

**А. К. Дондуа**

# **БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ**

( в двух томах )

## **ТОМ II. БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ**

Санкт-Петербург  
2004

© А. К. Дондуа

## СОДЕРЖАНИЕ

### 15 ГЛАВА 15. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ

15.1. Проблема генетической идентичности дифференцированных клеток	1
15.2. Теория дифференциальной активности генов	10
15.3. Механизмы регуляции активности генов	15

### ГЛАВА 16. АВТОНОМНАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ 38

16.1. Материнские факторы формирования осей зародыша	38
16.1.1. Роль материнских факторов в формировании переднезадней оси зародышей <i>Дрозофилы</i>	39

16.1.2. Роль материнских факторов в спецификация дорсовентральной оси зародыша <i>Дрозофилы</i>	42
---	----

16.2. Материнские факторы детерминации клеточных линий	43
--	----

16.2.1. Ооплазматическая сегрегация и формирование клеточных клонов у <i>Spiralia</i> .	46
---	----

16.2.2. Ооплазматическая сегрегация и формирование клеточных клонов у <i>Caenorhabditis elegans</i>	47
---	----

16.2.3. Автономные факторы спецификации энтодермального зачатка иглокожих и асцидий	48
---	----

16.2.4. Факторы автономной спецификации хордомезодермы позвоночных	51
--	----

16.2.5. Факторы автономной спецификации мышечных клеток у Асцидий	51
---	----

### ГЛАВА 17. ЗАВИСИМАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ

17.1. Эмбриональная индукция. История открытия.	58
---	----

17.2. Индукция и компетенция	62
------------------------------	----

17.3. Гетерогенные индукторы	64
------------------------------	----

17.4. Образование мезодермального зачатка у амфибий и рыб	65
---	----

17.5. Молекулярные механизмы, определяющие свойства организатора. Нейрализация.	67
---	----

17.6. Антагонистическая направленность действия белков BMP и Chordin как фактор спецификации клеток у асцидий.	72
17.7. Факторы роста фибробластов как индукционные сигналы	73
17.8. Межклеточная, или контактная индукция	74
17.8.1. Межклеточная индукция с помощью паракринных факторов	75
17.8.2. Межклеточные взаимодействия с помощью юкстакринных факторов	79
ГЛАВА 18. ПОЗИЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ	84
18.1. Общие представления о позиционной информации	85
18.2. Кластерные гомеобокс-содержащие гены.	95
ГЛАВА 19. КЛЕТОЧНАЯ АДГЕЗИЯ И ПРОЦЕССЫ МОРФОГЕНЕЗА	101
ГЛАВА 20. АПОПТОЗ КАК ФАКТОР МОРФОГЕНЕЗА	113
ГЛАВА 21. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОГРАММЫ РАЗВИТИЯ	116
21.1. Сегментация тела дрозофилы.	117
21.2. Морфогенез конечности у позвоночных	122
21.3. Становление лево-правой асимметрии.	131
21.4. Развитие глаза у позвоночных	133
ГЛАВА 22. РЕГЕНЕРАЦИЯ	138
22.1. Введение: история открытия и основные понятия	138
22.2. Регенерация у Стрекающих	142
22.3. Регенерация у Планарий.	145
22.4. Регенерация конечности позвоночных	146
22.5. Роль нервной системы в процессах регенерации	154
ГЛАВА 23. ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА	161
23.1. Механизмы определения пола у насекомых	167
23.2. Молекулярно-генетические аспекты детерминации пола у нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i> .	175
23.3. Молекулярно-генетические аспекты детерминации пола у млекопитающих.	179
23.4. Разнообразии форм детерминации пола у	

многочелочных животных.	185
ГЛАВА 24. ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ	191
24.1. Кооптация генов как фактор эволюции многочелочных животных.	195
24.2. Эволюция геновых сетей путем кооптации. Модель Дэвидсона.	198
24.3. Ретроградное формирование регуляторных путей. Модель Уилкинса.	200
24.4. Эволюция онтогенеза и филогения животных	201
УКАЗАТЕЛЬ ОБЪЕКТОВ	211
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	

- ✓Глава 19. Клеточная адгезия и процессы морфогенеза
- ✓Глава 20. Апоптоз как фактор морфогенеза.
- ✓Глава 21. Генетические программы развития.
  - ✓21.1. Сегментация тела у насекомых
  - ✓21.2. Морфогенез конечности у позвоночных
  - ✓21.3. Становление лево-правой асимметрии.
  - ✓21.4. Развитие глаза у позвоночных,
- ✓Глава 22. Регенерация.
- ✓Глава 23 Детерминация пола.
- Глава 24. Эволюционная биология развития

## **ГЛАВА 24. ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ.**

Содержание предыдущих глав дает обширный материал, который свидетельствует о том, что эмбриогенез животных, с его сложным переплетением процессов роста, клеточной дифференциации и формообразования, контролируется и направляется разветвленными генетическими, по-видимому, самонастраивающимися системами. Ни один формообразовательный процесс невозможен вне рамок этих систем.

Для того, чтобы в ходе исторического развития живой природы произошла эволюция структур и их функций, чтобы образовались новые виды или более крупные систематические группы, должны произойти изменения в генетической системе управления онтогенезом анцестральной формы. Эти изменения сохраняются в ряду поколений лишь в том случае, если новые системные связи механизмов развития и новые структурные образования докажут свою жизнеспособность под жестким контролем естественного отбора. Еще в 1970-х годах Роем Бриттеном и Эриком Дэвидсоном (1971) было высказано представление о том, что эволюция онтогенеза во многом является отражением эволюции транскрипционных регуляторных систем. Эволюция форм возможна только при условии эволюции механизмов, определяющих становление этих форм в онтогенезе. Другими словами, в основе эволюции Metazoa лежит эволюция генетических систем, контролирующих их индивидуальное развитие.

Конечно, отношения между эволюцией биологии развития и видообразованием имеют более сложный характер, и видообразование происходит, очевидно, по своим законам. Достаточно вспомнить виды-двойники, которые, не имея заметных морфологических различий, тем не менее, являются нескрещивающимися "хорошими" видами. С другой стороны, еще Ч. Дарвин отмечал, что в пределах одного вида, например, у собак или голубей, иногда возникают морфологические различия, которые по своим масштабам превышают иные межвидовые. Тем не менее, можно утверждать, что эволюция механизмов индивидуального развития является главной причиной возникновения огромного разнообразия форм животных.

Среди некоторой части морфологов бытует мнение, что при построении филогенетических систем эволюционная морфология имеет некие преимущества перед другими дисциплинами, и что выводы, вытекающие из исследования возможных путей изменения структур, более весомы, чем выводы, основанные на анализе изменения геномов. Противопоставлять генетике эволюционную морфологию, наделяя ее какими-то особыми преимуществами в понимании процессов филогении, принципиально неверно. Природа едина. Только в нашем сознании --- для удобства анализа --- многоуровневые по своей сути явления можно подразделить на анатомические, цитологические и молекулярные составляющие. Решение такого рода проблем возможно при кооперации разных направлений исследований. Необходим синтез аналитических данных об эволюции на всех уровнях организации живого, т. е. необходима *эволюционная биология развития*.

В ходе эволюции животных происходит как видоизменение, так и возникновение новых генов. Образование новых генов обусловлено различными перестройками генетического материала и, прежде всего, дупликацией генов, которая создает предпосылки для их последующего расхождения, или диверсификации. Определенную роль в новообразовании генов играет также слияние генов и обособление их частей.

Диверсификация генов происходит благодаря генетическим изменениям, происходящим спонтанно или в ходе рекомбинации, а также под действием радиации, химических агентов, и других факторов. Могут возникать точечные мутации, в ходе которых происходит перестановка оснований, или *инверсия* (от лат. *inverto* --- переворачивать), либо выпадение отдельных нуклеотидов, или *делеция* (от лат. *deleo* --- разрушать). Известны и точечные *инсерции* (от лат. *insero* --- вкладывать), или вставки. Подобные изменения могут затрагивать и более значительные участки ДНК.

Генетические изменения разного масштаба происходят как в кодирующих областях гена, что ведет к образованию белков с видоизмененным аминокислотным составом, так и в некодирующих областях, в том числе в *цис-*

контролирующих участках гена. На уровне клеточных функций мутации видоизменяют свойства транскрипционных факторов, элементов механизмов сигналинга, ферментов и др.

В результате дупликации и диверсификации последовательностей ДНК в процессе эволюции возникают целые семейства и даже сверхсемейства генов. Изменение нуклеотидных последовательностей генов и соответствующее изменение аминокислотного состава кодируемых ими белков служит причиной того, что гены данного семейства в ходе эволюции приобретают новые функции. Формирование семейств генов в течение длительной эволюции животных и сопровождает, и участвует в эволюции индивидуального развития (Wilkins, 2002).

На рис. 24-1 представлено эволюционное древо T-box (Tbx) генов. Впервые представитель этого семейства ген *Brachiury* был описан у мыши, у которой гетерозиготная мутация данного гена вызывает образование короткохвостых животных, а гомозиготная является летальной. Как известно, ген *Brachiury* необходим для образования мезодермы в задней области тела. Tbx гены кодируют транскрипционные факторы. Связывающая ДНК область этих транскрипционных факторов состоит из 180 - 190 аминокислот. Консервативность связывающего домена обусловлена консервативностью соответствующей области гена (Т-бокса), который насчитывает 540 - 570 пар оснований.

Как следует из рис.24-1, в составе семейства насчитывается несколько подсемейств, образование которых является следствием дупликации анцестрального гена. Представители разных подсемейств часто выполняют различные функции. В отличие, например, от гена T, ответственного за развитие мезодермы в задней области тела, гены *tbx4* и *tbx5* участвуют в развитии конечности.

Ведущую роль в эволюции многоклеточных животных играет видоизменение связей между генами, обеспечивающими индивидуальное развитие. Изменения, происшедшие в *цис*-регуляторной системе гена, могут вызвать переподчинение



данного гена регулятору, который ранее был индифферентен по отношению к данному гену предковой формы. Таким образом, изменения на уровне ДНК *цис*-регуляторных систем, создавая новые паттерны транскрипции генов в развивающемся организме, способны вызвать новообразования, радикально затрагивающие план строения животного.

Генетические программы развития подразделяются на ряд последовательных этапов. Завершающие этапы этих программ представлены батареями генов тканеспецифической терминальной дифференциации. Если возникает изменение связей в этом звене, т. е. на уровне взаимодействия регулятора с контролируемой батареей, происходят какие-то небольшие изменения морфологии, которые не нарушат общего плана строения тела животного. Если изменение затронет более ранние этапы реализации программ развития, следует ожидать более глубоких перемен. Действительно, если у предковой формы изменение затронет *цис*-регуляторную систему гена, которая детерминирует место и время его экспрессии, то могут возникнуть такие новообразования, которые существенно видоизменяют строение тела животного (Davidson, 2001). Это обстоятельство, по-видимому, нашло свое отражение в представлении А.Н. Северцова о филэмбриогенезах (гл.12). Согласно Северцову, закрепившиеся в филогенезе изменения ранних этапов онтогенеза, или архаллаксисы, вызывают коренную перестройку онтогенеза, и ведут к появлению радикально измененных форм, тогда как изменения, происходящие на поздних этапах, или анаболии, не связаны с реорганизацией плана строения тела.

Эволюционные процессы, в ходе которых регуляторные гены привлекаются к исполнению новых функций при формировании паттерна, называют *кооптацией* (англ. --- cooption) или *вовлечением* (англ. --- recruitment). Именно благодаря процессам вовлечения системы управления обнаруживают заворачивающую консервативность, в результате которой гомологичные системы генов контролируют развитие негомологичных образований, как это происходит, например, при развитии конечностей насекомых и позвоночных, фасеточных глаз Дрозофилы и глаз млекопитающих.

Для вовлечения генов в новые регуляторные связи особенно важны два типа генетических изменений: *мутации в области энхансеров* и расширение генетического ресурса за счет *дупликации генов* и их регуляторных зон.

Мутации энхансеров, видоизменяющие транскрипцию гена за счет приобретения или утраты энхансером способности взаимодействовать с определенными транскрипционными факторами, часто лежат в основе явления кооптации. На рис. 24-2 представлен гипотетический случай кооптации, когда, благодаря мутации энхансера гена *PaxX*, транскрипционный фактор Нох R приобретает возможность взаимодействовать с этим энхансером и включать экспрессию гена *PaxX* в тех областях, и в те моменты, где и когда синтезируется Нох R.

Множественные повторы участков хромосомы --- дупликации или мультипликации --- обычно возникают в результате неравного кроссинговера. Благодаря дупликации возникает своеобразный резерв генетического материала, который может быть использован для эволюции. В результате мутации энхансера одна из копий дублированного гена может быть вовлечена в новые регуляторные связи, отсутствовавшие у предковой формы (рис. 24-3 А-Г). После такой кооптации возможно дальнейшее изменение связей между генами за счет параллельной эволюции, или *коэволюции* транскрипционного фактора и энхансера (рис. 24-3 Д)

#### **24.1. Кооптация генов как фактор эволюции многоклеточных животных.**

Эволюционное значение кооптации генов детально проанализировано Э. Дэвидсоном (Davidson, 2001). Дэвидсон отмечает, что кооптация регуляторных генов, участвующих в образовании паттерна развития, бывает двух типов. Во-первых, регуляторный ген может приобрести новый сайт-мишень генов, которые он не контролировал у анцестральной формы. В результате этот регуляторный ген приобретает возможность контролировать новые процессы. Во-вторых, в результате мутации собственного энхансера он сам может подпасть под контроль новых факторов, которые инициируют его экспрессию в той области развивающегося животного, где у анцестральной формы он ранее

не экспрессировался. В любом случае изменяется регуляторная сеть, возникают новые пространственные паттерны экспрессии генов, и ход развития приобретает новые формы.

**Кооптация гена *brachiury*.** Проблема эволюционной кооптации регуляторных генов, проанализирована на примере изменения функции гена *brachiury* в разных группах вторичноротых животных (рис. 24-4, Davidson, 2001). Гены *brachiury* образуют подсемейство генов, которые кодируют транскрипционные факторы, содержащие Т-бокс. У большинства билатеральных животных гены *brachiury* экспрессируются в ходе развития в мезодерме и энтодерме задней области тела. Однако кроме этой анцестральной функции *brachiury*, благодаря кооптации, в разных группах билатеральных животных осуществляет целый ряд дополнительных, специфических функций. Так, у Иглокожих *brachiury* экспрессируется не только в проспективной задней области в районе бластопора, но и на переднем конце кишки, а также во вторичной мезенхиме. Эта ранняя экспрессия прекращается перед формированием личинки. Использование гена *brachiury* в оральной области зародышей Иглокожих является кооптацией. У морских ежей ген *brachiury* экспрессируется при закладке тела взрослого животного и в амниотическом впячивании, и в левом гидроцеле. Эти функции появились в связи с метаморфозом личинки и также являются следствием кооптации. У Полухордовых ген *brachiury* экспрессируется во всех трех --- переднем, среднем и заднем --- целомических мешках. Экспрессия в заднем целоме --- анцестральный тип активности гена, экспрессия в среднем целоме характерна и для Полухордовых, и для Иглокожих. Но экспрессия в переднем целоме Полухордовых, который участвует в образовании хоботка, представляет собой характерную для этой группы кооптацию, равно как и сам хоботок (*proboscis*) является новообразованием, специфичным для этой группы вторичноротых.

У Хордовых ген *brachiury* экспрессируется, как у всех Билатеральных в задней области зародыша, анцестральной для экспрессии этого гена. Однако, у них возникает и новая функция, необходимая для спецификации хорды. Экспрессия генов *brachiury* наблюдается и в хорде личинок асцидий, и в хорде ланцетника, и при формировании хорды мыши. Участие *brachiury* в развитии хорды

является очевидным проявлением кооптации. Эта функция *brachiury* характерна только для Хордовых, и отчетливо отличается от анцестральной, характерной для всех билатеральных животных, или *панбилатеральной* функции, связанной с развитием заднего отдела зародыша.

**Кооптация *Hox*-генов.** Сравнительный анализ *Hox*-генов у Членистоногих привел к заключению, что все основные группы Членистоногих --- хелицеровые, многоножки, ракообразные и насекомые имеют сходные наборы *Hox*-генов. Существенные различия в формировании придатков тела вдоль переднезадней оси, возникшие у них в ходе эволюции, обусловлены, прежде всего, видоизменением регуляторных связей между *Hox*-генами и их мишенями, а также между *Hox*-генами и их регуляторами. Именно неоднозначность регуляторных связей лежит в основе различий в экспрессии генов *Ubx* и *abdA* в сегментах тела у разных Членистоногих (рис. 24-5). У паука передняя граница локализации факторов *Ubx* и *abdA*, выявляемых с помощью одного и того же антитела, находится в области опистосомальных сегментов. У многоножек эта граница проходит на уровне первого туловищного сегмента; такой же характер экспрессии наблюдается у некоторых ракообразных, тогда как у других --- эволюционно более продвинутых --- эта граница смещается назад, и проходит между третьим и четвертым туловищными сегментами. У Дрозофилы передняя граница экспрессия *Ubx* в ходе развития достигает передней границы третьего грудного сегмента, а затем сдвигается вперед еще на один сегмент.

Другой случай кооптации, которая имеет филогенетические последствия, вызванные изменением пространственного паттерна экспрессии *Ubx/abdA*, представлен на рис. 24-5. У ракообразных грудные сегменты обычно имеют двигательные конечности, образование которых предопределяется экспрессией генов *Ubx* и *abdA*. Изменение паттерна экспрессии этих генов, наблюдаемое в разных группах ракообразных, о котором можно судить по сдвигу передней границы локализации *Ubx/abdA* назад, вызывает формирование в исходно грудных сегментах ногочелюстей, которые заменяют обычные двигательные конечности (рис. 24-6).

Яркий пример эволюционной кооптации *Hox*-генов представляет формирование конечностей у позвоночных животных: именно благодаря кооптации возникает новый паттерн экспрессии кластерных *Hox*-генов вне переднезадней оси тела. У предков Хордовых не было парных придатков, подобных конечностям четырехногих позвоночных. Их нет и у современных беспозвоночных Хордовых. Первые придатки, которые возникли у позвоночных, были непарными --- передним и задним --- плавниками. Парные придатки у позвоночных появились в Силуре примерно 410 --- 440 миллионов лет назад. У бесчелюстных рыб были только грудные парные плавники, а у челюстных рыб --- и грудные, и брюшные. По-видимому, именно на этом этапе эволюции произошла кооптация "задних" (с 9 по 13) кластерных *Hox*-генов для формирования конечностей. В этой связи можно заметить, что у млекопитающих экспрессия кластерных *Hox*-генов контролируется двумя элементами. Один из них контролирует активность всего кластера, и работает при спецификации передне-задней оси тела. Функция второго распространяется только на постериорные гены, которые включаются при развитии конечности. Древность и консервативность механизма активации *Hox*-генов в почке конечности подтверждается экспериментами по экспрессии гена *hoxd11* рыбы в почке конечности мыши. Активация этого гена свидетельствует о том, что в этих эволюционных ветвях Челюстных позвоночных --- у костистых рыб и у млекопитающих --- сохранился фактор или комплекс факторов, который активирует экспрессию гена *hoxd11*.

Свидетельством эволюционной кооптации *Hox*-генов служат, наконец, случаи их участия в терминальной дифференциации. Так, известно, что ген *ubx* детерминирует тонкое распределение волосков на члениках ноги Дрозофилы, контролирует клеточную дифференциацию при формировании жужжальца. Ген *labial* контролирует образование специализированных экскреторных клеток средней кишки. При сверхэкспрессии этого гена все клетки средней кишки становятся экскреторными. Кооптация *Hox*-генов для обеспечения терминальной дифференциации наблюдается и у позвоночных. Например, ген *hoxd 13* необходим для образования чешуй на ногах у птиц.

## 24.2. Эволюция генных сетей путем кооптации. Модель Дэвидсона.

Сравнительная морфология Билатеральных животных обнаруживает целый ряд аналогичных органов, выполняющих сходные задачи, такие как голова, сердце, глаза, головной мозг, центральная нервная система, конечности. Несмотря на то, что процессы их развития в разных ветвях Билатеральных осуществляются разными способами, тем не менее, многие транскрипционные регуляторы, которые используются при их формировании, одинаковы. Дэвидсон (2001) полагает, что возможное решение этого парадокса состоит в том, что регуляторные гены, участвующие в формировании аналогичных частей тела, первоначально активировали батареи генов дифференциации структур, которые необходимы для выполнения соответствующих функций. Позднее эти гомологичные регуляторные гены в разных ветвях Билатеральных были вовлечены в разные системы формообразования. Во многих аналогичных структурах, например, в глазах насекомых и позвоночных, формообразование которых во многих ветвях Билатеральных происходит независимым образом, имеются функционально гомологичные структуры, такие как сетчатка и фоторецепторы, дифференциация которых осуществляется консервативной системой генов.

На рис. 24-7 представлена схема, иллюстрирующая гипотезу о путях вовлечения батарей генов дифференциации в процессы формообразования (Davidson, 2001). Рассматривается три последовательных этапа эволюции --- А, В, С. На первом этапе (рис. 24-7А) имеется батарея генов *a, б, в, г, д, е, ж*, активность которой обеспечивает дифференциацию клеток определенного типа. Эта батарея находится под контролем небольшой регуляторной сети, представленной на схеме тремя генами *x*. Эта сеть находится под контролем локализованного в пространстве сигнального фактора. Специфический для данной области тела внешний сигнал воспринимает ген *z*, который после активации включает экспрессию генов *x* и *y*. Ген *y* поддерживает активность *x*. На следующем этапе формируется более сложная система, состоящая уже из нескольких пространственных доменов транскрипции (рис.24-7Б). На этой схеме видно, что между анцестральными блоками (гены *y* и *z* первого блока опущены) появляются новые многоклеточные транскрипционные домены. Ген *x*

приобретает способность активировать новый для себя ген *w*. Кроме того, в регуляторной области гена *x* возникает дополнительный *цис*-регуляторный модуль, который, взаимодействуя с транскрипционным фактором *W*, поддерживает транскрипцию гена *x*. Вместе с тем этот новый регуляторный модуль при действии фактора *S* из другого пространственного домена транскрипции обеспечивает репрессию гена *x*. Поэтому теперь транскрипционный фактор *X* синтезируется в ограниченном пространственном домене, активируя в нем батарею генов, которая имела и у предковой формы, но которая теперь входит в систему генов формообразования. На следующем этапе эволюции регуляторный аппарат усложняется (рис. 24-7В). Теперь имеются две батареи генов, каждая из которых экспрессируется в своем домене. Батарея *z, u, k, l, m* находится под контролем гена *v*. Последний был кооптирован в ходе эволюции в результате того, что в его *цис*-регуляторной системе появился элемент, который взаимодействует с транскрипционным фактором *W*. В результате возникает более сложная, разветвленная сеть генных взаимодействий, в которой, однако, сохраняется исходный ген *x*, функционировавший на самых ранних этапах эволюции как активатор тканеспецифических генов, и который используется теперь для формирования новой структуры, предопределяя ее свойства и положение в пространстве.

### **24.3. Ретроградное формирование регуляторных путей. Модель Уилкинса.**

Несколько иные представления об эволюции генных сетей, контролирующих индивидуальное развитие, развивает Адам Уилкинс (Wilkins, 2002). Анализ ряда генетических систем привел его к представлению о том, что в процессе эволюции происходит *ретроградное* (от лат. *retro* --- назад; *gradus* --- шаг) построение системы генетического контроля над развитием. В последовательной цепи событий генетического контроля, которые часто устроены по принципу последовательного ингибирования, различают начальные (верхние) и конечные (нижние) элементы. Такие пути, например, подробно изучены на примере становления лево-правой асимметрии у птиц (см. параграф 21.3), определения пола у *C. elegans* (гл. 23). Ключевым звеном, активность которого является решающей в детерминации контролируемого

признака или свойства, выступает самый нижний элемент. Мы уже отмечали, что при детерминации пола у *C. elegans* решающую роль играет ген *tra-1*, активность которого необходима для формирования гермафродитной особи. Если это звено не работает, то задача детерминации пола не будет решена, даже если все вышележащие звенья работают эффективно. Рассматривая эволюционный путь становления такой цепочки, Уилкинс предполагает, что у предковой формы обязательно наличие ключевого звена (*tra-1* в рассматриваемом случае). У анцестральной формы этот ген контролировался, видимо, простым переключением. У потомков могла возникнуть шаг за шагом последовательность ингибирующих элементов. Значительно сложнее представить себе существование предка с верхним регуляторным элементом без критического нижнего.

В системе типа  $A \dashv B \dashv C \dashv D$  самый последний ген D у анцестральной формы должен был быть единственным контролирующим элементом, а гены C, B, A вовлекались последовательно один за другим как ингибиторы ранее кооптированного гена. Таким образом, по Уилкинсу, первый ген A в этом ряду является самым последним во времени кооптированным геном в системе регуляции гена D.

Модель *ретроградного* становления системы генетического контроля над развитием, логически обоснованная Уилкинсом, не исключает все же предложенной Дэвидсоном модели *интеркалярного* формирования новой системы. При интеркалярном способе элементы первичной системы управления у потомков сохраняются как на верхних ступенях иерархии, так и на ее нижних ступенях за счет появления новых звеньев, которые в ходе эволюции встраиваются между ними.

#### **24.4. Эволюция онтогенеза и филогения животных**

Эволюционное древо животных служит ярким свидетельством творческой роли онтогенеза. Ранняя эволюция многоклеточных животных включает несколько фундаментальных этапов, нашедших свое отражение в образовании трех



главных ветвей эволюционного древа, каждая из которых характеризуется принципиальным своеобразием онтогенеза.

Первый этап связан с появлением Parazoa, многоклеточных животных, возникших из одноклеточных или колониальных хоанофлагеллят (Nielsen, 1995). Эти древнейшие Metazoa, клетки которых сохранили характерный воротничок вокруг жгутика, были предшественниками губок и других более сложно организованных многоклеточных. Этот важнейший в истории становления многоклеточных животных этап, который происходил в Неопротерозое примерно 1 миллиард лет тому назад, характеризовался возникновением разнообразных типов соматических клеток и появлением половых клеток. У этих животных впервые появляется примитивная тканевая организация. Образуются *эпителиальные* и *мезенхимные рудиментарные ткани*, дифференциация которых была лабильной и легко обратимой. Чрезвычайно важным эволюционным завоеванием этого периода было появление *внеклеточного матрикса*, с его коллагенами, адгезивными молекулами и интегринами. Возникновение внеклеточного матрикса предопределило развитие разнообразных морфогенетических процессов. У губок имеются многие молекулярные системы проведения сигналов с участием серин-треониновых и тирозиновых протеинкиназ. На этом этапе эволюции существовали многообразные молекулы-рецепторы, в том числе рецепторы TGF- $\beta$ . Следует подчеркнуть, что набор транскрипционных факторов у губок по своей широте сравним с разнообразием таких же факторов Eumetazoa. У предков современных Губок и Стрекающих путем дупликации и рекомбинации генов возникли новые гены, обеспечивающие функционирование регуляторных транскрипционных систем. Полагают, что скорость изменения последовательностей ДНК, ведущего к образованию новых генов, в этот период эволюции был заметно выше, чем позднее, в период эволюции двухслойных животных (Wilkins, 2002).

У Parazoa возникла возможность усложнение онтогенеза животных, в рамках которого появилась расселительная *личиночная* стадия. Энергетические возможности *взрослых форм* обеспечивали *половой процесс*, связанный с формированием специализированных мужских и женских половых клеток.

Судя по данным сравнительной эмбриологии губок и кишечнополостных, анцестральные Metazoa должны были обладать способностью к формированию эпителиальных пластов, а также иметь механизмы дезагрегации этих пластов на индивидуальные клетки. Они обладали способностью к эпителиальному морфогенезу, т.е. имели механизмы, обеспечивающие образование разного рода выпячиваний и втягиваний эпителиального пласта. Они имели также и регуляторные механизмы, контролирующие ингрессию клеток и обеспечивающие направленное движение клеточных масс. Таким образом, можно сделать вывод, что *механизмы морфогенетических движений возникли в ходе эволюции раньше обособления покровного кишечника и пищеварительного фагоцитобласта, что подчеркивает независимость процессов пространственного распределения клеток и их спецификации в формирующемся зародыше в виде эктодермальной и энтодермальной тканей.*

Второй фундаментальный этап связан с образованием истинных многоклеточных животных, или Eumetazoa. Расхождение Parazoa и Eumetazoa произошло примерно 900 миллионов лет тому назад. Переход от губкообразных животных к Стрекающим характеризовался появлением осевой организации у всех форм. Впервые возникли нервная система, пищеварительная паренхима, а позднее ротовое отверстие и пищеварительная полость. Происходящая в онтогенезе специализация покровных и пищеварительных эпителиев, образование эктодермы и энтодермы, привело к появлению Двухслойных животных со стабильной тканевой организацией. Стабильность эпителиальных тканей коррелирует с возникновением в эпителиях базальной пластинки. Многие гены и контролирующие развитие молекулярные системы, обнаруженные у Губок, имеются и у Стрекающих. К их числу относятся фибриллярные коллагены и коллаген IV типа, актины, миозины, серин-треониновые киназы, тирозинкиназы, система *ras* и др.

Возникновение генетических механизмов спецификации обособленных кишечника и фагоцитобласта следует признать важнейшим этапом эволюции Metazoa. В индивидуальном развитии животных эта спецификация происходит

вскоре после дробления. Клетки энтодермальной природы в результате разнообразных морфогенетических процессов (ингрессия, инвагинация, деламинация) формируют первичную кишку, которая сообщается с внешней средой при помощи лишь одного отверстия (бластопоральная кишка). Возникновение процесса гастрюляции и формирование первичной кишки открыли новую страницу в эволюции Metazoa. В результате этого преобразования раннего онтогенеза возникли Двухслойные, объединяющие Стрекающих и Гребневики. Формирование в онтогенезе древних Metazoa центрального органа пищеварения, в составе которого появились особые железистые клетки, секретирующие пищеварительные ферменты, обеспечило переход от исключительно внутриклеточного (Губки) к смешанной форме пищеварения. Теперь наряду с внутриклеточным происходило и предварительное внеклеточное пищеварение в полости кишки (Стрекающие, Гребневики). По-видимому, это повысило эффективность пищеварения, и таким образом создало энергетические предпосылки, необходимые для возникновения механизмов активного движения. Теперь, на этом этапе эволюции, на основе случайных мутаций могли возникнуть, и действительно возникли, соответствующие специфические структуры и функции, обеспечивающие активное движение животного. Двухслойность, возникшая благодаря появлению механизмов специфической дифференциации клеток эктодермальной и энтодермальной линий, послужила основой для дальнейшего поступательного движения эволюции.

Третий крупный этап в эволюции животных характеризуется возникновением трехслойной тканевой организации --- появлением тканей внутренней среды и мышечных тканей. Начальные этапы дифференциации этих тканей в эмбриогенезе обусловлены, по-видимому, сигналами, запрещающими развитие клеточных линий, эктодермальной и энтодермальной природы. Именно это сходство начальных этапов спецификации тканей внутренней среды, мышечной ткани и экскреторных элементов позволяет говорить о третьем --- мезодермальном --- направлении эмбриональной дифференциации. Процесс возникновения мезодермы, имевший поистине критическое значение для эволюции многоклеточных, продолжался весьма длительное время. Как полагают, он должен был начаться еще до появления гребневики (Peterson,

Davidson, 2000) и, возможно, предшествовал появлению Билатеральных животных.

Билатеральные животные возникли примерно 650 - 550 миллионов лет тому назад. Их онтогенез характеризуется появлением билатеральной симметрии, развитием лево-правой асимметрии, формированием нервной, пищеварительной, кровеносной и репродуктивной систем органов. Появление разнообразных форм животных, представленных такими группами типов, как Lophotrochozoa, Ecdisozoa, Deuterostomia, не было связано, как полагают, с образованием принципиально новых семейств транскрипционных факторов. Основные наборы генов, обеспечивающие разные типы развития, возникли еще во время становления Губок и Стрекающих.

Конечно, в ходе эволюции, приведшей к Билатеральным животным, неоднократно возникали новые гены. Огромную роль в становлении всех групп животных сыграла система Нох-генов. У губок обнаруживается единственный Нох-ген, который, вероятно, был исходным, или *примордиальным* (от лат. *primordium* --- начало). Благодаря последовательной дупликации этот ген за многие миллионы лет эволюции дал ProtoНох кластер тандемно расположенных Нох-генов. Первоначально, в период формирования Стрекающих, дупликация примордиального Нох-гена дала два гена --- передний, и задний. Передний ген стрекающих соответствует генам *Hox1* и *Hox2* билатеральных животных. Задний ген (*Abd B*) родственен *Hox9* --- *Hox13* генам. Позднее появляются центральные гены тандема (*Hox4*--- *Hox8*), которые имеются у гребневиков и у всех билатеральных животных (рис. 24-8, Davidson, 1999??). Позднее всех, уже у билатеральных животных, возникает ген *Hox3*.

Несмотря на отсутствие каких бы то ни было палеонтологических следов, можно попытаться воссоздать облик первичного билатерального предка на основании данных о гомологичных генах, которые имеются у всех Билатеральных. Билатеральные животные --- и первичноротые, и вторичноротые --- имеют высокоразвитую систему Нох-генов, определяющую переднезаднюю полярность тела. У всех Билатеральных имеются гены *otd/otx-2*, ответственные за развитие их клеток мозга. Высокая гомология характерна для

гена *Pax6*, который контролирует образование глаза. Гомология между генами *Pax6* мыши и дрозофилы столь велика, что ген мыши вызывает эктопическое формирование глаза у личинки Дрозофилы и, наоборот (Opuma et al., 2002). Гомеобокс-содержащий ген Дрозофилы *tinman*, контролирующей развитие сердца, гомологичен гену *Mkx2-5* мыши, функция которого также связана с развитием сердца. Все эти гены, имеющиеся у современных первично- и вторичноротых животных, должны были существовать и у их предков, до расхождения разных групп Билатеральных, поскольку их независимое возникновение крайне маловероятно. Поэтому первичные Билатеральные представляются животными, которые имели переднезаднюю полярность, имели голову с органами чувств, глаза, нервную систему и обладали внутренней системой циркуляции, снабженной сердцем.

Проблема происхождения билатеральных животных является одной из дискуссионных проблем современной филогенетики. В последние годы все настойчивее высказывается идея о монофилетическом происхождении Bilateria, объединяющих первичноротых (Lophotrochozoa, Ecdysozoa) и вторичноротых животных (Deuterostomia).

Как полагают, дробление у Архибилатерий не было детерминировано и не имело устойчивого характера. Благодаря этому они могли дать начало животным с разными типами дробления --- спиральным, билатеральным и радиальным (О.М. Иванова-Казас, 1995). Основой формирования спирального, радиального и билатерального типов дробления, как можно предполагать, стало возникновение клеточных механизмов, которые обеспечивали фиксацию положения веретена деления дробления относительно анимально-вегетативной оси яйца.

Возникновение спирального типа дробления с особыми механизмами пространственного распределения цитоплазматических факторов спецификации клеток, и клетками-родоначальницами различных клонов (трохобласты, первый и второй соматобласты и др.), занимающими строго определенное положение в пространстве, дало начало животным с личинками трохофорного типа.

Утрата ресничных покровов и появление способности к выработке хитиновой кутикулы и экзоскелета у некоторых Архибилатерий создали основу для появления особой ветви билатеральных животных Ecdysozoa, развитие которых сопряжено с линьками.

Предки билатеральных были радиально-симметричными животными с замкнутой пищеварительной системой. Согласно «радиальной модели головы» (рис. 24-9 [14-9]), переход к плану тела современных билатеральных мог произойти в результате асимметричной спецификации клеток одного из меридианов яйца радиального предка (Shankland, Seaver, 2000). Возникновение особой программы асимметричной спецификации в одном из квадрантов дробящегося яйца радиально-симметричного предка, по-видимому, могло стать важнейшим событием в эволюции многоклеточных, открывшим путь к возникновению билатеральных животных. Туловище разрасталось, и его концевой отдел все более отдалялся от головной области. Возникло анальное отверстие, и кишка стала биполярной. Голова, однако, сохраняла черты радиальной организации.

Появление ануса и сквозной кишки привело к возникновению новой конструкции тела животного. Вместо орально-аборальной оси низших Metazoa появилась переднезадняя ось, совпадающая поначалу с анимально-вегетативной осью яйца.

Смещение закладки ротового отверстия в переднем направлении открыло новые возможности в эволюции генерального плана строения тела. В частности, это перемещение освободило нейрогенную область зародыша от структур пищеварительного тракта. Благодаря этому в нейрогенной области стало возможным формирование проходящей вдоль всего тела, включая головной отдел, опорной структуры --- спинной струны или хорды. Возникновение хорды послужило отправной точкой развития внутреннего скелета с образованием позвоночника и черепа, т. е. дало начало новой прогрессивной ветви эволюции Metazoa. Начальные этапы этого процесса отмечены появлением бесчелюстных, а затем и челюстноротых позвоночных.

Проблема возникновения Хордовых является одной из актуальных, оживленно обсуждаемых глав эволюционной биологии развития (Иванова-Казас, 1995). Предки Хордовых имели пелагическую личинку типа диплеурулы, после метаморфоза которой формировались взрослые донные животные. По мнению ряда современных исследователей, ресничные шнуры диплеурулы послужили материалом, давшим начало центральной нервной системе Хордовых, а затем и позвоночных животных. (1999). Развивая идею Лакалли (Lacalli, West, 1993; Lacalli, 1996) о возникновении центральной нервной системы хордовых путем слияния ресничных шнуров диплеурулы, известный датский эволюционный эмбриолог Клаус Нильсен предположил, что ЦНС Хордовых возникла *на вентральной стороне личинки* из той части ресничного шнура, которая проходит позади бластопора в заднем направлении, тогда как остальная часть ресничного шнура дегенерировала (рис. 24-10). Смещение рта вперед и далее на контрнейрогенную (дорсальную) сторону зародыша, по-видимому, явилось предпосылкой того, что контрнейрогенная область придонных животных приобрела новую ориентировку в поле гравитации и стала той стороной, которая получила наименование вентральной. Иными словами, в силу своего происхождения вентральная сторона позвоночных не гомологична вентральной стороне первичноротых (рис. 24-11).

Среди предпосылок эволюционных процессов, которые привели к радикальному изменению сенсорной активности животных и замене фильтрационного характера питания на активный поиск и захват жертвы, ведущую роль, как полагают, сыграли такие изменения раннего эмбриогенеза как формирование нервного гребня, образование эпидермальных плакод в области головы и развитие глоточного аппарата. Появление новых источников клеточного материала обусловило эволюцию головы позвоночных, которая, по мнению Карла Ганса и Гленна Нортката, представляет собой истинное эволюционное новообразование, поскольку эти источники отсутствовали у предковых головохордовых (Gans, Northcutt, 1983).

Действительно, у современного головохордового – Ланцетника структуры собственно головы отсутствуют, и хорда простирается вдоль всего тела, захватывая и его передний отдел. Однако, исследования, выполненные

канадским эмбриологом Турстоном Лакалли (Lacalli et al., 1994; Lacalli et al., 1996) с использованием методов электронной микроскопии и гистохимии, обнаружили определенную гомологию переднего отдела нервной трубки Ланцетника с головным мозгом позвоночных (рис. 24-12). Так, имеется определенное соответствие между первичным двигательным центром Ланцетника и задним мозгом Позвоночных; между tectum и задней частью церебрального пузырька, с одной стороны, и средним мозгом Позвоночных; между секреторными клетками инфундибулюма Ланцетника и дном диэнцефалона Позвоночных.

Значимость этих данных подчеркивается молекулярно-биологическими исследованиями. Так, в самом переднем отделе нервной трубки Ланцетника экспрессируется ген *Otx*. Гомологи этого гена *Otx1* и *Otx2* у позвоночных экспрессируются в переднем и среднем мозгу (Williams, Hoiland, 1998). Ген *Dll* у Ланцетника экспрессируется несколько каудальней в передней части церебрального пузырька (Holland et al., 1996). Гены этого же семейства у позвоночных (гены *Dlx*) в центральной нервной системе также экспрессируются исключительно только в переднем мозгу. Наконец, Нох-гены Ланцетника *AmphiHox 1* и *AmphiHox 3* экспрессируются в более каудально расположенной области передней части нервной трубки, достигая, соответственно, уровня границы между 3 и 4 сомитами (*AmphiHox 1*) и границы между 4 и 5 сомитами (*AmphiHox 3*) (Holland, Holland, 1966) (рис. 24-13, Wilkins).

Таким образом, новообразование головы позвоночных, возможно, подразделяется на несколько независимых процессов, происходивших в ходе длительной мозаичной эволюции. Сначала, по-видимому, должна была возникнуть функциональная и структурная дифференциация переднего отдела нервной трубки, которая создала предпосылки формирования сложного мозга позвоночных. Независимо от этого формировались молекулярные механизмы, обеспечившие возникновение новых источников тканей, появление которых сделало возможным развитие черепа.

Образование амниона и других зародышевых оболочек в сочетании с некоторыми другими изменениями онтогенеза послужило необходимой



предпосылкой освоения суши вторичноротыми. На этом пути возникают рептилии, птицы и млекопитающие.

Нашу попытку обрисовать поступательный ход эволюции многоклеточных животных, обусловленный последовательными изменениями индивидуального развития, не следует воспринимать как утверждение непреложности описываемого сценария. Наша задача состояла лишь в том, чтобы подчеркнуть креативную роль индивидуального развития в возникновении новых форм животных. Накопление данных в этой области, естественно, приведет к разрушению старых и формированию новых представлений об эволюции Metazoa. Однако, идея о творческой роли онтогенеза, надо надеяться, надолго останется путеводной звездой для исследователей эволюции животных.

## ЛИТЕРАТУРА

Тыщенко В. П. Введение в теорию эволюции.//Изд. СПбГУ. 1992. 240 стр.

Britten, R. J., Davidson, E. H. Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty.// Q. Rev. Biol., 46: 111- 133.

Carrol, S.

Davidson, E. H. Genomic regulatory systems.// Acad. Press. San Diego. 2001. 261 p.

Davidson, E. H.

Nielsen, C. Animal evolution: interrelationships of the living phyla.// Oxford University Press, Oxford. 1995.

Wilkins, A. S.. The evolution of developmental pathways.// Sinauer Ass. Inc., Massachusetts. , 2002. 603 p.

## ГЛАВА 15. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ

### 15.1. Проблема генетической идентичности дифференцированных клеток

Роль наследственного аппарата клетки в процессах эмбрионального развития стала предметом пристального изучения уже в конце 19-го столетия. Эдмунд Вильсон (1856 - 1939), анализируя процессы мейоза, митоза и оплодотворения, подчеркивал роль хроматина ядер в эмбриональном развитии, как вещества, непосредственно связанного с передачей наследственных свойств от предков потомкам.

В 1880-х годах Август Вейсман (1834-1914) предложил концепцию, которая была, по-видимому, первой смелой попыткой осмыслить явления индивидуального и исторического развития на единой --- генетической --- основе. Согласно Августу Вейсману, дифференциация соматических тканей является результатом неравнонаследственных делений клеток, в ходе которых в разные клетки попадают разные генетические детерминанты. Лишь в линии половых клеток, по мнению Вейсмана, сохраняются все наследственные факторы, что и обеспечивает генетическую преемственность в ряду поколений. Представление о неравнонаследственных клеточных делениях, как о главном принципе дифференциации зародыша, было опровергнуто экспериментами Дриша (1867 --- 1941) и других исследователей, которые продемонстрировали регулятивную способность изолированных бластомеров зародыша (см. Введение). Эти данные свидетельствовали в пользу симметричного распределения наследственных факторов между делящимися клетками. Идея равнонаследственности делений не могла не породить у многих эмбриологов скептического отношения к генам, как факторам управления эмбриогенезом, поскольку биология первой половины XX столетия не могла предложить приемлемого объяснения механизмов дифференциальной активности генов в развитии.

Тем не менее, в разных областях биологии --- цитологии, генетике, эмбриологии --- накапливались свидетельства в пользу того, что возникновение разных типов клеток и тканей обычно не связано с разнокачественностью геномов. Конечно,

были известны данные о том, что в раннем развитии могут происходить существенные изменения генома, такие как диминуция хроматина и элиминация хромосом в клетках, дающих начало соматическим зачаткам (см. гл.1). Позднее стали известны случаи умножения части генома или локальная *амплификация* (от лат. *amplifico* --- увеличивать) ДНК некоторых генов, связанная со специализацией клеток. Например, в фолликулярных клетках яичника Дрозофилы амплифицируются гены, контролирующие синтез белков яйцевой оболочки --- хориона. Амплификация ДНК определенного локуса характерна для хромосом клеток слюнных желез *Rhynchosciara* (Diptera). Примером амплификации ДНК, связанной с дифференциацией клеток, является многократное увеличение числа генов, контролирующих синтез андроген-связывающего белка в клетках Сертоли человека и млекопитающих. Наконец, в основе дифференциации лимфоцитов высших позвоночных лежит *рекомбинация ДНК*, благодаря которой возникают клоны клеток, специализированные на выработке высоко специфических белков --- антител, которые обеспечивают иммунную реакцию организма. Благодаря сложным молекулярным механизмам рекомбинации определенных областей ДНК становится возможным синтез миллионов различных антител под контролем ограниченного числа генов.

Всё же исследования разнообразных явлений развития свидетельствовали скорее в пользу того, что процессы эмбриональной дифференциации обычно не связаны с необратимыми изменениями генома.

**Политенные хромосомы.** Исследователи уже давно обратили внимание, например, на неизменность структуры, открывшейся при изучении гигантских политенных (от греч. *πολύς* --- многий; лат. *taenia* --- лента) хромосом личинок двукрылых насекомых. Политенные хромосомы возникают в клетках, прекративших митотические деления. Они образуются вследствие многократной репликации ДНК и нерасхождения новообразованных молекул после их формирования. В результате такой полиплоидизации клеток политенные хромосомы содержат количество ДНК, в сотни и тысячи раз превышающее содержание в нормальных хромосомах диплоидных клеток. Благодаря своим размерам политенные хромосомы доступны для

светооптических исследований. Изучение этих хромосом цитологическими методами выявило характерную структуру, а именно, чередование темных и светлых полос, что связано с разной степенью конденсации хроматина. Темные полосы, или хромомеры, соответствуют участкам с более конденсированным хроматином. Оказалось, что *число хромомеров является постоянным для хромосомы данного типа. Сопоставление рисунка политенных хромосом в клетках, имеющих разный тип дифференциации, убеждал в том, что процесс специфической дифференциации клеток не связан с утратой каких-либо частей хромосомы.*

О потенциальной тотипотентности геномов дифференцированных клеток косвенно свидетельствуют данные о принципиальной возможности изменения детерминации и дифференциации клеток. Если клетки изменяют характер своей детерминации, говорят о *трансдетерминации*, во втором случае речь идет о *трансдифференциации*.

**Трансдетерминация.** Явление трансдетерминации было открыто при изучении потенций клеток имагинальных дисков Дрозофилы. У личинок Дрозофилы имеется два основных класса клеток. Один из них, наиболее обширный, представлен в полиплоидными клетками, которые входят в состав личиночных тканей. Другой класс клеток, составляющий примерно 10%, состоит из недифференцированных диплоидных клеток имагинальных дисков, которые в ходе метаморфоза формируют разнообразные органы взрослого животного (от лат. imago --- образ). Известны, например, имагинальные диски антенн, глаз, ног, крыльев, жужжалец, гениталиев и др. Недифференцированные клетки имагинальных дисков детерминированы, т.е. судьба их строго predetermined. Поэтому при эктопической имплантации имагинального диска, например, глаза в брюшко личинки, у взрослой мухи в области брюшка под влиянием гормонального стимула в период метаморфоза из имплантата развивается глаз. При имплантации имагинального диска взрослому животному развитие дефинитивного органа из-за отсутствия необходимого гормонального сигнала не происходит. Поэтому имплантация материала имагинальных дисков взрослым мухам позволяет поддерживать своеобразную культуру детерминированных клеток диска в течение длительного периода времени.

Соответствующие контрольные пересадки этого материала личинкам дают возможность убедиться в устойчивом сохранении их первоначального статуса. Тем не менее, изредка происходит спонтанное изменение характера детерминации, или трансдетерминация, и вместо глаза образуются иные органы. Явление трансдетерминации недвусмысленно говорит о том, что *обычно в зачатках, детерминация которых требует активности определенных генов, сохраняются также и иные гены, которые необходимы для развития других органов.*

**Трансдифференциация.** Изменение судьбы клеток может происходить и на более поздних стадиях развития, когда образуются структурно и функционально дифференцированные органы. Это явление, или трансдифференциация, обнаруживается как при нормальном развитии, так и в экспериментальных условиях. Примером онтогенетической трансдифференциации может служить закономерно происходящее в индивидуальном развитии переключение клеток лабиальной железы куколки шелковой моли с синтеза кутикулы на синтез секрета, растворителя фермента вылупления, коконазы. Нечто аналогичное наблюдается и у дрозофилы, у которой полиплоидные клетки слюнных желез в течение индивидуального развития вырабатывают, сначала одни, а затем другие продукты секреции.

Явление трансдифференциации часто наблюдается в экспериментальных условиях, например, при регенерации, а также в условиях культивирования *in vitro*. Классическим примером трансдифференциации является так называемая Вольфовская регенерация хрусталика у взрослых тритонов. После оперативного удаления хрусталика пигментные в клетках дорсальной области радужки, специализированных на выработке меланина, выключается экспрессия специфических генов *pP344* и *MMP115* (ген, контролирующий образование меланосом) и прекращается синтез меланина. Дедифференцирующиеся клетки освобождаются от пигментных телец --- *меланосом* (от греч. μέλανω --- темнеть; σῶμα --- тело). Вслед за дедифференциацией наступает фаза пролиферации, а затем и спецификации зачатка нового хрусталика, имеющего сначала вид шаровидного разрастания, которое затем обособляется от радужки. Программа цитодифференциации в новом зачатке резко отличается от программы,

характерной для пигментных клеток. Клетки регенерировавшего хрусталика экспрессируют гены кристаллинов, и синтезируют соответствующие специфические белки ---  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -кристаллины. Таким образом, в ходе регенерации радикально изменяется дифференциация клеток, у которых репрессируется система генов, связанная с синтезом меланина, и активируется система синтеза кристаллинов. Реальность трансдифференциации пигментного эпителия радужки была показана и в условиях культуры тканей. Очищенные от клеток стромы клетки радужки диссоциировали на отдельные клетки и культивировали *in vitro*. Размножающиеся клетки постепенно освобождались от меланосом и формировали монослой непигментированных эпителиальных клеток. После завершения пролиферации клетки в некоторых областях вновь превращались в пигментные. Тем не менее, в некоторых участках примерно через 1,5 месяца наблюдали образование прозрачных тел разных размеров, которые были названы *лентоидами*, поскольку в них были обнаружены кристаллины. Интересно, что в условиях культивирования клеток лентоиды были получены не только из дорсальной, но и из вентральной части радужки.

Явление трансдифференциации указывает на то, что специфическая дифференциация клеток, обусловленная активностью определенной системы генов, обычно не связана с исчезновением систем генов, активность которых необходима для других типов дефинитивной специализации.

**Гетерокарионы.** Физическое сохранение генов, функция которых не проявляется при данном типе дифференциации, четко демонстрируется в опытах по слиянию клеток, имеющих разную специализацию. Например, при искусственном слиянии клеток гепатомы мыши с амниоцитами или лимфоцитами человека образующиеся гетерокарионы, содержащие ядра мыши и человека, обнаруживали сывороточный альбумин, трансферрин и другие белки печени человека. Эти данные можно интерпретировать, как свидетельство того, что *под действием регуляторных ядерных белков печеночных клеток мыши включаются гены, активные в печени человека, но молчащие в амниоцитах или лимфоцитах*. Аналогичные результаты получены с миоцитами мыши (рис. 15-1).

**Клонирование животных.** Нетрудно заметить, что во всех рассмотренных случаях речь шла о сохранении какого-то гена или системы генов, функции которых удавалось восстановить в условиях эксперимента. Кардинальное решение вопроса о сохранении всех потенций генома в дифференцирующемся зародыше, как казалось, могло быть получено в эксперименте по замене ядра зиготы диплоидным ядром соматической клетки. Могут ли ядра соматических клеток, взятых из разных тканей или зачатков, подобно ядру зиготы обеспечить нормальное развитие зародыша, его морфогенез и дифференциацию всех клеточных типов, включая линию половых клеток?

По-видимому, первой попыткой подойти к решению этой проблемы были эксперименты Г. Шпеманна, выполненные в 1928 г. Шпеманн накладывал лигатуру на оплодотворенное яйцо тритона так, чтобы петля совпала бы с сагиттальной плоскостью. Затягивая петлю перед первым делением дробления, он получал яйца, подразделенные на две равноценные части, различие между которыми состояло лишь в том, что одна половина содержала ядро, а другая была безъядерной. Ослабляя лигатуру в период дробления, Шпеманн добивался того, что в безъядерную половину проникали ядра после первого, второго или третьего деления дробления. После попадания ядра в безъядерную половину яйца лигатура сильно затягивалась, и половинки зародыша изолировались друг от друга. В этих опытах было показано, что ядра после четвертого деления дробления сохраняют все потенции, которые необходимы для обеспечения развития до стадии личинки: обе разделенные половины яйца нормально развивались в полноценные личинки (рис. 15-2).

Однако лишь в 1950-ые годы данная проблема стала доступной для широкого экспериментального анализа, когда Бриггс и Кинг (1952) разработали методику энуклеации (удаления ядра) зиготы и трансплантации с помощью микропипетки ядер, взятых из бластомеров бластулы *Rana pipiens*. Эти опыты оказались успешными: после трансплантации ядра в энуклеированные яйца наблюдалось нормальное развитие, в результате которого формировались головастики. Вместе с тем опыты с ядрами постэмбриональных клеток дали отрицательные результаты.

Еще более впечатляющие результаты были получены английским эмбриологом Гёрдоном (Gurdon, 1962) в аналогичных опытах на шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*. При введении в энуклеированное яйцо *Xenopus* ядра, выделенного из ядра кишечного эпителия головастика, Гёрдон наблюдал развитие личинок, а в ряде случаев ему удалось получить взрослых фертильных лягушек, что свидетельствовало о генетической идентичности ядер клеток кишечного эпителия головастика и зиготы (рис. 15-3).

Опыты, в которых были использованы ядра из полностью дифференцированных клеток взрослых животных, обнаружили заметное снижение процента успешного развития, или даже полное его отсутствие. Источником ядер для трансплантации послужили первичные культуры клеток почек, сердца, легкого и других органов. И в этом случае трансплантированные в энуклеированное яйцо ядра иногда обеспечивали развитие головастиков, однако, процент успешных пересадок резко снижался.

Снижение процента успешных опытов требовало специального анализа, поскольку оно не исключало возможности необратимых изменений генома в процессе тканевой дифференциации. С другой стороны, отрицательный результат мог быть обусловлен иными причинами, не связанными с изменением потенций генома в процессе развития. В ходе анализа этой проблемы была предложена методика предварительного клонирования ядер дифференцированных клеток в дробящемся яйце. Взятые из клеток кожи взрослого животного ядра трансплантировали с энуклеированные яйца, часть из которых (около 20%) начинали дробление. Каждая бластула, полученная таким образом, представляет собой, по существу, клон клеток, имеющих идентичные геномы (рис. 15-4). Однако когда в энуклеированные яйца трансплантировали ядра, взятые из разных бластомеров одной и той же бластулы, т.е. ядра одного и того же клона, оказалось, что дробилось лишь около 30% яиц. Этот опыт показал, что ядра, принадлежащие к одному клону, т.е. имеющие исходно идентичные геномы, тем не менее, различаются по своей способности контролировать развитие. Отсюда следует важный вывод, что отрицательный результат, а именно *неспособность трансплантированных ядер поддерживать развитие зародыша может и не зависеть от потенций генома*. Позднее



выяснилось, что на результаты опытов с трансплантацией ядер высокоспециализированных тканей влияют не только генетические потенции ядер, но и многие другие причины, такие как состав среды, в которой находились трансплантируемые ядра, пролиферативный статус клеток и другое. Было установлено, что микрохирургические операции и перенос ядер вызывают различного рода хромосомные нарушения, в том числе анеуплоидию, возникновение кольцевых хромосом, разного рода транслокации. При этом оказалось, что в разные периоды клеточного цикла устойчивость хромосом к повреждениям неодинакова. Например, ядра, выделенные из клеток, которые находятся в пресинтетической фазе G1 клеточного цикла, сохраняют нормальный кариотип примерно лишь в 4% случаев, тогда как ядра из клеток S и G2 фаз более устойчивы к процедуре трансплантации, и нормальный кариотип здесь наблюдается в 25% случаев.

Изучение потенций генома методом трансплантации ядер, взятых из клеток на разных стадиях развития, помимо амфибий проводились на насекомых, оболочниках, рыбах и млекопитающих. Исследования, выполненные на млекопитающих, еще раз подчеркнули, что неспособность трансплантированного ядра обеспечить эмбриогенез не обязательно связана с утратой тотипотентности, а может быть обусловлена иными причинами. Так, у мыши на стадии двух бластомеров, когда они еще не детерминированы, и каждый из бластомеров может дать начало целому организму, при переносе ядер бластомеров в яйцо развитие шло до стадии бластоцисты лишь в 10% случаев. Ядра, взятые на стадии четырех бластомеров, вообще не были способны поддерживать развитие.

Таким образом, *опыты по трансплантации ядер в энуклеированные яйца свидетельствуют о том, что гены, необходимые для клеточной дифференциации и разнообразных морфогенетических процессов, в ходе специализации соматических клеток, как правило, не утрачиваются.* Отрицательный результат при использовании ядер, полученных от дифференцированных доноров, обусловлен, скорее всего, хромосомными нарушениями, связанными, в частности, с несоответствием пролиферативного статуса ядра донора и цитоплазмы реципиента. Во всяком случае, опыты, в

которых использовали заведомо тотипотентные ядра первичных половых клеток или сперматоцитов, показали, что эти ядра не способны обеспечить нормальное развитие. Весьма вероятно, что возможность ядра проявить свою тотипотентность зависит от того, происходит ли во время взаимодействия с цитоплазмой яйца полное освобождение ДНК донора от разнообразных связей с регуляторными и структурными белками, которые устанавливаются в процессе дифференциации зародыша. Если это не происходит, то особая структура хроматина дифференцированных клеток может затруднить синхронную репродукцию репликаонов ДНК в период дробления (см. гл. 3), привести к недорепликации ДНК и хромосомным аномалиям, и, в конечном счете, --- к гибели зародыша.

Клонирование млекопитающих впервые было осуществлено в 1997 г., когда Ян Уилмут (Ian Wilmut) получил развитие овцы после сращивания культивируемой *in vitro* клетки молочной железы взрослой овцы с энуклеированным ооцитом. О сложности такого рода эксперимента свидетельствует тот факт, что успешным был лишь один из более 400 первоначальных клонов.

**Тотипотентность ядер растений.** В отличие от животных, где клонирование с использованием соматических ядер возможно только на основе специализированной яйцевой клетки, у растений источником нового организма может служить соматическая клетка. Тотипотентность ядер дифференцированных клеток растений была доказана в ярких экспериментах Фредерика Стюорда (F. Steward, 1958). Оказалось, что клетки флоэмы моркови, т. е. клетки специализированной ткани, проводящей продукты фотосинтеза, после длительного культивирования в специальной среде, способствующей клеточной пролиферации, образуют так называемый каллус --- массу недифференцированных клеток. Изолированные клетки каллуса в суспензионной культуре формировали корнеподобные узелки, которые при культивировании на плотной агаровой среде давали начало новому полноценному растению. Позднее аналогичные результаты были получены на табаке и других растениях. Пионерские опыты Стюорда открыли дорогу для широкого клонирования растений из клеток соматических тканей.

**Блоттинг ДНК.** Молекулярная биология предоставляет возможность анализа проблемы тотипотентности генома путем прямого изучения структуры ДНК. Для того чтобы убедиться в наличии того или иного гена в ДНК, нужно с помощью обратных транскриптаз на основе соответствующей этому гену информационной РНК получить комплементарную ДНК (кДНК). Пометив эту кДНК, можно провести поиск интересующей нас последовательности ДНК. Для этого суммарную ДНК необходимо расщепить с помощью рестриктаз на фрагменты, разогнать эти фрагменты с помощью электрофореза, денатурировать ДНК и перенести ее путем блоттинга на нитроцеллюлозный фильтр, на котором уже можно провести молекулярную гибридизацию с меченой кДНК. Этот метод имеет достаточно высокую разрешающую способность, хотя небольшие делеции и точечные мутации интересующего нас гена и могут остаться незамеченными. Таким образом, было показано, например, что ген овальбумина, который интенсивно экспрессируется в эпителиальных клетках яйцевода курицы, имеется у этого животного в ядерной ДНК и эритроцитов, и сперматозоидов, где этот ген не обнаруживает активности. Аналогичный результат был получен и в отношении гена фиброина у шелкопряда *Bombix mori*. Сопоставление ДНК из разных зон шелкообразующей железы показало, что последовательность ДНК с геном фиброина имеется в клетках всех зон, тогда как экспрессия этого гена происходит только в клетках передней области железы.

Таким образом, разнообразные косвенные свидетельства, а в последние годы и непосредственные исследования обнаруживают, как правило, *стабильность генома в онтогенезе животных, его неизменность при различного рода дифференцировках.*

## **15.2. Теория дифференциальной активности генов**

Анализ разнообразных морфогенетических процессов, исследование процессов биохимической, структурной и функциональной специализации тканей и органов позволяет утверждать, что в основе развития индивидуума, т.е. в основе скоординированных в пространстве и времени процессов клеточной репродукции, морфогенеза и клеточной дифференциации лежит экспрессия

генов. Теория дифференциальной активности генов исходит из предположения, что деления клеток обычно равнонаследственны, а неэкспрессируемые гены сохраняются. Дифференциальная активность генов достигается разнообразными способами активации и репрессии генов, как прямыми (с помощью транскрипционных факторов), так и опосредованными (за счет изменения структуры ДНП и укладки хроматина, а также модификации структуры ДНК путем метилирования). Процессы эмбриогенеза основаны на дифференциальной активности генов, но не исчерпываются генетическим уровнем контроля. Образующиеся структуры выступают как физические и химические тела с присущими им особенностями взаимодействия (силы натяжения, силы давления, электрические силы и пр.). Некоторые синтезированные под контролем генома белки благодаря генетически детерминированной первичной и вторичной структуре, обладают способностью к самосборке, и, часто, их конкретная судьба определяется факторами среды. Так, переход глобулярного актина в фибриллярную форму зависит от концентрации ионов водорода и непосредственно не зависит от активности генома. Имеются многоуровневые системы взаимодействия генов, создающие предпосылки для самоорганизации.

Основы теории дифференциальной активности генов были сформулированы выдающимся эмбриологом и генетиком Томасом Морганом в начале 1930-х годов. Т. Морган (1866-1945) полагал, что в ходе эмбрионального развития в зачатках зародыша активируются разные группы генов. Первоначальная активация этих специфических наборов генов, по Моргану, обусловлена цитоплазматическими факторами, которые неравномерно распределены в яйце. Взаимодействие геномов разных бластомеров с цитоплазматическими факторами разной природы лежит в основе активации строго определенных генов --- разных в различных областях эмбриона. Работа генов, в свою очередь, видоизменяет цитоплазму, что ведет к включению нового набора генов, и формированию новых свойств цитоплазмы. Такой каскад включений все новых и новых батарей генов ведет, в конечном счете, к формированию сложно дифференцированного организма.

Концепция Т. Моргана не сразу была принята современниками, многие из которых отвергали хромосомную теорию наследственности как основу теории развития. Критическое отношение к идее об участии генетических механизмов в процессах эмбриональной дифференциации было обусловлено, прежде всего, тем, что в те далекие времена оставалась загадкой сама природа генов, так что рассуждения о механизмах взаимодействия между генами, о соподчинении и координации их активности многим представлялись далекими от реальных задач науки. Незнание природы связей между геном и контролируемым им признаком затрудняло, если не делало невозможным решение проблемы взаимной связи признаков, не позволяло сколько-нибудь убедительно объяснить явление зависимой детерминации и зависимого развития частей организма, которое наблюдалось в экспериментах по эмбриональной индукции..

Концепция дифференциальной активности генов первоначально постулировала существование прямолинейной цепи "цитоплазматический фактор яйца" → "ген А" → "цитоплазматический фактор А" → "ген В" → "цитоплазматический фактор В" → .....→ "признак". Такое допущение неминуемо вело к строгому детерминизму, к возрождению преформизма, который не соответствовал данным экспериментальной эмбриологии, утверждавшей эпигенетический принцип развития. Допущение прямолинейного каскада не оставляло места процессам самоорганизации целостной системы развивающегося зародыша. Попытки хотя бы теоретически осмыслить взаимодействие генов в процессах эмбрионального развития, как обязательный фактор развития (Р. Гольдшмидт), носили умозрительный характер и не могли создать надежную основу для экспериментальной разработки проблемы.

Главной причиной скептического отношения ведущих эмбриологов тридцатых годов XX столетия к концепции дифференциальной активности генов, как теории развития, были, конечно, во многом наивные представления о структуре и функциях генов, о реальной роли генома в жизни клетки, о путях реализации генетической информации, локализованной в хромосомах.

Идеи Т. Моргана о дифференциальной активности генов как основе эмбрионального развития получили свое новое рождение лишь в середине XX

столетия, когда стала ясной природа генетических факторов и их истинное назначение в биологии клетки. Развитие молекулярной биологии и генной инженерии создали общие предпосылки для плодотворного анализа раннего эмбриогенеза. Исследования в этой области дали начало новой отрасли науки -- генетике развития. Изучение функций генетического аппарата в процессах пролиферации, дифференциации и морфогенеза, составляющих основу индивидуального развития, обнаружило сложные разветвленные системы взаимодействующих генов, и показало ограниченность первоначально постулировавшегося каскадного принципа.

Нельзя не заметить, что представление о сложных системах взаимодействия между генами возникло в генетике уже давно, когда стали известны факты неоднозначного проявления генотипа. Оказалось, что проявление признака у генетически однородных особей может варьировать. В 1925 г. Н. В. Тимофеев-Ресовский ввел в науку понятия *пенетрантности* и *экспрессивности*. Под пенетрантностью понимается относительная доля особей, у которых проявляется данный признак. Наличие гена, контролирующего данный признак, не является абсолютной гарантией экспрессии данного признака. Экспрессивность понимается как степень проявления варьирующего признака. Признак может быть выражен сильно или слабо. Генетике известно и такое понятие как норма реакции, т.е. способность генотипа различным образом проявляться в зависимости от условий среды.

Первоначальная схема взаимодействия генов усложнилась, когда было установлено, что некоторые гены одновременно управляют совокупностью нескольких генов, обладающих одинаковыми сайтами связывания транскрипционных факторов. Гены, контролирующие активность нескольких *нижележащих генов*, называли *главенствующими* (*master genes* англоязычных авторов), а контролируемые ими гены --- *эффекторными*. Такое взаимодействие между генами, как полагали, обеспечивает одновременную активацию совокупности генов и, соответственно, целой *программы развития*, которая реализуется благодаря скоординированной во времени экспрессии различных генов. Одновременное включение совокупности генов, обеспечивающих единую программу развития, наблюдали, в частности, при

цитодифференциации, в ходе которой происходит формирование различных клеточных типов. Например, миогенез связан с экспрессией нескольких селекторных генов, в том числе *MyoD1* (*myoblast-determining gene 1*). Транскрипционный фактор MyoD1 включает экспрессию других эффекторных генов. Вместе с тем в регуляторной области гена *MyoD1* имеется сайт связывания белка MyoD1, что обеспечивает непрерывный синтез (автокатализ) этого транскрипционного фактора, который при этом становится конститутивным. Аналогичная картина наблюдается и при нейральной дифференциации, где экспрессируется обеспечивающий нейрогенез ген *NeuroD*.

Представление о селекторных господствующих генах, по-видимому, тоже уходит в прошлое. Скорее, имеется сложная система разветвленных сетей взаимных влияний, система динамической настройки экспрессии генов и постепенного уточнения *паттерна экспрессии*. Выясняется, что один и тот же ген в разные периоды развития и в разных областях тела зародыша может экспрессироваться под контролем различных транскрипционных факторов. Становится очевидным, что, по крайней мере, в некоторых случаях, экспрессия "главенствующих" генов подпадает под контроль генов, активность которых была инициирована.

Обнаруженные позитивные и негативные регуляторные взаимодействия между генами создают широкие возможности для процессов самоорганизации. Определенный рисунок, или паттерн экспрессии генов в пространстве устанавливается не сразу. После инициации экспрессии генов происходит постепенное уточнение области их активности, своего рода настройка, в ходе которой устанавливаются окончательные границы активности системы генов, ответственных за осуществление того или иного элемента развития. Способность к самоорганизации систем действия генов представляется существенной чертой генетических механизмов управления развитием, позволяющей преодолеть противоречие между преформизмом генетических систем и эпигенетическим характером индивидуального развития.

Активность генов в эмбриональном развитии связана с решением двух основных задач. Одна из них связана с формированием принципиального плана

строения организма, с *формированием паттерна* животного (*pattern formation*). Под формированием паттерна мы понимаем региональную спецификацию зародыша, в ходе которой происходит предопределение положения будущих органов.

Экспрессия генов в этом случае создает в трехмерном пространстве зародыша позиционную информацию, предопределяет положение осей тела зародыша, детерминируя его переднюю и заднюю, вентральную и дорсальную, левую и правую области, независимо от того, производные каких зародышевых листков располагаются в этих зонах. В ходе формирования паттерна из единого поля, представленного оплодотворенным яйцом, происходит образование многих *морфогенетических полей*, дающих начало разнообразным органам.

Вторая задача связана со *спецификацией* зачатков и клеток, с формированием многообразия типов клеток, тканей и зачатков, с процессами *цитодифференциации*. Координация формирования паттерна и процессов клеточной спецификации создает предпосылки *формообразования*, или *морфогенеза*. Генетические системы, обеспечивающие эту координацию, исследованы в настоящее время недостаточно глубоко, что объясняется, прежде всего, их сложностью.

### **15.3. Механизмы регуляции активности генов**

Регуляция экспрессии генов в эмбриогенезе животных имеет многоуровневый характер. Можно различать *прямую* и *опосредованную* (непрямую) регуляцию экспрессии. Прямая система регуляции, затрагивающая непосредственно гены, состоит из транс-регуляторного и цис-регуляторного аппаратов (Davidson, 2001). *Транс-регуляторный аппарат* клетки понимается как набор генов, которые кодируют специфические регуляторные белки, и, прежде всего, транскрипционные факторы. *Цис-регуляторный аппарат* представлен цис-регуляторными элементами, или *модулями*, которые расположены в молекуле ДНК на определенном расстоянии от кодирующих областей генов или внутри них. Цис-регуляторные модули содержат специфические последовательности -- сайты-мишени, с которыми взаимодействуют транскрипционные факторы.



Под опосредованной регуляцией понимается изменение активности генов путем видоизменения структуры хроматина или ДНК.

### **15.3.1. Транс-регуляторный аппарат. Транскрипционные факторы.**

Среди транскрипционных факторов (ТФ) различают *общие*, или *коровые* (от англ. core --- сердцевина, сущность) и *специфические*. Первые взаимодействуют с промоторной областью гена и обеспечивают посадку РНК-полимераз. Они необходимы для осуществления транскрипции любых генов. Специфические, или стабилизирующие ТФ, взаимодействуют с *энхансерами* (от англ. enhance --- усиливать) гена. Они предназначены для активации или репрессии генов определенного типа.

**Коровые транскрипционные факторы** --- специальные белки, которые выполняют следующие функции. Во-первых, они обнаруживают на молекуле ДНК так называемый ТАТА бокс --- особую последовательность нуклеотидов, расположенную близ точки инициации транскрипции, и связываются с ним (рис.15-5). Во-вторых, они образуют комплекс, с которым взаимодействует РНК-полимераза II. Наконец, один из белков этого комплекса фосфорилирует карбокситерминальный конец молекулы РНК-полимеразы II, что приводит этот фермент в активное состояние.

**Специфические транскрипционные факторы.** Транскрипционные факторы этого класса являются внешними для регулируемого гена и поэтому иногда называются *транс-регуляторными факторами*. Это --- особые белки, которые контролируют стабильность взаимодействия коровых ТФ с определенными участками молекулы ДНК.

Транскрипционные факторы имеют три специализированных домена (от англ. domain --- область), выполняющих разные функции. Главной функциональной областью транскрипционного фактора, обеспечивающей активацию транскрипционного аппарата, является *трансактивирующий домен*. Имеется также *домен модуляции*, область, которая обеспечивает взаимодействие с другими белками, благодаря которому активность транскрипционного аппарата

может быть модифицирована. Важную роль играет *домен связывания*, область, обеспечивающая распознавание и специфическое связывание ТФ с ДНК. Известны несколько структурных типов (мотивов) доменов связывания, в соответствии с которыми различают несколько крупных семейств транскрипционных факторов. Существование таких групп свидетельствует, что в ходе эволюции были найдены и отобраны несколько типов полипептидов, способных связываться с двойной спиралью ДНК. Для таких полипептидов характерно наличие последовательности, которая образует  $\alpha$ -спираль, способную размещаться в большой бороздке ДНК. Благодаря такому структурно устойчивому остову, транскрипционный фактор имеет возможность взаимодействовать со специфической последовательностью нуклеотидных оснований. Наиболее частыми являются следующие мотивы: цинк-фингер, базовый домен "петля-спираль-петля" (bHLH, basic Helix-Loop-Helix), домен "петля поворот-петля" (HTH, Helix-Turn-Helix), лейциновая застежка, домен HMG (рис. 15-6).

**Цинк-фингерный мотив** представлен двумя разновидностями "шпилек", или "пальцев". В одном случае атом цинка связан с четырьмя цистеиновыми остатками; в другом --- с двумя цистеиновыми и двумя гистидиновыми остатками. Что касается аминокислотных остатков, взаимодействующих с нуклеотидными последовательностями ДНК, то они отличаются большим разнообразием у разных цинк-фингерных транскрипционных факторов.

**Мотив "спираль-петля-спираль"** характеризуется двумя последовательно расположенными  $\alpha$ -спиралями, между которыми белковая молекула образует петлю. Перед этой конструкцией нередко располагается отрезок с высокоосновными аминокислотными остатками (основной домен), положительно заряженная цепь которых облегчает контакт с ДНК.

Белки этого типа всегда образуют димеры (рис. 15-7А). При этом субъединицы димера могут кодироваться разными генами, в результате чего транскрипционные факторы представлены гетеродимерами. Благодаря этому резко увеличивается разнообразие регуляторных факторов, которые могут быть образованы ограниченным числом полипептидов. Так, если в клетке

экспрессируется пять разных HLH-генов, белки которых дают гетеродимеры, то, теоретически, на основе этих генов может возникнуть 32 разновидности транскрипционных факторов.

Гены, контролирующие образование HLH-содержащих ТФ, играют роль в дифференциации многих типов тканей. Например, гены *MyoD* служат ключевыми генами, ответственными за развитие скелетной мускулатуры. HLH-содержащие ТФ принимают участие также в регуляции клеточного размножения, что предопределяет их роль в формировании разного рода раковых опухолей (гены *Myc*, *SCL*, *LYL-1*, *E2A*).

**Мотив "спираль-поворот-спираль"** --- структура, характерная для гомеодоменов, особых областей транскрипционных факторов, синтезируемых под контролем гомеобоксодержащих генов и обеспечивающих связывание белковой молекулы с ДНК (см. гл. 18). Гомеодомен состоит из 60 аминокислотных остатков, и характеризуется высоким содержанием аргинина и лизина. В составе гомеодомена имеется три  $\alpha$ -спирали. Первая и вторая располагаются антипараллельно, а третья спираль идет примерно под прямым углом к двум первым, образуя спираль-поворот-спираль (рис. 15-7Б). Третья "распознающая" спираль располагается в глубокой бороздке ДНК, тогда как аминокислотные остатки N-терминальной области гомеодомена локализуются в малой бороздке.

**Мотив лейциновой застёжки** представлен  $\alpha$ -спиралями, состоящими из 30 - 40 аминокислотных остатков с высоким содержанием лейцина. Остатки лейцина составляют каждую седьмую аминокислоту спирали. Поскольку два оборота  $\alpha$ -спирали соответствуют семи аминокислотным остаткам, все лейцины спирали расположены с одной стороны. Благодаря взаимодействию лейцинов одной спирали с лейцинами другой, обе спирали прочно связываются друг с другом. Поэтому транскрипционные факторы с лейциновыми застёжками также представлены димерами. Связь с ДНК обеспечивается участком, расположенным неподалеку от лейцин-содержащей спирали. Примером транскрипционного фактора с лейциновой застёжкой может служить гетеродимер AP1, состоящий из субъединиц C-FOS и C-JUN. Как отмечалось

выше, эти факторы играют важную роль в клеточной пролиферации. При мутации соответствующих генов они вызывают образование опухоли.

**Мотив НМГ** (*high mobility group*) впервые был обнаружен в белках *высокоподвижной группы*. Он состоит из трех  $\alpha$ -спиралей, которые придают молекуле слегка изогнутый вид. Транскрипционные НМГ факторы *активируют транскрипцию путем изгибания ДНК*, почему их называют иногда "архитектурными факторами". Содержащий НМГ-бокс белок SRY, играет ключевую роль в определении мужского пола у млекопитающих. Другой широко распространенный НМГ-белок UBF активирует транскрипцию генов рРНК. UBF образует димер, который насчитывает 10 НМГ-групп. Связываясь с ДНК, UBF *сгибает ее в виде петли* (рис. 15-8). При этом происходит сближение регуляторных областей ДНК, которые линейно разделены 120 парами оснований. Это изменение конфигурации молекулы ДНК обеспечивает ее связь с РНК-полимеразой I и синтез рРНК.

**Функциональные типы транскрипционных факторов.** Можно выделить три функциональных типа транс-регуляторных факторов: *индуцируемые, конститутивные и комплексные*. Существование *индуцируемых* транс-регуляторов обнаруживается в опытах с генами белков теплового шока (БТШ), которые активируются в условиях гипертермического воздействия. Ген БТШ (70 Кда) Дрозофилы интродуцировали в клетки млекопитающих, дрозофилы и морского ежа. Оказалось, что этот ген экспрессируется в клетках этих животных при разной температуре. Так, у млекопитающих ген белка теплового шока Дрозофилы экспрессируется при температуре 45°, у Дрозофилы при 37°, а у морского ежа при 25°. Тот факт, что активация одного и того же гена БТШ Дрозофилы у разных животных происходит при разных температурах, может быть объяснен тем, что экспрессия данного гена обусловлена не непосредственно температурой, а действием специфического транскрипционного фактора, который у животных с разным температурным оптимумом индуцируется при разных температурах.

*Конститутивные*, или постоянно действующие, транскрипционные факторы характерны для клеток, достигших терминальной дифференциации. Например,

в мышечной клетке транскрипционный фактор MyoD1 в результате автокатализа, синтезируется постоянно, в результате чего он становится конститутивным. Если интродуцировать чужеродные гены кристаллинов в клетки эпителия хрусталика, они будут экспрессироваться. Однако при введении в клетки других тканей эти гены не активируются. Эти различия объясняются тем, что в клетках хрусталика всегда имеются соответствующие транскрипционные факторы, которые не экспрессируются в других типах клеток.

*Комплексные транс-факторы* широко распространены в природе. Часто они состоят из индуцируемого и конститутивного элементов. Они характерны, например, для клеток, транскрипционная активность которых контролируется стероидными гормонами. В этом случае комплексный фактор образуется из стероидного гормона (индуцируемый элемент) и цитоплазматического рецепторного белка (конститутивный элемент). В отличие от составляющих его компонентов комплекс гормон/рецептор взаимодействует с определенными последовательностями ДНК, активируя экспрессию стероид-зависимых генов. Если в клетки молочной железы мыши, функция которых находится под контролем эстрогена, ввести ген овальбумина птицы, то в клетках мыши начинается синтез этого чужеродного белка, поскольку в них имеется соответствующий комплексный транскрипционный фактор.

Другим примером комплексных ТФ могут служить некоторые факторы, контролирующие клеточную пролиферацию. Так, при действии митогенов, веществ, стимулирующих клеточную репродукцию, происходит активация различных протоонкогенов, функция которых в клетке состоит в регуляции пролиферации. Белковые продукты этих генов имеют специфические аминокислотные последовательности, благодаря которым образуются димеры белковых молекул. Некоторые гетеродимеры, образованные белковыми продуктами разных протоонкогенов, обладают свойствами транскрипционных факторов. Например, гомодимер FOS/FOS не связывается с ДНК, тогда как гетеродимер JUN/FOS имеет сродство к определенным сайтам ДНК цис-регуляторных областей генов и является транскрипционным фактором. Комплексные факторы, образование которых зависит от активности разных

генов, создают дополнительные уровни контроля над клеточным размножением, и, таким образом, заметно повышают пластичность механизмов их регуляции.

### **15.3.2. Цис-регуляторный аппарат: организация транскрипции в пространстве и времени.**

Специфические транскрипционные факторы взаимодействуют с особыми участками гена --- энхансерами. Энхансеры обычно располагаются на расстоянии до 2 тпн (тысяч пар нуклеотидных оснований, или килобаз, кб) от *точки инициации транскрипции*, хотя известны случаи удаления энхансера на расстояние до 50 тпн. Энхансеры могут располагаться как в 3', так и в 5' положении относительно кодогенной области (рис. 15-9). По мере изучения регуляции транскрипции, и, прежде всего, ее регуляции в период эмбрионального развития, обнаруживается исключительно сложная структура *цис*-регуляторного аппарата регуляторных генов.

Цис-регуляторные области гена выполняют различные функции. Прежде всего, они служат для восприятия и обработки информации, которую создает совокупность всех транскрипционных факторов, имеющих в ядре. На основании этой информации происходит принятие альтернативного решения об активации или репрессии регулируемого гена. Регуляторная область гена имеет модульную организацию, которая обеспечивает дифференциальную активность гена в пространстве и во времени: один и тот же ген может активироваться не одним, но разными наборами сигналов, взаимодействующих с разными модулями регуляторной области.

Анализируя механизмы спецификации зародыша, Дэвидсон выделяет несколько принципов их работы (Davidson, 2001). Прежде всего, при дифференциации зародыша происходит превращение имеющейся информации, представленной транскрипционными факторами, в пространственные домены экспрессии генов. Далее, спецификация зародыша связана с переработкой *множественной информации* на входе, на основе которой формируется *единственное решение* на выходе. В ходе *цис*-регуляторной трансформации происходит

"информационный процессинг", в результате которого новая информация на выходе всегда отличается от информации на входе (Davidson, 2001). Наконец, цис-регуляторные элементы взаимодействуют как с активаторами, так и с репрессорами транскрипции, что необходимо для установления границы области экспрессии гена.

Существует несколько видов цис-регуляторных механизмов пространственной репрессии гена. Иногда весь регуляторный модуль ориентирован на репрессию. Чаще --- в одном модуле имеются сайты-мишени, которые взаимодействуют и с репрессорами, и с активаторами. На рис. 15-9 представлена структура гена *eve* Дрозофилы, который на стадии формирования бластодермы экспрессируется в виде семи последовательно расположенных вдоль переднезадней оси кольцевидных полос (рис. 15-10). Разные полосы имеют свои цис-регуляторные области, расположенные в разных участках гена. На рис. 15-11А дана схема устройства минимального элемента, которая обеспечивает вторую полосу экспрессии. Места связывания позитивных регуляторов экспрессии --- транскрипционного фактора материнской природы Bicoid (Bcd) и зиготического фактора Hunchback (Hb) на схеме показаны в нижней части рисунка (B1-B5, H3), негативных --- зиготических факторов Krüppel и Giant (K3-K5, G1-G3) --- в верхней. Оба положительных регулятора занимают обширную область зародыша, намного превышающую ширину полосы экспрессии *eve* (рис. 15-11Б). Границы второй полосы *eve* устанавливаются благодаря тому, что соответствующие сайты регуляторного модуля устанавливают связь с репрессирующими белками Krüppel и Giant. Задняя граница полосы экспрессии *eve* определяется взаимодействием модуля с белком Krüppel. Если область локализации Krüppel в силу тех или иных причин смещается вперед по сравнению с ее нормальным местоположением, то экспрессия второй полосы *eve* может быть полностью подавлена. Передняя граница второй полосы экспрессии *eve* детерминируется белком Giant. Таким образом, цис-регуляторный элемент гена *eve*, воспринимая и перерабатывая информацию, предоставляемую транскрипционными факторами Bcd и Hb (активаторы), а также Kr и Gt (репрессоры), создает новый, ранее не существовавший домен экспрессии гена *eve*, имеющий четко выраженную локализацию в пространстве.

Интересные результаты были получены в лаборатории Э. Дэвидсона при исследовании структуры регуляторной области гена морского ежа *endo 16*. Начиная со стадии вегетативной пластинки, этот ген экспрессируется в энтодерме зародыша. Ни в малых микромерах, расположенных на вегетативном полюсе, ни в мигрирующих скелетогенных клетках *endo 16* не экспрессируется. На рис. 15-12 представлена характеристика цис-регуляторной области этого гена (Davidson, 2001). На участке, длиной 2300 пар оснований, расположено 7 различных модулей, каждый из которых обеспечивает определенную функцию. Ближайший к промотору модуль А ответственен за раннюю экспрессию гена в клетках вегетативной пластинки. Модуль В контролирует экспрессию этого гена на более поздних стадиях в средней кишке. Модули С и D предназначены для репрессии гена в скелетогенной мезенхиме, тогда как модули Е и F --- для репрессии гена в прилегающей эктодерме. Наконец, модуль G служит позитивным усилителем экспрессии гена. Важно подчеркнуть, что все эти модули взаимодействуют не только с транс-факторами, сайты связывания которых распределены по всем модулям (на рисунке показаны внизу), но имеют и свои собственные, присущие только им транскрипционные факторы (на рисунке --- наверху). Существование такого рода модуль-специфических транскрипционных факторов обеспечивает включение гена *endo 16* в определенных областях зародыша и в определенное время.

Система модулей в регуляторной области гена подробно исследована на примере *raxb*. Этот ген принадлежит к обширному семейству регуляторных генов, отличительной особенностью продуктов которых служит наличие домена *paired*, предназначенного для связывания с ДНК. Ген *raxb* у всех животных, имеющих глаза, от плоских червей и немертин до членистоногих и позвоночных, выполняет ведущую роль в управлении развитием глаза. Цис-регуляторная система гена *raxb* имеет типичную модульную систему контроля. В гене *raxb* мыши, например, имеются особые модули, предназначенные для активации этого гена в разных частях глаза. Экспрессия одного и того же гена *raxb* в сетчатке, роговице, хрусталике, слезной железе, конъюнктиве контролируется различными специфическими энхансерами.



### 15.3.3. Непрямая регуляция транскрипции

В опытах на трансгенных животных было обнаружено, что в зависимости от места внедрения в геном реципиента трансфицированный ген может инактивироваться. Такого рода наблюдения дают основания предполагать существование *пермиссивной* (разрешающей транскрипцию) конфигурации хроматина, и *репрессивной* (запрещающей транскрипцию) конфигурации.

Хроматин, как известно, представляет собой дезоксиинуклеопротеид (ДНП), т. е. вещество, образованное соединением ДНК с разнообразными белками. Среди белков ДНП различаются гистоновые и негистоновые белки. Гистоны богаты лизином и аргинином и поэтому характеризуются основными свойствами. Негистоновые белки имеют очень разную природу. Среди них встречаются структурные, ферментативные и регуляторные молекулы. Гистоны представлены пятью разными классами белковых молекул, каждый из которых имеет свое специфическое соотношение лизиновых и аргининовых остатков (таблица 15.3).

ТАБЛИЦА 15.3. Характеристика некоторых параметров гистонов из тимуса теленка (по G. Karp, 1999)

Гистон	Число АК-остатков	Масса (Kda)	% Arg	% Lys
H1	215	23,0	1	29
H2A	129	14,0	9	11
H2B	125	13,8	6	16
H3	135	15,3	13	10
H4	102	11,3	14	11

Нить ДНП представлена повторяющимися частицами --- *нуклеосомами* (рис. 15-13). Пары гистонов H2A, H2B, H3 и H4 образуют дисковидный октамер, комплекс из 8 молекул, который представляет собой сердцевину нуклеосомы. С этим комплексом связан отрезок ДНК, длиной в 146 пар оснований, которая делает вокруг него почти полных два оборота. ДНК, находящаяся между нуклеосомными частицами, и связывающая их называется линкерной. Обычно она состоит из 60 пар оснований, но ее длина у разных видов и в разных тканях

варьирует. Таким образом, нуклеосомная частица и линкер составляют около 200 нуклеотидных пар. Концы ДНК каждой нуклеосомы связаны гистоном H1. При сперматогенезе происходит замена обычных гистонов на протамины или на спермийные гистоны, при этом хроматин конденсируется и утрачивает способность к транскрипции. В ходе клеточного цикла изменение степени конденсации хроматина и его транскрипционной способности происходит без замены гистонов --- за счет их химической модификации, в частности, за счет фосфорилирования.

**Гетерохроматин и эухроматин.** Хроматин в интерфазном ядре представлен двумя формами: деконденсированной и конденсированной, которая составляет примерно 10% . Конденсированный хроматин называют *гетерохроматином*. Диспергированный --- *эухроматином*. Гетерохроматин транскрипционно неактивен. Различают два вида гетерохроматина: конститутивный и факультативный. *Конститутивный гетерохроматин* находится в конденсированном состоянии постоянно. Обычно он представлен часто повторяющимися нуклеотидными последовательностями. Так, в центромерной области хромосомы человека короткие нуклеотидные последовательности, длиной 170 пар нуклеотидов, повторяются до 30 000 раз. При транслокации гена в область конститутивного гетерохроматина его экспрессия обычно прекращается (эффект положения).

*Факультативный гетерохроматин* возникает лишь на определенных стадиях развития, когда необходимо инактивировать хромосому или ее части. Классическим примером такой инактивации служат так называемые тельца Барра, инактивированные X хромосомы женских особей млекопитающих (рис.15-14). Одна из X хромосом гетерохроматинизируется в раннем развитии случайным образом, т.е. независимо от отцовского или материнского происхождения. Активность этих хромосом возобновляется в половых клетках перед мейозом. Инактивация X хромосомы происходит вследствие экспрессии локализованного в ней гена *Xist*. Транскрибируемая иРНК<sup>Xist</sup> накапливается в хромосоме, и, образуя своего рода оболочку, инактивирует ее. У мучнистого червеца *Planococcus citri* (Hemiptera) происходит гетерохроматинизация всех отцовских хромосом, что приводит к функциональной гаплоидности самцов.

**Белки "глушения".** Транскрипционная активность может регулироваться с помощью особых белков "глушения", которые кодируются генами семейства PcG (Polycomb-Group), насчитывающего около 30 генов. Эти белки имеют особую область --- *хромодомен*, с помощью которого они связываются с ДНК, инактивируя транскрипцию в этой области. Образование связи между белком PcG и ДНК происходит при наличии особой последовательности ДНК, которая носит название *модуля клеточной памяти (Cellular Memory Module, CMM)*. Имеющиеся в ДНК специальные *сайты взаимодействия с Polycomb* (сайты PRE, *Polycomb Response Element*) создают предпосылки образования очень крупных белковых комплексов, достигающих нескольких миллионов Da (рис. 15-15). В областях такой компактизации хроматина происходит блокирование транскрипции. С помощью механизмов глушения на определенных стадиях развития инактивируются, например, кластерные Нох-гены.

Точность экспрессии генов поддерживается, как обнаружилось, еще одной гетерогенной группой белков из группы триторакс (TrxG, *Trithorax group*), которые также образуют крупные комплексы, возникающие благодаря взаимодействию между белковыми молекулами. Их функция --- прямо противоположная --- поддержание открытого (активного) состояния хроматина.

**Метилирование ДНК.** Важным фактором регуляции транскрипционной активности является метилирование ДНК. Метилирование ДНК не является универсальным способом регуляции: оно отсутствует, в частности, у представителей Ecdysozoa --- у Дрозофилы и нематоды *Caenorhabditis elegans*.

У позвоночных кроме обычного цитозина в ДНК имеется "пятое основание" --- 5-метилцитозин. Особый фермент метилтрансфераза осуществляет метилирование цитозина, соседствующего с гуанозином. Рисунок метилирования ДНК в ряду клеточных поколений обычно сохраняется, если не включается специальный механизм деметилирования. Метилирование цитозинов, расположенных в промоторной области, ведет к репрессии транскрипции. Сравнение уровня содержания метилцитозина в генах глобина в эритроцитах и иных клетках взрослого человека свидетельствует, что в

эритроблестах, где происходит активная транскрипция этого гена, доля метилцитозина низка, тогда как в других тканях, где ген глобина не экспрессируется, она достигает высоких значений. В эмбриональный период развития низкий уровень содержания метилцитозина отмечен в генах глобина печени, где в это время происходит кроветворение. Если с помощью 5-азацитина, ингибитора метилтрансферазы, подавить метилирование в культуре клеток фибробластов, то эти клетки за счет активации верхних регуляторных генов начинают дифференцироваться и образуют миоциты, хондроциты и адипоциты.

**Геномный импринтинг.** У млекопитающих открыта функциональная неэквивалентность гомологичных генов, предпосылки которой закладываются в период гаметогенеза. Это предопределение судьбы гена в период гаметогенеза называют *геномным импринтингом* (от англ. imprint --- запечатлеть). Импринтированные области ДНК после оплодотворения и на самых начальных стадиях дробления метилируются и, тем самым, --- инактивируются. Импринтинг материнских и отцовских генов у млекопитающих затрагивает более 100 генов в различных хромосомах.

У человека в 7-ой хромосоме имеется ген инсулинподобного фактора роста 2 (IGF2). Во время оогенеза создаются предпосылки метилирования этого гена, тогда как при сперматогенезе --- нет. Соответственно у зародыша материнский ген метилирован и активен только отцовский ген. В 17-ой хромосоме имеется ген рецептора этого фактора (*Igf2r*), который импринтируется только в ходе сперматогенеза. Соответственно, ген отцовского происхождения у зародыша метилируется и инактивируется. Активность наблюдается у гена *Igf2r* только материнского происхождения. Делеция гена мыши *Igf2r* у самца не сказывается на развитии, поскольку он и при нормальном геноме инактивирован. Делеция этого же гена у самки ведет к гибели зародыша, так как ген, полученный от отца, инактивирован и не может компенсировать утрату материнского гена.

Из-за функциональной неэквивалентности некоторых гомологичных генов у млекопитающих у них невозможен ни партеногенез, ни андрогенез. Если из оплодотворенного яйца мыши удаляли мужской пронуклеус и заменяли его

женским, создавая, таким образом, предпосылки партеногенетического развития, то после формирования бластоцисты развитие останавливалось (рис. 15-16). Оказалось, что образование трофобласта и плаценты невозможно без участия отцовских генов, поскольку соответствующие материнские гены инактивированы. В условиях искусственного андрогенеза, когда женский пронуклеус заменяли на мужской, плацента развивалась, но отсутствие некоторых функционирующих генов материнской природы вызывало прекращение развитие собственно зародыша.

Благодаря импринтингу гены сохраняют характерный для них статуса метилирования в раннем развитии. Единственным, но чрезвычайно важным исключением из этого правила являются половые клетки, гены которых утрачивают импринтинг, унаследованный от родительской формы, и не метилируются. Наложение нового импринтинга в линии половых клеток происходит на сравнительно поздних стадиях развития зародыша --- только в период гаметогенеза. Новый импринтинг, естественно, соответствует полу животного, производящего гаметы.

#### **15.3.4. Системы проведения внешних сигналов к геному (сигналинг).**

Регуляция активности генома в клетке достигается двумя главными способами: с помощью транскрипционных факторов, которые вырабатываются и действуют внутри клетки, контролируя активность собственного генома, и под влиянием внешних факторов, которые синтезируются и секретируются другими клетками. Во втором случае необходимы специальные рецепторы, воспринимающие внешний сигнал (рис. 15-17), а также проводящие системы, с помощью которых трансформированный сигнал доводится до транскрипционных факторов и активирует их.

Среди сигнальных молекул, контролирующих эмбриональное развитие, различают две категории факторов: низкомолекулярные (менее 20 kDa), и высокомолекулярные белковой природы. Первые широко представлены разного рода ионами и газами, в том числе  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , NO. В последнее время

выясняется существенная роль NO в процессах дифференциации. Она участвует, как оказывается, в инициации кальциевых волн при оплодотворении, в нейрогенезе и др. К низкомолекулярным сигнальным молекулам относятся нейротрансмиттеры (ацетилхолин, глицин), производные нуклеотидов, в том числе, циклический аденозин-монофосфат. Например, цАМФ выступает в качестве внеклеточного сигнального фактора у слизевика *Dictyostelium*, где он побуждает обособленные амебоидные клетки к формированию многоклеточной миксомицеты.

В данном разделе рассматриваются, главным образом, сигнальные молекулы белковой природы (пептиды и белки).

На относительно поздних стадиях развития широко используются *эндокринные* (от греч. ἐνδον --- внутри, κρῖνω --- выделять) сигнальные молекулы, которые выводятся из клеток в кровяное русло и распространяются по развивающемуся зародышу на большие расстояния. На ранних стадиях, когда отсутствует и кровеносная система и эндокринные органы, решающая роль в межклеточных отношениях принадлежит *паракринным* (от греч. παρὰ --- возле, κρῖνω --- выделять) факторам, секретируемым белкам, которые распространяются в межклеточном пространстве путем диффузии и, в силу этого, имеют ограниченную сферу влияния. Разновидностью паракринных являются *автокринные* факторы, т.е. такие секретируемые сигнальные молекулы, которые регулируют функции самой клетки-производительницы. Наконец, известны и *юкстакринные* (от лат. juxta --- близ, и греч. κρῖνω --- выделять) факторы --- сигнальные молекулы, которые являются интегральными белками плазматической мембраны. Юкстакринные факторы не секретируются. Они влияют на спецификацию соседних клеток, непосредственно взаимодействуя с рецепторами последних (см. подробнее раздел 17.8.2).

**Паракринные сигнальные факторы.** Функционально --- это факторы, которые в эмбриогенезе регулируют процессы клеточной репродукции, клеточной дифференциации и морфогенеза. Известно несколько семейств этих белков. Каждое из них характеризуется своими особенностями взаимодействия с трансмембранными рецепторами клеток, активность которых они регулируют.

Фибробластические факторы роста (сем. FGF), эпидермальные факторы роста (EGF), инсулинподобные факторы роста (IGF) и некоторые другие факторы взаимодействуют с *тирозинкиназными рецепторами* (*receptor tyrosine kinase*, RTK). Цитоплазматический домен этих рецепторов при некоторых условиях обладает способностью фосфорилировать тирозиновые остатки белков, в том числе и собственные. Трансформирующие факторы роста бета (TGF- $\beta$ ) взаимодействуют с рецепторами, которые обладают *серин-треонинкиназной* активностью. Имеют свои особенности взаимодействия сигнальные белки сем. Wingless (Wnt), белки сем. Hedgehog (Hh).

**Фибробластические факторы роста (сем. FGF).** Свое название эта группа факторов получила исторически, поскольку первый из обнаруженных представителей этого обширного семейства факторов стимулировал рост клеточной культуры фибробластов. Обширное семейство фибробластических факторов роста связано с активностью многих генов *fgf* и насчитывает сотни изоформ, образование которых обусловлено дифференциальным сплайсингом. У млекопитающих имеется, по крайней мере, 19 представителей этого семейства. Свойства отдельных белков этого семейства могут существенно различаться. Например, факторы FGF-1 характеризуются кислыми свойствами, а факторы FGF-2 --- щелочными. Реальные функции факторов FGF в развитии животных многогранны. Например, FGF-2 играет важную роль в формировании кровеносных сосудов, FGF-7 является фактором роста кератиноцитов. Факторы FGF участвуют в индукции мезодермы на стадии бластулы и гастрюлы амфибий, участвуют в членении головного мозга на разные отделы, в формообразовательных процессах при развитии конечности, черепа и других процессах. У Дрозофилы представитель семейства FGF ген *branchless* и ген рецептора соответствующего фактора *breathless* участвуют в морфогенезе трахейной системы насекомого, обеспечивая ее ветвление.

Взаимодействие факторов FGF с клетками опосредуется рецепторами, встроенными в плазматическую мембрану белками. Известны четыре разновидности FGF рецепторов (FGFR 1-4). Внеклеточная область рецептора обеспечивает связь с FGF-лигандом, тогда как его внутриклеточная область представляет собой тирозинкиназу (рис. 15-18), фермент, который за счет

энергии АТФ фосфорилирует тирозиновые остатки. Когда лиганд FGF связывается с рецептором, происходит изменение конформации последнего, и он приобретает способность к димеризации с другой рецепторной молекулой. В связывании FGF с рецепторами принимают участие протеогликаны --- гепарин и гепарансульфат. Сближение двух молекул тирозинкиназных рецепторов RTK приводит к автофосфорилированию их цитоплазматических доменов. При этом они приобретают способность фосфорилировать белок-адаптор. Фосфорилированный белок-адаптор взаимодействует с G-белком RAS и активирует его (рис. 15-18). Далее следует последовательная цепочка MAP-киназ, которая завершается активацией транскрипционного фактора, включающего экспрессию определенного гена. Активированный рецептор RTK стимулирует также фосфолипазу C, которая расщепляет фосфатидилинозитолдифосфат (PIP<sub>2</sub>) на инозитолтрифосфат (IP<sub>3</sub>) и диацилглицерол (DAG), что ведет, в конце концов, к существенным изменениям ионного состава в цитоплазме клетки.

FGF-сигналинг играет важную роль в развитии конечности и лицевого черепа человека. Мутации рецептора FGFR1 вызывают синдром Пфейфера, который проявляется не только в нарушениях развития конечности, но и в дефектах черепа, обусловленных преждевременным сращением черепных швов (краниосиностоз). Разнообразны дефекты развития, которые обусловлены мутациями рецептора FGFR2. Все они связаны с нарушениями развития черепа и конечностей, в том числе с синдактилией. Мутации FGFR3 вызывают ахондроплазию, глубокое нарушение развития хрящевого и костного скелета. Одна из мутаций FGFR3 обусловлена замещением всего одной пары оснований, вызывающим замену глицина в 380-м положении на аргинин. Мутации, изменяющие тирозинкиназную внутриклеточную область этого рецептора, приводят к летальной форме карликовости.

Как уже отмечалось, аналогичный путь проведения сигнала через тирозинкиназный рецептор, белок-адаптор и цепочку киназ используется также эпидермальными (EGF) и инсулинподобными (IGF) факторами роста.

**Трансформирующие факторы роста бета (TGF-β)** образуют обширное сверхсемейство, в которое входят помимо многих разновидностей собственно TGF-β, *активины*, разнообразные BMP-факторы (BMP --- *bone morphogenetic*



*factor*), включая такие широко распространенные факторы, как Decapentaplegic (Dpp), Nodal, Vg1. Функции, выполняемые белками этого сверхсемейства, весьма разнообразны. Они контролируют клеточную репродукцию, программируемую смерть клеток, миграцию клеток, установление осей зародыша, спецификацию мезодермы, дифференциацию нервной системы и органов чувств, морфогенез кишки.

Факторы TGF- $\beta$  воспринимаются клетками, которые одновременно имеют специализированные рецепторные молекулы двух типов (рис. 15-19). Рецептор 1-го типа (R1) в цитоплазматическом домене имеет так называемый GS участок. Рецептор 2-го типа (R2) имеет область, которая является серин-треониновой киназой. Лиганд связывается с рецептором R2, что обеспечивает соединение и с рецептором R1. При сближении рецепторов киназа рецептора R2 фосфорилирует сериновые и треониновые остатки GS бокса рецептора R1. Активный R1 приобретает способность фосфорилировать сериновые остатки карбоксильной группы белков Smad, цитоплазматических эффекторов, проводящих сигнал от рецептора к ядерной ДНК.

**Белки Smad.** Свое наименование семейство Smad получило от названия белка Mad Дрозофилы (ген *Mothers against dpp*) и гомологичных белков Sma нематоды *C. elegans* (гены *sma-2*, *sma-3*, и *sma-4*). Эти высоко консервативные белки, насчитывающие в своем составе примерно 400 - 500 аминокислот, участвуют в проведении сигнала TGF- $\beta$ /BMP. Особенно большое сходство между молекулами этого семейства наблюдается в N-терминальном (MH1) и C-терминальном (MH2) доменах. MH2 домен отвечает за взаимодействие с рецептором, тогда как MH1 домен определяет специфическое связывание с ДНК и негативно регулирует функции MH2 домена.

Различают три подкласса белков Smad. Это, прежде всего, активируемые рецепторами белки R-Smad, в том числе, Smad-1, -2, -3, -5, и -8. Во-вторых, это --- общие медиаторные, или Co-Smad, к которым относятся, например, Smad-4 млекопитающих и Smad-10 (он же Smad-4b) Ксенопуса. Наконец, это антагонистические или ингибиторные I-Smad (Smad-6 и -7), которые негативно регулируют сигналинг, предотвращая фосфорилирование R-Smad или образование функционального комплекса между R-Smad и Co-Smad.

У позвоночных известны около 10 генов *Smad*. Специфика проведения сигнала обусловлена группой R-Smad (рис. 15-19). Так, сигналы, инициируемые активинами и собственно TGF- $\beta$  факторами, у позвоночных воспринимаются белками Smad-2 и Smad-3, тогда как сигналы BMP проводятся через Smad-1 и Smad-5. Все эти белки имеют сложную трехчленную структуру. Один из указанных R-Smad вместе с белком Smad-4 (Co-Smad), который является общим элементом для проведения различных сигналов, образует комплексный транскрипционный фактор, гетерогексамер. Такой комплекс, например, Smad-1/Smad-4, взаимодействуя со специфическими связывающими ДНК белками, включает экспрессию контролируемого гена (рис. 15-19).

**Таблица 15.\_NB. Гомологи TGF- $\beta$ /BMP и белки Smad у разных животных (по А. М. Arias, А. Stewart, 2002)**

ОБЪЕКТ	ЛИГАНД	R-Smad	Co-Smad	I-Smad
<i>Caenorhabditis elegans</i>	dbl-1	sma-2,-3	sma-4	
	daf-7	daf-8	daf-3	
<i>Drosophila melanogaster</i>	dpp	Mad	Medea	Dad
	Dactivin	Dsma2		
Позвоночные	BMPs активин	Smad1, 5, 8	Smad4	Smad6
		Smad2, 3	Smad4	Smad7

Сигналинг при участии активинов используется для решения разных задач. У Дрозофилы, например, он необходим для развития имагинальных дисков и мозга. Известно, что при мутации рецептора активина 1 типа *Vaboon* (*Vabo*) резко снижается интенсивность пролиферации в имагинальных дисках и ткани мозга личинки. Утрата функции гена *babo* ведет к гибели животного на стадии поздней личинки или ранней куколки. Подробно исследована роль гена *smad2* *Xenopus laevis*. Оказалось, что Smad2 --- у шпорцевой лягушки обеспечивает проведение сигналов TGF- $\beta$  и активинов, необходимых для индукции дорсальной мезодермы. Ген *smad2* у мыши также необходим для индукции

мезодермы и осуществления гаструляции. У гомозиготных мутантов *smad2* мышцы не образуется внезародышевая часть яйцевого цилиндра.

**Wnt-сигналинг.** Семейство генов *wnt* широко распространено в природе. Гены *wnt* кодируют секретируемые паракринные белки, которые исполняют роль сигнальных молекул для решения самых различных задач в эмбриогенезе животных. Например, у зародышей амфибий и рыб они используются при формировании переднезадней оси (*Xwnt-3*), при спецификации вентральной мезодермы (*Xwnt-8*), при дифференциации мозга (*Xwnt-1*, *Xwnt-8b*, *zWntd*), для осуществления гаструляции (*Xwnt-11*, *zWnt-11*) и др. Название семейства происходит от наименования наиболее полно изученных его представителей --- гена полярности сегментов Дрозофилы *wingless*, и протоонкогена млекопитающих *int-1*.

Известны два пути проведения сигнала Wnt: так называемый *канонический* и *альтернативный*. При каноническом способе (рис. 15-20) лиганд Wnt связывается с трансмембранным рецептором Frizzled (Fz) и способствует накоплению в клетке  $\beta$ -катенина. Известны и другие способы активации генома, в том числе посредством активации фосфолипазы C, инозитолтрифосфата и высвобождения  $Ca^{2+}$  (рис. 15-21). Рецептор Frizzled относится к семейству семичленных рецепторов, семь доменов которых находятся в плазматической мембране клетки (рис. 15-22). При взаимодействии с лигандом рецептор активирует фосфопротеин Dishevelled (Dsh). В активном состоянии Dsh ингибирует действие киназы гликогенсинтазы-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) и предотвращает, таким образом, разрушение  $\beta$ -катенина. Последний накапливается в цитоплазме реагирующей клетки и вместе с кофактором Tcf-3 формирует комплексный транскрипционный фактор, который обеспечивает экспрессию регулируемого гена. Например, этот механизм в случае индукции *дорсальной мезодермы* инициирует активность гена *siamois* шпорцевой лягушки (см. стр. NB). Следует заметить, что объединение  $\beta$ -катенина с кофактором иногда выполняет противоположную функцию, вызывая супрессию транскрипции (подробнее см. гл. 17).

Вскоре после стадии средней бластулы функции Wnt-сигналинга у Ксенопуса резко изменяются. Теперь фактор *Xwnt-8* используется для формирования *вентральной и латеральной мезодермы*, что, возможно, обусловлено переходом

на неканонический путь сигналинга. При альтернативном пути активация Dsh открывает путь цитоплазматическим киназам JNK или SAPK (рис. 15-), а при проведении сигнала, инициируемом лигандом Xwnt-5A, возможно, используется протеинкиназа C.

**Белки сем. Hedgehog (Hh).** Иной принцип лежит в основе проведения сигнала, инициируемого белками Hedgehog. Эти паракринные факторы также используются для решения широкого круга вопросов: от паттернинга нервной трубки и сомитов до обеспечения нормального течения сперматогенеза, от формирования лево-правой асимметрии тела и переднезадней оси конечности позвоночных до участия в дифференциации зубов и перьев. Рецептором Hh служит белок Patched, который является интегральным белком плазматической мембраны (рис. 15-23). В неактивном состоянии Patched оказывает ингибирующее влияние на другой белок мембраны --- Smoothened. Взаимодействие Hh с рецептором разблокирует активность Smoothened. В активном состоянии Smoothened подавляет функцию ряда факторов, которые расщепляют белок Ci (*Cubitus interruptus*) с образованием репрессора транскрипции (рис.15-23А). Если же белок Ci остается в нативном состоянии, как это происходит при действии Hh (рис.15-23Б) , то он становится транскрипционным активатором, и включает экспрессию того же гена, активность которого репрессируется продуктом деградации Ci.

**Гормоны.** Наряду с паракринными факторами важную роль в развитии животных играют так называемые *гормоны* (от греч. ὀρμάω --- побуждать). Это --- *эндокринные* дистантные факторы, вырабатываемые органами внутренней секреции, и распространяемые по всему организму. Естественно, что включение гормонов в регуляторные системы развития происходит на сравнительно поздних стадиях, так как само их образование предполагает достаточно высокий уровень дифференциации зародыша. Различают *пептидные*, *аминокислотные* и *стероидные* гормоны. К первым относятся, например, гормон роста; ко вторым такие производные аминокислот как тироксин, адреналин. Огромная роль в развитии животных принадлежит стероидным, в том числе половым гормонам. Специфическое восприятие гормонального сигнала обеспечивается наличием рецепторов. Водорастворимые сигнальные

молекулы --- полипептиды, некоторые производные аминокислот, такие как адреналин, взаимодействуют с клетками-мишенями также как и паракринные факторы --- посредством рецепторов, расположенных на плазматической мембране. Липофильные сигнальные молекулы, такие как стероидные гормоны, тироксин или ретиноевая кислота свободно проникают в клетку и взаимодействуют с цитоплазматическими или ядерными рецепторами, образуя активные транскрипционные факторы (рис. 15-24). Ретиноевая кислота --- активный фактор морфогенеза. Она используется при формировании паттерна конечности, участвует в дифференциации центральной нервной системы, глаза и др. Тироксин широко используется при метаморфозе. Данные о роли стероидных гормонов в детерминации пола изложены в гл. 23.

Рецепторы липофильных сигнальных молекул принадлежат к одной семье цинкфингерных белков. Комплексы, образованные сигнальной молекулой и цинкфингерным рецептором, объединяются в гомо- или гетеродимеры, которые и выступают в качестве транскрипционных факторов.

**Интеграция сигналинга.** Важно подчеркнуть, что описанные выше пути проведения сигналов функционируют не изолировано друг от друга. Они взаимосвязаны между собой. Сила и характер реакции клетки на внешние сигналы определяется совокупностью существующих у нее механизмов проведения сигналов. Оказалось, что один сигнал может активировать несколько различных путей. Во внутриклеточном домене рецептора PDGF (рис. 15-25) имеется несколько тирозиновых остатков (Y), которые фосфорилируются после присоединения лиганда и активации киназы. Каждый из них взаимодействует с *собственным, специфическим* SH<sub>2</sub>-белком, связывающим рецептор с различными путями проведения сигнала. Сложность ответной реакции клетки может усиливаться за счет быстрого возникновения вторичных сигналов. При изучении экспрессии 8600 генов человека в стимулированной сывороткой культуре фибробластов оказалось, что клетки реагировали выработкой сигнальных молекул, которые обеспечивали их взаимодействие между собой, т.е. вели себя как элементы системы. Эти сложные взаимоотношения, лежащие в основе интегральной реакции системы, не дают оснований упрощать проблему организации генетического контроля над

развитием. Современные исследователи ищут ключ к пониманию формирования разнообразия и специфичности в эмбриональном развитии в подходах, развиваемых комбинаторикой. Делаются попытки построить математические модели сетей биологического сигналинга (подробнее см. Martinez Arias, Stewart, 2002).

## ЛИТЕРАТУРА

Гёрдон Дж. Регуляция функции генов в развитии животных.// Мир. Москва. 1977. 196 с.

Дондуа А.К. Роль кластерных гомеобоксодержащих генов в морфогенезе животных//Онтогенез. 1997. Т. 28: 3-17.

Корочкин Л. И. Введение в генетику развития// Наука. Москва. 1999. 253 с.

Davidson E. H. Genomic regulatory systems. Development and evolution. Acad. Press. San Diego. 2001. 261 p.

Gilbert S. F. Developmental Biology. 6-th Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. 2000. 749 p.

Karp G. Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments. 2<sup>nd</sup> edition. J. Wiley & Sons Inc. 1999. 816 p.

Martinez Arias A., Stewart A. Molecular principles of animal development. Oxford University Press Inc., New York. 2002. 410 p.

Steward F. C. From cultured cells to whole plants: the induction and control of their growth and differentiation// Proc. R. Soc. B. 1970. V. 175:1-30.

Weng G., Bhalla U., Iyengar R. Complexity in biological systems. Science. 1999. V. 284:92 - 96.



## ГЛАВА 16. АВТОНОМНАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ

В природе существуют два способа управления дифференциальной активностью генов в онтогенезе Metazoa: *автономный* и *зависимый*. В первом случае дифференциальная активность генов в разных областях зародыша достигается главным образом за счет неравномерного распределения в ооците транскрипционных факторов или их иРНК, синтезированных под контролем генов материнского организма в период оогенеза. Во втором случае дифференциальная активность генов устанавливается с помощью межклеточных взаимодействий, в ходе которых сигнальные молекулы, вырабатываемые одними клетками, взаимодействуют с рецепторами других клеток, и побуждают последние специфицироваться в определенном направлении (рис.16-1). Принцип автономной спецификации широко используется при формировании генерального плана строения животного, при образовании осей тела индивидуума. У многих животных автономная спецификация лежит в основе формирования и частных клеточных систем. Хотя у представителей различных филогенетических групп удельное значение автономной и зависимой спецификации может варьировать, оба способа всегда сосуществуют у всех многоклеточных.

### 16.1. Материнские факторы формирования осей зародыша

В ходе индивидуального развития животных параллельно с клеточной спецификацией и дифференциацией, а также наряду с формированием анатомических структур, начиная с самых ранних этапов, обнаруживается достаточно самостоятельная цепь процессов, связанная с формированием общего плана тела, или формирование паттерна (pattern formation, от англ. pattern --- модель, рисунок). В ходе формирования паттерна единое вначале пространство зародыша подразделяется на ограниченное число доменов, соответствующих основным областям зародыша. В процессе развития возникают пространственно разделенные, хотя, часто, и не обособленные морфологически, системы неспецифицированных еще клеток, своего рода поля, в рамках которых идут и



морфогенетические процессы, и цитодифференциация. Важными элементами таких эмбриональных полей, предопределяющими их анизотропность, служат переднезадняя, дорсовентральная, проксимодистальная и другие оси тела. С молекулярно-биологической точки зрения, эмбриональные поля характеризуются тем или иным статусом экспрессии регуляторных генов. Формирование паттерна состоит в том, что в ходе развития в пространстве эмбрионального поля происходит изменение набора экспрессируемых регуляторных генов. Новый регуляторный статус этих субсистем отличается от существовавшего раньше, и служит основой для активации последующих программ развития. Таким образом, экспрессируемые в эмбриональных полях факторы наряду с материнскими факторами, синтезированными в период оогенеза, создают позиционную информацию, которая необходима для пространственной координации процессов развития.

Начальные этапы формирования паттерна часто связаны с материнскими цитоплазматическими детерминантами. Часто предопределение осей зародыша во многом обусловлено процессами, происходящими в проэмбриональный период, т.е. в период формирования женских половых клеток.

#### **16.1.1. Роль материнских факторов в формировании переднезадней оси зародышей Дрозофилы.**

Современное понимание принципов формирования паттерна развития насекомых было заложено в конце 1980-х, прежде всего, исследованиями Кристианы Нюссляйн-Фольхард и Эрика Висхауза. Этим авторам удалось выделить три группы генов материнского действия, которые ответственны за развитие передней и задней сегментированных областей, а также за развитие несегментированных терминальных участков тела --- переднего акрона и заднего --- тельсона. Труды по генетике развития Дрозофилы и, в частности, исследования, посвященные роли генов материнского действия в формировании главных осей зародыша Дрозофилы, принесли Нюссляйн-Фольхард и Висхаузу в 1995 году звание лауреатов Нобелевской премии.

**Гены, детерминирующие переднюю область тела.** Среди генов "передней" группы ведущую роль играет ген *bicoid*. Благодаря активности этого гена в цистocyтaх яйцевой камеры Дрозофилы синтезируется иРНК, которая по цитоплазматическим мостикам транспортируется в формирующийся ооцит. К этому времени в ооците возникает микротрубочковая система внутриклеточного транспорта. Эта система стабилизируется с помощью связанных с микротрубочками белков --- кинезина и динеина, которые вместе с тем являются транспортными средствами. Используя энергию гидролиза АТФ, эти белки перемещают различные вещества и структуры вдоль микротрубочек. Молекулы кинезина движутся в сторону (+) конца микротрубочки, а молекулы динеина --- в сторону (-) конца (рис. 16-2). В ооците Дрозофилы микротрубочки ориентированы таким образом, что их (+) концы направлены к будущему заднему полюсу. Поэтому некоторые иРНК, поступающие в ооцит из цистocyтoв, транспортируются вдоль этой транспортной системы в полярных направлениях.

В 3' нетранслируемой области иРНК<sup>*bicoid*</sup> имеется два сайта, которые обладают свойством к белкам *Exuperantia* и *Swallow*. С помощью этих белков иРНК<sup>*bicoid*</sup> прикрепляется к молекулам динеина и концентрируется в ближайшей к цистocyтaм зоне ооцита, куда обращены (-) концы микротрубочек. Благодаря этому, как выяснилось, данная область приобретает свойства переднего конца (рис.16-3). Соответственно, для правильного формирования паттерна тела животного необходима нормальная функция материнских генов *exuperantia* и *swallow*, тогда как мутации этих генов вызывают глубокие нарушения формообразования. После оплодотворения материнская иРНК<sup>*bicoid*</sup> транслируется, и образующийся белок диффундирует, создавая переднезадний градиент концентраций вдоль длинной оси яйца. Белок *Bicoid* служит транскрипционным фактором, о чем свидетельствует как его структура (наличие гомеодомена), так и его ядерная локализация. Мишенью транскрипционного фактора служит ген *hunchback*. Вместе с тем белок *Bicoid* обладает способностью связывать иРНК<sup>*caudal*</sup>, главный детерминант заднего конца, и предотвращать таким образом дифференциацию задних структур в передней области зародыша.

В яйцах гомозиготных мутантных самок *bcd*<sup>-/-</sup> белок Bicoid, естественно, отсутствует. Зародыши, которые развиваются из таких яиц, не имеют передних сегментированных отделов (рис. 16-4). Если в переднюю область яйца, взятого от самки *bcd*<sup>-/-</sup>, трансплантировать цитоплазму переднего конца яйца от самки дикого типа, то нормальное развитие восстанавливается. Введение цитоплазмы яйца, содержащей продукты гена *bcd* в среднюю область яиц *bcd*<sup>-/-</sup>, формирует двусторонний градиент белка Bicoid, направленный из центральной области яйца к переднему и заднему концам. Соответственно, развивается уродливая личинка с передними структурами в центральной области и с задними структурами на полюсах яйца (рис. 16-5).

**Гены, детерминирующие заднюю область тела.** Формирование задней области тела зародыша связано с активностью генов *nanos*, *oskar*, *valois*, *tudor*, *vasa*, *staufer* и др. Ключевым здесь является ген *nanos*. иРНК<sup>*nanos*</sup> закрепляется на будущем заднем конце ооцита с помощью белка Oskar. Поступающая в ооцит иРНК<sup>*oskar*</sup> связывается с белком Staufen, который соединяется с молекулами кинезина и по транспортной системе микротрубочек перемещается к их (+) концам, создавая здесь предпосылки формирования будущей задней области зародыша (рис. 16-6). Трансляция иРНК<sup>*oskar*</sup> создает здесь высокую концентрацию белка Oskar, который связывает иРНК<sup>*nanos*</sup>, способствуя ее накоплению. После оплодотворения иРНК<sup>*nanos*</sup> транслируется, и образующийся белок Nanos, который служит негативным транскрипционным фактором гена *hunchback*, закрывает путь развития структур головы.

**Гены, детерминирующие терминальные несегментируемые области.** Терминальная группа генов представлена генами *torso* и *torsolike*. Ген *torso* экспрессируется в цистоцитах, соответствующая иРНК транспортируется отсюда в ооцит, и после трансляции дает белок плазматической мембраны, тирозинкиназный рецептор torso, который равномерно распределен по поверхности яйца (рис. 16-7). Ген *torsolike* экспрессируется в клетках фолликулярного эпителия, расположенных в полярных областях ооцита, т.е. в участках, примыкающих к будущим переднему

и заднему концам ооцита. (рис. 16-8). Активность этого гена связана с выработкой секретлируемого белка *torsolike*, который является лигандом, взаимодействующим с рецептором *torso*. Это взаимодействие имеет своим результатом активацию MAP-киназы в полярных клетках бластодермы, что, в конечном счете, приводит к активации транскрипции генов *tailles* и *huckebein*. Транскрипция этих генов инициирует процессы, связанные с развитием тельсона. Наличие белка *Vicoid* модифицирует эти процессы так, что формируется акрон (рис. 16-9).

### **16.1.2. Роль материнских факторов в спецификации дорсовентральной оси зародыша Дрозофилы**

Более 10 генов материнского действия участвуют в спецификации дорсовентральной оси зародыша Дрозофилы. Это --- протяженный во времени процесс. Он начинается в период оогенеза, и завершается уже после оплодотворения, на стадии формирования бластодермы, в течение 14-го клеточного цикла. Во время оогенеза в цистоцитах экспрессируется ген *dorsal*, и соответствующая иРНК<sup>*dorsal*</sup> равномерно распределяется по ооциту. Примерно через 1,5 часа после оплодотворения синтезируется белок Dorsal, который является транскрипционным фактором, необходимым для спецификации вентральных структур зародыша, в частности, мезодермы и нейральной эктодермы. Первоначально белок Dorsal равномерно распределен по зародышу и находится в инактивированном состоянии, поскольку он связан с белком Cactus. Активация транскрипционного фактора Dorsal происходит лишь в вентральной области зародыша, где инактивирующий белок Cactus фосфорилируется, после чего комплекс Dorsal/Cactus диссоциирует, и Dorsal приобретает возможность выполнять функцию транскрипционного фактора. Асимметричная активация транскрипционного фактора Dorsal достигается довольно сложным путем, требующим значительного времени. Прежде всего, по мере формирования ооцита его ядро перемещается в передне-дорсальном направлении. Поэтому транскрипты гена *gurken* и соответствующие продукты трансляции (белок Gurken из семейства эпидермальных факторов роста), асимметрично концентрируются у одной, будущей спинной, стороны. После выведения лиганда во внешнюю среду он

взаимодействует с рецепторами фолликулярного эпителия, представленными белком *Torpedo*. Активация этих рецепторов ведет к подавлению экспрессии гена *pipe* в клетках фолликулярного эпителия, соседствующих с будущей дорсальной стороной яйца (рис.16-10). В результате этого белок *Pipe* образуется только на противоположной стороне. Наличие фактора *Pipe* является одной из предпосылок запуска каскада сериновых протеаз в перивителлиновом пространстве яйца. Этот каскад представлен белками *Gastrulation defective*, *Snake*, *Easter* и др. В результате активности протеаз, в конце концов, в перивителлиновом пространстве образуется активный лиганд *Sra(NB-aumlaut)tzle* (рис.16-11). Взаимодействие последнего с рецептором *Toll* на стадии формирования бластодермы ведет к образованию в клетках презумптивной вентральной области протеинкиназы *Pelle*. Эта протеиназа обеспечивает фосфорилирование белка *Cactus* и диссоциацию комплекса *Cactus/Dorsal* с высвобождением транскрипционного фактора *Dorsal* (рис.16-12). Последний поступает в ядра вентральной стороны зародыша и активирует гены, экспрессия которых необходима для спецификации нейрогенной эктодермы (*rhomboid*) и мезодермы (*twist*, *snail*). Одновременно блокируются гены, направляющие спецификацию дорсальной эктодермы (*tolloid*, *decapentaplegic*) и эктодермы амниона - серозы (*zerknu(NB-uumlaut)lt*) (рис.16-13)

## 16.2. Материнские факторы детерминации клеточных линий

Автономная спецификация, обусловленная особым пространственным распределением материнских цитоплазматических факторов в яйце, обеспечивает развитие разнообразных зачатков эпидермальной, энтодермальной и мезодермальной природы. Определение судьбы клеток зародыша с помощью материнских факторов, содержащихся в цитоплазме ооцита, широко распространено в природе. Классическим примером роли этих факторов может служить детерминация первичных половых клеток (см. главу 1, том 1).

Материнские факторы иногда используются не для спецификации тех или иных клеточных типов, а для управления морфогенетическими процессами. Например, белок Хоот шпорцевой лягушки *Xenopus*, который синтезируется в период оогенеза и сохраняется в субкортикальном слое анимальной половины ооцита, в

период дробления попадает в презумптивные эктодермальные клетки зародыша. Хоом связан с мембранами клетки и каким-то образом обеспечивает гастрюляцию. При инактивации белка Хоом с помощью соответствующего антитела наблюдали разнообразные нарушения гастрюляции, в частности, задержку эпиболии.

Представление о том, что у некоторых животных предопределение судьбы бластомеров происходит на ранних этапах развития, сформировалось уже в конце XIX столетия на основании морфологических и экспериментальных исследований. Например, изучение морфологии раннего развития аннелид и моллюсков показало, что все потомки некоторых бластомеров имеют один и тот же тип дифференциации. Возникло предположение, что такого рода клонообразующие бластомеры возникают при попадании в них специфической цитоплазмы яйца. Экспериментально проверить это предположения можно было в опытах по изоляции и последующем культивировании бластомеров. Оказалось, что изолированные бластомеры действительно во многих случаях дают те же зачатки, что и при нормальном развитии в составе целостной системы. Другой подход к проверке этой гипотезы состоял в разрушении некоторых бластомеров и наблюдении, какие структуры не образуются после этой процедуры. И в этом случае оказалось, что умерщвление клонообразующих бластомеров, или телобластов, вело к недоразвитию соответствующих частей зародыша.

Распределение и локализация цитоплазматических специфицирующих факторов по разным зонам яйца происходит не только в процессе оогенеза, но и после оплодотворения в ходе так называемой *ооплазматической сегрегации* (рис. 16-14). Механизмы последней разнообразны. Широко используются внутриклеточные системы транспорта, образованные белками цитоскелета и другими специальными белками.

Асимметричное распределение иРНК, синтезированных в ходе оогенеза, между бластомерами дробящегося яйца может происходить и благодаря преимущественному связыванию этих РНК с матриксом одной из двух centrosом клетки. Например, у моллюска *Ilyanassa obsoleta* в период дробления происходит

асимметричное распределение некоторых материнских цитоплазматических факторов, участвующих в формировании паттерна зародыша (рис. 16-15). Среди этих факторов материнские иРНК генов *Eve*, *Dpp*, и *Tld*. Ген *Eve*, вероятно, участвует в формировании переднезадней оси тела. Ген *Dpp* входит в состав семейства BMP. *Tld* кодирует секретлируемую протеазу, которая, как предполагается, служит модификатором *Dpp*. В силу каких-то функциональных различий между центросомами клетки, одну из которых следует, видимо, считать материнской, а другую --- дочерней, указанные иРНК перед началом деления дробления аккумулируются в перицентриолярном матриксе лишь одной из них. Позднее, иРНК<sup>*Eve*</sup> и другие поступают в кортикальную область клетки, расположенную близ центросомы, где и фиксируется до завершения деления дробления. Первая фаза --- аккумуляция иРНК на одной из центросом --- обусловлена активностью тубулиновой системы внутриклеточного транспорта. Вторая фаза --- сосредоточение иРНК в кортексе одной из будущих дочерних клеток --- связана с актиновыми микрофиламентами (Lambert, Nagy, 2002). Такое неравномерное распределение материнских иРНК после трансляции соответствующих белков --- транскрипционных факторов, естественно, вызывает дифференциальную активность генов.

Роль ряда генов материнского действия в асимметричном распределении цитоплазматических детерминант была исследована у нематоды *C. elegans*. Выявлено 6 генов *par*, мутации которых нарушают поляризацию зародыша в период дробления. Продукты генов *par-1* (серин-треониновая киназа) и *par-2* (белок неизвестной природы) локализованы в кортикальной области задней половины ооцита. Белок *par-3* сосредоточен в кортексе передней половины. Исследование мутантов по этим генам обнаружило, что гены *par*, необходимы для правильного расположения митотического веретена в период дробления и сегрегации полярных гранул в клетках половой линии. Оказалось также, что мутации *par* ведут к специфическим нарушениям распределения транскрипционных факторов *skn-1*, *glp-1*, *mex-3*, участвующих в спецификации клеточных линий нематоды (рис.16-16).

### 16.2.1. Ооплазматическая сегрегация и формирование клеточных клонов у *Spiralia*.

Выдающийся американский эмбриолог и цитолог Э. Вилсон (1856 - 1936) провел опыты по изоляции бластомеров моллюска *Patella* на стадии 16-и клеток (Рис. 16-17). Изоляция бластомеров анимального полушария, которые при нормальном развитии давали каждая четыре ресничные клетки прототроха, показала, что эти клетки содержат всю необходимую информацию, необходимую не только для осуществления массивированного цилиогенеза, характерного для этих клеток при нормальном развитии, но и факторы, контролирующие число клеточных делений, после которых происходит терминальная дифференциация. Аналогичные результаты были получены и при изоляции бластомеров 1q2 шестнадцатиклеточного зародыша полихеты *Nereis* (здесь q означает принадлежность к любому из квадрантов, т.е. a, b, c или d). Потомки изолированных бластомеров 1q1, как и при нормальном развитии, дифференцировались как сенсорные клетки (Рис. 16-18, Costello, 1945).

Удаление микромера 1a у восьмиклеточного зародыша моллюска *Illyanassa* приводило к образованию личинки без левого глаза. Удаление у такого же зародыша микромера 1c вело к недоразвитию правого глаза (рис. 16-19). На олигохетах были выполнены эксперименты, в которых с помощью ультрафиолетового облучения умерщвляли те или иные бластомеры. Если убивали производные бластомера D (2D, 3D, 4d), то у зародышей не развивались мезодермальные органы. Если умерщвляли бластомер 2d, то не формировались эктодермальные полосы. Эктодермальные органы в этом случае все же развивались за счет других источников, что свидетельствует об определенных регулятивных возможностях (Penners, 1938).

Весьма демонстративны опыты по удалению полярной лопасти зародышей моллюсков. В ходе дробления некоторых брюхоногих (*Illyanassa*, *Nassa*) или лопатоногих моллюсков (*Dentalium*) перед первым делением дробления происходит обособление цитоплазмы вегетативного полушария в виде шаровидной



лопасти, так что зародыш принимает характерную форму трилистника (рис.16-20). Эта лопасть после деления исчезает, так как ее цитоплазма поступает в бластомер CD. Лопасть вновь обособляется перед вторым и третьим делением. В конечном счете, ее материал попадает в бластомер 1D, а затем в бластомеры 2d и 4d. Э. Вилсон удалял полярную лопасть у зародыша *Dentalium* на стадии трилистника. Несмотря на то, что дробление заметно не изменялось, нормальная трохофора не развивалась. Формировалась уродливая личинка, лишенная мышц, ноги, раковинной железы (рис.16-21). Аналогичные нарушения происходили и после удаления бластомера 4D. На основании этих экспериментов Вилсон предположил, что цитоплазма полярной лопасти содержит мезодермальные детерминанты, локализация которых в вегетативной цитоплазме происходит вскоре после оплодотворения. Как показали дальнейшие опыты, предполагаемые детерминанты, по-видимому, связаны с кортексом яйца (Van den Biggelaar, 1977).

У пиявки *Helobdella triserialis* бластомеры А, В и С, образующиеся после второго деления дробления, дают начало эктодерме (микромеры 1а - 1с, 2а-2с) и энтодерме (макромеры 1А - 1С). В бластомер D попадает *телоплазма*, наличие которой у потомков D лежит в основе образования телобластов разной природы. С каждой стороны зародыша образуется по пять телобластов. Телобласты М становятся стволовыми мезодермальными клетками, деления которых дает полосу мезодермы. Телобласты N, O, P, Q дают покровы и нервную систему, и также образуют клеточные полоски (рис. 16-22), которые впоследствии сегментируются. Принципиально такие же телобласты --- по-разному специфицированные стволовые клетки, дающие начало клеточным полоскам, образуются и у малощетинковых червей.

### **16.2.2. Ооплазматическая сегрегация и формирование клеточных клонов у *Caenorhabditis elegans*.**

Сегрегация цитоплазматических детерминант ооцита по бластомерам происходит в период дробления и у нематоды *C. elegans*. Уже на стадии четырех клеток транскрипционные факторы *skn-1*, *pal-1*, *pie-1* распределены по разным клеткам,

предопределяя раннее формирование различных клеточных клонов (рис. 16-23) Фактор *skn-1* необходим для образования стволовых клеток нескольких клеточных линий, которые возникают из бластомера EMSt. На стадии 8 клеток обособляется бластомер E, дающий начало энтодерме, а на стадии 32 --- бластомеры M и St, стволовые клетки линии мезодермальных клеток (M), и линии клеток стомодеума (St). У животных, мутантных по гену *skn-1*, развитие соответствующих клеточных линий подавлено, и вместо них образуются эктодермальные клетки, которые при нормальном развитии образуются из бластомера C. В отсутствие фактора *pie-1* блокируется развитие клеток половой линии и бластомер, соответствующий по положению бластомеру P2, имеет судьбу бластомера EMSt. Фактор *pal-1* необходим для развития эктодермы. В его отсутствие при делении бластомера образуются две клетки P3, а не бластомеры C и P2, как при нормальном развитии. Конечно, названные транскрипционные факторы не являются непосредственной причиной той или иной спецификации. Один и тот же фактор *skn-1* важен для развития и мезодермы, и энтодермы. Реальная спецификация клеток происходит позднее и, возможно, при участии иных механизмов, включая межклеточные взаимодействия. *Роль факторов ранней детерминации состоит в том, чтобы инициировать в клетке-родоначальнице такую программу развития, которая обеспечит у потомков экспрессию определенного набора генов и выработку транскрипционных факторов, необходимых для определения их окончательной судьбы.*

### **16.2.3. Автономные факторы спецификации энтодермального зачатка иглокожих и асцидий.**

У асцидий судьба большинства бластомеров зародыша предопределена перед гастрულიей (рис. 16-24). Благодаря наличию материнских специфицирующих факторов уже на стадии 32-х бластомеров в разных областях зародыша наблюдается дифференциальная экспрессия многих зиготических генов, связанная со спецификацией клеток. В соответствии с локализацией экспрессии различаются три группы "ранних" генов. Одну группу составляют гены, активность которых проявляется повсеместно. Другая представлена генами, транскрипция которых

происходит главным образом в анимальном полушарии. Например, в бластомерах анимального полушария --- предшественниках эпидермальной линии экспрессируется ген *HrHesl 1*, гомологичный гену *hairy* Дрозофилы. (Tomioka M., Miya T., Nishida H. 2002; Miya T., Nishida H. 2002). Наконец, третья группа представлена генами, которые обнаруживают свою активность лишь в вегетативной области зародыша. Пять пар бластомеров-предшественников линии энтодермальных клеток в период дробления экспрессируют гомеобокс-содержащий ген *Citif 1* (Ristoratore et al., 1999). Наиболее полные данные о генетических механизмах спецификации в настоящее время имеются в отношении клеток мышечной линии.

У вторичноротых животных, как беспозвоночных, так и позвоночных, среди материнских факторов, участвующих в ранней спецификации зародыша, важную роль играет  $\beta$ -катенин. Как известно, катенины, в том числе и  $\beta$ -катенин служат для закрепления в клетке белков адгезии --- кадгеринов (см. NB). Другая функция  $\beta$ -катенина состоит в том, что, он является элементом универсальной, широко распространенной в природе системы передачи межклеточных сигналов, так называемого Wnt-сигналинга:  $Wnt \rightarrow Frizzled \rightarrow Dishevelled \rightarrow GSK-3 \rightarrow \beta\text{-катенин} \rightarrow \beta\text{-катенин} + Tcf/Lef 1 \rightarrow \text{транскрипция}$  (подробней см. главу 15). На конечном этапе Wnt-пути  $\beta$ -катенин, соединяясь с белком Tcf/Lef 1, образует комплексный регулятор транскрипции и, в качестве транскрипционного кофактора, локализуется в ядре клетки.

У морских ежей  $\beta$ -катенин участвует в спецификации энтодермы (рис. 16-25). Образование комплексного транскрипционного фактора с участием  $\beta$ -катенина в клетках дробящихся зародышей морских ежей носит автономный характер и не прекращается при диссоциации зародышей и изоляции макромеров. Уже на стадии 32 бластомеров  $\beta$ -катенин обнаруживается в ядрах макромеров, скелетогенных и малых микромеров. В ходе шестого деления дробления макромеры образуют два вегетативных венца клеток *veg1* и *veg2*. В ядрах клеток более анимально расположенного венца *veg1*  $\beta$ -катенин исчезает, так что после седьмого деления он обнаруживается только в ядрах клеток *veg2* и микромеров. Во всех других зачатках

$\beta$ -катенин остается в связанном с мембранами состоянии. Позднее, на стадии бластулы,  $\beta$ -катенин вновь выявляется в ядрах клеток *veg1*, потомки которых дают энтодерму задней кишки.

Ядерную локализацию  $\beta$ -катенина и спецификацию энтодермы можно предотвратить в условиях интенсивной экспрессии цитоплазматического домена кадгерина. При этом  $\beta$ -катенин связывается и не участвует в образовании транскрипционного фактора. В этих условиях активность гена *endo 16*, характерного маркера энтодермальных клеток, не обнаруживается, а сама энтодерма не дифференцируется. Тот же самый эффект вызывает и сверхэкспрессия киназы GSK3, которая препятствует накоплению  $\beta$ -катенина. Наоборот, обработка ранних зародышей морских ежей хлористым литием, который подавляет активность этой киназы, расширяет зону формирования энтодермы, вызывая вегетализацию зародышей, (Logan et al., 1999). О роли  $\beta$ -катенина в спецификации энтодермы говорят также и эксперименты, в которых подавлялась или стимулировалась активность Tcf/Lef 1. В случае экспрессии негативных форм этого кофактора, которые не образуют функционально активный комплексный транскрипционный фактор с  $\beta$ -катенином, спецификация энтодермы блокировалась, тогда как сверхэкспрессия нормальной формы Tcf/Lef 1, наоборот, расширяла область спецификации зачатка энтодермы. Интересно, что у морских ежей ведущая роль материнского  $\beta$ -катенина в спецификации энтодермы подкрепляется последующей активацией в клетках этого зачатка гена *Wnt8*, экспрессия которого необходима для включения полной цепи Wnt- $\beta$ -катенинового сигналинга.

$\beta$ -катенин участвует в спецификации энтодермы и у асцидий. Если в оплодотворенные яйца асцидий ввести иРНК стабилизированной формы  $\beta$ -катенина, который не имеет сайтов фосфорилирования, используемых GSK-3, во всех клетках зародыша происходит накопление  $\beta$ -катенина. При этом все клетки зародыша, кроме клеток мышечного зачатка, специфицируются как энтодермальные, о чем свидетельствует экспрессия щелочной фосфатазы, маркера энтодермальной дифференциации. Тот же эффект наблюдали при действии ионов

Li<sup>+</sup>. Наоборот, сверхэкспрессия кадгерина, ведущая к связыванию β-катенина, вызывала у зародышей асцидии *Ciona savignii* эпидермализацию клеток, которые экспрессировали специфический для эпидермиса ген *Cs-Epi1* (Nishida, 2002).

#### **16.2.4. Факторы автономной спецификации хордомезодермы позвоночных.**

У позвоночных животных материнский β-катенин также играет важную роль в раннем эмбриогенезе. Здесь, однако, он выступает как фактор спецификации дорсальной мезодермы, детерминируя при этом не только судьбу клеток определенной клеточной линии, но и дорсовентральную ось зародыша в целом..

В ооцитах *Xenopus* материнская иРНК β-катенина распределена по цитоплазме равномерно. Соответственно, повсеместно распределен и сам белок, количество которого ограничивается активностью киназы GSK-3, которая способствует деградации β-катенина. В ходе кортикальной ротации, наступающей после оплодотворения, из вегетативной области яйца на будущую дорсальную сторону зародыша транспортируется материнский фактор --- белок Disheveled, который служит супрессором киназы GSK-3. Благодаря этому в дорсальной области возрастает концентрация β-катенина, который вместе с белком Tcf3 образует комплексный транскрипционный фактор. Этот фактор включает экспрессию гена *siamois* и ряда других генов, активность которых предопределяет образование хордомезодермального зачатка.

По-видимому, аналогичную функцию выполняет β-катенин и у рыб. У *Danio rerio* ядерная локализация материнского β-катенина обнаруживается перед гастрულიей в клетках той части желточного синцития, которая подстилает будущую дорсальную область зародышевого щита. Если экспериментально вызвать накопление β-катенина в иных участках желточного синцития, они становятся областями формирования хордомезодермы и развития вторичных зародышей..

#### **16.2.5. Факторы автономной спецификации мышечных клеток у Асцидий.**

Мышечный зачаток личинки асцидий образован двумя субпопуляциями. Одна из

них, или первичные мышечные клетки, представлена потомками заднего вегетативного бластомера В4.1 (рис. 16-26). Вторичные мышечные клетки образуются из продуктов деления бластомеров В4.2 и А4.1. Существенное различие между этими субпопуляциями состоит в том, что спецификация первичных мышечных клеток происходит под влиянием материнских цитоплазматических факторов, тогда как судьба вторичных мышечных элементов определяется индуктивными сигналами, исходящими извне, со стороны соседних клеток.

До последнего времени существование цитоплазматических материнских факторов спецификации мышц у зародышей асцидий доказывалось методами экспериментальной эмбриологии. Этот вывод вытекал из экспериментов по изоляции бластомера В4.1, а также из опытов, в которых путем подавления цитотомии создавались условия, исключаящие межклеточные взаимодействия. Решающим доводом в пользу существования особых материнских факторов миогенеза были эксперименты, которые позволяли наблюдать непосредственное действие цитоплазмы, взятой из различных областей яйца асцидии. Оказалось, что сращивание клеток из презумптивных немышечных областей с цитоплазматическими пузырьками, содержащими "миоплазму", т.е. цитоплазму яйца, которая в ходе ооплазматической сегрегации и дробления попадает в бластомер В4.1, вызывает миогенную спецификацию. Действительно, клетки, получившие "миоплазму" яйца, при автономном развитии *in vitro* вместо, например, эпидермиса или энтодермы дают клетки мышечной линии.

У *Ciona intestinalis* и *Halocynthia roretzi* первичные мышечные клетки образуют две симметрично расположенные в хвостовой области зародыша полоски, состоящие -- - каждая --- из семи клеток (рис.16-27). Родословная этих клеток представлена на рис.16-28. Видно, что на пятом делении среди потомков бластомера В4.1 обособляется клетка В6.1 --- основательница энтодермы, а также два бластомера мезодермальной природы: В6.2, который дает впоследствии мышцы, мезенхиму и клетки хорды, и В6.4 --- дающий мезенхиму и мышцы. На следующем --- шестом делении обособляются клетки-основательницы мышечной линии --- бластомеры

В7.4, В7.5 и В7.8. Что касается бластомера В7.3, то он при следующих делениях дает начало и мезенхиме и хорде. Бластомер В7.7 служит родоначальником мезенхимы, а бластомер В7.6 --- энтодермы.

Обособление мезодермальных бластомеров В6.2 и В6.4 коррелирует с активацией гена *snail* (у *Ciona* --- *CiSna*). При следующем делении после отделения энтодермального бластомера В7.6 экспрессия *CiSna* начинается и в бластомере В7.5 (Satou et al., 1995; Erives et al., 1998; Erives, Levin, 2000). На этих ранних стадиях обнаружена экспрессия и специфического для миогенеза гена из семейства *MyoD* --- *CiMDF* (*Ciona MyoD Family*). Этот ген экспрессируется в обеих мышечных субпопуляциях. Однако, в первичной субпопуляции экспрессия *CiMDF* автономна, тогда как во вторичной --- она начинается лишь при наличии индуцирующих сигналов (Meedel et. al., 2002)

Интересно то, что на этих ранних стадиях эмбриогенеза экспрессируются не только регуляторные гены, участвующие в спецификации клеток мышечного типа, но и гены, непосредственно контролирующие синтез мышечных сократительных белков. В частности, в клеточных линиях В6.2 --- В7.4, В 7.5, В7.8 наблюдается экспрессия генов мышечного актина (*HrMA4*), гена тяжелой цепи миозина (*HrMHC1*) и гена специфического мышечного транспортера кальция (Satou et al., 1995; Tomioka et al., 2002).

В цис-регуляторных областях всех указанных генов среди прочих сайтов имеются E-box сайт, связывающий bHLH фактор, и T-сайт, связывающий материнский, относящийся к классу Brachyury T-box фактор, который у *Ciona intestinalis* называется *CiVegTr*. Мутации обоих этих сайтов делают невозможной мезодермальную спецификацию производных бластомера В4.1. В случае мутаций, затрагивающих структуру E-box и T-сайтов, ни мышцы, ни мезенхима, ни хорда не образуются. Есть все основания рассматривать материнский T-box фактор *CiVegTr* как цитоплазматический фактор, предопределяющий мезодермальную, в том числе и мышечную, спецификацию. Как полагают, автономная спецификация мышечной линии обеспечивается наряду с белком *CiVegTr* также и другими факторами.

Существование еще одного материнского фактора мышечной спецификации было недавно показано у асцидии *H. roretzi*, из яиц которой была выделена материнская иРНК<sup>*macho-1*</sup>, кодирующая цинк-фингерный белок. Судя по структуре этого белка, соответствующий ген асцидии *macho-1* (от японского **mabo**ya по **cho** omoshiroi idenshi --- "очень интересный ген асцидии", Н. Nishida, персональное сообщение) ортологичен регуляторному гену *Zic* позвоночных, и, по-видимому, произошел от общего с ним анцестрального гена. Распределение иРНК<sup>*macho-1*</sup> в яйце соответствует локализации цитоплазмы, содержащей материнские факторы миогенеза. При инъекции в яйцо антисмысловой иРНК<sup>*macho-1*</sup> происходит функциональное истощение запасов нормальной иРНК<sup>*macho-1*</sup>. Такие яйца после оплодотворения нормально дробились, проходили стадии гастрюляции и нейрулы. Однако при переходе к стадии хвостовой почки обнаружались глубокие нарушения развития, связанные с редукцией мышечной ткани. Общая масса мышечного зачатка уменьшалась по сравнению с нормальными личинками на 70%. Более того, изолированные бластомеры В4.1 после инъекции в яйцо антисмысловой иРНК<sup>*macho-1*</sup> вообще не были способны к спецификации клеток мышечной линии. Показано, что при выключении функции иРНК<sup>*macho-1*</sup> экспрессия гена мышечного актина отсутствовала. Наконец, свидетельством того, что иРНК<sup>*macho-1*</sup> является материнским фактором автономной спецификации мышц асцидии, служат эксперименты, в которых после инъекции этой иРНК в разные области зародыша происходило эктопическое образование мышц (Nishida, Sawada, 2001).

## ЛИТЕРАТУРА

- Исаева В. В. Клетки в морфогенезе. Москва. Наука. 1994. 224 стр.
- Davidson, E. H. Genomic regulatory systems. Development and evolution. Acad. Press. 2001. 261 p.
- Erives, A., Corbo, J.C., Levine, M. Lineage-specific regulation of the *Ciona snail* gene in the embryonic mesoderm and neuroectoderm// Dev. Biology. 1998. V. 194:213-225.
- Erives, A., Levin, M. Characterization of a maternal T-box gene in *Ciona intestinalis*// Dev. Biology. 2000. 225:169-178.



- Hassegawa, K., Sakurai, N., Kinoshita, T. Xoom is maternally stored and functions as a transmembrane protein for gastrulation movement in *Xenopus* embryos.// *Develop. Growth Differ.* 2001.43:25-31.
- Heasman, J. M. et al. Overexpression of cadherins and underexpression of  $\beta$ -catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus embryo*.// *Cell.* 1994. V.79:791-803.
- Lambert D., Nagy L.M., 2002. Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNA during embryonic cleavage.// *Nature*.V. 240:682-686.
- Logan, C.Y., Miller, J. R., Ferkowicz, M. J., McClay, D. R. Nuclear  $\beta$ -catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo.// *Development.* 1999. V.126:345-357.
- Meedel et. al., 2002
- Miya T., Nishida H. 2002. DBOC 6989).
- Nishida, H. Specification of developmental fates in Ascidian embryos: molecular approach to maternal determinants and signaling molecules.// *Int. Rev. Cytol.* (год?) V.217: 227 - 276.
- Nishida, H., Sawada, K. *macho-1* encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis// *Nature*.2001. V. 409:724-729.
- Ristoratore, F., Spagnuolo, A., Aniello, F., Dranno, M., Fabbrini, F., Di Lauro, R. Expression and functional analysis of *Citifl*, an ascidian NK-2 Class gene, suggest its role in endoderm development// *Development.* 1999. V.126:5149-5159.
- Satou, Y., Kusakabe, T., Araki, A., Satoh, N. Timing of initiation of muscle-specific gene expression in the ascidian embryo precedes that of developmental fate restriction in lineage cells// *Dev., Growth Differ.*1995. V. 37:319-327.
- Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M., Hausen, P. Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. // *Mech. Dev.* 1996. V. 57:191-198.
- Tomioka M., Miya T., Nishida H. 2002.;
- Yasuo, H., Satoh, N. An ascidian homolog of the mouse *Brachyury (T)* gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage// *Dev., Growth Differ.*1994. V. 36:9-18.

Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C., Heasman, J. The role of maternal *VegT* in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryo.// Cell. 1998.V.94:515-524

## ГЛАВА 17. ЗАВИСИМАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ

Автономная детерминация, обусловленная материнскими цитоплазматическими факторами, которые вырабатываются в период оогенеза, имеет относительно ограниченное распространение и проявляется только на ранних этапах индивидуального развития. Материнские цитоплазматические факторы, в силу хотя бы непродолжительного времени существования, могут обеспечить лишь начальную поляризацию зародыша и формирование нескольких типов клеточных линий. Для морфогенетических процессов и для клеточной спецификации, которые происходят в период гаструляции и после нее, требуются иные механизмы. Критической предпосылкой возникновения и эволюции современных многоклеточных животных, по-видимому, стало появление механизмов выработки и межклеточной передачи молекулярных сигналов, определяющих детерминацию клеток и зачатков. Детерминацию, которая обусловлена внешними сигналами, вырабатываемыми другими клетками, в отличие от *автономной* называют *зависимой*.

Зависимая детерминация происходит практически на всех этапах индивидуального развития и нередко обнаруживается уже в период дробления. Хорошо, например, известно, что раннее дробление Гребневииков благодаря неравномерному распределению материнских цитоплазматических факторов имеет мозаичный характер. При изоляции бластомеров на стадии двух клеток каждый бластомер образует ювенильное животное, имеющее уменьшенное вдвое число элементов тела. Тем не менее, образование гребных пластинок у Гребневииков носит зависимый характер. Действительно, в образовании гребных пластинок участвуют потомки бластомера  $e_1$ , а также один из потомков бластомера  $m_1$ , расположенный по соседству с производными  $e_1$ . Когда Генри и Мартиндейл (Henry, Martindale, 2001) на стадии 16 бластомеров удаляли микромеры --- производные  $e_1$ , оставляя при этом в неприкосновенности клетку  $m_1$ , они наблюдали полное подавление развития гребных пластинок. Без взаимодействия с производными бластомера  $e_1$  клетка  $m_1$  сама по себе не способна к формированию гребных пластинок. Вместе с тем, удаление  $m_1$  не сказывается на образовании гребных пластинок из производных  $e_1$ . Такого рода наблюдения приводят к логическому выводу о наличии неких сигналов, с

помощью которых производные бластомера  $e_1$  воздействуют на соседние клетки, вовлекая их в процесс формирования гребных пластинок (рис. 17-1).

Исследования последних лет показали, что зависимая детерминация, которая лежит в основе формирования новых структур и функций развивающихся животных, обусловлена сложной межклеточной системой передачи сигнальных молекул, или *сигналингом* (от англ. signal --- давать сигнал). Применение молекулярно-биологических методов анализа открыло взорам современных исследователей неизвестный ранее мир сигнальных молекул, их рецепторов и систем проведения сигнала от поверхности клетки к ее геному. Скоординированная во времени и пространстве активность молекул сигнальных систем создается и регулируется сложными сетями взаимодействующих генов.

На рубеже XIX и XX столетий, когда теоретическая эмбриология в лице Августа Вейсмана постулировала неравнонаследственное деление как основу процессов дифференциации, мысль о возможной морфогенетической роли межклеточных взаимодействий казалась лишь смелой догадкой, которая нуждалась в основательных экспериментальных доказательствах. Эти доказательства были получены выдающимся немецким эмбриологом Гансом Шпеманном, работы которого открыли новую страницу в истории эмбриологии (Spemann, 1901).

### **17.1. Эмбриональная индукция. История открытия.**

**Зависимое развитие хрусталика.** Свои поиски межклеточных взаимодействий Шпеманн начал на сравнительно поздних стадиях развития зародыша, когда можно было предполагать, что цитоплазматические факторы уже не оказывают непосредственного действия на процессы развития. В качестве модели исследования Шпеманн выбрал развитие глаза у амфибий. Последовательные стадии морфогенеза глаза к этому времени были достаточно хорошо исследованы и свидетельствовали о том, что этот орган образуется из нескольких закладок, ткани которых в ходе развития обнаруживают координированные во времени сложные морфогенетические преобразования.

Формирование глаза начинается с образования парных, симметрично расположенных выростов переднего мозга --- *глазных пузырей*, которые соединены с головным мозгом *глазными стебельками* (рис. 17-2). Разрастаясь, глазные пузыри приближаются к эктодерме головы, клетки которой в этой области принимают столбчатый вид и образуют дискообразный зачаток хрусталика --- *хрусталиковую плакodu* (от греч. *πλακους* --- лепешка). Вскоре начинается инвагинация дистальной области глазного пузыря, который благодаря этому преобразуется в двухслойную *глазную чашу* (*глазной бокал*). Наружная стенка чаши служит зачатком *пигментного эпителия*, внутренняя --- зачатком *сетчатки глаза*. Одновременно с инвагинацией глазного бокала вследствие замыкания хрусталиковой плакоды формируется эктодермальный хрусталиковый пузырек, который вскоре обособляется от эпидермального слоя и занимает положение в дистальной области глазного бокала. Чем определяются эти скоординированные морфогенетические процессы? Существует ли, например, причинная связь между образованием глазных пузырей и формированием хрусталиковой плакоды?

Для ответа на эти вопросы Шпеманн предпринял экспериментальное исследование развития глаза зародыша лягушки *Rana fusca*. На стадии ранней хвостовой почки Шпеманн делал обращенный вниз П-образный надрез эктодермы головы, прикрывающей область формирования глазного пузыря, отворачивал эктодермальный лоскут и удалял глазной пузырь (рис. 17-3). После хирургического удаления глазного пузыря эктодермальный лоскут возвращался в исходное положение и вскоре приживлялся. В этом опыте Шпеманну удалось показать, что в случае удаления глазного пузыря хрусталиковая плакода не формировалась и, соответственно, хрусталик не развивался (рис. 17-4). В другом эксперименте Шпеманн трансплантировал глазной бокал в туловищную область и наблюдал эктопическое образование хрусталика. Непреходящее значение этих, опубликованных в 1901 году, опытов Шпеманна, состоит в том, что впервые в истории эмбриологии было *доказано* существование зависимого развития органов: удаление или трансплантация одного зачатка соответственно негативно или позитивно сказывались на развитии другого. Значение опытов Шпеманна состояло и в том, что была разработана методология экспериментального анализа зависимого развития, а именно, нарушение

нормальных связей между взаимодействующими зачатками. Современные представления о механизмах, лежащих в основе развития глаза позвоночных будут представлены в главе NB.

**Открытие организатора.** Показав, что в период органогенеза предопределение судьбы зачатков происходит в результате взаимодействия, Шпеманн попытался распространить свою методологию анализа эмбрионального развития на более ранние стадии. Он трансплантировал различные зачатки гастролы тритонов *Triturus cristatus* и *Triturus taeniatus* на стадиях ранней и поздней гастролы. Выбор объектов был связан тем, что яйца этих видов отличаются своей пигментацией: у *T. cristatus* яйца светлые, тогда как у *T. taeniatus* --- темные. Применяя реципрокные трансплантации, Шпеманн мог проследить судьбу пересаженных естественно маркированных кусочков. Шпеманн установил, что трансплантированные зачатки ранней гастролы развивались в соответствии с новыми условиями окружающей их среды: презумптивная нейроэктодерма развивалась на брюшной стороне зародыша как эпидермис, тогда как презумптивный эпидермис в области нейральной пластинки развивался как нервная ткань (рис. 17-5). Из этих наблюдений следовал вывод, что на стадии ранней гастролы исследованные зачатки не были детерминированы и развивались независимо, принимая судьбу окружающих их тканей. Иная картина наблюдалась спустя несколько часов, когда трансплантацию проводили на стадии поздней гастролы. Теперь при трансплантации материала нейроэктодермы на брюшную сторону формировались структуры, характерные для нервной системы. Презумптивная эпидермальная ткань, пересаженная в область нейроэктодермы, также сохраняла свои свойства в новом окружении (рис. 17-6). Из этих экспериментов следовало, что на стадии гастролации происходит *детерминация* свойств эпидермальной и нервной ткани.

Особое значение имели результаты, полученные Шпеманном и его ученицей Хильдой Мангольд в опытах по трансплантации зачатка спинной губы бластопора, взятого на стадии ранней гастролы. Пересадка спинной губы бластопора на вентральную сторону зародыша вызывала полную реорганизацию морфогенетических процессов, в результате которой в этой области происходило развитие дополнительной хорды, нервной трубки,

сомитов (Spemann, Mangold, 1924). Дорсальная губа бластопора предстала, таким образом, *организатором* развития осевых структур и при трансплантации вызывала формирование вторичного зародыша (рис. 17-7).

Из экспериментов Шпеманна и его учеников следовало, что при нормальном развитии материал спинной губы бластопора образует хордомезодерму, которая контактирует с эктодермой и индуцирует в последней процессы, ведущие к возникновению нейральной ткани и нервной системы. Процесс образования нейральной ткани из компетентной эктодермы под действием организатора был назван Шпеманном *первичной эмбриональной индукцией*. Дальнейшее развитие зародыша, по Шпеманну, представлялось *цепью индукционных событий, в результате которых происходила последовательная дифференциация зародыша*. Вскоре во многих лабораториях мира было показано, что гомологичные спинной губе бластопора амфибий зачатки зародышей рыб, рептилий, птиц и млекопитающих обладают такими же свойствами организатора и способны индуцировать развитие осевых структур. Хотя впоследствии оказалось, что многие из выводов Шпеманна нуждаются в уточнении, а некоторые из них даже не соответствуют действительности, тем не менее, экспериментальные исследования Шпеманна и его школы позволили сформулировать некий новый фундаментальный принцип организации онтогенеза животных, за открытие которого Ганс Шпеманн в 1935 году был удостоен Нобелевской премии.

Открытие организатора и явления эмбриональной индукции способствовали интенсивному развитию экспериментальной эмбриологии и разработке новых методических приемов. В частности, возникла новая отрасль экспериментальной эмбриологии, широко использовавшая методику эксплантации зачатков *in vitro*. Начиная с Гольтфретера (1932), в исследовательскую практику внедряются разнообразные среды для культивирования зачатков *in vitro*. Для изучения индуцирующих свойств различных тканей создаются системы совместного культивирования предполагаемого индуктора и реагирующей ткани, в качестве которой часто использовалась анимальная шапочка недифференцированной эктодермы

бластулы или ранней гастролы амфибий. С этой же целью используется предложенный Отто Мангольдом метод имплантации предполагаемого организатора в бластоцель зародыша (рис. 17-8).

## 17.2. Индукция и компетенция

*Индукция* (от лат. *inductus* --- побуждение) --- межклеточное взаимодействие индуктора и реагирующей системы, в результате которого изменяется направление развития последней. *Индуктором* могут быть ткань, зачаток, клетка, которые вырабатывают сигнальные молекулы, действие которых вызывает изменение потенции развития ткани-мишени. *Реагирующая ткань*, или *ткань-мишень* --- это особым образом дифференцированная ткань, которая характеризуется *компетенцией* (от лат. *compeo* --- быть способным), т.е. способностью воспринять сигнальные молекулы и адекватным образом на них отреагировать (Waddington, 1932) (рис. 17-9). Важно подчеркнуть, что *эмбриональная индукция* --- это не однонаправленный процесс, а взаимодействие двух специально подготовленных для такого взаимодействия зачатков или клеток (Михайлов, 1988).

Примером компетенции клеток зачатка может служить индукция хрусталика при взаимодействии глазного пузыря и эктодермы, взятых от крыс с разным генетическим статусом (Fujiwara et al., 1994). В этом эксперименте исследовали индукцию хрусталика при разных комбинациях тканей, взятых от животных дикого типа, и от гомозиготных мутантов по гену *Pax6* (таблица 17.1).

Таблица 17.1. Зависимость индукции хрусталика при рекомбинации тканей крыс с различным генетическим статусом: *Wt* (дикий тип) и *Pax6<sup>-</sup>/Pax6<sup>-</sup>* (по Fujiwara et al., 1994)

Взаимодействующие ткани		Индукция хрусталика
Глазной пузырь	Эктодерма	
<i>Wt</i>	<i>Wt</i>	есть
<i>Pax6<sup>-</sup>/Pax6<sup>-</sup></i>	<i>Wt</i>	есть
<i>Wt</i>	<i>Pax6<sup>-</sup>/Pax6<sup>-</sup></i>	нет
<i>Pax6<sup>-</sup>/Pax6<sup>-</sup></i>	<i>Pax6<sup>-</sup>/Pax6<sup>-</sup></i>	нет



Как видно из таблицы 17.1, в данном случае положительный исход индукции определяется не тканью индуктора, но особенностями реагирующей ткани. В случае гомозиготной мутации  $Pax6^-/Pax6^-$  реагирующая ткань не обладает компетенцией, и хрусталик не образуется. Если же эктодерма берется от животного дикого типа, то хрусталик индуцируется даже в том случае, когда индуктор взят от мутантной формы. Эти наблюдения подтверждаются данными о том, что *in vivo* при нуль-мутации  $Pax6^-/Pax6^-$  у зародышей глаза не развиваются.

Индукцию, при которой происходит включение новых генетических программ, определяющих спецификацию клеток, называют *индуктивной*. В некоторых случаях, однако, предполагается, что индуктивные сигналы вызывают не изменение генетических программ клеточной спецификации, а лишь разблокировку такого рода программ. В этих случаях говорят о *пермиссивной* (от лат. *permissus* --- позволение) индукции.

Эмбриональная индукция является важнейшим фактором развития всех многоклеточных животных. Эмбриональная индукция реализуется как на тканевом уровне, когда взаимодействие происходит между зачатками эпителиальной природы, или между мезенхимными и эпителиальными зачатками, так и на уровне отдельных клеток. Эмбриональная индукция определяет как спецификацию клеточных типов, так и морфогенетические процессы, координируя их в пространстве и во времени. Индукция обеспечивает эпигенетическую связь между стадиями развития возрастающей сложности.

У позвоночных принцип эмбриональной индукции лежит в основе формирования практически всех органов, независимо от их принадлежности к тому или иному зародышевому листку. Так, индуктивные взаимодействия между мезенхимой и эктодермальным эпителием лежит в основе развития волоса, пера, чешуя, зубов, потовых и молочных желез. Печень, легкие, поджелудочная и слюнная железы возникают в результате индуктивных взаимодействий между мезенхимой и эпителиями энтодермальной природы.

Развитие почки обусловлено индуктивными процессами, в которых участвует мезодермальный эпителий.

Экспериментальная эмбриология выявила замечательную особенность мезенхимы зародышей, а именно региональную специфичность ее индуктивных свойств. Оказалось, что внешне однородная мезенхима, взятая из разных областей тела зародыша, обладает способностью при взаимодействии с одним и тем же видом эпителиальной ткани индуцировать разные органы (рис. 17-10). Это свидетельствует о пространственной дифференциации мезенхимы. Молекулярно-биологические факторы, обуславливающие эти различия, реальное содержание дифференциации мезенхимы еще предстоит раскрыть.

### **17.3. Гетерогенные индукторы**

Открытие явления индукции естественным образом поставило вопрос о химической природе индуцирующего фактора. Однако первоначальные попытки расшифровать химическую природу индуктора оказались неудачными. Субъективность критериев тканевой дифференциации и, главное, слабая разрешающая способность применявшихся аналитических методов, предопределили неудачу поисков в этом направлении. В качестве индукторов одними исследователями предлагалось рассматривать жирные кислоты, другими --- стеринны. Микроскопические объемы естественных организаторов и вытекающая отсюда сложность получения достаточной массы организатора побудили исследователей заняться поисками *гетерогенных индукторов*, т.е. веществ, выделенных не из эмбриональных тканей организатора, а из различных тканей взрослых животных (Саксен, Тойвонен, 1963). Такие вещества в ряде случаев действительно обладали

индуцирующим действием на недетерминированную ткань анимальной эктодермальной шапочки ранней гастролы амфибий. Среди гетерогенных индукторов различают факторы, вызывающие нейральную, энтодермальную и мезодермальную дифференциацию.

В качестве источников *нейтрализующих, или N-факторов*, выявлено несколько десятков тканей различных животных. В частности, N-факторы белковой природы выделяли разными способами из печени морской свинки, а также из куриных зародышей 9 - 11 сут инкубации (Михайлов, 1988).

Вегетализирующие или V-факторы, т.е. факторы, вызывающие развитие энтодермальных структур в эктодермальных шапочках амфибий, подробно исследовал немецкий эмбриолог Тидеман (H. Tiedeman). Из куриных зародышей он экстрагировал полипептиды, которые при добавлении к компетентной эктодерме зародыша амфибий вызывали образование энтодермы, а при больших концентрациях --- и мезодермы. Выход морфогенетически активных полипептидов составлял примерно 10 мг на 1 кг куриных эмбрионов, т.е. около 0,001%.

"Классическим" источником мезодермализующего, или M-фактора долгое время служил костный мозг морской свинки, из которого выделяли некий гликопротеид (Yamada, 1962). В 1987 Дж. Смит (J. Smith, 1987) выделил из культуральной среды клеток ХТС Ксенопуса термостабильный белок, который обладал сильным мезодермализующим действием. Этот белок, MIF (*mesoderm inducing factor*), имел молекулярный вес 27 KDa и состоял из двух субъединиц. Последующие исследования показали, что MIF --- один из представителей многочисленного семейства *активин*ов, входящих в состав суперсемейства TGF- $\beta$ . После того как было показано, что на стадии гаструлы *Xenopus* экспрессируются гены активина, стало ясно, что открытие MIF --- первый шаг на пути расшифровки молекулярных механизмов процессов индукции.

#### **17.4. Образование мезодермального зачатка у амфибий и рыб**

В раннем развитии амфибий и, по-видимому, других позвоночных одно из наиболее ранних событий связано со спецификацией мезодермы. Целый ряд экспериментальных данных свидетельствует о том, что детерминация осевой мезодермы у лягушек происходит в период дробления. Так, было установлено, что при эксплантации клеток, взятых из дорсальной маргинальной зоны на стадии 128 бластомеров, эти клетки давали эпидермальные структуры, тогда как клетки той же области, но взятые одним клеточным циклом позже,

дифференцировались как элементы осевой мезодермы. В 1970-ые годы Питер Ньюкуп показал, что если на стадии средней бластулы сделать разрез в экваториальной области и повернуть анимальную половинку зародыша на 180°, то хордомезодерма формируется из материала бывшей вентральной стороны, который после поворота занял дорсальное положение (рис. 17-11). Из этих экспериментов следовало, что материал хордомезодермы не преддетерминирован в яйце, а специфицируется в ходе дробления. Ньюкуп установил, что если изолировать анимальную, маргинальную и экваториальную области, то при культивировании изолированного анимального зачатка образуется эктодерма, из маргинальной области --- мезодерма, а из вегетативной части --- энтодерма. Если же в аналогичном опыте анимальный зачаток культивировать вместе с вегетативным, то кроме эктодермы и энтодермы формируется и мезодерма (рис. 17-12): дорсальные вегетативные бластомеры оказывают индуцирующее действие на клетки, лежащие в маргинальной области, побуждая их к развитию в мезодермальном направлении.

В опытах Гиммлиха и Герхарта (1980-ые годы) вегетативную область оплодотворенного яйца *Xenopus* облучали ультрафиолетовыми лучами. Хотя облученные яйца сохраняли способность к дроблению и гастрюляции, у зародышей не происходило образования мезодермы и нервной системы. Однако, пересадка облученным зародышам вегетативного дорсального бластомера, взятого на стадии 32 бластомеров у необлученного зародыша, восстанавливала нормальное развитие. После такой пересадки восстанавливалось формирование осевой мезодермы и нервной системы (рис. 17-13).

Из совокупности этих наблюдений следовало, что вегетативно-дорсальная область зародыша шпорцевой лягушки обладает способностью индуцировать мезодерму, и что процесс этой индукции происходит на стадии дробления. В конце 1980-х годов эта область зародыша была названа *центром Ньюкупа* (Gerhart et al., 1989).

Центр Ньюкупа образуется в результате упоминавшейся уже кортикальной ротации, которая происходит после оплодотворения. Как уже отмечалось в главе 16, белок Disheveled (Dsh) во время ротации из вегетативной области яйца перемещается на будущую дорсальную сторону и ингибирует здесь активность киназы GSK-3, стабилизируя таким образом  $\beta$ -катенин, концентрация которого благодаря этому возрастает. В результате в клетках дорсальной области образуется комплексный транскрипционный фактор  $\beta$ -catenin/Tcf3, который обеспечивает активацию экспрессии гена *siamois* (рис. 17-14).

Белок Siamois, в свою очередь, является транскрипционным фактором, наличие которого является необходимым условием экспрессии гена *gooseoid* (*gsc*), ключевого гена в образовании хордомезодермы. Согласно современным представлениям, в регуляции активности экспрессии *gsc* участвуют белки суперсемейства TGF- $\beta$  --- Vg1 и белки, родственные Nodal. Благодаря асимметричной локализации  $\beta$ -катенина гены группы *Xnr* (*Xenopus nodal related*) наиболее активно экспрессируются в бластомерах дорсальной области, создавая на стадии поздней бластулы предпосылки формирования хордомезодермы.

Согласно Герхарту (Gerhart, 2001), центр Ньюкупа имеет сложный состав (рис. 17-15). Имеется одна автономная область центра, которая образована клетками, содержащими материнские факторы VegT и  $\beta$ -катенин. Эти клетки секретируют большие количества белков Nodal и Xnr3, совместное действие которых вызывает образование хордомезодермы организатора (рис. 17-16). Кроме автономной имеется несколько областей, клетки которых сами по себе не способны к индукции организатора, так как, получая только материнский  $\beta$ -катенин (зона 2, рис. 17-15), или только материнскую иРНК<sup>VegT</sup> (зона 3, рис. 17-15), они секретируют, соответственно, либо белок Xnr3, либо белок Nodal. Порознь эти факторы не индуцируют хордомезодерму: фактор Xnr3, возможно, лишь сенсibiliзирует эктодерму к последующей нейтрализации, а Nodal сам по себе индуцирует латеральную мезодерму.

## 17.5. Молекулярные механизмы, определяющие свойства организатора. Нейрализация.

Разработка молекулярно-биологических методов клонирования генов открыла новые подходы к проблеме организатора. В 1991 году был клонирован первый специфический ген организатора. Им оказался ген *gooseoid* (Cho et al., 1991). Расшифровка нуклеотидной последовательности гена *gsc* обнаружила в его составе гомеобокс, наличие которого указывало на то, что *gsc* кодирует какой-то транскрипционный фактор. Инъекция иРНК *gsc* в вентральную область зародыша подобно трансплантации материала организатора вызывала развитие вторичного зародыша. Несколько позже были открыты еще несколько генов с аналогичным действием, в том числе *Xlim-1*, *HNF-3 $\beta$* , *Xnot*, *Xanf-1*, *Otx-2*, *Siamois*, *Xtwn*, *bozozok*. Выяснилось, что все эти гены являются регуляторными и кодируют транскрипционные факторы, под контролем которых находятся разнообразные гены, в том числе --- гены секретируемых белков. Именно секретируемые белки определяют способность хордомезодермы выступать в качестве организатора --- зачатка, при участии сигнальных молекул которого в окружающих тканях создаются предпосылки формирования комплекса дорсальных структур позвоночного животного.

Сравнительно-эмбриологический анализ показал, что специфический для организатора ген *gooseoid* экспрессируется не только у амфибий, но также на стадии гаструляции у рыб, птиц и млекопитающих. Установленная ранее гомология спинной губы бластопора амфибий и рыб с Гензеновским узелком птиц и млекопитающих нашла свое подтверждение и в особенностях экспрессии *gooseoid*: все эти области характеризуются активной экспрессией как маркера туловищной мезодермы --- гена *Brachyury*, так и гена *gooseoid*. У мыши первоначальная экспрессия *gsc* отмечена при закладке первичной полосы в задней области зародыша. Позднее клетки, экспрессирующие *gsc*, смещаются в переднюю область дефинитивной полосы, а затем обнаруживаются в передней области первичной полосы, головном отростке и прехордальной пластинке зародыша (Tam, Steiner, 1999). Сходная картина

наблюдается у куриного зародыша, у которого экспрессии *gsc* происходит сначала в клетках серпа Коллера, а позднее в области организатора в гензеновском узелке (Izpisua-Belmonte et al., 1993).

Регуляторные гены, активность которых обнаружена в области организатора, находятся в определенном соподчинении. Например, *gooseoid* включается позднее гена *bozozok* (у *Danio* этому гену соответствует ген --- *dharma*), так что при мутации *bozozok* экспрессия *gsc* подавляется.

Дифференциальный скрининг библиотеки кДНК организатора шпорцевой лягушки, как сказано выше, позволил выделить еще одну группу генов, активных в этой области зародыша. Оказалось, что более десятка генов, которые экспрессируются в области организатора (*chordin*, *noggin*, *follistatin*, *Frizzby*, *Cerberus*, *Dickkopf* и др.), контролируют синтез белков, предназначенных на экспорт. Эти секретируемые молекулы служат факторами дорсализации. Они поддерживают дифференциацию хордомезодермального зачатка и, вместе с тем, служат необходимым условием нейрализации прилегающей эктодермы. Выяснилось, что специфичность этого влияния определяется не только природой сигнальных молекул организатора, но не в малой степени --- свойствами реагирующей ткани. Например, сверхэкспрессия генов *chordin* или *noggin* в эктодермальных эксплантатах вызывает развитие нейральной ткани, а в эксплантатах вентральной мезодермы --- образование дорсальной мезодермы. Вырабатываемые организатором факторы дорсализации обеспечивают развитие структур и свойств, характерных для зачатков спинной области зародыша, в производных всех трех зародышевых листков (рис. 17-17) (см. De Robertis et al., 2001).

Замечательной особенностью этих секретируемых белков организатора оказалось то, что все они являются *ингибиторами* (см. De Robertis et al., 2001). Так, белки Chordin, Noggin, Follistatin обладают сильными ингибирующими свойствами в отношении факторов семейства BMP (**B**one **M**orphogenetic **F**actor). Белки Frizzby, Dickkopf ингибируют активность факторов Wnt. Cerberus оказывает ингибирующее действие на факторы различной природы, а именно,

он заметно снижает активность *Xwnt* (из семейства *Wnt*), *Xnrs* (родственен фактору *Nodal*), а также различных факторов семейства BMP.

В опытах *in vitro* на эктодермальных эксплантатах, взятых на стадии ранней гаструлы, было установлено, что в таких эксплантатах возникают структуры эпидермальной природы. Если же каким-то способом заблокировать активность морфогенетического фактора кости (BMP), который имеется в эксплантатах, то вместо эпидермальной происходит нейральная дифференциация. Блокировку BMP можно вызвать, например, с помощью доминантного негативного рецептора BMP, который, взаимодействует с соответствующим лигандом, связывает его, но не способен обеспечить проведение сигнала. Аналогичный эффект вызывает антисмысловая иРНК BMP4, наличие которой препятствует наработке соответствующего белка (Sasai et al., 1995). В области организатора инактивация BMP происходит *in vivo* в ходе нормального развития с помощью секретлируемых белков.

Анализ структуры молекулы хордина выявил в ее составе четыре участка, или модуля, каждый из которых насчитывает около десяти аминокислотных остатков. Эти модули отличаются высоким содержанием цистеина и обладают высоким сродством к BMP. Поэтому при контакте молекулы хордина с BMP происходит связывание последнего (рис. 17-18), что открывает путь нейральной дифференциации. Металлопротеаза шпорцевой лягушки *Xolloid*, гомологичная ферменту *Tolloid* Дрозофилы, расщепляет молекулу хордина, резко снижая его способность связывать BMP. Благодаря этому после попадания неактивного комплекса BMP/Chordin в зону действия металлопротеазы *Xolloid* возможно восстановление активности BMP, который обеспечивает эпидермальную дифференциацию.

Судя по всему, принципиальная схема взаимоотношений между тканями в области организатора, характерна для всех позвоночных. Исследования, выполненные на зародышах *Danio rerio*, выявили мутантов, у которых не развивались дорсальные структуры и, в частности, не происходила нейтрализация. Наиболее сильная вентрализация зародыша происходила при



мутации гена *chordino*, гомолога гена *chordin* Ксенопуса. Напротив, при мутации *swirl*, которая затрагивает белок BMP2, происходила дорсализация зародыша. Такой же эффект имела мутация *mini-fin*, нарушающая нормальную функцию гомолога *tolloid/xolloid*: отсутствие нормальной металлопротеазы вызывало полную разбалансировку механизма формирования дорсовентральной оси зародыша.

В области организатора секретлируемые факторы связывают не только BMP, но и другие вентрализирующие молекулы. Например, секретлируемый белок Frizzby соответствует внеклеточной части рецептора Wnt Frizzled. В отличие от Frizzled, интегрального белка плазматической мембраны, который обеспечивает сигналинг, Frizzby, также обладающий высоким сродством к молекулам Wnt, свою активность проявляет вне клетки. Секретция этого "белка-перехватчика" во внеклеточное пространство обеспечивает связывание молекул Wnt (рис. 17-19). Последние в комплексе с белком Frizzby утрачивают свойства лиганда и, следовательно, не могут функционировать в качестве вентрализирующего фактора.

Согласно современным данным, наблюдаемая в области организатора нейтрализация эктодермы осуществляется по принципу «ингибирования ингибитора»: подавляя активность молекул BMP и Wnt, организатор создает непреодолимые препятствия для дифференциации производных всех трех зародышевых листков в направлении формирования вентральных структур (рис. 17-20).

Таким образом, нейтрализация эктодермы происходит «по умолчанию», т.е. в случае отсутствия особого вентрализирующего сигнала. С этой точки зрения, детерминация нейральной судьбы эктодермы --- это реализация некоего "основного состояния" (ground state) системы. Для того чтобы развитие зачатка пошло в направлении формирования нейральных структур, необходимо лишь, чтобы организатор осуществил противодействие вентрализирующему индуктору. Таким образом, организатор, по своей сути, является "антииндуктором".

По-видимому, процесс нейрализации проходит несколько этапов. Заключительный этап, на котором происходит окончательный выбор между дорсальной и вентральной судьбой, охарактеризован достаточно полно. Однако, молекулярные механизмы, создающие предпосылки нейрализации и формирующие то, что экспериментаторы называют "основным состоянием", пока еще не раскрыты.

Перспективными представляются и сравнительно-эмбриологические исследования механизмов нейральной индукции вторичноротых. При изучении формирования радиально симметричного зачатка тела морского ежа во время метаморфоза билатеральной личинки выяснилось, что развитие нервной системы взрослого животного зависит от индуктивных воздействий со стороны мезодермального зачатка, а именно со стороны левого гидроцеля (Minsuk, Raff, 2002). Хирургическое удаление архентерона на стадии гастрюлы препятствует появлению целомических полостей, а отсутствие левого целомического мешка останавливает образование имагинального диска. Показано, что индуктивный сигнал со стороны мезодермы целомического мешка, необходимый для развития нервной системы, вызывает экспрессию гена *HeARS*, который кодирует фермент арилсульфатазу (Naag, Raff, 1998).

#### **17.6. Антагонистическая направленность действия белков BMP и Chordin как фактор спецификации клеток у асцидий.**

Антагонистические отношения между факторами, принадлежащими к семейству BMP, и хордином, лежащие в основе нейрализации у позвоночных животных, видимо, имеют более широкое распространение. Так, у асцидий был изолирован гомолог *Vmp-2/Vmp-4*. Первоначально предполагалось, что он играет такую же роль антагониста нейрализации, как *Vmp* амфибий (Miya et al., 1997). Однако, ни локализация экспрессии гена *Vmp-2/Vmp-4*, ни опыты по его сверхэкспрессии не дают оснований считать, что он участвует в индукции нервной системы. Оказалось, что антагонизм между белками BMP и Chordin, тем не менее, используется у асцидий при дифференциации другой системы, а именно при спецификации пигментированного глазка личинки. Развитие

пигментированных клеток нервной системы личинок асцидий подразделяется на три этапа. На первом этапе под индуктивным влиянием основного фактора роста фибробластов bFGF, который вырабатывается вегетативными клетками, происходит нейтрализация части эктодермальных бластомеров. На следующем этапе (стадия гаструлы) под влиянием BMPb, который вырабатывается в латеральных зонах нервного тяжа, некоторые клетки нервного зачатка специфицируются как пигментные. Наконец, на стадии хвостовой почки пигментные клетки, расположенные в передней области зачатка мозгового пузырька, под влиянием BMPb дифференцируются как элементы органа равновесия --- *отоциста*. Однако, более каудально расположенные пигментные клетки экспрессируют хордин, который подавляет активность BMPb. Вследствие этого здесь развивается не отоцист, а другой орган чувств --- пигментированный глазок (Darras, Nishida, 2001a).

Еще один пример антагонистических взаимоотношений между индуцирующим сигналом BMP и хордином демонстрирует процесс индукции хорды у асцидий. Хорда у личинок асцидий образована 40 клетками, которые представлены двумя популяциями --- первичной и вторичной. Первичная популяция, состоящая из 32 клеток, происходит из передних вегетативных бластомеров (линия А), вторичная --- из задних вегетативных (линия В). Первичная популяция специфицируется в период 5-го и 6-го циклов дробления за счет индуктивного воздействия со стороны презумптивных эктодермальных бластомеров. Этот процесс обусловлен несколькими сигналами. Сначала, на стадии 24 бластомеров, под действием фактора, родственного bFGF, происходит спецификация клеток первичной хорды. Позднее, на стадии 44 бластомеров, в передних эктодермальных клетках экспрессируется ген *HrBMPb* (гомолог *BMP2/4*). Образующийся в результате этой экспрессии белок семейства BMP, по-видимому, также необходим для индукции хорды. Вместе с тем во всех соседних бластомерах экспрессируется ген *Hrchordin* --- антагонист *BMP*. Клетки, синтезирующие и секретирующие гомолог хордина, не поддаются под действие BMP-4 и не превращаются в клетки хорды. В опытах по сверхэкспрессии *Hrchordin* также было показано, что усиленная выработка этого фактора подавляет образование хорды (Darras, Nishida, 2001b).

### 17.7. Факторы роста фибробластов как индукционные сигналы

Факторы роста фибробластов, образующие обширное семейство белков (семейство FGF, от --- *F*ibroblast *G*rowth *F*actor), играют важную роль в развитии животных. Широко известны гомологи FGF у Ecdysozoa, у которых эти сигнальные молекулы необходимы для миграции клеток. Например, у Дрозофилы ген *branchless* контролирует миграцию клеток трахей и ветвление трахей. У *Caenorhabditis* родственный *fgf* ген *egl-17* связан с миграцией миобластов в область гонады.

У позвоночных паракринные FGF-сигналы наряду с регуляцией скорости роста зародыша участвуют в спецификации мезодермального и нейрального зачатков, а также служат фактором формирования переднезадней оси тела. Если с помощью экспериментально вызванной экспрессии доминантных негативных рецепторов добиться подавления восприятия FGF-сигналов, то происходит недоразвитие задних структур зародыша. В экспериментах *in vitro* обнаружено, что наличие молекул FGF способствует нейтрализации эктодермы анимальных шапочек бластулы Ксенопуса. В опытах на куриных эмбрионах было показано, что для нейральной спецификации недостаточно лишь одного фактора Chordin. На ранних этапах нейтрализации у курицы ключевую роль играет FGF (Wilson et al., 2000; Streit et al., 2000).

Участие FGF сигналинга в формировании мезодермальных и нейральных производных, по-видимому, характерно для всех хордовых. Во всяком случае, есть данные, что у зародышей асцидий FGF-сигналинг также может быть фактором индукции мезодермы. Например, в опытах с рекомбинантным bFGF человека, было показано, что в изолированных бластомерах, потомки которых формируют хорду асцидий, bFGF индуцирует экспрессию гомолога гена *Brachyury* и обеспечивает последующую дифференциацию хорды. Действие bFGF на мезодермальные бластомеры, изолированные на стадии 32 клеток, индуцирует развитие мезенхимы. В отсутствии bFGF эти бластомеры "по умолчанию" (т. е. в данном случае под влиянием материнских цитоплазматических детерминантов) образуют мышечные клетки. FGF у асцидий может служить также и нейтрализующим фактором. Если на стадии 8

бластомеров изолировать передние анимальные клетки, то они при действии FGF они обнаруживают способность дифференцироваться как клетки нервной природы и экспрессируют специфические для нервной системы маркеры.

### **17.8. Межклеточная, или контактная индукция**

Повышение разрешающей способности методов анализа способствовало открытию строго локализованных индуктивных взаимодействий между отдельными клетками, которые обеспечивают своего рода "точечную" спецификацию.

#### **17.8.1. Межклеточная индукция с помощью паракринных факторов.**

**Спецификация фоторецепторов глаза Дрозофилы.** Ярким примером межклеточной индукции служит спецификация фоторецепторных клеток глаза насекомых. Сложный глаз *D. melanogaster* состоит примерно из 750 - 800 светочувствительных элементов, или омматидиев. Каждый омматидий состоит из 23 по-разному дифференцированных клеток, а том числе имеет восемь светочувствительных нейронов --- фоторецепторов. Начало развития омматидиев приходится на личиночную стадию, когда на заднем краю имагинального диска глаза появляется так называемая *морфогенетическая борозда*, поперечное углубление эпителиального пласта, которое в виде волны перемещается по диску в переднем направлении. Следует подчеркнуть, что движение борозды не связано с движением клеток, а определяется локальным изменением формы клеток. Появление борозды коррелирует с синхронизацией клеточного цикла и закладкой омматидиев. Продвижение борозды в заднепереднем направлении коррелирует с инициацией экспрессии генов, участвующих в спецификации фоторецепторов. Вполне вероятно, что имеется причинная связь между механическими изменениями сил натяжения пласта, ведущими к образованию морфологически различимой борозды, и включением генетической программы дифференциации омматидиев. Продвижение морфогенетической борозды связано с активностью генов *sine oculis (so)*, *eyes absent (eya)* и *dacshund (dac)*.

Порядок спецификации фоторецепторов омматидия (от греч. *ὄμμα* --- глаз) строго закономерен. Она всегда начинается с восьмого фоторецептора (R8), занимающего центральное местоположение (рис. 17-21). Под влиянием индуктивных воздействий со стороны R8 происходит попарная спецификация рецепторов R2/R5, R3/R4, и R1/R6. Последним в этот процесс вовлекается фоторецептор R7. Процесс спецификации R7 опосредован эпидермальным фактором роста. Механизмы выбора центрального фоторецептора из группы некоммутированных клеток, работающие с высокой точностью, в настоящее время неизвестны. Тем не менее, установлено, что, казалось бы, достаточно элементарный процесс дифференциации фоторецепторов глаза, определяется взаимодействием *четырёх групп генов*. Гены *atonal*, *daughterless*, *hairy*, *hedgehog* участвуют в спецификации будущих фоторецепторов R8. Гены *Notch*, *Delta*, *Epidermal growth factor receptor*, *scabrous* и др. обеспечивают закономерное размещение будущих фоторецепторов на плоскости эпителиального пласта. Гены *senseless*, *rough*, *spalt major* необходимы для дифференциации фоторецепторов. Индуктивные воздействия со стороны R8, инициирующие дифференциацию соседних клеток, обеспечиваются генами *spitz* и *boss*.

До образования морфогенетической борозды ген *atonal (ato)* экспрессируется вдоль заднего края имагинального диска глаза. После образования борозды экспрессия *ato* обнаруживается в виде сравнительно широкой полосы в области самой борозды и перед ее передним краем (рис. 17-22). Впереди от борозды экспрессируется также ген *hairy*. Позади борозды наблюдается активность гена *hedgehog*, а в самой борозде экспрессируется *decapentaplegic*. По мере прохождения борозды, процесс, который занимает около двух суток, рисунок активности *ato* видоизменяется. Вместо сплошной полосы экспрессии теперь наблюдаются регулярно расположенные обособленные группы клеток. Со временем экспрессия *ato* сохраняется лишь в отдельных клетках, которые и дают начало фоторецепторам R8. Предполагается, что обособление групп, а затем и отдельных клеток, экспрессирующих *ato* происходит в силу того, что белковый фактор Ato через промежуточные звенья (*scabrous*, *rhomboid*) индуцирует экспрессию генов *Notch* и *rough*, продукты которых подавляют активность *ato* в соседних клетках (рис. 17-23). Таким образом, рисунок

распределения клеток, дающих начало фоторецепторам R8 в плоскости эпителиального пласта имагинального диска, экспрессирующих ген *ato*, возникает на основе латерального ингибирования. Дальнейшая дифференциация R8 связана с активностью генов *senseless (sens)* и *rough (ro)* (рис. 17-24).

Формирующийся фоторецептор R8 служит первоначальным (но не единственным) источником белка Spitz (Spi), который секретируется во внешнюю среду, и в качестве лиганда взаимодействует с рецепторами EGFR окружающих клеток. В результате этого взаимодействия индуцируются остальные семь фоторецепторов. Клетки, дающие начало фоторецепторам R2/R5, по-видимому, являются источником сигнальных молекул, необходимых для спецификации парных фоторецепторов R3/R4 и R1/R6. Интересно, что центральная клетка R8 не только служит местом образования общего для всех фоторецепторов сигнала Spi, но и является уникальным источником лиганда тирозинкиназного рецептора Sevenless (Sev RTK) --- сигнального белка Boss (*Bride of sevenless*, т.е. "невеста sevenless"). Именно благодаря специфическому взаимодействию между Boss и Sev RTK активируется MAP-киназный сигналинг и, в конечном счете, осуществляется индукция непарного фоторецептора R7. При мутации генов *boss* и *sev* фоторецептор R7 не образуется, а вместо него --- по умолчанию --- возникает хрусталиковая клетка.

Генетическая система управления развитием глаза в развитии Дрозофилы была блистательно подтверждена в экспериментах по формированию эктопических глаз в имагинальных дисках крыльев, ног и антенн (Halder et al., 1995; Shen, Mardon, 1997). Эти результаты были получены путем скрещивания двух линий мух, одна которых имела дрожжевой активатор транскрипции GAL4, а другая -- - связанные с развитием глаза гены, находящиеся под контролем этой активаторной последовательности.

**Спецификация энтодермы у *Caenorhabditis elegans*.** Другим примером межклеточной индукции может служить спецификация энтодермы у почвенной нематоды *C. elegans*. Кишечник у *C. elegans* образован двадцатью клетками,

производными бластомера E, обособление которого происходит на восьмиклеточной стадии после деления клетки EMS. При своем делении EMS образует бластомер E, стволовую клетку кишечника, и бластомер MS, производные которого дают клетки глотки, мышцы стенки тела, соматическую ткань гонад, нейроны и некоторые другие типы клеток, но никогда не образует энтодермальных клеток. Если бластомер E изолировать, а затем культивировать *in vitro*, он сохраняет способность к делениям. Образующиеся в результате пролиферации клетки экспрессируют маркерные энтодермальные гены и дифференцируются как энтодермальные. Однако, если изолировать бластомер EMS вскоре после его возникновения, то судьба сестринских клеток, возникающих после деления EMS, не различается: они обе ведут себя одинаково как клетки MS и не образуют энтодермы.

Энтодермальная спецификация бластомера E зависит от сигнала, исходящего от клетки P2. Именно под влиянием этого сигнала бластомер EMS поляризуется и делится на клетки, имеющие столь различную судьбу. Оказалось, что специфицирующий сигнал реализуется в первые минуты клеточного цикла бластомера EMS (Goldstein, 1995). Исследование природы этого сигнала привело к открытию в геноме *C. elegans* нескольких генов *tom* (*more mesoderm*). Три из них кодируют белки, обеспечивающие Wnt сигналинг. Ген *tom-2* кодирует белок, гомологичный белку Wnt, а *tom-5* кодирует белок, родственный белку Frizzled, рецептору Wnt млекопитающих. Ген *tom-1*, по-видимому, кодирует пептид, необходимый для секреции Mom-2. Было показано, что *tom-1*, *tom-2*, и *tom-3* функционируют в индуцирующей клетке P2, участвуя в создании и секреции сигнальных молекул Wnt (Mom-2). В воспринимающей сигнал клетке EMS активен *tom-5*, создающий рецепторные молекулы, и *tom-4*, функция которого пока еще не определена.

Индукующий сигнал бластомера P2 активирует  $\beta$ -катениновый путь в делящемся бластомере EMS. Накапливающийся здесь гомолог  $\beta$ -катенина белок WRM-1 взаимодействует с материнским фактором транскрипции POP-1 (семейство Tcf/Lef1). Однако, в отличие от того, что происходит у позвоночных, WRM-1 ( $\beta$ -катенин) не активирует, а ингибирует POP-1 (Tcf/Lef1). Эта особенность, по-видимому, является критической для спецификации энтодермы. WRM-1, соединяясь POP-1, выключает функцию последнего,



которая состоит в предотвращении образования энтодермы. Таким образом, сигнал Wnt необходим для выключения функции POP-1, что обеспечивает спецификацию бластомера E, как предшественника клеток энтодермальной линии. Пока остается загадкой, каким образом взаимодействие P2 и EMS позволяет одной из дочерних клеток EMS формировать мезодерму, а другой --- энтодерму. Возможно, что асимметрия этого процесса обусловлена неравномерным распределением каких-то материнских факторов, которые влияют на характер восприятия одних и тех же сигналов в клетках E и MS.

Роль материнских факторов в ранней спецификации клеток дробящегося зародыша *Caenorhabditis* иллюстрируется следующим примером. Кроме уже названного продукта гена *pop1* имеется и другой материнский транскрипционный фактор --- белок Skn 1 (Bowerman et al., 1992,1993). Белок Skn 1 имеет аминокислотные последовательности, характерные для гомеодомена и bZIP. Этот белок концентрируется в бластомере P1, тогда как в бластомере AB и в его потомках он отсутствует. Фактор Skn 1 существует непродолжительное время и исчезает уже на стадии 12-и клеток. У зародышей, полученных от самок, мутантных по гену *Skn1*, спецификация производных P1 --- бластомеров E и MS --- нарушается.

### **17.8.2. Межклеточные взаимодействия с помощью юкстакринных факторов.**

Передача индуцирующих сигналов от клетки к клетке может происходить и без секреции паракринных факторов, но путем непосредственного взаимодействия сигнальных молекул и их рецепторов, встроенных в плазматические мембраны клеток. Такой тип взаимодействий позволяет контролировать выбор пути развития в зависимости от дифференцировочного статуса клеток, находящихся в непосредственном контакте. Этот тип межклеточных взаимодействий обеспечивается, например, широко распространенной у животных системой проведения сигналов Delta/Notch. Эта система сигналинга, впервые открытая и подробно исследованная у Дрозофилы, играет, как оказалось, важную роль и в эмбриогенезе млекопитающих.

Особенностью сигнальной системы Delta/Notch является то, что как молекулы-лиганды (Delta, Serrate), так и их рецептор (Notch) представляют собой интегральные белки плазматических мембран, и, в силу этих обстоятельств, могут осуществлять взаимодействие только между клетками, которые находятся в непосредственном контакте (рис. 17-25). Обычно эти клетки входят в состав одной клеточной популяции, т.е. имеют общую историю развития и одинаковые потенциалы.

Своеобразие Notch-сигналинга состоит в том, что при взаимодействии молекул лиганда и рецептора происходит активация протеазы реагирующей клетки, в результате которой отщепляется внутриклеточный домен рецептора --- Notch<sup>icd</sup>. Последний поступает в ядро, где взаимодействует с ДНК-связывающим белком, например, с белком Su(H) (Suppressor of Hairless) и становится элементом комплексного транскрипционного фактора (рис. 17-26).

Инициация транскрипции генов мишеней, обусловленная этим фактором, ведет к двум последствиям. Во-первых, в клетке, воспринявшей сигнал Delta, включаются генетические программы спецификации клетки. Во-вторых, комплексный транскрипционный фактор типа Notch<sup>icd</sup>/Su(H) осуществляет регуляцию активности генов, контролирующей выработку лигандов (Delta и т.п.).

В тех случаях, когда эта регуляция носит отрицательный характер, в популяции происходит *латеральное ингибирование*: клетка А, которая вырабатывает большие количества лигандов, взаимодействующих с рецептором Notch, побуждает своих соседей (Б, В, Г) уменьшить или даже прекратить выработку такого рода лигандов. Ослабление, а тем более прекращение синтеза молекул-лигандов в клетках Б, В, Г ведет к стабилизации синтеза лигандов в клетке А (рис. 17-27). Таким образом, благодаря возникшей петле обратной связи клетка А, с одной стороны, и окружающие ее клетки Б, В, Г, с другой, начинают специфицироваться в разных направлениях. При латеральном ингибировании любое различие между клетками данной популяции, затрагивающее

сигнальную систему Notch/Delta, каким бы малым и случайным оно ни было вначале, усиливается и поддерживается в течение всего периода спецификации.

Примером Notch-сигналинга, вызывающего латеральное ингибирование у млекопитающих, может служить дифференциация нейробластов в нервной трубке. В непосредственной близости от полости нервной трубки расположена пролиферативная зона, в которой происходит репродукция клеток. Клетки, находящиеся в этой зоне, экспрессируют *Notch-1*. Те клетки, которые выходят из пролиферативного цикла и, поступая в мантийную зону, начинают дифференцироваться, характеризуются появлением белка Delta-1. Благодаря этому начавшие дифференциацию нейробласты осуществляют латеральное ингибирование соседних клеток, потенциально способных встать на путь нейрогенеза. Активирующийся под действием Delta-1 рецептор Notch-1 ингибируемых клеток отделяет цитоплазматический домен, который входит в состав комплексного транскрипционного фактора. Под влиянием последнего начинается экспрессия гена *Hes5*. Белок Hes5 служит супрессором генов *Neurogenin* и *Mash 1* (рис. 17-28). Активность гена *Mash 1* необходима для дифференциации нейробластов. Активность гена *Neurogenin* важна для выработки белка-лиганда Dll-1. Поэтому активация экспрессии гена *Hes 5* не только блокирует нейрогенез, но и резко снижает выработку лигандов Delta-1. Клетки, плазматические мембраны которых лишены лигандов Delta-1, утрачивают способность подавлять спецификацию нейронов. Аналогичные результаты были получены также при исследовании рыб, амфибий и птиц.

Латеральное ингибирование служит важным инструментом, который позволяет наращивать массу нейронов постепенно. Об этом свидетельствуют эксперименты с доминантным негативным лигандом Delta-1<sup>dn</sup> на куриных зародышах. Было показано, что экспрессия дефектного белка Delta блокирует Notch-сигналинг и латеральное ингибирование. При этом в сетчатке куриного эмбриона происходила преждевременная дифференциация нейронов, после которой не оставалось клеток, способных продолжить пролиферацию. Наоборот, в опытах с ретровирусным вектором *Delta*, поддерживающим Notch-

сигналинг во всех клетках, нейроногенез прекращался, и все клетки сохраняли пролиферативный статус, оставаясь в недифференцированном состоянии.

Принцип латерального ингибирования лежит в основе широкого круга явлений. Например, при формировании чувствительных щетинок у Дрозофилы из клетки предшественницы образуются четыре клетки с разной судьбой, в том числе щетинковая клетка, воротничковая клетка, нейрон и глиальная клетка. При выключении функции *Notch* клетка-предшественница дает четыре нейрона. Функция Notch-сигналинга в этом процессе проявляется трижды, т. е. после каждого деления, ведущего к образованию всей группы. Первый раз --- после первого деления, когда расходятся пути линии щетинковой и воротничковой клеток и линии нейральной и глиальной клеток. Второй раз функция этого гена предопределяет расхождение судеб нейрона и глиальной клетки. Третий раз благодаря латеральному ингибированию осуществляется формирование щетинковой клетки и воротничковой клетки. На каждом этапе *Notch* активируется только в одной из двух клеток. Асимметричная экспрессия *Notch* в сестринских клетках обусловлена тем, что при митотическом делении происходит неравномерное распределение сосредоточенного в кортикальном слое белка Numb, который подавляет активность *Notch* даже при взаимодействии последнего с лигандом.

Notch-сигналинг широко используется при развитии глиальных элементов сетчатки рыб и других позвоночных (Vetter, Moore, 2001). Под действием факторов bHLH начинается дифференциация нейронов, в том числе и образование лиганда Delta. Активация рецептора Notch ведет к экспрессии *Hes* генов (родственных генам дрозофилы *hairy* и *Enhancer of split*), которые блокируют дифференциацию нейронов и способствуют активации генов, специфических для глии, в частности, гена GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (рис. 17-29).

Своеобразная модификация Notch-сигналинга имеется у нематод, у которых описана активация Notch-рецептора, по-видимому, свободным лигандом. У нематоды *Caenorhabditis* выявлен ген *glp-1*, структура которого гомологична

структуре *Notch* Дрозофилы. С помощью рецептора *glp-1*, встроенного в плазмалемму гоноцитов, последние воспринимают сигналы концевой клетки гонады, предотвращающие переход от митотических к мейотическим делениям. У рецессивных гомозиготных мутантов по гену *glp-1* пролиферативная фаза гоноцитов отсутствует, немногочисленные гонии вступают непосредственно в мейоз, в результате чего образуются практически стерильные животные (рис. 17- 30). Предполагается, что у *Caenorhabditis* тот же белок *glp-1* обеспечивает рецепцию сигнала, идущего от бластомера EMS к бластомеру AB, в результате чего потомки последнего приобретают способность к формированию глоточных мышц.

Следует заметить, что Notch-сигналинг может вызвать и противоположный процесс, а именно, *латеральную индукцию*. В этом случае клетка, продуцирующая лиганды, *стимулирует* своих соседей-реципиентов к аналогичной активности. Если в ходе *латерального ингибирования* в первоначально однородной популяции возникает мозаика клеток, дифференцирующихся в разных направлениях, то при *латеральной индукции* вся популяция специфицируется однообразно. Примером латеральной индукции может служить образование дорсовентральной границы крыла Дрозофилы, а также и иные случаи формирования границ между разными частями глаза или конечности Дрозофилы (см. Вгау, 1998).

## ЛИТЕРАТУРА

- Белоусов Л. В. Основы общей эмбриологии. Изд. Моск. ун-та. 1993. 303 с.
- Миташов В. И. Кусулакос С., Зиновьева Р. Д. и др. Конструктивный синергизм экспрессирующихся регуляторных генов в процессе развития и регенерации глаза и мышц.// Известия АН. Сер. Биол. 2001. №3:261-275.
- Михайлов А.Т. Эмбриональные индукторы. Наука. Москва. 1988. 216 с.
- Саксен Л., Тойвонен С. Первичная эмбриональная индукция. Изд. ИЛ. Москва. 1963. 343 с.
- Frankfort B. J., Mardon G. R8 development in the *Drosophila* eye: a paradigm for neural selection and differentiation. Development, 129: 1295-1306 (2002).

Gerhart J. Evolution of the Organizer and chordate body plan. Intern. Journal Dev. Biology. 2001. v.45:133-153.

Halder G., Callerts P., Gehring W. J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila* // Science. 1995. V. 267:1788-1792.

Martinez-Arias A., Stewart A. Molecular principles of animal development. Oxford University Press. New York. 410 p.

Shen W., Mardon G. Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed *dachshund* expression.// Development. 1997. V. 124:45-52.

## ГЛАВА 18. ПОЗИЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Наблюдаемая в разных областях зародыша дифференциальная активность генов в ходе развития устанавливается на основе автономной и зависимой детерминации. Поскольку в разных областях эмбриона включается экспрессия своих специфических наборов регуляторных генов, каждый из которых обеспечивает разные программы развития, напрашивается предположение, что дифференциация зародыша обусловлена некой системой распределенных в пространстве сигналов, своего рода позиционной информацией.

Позиционная информация создается разными способами. Существенная роль в ее формировании на ранних этапах эмбриогенеза принадлежит материнским факторам детерминации. Безусловна роль и межклеточных взаимодействий, в результате которых в разных областях зародыша продуцируются сигнальные молекулы, предопределяющие пространственную организацию эмбриогенеза. Особый интерес представляют морфогены, т. е. такие сигнальные молекулы, позиционная информация которых обусловлена градиентами их распределения в пространстве. Повышенный интерес к морфогенам, как возможным носителям позиционной информации, объясняется, по-видимому, относительной простотой моделирования морфогенетических процессов, основанного на допущении, что причиной многообразия направлений дифференциации могут быть чисто количественные изменения одного фактора.

*В ходе развития, в процессе формирования паттерна позиционная информация закономерно изменяется. Позиционная информация, с одной стороны, служит предпосылкой формирования паттерна, и таким образом предопределяет клеточную дифференциацию, рост и морфогенетические процессы. Вместе с тем в каждый данный момент позиционная информация, как система морфогенетически значимых сигналов, является выражением паттерна.*

### 18.1. Общие представления о позиционной информации

Существование позиционной информации ярко проявляется в развитии гинандроморфов (от греч. γυνή --- женщина, άνήρ, род. падеж άνδρ --- мужчина), двукрылых химер, клетки которых представлены двумя генетически различными популяциями --- женской и мужской. Такие химеры возникают по разным причинам. Например, известны дизиготические химеры Дрозофилы, которые образуются в результате диспермного оплодотворения (рис. 18-1). У этих животных часть клеток имеет женский (XX), часть --- мужской (XY) набор половых хромосом. Другой вариант гетерогенности наборов половых хромосом возникает в случае утраты одной X хромосомы при делении ядра зиготы, имеющей генотип XX, после оплодотворения. В результате этого нарушения одна из дочерних клеток получает полноценный (XX), а другая --- редуцированный (X0) набор половых хромосом. В соответствии с автономным характером детерминации пола у Дрозофилы (см. главу NB) клетки XX ведут себя как женские, а клетки XY и X0, как мужские. В зависимости от особенностей локализации потомков этих ядер образуются зародыши, а затем и imago со случайным распределением клеток мужской и женской природы (мозаичные гинандроморфы). В случае компактной сегрегации этих двух типов клеток возникают переднезадние или латеральные гинандроморфы, у которых одна часть тела имеет мужские признаки, а другая --- женские (рис. 18-1). Значение позиционной информации для процессов дифференциации отчетливо проявляется при анализе строения передней конечности Дрозофилы. Как известно, у самцов на передней лапке на первом тарзальном сегменте образуется так называемая половая гребенка (sex comb) (рис. 18-2). У женских особей эта структура не развивается. У мозаичных гинандроморфов на первом сегменте лапки часто вместо непрерывной половой гребенки образуется структура, в которой зубцы гребенки, образованные клетками с мужским генотипом, перемежаются со щетинками, производными клеток женской природы. Клетки с женским генотипом, попавшие в первый тарзальный сегмент, образованный в основном мужскими клетками, никогда не образует зубцов половой гребенки (рис. 18-2, Г). Наоборот, какое бы пространство ни занимала женская ткань, маленькая зона мужской ткани в соответствующем месте всегда образует структуру, характерную для половой гребенки (рис. 18-2, Д).



Явление гинандроморфизма свидетельствует не только о существовании позиционной информации. Анализ этого явления позволяет сделать вывод, что одна и та же позиционная информация по-разному интерпретируется клетками различной генетической природы.

Экспериментальная эмбриология дает свидетельства существования позиционной информации, которая возникает на основе индуктивных сигналов. В лаборатории Шпеманна в 1930-е годы Шотте производил реципрокные ксенопластические (*ксено* от греч. ξένος --- чужой) пересадки эктодермы туловища нейрулы хвостатых и бесхвостых амфибий на вентральную сторону головы. У Бесхвостых при нормальном развитии в головной области образуются присоски, а у Хвостатых --- нитевидные балансеры. В опытах Шотте было установлено, что трансплантированная туловищная эктодерма в области головы дает структуры, характерные для головной области тела. При этом оказалось, что возникающие головные структуры полностью соответствуют специфике генома трансплантата: из эктодермы Хвостатых развивались балансеры, а из эктодермы Бесхвостых --- присоски и ротовой аппарат с характерной для Бесхвостых роговой челюстью (рис. 18-3). Эти эксперименты показали, что новообразование структур происходит в развитии амфибий в соответствии с позиционной информацией, которая в данном случае определяется индуктивными сигналами. Вместе с тем, они также свидетельствовали, что интерпретация позиционной информации полностью зависит от генома реагирующей ткани.

В обосновании концепции позиционной информации заметную роль сыграли представления о градиентах морфогенов. Исследование регенерации у низших животных (Стрекающие, Плоские черви, Аннелиды) показало, что частота и скорость восстановления структур в разных областях тела этих животных различаются. Так, у планарии скорость регенерации головы заметно выше на переднем конце тела по сравнению со скоростью развития головы при регенерации более каудальной расположенной области (рис. 18-4). Восстановление головы на переднем разрезе объяснялось наличием переднезаднего градиента фактора регенерации головы, а хвостовых структур на заднем срезе --- наличием

заднепереднего градиента фактора регенерации хвоста. В пользу этой точки зрения приводили данные о том, что очень тонкий поперечный кусочек планарии, вырезанный в передней части тела, не способен регенерировать задний конец и образует две головы, расположенные спереди и сзади (рис. 18-5). Протяженность морфогенетических градиентов, как полагали, предопределяет размеры регенерационного поля, в рамках которого и возможно восстановление исследуемого органа.

Широко известны концепции градиентов активаторов и ингибиторов формообразования головы и подошвы гидры, также основанные на анализе частоты образования тех или иных структур при трансплантации кусочков, взятых на разных уровнях оси тела (Newman, 1974). На основании такого рода экспериментов возникло представление об апико-базальном градиенте активатора головы и апико-базальном градиенте ингибитора головы, а также о существовании обратных градиентов активатора и ингибитора подошвы. Градиентная концепция в целом непротиворечиво объясняла экспериментально данные. Так, регенерация гипостома после его удаления объяснялась высокой концентрацией активатора головы и отсутствием ингибитора головы после удаления гипостома. Появление зоны почкования у гидры в процессе ее развития объяснялось тем, что при обусловленном ростом животного увеличении расстояния между гипостомом и базальной частью гидры максимальные концентрации ингибиторов в туловищной зоне снижаются ниже порогового значения, открывая, таким образом, возможность почкования (рис. 18-6).

Современная биология развития дает многочисленные примеры реального существования градиентов морфогенов, веществ, определяющих морфогенетические процессы. Такого рода примером может служить градиент белка Bicoid зародыша Дрозофилы, который создает предпосылки для развития головных структур (см. гл. 21). Подробно исследовано формирование встречных градиентов белков семейства BMP и Chordin в гастрале амфибий, которые определяют вентральную и дорсальную природу формирующихся зачатков (гл.17). Градиенты белков Shh и BMP рассматриваются в качестве важных факторов

дифференциации нейронов нервной трубки позвоночных.

**Теория позиционной информации Л. Вольперта.** Представление о градиентах морфогенов положено в основу теории позиционной информации Л. Вольперта (L. Wolpert, 1969, 1978, 1989). Суть этой теории проста (рис. 18-7). Различия дифференциации вдоль какой-нибудь оси обусловлены, по Вольперту, существованием градиента морфогена. Первым шагом на пути образования градиента служит возникновение его границ, которое обусловлено появлением *источника морфогена* (рис. 18-7, И), т.е. области синтеза или активации морфогена, и "*слива*" (рис. 18-7, С) т.е. области, где морфоген разрушается или инактивируется. От «источника» к «сливу» морфоген распространяется путем диффузии. Градиент морфогена (М) создает позиционную информацию. Расположенные в области градиента клетки воспринимают концентрацию М как *позиционное значение*, т. е. как координату данной точки тела. По Вольперту, в основе детерминации судьбы клеток, как при нормальном развитии, так и при регенерации, лежит интерпретация клеткой ее позиционного значения. Существуют разнообразные модификации градиентной модели (Held, 1992). Так, иногда допускают, что все клетки действуют как слабый слив, так что на пути диффузии морфогена происходит постепенное падение его концентрации. Предложены модели, где все клетки выступают в качестве источников морфогена. В этих случаях предполагается существование специальных механизмов «накачки» морфогена в одном направлении. Нередко делается допущение существования двух противоположных градиентов, в этом случае позиционное значение клетки определяется соотношением двух морфогенов.

Позиционное значение в рамках градиентной модели --- чисто количественная характеристика, что существенно облегчает построение математических моделей дифференциации. По Вольперту, развитие признака определяется характерными для этого признака предельными характеристиками позиционного значения. Свою идею Вольперт представил в виде модели французского флага (рис. 18-7). На рисунке видно, что признак «синий цвет» определяется максимальными концентрациями морфогена, лежащими в пределах концентраций с и d. Признак

«белый цвет» развивается при наличии морфогена в концентрациях от  $b$  до  $c$ . Признак «красный цвет» возникает в той части градиента, где концентрация морфогена лежит в пределах между величинами  $a$  и  $b$ .

Для иллюстрации своей теории позиционной информации Вольперт использовал и флаг Соединенных Штатов Америки (рис. 18-8). Моделируя описанный выше эксперимент Шотте, он мысленно «трансплантировал» свободную нижнюю область недифференцированного, не имеющего еще определенного рисунка флага США, из которой впоследствии образуется часть с характерными продольными полосами, в прилегающую к древку верхнюю часть зачатка французского флага. В соответствии с теорией позиционной информации, можно ожидать, что трансплантат воспримет имеющуюся здесь позиционную информацию, и интерпретирует ее в соответствии со своей (американской) природой. Поэтому из трансплантата на французском флаге должна возникнуть область с характерными для американского флага звездочками.

Принципиальную возможность трансформации количественных параметров градиента концентрации морфогена в качественные характеристики развивающегося объекта иллюстрирует рис. 18-9. Если два гена различаются сродством к транскрипционному фактору, то ген с высоким сродством (ген А) будет транскрибироваться не только при высокой, но и при умеренной концентрации морфогена --- транскрипционного фактора. Ген В с относительно низким сродством к морфогену будет транскрибироваться только при его высокой концентрации. Тогда, в зоне высокой концентрации будет происходить транскрипция генов А и В, в зоне умеренной концентрации --- гена А, а в зоне низкой концентрации ни один из этих генов транскрибироваться не будет. Соответственно, возникший пространственный паттерн экспрессии создаст предпосылки для развития трех разных признаков.

Экспериментально зависимость экспрессии генов от концентрации морфогена была показана в лаборатории Гёрдена (Gurdon et al., 1994, 1995, 1998), где в условиях *in vitro* изучали экспрессию мезодермальных генов в недифференцированной

эктодермальной анимальной шапочке бластулы *Xenopus*. При низких концентрациях активина, при которых молекулы активина взаимодействовали менее чем с 20% активиновых рецепторов клетки, экспрессия генов, инициирующих развитие мезодермы, не происходила. При концентрации 1 пМ наблюдали экспрессию гена *Brachyury*. При концентрации 4 пМ, когда более 60% активиновых рецепторов клетки были связаны с лигандом, экспрессировался ген *goosecoid*.

Отдавая должное исследованиям, свидетельствующим о роли морфогенов для осуществления и координации процессов дифференциации в пространстве, следует, однако, понимать, что в реальной жизни морфогены никогда не выступают как самостоятельные независимые инструменты. То, что мы знаем в настоящее время о молекулярно-биологических механизмах дифференциации не оставляет сомнения в том, что даже самые элементарные процессы эмбриогенеза происходят под контролем сложной, разветвленной сети взаимодействующих, активирующих и ингибирующих, факторов, которые обеспечивают и динамизм, и консервативность морфогенеза. Морфогены являются важными, иногда, может быть, ведущими, но все же --- только элементами сложных генетических программ управления развитием.

Градиентная модель в свое время была воспринята с большим интересом, поскольку она позволяла непротиворечиво описывать, а иногда и предсказывать разнообразные процессы морфогенетических преобразований. Так, восстановление утраченного паттерна путем морфаллаксиса, с позиций этой модели, объясняется тем, что при становлении нового градиента клеточная память "очищается", и возникают новые позиционные значения. В соответствии с ними восстанавливается прежний паттерн, имеющий, правда, меньшие, чем прежде, линейные размеры. При эпиморфной регенерации восстановление градиента морфогена происходит после пролиферации клеток на границе среза.

Примером практического применения теории позиционной информации Л. Вольперта к анализу морфогенеза может служить исследование детерминации

переднезадней оси конечности птиц. Вольперт предположил, что второй, третий и четвертый пальцы передней конечности, которые образуются вдоль переднезадней оси почки конечности куриного эмбриона, формируются благодаря наличию вдоль этой оси градиента гипотетического морфогена (рис. 18-10). Для развития заднего (четвертого) пальца требуется высокая концентрация морфогена, для развития третьего --- умеренная, тогда как передний (второй) палец развивается при низкой концентрации. Было сделано предположение, что источник морфогена расположен в задней области почки конечности, а его «слив» происходит на переднем краю почки конечности. Теоретически трансплантация задней области с предполагаемым источником морфогена на передний край почки конечности должна вызвать образование зеркально-симметричного градиента морфогена с областями максимальной концентрации морфогена на переднем и заднем краях зачатка (рис. 18-11), что должно вызвать аномальное развитие конечности. Выполненные эксперименты показали, что в случае такой трансплантации действительно вместо нормального ряда пальцев (II, III, IV) формировался зеркально-симметричный паттерн --- IV, III, II, III, IV. Более того, в экспериментах, где область «истока» трансплантировали в дистальную часть конечности, что создает асимметричный градиент морфогена (рис. 18-12), формировался теоретически ожидаемый при сделанных предположениях паттерн. Было предположено, что в качестве морфогена в развивающейся конечности выступает ретиноевая кислота. Оказалось, что создание дополнительного градиента морфогена путем имплантации шарика, пропитанного ретиноевой кислотой, на передний край конечности также вызывало зеркальную дубликацию пальцев конечности. Несмотря на, казалось бы, блестящее подтверждение теории позиционной информации, более поздние исследования молекулярно-генетических механизмов спецификации конечности показали, что реальные события, контролируемые развитием конечности, значительно сложнее первоначально предложенной градиентной модели морфогенеза конечности (см. гл. 21).

Допускается, что позиционные значения могут определяться временем пребывания в каком-то состоянии. Например, временем, в течение которого клетки находятся в состоянии пролиферации. Клетки, выходящие из зоны пролиферации в

последовательные моменты времени, согласно этой модели, различаются своим позиционным значением, а, следовательно, и последующим направлением дифференциации.

### **Позиционная информация и моделирование морфогенетических процессов.**

Моделирование морфогенеза отражает потребность в разработке гипотез о причинно-следственных отношениях в развивающихся системах. Абстрагируясь от конкретного молекулярно-биологического содержания процессов, модели рассматривают принципиальную схему вероятных связей событий морфогенеза, открывая перспективы для последующих поисков реальных механизмов.

Рассмотрим в качестве примера модели регенерации конечности. С точки зрения модели, регенерация возможна, если происходит восстановление всех позиционных значений конечности. Условием начала восстановительных процессов служит конфронтация позиционных значений, возникающая при контакте клеток, разность позиционных значений которых больше единицы. Контакт клеток, которые в норме друг с другом не соприкасаются, согласно модели регенерации, служит причиной пролиферации, что и создает предпосылки для эпиморфной регенерации. Предполагается, что новообразованные клетки восстанавливают утраченный градиент позиционных значений путем так называемой интеркаляции (от лат. *intercalaris* --- вставочный) (рис. 18-13). В ходе интеркаляции клетки принимают усредненные позиционные значения, промежуточные между позиционными значениями конфронтующих клеток. Процесс интеркаляции заканчивается после того, как образуется полный ряд позиционных значений. Последующая интерпретация позиционных значений предопределяет детерминацию и дальнейшую дифференциацию регенерата.

При трансплантации на срез конечности таракана кусочков конечности, имеющих иные позиционные значения, происходит интеркалярная регенерация. При этом восстанавливается именно та область конечности, которая в неповрежденной конечности располагается между этими, приведенными теперь в контакт частями. Пусть проксимо-дистальная ось конечности, состоящей из последовательно

расположенных таза, вертлуга, бедра, голени и лапки, имеет позиционные значения от 10 (наиболее проксимальная часть) до 1 (наиболее дистальная часть). На уровень среза конечности с позиционным значением 8 трансплантируем дистальную область конечности, линия разреза которой прошла по клеткам с позиционным значением 4. В соответствии с условиями модели конфронтация тканей с позиционными значениями 4 и 8 вызовет пролиферацию клеток, и согласно усредняющей модели новообразованные клетки примут сначала промежуточное между 4 и 8 позиционное значение 6, а позднее восстановятся все утраченные значения 7, 6, 5. Градиент позиционных значений по направлению соответствует исходному градиенту. Другой результат будет получен, если на срез конечности в области позиционного значения 4 трансплантировать кусочек отрезанный на уровне позиционного значения 8. В этом случае аналогичные процессы восстановления позиционных значений приведут к формированию инвертированного градиента. Образовавшаяся после трансплантации новая структура в проксимо-дистальном направлении будет иметь позиционные значения 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 (уровень среза), 4, 5, 6, 7, 8 (граница новообразованного участка), 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1. В отличие от первого опыта полярность участка, возникшего в результате интеркалярной регенерации, не совпадает с исходной полярностью конечности. Таким образом, эта несложная модель обладает некой предсказательной силой. Можно предполагать, что она выражает, хотя и в абстрактной форме, какие-то существенные связи, имеющиеся в реальности.

Известна модель *полярных координат*, которая хорошо описывает процессы, происходящие как при регенерации имагинальных дисков насекомых, так и при регенерации конечности амфибий (French et al., 1976; Bryant, 1978). Если взятый у личинки Дрозофилы имагинальный диск разрезать на части и поместить эти фрагменты в брюшко взрослой мухи, то в этих условиях инициируется клеточная пролиферация, и фрагменты восстанавливают свои размеры. Такие восстановленные фрагменты можно заставить дифференцироваться, если их снова трансплантировать в личинку перед ее метаморфозом (рис. 18-14). Проведенные эксперименты показали, что если имагинальный диск разрезать на две неравные части, то крупный фрагмент после описанных манипуляций полностью



восстанавливает свои свойства, и образует орган, имеющий нормальное анатомическое строение. Маленький фрагмент, напротив, не обладает способностью к регенерации. Однако, недифференцированные клетки, образовавшиеся на этапе пролиферации, обнаружили удивительную способность к формированию зеркальной дубликации остатка органа.

Позиционные значения в модели полярных координат описываются двумя параметрами, определяющими угловые и радиальные координаты. При взаимодействии клеток, позиционные значения которых при нормальных обстоятельствах между собой не соседствуют, включаются пролиферативные процессы. В новообразованной ткани воссоздаются позиционные значения. Принимается, что этот процесс происходит по правилу кратчайшей интеркаляции. Допустим, если в большом фрагменте в контакт приходят клетки с угловыми значениями 3 и 6 (рис. 18-16), то во вновь образованном секторе в соответствии с правилом кратчайшей интеркаляции восстанавливаются промежуточные позиционные значения 4 и 5. Очевидно, что непрерывность позиционных значений между 3 и 6 могла восстановиться и другим способом, а именно, за счет образования позиционных значений 2, 1, 12, 11, 10, 9, 8 и 7. В соответствии с этим же правилом, и у маленького фрагмента контакт клеток с позиционными значениями 3 и 6 после пролиферации восстанавливаются те же значения 4 и 5, так что, в конечном счете, формируется структура с позиционными значениями 3-4-5-6-5-4-3, а она предопределяет развитие зеркальной дубликации вырезанного фрагмента.

Конечно, моделирование, по своей сути, является схематизацией и упрощением реальных процессов развития. Оно, тем не менее, плодотворно, поскольку позволяет исследовать роль интересующих исследователя факторов при определенных условиях. Будучи выражением какой-то гипотезы, модель облегчает планирование экспериментальной проверки сделанных предположений. Вместе с тем моделирование никогда не заменяет необходимости изучения конкретных процессов, лежащих в основе анализируемого явления.

## 18.2. Кластерные гомеобокс-содержащие гены.

Исключительно важным фактором формирования паттерна и создания пространственной информации являются кластерные гомеобокс-содержащие гены. История открытия этой системы восходит к концу XIX столетия, когда Бейтсон описал явление *гомеозиса* --- замещение в процессе развития одних органов другими. Оказалось, что наряду с *дисруптивными* (от лат. disruptus --- разорванный) мутациями, приводящими к нарушениям развития зачатка, вплоть до его полного исчезновения, имеется особый класс *гомеозисных* (от греч. όμοι --- подобный) мутаций, характерной особенностью которых является переключение одной программы развития на другую.

**Строение и функции гомеобокса и гомеодомена.** В 3'-экзонах гомеозисных генов (Нох-генов) выявлена высококонсервативная область, образованная 180 парами оснований. Этот короткий отрезок, или *гомеобокс*, имеется у всех гомеозисных генов (Gehring, 1997). Соответствующая последовательность аминокислот в кодируемых этими генами белках, богатая аргинином и лизином, получила наименование *гомеодомена*. Гомеодомен обеспечивает связывание белка с нуклеотидной последовательностью ТААТ молекулы ДНК. Таким образом, гомеобокс-содержащие гены (Нох-гены) являются регуляторными генами, которые контролируют образование особого класса гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов.

Функции гомеобокс-содержащих генов не обязательно связаны с гомеозисом. Так, у Дрозофилы известны гомеобокс-содержащие гены, которые специфицируют число и полярность сегментов животного (*fushi tarazu*, *eve*, *paired*, *goosberry*, *engrailed*), обеспечивают развитие передней (*bicoid*) или дорсальной (*zerknüllt*) области тела. Известны и тканеспецифические гомеобокс-содержащие гены. Примером такого рода может служить ген *H2.0*, экспрессия которого связана с дифференциацией висцеральной мускулатуры.

Среди гомеобокс-содержащих генов различаются два типа: один тип представлен дисперсными, или одиночными генами, тогда как другой --- кластерными формами. В последнем случае имеется ряд последовательно расположенных Нох-генов, возникших в результате дупликации исходного анцестрального гена.

**Кластерная организация.** Характерной особенностью пространственной организации гомеозисных генов Дрозофилы является *тандемный характер* их расположения. Оказалось, что эти гены находятся в третьей хромосоме, где они образуют два кластера. Кластер, расположенный в 3' области молекулы ДНК, по названию одного из генов, входящих в его состав, получил наименование Антеннапедиа-комплекса (ANT-C). Другой кластер, смещенный в сторону 5' конца, называют Биторакс-комплексом (BX-C). Подразделение на два комплекса произошло в ходе эволюции, и у более древних насекомых имеется единый кластер. В составе первого комплекса Дрозофилы располагаются гены (в направлении от 3' к 5' концу) *labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex comb reduced (Scr)* и *Antennapedia (Antp)*. Соответственно в BX-C расположены гены *Ultra-bithorax (Ubx)*, *abdominal A (abdA)* и *Abdominal B (Abd B)* (рис. 18-15). Наличие единого кластера Нох-генов характерно для всех билатеральных животных. Близкие по нуклеотидным последовательностям гены одного и того же животного, называют *паралогическими*. У позвоночных в результате дупликации анцестрального кластера гомеобокс-содержащих генов предковой формы образовалось 4 кластера Нох-генов (A, B, C, D), расположенных в разных хромосомах (рис. 18-16). НохА кластер мыши находится в 6-ой хромосоме, у человека --- в 7-ой. НохВ кластер обнаруживается у мыши в 11-ой хромосоме, а у человека в 17-ой. НохС кластер, соответственно, в 15-ой и 12-ой хромосомах, а НохD --- во 2-ой (мышь) и 13-ой (человек) хромосомах. Некоторые позиции в кластерах могут быть не заняты. Так, в кластере А свободны позиции 8 и 12; в кластере В отсутствуют гены В10 --- В13, в кластере С нет генов С1 --- С3 и С7; в кластере D нет генов D2 и D5 --- D7. Нох-гены, занимающие одну и ту же позицию в кластерах у животных разных видов, называют *ортологическими*. Ортологические гены отличаются большим сходством, и в некоторых случаях соответствующие транскрипционные факторы могут функционально заменять

друг друга, как, например, фактор НОХВ4 человека может замещать дефектный фактор *Dfd* дрозофилы.

Следует вместе с тем обратить внимание на то, что ортологические гены могут управлять развитием совершенно разных структур. У насекомых ген *Ubx* экспрессируется в третьем грудном сегменте формирующейся личинки. У Двукрылых активность этого гена подавляет программу развития крыла, в результате чего здесь формируются жужжальца. У Бабочек экспрессия *Ubx* не препятствует развитию крыльев. Можно допустить, что в ходе эволюции у Diptera гены, инициирующие развитие крыла, подпали под негативный контроль *Ubx*.

Различие функций ортологических Нох-генов особенно ярко выражено при сопоставлении беспозвоночных и позвоночных животных. Если у Дрозофилы ген *Dfd* контролирует развитие мандибулярного и максиллярного сегментов, то у млекопитающих экспрессия ортологичных гену *Dfd* генов *HoxA-4*, *HoxB-4*, *HoxC-4* и *HoxD-4* определяет спецификацию шейных позвонков. Из этих данных следует важный вывод о том, что *в процессе эволюции под действие в принципе одной и той же (гомологичной) генетической управляющей системы могут подпадать совершенно разные морфогенетические процессы.*

**Колинеарность экспрессии кластерных Нох-генов.** Экспрессия кластерных Нох-генов в эмбриогенезе характеризуется замечательной особенностью --- *колинеарностью* (от лат. со --- вместе, linea --- линия) Под колинеарностью понимается соответствие экспрессии Нох-генов вдоль переднезадней или иной оси зародыша порядку расположения этих генов в хромосоме. Нох-гены, расположенные ближе к 3'-концу кластера, экспрессируются в головном конце зародыша. Чем больше Нох-ген смещен к 5'-концу кластера в молекуле ДНК, тем в более каудальных отделах зародыша он экспрессируется, создавая определенный ряд позиционных сигналов вдоль оси формирующегося животного или его органа. Колинеарность является универсальным свойством системы Нох-генов, которое, за немногими исключениями, обнаруживается у всех билатеральных животных (рис. 18 - 17).

Гомеозисные гены ANT-C Дрозофилы участвуют в спецификации свойств сегментов головы дрозофилы, в том числе, интеркалярного, мандибулярного, максиллярного и лабиального сегментов, а также грудных сегментов. При утрате функции гена *Antp* (мутация типа “loss of function”) область тела, включающая заднюю часть первого грудного сегмента, второй грудной сегмент и переднюю часть третьего сегмента, приобретает свойства головных сегментов. Наоборот, при нарушении нормальной для головной области тела репрессии гена *Antp* (мутация типа “gain of function”) на голове происходит образование грудных структур. Экспрессия гена *Antp* в ненадлежащем месте вызывает искажение позиционной информации, и в области головы развиваются ходильные ноги. Гены BX-C экспрессируются каудальнее и контролируют спецификацию третьего грудного и брюшных сегментов. Так, *Ubx* контролирует развитие третьего грудного сегмента и первого брюшного сегмента; ген *abdA* контролирует развитие второго, третьего и четвертого брюшных сегментов; а гена *Abd B* --- задних брюшных сегментов. Мутации гомеозисных генов, связанные с утратой функции, вызывают изменение позиционной информации. Следствием такого рода мутаций является так называемая «передняя трансформация», в результате которой сегменты тела, контролируемые этими генами, экспрессируют признаки впереди лежащих сегментов. Например, при некоторых мутациях гена *Ubx* вместо жужжалец на третьем грудном сегменте развиваются крылья, которые в норме у мух образуются только на втором грудном сегменте (рис. 18-18).

Колинеарность часто проявляется и в расположении передней границы экспрессии Нох-генов вдоль оси зародыша или органа. Например, у млекопитающих передняя граница экспрессии гена *Hoxa-2* проходит на уровне линии раздела между первым и вторым ромбомерами головного мозга. Передняя граница экспрессии генов следующей, третьей группы (*Hoxa-3*, *Hoxb-3*, *Hoxd-3*) находится на уровне четвертого ромбомера. Передняя граница экспрессии генов *Hoxa-4*, *Hoxb-4* и *Hoxd-4*, занимающих следующую позицию в кластере, сдвинута еще больше назад, на уровень шестого ромбомера (рис. 18-19). В результате вдоль переднезадней оси тела возникает последовательный ряд позиционных значений, каждое из которых

определяется все возрастающим числом различных гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов.

Таким образом, кластерные Нох-гены создают векториально упорядоченные области экспрессии, что предопределяет нормальное течение морфогенеза вдоль переднезадней (А/Р) оси тела. Важно подчеркнуть, что кластерные Нох-гены не являются первичной пространственной регуляторной системой, подразделяющей тело на переднюю, среднюю или заднюю области. Гены Нох-кластера активируются после того как устанавливаются транскрипционные домены, которые обозначают главные будущие компоненты тела, такие как голова, центральная нервная система, сегменты, хвост и так далее. Как полагают, формирование паттерна переднезадней оси генами Нох-кластера представляет собой фундаментальное и глубоко консервативное свойство билатеральных животных (Davidson, 2001).

#### ЛИТЕРАТУРА:

- Вольперт Л. Морфогенез в процессе развития // Молекулы и клетки. Москва, Мир, 1982. Вып. 7. Стр. 115 - 133.
- Дьюкар Э. Клеточные взаимодействия в развитии животных. // Москва, Мир, 1978.
- Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. Москва. Наука. 1999. 252 с.
- Рэфф, Р., Кофмен, Т. Глава 9. Становление пространственной организации // В кн. Рэфф, Р., Кофмен, Т. Эмбрионы, гены и эволюция. // Москва. Мир. 1986. Стр. 275-300.
- Bryant P. J. 1978. Pattern formation, growth control and cell interactions in *Drosophila* imaginal discs. // In: Determinants of spatial organization. Acad. Press. New York: 95 - 316.
- Davidson E. H., 2001. Genomic regulatory systems. Development and Evolution // Acad. Press. New York: 261 p.
- French V., Bryant P., Bryant S., 1976. A theory of pattern regulation in epimorphic fields. // Science. 193:969 - 981.
- Gurdon J. B., Harger P., Mitchell A., Lemaire P. 1994. Activin signalling and responses to a morphogen gradient. // Nature. 371:487 - 493.

- Gurdon J B., Mitchell A., Mahony D. 1995. Direct and continuous assessment by cells of their position in a morphogen gradient.// *Nature*. 376:520 - 521
- Gurdon J. B., Dyson S., Johnston D. St. 1998. Cell's perception of position in a concentration gradient. *Cell*. 95:159 - 163.
- Held L. I., Jr. 1992. Models for embryonic periodicity. *Monographs in Developmental Biology*. Vol. 24.119 p.
- Wolpert L., 1971. Positional information and pattern formation. In: *Current topics in developmental biology*. Vol. 6, p. 183-224
- Wolpert L., 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation.// *J. Theor. Biol.* V. 25:1-47.
- Wolpert L., 1978. Pattern formation in biological development.// *Sci. Amer.* 10: 124-137.
- Wolpert L., 1989. Positional information revisited. *Development (Suppl.)*:3-12.

## ГЛАВА 19. КЛЕТОЧНАЯ АДГЕЗИЯ И ПРОЦЕССЫ МОРФОГЕНЕЗА

Еще в начале 20-го столетия Э. Вильсон наблюдал в опытах на разных видах губок, что после их диссоциации на отдельные клетки происходит reagregация клеток и восстановление губок. Если смешать клетки, полученные от губок разных видов, то наблюдается сортировка клеток, благодаря чему формирование новых особей имеет видоспецифический характер. Явление сортировки клеток подробно исследовал в 1940-х годах И. Гольтфретер на клеточных суспензиях тканей зародышей амфибий. Было показано, что в смешанных клеточных суспензиях *in vitro* реассоциация клеток происходит неслучайным образом. Например, если смешивали клетки мезодермы и эктодермы, мезодермальные клетки связывались между собой и оказывались окруженными эктодермой. Если смешивались эктодермальные, мезодермальные и энтодермальные клетки, возникала трехслойная структура с энтодермой, занимающей внутреннее положение, мезодермой в центре, и эктодермой на периферии. Для описания происходящих событий Гольтфретер ввел понятие *аффиности* (от лат. *affinis* --- родственный) или сродства тканей. В смешанной популяции *in vitro* формировались однородные тканевые структуры, в том числе покровные, нервные и энтодермальные образования (рис. 19-1). Из этих исследований вытекало, что фундаментальным свойством дифференцированных эмбриональных клеток является их избирательное сродство к подобным клеткам, так что строение ткани, возможно, в известной мере определяется дифференциальной *аффиностью* клеток разных типов.

Важно подчеркнуть, что происходит не просто объединение однородных элементов, но и закономерное их распределение в пространстве (Townes, Holtfreter, 1955).

В этих и подобных экспериментах клетки обнаруживали *адгезию* (от лат. *adhaesio* --- прилипание), или способность избирательно слипаться друг с другом. Как было установлено позднее, адгезивные свойства клеток определяются расположенными на их поверхности особыми *молекулами клеточной адгезии* (МКА). В ходе эмбрионального развития адгезивные свойства клеток закономерно изменяются за



счет синтеза и включения в состав плазматической мембраны различных белков, а также за счет их модификации, например, путем гликозилирования.

В 1960-х годах М. Стейнберг предложил термодинамическую модель дифференциальной адгезии. Если сила адгезии клеток ---  $I$ , и имеются клетки типа  $a$  и типа  $b$ , то в смешанной культуре этих клеток будет иметь место *гомотипическая* и *гетеротипическая* адгезия. Силы гомотипической адгезии между однородными элементами обозначим  $I_{aa}$  и  $I_{bb}$ , а силу гетеротипической адгезии между клетками  $a$  и  $b$  ---  $I_{ab}$ . Поведение клеток в культуре определяется соотношением между средней силой гомотипической адгезии  $W=(I_{aa}+I_{bb}):2$  и силой гетеротипической адгезии  $I_{ab}$ . Если  $W$  меньше или равно  $I_{ab}$ , то клетки в культуре будут распределены случайным образом. Если же  $W>I_{ab}$ , то произойдет сортировка, и два типа клеток образуют единую систему с четким пространственным разделением разнородных элементов. В случае  $W\gg I_{ab}$ , сортировка принимает вид сегрегации, в ходе которой два типа клеток пространственно обособляются (рис. 19-2). С точки зрения термодинамической модели, сортировка клеток разной природы в смешанной культуре способствует минимизации сил поверхностного натяжения. На поверхности конгломерата остаются клетки с наименьшей силой адгезии. Описанные процессы сортировки будут происходить и в тех случаях, когда клетки смешанной популяции имеют разное *количество* молекул адгезии: клетки с более высокой концентрацией МКА займут центральное положение в системе.

**Молекулы клеточной адгезии.** В настоящее время описаны три семейства молекул клеточной адгезии: суперсемейство кадгерины, иммуноглобулины и селектины (рис. 19-3). Широкое распространение имеют  $Ca^{2+}$ -зависимые *кадгерины* (от --- *Calcium-dependent adherin*), которые первоначально были обнаружены в печени, и ранее обозначались как L-CAM (от --- *liver cell adhesion molecules*). У позвоночных почти все клетки экспрессируют один или несколько кадгеринов. Кадгерины --- это крупные трансмембранные гликопротеины, внеклеточные домены которых содержат около ста аминокислотных остатков, в том числе последовательность His-Ala-Val, которая и участвует в соединении

молекул. Связь между молекулами кадгерина, встроенными в плазматическую мембрану клетки, возможна только при наличии в среде ионов кальция. Эти ионы фиксируются особыми кальций-связывающими сайтами. Соединение между молекулами кадгеринов имеет обычно *гомофильный* характер, при котором между собой взаимодействуют идентичные молекулы соседних клеток. Внутриклеточный домен кадгерина соединен с помощью катенинов с цитоскелетной системой клетки (рис 19-4).

Различают несколько типов кадгеринов: E-кадгерин эпителиальных клеток, P-кадгерин клеток плаценты, N-кадгерин клеток нервной природы. E-кадгерин, или *увоморулин*, играет критическую роль в формировании бластоцисты и дифференциации трофэктодермы зародыша мыши. Он инициирует компактизацию на 8-й клеточной стадии, и обеспечивает на этой стадии поляризацию бластомеров, а позднее --- кавитацию бластоцеля и пространственную сегрегацию внутренней клеточной массы. N-кадгерины играют роль в таких процессах, как удлинение нейритов, их объединение в пучки, прокладка путей прохождения аксонов, распознавание мишеней аксонов, спецификация зрительных путей. С помощью N-кадгеринов можно маркировать функциональные связи между различными отделами мозга. Вместе с тем N-кадгерины в ходе эмбрионального развития впервые экспрессируются в клетках перспективной мезодермы на стадии гастрюлы.

Важную роль играют разнообразные *иммуноглобулиновые* молекулы клеточной адгезии (рис. 19-5), входящие в состав суперсемейства иммуноглобулинов. Открытые впервые в клетках нейральной сетчатки, эти белки первоначально были названы N-CAM (*neural cell adhesion molecules*). В составе молекул N-CAM имеется от 4 до 6 иммуноглобулин-подобных и до 6 фибронектиновых доменов (рис. 19-6). Молекулы N-CAM заякорены в плазматической мембране и, обычно, взаимодействуют с гомологичными молекулами соседних клеток (*гомофильное* взаимодействие), не нуждаясь в ионах  $Ca^{2+}$ .

*Селектины* --- белки, связывающие углеводы. Это кальций-зависимые молекулы

адгезии, которые обеспечивают взаимодействие между клетками крови и эндотелием.

**Внеклеточный матрикс.** В процессах клеточной дифференциации и морфогенеза очевидную, хотя еще и мало исследованную, роль играет внеклеточный матрикс --- сложный комплекс, представленный, главным образом, адгезивными внеклеточными белками. Белки матрикса образуют сложную сеть, чему способствует наличие особого трипептида RGD (arg-gly-asp). Внеклеточный матрикс --- чрезвычайно динамичная структура, постоянно меняющаяся по мере дифференциации зародыша. Эти изменения обусловлены не только спецификой экспрессии генов клеток, которые продуцируют матрикс, но и активностью во внеклеточном пространстве различного рода ферментов, в том числе металлопротеаз, которые изменяют свойства матрикса, оказывая существенное влияние на сигналинг. В составе внеклеточного матрикса (рис. 19-7) различают *фибронектины, коллагены, ламинины, протеогликаны и эластины.*

*Протеогликаны* --- сильно обводненные белки, придающие гелеобразный характер соединительной ткани. Это не просто структурный компонент ткани. Протеогликаны, связывая факторы роста или другие белки, оказывают влияние на эффективность сигналинга. *Фибронектины* --- крупные гликопротеины, структура которых предопределяет их взаимодействие с другими компонентами матрикса и, с помощью интегринов, с клетками. Благодаря альтернативному сплайсингу ген фибронектина дает несколько разных форм белка, специфичных для разных типов клеток и тканей. *Коллагены* --- представлены нитчатыми структурами нерастворимого белка, которые образуют плотную сеть. Структура и состав коллагенов заметно варьируют в разных тканях. Особенно богаты коллагеном дерма, хрящи и кости.

*Ламинины* --- очень рано появляются в эмбриогенезе. Это --- неперенный компонент базальной пластинки эпителиев.

Важно подчеркнуть, что внеклеточный матрикс служит не только субстратом, который обеспечивает специфическое связывание и миграцию клеток. Это, вместе

с тем, источник сигналов, которые передаются клеткам с помощью молекул субстратной адгезии. Возможно, что некоторые молекулы субстратной адгезии участвуют в передаче информации, контролирующей экспрессию генов и морфогенетические процессы. Показано, что компоненты внеклеточного матрикса могут видоизменять действие паракринных сигналов. Например, действие FGF усиливается, если этот фактор связывается не только соответствующими рецепторами клетки, но и взаимодействует с гликозаминогликанным (GAG) компонентом гепаринсульфата. Наоборот, активность фактора TGF- $\beta$  подавляется при его взаимодействии с протеогликанами внеклеточного матрикса.

**Молекулы субстратной адгезии: гликозилтрансферазы.** Важную роль в адгезии играют *гликозилтрансферазы*. Это --- ферменты, встроенные в плазматическую мембрану так, что их каталитическая область обращена во внешнюю среду (эктоэнзим). Обычная функция гликозилтрансфераз состоит в переносе активированного сахара на субстрат. Связываясь с потенциальным акцептором сахара, гликозилтрансфераза прочно удерживает его до тех пор, пока в среде не появится соответствующая молекула активированного сахара. Связь между клеткой и субстратом в данном случае имеет *гетерофильный* характер, т. е. обеспечивается взаимодействием молекул разной природы. Гликозилтрансферазы, как правило, обеспечивают связывание клеток с внеклеточным матриксом и, таким образом, являются *субстратными молекулами адгезии* (рис. 19-8). В тех случаях, когда с помощью гликозилтрансфераз взаимодействуют клетки, на поверхности одной из них имеется хорошо выраженный *надмембранный комплекс*, в составе которого представлены акцепторы сахара, как это происходит при закоривании спермия на поверхности ооцита млекопитающих. Появление сахара в тканевой среде ослабляет или даже прекращает этот вид адгезии. Если акцептором сахара служит, например, N-ацетилгалактозамин внеклеточного матрикса, то при определенных условиях возможна миграция клетки по субстрату, в ходе которой происходит попеременное соединение клетки с субстратом и --- после переноса активированной УДФ-галактозы на субстрат --- ее отъединение и поиск свободного акцептора в результате чего и происходит перемещение клетки.

**Молекулы субстратной адгезии: интегрины.** К молекулам субстратной адгезии относятся и представители семейства *интегринов*, клеточных рецепторов, взаимодействующих с молекулами внеклеточного матрикса. Интегрины являются трансмембранными гликопротеинами, которые обычно связывают клетку и внеклеточный матрикс, хотя могут связывать между собой и клетки. Это связывание нуждается в кальции. Известно более 20 различных интегринов. Интегрины в активном состоянии это крупные трансмембранные белки --- гетеродимеры, состоящие из нековалентно связанных  $\alpha$  и  $\beta$  цепей (рис. 19-9). Разнообразные типы этих цепей по-разному комбинируются между собой, давая множество форм интегринов. Клетки, обычно, имеют больше количество интегринов: концентрация этих молекул-рецепторов на поверхности клеток на один-два порядка выше, чем концентрация рецепторов факторов роста.

Внутриклеточные области интегринов с помощью целого ряда линкеров связаны с актиновым цитоскелетом. Таким образом, интегрины создают непосредственную связь компонентов внеклеточного матрикса с цитоскелетом клетки.

Интегрины, как механохимические регуляторы, в результате взаимодействия с лигандами матрикса индуцируют экспрессию определенных генов, изменяют организацию цитоскелета клетки, контролируют движение клеток и клеточную пролиферацию (рис.19-10). Различная реакция клеток на один и тот же внешний сигнал может определяться тонкой структурой рецептора (рис. 19-11).

**Молекулы клеточной и субстратной адгезии как факторы морфогенеза.** Одним из фундаментальных процессов, лежащих в основе морфогенеза, является переход эпителиальных пластов в мезенхиму и, наоборот, конденсация клеток мезенхимы с образованием эпителиальных или массивных зачатков. Эти эпителиально-мезенхимные переходы, очевидно, связаны с экспрессией молекул клеточной адгезии. Например, перед образованием массивного зачатка хрящевого скелета в почке конечности куриного эмбриона в клетках мезенхимы отмечена экспрессия N-кадгерина. Блокирование активности этих молекул соответствующими антителами,

инъекцированными в почку конечности, препятствует развитию элементов скелета в конечности. Если N-кадгерин важен для инициации образования хрящевых узелков, то для их сохранения необходим иммуноглобулиновый N-CAM. Другой пример --- конденсация мезенхимы при образовании сомитов. Подробно исследована экспрессия кадгеринов при формировании нервной трубки. Обособление нервной пластинки и последующее обособление нервной трубки от покровной эктодермы, где экспрессируется E-кадгерин, связано с инициацией синтеза N-кадгерина. Если экспериментально вызвать экспрессию N-кадгерина в эктодермальном эпителии, то обособление нервной трубки нарушается (рис. 19-12).

Интегрины служат фактором дифференциации тканей и участвуют во многих морфогенетических процессах, например, в образовании нервных складок. Некоторые цитоплазматические сигналы вызывают *модуляцию аффинности* интегринов к лигандам. Благодаря интегринам осуществляется непосредственная связь цитоскелета клетки с компонентами матрикса, при этом определенным образом ориентированная клетка способна упорядочить расположение молекул фибронектина в матриксе. В свою очередь, это упорядоченное расположение молекул в матрикса создает предпосылки ориентированного расположения клеток в области формирования ткани или зачатка.

Взаимодействие интегринов с белками основного вещества обеспечивает направленное движение нервных отростков. Конус роста аксонов активно выбирает путь, который формируется заранее за счет создания предпочтительных "троп" из молекул субстратной адгезии. Прохождение аксона от тела нервной клетки к месту своего назначения по тканям зародыша --- сложный процесс, в котором участвуют многие компоненты. Большое значение в миграции аксонов играет, в частности, ламинин. Рост аксонов ганглиев сетчатки в область зрительного покрова, однако, невозможен без участия иммуноглобулиновых N-CAM, которые не только обеспечивают миграцию отростков, но и способствуют объединению сотен тысяч аксонов в оптический нерв.

Важные биологические функции в эмбриогенезе выполняют фибронектины, взаимодействие с которыми осуществляется, главным образом, интегринами клетки. Главным рецептором фибронектина у раннего зародыша Ксенопуса служит RDG-специфический интегрин  $\alpha 5\beta 1$ . В яйце Ксенопуса имеется большое количество материнских иРНК обеих субъединиц ( $\alpha 5$  и  $\beta 1$ ). В период дробления и гаструляции зрелый  $\alpha 5\beta 1$  интегрин синтезируется непрерывно и включается в новообразующиеся мембраны всех клеток. Фибронектин в раннем развитии амфибий впервые появляются на стадии бластулы, когда сеть его фибрилл образуется на внутренней поверхности многоклеточного слоя клеток --- крыши бластоцеля. При гаструляции этот матрикс обеспечивает миграцию мезодермы. Фибронектины обеспечивают миграцию мезодермальных клеток по поверхности энтодермы и при формировании зачатка сердца у куриного зародыша в конце первых суток инкубации.

Как уже говорилось, функция молекул клеточной адгезии не ограничивается только задачами механического соединения клеток. Молекулы клеточной адгезии входят в состав сложной сигнальной системы, которая, воспринимая сигналы внешней среды, участвует в регуляции транскрипции, и тем самым --- в регуляции клеточного размножения, дифференциации и формообразования. В экспериментах с мутантными формами интегринов и кадгеринов, у которых отсутствовали внутриклеточные домены, выяснилось, что изменяются не только адгезивные свойства клеток, но и их дифференциация. Внутриклеточные области молекул клеточной адгезии, как показали эти эксперименты, исполняют роль соответствующих областей клеточных рецепторов.

Поскольку внутренний домен кадгерина соединен с актиновым цитоскелетом клетки с помощью  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -катенинов, а  $\beta$ -катенин используется как транскрипционный кофактор при Wnt сигналинге, высказывается предположение, что Wnt сигналинг, с его механизмом регуляции стабильности  $\beta$ -катенина, может влиять на функции кадгеринов, и наоборот. Имеются данные о том, что концентрация E-кадгеринов влияет на дифференциацию ооцита у Дрозофилы (рис.

19-13). Оказалось, что ооцитом становится тот цисточит, который характеризуется максимальным содержанием Е-кадгерина. В тех случаях, когда в эксперименте Е-кадгерина отсутствовали в половых или фолликулярных клетках, детерминация ооцита происходила случайным образом. Если экспрессия Е-кадгерина происходила лишь у части фолликулярных клеток, то ооцит всегда возникал в области контакта цисточита с клеткой фолликулярного эпителия с максимальной концентрацией Е-кадгерина.

Данных о непосредственной роли иммуноглобулиноподобных молекул адгезии в управлении процессами дифференциации мало. Тем не менее, косвенным свидетельством их участия в этом процессе может служить их активная экспрессия в период морфогенеза.

**Миграция клеток нервного гребня.** Клетки нервного гребня возникают при замыкании нервной трубки в ее дорсальной медиальной области, где происходит трансформация эпителиального пласта в мезенхиму. После своего обособления клетки нервного гребня мигрируют в разные области тела по определенным направлениям (рис.19-14). В туловищной области миграция происходит в двух основных направлениях --- вентральном и дорсальном. Вентральное направление подразделено на два пути: прилегающий к нервной трубке *вентромедиальный*, и прилегающий к дермомиотому --- *вентролатеральный*. Дорсальное направление проходит между сомитом и покровным эпителием. Перемещение клеток нервного гребня обусловлено, прежде всего, их активным движением. Выяснилось, что направление этой миграции задается свойствами адгезивного субстрата, по которому происходит движение, или *ганготаксис* клеток (от греч. NB  $\alpha\tau\omega$  --- прикреплять, хватать). Внеклеточный матрикс может быть снабжен пермиссивными, разрешающими движение молекулами субстратной адгезии, или же молекулами, которые не позволяют клеткам мигрировать. Предполагается, что молекулы субстратной адгезии в разных комбинациях формируют пути миграции клеток нервного гребня.



Миграция клеток нервного гребня не происходит по тканям задней области сомита. Клеточные потоки из области нервного гребня в вентральном направлении проходят в туловище позвоночного только через ростральные области сомитов. Пересадка задних областей на пути миграции клеток гребня блокирует движение клеток, определенным образом указывая на то, что запрет на миграцию клеток действительно связан со свойствами тканей этой зоны сомита. Среди *пермиссивных* молекул субстрата, разрешающих миграцию, описаны фибронектин, ламинин, и некоторые изоформы коллагена. Миграцию клеток нервного гребня, можно подавить, если куриному зародышу инъецировать пептиды, которые блокируют рецепторы клеток, предназначенные для взаимодействия с фибронектином. Прекрасным субстратом для миграции клеток нервного гребня *in vitro* служат разнообразные ламинины. Эти гликопротеины состоят из трех варьирующих цепей ---  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Например, в составе ламинина-1 имеются  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  и  $\gamma 1$  цепи, а ламинин-4 состоит из  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  и  $\gamma 1$  изоформ.

В составе плазматической мембраны клеток нервного гребня имеются интегрины -- рецепторы, которые взаимодействуют с белками внеклеточного матрикса, обеспечивая миграцию клеток по субстрату. Показано, что у куриного эмбриона перед миграцией клетки нервного гребня туловища экспрессируют интегрин  $\alpha 4\beta 1$ . Если экспрессию интегрин подавить, то выселяющиеся из нервной трубки клетки не способны к миграции, и погибают. Миграцию клеток нервного гребня обеспечивают и другие белки.

Запретительными сигналами для миграции клеток нервного гребня служат протеогликаны внеклеточного матрикса *агрекан* и *версикан*. Так, *агрекан* имеется в зачатке хорды и, как полагают, именно он препятствует миграции клеток нервного гребня и росту аксонов в этой области. Другой хондроитинсульфатный протеогликан, *версикан*, экспрессируется в каудальной области склеротома.

В настоящее время известны несколько мутантных форм мыши с аномалиями миграции клеток нервного гребня, которые также свидетельствуют об участии внеклеточного субстрата в миграции клеток нервного гребня. Оказалось, что у

зародышей, имеющих мутацию гена *splotch*, существенно возрастает синтез версикана. Этот протеогликан появляется в области обычных путей миграции клеток нервного гребня, и, задерживая ее, нарушает нормальное формирование производных нервного гребня. Сходные данные имеются в отношении мутации *patch*. Нарушения миграции клеток нервного гребня происходят также у мутантов мыши *white spotting (W)* и *steel (Sl)*, характеризующихся нарушением пигментации. Обе мутации затрагивают проведение сигнала, связанного с тирозинкиназным рецептором *c-kit* и его лигандом SCF (*stem cell factor*). В отличие от мыши мутация *white* аксолотля вызывает уменьшение накопления пермиссивных белков внеклеточного матрикса в области путей миграции клеток нервного гребня. Пигментные клетки мутантов *white* мигрируют в дорсальной области лишь на короткие расстояния. Интересно, что миграция в вентральном направлении при этой мутации протекает нормальным образом.

Резюмируя сказанное, следует подчеркнуть, что управление миграцией клеток нервного гребня контролируется сложной системой взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом. Для обеспечения успешной миграции клеток нервного гребня требуется высокая координация экспрессия различных генов, чтобы в нужном месте и в нужное время у зародыша появились бы сигнальные молекулы клеточной и субстратной адгезии в необходимом ассортименте и в оптимальном соотношении.

## ЛИТЕРАТУРА

Cunningham B. A. Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Current Opinion in Cell Biology*, V. 7: 628-633 (1995).

Henderson D. J., Copp A.J. Role of the extracellular matrix in neural crest migration. *J. Anat.*, V. 191:507-515 (1997).

Steinberg M. S. Adhesion in development: an historical overview. *Developmental Biology*. V . 180, N2: 377-388 (1996).

## ГЛАВА 20. АПОПТОЗ КАК ФАКТОР МОРФОГЕНЕЗА.

Одним из удивительных явлений, открытых клеточной биологией в конце 20-го столетия, может служить программируемая клеточная гибель, или *апоптоз* (от греч. *άποπτος* --- невидимый, скрытый от взоров) (Керт, Wyllie, Currie, 1972). У животных имеются механизмы, активность которых включается при необходимости в определенный момент времени локально уничтожить избыточные клетки. У зародышей апоптозу подвергаются избыточные половые клетки, избыточные нейробласты, лимфобласты, устраняются избыточные клетки нервного гребня в области 1-ой и 3-ей жаберных дуг, препятствуя тем самым образованию здесь мест прикрепления мышц. При развитии конечности позвоночных с помощью апоптоза уничтожаются излишние клетки межпальцевых областей (рис. 20-1). При этом главными действующими факторами выступают белки сем. ВМР, которые активируют апоптоз, и фибробластические факторы роста, действующие в противоположном направлении (рис. 20-2). Благодаря апоптозу разрушаются зачатки молочных желез у самцов млекопитающих и каналцы мезонефроса позвоночных в период его замещения метанефросом.

Особые масштабы принимает программируемая смерть клеток в случае метаморфоза, связанного с дегенерацией массивных областей тела личинки. Так с помощью апоптоза достигается регрессия хвоста личинки бесхвостых амфибий. При метаморфозе путем апоптоза уничтожаются и покровы хвоста, и его мускулатура. Предрасположенность тканей хвоста к уничтожению в период метаморфоза была продемонстрирована еще работами экспериментальных эмбриологов первой половины 20-го столетия. В опытах по трансплантации тканей хвоста в туловище и глаза в хвост было показано, что деструктивные изменения тканей хвоста происходят независимо от положения в организме. Наоборот, трансплантированный глаз сохранял свою целостность в охваченном дегенеративными изменениями хвосте. Таким образом, программируемая смерть клеток хвоста в период метаморфоза *Anura*, инициируемая гормоном тироксином, имеет специфический для данного органа характер. Очевидное значение имеет апоптоз и при метаморфозе насекомых. У дрозофилы 20-дигидроэксизон, контролирующей метаморфоз, активирует два гена апоптоза --

- *reaper* и *hid* (**head involution defective**), от которых зависит включение механизмов апоптоза в разных органах личинки.

У нематоды *Caenorhabditis elegans* в процессе развития образуется 1090 клеток, из которых 131 подвергаются апоптозу. Механизмы программируемой смерти клеток сохраняются и у взрослых животных. Здесь они используются для уничтожения клеток, завершивших свою функцию, например, для уничтожения активированных Т-клеток после устранения инфекционного агента, а также для устранения клеток с генетическими нарушениями. Очевидно, что в последнем случае --- апоптоз служит для устранения потенциальной опасности возникновения злокачественных опухолей. Молекулярно-генетическая программа разрушения клеток служит столь же важным инструментом развития, как и программы, контролирующие пролиферацию или миграцию клеток.

Ген "клеточной смерти" был впервые открыт у *C. elegans* 1986 г., когда было обнаружено, что при мутации гена *ced-3* развитие нематоды происходит без апоптоза излишних нейробластов (Horvitz et al., 1986). Вскоре после этого гомологичные гены были открыты и у млекопитающих. Семейство этих генов кодирует протеолитические ферменты --- *каспазы*. Принципиальная схема активации апоптоза отличается высокой степенью универсальности, и повторяется у филогенетически отдаленных групп животных (рис. 20-3). Каспазы активируются на ранних стадиях апоптоза (фаза коммитирования) и инициируют практически все изменения, происходящие в обреченной на смерть клетке. Если активность каспаз элиминировать, что может произойти при мутации или при применении ингибиторов, клетка останется живой.

Каспазы имеют цистеиновый активный сайт. Они разрезают белки-мишени в точках, следующих за аспарагином. Мишенями каспаз служат разнообразные белки. В настоящее время известно более 100 белков-мишеней, в том числе киназа фокальной адгезии, разрушение которой ведет к нарушению адгезии и обособлению апоптирующих клеток. Разрушаются ламины, образующие внутреннюю выстилку ядерной оболочки, разрушаются белки цитоскелета --- актин, промежуточные филаменты, гельсолин и др. Интересно, что

протеолитическая активность каспаз иногда ведет к активации функции белка-мишени. Например, каспаза, вырезая ингибирующий домен, активирует эндонуклеазу CAD (*caspase activated DNase*), которая дробит ДНК на фрагменты.

Синтезируемые каспазы представлены инертными зимогенами, которые при необходимости активируются. Зимоген состоит из трех областей: N-терминальной области (продомен) и отрезков p20 и p10. Один из видов активации зимогена осуществляется путем "каспазного каскада", когда зимоген разрезается на составные части с помощью активной каспазы, а далее из доменов p20 и p10 формируется молекула зрелой активной каспазы. Зрелая каспаза представляет из себя гетеротетрамер, в составе которого находятся два гетеродимера p20/p10 (рис. 20-4А). Описан и другой, более сложный тип активации каспазы, который обеспечивается взаимодействием внешнего лиганда с тремя специальными рецепторами мембраны, которые сближаются и образуют тример. В составе тримера конформация рецепторов изменяется и инициирует цепную реакцию взаимодействий внутриклеточных белков, которая завершается образованием тримерной структуры из зимогенов, связанных с мембраной. Этим обеспечивается кросс-активация зимогенов, отщепление их терминальной области, и появление тетрамерного активного фермента (рис. 20-4Б).

В конце 1990-х было установлено, что важную роль в апоптозе играют митохондрии, которые служат не только источником энергии, но и хранилищем многих белков, которые участвуют в апоптозе. Выяснилось, в частности, что кроме участия в окислительном фосфорилировании цитохриомоксидаза-с необходима также для активации каспазы-9 в цитозоле.

## ЛИТЕРАТУРА

Hengartner M. O.. The biochemistry of apoptosis// Nature. 2000. V. 407:770-776.

Horvitz R. et al., 1986.

Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics// Br. J.Cancer. 1972. V. 26:239-257.

## ГЛАВА 21. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОГРАММЫ РАЗВИТИЯ.

В этой главе рассматриваются некоторые морфогенетические процессы, в основе которых лежат сложные, разветвленные генетические системы, управляющие развитием. В ходе эмбрионального развития происходит необратимый процесс самоусложнения, или *самоорганизации*, т. е. процесс образования на основе относительно простых более сложных, и действительно новых, структур, которые на более ранних стадиях не были каким-либо образом преформированы (Белоусов, 1993). Предпосылки процессов самоорганизации возникают благодаря наличию позитивных и негативных сигналов, существованию факторов, которые стимулируют или подавляют транскрипцию, благодаря *взаимодействию* факторов, активность которых может видоизменяться во времени в силу их различных модификаций

В ходе развития происходит не просто последовательное включение все новых и новых генов по принципу "передачи эстафетной палочки". Возникающие сигнальные молекулы обеспечивают взаимодействие между клетками. Одни из них активируют, другие --- ингибируют процессы транскрипции в клетках, благодаря чему у зародыша или в его зачатках возникает строго закономерный рисунок, или паттерн, экспрессии генов. *Взаимодействуя друг с другом, системы генов клеток создают в трехмерном пространстве зародыша динамически меняющуюся позиционную информацию, в соответствии с которой в процессе развития специфическим образом модифицируется интенсивность пролиферации клеток, происходит их спецификация и дифференциация, осуществляются разнообразные морфогенезы.*

Расшифровка систем взаимодействующих генов --- крайне сложная задача. До сих пор на немногих моделях удавалось исследовать начальные этапы взаимодействия, происходящие на уровне регуляторных генов, а в ряде случаев и терминальную дифференциацию, обеспечиваемую «батареями генов». Тем не менее, полученные данные позволяют говорить о существовании неких принципов организации генетического управления развитием.

Одна из обнаруженных особенностей экспрессии генов, управляющих развитием, состоит в том, что более или менее единое вначале пространство

зародыша или зачатка со временем подразделяется на все более мелкие подпространства, каждое из которых дает начало определенной части органа или зародыша. Относительно гомогенный характер первоначального распределения сигнальных молекул в области эмбрионального поля сменяется гетерогенным паттерном экспрессии генов. В результате непрерывного взаимодействия генов неоднородность этого паттерна в ходе эмбриогенеза нарастает. Таким образом, в основе известного морфологического принципа развития "от общего к частному" лежит последовательное усложнение сети генных взаимодействий.

Другая особенность функциональной активности генов развития состоит в *синергизме* их действия (от греч. συνείρω --- связывать вместе). В процессе развития происходит переход от внешних сигналов настройки к авторегуляции, или *самонастройке*, в ходе которой уточняются и, в конечном счете, устанавливаются границы между зонами, где экспрессируются различные наборы генов.

### **21.1. Сегментация тела Дрозофилы.**

Относительно хорошо изученным примером системы генов, активность которых управляет сложным морфогенетическим процессом, может служить иерархия регуляторных генов, осуществляющих начальные этапы сегментации тела Дрозофилы.

Активность этих генов обнаруживается уже на ранних стадиях эмбриогенеза, в период формирования бластодермы, т. е. задолго до начала сегментации. У Дрозофилы появление ядер в поверхностной бластеме зародыша приходится на 9-ый клеточный цикл. На 10-ом цикле образуется синцитиальная бластодерма, а ее целлюляризация осуществляется на 13-ом. Морфогенетические движения, связанные с образованием зародышевых листков и сегментацией зародышевой полоски, начинаются только после 14-го цикла.

Система действия *генов сегментации* Дрозофилы находится под контролем материнских цитоплазматических факторов, которые вырабатываются в период



оогенеза. Среди зиготических генов сегментации можно выделить три основные, последовательно активирующиеся группы: *гены пробелф* (gap genes), *гены парности* (pair-rule genes) и *гены полярности сегментов* (segment polarity genes). Активность этих групп генов предопределяет число одновременно формирующихся сегментов, их границы и полярность. Гены сегментации, в свою очередь, вырабатывают сигнальные молекулы, управляющие активностью гомеозисных генов, которые осуществляют спецификацию обособленных сегментов (рис. 21-1).

**Гены пробелф.** Свое наименование гены пробелф получили благодаря тому, что мутации этих генов блокируют формирование целых групп сегментов. Поэтому мутантные по этим генам личинки характеризуются определенными пробелами в образовании сегментов. Гены пробелф экспрессируются на стадии формирования бластодермы и предопределяют образование расположенных вдоль продольной оси групп клеток, *парасегментов* (греч. пара --- возле, подле), каждый из которых объединяет заднюю область одного из будущих сегментов и переднюю область сегмента, лежащего непосредственно за ним (рис. 21-2).

Известны несколько генов пробелов: *hunchback*, *Krüppel*, *giant*, *knirps*, *tailless*, *huckebein*. Ключевым геном этой группы является ген *hunchback* (*hb*), активность которого определяется градиентом материнского фактора Bicoid.

В области высокой концентрации белка *hunchback* включается экспрессия другого гена пробела *giant*. Каудальнее, где концентрация *hunchback* несколько ниже, инициируется экспрессия гена пробела *Krüppel*. С другой стороны, транскрипционный фактор *hunchback* служит негативным сигналом в отношении гена пробела *knirps*, который экспрессируется в задней трети зародыша под влиянием "заднего" гена материнского действия *caudal*. Экспрессия гена *knirps* демонстрирует сложный характер регуляторных отношений, поскольку фактор Bicoid служит для этого гена позитивным сигналом, который в самой передней области преодолевает негативный сигнал *hunchback*, так что *knirps* экспрессируется в двух областях: самой передней, где

высока концентрация Bicoid, и в задней области, где он стимулируется материнским фактором Caudal.

Граница экспрессии генов пробелов со временем уточняется. Первоначально границы областей экспрессии *hunchback* и *Kru*[u-umlaut]*ppel* перекрываются, но вскоре они становятся четкими, так как в отличие от белка hb, стимулирующего экспрессию *Kr*, белок K $\kappa$  является негативным регулятором гена *hb* (рис. 21-3). При мутации *Kr*<sup>-/-</sup> зона экспрессии *hb* распространяется по сравнению с диким типом в каудальном направлении. Этот же фактор ограничивает и области экспрессии *giant*: обе полосы экспрессии последнего лежат за пределами области активности *Kr*. Окончательный паттерн экспрессии генов пробела, обусловленный позитивными и негативными взаимодействиями, представлен на рис. 21-4.

**Гены парности.** Гены этой группы активируются на стадии синцитиальной бластодермы. Свое название гены парности получили потому, что они экспрессируются в виде семи поперечных колец (полос), причем каждая полоса экспрессии приходится на два соседствующих парасегмента. Таким образом, экспрессия генов парности имеет периодический рисунок, и возникающий полосатый паттерн их экспрессии служит первым указанием на формирование метамерного строения тела. Возникновение периодического паттерна экспрессии генов парности на основе непериодической экспрессии генов, занимающих более высокое положение в иерархии (up-stream genes англоязычных авторов) --- яркий пример самоорганизации.

По времени начала экспрессии различают две подгруппы генов парности: *первичные* и *вторичные*. К первичным генам парности относятся гены *hairy* (*h*), *even-skipped* (*eve*) и *runt* (*run*). Ко вторичным генам парности принадлежат *fushi-tarazu* (*ftz*), *odd-skipped* (*odd*), *odd-paired* (*opa*), *sloppy-paired* (*slp*), *paired* (*prd*). Полосы экспрессии этих генов могут быть индивидуальными, представленными продуктами одного гена, и перекрывающимися, когда в одних и тех же клетках данного парасегмента экспрессируется более одного гена парности. Важно подчеркнуть, что последовательность полос экспрессии стереотипна на всем протяжении зародыша.

Активация генов парности обусловлена наличием транскрипционных факторов, выработанных генами, которые в иерархии занимают более высокое положение, т.е. генами пробела и генами материнского действия. Оказалось, что экспрессия одного и того же гена парности в разных областях тела может контролироваться разными генами пробела. Так при мутации гена пробела *Kr* не формируется пятая полоса экспрессии гена *hairy*. При мутации гена *Kni* не образуется шестая полоса экспрессии *hairy*. Мутация гена *tll* подавляет образование самой задней, седьмой полосы экспрессии *hairy*. Таким образом, для экспрессии одного и того же гена *hairy* в разных областях зародыша нужны разные транскрипционные факторы: для образования 5-ой полосы необходим белок *Kr*, для 6-ой *Kni*, для 7-ой --- *tll*. Данные о том, что экспрессия одного и того же гена в разных областях зародыша может контролироваться разными наборами транскрипционных факторов, свидетельствуют о наличии в регуляторной зоне гена *hairy* модулей, которые, воспринимая эти разные сигналы, инициируют экспрессию гена.

Как уже отмечалось в главе 15, в энхансере гена парности *even-skipped* обнаружены модули, ответственные за экспрессию разных полос. Структура одного из энхансеров, представленных на рис. 15-11, предопределяет, например, экспрессию гена *even-skipped* между пиками концентрации белков *Giant* и *Kru[u-umlaut]ppel*, создавая предпосылки образования второй полосы экспрессии. Таким образом, гетерогенная мозаика белковых транскрипционных факторов, которая возникает благодаря активности генов пробела на стадии клеточной бластодермы, создает в теле зародыша позиционную информацию, которая воспринимается разными модулями регуляторной области гена и обеспечивает активацию одного и того же гена в различных зонах зародыша.

**Гены полярности сегментов.** Гены полярности находятся под контролем генов парности. Их активация происходит на стадии клеточной бластодермы и ведет к поляризации сегментов и формированию их границ. Экспрессия генов полярности обеспечивает переход от парасегментов к сегментам, в ходе которого единое морфогенетическое поле зародыша подразделяется на ряд новых морфогенетических полей со своими границами и своей позиционной

информацией. Среди генов полярности достаточно подробно исследованы гены *engrailed* (*en*) и *wingless* (*wg*), продукты которых, являются важными элементами сигналинга (см. главу 15).

Если гены пробелов экспрессируются каждый в обширных областях зародыша, имеющих в ширину примерно 10 клеточных диаметров, что соответствует 2-3 зачаткам сегментов, а ширина полос экспрессии отдельных генов парности существенно сужается, то полосы экспрессии каждого гена полярности представлены лишь одним рядом клеток. Таких полос экспрессии четырнадцать. В результате тело зародыша подразделяется на четырнадцать парасегментов. Каждый последний ряд парасегмента экспрессирует *wg*, а каждый первый ряд парасегмента --- *en*. С момента экспрессии генов полярности можно говорить о возникновении зачатков сегментов, так как полоски клеток, продуцирующие белки Wg и En, определяют заднюю границу каждого сегмента (рис.21-5).

Каким образом транскрипционные факторы, продуцируемые генами парности, и, следовательно, повторяющиеся по продольной оси зародыша с интервалом в два сегмента, обеспечивают экспрессию одних и тех же генов *wg* и *en* в каждом зачатке сегмента? Эта задача может быть решена только потому, что экспрессия генов полярности также инициируется различными сочетаниями транскрипционных факторов, которые воспринимаются различными модулями регуляторной области генов. Так, например, *en* экспрессируется в тех клетках, где имеются высокие концентрации белка Even-skipped (*Eve*) в сочетании с белком Paired (*Pa*) или белка Fushi tarazu (*Ftz*) в сочетании с белком Odd-paired. В тех клетках, где имеются высокие концентрации белков Odd-skipped, Runt или Sloppy-paired, экспрессия *en* подавляется. Наоборот, экспрессия *wg* невозможна в тех областях, где клетки содержат высокие концентрации *Eve* или *Ftz*. Для активации этого гена необходимо отсутствие *Eve* и *Ftz* и наличие белков Sloppy-paired или Paired (рис. 21-6).

Для поддержания экспрессии генов полярности сегментов, инициированной активностью генов парности, имеется особый механизм взаимной стимуляции клеток, синтезирующих белки Wg и En. Транскрипционный фактор En

обеспечивает не только автокатализ, но активирует и транскрипцию гена *hedgehog*, и, тем самым, секрецию белка Hedgehog в окружающую среду. Эти лиганды воспринимаются соседними клетками, продуцирующими Wg, которые имеют рецептор Patched. Таким образом включается механизм, поддерживающий синтез белка Wingless. Этот последний также секретируется, и, с помощью Wnt-сигналинга, поддерживает активность гена *en*. В результате образуется замкнутая петля, стабилизирующая в течение длительного времени экспрессию En и Wg в клетках, формирующих заднюю границу сегмента (рис. 21-7).

## 21.2. Морфогенез конечности у позвоночных

Предпосылкой эволюции конечности наземных позвоночных послужило появление парных плавников рыб. Предполагается, что предки современных рыб имели непарную спинную плавниковую складку, которая огибала заднюю часть тела и, переходя на брюшную сторону, подразделялась на две вентролатеральные складки. По А. Н. Северцову, парные плавники рыб в индивидуальном развитии закладываются в виде боковых горизонтально расположенных складок с широким основанием (эврибазальные плавники) (Северцов, 1949). В складку проникает материал вентральных краев миотомов сомитов, находящихся в этой области тела, что может быть истолковано в пользу теории метамерного происхождения конечности. Об этом же говорит метамерия скелета и иннервации конечности.

Передние и задние пятипалые конечности тетрапод являются гомологичными образованиями и развиваются принципиально сходным образом. В ходе эволюционного процесса такая конечность, как полагают, возникла путем упрощения более расчлененной конечности предков за счет сокращения числа составляющих конечность лучей. Предполагается, что земноводные возникли от каких-то примитивных форм кистеперых рыб, которые обладали легкими, и скелет конечности которых имел элементы, обнаруживаемые в пятипалой конечности ископаемого палеозойского земноводного стегоцефала (Банников и др., 1985). Гомология конечности tetrapoda с плавником рыб подтверждается и на молекулярно-биологическом уровне. Местоположение формирования передних (грудных) и задних (брюшных) плавников в онтогенезе рыб, также как

и конечностей наземных позвоночных, определяется экспрессией *hox* генов, а их спецификация обычно связана с функцией генов семейства *tbx*. Хотя принципиальное сходство развития конечности у четырехногих позвоночных очевидно, тем не менее, у хвостатых амфибий отмечается своеобразие спецификации передних и задних конечностей, равно как и особенности формирования пальцев.

Конечности тетрапод подразделяются на три основных отдела. Прилегающий к телу проксимальный отдел или стилоподий (от греч. *στήλη* --- столб, колонна; *ποδῆών* --- нога) имеет один элемент скелета --- плечевую или бедренную кость. Средний отдел --- зигоподий (от греч. *ζεύγος* --- пара, чета) состоит из двух костей --- локтевой и лучевой в передней конечности, большой и малой берцовой --- в задней. Дистальный отдел, или аутоподий (в передней конечности кисть, в задней --- стопа), подразделяется на базиподий (соответственно, запястье или предплюсна), метаподий (пять или плюсна) и акроподий (пальцы) (рис. 21-8).

Кроме проксимодистальной оси в конечности различают дорсовентральную и переднезаднюю оси. Вентральную сторону передней конечности иногда называют ладонной, или пальмарной (от лат. *palma* --- ладонь), а задней --- подошвенной, или плантарной (от лат. *planta* --- ступня, подошва) стороной. На переднем краю конечности располагается первый палец, на заднем --- пятый.

**Морфогенетическое поле конечности.** В развитии позвоночных животных органогенезу предшествует образование разного рода морфогенетических полей, особых областей, которые появляются до морфологического обособления зачатка органа. На стадии нейрулы амфибий выявлены поля детерминации глаза, слухового пузырька, носовой ямки, хрусталика, сердца, жабр, а также поля конечностей (рис. 21-9). Морфогенетическое поле представляет собой совокупность клеток, детерминированную как целостный зачаток органа.

Зоны, детерминированные как поля конечностей, образуются задолго до появления морфологических признаков конечностей. У аксолотля первыми

появляются симметрично расположенные на латеральных поверхностях тела поля передней конечности: это округлые зоны, занимающие пространство от переднего края третьего сегмента до середины шестого. Поле задней конечности образуется несколько позднее в промежутке между шестнадцатым и серединой восемнадцатого сегмента.

В пределах поля все его участки способны к образованию конечности. Как было установлено экспериментально, поле конечности занимает площадь, превосходящую площадь реального зачатка конечности. Наибольшей потенцией к образованию конечности обладает передний и дорсальный участки. Однако в момент своего появления поле детерминировано как целое, и обладает способностью к регуляции: после удаления половины поля из оставшейся половины развивается нормальная конечность. Аналогичный результат наблюдается и при трансплантации половины поля на другое место туловища. С самого момента своего возникновения поле анизотропно: оно поляризовано вдоль переднезадней, а позднее и по дорсовентральной оси. Если на стадии 16-и сомитов поле передней конечности куриного эмбриона перевернуть на 180°, то развивающаяся конечность будет иметь инвертированную полярность (рис. 21-10). Поляризация поля показана и в отношении других органов (рис. 21-11). В опытах по реципрокной трансплантации поля быстро- и медленно растущих видов аксолотлей оказалось, что детерминирована и скорость роста конечности.

Местоположение полей, а затем и зачатков конечностей, определяется экспрессией *hox*-генов, хотя конкретные молекулярные механизмы локализации полей в настоящее время не известны. В латеральной мезодермальной пластинке куриного эмбриона инициируется локальная экспрессия фактора роста фибробластов *fgf-10*, который предопределяет активность генов семейства *tbx*. В области экспрессии *tbx5* у зародышей курицы и мыши закладывается поле передней конечности, а в области экспрессии генов *tbx4* и *pitx1*--- задней (рис. 21-12). Подсаживая микроскопический шарик адсорбента, несущий *fgf*, в ткани передней области зародыша, можно вызвать экспрессию *tbx5* и формирование эктопической передней конечности. Зависимость развития верхней конечности от гена *tbx5* отмечена и у человека, у которого наблюдается нарушение развития сердца и *верхней* конечности у гетерозиготных особей

*tbx5*<sup>+/−</sup>. Экспрессия *pitx1*, видимо, является предпосылкой активности *tbx4*, поскольку она предшествует экспрессии *tbx4* и охватывает более широкую область, чем непосредственно сама почка конечности. Если индуцировать эктопическую экспрессию *pitx1* в почке крыла, например, введением соответствующего ретровирусного вектора, в этой области начинается также и экспрессия *tbx4*, которая при нормальном развитии происходит только в области закладки ноги.

Интересно, что у хвостатых амфибий спецификация передних и задних конечностей обусловлена иными механизмами. Показано, что у тритона и аксолотля гены *tbx5* и *tbx4* экспрессируются совместно и в области передней, и в области задней конечности и, следовательно, не могут рассматриваться как гены их спецификации (Khan et al., 2002). Высказывается предположение, что у амфибий для индукции и поддержания роста передней конечности необходима сочетанная экспрессия по крайней мере трех генов --- *tbx5*, *wnt2b*, *fgf10*, а для задней --- *tbx4*, *wnt8c*, *fgf10*. Наличие такого сложного генетического кода допускает известные вариации экспрессии генов, специфицирующих переднюю и заднюю конечность (H.-G. Simon, 2002).

Появление морфологически обособленного зачатка конечности сопровождается *регионализацией поля*, которое по мере развития подразделяется на отдельные субзоны --- зачатки элементов конечности. После регионализации трансплантация частей поля дает развитие не целой конечности, а лишь отдельных ее элементов. У тритона регионализация поля происходит на стадии хвостовой почки. При трансплантации на хориоаллантоис кусочки зачатка задней конечности четырехдневного куриного эмбриона, взятые вдоль проксимодистальной оси, образуют при автономном культивировании последовательные части конечности. Самый проксимальный сегмент развивался как стилоподий, следующий как зигоподий, а дистальный --- как аутоподий.

**Почка конечности.** Зачаток, или *почка конечности* образуется в результате скоординированных во времени и пространстве событий, из которых главными являются миграция клеток мезенхимы и их пролиферация, а также изгибание



эктодермы. Мезенхима, выселяющаяся из латеральной мезодермальной пластинки, в ходе дифференциации конечности образует элементы скелета, мезенхима из миотомов сомитов дает мышечные элементы, а из нервного гребня --- соединительную ткань.

В почке конечности выделяются три области, активность которых имеет решающее значение для формирования трехмерной структуры конечности, для формирования дорсовентральной, проксимодистальной и переднезадней осей: *апикальный эктодермальный гребень (АЭГ)*, лежащая под гребнем в дистальной части зачатка *транзитная зона (progress zone)* англоязычных авторов), и расположенная на заднем краю почки *зона поляризующей активности*.

**Апикальный эктодермальный гребень.** Спецификация зоны апикального эктодермального гребня происходит на стадии, предшествующей образованию почки конечности, когда под влиянием сигналов, исходящих из осевой, промежуточной и латеральной мезодермы, в эктодерме морфогенетического поля конечности устанавливается экспрессия генов, предопределяющих дорсальную и вентральную судьбу покровов будущей конечности. В области, примыкающей к осевому комплексу, в эктодерме инициируется экспрессия гена *wnt7a*, нуль-мутация которого ведет к вентрализации конечности. Над париетальным листком мезодермы в пределах морфогенетического поля конечности в эктодерме формируется область экспрессии гена *engrailed 1 (en1)*, нуль-мутация которого вызывает дорсализацию покровов конечности. У куриного эмбриона между зонами экспрессии *wnt7a* и *en1* остается узкая полоска, шириной около 150 мкм. Именно эта зона после изгибания эктодермы дает область, в которой формируется столбчатый эпителий апикального гребня. В клетках апикального эктодермального гребня происходит экспрессия гена *msx 2 (muscle segment homeobox)*, что способствует пролиферации в подлежащей мезенхиме, в которой экспрессируется другой ген этого же семейства --- *msx 1*. Высокий уровень пролиферации в мезенхиме дистальной области почки конечности поддерживается достаточно сложной системой факторов (рис. 21-13), в которой участвуют разнообразные факторы роста фибробластов.

Роль АЭГ в развитии конечности подтверждается экспериментально. Хирургическое удаление гребня ведет к прекращению поступления в мезенхиму факторов *msx 2*, *fgf8*, *fgf4* и к остановке развития. Наоборот, расширение зоны гребня путем трансплантации соответствующего материала вызывает появление дополнительных элементов аутоподия, как и в случае мутации *polydactylous*, которая вызывает расширение зоны АЭГ и развитие дополнительных пальцев. Мутация *eudiplopodia*, при которой происходит закладка двух эктодермальных гребней вместо одного, ведет к развитию раздвоенной конечности. При мутации *limbless* не образуется связка между презумптивной дорсальной и вентральной эктодермой поля конечности, не образуется АЭГ, и хотя почка конечности закладывается, ее дальнейшее развитие не происходит.

**Транзитная зона.** Судя по всему, функция АЭГ состоит в поддержании высокого пролиферативного статуса мезенхимы транзитной зоны. Последовательная во времени смена программ спецификации мезенхимы, наблюдаемая в этой зоне, обусловлена процессами, происходящими в самой мезенхиме, и не зависит от возраста АЭГ. Замещение апикального гребня конечности гребнем более ранней или более поздней стадии не изменяет нормальное развитие проксимодистальной оси. Если же удалить часть почки конечности вместе с мезенхимой, и на место среза трансплантировать ткань транзитной зоны, взятой от зародыша ранней стадии развития, то развивается сложная многочленная конечность. В этих случаях проксимальные элементы, детерминированные в остатке органа, дополнены образованием полной конечности, сформированной за счет спецификации тканей трансплантированной транзитной зоны. Трансплантат развивается независимо от остатка органа, следуя лишь сигналам, возникающим в новой транзитной зоне (рис. 23-14).

Позиционная информация транзитной зоны, определяющая спецификацию проксимодистальной оси конечности, изменяется во времени. Чем меньше времени клетки находятся в транзитной зоне, тем более проксимальные элементы конечности они формируют. В развитии конечности различаются три фазы, каждая из которых связана с детерминацией соответственно стилоподия, зигоподия и аутоподия. У мыши *первая фаза* характеризуется экспрессией

генов *hoxd9* и *hoxd10*, которая охватывает всю почку в целом (рис. 21-15А). Во второй фазе паттерн экспрессии имеет коллинеарный характер (рис. 21-15Б). Ген *hoxd9* экспрессируется во всей почке конечности от ее передней до задней границы. Передняя граница экспрессии гена *hoxd10* сдвинута назад. Еще несколько отступя назад проходит граница экспрессии гена *hoxd11*. Затем идет граница экспрессии гена *hoxd12*, и, наконец, ген *hoxd13* экспрессируется в самой задней части почки конечности. Таким образом, во второй фазе формирования конечности устанавливается гнездовой паттерн экспрессии *hoxd* генов: в задней области представлены транскрипты всех пяти экспрессирующихся в конечности генов (*hoxd9* - *hoxd13*). Далее вперед расположена зона экспрессии генов *hoxd9* - *hoxd12*. Затем идет полоска, в которой имеются транскрипты лишь трех генов *hoxd9* - *hoxd11*. В следующей, сдвинутой в переднем направлении зоне экспрессируются гены *hoxd9* и *hoxd10*. И, наконец, в передней области конечности экспрессируется лишь один ген --- *hoxd9*. Третья фаза характеризуется выключением экспрессии более 3' расположенных генов. В дистальной части конечности начинает повсеместно экспрессироваться *hoxa13*, несколько отступя назад проходит граница экспрессии гена *hoxd13*, тогда как в задней дистальной области сохраняется экспрессия генов *hoxd10* - *hoxd13* (рис.21-15В). Важность этого паттерна экспрессии для формирования конечности подтверждается экспериментами по нокауту паралогических генов *hoxa13* и *hoxd13*, который вызывает недоразвитие аутоподия. Существенные нарушения развития кисти и стопы, обусловленные слиянием пальцев, отмечаются и у людей при гетерозиготной мутации *hoxd13*. Нокаут генов *hoxa11* и *hoxd11* у мышей ведет к недоразвитию лучевой и локтевой костей.

Есть основания считать, что для скоординированных морфогенетических процессов, происходящих при развитии конечности, существенное значение имеют различия в степени сродства между клетками, занимающими разное пространственное положение в системе. Во время интенсивного роста конечности слагающие ее группы специфицированных на ранних стадиях клеток, благодаря высокой аффинности ведут себя как целостные системы. Если бы не существовали особые механизмы поддержания единства клеточных общностей, то в ходе роста зачатка клетки перераспределялись бы в

пространстве случайным образом. В этом случае ранние сигналы спецификации не имели бы реального значения для процессов дифференциации, происходящих на поздних стадиях. Экспериментально показано, что при развитии конечности клетки, занимающие разные позиции в системе, характеризуются разным сродством друг к другу. Кусочки тканей, взятые из передней и из задней областей почки конечности, в условиях *in vitro* диссоциировали на отдельные клетки. Клетки метили разными прижизненными красителями и получали смешанную популяцию из меченых передних и задних клеток. Эти клетки агрегировали, помещали в эктодермальный лоскут, после чего трансплантировали на ампутированную переднюю конечность куриного эмбриона. В такого рода конструкциях происходила *сортировка* клеток. По мере роста конечности формировались вытянутые вдоль проксимодистальной оси отдельные полосы "передних" и "задних" клеток, свидетельствуя о существовании специфической для разных областей зачатка конечности клеточной адгезии (Omi et al., 2002). Поскольку в передней области почки конечности экспрессируется *cadherin-11*, а в задней --- *pd-cadherin*, весьма вероятно, что именно эти молекулы клеточной адгезии ответственны за дифференциальную, специфическую для разных областей конечности адгезию клеток. Предполагается, что в непосредственной близости от АЭГ сортировка клеток мезенхимы подавлена, и проявляется только на некотором удалении от него.

**Зона поляризующей активности (ЗПА).** Роль этой зоны, расположенной на заднем краю ранней почки конечности, в установлении переднезадней оси конечности была показана экспериментально. Трансплантация этой области на передний край конечности приводила к зеркальной дубликации пальцев, и первоначально предполагалось, что ЗПА является источником морфогена, образующим заднепередний градиент (см. гл. 18). Предполагалось, что в качестве морфогена в ЗПА выступает ретиноевая кислота, поскольку имплантация шарика, пропитанного ретиноевой кислотой на передний край почки конечности, вызывала такую же зеркальную дубликацию, что и трансплантация самой ЗПА. Позднее было выяснено, что ключевым событием, определяющим свойства ЗПА, является включение экспрессии гена *sonic hedgehog (shh)* (Riddle et al., 1993). С помощью вирусного вектора, содержащего

ген *shh*, были трансфицированы фибробласты куриного эмбриона, которые затем имплантировали на передний край почки конечности. Появление эктопического источника белка *shh* вызывало изменение полярности конечности, свидетельством чему была зеркальная дупликация пальцев. По-видимому, активность *shh* инициирует синтез белков BMP (BMP2 и BMP7). Эти белки, диффундируя из зоны поляризующей активности, создают заднепередний градиент, который, возможно, служит причиной дифференциальной активности генов *hoxd* кластера, наблюдаемой во второй фазе развития конечности. Участие *hoxd* генов в формировании переднезадней оси является весьма древним механизмом регионализации конечности, который возник у рыб, задолго до появления четырехногих позвоночных (рис. 21-16).

**Апоптоз.** Важную роль в морфогенезе конечности позвоночных играет программное устранение клеток, или *апоптоз* (от греч. *ἀποπτῶ* --- отвергать). Лежащая в основе этого явления активация генов, контролирующих синтез *каспаз*, ферментов, которые фрагментируют белки и ДНК своей клетки, регулируется при помощи таких же сигнальных паракринных факторов, которые используются и при других видах дифференциации. В конечности куриного зародыша с помощью апоптоза устраняются клетки, которые расположены в межпальцевых промежутках, а также клетки, занимающие центральную область зигоподия. В результате самоуничтожения клеток здесь образуются два обособленных хрящевых зачатка зигоподия. Данные молекулярной биологии свидетельствуют, что апоптоз в конечности куриного эмбриона инициируется белками семейства BMP --- BMP2, BMP4 и BMP7. Наличие этих белков открывает путь апоптозу. Поддержание жизнеспособности клеток зачатка обеспечивается белком *poggin*, антагонистом BMP.

Нельзя не обратить внимания на то, что у хвостатых амфибий закладка пальцев происходит отдельно, в виде почек, образующихся последовательно в переднезаднем направлении. Этот способ формирования пальцев резко отличается от механизма, характерного для других позвоночных, у которых все пальцы образуются одновременно, когда путем апоптоза образуются промежутки между пальцами. Последовательная закладка пальцев у тритонов и аксолотлей предваряется интенсивной экспрессией генов *tbx4* и *tbx5*, активность

которых на стадии формирования пальцев обычно затухает. Своеобразие путей развития конечности у хвостатых амфибий, особенности формирования у них пальцев, равно как и упоминавшаяся ранее коэкспрессия *tbx4* и *tbx5* в зачатках передних и задних конечностей, представляют несомненный интерес для эволюционной биологии развития.

### 21.3. Становление лево-правой асимметрии.

Становление лево-правой асимметрии --- фундаментальное событие в развитии позвоночных животных. В отличие от симметрично расположенных внешних органов многие внутренние органы располагаются асимметрично относительно медиальной плоскости. Например, сердце при нормальном развитии занимает левостороннее расположение, печень --- правостороннее. Асимметричность характерна для укладки кишечника. Полагают, что лево-правая асимметрия имеет адаптивное значение, поскольку она обеспечивает компактное расположение внутренних органов, и создает более эффективные условия для работы сердечно-сосудистой системы.

Зеркальное расположение висцеральных органов --- *situs inversus* (лат. *situs* --- положение; *inversus* --- перевернутый) --- у мыши возникает при нарушениях развития, связанных с мутацией генов *iv* (*situs inversus viscerum*; лат. *viscera* --- внутренности) и *inv* (*inversion of turning*; англ. *inversion* --- перевертывание; *turning* --- поворот). В случае мутации *iv* происходит рандомизация расположения органов: у 50% животных фенотип нормальный, у 50% имеет место *situs inversus*. При мутации *inv* зеркальное расположение органов происходит в 100% случаев.

Известны и другие нарушения лево-правой асимметрии. Например, иногда возникает *билатеральная симметрия*. Если аномальное положение занимают лишь отдельные органы, тогда как вся система в целом остается нормальной, говорят об *изолированной гетеротаксии*. Нарушение лево-правой асимметрии происходит и при так называемом *изомеризме* --- удвоении (дубликации) органов.

Главная загадка становления лево-правой асимметрии --- ее первопричина. Здесь имеются две логические возможности. Одна из них состоит в том, что лево-правая асимметрия преформирована уже в яйцевой клетке. Другая исходит из предположения, что эта асимметрия возникает в ходе развития, например, в результате появления молекул, предопределяющих асимметричность каких-то функций. Действительно, ген мыши *iv*, равно как и гомологичный ген курицы *lrd* (*left-right dynein*), контролируют синтез *динеина*, двигательного белка микротрубочек. Известно, что при синдроме Картадженера возникновение *situs inversus totalis* коррелирует с дефектами динеина клеточных ресничек. Заметим, что и второй ген мыши, связанный со становлением лево-правой асимметрии, кодирует белок *анкирин*, который связывает цитоскелет с трансмембранными белками.

Была высказана гипотеза ("модель узелкового течения", nodal-flow model), согласно которой становление лево-правая асимметрии у млекопитающих связано с направлением тока жидкости в области узелка на стадии зародышевой полоски. Ресничные клетки узелка гонят имеющуюся здесь жидкость справа налево. Мутация гена динеина, вызывающая остановку биения ресничек, нарушала формирование нормальной лево-правой асимметрии, и положение органа в теле зародыша приобретало рандомизированный, случайный характер. В исключительно тонких экспериментах, выполненных с сотрудниками японским исследователем Нонака (2002), было показано, что искусственно меняя направление тока жидкости в условиях культуры, можно изменить и характер асимметрии положения внутренних органов зародыша. С помощью искусственного тока жидкости в области узелка эта группа исследователей добивалась восстановления нормальной лево-правой асимметрии у мутантов. По-видимому, модель "узелкового течения" распространяется на всех позвоночных животных. Другая группа исследователей из университета Ута в США показала, что наличие ресничных клеток в зародышевом узелке и экспрессия в этой области генов, родственных *Ldr*, характерны не только для мыши, но также и для птиц (курица), амфибий (*Xenopus*) и рыб (*Danio*) (Essner et al., 2002).

У куриного зародыша на стадии Гензеновского узелка под действием окружающих тканей так называемого *лево-правого координатора* LRC (Left-Right Coordinator) происходит лево-правая спецификация узелка. В результате этого процесса Гензеновский узелок подразделяется на две зоны: в правой части узелка начинается экспрессия гена *activin*, а в левой --- гена *Sonic hedgehog (Shh)* (рис. 21-17). При этом Activin служит ингибитором *Shh*. Активность *Shh* в левой части узелка инициирует экспрессию гена *Caronte (Car)*. Напротив, в правой части зародыша Activin включает экспрессию *fgf8*, продукт которого FGF8 ингибирует активность гена *Car*. Активность *Caronte*, по-видимому, является ключевым моментом в формировании свойств левой стороны тела, поскольку далее идет одна и та же цепочка генов, ингибирующих последовательно расположенные звенья. Так, *Caronte* ингибирует активность *bmp*, BMP выключает активность генов *Nodal* и *Lefty-2*, тогда как продукты последних ингибируют активность гена *Snail*, и являются активаторами гена *Pitx2* (рис.21-18). *Snail* ответственен за включение генов, определяющих правую сторону (цинкфингерный *cSnR*, *fibrillin-2* и др.). *Pitx2* ответственен за включение генов, определяющих левую сторону (*bmp4*, *flectin* и др.). Итак, в левой области куриного зародыша активируется *Caronte*, подавляется активность *bmp*, активируются *Nodal* и *Lefty-2*, благодаря чему начинает транскрибироваться *Pitx2*, тогда как *Snail* выключается. В правой области, где *Caronte* блокирован, активируется *bmp*, выключаются *Nodal* и *Lefty-2*, и тем самым снимается блокировка гена *Snail* (рис. 21-18).

У *Xenopus* становление лево-правой асимметрии связано с кортикальной реакцией. По каким-то причинам, имеющийся в вегетативном полушарии материнский белок Vg1, после оплодотворения и кортикальной реакции только в левой области переходит в активную форму, способную включить экспрессию гена *Xnr-1 (Xenopus nodal related)*. Если эту активную форму белка инъецировать в правый бластомер, то при последующем развитии расположение сердца имеет случайный характер. В опытах, где производили инъекцию иРНК<sup>Vg1</sup>, наблюдали инверсию лево-правой оси.

#### 21.4. Развитие глаза у позвоночных



Зачаток глаза амфибий закладывается на стадии нейрулы в передней области нервной пластинки как непарное образование, лежащее над прехордальной пластинкой (рис.21.19А). В зачатке глаз экспрессируются гены *Pax6*, *Rx1* и *Six3*; в прехордальной пластинке --- ген *Sonic hedgehog (Shh)*, секретизируемые продукты которого достигают нервной пластинки и ингибируют экспрессию *Pax6* в центральной области глазного зачатка, подразделяя его на два симметричных образования (рис. 21.19Б). После замыкания переднего отдела нервной трубки и образования зачатка головного мозга эти участки формируют парные выпячивания --- *глазные пузыри*, морфологически обособленные зачатки глаз (рис. 21-20). При мутации *Shh* первичный зачаток глаз остается непарным, в результате чего возникает *циклопия*, развитие единственного, занимающего центральное положение глаза. В зачатках глаз отмечена экспрессия многих генов, гомологичных генам Дрозофилы, участвующих в образовании морфогенетического поля глаза в имагинальном диске: ген *Pax6* мыши гомологичен гену *ey* Дрозофилы, ген *Six3* мыши гену *so* Дрозофилы, гомологичны гены *Eya* и *eya*, *Optx1* и *optix*, *Otx2* и *otx2*. Степень гомологии *Pax6* и *ey* очень высока, так что этот ген мыши способен обеспечить развитие фоторецепторов глаза плодовой мушки.. *Pax6* --- универсальный ключевой фактор развития глаза всех животных.

После образования глазных пузырей, в прилегающей к этим латеральным выростам диенцефалона эктодерме происходит спецификация хрусталика. Хирургическое удаление глазного пузыря, как показал еще Шпеманн, или его недоразвитие у мутантов *Lhx2* и *Rx* вызывает подавление развития хрусталика. Предполагается, что индуктивную функцию глазного пузыря у разных позвоночных осуществляют разные представители сем. BMP. При действии сигнальных молекул индуктора в эктодерме презумптивного хрусталика экспрессия некоторых генов, в том числе *Otx2*, прекращается. Экспрессия других, например, *Pax6* --- поддерживается. Это взаимодействие ведет к образованию эктодермального утолщения --- плакоды. В хрусталиковой плакоде инициируется экспрессия целой плеяды генов, которые контролируют образование кристаллинов (*Six3*, различные *Sox*) и регулируют клеточную пролиферацию (*Prox1*, *FoxE3*).

Как следует из рисунка 21-21, экспрессия *Sox2*, *Six3*, *Prox1* в хрусталиковой плакоде поддерживается благодаря активности *Pax6*.

У мыши превращение глазного пузыря в глазной бокал и его регионализация, связанная со спецификацией клеток и морфогенетическими движениями, происходит под влиянием трех основных факторов (рис.21-22). Под влиянием фибробластических факторов роста (FGF), секретируемых хрусталиковой плакодой, инициируется спецификация нейральной сетчатки в дистальной части глазного пузыря. Этот процесс сопровождается активацией экспрессии *Chx10* в этой области. Мезенхима, граничащая с дорсальной областью зачатка глаза, секретирует трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), который предопределяет развитие пигментного эпителия сетчатки. Этот зачаток характеризуется экспрессией гена *Mitf*. Вентральная область переднего мозга является источником белка *Shh*, который важен для дорсовентрального паттернинга глазного бокала. Таким образом, единый вначале непарный зачаток глаза под влиянием внешних сигнальных молекул подразделяется на субзоны, каждая из которых проходит специфический путь дифференциации.

После спецификации клеток глазного пузыря происходит инвагинация дистальной части пузыря с образованием глазного бокала. Процесс инвагинации бокала определяется воздействиями со стороны эктодермальной плакоды. У мутантов с подавленной в эктодерме функцией *Pax6* плакода не образуется и формообразование глазного бокала не происходит. Позднее, когда глазной бокал сформируется, у птиц и млекопитающих (но не у рыб) дифференциация сетчатки может идти и в отсутствие зачатка хрусталика. После образования глазного бокала экспрессия *Pax6* в области презумптивного пигментного эпителия сетчатки и в области глазного стебелька выключается.

Сетчатка позвоночных состоит из шести типов нейронов и одного типа глиальных клеток. Появление этих клеточных типов происходит в определенной последовательности, которая оказалась консервативной в ряду позвоночных животных, что свидетельствует об эволюционной устойчивости механизмов, управляющих процессом гистогенеза сетчатки.

## ЛИТЕРАТУРА

- Банников А. Г., Денисова М. Н., Даревский И. С. Класс земноводные или амфибии. Общий очерк. В кн.: Жизнь животных. Т.5. Земноводные. Пресмы- кающиеся. М. "Просвещение". 1985. Стр.: 5- 27
- Белоусов Л. В. Проблема эмбрионального формообразования. Изд. Мгу.1971. 174 стр.
- Корочкин Л. И. Введение в генетику развития. М. Наука. 253 с.
- Миташов В. И. Клеточные источники, регуляторные факторы и экспрессия генов при регенерации хрусталика и сетчатки у позвоночных животных // Изв. АН. Сер. биол. 1996.№3 :298 - 318.
- Миташов В. И., Кусулакос С. Молекулярные механизмы развития и дифференцировки структур глаза дрозофил и позвоночных // Онтогенез. 2001. Т. 32: 14-28.
- Миташов В. И., Кусулакос С., Зиновьева Р. В. и др. Конструктивный синергизм экспрессирующихся регуляторных генов в процессе развития и регенерации глаза и мышц // Изв. АН. Сер. биол. 2001. №3 :261 - 275.
- Лопашов Г. В. Механизмы развития зачатков глаз в эмбриогенезе позвоночных. Изд. АН СССР. М. 1960. 224 с.
- Лопашов Г. В., Строева О. Г. Развитие глаза в свете экспериментальных исследований. Изд. АН СССР. М. 1963. 206 с.
- Северцов А. Н. Эволюция предков челюстных позвоночных.// В кн.: Морфологические закономерности эволюции. Собр. соч. Т. 5. Изд. АН СССР. М. Л. 1949. Стр. 90-117.
- Строева О. Г. Морфогенез и врожденные аномалии глаза млекопитающих// Изд. Наука. М. 1971. 242 с.

- Ashery-Padan R., Gruss P. Pax6 lights-up the way for eye development// Current Opinion in Cell Biology. 2001. 13:706-714.
- Cohn M. K., Tickle C. Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan// Trends Genet. 1996. 12:253-257.
- Davidson E. Forelimb and hindlimb buds. // In: E. Davidson. Genomic regulatory systems. Acad. Press. 2001:111- 115.
- Gilbert S. The genetics of axis specification in *Drosophila*.// In: Developmental biology. Seventh edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 2003: 263-303.
- Khan P., Linkhart B., Simon H.-G. Different regulation of t-box genes *tbx4* and *tbx5* during limb development and limb regeneration.// Developmental Biology. 2002. V.250:383-392.
- Omi M., Anderson R., Muneoka K. Differential cell affinity and sorting of anterior and posterior cells during outgrowth of recombinant avian limb buds// Developmental Biology. 2002. V.250: 292-304.
- Khan P., Linkhart B., Simon H.-G. Different regulation of t-box genes *tbx4* and *tbx5* during limb development and limb regeneration.// Developmental Biology. 2002. V.250:383-392.
- Omi M., Anderson R., Muneoka K. Differential cell affinity and sorting of anterior and posterior cells during outgrowth of recombinant avian limb buds// Developmental Biology. 2002. V.250: 292-304.
- Riddle R. D., Johnson R. L., Laufer E., Tabin C. *Sonic hedgehog* mediates the polarizing activity of ZPA.// Cell. 1993. V.75:1401-1416.

## ГЛАВА 22. РЕГЕНЕРАЦИЯ

### 22.1. Введение: история открытия и основные понятия

Способность животных восстанавливать утраченные органы известна издавна. Она отмечалась в трудах Аристотеля и других древних авторов. Предметом научного исследования способность к восстановлению органов и тканей стала в начале 18-го столетия, когда в 1712 году замечательный французский естествоиспытатель Р. Реомюр (R. Reaumur, 1683 - 1757) описал восстановление ног у речного рака после ампутации и назвал это явление *регенерацией* (от лат. regeneratio --- возрождение). Будучи преформистом, Реомюр полагал, что регенерация конечности происходит за счет особых резервных зачатков ноги (рис. 22-1). Поскольку он получал многократную регенерацию одной и той же конечности у одной и той же особи, он пришел к выводу, что резервных зачатков ноги должно быть много. Огромный резонанс вызвали работы блестящего экспериментатора швейцарца А. Трамбле (A. Trembley, 1744), которые обнаружили исключительно высокую регенерационную способность у пресноводного полипа, названного им гидрой в честь мифической многоголовой лернейской гидры, убитой Гераклом. Работы Реомюра, Трамбле, а также исследования Ш. Бонне (1745) на кольчатых червях, моллюсках и тритонах, и Спалланцани (1769) (регенерация ног и хвоста у тритонов и головастиков лягушек) --- заложили прочную основу для научной разработки проблемы регенерации.

В девятнадцатом столетии, когда клеточная теория создала новые основания биологии, проблема регенерации вновь привлекла к себе внимание в связи с исследованием клеточных механизмов восстановительных процессов.

Существенно расширился круг объектов и явлений, связанных с регенерацией. Оказалось, что регенерация это не только реакция на нанесенную травму, но что она составляет важный элемент процессов репродукции животных путем бесполого размножения. Например, при поперечном делении червей надвое в случае *архитомии* обе образовавшиеся части восстанавливают недостающие части *после деления*. При *паратомии* последовательность событий иная: в области, где должно произойти поперечное деление особи, расхождение новых особей происходит после формирования их задних и передних структур.

Исследование клеточных механизмов регенерации показало, что имеется два основных способа восстановления утраченных частей. В одном случае в результате дедифференциации или миграции особых резервных клеток образуется недифференцированная *регенерационная бластема* (от греч. βλαστός --- росток), клетки которой пролиферируют и из которой позднее строится восстанавливаемый орган. Такой тип регенерации называется *этиморфозом* (от греч. ἐπί --- в сложных словах означает прибавление; μόρφωσις --- образование). Термин *этиморфоз* сохранил свое значение и в наши дни. В другом случае восстановление утраченной формы происходит путем перестройки оставшейся части. Как полагали, она идет без образования бластемы и не имеет пролиферативной фазы. Наблюдавший впервые эту форму регенерации у Планарий Т. Морган (1901) назвал этот тип регенерации *морфаллаксисом* (от греч. μορφή --- вид, форма; ἀλλάσσω --- делать другим, изменять). Позднее оказалось, что его наблюдения не были вполне точными. В настоящее время термин морфаллаксис или морфаллактическая регенерация используют в тех случаях, когда восстановление утраченной части осуществляется не за счет образования особой бластемы, а в результате перемещения клеточных масс, как это происходит у Стрекающих (Slack, 2003).

Исследованиями 19-го и начала 20-го столетий была открыта *физиологическая регенерация*, в ходе которой происходит обновление клеточного состава многих тканей. Действительно, у большинства Metazoa клеточный состав многих функционирующих дифференцированных тканей непрерывно или периодически обновляется. Наряду со *статическими* тканями, такими как

нервная или мышечная, где клеточное обновление, если и происходит, то в малозаметных масштабах, широко распространены *обновляющиеся* ткани. Для обновляющихся тканей, примером которых могут служить эпидермис или кишечный эпителий позвоночных, характерна особая организация ткани с пространственным обособлением камбиальной зоны, в которой происходит размножение клеток, зоны дифференциации и рабочей зоны, где и реализуется специфическая функция ткани. Клетки некоторых тканей иногда могут выполнять свою функцию и не утрачивая способности к пролиферации. Такие, *стабильные*, ткани, например, соединительная ткань, некоторые железистые ткани, не имеют особого камбия, так как все или почти все дифференцированные клетки время от времени прекращают свою функцию и делятся. При физиологической регенерации на первый план выступают генетические программы *терминальной дифференциации уже коммитированных клеток*.

Можно выделить два обязательных условия физиологической регенерации. Прежде всего, это --- наличие недифференцированных клеточных элементов, которые либо сохраняются в ткани в виде особого резерва, представленного стволовыми (камбиальными) клетками, либо возникают в результате дедифференциации функционирующих клеток, как это происходит с фибробластами соединительной ткани, вступающими в цикл репродукции. Другим неизменным условием физиологической регенерации является способность клеток сохранять в активном состоянии или периодически активировать программы генетического контроля клеточной дифференциации.

К середине 20-го века были открыты многие виды регенерационных процессов. Стало очевидно, что понятие *регенерация* объединяет множество разнородных явлений (рис. 22-2). Например, к числу регенерационных явлений относятся разнообразные *эндоморфозы*, процессы, в ходе которых остаток травмированного органа увеличивается в размерах за счет пролиферации и изменения размеров клеток, без восстановления, однако, исходной организации. Известны *гиперморфозы* и *гипоморфозы*, в случае которых орган восстанавливается --- соответственно --- в увеличенном или уменьшенном масштабе. Описаны разнообразные *гетероморфозы*, когда вместо утраченного

органа одного типа образуется орган другого типа, в том числе гомеостатическая регенерация (Карлсон, 1986; Короткова, 1997).

В 20-ом столетии значительные усилия затрачивались на исследование факторов, стимулирующих и тормозящих регенерационные процессы. В частности, проводились исследования влияния нервной системы, результаты которых были обобщены *нейротрофической теорией* (Singer, 1965), согласно которой в обеспечении регенерации конечности амфибий ведущую роль играет нервная система животного. В противоположность первоначальным взглядам о роли симпатической нервной системы Зингер показал, что для регенерации значение имеет число нервных волокон, а не их качественная характеристика.

В 1960-1970 гг. в исследованиях регенерации на первый план вышли проблемы позиционной информации и позиционного значения клеток и тканей, занимающих разное положение в пространстве. Были предложены некоторые модели, описывающие процессы регенерации в обобщенном виде (см. гл. 18).

Новый этап в исследованиях регенерации приходится на 1980-е годы, когда молекулярная биология открыла новые горизонты изучения морфогенетических процессов. В русле этих исследований в настоящее время проводится описание и анализ генов, участвующих в процессах регенерации, а также их возможные функции. Анализ генетических механизмов морфогенетических процессов, происходящих при регенерации, проводится как в опытах по трансфекции генов, что позволяет изучить последствия "сверхэкспрессии" генов, так и в экспериментах, где избирательно выключается экспрессия строго определенных генов. При этом возникает возможность сравнительного изучения сходных морфогенетических процессов при регенерации и при нормальном эмбриональном развитии.

Изучение регенерации у многоклеточных животных, проводившееся на протяжении более двух столетий, открыло огромное разнообразие типов восстановительных процессов. Это разнообразие, как свидетельствует современная литература, можно классифицировать по-разному, используя различные критерии (Воронцова, 1949; Карлсон, 1986; Короткова, 1997). В данной главе вопрос о классификации явлений регенерации не рассматривается.



Мы выделим и охарактеризуем лишь те основные типы регенерации у животных, которые различаются источником клеточного материала, идущего на восстановление утраченных частей. Среди этих типов --- регенерация за счет непосредственного использования источников, которые обеспечивают тканевой гомеостаз у нормальных, неповрежденных животных. Другой тип связан с участием стволовых резервных клеток, которые образуют регенерационную бластему --- систему недифференцированных клеток, способную при некоторых условиях воссоздать утраченный орган. Наконец, третий тип регенерационных процессов, который будет рассмотрен в этой главе, связан с формированием регенерационной бластемы за счет дедифференциации специализированных тканей. Естественно, возможны и комбинации разных способов образования бластемы. Первый из указанных типов представлен морфаллактической регенерацией у Стрекающих. Второй и третий типы являются разновидностями эпиморфной регенерации.

## **22.2. Регенерация у Стрекающих**

Большинство исследований по регенерации у Стрекающих выполнено на гидре. Высокая регенерационная способность гидры и специфика этого процесса во многом определяется особенностями морфо-функциональной организации животного.

Тело гидры состоит из двух листков --- эктодермального и энтодермального, разделенных тонким слоем мезоглеи, представляющей собой внеклеточный матрикс. Во внешнем эпителиальном слое располагаются интерстициальные клетки (i-клетки). Эктодермальный эпителий, энтодермальный эпителий и интерстициальные клетки представляют собой три независимые самоподдерживающиеся клеточные линии со своими собственными стволовыми клетками. Популяция линии i-клеток состоит из мультипотентных стволовых клеток и их производных --- стрекующих клеток, или нематоцитов, нервных и половых клеток. Особенность организации гидры состоит в том, что клеточный состав ее тела постоянно обновляется. Эктодермальные и энтодермальные эпителиальные клетки делятся в гастральной области тела. Из этой области эпителиальные клетки в составе пластов движутся в апикальном и базальном направлениях, достигая, соответственно, области головы и подошвы

(рис. 22-3). При достижении уровня щупалец или подошвы клетки прекращают делиться, дифференцируются и, после гибели, элиминируются. Прирост числа клеток в эпителиальных пластах компенсируется двумя способами. Во-первых, дифференцированные клетки погибают, а, во-вторых, избыток клеток постоянно расходуется на образование новых особей в зоне почкования. При разрезании гидры все области тела за исключением дифференцированных областей, т.е. за исключением щупалец и подошвы, всегда имеют стволовые клетки всех трех клеточных линий, обеспечивающих регенерационный процесс.

Поддержание стабильной формы животного в условиях постоянного обновления клеточного состава и движения эпителиальных пластов, по-видимому, осуществляется с помощью особых сигнальных пептидов. В настоящее время секвенировано более 300 пептидов. Экспериментальный анализ функций этих пептидов показал, что из 52 исследованных пептидов примерно половина оказалась нейропептидами, а половина --- эпителиальными пептидами. Широко известны пептиды --- активаторы и ингибиторы головы, а также активаторы и ингибиторы ноги. Эти сигнальные молекулы являются морфогенами, т. е. образуют градиенты концентраций вдоль оси тела, создавая позиционную информацию, необходимую для спецификации клеток и их дальнейшей дифференциации в клетки гипостома, щупалец или подошвы. Деление на нейральные и эпителиальные пептиды, возможно, не является строгим. Во всяком случае, активатор головы, пептид НА (*Head activator*), состоящий из 11 аминокислотных остатков (pEPPGGSKYILF), в норме продуцируется нервными клетками, а при их удалении --- эпителиальными. Активатор головы НА усиливает пролиферацию клеток, индуцирует дифференциацию нервных элементов и инициирует специфическую дифференциацию головы.

При регенерации гипостома со щупальцами в первые часы после ампутации происходит сближение краев гастродермы. По образовавшейся поверхности нарастает эпидермальный слой, и после восстановления двухслойной структуры между эктодермой и энтодермой восстанавливается мезоглея. Какой-либо бластемы в области раны не образуется. Спустя 1,5 - 2 суток начинается восстановление щупалец. Наличие трех типов стволовых клеток, за счет

которых происходит восстановление тела гидры и некоторых гидроидов продемонстрировано в опытах на диссоциированных животных. Несколько десятков гидр диссоциировали на отдельные клетки. Клеточную суспензию центрифугировали и получали сгусток, в котором происходила сортировка разных типов клеток, за счет которых восстанавливалось тело животного.

При удалении головы и базального отдела у гидры происходит двунаправленная регенерация с сохранением прежней полярности, что объясняется разностью концентрации морфогенов головы и подошвы в областях ампутации. Насколько можно судить по данным экспериментов, морфогены определяют экспрессию генов, контролирующих процессы дифференциации головы и подошвы. На ранних стадиях регенерации головы в энтодермальных клетках апикальной области экспрессируется ген *Heady*, продукт которого пептид HEADY является индуктором апикальной судьбы. Обработка гидр синтетическим пептидом HEADY вызывает образование дополнительных голов. В образовании щупалец у *Hydra magnipapillata* принимает участие ген *Hym-301*, который экспрессируется в эктодермальных эпителиальных клетках головной области. Гомологичные гены были обнаружены и у других видов гидры.

Процесс регенерации подошвы рисуется следующим образом (Fushjisawa, 2003). После ампутации возникает "сигнал тревоги". Предполагается, что это может быть изменившийся состав ионов, который вызывает секрецию морфогенов *Hym-323* и *redibin/Hym-346* в окружающую среду (рис.22-4). Показано, что эти морфогены усиливают регенерацию подошвы, не затрагивая пролиферативную активность эпителиальных клеток. Предполагается, что морфогены *Hym-346* и *redibin* взаимодействуют со специальными рецепторами и, с помощью систем проведения сигналов, включают экспрессию некоторых транскрипционных факторов, в том числе гена *CnNK2*. Синтезируемые транскрипционные факторы активируют следующую ступень каскада, в результате чего включаются новые гены (*Farm1*), которые усиливают первичный сигнал. Интерстициальные клетки при регенерации, как и при нормальном развитии, дают начало нематоцитам, нервным и половым клеткам.

Исследования последних лет показали, что Стрекающие имеют многие гены, которые контролируют развитие и у других животных. У гидры обнаружены гены, обеспечивающие Wnt сигналинг. Они включаются тотчас после ампутации на вершине регенерата, свидетельствуя, что Wnt также может служить активатором головы.

### 22.3. Регенерация у Планарий.

Принципиально иной механизм регенерации описан у Планарий, которые, как и Стрекающие, являются модельным объектом для изучения восстановительных процессов. У Планарий также имеется двунаправленная регенерация, обеспечение которой происходит на основе присущей этим животным позиционной информации. Существенное отличие регенерации у Планарий от Стрекающих состоит в том, что у них имеется единый клеточный источник, за счет которого происходит восстановление всех или почти всех утраченных структур. Таким источником служат стволовые клетки --- *необласты*, относительно небольшие базофильные клетки, не утратившие способность к митотическим делениям. После ампутации кусочка тела необласты накапливаются под раневым эпителием, создавая основу для эпиморфной регенерации. Роль необластов в эпиморфозе демонстрируется опытами, где планарий подвергали рентгеновскому облучению в дозах, которые подавляют регенерацию (рис.22-3). Если у облученной планарии вырезать кусочек тела, регенерация не происходит. Необлученные планарии диссоциировали на клетки и получали очищенные суспензии дифференцированных клеток и необластов. Трансплантация необластов от необлученной планарии способствовала быстрому восстановлению нормальной структуры тела оперированной облученной планарии. Суспензия необлученных дифференцированных клеток способностью восстановить регенерационную потенцию животного не обладала.

При регенерации глаз у Планарий участвуют гены *рахб* и *sine oculis* (лат. --- "без глаз"), гомологичные этим же генам позвоночных, которые также контролируют развитие глаз.

## 22.4. Регенерация конечности позвоночных

Среди амфибий высокой регенерационной способностью обладают Хвостатые --- тритоны и аксолотли, ставшими модельными объектами биологии развития. В последние десятилетия регенерацию с успехом исследуют и у головастиков лягушки *Xenopus*.

Классической моделью эпиморфной регенерации может служить регенерация конечности тритона. В этом процессе различают короткую *деструктивную* и длящуюся примерно три недели *конструктивную* фазы. В течение первой фазы происходит распад поврежденных тканей. Разрушение тканей сопровождается воспалительными явлениями. Вторая фаза связана с эпителизацией раны, образованием и дифференциацией регенерационной бластемы.

Первым этапом регенерации конечности является *заживление раны*. В это время происходит сокращение мышечной ткани остатка органа и остановка кровотечения. Вслед за этим начинается *эпителизация* раны, которая осуществляется в результате миграции резервных стволовых клеток базальных слоев эпидермиса из неповрежденной области к центру раны. Практически одновременно с этим происходит развитие воспалительного процесса: наблюдается отек, выселение макрофагов и фагоцитоз некротических масс. Следующий этап можно назвать этапом *дедифференциации*. К этому времени регенерирующие нервные волокна подрастают под эпидермис, закрывающий поверхность раны. Эпидермис активируется, становится столбчатым и образует апикальную эпидермальную шапочку (АЭШ), наличие которой чрезвычайно важно для успешной регенерации конечности. Стволовые клетки мезодермальных производных образуются за счет дедифференциации хряща, мышц, и соединительной ткани. В результате дедифференциации образуются мезенхимоподобные элементы, лишенные каких бы то ни было черт специализации. Эти клетки пролиферируют и сравнительно быстро образуют в дистальной ампутированной конечности *регенерационную бластему* (рис.22-4). Образование регенерационной бластемы --- непременное условие начала морфогенетических процессов, связанных с формированием утраченной части конечности. На завершающем этапе регенерации происходит *дифференциация бластемы*, которая образует хрящевой скелет, мышечные элементы и

соединительную ткань регенерата. Одновременно с морфогенезом происходит и рост конечности, благодаря которому у многих видов регенерат достигает размеров нормальной конечности.

**Апикальная эктодермальная шапочка.** После заживления раны на дистальном конце регенерата эпидермис утолщается, образуя апикальную эктодермальную шапочку, морфологический и функциональный эквивалент апикального эктодермального гребня зачатка конечности зародыша. У аксолотля АЭШ служит местом, где синтезируются фибробластические факторы роста FGF-1 и FGF-2, которые, поддерживают пролиферативную активность в формирующейся под эпителием регенерационной бластеме. Действительно, удаление эпидермального утолщения подавляет образование бластемы, тогда как обработка конечностей, лишенных АЭШ, указанными факторами роста восстанавливает митотическую активность в бластеме. Также как в почке конечности амниот, в бластеме регенерата амфибий синтезируется FGF-10, под влиянием которого в АЭШ активируется ген *Fgf-8*. Факторы FGF-10 и FGF-8 являются ключевыми сигнальными молекулами при регенерации задней конечности головастика Ксенопуса.

В апикальной эпидермальной шапочке экспрессируется ген *Dlx-3*, гомолог дрозофилиного гена *Distal-less*. По-видимому, экспрессия *Dlx-3* поддерживается фактором роста фибробластов FGF-2, поставляемым в дистальную область регенерата также и с помощью проникающих в регенерат нервных отростков. Во всяком случае, в отсутствии иннервации экспрессия *Dlx-3* не наблюдается. Если же в денервированные конечности инъектировать FGF-2, экспрессия *Dlx-3* восстанавливается.

**Регенерационная бластема.** Образование *регенерационной бластемы* по праву рассматривается как ключевой этап эпиморфоза. От того, образуется или нет регенерационная бластема, напрямую зависит регенерационная способность органа. Известны два источника формирования бластемы. Один из них связан с потерей черт специализации дифференцированных тканей и с восстановлением пролиферативной активности их клеток. Другой источник клеток бластемы представлен резервными клетками, а именно, мышечными одноядерными сателлитами, которые входят в состав регенерационной бластемы.

Формирование регенерационной бластемы за счет дедифференциации тканей остатка органа имеет локальный характер. Свидетельством этого служит образование бластемы в регенерирующей конечности животных, подвергнутых общему рентгеновскому облучению в дозах, которые подавляют способность к пролиферации и регенерации. Если защитить от облучения узкую зону конечности шириной всего 1 --- 2 мм и ампутировать конечность в плоскости этой зоны, то регенерация происходит. Если плоскость ампутации проходит в незащищенной от облучения зоне, восстановление конечности не наблюдается.

В опытах по пересадке кожи и хряща, взятых от триплоидных доноров, на ампутированные конечности диплоидных животных, была проведена оценка относительного вклада различных тканей конечности в образование регенерационной бластемы. Оказалось, что этот вклад далеко не одинаков. Так, фибробласты пересаженной триплоидной кожи дали 43% клеток бластемы, тогда как клетки хряща всего 2%. Хотя индивидуальные клетки бластемы обладают, по-видимому, способностью к трансдетерминации, тем не менее, в целом, судьба клеток бластемы предопределена их происхождением.

Было бы ошибкой рассматривать формирование регенерационной бластемы просто как накопление массы недифференцированных клеток, которое создает предпосылки восстановительного процесса. В ходе своего образования *регенерационная бластема приобретает свойства целостной системы, в которой имеется информация об общем плане и полярности восстанавливаемой структуры.* Бластема представляет собой *самоорганизующуюся систему*, в которой есть все необходимое для восстановления утраченных структур. В опытах по культивированию бластемы *in vitro*, при трансплантации бластемы из регенерата конечности в иные области тела, в опытах по замене бластемы передней конечности бластемой задней и в других --- развитие этой системы всегда происходит в соответствии с ее происхождением. Бластема задней конечности всегда образует структуры, типичные для задней конечности. Регенерационная бластема конечности левой стороны при трансплантации на правую сторону тела будет развиваться как левая конечность и т. д.

В бластеме четко детерминирована проксимальная граница регенерата. Если бластему одного регенерата трансплантировать в другую конечность, ампутированную на более дистальном уровне сравнительно с первой, то регенерирует сложная конечность, в которой вслед за дистальными элементами скелета остатка органа повторяются все части скелета, которые были ампутированы у донора бластемы (рис.22-5). Трансплантированная бластема не теряет детерминации своей проксимальной границы. Данные о том, что клетки бластемы сохраняют «память» об уровне плоскости ампутации, легли в основу *концепции позиционной памяти* (Carlson, 1983).

**Позиционная память и позиционные значения.** Носителями позиционной памяти служат фибробласты дермы. Костная или хрящевая ткани, равно как и эпидермис, такими свойствами не обладают. Например, если повернуть кость в остатке органа на  $180^{\circ}$ , полярность регенерата не изменится. Не изменится она и в том случае, если эпидермис регенерата заменить эпидермисом хвоста, тогда как аналогичная пересадка дермы резко видоизменит регенерационный процесс. В опытах с пересадкой необлученной кожи (дермы вместе с эпидермисом) на облученную конечность с целью восстановления утраченной регенерационной способности выяснилось, что необлученные фибробласты дедифференцируются и образуют бластему. Однако эта бластема не обладала способностью к мышечной дифференциации, хотя и восстанавливала нормальный скелет. В этих экспериментах с трансплантацией необлученной кожи обнаружилось еще одно чрезвычайно интересное обстоятельство. Оказалось, что для инициации регенерации важно наличие фибробластов из разных участков кожи, расположенных в разных местах относительно проксимодистальной оси конечности. Таким образом, фибробласты из разных участков конечности имеют какие-то, пока неизвестные, функциональные различия. Существование таких различий у клеток из разных областей одной и той же ткани дает повод говорить о разных *позиционных значениях* клеток. При взаимодействии клеток, имеющих разное позиционное значение, возникает своего рода конфронтация клеток, ведущая к возобновлению пролиферативной активности и восстановлению всего ряда позиционных значений, характерного для неповрежденных тканей органа.

Появление разрыва в последовательном ряду позиционных значений



служит необходимой предпосылкой регенерации. Если система способна ответить на этот разрыв восстановлением паттерна позиционных значений, характерного для развивающейся конечности, то она способна и восстановить соответствующую структуру.

Молекулярная природа факторов, создающих позиционные значения, не раскрыта, хотя есть веские основания считать, что позиционные значения клеток могут быть связаны с молекулами клеточной адгезии (см. главу 19). Установлено, например, что клетки конечности хвостатых амфибий, занимающие разные позиции вдоль проксимодистальной оси, обладают различными адгезивными свойствами. Если у разных особей тритона ампутировать *переднюю* конечность на разных уровнях, например, на уровне запястья, предплечья и плеча, то возникают регенерационные бласты, состоящие из клеток с разными позиционными значениями. Этот материал пересаживали на культю *задней* конечности, перерезанной на уровне середины бедра (рис.22-6). Из бласты области плеча регенерат развивался на уровне середины бедра. Бласта предплечья формировала регенерат в области голени. Регенераты, которые формировались при трансплантации бласты предплечья и запястья, еще более смещались в дистальном направлении. Максимальное смещение наблюдали при трансплантации клеток бласты из области запястья: в этом случае регенераты возникали на уровне лодыжки задней конечности. Из этих опытов следует, что для клеток бласт, которые образуются на разных уровнях проксимодистальной оси передней конечности, благодаря сродству к клеткам с аналогичным позиционным значением, располагающихся в соответствующих зонах задней конечности, характерен своеобразный *аффинофорез* (рис.22-6), или перемещение в зону с тождественными позиционным значением и аффинитетом.

Различные адгезивные свойства присущи и клеткам, которые находятся на разных уровнях проксимодистальной оси развивающейся конечности зародыша. И в этом случае обнаруживается определенная связь между адгезивными свойствами клеток и их морфогенетическими потенциями. Так, при действии ретиноевой кислоты происходит проксимализация адгезивных свойств и клеток, и развивающейся конечности в целом. На очереди стоит исследование вопроса, активация каких генов происходит при конфронтации позиционных значений.

В настоящее время мы можем ограничиться лишь общим выводом о том, что в нормальном функционирующем органе устанавливается состояние стабильности, или *гомеостаза* (от греч. ὁμοίος--- одинаковый; στάσις --- состояние), поддерживаемое системой неких позиционных значений взаимодействующих клеток. При дестабилизации этой системы, вызванной травмой, она обнаруживает тенденцию к восстановлению исходного паттерна. По-видимому, стабильное состояние достигается разными путями. Если не происходит активации клеточного размножения, то система позиционных значений видоизменяется, и обеспечивает процессы заживления раны и образования рубцовой ткани. Если же дестабилизация инициирует пролиферацию клеток, то в системе может восстановиться первоначальный паттерн позиционных значений, что повлечет за собой восстановление утраченного органа или его части. Так или иначе, при регенерации конечности воссоздается система межклеточных отношений, во многом сходная с той, которая формируется в процессе эмбрионального развития, но, вместе с тем, имеющая свои специфические особенности.

**Модель самоорганизации бластемы.** Дэвид Стокум предложил модель интеркалярной самоорганизации бластемы (Stocum, 1996, 2003). Согласно модели Стокума, на ампутационной поверхности конечности еще до появления заметных скоплений клеток бластемы, прежде всего, устанавливаются проксимальная и дистальная границы регенерата (рис. 22-9). Образующиеся позднее клетки бластемы заполняют промежуток между этими границами. Дистальная граница, по Стокуму, устанавливается в клетках, которые контактируют с АЭШ: действительно, эксцентричное смещение апикальной

шапочки ведет к изменению положения регенерата относительно остатка органа, а подсадка дополнительной АЭШ вызывает образование добавочной конечности. В результате локальных взаимодействий клеток бластемы устанавливаются промежуточные позиционные значения, так что восстанавливается весь последовательный их ряд от дистальной до проксимальной границы, равно как и ряд позиционных значений по окружности. Стокум полагает, что уже на ранних этапах формирования бластемы происходит детерминация всех отделов конечности. Вслед за этим происходит пролиферация и интеркалярный рост, в процессе которого и происходит восстановление конечности.

**Молекулярно-биологические механизмы дифференциации регенерата.** При регенерации конечности у аксолотля, также как и при нормальном ее развитии, выявлен проксимодистальный паттерн экспрессии Нох-генов, входящих в состав кластеров А и D (рис.22-7). Например, гены *HoxA-13* и *HoxD-13* у тритона экспрессируются только лишь в самой дистальной области регенерирующей конечности, тогда как область экспрессии генов *HoxA-9* и *HoxD-9* более обширна, и охватывает наряду с дистальными также и наиболее проксимальные участки. При мутации 5' "задних" генов нарушается развитие дистальных областей регенерата. Так, при мутации гена *HoxA-13* нарушается развитие кисти, а в случае мутации *HoxA-11* --- предплечья. При эмбриональном развитии экспрессия 3'- и 5'-генов имеет определенную последовательность инициации, так что 5'-гены, контролирующие дистальную область конечности, экспрессируются в последнюю очередь. В отличие от этого НохА-гены при регенерации конечности экспрессируются синхронно, независимо от их положения в молекуле ДНК. Такой тип экспрессии, естественно, предопределяет «дистальный» характер регенерата.

Таким образом, уже в ранней бластеме приходят в активное состояние Нох-гены, создающие код, необходимый для формирования *аутоподия*, наиболее дистальной части конечности. По мере формирования бластемы и роста регенерата, т.е. по мере удаления дистальной части конечности от плоскости ампутации, во вновь образующихся будущих проксимальных

участках регенерата, лежащих близ линии разреза, экспрессия дистальных Нох-генов последовательно выключается. Такой характер экспрессии, возможно, обусловлен тем, что источник фактора, инициирующего экспрессию Нох-генов, расположен в дистальной области конечности, и сродство "дистальных" Нох-генов к этому фактору ниже, чем у «проксимальных» генов, активация которых возможна и при незначительных его концентрациях.

Экспрессия проксимальных и дистальных Нох-генов через 1 день после ампутации и последующее ограничение зоны экспрессии дистальных генов областью аутоподия свидетельствует в пользу модели самоорганизации бластемы Стокума, постулирующей раннее возникновение дистальной границы регенерата.

Сопоставление особенностей экспрессии генов, которая наблюдается у хвостатых амфибий при заживлении раны на боковой поверхности тела и после ампутации конечности (регенерационная рана), обнаруживает идентичность начальных этапов этих процессов. Однако позднее выявляются существенные различия, свидетельствующие о специфике пути, ведущего к регенерации конечности. Через 24 часа после ампутации в регенерационной ране отмечается экспрессия генов *HoxA-9*, *HoxA-13* и *HoxD-10*, тогда как в латеральных ранах, где происходит лишь заживление и образование рубцовой ткани, экспрессии этих генов нет.

## **22.5. Роль нервной системы в процессах регенерации**

Хотя регенерация различных органов по многим параметрам часто похожа на процессы эмбрионального морфогенеза, все же есть целый ряд обстоятельств, придающих регенерации присущую только ей специфику. Среди этих обстоятельств на первый план выступают два: клеточные источники регенерации, и влияние на морфогенез со стороны тканей и регуляторных систем регенерирующего животного, которые, естественно, отсутствуют у развивающегося зародыша. В данном разделе рассматриваются данные о влиянии нервной системы.

Влияние нервной системы на регенерацию впервые было продемонстрировано Т. Тоддом еще в 1823 году, когда он, перерезая седалищный нерв, показал, что такая операция ингибирует регенерацию задней конечности хвостатых амфибий. Хотя позднее оказалось, что участие нервов не является универсальным условием регенерации и что некоторые структуры способны регенерировать и в отсутствие иннервации, тем не менее, наблюдения Тодда открыли новое направление исследования роли нервной системы для процессов регенерации и морфогенеза регенерирующих органов.

В ходе подробных исследований влияния нервной системы на регенерацию конечностей у хвостатых амфибий выяснилось, что этот процесс подразделяется на два этапа --- зависимый от нервной системы и независимый от нее. Оказалось, что формирование регенерационной бластемы, в отличие от более поздних стадий тканевой дифференциации и морфогенеза, зависит от наличия нервов в ампутированной конечности.

Перерезка нервов не препятствует эпителизации раны, развитию воспалительных явлений и гистолизу. Однако она ведет к подавлению фазы размножения дедифференцированных клеток. Если денервация проводится несколько позже, когда регенерационная бластема уже сформирована, то в регенерате, лишенном связи с нервной системой, происходит резкое снижение интенсивности пролиферации клеток бластемы. На завершающем этапе регенерации гистогенетические и морфогенетические процессы не зависят от иннервации.

Вскоре после ампутации конечности в область регенерата проникают многочисленные аксоны, отрастающие от перерезанных нервов. Оказалось, что как раневой эпителий, так и, в еще большей степени, область скопления дедифференцированных элементов снабжены большим количеством аксонов, образующих здесь обширную сеть. Позднее, когда начинается дифференциация тканей регенерата, эта сеть заменяется нервными волокнами, формируются концевые бляшки двигательных нервов, восстанавливаются синаптические соединения.

Специальные исследования, выполненные Зингером в 1940-х годах, показали, что трофический эффект нервов на пролиферацию в регенерирующей конечности не зависит от качественных особенностей нерва. Согласно его *количественной теории нервной регуляции*, действие и чувствительных, и двигательных нервов на регенерацию одинаково. Зингер предполагал (Singer, 1952), что имеется некое пороговое число нервных волокон, при котором возможна регенерация. Так, в конечности тритона на 1 мм<sup>2</sup> среза должно приходиться 1000 нервных волокон. Если число нервных волокон меньше этого значения, регенерация не произойдет.

В настоящее время выясняется, что действие нервной системы действительно обусловлено трофическими факторами, которые транспортируются по аксонам и доставляются, таким образом, в регенерат. По-видимому, эти факторы не являются строго специфичными для нервов. Например, у зародышей амфибий аналогичные трофические факторы продуцируются и в других --- не нервных --- тканях.

В качестве возможных трофических факторов регенерации рассматриваются факторы роста, аполипопротеины, белок, транспортирующий железо (трансферрин), некоторые гликопротеины, а также низкомолекулярные вещества, например, нуклеозиды и другие предшественники макромолекул. Так, предполагается, что важную роль при регенерации играют фибробластические факторы роста (FGF) и факторы роста глии (GGF, *glial growth factor*). Показано, что фибробластические факторы роста иммуноцитохимически выявляются как в двигательных, так и в чувствительных нервах, а при действии веществ, которые связывают FGF или соответствующие рецепторы, пролиферация мезенхимы бластемы регенерата заметно снижается. При денервации, а также при культивировании эксплантатов бластемы *in vitro*, экзогенные FGF стимулируют пролиферацию бластемы. Экспрессия FGF необходима для поддержания экспрессии гена *Dlx-3* в апикальном эпителии регенерата. Активность этого гена прекращается при денервации, но возобновляется при трансплантации в регенерат шарика, пропитанного FGF.

Поддерживающие пролиферацию тканей регенерата глиальные факторы роста (GGF) составляют семейство белков, которые являются продуктами

альтернативного сплайсинга про-иРНК одного и того же гена. Эти факторы регулируют пролиферацию, подвижность и апоптоз Шванновских клеток.

Роль трансферрина состоит в доставке в регенерат ионов железа, которые входят в состав многих жизненно необходимых ферментов. Методом иммуносорбции трансферрина или путем хелатирования железа в экстрактах из нервов снимается способствующее пролиферации действие этих экстрактов. Наоборот, добавление ионов железа или трансферрина восстанавливает эту способность. Если в бластеме денервированной конечности имплантировать сефарозные шарики с трансферрином, то в клетках поддерживается синтез ДНК.

По-видимому, на ранних этапах формирования бластемы регенерата, когда поступление трансферрина в регенерат по кровеносным сосудам еще невозможно из-за их отсутствия, именно транспорт трансферрина по нервным отросткам восполняет потребность в ионах железа для нормального функционирования ферментов, обеспечивающих пролиферацию. Как полагают, аксоны регенерирующих нервов в ранней бластеме функционально заменяют кровеносные капилляры, и снабжают эту область некоторыми критическими белками и низкомолекулярными соединениями. После образования в регенерате сети кровеносных капилляров, нервные волокна теряют свое исключительное значение как источники этих веществ, важных для поддержания высокого уровня клеточной репродукции.

Роль нервной системы в процессах регенерации впервые была обнаружена еще в начале 20-го столетия, когда Т. Морган, исследуя эпиморфную регенерацию у олигохеты *Eisenia foetida*, в 1902 г. установил, что предварительное удаление брюшной нервной цепочки в области ампутации предотвращает регенерацию головного отдела червя. Наличие хотя бы двух сегментов с нервными ганглиями, расположенных каудальнее относительно линии разреза, сохраняло присущую этим аннелидам способность к регенерации.

Впоследствии эти наблюдения были подтверждены другими исследователями. При разрушении нервной цепочки всегда происходило подавление регенерации головы. Если же операция производилась так, что нервные волокна все же

подрастали к раневой поверхности, то восстанавливалась и регенерационная способность. Впрочем, эта закономерность не имеет универсального характера: у полихеты *Spirographis* головной отдел регенерирует и в отсутствие нервной системы, хотя регенерация хвостового отдела обнаруживает строгую зависимость от наличия нервов.

Влияние нервной системы на регенерационную способность у червей объясняют действием *нейрогормонов*, например, ацетилхолина и др. Оказалось, что удаление надглоточного ганглия препятствует регенерации хвостового отдела полихеты *Nereis diversicolor*. После ампутации хвоста в надглоточном ганглии накапливается нейрогормон, который необходим для начала регенерации. Этот вывод следует из опыта, в котором надглоточный ганглий полихеты с ампутированным задним отделом трансплантировали в день ампутации или спустя 2-3 дня реципиенту, у которого наряду с ампутацией хвоста удаляли также и надглоточный ганглий, потенциальный эндогенный источник нейрогормона (рис.22-8). Лишенный головного мозга реципиент сам по себе не был способен регенерировать хвост. Трансплантация надглоточного ганглиев в день ампутации хвоста донора не восстанавливала регенерационную способность. Однако спустя 2-3 дня после ампутации надглоточный ганглий приобретал способность при трансплантации в целомическую полость реципиента инициировать восстановительные процессы заднего отдела червя (рис.22-8).

Интригующими остаются наблюдения, сделанные еще в 1965 г. Киортсисом и Морету (Kiortsis, Moraitou, 1965). Они перерезали нервную цепочку у полихеты *Spirographis*, а ее перерезанные концы отводили к поверхности тела. Эта операция вызывала новообразование терминальных областей тела, а именно, остающийся впереди конец нервной цепочки, который после перерезки становился задним концом, индуцировал образование хвостового отдела, тогда как новообразованный передний конец цепочки стимулировал образование головного отдела (рис.22-9). Стимуляция морфогенетических процессов отведенными нервами не ограничивается лишь типом Аннелид. Впервые это явление было описано итальянской исследовательницей П. Локателли в 1929 г, которая наблюдала развитие добавочных конечностей у бесхвостых амфибий



при отведении перерезанного нерва конечности к основанию последней. При безусловном сходстве результатов обнаружилось заметные различия между полихетами и амфибиями. В отличие от полихет, у которых на первый план выступает специфика активатора морфогенетического процесса, у амфибий специфика добавочных органов была обусловлена, в первую очередь, особенностями области тела, в которую отводился нерв. Выяснилось, что разные области тела животного --- территории конечности, плавника, хвоста, морды--- имеют различные морфогенетические потенциалы, в связи с чем их иногда называют *регенерационными* или *морфогенетическими территориями*. Отведение нервов в разные морфогенетические территории при определенных условиях инициирует морфогенез органов, присущих данной области тела. О тонких механизмах этих морфогенетических процессов сведений практически нет, хотя известно, что отведение нерва в регенерационную территорию сказывается на интенсификации экспрессии Нох-генов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Воронцова М. А. Регенерация органов у животных// "Советская наука". М. 1949. 270 с.
- Воронцова М. А., Лиознер Л. Д. Бесполое размножение и регенерация// "Советская наука". М. 1957. 416 с.
- Канаев И. И. Абрам Трамбле (1710-1784)// Изд. Наука, Л-д. 1972. 130 с.
- Карлсон Б. М. Регенерация// Изд. Наука. М. 1986. 296 с.
- Короткова Г. П. Регенерация животных// Изд. СПб Ун-та. 1997. 479 с.
- Миташов В. И., Лукьянов С. А., Казанская О. В. и др. Молекулярно-биологические подходы в исследованиях экспрессии генов в процессе регенерации// Изв. АН. Сер. биол. 1995. №3: 280-284.

Мэттсон П. Регенерация --- настоящее и будущее// Изд. Мир. М. 176 с.

Хэй Э. Регенерация // Изд. Мир. М. 1969. 154 с.

Fushjisawa T. Hydra regeneration and epitheliopeptides.// Developmental Dynamics. 2003. V. 226. P.182-189.

Nye H. L. D., Cameron J. A., Chernoff E. A. G., Stocum D. L. Regeneration of the Urodele limb: a review// Developmental Dynamics. 2003. V. 226. P.280-294.

Slack J. M. W. Regeneration research today// Developmental Dynamics. 2003. V. 226. P.162-166

## ГЛАВА 23. ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА

В мире живого размножение или репродукция особей является главным биологическим процессом, которому подчинены все остальные --- частные --- процессы. Можно сказать, что жизнь началась тогда, когда возникли молекулы-репликаторы, способные к самовоспроизведению (Р. Докинз, 1993). Способность к самовоспроизведению --- важнейшая особенность живых систем.

Известны разные формы репродукции многоклеточных животных: *бесполое* (вегетативное) и *половое размножение*. Бесполое размножение предполагает деление родительской особи, ее почкование или фрагментацию. При бесполом размножении генотип потомства остается идентичным генотипу родительской особи. Для половой репродукции характерно возникновение генетического разнообразия, которое обусловлено смешиванием геномов при соединении гамет и генетической рекомбинацией, происходящей в процессе мейоза при формировании половых клеток. Отличительной особенностью половой репродукции является чередование гаплоидных и диплоидных поколений или фаз, а также наличие двух взаимодействующих специализированных половых клеток, репрезентирующих две особи, участвующие в процессе размножения.

Главным стратегическим направлением эволюции размножения является половая репродукция, которая способствует более быстрому и эффективному закреплению благоприятных аллелей в популяциях животных или растений (рис. 23-1).

У одноклеточных гаметам служат сами видоизмененные особи, поэтому при соединении гамет собственно размножения не происходит и в этом случае уместней говорить просто о половом процессе. У многих простейших происходит копуляция (от лат. *copulo* --- связывать), или слияние половых особей. Для инфузорий характерно временное объединение, во время которого происходит обмен генетическим материалом --- конъюгация (от лат. *conjungo* -- соединять).

Наиболее простой формой полового процесса является *гомогамная копуляция*, для которой характерно почти полное отсутствие специализации гамет, которые

морфологически не отличаются ни друг от друга, ни от вегетативных особей. При *мерогамной копуляции* имеет место цикл превращений вегетативных особей, или гаметогенез. При парной мерогамии образуются две половые клетки, множественная мерогамия характеризуется появлением большого количества гамет.

У многоклеточных животных специализированные половые клетки --- гаметы образуются, как правило, в большом числе. Для одноклеточных водорослей, грибов и многих простейших животных характерна *изогамия*, при которой гаметы не имеют видимых морфологических различий, но разнятся лишь по физиологическим и биохимическим свойствам. Многоклеточные животные отличаются четко выраженной *гетерогамией* или специализацией двух типов гамет. Для Metazoa характерна так называемая *оогамия*, при которой образуются высокоспециализированные яйца и сперматозоиды, которые заметно различаются своей формой, размерами и физиологией.

**Сексуальность.** Мужские и женские особи --- это индивиды, производящие соответственно мужские и женские гаметы, и в этом смысле признаки пола особи вторичны относительно пола гамет. Процессы детерминации свойств гамет обычно называют *первичной детерминацией пола*. Подразделение на мужские или женские особи или *сексуальность* --- один из наиболее фундаментальных признаков жизни (В.А. Догель, 1951).

Под признаками пола особи понимается совокупность морфологических, физиологических и поведенческих приспособлений, которые обеспечивают половой процесс. К таким признакам относятся наличие определенного типа гонад; наличие органов, обеспечивающих поддержание жизнеспособности, а затем и выведение половых клеток из организма; форма тела, окраска, голос, поведение и др. Своеобразие признаков, характеризующих пол, состоит в их альтернативном характере. Гаметы, органы, поведение могут иметь черты, типичные для мужского или для женского организма, т.е. всегда имеются, по крайней мере, две программы дифференциации и морфогенеза, включение которых обеспечивается альтернативными сигналами. Из сказанного видно, что проблема определения пола в онтогенезе многогранна. Действительно, в ходе

этого процесса координировано детерминируются свойства половых клеток, гонад, половых и иных органов, включая органы центральной нервной системы. Отсюда следует, что детерминация пола затрагивает разные уровни организации особи и осуществляется на разных стадиях онтогенеза, а это неизбежно предопределяет многообразие конкретных механизмов, лежащих в основе детерминации пола.

**Гермафродитизм и гонохоризм.** У животных имеются виды, особи которых имеют и мужские и женские гонады. В этих случаях принято говорить о *гермафродитизме* (рис 23-2). Гермафродитизм бывает *синхронный*, когда мужские и женские гонады функционируют одновременно, и *последовательный*. В последнем случае различают *протандрический гермафродитизм*, при котором особь сначала функционирует как самец, или *протогинный гермафродитизм*, если особь сначала функционирует как самка.

Гермафродитизм широко распространен в природе. Гермафродитные формы характерны для аннелид, моллюсков, ракообразных, для некоторых рыб и амфибий. У полихет более 20 семейств имеет гермафродитные формы. В качестве примера можно привести данные о гермафродитизме полихеты *Ophryotrocha puerilis*. Эти черви являются протандрическими гермафродитами. В молодом возрасте они выступают как мужские особи. При достижении определенных размеров у них начинается выработка оотропного нейрогормона, который переключает генетический механизм определения пола на «женскую» программу (рис. 23-2). Это событие можно задержать в условиях подавления роста голоданием или регулярным удалением задних сегментов. Лабильность детерминации пола у *O. puerilis* проявляется также и в том, что при действии *феромона* (от греч. φέρω --- нести; ὀρμάω --- возбуждать) самки другая женская особь может превратиться в самца (рис. 23-3).

Очень многие виды представлены, однако, однополыми индивидами. В этих случаях говорят о *гонохоризме* (гонохоризм от греч. γονή --- семя; ὀρισμός --- ограничение) животных или о двудомности растений. Наличие особей двух полов или *половой диморфизм* проявляется не только в существовании двух типов гонад. Самцы и самки имеют существенные различия в строении органов

выведения половых клеток и других половых органов, очень часто они различаются формой тела, окраской, голосом и поведением.

**История проблемы.** Вплоть до конца 19-го столетия проблема детерминации пола была областью процветания разного рода спекуляций, восходящих к наивным представлениям Аристотеля (384 - 322 г. до н. э.) об определяющей роли факторов внешней среды. Согласно воззрениям этого великого естествоиспытателя, развитие пола у человека зависит от температуры. Для детерминации мужского пола требуется относительно высокая температура. Если же она недостаточно высока, то образуется особь женского пола, которая, с точки зрения Аристотеля, является недоразвитой особью мужского пола. Те же по существу идеи развивал и Гален из Пергама (130-200 гг.). Представления о несовершенстве женского пола были поколеблены знаменитым анатомом Везалием из Падуи. Детальное исследование анатомии половых органов человека (1543) привело к утверждению альтернативности мужских и женских половых органов, развивающихся из тождественных зачатков. В отношении факторов, определяющих пол особи, даже на рубеже 19-го и 20-го столетий господствовали представления, связывающие пол ребенка с конституцией, возрастом, характером питания и условиями обитания родителей. Полагали, что факторы, способствующие накоплению питательных веществ или энергии, детерминируют женский пол, тогда как факторы, способствующие потреблению энергии, детерминируют мужской пол.

Переоткрытие законов Менделя на рубеже столетий и утвердившееся в 1890-х годах учение о хромосомах создали реальные предпосылки для научного анализа процессов детерминации пола. Исследование проблемы постоянства числа хромосом в клетках разных животных обнаружило, что у некоторых насекомых животные разного пола имеют неодинаковое число хромосом. Например, у клопа-солдатика *Pyrrhocoris apterus* и у клопа *Protenor belfragi* мужские особи имеют нечетное число хромосом: на одну хромосому меньше, чем женские особи. У других представителей полужесткокрылых обнаружилось, что самцы имеют то же число хромосом, что и самки, но одна

пара хромосом представлена у них резко различающимися формами - большой (X) и маленькой (Y), тогда как у самок имелись две одинаковые X хромосомы.

У этих животных при гаметогенезе в результате редукционных делений возникает два типа мужских гамет с различным набором хромосом (*мужская дигаметия*). В одном случае (тип Progenitor) половина мужских гамет содержит X хромосому, тогда как другая половина гамет не имеет этой хромосомы. Дигаметия другого рода (тип Lygaeus) характеризуется наличием в мужских гаметах либо X, либо Y хромосомы. Естественно, что гаметы женских особей у этих животных по своему хромосомному составу не различаются. Таким образом было установлено, что пол может быть *гетерогаметным* или *гомогаметным*. Так как у мужских особей соотношение двух видов гамет X:Y=1:1 или X:0=1:1, а число особей мужского и женского пола одинаково, возникло предположение, что именно эти различающиеся хромосомы или *гетерохромосомы* связаны с определением пола в онтогенезе, тогда как имеющие гомологов *аутосомы* играют в этом процессе вторичную роль.

Помимо мужской дигаметии (M=XY; Ж=XX) известна и женская. В случае женской дигаметии, которая наблюдается, например, у бабочек, рыб и птиц, гетерохромосомы условились обозначать буквами W, Z (M=ZZ, Ж=WZ).

Следующий принципиально важный шаг в понимании роли половых хромосом был сделан Донкастером (1908), который открыл наследственность, сцепленную с полом. При скрещивании двух рас крыжовниковой пяденицы *Abraxas grossulariata* он обнаружил «крис-крос» наследование, при котором дочери приобретают признаки отца, а сыновья --- признаки матери. Он предположил, что такой тип наследования должен возникать в тех случаях, когда гомогаметный пол гомозиготен по рецессивной мутации, сцепленной с половой хромосомой (рис. 23-4). Исследование Донкастера было чисто теоретическим доказательством существования половых хромосом, так как оно не содержало цитологических свидетельств в пользу такого утверждения. Окончательное решение этой проблемы принадлежит Моргану (1909), который исследовал закономерности наследования рецессивного признака белоглазости *white* (w) у Дрозофилы. В отличие от бабочек с большим числом мелких

хромосом Дрозофила имеет лишь четыре пары хромосом. При этом половые гетерохромосомы X и Y хорошо идентифицируются. Эта особенность генотипа Дрозофилы позволила Моргану представить неоспоримые данные о корреляции наследования сцепленного с полом признака с наличием особой половой хромосомы.

Доказательство существования половых хромосом в геноме животных явилось поворотным пунктом в понимании процессов детерминации пола. Тем не менее расшифровка конкретных молекулярных механизмов определения пола оказалась весьма непростой задачей. В настоящее время сравнительно полное представление об этих процессах получено в отношении лишь нескольких объектов, среди которых следует назвать, прежде всего, Дрозофилу, *Caenorhabditis elegans*, и некоторых представителей высших млекопитающих, включая человека, т.е. объекты с относительно хорошо изученной генетикой. Насколько позволяют судить имеющиеся данные, конкретные механизмы детерминации пола весьма разнообразны. Так, у насекомых определение пола осуществляется не только с помощью половых хромосом XY или ZW, но и в зависимости от пloidности гамет, с помощью доминантных детерминаторов мужского или женского типа. Даже у одного вида *Musca domestica* детерминация пола обеспечивается как половыми хромосомами, так и без них, с помощью транспозируемого элемента, а также доминантным геном женского пола. Вместе с тем обнаружилась относительная простота генетических механизмов детерминации пола, которые представляют собой скорее линейные последовательности, каскады, а не разветвленные сети, как регуляторные процессы многих морфогенетических процессов. Эти два обстоятельства --- относительная простота и разнообразие механизмов --- делают проблему детерминации пола особенно привлекательной для эволюционной биологии развития, разрабатывающей общие вопросы становления и эволюции механизмов морфогенеза.

### **23.1. Механизмы определения пола у насекомых**

**Молекулярно-генетические аспекты детерминация пола у Дрозофилы.** Скрещивая триплоидных самок Дрозофилы с диплоидными самцами, Бриджес в



1920-х годах получил мух с разным числом половых хромосом и аутосом (рис. 23-5). При этом оказалось, что пол потомков коррелирован с половым индексом ( $I_p$ ), т.е. с отношением числа X хромосом к числу наборов аутосом ( $I_p = N_X/S_A$ , где  $N_X$  число X хромосом, а  $S_A$  число наборов аутосом). При индексе, равном или превышающем единицу, особи были женского типа. При индексе, равном или меньшем 0,5, особи были мужского пола (Таблица 1). Промежуточные значения между 1 и 0,5 были характерны для интерсексов, которые обладают признаками и женского, и мужского пола.

ТАБЛИЦА 1. ПОЛОВОЙ ИНДЕКС *DROSOPHILA MELANOGASTER*,  
(♂ XY, ♀ XX)

ПОЛ	ПЛОИДНОСТЬ	СТРУКТУРА ГЕНОМА	ИНДЕКС X:A
Самцы	Диплоидные	XY, 2A	0,5
		X0, 2A	0,5
Самки	Диплоидные	XX, 2A	1,0
	Триплоидные	XXX, 3A	1,0
	Тетраплоидные	XXXX, 4A	1,0

Полученный результат, свидетельствующий о том, что направление дифференциации пола зависит от соотношения числа X хромосом и аутосом, открыл путь для расшифровки механизмов, контролирующих этот процесс. Оказалось, что Y хромосома у Дрозофилы не связана с детерминацией пола. Животные с генотипом X,0, у которых половой индекс не превышает 0,5, дифференцировались как самцы. Однако эти самцы стерильны, поскольку без Y хромосомы сперматогенез не происходит. Данные об определении пола в соответствии с половым индексом обнаруживают условность понятия «половая хромосома» и подчеркивают важность для детерминации пола генов аутосом. Важной особенностью определения пола у Дрозофилы и, по-видимому, у других насекомых является автономный, «клеточный» уровень решения проблемы. На клеточный характер детерминации пола у дрозофилы указывает явление *гинандроморфизма*, о котором говорилось в главе 18.

Современные исследования показали, что половой индекс определяется соотношением генопродуктов --- белков, экспрессия которых контролируется генами X хромосомы и генами аутосом. Первые иногда называют генами числителя или *генами-нумераторами* (от англ. numerator --- числитель), вторые генами знаменателя или *генами-деноминаторами* (от англ. denominator --- знаменатель).

Среди генов числителя известны *sisterless-a (sis-a)*, *sisterless-b (sis-b)*, а также *runt*, белки которых являются транскрипционными факторами. Включая экспрессию гена *sexlethal*, они непосредственно инициируют женский путь детерминации пола. Важную роль в активации этого пути выполняет и ген *daughterless (da)*, который одновременно служит одним из элементов механизма дозовой компенсации. У особей женского пола с двумя X хромосомами белок Да снижает скорость транскрипции на X хромосомах. При отсутствии белка Да высокая скорость транскрипции на X хромосомах приводит к гибели животных, с двумя такими хромосомами.

Факторы «знаменателя» представлены продуктами, синтезируемыми под контролем генов аутосом. Известно несколько таких генов - *deadpan*, *her*, *etc*, *gro*, активность которых достаточна, чтобы при некоторых условиях погасить раннюю экспрессию гена *sexlethal*. В этих условиях открывается путь для детерминации мужского пути развития.

Механизм детерминации женского и мужского пола у Дрозофилы основан на альтернативном сплайсинге трех генов - *sexlethal*, *transformer* и *doublesex*, которые образуют иерархическую цепочку. Транскрипционная активность каждого из этих генов благодаря альтернативному сплайсингу может реализоваться в синтезе двух различных белков, один из которых обеспечивает развитие по женскому пути, а другой --- по мужскому.

Ген *sexlethal* имеет два промотора, а именно промоторы ранней и поздней транскрипции (рис. 23-6). Ранний промотор взаимодействует с транскрипционными факторами в первые часы после оплодотворения. Он активируется факторами, которые синтезируются в достаточном количестве в

клетках с половым индексом  $I_p \geq 1$ . В результате ранней транскрипции *sexlethal* образуется про-иРНК, в ходе сплайсинга которой вместе с интронами вырезается и второй экзон, содержащий стоп-кодон UGA. На основе этой иРНК у особей с женским генотипом синтезируется белок Sexlethal (Sxl). Этот белок участвует в сплайсинге про-иРНК *sexlethal*, которая на более поздних стадиях транскрибируется с позднего промотора. При наличии белка Sxl и в этом случае второй экзон вырезается, благодаря чему в клетке поддерживается синтез нормально функционирующего белка Sxl.

У особей с мужским генотипом ранняя экспрессия гена *sexlethal* не происходит. Относительно большое количество факторов, синтезируемых под контролем генов аутосом, не дает возможности белкам *sis* и другим факторам X хромосомы, инициировать раннюю экспрессию гена *sexlethal*. В этом случае на той стадии, когда включается конститутивная экспрессия этого гена под поздним промотором, сплайсинг соответствующей про-иРНК происходит в отсутствие белка Sexlethal. В этом случае второй экзон остается в составе иРНК и при последующей трансляции она тотчас обрывается на стоп-кодоне (рис. 23-6). Благодаря этому функционально полноценного белка Sexlethal не образуется: если у генетически женских особей белок *Sxl* состоит из 354 аминокислотных остатков, то у мужских --- всего из 48.

Белок Sxl женского типа ( $Sxl^F$ ) представляет собой ядерный РНК-связывающий белок с двумя областями связывания: одна из них обеспечивает сплайсинг *Sxl*, а другая обеспечивает участие этого белка в процессинге про-иРНК *transformer1*. Этот ген состоит из трех экзонов (рис. 23-7). В начале второго и в третьем экзонах имеются стоп-кодоны, останавливающие трансляцию. При наличии белка  $Sxl^F$  сплайсинг про-иРНК *tra1* проходит таким образом, что вместе с интроном вырезается и часть второго экзона, содержащая стоп-кодон. В результате образуется иРНК, дающая полноценный белок Tra1. Если белок  $Sxl^F$  отсутствует, сплайсинг проходит обычным способом и образуется иРНК со стоп-кодонами в начальной области молекулы. В этом случае, т.е. у особей с мужским генотипом, образуется лишь небольшой, усеченный полипептид, который не имеет видимой функции и вскоре после синтеза дегенерирует. Итак, существенное различие между клетками женской и мужской природы

Дрозофилы состоит в том, что только первые, но не вторые, синтезируют белок Tra1.

Белок Tra1 представляет собой фактор альтернативного сплайсинга последнего продукта цепочки --- гена *doublesex*. Про-иРНК *doublesex* состоит из шести экзонов, четвертый и пятый из которых содержит стоп-кодоны. Белок Tra1 вместе с белком Tra2 образует комплекс, благодаря которому предотвращается вырезание четвертого экзона. В присутствии этого комплекса образуется иРНК *doublesex*, которая представлена последовательностями, соответствующими первым четырем экзонам. В клетках с мужским генотипом, где белок Tra1 отсутствует, четвертый экзон вырезается. В результате в клетках мужской и женской природы синтезируются различные белки Doublesex: специфический «мужской» белок Dsx<sup>M</sup> и специфический «женский» белок Dsx<sup>F</sup> (рис. 23-8). Наличие Dsx<sup>M</sup> препятствует развитию женского фенотипа и обеспечивает развитие мужских гениталиев. Белок Dsx<sup>F</sup>, напротив, способствует развитию женской половой сферы и блокирует развитие мужского фенотипа. Ген *doublesex* играет важную роль не только в период детерминации пола, но и позднее, на стадиях, когда начинается вителлогенез. Показано, в частности, что Dsx<sup>F</sup> в период оогенеза важен для экспрессии генов, обеспечивающих синтеза вителлогенина, тогда как белок Dsx<sup>M</sup> блокирует этот синтез. Интересно, что и тот и другой белок связываются с геном *yolk protein*, но оказывают на него --- один (Dsx<sup>F</sup>) активирующее, а другой (Dsx<sup>M</sup>) --- ингибирующее действие.

В заключение следует обратить внимание на то, что у *D. melanogaster* координация различных аспектов детерминации пола, связанных с детерминацией тканей и органов, ЦНС, с обеспечением оогенеза и дозовой компенсации, обеспечивается тем, что все эти пути инициируются геном *Sxl* (рис. 23-9).

**Гаплодиплоидная детерминация пола.** У многих перепончатокрылых (муравьи, пчелы, осы и др.) детерминация пола связана с плоидностью зародыша. Самки обычно развиваются из диплоидных зародышей, самцы --- из гаплоидных. У медоносной пчелы, например, из оплодотворенных яиц развиваются две разновидности особей женского пола --- рабочие пчелы,

оогенез у которых подавлен, и откладывающие яйца матки. Эти различия между рабочими пчелами и маткой обеспечиваются фенотипически за счет особого выкармливания и воспитания личинок. Из неоплодотворенных яиц партеногенетически развиваются самцы (трутни). Такой вид партеногенеза, при котором возникают мужские особи, носит название *аррентокического* (от греч. *ἀρρενικός* --- мужской; *τόκος* --- роды). Исходная гаплоидность первичных половых клеток трутней обуславливает ряд особенностей сперматогенеза. В частности, отсутствует мейотическая конъюгация хромосом и происходит только эквационное деление сперматоцитов, образующих при этом только две сперматиды. Изредка встречающийся у медоносной пчелы диплоидный партеногенез называют женским или *телитокическим* (от греч. *τῆλις* --- девица; *τόκος* --- роды), т.к. в этом случае образуются женские особи.

Известны случаи, когда гаплоидизация, как фактор детерминации мужского пола у перепончатокрылых, возникает не только в результате партеногенетического развития неоплодотворенных яиц, но может достигаться и как следствие активной элиминации хромосом после оплодотворения. Так у одной из хальцидид *Nasonia vitripennis* обнаружена передаваемая по мужской линии сверхчисленная хромосома «полового соотношения» (PSR, *paternal sex ratio chromosome*), наличие которой обуславливает элиминацию всех отцовских аутосом. Благодаря этому зародыши становятся гаплоидными и развиваются как мужские особи.

Диплоидный женский партеногенез встречается у многих животных как обязательный элемент сложного цикла, обеспечивающий быстрое возрастание числа самок в популяции. Диплоидность при этом поддерживается либо за счет выпадения редукционного деления (*амейотический партеногенез*), либо (реже) за счет восстановления диплоидного числа хромосом путем воссоединения хромосом женского пронуклеуса и сливающегося с ним направительного тельца (*амфимиктический партеногенез*). Нетрудно заметить, что диплоидное партеногенетическое развитие ведет к возникновению особей женского пола в случае гетерохромосомного механизма определения пола независимо от того, является ли гетерогаметным женский или мужской пол (рис. 23-10).

**Детерминаторы пола.** У осы *Habrobracon juglandis* наряду с гаплоидными самцами и диплоидными самками в популяции имеются диплоидные стерильные самцы. Предполагается, что определение пола у этих насекомых происходит с помощью нескольких аллелей --- детерминаторов пола. У данного вида насчитывают девять аллелей: Xa, Xb, Xc, Xd... и т. д. Осы, гетерозиготные по любым двум аллелям детерминаторов (Xa/Xb, Xa/Xc, Xb/Xc...), развиваются как женские особи. Гемизиготные гаплоидные особи (Xa, Xb, Xc...) развиваются как нормальные самцы, тогда как диплоидные гомозиготные особи (Xa/Xa, Xb/Xb, Xc/Xc...) развиваются как стерильные самцы.

**Детерминация пола у бабочки *Bombyx mori*.** Гены-детерминаторы, по-видимому, участвуют в определении пола и у бабочек. Выдающимся российским эмбриологом Б. Л. Астауровым (19 - 19NB) были подробно изучены разнообразные по плоидности формы тутового шелкопряда *Bombyx mori* с разным составом половых хромосом (Таблица 2; Астауров, 1966). Оказалось, что развитие самок независимо от плоидности происходит лишь в тех случаях, когда в геноме имеется хотя бы одна W-хромосома. Б. Л. Астауров предполагал, что W-хромосома тутового шелкопряда содержит доминантные гены-детерминаторы женского пола. Аналогичный механизм предполагается и у непарного шелкопряда *Lymantria dispar*.

Понимание цитогенетики детерминации пола стало более полным после экспериментов Астаурова по управлению соотношением полов в потомстве тутового шелкопряда. Помимо теоретического интереса эти исследования, выполненные на шелковичном черве, имели практический смысл, так как у самцов шелконосность примерно на 25-30% выше, чем у самок. Схема эксперимента

ТАБЛИЦА 2. ПОЛОВОЙ ИНДЕКС У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА  
*BOMBYX MORI*, ♂ ZZ, ♀ZW (По Б. Л. Астаурову, 1966)

Пол	Плоидность	Структура генома	Индекс Z:A
Самцы	диплоидные	ZZ, 2A	1,0
	триплоидные	ZZZ, 3A	1,0

	тетраплоидны е	ZZZZ, 4A	1,0
Самки	диплоидные	ZW, 2A	0,5
	триплоидные	ZZW, 3A	0,67
		ZWW, 3A	0,33
	тетраплоидны	ZZZW, 4A	0,75
	е	ZZWW, 4A	0,5

Астаурова по изменению соотношения полов за счет селекции жизнеспособных особей включала три основных этапа (рис. 23-11). Сначала облучали рентгеновскими лучами самок, и получали летальные мутации в их Z-хромосоме ( $Z^*$ ). Затем скрещивали мутантных самок  $Z^*W$  с нормальными самцами ZZ. В потомстве все самцы были гетерозиготными ( $Z^*Z$ ), так как в одной из их Z-хромосом были летальные мутации. Скрещивание этих гетерозиготных самцов-носителей летали с нормальными самками дало в потомстве равное соотношение животных, имеющих следующие типы половых хромосом ---  $ZW : Z^*W : Z^*Z : ZZ$ . 50% женских особей, или 25% популяции, погибало из-за летальной мутации в Z-хромосоме. Гетерозиготные самцы с летальными генами в Z-хромосоме выживали благодаря наличию второй нормальной Z-хромосомы. В итоге соотношение числа самцов и самок в потомстве было в два раза выше (2:1), чем в нормальной популяции (1:1). За счет ранней элиминации менее продуктивных женских особей расходы на выкармливание гусениц шелкопряда существенно сокращались.

**Модель сохраняемого коренного пути.** Сопоставляя разнообразные механизмы детерминации пола у разных насекомых, Рольф Нётингер и Моника Штейнман-Цвикки (No[umlaut]thing, Steinmann-Zwicky, 1985) высказали гипотезу о путях формирования разнообразных способов детерминации пола на общей основе за счет изменения отдельных элементов регуляторной системы (рис.23-8). В основе гипотезы лежит допущение, что у всех насекомых существует один и тот же *коренной путь детерминации пола* в виде каскада от гена *Sxl* к гену *Dsx*. Второе допущение состоит в том, что главным регулятором *Sxl* в геноме насекомых служит ген *R/r*. Доминантный аллель *R* кодирует репрессор R, который выключает *Sxl*. При наличии рецессивного аллеля *r*

образуется неактивный репрессор, в этом случае ген *Sxl* экспрессируется (рис. 23-12, А). Это анцестральное состояние видоизменяется в разных группах насекомых. Механизм детерминации пола, описанный у Дрозофилы, возникает, согласно предположению этих авторов, благодаря тому, что X хромосома посредством белков, кодируемых ее генами, "титрует" репрессор R. Если белков, инактивирующих R много, как в случае генома 2X/A, то функция репрессора подавляется. В этих условиях ген *Sxl* включается и тем самым запускается механизм детерминации женского пола. Если же этих белков мало, что имеет место в геноме типа X/A, то репрессора R достаточно, чтобы подавить активность *Sxl* и включить мужской путь детерминации пола (рис. 23-12, Б). В том случае, если аллель R имеется только в Y хромосоме, возникает механизм мужского детерминанта (рис. 23-12, В), поскольку в этом случае репрессия *Sxl* будет происходить только при наличии Y хромосомы. Фенотипическое определение пола возникнет в том случае, если произойдет мутация R, после которой он будет полноценно функционировать только при определенных условиях среды. Если активность R будет протекать нормально только при низкой температуре, то и детерминация мужского пола будет происходить при низкой температуре (рис. 23-12, Г). При более высокой температуре, когда активность R нарушается, т. е. когда *Sxl* не будет инактивирован, произойдет включение путей детерминации женского пола. Наконец, эта гипотеза дает объяснение, каким образом происходит детерминация пола на основе аллельного состояния *Sxl*. При мутации *Sxl* сочетания *Sxl*<sup>-</sup>/*Sxl*<sup>-</sup> всегда дадут мужской пол, а *Sxl*<sup>+</sup>/*Sxl*<sup>-</sup> или *Sxl*<sup>+</sup>/*Sxl*<sup>+</sup> --- всегда женский (рис.23-12, Д).

### **23.2. Молекулярно-генетические аспекты детерминации пола у нематоды *Caenorhabditis elegans*.**

Среди нематод имеются виды-гонохористы и гермафродитные формы. У *C. elegans* особи обычно представлены двумя формами: самцами и гермафродитами, хотя у близких видов имеются не гермафродиты, а самки. Дигаметными являются особи мужского пола с одной половой хромосомой (X0). В геноме гермафродитных особей имеются две X хромосомы. Гермафродитизм *C. elegans* последовательный: в качестве самцов особи XX



выступают на стадии личинки. По мере развития такие особи превращаются в самок. Очевидно, однако, что одна X хромосома в расчете на диплоидный геном недостаточна для формирования женской гонады и иных женских репродуктивных органов. Наличие двух X хромосом создает предпосылки развития женского фенотипа, не препятствуя, однако, развитию семенника, что, возможно, обусловлено особыми механизмами инактивации одной из X хромосом на ранних стадиях развития. При самооплодотворении подавляющее большинство потомков (99.8%) --- это гермафродиты с генотипом XX, тогда как после спаривания самцов и гермафродитных самок соотношение мужских особей (М) и гермафродитов (Гф) среди потомков, как и следует, ожидать, М: Гф = 1:1. Неравное отношение особей разного пола в потомстве при самооплодотворении может служить указанием на известную неполноценность мужских гамет, формирующихся в семенниках особей с генотипом XX.

У *C. elegans* выявлен каскад генов, состоящий, по крайней мере, из шести ступеней: *xol-1*— *sdn-1*— *her-1*— *tra-2*— *fem-1*— *tra-1* (рис. 23-13). Экспрессия генов каждой из этих ступеней отрицательно отражается на экспрессии генов следующей ступени. При этом негативное действие может происходить как на уровне экспрессии собственно гена, так и на уровне функционирования соответствующих белков (негативное взаимодействие белков). В результате такой организации каскада проявляют свою функциональную активность либо белки нечетных ступеней (1-ой, 3-ей, 5-ой), либо белки четных ступеней (2-ой, 4-ой, 6-ой).

Поскольку при половом индексе  $X/A=1$  образуются гермафродиты, а при  $X/A=0,5$  --- самцы, очевидно, что у *C. elegans* должны существовать гены-номинаторы, активные в X хромосоме. Действительно было выявлено несколько генов, регуляторов первого элемента каскада, причем 16 таких генов находятся в аутосомах, а 2 в X хромосоме. Один из этих двух генов-номераторов X хромосомы носит название *signal element of the X*, или *sex-1*.

Экспрессия гена 1-ой ступени *xol-1* (*XO-lethal-1*) зависит от количества белка, синтез которого контролируется геном *sex-1*. Полагают, что при наличии двух X хромосом белка Sex-1 в два раза больше, чем в клетках с генотипом XO.

Образующиеся в случае высокой концентрации белка Sex-1 димеры Sex-1/Sex-1, связываясь с промотором гена *xol-1*, обуславливают низкий уровень его транскрипции (рис. 23-14). Если белка Sex-1 мало, то образование транскриптов не тормозится, и в клетке образуется большое число молекул белка Xol-1 (рис. 23-15). Поскольку ген *sex-1* репрезентирует X хромосому, то при мутации *sex-1* следует ожидать формирование мужского пола при генотипе XX. При одновременной мутации *sex-1* и *xol-1* особи с генотипом XX развиваются как нормальные гермафродиты. Из этих результатов следует, что *xol-1* действительно находится под контролем *sex-1* и является его единственной мишенью.

Последняя ступень каскада представлена геном *tra-1*: фактор TRA-1 закрывает путь развития мужского фенотипа и инициирует путь развития гермафродитного. Известна доминантная мутация *tra-1<sup>D</sup>*, при которой не воспринимается негативная регуляция со стороны предшествующего звена. В этом случае всегда, как при "женском" генотипе X, X<sup>*tra-1<sup>D</sup>*</sup>, так и при "мужском" генотипе X<sup>*tra-1<sup>D</sup>*</sup>,0, образуются фертильные гермафродиты.

Как полагают, одним из ключевых элементов системы детерминации пола у *C. elegans* служит белок Fem, который обладает способностью взаимодействовать с двумя белками --- Tra-1 и Tra-2, направляя развитие, соответственно, по мужскому или по женскому пути.

Итак, в случае, если в клетке имеется одна X хромосома в расчете на диплоидный геном, то образуется сравнительно мало белка Sex-1. Благодаря этому ген *xol-1* не репрессируется и в клетке синтезируется много белка Xol-1, репрессора генов *sdc*. При этом происходит активная наработка белка Her-1, который связывается с внеклеточной областью белка Tra-2. В этих условиях Tra-2 не способен соединиться с белком Fem. В этом случае белок Fem образует комплекс с белком Tra-1, который в свободном состоянии является ключевым фактором транскрипции, инициирующей развитие гермафродитной особи (рис. 23-16).

Своеобразие механизма детерминации пола у *C. elegans* состоит, таким образом, в том, что он построен на *принципе чередующейся активности генов*, которые составляют регуляторный каскад.

Некоторые черты механизма определения пола у *C. elegans* напоминают организацию этого процесса у Дрозофилы. Прежде всего, нельзя не отметить клеточный характер детерминации пола: в каждой клетке нематоды имеется все необходимое для автономного решения проблемы. Сходство можно усмотреть и в наличии молекулярного механизма, «считающего» число X хромосом. Очевидны, вместе с тем, и существенные различия. Это, прежде всего, касается молекулярно-биологической природы механизма детерминации пола. Если у Дрозофилы имеется каскад альтернативных сплайсингов иРНК, то у *C. elegans* совершенно иные механизмы регуляции активности генов. У Дрозофилы имеет место последовательная активация генов каскада, у *C. elegans* --- последовательное их ингибирование.

К сожалению, в настоящее время проблема детерминации пола у других нематод разработана слабо, что затрудняет понимание эволюционного становления соответствующих механизмов регуляции. Согласно *модели ретроградного становления* (Wilkins, 2002), в эволюции первоначально сформировалась нижняя ступень каскада (*tra-1*), а затем уже путем добавления, шаг за шагом, верхних уровней регуляции происходила постепенная надстройка регуляторной цепочки. Модель ретроградного становления, по-видимому, имеет более общее значение, и приложима к анализу эволюции регуляторных систем и других программ развития. В соответствии с этой моделью, в системе A—| B—| C—|D самым древним элементом является D, а самым эволюционно молодым --- A.

### **23.3. Молекулярно-генетические аспекты детерминации пола у млекопитающих.**

Расшифровка молекулярных механизмов детерминации пола у млекопитающих по существу началась в конце 1950-х годов, когда стало очевидно, что у высших млекопитающих в детерминации мужского пола важную роль играет Y

хромосома. В пользу представления о том, что в Y хромосоме сосредоточены гены, детерминирующие мужской пол, говорили многие факты. Например, в отсутствие Y хромосомы (X0 генотип) всегда развивался женский фенотип; при наличии Y хромосомы даже существенное увеличение числа X хромосом (до 48,XXXXY) не нарушало развития особи мужского пола. Сложилось представление о том, что в Y хромосоме млекопитающих имеется особый ген *TDF (Testis-determining factor)*, наличие которого предопределяет развитие семенника. Дифференциация семенника связана с выработкой гормонального сигнала, способствующего развитию мужского фенотипа. С этой точки зрения, детерминация развития семенника представляет собой первичное определение пола, тогда как формирование мужского фенотипа под влиянием гормональных сигналов - составляет вторичное определение пола.

Участие гормонов в детерминации пола у позвоночных животных постулировалось уже давно. Эксперименты, выполненные в 1910-х --- 1920-х годах, не оставляли сомнения в том, что при кастрации взрослых крыс и морских свинок происходит существенное изменение фенотипа животного, которое еще более усиливалось при трансплантации половых желез противоположного пола. При кастрации мужских особей и трансплантации им яичника наблюдали феминизацию животного. При кастрации женских особей и трансплантации им семенника происходила маскулинизация.

Опыты по кастрации зародышей млекопитающих показали, что удаление яичника у особей женского пола не вызывает существенных изменений: как и в норме у них происходит дегенерация Вольфовых протоков, преобразование Мюллеровых протоков в яйцеводы; формирование матки (рис. 23-17). Наоборот, удаление семенника вызывает инверсию дифференциации, связанную с тем, что после такой операции Вольфовы протоки дегенерировали, тогда как Мюллеровы протоки развивались, образуя женские половые органы. При пересадке семенника кастрированным зародышам с мужским генотипом развитие мужского фенотипа восстанавливалось. Более того, трансплантация семенника кастрированным и даже нормальным зародышам женской природы вызывала атрофию Мюллеровых протоков и формирование фенотипических самцов.

Зависимость дифференциации Вольфовых протоков от гормональных факторов исследована в условиях органной культуры *in vitro*. Вольфовы протоки крысы культивировали на обычной среде; на среде, содержащей экстракт из семенника; на среде с добавлением андрогенов, и, наконец, на среде, содержащей экстракт из яичника. Вольфовы протоки дифференцировались только во втором и третьем вариантах, т.е. лишь в тех случаях, когда в культуральной среде имелись мужские половые гормоны. Таким образом, судьба Вольфовых протоков зависит не от кариотипа культивируемого органа, а от вещества, синтезируемого в семеннике, а именно от тестостерона.

При исследовании развития Мюллеровых протоков оказалось, что они закладываются у зародышей и мужской и женской природы, имеющих соответственно XY и XX половые хромосомы. Однако эти протоки дегенерируют у XY зародышей вскоре после закладки семенника. Они развиваются у зародышей XX, а также у кастратов. Изучение развития Мюллеровых протоков *in vitro* показало, что они хорошо развиваются в среде без гормонов, индифферентны к андрогенам, но не могут развиваться в присутствии семенника, что указывает на то, что семенник служит источником не только тестостерона, но и специфического анти-Мюллеровского фактора, представляющего собой паракринный белок из суперсемейства TGF- $\beta$ .

С учетом данных о роли гормонов семенника в развитии признаков пола можно выделить три основных этапа детерминации пола у высших (плацентарных) млекопитающих: закладка индифферентной гонады; детерминация пола гонады и ее первичная дифференциация; и, наконец, гормон-зависимая фаза дифференциации пола.

Первый этап связан с активностью генов *WT1* и *SFI* (рис. 23-18). Ген *WT1*, находящийся у человека в 11-ой хромосоме, ответственен за возникновение одной из форм детского рака (*Wilmstumor*). Его мутации вызывают тяжелое наследственное заболевание (DDS, *Denis-Drash syndrom*), при котором происходят разнообразные нарушения развития почек, гонад, половых органов, а часто и реверсия пола. Первичная экспрессия *WT1* у зародышей

млекопитающих наблюдается в клетках еще недифференцированного уrogenитального гребня. Нуль-мутация *WT1* приводит к полному недоразвитию гонад и почек.

Важную роль в образовании гонад играет также ген *SFI* (*steroidogenic factor 1*), белок которого является ядерным рецептором орфана, ключевого регулятора ферментов, участвующих в образовании половых гормонов. Этот ген экспрессируется на самом раннем этапе развития гонад в уrogenитальном гребне зародышей независимо от их пола. Позднее экспрессия *SFI* продолжается в зачатке семенника, но прерывается в зачатке яичника. При нуль-мутации этого гена развитие гонад нарушается и они дегенерируют. Одной из мишеней гена *SFI* является ген анти-Мюллеровского фактора.

Детерминация пола гонады обусловлена активностью генов *SRY* и *DAX* (рис. 23-18). Было установлено, что при утрате короткого плеча Y хромосомы развиваются женские особи, тогда как утрата длинного плеча не сказывается видимым образом на детерминации мужского пола. Из этих наблюдений следовало, что ген *TDF*, детерминирующий развитие семенника, располагается в участке короткого плеча Y хромосомы, длиной 35 Кб. Спонтанная транслокация этой специфической ДНК в аутосомы или X хромосому приводит к развитию мужских особей XX. Утрата этой области ДНК служит причиной возникновения женских особей с генотипом XY.

Более точная локализация *TDF* привела к обнаружению гена *SRY* (*Sex Determining Region of the Y*), который кодирует транскрипционный фактор - белок, состоящий из 223 аминокислотных остатков (рис. 23-19). В этом белке имеется участок, насчитывающий 79 аминокислотных остатков - так называемый HMG бокс (*high mobility group box*). Этот участок обеспечивает сиквенс-специфическое связывание белка с ДНК. При этом он вызывает характерное изгибание молекулы ДНК под углом 70 - 80°. Методом блоттинга по Саузерну показано, что последовательность ДНК, содержащая *SRY*, практически всегда (об исключении см. ниже) имеет место при развитии мужского фенотипа, независимо от того, какой генотип --- XY или XX ---

характеризует данную особь. Для развития женского фенотипа обязательно отсутствие *SRY*.

Опыты по инсерции клонированного гена мыши *Sry* в XX геном оплодотворенного яйца мыши, когда фрагменты ДНК, содержащие *Sry*, инъецировали непосредственно в пронуклеусы, убедительно свидетельствовали, что такой перенос *единственного* гена в геном женской природы вызывает трансформацию пола. У зародышей XX после инсерции *Sry* развивались семенники и другие мужские половые органы. Из этих данных вытекает очень важный вывод, а именно, что в аутосомах и X хромосоме мыши имеются все необходимые для развития мужского фенотипа гены за исключением лишь *Sry*.

Экспрессия гена *Sry* начинается в клетках полового гребня. У мыши начало экспрессии *Sry* наблюдается на 10,5 сутки после спаривания. Пик экспрессии приходится на 11,5 сутки, на 12 сутки, т.е. перед началом половой дифференциации гонад, экспрессия угасает.

Известно более 20 мутаций гена *Sry*. Все они --- кроме одной --- затрагивают ДНК-связывающую область. Мутации в области HMG-бокса ведут к снижению специфического связывания с ДНК или даже к его утрате. Исследование этих мутаций показало, что ДНК-связывающая и ДНК-изгибающая функции белка *SRY* разобщены. При мутациях *SRY* наблюдается реверсия пола, при которой особи с мужским генотипом развиваются как женские.

Ген *SRY* необходим, но недостаточен для детерминации мужского пола: для развития семенников требуются и другие гены. У человека при внешне нормальном генотипе 46, XX изредка (1 случай из 20 000) наблюдается реверсия или обращение пола, в результате которой возникает мужской фенотип. В большинстве таких случаев в ДНК ревертированных особей обнаруживается транслоцированный ген *SRY*. Однако примерно в 20% случаев у ревертантов ген *SRY* не обнаруживается. Это может быть объяснено лишь мутацией гена, связанного с развитием семенника, но активность которого

обычно инициируется геном *SRY*, так что в отсутствии *SRY* нормальный ген-мишень должен находиться в покоящемся состоянии.

Одним из генов, который, по-видимому, находится под контролем *Sry* является ген *Sox-9* (из семейства SOX, *SRY-box-related*, имеющих, как и *Sry* в своем составе эволюционно-консервативную область HMG-box). Экспрессия *Sox-9* происходит только у особей с генотипом XY, ее нет у особей XX. Этот ген экспрессируется в клетках полового гребня вслед за экспрессией *Sry*. Мутация *Sox-9* является причиной врожденной *камptomелии* (от греч. κάπτω --- гнуть, лат. -melus --- в конце слова --- конечность), болезни, при которой нарушаются нормальное развитие скелета, а также структуры и функции бронхов и трахей, что и предопределяет летальный исход. У 75% генотипически мужских особей с синдромом врожденной камptomелии происходит реверсия пола с образованием женских особей или гермафродитов.

О существовании генов аутосом, которые находятся под контролем гена *Sry* и участвуют в развитии семенников, свидетельствуют опыты по скрещиванию самцов *Mus domesticus* с самками мышей линии C57BL. У потомков от такого скрещивания наблюдается реверсия пола. У генотипически мужских зароды развиваются как женские особи. Другими словами, избыточное количество белка DAX1 подавляет действие белка SRY, который в этих условиях не способен направить развитие бипотенциального зачатка гонады по пути формирования семенника.

Анализ структуры гена *DAX1* свидетельствует, что контролируемый им белок относится к семейству ядерных рецепторов гормонов. На ранних этапах развития *DAX1* экспрессируется в клетках полового гребня у зародышей с мужским (XY) и женским (XX) генотипом. Несколько позднее, когда начинает экспрессироваться ген *SRY*, экспрессия *DAX1* у зародышей мужской природы прекращается, но продолжается у зародышей женской природы. Эта особенность экспрессии *DAX1* объясняется негативным контролем со стороны *SRY*. Антагонистические отношения между *SRY* и *DAX1* носят, однако, не односторонний характер: при увеличении дозы гена *DAX1*, вызванной дубликацией соответствующей области функционирующей X хромосомы,



происходит реверсия пола зародышей XY. Оказалось, что белок DAX1 образует вместе с SF1 гетеродимер DAX1/SF1, который выключает экспрессию генов *Sox9* и *Amh*, при нормальном развитии инициируемую белками SRY и SF1 (рис.23-20).

Критическое значение для детерминации яичника имеет также и ген аутосомы *Wnt4a* экспрессия которого начинается на индифферентной стадии развития гонады. У зародышей с генотипом XX она продолжается в период образования яичника. У зародышей XY с началом дифференциации гонад экспрессия *Wnt4a* прекращается. Мутации *Wnt4a* ведут к экспрессии тестостерона и анти-Мюллеровского гормона со всеми вытекающим из этого обстоятельства последствиями.

У представителей низших млекопитающих из отряда сумчатых (отряд Marsupialia) механизм детерминации пола заметно отличается от описанного. У животных этой группы некоторые признаки полового диморфизма появляются на стадиях, предшествующих дифференциации гонад, и, соответственно, появлению гормонального сигнала. Так, у Валлаби образование семенников начинается только после рождения --- на 3-ий день развития в сумке, тогда как зачаток мошонки закладывается и формируется еще в период эмбрионального развития. Также и зачатки молочных желез у зародышей генотипически женского пола образуются задолго до рождения (рис. 23-21). Интересно, что развитие этих органов не чувствительно к гормональным воздействиям. Так, если новорожденным женского пола инъектировать тестостерон, то мошонка (scrotum) не развивается, а имеющиеся зачатки молочных желез не резорбируются. Аналогично, инъекция женского полового гормона эстрадиола новорожденным мужской природы не ингибирует развития scrotum и не стимулирует развитие молочной железы. Тем не менее ген *Sry* у сумчатых имеется что свидетельствует в пользу монофилетизма подкласса Theria, объединяющего сумчатых (Marsupialia) и плацентарных (Eutheria). У сумчатых экспрессия *Sry*, по-видимому, также необходима для дифференциации семенника.

В свете данных по сумчатым нельзя исключить того, что выделение трех основных этапов детерминации пола у плацентарных млекопитающих, в известной степени упрощает реальную ситуацию. Действительно, имеются свидетельства того, что некоторые признаки полового диморфизма зародышей *Eutheria* появляются на доимплантационных стадиях, т.е. на стадиях, предшествующих гистологической дифференциации семенников. Возможно, что так же, как и у сумчатых, некоторые черты полового диморфизма зародышей определяются непосредственно генотипически, а не опосредованно через гормональные сигналы. Известно, например, что предимплантационные зародыши мужской природы растут быстрее, чем XX зародыши; есть указания на антигенные различия XX и XY предимплантационных зародышей; не исключено, что ген *Sry* экспрессируется у XY зародышей также до стадии имплантации.

#### **23.4. Разнообразие форм детерминации пола у многоклеточных животных.**

Гетерохромосомный тип детерминации пола, разнообразные молекулярно-генетические механизмы которого изучены в общих чертах, как мы видели, лишь у нескольких видов животных, широко распространен в природе. Одно из его преимуществ состоит в поддержании *амфогении* (от греч. ἀμφω --- оба; γένος --- происхождение) --- равного численного соотношения особей разного пола в популяции. Однако, амфогения не исчерпывает собой всего многообразия явления. Так, в некоторых случаях наблюдается *арреногения* (от греч. ἀρρενικός --- мужской) --- развитие в потомстве особей лишь мужского пола, что может быть обусловлено, например, сцепленным с полом летальным фактором, при наличии которого зародыши женского пола элиминируются. Аналогично, в потомстве могут возникать исключительно женские особи --- явление, называемое *телигенией* (от греч. τάλς --- девица). Причины смещения количественного соотношения особей разного пола в потомстве далеко не раскрыты. Известны случаи, когда соотношение мужских и женских особей в потомстве зависит от того или иного сочетания родительских пар. Так, например, у полихеты *Nerilla antennata* существует сложная система родительских пар: есть *амфогенные* пары, в потомстве которых имеются и мужские и женские особи; есть *семителигенные* пары, дающие в основном

самок; и, наконец, есть *арреногенные* пары, в потомстве которых преобладают мужские особи. Указанием на возможность достаточно сложного механизма детерминации пола могут служить уже упоминавшиеся данные об этом процессе у осы *Habrobracon juglandis*.

**Прогамное определение пола.** Итак, генетический пол особи, как правило, предопределяется при мужской гетерогаметии после оплодотворения, а в случае женской гетерогаметии уже в момент редукционного деления ооцита. Однако, известны случаи, когда образуются «женские» и «мужские» ооциты у животных с мужской гетерогаметией (самцы XY, самки XX). В этом случае говорят о *прогамном* определении пола. Прогамное определение пола описано, например, у архианнелиды *Dinophilus gyrociliatus*, которая характеризуется резким половым диморфизмом. Если самки этих микроскопических червей достигают в длину 1 мм, то их карликовые самцы не превышают 50 мкм. Самки производят два типа яиц: крупные, из которых впоследствии развиваются особи женского пола, и мелкие, предназначенные для формирования самцов, имеющих, как полагают, одну непарную хромосому (рис. 23-22).

Прогамное определение пола характерно для некоторых тлей. Например, у Филлоксеры из зимующего оплодотворенного яйца развивается бескрылая самка-основательница, которая размножается путем диплоидного партеногенеза, обусловленного выпадением редукционного деления мейоза. В определенный момент партеногенетического цикла возникают крылатые особи --- полоноски. Полоноски представлены двумя формами: одни особи производят яйца крупных размеров («женские»), из которых партеногенетическим путем развиваются самки, а другие образуют более мелкие «мужские» яйца, из которых также партеногенетически развиваются самцы. Как показал еще Морган (1909), «женские» и «мужские» яйца диплоидны, но «женские» имеют три пары хромосом (*Aphis saliceti*), а «мужские» --- на одну хромосому меньше. В процессе оогенеза у производящих «мужские» яйца плодоносок одна из X хромосом утрачивается. Эти яйца при созревании выделяют лишь одно направительное тельце и остаются диплоидными. В результате партеногенеза теперь уже образуются половые особи, у которых гаметогенез сопровождается обычной редукцией числа

хромосом и завершается формированием гаплоидных мужских и женских гамет. У самцов (X,0) образуются два типа сперматозоидов. Однако, как полагают, мужские гаметы, лишенные X хромосомы, погибают так что в оплодотворении участвует лишь один тип спермиев (2A,X), которые, оплодотворяя яйцевые клетки (2A,X), дают начало зимующей диплоидной форме --- самке-основательнице (4A,XX) (рис.23-23).

Таким образом у самок тлей с хромосомным набором, характерным для гомогаметии, тем не менее возможно образование двух разных типов женских гамет за счет элиминации одной из половых хромосом. В отличие от истинной гетерогаметии, при которой разные типы гамет образуются всеми самками, у тлей наблюдается специализация самок, производящих тот или иной тип ооцитов.

**Фенотипическое определение пола.** У некоторых животных детерминация пола обнаруживает видимую зависимость от факторов среды --- например, температуры или каких-то иных ее составляющих. В прошлом этот зависимый от факторов среды *фенотипический* тип детерминации пола противопоставляли *генотипическому*, независимому от среды.. В настоящее время очевидно, что это противопоставление некорректно, так как действие факторов среды неизбежно опосредуется механизмами генетического контроля над развитием.

Классическим примером фенотипического определения пола может служить эхиурида *Bonellia viridis*. Бонеллии являются гонохористами, причем половой диморфизм у них резко выражен. Если самки достигают 10 см и имеют длинный (до 1 м) хоботок, то карликовые самцы не превышают 1-2 мм. Самцы ведут, по существу, паразитический образ жизни. Они живут в матке самки и служат своеобразными живыми «семяприемниками». У личинок пол не детерминирован; процесс определения пола происходит лишь на 8 - 10 день после вылупления. При развитии личинок в отсутствии контакта с самками около 80% личинок превращается в женские особи и лишь 3% становятся самцами,. Остальные личинки дают интерсексов или погибают. Если же личинки развиваются в присутствии самок, то они прикрепляются к телу самки

и в этом случае до 75% потомков развиваются как самцы и лишь 15% как самки (рис.23-24).

К сожалению, данных о реальных механизмах детерминации пола у бонеллии нет. Характер соотношения особей разного пола служит указанием, по-видимому, на отсутствие особых половых хромосом. По-видимому, у бонеллии имеет место *полифакториальная детерминация пола*, при которой существует множество феминизирующих (F) и маскулинизирующих (M) генов, разбросанных по разным хромосомам (рис. 23-25). Маскулинизирующий фактор самки является мощным репрессором --- прямым или опосредованным --- F-генов. В условиях подавления экспрессии F-генов проявляется активность M-генов.

Среди позвоночных фенотипическое определение пола характерно для многих рептилий. У некоторых видов ящериц, черепах и крокодилов выявлена зависимость пола зародыша от температуры, при которой происходит развитие яиц. У некоторых животных (*Agama agama*, *Aligator mississippiensis*, *Trachemys scripta*) при повышении температуры резко снижается процент самок в потомстве; у многих черепах (*Emys orbicularis*, *Testudo graeca*), наоборот, с повышением температуры процент самок в потомстве резко возрастает. У некоторых видов наблюдается более сложная зависимость: при относительно низкой и относительно высокой температурах развиваются самки, тогда как при промежуточной температуре развиваются мужские особи (рис.23-26).

Чувствительная к температуре стадия развития приходится на период, предшествующий половой дифференциации гонад. Например, у миссисипского аллигатора она приходится на стадию полового гребня. Детерминация пола становится необратимой после возникновения различий между женскими и мужскими гонадами. В настоящее время установлено, что феминизирующее действие температурного фактора связано с активацией экспрессии гена ароматазы. Появление ароматазы способствует переключению биосинтеза на формирование женских половых гормонов, в частности, эстрадиола (рис.23-27).

Таким образом, у рептилий, как и у эхиурид, генетический механизм определения пола обусловлен дифференциальной активностью генов исходно генетически бисексуальных зародышей.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Астауров Б. Л. Генетика пола.// В кн. Актуальные вопросы современной генетики. Изд. Московского Университета. 1966.Стр. 65 - 113.
- Догель В. А. Общая протистология.// ГИЗ "Советская наука". Москва.1951. 603 стр.
- Левина С. Е. Очерки развития пола в раннем онтогенезе высших позвоночных.// Изд. Наука. Москва. 1974. 239 стр.
- Wilkins, A. S. The evolution of developmental pathways.// Sinauer Ass. Inc., Massachusetts. 2002. 603 p.