

УДК 577.29

ЭКСПРЕССИЯ ПРОТЕИНКИНАЗ RIPK-1 И RIPK-3 В КЛЕТКАХ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Е. И. Моргун^{1,2,*}, Е. Д. Позднякова³, член-корреспондент РАН Е. А. Воротеляк²

Поступило 19.05.2020 г.
После доработки 22.05.2020 г.
Принято к публикации 25.05.2020 г.

Исследована экспрессия регуляторов клеточной гибели протеинкиназ RIPK-1 и RIPK-3 в структурах волосяного фолликула мыши и человека. Обнаружены RIPK-1+ клетки во внутреннем корневом влагалище и RIPK-3+ клетки в наружном и внутреннем корневом влагалище, дермальной папилле и интерфолликулярном эпидермисе на стадии анагена и катагена волосяного фолликула мыши. Интенсивность экспрессии RIPK-1 в раннем анагене была слабой и значительно увеличивалась по мере приближения зрелого анагена и катагена. Также RIPK-1+ и RIPK-3+ клетки обнаружены в волосяном фолликуле человека. Предполагается, что маркеры некроптоза играют в жизнедеятельности волосяного фолликула роль, не связанную с запрограммированной клеточной гибелью, и могут иметь неизученные на данный момент функции и принимать участие в неканонических сигнальных каскадах.

Ключевые слова: волосяной фолликул, некроптоз, RIPK-1, RIPK-3, запрограммированная клеточная гибель, анаген, катаген

DOI: 10.31857/S2686738920050170

Волосяной фолликул (ВФ) — мини-орган млекопитающих, структура которого подвержена на протяжении жизни циклическим изменениям. Во время фазы телогена ВФ пребывает в состоянии метаболического покоя в виде небольшой группы клеток, в период фазы роста — анаген — его кератиноциты пролиферируют и дифференцируются, формируя полноценный ВФ, а в катагене происходит частичная регрессия структуры ВФ. Запрограммированная клеточная гибель является неотъемлемой частью нормальной жизнедеятельности ВФ. Так, инволюция волосяной луковицы в катагене происходит путем апоптоза кератиноцитов [1], а волосяной стержень формируется благодаря особому типу клеточной гибели — ороговению, которому подвергаются клетки внутреннего корневого влагалища [2]. Однако, механиз-

мы этих процессов до сих пор до конца неизвестны: изучены далеко не все компоненты сигнальных путей апоптоза [3] и ороговения [2], а также их точки пересечения. В связи с этим, мы исследовали ВФ на предмет экспрессии маркеров еще одного типа программируемой клеточной гибели — некроптоза, участниками которого являются RIPK-1 (Receptor interacting protein kinase-1) и RIPK-3 (Receptor interacting protein kinase-3) [4]. В неактивном состоянии RIPK-1 в составе многокомпонентных белковых комплексов может способствовать выживанию клетки. В результате, например, ингибирования ИКК α/β - и ТВК1/ИКК ϵ -зависимого фосфорилирования, становится возможной реализация киназной активности RIPK-1, что приводит к клеточной гибели [5]. Активность RIPK-3 зависит от RIPK-1, но данных в пользу того, что RIPK-1 фосфорилирует RIPK-3, нет. Вероятно, RIPK-1 и RIPK-3 активируются путем аутофосфорилирования, однако детали данного процесса не изучены [4, 6]. Целью работы была детекция паттерна экспрессии RIPK-1 и RIPK-3 в клетках ВФ мыши и человека. В эксперименте были использованы 18 самцов мышей линии C57b/6 в возрасте 6–8 недель. Синхронизацию цикла ВФ проводили путем депиляции воском стандартного участка кожи спины животного на стадии телогена [7]. Все манипуляции с мышами осуществляли под общим наркозом и с одобрения Комиссии по биоэтике ИБР РАН. Мышей выводили из экспе-

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (государственный университет)”, г. Долгопрудный, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: lady.morgun2016@yandex.ru

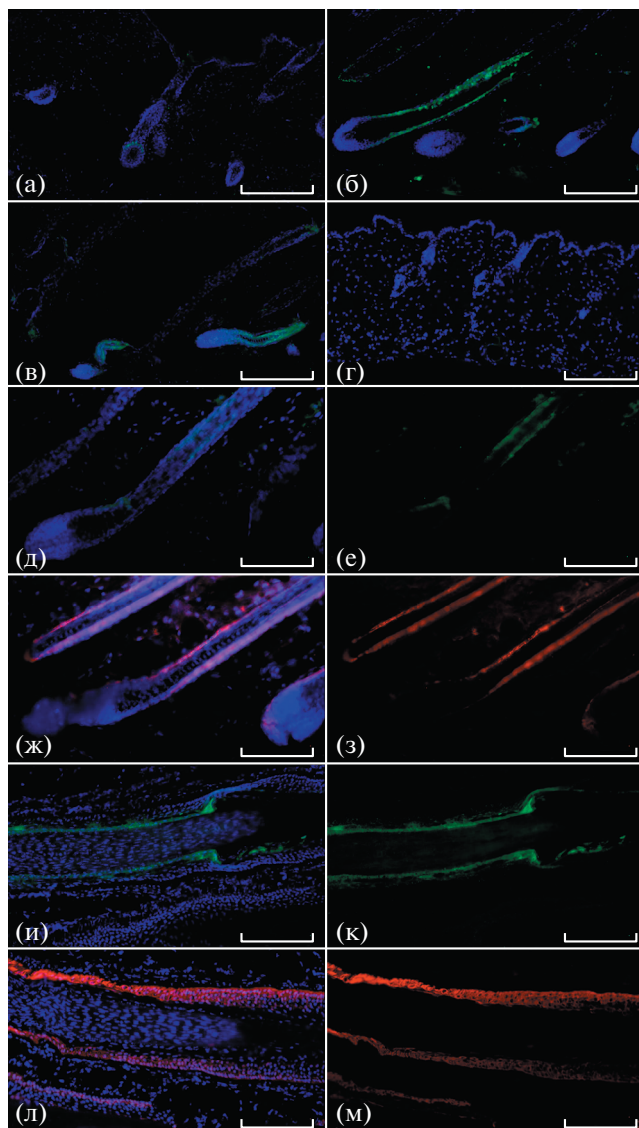


Рис. 1. ВФ мыши, окрашивание антителами против RIPK-1, (а – ранний анаген, б – зрелый анаген, в – катаген, г – телоген); ВФ мыши на стадии среднего анагена, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-1 (д – с DAPI, е – без DAPI) и против Krt15 (ж – с DAPI, з – без DAPI); ВФ человека, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-1 (и – с DAPI, к – без DAPI) и против Krt15 (л – с DAPI, м – без DAPI). Масштабные отрезки: а, б, в, г, и, к, л, м – 200 мкм; д, е, ж, з – 100 мкм.

римента на 0, 5, 7, 10, 18, 25 сутки после депиляции. Кожа человека была получена после операции по круговой подтяжке лица из МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов. Все образцы кожи заливали в ОСТ, затем замораживали. Криосрезы получали на криостате модели SM1900 (Leica Microsystems), затем их окрашивали гематоксилин-эозином. Иммуногистохимическое исследование проводи-

ли с помощью антител против RIPK-1 (ABIN 127073, Antibodies-online), RIPK-3 (AV31513, Sigma), Keratin 15 (Krt15) (ab52816, Abcam) и Versican (ab19345, Abcam) на серийных срезах. Специфичность антител подтверждали окрашиванием контрольных тканей по рекомендации производителя или данным литературы (положительный контроль) и препаратов без первых антител (отрицательный контроль). Препараты анализировали на микроскопах моделей BZ-9000E (Keyence) и IX73 (Olympus). Стадию цикла ВФ определяли согласно методике Muller-Rover [1].

Гистологический анализ показал, что ВФ находились в телогене на 0 и 25 сутки, в раннем анагене на 5 сутки, в зрелом анагене на 7 и 10 сутки, а в катагене на 18 сутки.

Было обнаружено, что в клетках ВФ мыши экспрессия RIPK-1 в раннем анагене была выражена слабо (рис. 1а); значительно усиливаясь по мере наступления зрелого анагена (рис. 1б) и последующего перехода ВФ в катаген (рис. 1в). В телогене экспрессии RIPK-1+ в кератиноцитах не выявлено (рис. 1г). Анализ серийных срезов, окрашенных антителами против RIPK-1 и против маркера наружного корневого влагалища Krt15 показал, что RIPK-1+ клетки находились во внутреннем корневом влагалище ВФ (рис. 1д–1з). Также при анализе серийных срезов была обнаружена экспрессия RIPK-1 в кератиноцитах внутреннего корневого влагалища ВФ человека (рис. 1ж–1м).

Экспрессию RIPK-3 в ВФ мыши также наблюдали на стадиях анагена (рис. 2а и 2б) и катагена (рис. 2в). В телогене RIPK-3+ кератиноцитов обнаружено не было (рис. 2г). Анализ серийных срезов, окрашенных антителами против RIPK-3, Krt15 и против маркера дермальной папиллы (мезенхимный регулятор цикла ВФ) – Versican [8], подтвердил наличие RIPK-3+ клеток в наружном и внутреннем корневых влагалищах (рис. 2д–2з), а также в дермальной папилле (рис. 3а, 3б, 3д, 3е). Кроме того, экспрессия RIPK-3 присутствовала в интерфолликулярном эпидермисе (ИФЭ) (рис. 2а и 2в). Экспрессия RIPK-3 была обнаружена в клетках ВФ не только мыши, но и человека в том числе в дермальной папилле (рис. 3в, 3г, 3ж, 3з).

Таким образом, экспрессия RIPK-1 и RIPK-3 была выражена не только в катагене, характеризующемся массовой гибелью кератиноцитов, но и на протяжении всей фазы роста – анагена. Кроме того, экспрессия RIPK-3 была обнаружена в кератиноцитах наружного корневого влагалища, которым не свойственно ороговение, а также в фибробластах дермальной папиллы – мезенхимальной структуры, которая не подвергается какому-либо типу клеточной гибели на протяжении всего цикла ВФ в норме [9]. Мы предполагаем, что RIPK-1 и RIPK-3 могут играть роли, не связанные напрямую ни с процессом ороговения

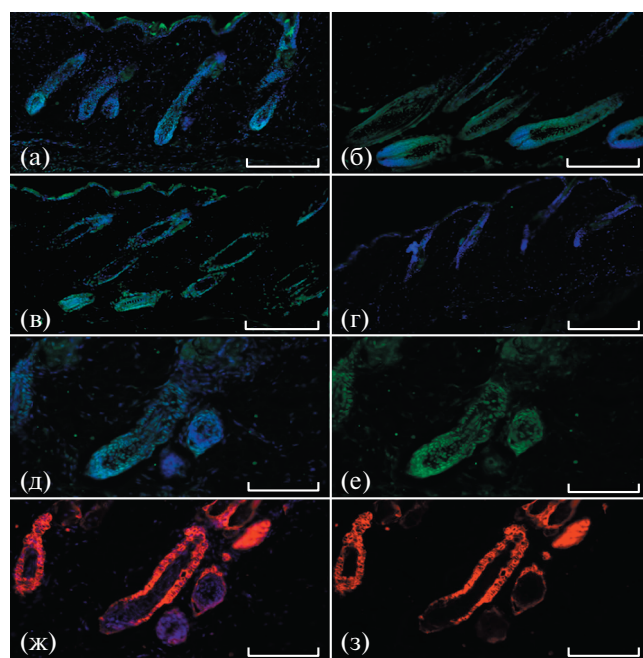


Рис. 2. ВФ мыши, окрашивание антителами к RIPK-3, (а – ранний анаген, б – зрелый анаген, в – катаген, г – телоген); ВФ мыши на стадии раннего анагена, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-3 (д – с DAPI, е – без DAPI) и антителами против Krt15 (ж – с DAPI, з – без DAPI). Масштабные отрезки: а, б, в, г – 200 мкм; д, е, ж, з – 100 мкм.

при формировании стержня волоса, ни с циклическим апоптозом кератиноцитов.

Известно, что, помимо активации некроптоза, RIPK-1 и RIPK-3 имеют и другие функции [10, 11].

Исходя из данных литературы, мы допускаем, что RIPK-1 и RIPK-3 в клетках ВФ мыши могут юбыть компонентами сигнальных каскадов Wnt или BMP. Известно, что путь Wnt/ β -катенин играет ключевую роль в развитии и обеспечении циклических изменений ВФ: лиганд Wnt10b, секретлируемый клетками дермальной папиллы, приводит к телоген-анагеновому переходу [12]. В то же время есть данные, что другой лиганд семейства Wnt – Wnt3a ингибирует экспрессию генов *ripk1* и *ripk3* в культуре мышечных ретинальных ганглионарных клетках [13]. Возможно, экспрессия RIPK-1 и RIPK-3 в клетках ВФ имеет сходный механизм регуляции. В то же время, мы обнаружили экспрессию RIPK-3 не только в ВФ, но и в кератиноцитах ИФЭ, которые, наряду с клетками ВФ, являются мишенями для BMP-лигандов, способствующих пребыванию ВФ в телогене, а также переходу из анагена в катаген [14], поэтому мы предполагаем, что белки семейства BMP могут участвовать в регуляции RIPK-3.

Таким образом, в коже мыши и человека впервые обнаружена экспрессия протеинкиназ RIPK-1

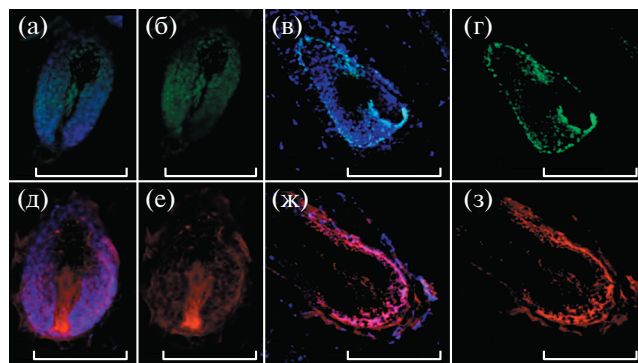


Рис. 3. ВФ мыши на стадии среднего анагена, серийные срезы, окрашивание антителами против RIPK-3 (а – с DAPI, б – без DAPI) и антителами против Versican (д – с DAPI, е – без DAPI); ВФ человека, серийные срезы, окрашивание антителами RIPK-3 (в – с DAPI, г – без DAPI) и антителами против Versican (ж – с DAPI, з – без DAPI). Масштабные отрезки: а, б, д, е – 100 мкм; в, г, ж, з – 200 мкм.

и RIPK-3, которые могут играть не изученные роли в жизнедеятельности ВФ. Предполагается проведение исследований RIPK-1 и RIPK-3 с точки зрения их участия в различных сигнальных каскадах, обеспечивающих циклические изменения ВФ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН, тема № 0108-2019-0004.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Müller-Röver S., Foitzik K., Paus R. et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages // *Journal of Investigative Dermatology*. 2001. V. 117 (1). P. 3–15. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01377.x>
2. Eckhart L., Lippens S., Tschachler E., et al. Cell death by cornification // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2013. V. 1833 (12). P. 3471–3480. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2013.06.010>
3. Tong X. Keratin 17 modulates hair follicle cycling in a TNF-dependent fashion // *Genes Dev*. 2006. V. 20 (10). P. 1353–1364. <https://doi.org/10.1101/gad.1387406>
4. Raju S., Whalen D., Mengistu M. et al. Kinase domain dimerization drives RIPK3-dependent necroptosis // *Sci. Signal*. 2018. V. 11 (544). P. eaar2188. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar2188>
5. Delanghe T., Dondelinger Y., Bertrand M. RIPK1 Kinase-Dependent Death: A Symphony of Phosphoryla-

- tion Events // *Trends Cell Biol.* 2020; V. 30. № 3. P. 189–200.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.12.009>
6. *Cho Y., Challa S., Moquin D. et al.* Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation // *Cell.* 2009. V. 137. № 6. P. 1112–1123.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037>
 7. *Paus R., Stenn K., Link R.* Telogen skin contains an inhibitor of hair growth // *British Journal of Dermatology.* 1990. V. 122. № 6. P. 777–784.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1990.tb06266.x>
 8. *Yang C., Cotsarelis G.* Review of hair follicle dermal cells // *J Dermatol Sci.* 2010. V. 57. № 1. P. 2–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.11.005>
 9. *Krause K., Foitzik K.* Biology of the hair follicle: the basics // *Semin Cutan Med Surg.* 2006. V. 25. № 1. P. 2–10.
<https://doi.org/10.1016/j.sder.2006.01.002>
 10. *Lin Y.* RIP1-Mediated Signaling Pathways in Cell Survival and Death Control // *Necrotic Cell Death.* 2014. P. 23–43.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8220-8_2
 11. *Orozco S., Oberst A.* RIP3 in cell death and inflammation: the good, the bad, and the ugly // *Immunol Rev.* 2017. V. 277. № 1. P. 102–112.
 12. *Wu P., Zhang Y., Xing Y. et al.* Correction to: The balance of Bmp6 and Wnt10b regulates the telogen-anagen transition of hair follicles // *Cell Communication and Signaling.* 2020. V. 18. № 1.
<https://doi.org/10.1186/s12964-020-0508-2>
 13. *Udeh A., Dvorianchikova G., Carmy T., et al.* Wnt signaling induces neurite outgrowth in mouse retinal ganglion cells // *Exp Eye Res.* 2019. V. 182. P. 39–43.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.03.004>
 14. *Botchkarev V., Sharov A.* BMP signaling in the control of skin development and hair follicle growth // *Differentiation.* 2004. V. 72. № 9-10. P. 512–526.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2004.07209005.x>

EXPRESSION OF PROTEIN KINASES RIPK-1 AND RIPK-3 IN MOUSE AND HUMAN HAIR FOLLICLE

E. I. Morgun^{a,b,#}, E. D. Pozdniakova^c, and Corresponding Member of the RAS E. A. Vorotelyak^b

^a *Moscow Institute of Physics and Technology (State University) Dolgoprudny, Moscow, Russian Federation*

^b *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences Moscow, Russian Federation*

^c *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: lady.morgun2016@yandex.ru*

Expression of cell death regulators RIPK-1 and RIPK-3 in the mouse and human hair follicle subunits was studied by immunohistochemistry. In anagen and catagen stages of mouse hair follicle, RIPK-1+ cells were located in the inner root sheath while RIPK-3+ were found in the inner and the outer root sheath, dermal papilla and interfollicular epidermis. RIPK-1 expression intensity was low in early anagen and increased as mature anagen and catagen approached. RIPK-1+ and RIPK-3+ cells were also found in human hair follicle. It is supposed, that necroptosis markers play independent of programmed cell death role in hair follicle vital activity; they may have unknown functions and take part in non-canonical signal cascades.

Keywords: hair follicle, necroptosis, RIPK-1, RIPK-3, programmed cell death, anagen, catagen