезируют собственный GDNF. Косвенное подтверждение этому,

А Б

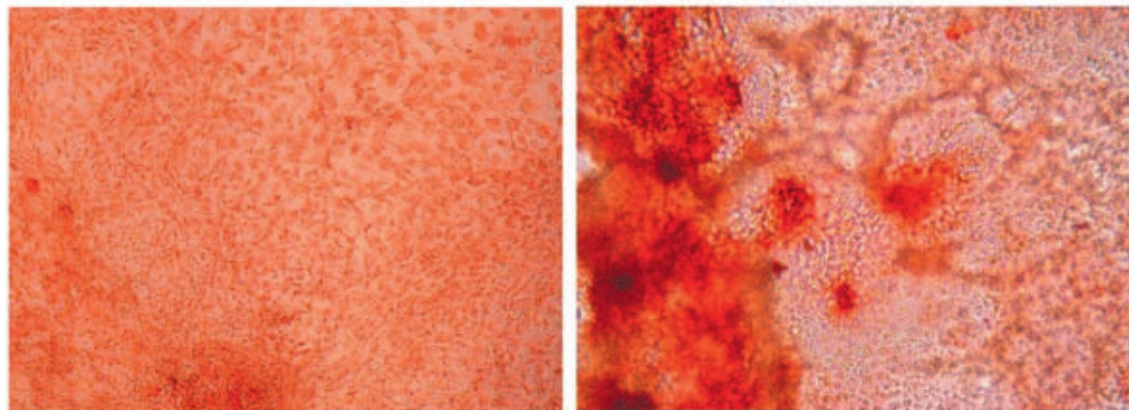


Рис. 5. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток линии es-gfp (А) и es-gdnf (Б) антителами к GDNF человека (x 100)

как уже упоминалось, было получено с помощью Нозерн-гибридизации (рис. 4-2, 4-3). Ярко окрашенные кластеры клеток свидетельствуют о синтезе GDNF человека в клетках линии *es-gdnf* (рис. 5Б).

На следующем этапе было изучено влияние экспрессии гена *gdnf* человека на пролиферативную активность ЭС клеток. Сравнение пролиферативной активности опытных и контрольных клеток не выявило достоверных различий между ними (данные не приведены). Эти результаты позволяют предположить, что продукт гена *gdnf* человека не играет существенной роли в регуляции клеточного цикла этих клеток.

Был проведен анализ влияния экспрессии этого гена на начальную стадию дифференцировки трансфицированных ЭС клеток – образование ЭТ. В ходе исследования определяли время образования ЭТ и их количество. Результаты этих экспериментов (подсчет ЭТ тел проводили на 3 и 4 день после посева клеток) показали, что клетки линии *es-gdnf* образуют ЭТ практически одновременно с контрольными, однако количество ЭТ в клетках линии *es-gdnf* было на 40–45% меньше, чем в линии *es-gfp* (рис. 6). Полученные данные указывают на то, что в клетках линии *es-gdnf* происходит достоверное снижение количества ЭТ по сравнению с контролем, что свидетельствует об ингибирующем влиянии GDNF на ранние стадии дифференцировки ЭС клеток.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов была получена и частично охарактеризована линия ЭС клеток мыши, экспрессирующая ген *gdnf* человека, слитый с геном *gfp*. Повышенная экспрессия данного гена приводит к замедлению формирования ЭТ, не оказывая влияния на морфологию и пролиферативную активность трансфицированных ЭС клеток. В дальнейшем данная линия клеток может быть использована как для исследования влияния гена *gdnf* человека на последующие стадии дифференцировки ЭС клеток *in vitro*, особенно в нейро-

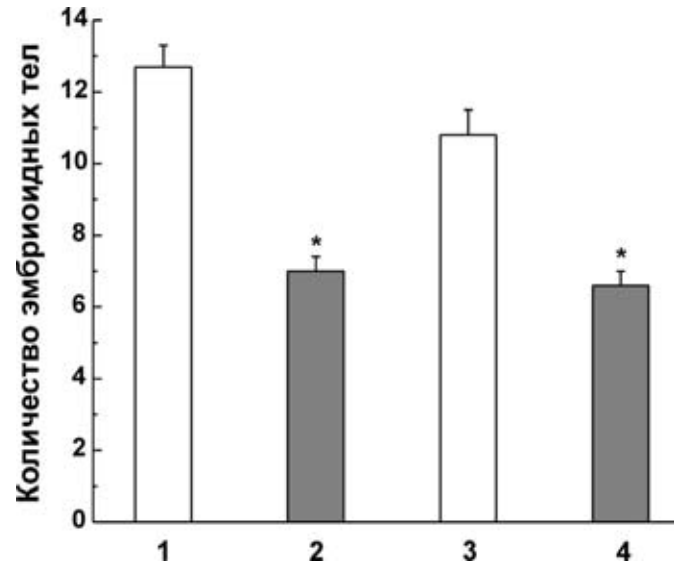


Рис. 6. Влияние экспрессии гена *hgdnf* на образование эмбрионидных тел, трансфицированными ЭС клетками *in vitro*. 1, 2 – количество образованных ЭТ на 3 день после посева клеток. 3, 4 – количество образованных ЭТ на 4 день после посева клеток. Белые столбики – контроль (*es-gfp*). Серые столбики – опыт (*es-gdnf*) * $p < 0.05$, $n = 30$

нальном направлении, так и для экспериментов *in vivo* с целью осуществления коррекции ряда патологий мозга, связанных с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона. ●

Настоящая работа была выполнена при частичной поддержке гранта Министерства образования и науки РФ (ГК № 02.512.12.2013) и гранта РФФИ (09-04-01464-а).

Список литературы

1. Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В. и др. // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 3. С. 204-210.
2. Павлова Г.В., Модестова Е.А., Венгрова С.П. и др. // ДАН. 2001. Т. 376. № 5. С. 694-696.
3. Павлова Г.В., Ефанов А.А., Башкиров В.Н. и др. // Цитология. 2002. Т. 44. № 11. С. 1104-1108.
4. Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J.E., Gottlieb D.I. // Dev Biol. 1995. V. 168. № 2. P. 342-357.
5. Buytaert-Hoefen K.A., Alvarez E., Freed C.R. // Stem cells. 2004. V. 22. № 5. P. 669-674.
6. Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G. et al. // J. Cell Sci. 1995. V. 108. № 10. P. 3181-3186.
7. Guan K., Rohwedel J., Wobus A.M. // Cytotechnology. 1999. V. 30. № 4. P. 211-226.
8. Kawai K., Iwashita T., Murakami H. et al. // Cancer Res. 2000. 15. V. 60. № 18. P. 5254-5260.

9. Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S. et al. // Neuron. 2000. V. 28. № 1. P. 31-40.
10. Kim J.H., Auerbach J.M., Rodrigues-Gomez J.A. et al. // Nature. 2002. V. 418. № 6893. P. 50-56.
11. Klug M.G., Soonpaa M.H., Koh G.Y., Field L.J. // J. Clin. Invest. 1996. V. 98. № 1. P. 216-224.
12. Lin L.F., Doherty D.H., Lile J.D. et al. // Science. 1993. V. 260. № 5111. P. 1130-1132.
13. Manuilova E.S., Arsenyeva E.L., Khaidarova N.V. et al. // IJBS. 2008. V. 4. № 1. P. 29-37.
14. Sariola H., Saarma M. // J. Cell Sci. 2003. V. 116. № 19. P. 3855-3862.
15. Soria B., Roche E., Berná G. et al. // Diabetes. 2000. V. 49. № 2. P. 157-162.
16. Wiles M.V., Keller G. // Development. 1991. V. 111. № 2. P. 259-267.
17. Yue F., Cui L., Johkura K. // Stem cells. 2006. V. 24. № 7. P. 1625-1706.
18. Zeng X., Cai J., Chen J. et al. // Stem cells. 2004. V. 22. № 6. P. 925-940.