

	Название статьи	Страницы	Цит.
<b>ОБЗОР</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ГЕНЫ СЕМЕЙСТВА D4 ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ: СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ</b> Куликова Д.А., Мерцалов И.Б., Симонова О.Б.	3	0
<b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА TGF<math>\beta</math> И ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ FGF2 В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА, ПОДДЕРЖИВАЕМЫХ В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ</b> Лифанцева Н.В., Кольцова А.М., Полянская Г.Г., Гордеева О.Ф.	10	0
<b>БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>ЦИКЛИЧЕСКОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ В РАЗВИТИИ ПОБЕГОВ КАНАРСКОЙ СОСНЫ (PINUS CANARIENSIS C. SM.)</b> Михалевская О.Б., Шабашева А.А.	24	0
<input type="checkbox"/>	<b>ВЛИЯНИЕ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА NTEXRA5 НА РАЗМЕРЫ КЛЕТОК И РОСТ ОРГАНОВ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА</b> Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В.	34	3
<b>КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>УЧАСТИЕ MAP-КИНАЗНОГО СИГНАЛИНГА В СПЕЦИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ДОРСОВЕНТРАЛЬНОЙ ОСИ У ПРИМИТИВНОЙ ГАСТРОПОДЫ TESTUDINALIA TESTUDINALIS (PATELLOGASTROPODA, MOLLUSCA)</b> Козин В.В., Бабаханова Р.А., Костюченко Р.П.	42	0
<b>НОВЫЕ МЕТОДЫ И МОДЕЛИ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>СТУПЕНЧАТОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ МЫШЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ</b> Мальгин А.Г.	57	3
<b>РЕЦЕНЗИЯ</b>			
<input type="checkbox"/>	<b>РЕЦЕНЗИЯ НА КНИГУ А.Н. ОСТРОВСКОГО "ЭВОЛЮЦИЯ ПОЛОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ МШАНОК ОТРЯДА CHEILOSTOMATA (BRYOZOA: GYMNOLEAMATA)" (САНКТ-ПЕТЕРБУРГ: ИЗДАТЕЛЬСТВО С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА, 2009. 404 С.)</b> Исаева В.В.	66	0

УДК 575.24:595.773.4

## ГЕНЫ СЕМЕЙСТВА *d4* ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ: СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ

© 2013 г. Д. А. Куликова\*, \*\*, И. Б. Мерцалов\*, \*\*, О. Б. Симонова\*

\* Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

\*\* Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

E-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 17.09.10 г.

Окончательный вариант получен 28.11.10 г.

Ранее было обнаружено новое эволюционно консервативное семейство генов *d4*. Было показано, что белки этого семейства обладают общим планом строения, включающим набор уникальных доменов. Название семейства определяется доменом D4, который входит в состав белков, кодируемых генами-ортологами. Белки этого семейства могут входить в состав SWI/SNF хроматин-ремоделирующих комплексов позвоночных животных (BAF-комплексов) и выступать в качестве регуляторов транскрипции. В геноме позвоночных животных есть три гена *d4*: *neuro-d4* (*Dpf1*), *ubi-d4/Requiem* (*Dpf2*) и *Cer-d4* (*Dpf3*). Анализ компьютерных баз данных геномов других организмов обнаружил единственного гомолога семейства *d4* у дрозофилы, у нематоды и у гидры, и только геном прокариот и низших эукариот (дрожжи) лишен этих генов. Данный обзор посвящен истории исследования и сравнительному описанию структурной организации и экспрессии этих генов у позвоночных животных.

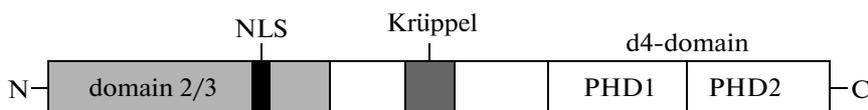
**Ключевые слова:** семейство генов *d4*, нейрогены, альтернативный сплайсинг, транскрипция, специфическая экспрессия генов, убиквитинная экспрессия генов.

DOI: 10.7868/S0475145013010047

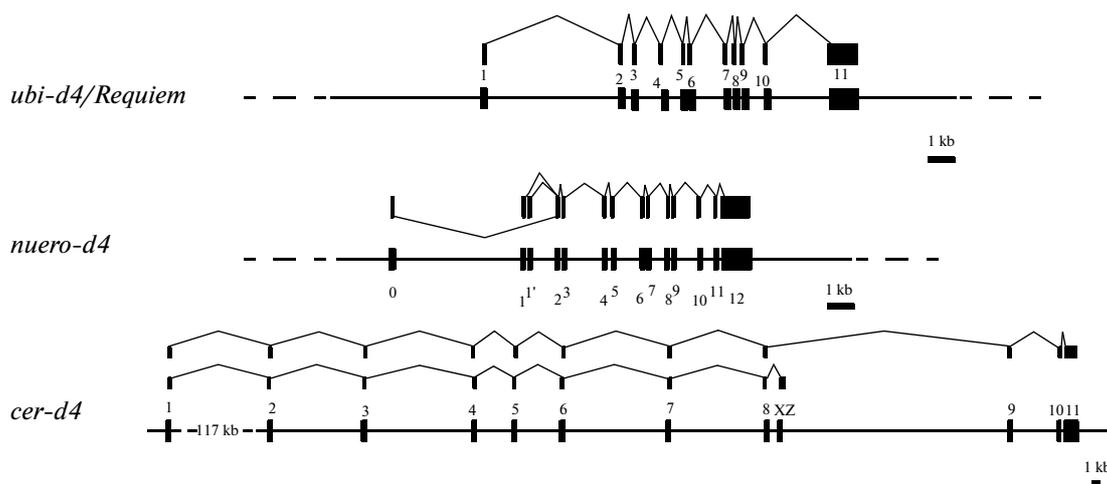
### ВВЕДЕНИЕ

В начале 90-х годов группой В.Л. Бухмана был идентифицирован ранее неизвестный нейроспецифический ген, *neuro-d4*. Этот ген был клонирован при дифференциальном скрининге библиотеки кДНК, выделенной из коры головного мозга 7–9-дневных крыс (Buchman et al., 1992). Этот ген стал родоначальником семейства генов *d4*. В это семейство входят три гена: *neuro-d4*, *ubi-d4/Requiem* и *Cer-d4* (или *Dpf1*, *Dpf2* и *Dpf3* согласно нуклеотидной базе данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Белки, кодируемые генами этого семейства, обладают общим планом строения и высокой гомологией аминокислотных последовательностей структурных доменов (рис. 1).

В их N-концевой области находится уникальный домен 2/3, который содержит сигнал ядерной локализации, вероятно, необходимый для проникновения белков в ядро клетки. В центральной части белковой молекулы расположен домен, гомологичный известным ДНК-связывающим последовательностям цинковых пальцев *Krüppel*-типа и последовательность отрицательно заряженных аминокислот (предполагаемый активатор транскрипции) (Buchman et al., 1992). В C-концевой области находится домен D4, структура которого представляет собой расположенные друг за другом два “цинковые пальца” PHD-типа (Aasland et al., 1995), которые участвуют во взаимодействии с модифицированными гистоновыми белками H3 и H4 (Lange et al., 2008).



**Рис. 1.** Общий план строения белков D4. Domain 2/3 – домен 2/3, специфичный для белков семейства *d4*, NLS – сигнал ядерной локализации, Krüppel – последовательность, гомологичная “цинковому пальцу” Крюппель-типа, acidic – последовательность отрицательно заряженных аминокислот, d4-domain – домен, специфичный для генов семейства *d4* и содержащий два последовательно расположенных парных “цинковых пальца” PHD-типа.



**Рис. 2.** Структурная организация и схема сплайсинга экзонов генов семейства *d4* эукариот. Тонкие линии — геномная ДНК; закрашенные прямоугольники — экзоны, им также соответствуют обозначения цифрами; соединяющие экзоны линии показывают различные варианты сплайсинга.

Несмотря на то, что общая структура белков этого семейства сходна, гены, их кодирующие, различаются как по своей организации, так и по времени и паттерну экспрессии. Ниже каждый из этих генов будет описан отдельно.

#### *ubi-d4/Requiem*

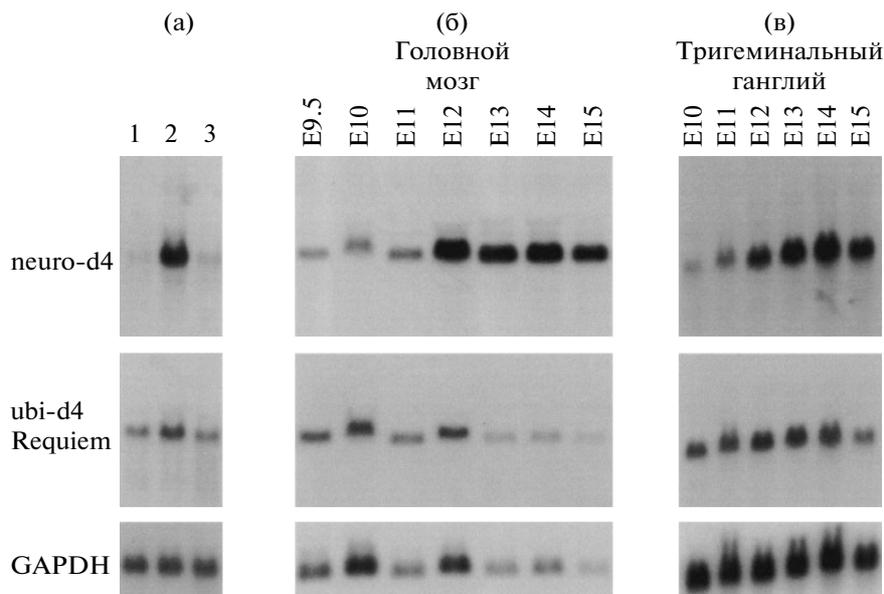
Этот ген был описан группой В.Л. Бухмана и группой Габига. Первые клонировали его в результате скрининга библиотек мыши, цыпленка и человека после их гибридизации с зондом гена *neuro-d4* (Chestkov et al., 1996). Группа Габига обнаружила его при попытке изолировать гены, связанные с программированной гибелью клеток. Они использовали интерлейкин-зависимую линию миелоидных клеток млекопитающих (FDCP-1T) для трансформации их к-ДНК-ой библиотекой, выделенной из селезенки мыши, и созданной на основе экспрессионного вектора рсDNAI. Далее трансформированные клетки культивировались в среде с дефицитом интерлейкина-3 в течение десяти дней. В результате был обнаружен единственный клон, несущий последовательность неизвестного гена, экспрессия которого способствовала выживанию клеток в среде, лишенной интерлейкина-3. Соответствующий ген был клонирован и секвенирован. Габиг предположил, что он необходим для исполнения программы апоптотической гибели клеток, поэтому и дал ему такое мрачное название — *Requiem* (Gabig et al., 1994, 1998).

**Экспрессия.** Оказалось, что *Requiem* имеет один единственный транскрипт, который выявляется во всех исследованных эмбриональных и зрелых тканях (рис. 3). При этом уровень его экспрессии во всех тканях (за исключением передне-

го мозга эмбриона) практически одинаков. Отсюда его другое название “убиквитарно экспрессирующийся *d4*-ген” — *ubi-d4*. В эмбриональном переднем мозге экспрессия *ubi-d4* существенно снижена (Gabig et al., 1994). Отсутствие сплайс-вариантов и одинаковый уровень экспрессии гена *ubi-d4* позволили сделать вывод о том, что эукариотическим клеткам требуется стабильная концентрация белка Ubi-d4. *ubi-d4* человека был локализован на хромосоме в локусе 11q13. В этом же районе находится хорошо известный, но до того времени не клонированный, ген-супрессор опухолей-3 (*tumorigenicity-3*). Авторы решили, что *ubi-d4*, возможно, является этим геном (Chestkov et al., 1996).

В геноме мыши ген *ubi-d4/requiem* локализовали на 19-й хромосоме (Gabig et al., 1998). Он состоит из одиннадцати экзонов, а его общая протяженность составляет около 15.5 т.п.н. (рис. 2). Транскрипт *ubi-d4/requiem* ограничивается одним вариантом, представляющим собой сплайсинг всех одиннадцати экзонов в единую мРНК (Куликова и др., 2000; Mertsalov et al., 2000).

Изучение экспрессии белка методом Вестерн-блот анализа, проведенного с помощью поликлональных антипептидных антител, показал, что белок Ubi-d4 присутствует как в ядерной (что ожидалось, исходя из наличия сигнала ядерной локализации в аминокислотной последовательности), так и в цитоплазматической фракциях тканей мозга. Предполагают, что этот белок функционирует в ядерном и в цитоплазматическом компартментах, возможно, образуя комплексы с разными белками (Gabig et al., 1998).



**Рис. 3.** Динамика специфической экспрессии генов *neuro-d4* и *ubi-d4/Requiem* мыши (Нозерн-блот анализ totalной РНК с мечеными зондами, специфичными для *neuro-d4* и *ubi-d4/Requiem*). (а) – РНК была выделена из целых эмбрионов мыши стадии E8.5 (1); из головы (2) и тела (3) эмбрионов стадии E16. (б, в) – экспрессия этих генов в эмбриональном головном мозге (б) и в тригеминальном ганглии (в) (верху обозначены стадии эмбрионального развития). Внизу приведена картина гибридизации с маркерным геном *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы) для индикации количества РНК, нанесенной на дорожку.

*neuro-d4*

Как уже было сказано выше, этот ген явился родоначальником семейства *d4*. Его клонировали из коры головного мозга крысы. Затем была определена структура гена *neuro-d4* человека и мыши. Было показано, что этот ген состоит из двенадцати экзонов, при этом границы экзонов и интронов гена человека и мыши соответствуют границам экзонов и интронов гена крысы (Buchman et al., 1992; Chestkov et al., 1996).

Из мозга мыши были клонированы четыре варианта кДНК, различающиеся по структуре 5'-области, расположенной перед вторым экзонам (Мерцалов и др., 2000; Mertsalov et al., 2000). Однако, последовательности, соответствующие первому экзону в трех вариантах кДНК, имели иницирующие кодоны, попадающие в основную рамку считывания. Этот факт позволил предположить возможность формирования трех видов транскриптов за счет трех альтернативных первых экзонов. Видимо, эти транскрипты должны независимо транскрибироваться с собственных промоторов. При сравнении нуклеотидной последовательности кДНК-клонов с последовательностью геномных клонов было обнаружено два альтернативных первых экзона – I и I', разделенных последовательностью размером 160 п.н. Третий вариант первого экзона (экзон I<sup>0</sup>) находится на расстоянии 4 т.п.н. выше экзона I'. В геноме мыши экзоны расположены в последова-

тельности: экзон I<sup>0</sup>, затем экзоны I и I', соответственно. Далее следуют остальные одиннадцать экзонов. Четвертый вариант кДНК имел в 5'-области последовательность длиной 591 п.н., являющуюся частью первого интрона. Возможные рамки считывания внутри этой последовательности быстро терминируются, и первый иницирующий кодон, попадающий в основную рамку считывания, находится в последовательности конца второго экзона. Промотор этого транскрипта, вероятно, находится внутри первого интрона (Mertsalov et al., 2000).

У крысы также был обнаружен вариант кДНК гена *neuro-d4*, свидетельствующий о существовании у него альтернативных первых экзонов. Кроме того, был клонирован фрагмент геномной ДНК, содержащий экзон I<sup>0</sup>, который, как и в геноме мыши, расположен далеко выше области, содержащей остальные экзоны (В.Л. Бухман, неопубликованные данные). У человека варианты кДНК, свидетельствующие о существовании альтернативных транскриптов, были найдены в ходе выполнения мирового проекта “Геном человека” и их последовательность можно найти в нуклеотидной базе данных (Gene ID: 8193) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Для гена крысы было показано, что он имеет и другие многочисленные сплайс-варианты мРНК. Сплайсинг вырезает некоторые экзоны или их части, формируя делетированные транскрипты. Однако ряд транскриптов может содержать фраг-

менты из области интронов, вероятно за счет альтернативных донорных и акцепторных сайтов, расположенные внутри экзонов и интронов, при этом рамка считывания не нарушается. В других случаях происходит сбой рамки считывания, в результате чего терминируется трансляция, которая затем начинается с альтернативного АТГ кодона, что приводит к укорочению белковой молекулы с N-конца (Buchman et al., 1992). Подобная сложная схема сплайсинга принципиально возможна и для транскриптов гена *neuro-d4* мышцы, так как было обнаружено, что ген мышцы содержит последовательности и сплайс-сайты, гомологичные тем, которые используются при необычном сплайсинге мРНК *neuro-d4* крысы (Мерцалов и др., 2000; Mertsalov et al., 2000). И хотя похожие варианты кДНК мышцы пока не были клонированы, два дополнительных варианта мРНК гена *neuro-d4* есть и у мышцы. Первый из них формируется в результате сплайсинга, когда используется альтернативный донорный сайт, расположенный внутри 6-го экзона, что должно приводить к делеции части нуклеотидной последовательности 6-го экзона, нарушению рамки считывания и терминации трансляции. Вероятно, синтез белка в этом случае начинается с другого АТГ-кодона, расположенного внутри 6-го экзона. Белок, транслируемый с такой мРНК, становится короче на 179 аминокислот и попадает в основную рамку считывания 7-го экзона. Он не имеет сайта ядерной локализации и первого цистеина, необходимого для формирования домена Крюппель-типа. Формирование второго варианта мРНК возможно при использовании альтернативного акцепторного сайта 10-го интрона. При этом мРНК имеет инсерцию в 30 нуклеотидов, соответствующую прилегающей к 11-му экзону последовательности 10-го интрона. Белок, транслируемый с этой мРНК, содержит внутри RHD-домена дополнительно десять аминокислот, которые должны изменять его пространственную конфигурацию. Наличие сплайс-вариантов мРНК, кодирующих белок, в котором отсутствуют домен Крюппель-типа, последовательность отрицательно заряженных аминокислот и сайт ядерной локализации, позволил предположить, что продукт гена *neuro-d4* является не только нейроспецифическим ядерным фактором, но и играет важную роль в цитоплазме (Buchman et al., 1992; Chestkov et al., 1996).

Если сравнить последовательности экзонов генов *neuro-d4* и *ubi-d4/requiem* мышцы, то можно обнаружить высокую гомологию экзонов, кодирующих а.к. последовательности N- и C-концевых областей, и совпадение мест сплайсинга экзонов в гомологичной последовательности (Mertsalov et al., 2000). Однако, длина интронов между гомологичными экзонами разная. Некоторое сходство в структуре генов *ubi-d4/requiem* и

*neuro-d4* мышцы обнаруживается в расположении первых экзонов. Так первый экзон *ubi-d4/requiem* и один из трех альтернативных первых экзонов *neuro-d4* не только кодируют высокомолекулярные а.к.-последовательности, но и расположены одинаково на большом расстоянии выше области, кодирующей остальные экзоны. Таким образом, высокая степень гомологии кДНК генов *ubi-d4/requiem* и *neuro-d4* указывает на возможную общность их происхождения, а различие в последовательности и длине интронов, разделяющих гомологичные экзоны — на достаточно сильную степень эволюционной дивергенции.

**Экспрессия.** Результаты Нозерн-блот анализа и гибридизации *in situ* показали, что *neuro-d4* у мышцы экспрессируется в большинстве зрелых постмитотических нейронов центральной и периферической нервной системы кроме нейроblastов. Начало экспрессии этого гена приходится на середину эмбрионального периода, с резким подъемом уровня м-РНК между одиннадцатым и двенадцатым днями эмбрионального развития во всех исследованных отделах ЦНС и в периферических ганглиях эмбрионов мышцы (рис. 3) (Mertsalov et al., 2000). В отличие от *ubi-d4*, уровень экспрессии *neuro-d4* в мозгу крысы уменьшается в течение постнатального развития (Buchman et al., 1992).

Таким образом *neuro-d4* — это нейроспецифический ген, экспрессия которого изменяется в эмбриональном и постнатальном периодах развития млекопитающих и сохраняется на довольно высоком уровне в течение жизни в центральной и периферической нервной системе (Buchman et al., 1992). Для выяснения возможной функции белка NEURO-D4 было изучено влияние его суперэкспрессии на морфологические и физиологические характеристики культивируемых нейронов. Были обнаружены два типа эффектов, появляющихся после микроинъекции плазмид, содержащих кДНК гена *neuro-d4* под контролем сильного вирусного промотора, в ядра нейронов переднего цервикального (шейного) ганглия симпатической нервной системы. Существенный процент нейронов с суперэкспрессией *neuro-d4* приобретает способность выживать в культуре клеток в отсутствие нейротрофических факторов в среде культивирования, в то время как для выживания в культуре клеток, не инъецированных или инъецированных контрольной плазмидой, нейронов этого типа абсолютно необходим фактор роста нервов (NGF). Таким образом, было предположено, что *neuro-d4* в нейронах, как и *ubi-d4* в миелоидных клетках, принимает участие в регуляции процесса апоптотической смерти. При культивировании нейронов, суперэкспрессирующих *neuro-d4*, в присутствии NGF наблюдались и существенные морфологические изменения этих

клеток, связанные с процессом роста их отростков (Chestkov et al., 1996).

### *Cer-d4*

Третьего представителя семейства генов *d4* выявили при анализе генома человека. Его локализовали на хромосоме 14 в районе q24.3-q31 (Chestkov et al., 1996). Затем он был обнаружен в геномах мыши (хромосома 12, район 12D3) и цыпленка (Ninkina et al., 2001). Свое название этот ген получил из-за высокого уровня своей экспрессии в пирамидальных нейронах мозжечка (*cerebellum*).

У *Cer-d4* сложная геномная организация. Его экзон-интронную структуру исследовали сначала у цыпленка, затем у мыши. Оказалось, что у цыпленка этот ген кодирует белковый продукт, типичный для всех остальных членов семейства *d4*, но отличный по а.к.-последовательности от двух других представителей белков D4: NEURO-D4 и UBI-D4. Два из четырех клонов кДНК гена *Cer-d4*, полученных после скрининга кДНК-овой библиотеки мозга цыпленка, кодировали полноразмерные белковые продукты, которые оказались усеченной версией белка CER-D4, полученной в результате альтернативного сплайсинга мРНК. Эта усеченная форма сохраняла N-терминальные домены, но S-терминального домена D4 у нее не было. Выяснилось, что усеченная форма образуется в результате замены области, лежащей ниже четвертого цистеина первого “цинкового пальца” РНД-типа, новой короткой а.к.-последовательностью, названной XZ. Сравнительный анализ этой последовательности на гомологию с известными на сегодняшний день последовательностями из доступных баз данных установил ее уникальность. Один из клонов, кодирующий усеченную версию XZ белка CER-D4, обладал дополнительной последовательностью длиной 39 п.н., локализованной между доменом 2/3 и доменом “цинковых пальцев” Крюппель-типа. Такая же последовательность присутствовала в полноразмерном клоне, у которого была дополнительная последовательность длиной 117 п.н. в другом месте, однако, расположенная там же, в области между доменом 2/3 и доменом “цинковых пальцев” Крюппель-типа (Ninkina et al., 2001).

После клонирования части гена *Cer-d4* мыши стало ясно, что усеченная версия его белкового продукта, имеющая XZ-последовательность, является характерной особенностью данного представителя семейства *d4*, а нуклеотидная последовательность экзона, кодирующая XZ у цыпленка и мыши, является консервативной. Из-за сложной организации и наличия протяженных интронов, отличающих его от других представителей семейства, ген *Cer-d4* мыши не был проклонирован целиком. Анализ современной нуклеотидной

базы данных мыши показал, что ген *Cer-d4* состоит из 11 экзонов и занимает область в геноме около 274 т.п.н., в основном из-за значительных размеров большинства интронов. У человека этот ген также состоит из 11 экзонов и занимает область 275 т.п.н. Остальные 2 гена семейства *d4* (*neuro-d4*, *ubi-d4/Requiem*), во всяком случае, у исследованных организмов (человек, крыса, мышь) довольно компактны за исключением длинных первых интронов (см. выше). Тем не менее, количество экзонов и положения экзон-интронных границ, отвечающих за а.к.-последовательности белковых продуктов, остаются консервативны у всех трех представителей генного семейства *d4* (Mertsalov et al., 2000). Единственное отличие есть у гена *neuro-d4*. Это дополнительный экзон (экзон 8), благодаря чему в кодируемом белке увеличивается расстояние между доменом “цинковых пальцев” Крюппель-типа и доменом D4.

мРНК гена *Cer-d4*, также как мРНК *neuro-d4*, имеет многочисленные сплайс-варианты, часто аналогичные сплайс-вариантам *neuro-d4*. Альтернативный сплайсинг транскриптов является, по видимому, одной из характерных и важных особенностей нейроспецифических (*neuro-d4* и *Cer-d4*) членов семейства *d4*. Очевидно, поэтому *neuro-d4* и *Cer-d4* сложно организованы. У них множество экзонов, есть альтернативные донорные и акцепторные сайты сплайсинга и альтернативные промоторы.

**Экспрессия.** У генов *Cer-d4* и *neuro-d4* картина экспрессии сходная: у мыши они экспрессируются начиная с 12-ого эмбрионального дня только в нейронах центральной и периферической нервной системы. Существенным отличием является отсутствие экспрессии *Cer-d4* в эмбриональном переднем мозге и, соответственно, в коре головного мозга в постнатальном периоде (Ninkina et al., 2001).

Экспрессия *ubi-d4* принципиально отличается от экспрессии двух других членов семейства: единственный транскрипт выявляется во всех исследованных эмбриональных и зрелых тканях (Gabig et al., 1994). При этом уровень его экспрессии во всех тканях практически одинаков. Особенности экспрессии этих генов, возможно, отражают последовательность их возникновения в процессе эволюции. Предполагается, что *ubi-d4* имеет более древнее происхождение так как его экспрессия необходима всем клеткам организма во все периоды онтогенеза на одинаково стабильном уровне и не требует сложного механизма регуляции на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. Другие гены семейства более специализированы, экспрессия их ограничена нервной системой, и уровень этой экспрессии различается в различные периоды онтогенеза.

В целом, функции белков семейства D4 до сих пор остаются неизвестными, однако уже сейчас можно сказать, что они очень важны как для функционирования отдельных клеток, так и для развития организма в целом. Недавно показали, что белки семейства D4 могут входить в состав BAF-комплексов (SWI/SNF хроматин-ремоделирующих комплексов позвоночных), и быть регуляторами транскрипции (Lessard et al., 2007). Изменение субъединичного состава BAF-комплексов с участием белков PHF10, NEURO-D4 и CER-D4 играет важную роль в развитии нервной системы. В процессе дифференцировки клеток-предшественников в постмитотические нейроны происходит изменение субъединичного состава этих комплексов, в частности замена белка PHF10/BAF45a на белки, кодируемые нейроспецифическими генами *d4*: NEURO-D4/BAF45b и (или) CER-D4 (определенной изоформой, известной как CER-D4-XZ или BAF45c). Таким образом формируется нейрональный комплекс pBAF, который специфичен для дифференцированных постмитотических нейронов (Lessard et al., 2007). CER-D4 связывается с модифицированными (ацетилованными и метилированными) N-концевыми последовательностями гистонов H3 и H4. Было показано, что изоформа CER-D4-(DPF3) участвует в развитии сердечной мышцы и скелетной мускулатуры позвоночных животных. Дисфункция гена у *D. rerio* приводит к морфологическим нарушениям в сердце, а также дезорганизации миофибрилл сердечной мышцы и скелетной мускулатуры (Lange et al., 2008). На клеточной линии C2C12 мышцы показана роль *Cer-d4* как активатора транскрипции генов *Pitx2* и *Jmjd1c* (Zeng et al., 2010).

Белок UBI-D4/REQUIEM является корепрессором для ядерного эстроген-подобного рецептора ER $\alpha$  и связывается с ацетилованным гистоном H3 и гистон-деацетилазой HDAC1 (Matsuyama et al., 2010). Однако другими исследователями было показано, что UBI-D4/REQUIEM выступает в роли коактиватора транскрипции в неканоническом NF- $\kappa$ B сигнальном пути при стимуляции линии клеток HT-29 лимфотоксином и связывается с транскрипционным фактором RelB/p52 и с SWI/SNF-подобным комплексом (Tando et al., 2010).

В заключении отметим, что гены семейства *d4* отличаются сильным эволюционным консерватизмом. Они обнаружены у человека, крысы, мыши, цыпленка, лягушки *Xenopus laevis* (Konishi et al., 1999), а также в геномах нематоды *C. elegans* (Wilson et al., 1994), плодовой мушки *D. melanogaster* (Nabirochikina et al. 2002; Симонова О.Б. и др., 2005) и гидры (*H. magnipapillata*, Gene ID: 100200083, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) и отсутствуют только у прокариотов и у низших эукариотов (дрожжей) (Chestkov et al., 1996). Учиты-

вая этот консерватизм можно предположить, что все три *d4*-гена произошли от одного предшественника с компактной структурой, обусловленной короткими интронами. Тем не менее, в процессе эволюции интроны генов постепенно увеличивались в размере, возможно за счет дупликаций и инсерций различных мобильных элементов. Альтернативный сплайсинг транскриптов является одной из характерных и важных особенностей нейроспецифических (*neuro-d4* и *Cer-d4*) членов семейства *d4*. Большинство вариантов сплайсинга не приводят к значительным изменениям в размерах мРНК, но влияют, иногда существенно, на структуру кодируемых белков. В 5'-области этих генов были идентифицированы три альтернативных первых экзона со своими внутренними стартом кодонами (экзоны 0, 1, 1'). Другие сплайс-варианты приводили к делециям "цинкового пальца" Крюппель-типа, части или всего домена D4, к изменениям размера петли в "цинковом пальце" и расстояния между доменами. Очевидно, что такие структурные изменения должны менять функциональные свойства белков, а процессы, их формирующие, должны быть результатом тонкой внутриклеточной регуляции. Косвенным свидетельством функциональной важности вариативности белков D4 является эволюционный консерватизм описанных вариантов, обнаруженный при анализе транскриптов крысы, человека, цыпленка и даже нематоды (Chestkov et al., 1996).

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты №№ 12-04-00839-а, 10-04-01120-а, 11-04-02047-а) и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН "Живая природа: современное состояние и проблемы развития".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Куликова Д.А., Мерцалов И.Б., Нинкина Н.Н. и др. Генетическая организация гена *ubi/requet* мыши // ДАН. 2000. Т. 370. № 5. С. 711–714.
- Мерцалов И.Б., Куликова Д.А., Нинкина Н.Н. и др. Генетическая организация гена *neuro-d4* мыши // Генетика. 2000. Т. 36. № 3. С. 314–317.
- Симонова О.Б., Куликова Д.А., Мерцалов И.Б. и др. Исследование суперэкспрессии нового гена *toothrin* у дрозофилы // Генетика. 2005. Т. 41. № 2. С. 196–202.
- Aasland R., Gibson T.J., Stewart A.F. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation // Trends Biochem. Sci. 1995. V. 20. P. 56–59.
- Buchman V.L., Ninkina N.N., Bogdanov Yu.D. et al. Differential splicing creates a diversity of transcripts from a neurospecific developmentally regulated gene encoding a protein with new zinc-finger motifs // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 5571–5585.

- Chestkov A.V., Baka I.D., Kost M.V. et al.* The *d4* Gene family in the Human Genome // *Genomics*. 1996. V. 36. P. 174–177.
- Gabig T.G., Mantel P.L., Rosli R., Crean C.D.* *Requiem*: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 29515–29519.
- Gabig T.G., Crean C.D., Klenk A. et al.* Expression and chromosomal localization of the *Requiem* gene // *Mamm. Genome*. 1998. V. 9. P. 660–665.
- Konishi M., Hiraoka Y., Ogawa M. et al.* Molecular cloning and expression of *Xenopus laevis Requiem* cDNA // *BBA*. 1999. V. 1445. P. 172–176.
- Lange M., Kaynak B., Forster U.B. et al.* Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 17. P. 2370–2384.
- Lessard J., Wu J., Ranish J.A. et al.* An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // *Neuron*. 2007. V. 55. P. 201–215.
- Matsuyama R., Takada I., Yokoyama A. et al.* Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1 // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 24. P. 18166–18176.
- Mertsalov I.B., Kulikova D.A., Alimova-Kost M.V. et al.* Structure and expression of two members of the *d4* gene family in mouse // *Mamm. Genome*. 2000. V. 11. P. 72–74.
- Nabirochkina E., Simonova O.B., Mertsalov I.B. et al.* Expression pattern of *dd4*, a sole member of the *d4* family of transcription factors in *Drosophila melanogaster* // *Mech. Dev.* 2002. V. 114. P. 119–123.
- Ninkina N.N., Mertsalov I.B., Kulikova D.A. et al.* *Cer4*, third member of the *d4* gene family: expression and organization of genomic locus // *Mamm. Genome*. 2001. V. 12. P. 862–866.
- Tando T., Ishizaka A., Watanabe H., Ito T. et al.* *Requiem* protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a noncanonical NF-kappaB pathway // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 29. P. 21951–21960.
- Wilson R., Ainscough R., Anderson K. et al.* 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans* // *Nature*. 1994. V. 368. P. 32–38.
- Zeng L., Zhang Q., Li S. et al.* Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b // *Nature*. 2010. V. 466. № 7303. P. 258–262.

## ***d4* Family Genes: Genomic Organization and Expression**

**D. A. Kulikova<sup>a,b</sup>, I. B. Mertsalov<sup>a,b</sup>, and O. B. Simonova<sup>b,\*</sup>**

<sup>a</sup> *Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

<sup>b</sup> *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

\**e-mail: osimonova@hotmail.com*

**Abstract**—A family of closely related genes, named the *d4* family, has been previously identified in mammals. It comprises three genes encoding structurally related proteins. The hallmark of the family is *d4* domain—a double-paired finger motif that consists of two tandemly arranged PHD finger domains. These genes are expressed in various tissues and at various developmental stages. Two of those, *neuro-d4* and *cer-d4*, are strictly neurospecific and their expression is developmentally regulated. Another gene, *ubi-d4/Requiem* is ubiquitously expressed in all embryonic and adult tissues at the same levels. *d4* family genes are evolutionary conserved. Human, mouse, rat, and chicken *d4* genes have been cloned. The only *d4*-like gene was found in the genome of nematode *C. elegans*. The sole member of *d4* family was identified also in the genome of *D. melanogaster*. However, *d4* genes are not believed to be present in the genomes of prokaryotes and yeast. This review describes genomic organization and expression of *d4* family genes in different organisms.

**Keywords:** *d4* family genes, neurogenes, alternative splicing, transcription, specific gene expression, ubiquitously expressed genes.

## ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА TGF $\beta$ И ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ FGF2 В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА, ПОДДЕРЖИВАЕМЫХ В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2013 г. Н. В. Лифанцева\*, А. М. Кольцова\*\*, Г. Г. Полянская\*\*, О. Ф. Гордеева\*

\* Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

\*\* Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

Поступила в редакцию 06.08.12 г.

Окончательный вариант получен 04.09.12 г.

Эмбриональные стволовые клетки мыши и человека находятся в разных статусах плюрипотентности — базовом и первичном (naïve/ground and primed states). Механизмы сигнальной регуляции клеток в базовом и первичном статусах плюрипотентности значительно различаются. Для того, чтобы понять вклад эндогенных и экзогенных факторов в поддержании метастабильного состояния клеток в разных статусах плюрипотентности, мы исследовали экспрессию факторов семейства TGF $\beta$  (ActivinA, Nodal, Lefty1, TGF $\beta$ 1, GDF3 и BMP4) и FGF2, инициирующие соответствующие сигнальные пути, в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека (мЭСК и чЭСК) и поддерживающих их фидерных клетках. Количественный ПЦР анализ генной экспрессии показал, что паттерны эндогенной экспрессии изучаемых факторов значительно различаются в мЭСК и чЭСК. Наиболее существенные различия были обнаружены в уровнях эндогенной экспрессии TGF $\beta$ 1, BMP4 и ActivinA, а также FGF2. Источниками экзогенных факторов ActivinA, TGF $\beta$ 1 и FGF2 для чЭСК являются фидерные клетки (эмбриональные фибробласты мыши и человека), экспрессирующие высокие уровни этих факторов, а также низкий уровень BMP4. Таким образом, наши данные показали, что поддержание метастабильного недифференцированного состояния плюрипотентных клеток *in vitro* достигается в мЭСК и чЭСК с помощью различных схем регуляций ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 и BMP/Smad1/5/8 эндогенных ветвей TGF $\beta$  сигналинга. Необходимость экзогенной стимуляции или ингибирования этих сигнальных путей обусловлена различиями в паттернах эндогенной экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в мЭСК и чЭСК. Для чЭСК усиление ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 сигналинга с помощью экзогенных факторов, возможно, является необходимым для ослабления эффектов BMP/Smad1/5/8 сигнальных путей, стимулирующих дифференцировку в клетки внезародышевых структур. Значительные различия эндогенной экспрессии FGF2 в клетках с базовым и первичным статусом плюрипотентности свидетельствуют о различной степени вовлеченности этого фактора в регуляцию самообновления плюрипотентных клеток.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность, базовый и первичный статусы, дифференцировка, сигнальные пути, TGF $\beta$ , ActivinA, FGF.

DOI: 10.7868/S0475145013010060

Эмбриональные стволовые клетки мыши и человека являются *in vitro* моделями плюрипотентных клеток эмбрионов млекопитающих, находящихся в разных статусах плюрипотентности — базовом и первичном (naïve/ground and primed states) (Nichols, Smith, 2009). При переходе от базового к первичному статусу плюрипотентные клетки эмбриона утрачивают способность к развитию в линию половых клеток (Hayashi, Surani, 2009; Guo et al., 2009; Han et al., 2010). Эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК), поддерживаемые

*in vitro* в базовом статусе плюрипотентности, гомологичны клеткам внутренней клеточной массы бластоцисты, т.к. способны к развитию во все типы соматических и половых клеток после инъекции их в бластоцисту. Однако эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК), также полученные из бластоцист человека, отличаются от мЭСК системой поддержания и скоростью их самообновления *in vitro* (Smith et al., 1988; Savatier et al., 1996; Thomson et al., 1998; Burdon et al., 2002; Dahéron et al., 2004; Vallier et al., 2005; Xu et al., 2005;

Becker et al., 2006). Кроме того, обнаружено значительное сходство чЭСК с более поздней эмбриональной популяцией, культивируемой *in vitro*, — стволовыми клетками эпибласта мыши (epiblast stem cells, EpiSCs), которые находятся в первичном статусе плюрипотентности (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009; Hanna et al., 2010; Гордеева и др., 2011).

Для поддержания *in vitro* мЭСК и чЭСК в плюрипотентном статусе используют разные системы культивирования, которые можно рассматривать как искусственные клеточные ниши, обеспечивающие оптимальное микроокружение для самообновления плюрипотентных клеток. ЭСК человека и мыши способны расти на фидерных клетках, полученных из фибробластов различного происхождения, а также в бесфидерных системах, включающих различные компоненты внеклеточного матрикса и определенные наборы факторов роста (Smith et al., 1988; Xu et al., 2001; Stojkovic et al., 2005; Vallier et al., 2005; Yoo et al., 2005; Eiselleova et al., 2008; Evseenko et al., 2009; Montes et al., 2009; Кольцова и др., 2011; Кольцова и др., 2012). Однако для самообновления мЭСК и чЭСК *in vitro* необходимы разные наборы факторов роста, что свидетельствует о различных механизмах сигнальной регуляции базового и первичного плюрипотентного статуса и ранних стадий детерминации эмбриональных популяций. Сигнальные пути факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 являются одними из ключевых регуляторов поддержания плюрипотентного статуса и дифференцировки ЭСК *in vivo* и *in vitro* (Mummery, 2001; Valdimarsdottir, Mummery, 2005; Dreesen, Brivanlou, 2007; Pucéat, 2007; Lanner, Rossant, 2010), однако функциональные роли этих сигнальных путей в клетках с базовым и первичным статусом плюрипотентности остаются неясными.

Моделирование ранних стадий развития млекопитающих *in vitro* с использованием линий мЭСК и чЭСК позволяет исследовать механизмы функционирования сигнальных путей в развитии плюрипотентных клеток млекопитающих и их специализацию в различные типы клеток. Для того, что исследовать механизмы сигнальной регуляции клеток в разных статусах плюрипотентности, мы проводили анализ экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2/bFGF, инициирующих соответствующие сигнальные пути, которые активно функционируют в мЭСК, чЭСК и поддерживающих их фидерных клетках. На основе данных сравнительного анализа экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в мЭСК и чЭСК предложена гипотеза о функциональной роли сигнальных путей, активируемых этими факторами, при переходе плюрипотентных клеток от базового к первич-

ному статусу, а также к ранним стадиям дифференцировки эмбриональных популяций клеток.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Культивирование клеток *in vitro*.** В работе была использована линия мЭСК R1, любезно предоставленная доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). Линия чЭСК ESM02 была любезно предоставлена проф. Г.П. Георгиевым (Институт биологии гена РАН, Москва). Линия чЭСК SC5 и линия эмбриональных фибробластов человека (чЭФ) были получены и охарактеризованы ранее в Отделе клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург (Кольцова и др., 2011, 2012).

ЭСК мыши и человека культивировали в среде DMEM, содержащей 1мМ L-глутамин, 0.1 мМ заменимых аминокислот (“HyClone”, США), 0.1 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола (“Sigma”, США) и 15% заменителя телячьей фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, “Gibco”, США). Недифференцированные мЭСК поддерживали на фидере из эмбриональных фибробластов мыши (мЭФ, полученных из E12.5 эмбрионов мышей C57Bl/6), инактивированных митомицином C (10 мкг/мл, “Sigma”) или в бесфидерной системе в среде, содержащей фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл, “Sigma”). Недифференцированные чЭСК линии ESM02 поддерживали на инактивированном фидере мЭФ, а чЭСК SC5 — на фидере из чЭФ. В среду для культивирования чЭСК добавляли рекомбинантный фактор роста фибробластов человека (FGF2/bFGF, 10 нг/мл, “Invitrogen”, США).

Для рутинного культивирования мЭФ и чЭФ использовали среду DMEM, содержащую 1 мМ L-глутамин (“HyClone”, США) и 10% телячьей фетальной сыворотки (“HyClone”, США). Для анализа генной экспрессии в фидерных клетках их культивировали в среде для культивирования ЭСК мыши и человека в течение 24 ч.

Фидерные клетки мЭФ и чЭФ, а также мЭСК пассировали с использованием раствора трипсина (0.05% Trypsin-EDTA solution, “HyClone”). Для пассирования чЭСК использовали метод механического разделения колоний недифференцированных клеток на кластеры.

Эмбриоидные тела (ЭТ), формируемые при дифференцировке мЭСК, получали с помощью метода “висячей капли”, описанного ранее (Гордеева и др., 2009). ЭТ ESM02 и SC5 получали при механическом разделении колоний недифференцированных чЭСК и последующем культивировании клеточных кластеров в планшетах для суспензион-

**Таблица 1.** Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии в эмбриональных стволовых клетках и эмбриональных фибробластах мышцы

Ген	№ Последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>Oct4/Pou5f1</i>	NM_013633.2	5'caccctggcggttctctttg3' 5'gttctcattgtgtcggcttcc3'	142
<i>Nanog</i>	NM_028016	5'aactctcctcattctgaacctga3' 5'ggtgctgagcccttctgaatc3'	136
<i>Gata4</i>	NM_008092	5'tctcactatgggcacagcag3' 5'gggacagcttcagagcagac3'	100
<i>ActivinA</i>	NM_002192	5'tggagcagacctcggagatcatcac3' 5'ttggctcctggttctgttagccttgg3'	160
<i>Nodal</i>	NM_013611	5'gcgaggtgcctaaccctgtg3' 5'atgctcagtggttggctg3'	136
<i>Lefty1</i>	NM_010094	5'tgtgtgctctttgcttctctg3' 5'gcagtgaacaatatgaaggacagag3'	123
<i>Tgfb1</i>	NM_011577	5'caattcctggcggttaccttgg3' 5'ccctgtattccgctccttgg3'	120
<i>Bmp4</i>	NM_007554	5'tctggtctccgtccctgatg3' 5'cgctccgaatggcactacg3'	175
<i>Gdf3</i>	NM_008108	5'gatgagtggtgggtggtag3' 5'gtccgattcaagagagcataagc3'	109
<i>Fgf2</i>	NM_008006	5'cgtcaactacaactccaagcag3' 5'tccagtcgttcaagaagaaacac3'	147
<i>Hprt</i>	NM_013556	5'cgttgggcttacctactgcttct3' 5'ggtcataacctggttcatcatcgctaact3'	150

ного культивирования (“Greinerbio”, Германия) в течение последующих 5 сут (ЭТ).

**Анализ генной экспрессии.** Анализ генной экспрессии проводили в клетках и ЭТ, растущих в бессывороточной среде: фидерных клетках мЭФ и чЭФ, в мЭСК, растущих в среде с LIF, в чЭСК, механически изолированных от фидера, и в ЭТ на 5 сут дифференцировки в средах без LIF и bFGF. Тотальную РНК выделяли из клеток, используя Trizol (“Invitrogen”, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (ThermoScientific, США). Все образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”, США) по протоколу производителя для предотвращения контаминации геномной ДНК. Для синтеза кДНК библиотек использовали 1 мкг тотальной РНК каждого образца. Синтез кДНК библиотек проводили с использованием обратной тран-

скриптазы М-MuLV и олиго (dT)<sub>18</sub> праймеров (“Fermentas”, Литва).

Количественный анализ генной экспрессии проводили на амплификаторе “Applied Biosystems 7500” (США) с использованием набора для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя Eva Green (“Синтол”, Россия) по следующему протоколу: предварительная денатурация: 94°C – 5'; отжиг праймеров и элонгация: 62°C – 45"; денатурация: 94°C – 15", 40 циклов. Уровень флуоресценции детектировали при 62°C в каждом цикле. Специфические праймеры были сконструированы на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank, MGI и Ensemble (табл. 1, 2). Для всех использованных пар праймеров было подтверждено удвоение количества продукта в каждом цикле амплификации и образование единственного ампликона предсказанного размера. Каждый эксперимент был проведен в трех повторах. Уровень экспрессии генов в каждом образце нормализовали к уровню

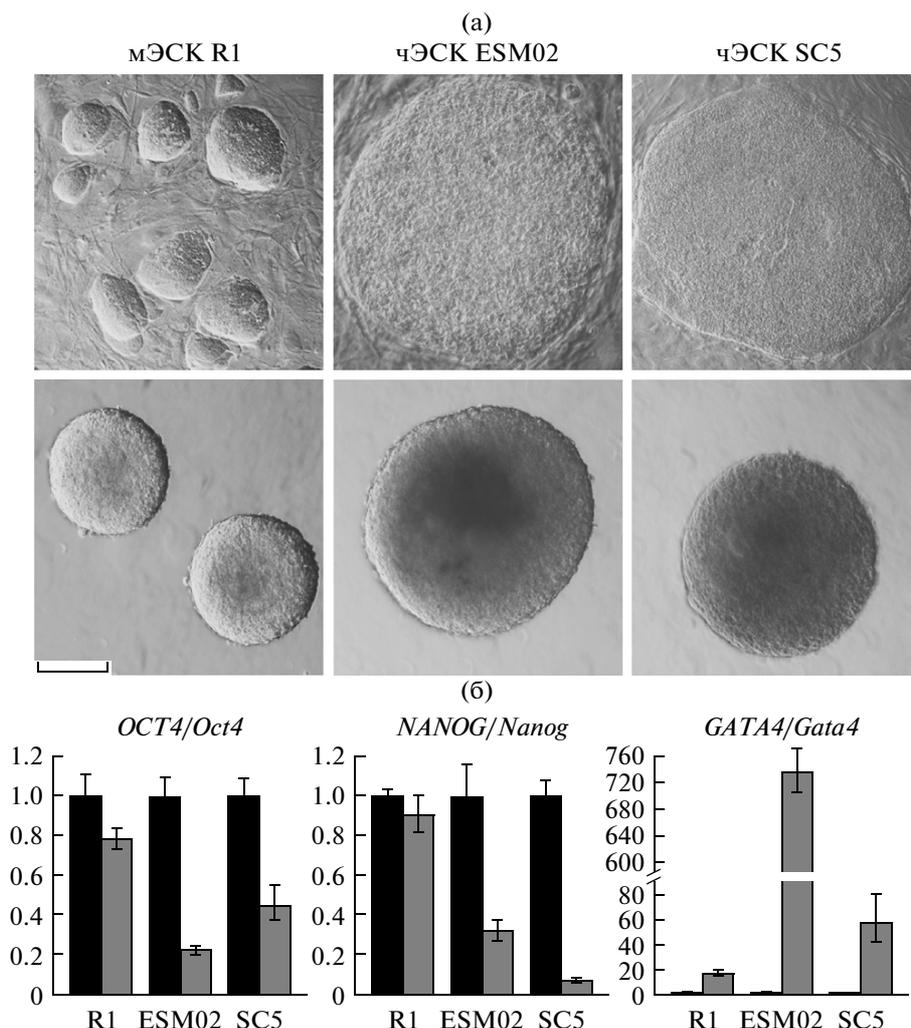
**Таблица 2.** Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии в линиях эмбриональных стволовых клеток и эмбриональных фибробластах человека

Ген	№ Последовательности	Прямой и обратный праймеры	Размер, п.о.
<i>OCT4/POU5F1</i>	NM_002701	5'cgaaagagaagcgaaccagatc3'	220
	NM_203289	5'accagcagcctcaaaatcc3'	
<i>NANOG</i>	NM_024865	5'caagaactctcaacatcctgaacc3'	127
		5'tctgcgtcacaccattgctattc3'	
<i>GATA4</i>	NM_002052	5'gatgggacgggtcactatctg3'	160
		5'ggcagttggcacaggagag3'	
<i>ACTIVINA</i>	NM_002192	5'agggcagaaatgaatgaacttatgg5'	198
		5'gaggcggatggtgactttgg5'	
<i>NODAL</i>	NM_018055	5'tcaactgtgtcggaggtaac3'	190
		5'tcggggggctgtaacg3'	
<i>LEFTY1</i>	NM_020997	5'tcattgttactgtcctgtcactg3'	116
		5'agtctttattatctggattgggatgc3'	
<i>TGFB1</i>	NM_000660	5'tggacatcaacgggtcactac3'	186
		5'gcacgcagcagttcttctcc3'	
<i>BMP4</i>	NM_001202	5'tgagtgccatctccatctgta3'	91
	NM_130850	5'cggcacccacatccctacta3'	
	NM_130851		
<i>GDF3</i>	NM_020634	5'cttcgctttctccagaccaag3'	128
		5'gccaatgtcaactgttcccttc3'	
<i>FGF2</i>	NM_002006	5'gccagtaatcttccatcttcccttc3'	113
		5'tgtgtgctcttcttctcctg3'	
<i>HPRT</i>	NM_000194.2	5'aagatggtcaaggtcgcaagc3'	132
		5'gaagtattcattatagtaaggcatatcc3'	

экспрессии гена гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы (*HPRT/Hprt*). Для определения относительного уровня экспрессии генов использовали сравнительный Ct метод (ABI Relative Quantification Study software, Applied Biosystems, США). Относительные уровни экспрессии рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$ . За одну относительную единицу принимали уровень экспрессии генов в недифференцированных ЭСК или необработанных фибробластах. При анализе относительных уровней экспрессии семейства факторов TGF $\beta$  и FGF2 в каждом типе клеток уровень экспрессии гена *HPRT* принимали за одну относительную единицу, а уровень экспрессии всех остальных генов в образце рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta Ct} \pm SE$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Эндогенная экспрессия факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в недифференцированных и дифференцирующихся ЭСК мыши и человека.* Для анализа роли сигнальных путей факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в регуляции плюрипотентного статуса ЭСК мыши и человека мы исследовали экспрессию этих сигнальных факторов и специфических транскрипционных факторов OCT4/Oct4, NANOG/Nanog и GATA4/Gata4 в недифференцированных и дифференцирующихся клетках (рис. 1, 2). По данным количественного ПЦР-анализа (рис. 1б) в ходе дифференцировки ЭТ, формируемых клетками линий ESM02 и SC5, экспрессия гена *OCT4* снижалась в 4.4 и 2.2 раза, а экспрессия гена *NANOG* – в 3.1 и 13.5 раз соответственно. В то же время в ЭТ, формируемых мЭСК, экспрессия генов *Oct4* и *Nanog* снижалась лишь в 1.1–1.2 раза

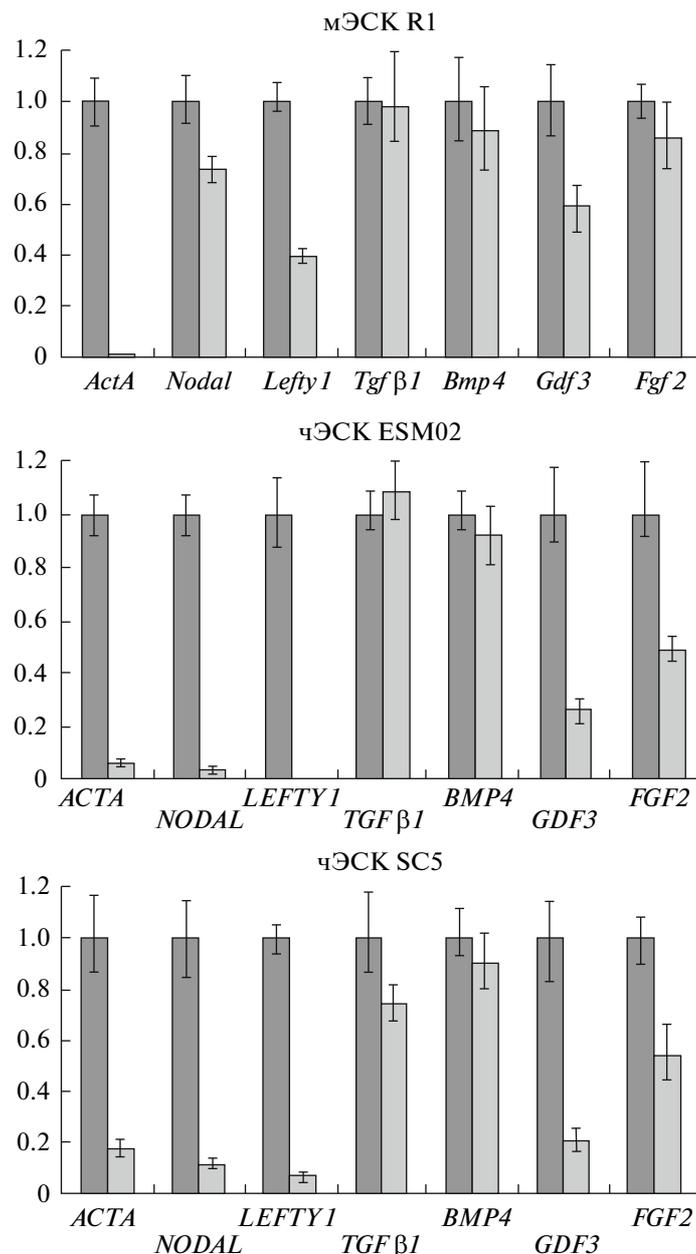


**Рис. 1.** (а) – колонии недифференцированных ЭСК мыши и человека, поддерживаемых на мЭФ и чЭФ (верхний ряд), и ЭТ, формируемые этими клетками в процессе дифференцировки (нижний ряд). Масштаб: 100 мкм; (б) – количественный анализ экспрессии генов *OCT4/Oct4*, *NANOG/Nanog* и *GATA4/Gata4* в линиях ЭСК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень экспрессии в недифференцированных клетках принят за 1 относительную единицу. (■) – недифференцированные клетки, (■) – ЭТ5.

(рис. 16). Дифференцировка ЭСК во внезародышевую энтодерму сопровождалась увеличением экспрессии гена *GATA4* в 737, 58 и 16 раз в ЭТ линий ESM02, SC5 и R1 соответственно. Таким образом, наши данные показывают, что чЭСК значительно быстрее и эффективнее вступают в дифференцировку, чем мЭСК.

Анализ экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2/bFGF показал, что все изучаемые факторы экспрессируются в недифференцированных ЭСК мыши и человека, однако в процессе дифференцировки ЭТ уровни экспрессии большинства факторов снижаются (рис. 2). Причем, в дифференцирующихся ЭТ человека самое сильное снижение уровней генной экспрессии было обнаружено для *LEFTY1* (в 200 и 16 раз для ESM02 и SC5 соответ-

ственно), а в ЭТ мыши – для гена *ActivinA* (83 раза). Экспрессия генов *TGF $\beta$ 1* и *BMP4* практически не изменялась во всех линиях ЭСК. Следует отметить, что снижение экспрессии генов *ACTIVINA/ActivinA*, *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2* коррелировало с изменениями в экспрессии генов *OCT4/Oct4*, *NANOG/Nanog* и *GATA4/Gata4* в процессе дифференцировки ЭТ мыши и человека. Причем экспрессия генов *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2* значительно сильнее снижалась в чЭСК. Эти данные свидетельствуют о том, что эндогенные факторы семейства TGF $\beta$  и FGF2 вовлечены в регуляцию плюрипотентного статуса и дифференцировки ЭСК мыши и человека. Однако эффекты сигнальных путей, инициируемых этими факторами, ве-



**Рис. 2.** Количественный анализ экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и фактора FGF2 в процессе дифференцировки ЭСК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень экспрессии в недифференцированных клетках принят за 1 относительную единицу. (■) – недифференцированные клетки, (□) – ЭТ5.

роятно, различаются в ЭСК мыши и человека, что и обуславливает различную скорость их дифференцировки.

*Анализ экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в фидерных клетках мЭФ и чЭФ, используемых для поддержания недифференцированных ЭСК мыши и человека.* Для анализа роли сигнальных путей, инициируемых факторами семейства TGF $\beta$  и FGF2, в поддержании недифференцированного статуса ЭСК мыши и человека мы изучили экс-

прессию этих факторов в фидерных клетках мЭФ и чЭФ. Фидерные клетки являются источниками белков внеклеточного матрикса и экзогенных факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2, которые также вовлечены в общую систему регуляции поддержания недифференцированных ЭСК мыши и человека. Факторы семейства TGF $\beta$  мыши и человека имеют до 90% гомологии, поэтому могут быть утилизированы клетками обоих видов. В наших экспериментах мЭСК R1 и чЭСК ESM02 поддерживались на

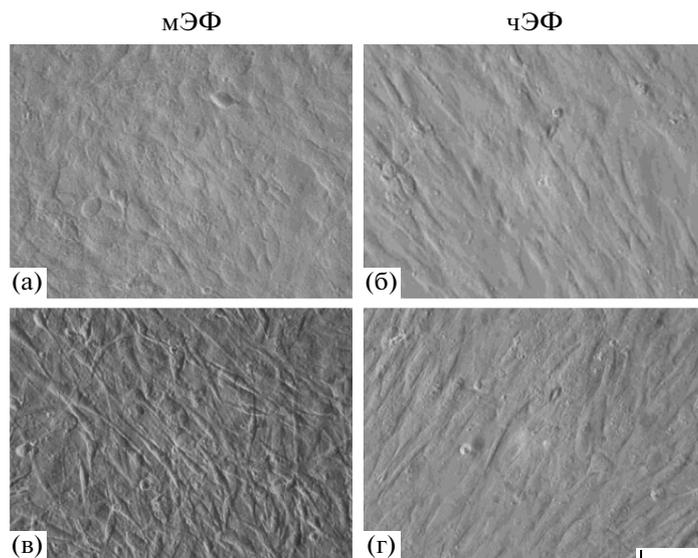


Рис. 3. Фидерные клетки мЭФ и чЭФ до (а, б) и после (в, г) воздействия митомицина и FGF2. Масштаб: 100 мкм.

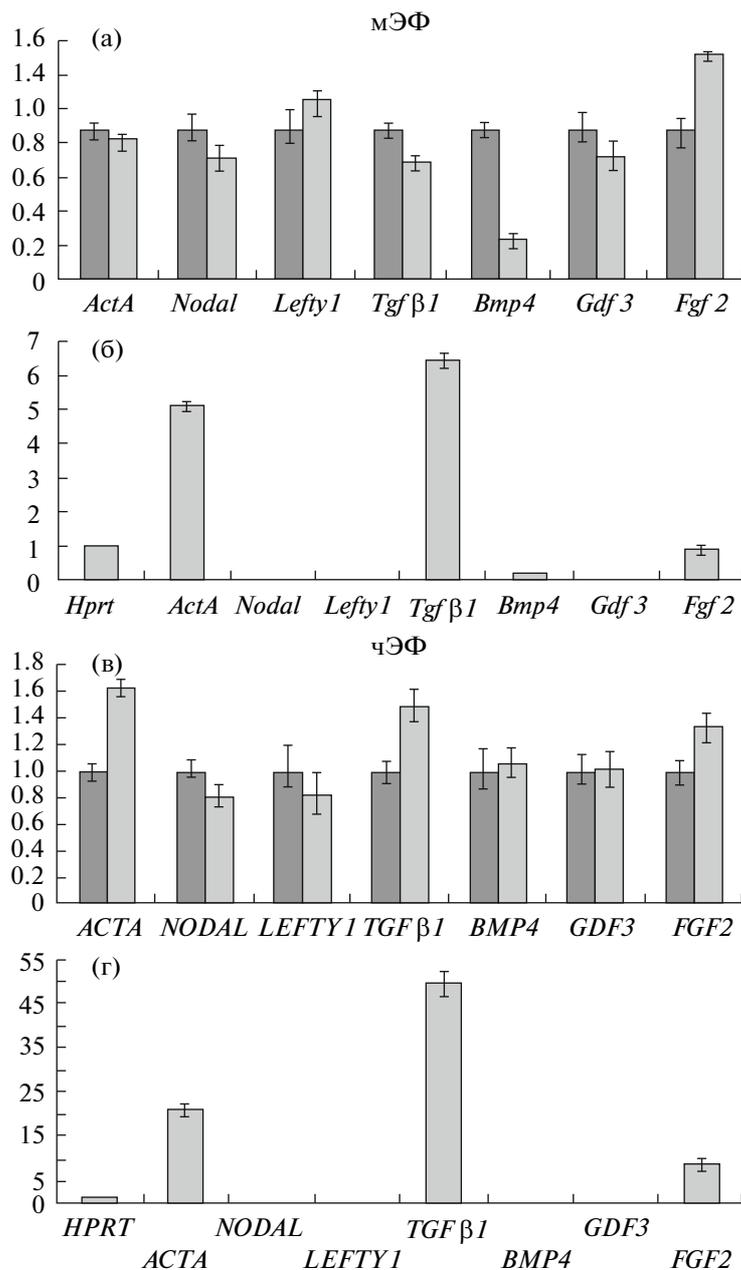
фидере мЭФ, а чЭСК SC5 — на фидере чЭФ (рис. 3). Обе фидерные системы эффективно поддерживали рост недифференцированных ЭСК мыши и человека. Однако для поддержания самообновления чЭСК, растущих на мЭФ и чЭФ, в среду для культивирования добавляли фактор FGF2/bFGF.

Изучение экспрессии генов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в мЭФ и чЭФ показало, что оба типа фидерных клеток имеют сходный паттерн экспрессии факторов: высокий уровень *ACTIVINA/ActivinA*, *TGF $\beta$ 1/Tg $\beta$ 1* и *FGF2/Fgf2* и низкий уровень *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *BMP4/Bmp4* (рис. 4). Анализ экспрессии изучаемых факторов в фидерных клетках мЭФ и чЭФ до и после обработки митомицином С и добавления FGF2/bFGF показал, что экспрессия генов *ACTIVINA/ActivinA*, *TGF $\beta$ 1/Tg $\beta$ 1* и *FGF2/bFGF* остается на высоком уровне, а низкоэкспрессирующихся факторов — незначительно варьирует (рис. 4). Однако сопоставление уровней экспрессии генов *ACTIVINA/ActivinA*, *TGF $\beta$ 1/Tg $\beta$ 1* и *FGF2/Fgf2* по отношению к эндогенной экспрессии гена *HPRT/Hprt* в обоих фидерах показало, что все три гена экспрессируются на значительно более высоких уровнях в чЭФ по сравнению мЭФ (рис. 4б, 4г). Кроме того, сравнительный анализ показал, что уровни экспрессии *HPRT/Hprt* в мЭФ и чЭФ практически не различаются. Для образцов кДНК, синтезированных из 1мг тотальной РНК, показатели пороговых циклов реакции *St HPRT/Hprt* были  $22.907 \pm 0.038$  и  $22.967 \pm 0.099$  для мЭФ и чЭФ соответственно. Таким образом, фидерные клетки мЭФ и чЭФ, экспрессирующие различные уровни факторов семейства TGF $\beta$  и

FGF2, формируют различные ниши для поддержания самообновления плюрипотентных ЭСК мыши и человека.

*Анализ регуляции плюрипотентного статуса в ЭСК мыши и человека при взаимодействии сигнальных путей, активируемых эндогенными и экзогенными факторами семейства TGF $\beta$  и FGF2.* На основании полученных данных по экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в ЭСК и фидерных клетках мы провели анализ соотношений эндогенного и экзогенного сигналинга, обеспечивающего поддержание *in vitro* ЭСК мыши и человека в недифференцированном состоянии (рис. 5). При расчете соотношений уровней экспрессии изучаемых факторов к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt* мы обнаружили, что в мЭСК самый высокий уровень экспрессии был выявлен для гена *Lefty1* (в 6 раз выше уровня *Hprt*), уровни экспрессии генов *ActivinA*, *Tg $\beta$ 1* и *Bmp4* были сопоставимы с уровнем экспрессии *Hprt*, а гены *Nodal*, *Gdf3* и *Fgf2* экспрессировались на более низком уровне, чем *Hprt*.

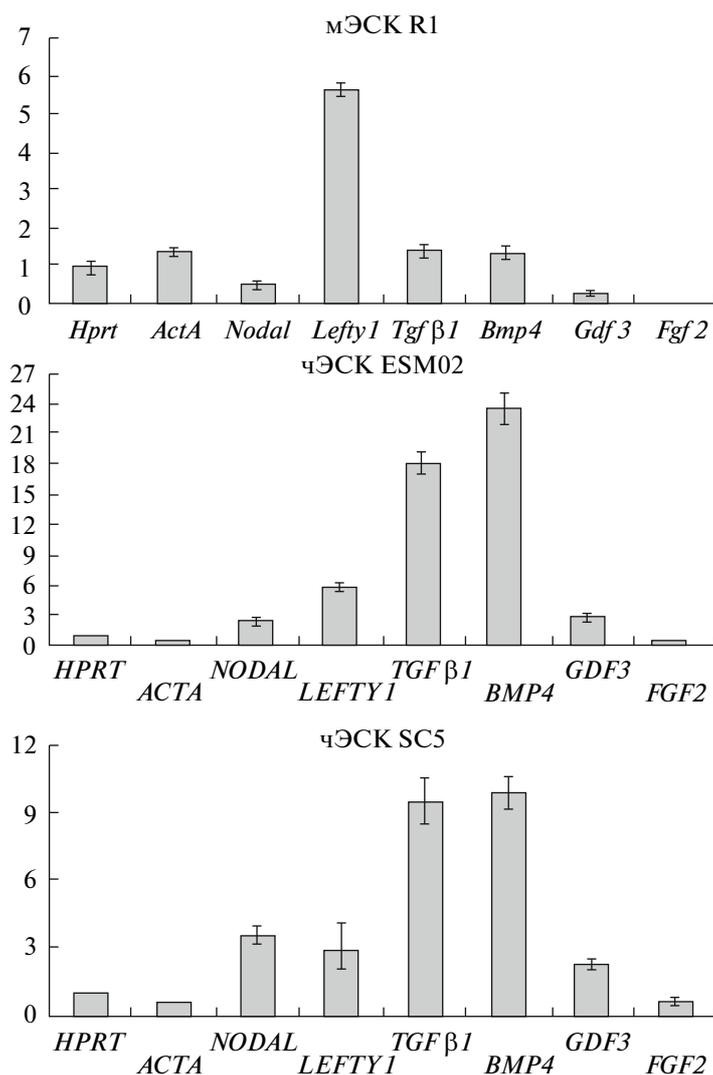
В линиях чЭСК паттерны экспрессии изучаемых факторов значительно отличались от таковых в мЭСК (рис. 5). Наиболее значительные различия были обнаружены в экспрессии генов *TGF $\beta$ 1* и *BMP4*, причем уровни экспрессии этих генов также в 2 раза различались для линий ESM02 и SC5. В обеих линиях чЭСК самые высокие уровни экспрессии были выявлены для генов *TGF $\beta$ 1* и *BMP4* (в 10–20 раз выше *HPRT*), уровень экспрессии *LEFTY1* был в 3–6 раз выше, чем *HPRT*, но сопоставим с таковым в мЭСК. Экспрессия генов *NODAL* и *GDF3* в ESM02 и SC5 была в 2–3 раза выше, чем уровни экспрессии *HPRT* в этих линиях



**Рис. 4.** Анализ экспрессии факторов семейства TGFβ и фактора FGF2 в мЭФ и чЭФ. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень генной экспрессии факторов в необработанных клетках принят за 1 относительную единицу (а, в) или уровень экспрессии гена *HPRT/Hprt* в обработанных клетках принят за 1 относительную единицу (б, г); (■) – необработанные клетки, (□) – клетки, обработанные митомизином С, после добавления фактора FGF2.

соответственно. При этом соответствующие соотношения уровней экспрессии этих генов и *HPRT/Hprt* были в 2–3 раза выше для *NODAL* и в 10 раз выше для *GDF3* для чЭСК по сравнению с мЭСК. В обеих линиях чЭСК были выявлены сходные уровни экспрессии генов *ACTIVINA* и *FGF2*, которые были ниже, чем соответствующие уровни *HPRT*. Однако экспрессия *ACTIVINA* в

чЭСК была ниже, чем в мЭСК, а *FGF2/Fgf2* – более чем в 10 раз выше. Таким образом, уровни экспрессии эндогенных факторов семейства TGFβ и FGF2 различаются в плюрипотентных ЭСК мыши и человека. Однако в обеих линиях чЭСК, поддерживаемых на разных фидерных клетках, паттерны эндогенной экспрессии мРНК изучаемых сигнальных лигандов были сходными.

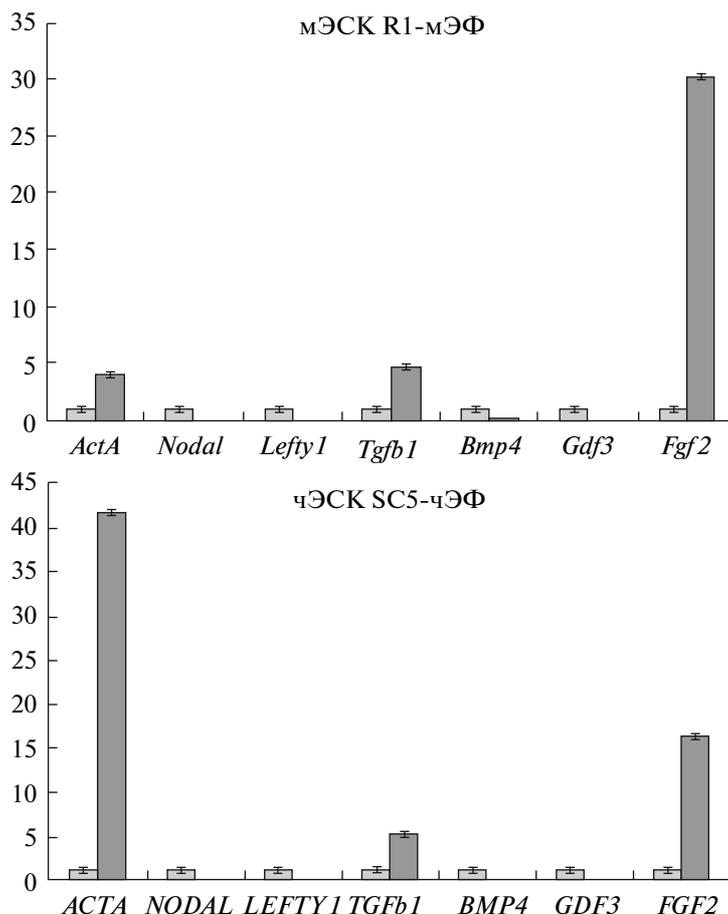


**Рис. 5.** Экспрессии факторов семейства TGFβ и фактора FGF2 в недифференцированных ЭСК мыши и человека. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt*. Уровень экспрессии гена *HPRT/Hprt* принят за 1 относительную единицу.

Анализ соотношений уровней экспрессии факторов семейства TGFβ и FGF2 в ЭСК линий R1 и SC5 и их фидерных клетках показал, что уровни экспрессии *ActivinA/ACTIVINA* в фидерных клетках мЭФ и чЭФ превышают уровни экспрессии в мЭСК и чЭСК в 4 и 42 раза соответственно (рис. 6). В тоже время уровни экспрессии *Tgfβ1/TGFβ1* и *Fgf2/FGF2* были в 5 и 30/16 раз выше в мЭФ и чЭФ, чем в мЭСК и чЭСК соответственно (рис. 6). Учитывая тот факт, что поддержание недифференцированных мЭСК возможно в бесфидерной системе при добавлении в среду фактора LIF, но при отсутствии экзогенных факторов ActivinA, TGFβ1 и FGF2, вероятно, уровни эндогенной экспрессии этих факторов являются оптимальными для сохранения плюрипотентного статуса мЭСК в культуре *in vitro*. Кроме того, факторы ActivinA, TGFβ1 и

FGF2, продуцируемые мЭФ, не оказывают существенного влияния на самообновление и дифференцировку мЭСК, растущих на этом фидере.

Напротив, поддержание определенных уровней и эндогенных, и экзогенных (фидерные клетки и рекомбинантные факторы) факторов *ACTIVINA*, *TGFβ1*, *BMP4* и *FGF2* в среде является критическим для сохранения недифференцированного статуса чЭСК *in vitro*. Очевидно, что фидерные клетки в комбинации с рекомбинантным FGF2 обеспечивают оптимальное количество факторов *ACTIVINA* и FGF2, необходимых для поддержания недифференцированного состояния чЭСК *in vitro*. Кроме того, фактор BMP4, стимулирующий дифференцировку чЭСК, экспрессируется на низком уровне в мЭФ и чЭФ.



**Рис. 6.** Соотношение эндогенной и экзогенной экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и фактора FGF2 в недифференцированных ЭСК мыши и человека и поддерживающих их фидерных клетках. По оси ординат – относительный уровень генной экспрессии, нормализованной к уровню экспрессии гена *HPRT/Hprt* (уровень генной экспрессии факторов в недифференцированных ЭСК принят за 1 относительную единицу).

(□) – недифференцированные мЭСК R1 и чЭСК SC5; (■) – мЭФ и чЭФ.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы и эпибласта доимплантационных стадий развития находятся в окружении клеток двух внезародышевых структур – трофобласта и гипобласта (первичной внезародышевой энтодермы), представляющих естественную нишу для эмбриональных клеток с базовым статусом плюрипотентности. Клетки трофобласта и гипобласта экспрессируют факторы, необходимые для дальнейшего развития плюрипотентных клеток, в том числе для перехода их в следующую фазу – первичный статус плюрипотентности. Плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы, помещенные на фидерные клетки *in vitro*, оказываются в другом микроокружении, которое способствует их пролиферации и ингибирует дифференцировку. ЭСК мыши и человека возможно поддерживать на мЭФ, но для поддержания чЭСК в недифференцированном состоянии необходимо добавление рекомби-

нантного фактора FGF2 в среду. Кроме того, при бесфидерном культивировании самообновление мЭСК обеспечивается присутствием в среде только фактора LIF, тогда как для чЭСК и стволовых клеток эпибласта мыши необходима более сложная система культивирования, включающая факторы семейства TGF $\beta$  (ActivinA или Nodal) и FGF2, но не LIF (Smith et al., 1988; Thomson et al., 1998; Dahéron et al., 2004; Vallier et al., 2005; Xu et al., 2005; Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009). Однако в отличие от мЭСК, при использовании фидера и при бесфидерном культивировании часть популяции чЭСК вступает в спонтанную дифференцировку. Таким образом, поддержание самообновления клеток в базовом и первичном статусе плюрипотентности обеспечивается различными сигнальными путями и различной функциональной активностью сигнальных путей LIF/Stat3, Activin/Nodal/TGF $\beta$ /Smad2/3 и FGF2.

Используя линии ЭСК мыши и человека для изучения сигнальных путей, регулирующих самообновление плюрипотентных стволовых клеток в разных фазах плюрипотентности, в данной работе мы анализировали соотношения эндогенной и экзогенной экспрессии сигнальных лигандов семейства TGF $\beta$  и bFGF в ЭСК и в их фидерных клетках. В первую очередь, мы обнаружили, что паттерны эндогенной экспрессии этих факторов значительно различаются в мЭСК и чЭСК (рис. 5). Так, в мЭСК самый высокий уровень экспрессии был обнаружен для гена *Lefty1*, а в чЭСК для генов *TGF $\beta$ 1* и *BMP4*, к тому же экспрессия *NODAL/Nodal*, *TGF $\beta$ 1/Tgf $\beta$ 1*, *BMP4/Bmp4*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2* была выше в чЭСК, чем в мЭСК. В то же время экспрессия *ACTIVINA* в обеих линиях чЭСК была ниже, чем в мЭСК. Таким образом, различия в паттернах эндогенной экспрессии изучаемых сигнальных факторов в недифференцированных мЭСК и чЭСК демонстрируют внутренние различия в сигнальной регуляции этих клеточных популяций. Кроме того, более высокая скорость дифференцировки чЭСК по сравнению с мЭСК в ЭТ сопровождалась более динамичным снижением экспрессии факторов *NODAL/Nodal*, *LEFTY1/Lefty1*, *GDF3/Gdf3* и *FGF2/Fgf2*. Подобное снижение уровней экспрессии изучаемых факторов мы наблюдали только на 10 день дифференцировки ЭТ, сформированных мЭСК (неопубликованные данные). При этом уровни экспрессии *TGF $\beta$ 1/Tgf $\beta$ 1* и *BMP4/Bmp4* мало изменялись в процессе спонтанной дифференцировки всех клеточных линий и оставаясь самыми высокими по сравнению с другими факторами в ЭТ. На основе этих данных можно предположить, что высокий уровень экспрессии *TGF $\beta$ 1/Tgf $\beta$ 1* и *BMP4/Bmp4* на фоне относительно более низкого уровня экспрессии остальных факторов характеризует более дифференцированное состояние ЭСК. В этом случае большую склонность к спонтанной дифференцировке чЭСК по сравнению с мЭСК можно объяснить более высоким уровнем экспрессии *TGF $\beta$ 1/Tgf $\beta$ 1* и *BMP4/Bmp4* в исходных популяциях недифференцированных чЭСК, находящихся на более продвинутой стадии развития, чем мЭСК. Другой особенностью сигнальной регуляции в недифференцированных чЭСК является более низкий уровень эндогенной экспрессии *ACTIVINA*, который также драматически снижается в процессе дифференцировки мЭСК и чЭСК.

Анализ экспрессии факторов TGF $\beta$  и FGF2 в фидерных клетках мЭФ и чЭФ показал, что они являются источниками экзогенных факторов ActivinA, TGF $\beta$ 1 и FGF2 для ЭСК. Эти факторы экспрессируются на более высоком уровне, чем в ЭСК, хотя уровень их экспрессии в мЭФ был значительно ниже, чем в чЭФ. Как было отмечено вы-

ше, для поддержания самообновления мЭСК *in vitro* не требуются экзогенные факторы ActivinA, TGF $\beta$ 1 и FGF2, тогда как для чЭСК необходимы экзогенные факторы ActivinA и FGF2. Оба используемых фидера способны эффективно поддерживать самообновление чЭСК, несмотря на значительные различия в уровнях экспрессии *ACTIVINA/ActivinA* и *TGF $\beta$ 1/Tgf $\beta$ 1*, следовательно, в этих пределах уровни экспрессии факторов могут быть допустимыми для поддержания чЭСК. Однако при поддержании чЭСК на мЭФ требуется добавление экзогенного рекомбинантного фактора FGF2, т.к. *Fgf2* экспрессируется на низком уровне в этих фидерных клетках. Напротив, при использовании чЭФ или среды, кондиционированной чЭФ, добавление рекомбинантного FGF2 не является необходимым. Способность сред, кондиционированных чЭФ, а также эмбриональными фибробластами, полученными из чЭСК линий SC5 и SC7, поддерживать самообновление этих линий чЭСК была показана нами ранее (Кольцова и др., 2012). Фидерные клетки, используемые для поддержания чЭСК, могут значительно различаться по уровням экспрессии факторов ActivinA, TGF $\beta$ 1 и FGF2, но такие системы культивирования могут быть скорректированы с помощью экзогенных рекомбинантных факторов (Eiselleova et al., 2008).

Необходимо отметить, что в обоих типах фидерных клеток уровень экспрессии *BMP4/Bmp4* был значительно ниже, чем в ЭСК, что также способствовало поддержанию их в недифференцированном состоянии. Ранее было показано, что BMP4 в кооперации с LIF может поддерживать самообновление мЭСК, хотя его присутствие не является обязательным (Ying et al., 2003). Напротив, в чЭСК экзогенный BMP4 стимулировал дифференцировку в клетки внезародышевых структур, а ингибирование киназ рецепторов BMP способствовало самообновлению чЭСК (Xu et al., 2002, 2005; Vallier et al., 2005, 2009; Greber et al., 2007). Различные эффекты стимуляции BMP/Smad1/5/8 сигнальных путей на дифференцировку ЭСК мыши и человека можно объяснить более высоким уровнем эндогенной экспрессии *BMP4* в чЭСК по сравнению с мЭСК. В связи с тем, что усиление активности BMP/Smad1/5/8 ветви TGF $\beta$  сигнальных путей приводит к стимуляции дифференцировки чЭСК, поддержание самообновления недифференцированных чЭСК возможно только на фидерных клетках, экспрессирующих низкий уровень факторов BMP.

Для поддержания метастабильного недифференцированного состояния плюрипотентных ЭСК *in vitro* необходима сбалансированная активность различных сигнальных путей, в том числе ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 и BMP/Smad1/5/8 ветвей TGF $\beta$  сигналинга (Xiao et al., 2006; Dreesen,

Brivanlou, 2007; Greber et al., 2007). По-видимому, высокий уровень эндогенной экспрессии TGF $\beta$ 1 в чЭСК не достаточен для того, чтобы нейтрализовать стимулирующие дифференцировку эффекты эндогенного BMP4, поэтому для сохранения сигнального баланса необходимо усиление активности ActivinA/Nodal/Smad2/3 ветви с помощью экзогенных факторов ActivinA и Nodal. Необходимость ActivinA/Nodal/TGF $\beta$ /Smad2/3 сигналинга для пролиферации плюрипотентных клеток blastocисты мыши и поддержания чЭСК в недифференцированном состоянии была продемонстрирована при ингибировании киназ рецепторов ALK-4, -5, -7 ингибитором SB 431542 и воздействии указанных факторов роста (Dunn et al., 2004; James et al., 2005; Vallier et al., 2005). Однако при высокой концентрации этих факторов в среде также может быть стимулирована дифференцировка чЭСК (McLean et al., 2007).

Роль фактора FGF2 в самообновлении чЭСК остается неясной, т.к. имеются противоречивые данные о взаимодействиях FGF2 и ActivinA сигнальных путей. Ранее показано, что FGF2 может стимулировать активность PI3K и ERK сигнальных путей и в кооперации с ActivinA/Nodal сигналингом поддерживать самообновление и жизнеспособность чЭСК *in vitro* (Vallier et al., 2005; Eiseleova et al., 2009). Причем только FGF2 не способен блокировать дифференцировку и стимулировать пролиферацию чЭСК (Vallier et al., 2005; Greber et al., 2007; Na et al., 2010). С другой стороны, в ряде работ было показано, что добавление экзогенного ActivinA является достаточным для поддержания чЭСК в недифференцированном состоянии (Beattie et al., 2005; Xiao et al., 2006;). Более того, при добавлении ActivinA в комбинации с FGF2 чЭСК дифференцировались быстрее (Na et al., 2010). В наших экспериментах чЭСК ESM02 и SC5, поддерживаемые на фидерных клетках с различными уровнями экспрессии FGF2, оставались недифференцированными только в случае высокой концентрации экзогенного FGF2 (на мЭФ только в среде с рекомбинантным FGF2).

Стволовые клетки эпибласта мыши поддерживают *in vitro*, как и чЭСК, в среде с экзогенными факторами ActivinA и FGF2 (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009). Реверсия от первичного статуса к базовому статусу плюрипотентности для этих клеток (в мЭСК-подобные) возможна при культивировании их в 2i+LIF условиях — в среде с LIF и ингибиторами ERK1/2 (PD0325901) и GSK3-киназа (CHIR99021) (Silva et al., 2008; Ying et al., 2008). Переход чЭСК из первичного в базовый статус плюрипотентности происходил при культивировании их в 3i+LIF условиях —

PD0325901/ CHIR99021/Forskolin/LIF (Hanna et al., 2010). В обоих случаях ингибирование ERK1/2 сигнальных каскадов приводило к ослаблению зависимости от экзогенных факторов ActivinA и FGF2.

Таким образом, при переходе плюрипотентных клеток от базового к первичному статусу, а также к ранним стадиям дифференцировки эмбриональных популяций изменяются функциональные роли сигнальных путей, активируемых факторами семейства TGF $\beta$  и FGF2. На основе полученных нами данных можно заключить, что поддержание метастабильного недифференцированного состояния плюрипотентных клеток *in vitro*, обеспечиваемое сбалансированной активностью различных сигнальных путей, достигается в мЭСК и чЭСК с помощью различных схем регуляций ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 и BMP/Smad1/5/8 ветвей TGF $\beta$  сигналинга. Необходимость экзогенной стимуляции или ингибирования этих сигнальных путей обусловлена внутренними различиями в паттернах экспрессии факторов семейства TGF $\beta$  и FGF2 в мЭСК и чЭСК. Для чЭСК (более продвинутой в развитии клеточной популяции) усиление ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 сигналинга с помощью экзогенных факторов является необходимым для ослабления эффектов BMP/Smad1/5/8 сигнальных путей, стимулирующих дифференцировку в клетки внезародышевых структур. Различные модулирующие эффекты FGF2 в клетках с базовым и первичным статусом плюрипотентности, очевидно, обусловлены различной функциональной активностью ERK1/2 сигнальных каскадов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а) и Государственным контрактом Минобрнауки РФ № 16.М04.11.0002.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В. Паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека связаны с регуляцией базового и первичного статусов плюрипотентности // Онтогенез. 2011. Т. 42. С. 403–424.
- Кольцова А.М., Гордеева О.Ф., Крылова Т.А. и др. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 4. С. 249–263.
- Кольцова А.М., Воронкина И.В., Гордеева О.Ф. и др. Разработка новой бесфидерной системы и характеристика полученных в ней линий эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании // Цитология. 2012. Т. 54. № 8. С. 637–651.
- Beattie G.M., Lopez A.D., Bucay N. et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in

- the absence of feeder layers // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 489–495.
- Becker K.A., Ghule P.N., Therrien J.A. et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase // *J. Cell Physiol.* 2006. V. 209. P. 883–893.
- Brons I.G.M., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // *Nature*. 2007. V. 448. P. 191–195.
- Burdon T., Smith A., Savatier P. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells // *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. P. 432–438.
- Dahéron L., Opitz S.L., Zaehres H. et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2004. V. 22. P. 770–778.
- Dreesen O., Brivanlou A.H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells // *Stem Cell Rev.* 2007. V. 3. P. 7–17.
- Dunn N.R., Vincent S.D., Oxburgh L. et al. Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo // *Development*. 2004. V. 131. P. 1717–1728.
- Eiselleova L., Peterkova I., Neradil J. et al. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. V. 52. P. 353–363.
- Eiselleova L., Matulka K., Kriz V. et al. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 1847–1857.
- Evseenko D., Schenke-Layland K., Dravid G. et al. Identification of the critical extracellular matrix proteins that promote human embryonic stem cell assembly // *Stem Cells Dev.* 2009. V. 18. P. 919–928.
- Greber B., Lehrach H., Adjaye J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor  $\beta$  signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal // *Stem Cells*. 2007. V. 25. P. 455–464.
- Guo G., Yang J., Nichols J. et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency // *Development*. 2009. V. 136. P. 1063–1069.
- Han D.W., Tapia N., Joo J.Y. et al. Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pre-gastrulation stages // *Cell*. 2010. V. 143. P. 617–627.
- Hanna J., Cheng A.W., Saha K. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 9222–9227.
- Hayashi K., Surani M.A. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. P. 493–498.
- James D., Levine A.J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A. TGF $\beta$ /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Development*. 2005. V. 132. P. 1273–1282.
- Lanner F., Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells // *Development*. 2010. V. 137. P. 3351–3360.
- McLean A.B., D'Amour K.A., Jones K.L. et al. Activin A efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed // *Stem Cells*. 2007. V. 25. P. 29–38.
- Montes R., Ligeró G., Sanchez L. et al. Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF- $\beta$  and IGF-II // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 698–709.
- Mummery C.L. Transforming growth factor beta and mouse development // *Microscopy Research and Technique*. 2001. V. 52. P. 374–386.
- Na J., Furue M.K., Andrews P.W. Inhibition of ERK1/2 prevents neural and mesodermal differentiation and promotes human embryonic stem cell self-renewal // *Stem Cell Research*. 2010. V. 5. P. 157–169.
- Nichols J., Smith A. Naive and primed pluripotent states // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. P. 487–492.
- Pucéat M. TGF $\beta$  in the differentiation of embryonic stem cells // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 74. P. 256–261.
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L.A. et al. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells // *Oncogene*. 1996. V. 12. P. 309–322.
- Silva J., Barrandon O., Nichols J. et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. e253.
- Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides // *Nature*. 1988. V. 336. P. 688–690.
- Stojkovic P., Lako M., Stewart R. et al. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. P. 306–314.
- Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // *Nature*. 2007. V. 448. P. 196–199.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. P. 1145–1147.
- Valdimarsdóttir G., Mummery C. Functions of the TGF $\beta$  superfamily in human embryonic stem cells // *APMIS*. 2005. V. 113. P. 773–789.
- Vallier L., Alexander M., Pedersen R.A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells // *J. Cell. Sci.* 2005. V. 118. P. 4495–4509.
- Vallier L., Touboul T., Chng Z. et al. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. P. e6082.
- Xiao L., Yuan X., Sharkis S.J. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1476–1486.
- Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells // *Nature Biotechnology*. 2001. V. 19. P. 971–974.
- Xu R.H., Chen X., Li D. et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 1261–1264.

- Xu R.H., Peck R.M., Li D.S. et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells // *Nat. Methods*. 2005. V. 2. P. 185–190.
- Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 // *Cell*. 2003. V. 115. P. 281–292.
- Ying Q., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal // *Nature*. 2008. V. 453. P. 519–523.
- Yoo S.J., Yoon B.S., Kim J.M. et al. Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells // *Exp. Mol. Med*. 2005. V. 37. P. 399–407.

## Expression of TGF $\beta$ Family Factors and FGF2 in Mouse and Human Embryonic Stem Cells Maintained in Different Culture Systems

N. V. Lifantseva<sup>a</sup>, A. M. Koltsova<sup>b</sup>, G. G. Poljanskaya<sup>b</sup>, and O. F. Gordeeva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

<sup>b</sup> Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

\*e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

**Abstract**—Mouse and human embryonic stem cells are in different states of pluripotency (naive/ground and primed states). Mechanisms of signaling regulation in cells with ground and primed states of pluripotency are considerably different. In order to understand the contribution of endogenous and exogenous factors in the maintenance of a metastable state of the cells in different phases of pluripotency, we examined the expression of TGF $\beta$  family factors (ActivinA, Nodal, Lefty1, TGF $\beta$ 1, GDF3, BMP4) and FGF2 initiating the appropriate signaling pathways in mouse and human embryonic stem cells (mESCs, hESCs) and supporting feeder cells. Quantitative real-time PCR analysis of gene expression showed that the expression patterns of endogenous factors studied were considerably different in mESCs and hESCs. The most significant differences were found in the levels of endogenous expression of TGF $\beta$ 1, BMP4 and ActivinA. The sources of exogenous factors ActivinA, TGF $\beta$ 1, and FGF2 for hESCs are feeder cells (mouse and human embryonic fibroblasts) expressing high levels of these factors, as well as low levels of BMP4. Thus, our data demonstrated that the in vitro maintenance of metastable state of undifferentiated pluripotent cells is achieved in mESCs and hESCs using different schemes of the regulations of ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3/BMP/Smad1/5/8 endogenous branches of TGF $\beta$  signaling. The requirement for exogenous stimulation or inhibition of these signaling pathways is due to different patterns of endogenous expression of TGF $\beta$  family factors and FGF2 in the mESCs and hESCs. For the hESCs, enhanced activity of ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3 signaling by exogenous factor stimulation is necessary to mitigate the effects of BMP/Smad1/5/8 signaling pathways that promote cell differentiation into the extraembryonic structures. Significant differences in endogenous FGF2 expression in the cells in the ground and primary states of pluripotency demonstrate diverse involvement of this factor in the regulation of the pluripotent cell self-renewal.

**Keywords:** embryonic stem cells, pluripotent, ground and primed state, differentiation, signaling pathways, TGF $\beta$ , ActivinA, FGF2.

УДК 582.632.2

## ЦИКЛИЧЕСКОЕ ОМОЛОЖЕНИЕ В РАЗВИТИИ ПОБЕГОВ КАНАРСКОЙ СОСНЫ (*PINUS CANARIENSIS* C. Sm.)

© 2013 г. О. Б. Михалевская, А. А. Шабашева

Московский педагогический государственный университет

129278 Москва, ул. Кибальчича, д. 6

E-mail: olgam18@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.02.11 г.

Окончательный вариант получен 24.03.11 г.

Описаны возрастные изменения в структуре побегов *Pinus canariensis* C. Sm. у дерева высотой 6 м, растущего в оранжерее. Возрастные изменения структуры у моноподиально нарастающих побегов кроны носят периодический характер и проявляются как циклическое омоложение.

*Ключевые слова:* онтогенез, структура побегов древесных растений, циклическое омоложение.

DOI: 10.7868/S0475145012050060

Циклическое омоложение в развитии растений, описанное Н.П. Кренке в его “Теории циклического старения и омоложения растений” (Кренке, 1940, 1950), наблюдается у многих видов древесных растений и широко используется в практике при селекции и выращивании плодовых культур. У деревьев омоложение наблюдается чаще всего на побегах, вырастающих из пазушных почек, и проявляется появлением на этих побегах морфологических признаков, характерных для этих растений в более раннем возрасте по сравнению с возрастом родительского побега, на котором вырос пазушный побег. У саженцев сосен это проявляется на побегах, выросших из спящих почек в нижней части ствола (рис. 1). Морфология этих побегов такая же, как у выросших из семян проростков разных видов сосны в первые два года их жизни (рис. 2). Они отличаются от побегов взрослых деревьев отсутствием укороченных побегов с пучками хвои – брахибластов. Структура побегов малолетних сеянцев сосны получила название ювенильной структуры, а структура побегов с брахибластами у растений сосны большего возраста получила название зрелой структуры. Различие в структуре побегов у проростков и у взрослых деревьев сосны описаны многими исследователями (Серебряков, 1962; Чепик, 1969, 1982; Горошкевич, Попов, 2004).

У дерева сосны канарской (*Pinus canariensis* C. Sm.), растущего в субтропическом отделе Фондовой оранжереи Главного ботанического сада РАН, наблюдается необычное формирование побегов с ювенильной структурой не только из спящих почек в нижней части ствола, но и на побегах

во всех частях кроны этого дерева, высота которого около 6 м.

У деревьев этого вида в местах их естественно произрастания такого многочисленного образования в кроне побегов с ювенильной структурой вероятно не наблюдается, поэтому в литературе мы не нашли упоминаний о такой особенности его морфологии (Мигон, 1967; Krussman, 1983). В статье С.Н. Page, опубликованной в 1974 г., дано подробное описание морфологии ювенильных листьев у *Pinus canariensis*, но не дано описания структуры побегов, на которых вырастают эти листья. В интернет приведена фотография стволов больших деревьев *Pinus canariensis*, на которых после лесного пожара вырастает стволовая поросль, побеги которой, судя по их внешнему виду на фотографии, имеют ювенильную структуру, хотя автор фотографии об этом не пишет (А.С. Боголюбов, 2008, [www.ecosystema.ru](http://www.ecosystema.ru)). Аналогичные фотографии побегов стволовой поросли канарской сосны, демонстрирующие ювенильную структуру побегов, приведены в интернет и на других сайтах. В то же время на фотографиях побегов, выросших в кроне деревьев канарской сосны, ювенильной структуры не обнаруживается ([www.ru.wikipedia.org](http://www.ru.wikipedia.org)).

Ювенильная и зрелая структуры побегов у сосен различаются не только по наличию или отсутствию брахибластов. Структура зрелых побегов хорошо изучена. Нарастание оси многолетнего побега со зрелой структурой происходит моноподиально. Новый прирост оси вырастает из верхушечной почки предыдущего прироста. Все метамеры побега несут редуцированные чешуевидные



**Рис. 1.** Саженец *Pinus* sp. с ювенильными побегами, выросшими из спящих почек в нижней части ствола.

листья. Из пазушных почек верхних чешуй, расположенных сразу под верхушечной почкой, вырастают боковые удлиненные побеги со зрелой структурой. Длина этих побегов (аукибластов) гораздо больше, чем длина брахибластов. Брахибласты вырастают из пазушных почек, распо-

ложенных ниже аукибластов на оси побега. Аукибласты на верхнем конце каждого прироста осевого побега образуют своеобразную мутовку.

Структура оси каждого прироста многолетнего побега со зрелой структурой состоит у сосен обычно из трех зон. В его нижней зоне метамеры



Рис. 2. Проростки *Pinus junnaniana*.

несут почечные чешуи без пазушных почек, в средней самой большой по длине зоне в пазухах чешуй формируются почки, из которых вырастают брахибласты, а в верхней зоне в пазухах чешуй формируются почки, из которых вырастают ауксибласты. Такая структура оси зрелого побега характерна для многих видов сосны (Артемов, 1981; Чепик, 1982; Горошкевич, 1994; Горошкевич, Попов, 2004). У генеративных побегов во второй зоне оси побега со зрелой структурой в пазушных почках закладываются зачатки мужских шишек, которые располагаются на оси ниже брахибластов, а в верхней третьей зоне оси побега в пазухах чешуй закладываются зачатки женских шишек. Мужские и женские шишки формируются на разных побегах, расположенных в разных частях кроны. (Минина, 1971; Некрасова, 1972). Такая зрелая структура побегов формируется у сосен еще в почках до их распускания (Михалевская, 1960, 1962).

Целью нашего исследования было выявление деталей морфологической структуры побегов у дерева канарской сосны, растущей в Фондовой оранжерее ГБС РАН, с необычно обильным образованием побегов с ювенильной структурой. Нами были исследованы 16 многолетних: побегов из

средней части кроны, взятых с осевых ветвей, отходящих от ствола на высоте 2–4 м от уровня почвы. Все исследованные побеги были вегетативными. Образование генеративных побегов на этом дереве не наблюдалось. У каждого побега на последовательно расположенных вдоль оси участках определяли число метамеров, длину чешуй и ювенильной хвои, длину брахибластов вместе с их хвоей, высоту верхушечных и пазушных почек, длину боковых побегов. Из-за того, что длина большинства междоузлий была очень мала, менее 1 мм, ее определяли путем подсчета под лупой числа узлов на помеченном и измеренном участке оси побега длиной в 10–20 мм и затем рассчитывали среднюю длину междоузлия на этом участке оси. Длину участков оси, длину чешуй, высоту почек определяли под бинокулярной лупой с помощью линейки с миллиметровыми делениями. У верхушечных почек определяли их емкость (число зачатков метамеров в почке), препарировав почки под бинокулярной лупой.

Побеги с ювенильной и со зрелой структурой расположены рядом на одной ветви почти во всех частях кроны исследуемого дерева. Однако у нижних ветвей кроны побегов с ювенильной структурой было больше, чем у верхних ветвей.



**Рис. 3.** Побеги *Pinus canariensis* со зрелой структурой (слева) и с ювенильной структурой (справа), выросшие на одной оси материнского побега. Побег со зрелой структурой вырос из верхушечной почки, побег с ювенильной структурой — из пазушной почки.

По внешнему виду побеги с разной структурой четко различаются (рис. 3 и 4). Хвоя на ювенильных побегах отличается от хвои на побегах со зрелой структурой не только тем, что гораздо короче, но и более светлозеленой окраской с голубоватым оттенком. Одиночные хвоинки длиной от 3 до 8 см расположены по спирали на оси побега. Верхушечные почки ювенильных побегов не имеют чешуй. Апикальная меристема ювенильного побега защищена растущей хвоей и представляет собой открытую почку (рис. 5а). Крупных пазушных почек, из которых вырастают ауксибласты, у побегов с ювенильной структурой не образуется. Ветвления оси у побегов с ювенильной структурой не наблюдается и нарастание оси побега происходит только моноподиально. Все боковые побеги, которые мы обнаружили у них, были брахибластами, вырастающими из почек в пазухах одиночной хвои. Нарастания оси побега у брахибластов тоже не происходит, так как у них отмирает апикальная меристема.

Побеги со зрелой структурой не имеют зеленой одиночной хвои. Все метамеры оси их элементарного побега вместо хвои несут сухие чешуи. У метамеров в верхней половине оси элементарного побега в пазухах чешуй вырастают брахибласты, с пучками из трех зеленых хвоинок, длина которых гораздо больше, чем у одиночной ювенильной хвои и варьирует от 10 до 30 см. Сама ось побега у брахибласта очень короткая, не более 1 мм. Она несет несколько сухих чешуй, которые закрывают основание пучка хвои, состоящего из трех длинных зеленых игл. Длина междоузлий на участке оси побега с брахибластами обычно больше, чем в других частях оси и достигает 1.5 и 2 мм, в то время как в других частях оси она меньше 1 мм.

У побегов со зрелой структурой верхушечные почки закрыты чешуями (рис. 5б) Их высота часто достигает 20–30 мм, а число зачатков метамеров побега в них (емкость почки) варьирует от 60 до 150. У одной из исследованных почек мы обнаружили 176 зачатков метамеров. Самые нижние из них образуют наружный покров почки, а самые

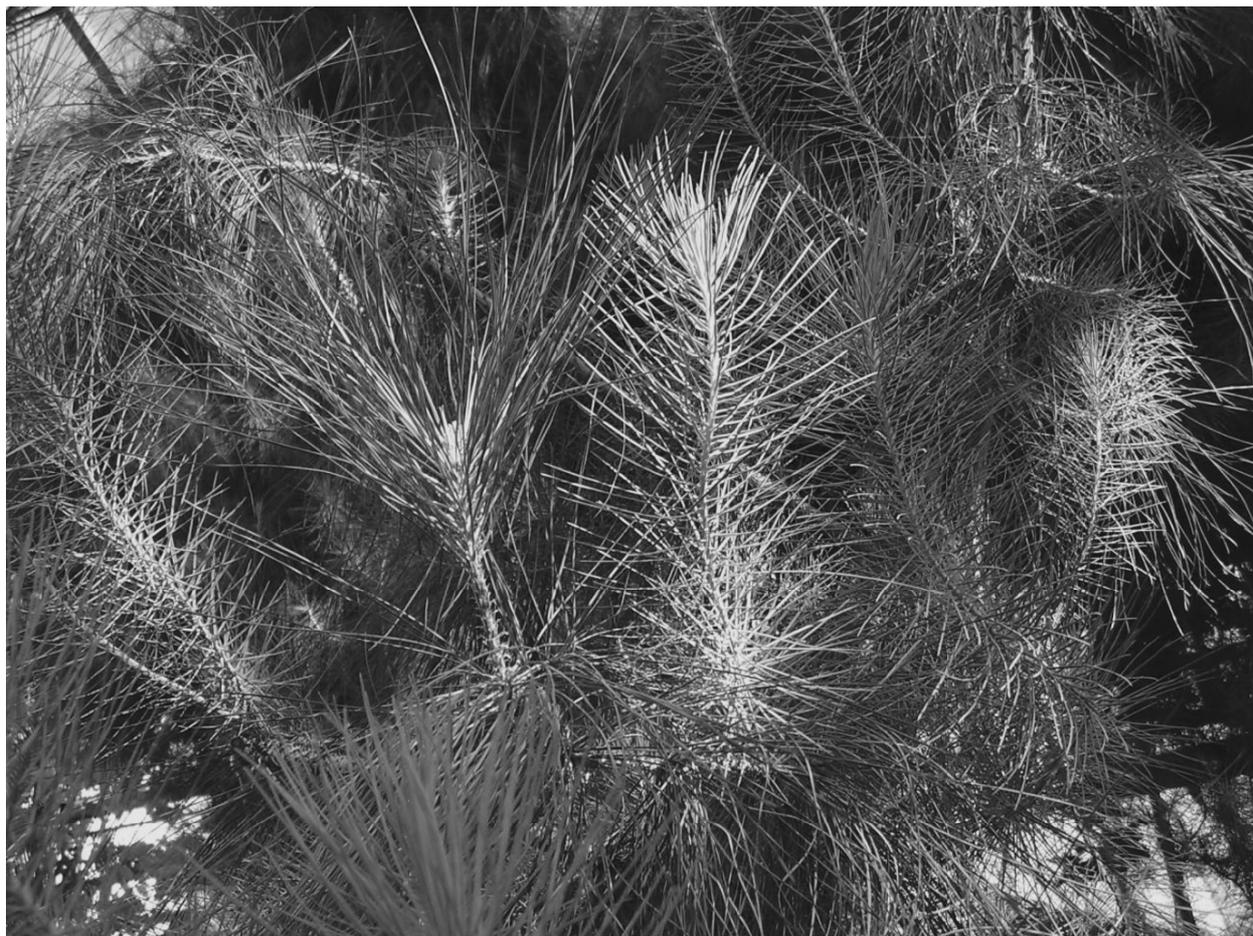


Рис. 4. Побеги *Pinus canariensis* с разной структурой, растущие рядом в кроне дерева.

верхние представляют собой зачатки чешуй верхушечной почки следующего прироста побега. В пазухах этих самых нижних и самых верхних чешуй нет зачатков пазушных почек, а большинство чешуй в средней части оси почки имеют такие зачатки. Из этих зачатков при распускании почки начинают расти брахибласты.

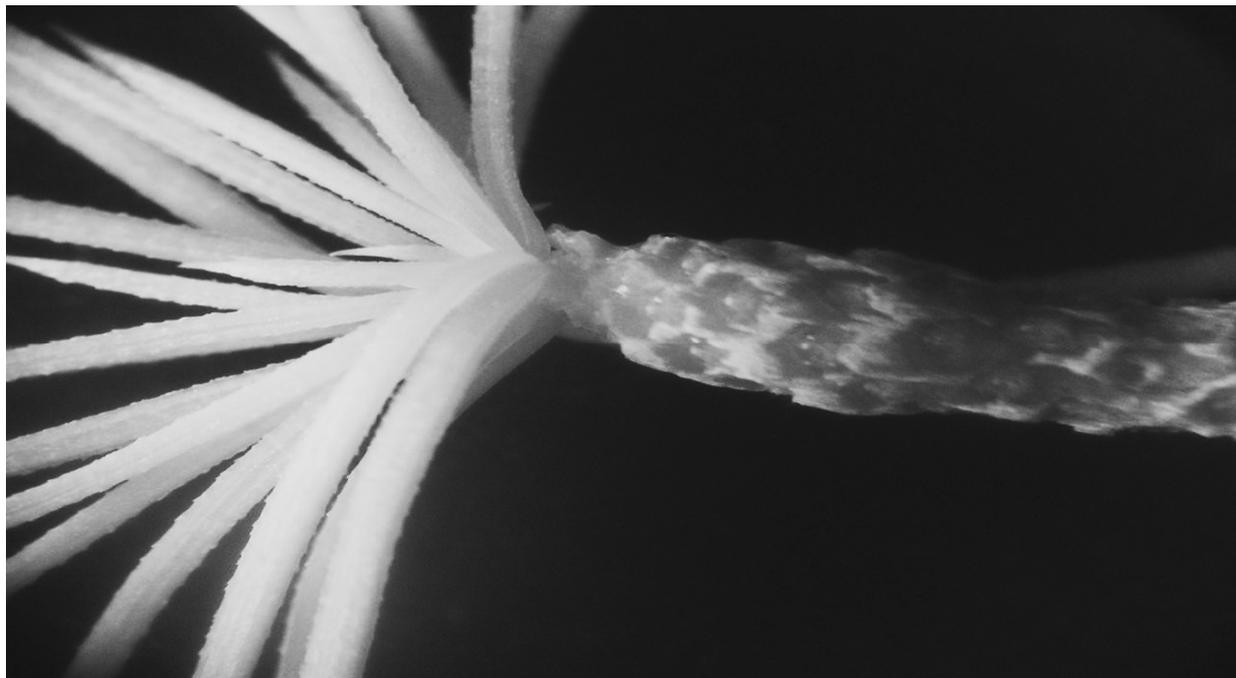
Рядом с верхушечной почкой, чуть ниже ее формируются крупные пазушные почки, из которых вырастают боковые удлиненные побеги — ауксибласты. В результате этого на оси образуются мутовки боковых ауксибластов. Образование в кроне дерева мутовок боковых ветвей характерно для всех видов сосны.

У чешуй в самой нижней части оси элементарного побега пазушных почек не образуется. Чешуи этой нижней зоны, формировавшие наружный покров у еще не распутившейся почки, при распускании почки не опадают. Из них формируется почечное кольцо, по которому узнается граница между соседними приростами (элементарными побегами) оси побега со зрелой структурой.

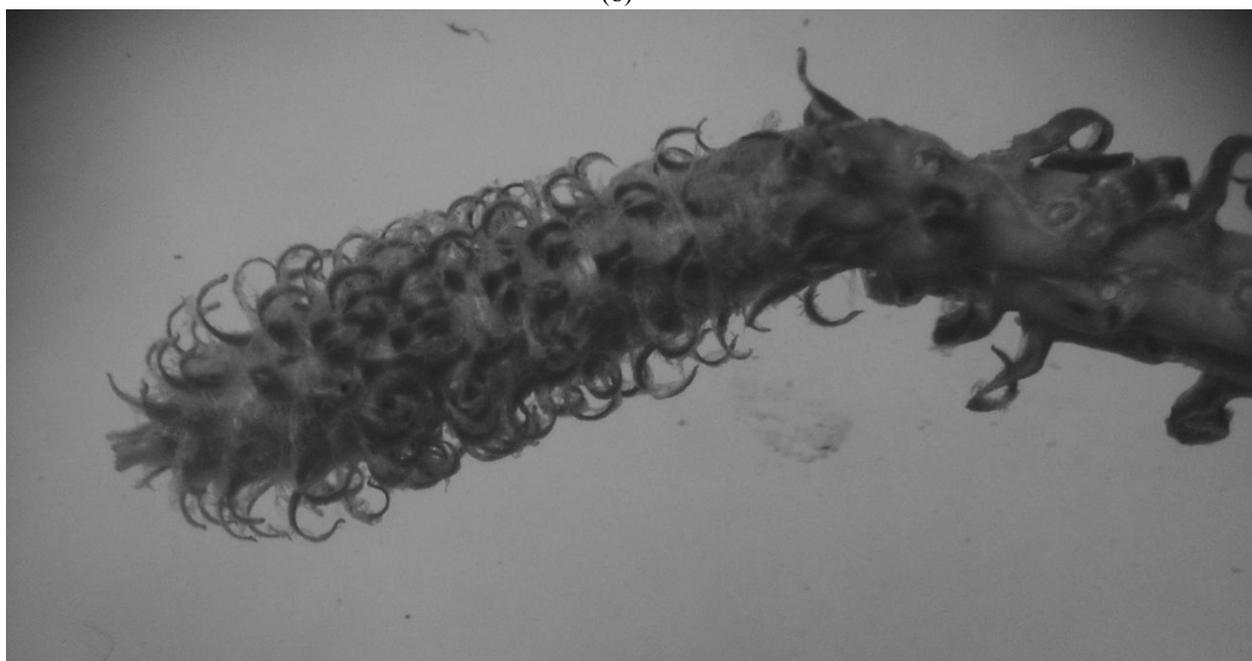
После распускания верхушечной почки из нее вырастает новый прирост оси материнского побега, образующий новый элементарный побег, а из соседних с ней крупных пазушных почек вырастает мутовка боковых ауксибластов. У всех сосен верхушечный ауксибласт и боковые ауксибласты имеют зрелую структуру. (Артемов, 1981; Чепик, 1982; Горошкевич, 1994; Горошкевич, Попов 2004). Но у исследованного нами дерева *Pinus canariensis* это наблюдается не всегда. Иногда из этих почек на его побегах со зрелой структурой начинают вырастать побеги с ювенильной структурой. Эти побеги вырастают как из верхушечных почек, так и из верхних пазушных почек (рис. 6, 7).

У нового вырастающего из верхушечной почки побега с ювенильной структурой нижняя часть его оси морфологически не отличается от нижней зоны оси побега со зрелой структурой. Но выше этой зоны стебель становится тоньше и вместо чешуй на нем начинает расти одиночная хвоя, а не брахибласты (рис. 7). У следующих выше расположенных метамеров этого побега в пазухах ювенильных хвоинок начинают формироваться

(a)



(б)



**Рис. 5.** Апексы побегов *Pinus canariensis*. (а) – апекс побега с ювенильной структурой, у которого удалена ювенильная хвоя, расположенная ниже апекса. (б) – верхушечная почка побега со зрелой структурой, у которого удалены брахибласты ниже верхушечной почки.

пазушные почки, из которых вырастают брахибласты (рис. 8). Еще выше по оси этого побега вместо ювенильной хвои снова формируются чешуи. Переход от формирования ювенильных хвоинок к формированию чешуй происходит не сразу, а плавно. У первых чешуй их верхняя часть обычно

зеленая и сохраняет такую же форму, как у ювенильных хвоинок. Длина их тоже больше, чем у следующих за ними выше расположенных уже полностью сухих чешуй. В пазухах этих чешуй тоже формируются брахибласты, в результате чего побег вновь приобретает зрелую структуру. Таким



**Рис. 6.** Формирование побегов с ювенильной структурой из верхушечной и верхней пазушной почек на побеге со зрелой структурой.

образом нижняя часть элементарного побега имеет ювенильную структуру, а верхняя часть зрелую. Следующий прирост этого побега, новый элементарный побег, тоже имеет зрелую структуру, но из его верхушечной почки часто вырастает побег опять с ювенильной структурой (рис. 9). В результате этого вдоль моноподиально нарастающей оси одного побега происходит чередование зрелой и ювенильной структуры.

Развитие боковых побегов у этого дерева канарской сосны часто начинается с формирования ювенильной структуры с последующим переходом к зрелой структуре. Их первый элементарный побег имеет ювенильную хвою (рис. 10), а следующие элементарные побеги формируют зрелую структуру с брахибластами.

Ритм в росте побегов у сосен очень четко отражается в их структуре в виде чередования участков оси побега без брахибластов и с брахибластами. У исследованного нами дерева канарской сосны такой ритм в структуре особенно четко проявлялся на побегах со зрелой структурой. Этот ритм проявился также в изменении длины меж-

доузлий у последовательных метамеров побега, хотя его трудно обнаружить, так как междоузлия очень короткие. Тем не менее наши определения средней длины междоузлий на разных участках оси побега показали, что она всегда больше на участках с брахибластами, чем на участках без брахибластов. У первых она равна 1–2.5 мм, а у вторых всегда меньше 1 мм. У побегов с чередованием вдоль их осей зрелой и ювенильной структур этот ритм тоже был виден, когда смена структур происходила в пределах одного элементарного побега (рис. 9 и 10). Если же побег долго рос как ювенильный, то на его длинной оси, которая иногда достигала 50–70 см, нельзя было увидеть проявление ритма и выделить отдельные элементарные побеги. Однако и у этих побегов тоже наблюдалось периодическое небольшое изменение длины ювенильной хвои на отдельных участках, расположенных вдоль оси побега. Но эти изменения не имели такой четкой ритмичности, как у побегов со зрелой структурой.

Подводя итог описанию структуры побегов исследованного нами дерева канарской сосны, можно сделать вывод, что основной особенно-



**Рис. 7.** Участок моноподиально нарастающей оси побега *Pinus canariensis* в зоне перехода от зрелой структуры к ювенильной.



**Рис. 8.** Брахибласты вырастают в пазухах ювенильных одиночных хвоинок.



**Рис. 9.** Три последовательных элементарных побега на моноподиально нарастающей оси побега *Pinus canariensis*. Нижний элементарный побег в нижней половине своей оси имеет ювенильную структуру, а в верхней половине — зрелую структуру. Средний элементарный побег весь имеет зрелую структуру. Верхний элементарный побег начал расти с ювенильной структурой.



**Рис. 10.** Осевой и боковой побеги *Pinus canariensis*. Первый прирост бокового побега имеет ювенильную структуру, переходящую в зрелую.

стью этого дерева *Pinus canariensis* является периодическая смена ювенильной и зрелой структур на одной и той же моноподиально нарастающей оси многолетнего побега. Эта смена структур отличается от описанного Н.П. Кренке явления циклического омоложения у побегов многих древесных растений. Отличие заключается в том, что омоложение, проявляющееся в формировании ювенильной структуры, возникает не только при прорастании боковых побегов, как это происходит при омоложении у многих древесных растений, а при росте одной и той же моноподиально нарастающей оси одного побега. Это означает, что омоложение у исследованного нами дерева происходит не только при возникновении новой апикальной меристемы, из которой вырастает на материнской оси боковой побег, а периодически омолаживается и потом стареет одна и та же апикальная меристема материнского побега.

Возможной причиной такого своеобразия циклического омоложения у исследованного нами дерева является отличие внешних условий в оранжерее, где оно растет, от внешних условий в районах естественного произрастания *Pinus canariensis*. Однако, качеством внешних условий нельзя объяснить возникновение омоложения и других возрастных изменений в развитии как растений, так и других живых организмов. Решением этой проблемы биологическая наука занимается уже более сотни лет, но она до сих пор не решена. Дальнейшее исследование явления циклического омоложения у побегов растений может содействовать ее решению.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артемов В.А.* Морфогенез побегов сосны // глава в книге “Эколого-биологические основы повышения продуктивности таежных лесов Европейского Севера”. Л.: Наука, 1981. 231 с.
- Боголюбов А.С.* Возобновление канарской сосны после пожара — стволовая поросль, январь 2008 г. // сайт в интернет [www.ecosystema.ru](http://www.ecosystema.ru)
- Горошкевич С.Н.* О морфологической структуре и развитии побегов *Pinus sibirica* (Pinaceae) // Ботанич. Ж. 1994. Т. 59. № 3. С. 63–71.
- Горошкевич С.Н., Попов А.Г.* Структура побегов у российских видов *Pinus* из группы *Sembrae* (Pinaceae) // Ботанич. Ж. 2004. Т. 89. № 7. С. 1077–1092.
- Кренке Н.П.* Теория циклического старения и омоложения растений. М.: 1940. 135 с.
- Кренке Н.П.* Регенерация растений. М.—Л.: изд. АН СССР, 1950. 675 с.
- Минина Е.Г.* О морфогенезе кедр сибирского // Лесоведение. 1971. № 4. С. 27–36.
- Минина Е.Г.* Пол у сосны обыкновенной // Вопросы физиологии половой репродукции хвойных. Красноярск, 1975. С. 68–89.
- Михалева О.Б.* О биологии кедрового стланика на Камчатке // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки 1960. № 3. С. 136–141.
- Михалева О.Б.* Развитие почек сосны обыкновенной в условиях Московской области // Бюлл. ГБС, 1962. Вып. 48. С. 61–68.
- Некрасова Т.П.* Биологические основы семеношения кедр сибирского. Новосибирск, 1972. 274 с.
- Серебряков И.Г.* Экологическая морфология растений. М., 1962. 378 с.
- Чепик Ф.А.* К вопросу об образовании почек у *Pinus sylvestris* L. // Ботанич. Ж. 1968. Т. 53. № 11. С. 1627–1630.
- Чепик Ф.А.* Особенности строения и формирования замещающих побегов у *Pinus sylvestris* // Ботанич. журн. 1974. Т. 59. № 3. С. 426–433.
- Чепик Ф.А.* Биология развития и типы морфогенеза побегов древесных растений. Л.: ЛТА, 1982. 72 с.
- Krussman G.* Handbuch der Nadelgehölze. 2 neubearbeitete Auflage. Berlin—Hamburg, 1983. 480 s.
- Mirov N.T.* The genus *Pinus*. The Ronald Press Company. Copyright, 1967. 602 p.
- Page C.N.* Morphology and Affinities of *Pinus canariensis*. Notes of the Royal Botanic Garden Edinburgh. 1974. V. 33. P. 317–323.

### Cyclic Rejuvenation in the Development of Shoots of Canary Island Pine (*Pinus canariensis* C. Sm.)

O. B. Mikhalevskaya and A. A. Shabasheva

Moscow State Pedagogical University, Moscow, 129278 Russia

e-mail: [olgaml8@yandex.ru](mailto:olgaml8@yandex.ru)

**Abstract**—Age-related changes in the structure of shoots are described for a 6-m Canary Island pine tree (*Pinus canariensis* C. Sm.) growing in a greenhouse. These changes in the structure of monopodial shoots of the crown have a periodic character and are manifested in the form of a cyclic rejuvenation.

**Keywords:** ontogenesis, shoot structure of woody plants, cyclic rejuvenation.

УДК 581.1:577.214.625:578.853

## ВЛИЯНИЕ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *NtEXPA5* НА РАЗМЕРЫ КЛЕТОК И РОСТ ОРГАНОВ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

© 2013 г. Б. Р. Кулуев, М. Г. Сафиуллина, А. В. Князев, А. В. Чемерис

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450054 Уфа, ул. Проспект Октября, д. 71

E-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 10.10.11 г.

Окончательный вариант получен 16.12.11 г.

Получены трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие ген *NtEXPA5*, кодирующего  $\alpha$ -экспансин *Nicotiana tabacum*. Трансгенные растения характеризовались увеличением размеров листьев и стеблей, при этом величина цветков оставалась практически неизменной. Увеличение размеров органов было обусловлено стимулированием только клеточного растяжения, при этом число клеточных делений даже уменьшалось. Полученные данные свидетельствуют о тесном взаимодействии регуляции клеточного растяжения и клеточного деления, которые вместе являются основными механизмами контроля величины органов растений.

**Ключевые слова:** экспансины, клеточное растяжение, клеточное деление, величина органов, *NtEXPA5*, сверхэкспрессия, трансгенные растения, *Nicotiana tabacum*.

DOI: 10.7868/S0475145013010059

### ВВЕДЕНИЕ

Во многих морфогенетических процессах у растений, которые регулируются фитогормонами и множеством белковых факторов, важная роль принадлежит экспансином. Экспансины — белки, участвующие в разрыве нековалентных связей между целлюлозными микрофибриллами и гликановыми поперечными мостиками (см. обзор Шаровой, 2007). Благодаря своим способностям разрывать клеточную стенку, экспансины стимулируют клеточное растяжение и таким образом участвуют в контроле роста всех органов растений. Было показано, что экспансины участвуют в регуляции таких физиологических процессов, как прорастание семени, развитие корня и листа, размягчение плодов, ответные реакции на стресс и многих других. Экспансины являются консервативными щелочными белками, непосредственно не обладающими ферментативной активностью, при этом они подразделяются на  $\alpha$ - и  $\beta$ -экспансины, сходство между последовательностями нуклеотидов которых составляет 20–40%, а топологическое сходство третичной структуры доходит до 75%. Анализ промоторов генов экспансинов риса показал наличие доменов связывания с ауксинами, гиббереллинами, брассиностероидами, цитокининами и этиленом (Lee et al., 2001). Таким образом, экспрессия экспансинов контролируется

многими фитогормонами, которые служат сигнальными молекулами при регуляции формообразовательных и деструктивных процессов в растениях (Azeez et al., 2010; Park et al., 2010). Кроме экспансинов в регуляции клеточного растяжения участвуют большое количество других белковых факторов, таких как ARL (Hu et al., 2006), GRF5 (Horiguchi et al., 2005), XET (Nishikubo et al., 2007) и другие. Эти белковые факторы и фитогормоны функционируют совместно, формируя сложную сеть клеточной сигнализации, контролирующей клеточное растяжение. При этом процессы клеточного растяжения и клеточного деления тесно связаны друг с другом через многочисленные точки взаимодействия сигнальных молекул (Horiguchi et al., 2005).

В каждом растении присутствуют большое количество разнообразных экспансинов, но лишь у немногих растений они идентифицированы и определены их функции. Например, в геноме арабидопсиса было обнаружено 26 генов  $\alpha$ -экспансинов и пять  $\beta$ -экспансинов, в геноме риса — 26 генов  $\alpha$ - и 14 генов  $\beta$ -экспансинов (Cosgrove et al., 1997).

Одним из эффективных методов изучения экспансинов является получение трансгенных форм с повышенным или пониженным уровнем экспрессии целевых генов и проведение морфофизиоло-

гического анализа опытных растений в сравнении с контрольными (Cho et al., 2000). Таким способом, например, было показано, что повышенная экспрессия гена *AtEXPA1* арабидопсиса приводит к задержке роста побегов, особенно в ранней фазе вегетативного роста (Гао и др., 2010). Трансгенные по гену *AtEXPA10* растения характеризовались увеличением длины черешков и площади листовой пластинки (Cho et al., 2000). Эктопическая экспрессия гена *PttEXPA1* осины (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) способствовала увеличению размеров междоузлий и площади листьев (Gray-Mitsumune et al., 2008). Таких исследований с каждым годом становится все больше, при этом наиболее частым фенотипическим проявлением сверхэкспрессии экспансинов является увеличение размеров клеток растений. Что касается табака, то у него на данный момент идентифицировано лишь 6 генов  $\alpha$ -экспансинов (Link et al., 1998), которые получили названия *NtEXPA*, с порядковыми номерами от 1 до 6, и их нуклеотидные последовательности имеются в GenBank (AF049350–AF049355). Эксперименты по получению трансгенных растений табака с измененным уровнем экспрессии данных экспансинов не проводились, поэтому точно не известно, за какие процессы они несут ответственность в организме табака. Наличие в геноме растений большого количества генов различных экспансинов пока не находит точного объяснения, поэтому представляет большой интерес изучение их по отдельности, с целью выяснения функции каждого из них. В данной работе в качестве объекта исследования нами был выбран ген *NtEXPA5* табака. С целью изучения влияния эктопической экспрессии этого экспансина на величину органов и отдельных клеток, нами были получены трансгенные растения табака, с повышенным уровнем экспрессии целевого гена. Предполагалось, что трансгенные по гену *NtEXPA5* растения табака за счет увеличения размеров клеток, будут отличаться большими размерами органов. Однако изначально было неясно, какие именно органы будут преимущественно увеличиваться.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### *Бактериальные клетки, штаммы, плазмиды, генно-инженерные манипуляции*

В работе использованы бактерии *E. coli* штамма XL1-Blue и *A. tumefaciens* штамма AGL0. Из плазмид использовали T-вектор pKRX и бинарный вектор pCambia 1301 с геном устойчивости к гиромцину и репортерным геном *GUS* (CAMBIA, Австралия). В вектор pCambia 1301 по сайту *Sma*I была дополнительно вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора и сайта полиаденилирования. Геномную ДНК табака выделяли методом солевой экстракции (Aljanabi et al., 1997). Тотальную РНК выделяли тризолом фирмы Invitro-

gen (США). ОТ-ПЦР осуществляли при помощи MuLV-обратной транскриптазы (Fermentas, Литва). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса бактериальных колоний используя наборы фирмы Цитокин (Россия). Качество и количество выделенных препаратов определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (Bio-Rad, США). Для ПЦР использовали амплификаторы производства компании “ДНК-технология” (Россия). Ген *NtEXPA5* выделили из тотальной ДНК табака при помощи праймеров NtEXPF ACAATGGCAACATTCTCCATTATCTC и NtEXPR СТАСТТААТТААААТТGAGCCCc. Для ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5* использовали праймеры ATTCAACAATGGTTTAAACATGTG и TTGC-CATCCAGTATTAGACCCTTTA. Для получения ампликонов с “тупыми” концами использовали Pfu ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия), для “затупления” липких концов после рестрикции или амплификации использовали T4-ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Россия). Для поиска целевых клонов при лигировании в векторе pCambia 1301 использовали праймер 35ScambF: AGAGGAC-СТАACAGAАСТCG в паре с праймером 1301R TGCTCTAGCATTCGCCATTC. Из целевых генно-инженерных конструкций нарабатывались специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих пар праймеров: 35ScambF/NtEXPR, NtEXPF/1301R, 35ScambF/1301R, а при сочетании пар 35ScambF/NtEXPF, NtEXPR/1301R амплификация проходила лишь в случае антисмысловой ориентации гена *NtEXPA5*. После полной проверки полученный бинарный вектор с геном *NtEXPA5* под контролем 35S промотора вводили в клетки *A. tumefaciens* методом электропорации при помощи прибора фирмы Bio-Rad модели Micropulser. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, США). Поиск гомологичных генов осуществляли при помощи программы MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast, доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей открытых рамок считывания генов экспансинов и построения филогенетического дерева использовали метод CLUSTALW (программа MegAlign).

### *Получение трансгенных растений табака, морфологическая характеристика и условия выращивания растений*

Трансгенные формы табака (*Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR-1) получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков, для получения которых использовали листья растений

3-месячного возраста. Первичные трансгенные T<sub>0</sub>-побеги отбирали на селективной среде (соли среды МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0.1 мг/л НУК), содержащей 25 мг/л гигромицина (Нуг). Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* в листьях T<sub>0</sub>-побегов определяли гистохимически, используя субстрат X-Gluc (натриевая соль 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуроновой кислоты, Fermentas). Образцы ткани листьев инкубировали в течение ночи при 37°C в 0.1% растворе X-Gluc, содержащем 0.1 М натриевый фосфатный буфер (рН 7.0), 10 мМ Na<sub>2</sub>EDTA и 0.1% Triton X-100. После инкубации с гистохимическим реактивом в течение ночи, зеленые ткани отбеливались обработкой 70% этанолом и исследовались под стереомикроскопом на наличие синей окраски. Все полученные T<sub>0</sub> GUS+ побеги каждого варианта укореняли в присутствии 25 мг/л Нуг, затем переносили в почвенную смесь, довели до цветения, самоопыляли и получали семена (T<sub>1</sub> потомство).

Для контроля наследования трансгенов и определения количества вставок, часть T<sub>1</sub> семян каждой полученной линии поверхностно стерилизовали последовательным погружением в 70% спирт, 5% раствор гипохлорита натрия, промывали в стерильной дистиллированной воде и проращивали на среде МС с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия). Через 3 недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту сеянцев и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом  $\chi^2$  по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии с одной интегрированной копией трансгенов. Интеграцию собственно целевого гена в растительные геномы определяли с помощью ПЦР анализа.

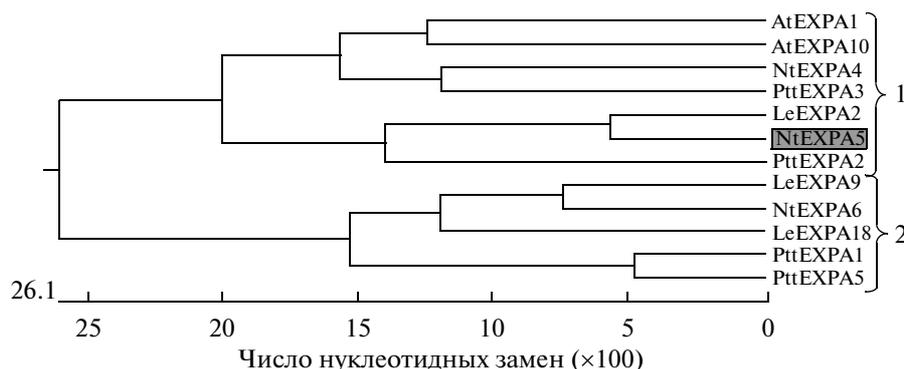
Растения трансгенных линий и контрольные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом ("Гера", Россия) на открытой светоплощадке при температуре 25–27°C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота) и освещенностью около 10 клк. Наблюдение за растениями поколения T<sub>1</sub> осуществляли начиная от стадии появления корешков до получения семян, что занимало от 4 до 6-ти месяцев. На чашках Петри отмечали время появления корешков, семядолей, оценивали скорость роста и дружность всходов. Замеры величины листьев производили только после пересадки в почву, через каждые 30, 45 дней и в период цветения), в итоге было осуществлено 3 замера. По каждому варианту (линия трансгенных растений) было отобрано по 5 растений, измеряли по три самых крупных нижних листа в длину, начиная от начала листовой пластины, по центральной жилке до самого кончика. Затем вычисляли среднее значение

длины листа для каждого растения. Длину стебля определяли в период цветения, так как стебель у табака начинал активно расти только через месяц после акклиматизации. Отмечали время перехода к цветению, определяли длину цветка, начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика. При этом измеряли длину 3-х цветков с каждого растения и вычисляли среднее значение. Определяли площадь 3-х самых крупных нижних листьев и вычисляли среднее значение. Для изучения влияния конститутивной экспрессии целевого гена на размер и количество клеток, проводили измерения площади клеток нижнего эпидермиса листьев одного возраста. Также определяли среднее число клеток, приходящихся на один лист и на 1 мм<sup>2</sup> листовой поверхности. Измерения проводили при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения. Кроме сравнительной морфологической характеристики, из растений выделяли ДНК и проводили ПЦР.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Поиск гомологов гена NtEXPA5 в GenBank, амплификация и получение генно-инженерных конструкций целевого гена в векторе pCambia 1301*

Выравнивание нуклеотидных последовательностей кДНК генов различных экспансинов арабидопсиса, табака, томатов и тополя размерами около 750 п.н. показало, что наиболее высоким уровнем сходства к гену *NtEXPA5* обладают гены *LeEXPA2* (AF096776) томатов *L. esculentum* (*S. lycopersicum*) и *PttEXPA2* (AY435100.1) осины *P. tremula* × *tremuloides*, которые с генами *AtEXPA1*, *AtEXPA10* арабидопсиса, *NtEXPA4* табака и *PttEXPA3* осины формируют отдельную родственную группу экспансинов (рис. 1). Наиболее близкой к этим экспансином является вторая группа, состоящая из генов *LeEXPA9*, *LeEXPA18*, *NtEXPA6*, *PttEXPA1* и *PttEXPA5* (рис. 1). Из литературных источников следует, что экспансины первой группы, а именно гены *AtEXPA10* (Cho et al., 2000), *PttEXPA2*, *PttEXPA3* (Gray-Mitsumune et al., 2004), *LeEXPA* (Argu et al., 2008) характеризуются высоким уровнем экспрессии в молодых листьях и принимают участие в регуляции роста и развития листьев. Исходя из этого, было высказано предположение, что сверхэкспрессия гена *NtEXPA5*, в первую очередь должна оказывать влияние на величину листьев. Другие экспансины на рисунке 1 не представлены, так как они обладают меньшей схожестью с исследуемым геном *NtEXPA5*. Для подбора праймеров и амплификации гена *NtEXPA5* табака была использована нуклеотидная последовательность под номером AF049354 из GenBank. Участок ДНК, содержащий ген *NtEXPA5*, был амплифицирован из геномной ДНК



**Рис. 1.** Результаты сравнительного анализа последовательностей нуклеотидов гена *NtEXPA5* с близкородственными экспансионами табака, томатов, арабидопсиса, тополя. Для выравнивания использовались нуклеотидные последовательности открытых рамок считывания кДНК генов экспансионов размером около 750 п.н. Показаны две отдельные ветви экспансионов, которые, возможно, выполняют разные функции.

табака и его размер составил около 1000 п.н. (рис. 2а). Ампликон был клонирован в фагмидном Т-векторе рKRX, а затем секвенирован. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что выделенная нами копия целевого гена полностью совпадает с теоретически ожидаемым и не содержит замен нуклеотидов. Ген *NtEXPA5* был выщеплен из вектора рKRX по сайту *BsePI*, а липкие концы затуплены Т4-ДНК-полимеразой. После этого по сайту рестрикции *SmaI* было осуществлено ненаправленное клонирование целевого гена в векторе рСambia 1301. Полученный в результате электропорации агробактериальный клон, содержащий вектор рСambia 1301 с целевым геном в сенсорной ориентации, был использован для экспериментов по трансформации листовых дисков табака и получения трансгенных растений.

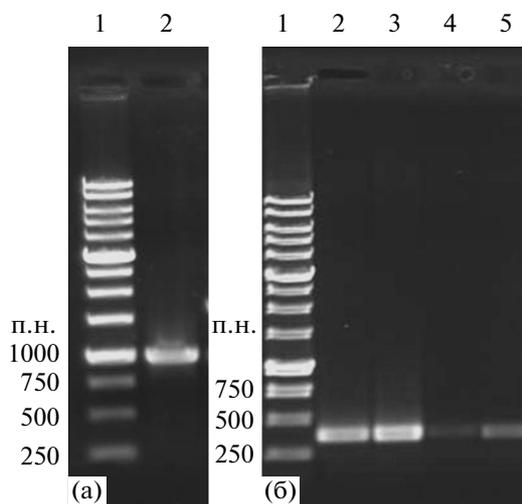
#### Получение трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*

В ходе агробактериальной трансформации листовых дисков табака целевой генно-инженерной конструкцией с геном *NtEXPA5* было отобрано 15 первичных побегов. Из них укоренились на селективной среде с гигромицином 8 растений, которые все показали активность репортерного гена *GUS* в листьях. Из этих растений шесть были успешно акклиматизированы к условиям почвы и отобраны для дальнейшей работы. Таким образом, было получено 6 линий трансгенных растений с номерами 4, 5, 6, 8, 12 и 15. Из первых четырех отобранных растений табака была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *NtEXPA5* и 35S промотора. Было показано, что все 4 отобранные растения содержат в своем геноме как целевой ген, так и 35S промотор. Экспрессия гена *NtEXPA5* в трансгенных растениях табака была доказана при помощи ОТ-ПЦР (рис. 2б), при этом в контрольных растениях уровень экспрессии был заметно ниже. Размер ампликона

при ОТ-ПЦР составил около 400 п.н., что совпадает с теоретически ожидаемым размером в 379 п.н. Из всех линий трансгенных растений были отобраны семена с целью получения второго поколения растений.

#### Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*

Семена шести линий трансгенных растений второго поколения были высеяны на селективную среду, где растения № 4 показали соотношение вы-



**Рис. 2.** Электрофореграмма ПЦР и ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5*. (а) — результаты ПЦР участка ДНК табака, содержащего ген *NtEXPA5*. 1 — маркеры молекулярной массы 250 п.н. — 10000 п.н. (Сибэнзим, Россия), 2 — ампликон гена *NtEXPA5* размером около 1000 п.н. (б) — результаты ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5*. 1 — маркеры молекулярной массы 250 п.н. — 10000 п.н. (Сибэнзим, Россия). 2, 3 — ампликоны кДНК гена *NtEXPA5* размером 379 п.н. из трансгенных растений. 4, 5 — ампликоны кДНК гена *NtEXPA5* из контрольных растений.

Морфофизиологические параметры контрольной группы, содержащей Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301, и трансгенных растений табака поколения T<sub>1</sub>, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5* арабидопсиса

Параметр	Линия контрольных растений pCambia 1301	Линии трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген <i>NtEXPA5</i>		
		pCambia 1301 NtEXPA5 № 4	pCambia 1301 NtEXPA5 № 5	pCambia 1301 NtEXPA5 № 6
<i>Длина листьев, см</i>				
30 дней	3.6 ± 0.3	2.7 ± 0.4	3.5 ± 0.2	4.4 ± 0.1
45 дней	10.3 ± 0.8	7.4 ± 0.9	7.7 ± 0.1	8.9 ± 0.4
В период цветения	17.2 ± 0.6	19 ± 0.1	20.9 ± 0.2	19.7 ± 0.2
<i>Площадь трех самых крупных листьев, см<sup>2</sup></i>	148 ± 2	162.7 ± 3.9	178.5 ± 6.2	178.0 ± 3.4
<i>Высота стебля, см</i>	78 ± 3	96.5 ± 0.5	113.5 ± 2.1	96.6 ± 1.9
<i>Длина цветка, см</i>	4.49 ± 0.01	4.55 ± 0.01	4.90 ± 0.03	4.88 ± 0.07
Площадь клеток эпидермиса листьев, мкм <sup>2</sup>	15472 ± 753	24342 ± 114	23303 ± 1582	19041 ± 261
Число клеток эпидермиса листьев на 1 мм <sup>2</sup>	71.5 ± 2.8	41.1 ± 0.2	44.1 ± 2.5	52.3 ± 0.8

живших и погибших 72 : 22, растения № 5 – 66 : 21 и растения № 6 – 82 : 23, что близко к классическому соотношению 3 : 1 ( $\chi^2 = 0.13; 0.03; 0.54$ , соответственно), а это косвенно предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена. Соотношение выживших и погибших у других трех линий растений было ближе к значению 15 : 1, что предполагает двойное встраивание трансгена, поэтому эти растения в дальнейших экспериментах не использовались. По 5 растений отобранных линий № 4, № 5 и № 6 были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфофизиологической характеристике. В качестве контроля использовали линию трансгенных растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора без целевого гена (pCambia 1301 № 5).

Через 30 и 45 дней после акклиматизации опытные и контрольные растения практически не отличались по длине листьев (таблица). В то же время в период цветения листья у опытных растений были длиннее на 10–22% (рис. 3 и 4). По площади листьев трансгенные растения также характеризовались увеличением на 10–21% (таблица). По высоте стебля опытные растения были заметно выше контрольных, и разница составляла у линии № 4 и № 6 24%, а у линии № 5 – 46%. По длине цветка различия между опытными и контрольными растениями были небольшими и в целом составили от 1% у линии № 4 до 9% у линий № 5 и № 6 (таблица). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения не различались (рис. 3).

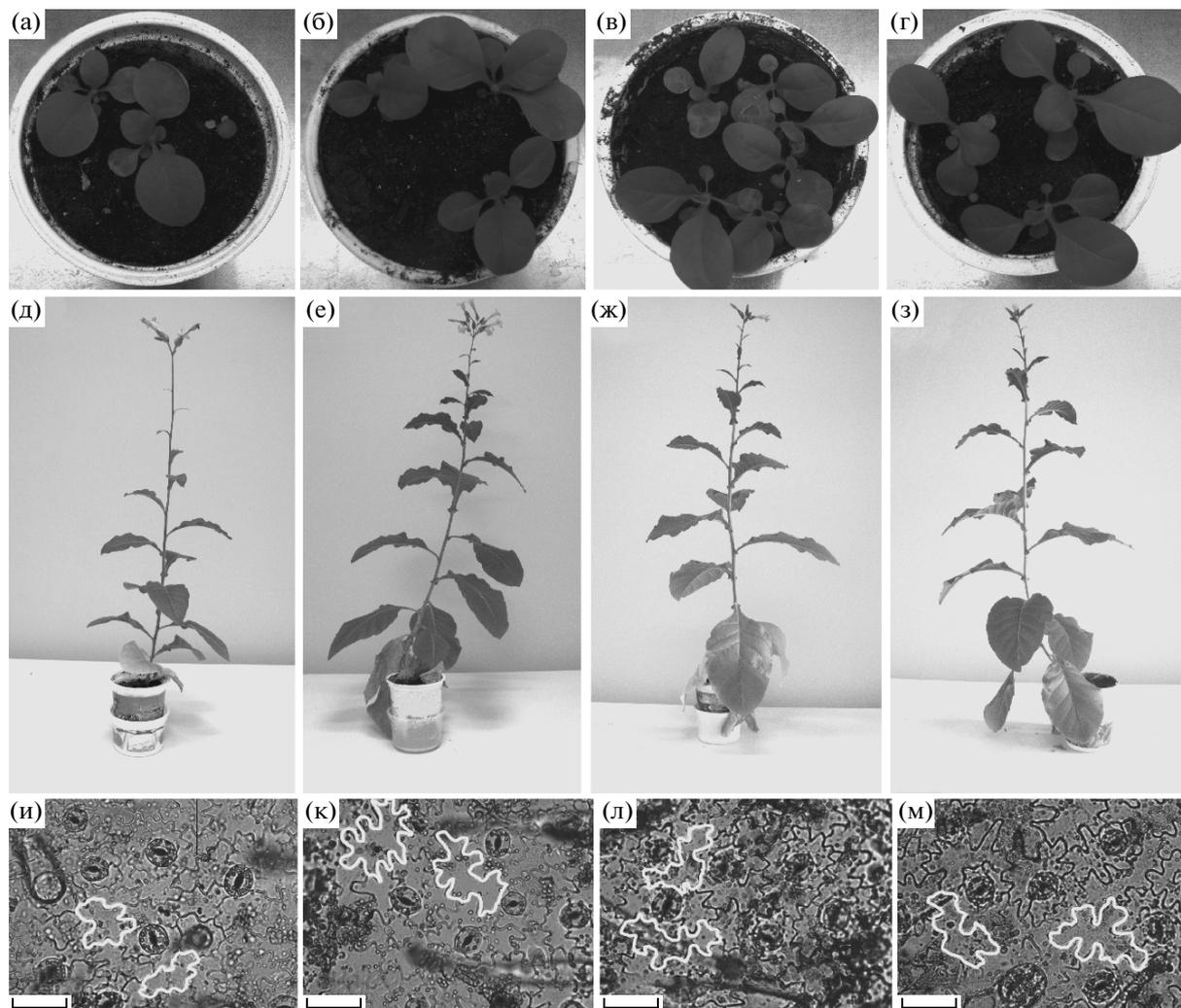
Для выяснения причины увеличения размеров листьев и стебля, нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса ли-

стьев. Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток, так и за счет стимуляции клеточного деления. Трансгенные по гену *NtEXPA5* растения, в отличие от контрольных растений, характеризовались увеличенными размерами клеток эпидермиса листьев (рис. 3). При этом у линии № 4 клетки были больше на 57%, у линии № 5 на 51%, а у линии № 6 на 23% крупнее, чем у контрольных растений (рис. 4). Из полученных данных видно, что размеры клеток у опытных растений увеличивались в гораздо большей степени, чем размеры отдельных органов (рис. 4).

Выявленные различия в размерах клеток эпидермиса сохранялись и при измерении площади клеток мезофилла листьев и эпидермиса цветков. Например, клетки мезофилла листьев по сравнению с контролем были увеличены в среднем на 20–40%, а размеры клеток эпидермиса цветков лишь на 10–15%. То есть сверхэкспрессия гена *NtEXPA5* в первую очередь влияла на величину клеток листьев, а размеры клеток эпидермиса цветков изменялись в гораздо меньшей степени.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *NtEXPA5* по схожести нуклеотидных последовательностей оказался наиболее близким к экспансионам, участвующим в регуляции роста и развития листьев. Действительно, эктопическая экспрессия гена *NtEXPA5* приводила, в первую очередь к увеличению размеров листьев, но в то же время у анализируемых растений были существенно увеличены и размеры стебля. Ранее нами были получены трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие гены *AtEXPA10* арабидопсиса и

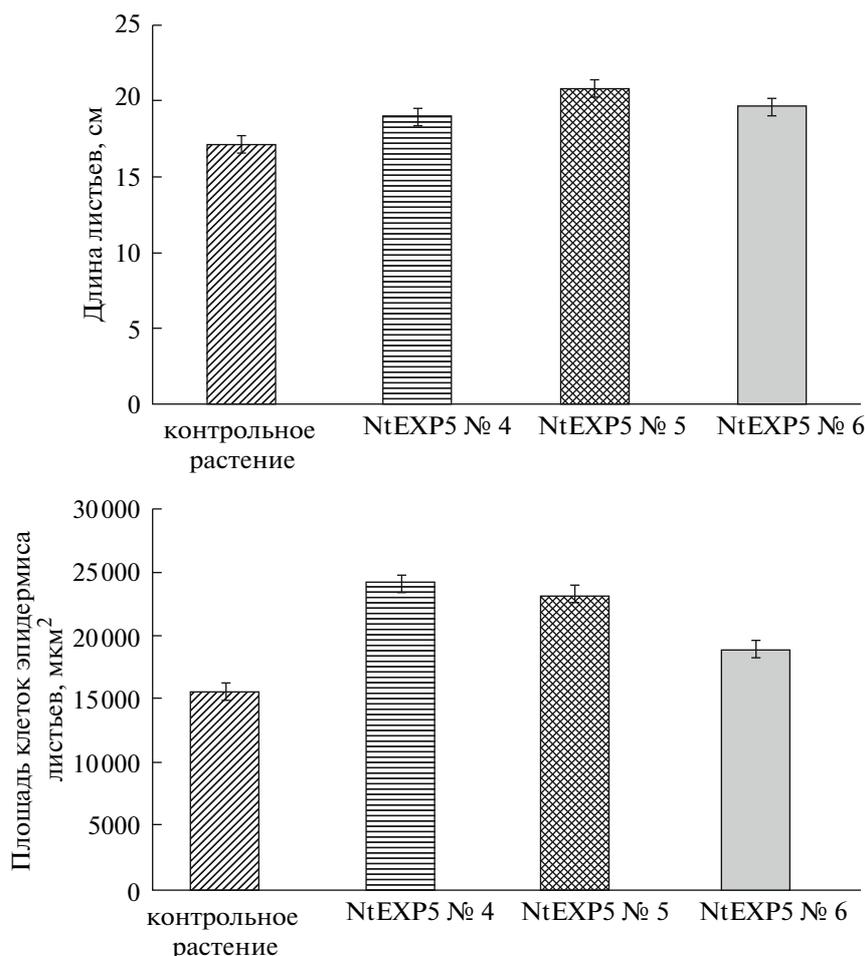


**Рис. 3.** Сравнение трансгенных растений поколения  $T_1$  сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*, и контрольной группы, содержащей в своем геноме векторную молекулу без целевого гена. (а) – контрольные растения через 30 дней после акклиматизации; (б–г) – трансгенные растения через 30 дней после акклиматизации; (д) – контрольные растения в период цветения; (е–з) – трансгенные по гену *NtEXPA5* растения табака в период цветения; (и) – клетки эпидермиса листьев контрольных растений табака, увеличение 200 $\times$ ; (к–м) – клетки эпидермиса листьев трансгенных по гену *NtEXPA5* растений табака, увеличение 200 $\times$ . Шкала 50 мкм.

*PnEXPA1* тополя черного (Кулуев и др., 2012). Трансгенные по генам *AtEXPA10* и *PnEXPA1* растения характеризовались увеличением размеров листьев на 20–40%, а у трансгенных по гену *NtEXPA5* растений листья были больше лишь на 10–20%. Интересно отметить, что стебли у трансгенных по гену *NtEXPA5* растений табака были больше, чем у контрольных растений на 24–46%, против разницы в 16–29% в случае с генами *AtEXPA10* и *PnEXPA1*. Отсюда можно сделать вывод о том, что эктопическая экспрессия гена *NtEXPA5* в первую очередь влияет именно на рост стебля в длину, а на рост листьев в меньшей степени. Повышенная экспрессия гена *NtEXPA5* практически не влияла на рост цветков, что может объясняться компенсаторным влиянием других путей генетического

контроля размеров цветков у табака. Повышенный уровень экспрессии гена *NtEXPA5* мог привести и к уменьшению размеров органов (Гао и др., 2010), однако все проанализированные нами трансгенные растения характеризовались увеличением размеров всех вегетативных органов или соответствием контрольным растениям.

Как и предполагалось, все полученные трансгенные растения отличались увеличением размеров клеток эпидермиса и паренхимы листьев. В среднем величина клеток увеличивалась на 25–55%, при этом листья у анализируемых растений увеличивались лишь на 10–20%. Это говорит о том, что в листьях трансгенных растений происходило компенсаторное уменьшение количества клеток, что способствовало, сохранению размеров



**Рис. 4.** Сравнительный анализ длины листьев и размеров клеток эпидермиса листьев трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген *NtEXPA5*.

органов близких к размерам органов контрольных растений. В связи с полученными данными не исключается, что сверхэкспрессия экспансинов влияет негативно на уровень экспрессии различных транскрипционных факторов, стимулирующих клеточное деление, например, AP2-фактора AINTEGUMENTA (Mizukami et al., 2000), при этом сигнальными молекулами могут оказаться различные фитогормоны.

Результаты наших исследований показывают, что ген *NtEXPA5* может быть применен для создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов. Особенно данный ген актуален для увеличения длины стебля, что может иметь практическое значение в лесной биотехнологии. Однако применение этого гена ограничивается компенсаторным механизмом в растениях, направленным на поддержание гомеостаза. Для преодоления этих трудностей необходимо вместо конститутивных использование тканеспецифичных и индуцибельных промоторов, а также, наряду со сверхэкспрессией экспансинов, одновременно стимулировать

биосинтез транскрипционных факторов, регулирующих клеточное деление, уровень экспрессии которых в трансгенных по экспансином растений, по всей видимости, снижен.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (контракт № 16.518.11.7047).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гао К., Лю К., Лю И.Т. Специфическая роль АТЕХР1 при росте и адаптации растений *Arabidopsis* к стрессу // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 2. С. 245–253.
- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П. и др. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов *AtEXPA10* арабидопсиса и *PnEXPA1* тополя // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 108–117.
- Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 805–819.

- Aljanabi S.M., Martinez I.* Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4692–4693.
- Arru L., Rognoni S., Poggi A. et al.* Effect of sugars on auxin-mediated *LeEXPA2* gene expression // *Plant Growth Regul.* 2008. V. 55. P. 11–20.
- Azeez A., Sane A.P., Tripathi S.K. et al.* The gladiolus *GgEXPA1* is a GA-responsive alpha-expansin gene expressed ubiquitously during expansion of all floral tissues and leaves but repressed during organ senescence // *Postharvest Biology and Technology.* 2010. V. 58. P. 48–56.
- Cho H.T., Cosgrove D.J.* Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 9783–9788.
- Cosgrove D.J., Bedinger P.A., Durachko D.M.* Group I allergens of grass pollen as cell wall loosening agents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 6559–6564.
- Gray-Mitsumune M., Blomquist K., McQueen-Mason S. et al.* Ectopic expression of a wood-abundant expansin PttEXPA1 promotes cell expansion in primary and secondary tissues in aspen // *Plant Biotechnol. J.* 2008. V. 6. P. 62–72.
- Horiguchi G., Kim G.T., Tsukaya H.* The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2005. V. 43. P. 68–78.
- Hu Y., Poh H., Chua N.* The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // *The Plant J.* 2006. V. 47. P. 1–9.
- Lee Y., Choi D., Kende H.* Expansins: over-expanding numbers and functions // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001. V. 4. P. 527–532.
- Link B.M., Cosgrove D.J.* Acid-growth response and alpha-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 907–916.
- Mizukami Y., Fisher R.L.* Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 942–947.
- Nishikubo N., Awano T., Banasiak A. et al.* Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar – a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 843–855.
- Park C.H., Kim T.W., Son S.H. et al.* Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Phytochemistry.* 2010. V. 71. P. 380–387.

## Effect of Ectopic Expression of *NtEXPA5* Gene on Cell Size and Growth of Organs of Transgenic Tobacco Plants

**B. R. Kuluev, M. G. Safiullina, A. V. Knyazev, and A. V. Chemeris**

*Research Institute for Biochemistry and Genetics, Scientific Center of Ufa, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Bashkortostan, Russia*  
e-mail: kuluev@bk.ru

**Abstract**—We obtained transgenic tobacco plants demonstrating overexpression of *NtEXPA5* gene that encodes  $\alpha$ -expansin of *Nicotiana tabacum*. The transgenic plants were characterized by increased size of leaves and stems. However, size of flowers remained almost unchanged. The increase of organ sizes was induced by cell stretching only. Moreover, the number of cell divisions was even decreased. The obtained data suggest tight interaction between cell stretching regulation and cell division, which together provide the basic mechanism aimed at the controlling of plant organ sizes.

**Keywords:** expansins, cell stretching, cell division, organ size, *NtEXPA5*, overexpression, transgenic plants, *Nicotiana tabacum*.

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 591

УЧАСТИЕ MAP-КИНАЗНОГО СИГНАЛИНГА В СПЕЦИФИКАЦИИ  
КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ДОРСОВЕНТРАЛЬНОЙ ОСИ  
У ПРИМИТИВНОЙ ГАСТРОПОДЫ *TESTUDINALIA TESTUDINALIS*  
(*PATELLOGASTROPODA*, *MOLLUSCA*)

© 2013 г. В. В. Козин, Р. А. Бабаханова, Р. П. Костюченко

Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9  
E-mail: kostyuch@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.11 г.  
Окончательный вариант получен 15.08.12 г.

Известно, что спецификация клеточных линий во время развития у Spiralia обеспечивается материнскими факторами. Однако недавние исследования продемонстрировали важность индуктивных процессов, существенным элементом которых служит клеточный сигналинг. Наши данные дают основания говорить о зависимой спецификации ряда клеточных линий на ранних стадиях развития моллюска *Testudinalia testudinalis* (*Testudinalia tessellata*, *Patellogastropoda*), в том числе, когда происходит определение клетки 3D, сопровождающееся изменением формы и установлением контактов с анимальными микромерами одним из макромеров третьего квартета. Именно в этот момент в бластомере-организаторе 3D была отмечена активация MAPK. При анализе влияния блокатора MAP-киназного пути U0126 на развитие *Testudinalia* нами было показано, что наибольший эффект ингибитора наблюдается при культивировании зародышей до шестого цикла дробления, при этом следует отметить, что имеется шкала корреляции выраженности дефектов и повышения концентрации. При длительном содержании объектов в растворе U0126 у значительной части личинок отмечено отсутствие функционирующего ретрактора, дезорганизация мышечной системы, ненормальное строение раковины (вплоть до полного отсутствия), паруса, ноги, мантийной складки. В то же время ни в одном из экспериментов не было получено полного нарушения спецификации дорсовентральной оси, приводящего к развитию личинки с четырехлучевой радиальной симметрией. Это говорит в пользу существования разных молекулярных механизмов определения вторичной оси тела среди животных группы Spiralia.

**Ключевые слова:** Spiralia, моллюски, клеточные линии, спецификация, цитодифференциация, оси зародыша, сигналинг, MAPK, эволюционный консерватизм.

DOI: 10.7868/S0475145013010035

Раскрытие механизмов детерминации клеточных линий и становления осевых отношений является актуальной задачей биологии развития. На примере представителей группы Spiralia, т.е. животных со спиральным типом развития (Аннелиды, Моллюски, Немертины и др.) исследования в этой области имеют более чем вековую историю. Однако сложность решения поставленных задач в немалой степени определяется многоуровневым взаимодействием в эмбриогенезе животных различных элементов генетических регуляторных сетей, управляющих как спецификацией определенного домена зародыша, так и клеточной пролиферацией, дифференциацией и морфогенезом.

Spiralia – группа типов животных, различающихся во взрослом состоянии строением тела. Молекулярный анализ, однако, в целом указывает на

близкородственные филогенетические отношения между представителями различных типов внутри этой группы (Peterson, Eernisse, 2001; Mallatt, Winchell, 2002; Nielsen, 2001, 2003; Baguna, Riutort, 2004). Кроме того, зародыши этих животных характеризуются высоким сходством развития, в частности дробление, гастрюляция и личиночный органогенез протекают в высшей степени сходно, вплоть до совпадения проспективного значения отдельных бластомеров (см. Иванова-Казас, 1995), а анализ клеточных линий обнаруживает потрясающий уровень консерватизма программ развития (Render, 1991, 1997; Dictus, Damen, 1997; Boyer et al., 1996, 1998; Maslakova et al., 2004; Henry, Martindale, 1998; Ackermann et al., 2005; Kostyuchenko, Dondua, 2006).

Характерной особенностью *Spiralia* является развитие с личинкой трохофорного типа, начальные этапы которого осуществляются путем так называемого спирального дробления. Получившиеся в ходе второго деления зиготы четыре клетки (позднее и совокупность потомков каждой из них) называют квадрантами (см. Иванова-Казас, 1975). Каждому квадранту принято давать буквенное обозначение *A*, *B*, *C* или *D*. Когда такие клетки одинаковы в размерах, дробление называют гомоквадрантным, если хотя бы одна из четырех клеток отличается по размеру – гетероквадрантным. В последнем случае, как правило, квадрант *D* является самым крупным. Он расположен на дорсальной стороне зародыша и во всех случаях спирального типа развития играет особую роль, являясь источником энтодермы и значительной части эктодермы тела животного. При эволюционно более древнем гомоквадрантном спиральном дроблении (Иванова-Казас, 1995) квадранты на ранних стадиях развития не отличаются друг от друга, пока не появятся признаки нарушения радиальной симметрии в пользу билатеральной путем изменения положения бластомеров и вычленения по морфологическим признакам квадранта *D*. До тех пор, пока квадранты неразличимы, макромеры принято обозначать буквой *Q* (или *M*), а микромеры – *q(m)*.

Изначально классическими экспериментами по изоляции или удалению бластомеров (Wilson, 1904a, b; Costello, 1945; Clement, 1952 и др.) было обосновано представление о том, что у *Spiralia* спецификация разнообразных клеточных линий во время развития личинки трохофоры обеспечивается материнскими факторами, которые синтезируются во время оогенеза. Как полагают, после оплодотворения эти детерминанты, иРНК и/или белки, в ходе ооплазматической сегрегации попадают в строго определенные бластомеры и дают начало специализированным клеточным клонам, которые используются как при формировании органов личинки, так и на более поздних стадиях развития. Однако уже классические эксперименты позволяли сделать вывод и о вероятных регулятивных процессах.

Так, Вилсон (Wilson, 1904b) описывает серию экспериментов с ранними зародышами моллюска *Dentalium*, развитие которого происходит с образованием сначала в ходе первого, потом второго деления дробления особого временного выроста, так называемой полярной лопасти. Каждый раз эта лопасть соединена тонким цитоплазматическим мостиком с одним из образующихся бластомеров и в конечном итоге наследуется бластомером *D*. Согласно результатам опытов по разделению бластомеров (Wilson, 1904a, b), из четырех имеющихся квадрантов только *D* способен к образованию клеток, дающих начало энтодерме. Если полярную лопасть, удалить, то такие “прооперирован-

ные” зародыши не образуют мезодермальные плоскости. Исследование постгастрюляционных зародышей (т.е. личинок), у которых была удалена первая полярная лопасть, показало отсутствие у них зачатков большинства органов, образование которых прямо или косвенно связано с мезодермой: зачатков раковинной железы, ноги и собственно целома.

Клемент (Clement, 1952, 1956, 1967, 1986a, b), на другом виде моллюсков, *Ilyanassa obsoleta*, пришел к выводу, что удаление как первой полярной лопасти, так и квадранта *D* или макромера *D* до отделения клетки *2d* приводит к резкому подавлению морфогенеза: у таких зародышей не образуются сердце и кишечник, а также раковина, глаза, нога и статоцист. Результаты, полученные Клементом, позволяют говорить о роли материала полярной лопасти у *Ilyanassa* при 1) детерминации линии клеток целомической мезодермы и ее производных и 2) детерминации структур, развивающихся из других клеток, под влиянием индукции со стороны производных энтодермы.

Позже было показано, что развитие некоторых эктодермальных производных зародышей и личинок *Ilyanassa obsoleta* требует индуктивных взаимодействий между микромерами и макромером квадранта *D* уже на стадии восьми бластомеров (Sweet, 1998).

Удаление у *Ilyanassa* полярной лопасти или макромеральной линии *D* вплоть до стадии сразу после образования *3D*, приводит к формированию радиально-, а не билатерально-симметричной личинки, т.е. личинки, не обладающей дорсовентральной осью (Clement, 1952, 1962). В своих экспериментах Клемент (Clement, 1962) обнаружил, что макромер *3D* индуцирует микромеры в период между формированием третьего квартета микромеров и мезентобласта *4d*, на стадии 24–28 клеток, т.е. незадолго до деления *3D* на дочерние бластомеры *4D* и *4d*. Долгое время место начала индукции и молекулярная природа индуктивного сигнала оставались неизвестными.

Важно отметить, что факт взаимодействий между анимальными микромерами и макромером *3D* отмечен и для животных с гомоквадрантным делением дробления, когда морфологически не выражены процессы асимметричного наследования на самых ранних циклах дробления. Так, зародыши моллюска *Patella vulgata* до стадии третьего квартета макромеров обладают четырехлучевой радиальной симметрией без признаков дорсовентральной полярности. Однако, вскоре после образования этих макромеров, один из них вытягивается и приходит в контакт с анимальными микромерами. Такой вытянутый макромер становится *3D*, т.е. мезодермообразующим и маркирующим дорсальную сторону, естественно, что и сами зародыши, начиная с этого момента, и личинки имеют

выраженную дорсовентральную ось (van den Biggelaar, 1977). При этом показано, что для эффекта дорсализации и мезодермализации необходима взаимная индукция макромера *3D* и анимальных микромеров (van den Biggelaar, Guerrier, 1979; Damen, Dictus, 1994, 1996).

Исключительная роль макромера *3D*, как в случае гомо-, так и гетероквадрантного спирального развития, позволяет называть этот бластомер эмбриональным организатором, т.к. он индуцирует разные судьбы (клеточные линии) у контактирующих с ним клеток и необходим для организации нормальных осевых отношений зародыша и в последствие личинки (Lambert, Nagy, 2001; Gonzales et al., 2007a). Существенным элементом индуктивных процессов, которые наряду с автономной спецификацией играют важную роль в раннем развитии *Spiralia*, служит так называемый сигналинг, т.е. молекулярные механизмы передачи сигналов от одной клетки к геному другой. МАРК (от англ. *mitogen activated protein kinase*) — первый известный элемент такой сигнальной системы у *Spiralia* (Lambert, Nagy, 2001, 2003). Сигнальный путь МАРК-киназы ERK (от англ. *extracellular signal-related kinase*) состоит из каскада последовательно фосфорилирующих друг друга консервативных белков с киназным доменом, эффекторами которого являются системы клеточного цитоскелета, пролиферации и дифференцировки (Ferrell, 1996; Garington, Johnson, 1999; Schohl, Fagotto, 2002; Sakaguchi et al., 2004). Этот каскад дифференциально активируется у зародыша *Ilyanassa* именно на стадии, когда происходит взаимодействие между макромером *3D* и микромерами, и первоначально активную форму МАРК обнаруживают в этом бластомере, однако вскоре сигнал появляется и в микромерах, что, как полагают, говорит о распространении индукционных взаимодействий, исходящих от *3D*. И, действительно, ликвидация источника сигнала, макромера *3D*, предотвращает нормальную активацию МАРК в микромерах (Lambert, Nagy, 2001).

Последние данные, полученные на нескольких видах моллюсков и одном виде полихет говорят в пользу участия каскада МАРК-киназы ERK в событиях раннего развития, причем, если у моллюсков как с гетероквадрантным типом спирального дробления (*Ilyanassa obsoleta*), так и с гомоквадрантным (*Chaetopleura apiculata*, *Patella vulgata*, *Tectura scutum*, *Haliotis asinina*, *Lymnaea palustris*) (Lambert, Nagy, 2001, 2003; Koop et al., 2007; Henry, Perry, 2008), активность сигналинга с участием МАРК-киназы обнаруживает бластомер-индуктор *3D*, у полихеты *Hydroides hexagonus* МАРК-киназный путь впервые проявляется у прямого потомка бластомера *3D* — микромера *4d*, производные которого служат источником образования мезодермы личинки и будущего червя (Lambert, Nagy, 2003). С целью понимания эволюции механизмов

спецификации клеточных линий и осевых отношений в раннем развитии *Spiralia*, безусловно, важно выяснить, насколько универсальны подобные различия между моллюсками и аннелидами. Однако на настоящем этапе исследований не менее важно понять степень универсальности подобных механизмов в развитии моллюсков, прежде всего наиболее примитивных, таких как *Patellogastropoda*. Поскольку имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о заметных отличиях в масштабе вовлечения МАРК-киназного каскада у разных видов и возможной корреляции роли МАРК со степенью примитивности животного, первоочередной задачей представляется проверка этих предположений на большем числе объектов.

В ходе настоящего исследования нами описаны этапы раннего развития примитивного моллюска *Testudinalia testudinalis* (*T. tessellata*, *Patellogastropoda*, *Mollusca*), представителя наиболее древней группы гастропод (Bouchet, Rocroi, 2005; Nakano, Ozawa, 2007), и проведен анализ возможного участия МАРК-киназного пути сигналинга в процессах ранней спецификации клеточных линий и дорсовентральной оси у данного объекта. Активация МАРК была выявлена иммуоцитохимически в бластомере-организаторе *3D*. Применение специфического блокатора МАРКК вызвало существенные нарушения развития отдельных тканей и органов, если действие ингибитора приходилось на стадии до шестого клеточного цикла. На основе экспериментальных данных мы предполагаем, что МАРК каскад может многократно вовлекаться в процессы взаимодействия бластомеров на этапах раннего дробления. Вместе с тем, очевидно, что спецификация мезодермы и дорсовентральной оси у *Testudinalia* лишь отчасти увязана с МАРК-киназным сигналингом, и обеспечивается в отличие от эволюционно продвинутых форм моллюсков в большей степени за счет иных, пока неизвестных механизмов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал был собран на Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета в губе Чупа Белого моря. В конце июня — начале июля половозрелые особи *Testudinalia testudinalis* (*Testudinalia tessellata*, *Gastropoda*, *Mollusca*) были собраны во время отлива, все дальнейшие работы производились в лабораторных условиях, где животных помещали в чашки Петри большого размера отдельно. Полученные от разных самок яйца отмывали отдельно в двух сменах чистой морской воды, после чего производили искусственное осеменение. Для предотвращения полиспермии сперму разводили морской водой, контролируя концентрацию сперматозоидов под микроскопом. Через 10 мин после добавления спермы яйца отмывали однократно морской

водой. Культивирование проводили в профильтрованной морской воде при температуре 16°C в кристаллизаторах небольшого объема.

На ранних стадиях развития партии зародышей *Testudinalia* (по 200–300 объектов) помещали в раствор МЕК-ингибитора U0126 (“Promega”, США) с конечной концентрацией 10 либо 40 мМ. Каждая серия опытов, в которую брали материал от одной пары родителей, была проведена не менее двух раз. Эксперименты с использованием различной концентрации МЕК-ингибитора проводились по принципиально сходной схеме (рис. 5), где варианты опытов (i, I–IV) различались моментом начала инкубации и временем содержания в растворе ингибитора: (i) начиная с четырехклеточной стадии (1 ч 30 мин развития) – общей продолжительностью 4 ч 20 мин, (I) начиная со стадии 16-ти бластомеров (2 ч 50 мин развития) в течение 3 ч, (II) после отделения третьего квартета микромеров (3 ч 30 мин развития) – всего 2 ч 20 мин, (III) с 4 ч 10 мин развития (до деления макромеров третьего квартета) – всего 1 ч 40 мин, (IV) с 4 ч 50 мин развития (во время начала деления макромеров третьего квартета) – всего 1 ч. Так, время начала экспериментов (i) и (I) отличалось на 80 минут, а в экспериментах (I–IV), объекты помещали в ингибитор через каждые 40 минут и во всех случаях были отмыты несколько раз в чистой морской воде в 5 ч 50 мин развития (на стадии ранней гаструлы), после чего развивались без ингибитора до момента фиксации при достижении в контроле личиночных стадий велигера двух и трех дней развития. Так как маточный раствор МЕК-ингибитора U0126 был приготовлен на DMSO, в контроле к соответствующему опыту в культуру зародышей добавляли DMSO до получения той же концентрации, что и в опыте. Анализ показал, что указанная концентрация не оказывает видимого эффекта на развитие.

Нормальное развитие изучали как на живом, так и фиксированном материале. С целью решения вопроса о возможном существовании выраженных процессов ооплазматической сегрегации и для приготовления постоянных тотальных препаратов часть объектов фиксировали жидкостью Ценкера и выдерживали в галлоцианине (“Fluka”, Германия) 8 часов при комнатной температуре (Пирс, 1962; Kostyuchenko, Dondua, 2000). В остальных случаях фиксацию материала осуществляли в 4%-ном формалине на фосфатном буфере, хранение материала производили в 70° этаноле при –20°C. С целью точного определения стадии развития часть материала фиксировали на момент помещения партии зародышей в раствор МЕК-ингибитора. В дальнейшем такой материал анализировали стандартными методами микроскопии светлого поля и дифференциального интерференционного контраста (DIC), а также иммуноцитохимии, используя антитела против  $\alpha$ -ту-

булина (для выявления клеточных границ и ресничек) или актина (для окраски мышц) (“Sigma”, США) в качестве первичных, и противомышинные, конъюгированные с FITC (“Sigma”, США) – в качестве вторичных. Специфическую окраску на ДНК проводили с помощью красителя DAPI (“Sigma”, США). Кроме того, часть фиксированного материала этих контрольных партий подвергали обработке иммуноцитохимическими методами для выявления активности MAP-киназного каскада. В качестве первичных антител использовали anti-diphosphorylated ERK1/2 (4370 “Cell Signaling”, США) при разведении 1 : 200, в качестве вторичных – антитела, конъюгированные с Alexa 488 (“Invitrogen”, США).

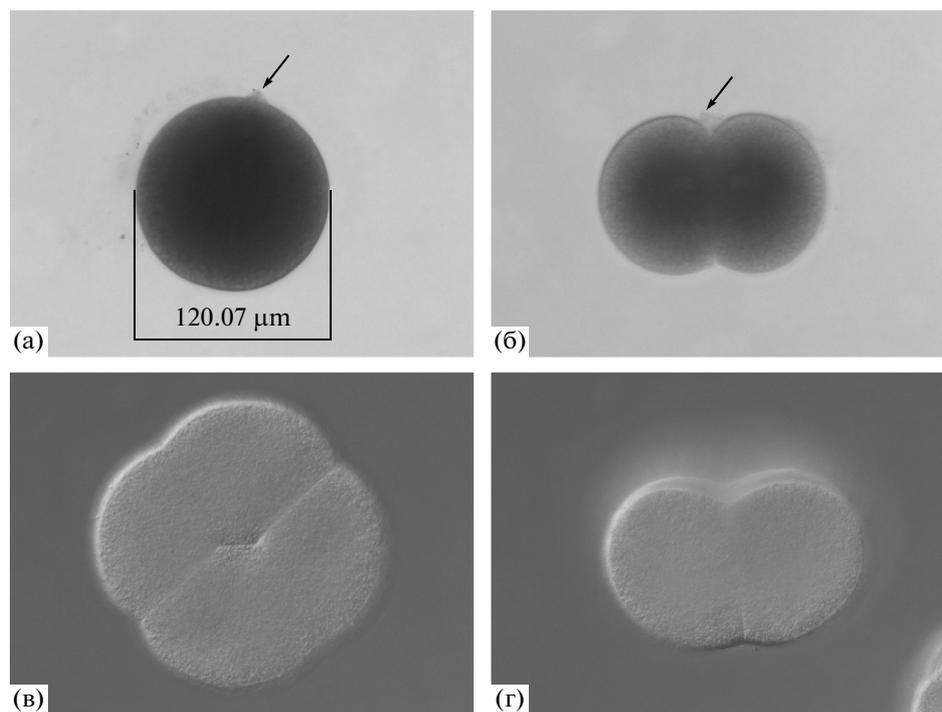
Материал анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SPE и флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1, оснащенного дифференциальным интерференционным контрастом (DIC), приставкой ApoTome, камерами AxioCam ICc3 и AxioCam MRm и программным обеспечением AxioVision 4.8 (“Carl Zeiss”, Германия). Морфометрические измерения производили, используя программу AxioVision 4.8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Нормальное развитие Testudinalia*

*T. testudinalis* имеет обычное для примитивных гастропод развитие с лецитотрофной пелагической личинкой и плавным эволютивным метаморфозом. Оплодотворение наружное, в месте сбора происходит в середине лета, когда литораль прогревается до 15–20°C. Самцы выметывают белые струи спермы, в присутствии которой самки выделяют светло-коричневые ооциты сферической формы. Размеры ооцитов после фиксации составляют 115–120 мкм в диаметре.

После слияния гамет и слабовыраженной кортикальной реакции начинается созревание ооцита: на анимальном полюсе последовательно образуются мелкие редуцированные тельца (рис. 1а). Как и у всех изученных Patellogastropoda, спиральное дробление имеет гомоквадрантный характер с различимыми по размерам микро- и макромерами. При этом признаков ооплазматической сегрегации, т.е. специфического распределения особых доменов цитоплазмы в отдельные бластомеры, как на морфологическом уровне, так и при окрашивании нуклеиновых кислот с помощью галлоцианина не наблюдается. В результате меридионального и равного деления зиготы формируются два несколько уплощенных не отличающихся друг от друга бластомера (рис. 1б). Второе деление также меридиональное и равномерное. Таким образом, при температуре +16°C через 1 ч 30 мин развития зародыш *T. testudinalis* состоит из четырех внешне одинаковых клеток-основательниц четырех эмбриональных квадрантов (рис. 1в, 1г; рис. 2а).



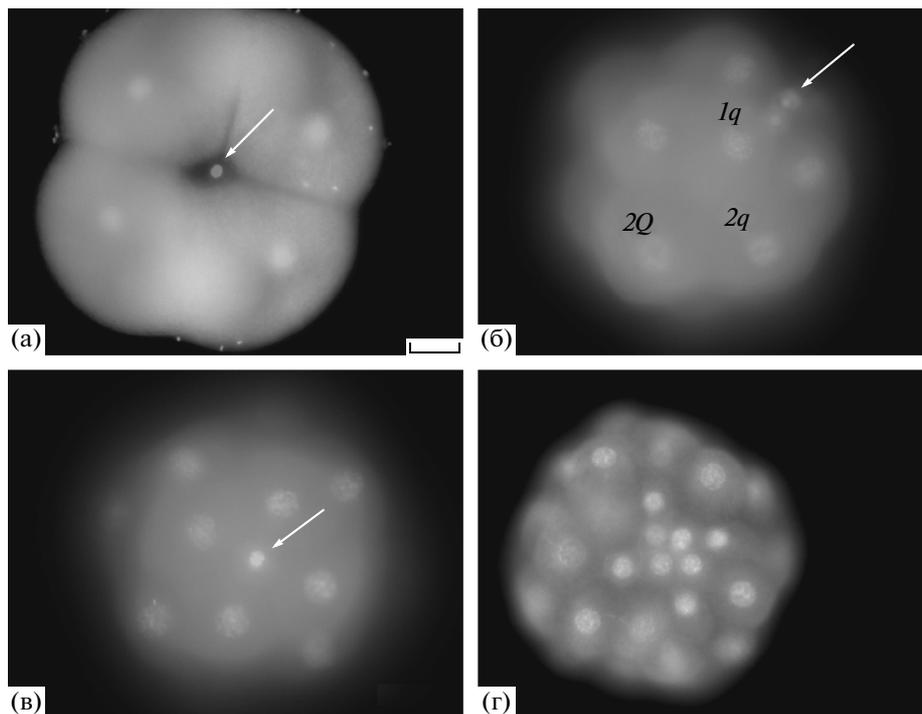
**Рис. 1.** Зародыши *Testudinalia testudinalis* на ранних стадиях развития. (а, б) — окраска галлоцианином, микроскопия светлого поля; (в, г) — неокрашенные препараты, микроскопия по методу дифференциального интерференционного контраста (DIC). (а) — зигота; (б) — 2 бластомера, латеральная проекция; (в, г) — на стадии четырех бластомеров зародыш имеет уплощенную форму: вид с вегетативного полюса (в) и (г) сбоку. Стрелкой обозначены полярные тельца на анимальном полюсе.

В ходе третьего клеточного цикла образуются четыре макромера (*IQ*) и четыре микромера первого квартета (*Iq*). Макромеры — несколько более крупные клетки, занимающие вегетативный полюс зародыша, микромеры, расположенные на анимальном полюсе, по размерам незначительно уступают макромерам.

Третье деление дробления является первым “спиральным” дроблением в ходе развития *Testudinalia*. Анализ расположения веретен говорит о том, что в результате закладки борозд дробления под небольшим углом к плоскости экватора первый квартет микромеров оказывается смещенным дексиготропно по отношению к соответствующим сестринским клеткам макромерам.

Борозды четвертого и нескольких последующих циклов спирального деления дробления также закладываются под небольшим углом к плоскости экватора. Однако в результате поворота осей веретен деления каждый раз примерно на  $90^\circ$  по отношению к осям веретен предыдущего цикла образующиеся анимальные бластомеры смещаются относительно соответствующих вегетативных сестринских клеток (с чередованием леотропного и дексиготропного смещения) (рис. 2б, 2в, 2г). При этом зародыш перестает быть уплощенным по анимально-вегетативной оси и приобретает сферическую форму.

Первые четыре деления дробления синхронны во всех четырех квадрантах и при  $16^\circ\text{C}$  проходят каждые 40 минут. Однако уже в ходе четвертого раунда наблюдается неодновременное деление клеток разных квартетов (рис. 2б, 2в). После отделения третьего квартета микромеров, при переходе к стадии 32-х бластомеров (3 ч 30 мин развития), продолжительность клеточных циклов увеличивается, а в делениях клеток разных квадрантов появляется асинхронность. Интересно отметить, что именно в этот момент (к 4 ч 10 мин развития) один из макромеров *3Q*, изменяя свою форму, вытягивается в полость слабо развитого бластоцеля и приходит в контакт с анимально расположенными микромерами (рис. 3а, 3б). Эта клетка, ее ядро и цитоплазма, особенно в месте контакта с анимальными микромерами, активно метится антителами против фосфорилированной формы ERK1/2 (рис. 3в, 3г). Именно этот бластомер становится макромером *3D*, маркирующим дорсальную сторону зародыша и дающим в ходе следующего деления мезентобласт *4d*. Активация MAPK в клетке *3D* продолжается около часа, при этом в зародышах после инкубирования с ингибитором U0126 сигнал активированной MAP киназы отсутствует (не показано). Достоверных данных об активности MAPK в иных бластомерах в ходе раннего дробления получить не удалось, хотя опыты со специфи-



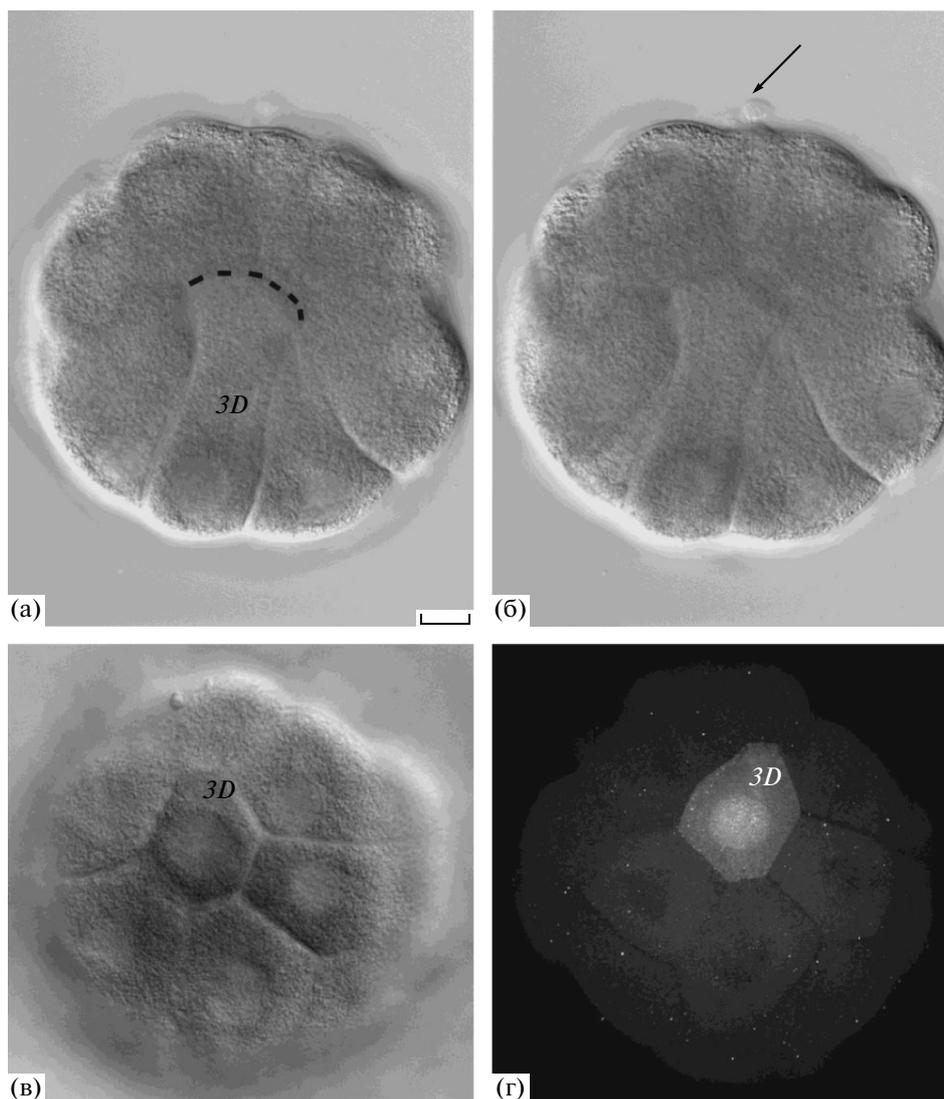
**Рис. 2.** Стадии дробления зародышей *Testudinalia*. Окраска тубулина иммуноцитохимическим методом с помощью анти-тел против  $\alpha$ -тубулина, хромосомного материала DAPI, флуоресцентная микроскопия. (а) — 4 бластомера, вид с анимального полюса; (б, в) — стадия 12 бластомеров, латеральная проекция (б) и вид с анимального полюса (в), квадранты не различаются между собой, деления дробления идут синхронно в разных квадрантах, но не в квартетах бластомеров; (г) — переход к стадии 64 клеток, вид с анимального полюса. Стрелкой обозначены полярные тельца на анимальном полюсе. Масштаб 20 мкм.

ческим ингибитором U0126 указывают на возможность неоднократной активации каскада на стадиях дробления (см. ниже). Гастрюляция у *T. testudinalis* происходит путем плотного врастания и эпиболлии.

Эмбриогенез завершается формированием просто устроенной пелагической личинки трохофоры. Тело трохофоры опоясывает состоящий из ресничных клеток (трохобластов) прототрох. Следует отметить, что, несмотря на отсутствие массивных эмбриональных оболочек, изначально биение ресничек прототроха не приводит к активному движению зародышей. Лишь спустя некоторое время, к 7 ч развития объекты начинают вращаться, не отрываясь от субстрата, и только потом переходят к плаванию в толще воды. Прототрох делит тело личинки на анимально расположенную претрохальную область (эписферу) и посттрохальную область (гипосферу), занимающую вегетативное положение. В центре эписферы находится апикальный орган, увенчанный пучком длинных ресничек — т. н. апикальный (теменной) султанчик. В гипосфере на противоположном вегетативном полюсе расположен телотрох.

На вторые сутки развития трохофора превращается в велигера, у которого помимо ларвальных структур присутствуют и зачатки дефинитивных

органов. Прототрох трансформируется в парус (velum), который у *Testudinalia* не расчленен на лопасти и имеет примитивное строение (рис. 4). Претрохальный регион велигера уплощается, а апикальный султанчик вскоре исчезает. В посттрохальной области на дорсальной стороне развивается раковинная железа, которая начинает формировать личиночную раковину (протоконх). Раковина сначала имеет блюдцевидную форму, а затем с ростом внутренностного мешка становится более выпуклой и цилиндрической, оставаясь прозрачной примерно до полутора суток развития, когда начинается ее обызвествление (рис. 4). К дистальному концу протоконха крепится главный личиночный ретрактор. Этот мускул, ветви которого тянутся через все тело велигера к эписфере и основанию ноги (рис. 8а), по достижении кальцифицированной раковины ригидности, позволяет почти полностью втягивать парус в протоконх. Такая реакция происходит, если личинку потревожить, в частности, при манипуляциях, в связи с чем зафиксированные объекты выглядят компактно, и раковина полностью заполнена живой тканью. На вентральной стороне между раковинной и парусом развивается изначально парный зачаток ноги, на задне-спинной стороне снабженный крышечкой (operculum). На третий день развития, во



**Рис. 3.** Зародыши *Testudinalia* 4 ч 10 мин развития: после отделения третьего квартета микромеров один из макромеров вытягивается по направлению к анимальным blastomeres и приходит с ними в контакт, становясь blastomere 3D. (а, б) – один и тот же зародыш в разных оптических плоскостях, латеральная проекция; (в, г) – вид с вегетативного полюса. (а, б, в) – неокрашенные препараты, DIC; (г) – иммуноцитохимическое выявление активной MAP-киназы в макромере 3D, конфокальная микроскопия. Стрелкой обозначено полярное тельце на анимальном полюсе, пунктирной линией – граница макромера 3D и анимальных микромеров. Масштаб 20 мкм.

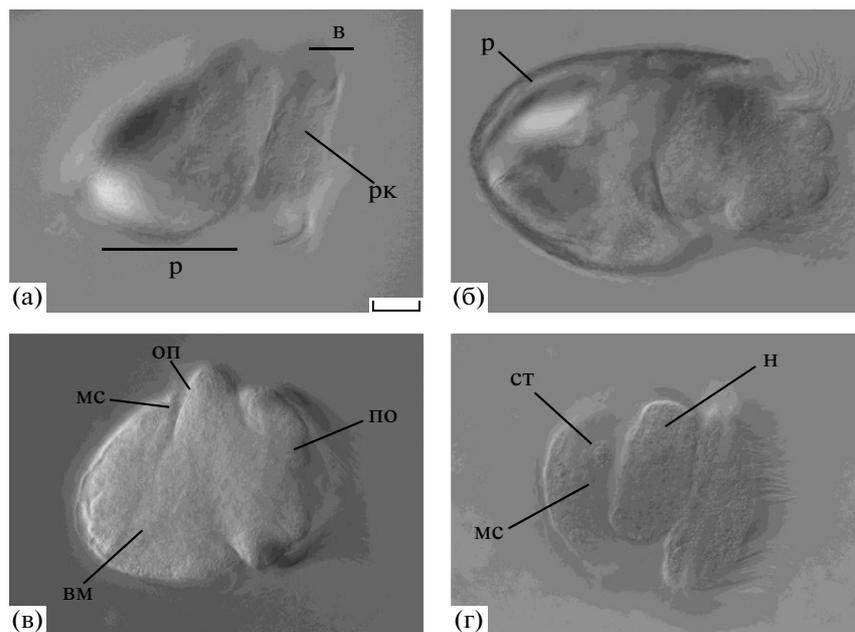
время метаморфоза в ювенильную форму, личинки претерпевают торсию. Достигнув 4–5-дневного возраста, велигеры оседают и ползают по субстрату с помощью ноги, хотя еще способны изредка плавать на небольшие расстояния, используя парус.

#### *Влияние MEK-ингибитора U0126 на развитие Testudinalia*

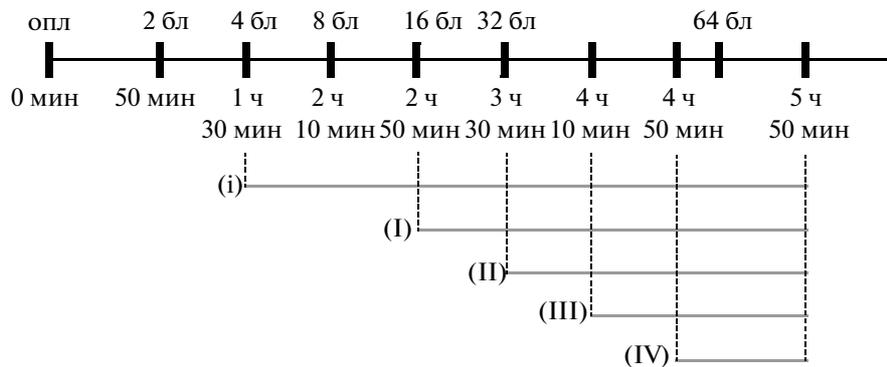
В ходе экспериментов зародышей *Testudinalia* на ранних стадиях развития выдерживали в растворе MEK-ингибитора U0126 в фильтрованной морской воде (конечная концентрация 10 или 40 мМ). Объекты помещались в ингибитор соглас-

но схеме рис. 5. Во всех вариантах эксперимента материал отмывали от ингибитора на стадии ранней гаструлы (5 ч 50 мин после оплодотворения). Влияние ингибитора анализировали на живом и фиксированном материале, на стадиях, когда в контроле наблюдались велигеры, после двух и трех дней развития. Специфичность U0126 подтверждается отсутствием сигнала активированной MAP-киназы в клетке 3D после обработки этим ингибитором.

Прежде всего, следует отметить, что во всех экспериментах с использованием 40 мМ U0126, за исключением (IV), наблюдалась явная задержка развития. Так, когда к 7 часам развития в контроле и



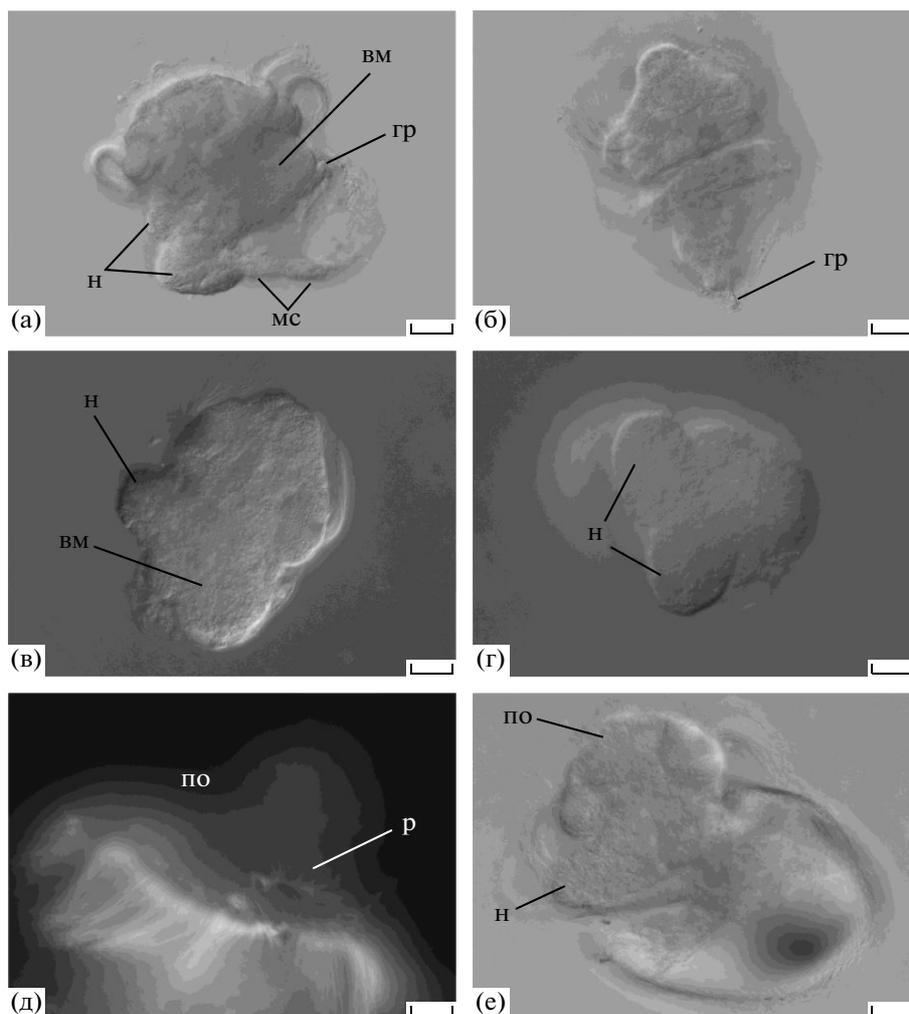
**Рис. 4.** Нормальное развитие *Testudinalia*. Личинка велигер, DIC. (а, б) – общий вид личинки 60 часов (а) и 73 часа развития (б), раковина перестает быть прозрачной из-за процесса обызвествления, на третий день развития происходит торсия; (в) – личинка 48 часов развития, раковина начинает терять свою прозрачность; (г) – личинка 42 часа развития, раковина хорошо развита, но еще прозрачная. Велум (в), раковина (р), ресничные клетки (рк), внутренностный мешок (вм), мантийная складка (мс), претрохальная область (по), оперкулюм (оп), нога (н), статоцист (ст). Масштаб 20 мкм.



**Рис. 5.** Схема проведения эксперимента. Серыми линиями обозначены периоды содержания зародышей в растворе МЕК-ингибитора U0126.

№ (IV) уже были активно плавающие трохофоры, в экспериментах (I) и (II) объекты лежали на дне неподвижно, хотя и демонстрировали биение ресничек прототроха, а в случае (III), кроме того, были отмечены единичные вращающиеся у дна экземпляры. Рост и дифференцировка различных зачатков велигера также сильно отставали в экспериментальных культурах (I–III) по сравнению с контролем и № (IV). Кроме того, у обработанных U0126 объектов наблюдалась дезорганизация мышечной системы, и была в той или иной мере искажена реакция на раздражение: прекращалось биение ресничек, но не всегда парус вытягивался в раковину. Детальная морфология личи-

нок была изучена после фиксации велигеров на стадии двух дней развития. У личинок в контроле (рис. 4в) к этому времени хорошо развитая, но еще прозрачная раковина начинала обызвествляться и была полностью заполнена живой тканью (внутренностный мешок, по крайней мере, часть ноги и велума). Тело компактизовано, на зачатке ноги присутствует крышечка (operculum), прижатая сзади мантийной складкой. Претрохальная область с расположенным в центре пучком длинных ресничек апикального султанчика уплощена. Антитела против актина хорошо выявляют на этой стадии главный и добавочный личиночный ретрактор (рис. 8а).



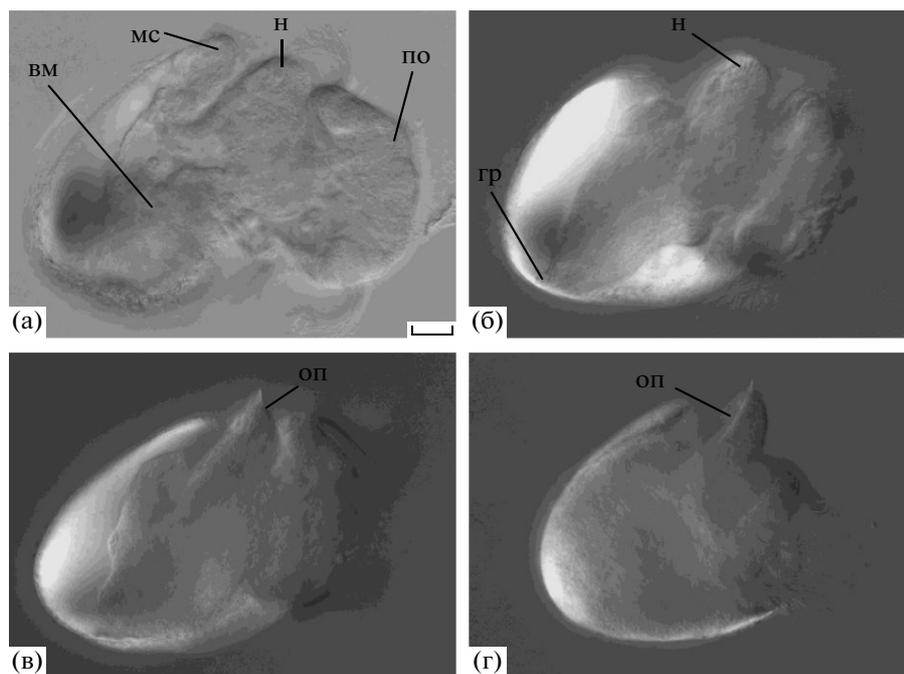
**Рис. 6.** Морфология двухдневных личинок *Testudinalia* после инкубации зародышей в МЕК-ингибиторе U0126 в экспериментах (i) и (I). (а, б, в, г, е) – микроскопия по методу DIC, (д) – окраска тубулина иммуноцитохимическим методом с помощью антител против  $\alpha$ -тубулина, флуоресцентная микроскопия. (а, б, в, д, е) – вид сбоку; (г) – вентральная проекция. (а, б) – результаты опыта по схеме (i), 10  $\mu$ M U0126; (в, г, д) – результаты эксперимента (I), 40  $\mu$ M U0126; (е) – результаты эксперимента (I), 10  $\mu$ M U0126. Материал внутренностного мешка (вм), материал мантийной складки (мс), нога (н), место прикрепления главного личиночного ретрактора (гр), претрохальная область (по), реснички на эписфере вне прототроха (р). Масштаб 20 мкм.

#### Морфология личинок в эксперименте (i)

Морфология двухдневных личинок, после длительного воздействия U0126 по схеме (i) даже в низкой концентрации 10  $\mu$ M, имеет отчетливо ненормальный характер (рис. 6а, 6б). Начавший обызвестляться недоразвитый протоконх не примыкает плотно к телу и деформирован. Для личинок характерна выпуклая претрохальная область и отсутствие длинных ресничек апикального органа. Зачаток ноги разделен терминально на две лопасти и лишен крышечки. Материал мантии не формирует складку и не примыкает к ноге и сильно недоразвитому внутренностному мешку. В большинстве случаев (80%,  $n = 20$ ) главный личиночный ретрактор прикреплен к раковине (рис. 6а, 6б).

#### Морфология личинок в эксперименте (I)

Двухдневные личинки, обработанные 40  $\mu$ M U0126 по схеме (I), имели явные аномалии строения, не отмеченные в экспериментах с меньшим временем экспозиции: раковина, велум, внутренностный мешок и зачаток ноги сильно недоразвиты: имеют ненормальное строение и меньше по размеру, чем в контроле (рис. 6в, 6г). Протоконх необызвествлен, имеет вид прозрачной пленочки или отсутствует вовсе. Претрохальная область выпуклая, конусовидная (рис. 6в). Клетки прототроха ненормальной формы (треугольные, призматические), лежат рыхло и не в один ряд, за пределами которого на эписфере встречаются отдельные оресниченные участки (рис. 6д). Зачаток ноги разделен терминально на две лопасти (рис. 6г) и ли-



**Рис. 7.** Морфология двухдневных личинок *Testudinalia* после инкубации зародышей в МЕК-ингибиторе U0126 в экспериментах (II), (III), (IV), микроскопия по методу DIC, вид сбоку. (а) — результаты опыта по схеме (II), 10  $\mu\text{M}$  U0126; (б, в, г) — результаты экспериментов (II), (III) и (IV), соответственно, 40  $\mu\text{M}$  U0126. Материал внутренностного мешка (вм), мантийная складка (мс), нога (н), место прикрепления главного личиночного ретрактора (гр), претрохальная область (по), оперкулюм (оп). Масштаб 20  $\mu\text{m}$ .

шен крышечки. Мантийная складка не выражена. Дезорганизованный внутренностный мешок плотно примыкает к раковине, место крепления главного личиночного ретрактора удается идентифицировать с трудом, а мышечные волокна антителами против актина не выявляются.

При использовании концентрации 10  $\mu\text{M}$  в экспериментах по схеме (I), значительных дефектов развития не наблюдалось. Претрохальная область у личинок была выпуклая, раковина обезвестлена, деформирована в месте прикрепления ретрактора (рис. 6е). Морфология велигеров напоминала таковую в эксперименте (II). На третьи сутки развития, так же как и в контроле, личинки претерпевали торсию и внешне не отличались от интактных.

#### *Морфология велигеров в эксперименте (II)*

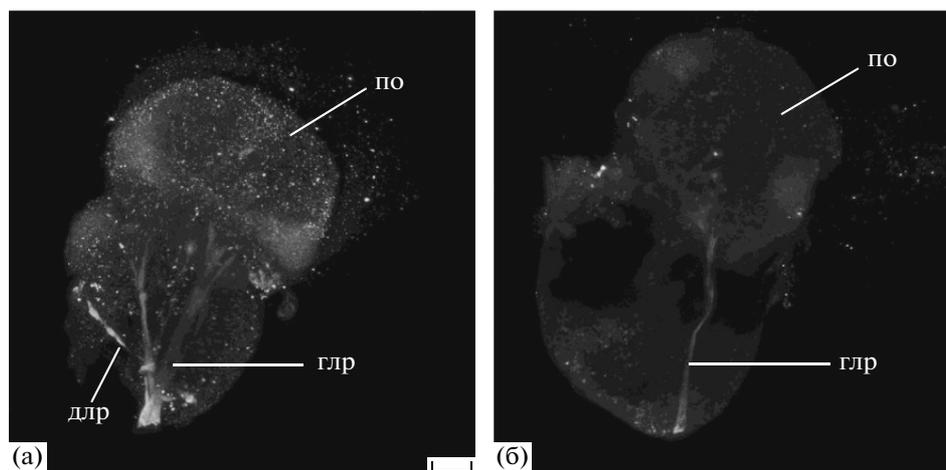
В эксперименте (II) с использованием 40  $\mu\text{M}$  U0126 двухдневные велигеры демонстрировали незначительные дефекты развития (рис. 7б). Раковина была кальцифицирована, иногда деформирована, варьирующего размера. Велюм втянут в протоконх лишь в 25% случаев ( $n = 30$ ), у остальных объектов претрохальная область выпуклая, трохоласты сильно вытянуты по анимально-вегета-

тивной оси, раковина примерно на 1/3 свободна от живой ткани. Место прикрепления главного личиночного ретрактора хорошо видно, хотя сам мускул заметно тоньше, чем в контроле и содержит меньшее количество волокон, а добавочный личиночный ретрактор отсутствует (рис. 8б). Такой паттерн нарушений свидетельствует о явной дезорганизации мышечной системы, хотя и не полной. В отдельных случаях (не более 10%) обнаружить оперкулюм не удалось, а зачаток ноги был слегка разделен терминально на две лопасти.

После обработки зародышей в течение 2 ч 20 мин после отделения третьего квартета микромеров 10  $\mu\text{M}$  раствором МЕК-ингибитора велигеры имели сходную морфологию, как и в случае опытов по той же схеме, но с более высокой концентрацией U0126 (40  $\mu\text{M}$ ) (рис. 7а). На третьи сутки развития личинки претерпевали торсию и внешне не отличались от личинок в контроле.

#### *Морфология двухдневных велигеров в эксперименте (III)*

МЕК-ингибитор U0126, даже в концентрации 40  $\mu\text{M}$ , при содержании в нем зародышей по схеме эксперимента (III) имел незначительное влияние на дальнейшее развитие *Testudinalia* (рис. 7в). В хо-



**Рис. 8.** Окрашивание антителами против актина мышечной системы двухдневных личинок *Testudinalia* в норме (а) и эксперименте (II), 40  $\mu$ M U0126 (б), вид сбоку, конфокальная микроскопия. Главный личиночный ретрактор (глр), добавочный личиночный ретрактор (длр), претрохальная область (по). Масштаб 20 мкм.

де этой серии опытов были получены личинки, похожие на таковые в партии (IV). Велигеры обладали кальцифицированной, но более прозрачной, чем в случае (IV) раковины. В большинстве случаев (60%,  $n = 30$ ) вельюм был втянут в раковину. У экземпляров с выставленным наружу вельюмом около 1/3 объема протоконха (вентральная часть) было свободно от живой ткани. Оперкулюм присутствовал у всех личинок.

#### Морфология двухдневных велигеров в эксперименте (IV)

Двухдневные велигеры после обработки 40  $\mu$ M U0126 по схеме эксперимента (IV) мало отличались от таковых в контроле и имели следующую морфологию: раковина обызвествлена, почти непрозрачна, нормального размера с присутствием некоторого полиморфизма по этой характеристике. У преобладающего большинства (87%,  $n = 30$ ) вельюм втянут в протоконх. Раковина почти полностью заполнена живой тканью у всех объектов. Во всех случаях обнаружена крышечка (operculum) (рис. 7г).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые описаны ранние этапы нормального развития *Testudinalia testudinalis*, относящейся к наиболее древней группе гастропод (Patellogastropoda) (Bouchet, Rocroi, 2005; Nakano, Ozawa, 2007) и предпринята попытка оценить участие MAP-киназного каскада в процессах спецификации клеточных линий и вторичной оси тела.

Развитие *T. testudinalis* проходит с типичным для Patellogastropoda гомоквадрантным дроблением, явно выраженной стадией перехода от четы-

рехлучевой симметрии к билатеральной через механизм изменения формы и положения в целом одного из макромеров третьего квартета и вычленения квадранта *D* с последующей сменой спирального дробления билатеральным делением клеток зародыша (см. Иванова-Казас, 1995). На самых ранних этапах дробления зародыши *Testudinalia* имеют уплощенную форму, но постепенно претерпевают компактизацию и становятся сферическими. Сам факт относительно свободного расположения blastomeres на стадиях 4–16 клеток и последующая гораздо более плотная укладка клеток в зародыше при переходе к 32-клеточной стадии позволяет предположить межклеточные индукционные взаимодействия уже на ранних этапах дробления. Важно также отметить, что в отличие от *Patella vulgata* (van den Biggelaar, 1977), наиболее изученного моллюска из группы Patellogastropoda, синхронность раннего дробления у *Testudinalia* относительная и наблюдается между квадрантами зародыша, но не между квартетами blastomeres.

Известно, что у ряда моллюсков макромер 3*D* выполняет функцию организатора (Clement, 1962; van den Biggelaar, Guerrier, 1979; Damen, Dictus, 1994, 1996; Lambert, Nagy, 2001, 2003). При этом процесс индукции у моллюсков, как правило, не однонаправленный. Так, и у примитивной *Patella* спецификация дорсовентральной оси и судьбы части клеточных линий происходит только при взаимодействии макромера 3*D* и анимальных микромеров (van den Biggelaar, Guerrier, 1979; Damen, Dictus, 1994, 1996), и у эволюционно продвинутой *Plyanassa* определение клеточной судьбы во многих клонах зависит от взаимодействия макромера линии *D* и анимальных микромеров на той же стадии (Lambert, Nagy, 2001). В то же время у моллюска *Crepidula fornicata* таким организатором выступает 4*d*, дочерняя клетка 3*D* (Henry et al., 2006), специ-

фикация которой в свою очередь зависит от индукции со стороны микромеров первого квартета на стадии 16–24 клеток макромера линии *D* (Henry, Perry, 2008).

Момент спецификации макромера *3D* у моллюсков совпадает с активацией MAPK сигнального пути, что было показано для целого ряда видов (*Ilyanassa obsoleta*, *Chaetopleura apiculata*, *Patella vulgata*, *Tectura scutum*, *Haliotis asinina*, *Lymnaea palustris*, *Crepidula fornicata*) (Lambert, Nagy, 2001, 2003; Lartillot et al., 2002a; Koop et al., 2007; Henry, Perry, 2008). Причем, если у зародыша *Ilyanassa* MAPK дифференциально активируется именно в клетке *3D*, когда происходит взаимодействие между макромером *3D* и микромерами, а затем передается дорсальным микромерам, непосредственно лежащим на макромере *3D*, и постепенно на микромеры, расположенные более вентрально (Lambert, Nagy, 2001), то у *Crepidula fornicata* активация MAPK происходит сначала в анимальных микромерах и необходима для запуска MAPK пути в *3D* (Henry, Perry, 2008). У более примитивных моллюсков активация этого каскада отмечена только в *3D* (Lartillot et al., 2002a; Lambert, Nagy, 2003). Подавление активности сигнального пути MAPK приводит к существенным нарушениям в развитии организмов, выраженных в разной степени как на органно-тканевом уровне, так и на уровне становления дорсовентральной оси, что позволило говорить о крайней необходимости MAPK для спецификации blastомера-организатора *3D/4d*.

С помощью антител против фосфорилированной формы ERK1/2 нам удалось отчетливо выявить активность MAP-киназы в раннем развитии *T. testudinalis* (рис. 3г). Сигнал активной MAPK был обнаружен примерно через полчаса после отделения третьего квартета микромеров в одном из макромеров и сохранился в этой клетке и после перехода к билатеральному паттерну дробления. Этот blastомер имел характерную вытянутую форму, занимал дорсальное положение и начинал делиться позже остальных макромеров, что дает основания определить его как клетку *3D* (рис. 3). Таким образом, избирательная активация каскада MAPK в презумптивном blastомере *3D* у примитивных гастропод *Patella*, *Tectura* и *Testudinalia* свидетельствует о возможности вовлечения этого сигналинга в механизм спецификации как самого *D* квадранта/клетки-организатора *3D*, так и индуцируемых им клеточных линий.

Результаты экспериментов с использованием ингибитора MAP-киназного пути U0126 говорят о существенной роли, которую данный сигналинг играет в определении судьбы различных клеточных линий. Так, длительная экспозиция (со стадии 4-х blastомеров до стадии ранней гастролы) в ингибиторе даже низкой концентрации (10  $\mu\text{M}$ ) приводила к значительным дефектам развития прак-

тически всех органов и частей тела (рис. 6а, 6б). Фактически столь же существенные нарушения морфогенезов и дифференцировок наблюдались при инкубации зародышей, начиная со стадии 16 blastомеров при высоких концентрациях ингибитора (40  $\mu\text{M}$ ) (рис. 6в, 6г, 6д), однако применение низких концентраций уже на этой стадии не имело таких катастрофических последствий (рис. 6е), а на более поздних эффект и вовсе был практически незаметным. Из полученных нами описательных и экспериментальных данных можно сделать вывод, что основные этапы спецификации с участием MAP-киназы у *Testudinalia* затрагивают период до шестого цикла дробления, в т.ч. стадии формирования и существования макромеров третьего квартета, т.е. когда морфологически оформляется blastомер *3D* (рис. 3). В то же время, результаты опытов с низкими концентрациями U0126 позволяют предположить, что процесс активации MAPK у *Testudinalia* вовлекается в индукционные взаимодействия между blastомерами несколько раз в ходе раннего дробления, в т.ч. и на стадии до 16 blastомеров. Об этом свидетельствуют и наши данные, полученные в ходе предварительных исследований, когда короткие (на время одного цикла деления дробления) экспозиции в растворе U0126 с концентрацией 10  $\mu\text{M}$  на стадиях 4–16 blastомеров приводили к незначительным нарушениям развития (Бабаханова и др., 2010). Важность ранней активации MAPK (в микромерах первого квартета еще до появления *3D*) была продемонстрирована и у *Crepidula fornicata* (Henry, Perry, 2008). При этом ряд ученых (например, Henry, Perry, 2008) отмечали сложность выявления активной формы MAPK ERK1/2 у моллюсков, предполагая, что антитела не могут выявлять низкую концентрацию активной MAPK *in situ*.

У всех Spiralia клетка *4d*, потомок *3D*, является источником энтомезодермы, которая у моллюсков дает целый набор мышц, включая систему личиночного ретрактора (у *Patella*, *Crepidula*, *Ilyanassa*), личиночное сердце и почку (Clement, 1986b; Dicitus, Damen, 1997; Render, 1997; Hejnlol et al., 2007). У *Haliotis asinina* (Vetigastropoda) в зачатке этой части мезодермы была обнаружена экспрессия генов-гомологов консервативных регуляторов развития мезодермы (*Mox*, *COE*) (Hinman, Degnan, 2002; Koop et al., 2007), которая существенно изменялась или исчезала вовсе после обработки зародышей на ранних стадиях дробления ингибитором U0126 (Koop et al., 2007).

Вторая часть мезодермы — эктомезодерма — происходит у разных моллюсков из различных микромеров второго и третьего кварталов (Hejnlol et al., 2007), и дает начало мышцам, в том числе и части личиночного ретрактора у *Patella* и *Crepidula*. В эктомезодерме с начала гастрюляции экспрессируются гомологи генов *fork head* и *gooseoid* (Lartillot et al., 2002b), а на более поздних стадиях —

добавок к ним — *twist* и *Mox* (Nederbragt et al., 2002; Koop et al., 2007). Было также установлено, что после инкубации эмбрионов в U0126 (даже с использованием низкой концентрации 10  $\mu$ M) экспрессия *Mox* полностью исчезала из клеток эктодермы (Koop et al., 2007). Естественно, что изменение экспрессии генов-спецификаторов мезодермы при воздействии МЕК-ингибитором сопровождалось нарушением развития мезодермальных производных.

По существующей модели (для постторсионного велигера) (Damen, Dictus, 2002) втягивание велама и ноги в раковину осуществляется благодаря сокращению главного личиночного ретрактора и расслаблению добавочного ретрактора и поперечного мускула. В экспериментах с применением U0126 у разных гастропод на живом и фиксированном материале отмечали либо более или менее полную, либо частичную дезорганизацию системы личиночного ретрактора (Lambert, Nagy, 2001, 2003; Koop et al., 2007; Henry, Perry, 2008). По результатам наших исследований на *Testudinalia*, с увеличением времени и концентрации МЕК-ингибитора усиливалась и степень выраженности нарушений как в мышечной системе (в том числе и функционально — неспособность втягивать парус в раковину), так и в других мезодермальных производных внутренностного мешка. При воздействии на зародыши ингибитором U0126 на стадии перехода к 32 клеткам можно говорить скорее о частичной, но не полной дезорганизации системы личиночного ретрактора (рис. 8б). В то же время, следует отметить, что MAP-киназный каскад, очевидно, лишь отчасти управляет развитием мезодермы, в дополнение каким-то иным основным механизмам спецификации.

Другой важный аспект нашего исследования: ни в одном из экспериментов, проведенных на исследуемом виде моллюсков, не было получено полного нарушения спецификации дорсовентральной оси, приводящего к развитию личинки с четырехлучевой радиальной симметрией. При этом следует учесть, что выявленные нами аномалии в строении ресничного кольца, а именно формы и положения трохобластов, могут косвенно свидетельствовать об ограниченном участии MAP-киназного каскада в становлении дорсовентральной оси. Отсутствие эффекта радиализации личинок даже при очень высоких концентрациях U0126 было отмечено и для моллюска *Patella vulgata* (Lartillot et al., 2002a), в то время как для ряда других моллюсков, как правило, не относящихся к примитивным Patellostropoda, эффект нарушения спецификации дорсовентральной оси при блокировании активации MAPK был неоднократно показан. При этом важно иметь в виду, что, если для моллюсков *Ilyanassa* (Lambert, Nagy, 2001) и *Crepidula* (Henry, Perry, 2008) эффект радиализации личинок наблюдается даже при применении

низких концентраций блокатора U0126 (10  $\mu$ M), то для моллюсков *Tectura* (Lambert, Nagy, 2003) и *Haliotis* (Koop et al., 2007) такого рода нарушения обнаруживаются только при использовании очень высоких концентраций ингибитора (50  $\mu$ M). Интересно, что для полихет в экспериментах с неспецифическими блокаторами клеточного сигналинга была продемонстрирована зависимость спецификации дорсовентральной оси (Gonzales et al., 2007b), однако до сих пор нет данных, свидетельствующих об участии в этом процессе именно пути MAPK. Это говорит в пользу существования и других молекулярных механизмов определения вторичной оси тела среди животных группы Spiralia.

Таким образом, в ряду моллюсков от наиболее примитивных к более эволюционно продвинутым наблюдается усиление роли MAP-киназного каскада в развитии мезодермального зачатка и определения дорсовентральной оси. Однако, очевидно, что MAPK сигналинг работает в дополнение к каким-то более древним и фундаментальным механизмам спецификации клеточных линий и вторичной оси, как минимум у аннелид и моллюсков, но, вероятно, и у всех Spiralia.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 07-04-00201).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабаханова Р.А., Смирнова Н.П., Кондакова Е.А., Стрекаловский И.В., Костюченко Р.П. Влияние ингибитора активации MAPK U0126 на развитие моллюска *Testudinalia tessellata* // XI научная сессия Морской Биологической станции СПбГУ. Тезисы докладов. 2010. С. 56–57.
- Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосибирск: Наука, 1975. 372 с.
- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука, 1995. 565 с.
- Пирс Э. Гистохимия. М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. 962 с.
- Ackermann C., Dorresteijn A., Fischer A. Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida: Polychaeta) // J. Morphol. 2005. V. 266. P. 258–280.
- Baguna J., Riutort M. The dawn of bilaterian animals: the case of acoelomorph flatworms // Bioessays. 2004. V. 26. P. 1046–1057.
- Bouchet P., Rocroi J.-P. Classification and nomenclator of gastropod families // Malacologia. 2005. V. 47. P. 1–397.
- Boyer B.C., Henry J., Martindale M.Q. Dual origins of mesoderm in a basal member of the spiralian clade: cell lineage analyses in the polyclad turbellarian *Hoploplana inquilina* // Dev. Biol. 1996. V. 179. P. 329–338.
- Boyer B.C., Henry J., Martindale M.Q. The cell lineage of a polyclad turbellarian embryo reveals close similarity to coelomate spiralian // Dev. Biol. 1998. V. 204. P. 111–123.

- Clement A.C.* Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. I. The role of the polar lobe in determination of the cleavage pattern and its influence in later development // *J. Exp. Zool.* 1952. V. 121. P. 593–626.
- Clement A.C.* Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. II. The development of isolated blastomeres // *J. Exp. Zool.* 1956. V. 132. P. 427–446.
- Clement A.C.* Development of *Ilyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages // *J. Exp. Zool.* 1962. V. 149. P. 193–216.
- Clement A.C.* The embryonic value of micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. I. The first quartet cells // *J. Exp. Zool.* 1967. V. 166. P. 77–88.
- Clement A.C.* The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. II. The second quartet cells // *Int. J. Invertebr. Repr. Develop.* 1986a. V. 9. P. 139–153.
- Clement A.C.* The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. III. The third quartet cells and the mesentoblast cell, *4d* // *Int. J. Invertebr. Repr. Develop.* 1986b. V. 9. P. 155–168.
- Costello D.P.* Experimental studies of germinal localization in *Nereis*. I. The development of isolated blastomeres // *J. Exp. Zool.* 1945. V. 100. P. 19–66.
- Damen P., Dictus W.J.A.G.* Cell lineage of the prototroch of *Patella vulgata* (Gastropoda, Mollusca) // *Dev. Biol.* 1994. V. 162. P. 364–383.
- Damen P., Dictus W.J.A.G.* Newly-discovered muscle in the larva of *Patella coerulea* (Mollusca, Gastropoda) suggests the presence of a larval extensor // *Contrib. Zool.* 2002. V. 71. P. 37–45.
- Damen P., Dictus W.J.A.G.* Spatial and temporal coincidence of induction processes and gap-junctional communication in *Patella vulgata* (Mollusca, Gastropoda) // *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1996. V. 205. P. 401–409.
- Dictus W.J.A.G., Damen P.* Cell-lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata* (Mollusca) // *Mech. Dev.* 1997. V. 62. P. 213–226.
- Ferrell J.E.* MAP kinases in mitogenesis and development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1996. V. 33. P. 1–60.
- Garrington T.P., Johnson G.L.* Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. V. 11. P. 211–218.
- Gonzales E.E., van der Zee M., Dictus W.J., van den Biggelaar J.* Brefeldin A or monensin inhibits the 3D organizer in gastropod, polyplacophoran, and scaphopod molluscs // *Dev. Genes Evol.* 2007a. V. 217. P. 105–118.
- Gonzales E.E., van der Zee M., Dictus W.J., van den Biggelaar J.* Brefeldin A and monensin inhibit the D quadrant organizer in the polychaete annelids *Arctonoe vittata* and *Serpula columbiana* // *Evol. Dev.* 2007b. V. 9. P. 416–431.
- Hejnol A., Martindale M.Q., Henry J.Q.* High-resolution fate map of the snail *Crepidula fornicata*: the origins of ciliary bands, nervous system and muscular elements // *Dev. Biol.* 2007. V. 305. P. 63–76.
- Henry J., Martindale M.Q.* Conservation of the spiralian developmental program: cell lineage of the nemertean, *Cerebratulus lacteus* // *Dev. Biol.* 1998. V. 201. P. 253–269.
- Henry J.J., Perry K.J.* MAPK activation and the specification of the D quadrant in the gastropod mollusc, *Crepidula fornicata* // *Dev. Biol.* 2008. V. 313. P. 181–195.
- Henry J.Q., Perry K.J., Martindale M.Q.* Cell specification and the role of the polar lobe in the gastropod mollusc *Crepidula fornicata* // *Dev. Biol.* 2006. V. 297. P. 295–307.
- Hinman V.F., Degnan B.M.* Mox homeobox expression in muscle lineage of the gastropod *Haliotis asinina*: evidence for a conserved role in bilaterian myogenesis // *Dev. Genes Evol.* 2002. V. 212. P. 141–144.
- Koop D., Richards G.S., Wanninger A., Gunter H.M., Degnan B.M.* The role of MAPK signaling in patterning and establishing axial symmetry in the gastropod *Haliotis asinina* // *Dev. Biol.* 2007. V. 311. P. 200–212.
- Kostyuchenko R.P., Dondua A.K.* Development of the prototroch in embryogenesis of *Nereis virens* (Polychaeta) // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2006. V. 37. № 2. P. 69–76.
- Kostyuchenko R.P., Dondua A.K.* Ooplasmic segregation and formation of embryonic morphological axes in the polychaete *Nereis virens* // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2000. V. 31. № 2. P. 95–105.
- Lambert J.D., Nagy L.M.* MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusc *Ilyanassa obsoleta* // *Development.* 2001. V. 128. P. 45–56.
- Lambert J.D., Nagy L.M.* The MAPK cascade in equally cleaving spiralian embryos // *Dev. Biol.* 2003. V. 263. P. 231–241.
- Larillot N., Lespinet O., Vervoort M., Adoutte A.* Expression pattern of *Brachyury* in the mollusc *Patella vulgata* suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria // *Development.* 2002a. V. 129. P. 1411–1421.
- Larillot N., Le Gouar M., Adoutte A.* Expression patterns of *fork head* and *gooseoid* homologues in the mollusc *Patella vulgata* supports the ancestry of the anterior mesoderm across Bilateria // *Dev. Genes Evol.* 2002b. V. 212. P. 551–561.
- Mallat J., Winchell C.J.* Testing the new animal phylogeny: first use of combined large-subunit and small-subunit rRNA gene sequences to classify the protostomes // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 19. P. 289–301.
- Maslakova S., Martindale M.Q., Norenberg J.L.* Fundamental properties of spiralian cleavage program are displayed by the basal nemertean *Carinoma tremaphoros* (Palaeonemertea; Nemertea) // *Dev. Biol.* 2004. V. 267. P. 342–360.
- Nakano T., Ozawa T.* Worldwide phylogeography of limpets of the order Patellogastropoda: Molecular, morphological and palaeontological evidence // *J. of Molluscan Studies.* 2007. V. 73. P. 79–99.
- Nederbragt A.J., Lespinet O., van Wageningen S., van Loon A.E., Adoutte A., Dictus W.J.A.G.* A lophotrochozoan *twist* gene is expressed in the ectomesoderm of the gastropod mollusk *Patella vulgata* // *Evol. Dev.* 2002. V. 4. P. 334–343.
- Nielsen C.* Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla, 2nd edition. New York: Oxford Univ. Press, 2001. 563 pp.

- Nielsen C. Defining phyla: morphological and molecular clues to metazoan evolution // *Evol. Dev.* 2003. V. 5. P. 386–393.
- Peterson K.J., Eernisse D.J. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: interferences from morphology and 18S rDNA gene sequences // *Evol. Dev.* 2001. V. 3. P. 170–205.
- Render J.A. Fate maps of the first quartet micromeres in the gastropod *Ilyanassa obsoleta* // *Development.* 1991. V. 113. P. 495–501.
- Render J.A. Micromere fate maps in the gastropod *Ilyanassa obsoleta* // *Dev. Biol.* 1997. V. 189. P. 301–310.
- Sakaguchi A., Matsumoto K., Hisamoto N. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans* // *J. Biochem.* 2004. V. 136. P. 7–11.
- Schohl A., Fagotto F. Beta-catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development // *Development.* 2002. V. 129. P. 37–52.
- Sweet H.C. Specification of the first quartet micromeres in *Ilyanassa* involves inherited factors and position with respect to the inducing D macromere // *Development.* 1998. V. 125. P. 4033–4044.
- van den Biggelaar J.A.M. Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgata* // *J. Morphol.* 1977. V. 154. P. 157–186.
- van den Biggelaar J.A.M., Guerrier P. Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusk *Patella vulgata* // *Dev. Biol.* 1979. V. 68. P. 462–471.
- Wilson E.B. Experimental studies on germinal localization. I. The germ-regions in the egg of *Dentalium* // *J. Exp. Zool.* 1904a. V. 1. P. 1–72.
- Wilson E.B. Experimental studies on germinal localization. II. Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium* // *J. Exp. Zool.* 1904b. V. 1. P. 197–268.

## Functional Role for MAP Kinase Signaling in Cell Lineage and Dorso-Ventral Axis Specification in the Basal Gastropod *Testudinalia testudinalis* (Patellogastropoda, Mollusca)

V. V. Kozin, R. A. Babakhanova, and R. P. Kostyuchenko

*Department of Embryology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

*e-mail: kostyuch@mail.ru*

**Abstract**—In Spiralia, the specification of cell lines in the course of development is provided by maternal factors. However, recent studies demonstrated the importance of inductive processes whose significant element is cellular signaling. Our data allow us to speak of the dependent specification of a number of cell lines at the early stages of development of the mollusk *Testudinalia testudinalis* (*Testudinalia tessellate*, Patellogastropoda), including the period when the determination of the 3D cell takes place, which is accompanied by a change in the shape and establishing of contacts with animal micromeres by one of the macromeres of the third quartet. It is exactly at this moment that activation of MARK was registered in the 3D blastomere-organizer. An analysis of the influence of the U0126 blocker of the MAP-kinase way on the development of *Testudinalia* showed that the greatest effect of the inhibitor is observed during the cultivation of embryos until the sixth cycle of fragmentation. It should be noted that a scale of correlation of the degree of defects and increase in concentration exists. Absence of the functioning retractor, disorganization of the muscle system, and abnormal structure of the shell (to the extent of complete absence of the shell), as well as velum, foot, and mantle fold, were observed in a considerable part of larvae after a lengthy upkeep of the objects in the U0126 solution. At the same time, none of the experiments showed a complete disruption of the specification of the dorsoventral axis, which produces a larva with a four-ray radial symmetry. This attests in favor of the existence of various molecular mechanisms of determination of the secondary body axis among the animals from the group Spiralia.v

**Keywords:** Spiralia, mollusks, cell lines, specification, cytodifferentiation, embryo axes, signaling, MARK, evolutionary conservatism.

## НОВЫЕ МЕТОДЫ И МОДЕЛИ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

УДК 57.032

### СТУПЕНЧАТОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ МЫШЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2013 г. А. Г. Малыгин

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33

E-mail: agmalygin@mail.ru

Поступила в редакцию 23.05.11 г.

Окончательный вариант получен 09.04.12 г.

Изучено распределение продолжительности жизни у потомков нормальной самки и самца мыши с наследуемым признаком задержки роста, обнаруженным в лабораторной популяции. Наследуемость признака позволяет считать его результатом мутации. Показано, что кривая зависимости продолжительности жизни мышей от их порядкового номера в ряду увеличения продолжительности жизни (кривая рангового распределения), имеет ступенчатый характер для самцов и самок мутантов, а также для самцов с нормальным развитием. Первая ступень гибели мышей на кривой рангового распределения соответствует месячному сроку со дня их рождения и характерна только для мутантных самцов и самок в период их максимального отставания в весе от нормальных сородичей. Выжившие мутанты в течение двух месяцев догоняют в развитии нормально развивавшихся особей и внешне становятся не отличимыми от них. Последующие ступени гибели у мутантов и нормальных самцов совпадают по времени. На ранговых кривых продолжительности жизни нормально развивавшихся и рожавших самок ступени отсутствуют. Показано, что временные интервалы между ступенями, воспроизводятся в независимых группах мышей и, следовательно, ступени не являются случайными отклонениями от теоретических кривых, а имеют закономерный характер. Обнаруженное явление интерпретировано в рамках гипотезы о реализации у мышей генетической программы онтогенеза, которая обеспечивает периодическую смену стадий повышенной жизнестойкости стадиями чувствительности к внешним факторам риска, проявляющимися в увеличении вероятности гибели. Ненаблюдаемость таких стадий в группе нормально развивавшихся самок может быть объяснена случайными смещениями в развитии, вызванными нерегулярностью репродуктивных функций.

*Ключевые слова:* продолжительность жизни, мыши, задержка роста, ранговое распределение, стадии развития, интенсивность смертности, формула Гомперца–Мейкема, гипотеза.

DOI: 10.7868/S0475145013010072

Почти два столетия назад служащий страховой компании Гомперц (Gompertz, 1825), изучая статистику смертности населения, обнаружил, что интенсивность смертности в средних возрастах (для современного населения промышленно развитых стран – от 35 до 90 лет), можно характеризовать экспоненциальной зависимостью от возраста.

$$\mu(x) = dl_m(x)/[(l_0 - l_m(x))dx] = R \exp(\alpha x), \quad (1)$$

где:  $\mu(x)$  – функция интенсивности смертности;

$x$  – время;

$l_m(x)$  – функция смертности – число лиц, умерших к данному возрасту;

$dl_m(x)/dx$  – производная, выражающая скорость вымирания лиц данного возраста;

$l_0$  – суммарное число умерших и доживающих лиц;

$l_0 - l_m(x)$  – функция дожития, дополнительная к функции смертности;

$R, \alpha$  – экспериментально определяемые параметры формулы Гомперца.

По сравнению с другими способами аналитического описания смертности (Гаврилов, Гаврилова, 1991 с. 44), формула Гомперца получила более широкое распространение, поскольку ее логарифмирование давало прямую линию, что позволяло ограничиваться двумя параметрами.

$$\ln \mu(x) = \alpha x + \ln R.$$

Чтобы опустить нижнюю границу применимости формулы Гомперца до возраста 25 лет, Мейкем (Makeham, 1860) ввел в формулу (1) дополнительный параметр  $A$ :

$$dl_m(x)/[(l_0 - l_m(x))dx] = A + R \exp(\alpha x). \quad (2)$$

Для уменьшения разброса точек на экспериментальной кривой интенсивности смертности, исходные статистические данные перед дифференцированием принято сглаживать путем усред-

нения по одинаковым временным интервалам  $\Delta x$ . Для человеческих популяций часто используют интервалы 1 или 5 лет. В случае волнообразного характера кривой, такое усреднение может устранять колебания с периодами соответственно до 3 или до 15 лет.

В отличие от людей, данные о смертности в многочисленных однородных популяциях лабораторных животных плохо соответствуют теоретическим кривым, построенным с использованием модели Гомперца–Мейкема (Анисимов, 1979; Анисимов, 2008, с. 160, 164, 166, 212–215; Попович, 2003). Достичь хорошего совпадения с теоретическими кривыми не удается даже при использовании процедуры сглаживания (Лемб, 1980, с. 53). Несмотря на это, наблюдаемые отклонения экспериментальных значений смертности от теоретических кривых до сих пор принято относить к случайным, и они мало интересуют специалистов.

Цель настоящего исследования сравнить формы экспериментально полученных и теоретически вычисленных по модели Гомперца–Мейкема кривых, характеризующих смертность мышей наследующих и не наследующих признак задержки роста, выяснить степень закономерности или случайности наблюдаемых отклонений, и, по возможности, дать им объяснение в рамках более адекватной гипотезы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали потомков мышей, полученных от скрещивания нормальной самки гетерогенной лабораторной популяции с примесью линии Swiss Webster филиала “Андреевка” питомника ГУНЦБМТ РАМН и самца с признаком задержки роста. Наследуемость признака позволяет считать его результатом мутации. Самец-мутант был случайно обнаружен в потомстве нормальной самца той же популяции, которого поили 0.01 M раствором азотнокислого серебра в течение 1.5 месяца, начиная с 28-дневного возраста, и спустя месяц после окончания процедуры затравливания серебром скрестили с интактной самкой той же линии. Мышей содержали в виварии на стандартном лабораторном корме, сбалансированном по белкам, жирам и углеводам, с необходимым набором витаминов и микроэлементов. Данные о продолжительности жизни всех 118 мышей обоего пола получены в результате учета их рождения и естественной смерти в течение 3 лет и 9 месяцев в разное время. Число особей, использованных для построения кривых рангового распределения, соответствует числу точек на графиках. Построение и преобразование графиков осуществляли в компьютерной программе “Origin”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

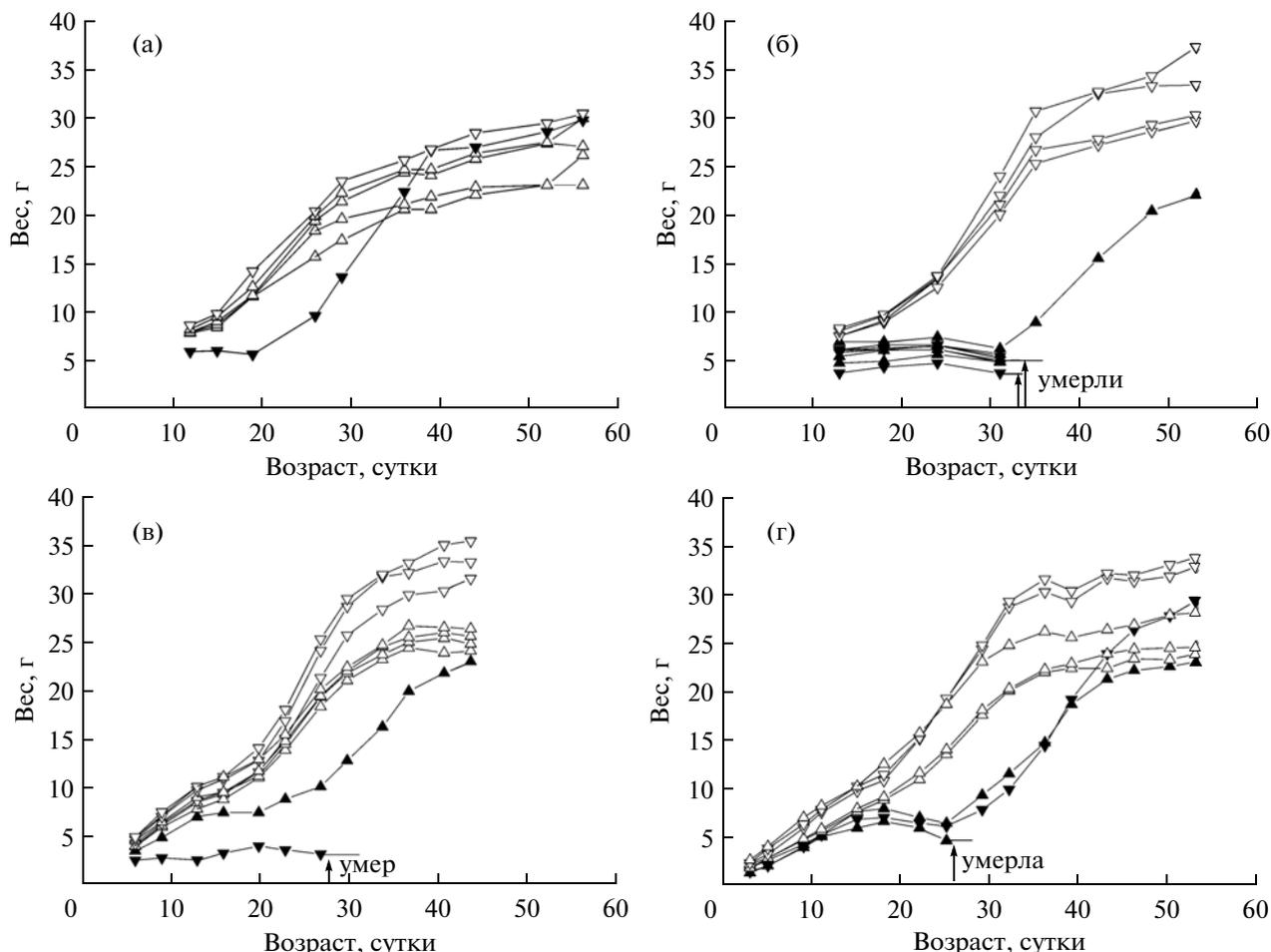
### *Общая характеристика мышей с мутацией задержки роста*

Различие в кинетике увеличения веса первого самца с задержкой роста и веса нормально развивавшихся мышей из того же помета представлено на рис. 1. Было обнаружено, что полученные в последующих поколениях самки с задержкой роста при скрещивании как с мутантными так и нормальными самцами либо не давали потомства, либо мышата умирали в течение одного-двух дней после рождения. Поэтому мутация передавалась следующим поколениям только через скрещивание мутантных самцов и нормально развивавшихся самок. Скрещивание нормальных самцов и самок, полученных от мутантных самцов и нормальных самок, приводило к рождению нормальных особей. Это указывало на нерецессивную природу мутации. При первом и последующих скрещиваниях самцов-мутантов и нормальных самок от 10 до 70% особей в помете составляли мутанты с задержкой роста, представленные обоими полами. Однако среднее количество мутантов в помете не превышало 30%, что было недостаточным для признания мутации доминантной. Отсюда следовало, что мутация может иметь нехромосомную природу.

При сравнении изменения веса мутантов и нормально развивавшихся особей в пометах, полученных от скрещивания самцов-мутантов с нормальными самками, было обнаружено, что мутанты обычно догоняют в росте нормальных особей в течение первых двух месяцев развития. Как видно из рис. 1 максимальное различие в весе наблюдается примерно через месяц после рождения. При этом, в большинстве случаев к середине месяца вес мутантов перестает увеличиваться, или даже начинает снижаться. Можно также заметить, что период торможения развития мутантов соответствует периоду быстрого увеличения веса на кривой роста нормально развивавшихся мышей, который приходится на возраст от 15 до 30 суток.

Другой важной особенностью мышей-мутантов явилось то, что многие из них были не в состоянии преодолеть период задержки роста и погибали в возрасте 25–35 суток. Из литературы известно, что этот возраст у нормальных мышей характеризуется максимальной чувствительностью к действию ионизирующего излучения (Grosfill, 1959). Отсюда следует, что мутация задержки роста проявляет скрытую стадию повышенного риска смерти, соответствующую месячному сроку постнатального развития мышей.

Из сравнения кривых увеличения веса мышей и полученной еще в первой половине прошлого века Шмальгаузенем (Шмальгаузен, 1984, с. 139, 170) кривой увеличения веса человека следует, что участку быстрого увеличения веса у мышей (15–



**Рис. 1.** Изменения в весе мышей-мутантов и нормальных мышей в начальном периоде онтогенеза. Пометы: (а) – с первым самцом-мутантом (дата рождения – 08.07.07); (б) – с одной выжившей самкой-мутантом (дата рождения – 04.01.08); (в) – с одним умершим самцом-мутантом (дата рождения – 20.08.08); (г) – с одной умершей самкой-мутантом (дата рождения – 02.03.08). Треугольники с вершинами вниз – самцы. Треугольники с вершинами вверх – самки. Темные треугольники – мыши мутанты. Светлые треугольники – нормальные мыши.

30 суток) соответствует участок быстрого увеличения веса у человека, который приходится на период развития от 12 до 19 лет.

При этом, максимум на начальном участке кривой логарифма интенсивности смертности человека. (Лэмб, 1980, с. 53), не описываемом формулой Гомперца–Мейкема, соответствует 20 годам, то есть практически совпадает с концом периода быстрого увеличения веса на кривой изменения веса у человека. Этот факт позволяет высказать предположение, что области максимального риска смерти в начальном периоде жизни соответствуют одинаковым стадиям развития у мыши и у человека.

*Графическое представление данных о смертности мышей*

Обнаружение в начальном периоде развития мутантов области повышенной смертности приве-

ло к мысли проследить продолжительность жизни отстающих в росте и нормально развивающихся особей на протяжении всего периода видовой продолжительности жизни и выяснить степень соответствия теоретических кривых экспериментальным данным. Для этого необходимо было выбрать способ оптимального графического представления теоретических и экспериментальных данных. Данные можно было бы представить принятым в демографии способом в виде логарифмов экспериментальных и теоретических значений интенсивности смертности в соответствии с формулой Гомперца–Мейкема. Однако для построения экспериментальных кривых интенсивности смертности необходимо вычислить производные кривых смертности из усредненных данных, что требует большого объема исходного статистического материала. Поскольку количество исследуемых мышей в нашем случае ограничено, сравнительный анализ имело смысл провести на кривых дожития или

смертности, функции которых не содержат производной. Но при построении этих кривых количество выживших или умерших особей также принято усреднять по дискретным временным интервалам. Выход может быть найден в отказе от процедуры усреднения. Однако правомерность отказа от традиционно применяемой процедуры требует обоснования.

Используемые при постановке опытов значения независимой переменной определяются волей экспериментатора. В естественных науках эти значения обычно выбирают так, чтобы они равномерно располагались на горизонтальной оси графиков. В тех случаях, когда по сложившейся традиции на горизонтальной оси располагают зависимую переменную, которая по определению не контролируется экспериментатором (в данном случае это продолжительность жизни мышей), равномерное распределение достигается усреднением значений результатов эксперимента по одинаковым дискретным интервалам зависимой переменной.

Использование усреднения данных основано на убеждении, что оно позволяет избавиться от случайных отклонений и тем самым выявить истинный характер экспериментальных зависимостей. Однако чтобы получить достоверный результат, необходимо иметь критерии, позволяющие отличать закономерные изменения от случайных. Универсальным критерием закономерности наблюдаемых изменений является их воспроизводимость в независимых опытах. Пренебрежение этим критерием превращает усреднение экспериментальных данных всего лишь в способ упрощения информации, оборотной стороной которого является ее потеря и искажение. Действительно, если каждая точка кривой получена усреднением десяти экспериментальных точек, то исходная информация сокращается в десять раз. При этом усредненное значение не представляет ни одного из реально полученных значений и, следовательно, информация искажена. Например, часто используемый в демографических исследованиях для усреднения интенсивности смертности людей пятилетний интервал полностью исключает обнаружение в границах этого интервала объективных закономерностей.

Искажение и потерю информации при ее усреднении первыми начали сознательно практиковать астрономы (Математическая энциклопедия, 1984) с целью экономного описания больших объемов данных наблюдений простыми аналитическими функциями с ограниченным числом параметров. Затем эти приемы распространились в другие области науки. Однако в настоящее время, благодаря доступности вычислительной техники, проблема экономной записи научной информации потеряла остроту. Поэтому, если нет особой

надобности, целесообразно избегать усреднения исходной информации, ведущего к ее потере и искажению.

Поскольку при малых объемах экспериментальных данных усреднение по одинаковым дискретным интервалам невозможно, то их неравномерное распределение по горизонтальной оси приводит к образованию провалов, создающих впечатление неаккуратно выполненного исследования. В нашем случае исключить эти трудности можно, если использовать для графического представления экспериментальных данных функцию рангового распределения  $x(l_m)$ , обратную функции смертности  $l_m(x)$ . Последняя является дополнительной к обычно употребляемой демографами функции дожития  $l_0 - l_m(x)$ . В функции рангового распределения, независимой переменной служит номер особей, расположенных в порядке увеличения продолжительности жизни, а зависимой переменной является продолжительность жизни особи. Это обеспечивает равномерное размещение значений независимой переменной на горизонтальной оси. Следует подчеркнуть, что при переходе к обратной функции информативность графика не уменьшается, поскольку число экспериментальных точек остается неизменным.

Графически переход от функции смертности к функции рангового распределения осуществляют простым обменом местами осей координат. Кривая при этом приобретает зеркально симметричную форму по отношению к исходной.

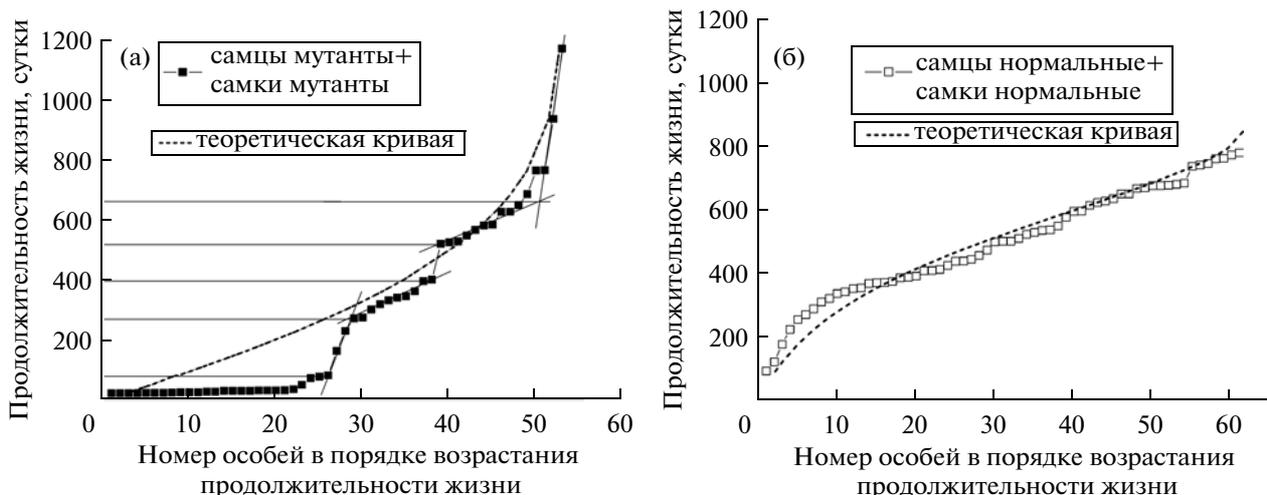
Теоретическая форма кривой функции рангового распределения получается из теоретического графика функции смертности, выводимой интегрированием формулы Гомперца–Мейкема (2) при начальных условиях  $x = 0$  и  $l_m = 0$ :

$$l_m(x) = l_0 \{1 - \exp[R/\alpha(1 - \exp(\alpha x)) - Ax]\}. \quad (3)$$

При этом, входящие в нее параметры формулы Гомперца–Мейкема вычислялись по четырем экспериментальным значениям функции дожития  $l_0 - l_m(x)$ , методом, описанным Гавриловым Л.А. и Гавриловой Н.С. (Гаврилов, Гаврилова, 1991, с. 68).

#### *Закономерности смертности мышей в онтогенезе*

На рис. 2 представлены кривые рангового распределения продолжительности жизни нормальных и мутантных мышей. Как видно из рис. 2а, на кривой рангового распределения, описывающей смертность в популяции мышей-мутантов, выявились две четкие ступени в интервалах продолжительности жизни: от 80 до 270 суток и от 400 до 520 суток с минимальной смертностью (см горизонтальные линии), и разделяющие их области с повышенной смертностью. В то же время, на кривой, описывающей смертность нормальных мы-



**Рис. 2.** Графики рангового распределения продолжительности жизни: (а) – мышей-мутантов и (б) – нормальных мышей. Теоретические кривые вычислены при значениях параметров формулы Гомперца–Мейкема: для (а) –  $A = -1.3 \times 10^{-3}$ ;  $R = 2.07 \times 10^{-3}$ ;  $\alpha = 1.18 \times 10^{-3}$  и для (б) –  $A = 9.413 \times 10^{-5}$ ;  $R = 2.849 \times 10^{-4}$ ;  $\alpha = 4.68 \times 10^{-3}$ .

шей (рис. 2б), аналогичные ступени выражены весьма слабо. Из этого следует, что жизнь мышей-мутантов разделяется по времени на стадии устойчивого развития, когда вероятность смерти имеет минимальные значения и стадии повышенного риска, когда вероятность смерти значительно возрастает. При этом максимальная продолжительность жизни для обеих групп мышей, определяемая положением точек на конечных участках кривых, оказывается практически одинаковой. Это значит, что пережитое мутантами в начале жизни отставание в развитии заметно не влияет на продолжительность последующей жизни.

Для сравнения с экспериментально полученными кривыми рангового распределения на рис. 2 приведены теоретические кривые рангового распределения (обозначены пунктирными линиями). Сравнение теоретических кривых рангового распределения с экспериментальными выявляет качественные различия в их форме. Если теоретические кривые имеют лишь один перегиб в средней части линий, то ступени на экспериментальных кривых образуют несколько явно выраженных перегибов. Это значит, что теория формулы Гомперца–Мейкема, преобразованием которой получены теоретические кривые, в данном случае не согласуется с полученными экспериментальными результатами.

Как следует из предыдущего раздела, критерием достоверности экспериментальных данных служит их воспроизводимость. Чтобы доказать, что отклонения экспериментальной кривой от теоретических кривых, построенных с использованием параметров формулы Гомперца–Мейкема, воспроизводимы, а, следовательно, наблюдаемые на экспериментальных кривых ступени не случай-

ны, было проведено следующее исследование. Группа мутантных мышей, размещенных в ряду в последовательности сроков их рождения, была разделена на две равные подгруппы. Одна подгруппа состояла из мышей, родившихся раньше срока, разделившего эти группы, другая – из мышей, родившихся позже этого срока. Затем для каждой подгруппы построили кривые рангового распределения по продолжительности жизни, представленные на рис. 3а. Аналогичное разделение с построением соответствующих кривых было проведено по срокам смерти (см. рис. 3б). Поскольку кривые для разных подгрупп можно толковать как результат двух независимых опытов, то близость уровней ступеней на кривых, полученных в этих опытах, свидетельствует о том, что ступени имеют закономерный характер.

Чтобы получить дополнительные доводы в пользу того, что наблюдаемые отклонения закономерны, было проведено другое исследование. Группы мутантных и нормальных особей были разделены на подгруппы по половому признаку. Соответствующие им кривые представлены на рис. 4а и 4б. Как видно из рисунка, характерные ступени на кривых рангового распределения мутантных самцов и самок по продолжительности жизни не только сохранили свое положение, но даже приобрели более четкие очертания. В то же время, разделение по половому признаку нормальных мышей привело к тому, что на кривой нормальных самцов обнаружилось четкие ступени, аналогичные ступеням на кривых мутантных мышей. От ступеней у мутантных мышей они отличаются лишь некоторой приподнятостью. На кривой нормальных самок эти ступени выражены, хотя и очень слабо, но все же несколько четче, чем на исходной кривой (сравните рис. 2б и 4б). Практическое совпадение

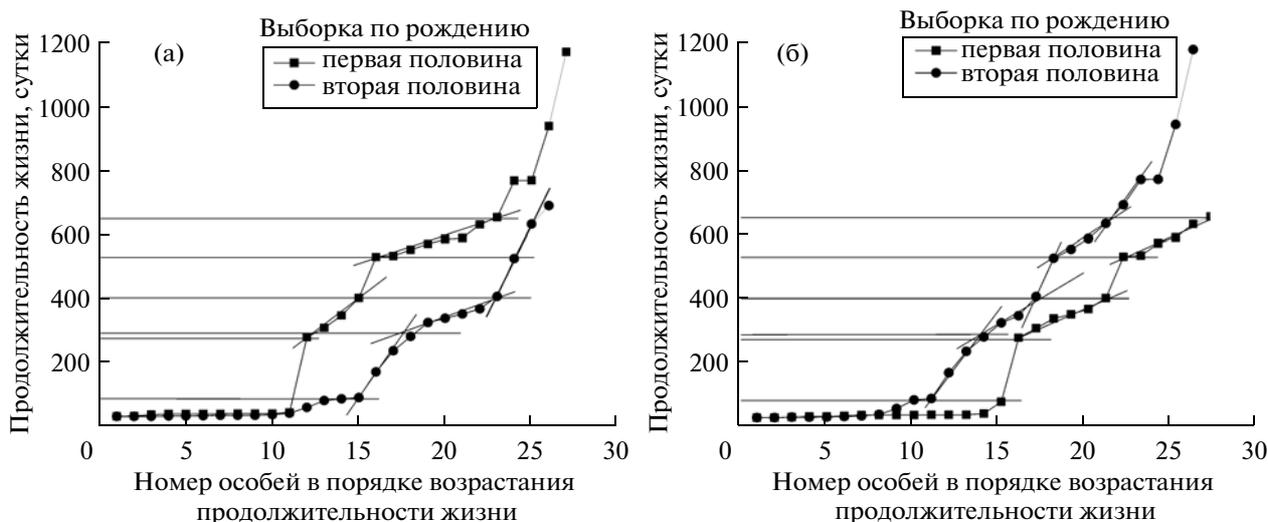


Рис. 3. Графики рангового распределения продолжительности жизни мышей-мутантов, разделенных на две подгруппы: (а) – по времени рождения (27 особей, рожденных с 08.07.07 по 27.06.08 и 26 особей, рожденных с 27.06.08 по 17.03.11); (б) – по времени смерти (27 особей, умерших с 05.02.08 по 20.11.09 и 26 особей, умерших с 27.06.08 по 11.04.11).

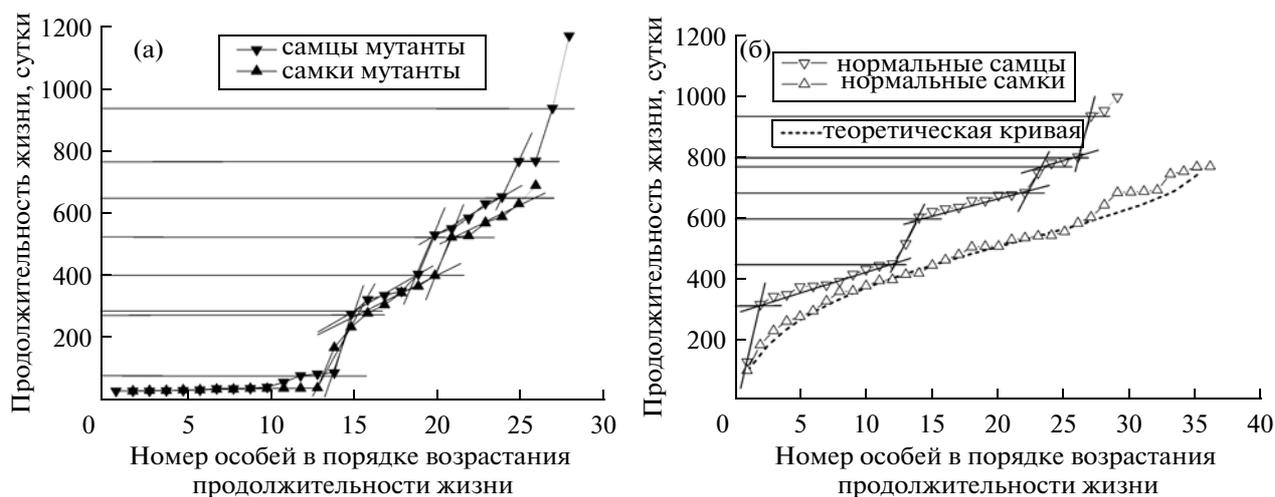


Рис. 4. Графики рангового распределения продолжительности жизни: (а) – мутантных самцов и самок и (б) – нормальных самцов и самок. Теоретическая кривая для самок вычислена при значениях параметров формулы Гомперца–Мейкема:  $A = 2.201 \times 10^{-4}$ ;  $R = 2.295 \times 10^{-4}$ ;  $\alpha = 6.25 \times 10^{-3}$ .

кривых рангового распределения у мутантных самцов и самок и различие у нормальных самцов и самок можно объяснить тем, что мутантные самки не способны вынашивать потомство, и этим они похожи на самцов. Нормальные самки, в отличие от самцов, обладают целым комплексом физиологических функций, позволяющих рожать и выкармливать потомство. Вероятно, какие то из этих функций прямо или косвенно способствуют смещению во времени у отдельных особей стадий устойчивого развития и повышенного риска смерти, выражающемся в спрямлении кривых рангового распределения. Кроме того, было замечено, что, в отличие от нормальных самцов, мутантных сам-

цов и мутантных самок, большая часть нормальных самок погибает от опухолей.

Близость уровней ступеней на кривых рангового распределения у мышей-мутантов обоего пола и у нормальных самцов свидетельствует о том, что ступени служат устойчивыми характеристиками развития мышей в онтогенезе, на которые мутация задержки роста существенного влияния не оказывает.

Воспроизводимость одних и тех же ступеней на кривых рангового распределения в описанных способах представления экспериментальных данных свидетельствует об их закономерной природе. Это позволяет сделать вывод, что наблюдаемые в

виде ступеней отклонения формы экспериментальной кривой от теоретической, построенной с использованием параметров формулы Гомперца–Мейкема, следует относить не на счет случайных погрешностей определения исходных данных, а на счет неадекватности теоретической модели Гомперца–Мейкема.

Тот факт, что разделение мышей на группы со сходными биологическими признаками не приводит к потере характерных ступеней на соответствующих кривых, а, наоборот, способствует их выявлению, навела на мысль, что в кривых, описывающих продолжительность жизни мышей в смешанных группах, составленных из разнородных мышей, наличие ступеней маскируется. Процесс напоминает явление интерференции когерентных пучков света в оптике. Чем выше однородность синусоидальных гармоник в пучках, то есть их когерентность, тем более выражены полосы интерференции, чем когерентность меньше, тем полосы менее выражены и по мере дальнейшей потери когерентности превращаются в однородно освещенное поле. Пользуясь этой аналогией, группы особей с близкими уровнями ступеней на кривой рангового распределения по продолжительности жизни можно называть когерентными.

Как отмечалось выше, кривые рангового распределения мутантных самцов и самок практически совпадают (рис. 4а) и, следовательно, эти группы мышей высоко когерентны. В то же время, положение перегибов на кривой рангового распределения нормальных самцов (рис. 4б) несколько отличается от положения аналогичных перегибов на кривых рангового распределения мутантных мышей обоего пола (рис. 2а) и, следовательно, соответствующие группы мышей менее когерентны. Чтобы продемонстрировать зависимость сглаженности кривых рангового распределения от степени когерентности между выделенными группами мышей, построили кривые рангового распределения для различных сочетаний этих групп.

Как и следовало ожидать, ступени на кривых рангового распределения, построенных на основании данных о продолжительности жизни группы мышей, полученной при смешении менее когерентных групп, а именно: нормальных самцов с самцами-мутантами (рис. 5а) и нормальных самцов с самками-мутантами (рис. 5б) — выражены практически одинаково, но заметно слабее, чем на кривой, ранее построенной для группы мышей, состоящей из более когерентных групп: самцов-мутантов и самок-мутантов, представленной на рис. 2а.

Ввиду того, что различие в когерентности у групп нормальных самцов, самцов-мутантов и самок-мутантов сохраняется неизменным, степень выраженности ступенек на кривой рангового рас-

пределения, построенной при их объединении, также остается практически неизменной (рис. 5в).

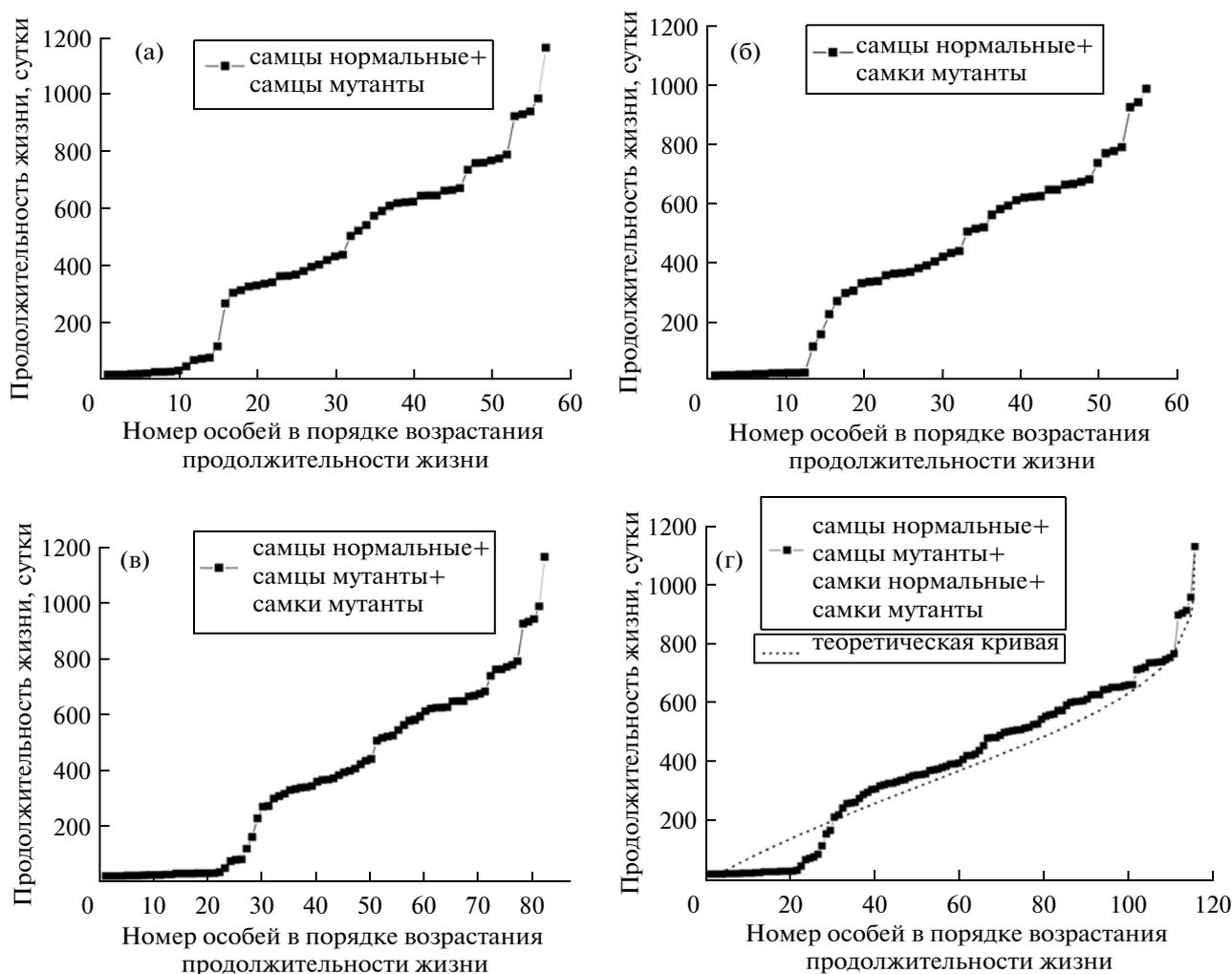
Напротив, объединение этих трех групп (рис. 5в) с некогерентной группой нормальных самок (см. рис. 4в), ранговая кривая которой имеет весьма размытые перегибы, практически полностью сглаживает результирующую кривую (рис. 5г), придавая ей большее сходство с теоретической кривой, построенной с использованием параметров формулы Гомперца–Мейкема.

Аналогия с интерференцией позволяет объяснить, почему кривые интенсивности смертности людей, построенные демографами на материале больших статистических выборок, в своей средней части хорошо описываются формулой Гомперца–Мейкема, в то время как аналогичные кривые для экспериментальных животных, построенные на небольших выборках (Лэмб, 1980, с. 53), этой формулой описываются неудовлетворительно. Логарифмическая форма экспериментальной кривой интенсивности смертности для людей в период до 30 лет имеет волнообразный вид (Гаврилов, Гаврилова, 1991, с. 137; Лэмб, 1980, с. 53). Для возрастов старше 90 лет кривая также испытывает изгибы (Гаврилов, Гаврилова, 1991, с. 109; Vaupel et al., 1998). Последний факт мало изучен и поэтому его не принято связывать с первым. Отклонениями статистической кривой интенсивности смертности на начальном и конечном участках от теоретической — демографы пренебрегают, еще и потому, что суммарная доля умерших (исключая смертность до одного года) на этих участках не превышает 3% от общей смертности. В отличие от демографов, геронтологи, изучающие природу смерти, должны быть заинтересованы в детальной информации о перегибах на кривых смертности.

Совместное рассмотрение перегибов на начальном и конечном участках кривой позволяет предположить, что кривая составлена периодическими функциями, описывающими смертность некогерентных групп индивидов. При этом соответствующие гармоники начинаются с одной фазы, придавая суммарной кривой волнообразный вид на ее начальном участке. Затем эти гармоники расходятся по фазе и гасят друг друга, образуя сглаженный участок. В конце жизни, когда их фазы снова совпадают, к кривой возвращается первоначальный волнообразный вид.

Для живых организмов свойственна индивидуальная запрограммированность протекания во времени многих физиологических процессов. Примерами могут служить: месячный цикл у женщин, стадии перехода к половой зрелости, сроки беременности и наступления менопаузы. Наступление смерти можно рассматривать как завершающий этап физиологического развития организма.

Однако, в отличие от названных выше физиологических процессов, смерть особей в популяции



**Рис. 5.** Графики рангового распределения продолжительности жизни четырех групп мышей, объединенных в различных сочетаниях: (а) — нормальные самцы и самцы-мутанты; (б) — нормальные самцы и самки-мутанты; (в) — нормальные самцы, самцы-мутанты и самки-мутанты; (г) — все мыши. Теоретическая кривая для всех мышей вычислена при значениях параметров формулы Гомперца–Мейкема:  $A = -9.84 \times 10^{-4}$ ;  $R = 1.03 \times 10^{-3}$ ;  $\alpha = 2.86 \times 10^{-3}$ .

не строго детерминированное во времени явление и поэтому допускает в качестве причины воздействия случайных факторов среды, таких как возбудители болезней, неправильное питание или неблагоприятные для жизни условия среды.

С другой стороны, имеющиеся статистические данные о детерминированности и сужении временных рамок заболеваемости и смертности у пар однояйцевых близнецов в отличие от разнояйцевых, примеры совпадения завершения жизненного цикла с окончанием процессов оплодотворения у мужских особей или плодоношения у женских (лососи, пчелы, бабочки однодневки, однолетние растения и т.д.) и описанная выше смена периодов устойчивого развития периодами повышенного риска гибели у мышей побуждают видеть причину смерти в завершении внутренней программы развития организма.

Согласовать данные, свидетельствующие в пользу внутренней запрограммированности продолжительности жизни или ее изменения под влиянием внешних случайных факторов, можно в рамках гипотезы о том, что запрограммированной является не сама смерть, а ее вероятность, обусловленная периодическим изменением чувствительности организма к неблагоприятным воздействиям внешней среды. Согласно этой гипотезе, владея информацией о том, когда в результате внутреннего развития организма вероятность смерти достигает максимальных значений, можно принимать меры, чтобы исключить усугубляющую опасность неблагоприятное влияние среды и тем самым обеспечить переход к следующей стадии устойчивого развития.

Доказательство справедливости этой гипотезы в отношении человеческого организма, а именно,

наличия подобных стадий в онтогенезе людей, открыло бы перспективу решения проблемы продления жизни до видового максимума (около 105 лет) у всех ныне живущих индивидов. Попытки найти доказательства существования критических стадий развития на основе обсчета имеющихся статистических данных уже предпринимаются (Frank, 2004). В случае успеха, наблюдаемая массовая гибель мужчин от инфарктов в возрасте 60 лет с позиций этой гипотезы может быть истолкована как результат достижения частью популяции критической стадии возрастной физиологической перестройки, которую в сложившихся социально-экономических условиях она не в состоянии преодолеть, чтобы перейти к новой стадии устойчивого развития.

Автор благодарит Л.А. Денисову за всестороннюю помощь в осуществлении технической части эксперимента и Д.Л. Тытика за подсказку использовать зависимость рангового распределения для графического представления данных о смертности мышей. Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01615 а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения. Т. 2. СПб.: Наука, 2008. 424 с.
- Анисимов В.Н., Кондрашова М.Н.* Влияние янтарной кислоты на частоту спонтанных опухолей и продолжительность жизни мышей С3Н/Sn // Докл. АН СССР. 1979. Т. 248. С. 1242–1245.
- Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С.* Биология продолжительности жизни. М.: Наука, 1991. 280 с.
- Лэмб М.* Биология старения: пер. с англ. М.: Мир, 1980. 208 с.
- Математическая энциклопедия. Т. 4. Осреднение. М.: Советская энциклопедия, 1984. С. 134.
- Попович И.Г., Войтенков Б.О., Анисимов и др.* Влияние пептида дельта-сна на продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у мышей // Докл. РАН. 2003. Т. 388. С. 1–3.
- Шмальгаузен И.И.* Рост и дифференцировка. Т. 1. Киев: Наукова думка, 1984. 176 с.
- Frank S.A.* A multistage theory of age-specific acceleration in human mortality. // BMC Biology. 2004. V. 2. 16. doi: 10.1186/1741-7007-2-16. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/2/16>
- Gompertz B.* On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining the value of life contingencies // Philos. Trans. Roy. Soc. London A. 1825. V. 115. P. 513–583.
- Grosfill M.L., Lindop P.J., Rotblat J.* Variation of sensitivity to fonizing radiation with age // Nature. 1959. V. 183. P. 1729–1730.
- Makeham W.M.* On the law of mortality and the construction of annuity tables // J. Inst. Actuaries. 1860. V. 8. P. 301–310.
- Vaupel J.W., Carey J.R., Christeansen K. et al.* Biodemographic trajectories of longevity // Science. 1998. V. 280. P. 855–860.

## Graduated Change of Life Expectancy in Mice in Ontogenesis

A. G. Malygin

*Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: agmalygin@mail.ru*

**Abstract**—Life expectancy of descendants of a normal female mouse and a male with an inherited growth inhibition mutation discovered in a laboratory population was investigated. The heritability of the characteristic allows us to consider it a result of mutation. It was shown that, in mice, the curve of dependence of life expectancy on their serial number in a row of increase in life expectancy (curve of rank distribution) has step-like shape for mutant males and females, as well as for males with normal development. The first grade of mice death on the curve of rank distribution was observed at one month after their birth and was characteristic only of males and females with a mutation during the period of maximum lag in weight as compared with their normal relatives. The surviving mutants catch up to the normally developing individuals within two months and externally become indistinguishable from them. The subsequent grades of death in mutants and normal males coincide on the time axis. The steps are absent on the rank curves of life expectancy of normally developing females. The time intervals between the steps are reproduced in parallel groups of mice and, hence, are not casual deviations from theoretical curves and are of a regular nature. The discovered phenomenon is interpreted within the scope of a hypothesis about the realization of the genetic program of ontogenesis, which provides periodic change of vitality stages with stages of sensitivity to external risk factors, which increase the probability of death, by mice. Absence of such stages in the group of normally developing females can be explained by shifts in development, which are produced by the irregular performance of reproductive functions.

**Keywords:** life expectancy, mice, growth inhibition, rank distribution, stages of development, death rate intensity, Gompertz–Makeham formula, hypothesis.

УДК 591

**РЕЦЕНЗИЯ НА КНИГУ А.Н. ОСТРОВСКОГО “ЭВОЛЮЦИЯ ПОЛОВОГО  
РАЗМНОЖЕНИЯ МШАНОК ОТРЯДА CHEILOSTOMATA  
(BRYOZOA: GYMNOLEAEMATA)”  
(САНКТ-ПЕТЕРБУРГ: ИЗДАТЕЛЬСТВО С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА, 2009. 404 с.)**

DOI: 10.7868/S0475145013010023

Монография А.Н. Островского посвящена сравнительному исследованию полового размножения и эволюции репродуктивной стратегии мшанок отряда Cheilostomata.

В главе 1 подробно описаны варианты репродуктивной стратегии и характеристики полового размножения представителей Cheilostomata. Изучены 246 современных и ископаемых видов этого отряда. Выделены 6 вариантов репродуктивной стратегии, один из которых относится к г-стратегии и характеризуется множеством олиголецитальных яиц, выметываемых после оплодотворения в воду и развивающихся в планктотрофных личинок (цифонаутов). Остальные варианты репродуктивной стратегии представлены К-стратегией, включающей заботу о потомстве с различными типами вынашивания полипидом одного или нескольких зародышей и их последующим развитием как лецитотрофных личинок либо живорождением. В одном из вариантов К-стратегия с живорождением включает и полиэмбрионию.

Описана и классифицирована половая структура колоний и половой гетероморфизм зооидов, включающий гонохоризм, гермафродитизм и стерильность и представленный четырьмя сочетаниями состояний зооидов. Подробно рассмотрена морфологическая организация гонад и связанных с вынашиванием структур зооидов, процессы оогенеза и вынашивания зародышей.

Глава 2 содержит детальное описание, анализ и классификацию строения выводковых камер; анализируется эволюция этих образований и возникновение вынашивания у Cheilostomata.

В главе 3 реконструируется эволюция репродуктивной стратегии Cheilostomata. Сделан обоснованный вывод о переходе от планктотрофных личинок к лецитотрофным, обусловленный изменениями характера оогенеза, с последующим приобретением вынашивания и переходом к плацентарной эмбриональной репродуктивной стратегии.

Известно, что переход от исходной планктотрофной личинки к лецитотрофной у морских моллюсков и иглокожих включает комплекс

скоррелированных изменений оогенеза, эмбриогенеза и личиночного развития (Касьянов, 1989; Wray, Raff, 1990, 1991; Kasyanov, 1991). Радикальное преобразование предковой репродуктивной стратегии у колониальных корнеголовых ракообразных (Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala) затрагивает оогенез и онтогенез, вовлекая все уровни организации, от молекулярного и субклеточного до видового и биоценотического (Касьянов и др., 1997; Исаева, Шукалюк, 2007). Клеточной основой репродуктивной стратегии корнеголовых ракообразных, включающей половое и бесполое размножение, служат плюрипотентные гаметогенные ствольные клетки (Isaeva, 2011).

А.Н. Островский полагает, что почкование колониальных организмов с образованием зооидов правильнее рассматривать как колониальный рост, а не как бесполое размножение (с. 8), хотя постоянно и неизбежно употребляемые в тексте книги термины “зооид” и “полипид” – наименование редуцированных индивидов, а не просто модульных частей колонии. Согласно А.Н. Островскому, половое размножение – единственный способ воспроизводства большинства мшанок, бесполое же размножение (к которому автор причисляет лишь фрагментацию) у этих колониальных организмов отсутствует (с. 10). Такой взгляд позволяет автору сосредоточиться на описании характеристик лишь полового размножения и классификации их вариантов.

Данные автора иллюстрированы множеством микрофотографий, электронограмм и схематических рисунков высокого качества. Монография завершается исчерпывающим списком литературы, списком исследованных видов и восемью таблицами.

В целом книга А.Н. Островского ценна и полезна не только специалистам по мшанкам, но и широкому кругу зоологов, биологов развития и палеонтологов. Многие детали оогенеза, оплодотворения и вынашивания представляют интерес и для сравнительных гистологов и цитологов.

В.В. Исаева