## СОДЕРЖАНИЕ

### Том 52, номер 1, 2021

80 ЛЕТ КАФЕДРЕ ЭМБРИОЛОГИИ МГУ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА	
К 80-летию кафедры эмбриологии Московского Государственного	
университета им. М.В. Ломоносова	2
В. А. Голиченков, О. В. Бурлакова, А. В. Васильев	3
Локализация РНК Germes в ооцитах Xenopus М. Б. Пономарев, В. В. Кондукторова, Н. Н. Лучинская, А. В. Белявский	10
м. <i>В. Пономарев</i> , <i>В. В. Коноукторова</i> , <i>Н. Н. Лучинская</i> , <i>А. В. Велявский</i> Некоторые парадоксальные явления гистофизиологии волосяных фолликулов	10
Э. Б. Всеволодов, А. С. Мусаева, И. Ф. Латыпов,	
О. В. Бурлакова, Е. Н. Никерясова, В. А. Голиченков	19
ОБЗОРЫ	
Соматические клетки цисты как микроокружение для поддержания	
и дифференцировки герминальных клеток в сперматогенезе Drosophila	
С. С. Базылев, В. Е. Адашев, А. С. Шацких, Л. В. Оленина, А. А. Котов	27
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ	
Сравнительный анализ паттернов экспрессии генов семейства <i>Noggin</i>	
на ранних стадиях развития головных структур европейской речной миноги <i>Lampetra fluviatilis</i>	
Г. В. Ермакова, А. В. Кучерявый, А. Г. Зарайский, А. В. Байрамов	46
МЕТОДЫ И МОДЕЛИ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ	
Ксенотрансплантация полнослойного кожного лоскута человека — модель	
для изучения регенерации кожи и цикла волосяных фолликулов	
Е. П. Калабушева, А. Л. Риппа, А. А. Цитрина, А. Пинто, А. В. Терских, Э. С. Чермных, Е. А. Воротеляк	56
А. Б. Терских, Э. С. Чермных, Е. А. воротеляк	
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ	
Гиперэкспрессия гена рецептора урокиназы uPAR в головном мозге мыши стимулирует миграцию нейронов в кору в эмбриогенезе	
А. А. Шмакова, А. В. Балацкий, М. А. Кулебякина, Т. Шауб,	
М. Н. Карагяур, К. Ю. Кулебякин, К. Д. Рысенкова,	
В. С. Тарабыкин, В. А. Ткачук, Е. В. Семина	68
ПОТЕРИ НАУКИ	
Ирина Васильевна Урываева (1939—2020)	80

## **Contents**

Vol. 52, No. 1, 2021

Irina Vasilievna Uryvaeva (1939–2020)

TO THE 80TH ANNIVERSARY OF THE EMBRYOLOGY DEPARTMENT IN LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY	
To the 80th Anniversary of the Embryology Department in Lomonosov Moscow State University	
V. A. Golichenkov, O. V. Burlakova, and A. V. Vasiliev	3
Localization of Germes RNA in Xenopus Oocytes	
M. V. Ponomarev, V. V. Konduktorova, N. N. Luchinskaya, and A. V. Belyavsky	10
Some Paradoxical Phenomena in Hair Follicles Histophysiology	
E. B. Vsevolodov, A. S. Mussayeva, I. F. Latypov, O. V. Burlakova, E. N. Nikeryasova, and V. A. Golichenkov	19
REVIEWS	
Somatic Cyst Cells as a Microenvironment for the Maintenance and Differentiation of Germline Cells in <i>Drosophila</i> Spermatogenesis	
S. S. Bazylev, V. E. Adashev, A. S. Shatskikh, L. V. Olenina, and A. A. Kotov	27
BIOLOGY OF VERTEBRATE DEVELOPMENT	
Comparative Analysis of Expression Patterns of Genes of the <i>Noggin</i> Family at the Early Stages of Development of Head Structures of the European River Lamprey <i>Lampetra fluviatilis</i>	
G. V. Ermakova, A. V. Kuchryavyy, A. G. Zaraisky, and A. V. Bayramov	46
METHODS AND MODELS OF BIOLOGY DEVELOPMENT	
Full-Thickness Human Skin Strips Xenotransplantation — a Model for Studying Skin Regeneration and Hair Follicles Cycling	
E. P. Kalabusheva, A. L. Rippa, A. A. Tsitrina, A. Pinto, A. V. Terskikh, E. S. Chermnykh, and E. A. Vorotelyak	56
DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PLANTS	
uPAR Overexpression in the Mouse Brain Stimulates the Migration of Neurons Into the Cortex during Embryogenesis	
A. A. Shmakova, A. V. Balatskiy, M. A. Kulebyakina, T. Schaub, M. N. Karagyaur, K. Yu. Kulebyakin, K. D. Rysenkova, V. S. Tarabykin, V. A. Tkachuk, and E. V. Semina	68
LOSSES OF SCIENCE	

80

#### \_\_\_\_\_ 80 ЛЕТ КАФЕДРЕ ЭМБРИОЛОГИИ МГУ \_ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

УЛК 591.3

## К 80-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ ЭМБРИОЛОГИИ МОСКОВСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

© 2021 г. В. А. Голиченков<sup>а</sup>, О. В. Бурлакова<sup>а, \*</sup>, А. В. Васильев<sup>а, b</sup>

<sup>а</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

<sup>b</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия \*e-mail: burlakovao@mail.ru

Поступила в редакцию 10.09.2020 г. После доработки 24.09.2020 г. Принята к публикации 30.09.2020 г.

В статье представлена краткая история создания, становления научной школы, основные образовательные и научные достижения кафедры эмбриологии биологического факультета  $M\Gamma Y$ , выпускающей специалистов — эмбриологов и биологов развития на протяжении 80 лет.

Ключевые слова: кафедра эмбриологии, научная школа, подготовка биологов развития

**DOI:** 10.31857/S0475145021010079

1 сентября 1940 г. на биологическом факультете Московского университета была открыта первая в стране кафедра эмбриологии. Решение о ее создании было принято годом ранее (15 августа 1939 г.). Возглавил кафедру выдающийся биолог Дмитрий Петрович Филатов. Создание кафедры эмбриологии в Московском университете было подготовлено всем ходом развития биологической науки. В канун Великой Отечественной войны Московский университет являлся крупнейшим вузом страны и одним из важнейших научных и интеллектуальных центров мира. В составе университета было 7 факультетов (механико-математический, физический, химический, биологический, геолого-почвенный, географический и исторический) и 10 научно-исследовательских институтов (математики, механики, астрономии, физики, химии, зоологии, ботаники, антропологии, морфогенеза и почвоведения). В связи со 185-летием со дня основания, 7 мая 1940 г. Московский государственный университет был награжден Орденом Ленина, ему было присвоено имя его основателя Михаила Васильевича Ломоносова.

В годы, которые предшествовали организации кафедры эмбриологии (20—30-е гг.) страна восстанавливалась после потрясений революций и Гражданской войны. Тем удивительнее видеть, насколько мощно, широко и талантливо были представлены в стране научные и образовательные учреждения и организации биологического профиля: из 10 НИИ Московского университета 4 были биологическими. Почти все они оказались

причастными к организации кафедры эмбриологии Московского университета, и многие выдающиеся биологи создавали фундамент учебной и научной работы кафедры. В стране и в самом университете уже работали центры, тематически связанные с эмбриологией. Так, Институт экспериментального морфогенеза возник из лаборатории экспериментального морфогенеза Биологического института им. К.А. Тимирязева, которой руководила и частично финансировала ее работу Вера Михайловна Данчакова (тогда подданная США). Постановлением Совнаркома РСФСР от 1931 г. лаборатория была преобразована в Институт экспериментального морфогенеза, задачей которого являлось всестороннее изучение закономерностей индивидуального развития. Директором был назначен профессор Р.И. Белкин. В структуре института были лаборатории (отделения): цитологии (профессор П.И. Живаго), оплодотворения (профессор В.А. Дорфман), механики эмбрионального развития (профессор Д.П. Филатов), гистогенеза (профессор А.В. Румянцев, позднее - профессор Г.К. Хрущов), механики постэмбрионального развития (профессор Л.Я. Бляхер), отделение эндокринных факторов развития (профессор В.Ф. Ларионов), отделение внешних факторов развития (профессор Р.И. Белкин). В лаборатории механики эмбрионального развития под руководством Д.П. Филатова работали будущие сотрудники кафедры В.В. Попов, А.И. Лазарев, Н.А. Мануилова, Д.А. Потемкина, Р.А. Борсук. За время своего существования Институт выпустил более 300 статей, опубликованных в 6 томах "Трудов Института экспериментального морфогенеза", провел Всесоюзную конференцию по проблемам механики развития.

Целый ряд структур Московского университета также стали базой для кафедры эмбриологии. В 1923 г. в Московском университете был организован Институт зоологии. До 1930 г. Институт включал лабораторию морфологии и сравнительной анатомии (акад. А.Н. Северцов), лабораторию зоологии и зоогеографии (проф. Н.А. Богоявленский) и лабораторию систематики и зоологии позвоночных (проф. Б.М. Житков). Директором Института был акад. А.Н. Северцов. Научная работа велась, главным образом, в области эволюционной морфологии и сравнительной анатомии А.Н. Северцовым и его учениками Б.С. Матвеевым, В.В. Васнецовым, С.Н. Боголюбским, А.А. Машковцевым. Под руководством Г.А. Кожевникова стала работать лаборатория беспозвоночных. В ней изучали явления видовой, половой, возрастной и географической изменчивости (В.В. Алпатов). Институт играл в стране координирующую роль, созывая научные конференции. В аспирантуре Института были подготовлены будущие выдающиеся зоологи и биологи страны. Среди них профессора Московского университета Б.А. Кудряшов, А.Н. Формозов, В.Г. Гептнер, Г.Ф. Гаузе, С.М. Гершензон, Н.В. Богоявленский, Д.Ф. Вермель, Н.П. Дубинин и др. С 1930 г. научная работа Института велась уже по 5 направлениям: 1) морфология, физиология, эволюция и дарвинизм (А.Н. Северцов, Б.С. Матвеев, Г.И. Роскин, И.Л. Кан); 2) сельскохозяйственная энтомология и зоология (членкорр. АН СССР С.Н. Кулагин, А.А. Захваткин); 3) биология развития (М.М. Завадовский, Б.А. Кудряшов); 4) фауна СССР (Л.А. Зенкевич, С.И. Огнев) и 5) рыбное хозяйство (Л.А. Зенкевич, С.И. Строганов).

Еще в 1918 г. в МГУ М.М. Завадовский начал читать курс "Экспериментальная биология", с 1923 г. этот курс стал основой преподавания по специальности экспериментальная морфология. В связи с этим в 1930 г. была открыта кафедра динамики развития, которую и возглавил М.М. Завадовский. Кроме того, на кафедре гистологии Московского университета (с 1930 по 1939 г. – гистологии и эмбриологии), организованной в 1913 г., воспитывались и выросли выдающиеся гистологи и эмбриологи А.В. Румянцев, Е.М. Вермель, А.Н. Студитский, Г.А. Шмидт. В течение ряда лет профессор Г.Г. Щеголев читал курс обшей эмбриологии. С 1921 г. под его руководством вел свои исследования будущий второй заведующий кафедрой эмбриологии Степан Иванович Кулаев. В 1933 г., будучи доцентом кафедры гистологии, С.И. Кулаев создал на Большом практикуме кафедры гистологии раздел эмбриологии, а с 1934 г. начал читать в Университете переданный ему профессором Г.Г. Щеголевым курс общей эмбриологии, введенный в учебный план биологического факультета.

Все вышеназванные имена ученых — из институтов, кафедр гистологии и динамики развития известны теперь как имена выдающихся эмбриологов, гистологов, генетиков. И все они (большинство из них) принимали участие в становлении советской и российской эмбриологии, организации жизни и работы кафедры эмбриологии. Широкая представленность в исследовательских работах изучения онтогенеза (в т.ч. и в эволюционном плане) естественным образом определила необходимость подготовки специалистов такого профиля, где предметом изучения становился сам онтогенез во всем разнообразии подходов к его исследованию.

Основателем кафедры стал выдающийся русский ученый, создатель отечественной школы экспериментальной эмбриологии профессор Дмитрий Петрович Филатов (1876—1943). Д.П. Филатов предлагал свое понимание проблемы детерминации в индивидуальном развитии (1934), говорил о понятии гомологии (1937), о значении экспериментальной эмбриологии для медицинской практики (1938). Однако основное научное достижение Дмитрия Петровича — разработка им сравнительно-эмбриологического направления в экспериментальной эмбриологии. Вот это самобытное направление отечественной механики развития и было положено в основу работы созданной кафедры. После смерти Д.П. Филатова в трудном 1943 г. кафедру возглавил профессор С.И. Кулаев, в годы войны проректор МГУ, обеспечивавший эвакуацию Университета в Ашхабад, а затем Свердловск (ныне Екатеринбург) и его последующее возвращение в Москву (Голиченков, 1998). Однако, громадные перегрузки, связанные с работой по сохранению Университета во время войны, подорвали здоровье С.И. Кулаева, и в 1944 г. в возрасте творческого расцвета он скончался. После его кончины в 1944 г. на протяжении более 30 лет кафедрой руководил Василий Васильевич Попов (1903—1975). Будучи одним из организаторов кафедры, учеником и соратником Д.П. Филатова, В.В. Попов продолжал и развивал на кафедре дело своего учителя. Под его руководством изучались характеристики формообразовательных воздействий в индивидуальном развитии. Было детально изучено явление вторичной индукции роговицы в кожных трансплантатах и регенератах, обнаружено длительное сохранение формообразовательных реакций рядом тканей зародышей и личинок при индукции хрусталика и гетерогенной индукции конечности у амфибий. В.В. Поповым было обнаружено, изучено и введено в научный обиход явление перехода (трансгрессии) некоторых формативных связей из эмбрионального периода развития в постэмбриональный (1944—1953). Им был сформулирован и развит функциональный

принцип в физиологии развития (1967). Параллельно с А.А. Машковцевым, В.В. Поповым разрабатывался принцип смены морфогенетических отношений в эволюции. Именно при Василии Васильевиче вырабатывался основной методологический принцип преподавания на кафедре подход к процессу развития как к самоорганизации усложняющихся подсистем разного уровня, обеспечивающей целостность организма. С 1975 г. после кончины возглавлявшего кафедру в течение почти 30 лет профессора В.В. Попова и по 1983 г. кафедрой заведовал Лауреат Государственной премии, профессор Карлен Григорьевич Газарян. Его приход совпал с периодом развития методов молекулярной биологии. Своей задачей К.Г. Газарян поставил внедрить новые молекулярно-биологические методы исследования в научный и учебный арсенал кафедры, а также ввести в практику работы кафедры новые методы исследования ранних стадий развития млекопитающих. Организатором исследований ранних стадий млекопитающих стал выпускник кафедры Анатолий Александрович Языков, сумевший создать современную базу для исследования и экспериментальных манипуляций с ооцитами и ранними зародышами млекопитающих, стоящий у истоков появления технологий экстракорпорального оплодотворения (ЭКО-технологий) в нашей стране. В развитии этого раздела эмбриологии впоследствии под руководством профессора Марии Львовны Семеновой была разработана программа дополнительного образования "Эмбриологические методы вспомогательных репродуктивных технологий", сформированная на базе курса эмбриологии млекопитающих и научных разработок в области предзародышевого и раннего зародышевого развития млекопитающих. Этот раздел имеет непосредственный выход в медицинскую практику - наших выпускников-эмбриологов можно встретить во многих ЭКО-клиниках, а среди репродуктологов большим авторитетом пользуются сотрудники кафедры Рамин Ахмедович Шафеи и Илья Владимирович Володяев. Тогда же на кафедре впервые в мире Людмилой Алексеевной Слепцовой (Слепцова и др., 1983) на представителе костистых рыб — выоне были проведены успешные пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки. Эти работы имели достойное продолжение и позволили ввести данную методику в педагогический процесс (Слепцова и др., 1993; Sleptsova, Popov, 1996).

С 1984 по 2014 гг. кафедру возглавлял Владимир Александрович Голиченков, ныне профессор кафедры. Выпускник кафедры, ученик В.В. Попова, он сумел сохранить и развить лучшие традиции кафедры, создать атмосферу научной свободы и неизменной благожелательности к сотрудникам и студентам, которую так ценят все, кто приходит

на кафедру. В.А. Голиченков ввел в экспериментальную эмбриологию перспективную модель пигментную систему амфибий, дающую возможность прослеживать непосредственную реализацию воздействий на организм на уровнях от молекулярного до организменного. Именно эта модель послужила развитию работ по исследованию немышечной подвижности клетки (направленное перемещение пигментных гранул по меланофору), начатой в коллаборации сотрудников кафедры с молекулярными биологами; позволила выявить гормональную активность латеральных глаз позвоночных, выделяющих мелатонин; исследовать становление биоритмологических механизмов в онтогенезе и т.п. В 2014 г. кафедру возглавил директор Института биологии развития им. Н.К. Кольцова, ныне член-корреспондент РАН, д. б. н. Андрей Валентинович Васильев. А.В. Васильев привнес в работу кафедры учебные курсы и исследования клеточных механизмов развития и регенерации, биологии стволовых клеток. Сегодня Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН является базовым для кафедры эмбриологии, во многом участвуя в педагогическом процессе кафедры и предоставлении возможности выполнения научных квалификационных работ студентов.

Несомненная гордость кафедры – общий курс "Эмбриология", авторские оттенки которому придавали все читающие его преподаватели. Впервые этот общий курс был прочитан в 1934 г. доцентом кафедры гистологии и эмбриологии С.И. Кулаевым. Курс базировался на лекциях по эмбриологии профессора Г.Г. Щеголева, читавшихся на той же кафедре. Параллельно для аспирантов биологического факультета в течение ряда лет подобный курс читал Д.П. Филатов. Классическую основу этого курса заложил в своих блестящих лекциях третий заведующий кафедрой В.В. Попов. Затем этот курс продолжил профессор Лев Владимирович Белоусов, который читал с 1975 по 1983 гг. параллельно с К.Г. Газаряном, а с 1984 по 2017 гг. с В.А. Голиченковым. По материалам лекций выпущены базовые учебники для студентов ВУЗов: Газарян К.Г., Белоусов Л.В. Биология индивидуального развития животных, 1983; Голиченков В.А. Биология развития, 1991; Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии, 1997; Голиченков В.А., Иванов Е.А., Никерясова Е.Н. Эмбриология, 2004; Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии, 2005, вошедший в серию "Классический университетский учебник". С 2018 года курс успешно читается доцентом кафедры Еленой Александровной Супруненко. Этот курс включен не только в учебный план биологического факультета, но и факультета фундаментальной медицины (с 1993 г.), факультета биоинженерии и биоинформатики (с 2017 г.) и биотехнологического факультета (с 2017 г.). Лекции курса, сочетающие классические под-

ходы к предмету с последними сведениями в этой области, пользовались заслуженным успехом у слушателей. Кроме того, адаптированные курсы "Общая эмбриологии" читаются д. б. н. Ольгой Петровной Мелеховой на физическом факультете (кафедра биофизики), к. б. н. Евгением Алексеевичем Ивановым, а затем к. б. н. Е.А. Супруненко на геологическом факультете (кафедра палеонтологии), к. б. н. Еленой Николаевной Никерясовой (курс "Биология развития" для бакалавров биологического факультета направления экология и природопользование). Все эти лекционные курсы сопровождает Малый практикум. Классический круг объектов и тем занятий практикума был сформирован еще учениками Д.П. Филатова старшим научным сотрудником кафедры Ниной Александровной Мануиловой и доцентом Дарьей Анатольевной Потемкиной. В настоящее время занятия Малого практикума ведут для каждой группы студентов практически все сотрудники кафедры (в семестре бывает параллельно до 19 групп студентов разных факультетов), а также и кафедральные аспиранты второго года аспирантуры в рамках педагогической практики. Усилиями доцента Л.А. Слепцовой на протяжении многих лет занятия практикума обеспечиваются модельным организмом — вьюном на соответствующих стадия развития. По материалам занятий малого практикума Издательским центром "Академия" в 2004 г. выпущен "Практикум по эмбриологии. Учебное пособие для студентов университетов" (авторы – Голиченков В.А., Иванов Е.А., Лучинская Н.Н., Неклюдова И.В., Никерясова Е.Н., Семенова М.Л., Слепцова Л.А., Чунаева М.З., Языкова Н.В.).

Набор специальных дисциплин для студентов кафедры всегда был призван сочетать классические направления в эмбриологии и биологии развития с современными подходами к исследованию в этой области. Основной спецкурс — Большой практикум (ныне "Эмбриология позвоночных"), включающий лекции и семинары по этапам онтогенеза и соответствующие практические занятия на основных модельных объектах ныне проводят н.с. Наталья Николаевна Лучинская, к. б. н. Ирина Васильевна Неклюдова, к. б. н. Настасья Владимировна Кошелева. В настоящее время студенты кафедры слушают более 20 спецкурсов. В ряде спецкурсов прослеживается преемственность от корифеев, стоявших у истоков кафедры до работающих сегодня сотрудников. Так, курс "Экспериментальная эмбриология", который начинал читать В.В. Попов, продолжала к. б. н. Н.В. Дабагян, а сейчас ведут к. б. н. И. В. Неклюдова и к. б. н. Л.А. Слепцова. Курс "Гаметогенез" – от к. б. н. Д.А. Потемкиной, затем к. б. н. М.З. Чунаева и сейчас – к. б. н. Е.Н. Никерясова. Курс "Иммунология эмбриогенеза", у истоков которого стоял Олег Евгеньевич Вязов, позже его возродила профессор кафедры Нелли Георгиевна Арцимович, вот уже много лет его успешно читает выпускник кафедры Дмитрий Борисович Казанский. Курс "Регенерация", который разработала и читала старший научный сотрудник Ревекка Абрамовна Борсук, затем В.А. Голиченков, Д.В. Попов, а в настоящее время к. б. н. Ольга Владимировна Бурлакова. Ряд блестящих спецкурсов был создан на кафедре профессором Л.В. Белоусовым. Ныне они продолжаются силами его учеников: "Молекулярная биология клетки" (н.с. Наталья Николаевна Лучинская и к. б. н. Алена Юрьевна Евстифеева), "Морфогенез" (с.н.с. И.В. Володяев). Эстафету Беломорской летней практики по "Эмбриологии морских беспозвоночных" из рук Л.В. Белоусова и Н.В. Дабагян приняла профессор М.Л. Семенова. Закономерности заключительного этапа онтогенеза отражены в спецкурсе д. б. н. Юрия Константиновича Доронина "Основы биологии старения".

Создаются новые курсы, необходимость которых обусловлена тенденциями развития науки. Это, прежде всего, "Биология стволовых клеток" – курс заведующего кафедрой члена-корреспондента РАН А.В. Васильева, "Методы клеточных технологий" (к. б. н. Е.А. Супруненко) с практическими занятиями на базе Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, "Молекулярные методы в биологии развития" (к. б. н. Станислав Валерьевич Кремнев). Ряд спецкурсов читают сотрудники профильных институтов. Это, например, курс "Генетика онтогенеза", созданный член-корреспондентом РАН Леонидом Ивановичем Корочкиным, который в настоящее время ведет и читает д. б. н. О.Б. Симонова, сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Курс "Молекулярная генетика онтогенеза" разработал и читает профессор В.З. Тарантул (Институт молекулярной генетики РАН) и выпускница кафедры Л.Е. Андреева. В.А. Голиченков одним из первых на факультете создал новую форму спецкурса "Актуальные проблемы биологии развития" (теперь "Современные проблемы биологии"), где приглашенные ведущие ученые читают актуальные лекции связанные с проблемой биологии развития, для студентов выпускных курсов. Это предоставляет редкую возможность непосредственного общения молодежи с крупнейшими специалистами в соответствующих областях науки. Учебно-научная работа студентов кафедры ведется в тесном сотрудничестве с академическими институтами: Институтом биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Институтом общей генетики РАН, Медико-генетическом научном центром им. Н.П. Бочкова, Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институтом биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институтом биологии гена, Институтом молеку-

лярной генетики и др. В этих центрах студенты кафедры выполняют курсовые и дипломные работы, пополняя затем их коллективы уже в качестве сотрудников и аспирантов. Научная подготовка студентов, естественно, происходит и на кафедре. Для квалификационных бакалаврских и магистерских работ им предлагаются темы в рамках проводимых на кафедре исследований. В настоящее время научная работа кафедры ведется по трем основным научным направлениям. В рамках исследований направленной дифференцировки клеток млекопитающих в системе in vitro (руководитель - член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой А.В. Васильев) ведется изучение возможности нейральной дифференцировки клеток ретинального пигментного эпителия человека in vitro под действием bFGF, мелатонина и кондиционированных сред регенератов сетчаток тритона (Шафеи и др., 2020), анализируются особенности половой дифференцировки клеток с индуцированной плюрипотентностью человека in vitro, где показана дифференцировка до стадии гаплоидных клеток, в том числе с появлением маркеров мейоза (Абдыев и др., 2019). Новым направлением является изучение свойств везикулярных частиц стволовых клеток (мультипотентных клеток и индуцированных плюрипотентных клеток) как паракринного регулятора межклеточных взаимодействий в онтогенезе (Супруненко и др., 2019). В рамках исследований механизмов дифференцировки и интеграции дифференцирующихся систем в развитии животных как основы медицинских технологий, под руководством профессора В.А. Голиченкова, ведется изучение фундаментальных основ регуляции онтогенеза позвоночных на организменном, тканевом, клеточном и молекулярно-генетическом уровне. В частности, ведутся работы по изучению предзародышевого развития млекопитающих на ранних этапах фолликуло- и оогенеза, возможности моделировать эти процессы в системе *in vitro*. В рамках исследования разработана система культивирования эмбриональных яичников мыши in vitro, изучены уровни экспрессии генов Mos, Epab, Ccnh, Cdk1, Ccnb, Wee2, ответственных за созревание ооцита в условиях *in vitro* и *in vivo*. Показано, что в ооцитах на стадии GV уровни экспрессии генов, кодирующих белки MPF-комплекса (Cdk1, Ccnb), а также Wee2, не различаются в ооцитах, выделенных из фолликулов, культивированных in vitro в подобранных условиях, и в ооцитах, полученных из яичников половозрелых и неполовозрелых мышей. Также показано, что уровни экспрессии генов *Epab* и *Ccnh* в ооцитах, выделенных из фолликулов, культивированных in vitro, достоверно ниже таковых в ооцитах, выделенных из яичников от половозрелых и неполовозрелых мышей. Также проведены работы по исследованию механизмов инициации клеточ-

ной гибели в случае повреждения трофэктодермы при микрохирургических процедурах, работы по повышению эффективности криоконсервации ранних эмбрионов млекопитающих – работы, имеющие определенные перспективы по внедрению в практику совершенствования репродуктивных технологий в медицине. Ведутся работы по исследованию регенерационных явлений на новых моделях – на сфероидах, образованных из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток млекопитающих из различных источников (костного мозга, лимба глаза, десны) в условиях in vitro и на клетках пигментной системы личинок амфибий in vivo. Одной из практических перспектив этих работ могут стать разработки подходов улучшения функционально-метаболических показателей клеток, например, при формировании тканеинженерных конструктов (Molchanov et al., 2017; Velikanov et al., 2018; Ilina et al., 2019; Filatov et al., 2019, 2020; Kosheleva et al., 2020). На кафедре продолжаются исследования клеточных и молекулярных основ морфогенетических реакций на механические напряжения, основы которого были заложены д. б. н. Л.В. Белоусовым (Ambrosi et al., 2017; Bredov, Volodyaev, 2018). Прослежено влияние искусственных деформаций на морфогенез осевых зачатков у *Хепория*. Проведено детальное исследование микродеформации тканей в разных областях зародышей на разных стадиях нормального развития (от ранней гаструлы до поздней нейрулы). Установлена роль активных и пассивных компонентов микродеформаций в формировании паттернов механических напряжений (Вгеdov, Evstifeeva, 2017; Vasilegina et al., 2017; Beloussov et al., 2018; Luchinskaia et al., 2018). Ученик Л.В. Белоусова, к. б. н. С.В. Кремнев, руководит группой, исследующей молекулярные механизмы, регулирующие формирование плана строения Dynamena pumila, гидроида с очень необычным и вариабельным развитием. Так, изучена молекулярная разметка верхушки роста побега колонии Dynamena компонентами канонического Wnt каскада (Bagaeva et al., 2019; Kupaeva et al., 2020). В работах сотрудников кафедры изучена динамика экспрессии гена shh v представителей разных классов позвоночных (птиц и млекопитающих), и это исследование выявило высокую эволюционную пластичность ранней эмбриональной индукции (Kremnyov et al., 2018).

Среди выпускников кафедры — выдающиеся ученые, оставившие глубокий след в "науке о развитии". Это одна из первых выпускниц кафедры, доктор биологических наук Ольга Георгиевна Строева, один из ведущих эмбриологов страны Александр Александрович Нейфах (1926—1997), крупнейший биолог развития, исследователь проблем регенерации Виктор Иванович Миташов (1937—2007), его ученица и талантливый про-

должатель Элеонора Норайровна Григорян. Яркую страницу в биологию развития вписал ученый с мировым именем Л.В. Белоусов (1935— 2017). Мировое признание получили его пионерские работы о роли механических натяжений в онтогенезе, завершившиеся предсказанием существования, а затем открытием механозависимой экспрессии генов (Белоусов, 1971, 1987; Beloussov, 2015). Его ученик Е.А. Иванов (1945–2014) был не только выдающимся экспериментатором, но и ярчайшим педагогом и организатором учебного процесса, Советником Ректора Гаванского университета. Выпускник кафедры проф. Николай Дмитриевич Озернюк в течение многих лет возглавлял Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Крупные биологи развития Эдуард Борисович Всеволодов (Республика Казахстан), Нгуен Монг Хунг (Социалистическая Республика Вьетнам), создатель лаборатории генетики развития Института общей генетики РАН д. б. н. Борис Николаевич Конюхов, глубокий мыслитель и тончайший экспериментатор Владимир Николаевич Мещеряков (1947—1994). Выпускником кафедры является Лауреат Государственной Премии Российской Федерации, академик РАН, Ректор РНИМУ им. Н.И. Пирогова Сергей Анатольевич Лукьянов, один из ведущих биологов развития в мире, сотрудник Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, д. б. н. Андрей Георгиевич Зарайский.

Все наши выпускники, и выдающиеся ученые, и менее известные труженики науки, и те, кому волею судеб пришлось оставить научное поприще, — это люди, посвятившие хотя бы часть своей жизни нашей *alma mater*, нашей почтенной юбилярше — КАФЕДРЕ ЭМБРИОЛОГИИ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдыев В.К., Дашинимаев Э.Б., Неклюдова И.В. и др. Современные технологии получения первичных половых клеток человека *in vitro* // Биохимия. 2019. Т. 84. № 3. С. 330—342.
- *Белоусов Л.В.* Проблема эмбрионального формообразования. М.: Изд-во МГУ, 1971. 174 с.
- *Белоусов Л.В.* Биологический морфогенез. М.: Изд-во МГУ, 1987. 238 с.
- Голиченков В.А. Жизнь и деятельность Степана Ивановича Кулаева // В кн. "Проблемы репродуктивной биологии в трудах профессора С.И. Кулаева и его последователей" (п/ред. Макеевой А.П., Захидова С.Т.). М.: Изд-во МГУ, 1998. С. 9—15.
- Слепцова Л.А., Кочерга М.П., Дабагян Н.В., Газарян К.Г. Трансплантация ядер в яйцеклетки костистых рыб (вьюн): анализ нормального развития и аномалий // Журн. общей биологии. 1983. Т. 244. № 5. С. 701—709.
- Слепцова Л.А., Доронин Ю.К., Бенюмов А.О., Языков А.А. Трансплантация ядер клеток ранних зародышей

- амфибий и млекопитающих в неоплодотворенные яйцеклетки вьюна // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 1993. № 1. С. 19—31.
- Супруненко Е.А., Сазонова Е.А., Куринов А.М. и др. К характеристике внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток человека// Гены & клетки. 2019. Т. 14. С. 226—227.
- Шафеи Е.В., Ржанова Л.А., Новикова Ю.П. и др. Ответ клеток ретинального пигментного эпителия человека на воздействие кондиционированных сред регенератов сетчаток тритона // Цитология. 2020. Т. 62. № 9. С. 728—743. https://doi.org/10.31857/S004137712009006
- Ambrosi D., Beloussov L.V., Ciarletta P. Mechanobiology and morphogenesis in living matter: a survey Meccanica // Meccanica. 2017. V. 52. № 14. P. 3371—3387.
- Bagaeva T.S., Kupaeva D.M., Vetrova A.A. et al. cWnt signaling modulation results in a change of the colony architecture in a hydrozoan // Developmental Biology. 2019. V. 456. № 2. P. 145–153. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.08.019
- Beloussov L.V. Morphomechanics of Development. Springer Cham Heidelberg N.Y.—Dordrecht—London. 2015. 195 p.
- Beloussov L.V., Troshina T.G., Glagoleva N.S. et al. Local and global dynamics in collective movements of embryonic cells // BioSystems. 2018. V. 173. P. 36–51.
- Bredov D., Volodyaev I. Increasing complexity: Mechanical guidance and feedback loops as a basis for self-organization in morphogenesis // BioSystems. 2018. V. 173. P. 133–156.
- Bredov D.V., Evstifeeva A.U. Role of mechano-dependent cell movements in the establishment of spatial organization of axial rudiments in Xenopus laevis embryos // Russian J. Developmental Biology. 2017. V. 48. № 1. P. 16–22.
- Filatov M.A., Nikishin D.A., Khramova Y.V. et al. Reference genes selection for real-time quantitative PCR analysis in mouse germinal vesicle oocytes // Zygote. 2019. P. 1–6.
- Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A. et al. Application of femtosecond laser microsurgery in assisted reproductive technologies for preimplantation embryo tagging // Biomedical Optics Express. 2019. V. 10. № 6. P. 2985— 2995.
- Kosheleva N.V., Efremov Yu.M., Shavkuta B.S. et al. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model // Scientific Reports. 2020. V. 10. P. 12614.
- Kremnyov S., Henningfeld K., Viebahn C., Tsikolia N. Divergent axial morphogenesis and early shh expression in vertebrate prospective floor plate // EvoDevo. 2018. V. 9. № 1. P. 4.
- Kupaeva D., Konorov E., Kremnyov S. De novo transcriptome sequencing of the thecate colonial hydrozoan, Dynamena pumila // Marine Genomics. 2020. V. 51. P. 100726.
- Luchinskaia N.N., Cherdantsev V.G., Ermakov A.S. et al. Morphomechanical reactions and mechanically stressed structures in amphibian embryos, as related to gastrulation and axial organs formation // BioSystems. 2018. V. 173. P. 18–25.

- *Molchanov A. Yu, Burlakova O.V., Golichenkov V.A.* Regeneration of the skin pigment system during larval development of the clawed frog // Russian J. Developmental Biology. 2017. V. 48. № 1. P. 75–80.
- Sleptsova L.A., Popov D.V. Problem of conservation and realization of genetic information. II. Transplantation of the nuclei of cryoconserved cells into unfertilized eggs // Ontogenez. 1996. V. 27. № 6. P. 456.
- Vasilegina Y.I., Kremnev S.V., Nikishin D.A. Effects of mechanical stretching of embryonic tissues on axial structure formation in *Xenopus laevis* // Russian J. Developmental Biology. 2017. V. 48. № 1. P. 34–40.
- Velikanov A.N., Tambiev A.Kh., Golitchenkov V.A. The influence of millimeter wave electromagnetic radiation on the growth of MSC, HaCaT and HeLa Cell lines // Онтогенез. 2018. Т. 49. № 4. Приложение. С. 50.

# To the 80th Anniversary of the Embryology Department in Lomonosov Moscow State University

V. A. Golichenkov<sup>1</sup>, O. V. Burlakova<sup>1, \*</sup>, and A. V. Vasiliev<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119234 Russia <sup>2</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia \*e-mail: burlakovao@mail.ru

The article presents a brief history of the establishment, the formation of a scientific school, the main educational and scientific achievements of the Department of Embryology, Faculty of Biology, Moscow State University, which has graduated specialists — embryologists and developmental biologists for 80 years.

Keywords: Embryology Department of Lomonosov Moscow State University, scientific school, education of developmental biologists

#### \_\_\_\_\_ 80 ЛЕТ КАФЕДРЕ ЭМБРИОЛОГИИ МГУ \_\_ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

УЛК 577.218

#### ЛОКАЛИЗАЦИЯ PHK GERMES В ООЦИТАХ XENOPUS

© 2021 г. М. Б. Пономарев<sup>а</sup>, В. В. Кондукторова<sup>b, \*</sup>, Н. Н. Лучинская<sup>b</sup>, А. В. Белявский<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Вавилова, 32, Москва, 119991 Россия <sup>b</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия \*e-mail: virgo584@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.05.2020 г. После доработки 26.06.2020 г. Принята к публикации 30.06.2020 г.

Идентифицированный нами ранее ген Germes экспрессируется в ооцитах Xenopus, мРНК которого ассоциируется с половой плазмой. В настоящем исследовании были охарактеризованы цис-действующие факторы, которые регулируют локализацию РНК germes в развивающемся ооците. Инъекция флуоресцентно меченых РНК, соответствующих различным частям последовательности мРНК germes, продемонстрировала, что последовательность, необходимая и достаточная для правильной локализации в митохондриальное облако ооцита ранней стадии развития, расположена в 3'НТО. Было обнаружено, что домен, богатый САС-мотивами, выявленными в дистальной части 3 'НТО, является достаточным для локализации РНК. В пределах этого домена были идентифицированы один незначительный (а) и два необходимых (b и c) поддоменов. Было обнаружено, что 37-буквенный субдомен с, примыкающий к поли-А хвосту, нужен для локализации, поскольку его удаление из нескольких протестированных конструкций лишает их способности к локализации.

*Ключевые слова:* локализация РНК, элементы локализации, НТО, митохондриальное облако, РНК-связывающие белки, САС мотивы, ооциты Xenopus

Анализ последовательности 3 'НТО показал наличие трех различных мотивов локализации РНК в

**DOI:** 10.31857/S0475145021010055

ооните.

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Локализация молекул РНК в клетках является важным и широко распространенным механизмом регуляции целого ряда клеточных функций. У многих видов животных РНК, локализованные в ооците, играют решающую роль в раннем развитии, инициируя разнообразные процессы в различных областях зародыша. Такие эндогенные РНК могут концентрироваться в ооците на анимальном или вегетативном полюсе, но на вегетативном полюсе концентрирование за счет заякоривания в кортексе идет массово (King et al., 2005). Некоторые из локализованных материнских РНК сосредоточены на вегетативном полюсе в половой плазме – особой структуре, определяющей развитие первичных половых клеток у некоторых многоклеточных, включая бесхвостых амфибий. Как правило РНК участвующие в ранней разметке зародыщей Xenopus и специализации соматических тканей локализуются на вегетативный полюс на более поздней стадии развития ооцита, чем РНК половой плазмы (Кloc, Etkin, 1995). Механизм локализации РНК в превителлогенных ооцитах (стадия I) включает в себя первоначальную ассоциацию этих РНК с околоядерной структурой, называемой митохондриальным облаком (МО), и носит название раннего или МЕТКО (Message Transport Organizer) опосредованного. В начале вителлогенеза (стадии II—III) МО приходит в контакт с вегетативным кортексом ооцита, где и закрепляются РНК и белки МО. Позже с III стадии роста ооцита и вплоть до созревания половая плазма выглядит как островки в субкортикальной области. Поздно вегетативно локализующиеся РНК используют механизм, включающий транспорт по микротрубочкам с участием кинезинов (Yisraeli et al., 1990; Betley et al., 2004; Yoon and Mowry, 2004; King et al., 2005).

Однако жесткой корреляции способа и времени локализации нет. Houston даже выделяет особый "промежуточный" путь (Houston, 2013). Для ряда РНК показана способность использовать оба эти пути. Так, РНК wnt11, как правило, локализуется ранним путем, но ее также обнаруживают в РНП частицах позднего пути. Другой пример — РНК половой плазмы Xcat2/nos1, Xpat, Xlsirt, использующие механизм МЕТRO, могут локализоваться в островки по механизму позднего пути (Zhou, King, 1996; Hudson, Woodland, 1998; Berekelya et al., 2003). И наоборот, ключевые вегетативные РНК Vg1 и VegT, локализующиеся по

позднему пути, обнаруживают в структурах половой плазмы (ПП), сформированных ранним механизмом (Nijjar, Woodland, 2013). Для РНК ПП germes основным путем локализации является МЕТКО, но после инъекций в ооцит на поздних стадиях обнаруживается в ПП, что говорит о возможности локализации эндогенной РНК, не попавшей в МО на ранней стадии, использовать поздний путь (Berekelya et al., 2003, 2007).

Исследования механизмов локализации различных мРНК у Хепориз привели к открытию множества цис-действующих элементов локализации (ЭЛ), в основном, в 3'-нетранслируемой области (НТО) последовательности РНК и трансдействующих с ними белков. Стало ясно, что единой консенсусной последовательности локализации РНК не существует. ЭЛ могут быть разной длины, как правило, около 300 п.н. (Вивипепко et al., 2002). У многих РНК были найдены одинаковые мотивы в элементах локализации, которые, как полагают, могут конкурировать за одни и те же транс-действующие белки (Houston, 2013). За последнее время накоплено немало такого рода дан-

ных, однако, ясной схемы локализации различных РНК к вегетативному полюсу ооцита попрежнему нет.

Описанная нами ранее РНК гена Germes локализуется в ооцитах Xenopus на вегетативный полюс по раннему механизму (Berekelya et al., 2003). Целью настоящего исследования было найти необходимый и достаточный ЭЛ, охарактеризовать цисдействующие последовательности, ответственные за это. Как и для многих других локализующихся РНК, было установлены мотивы, содержащие САС элементы в З'НТО germes. Попытки уменьшить размеры ЭЛ были в основном безуспешными, что указывает на то, что общая вторичная структура этого региона РНК важна для его функции.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Создание конструктов

В работе были использованы следующие олигонуклеотиды:

xGer-3U/Xho-S9: TCATCTCGAGTAAAGATGGTAAAGACTGAAAA;

xGer-3U/Xho-S8: TCATCTCGAGTATTGTTGGAGTGCAGTTTTT;

xGer-3U/Xho-S7: TCATCTCGAGTGTTTAGATGTGTCTTATATTTAG;

xGer-3U/Sal-A6: CTGAGTCGACATAAAATATTTGAATTTATTGAGG;

XhoI-UTR/s6: TCATCTCGAGTATCACTTTCTGCACTTTTT;

SpeI-UTR/as5: CAACTAGTATCCAATCTTATCAAATC;

SpeI-UTR/s5: AGACTAGTATAACTTTTGAACCAC;

SalI-UTR/as4: CTGAGTCGACGTATTAATTAGAAGTTGTG;

XhoI-UTR/s4: CATCCTCGAGTGCAAAATTGTCACTTG;

XhoI-UTR/s3: GACACTCGAGATAACTTTTGAACCACACTG;

XhoI-UTR/s2: CAGACTCGAGAAAAAAATGTATTTCATTTG;

UTR/as1: ACAAGCATGCACAGACTACAAATGAAATAC;

UTR/s1: GGCTTCATGCATGCAAAATTG.

Для получения конструкций для экспрессии поддоменов 3'HTO germes соответствующие фрагменты кДНК амплифицировали с плазмиды, содержащей полнодлинновую кДНК germes, с использованием следующих пар праймеров для указанных клонированных поддоменов.

c: XhoI-UTR/s4 & xGer-3U/Sal-A6 bc: XhoI-UTR/s3 & xGer-3U/Sal-A6 Lbc: XhoI-UTR/s2 & xGer-3U/Sal-A6 abc: XhoI-UTR/s6 & xGer-3U/Sal-A6 3'HTO: Ger-3U/Xho-S9 & xGer-3U/Sal-A6 a'bc: xGer-3U/Xho-S7 & xGer-3U/Sal-A6 a'bc: xGer-3U/Xho-S8 & xGer-3U/Sal-A6 abc': XhoI-UTR/s6 & SalI-UTR/as4 Lbc': XhoI-UTR/s3 & SalI-UTR/as4 c': XhoI-UTR/s4 & SalI-UTR/as4.

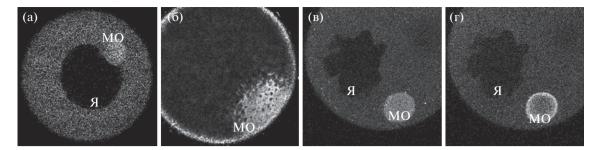
После амплификации фрагменты обрабатывали рестриктазами XhoI и SalI, встраивали в вектор pSP73 (Promega) и после клонирования проверяли секвенированием.

Для создания конструкций с делециями основные цепи, лишенные соответствующих областей, амплифицировали из плазмиды, содержащей полную 3'HTO со следующими парами праймеров:

3'UTRΔa: SpeI-UTR/s5 & SpeI-UTR/as5

3'UTRΔb: UTR/s1 & UTR/as1.

Конструкт 3'UTR $\Delta$ с был сделан из конструкта 3'HTO, путем удаления области рестриктазами SphI и SnaBI.



**Рис. 1.** З'НТО ответственна за локализацию РНК *germes* в митохондриальное облако ооцитов. (а, б) Полноразмерная флуоресцентно меченая мРНК *germes* локализуется в ооцитах I (а) и II/III (б) стадий преимущественно в МО через 24—48 ч. (в, г) Флуоресцентно меченые З'НТО РНК *germes* (в) и *xcat2* (г) совместно инъецированные в оцитах I/II стадии также локализуются в МО, однако *xcat2* концентрируется на его границах, в отличие от равномерно распределенного *germes*. Я — ядро, МО — митохондриальное облако.

#### Создание флуоресцентных РНК зондов

РНК-зонды были синтезированы с плазмид с помощью стандартных техник по протоколу производителя (mMessage mMachine, Ambion) с добавлением Alexa488-UTP или тетраметилродамин-UTP (Molecular Probes) и смеси немеченых нуклеотидов (соотношение 1 : 5). Несвязанные нуклеотиды удаляли с использованием колонок Sephadex G-50 Quick Spin (Roche).

#### Микроинъекции

Ооциты I/II стадии (или III/IV) (по Dumont, 1972) высвобождали из иссеченных яичников после обработки коллагеназой A (Sigma, 0.8 мг/мл в  $0.1 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) путем легкого покачивания в среде L-15: 50% среда Leibowitz (Sigma) с добавлением 1 мг/мл BSA, 100 мкг/мл гентамицина, 1 ед./мл пенициллина и 1 мкг/мл стрептомицина. Затем ооциты промывали трижды и переносили в свежую среду. Микроинъекции в объеме 30-100 пл (в концентрации 1 мг/мл) проводили с помощью аппарата Eppendorf Femtojet. После инъекций ооциты переносили в свежую среду L-15, но без БСА с добавлением 1 мМ L-глутамина, 1 мкг/мл инсулина, 15 мМ Hepes (рН 7.8), 50 ед./мл нистатина и 5-10% сыворотки Xenopus, содержащей вителлогенин (Opresko, 1991). Культивирование проводили в темноте при 18°C в герметичных камерах, состоящих из двух стеклянных покровных стекол, разделенных прокладкой из увлажненной фильтровальной бумаги (Zhou, King, 1996).

#### Конфокальная микроскопия ооцитов

Для визуализации эндоплазматического ретикулума в ооциты инъецировали 30 пл насыщенного DiIC16 в растительном масле Wesson (Terasaki, Jaffe, 1991). Изображения были получены через 3—30 ч после введения РНК. Для исследований мутаций две РНК, синтезированные в присутствии различных флуоресцентных меток (Alexa488 и Те-

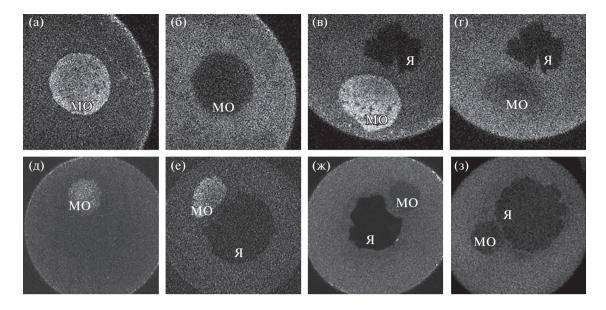
tramethylrhodamine), смешивали в равном молярном соотношении и инъецировали в ооциты. После инкубации в течение 24—48 ч ооциты исследовали на инвертированном конфокальном микроскопе Leica SP2 с использованием программного обеспечения Leica и ImageJ.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

## PHK germes локализуется в митохондриальное облако с помощью 3'HTO

Для определения цис-последовательности, ответственной за локализацию РНК germes, флуоресцентно меченые синтетические РНК или РНК участков регионов germes инъецировали в ранние ооциты (ст. I–II/III), а затем исследоваловали их распределение с помощью конфокальной микроскопии. Через 24-48 часов после инъекции полноразмерная РНК germes локализовалась в МО ооцитов, что соответствует раннему механизму локализации (рис. 1а, 1б). Кроме того, было показано, что как полноразмерная PHK germes, так и 3'НТО РНК колокализуются в МО с совместно инъецированной 3'HTO PHK xcat2 (nanos homolog 1) (рис. 1в, 1г), в отличие от РНК открытой рамки считывания (ORF) germes, которая оставалась равномерно распределенной в цитоплазме (данные не приводятся). Был сделан вывод, что за правильную локализацию PHK germes в ооците необходимой и достаточной является З'НТО, где должны содержаться цис-действующие элементы локализации.

Удалось показать, что инъецированные флуоресцентные РНК *xcat2* и *germes* по-разному распределяются внутри МО: РНК *germes* — равномерно, а РНК Xcat2 концентрируется на границах МО (рис. 1в–1г). Локализация других мРНК в разных компартментах МО отмечалась и ранее при исследовании локализации методом электронной микроскопии (Kloc et al., 2002).



**Рис. 2.** Локализация РНК поддоменов 3'HTO *germes*. (а—г) РНК 3'HTO с делецией поддомена b (б) и с делецией поддомена c (г) не локализуются в МО в отличие от совместно инъецированной полной 3'HTO в качестве положительного контроля (а и в соответственно). (д—е) РНК поддоменов bc и Lbc локализуется в МО. (ж—з) РНК поддоменов c и Lbc исключаются из митохондриального облака. Я—ядро, МО—митохондриальное облако.

## CAC-богатый регион 3'HTO PHK germes необходим для локализации

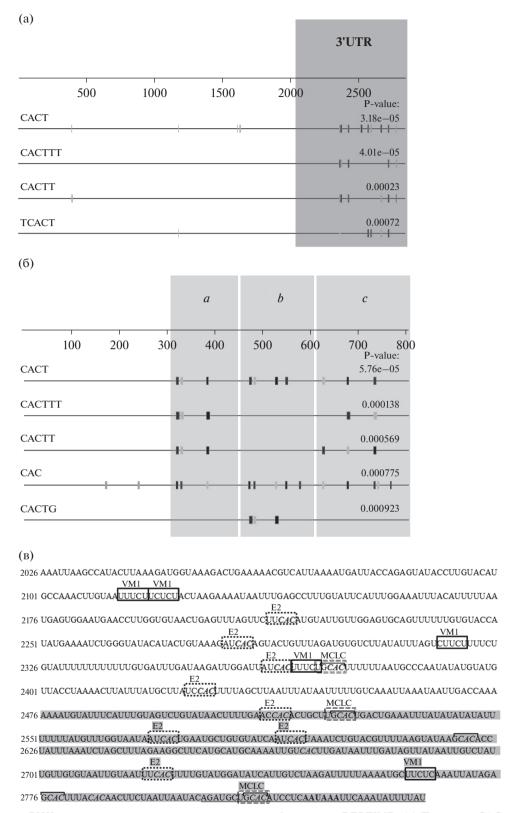
Для идентификации области мРНК germes, возможно вовлеченной в локализацию, полноразмерная последовательность была проанализирована с помощью программы REPFIND (Betley et al., 2002). Протяженный домен, богатый САСмотивами, был обнаружен в 3'-концевой области 3'НТО РНК germes (рис. 3а). Первоначально, мы подразделили его на три условных поддомена, которые были обозначены как a, b и c (рис. 3б).

Инъекция родамин-меченой РНК З'НТО, в которой отсутствуют области a, b или c, совместно с Alexa—488-меченой РНК З'НТО (в качестве положительного контроля) в ооциты І/ІІ стадии показала, что РНК, лишенные областей b или c, были полностью или частично исключены из МО, в отличие от полноразмерной РНК З'НТО (рис. 2a-2r). Удаление области a не препятствовало локализации РНК в МО (не показано). Можно сделать вывод, что дистальные САС повторы поддоменов b и c необходимы для правильной локализации РНК germes, тогда как поддомен a не является обязательным, хотя и влияет на процесс.

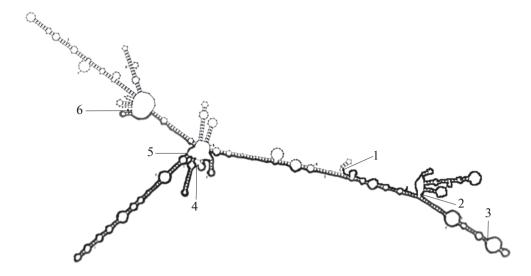
С помощью алгоритма MFOLD (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003) была предсказана вторичная структура 3'НТО последовательности Germes, в частности САС-богатой области. С высокой вероятностью можно предположить, что последовательность формирует компактные вторичные структуры на протяжении всей длины 3'НТО (рис. 4). Области а и b (фрагменты 1—4, рис. 4) вместе формируют совместную двухцепочечную струк-

туру с петлями и группой шпилек, полностью сформированной поддоменом a (участок 1-2, рис. 4). Оставшаяся часть поддомена a, обозначенная как L (участок 2-3, рис. 4), образует спираль с петлями совместно с b. Регион c отмечен на рис. 4, участок 4-6, большая его часть формирует две автономные спирали с петлями, который мы условно назвали c' (участок 4-5 на рис. 4).

Основываясь на анализе вторичной структуры, были синтезированы и проверены в отношении их способности к локализации в ооцитах различные фрагменты последовательности РНК, представленные на рис. 5. Флуоресцентные РНК, соответствующие этим последовательностям, инъецировали в ооциты I/II стадии. Последовательность *abc* локализуется в MO как и совместно вводимая полная последовательность З'НТО в качестве положительного контроля. РНК с фрагментов a, b, c, c', abc', Lb и Lbc' не локализовались в МО (рис. 26, 2ж, 23). PHK abc'-конструкции отличается от *abc* отсутствием дистальных 37 п.н., что указывает на важность этой короткой 3'-концевой последовательности (участок 5-6 на рис. 4). Этот результат был также подтвержден аналогичными сравнениями между областями вс (рис. 2д) и bc' (не показаны) и областями Lbc и Lbc' (рис. 2e, 23). В каждом случае удаление 3'-конца приводило к нарушению локализации РНК конструкта. Таким образом, минимальной последовательностью, поддерживающей локализацию, является область bc, хотя она окрашивает MO не типично. Следующий по размеру конструкт *Lbc* локализуется неотличимо от контрольной З'НТО.



**Рис. 3.** Анализ РНК *germes* с использованием программного обеспечения REPFIND. (а) Показаны CAC-содержащие повторы с наименьшими значениями Р (изображены штрихами на последовательности). З'НТО выделена серым цветом. (б) Домен, богатый CAC-повторами, разделен на три поддомена, *a*, *b* и *c*. Показаны CAC-содержащие повторы с самыми низкими значениями Р. (в) Последовательность З'НТО *germes*. Нумерация соответствует полноразмерной РНК *germes*. Минимальная локализующаяся область *bc* выделена серым цветом. CAC мотивы выделены курсивом с тенью. З'-терминальная 37 п.н. область, критическая для локализации, подчеркнута. Сайт полиаденилирования показан жирным шрифтом. Отмечена повторность GCAC. Выделены мотивы VM1, E2 и MCLC.



**Рис. 4.** Вторичная структура 3'HTO PHK *germes* с наименьшим значением P, полученная с использованием алгоритма MFOLD. Фрагмент 1-3 соответствует поддомену a, фрагмент 3-4 – поддомену b, фрагмент 4-6 – поддомену c, 2-4 соответствует области b, 4-5 – области c.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании мы показали, что 3'НТО PHK germes является необходимой и достаточной для ее правильной локализации в ооцитах по раннему пути. Была изучена роль различных регионов РНК 3'HTO germes в локализации. Хотя более детальный анализ делеций проведен не был, похоже, что минимальная последовательность, необходимая для локализации, не может быть меньше, чем область bc. Картина локализации в MO bcуже выглядит атипично. Усеченные на 5' или 3' конце производные области bc конструкции c и bc' теряли способность к локализации. Таким образом, ЭЛ РНК germes может быть определена как последовательность из 300 п.н., сходная с элементами локализации, определенными для ранней xcat2 (240 п.н.) и поздних локализующихся РНК Vg1 (340 п.н.) и VegT (300 п.н.) (Bubunenko et al., 2002).

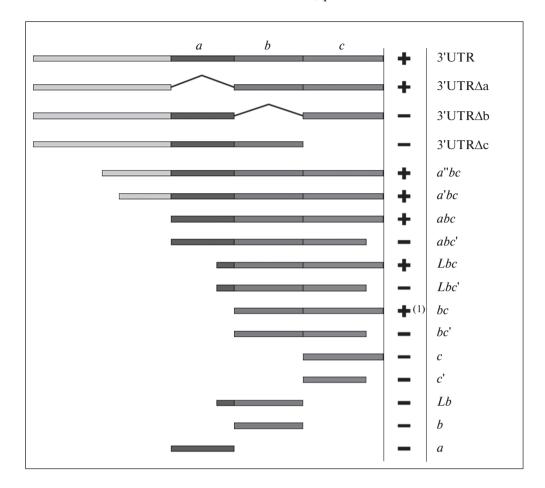
Какие особенности РНК *germes* определяют ее поведение локализации в ооцитах? Мы не нашли четких доказательств критической роли вторичной структуры РНК. Конструкция bc, которая в соответствии с предсказаниями MFOLD не способна имитировать свертывание полной З'НТО, локализовалась почти так же, как и полноразмерная З'НТО и более длинные конструкции. Кроме того, было продемонстрировано, что наиболее дистальная 3'-концевая область фрагмента c, которая, как ожидалось, не участвует в компактном сворачивании областей bc или Lbc, является важной для локализации. Исследования других ЭЛ известных РНК в ооцитах Xenopus также не выявили важности вторичной структуры РНК в локализации, исключение составляет PHK Xlsirt (Allen et al., 2003). Отсутствие корреляции между

предсказанной вторичной структурой РНК и ее поведением может отражать как недостатки алгоритма MFOLD, так и то, что вторичная структура РНК меняется при взаимодействии с белками.

Какова бы ни была роль вторичной структуры, САС мотивы остаются существенными для локализации. В 3'НТО germes обнаружено 15 повторов САС, тогда как в РНК их всего 6 (рис. 3а). Количество САС мотивов само по себе не является достаточным для локализации РНК. В частности, область abc' содержит больше количество мотивов САС, чем область bc, но только последняя продемонстрировала способность правильно локализоваться. Потеря одного мотива САС в критической 3' области домена c (подчеркнута на рис. 3в) не компенсировалась добавлением домена a, содержащего три мотива САС.

Для других РНК также известны мотивы локализации, содержащие САС повторы, например мотив UGCAC локализации в митохондриальное облако (MCLS). Он был найден в нетранслируемой области РНК xcat2/nos I, отвечающей за локализацию в МО (Zhou, King, 1996; Chang et al., 2004). Однако для РНК xpat показано, что кластеризованные повторы UGCAC необходимы, но не достаточны для локализации в МО (Betley et al., 2002). В 3'НТО РНК germes обнаружено три мотива MCLS (UGCAC), два из которых располагаются в области bc, ответственной за локализацию.

Среди мотивов САС, обнаруженных в 3'HTO germes, найдены 8 последовательностей UUCAC, AUCAC, ACCAC и UCCAC. Показано, что они участвуют во взаимодействии с белком Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 и получили название E2 (WYCAC) (Betley et al., 2002; Kwon et al., 2002). Необходимо



**Рис. 5.** Схема исследованных РНК-конструктов и их способность локализоваться в MO ооцитов. (1) — РНК bc поддомена показывает атипичную картину локализации.

заметить, что локализация многих РНК в ооцитах многих видов хордовых сопряжена с наличием E2 (UUCAC) мотива и взаимодействием с белком Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 (Betley et al., 2002).

В РНК germes имеется также цис-действующая последовательность мотива, названного VM1(YYUCU): UUUCU, CUUCU, UCUCU. Последовательность связывает белок hnRNPI/ VgRBP60/Ptbp1 (Cote et al., 1999; Lewis et al., 2004). В двух работах было продемонстрировано, что кластеризация сайтов связывания белков Vg1RBP/Vera/Igf2bp3 и hnRNPI/VgRBP60/Ptbp1 имеет решающее значение для локализации РНК Vg1 и VegT по позднему пути (Bubunenko et al., 2002; Snedden et al., 2013). Интересно, мотивы E2 и VM1 важны для локализации как к вегетативному, так и анимальному полюсу, как это показано для PHAX PHK (Snedden et al., 2013). В PHK germes сайты E2 и VM1 также кластеризованы, однако находятся вне зоны bc, ответственной за локализацию.

Choo с соавторами продемонстрировали, что ранние и поздние пути локализации РНК ис-

пользуют общие клеточные механизмы. Мотивы MCLC (UGCAC), E2 (UUCAC) важны для локализации PHK как ранним, так и поздним путем (Choo et al., 2005). PHK germes также содержит мотивы ранней и поздней локализации. Именно они, по видимому, обеспечивают локализацию на вегетативный полюс после инъекции PHK в ооциты стадии III—IV по позднему механизму. Возможно, это путь используется и эндогенной PHK germes. На стадии II—III не вся PHK сконцентрирована в МО и транспортируется по раннему пути, существенная часть PHK остается распределенной по объему ооцита. Можно предположить, что эта PHK использует поздний механизм для локализации в половую плазму вегетативного полюса.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Evelyn Houliston (Sorbonne Université, Paris) за неоценимую методическую помощь в подготовке и проведении экспериментов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госНИР № 30-2-16 МГУ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания и эвтаназии соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы А.В. Белявский и М.Б. Пономарев — планирование экспериментов, авторы М.Б. Пономарев и В.В. Кондукторова — создание конструктов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и подготовке публикации. М.Б. Пономарев, В.В. Кондукторова внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allen L., Kloc M., Etkin L.D. Identification and characterization of the Xlsirt cis-acting RNA localization element // Differentiation. 2003. V. 71. P. 311–321.
- Berekelya L.A., Ponomarev M.B., Luchinskaya N.N. et al. Xenopus Germes encodes a novel germ plasm-associated transcript // Gene Expr. Patterns. 2003. V. 3. P. 521–524.
- Berekelya L.A., Mikryukov A.A., Luchinskaya N.N. et al. The protein encoded by the germ plasm RNA Germes associates with dynein light chains and functions in Xenopus germline development // Differentiation. 2007. V. 75(6). P. 546–558.
- Betley J.N., Frith M.C., Graber J.H. et al. A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. 1756–1761.
- Betley J.N., Heinrich B., Vernos I. et al. Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in Xenopus oocytes // Curr. Biol. 2004. V. 14. P. 219–224.
- Bubunenko M., Kress T.L., Vempati U.D. et al. A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of Xenopus oocytes // Dev. Biol. 2002. V. 248. P. 82–92.
- Cote A. C., Gautreau D., Denegre J. et al. A Xenopus protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization // Mol Cell. 1999. V. 4(3). P. 431–437.
- Chang P., Torres J., Lewis R.A. et al. Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in Xenopus oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum // Mol. Biol. Cell. 2004. V. 15. P. 4669–4681.
- *Choo S.*, *Heinrich B.*, *Betley J.N. et al.* Evidence for common machinery utilized by the early and late RNA localization pathways in Xenopus oocytes // Dev. Biol. 2005. V. 278. P 103–117.

- Dumont J.N. Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin).
  I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // J. Morphol. 1972. V. 136. P. 153–179.
- Hudson C., Woodland H.R. Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of Xenopus laevis // Mech. Dev. 1998. V. 73. P. 159–168.
- Houston D. W. Regulation of cell polarity and RNA localization in vertebrate oocytes // Int. Rev. Cell. Mol. Biol. 2013. V. 306. P. 127–185.
- King M.L., Messitt T.J., Mowry K.L. Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte // Biol. Cell. 2005. V. 97. P. 19–33.
- *Kloc M., Etkin L.D.* Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in Xenopus oocytes // Development. 1995 V. 121. P. 287–297.
- Kloc M., Dougherty M.T., Bilinski S. et al. Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of Xenopus // Dev. Biol. 2002. V. 241. P. 79–93.
- Kwon S., Abramson T., Munro T.P. et al. UUCAC- and Veradependent localization of VegT RNA in Xenopus oocytes // Curr. Biol. 2002. V. 12. P. 558–564.
- Lewis R.A., Kress T.L., Cote C.A. et al. Conserved and clustered RNA recognition sequences are a critical feature of signals directing RNA localization in Xenopus oocytes // Mech. Dev. 2004. V. 121. P. 101–109.
- Mathews D.H., Sabina J., Zuker M. et al. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure // J. Mol. Biol. 1999. V. 288. P. 911–940.
- Nijjar S., Woodland H.R. Localisation of RNAs into the germ plasm of vitellogenic Xenopus Oocytes // PLoS ONE. 2013. V. 8(4). e61847.
- Opresko L.K. Vitellogenin Uptake and in Vitro Culture of Oocytes // Methods Cell Biol. 1991. V. 36. P. 117–132.
- Snedden D.D., Bertke M.M., Vernon D. et al. RNA localization in Xenopus oocytes uses a core group of trans-acting factors irrespective of destination // RNA. 2013. V. 19. P. 889–895.
- *Terasaki M., Jaffe L.A.* Organization of the sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization // J. Cell Biol. 1991. V. 114. P. 929–940.
- *Yisraeli J.K.*, *Sokol S.*, *Melton D.A*. A two-step model for the localization of maternal mRNA in Xenopus oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of *Vg1* mRNA // Development. 1990. V. 108. P. 289–298.
- *Yoon Y.J., Mowry K.L.* Xenopus Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin // Development. 2004. V. 131. P. 3035–3045.
- Zhou Y., King M.L. RNA transport to the vegetal cortex of Xenopus oocytes // Dev. Biol. 1996. V. 179. P. 173–183.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 3406–3415.

#### Localization of Germes RNA in Xenopus Oocytes

#### M. V. Ponomarev<sup>1</sup>, V. V. Konduktorova<sup>2, \*</sup>, N. N. Luchinskaya<sup>2</sup>, and A. V. Belyavsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>2</sup>Department of Embryology, Faculty of Biology, Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia \*e-mail: virgo584@yandex.ru

We have previously identified a *Xenopus* maternally expressed gene *Germes*, whose mRNA associates with germ plasm. In the present study, we have characterized the cis- and trans-acting factors which regulate the localization of *Germes* RNA within the developing oocyte. Injection of fluorescently labeled RNAs corresponding to various parts of the *Germes* message demonstrated that the sequence information necessary and sufficient for correct localization in the mitochondrial cloud region of the early oocyte is located in the 3' UTR. A domain rich in CAC motifs identified in the distal part of the 3' UTR was found to be sufficient to mediate RNA localization. Within this domain, one non-essential (*a*) and two essential (*b* and *c*) subdomains were identified. A 37-base region of the c subdomain adjacent to the poly(A) tail was found to be important for localization since its removal from several tested constructs abolished their localization capacity. Analysis of the 3' UTR sequence showed the presence of three different motives for RNA localization in the oocyte.

Keywords: RNA localization, localization elements, UTR, mitochondrial cloud, RNA-binding proteins, CAC motifs, Xenopus oocytes

#### \_\_\_\_ 80 ЛЕТ КАФЕДРЕ ЭМБРИОЛОГИИ МГУ \_\_\_\_ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

УДК 651.3:636.32:591.478.1

#### НЕКОТОРЫЕ ПАРАДОКСАЛЬНЫЕ ЯВЛЕНИЯ ГИСТОФИЗИОЛОГИИ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ

© 2021 г. Э. Б. Всеволодов<sup>а</sup>, А. С. Мусаева<sup>b, \*</sup>, И. Ф. Латыпов<sup>b</sup>, О. В. Бурлакова<sup>c</sup>, Е. Н. Никерясова<sup>c</sup>, В. А. Голиченков<sup>c</sup>

<sup>а</sup> Казахский национальный университет им. аль Фараби, ул. аль Фараби, 71, Алматы, 050040 Республика Казахстан <sup>b</sup> Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, ул. аль Фараби, 93, Алматы, 050060 Республика Казахстан <sup>c</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: aimus\_@mail.ru
Поступила в редакцию 12.12.2019 г.
После доработки 18.03.2020 г.
Принята к публикации 21.03.2020 г.

Работа посвящена изучению морфологических особенностей волосяного фолликула и волоса грубошерстной овцы. Ее результаты позволяют объяснить парадоксальное явление сочетания прочного закрепления волоса в коже с его непрерывным продвижением в сторону поверхности кожи в процессе роста волос. Показано приуроченное к муфте волосяного фолликула образование выступов в кутикуле волоса и комплементарных им впадин в кутикуле внутреннего влагалища, разъединяющихся только ближе к поверхности волоса в области ниже истмуса. Изучена также изменчивость некоторых признаков волос (диаметр волоса и соотношение толщины его слоев) на стандартном участке кожи, а также влияние внешних условий на формирование структуры отдельного волоса. Обсуждаются возможные механизмы регуляции временной и пространственной изменчивости структуры волос.

Ключевые слова: волосяной фолликул, овца, морфогенез волоса, рост волоса

**DOI:** 10.31857/S0475145020040084

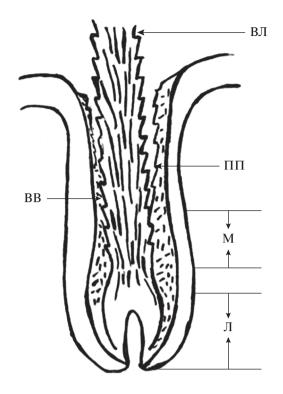
#### **ВВЕДЕНИЕ**

Волосяные фолликулы рассматриваются как модельный объект биологии индивидуального развития (Oliver, 1971), гистофизиологии (Chapman, 1971) и цитофизиологии стволовых клеток (Oshima et al., 2001; Reik et al., 2001; Rhee et al., 2006; Nowak et al., 2008; Greco et al., 2009; Rompolas et al., 2012; Panteleyev, 2018), а также как объект исследования молекулярно-генетических механизмов, не только определяющих морфогенез самого волоса как деривата кожи (Panteleyev et al., 1999, 2000; Rendl et al., 2005; Hwang et al., 2008; Romano et al., 2010), но и участвующих в гистиотипической специализации, включая механизмы, обеспечивающие рецепцию клеткой внешних сигналов (Rippa et al., 2013; Rudkouskaya et al., 2014).

Волосяной фолликул демонстрирует ряд парадоксальных гистофизиологических свойств. ПАРАДОКС ПЕРВЫЙ. С одной стороны, в ходе роста волоса его погруженная в кожу корневая часть непрерывно выдвигается в сторону поверхности кожи, а затем созревающий в ходе этого движения внутри кожи волос выдвигается дальше за пределы кожи, иногда несколько лет без остано-

вок (например, волос скальпа человека, волос мериносной овцы). С другой стороны, растущие продвигающиеся по влагалищу волосы крепко фиксированы в коже (Vsevolodov, 2017). Как можно совместить прочную фиксацию волоса с непрерывным его выдвижением из волосяного фолликула?

ВТОРОЙ ПАРАДОКС: парадоксальным можно назвать само фенотипическое разнообразие морфометрических характеристик волос (и их дериватов) в пределах индивидуального генома не только в пределах анатомической локализации (например, скальп, кожа тела, ладонь, дорсальная и вентральная поверхность концевых фаланг пальцев человека), но и в пределах анатомически обозначенных территорий. Если механизмы развития волоса, связанных с территориальными различиями, в достаточной мере исследованы (Всеволодов и др., 2015а), то формирование морфогенетических особенностей разнообразия волос внутри выделенных гомологичных территорий обращало на себя внимание исследователей в меньшей степени. Цель настоящей работы – попытка разрешения отмеченных парадоксов.



**Рис. 1.** Схема расположения муфты, крепящей стержень корня волоса в волосяном фолликуле. ВЛ — стержень корня волоса;  $\Pi\Pi$  - пилярное пространство; BB — внутреннее корневое влагалище; M — муфта;  $\Pi$  — луковица волосяного фолликула.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили образцы кожи и волос грубошерстных овец Ovis aries из стада экспериментальной базы Института экспериментальной биологии Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (г. Алматы), расположенной в Илийском районе Алматинской области. Взятие биопсийного материала проводили с соблюдением биоэтических норм, руководствуясь требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Под местной анестезией (инъекция 2% раствора новокаина) у овцы иссекали участок кожи размером  $0.5 \times 0.5$  см на дорзальной поверхности в области крестца, предварительно срезав образцы волос с этого участка. Рану обрабатывали антисептиком и овцу отпускали в стадо. В работе использованы образцы, взятые у 10 овец, не состоящих в прямом генетическом родстве. Биопсийный материал кожи от каждой из 10 овец разделяли на 2 части для анализа методом световой микроскопии (окраска гематоксилин-эозин) и методом трансмиссионной электронной микроскопии. Подготовку образцов для электронной микроскопии проводили по методике, описанной ранее (Конюхов и др., 1993).

Использовали микроскоп ПЭМ-125К, фирма SELMI. Часть срезанного пучка волос от каждой овцы (всего 10 образцов) анализировали с применением сканирующей электронной микроскопии. Подготовку образцов проводили по оригинальной методике, предложенной одним из соавторов настоящей статьи (И.Ф. Латыповым): часть срезанных волос - пучок волос, срезанных перпендикулярно оси волоса на определенном расстоянии от поверхности кожи, - помещали в пластиковый капилляр, затем лезвием бритвы делали срез перпендикулярно длине капилляра (получали поперечный срез пучка волос). Срез капилляра с заключенным пучком волос без обработки контрастирующими агентами анализировали с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM6510LA фирмы JEOL. По несколько волос (не менее 10), оставшихся от каждого из 10 образцов, анализировали под световым микроскопом без гистологической обработки, определив время начала роста волоса (в зависимости от сезона) по скорости его выдвижения из кожи (у грубошерстной овцы порядка 0.5 мм в сутки). Фотографировали участки одного волоса, соответствующие этапу формирования в определенное время года.

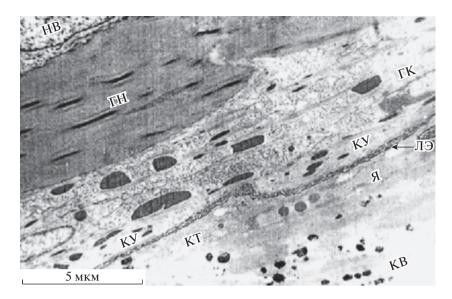
#### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Анализируя структуру волосяного фолликула и волоса после выхода из кожи, удалось проследить особенности формирования их структуры.

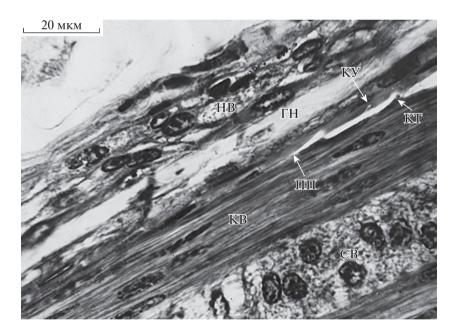
Поперечные срезы кожи с волосом на разной глубине волосяного фолликула на уровне муфты и над ней (рис. 1) позволили продемонстрировать разную степень сопряженности клеток коркового слоя волоса с клетками внутреннего влагалища.

На электронной микрофотографии, полученной при анализе срезов кожи на глубине, соответствующей муфте волосяного фолликула, хорошо различимо образование выступов как клеток внутреннего влагалища, так и сопряженных с ними зубчиков клеток кутикулы волоса (рис. 2). В клетках кутикулы волоса видны апоптозные сферические тельца, эпикутикула лабиринтообразна, что свидетельствует о завершающих этапах кератинизации клеток. Слой Гексли внутреннего влагалища оказывается наименее ороговевшим на данном уровне. Ороговевший слой Генле внутреннего влагалища имеет узкие складки.

В верхней границе "муфты" (рис. 3, световой микроскоп) появляется воздушная щель между волосом и кутикулой внутреннего влагалища — пилярный просвет. Видно, что выступающие зубцы, сформированные кутикулой внутреннего влагалища, отошли от соответствующих ямок в кутикуле волоса. Степень кератинизации клеток выше наблюдаемой в клетках на уровне муфты. На срезе хорошо видны клетки сердцевины волоса.



**Рис. 2.** Участок волосяного фолликула вблизи нижней границы "муфты" грубошерстной овцы (Vsevolodov, 2017). KB — корковый слой волоса с меланосомами; KT — клетка кутикулы волоса; H — ядро клетки H — клетка кутикулы внутреннего влагалища; H — слой Генле внутреннего влагалища; H — ядро клетки наружного влагалища. Трансмиссионная электронная микроскопия. © 2017 Vsevolodov E.B. Published in "Hair and scalp disoders" Kutlubay and Serdaroglu, eds. under CC BY 3.0 license. Available from: http://dx.doi.org/10.5772/67275.

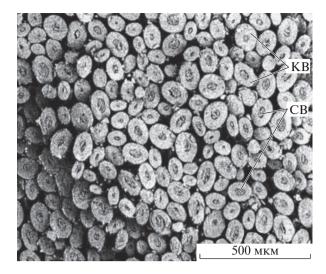


**Рис. 3.** Появление пилярного просвета на уровне верхней границы "муфты" у волоса грубошерстной овцы (Vsevolodov, 2017). ПП — пилярное пространство; CB — сердцевина волоса; KB — кора волоса; KT — зубец кутикулы волоса, KY — кутикула внутреннего влагалища;  $\Gamma H$  — ороговевший слой  $\Gamma$  енле внутреннего влагалища; HB — наружное влагалище. Световая микроскопия. Окраска гематоксилином и эозином. © 2017 Vsevolodov E.B. Published in "Hair and scalp disoders" Kutlubay and Serdaroglu, eds. under CC BY 3.0 license. Available from: http://dx.doi.org/10.5772/67275.

Использование сканирующего микроскопа для изучения поперечного среза пучка волос над поверхностью кожи (рис. 4) позволило обнаружить разнообразие диаметров и структуры волос. В волосах большего диаметра всегда представлена сердцевина волоса, варьирующая по относитель-

ному диаметру, тогда как в наиболее тонких волосах сердцевина отсутствует. Такая картина наблюдалась во всех исследованных образцах.

Анализ структуры волоса под световым микроскопом на протяжении длительного периода роста позволил проследить изменение его структуры,



**Рис. 4.** Электронная микрофотография поперечного среза пучка волос грубошерстной овцы. КВ — кора волоса; СВ — сердцевина волоса. Сканирующая электронная микроскопия.

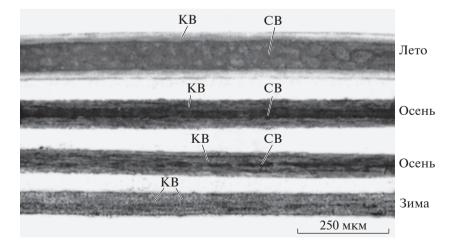
сформированной в разные сезоны. Временная принадлежность отрезка определялась по расстоянию от поверхности кожи по скорости роста, для овец этой породы равной около 0.5 мм в сутки. Отчетливо прослеживается изменение структуры волос, формирующейся в разные сезоны года. В летний период (рис. 5, верхний фрагмент) кутикула волоса наиболее тонкая, сердцевина имеет максимальный диаметр. Осенью (второй сверху фрагмент волоса) куликула утолщена, сердцевина сужена. В зимний период волос представлен кератинизированной кутикулой и полностью лишен сердцевины (рис. 5, нижний фрагмент). На протяжении третьего сверху фрагмента (рис. 5), соответствующего формированию волоса поздней осе-

нью, можно проследить переход от "осенней" к "зимней" структуре (справа налево на снимке). Следует отметить, что волосяной фолликул и волос позволяет проследить изменения во времени гистофизиологии волосяного фолликула, "запечатленные" в структуре волоса.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

ПАРАДОКС 1. Как можно совместить прочную фиксацию волоса с непрерывным выдвижением корня волоса? Решение этого парадокса в том, что выдвижение происходит с помощью гистофизиологических механизмов, обеспечивающих, например, у овцы, выдвижение волоса (рост) со скоростью, порядка 0.5 мм в сутки, т.е. 18 см в год. Та морфофизиологическая структура, которая играет важную роль в его продвижении к поверхности кожи, обеспечивает и фиксацию волоса в коже. Стержень волоса в верхней (ближе к поверхности кожи) части волосяного фолликула отделен от окружающих слоев фолликула воздушной щелью ("пилярным просветом"). В нижней части волосяного фолликула, где только начинающий накапливать кератин корень волоса граничит с камбиальной зоной луковицы, клетки лишены механической прочности и не могут фиксировать волос в коже. Следовательно, стержень волоса зафиксирован в коже и одновременно снабжен механизмом медленного выдвижения к поверхности кожи на средней глубине волосяного фолликула (рис. 1).

Близкий к завершению ороговения волос тесно контактирует с поверхностью внутреннего корневого влагалища (рис. 2), причем выступающие зубцы наружной поверхности волоса входят в соответствующие ямки внутренней поверхности внутреннего корневого влагалища как зубцы шестеренки между зубцами сопряженной с нею



**Рис. 5.** Фрагменты одного и того же волоса грубошерстной овцы, росшего непрерывно с лета по конец весны. КВ – кора волоса; СВ – сердцевина волоса. Световая микроскопия без окрашивания гистологическими красками.

второй шестеренкой. Как клетки поверхности волоса (кутикула волоса и подстилающий ее корковый слой), так и клетки внутреннего корневого влагалища (слой кутикулы и слой Генле) близки к завершению кератинизации и, следовательно, имеют высокую механическую прочность. Это связано с тем, что большая часть клетки или почти весь ее объем заполняются кератином или кератиноподобными белками. Кератины образуют волокнистый компонент (промежуточные филаменты), во внутреннем влагалище и корковом слое встроены в матрикс, образованный богатыми цистеином кератин-ассоциированными белками (Rogers, 2004). На поздних стадиях кератинизации матриксные белки претерпевают структурные уплотнение за счет образования дисульфидных связей (Fraser, Parry, 2012), и это значительно повышает прочность волоса. В кутикуле волоса филаментарного компонента нет, но ее матриксные белки также уплотнены дисульфидными мостиками, что обеспечивает их физическую и химическую устойчивость.

Даже сама по себе описанная зубчатая структура (рис. 2) делает невозможным гладкое скольжение волоса мимо примыкающего к нему снаружи внутреннего корневого влагалища волоса, если попытаться вырвать волос из кожи. Эта зубчатая структура является одним из компонентов фиксации волоса в коже. Усилие, передаваемое от вытягиваемого волоса на волосяное влагалище должно приводить к образованию складок влагалища, которые зажимают волос внутри соединительнотканной сумки волосяного фолликула, и при нарастании усилия стержень волоса будет вырван вместе с частью клеток влагалища волосяного фолликула, что и наблюдается при выдергивании волоса из кожи. "Зубчики" кутикулы волоса во всех случаях остаются в теснейшем контакте с корковым слоем волоса. Их, по нашим данным, можно отделить от коркового слоя волоса и частично друг от друга только помещением зрелых волос на 1 ч в кипящую 6 N HCl (широко принятый способ мацерации волос).

Связь клеток волоса между собой и с внутренним влагалищем обеспечивается всеми типами межклеточных контактов. Десмосомы, щелевые контакты и плотные контакты формируются между дифференцирующимися кератиноцитами волос и кератиноцитами и внутренним влагалищем волосяного фолликула. Их соотношение и белковый состав меняются на восходящем пути волоса в фолликуле (Kurzen et al., 1998). Плотные контакты (zonula occludens) также установлены между клетками слоев Генле и Гексли и между клетками слоя Генле и клетками наружной оболочки влагалища. Эти соединения, вероятно, изменяют движение малых молекул (сигнальные молекулы и метаболиты) между клетками. Щелевые контакты и десмосомы занимают около 10%

поверхности плазматической мембраны кортикальных клеток в области луковицы, причем десмосомы более обильны в клетках внутреннего влагалища по сравнению с развивающимся кортексом. По мере дальнейшей дифференцировки слоев клеток волоса и внутреннего корневого влагалища локальные очаговые контакты — десмосомы заменяются непрерывной областью послойного контакта клеток (Rogers, 2004).

Таким образом, фиксация волоса в фолликуле происходит в "муфте", расположенной несколько выше луковицы волосяного фолликула, но ниже уровня, где наблюдается отделение стержня волоса от окружающего его внутреннего влагалища (рис. 3). В состав этой "муфты" входят помимо стержня волоса, клетки внутреннего слоя внутреннего влагалища (кутикула), уже подвергшиеся существенной кератинизации, но не отделившиеся еще от влагалища, а также взаимодействующие с ними клетки более наружных слоев волосяного фолликула. Муфта остается постоянно на одном и том же уровне в фолликуле, но составляющие ее клетки мигрируют параллельно с ростом волоса от луковицы в сторону поверхности кожи. Миграция обеспечивается активностью клеток наружного корневого влагалища (Straile, 1965; Chapman, 1971; Vsevolodov et al., 2014). Те клетки, которые выходят из верхнего края муфты, теряют связь с волосом и более не относятся к муфте, т.е. бывшие клетки муфты мигрируют вверх, но верхняя граница муфты остается на месте.

Потеря клеток из верхнего края муфты компенсируется поступлением клеток в муфту через нижнюю ее границу. Будущие клетки муфты ниже ее нижней границы еще недостаточно ороговевают и не имеют достаточной прочности, чтобы фиксировать волос в коже, но приобретают эту прочность в ходе ороговения по достижении нижней границы муфты (рис. 3). Таким образом, и нижняя граница муфты не меняет своего положения в волосяном фолликуле.

РЕШЕНИЕ ПАРАДОКСА 1. Волос скреплен в волосяном фолликуле не с неподвижной клеточной структурой, а с клетками наружного корневого влагалища, движущимися в "муфте" со скоростью роста волоса (у овцы около 0.5 мм в сутки). Поэтому закрепленность волоса в "муфте" не мешает его медленному движению в сторону поверхности кожи. При этом "муфта" находится на постоянном удалении от луковицы, представляя собой определенную стадию дифференцировки (ороговения) волосяного влагалища, которая соответствует степени ороговения клеток самого волоса. Дифференцировка прогрессирует по мере миграции клеток из камбия луковицы в сторону поверхности кожи. Она недостаточна для крепления волоса ниже муфты и приводит к изоляции волоса от окружающих структур выше муфты за счет появления пилярного пространства (рис. 2).

ПАРАЛОКС ВТОРОЙ. Фенотипическое разнообразие морфометрических характеристик волос или облигатная изменчивость параметров волос на одном и том же стандартном участке кожи (т.е. структура волосяной группы) (Vsevolodov et al., 2015) может считаться вторым парадоксом. Структура волосяного покрова характеризуется, прежде всего, двумя основными параметрами: 1) набором морфометрических параметров самих волос (число волос на 1 см<sup>2</sup> кожи, диаметр, длина, обеспеченная продолжительностью непрерывного роста волоса) и 2) набором слоев, из которых состоит волос (сердцевина, корковый слой и кутикула волоса), и которым соответствует разный набор белков-кератинов и кератиноподобных белков (Ryder, 1968).

Набор слоев волоса является эволюционно довольно консервативным, несмотря на крайнее внешнее разнообразие волос от пухового до иглы дикобраза. Во всех случаях присутствует кутикула волосяного влагалиша и корковый слой и только сердцевины иногда может не быть. Различия параметров волос у разных видов и пород могут быть обусловлены различиями геномов. Сложнее объяснить закономерную изменчивость параметров волос на одном и том же участке кожи. Действительно, на участке кожи в 1 мм<sup>2</sup> у грубошерстной овцы могут расти волосы диаметром от 130 до 12 мкм (Всеволодов и др., 2015), причем наиболее мелкие волосы могут не иметь сердцевины. Формирование структуры волоса в волосяном фолликуле обусловлено интенсивностью кератинизации клеток коры волоса. Чем меньше диаметр волоса, тем меньшую долю занимает сердцевина, а у самых тонких волос она вообще не формируется. Показана роль в регуляции начальных этапов дифференцировки волосяного фолликула определенных генных каскадов. Так, гены семейства ВМР запускают экспрессию ряда транскрипционных регуляторов дифференцировки кератиноцитов, таких как *Hoxc13*, *Foxn1*, Msx1 и Msx2, а Noggin, соответственно, предотвращает кератинизацию (Kulessa et al., 2000). Таким образом, этой формы регуляции кератинизации достаточно для качественных различий формирования слоев волоса. Вероятно, условия в мелких волосяных фолликулах не обеспечивают локальных различий в степени кератинизации клеток, образующих волос, поэтому развивается волос, лишенный сердцевинного слоя. Итак, в таком, казалось бы, наследственно обусловленном качественном проявлении морфогенеза как дифференцировка на слои волоса, гены специфической экспрессии могут подчиняться складывающимся условиям количественного характера (размер луковицы) в популяциях клеток, участвующих в дифференцировке.

Качественные различия структуры можно наблюдать и на одном волосе (рис. 5). Волосы грубошерстных овец, формирующие в благоприятный сезон (летом) сердцевинный слой, в менее благоприятный стрессогенный сезон (зимой) уменьшаются в диаметре и могут совсем лишиться сердцевины (рис. 5). Т.о., механизмы, регулирующие образование слоев волоса, зависят от внешних условий и связаны с сезонным стрессом (более голодная диета и холод), что, например, способствует усилению секреции гормонов коры надпочечников, тормозящих пролиферацию в камбии луковиц и нарушающих прежнее равновесие между делением клеток, их дифференцировкой и эвакуацией из камбия (Всеволодов, 1979).

РЕШЕНИЕ ПАРАДОКСА 2. Размер луковицы фолликула, определяющий диаметр волоса, регулируется размером соединительно-тканного сосочка, на котором она сформирована (Oliver, 1971; Jahoda et al., 1984). Закладка волосяных фолликулов начинается с синтеза медленно диффундирующих паракринных факторов Wnt в очагах базального слоя кожного эпидермиса. Это приводит к очаговому усилению пролиферации базальных клеток и образованию плакод (локальных утолщений и уплотнений базального слоя эпидермиса). В тех же очагах включается с небольшим опозданием и синтез ингибиторов Wnt, в частности, из семейств генов Dickkopf и BMP (Reddy et al., 2001; Andl et al., 2002; Lei et al., 2014). Они диффундируют быстрее и обгоняют фронт диффузии Wnt и предотвращают дальнейшее расширение плакод, не допуская их слияния друг с другом (Sick et al., 2006). Очевидно, что заложившиеся позже плакоды оказываются мельче. Такой механизм очаговой дифференцировки первоначально однородных полей на теле эмбриона был назван диффузионно-реакционным (математическая модель выдающегося британского математика Тьюринга). Таким образом, число и размеры закладывающихся плакод зависят, в частности, от соотношения скоростей диффузии Wnt и BMP.

Образовавшиеся плакоды индуцируют скопление под ними эмбриональных фибробластов дермы, из которых формируется соединительнотканный сосочек — важный источник морфогенетической сигнализации во взрослом организме, поддерживающий пролиферацию камбия луковиц волосяного фолликула и детерминирующего размер волосяного фолликула и диаметр волоса при оптимальных условиях (Reynolds, Jahoda, 1992; Rendl et al., 2008; Morgan, 2014). Размер, достигаемый каждым волосяным фолликулом, зависит от двух важнейших факторов: 1) параметры сосочка-регулятора (стабильные в силу ограниченной способности клеток к пролиферации),

которые установились в ходе эмбриогенеза и определяют верхний возможный предел размеров данного волосяного фолликула при оптимальных условиях; 2) совокупность лабильных, подверженных условиям содержания воздействий, которые лимитируют пролиферацию камбия луковицы и влияют на относительную степень развития разных слоев волосяного фолликула вплоть до отсутствия сердцевины волоса.

Таким образом, изменение количественного параметра (размер соединительнотканных сосочков и, соответственно, луковицы волосяного фолликула), вероятно, влияет на проявление разнокачественности дифференцировок. Чем позже закладываются фолликулы, тем они мельче, и тем тоньше волосы, которые они формируют. Это хорошо вписывается в представление о соотношении времени и, соответственно, величине закладки органа и сложности его дифференцировок (Голиченков и др., 1991).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках бюджетной программы 217 "Развитие науки" и подпрограммы 101 "Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или научно-технической деятельности", договор № 206 от 19 марта 2018 года.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Всеволодов Э.Б. Волосяные фолликулы. Алма-Ата: Наука, 1979. 245 с.
- Всеволодов Э.Б., Голиченков В.А., Латыпов И.Ф. и др. Оценка событий послойной дифференцировки волосяного фолликула // Вестн. МГУ. Серия 16. Биология. 2015. № 2. С. 13—18.
- Всеволодов Э.Б., Голиченков В.А., Мусаева А.С. и др. Наши волосы. Алматы: Казак университеті, 2015а. 45 с.
- Голиченков В.А., Никерясова Е.Н., Попов Д.В. Значение массы клеток для становления и эволюции онтогенеза // В сб. Современная эволюционная морфология. Киев: Наукова думка, 1991. С. 130—139.
- Конюхов Б.В., Всеволодов Э.Б., Сажина М.В. Ультраструктурный анализ клеток наружного корневого влагалища волосяных фолликулов у мышей мутантной линии WELLHAARIG // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 1. С. 96—102.
- Andl N., Reddy S. T., Gaddapara T. et al. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development // Dev. Cell. 2002. V. 2. P. 643–653.

- Chapman R.E. Cell migration in wool follicles of sheep // J. Cell Sci. 1971. V. 9. P. 791–803.
- Fraser B.R.D., Parry D.A. The role of disulfide bond formation in the structural transition observed in the intermediate filaments of developing hair // J. Struct. Biol. 2012. V. 80. № 1. P. 117–124.
- *Greco V., Chen T., Rendl M. et al.* A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. P. 155–169.
- *Hwang J., Mehrani T., Millar S.E. et al.* Dlx3 is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling // Dev. 2008. V. 135. P. 3149–3159.
- Jahoda C.A., Horne K.A., Oliver R.F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells // Nature. 1984. V. 311. P. 560–562.
- Kulessa H., Turk G., Hogan B.L. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle // EMBO J. 2000. V. 24. № 19. P. 6664–6674.
- Kurzen H., Moll I., Moll R. et al. Compositionally different desmosomes in various compartments of human hair follicle // Differentiation. 1998. V. 63. P. 295–304.
- Lei M., Guo H., Qiu W.et al. Modulating hair follicle size with Wnt10b-DKK1 pair during hair regeneration // Exp. Dermatol. 2014. V. 23. № 6. P. 407–413.
- Morgan B.A. The dermal papilla: an instructive niche for epithelial stem and progenitor cells in development and regeneration of the hair follicle // Cold Spring Harb Perspect. Med. 2014. 4: a015180.
- Nowak J.A., Polak L., Pasolli H.A. et al. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis // Stem Cell. 2008. V. 3. P. 33–43.
- Oliver R.F. The dermal papilla and development and growth of hair // J. Soc. Cosmetic Chem. 1971. V. 22. P. 741–755.
- Oshima H., Rochat A., Kedzia C. et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells // Cell. 2001. V. 104. P. 233–245.
- Panteleyev A.A. Functional anatomy of the hair follicle: The Secondary Hair Germ // Experimental Dermatology. 2018. V. 27. P. 701–720.
- Panteleev A.A., Botchareva N.V., Sundberg J.P. et al. The role of the hairless (hr) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation // Am. J. Pathol. 1999. V. 155. № 1. P. 159–171.
- Panteleyev A.A., Paus R., Christiano A.M. Patterns of hairless (hr) gene expression in mouse hair follicle morphogenesis and cycling // Am. J. Pathol. 2000. V. 157. № 4. P. 1071–1079.
- Reddy S., Andl T., Bagasra A. et al. Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis // Mech. Dev. 2001.V. 107. P. 69–82.
- Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development // Science. 2001. V. 293(532). P. 1089–1093.
- Rendl M., Lewis L., Fuchs E. Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle // PLoS Biol. 2005. V. 3. № 11. P. 303–331.
- Rendl M., Polak L., Fuchs E. BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties // Gen. Dev. 2008. V. 22. P. 543–557.

- Reynolds A.J., Jahoda C.A. Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis // Development. 1992. V. 115. P. 587–593.
- Rhee H., Polak L. Fuchs E. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles // Science. 2006. V. 312(5782). P. 1946–1949.
- Rippa A.L., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Terskikh V.V. The role of integrins in the development and homeostasis of the epidermis and skin appendages // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 4 (19). P. 22–33.
- Rogers G.E. Hair follicle differentiation and regulation // Int. J. Dev. Biol. 2004. V. 48. P. 163–170.
- Romano R.A., Smalley K., Liu S. et al. Abnormal hair follicle development and altered cell fate of follicular keratinocytes in transgenic mice expressing ΔNp63α // Development. 2010. V. 137. № 9. P. 1431–1439.
- Rompolas P., Elizabeth R., Giovanni Z. et al. Live imaging of stem cell and progeny behavior in physiological hair-follicle regeneration // Nature. 2012. V. 487(7408). P. 496–499.

- Rudkouskaya A., Welcha I., Dagnino L. ILK modulates epithelial polarity and matrix formation in hair follicles // Mol. Biol. Cell. 2014. V. 25. P. 620–632.
- Ryder M.L., Stephenson S.K. Wool Growth. London. New York: Academic Press, 1968. P. 10–805.
- Sick S., Reinker S., Timmer J. et al. WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism // Science. 2006. V. 314. P. 1447–1450.
- Straile W.E. Root sheath-dermal papilla relationships and the control of hair growth // Biology of the Skin and Hair Growth / Eds. Lyne A.G., Short B.F., Sydney: Angus and Robertson, 1965. P. 35–58.
- *Vsevolodov E.B.* The histological mechanisms of hair loss // Hair and Scalp Disorders. 2017. Chapter 5. P. 67–79.
- Vsevolodov E.B., Golichenkov V.A., Latyhov I.F. Cellular dynamics of the outer layers of the hair follicle of fine-wool sheep during the phase of stable hair growth // Rus. J. Dev. Biol. 2014. V. 45. № 6. P. 412–422.
- Vsevolodov E.B., Golichenkov V.A., Latypov I.F. et al. Estimation of events of hair follicle layers differentiation // Mos. Univ. Biol. Sci. Bul. 2015. V. 70. № 2. P. 62–66.

#### Some Paradoxical Phenomena in Hair Follicles Histophysiology

E. B. Vsevolodov<sup>1</sup>, A. S. Mussayeva<sup>2</sup>, \*, I. F. Latypov<sup>2</sup>, O. V. Burlakova<sup>3</sup>, E. N. Nikeryasova<sup>3</sup>, and V. A. Golichenkov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan <sup>2</sup>Institute of General Genetics and Cytology, Almaty, 050060 Kazakhstan <sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia \*e-mail: aimus @mail.ru

Our study was focused on the morphological features of the hair follicle and hair shaft of the coarse-haired sheep. The results of this study allow to explain the paradoxical phenomenon of combining strong hair fastening in the skin with its continuous advancement towards the skin surface during hair growth. We have shown that tooth-like structures of the surface of hair cuticle and complementary indentations of the surface of the inner root sheath are formed in the suprabulbar region of the hair follicle. These surfaces detach from each other only closure to the skin surface, in the region under the isthmus. We also studied the variability of some hair features (hair diameter and the ratio of the thickness of its layers) on a standard area of the skin, as well as the influence of external conditions on the formation of the structure of an individual hair. Possible mechanisms for regulating the temporal and spatial variability of the hair structure are discussed.

Keywords: hair follicle, sheep, hair morphogenesis, hair growth

— ОБЗОРЫ —

УЛК 576.536

#### СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ЦИСТЫ КАК МИКРООКРУЖЕНИЕ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA*

© 2021 г. С. С. Базылева, В. Е. Адашева, А. С. Шацкиха, Л. В. Оленина, А. А. Котова, \*

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", площадь академика И.В. Курчатова, 2, Москва, 123182 Россия

\*e-mail: kotov\_alexei@mail.ru Поступила в редакцию 29.05.2020 г. После доработки 02.07.2020 г.

После доработки 02.07.2020 г. Принята к публикации 10.07.2020 г.

Функции соматических клеток у многоклеточных организмов существенны для поддержания герминальных стволовых клеток и образования гамет, и, в конечном итоге, для выживаемости видов. В семенниках *Drosophila* две популяции соматических клеток выполняют функции микроокружения герминальных клеток. Группа терминально-дифференцированных клеток на апикальном конце семенника, хаб, непосредственно контактирует с герминальными стволовыми клетками, регулируя их самообновление и пролиферацию с помощью секреции сигнальных молекул. Другая популяция соматических клеток семенников, соматические клетки цисты, играет важную роль как в поддержании герминальных стволовых клеток, так и в процессах направленной дифференцировки их потомков, модулируя внешние сигналы и создавая микроокружение дифференцирующихся герминальных клеток в течение всего сперматогенеза. Обзор посвящен анализу современных данных о молекулярно-клеточных механизмах и белковых комплексах, необходимых в соматических клет-ках цисты для неавтономной регуляции развития герминальных клеток.

*Ключевые слова:* сперматогенез, ниша, соматические клетки цисты, герминальные стволовые клетки, сигнальные пути, *Drosophila* 

**DOI:** 10.31857/S047514502101002X

#### **ВВЕДЕНИЕ**

У всех животных герминальные стволовые клетки (ГСК) функционируют в уникальном процессе самообновления и производства потомков, вступающих в клеточную дифференцировку, критически важном для образования гамет и передачи генетической информации следующим поколениям. Самообновляющие деления ГСК и дифференцировка их потомства поддерживаются сигналами, исходящими из ниш, — структур, формируемых соматическими клетками гонад. Динамический процесс сперматогенеза требует точных переключений между отдельными стадиями: от самообновления ГСК к митотически амплифицирующимся сперматогониям и созреванию сперматоцитов, до образования гаплоидных сперматид и морфогенетического процесса их индивидуализации, ведущего к образованию зрелой спермы (Spradling et al., 2011; Greenspan et al., 2015). Специализированные соматические клетки сопровождают герминальные клетки семенников в течение всего процесса сперматогенеза и контролируют переключение

стадий развития герминальных клеток. Концепция ниши стволовых клеток была впервые предложена в 1978 г. при обсуждении механизмов поддержания гематопоэтических клеток млекопитающих (Schofield, 1978). Соматические клетки, выполняющие функции ниши, были впервые идентифицированы при исследовании гаметогенеза у модельного объекта Drosophila melanogaster (Hardy et al., 1979; Wieschaus, Szabad, 1979; Xie, Spradling, 2000). Под нишей понимаются клетки и клеточные структуры, формирующие микросреду, в которой размещены стволовые клетки, получающие из ниши регуляторные сигналы и питательные компоненты. Данные, полученные к настоящему времени, ясно демонстрируют консервативные функции соматической ниши в регуляции процессов поддержания и самообновления стволовых клеток у многоклеточных эукариот (Morrison, Spradling 2008; Spradling et al., 2011; de Cuevas, Matunis, 2011; Oatley, Brinster, 2012). Соматические клетки также играют существенную роль в процессах направленной дифференцировки потомков стволовых клеток, модулируя

внешние сигналы и создавая микроокружение дифференцирующихся клеток. При этом в настоящее время молекулярные и клеточные механизмы поддержания и функционирования самих соматических клеток в гонадах, а также их взаимодействия с герминальными клетками на разных этапах гаметогенеза, изучены недостаточно.

Сперматогенез млекопитающих, изучаемый главным образом на мышиной модели, происходит в семенных канальцах семенников. Основные этапы сперматогенеза у животных консервативны от дрозофилы до человека. Семенники дрозофилы и млекопитающих, при значительных морфологических различиях имеют высокое функциональное сходство. Соматические клетки цисты дрозофилы рассматриваются как функциональные аналоги клеток Сертоли у млекопитающих (Spradling et al., 2011; Greenspan et al., 2015; Kotov et al., 2017). Большие неделящиеся клетки Сертоли присоединены к базальной мембране семенных канальцев, простираясь внутрь их просвета и выполняя функции ниши герминальных клеток на всех стадиях дифференцировки (Griswold, 1998; Nel-Themaat et al., 2011; Oatley, Brinster, 2012; Jiang et al., 2014). Герминальные клетки, как у млекопитающих, так и у дрозофилы, упорядочены вдоль условной пространственно-временной оси, где наиболее ранние герминальные клетки расположены возле базальной мембраны, тогда как клетки на более зрелых стадиях дифференцировки расположены близко к просвету семенного канальца у млекопитающих или семенному пузырьку у Drosophila. Тесное взаимодействие между соматическими и герминальными клетками является консервативным для сперматогенеза у различных животных (Valli et al., 2014; Greenspan et al., 2015).

Выяснение того, как множество сигналов интегрируются для регуляции поддержания и дифференцировки герминальных клеток, является актуальным в изучении молекулярных механизмов сперматогенеза, и семенники Drosophila являются ценной модельной системой для таких исследований. Значительная доказательная база указывает на то, что соматическое микроокружение критически важно для самообновления ГСК, дифференцировки их потомков, предотвращения канцерогенеза герминальных клеток и их преждевременной потери, а также для поддержания их клеточной идентичности (Tran et al., 2000; Kiger et al., 2000; Lim, Fuller, 2012; Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017; Kotov et al., 2020). В этом обзоре мы суммируем современные представления о молекулярных механизмах, обеспечивающих функционирование соматических клеток цисты семенников в регулировании процесса сперматогенеза.

#### КРАТКИЙ ОБЗОР СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ДРОЗОФИЛЫ

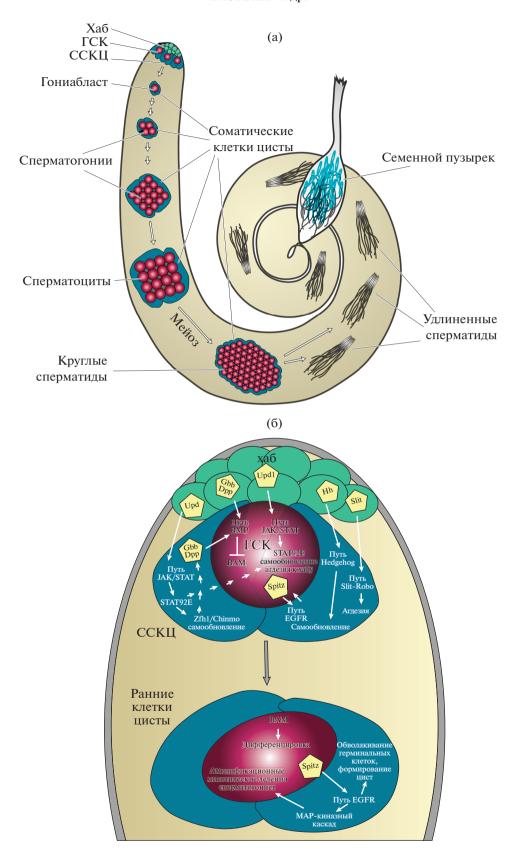
Семенники D. melanogaster морфологически представляют собой понятную и просто интерпретируемую систему для изучения процессов поддержания герминальных клеток и их дифференцировки в зрелые гаметы (рис. 1а). В семенниках Drosophila 9-12 герминальных стволовых клеток (ГСК) плотно контактируют с нишевой структурой, называемой хабом, и состоящей из 12-15 терминально-дифференцированных соматических клеток, прикрепленной к базальной мембране на апикальном слепом конце семенника (рис. 1а). Соматические стволовые клетки цисты (ССКЦ) располагаются на второй линии от хаба за ГСК и в норме контактируют с клетками хаба с помощью длинных цитоплазматических выростов, расположенных в просветах между ГСК. Две ССКЦ окружают каждую ГСК, полностью изолируя друг от друга индивидуальные ГСК (Hardy et al., 1979). Две популяции стволовых клеток, ГСК и ССКЦ, вследствие ассиметричного митоза производят себе подобные стволовые клетки и дочерние клетки, вступающие в дифференцировку (Gönczy, DiNardo, 1996). Являясь источником соматических клеток цисты, ССКЦ также составляют важную часть ниши для ГСК (Kawase et al., 2004; Zoller, Schulz, 2012; Greenspan et al., 2015). Непосредственные потомки ГСК, вступающие в дальнейшую дифференцировку, гониабласты, окружаются двумя соматическими клетками цисты (СКЦ), которые ко-дифференцируются вместе с ними. Таким образом, формируется основная функциональная единица сперматогенеза циста. Две соматические клетки цисты образуют прочные окклюзионные и адгезионные соединения друг с другом, формируя барьер проницаемости для посторонних сигналов (Fairchild et al., 2015). Каждый гониабласт внутри развивающейся цисты претерпевает 4 цикла митотических делений с неполным цитокинезом, превращаясь в синцитий из 16 сперматогониев, взаимосвязанных между собой через круглые мембранные каналы. СКЦ в процессе сперматогенеза не делятся, но увеличиваются в размерах, уплощаются и вытягиваются вокруг герминальных клеток, создавая барьер проницаемости для внешнего окружения, а также являясь акцептором и источником молекулярных сигналов. 16 герминальных клеток внутри цисты, ограничиваемой двумя СКЦ, становятся сперматоцитами, значительно увеличиваются в размерах и вступают в мейоз, с образованием 64 гаплоидных сперматид. Сперматиды в процессе индивидуализации превращаются в зрелые гаметы, двигаются к базальному концу семенника и запасаются в семенном пузырьке (Fuller, 1998; Spradling et al., 2011; Dubey et al., 2019) (рис. 1а). СКЦ продолжают ко-дифференцироваться с герминальными клетками в течение всего сперматогенеза и, в конечном итоге, поглощаются эпителиальными клетками на базальном конце семенника после индивидуализации сперматид (Fuller, 1998; Dubey et al., 2016).

Соматические клетки семенников происходят из соматических клеток-предшественников гонад, специфицирующихся из клеток дорсолатеральной мезодермы. Эмбриональные семенники формируются в период среднего и позднего эмбриогенеза путем ассоциации примордиальных герминальных клеток, мигрирующих внутрь эмбриона с его заднего конца через кишечный эпителий, и нескольких кластеров соматических клеток: передних, задних и специфических мужских соматических клеток-предшественников (Santos, Lehmann, 2004; Jemc, 2011; Whitworth et al., 2012). Последние экспрессируют маркерные белки Eyes absent (Eya), Six4, Doublesex и SOX100B; эти клетки выживают только у самцов и впоследствии формируют терминальный эпителий семенников. Хаб формируется на поздней стадии эмбриогенеза из кластера передних соматических клеток-предшественников (Hardy et al., 1979), экспрессирующих молекулярный маркер Escargot (Boyle, DiNardo, 1995; Voog et al., 2014). Подмножество этих клеток плотно ассоциировано между собой, они терминально-дифференцированы и экспрессируют на высоком уровне молекулы клеточной адгезии, такие как DE-кадгерин, DN-кадгерин и Fasciclin III. Хаб секретирует лиганды множества сигнальных путей, включая JAK/STAT, BMP, Hedgehog и других (рис. 1б). Те примордиальные герминальные клетки, которые оказалась в непосредственном контакте с хабом, принимают эти сигналы и становятся стволовыми, тогда как остальные герминальные клетки, не получающие сигналов от хаба на достаточном уровне, подвергаются дифференцировке (Sheng et al., 2009; Whitworth et al., 2012). ССКЦ происходят из того же пула соматических клеток-предшественников, что и клетки хаба. Каким же образом формируется нужное количество соматических клеток семенника обоих этих типов? По-видимому, транскрипционный фактор Bowl, экспрессируемый в клетках хаба, существенен для этого процесса, поскольку в случае мутаций bowl хаб содержит меньшее количество клеток, а репрессия Lines, ингибитора Bowl, напротив, увеличивает численность клеток хаба (DiNardo et al., 2011). Образование хаба индуцируется с помощью сигнального пути Notch, который необходим и достаточен для этого и регулирует число клеток хаба, частично действуя через активацию фактора Bowl (Kitadate, Kobayashi, 2010; DiNardo et al., 2011; Okegbe, Di-Nardo, 2011). Остается невыясненным, как специфицируются ССКЦ. Эктопическая активация Bowl с помощью нокдауна lines в ССКЦ, приводит к транс-дифференцировке их в клетки хаба, что указывает на общее происхождение клеток

хаба и ССКЦ (Voog et al., 2008; DiNardo et al., 2011). ССКЦ экспрессируют транскрипционный фактор Zfh1, регулируемый сигнальным каскадом JAK/STAT, и используемый в настоящее время как специфический маркер для этих клеток (Leatherman, Dinardo, 2008; Issigonis et al., 2009; Flaherty et al., 2010). Уровень экспрессии Zfh1 падает в дифференцирующихся потомках ССКЦ, покидающих область ниши возле хаба. ССКЦ также экспрессируют на высоком уровне транскрипционный фактор Traffic jam (Тj), но период его экспрессии в процессе сперматогенеза шире, он экспрессируется также в СКЦ, окружающих гониабласты и сперматогонии (Li et al., 2003), и рассматривается в литературе как маркер совокупной популяции ранних СКЦ. В качестве маркера зрелых СКЦ, окружающих сперматоциты, часто используется транскрипционный активатор Еуа (Fabrizio et al., 2003).

#### РЕГУЛЯЦИЯ САМООБНОВЛЕНИЯ ГСК С ПОМОЩЬЮ РЯДА СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ

Локальный сигнальный путь JAK/STAT в регулировании адгезии ГСК к хабу, поддержании их идентичности и конкуренции с ССКЦ. Соматические клетки хаба являются источником сигналов короткой дистанции, регулирующих поддержание обеих популяций стволовых клеток, герминальных и соматических. Сигнальный путь JAK/STAT (Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription) способствует самообновлению как ГСК, так и ССКЦ (рис. 16). Клетки хаба секретируют цитокин Unpaired1 (Upd1), активирующий путь JAK/STAT в примыкающих к нему стволовых клетках обоих типов, ГСК и ССКЦ (Kiger et al., 2001; Tulina, Matunis, 2001). Upd1, связываясь с рецептором Domeless (Dome), активирует единственную у Drosophila киназу JAK, Hopscotch (Hop), которая, в свою очередь, рекрутирует и фосфорилирует единственный гомолог транскрипционного фактора STAT у Drosophila — STAT92E по остатку тирозина 711, способствуя его димеризации и активации. Ранние данные позволяли предположить, что STAT92E необходим как внутриклеточный фактор для поддержания ГСК и ССКЦ, поскольку в stat92E-мутантных семенниках или при использовании нулевых клонов stat92E, как ГСК, так и ССКЦ, быстро терялись из ниши, вступая в дифференцировку (Кіger et al., 2001; Tulina, Matunis, 2001). Однако позднее было показано, что сигнальный путь JAK/STAT по-разному требуется для поддержания этих двух клеточных популяций. Активация эндогенного STAT92E в ГСК оказалась недостаточной для их самообновления. Но эктопическая активация STAT92E в ССКЦ способна поддерживать самообновление обеих популяций стволовых



**Рис. 1.** (а) Общая схема сперматогенеза у *Drosophila melanogaster*. На апикальном конце семенника (вверху) находится соматическая нишевая структура — хаб. Хаб поддерживает две соседние популяции стволовых клеток, ГСК и ССКЦ, посредством межклеточной передачи сигналов. ГСК делится с самообновлением и производством гониабласта, который обволакивается двумя клетками цисты и дополнительно подвергается четырем митотическим делениям с неполным цитокинезом, после чего циста из 16 герминальных клеток переключается на программу первичных сперматоцитов. Сперматоциты растут и созревают внутри цисты, а затем входят в мейоз, образуя 64 гаплоидных круглых сперматид, также взаимосвязанных внутри цисты. Наконец, удлиненные сперматиды подвергаются индивидуализации и перемещаются к базальному концу семенника. Зрелые индивидуальные сперматозоиды попадают в семенной пузырек. (б) Сигнальные пути, регулирующие сперматогенез в области ниши (вверху) и вне ее (внизу). В пятиугольниках представлены секретируемые лиганды сигнальных путей. Только некоторые из множества сигнальных путей, действующих в семенниках, указаны на схеме.

клеток, ГСК и ССКЦ, независимо от хаба (Leatherman, DiNardo, 2008, 2010). ГСК с нарушенной экспрессией STAT92E вытесняются с позиции возле хаба, проигрывая конкуренцию с ССКЦ, благодаря дефектам адгезионных контактов между хабом и ГСК (Issigonis et al., 2009; Leatherman, DiNardo, 2010). В этих условиях ССКЦ кластеризуются вокруг хаба, но ГСК, контактирующие с ССКЦ, продолжают самообновляющие деления. Вместе эти данные свидетельствуют о том, что активация пути JAK/STAT в ССКЦ достаточна для индукции самообновления как в ГСК, так и в ССКЦ.

Несмотря на то, что JAK/STAT не требуется внутриклеточно для самообновления ГСК, этот путь необходим для DE-кадгерин-опосредуемой адгезии ГСК к клеткам хаба (Leatherman, DiNardo, 2008, 2010). STAT92E способен связываться с промотором гена chickadee и активировать его транскрипцию в ГСК и ССКЦ (Shields et al., 2014). Этот ген, кодирующий профилин у *Drosophila*, необходим для локализации DE-кадгерина в составе комплексов адгезии на клеточной поверхности и, таким образом, для поддержания ГСК в нише. В семенниках с отсутствием экспрессии STAT92E нарушается внутриклеточный траффик кадгерин-катениновых комплексов к клеточной мембране ГСК и, таким образом, DE-кадгерин отсутствует в зоне контакта с хабом и ГСК теряются из ниши вступлением в дифференцировку. Эктопическое увеличение экспрессии DE-кадгерина умеренно супрессирует потерю ГСК (Leatherman, DiNardo, 2008). Тем не менее, автономные сигналы JAK/STAT сами по себе не достаточны для самообновления ГСК.

Предполагаемые мишени транскрипционной регуляции, осуществляемой фактором STAT92E, по-видимому, различны в ГСК и ССКЦ. Две транскрипционные мишени пути JAK/STAT zinc finger homeodomain 1 (zfh1) и chronologically inappropriate morphogenesis (chinmo) экспрессируются в ССКЦ и необходимы для их самообновления поддержания идентичности (Leatherman, DiNardo, 2008; Flaherty et al., 2009, 2010). Хотя оба этих фактора требуются внутриклеточно ССКЦ, они не взаимодействуют друг с другом, предположительно участвуя в независимых процессах (Flaherty et al., 2010). Мутантные по zfh1 или chinmo ССКЦ неспособны к поддержанию

самообновления, мутантные клоны теряются, вступая в дифференцировку. Гиперэкспрессия любого из этих факторов вызывает экспансию обеих популяций стволовых клеток, как и в случае гиперактивации STAT92E (Leatherman, DiNardo, 2008; Flaherty et al., 2010). Chinmo также экспрессируется в ГСК, но не требуется для их самообновления, тогда как мутантные по *chinmo* клоны ССКЦ быстро теряются через преждевременную дифференцировку (Flaherty et al., 2010).

Suppressor of Cytokine Signaling at 36E (Socs36E) является прямой мишенью пути JAK/STAT в ССКЦ и его репрессором, формируя классическую петлю негативной обратной связи (Arbouzova, Zeidler, 2006). Socs36E (ортолог SOCS5 млекопитающих) контролирует конкуренцию двух популяций стволовых клеток за место в нише, модулируя уровень клеточной адгезии ССКЦ (Issigonis et al., 2009). Socs36E ослабляет активацию сигнального каскада JAK/STAT в ССКЦ, приводя к сбалансированному соотношению ГСК и ССКЦ возле хаба (Issigonis et al., 2009; Singh et al., 2010; Amoyel et al., 2016а). Тогда как обе популяции стволовых клеток используют DE-кадгерин для адгезии к хабу, ССКЦ также используют для этого гетеродимерные интегриновые комплексы. Socs36E негативно регулирует уровень интегринов в этих клетках. В семенниках мутантов *Socs36E* это приводит к сверхпредставленности ССКЦ, окружающих хаб, и конкурентному вытеснению ГСК из ниши. Клоны ССКЦ, в которых отсутствует экспрессия Socs36E, способны вытеснять как ГСК, так и ССКЦ дикого типа, за счет повышенного уровня экспрессии интегринов на их клеточной поверхности (Singh et al., 2010). Socs36E ингибирует MAP-киназный (Mitogen-Activated Protein) каскад в ССКЦ, активируемый сигнальным путем EGFR, тогда как эктопическое усиление активности МАР-киназного каскада в клонах ССКЦ вызывает вытеснение ССКЦ дикого типа и ГСК из ниши за счет конкуренции (Amoyel et al., 2016а). Таким образом, Socs36E специфически модулирует уровень сигналов JAK/STAT и EGFR в ССКЦ для поддержания корректного соотношения двух популяций стволовых клеток, поскольку две дочерние соматические клетки цисты нужны для поддержания и окружения одного дифференцирующегося гониабласта при формировании цисты.

Существенные функции сигнального пути ВМР в поддержании ГСК в семенниках. Локальные сигналы пути Bone Morphogenetic Protein (BMP) необходимы для регулирования самообновления и поддержания ГСК в семенниках (Schulz et al., 2002: Shivdasani, Ingham, 2003; Kawase et al., 2004). Цитокино-подобные лиганды BMP-пути Decapentaplegic (Dpp) и Glass Bottom Boat (Gbb), секретируемые клетками хаба и ССКЦ в область адгерентных контактов с ГСК, связываются с рецепторами первого типа Thickveins (Tkv) and Saxophone (Sax) и рецептором второго типа Punt на поверхности ГСК (Kawase et al., 2004). Секреция сигнальных молекул Dpp и Gbb приводит к активации сигнального каскада в ГСК, вследствие чего в них подавляется транскрипция основного фактора дифференцировки Bag-of-marbles (BAM) (Kawase et al., 2004; Michel et al., 2011) (рис. 16). Дочерние герминальные клетки, которые не контактируют с хабом и ССКЦ, не получают сигналов ВМР в достаточной дозе и начинают экспрессировать ВАМ, что дает им возможность вступить на путь дифференцировки (McKearin, Spradling, 1990; Kawase et al., 2004). Показано, что недавно идентифицированные нанотрубки – проникающие в хаб структуры, создаваемые ГСК, – играют специфическую роль в проведении сигналов ВМР из клеток хаба, что, предположительно, обеспечивает высокий пороговый уровень секреции лигандов ВМР в ГСК, необходимый для их самообновления (Inaba et al., 2015). В яичниках *Drosophila* повышенная экспрессия **Орр** в соматических клетках гермария, окружающих ГСК, приводит к опухолеподобному накоплению ГСК-подобных клеток, не экспрессирующих ВАМ и не вступающих в дифференцировку (Xie, Spradling, 1998). В ГСК семенников эктопически повышенный уровень Dpp или Gbb не приводит к предотвращению дифференцировки гониабластов или к формированию опухолеподобных кластеров ГСК. Но в случае повышенной экспрессии Dpp, но не Gbb, митотические деления сперматогониев часто не останавливаются на четырех, как в норме, а продолжаются, приводя к формированию цист, содержащих более чем 16 сперматогониев (Kawase et al., 2004). Тем не менее, анализ семенников самцов с мутациями по gbb или по dpp показал, что только экспрессия Gbb существенна для поддержания ГСК, и Dpp экспрессируется на более низком уровне, чем Gbb (Kawase et al., 2004). Однако недавние исследования показали, что эктопическая экспрессия **Dpp** в ССКЦ может способствовать усилению конкуренции между популяциями стволовых клеток за позиции возле хаба с последующей потерей ГСК (Lu et al., 2019). По-видимому, уровни экспрессии Dpp и Gbb в семенниках тщательно

регулируются, обеспечивая правильный баланс стволовых клеток обеих популяций.

# СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПОДДЕРЖАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЦИСТЫ

Сигнальный путь Hedgehog. Сигнальный путь Hedgehog активируется в ССКЦ с помощью секреции из хаба одноименного лиганда Hedgehog (Hh) (рис. 1б). В отсутствие сигнала рецептор Patched (Ptc) на поверхности ССКЦ подавляет активацию другого трансмембранного белка Smoothened (Smo). В этом случае белковый комплекс, состоящий из протеинкиназы А (РКА) и фактора Costal2, осуществляет протеолитическое разрезание 155 кДа транскрипционного фактора Cubitus interruptus (Ci) до укороченной формы 75 кДа, которая, в отличие от полноразмерной, подавляет транскрипцию генов-мишеней пути Hedgehog. Взаимодействие лиганда Hh с рецептором Рtc приводит к предотвращению расщепления Сі и к активации транскрипции геновмишеней. Транскрипция неустановленных генов, активируемых в этом сигнальном каскаде необходима только для самообновления ССКЦ, но не ГСК (Michel et al., 2012; Amoyel et al., 2013; Zhang et al., 2013). ССКЦ, дефицитные по экспрессии вто, теряются из ниши, но не в результате конкуренции, а вследствие нарушения самообновления (Amoyel et al., 2013). Сигнальный путь Hedgehog действует в ССКЦ клеточно-автономно и независимо от пути JAK/STAT и необходим для спецификации определенного числа ССКЦ в нише семенника, поскольку эктопическая гиперэкспрессия лиганда Hh вызывает значительное увеличение численности Zfh1-положительных соматических клеток на апикальном конце. Но активность пути Hedgehog не существенна для формирования ниши для ГСК: в *stat92E*-мутантных семенниках ССКЦ с эктопически активированным путем Hedgehog не способны к поддержанию ГСК (Amoyel et al., 2013). Этот путь, повидимому, действует параллельно JAK/STAT для обеспечения самообновления ССКЦ, хотя некоторые нижерасположенные мишени обоих путей могут перекрываться (Amoyel et al., 2013, Zhang et al., 2013).

Сигнальный путь Нірро. Нірро играет важную роль в регуляции пролиферации различных типов стволовых клеток у дрозофилы, таких как нервные стволовые клетки, стволовые клетки кишечника и фолликулярные стволовые клетки яичников (Мо et al., 2014; Hsu et al., 2017). Основными компонентами пути Нірро являются киназы Нірро (Нро) и Warts (Wts), а также ко-активатор транскрипции Yorkie (Yki), активность которого регулируется фосфорилированием, что обусловливает его стабильность и субклеточную локализацию.

Фосфорилированный Үкі локализуется в цитозоле и быстро деградирует, что показано при использовании имагинальных дисков крыла дрозофилы и клеточной культуры S2 (Oh. Irvine. 2008: Ren et al... 2010). Нефосфорилированный Үкі импортируется в ядро и взаимодействует с факторами транскрипции, такими как Scalloped (Sd), активируя транскрипцию генов-мишеней, таких как циклин E, Mvc, diap 1, expanded и bantam, способствуя клеточному росту, пролиферации и поддержанию стволовых клеток, что изучено, прежде всего, на клетках глазных имагинальных дисков и имагинальных дисков крыла (Wu et al., 2008). В семенниках *hpo*-мутантные клоны ССКЦ гиперпролиферируют и вытесняют ГСК из ниши, что сравнимо фенотипически с конкурентным поведением мутантных клонов *ptc*, в которых постоянно активирован путь Hedgehog (Amoyel et al., 2014). Показано, что Yki требуется автономно для самообновления ССКЦ, но не ГСК (Sun et al., 2008; Amoyel et al., 2014). Клональная эктопическая экспрессия активированной формы Үкі в ССКЦ приводит к вытеснению как ГСК, так и ССКЦ дикого типа, из ниши (Amoyel et al., 2014). Изучение взаимодействия сигнальных путей Нірро и Hedgehog с помощью создания клонов ССКЦ, мутантных по ptc и yki одновременно, показало, что такие клоны не способны к гиперпролиферации и колонизации ниши. Таким образом, путь Нірро проявляет эпистатические эффекты по отношению к сигнальному пути Hedgehog, маскируя фенотипические проявления последнего (Amoyel et al., 2014). Предполагается, что оба пути, Hedgehog и Hippo, необходимы параллельно для поддержания и пролиферации ССКЦ с помощью независимого или аддитивного контроля экспрессии генов клеточного цикла, но это требует дальнейшего подтверждения.

Сигнальный путь Slit-Robo. Показано, что сигнальный путь Slit-Roundabout (Slit-Robo) модулирует адгезию в ССКЦ через регуляцию DE-кадгерина (Stine, Matunis, 2014). Хаб секретирует лиганд Slit и снижение уровня его рецептора Roundabout 2 в ССКЦ приводит к потере их из ниши (рис. 1б). В противоположность этому, потеря нижерасположенного в каскаде эффектора пути Slit-Robo тирозин-киназы Abelson обеспечивает ССКЦ конкурентное преимущество. Тирозин-киназа Abelson в норме функционирует в пути дестабилизации β-катенина, позволяя проводить обновление адгезионных контактов, обеспечиваемых кадгерин-катениновыми комплексами адгезии (Stine, Matunis, 2014). Экспрессия Roundabout 2 в ССКЦ также регулируется сигнальным путем JAK/STAT, что указывает на координацию сигналов из ниши для регуляции адгезии.

#### ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД КОНТРОЛЕМ СИГНАЛОВ ИЗ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЦИСТЫ

Сигнальный путь EGFR. Как в яичниках, так и в семенниках дифференцировка герминальных клеток зависит от сигнального пути рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (Brand, Perrimon, 1994; Kiger et al., 2000; Schulz et al., 2002) (рис. 16). В семенниках *Drosophila* основной лиганд этого пути Spitz активируется в ранних герминальных клетках протеазой Stet и секретируется из них, активируя рецепторы EGFR на соматических клетках цисты (Schulz et al., 2002; Sarkar et al., 2007; Parrot et al., 2012). Как во многих других типах клеток, взаимодействие лиганда с рецептором EGFR запускает в соматических клетках цисты линейный киназный каскад Ras-Raf-MAP (Shilo, 2014). Каскад заканчивается фосфорилированием фактора ERK и транслокацией его в ядро, где он активирует транскрипцию неизвестных мишеней (Tran et al., 2000; Chen et al., 2013; Hudson et al., 2013). Предполагается, что вследствие активации МАРкиназного каскада, герминальные клетки на разных стадиях развития от ГСК до сперматогониев получают от соматических клеток цисты специфические обратные сигналы, часть из которых существенна для самообновляющего деления ГСК, другая часть для ограничения синхронных амплификационных делений сперматогониев и переключения на программу роста сперматоцитов (Kiger et al., 2000; Hudson et al., 2013). Однако поиск таких обратных сигналов чрезвычайно трудная задача, нерешенная в настоящее время. Гиперактивация сигналинга EGFR приводит к инициации терминальной дифференцировки сперматогониев до завершения всех четырех раундов митотических делений (Hudson et al., 2013). В случае мутаций компонентов сигнального пути EGFR, таких как *spitz*, stet, raf или egfr, ранние герминальные клетки не формируют 2–16-клеточные цисты, а образуют крупные гиперпролиферирующие кластеры мелких герминальных клеток, задержанных на ранних этапах дифференцировки, тогда как СКЦ не окружают их, а сегрегируют в группы мелких клеток округлой формы и теряются впоследствии (Kiger et al., 2000; Schulz et al., 2002; Sarkar et al., 2007; Parrott et al., 2012; Hudson et al., 2013). Hapyшение окружения сперматогониев соматическими клетками цисты у таких мутантов предположительно приводит к потере последующих сигналов пути EGFR, необходимых как для дифференцировки герминальных клеток, так и для выживания СКЦ (Kiger et al., 2000). Вторая ветвь пути EGFR, действующая в ССКЦ, связана с фактором обмена гуанина Vav и малыми ГТФазами Rac1 и Rho1. Подавление экспрессии Vav или Rac1 существенно усиливает мутантный фенотип *spitz*, в том числе дефекты окружения герминальных клеток соматическими клетками цисты, тогда как редукция

Rho1 производит противоположный эффект (Sarkar et al., 2007). Активация пути EGFR герминальными клетками вызывает противоположные активности Rac1 и Rho1 в СКЦ, по-видимому, вследствие реорганизации актинового цитоскелета, в норме приводящей к росту и вытягиванию соматических клеток цисты вокруг герминальных клеток и образованию ламеллоподия-подобных выростов в области контактов, предположительно концентрирующих на своей поверхности комплексы клеточной адгезии (Sarkar et al., 2007; Zoller, Schulz, 2012). В семенниках млекопитающих гомолог EGFR локализуется на поверхности соматических клеток Сертоли и перемещение дифференцирующихся герминальных клеток в направлении просвета семенных канальцев требует постоянной реорганизации их контактов с клетками Сертоли (Amlani, Vogl, 1988; Suarez-Quian, Niklinski, 1990; Kopera et al., 2010). Поскольку соматические клетки цисты у Drosophila являются функциональными аналогами клеток Сертоли у млекопитающих (Spradling et al., 2011), ряд функций пути EGFR имеет консервативный характер в сперматогенезе как у Drosophila, так и у млекопитающих.

Однако в настоящее время не идентифицированы молекулярные взаимодействия, обеспечивающие формирование цисты за счет роста и окружения соматическими клетками герминальных. Также неизвестен характер сигналов, посылаемых соматическими клетками цисты на различных этапах дифференцировки герминальных клеток. К настоящему времени выявлены только некоторые факторы, принадлежащие пути EGFR и функционирующие в семенниках, такие как Spitz, Stet, EGFR, Raf, ERK, Rac1, Rho1, Vav. Taким образом, молекулярные механизмы, запускающие аномальную пролиферацию ранних герминальных клеток в семенниках при нарушении пути EGFR. остаются неизвестными. В большинстве тканей эукариотических организмов непосредственные потомки стволовых клеток подвергаются амплификационным делениям для увеличения числа предшественников терминально-дифференцированных клеток. Такая пролиферация должна подвергаться строгой регуляции для предотвращения онкогенеза и выявление механизмов, ее ограничивающих, является важным приоритетом для биологии стволовых клеток и изучения формирования опухолей в развивающихся тканях.

Экдизоновый сигнальный путь и его антагонизм пути EGFR. Стероидный гормон экдизон выполняет хорошо охарактеризованные функции в контроле процессов развития, обмена веществ и размножения (Ables, Drummond-Barbosa, 2017). Экдизон связывается с гетеродимерным рецептором, состоящим из рецептора экдизона (EcR) и белка Ultraspiracle (Usp), что приводит к последующей активации многих его транскрипционных

мишеней, включая такие транскрипционные факторы как E74, E75, Broad, E78 и Ftz-f1. Экдизоновый путь генетически взаимодействует с ВМР в семенниках, усиливая ответ ГСК на сигналы BMP (Ables, Drummond-Barbosa, 2010). Мутации EcR, E75 или ftz-f1 в ССКЦ приводят к потере ГСК в семенниках, которая предотвращается при кормлении самцов экдизоном (Li et al., 2014). У самцов с мутацией ЕсR наблюдается высокий уровень гибели дифференцирующихся герминальных клеток в семенниках, но эктопическая экспрессия EcR в СКЦ неавтономно приводит к спасению герминальных клеток (Li et al., 2014). Однако в другом исследовании показано, что нокдауны Usp, EcR или E75 в ССКЦ не нарушают раннее развитие герминальных клеток в семенниках и их обволакивание соматическими клетками цисты (Morris, Spradling, 2012). Еще одно исследование свидетельствует, что нормальная активность экдизонового пути не существенна или избыточна в семенниках дикого типа для сперматогенеза, но гиперэкспрессия EcR в СКЦ неавтономно приводит к массовой гибели дифференцирующихся герминальных клеток (Qian et al., 2014). В этом же исследовании показано, что в случае семенников *spitz*-мутантов, редуцированный экдизоновый сигналинг в СКЦ приводит к "спасению" дефектов взаимодействия соматических и герминальных клеток при формировании цист, таким образом, антагонизируя пути EGFR. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить молекулярные аспекты функционирования экдизонового каскада в семенниках и его баланса и антагонизма с сигнальным путем EGFR.

Только некоторые пути, вносящие существенный вклад в самообновление и поддержание ГСК, идентифицированы к настоящему времени. Диетические особенности, инсулиновая сигнальная система (путь PI3K/Tor), путь Wnt, путь Notch, путь трансляционной репрессии Nanos/Pumilio и эпигенетические факторы также влияют на поддержание и регуляцию ГСК и ССКЦ (Forbes, Lehmann, 1998; Wang, Lin, 2004; Park et al., 2007; Matunis et al., 2012; Amoyel et al., 2016b; Ng et al., 2019). Взаимодействие и параллельное функционирование множества сигнальных путей, таких как JAK/STAT, BMP, EGFR, Hedgehog, Hippo, Slit-Roundabout и других регулирует конкуренцию стволовых клеток семенников (Amoyel et al., 2013, 2014, 2016а; Stine, Matunis, 2014; Singh et al., 2016; Lu et al., 2019). ССКЦ интегрируют различные сигналы, контролирующие совокупность сигнальных путей. направленных на поддержание стволовых клеток в нише семенников и дифференцировку их потомков, но соответствующие интегральные механизмы далеко не полностью выяснены (рис. 1б). Выяснение того, как множество сигналов интегрируются для поддержания стволовых клеток, является одной из основных проблем в изучении стволовых клеток; и исследования *Drosophila* как модельного организма обеспечивают все большее понимание этих механизмов.

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФАКТОРОВ, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЦИСТЫ НЕАВТОНОМНО ПРЕДОТВРАЩАЕТ НАРУШЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РАННИХ ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Классические генетические скрининги, проводимые на дрозофиле в XX веке и направленные на поиск и идентификацию генов, существенных для сперматогенеза, сталкивались с трудностями, если мутации приводили к летальному фенотипу, поскольку многие гены, необходимые для производства гонад, также вовлечены и в другие процессы в организме. Использование системы *UAS-GAL4* в настоящее время позволяет исследователям проводить скрининговые исследования с помощью РНКі-индуцированных нокдаунов выбранных генов в строго определенном типе клеток за счет использования драйверных конструкций, активных в специфических клетках мухи (Dietzl et al., 2007; Gleason et al., 2018; Vorontsova et al., 2019). Это позволяет с одной стороны обойти проблему летальности на любой стадии развития, и с другой стороны выявить фенотипические проявления, обусловленные нарушением экспрессии изучаемого гена прицельно, в определенных клетках или тканях. Ряд таких скрининговых исследований, направленных на выявление генов, экспрессия которых существенна в соматических клетках цисты, был проведен к настоящему времени с использованием коллекций трансгенных мух, несущих РНКіконструкции к последовательностям 2338 белоккодирующих генов (Liu et al., 2016; Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017). В результате этих трех исследований выявлено 319 генов, РНКі-опосредованные нокдауны которых в соматических клетках цисты приводят к стерильности самцов, а также с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии проанализированы фенотипические нарушения в семенниках этих самцов на разных стадиях сперматогенеза. Основные типы фенотипических нарушений в таких семенниках выражаются в неавтономных дефектах поддержания герминальных клеток (существенная потеря их количества) или в нарушении их дифференцировки. Согласно результатам этих скринингов, выявлена обширная категория генов. РНКі-опосредованные нокдачны которых в ранних соматических клетках цисты при использовании драйверных линий tj-GAL4 или *c587-GAL4* приводят к формированию недоразвитых или рудиментарных семенников, как правило, содержащих обширные кластеры недифференцированных герминальных клеток. В таких семенниках СКЦ часто не поддерживаются или

расположены отдельно от герминальных клеток. Вследствие этого, основные функциональные единицы сперматогенеза – цисты – не формируются, герминальные клетки не вступают в дифференцировку, но, как правило, поддерживаются в течение длительного времени и пролиферируют независимо друг от друга. Как было показано ранее, даже полное удаление из семенников соматических клеток цисты путем индукции в них апоптоза не приводит к потере ранних герминальных клеток (Lim, Fuller, 2012), но полностью останавливает дифференцировку последних. Образование герминальных опухолей в линиях мух, несущих конструкции tj-Gal4>UAS-RNAi или c587-Gal4>UAS-RNAi, обеспечивающих нокдауны тестируемых генов в ранних СКЦ, может быть обусловлено как преждевременной потерей этих клеток, так и нарушением их взаимодействия с герминальными клетками вследствие недостаточной экспрессии комплексов клеточной адгезии или нарушения их сборки и траффика к клеточной мембране. Обнаруженные в скринингах гены, нокдачны которых в соматических клетках цисты приводят к подобным фенотипам, вовлечены в такие клеточные процессы как внутриклеточный мембранный транспорт, адгезию и поддержание клеточной поляризации; формирование внутриклеточной цитоскелетарной системы; процессинг мРНК; убиквитин-зависимый протеолиз и стабилизацию белков; ядерный импорт и экспорт; функционирование ядрышка; функционирование митохондрий; транскрипцию и ремоделирование хроматина; трансляцию; а также другие процессы (табл. 1). Ниже мы рассмотрим некоторые примеры таких генов и белковых комплексов, в которых функционируют их продукты.

Комплекс ремоделирования хроматина NURF. Комплексы ремоделирования хроматина участвуют в поддержании самообновления как ГСК, так и ССКЦ, катализируя ряд модификаций хроматина, таких как посттрансляционные модификации гистоновых хвостов, метилирование ДНК, транслокацию и изменение конформации нуклеосом для активации транскрипции (Narlikar et al., 2013). Эти комплексы содержат в своем составе АТФазы, принадлежащие к суперсемейству ДНК-хеликаз. Kомплекс Nucleosome-Remodeling Factor (NURF), состоящий из белков NURF301 (E(bx)), Caf1-55 (NURF55), NURF38 и ISWI, ATФ-зависимо регулирует процессы самообновления в обеих популяциях стволовых клеток семенников, герминальных и соматических (Cherry and Matunis, 2010). Этот комплекс действует как позитивный регулятор JAK/STAT-пути в ССКЦ. Мозаичный клональный анализ позволил выяснить, что ССКЦклоны, мутантные по nurf301, nurf38 или iswi, не поддерживаются в семенниках и теряются из ниши, вступая в дифференцировку. В ССКЦ-клонах, мутантных по *nurf301*, обнаруживается пони-

**Таблица 1.** Функциональная классификация генов, экспрессия которых в ранних соматических клетках цисты существенна для дифференцировки ранних герминальных клеток семенника

Функциональная классификация	Гены	Ссылки
Внутриклеточный мембранный транспорт	Bet3, exo84, Rab1, Rab11, Rph, sar1, sec23, sec5, Slh, Syx18, β'Cop, βCop, γCop, ζCOP, CG2023, CG32113	Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Адгезия и клеточная полярность, цитоскелет	ama, pk, Act88F, chic, form3, pbl, Rho1, tum, nudC, shi, unc-104	Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Убиквитинирование/стабильность белков	Cct5, Hsc70-4, hyd, Prosα7, Pros26, Pros26.4, Prosβ5, Rpn1, Rpn3, Rpn5, Rpn9, Rpn11, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpt2, skpA, T-cp1, Uba1, Uba2, Nedd8, CSN7, Tbp-1	Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 Kotov et al., 2020
Ядерный импорт и экспорт	Cas, emb, Fs(2)Ket, msk, Ntf-2, RanGAP	Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 Kotov et al., 2020
Ядрышко	bys, l(2)05287, Rs1, CG11920, CG13096	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Регуляция мРНК	Bx42, cbp20, cbp80, crn, hfp, hrg, l(1)10Bb, Not1, pAbp, Prp19, Prp3, SmB, SmD3, SmE, snRNP-U1-C, CG10418, Sf3b5, Sf3b1, Phf5a, tut	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 Kotov et al., 2020
Функционирование митохондрий	ATPsynCF6, ATPsynO, ATPsynβ, Letm1, CG8728	Liu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Транскрипция	e(y)1, lab, Spt5, Stat92E, MBD-R2, Ctr9, M1BP	Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Ремоделирование хроматина	Atac2, aurB, BRWD3, caf1-55, Hat1, Mi-2, mxc, Nipped-A, Ssrp, Su(var)2-10, Su(var)2-HP2, Su(var)3-9, E(bx), iswi, Nurf38	Badenhorst et al., 2005 Cherry, Matunis, 2010 Liu et al., 2016 Lv et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 Kotov et al., 2020
Клеточное деление/цитокинез	Cdk1, Cenp-C, CycK, glu, SMC2, SMC3, Spc105R, Cdc37, east	Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Трансляция	eIF-2γ, eIF4A3, eIF5, belle, eIF-1A	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 Kotov et al., 2020
Другое	SERCA, Vha26, AsnRS, LeuRS, Akt1, alph, Ance, Strip, Tor, CG10483, INPP5E, l(2)37Cc, Pp2A-29B, Sps1, CG11180, Nfs1, CG7839	Amoyel et al., 2016b Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 La Marca et al., 2019
	1	1

женный уровень экспрессии STAT92E, и эктопическая экспрессия STAT92E спасает их потерю. Это указывает на то, что данный комплекс действует как позитивный регулятор пути JAK/STAT в ССКЦ и транскрипция stat92E может опосредованно регулироваться NURF (Cherry, Matunis, 2010). В семенниках мутантов, у которых отсутствует экспрессия полноразмерного NURF301, часто возникает остановка мейоза и детектируется нарушение экспрессии ряда генов, необходимых для дифференцировки сперматид (Kwon et al., 2009). Нужно отметить, что Caf1-55 входит в состав нескольких комплексов ремоделирования хроматина, таких как CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1), а также NURF, NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) и PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Нокдаун caf1-55 в ССКЦ приводит к нарушению формирования цист, разобщению герминальных и соматических клеток на ранних стадиях сперматогенеза и гиперпролиферации ГСК-подобных клеток (Fairchild et al., 2017, Kotov et al., 2020). Таким, образом, Caf1-55 также функционирует в соматических клетках цисты в составе других хроматиновых комплексов, отличных от NURF. Ho, поскольку NuRD и другие комплексы не являются необходимыми для поддержания стволовых клеток в семенниках, регуляция ССКЦ и ГСК в нише на уровне хроматина зависит, главным образом, от функционирования NURF (Cherry, Matunis, 2010), а участие Caf1-55 в других комплексах ремоделирования хроматина существенно для программы дифференцировки.

Генетическое взаимодействие было обнаружено между генами комплекса NURF iswi и nurf301 и генами экдизонового каскада usp и E74 (Ables, Drummond-Barbosa, 2010). Мутации в usp и E74 приводят к снижению уровня ISWI. Мутации и нарушение экспрессии iswi приводят к подавлению сигнального пути ВМР и преждевременной экспрессия фактора дифференцировки ВАМ в ГСК (Ables, Drummond-Barbosa, 2010). В соответствии с уменьшением уровня ISWI в нулевых клонах usp и E74 соматических клеток цисты в них наблюдается редуцированный уровень активации BMP. Показано также, что комплекс NURF экдизон-зависимо физически взаимодействует с EcR и экспрессия генов-мишеней экдизонового пути нарушается у мутантов *nurf301*, подтверждая то, что NURF является ко-активатором EcR (Badenhorst et al., 2005).

РНК-хеликаза Belle как существенный трансляционный регулятор. Недавно мы показали, что РНКі-нокдаун гена belle, кодирующего РНК-хеликазу Belle подсемейства DDX3, в ранних соматических клетках цисты приводит к гиперплазии ГСК-подобных ранних герминальных клеток, аресту их дифференцировки и сегрегации Тј-положительных соматических клеток цисты от герминальных. С помощью CLIP-seq анализа мы определили

более 300 генов, транскрипты которых взаимодействуют с Belle в семенниках (Kotov et al., 2020). Belle преимущественно взаимодействует со зрелыми мРНК и функционирует как трансляционный регулятор, и, в соответствии с опубликованными данными, может как активировать, так и подавлять трансляцию транскриптов-мишеней (Ihry et al., 2012; Götze et al., 2017; Liao et al., 2019; Kotov et al., 2020). Среди идентифицированных транскриптов мы обнаружили подмножество из 17 генов, ранее определенных в скрининговых ислледованиях (Liu et al., 2016; Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017), нокдауны которых в ССКЦ приводят к подобному фенотипу. Среди них были обнаружены транскрипты генов *Rpn7*, *Fs*(2)*Ket*, *Not1*, *caf1-55* и др. (Kotov et al., 2020). Not 1 является ключевым компонентом комплекса деаденилирования CCR4-Not, вовлеченного в трансляционную регуляцию мРНК во множестве процессов развития (Тетте et al., 2014; Götze et al., 2017). Caf1-55, как упоминалось выше, является компонентом нескольких комплексов ремоделирования хроматина, существенным для поддержания и пролиферации ГСК в семенниках и яичниках (Wen et al., 2012; Angulo et al., 2019). Rpn7 является компонентом протеасомы, а β-импортин Fs(2) Ket вовлечен в ядерный импорт и экспорт (Yu et al., 2016; Lippai et al., 2000). Нокдауны этих генов в соматических клетках цисты с различной пенетрантностью вызывают формирование опухолеподобных кластеров ГСК-подобных герминальных клеток в семенниκαχ (Liu et al., 2016; Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017; Kotov et al., 2020). Мы полагаем, что нарушение трансляции этих и других мРНК-мишеней в случае нокдауна belle в ССКЦ обеспечивает интегральный вклад в наблюдаемые дефекты сперматогенеза. Эктопическая экспрессия β-интегрина на фоне нокдауна belle в ССКЦ приводит к восстановлению ранних стадий сперматогенеза в 80% случаев, что свидетельствует в пользу гипотезы о нарушении взаимодействия соматических клеток цисты с герминальными благодаря автономным дефектам клеточной адгезиии (Kotov et al., 2020).

Убиквитин-зависимый протеолиз. Как показано в скрининговых исследованиях, нокдауны целого ряда генов в ранних соматических клетках цисты, таких как *Rpn1*, *Rpn7*, *Rpn11*, *Rpn12*, *Rpn8*, *Rpn9*, *Rpn3*, *Rpn5*, *Tbp-1*, *Prosα7*, *Prosβ1*, *Prosβ5*, *Pros26* и *Pros26.4*, кодирующих компоненты протеасомного комплекса 26S, приводят к дефектам поддержания самих ССКЦ и к гиперпролиферации ГСК-подобных герминальных клеток (Liu et al., 2016; Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017) (табл. 1). Все субстраты протеасомного комплекса 26S должны иметь узнаваемый сигнал и неструктурированную инициирующую область (Bard et al., 2018). Преобладающим сигналом является полиубиквитиновая цепь, которая формируется кова-

**Таблица 2.** Функциональная классификация генов, экспрессия которых в соматических клетках цисты существенна для морфогенеза сперматогониев и сперматоцитов

Функциональная классификация	Гены	Ссылки
Эндоцитоз	AP-1-2β, Chc, Rab5, sec 15, Vps 16A, AP-2μ, Syx 1A, Syx 7	Fairchild et al., 2017 Tang et al., 2017
Адгезия, клеточная полярность, цитоскелет	cora, dlg1, l(2)gl, Lac, Nrx-IV, scrib, Cdc42, ssh, aPKC, baz, par-1, par-6, pck, sinu	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 Dubey P. et al., 2019 Papagiannouli et al., 2019 Brantley, Fuller, 2019
Убиквитинирование/стабильность белков	alien, CSN1b, CSN3	Fairchild et al., 2017
Ядерный импорт и экспорт	Кар-0.3	Fairchild et al., 2017
Регуляция мРНК	Atx2, IntS8, LSm7, pix, Pop2, Cnot7, snRNP-U1-70K, U2af50, CG6066	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Функционирование митохондрий	ATPsynB, ATPsynγ, Mtch, Tom40	Fairchild et al., 2017
Ремоделирование хроматина	Tip60, Domino, Reptin, Ing3, BAP55, E(Pc)	Liu et al., 2016 Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017 Feng et al., 2017
Другое	Atpα, cngl, MED19, MED4, chico, SA, CG5589, CG9609, CkIIβ, CkIα, mts	Liu et al., 2016 Fairchild et al., 2017

лентным присоединением убиквитина посредством изопептидной связи с остатком лизина белкового субстрата и последующих присоединений молекул убиквитина к лизинам в убиквитиновой цепи. Полиубиквитинированные белки рекрутируются в протеасому путем взаимодействия с одним из трех убиквитиновых рецепторов комплекса, одним из которых является Rpn1. Среди найденных в скринингах существенных генов также обнаружен *Rpn11*, кодирующий наиболее важную деубиквитиназу комплекса 26S (Bard et al., 2018). В скринингах также определены reны Uba1 и Uba2 (Fairchild et al., 2017), кодирующие убиквитин-активирующие ферменты, вовлеченные в убиквитинирование белков (табл. 1). Все эти находки свидетельствует о необходимости протеасомной активности и убиквитин-опосредуемого протеолиза в ССКЦ для их выживания и функционирования (Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017). Потеря ССКЦ и их потомков вследствие дефектов системы внутриклеточного протеолиза белков в соответствии с более ранним исследованием (Lim, Fuller, 2012) неавтономно приводит к нарушению дифференцировки герминальных клеток и их опухолеподобной пролиферации.

## ДЕФЕКТЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОЙ ПРОГРАММЫ СПЕРМАТОГОНИЕВ ПРИ НАРУШЕНИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЦИСТЫ

Выявлена еще одна категория генов, нокдауны которых в СКЦ не приводят к нарушению их поддержания, но неавтономно вызывают дефекты развития сперматогониев, что выражается в нарушении контроля численности митозов и часто приводит к гиперпролиферации сперматогониев из-за повышенной частоты их синхронных делений. В этом случае переключение на программу роста и развития сперматоцитов не происходит, и семенники постепенно наполняются большими кластерами ранних герминальных и соматических клеток. Анализ кандидатных генов, чей нокдаун неавтономно приводит к нарушениям развития на стадии сперматогониев, выявил обогащение генами, связанными с процессом эндоцитоза, такими как Rab5, Chc, Vps16A, Sec15, и AP-1-2\beta (Fairchild et al., 2017), а также генами компонентов гистонацетилтрансферазного комплекса Тір60 НАТ и другими (Liu et al., 2016; Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017) (табл. 2).

**Малая ГТФаза Rab5.** Нокдаун гена *Rab5*, кодирующего малую ГТФазу, вовлеченную в эндосо-

мальный мембранный транспорт от поверхности клетки, приводит к эктопической аккумуляции, как соматических клеток цисты, так и ранних герминальных клеток в семенниках. Эти герминальные клетки имеют тонкие, многократно разветвляющиеся фузомы, соединяющие эти клетки в синцитиальные структуры. Найдено, что эктопические соматические клетки цисты экспрессируют специфический маркер ССКЦ транскрипционный фактор Zfh1, что позволяет предположить, что нокдаун *Rab5* вызывает нарушение функционирования внутриклеточных сигнальных каскадов в этих клетках. В семенниках дикого типа экспрессия Zfh1 в СКЦ, отошедших от хаба, подавляется, позволяя таким клеткам дифференцироваться самим и контролировать дифференцировку герминальных клеток. Нокдаун *Rab5*, предположительно, может подавлять способность соматических клеток цисты обрабатывать сигналы, исходящие из хаба, и в этом случае в гониабластах и сперматогониях путь ВМР остается активным, что останавливает их дифференцировку (Tang et al., 2017). Известно, что сигнальные пути JAK/STAT и Hedgehog независимо поддерживают экспрессию Zfh1 в ССКЦ (Leatherman, DiNardo 2008; Michel et al., 2012). Таким образом, Rab5 в ранних СКЦ модулирует работу нескольких сигнальных путей, таких как JAK/STAT и Hedgehog, возможно также влияя на уровень экспрессии лигандов сигнального пути ВМР.

Гистонацетилтрансферазный комплекс Тір60 **HAT.** Enhancer of Polycomb (E(Pc)) – консервативный представитель генов группы Polycomb, который распространен от дрожжей до млекопитающих и является существенным для регуляции структуры хроматина у разных видов, функционируя в составе гистонацетилтрансферазного комплекса Тір60 НАТ, ацетилирующего гистоны H4 и H2A (Kusch et al., 2004; Clapier, Cairns, 2009). По данным скрининговых исследований экспрессия Е(Рс) и еще шести компонентов комплекса, Tip60, Domino, Reptin, Ing3, Nipped-A и ВАР55 в соматических клетках цисты является существенной для сперматогенеза дрозофилы (Liu et al., 2016; Yu et al., 2016; Fairchild et al., 2017) (табл. 2). Нокдаун E(Pc) в ранних СКЦ приводит к опухолеподобному накоплению ранних герминальных клеток, соответствующих, в большинстве случаев, сперматогониальной стадии дифференцировки, и накоплению избытка ССКЦ-подобных соматических клеток, экспрессирующих одновременно как ранние маркеры Zfh1 и Yan. так и маркер поздних соматических клеток цисты Eya (Feng et al., 2017; Fairchild et al., 2017). Таким образом, Е(Рс) способствует дифференцировке соматических клеток цисты с помощью репрессии ССКЦ-специфических транскрипционных факторов Zfh1 и Yan, а нокдаун E(Pc) останавливает дифференцировку как соматических, так и

герминальных клеток. Е(Рс) в СКЦ действует в составе комплекса Тір60 НАТ, содержащего Тір60 как каталитический компонент, и регулирует уровень ацетилирования гистона Н4 в генах-мишенях. С помощью ChIP-seq экспериментов были выявлены многочисленные гены-мишени Е(Рс) в СКЦ. Три основных категории мишеней представлены генами, кодирующими компоненты сигнальных путей; генами, ответственными за чекпойнт-контроль повреждения ДНК; и генами, кодирующими гистонмодифицирующие ферменты (Feng et al., 2017). В частности обогащены гены сигнальных путей EGFR, JAK/STAT, Wnt и Notch, что подтверждает важную роль Е(Рс) и Тір60 в координации взаимодействия между соматическими и герминальными клетками семенников в процессе дифференцировки. ChIP-seq анализ позволил идентифицировать значительное обогащение Е(Рс) на геномных локусах, содержащих гены пути JAK/STAT, domeless, hopscotch, stat92E и zfh1. Эксперименты с применением репортерных конструкций показывают, что Е(Рс) подавляет активность сигнального пути JAK/STAT в потомках ССКЦ (Feng et al., 2017). Возможной мишенью Е(Рс) является ген уап, функционирующий как антагонист пути EGFR (Lai, Rubin, 1992). Потенциально E(Pc) может рассматриваться как ключевой регулятор взаимодействия между соматическими и герминальными клетками в семенниках дрозофилы, обеспечивающий тонкую настройку деятельности различных сигнальных путей.

## ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ JNK КОМПЛЕКСОМ АПИКАЛЬНОЙ ПОЛЯРНОСТИ PAR НЕОБХОДИМО ДЛЯ ВЫЖИВАНИЯ СПЕРМАТОПИТОВ

Белковый комплекс апикальной полярности Par, состоящий из таких компонентов как Bazooka (Baz), Par-6 и aPKC, высоко консервативен от нематод до человека (Baum and Georgiou, 2011). Функции комплекса Par необходимы в СКЦ для подавления активации сигнального пути Jun-киназы (JNK) (Timmons et al., 2016). PHKi-опосредованные нокдауны компонентов комплекса Par, aPKC, par-6 или baz, в соматических клетках цисты не вызывают потери самих этих клеток, но неавтономно приводят к прогрессирующей потере ранних сперматоцитов (Fairchild et al., 2017; Brantley, Fuller, 2019) (табл. 2). При этом дифференцирующиеся герминальные клетки в таких семенниках успешно проходят через митотическую программу сперматогониев. Неавтономная гибель сперматоцитов внутри цист зависит от экспрессии в соматических клетках цисты эндосомальной малой ГТФазы Rab35. Гибель сперматоцитов вследствие нокдауна компонентов комплекса Par, повидимому, не связана с разрушением барьера про-

Таблица 3. Функциональная классификация генов, экспрессия которых в соматических клетках цисты существенна для процесса формирования и индивидуализации сперматид

Функциональная классификация	Гены	Ссылки
Эндоцитоз	Arf102F, Crag, dor, endoB, Rab7, Rbcn-3A, Rep, sec71, Snap29, Syx5, Vps25	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Адгезия и клеточная полярность	DE-cadherin	Fairchild et al., 2017
Актиновый цитоскелет	Act5C, AnxB10, Arp1, Arp2, Arp3, Arpc1, Arpc2, Arpc5, DCTN2-p50, RacGAP84C, zip	Desai et al., 2009 Dubey et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Тубулиновый цитоскелет	Dhc64C, Dlic, DCTN5-p25, DCTN1-p150, msps, sw, αTub84B, αTub85E, βTub60D, βTub97EF	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Регуляция мРНК	me31B, CG2021	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017
Функционирование митохондрий	blw, COX5A, cype, mRpS10, ND-23, ND-42, ND-51, ND-75, ND-B18	Fairchild et al., 2017
Убиквитинирование/стабильность белков	Hsf, Hsp83, l(2)tid	Fairchild et al., 2017
Другое	ZnT49B, da, yki, bun, msn, Pten, pyr, Hlc, PI4KIIIa, schlank, sktl, TER94	Yu et al., 2016 Fairchild et al., 2017

ницаемости цисты, созданного контактами между двумя СКЦ. Согласно предложенным моделям (Brantley, Fuller, 2019), нарушение функции комплекса Раг в соматических клетках цисты приводит к гибели сперматоцитов благодаря активации пути JNK, который может осуществлять секрецию про-апоптотических сигналов в сперматоциты через эндосомальный транспорт с помощью Rab35. Альтернативно, Rab35 может также функционировать параллельно с сигнальным путем JNK с потерей функции комплекса Par, вызывая фагоцитоз погибших сперматоцитов соматическими клетками цисты.

# ЭКСПРЕССИЯ КОМПОНЕНТОВ МИКРОТРУБОЧЕК И КОМПЛЕКСОВ ДИНЕИНА И ДИНАКТИНА В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЦИСТЫ НЕОБХОДИМА НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СПЕРМАТИД

После образования гаплоидных сперматид вследствие мейоза, начинается морфогенетический процесс превращения их в зрелую сперму. Одновременно с удлинением сперматид СКЦ также претерпевают ряд изменений, становясь структурно различными. Соматическая клетка цисты, оказавшаяся в хвостовой части элонгирующей цисты, значительно увеличивается в размерах, чтобы приспособиться к удлиненным хвостам сперматид, тогда как головная соматическая клетка в передней части растет в меньшей степени (Zoller, Shulz, 2012; Dubey et al., 2016). По мере созревания сперматид, головная соматиче-

ская клетка формирует вокруг головок удлиненных сперматид шапочкообразную структуру, обогащенную молекулами актина, комплексами клеточной адгезии и комплексом Arp2/3 (табл. 3). Любые мутации или нокдауны, приводящие к нарушению формирования шапочки, приводят к остановке развития на этой стадии (Desay et al., 2009; Dubey et al., 2016; Fairchild et al., 2017). Еще одна категория генов, нокдауны которых неавтономно вызывают дефекты развития сперматид, представлена генами, ассоциированными с функциями клеточного транспорта, зависимого от микротрубочек (табл. 3). Среди них гены компонентов комплексов динеина и динактина, Dhc64C, Dlic и DCTN1-p150 (Glued), а также субъединиц микротрубочек, такие как  $\alpha Tub84B$ ,  $\alpha Tub85E$ ,  $\beta Tub60D$  и В*Tub97EF*. Несмотря на корректное прохождение митотической и мейотической стадий сперматогенеза, нокдауны этих генов в СКЦ приводят к уменьшению численности удлиненных сперматид в семенниках и нарушению процесса их индивидуализации, в результате чего индивидуальные сперматозоиды не попадают в семенной пузырек (Fairchild et al., 2017). Тогда как специфический нокдаун динактина 1 (Glued) в СКЦ не нарушает исходную инкапсуляцию герминальных клеток в цисте, он нарушает упорядоченность В-тубулин-содержащих микротрубочек в СКЦ и целостность цист на стадии морфогенеза сперматид (Fairchild et al., 2017).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Поддержание и дифференцировка герминальных клеток базируются на клеточно-автономных

и неавтономных механизмах. Правильная регуляция пролиферации, адгезии и селекции герминальных клеток для их предназначения осуществляется при помощи сигналов из соматического микроокружения. Секретируемые лиганды и питательные вещества, поступающие из соматических клеток, регулируют сохранение идентичности и самообновление ГСК, контролируют их пролиферацию и дифференцировку потомков на протяжении всего сперматогенеза. Сложная сеть взаимодействий между сигнальными путями с элементами обратной связи, функционирующая для производства гамет, идентифицирована лишь частично к настоящему времени. Результаты недавних исследований, включающие генетические скрининги, полногеномные и транскриптомные исследования, обеспечивают новые данные для улучшенного понимания неавтономной регуляции поддержания и дифференцировки герминальных стволовых клеток, осуществляемой соматическими клетками цисты. Выявлены существенные комплексы, ответственные за ремоделирование хроматина и регуляцию транскрипции на различных стадиях дифференцировки, протеасомные комплексы, компоненты машины эндоцитоза и факторы регуляции трансляции множества транскриптов, необходимых для нормального сперматогенеза. Исследования, осуществленные при использовании Drosophila как модельного организма, способствуют лучшему пониманию неавтономных функций соматических клеток семенников в поддержании сперматогенеза на всех его стадиях. Мы предполагаем актуальность и полезность этих исследований для изучения широкого круга эукариотических организмов, в том числе и человека. Дальнейшее изучение механизмов, обеспечивающих непрерывное производство гамет с постоянной скоростью в течение репродуктивного возраста, важно для понимания возникновения таких патологий, как бесплодие, онкологические заболевания, а также возрастные нарушения.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.А. Гвоздеву и Г.Л. Коган за внимательное и критическое прочтение обзора и ценные замечания.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Эта работа была поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, проекты № 18-34-20124 и № 18-04-00546.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор содержит анализ исследований с использованием животных в качестве объектов. Все применимые международные, национальные и/или

институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены в соответствующих исследованиях.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

С.С. Базылев, Л.В. Оленина, А.А. Котов подготовили первоначальный вариант обзора. В.Е. Адашев и А.С. Шацких читали, обсуждали и редактировали рукопись. В.Е. Адашев и Л.В. Оленина создали рисунки и таблицы. С.С. Базылев, Л.В. Оленина, А.А. Котов сформировали окончательный вариант обзора. Все авторы внесли в создание обзора интеллектуальный вклад, отредактировали и одобрили рукопись для публикации в ее нынешней форме.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ables E.T., Drummond-Barbosa D. The steroid hormone ecdysone functions with intrinsic chromatin remodeling factors to control female germline stem cells in Drosophila // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. № 5. P. 581–592.
- Ables E.T., Drummond-Barbosa D. Steroid hormones and the physiological regulation of tissue-resident stem cells: Lessons from the Drosophila ovary // Curr. Stem Cell Rep. 2017. V. 3. № 1. P. 9–18.
- Amlani S., Vogl A.W. Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis // Anat. Rec. 1988. V. 220. № 2. P. 143–160.
- Amoyel M. et al. Socs36E controls niche competition by repressing MAPK signaling in the *Drosophila* testis // PLoS Genet. 2016a. V. 12. № 1. P. e1005815.
- Amoyel M. et al. Somatic stem cell differentiation is regulated by PI3K/Tor signaling in response to local cues // Development. 2016b. V. 143. № 21. P. 3914–3925.
- Amoyel M. et al. Hedgehog is required for CySC self-renewal but does not contribute to the GSC niche in the Drosophila testis // Development. 2013. V. 140. № 1. P. 56–65.
- Amoyel M., Simons B.D., Bach E.A. Neutral competition of stem cells is skewed by proliferative changes downstream of Hh and Hpo // EMBO J. 2014. V. 33. № 20. P. 2295—2313.
- Angulo B. et al. DREF genetically counteracts Mi-2 and Caf1 to regulate adult stem cell maintenance // PLoS Genet. 2019. V. 15 № 6. P. e1008187.
- Arbouzova N.I., Zeidler M.P. JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions // Development. 2006. V. 133. № 14. P. 2605–2516.
- Badenhorst P. et al. The Drosophila nucleosome remodeling factor NURF is required for Ecdysteroid signaling and metamorphosis // Genes Dev. 2005. V. 19. № 21. P. 2540–2545.

- Bard J.A.M. et al. Structure and function of the 26S proteasome // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. P. 697–724.
- Baum B., Georgiou M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling // J. Cell Biol. 2011. V. 192. P. 907–917.
- Brand A.H., Perrimon N. Raf acts downstream of the EGF receptor to determine dorsoventral polarity during Drosophila oogenesis // Genes Dev. 1994. V. 8. № 5. P. 629–639.
- Brantley S.E., Fuller M.T. Somatic support cells regulate germ cell survival through the Baz/aPKC/Par6 complex // Development. 2019. V. 146. № 8. P. dev169342.
- Boyle M., DiNardo S. Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad // Development. 1995. V. 121. P. 1815–1825.
- Chen D., McKearin D. Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells // Curr. Biol. 2003. V. 13. P. 1786—1791.
- Chen H., Chen X., Zheng Y. The nuclear lamina regulates germline stem cell niche organization via modulation of EGFR signaling // Cell Stem Cell. 2013. V. 13. № 1. P. 73–86.
- Cherry C.M., Matunis E.L. Epigenetic regulation of stem cell maintenance in the *Drosophila* testis via the nucleosome-remodeling factor NURF // Cell Stem Cell. 2010. V. 6. № 6. P. 557–567.
- Clapier C.R., Cairns B.R. The biology of chromatin remodeling complexes // A. Rev. Biochem. 2009. V. 78. P. 273–304.
- Dietzl G. et al. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila // Nature. 2007. V. 448. P. 151–156.
- DiNardo S. et al. lines and bowl affect the specification of cyst stem cells and niche cells in the Drosophila testis // Development. 2011. V. 138. P. 1687–1696.
- De Cuevas M., Matunis E.L. The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis // Development. 2011. V. 138. № 14. P. 2861–2869.
- Desai B.S., Shirolikar S., Ray K. F-actin-based extensions of the head cyst cell adhere to the maturing spermatids to maintain them in a tight bundle and prevent their premature release in *Drosophila* testis // BMC Biol. 2009. V. 7. P. 19.
- Dubey P. et al. Atypical septate junctions maintain the somatic enclosure around maturing spermatids and prevent premature sperm release in *Drosophila* testis // Biol. Open. 2019. V. 8. № 2. P. pii: bio036939.
- Dubey P. et al. Localized, reactive F-actin dynamics prevents abnormal somatic cell penetration by mature spermatids // Dev. Cell. 2016. V. 38. № 5. P. 507–521.
- Fabrizio J.J., Boyle M., DiNardo S. A somatic role for eyes absent (eya) and sine oculis (so) in Drosophila spermatocyte development // Dev. Biol. 2003. V. 258. № 1. P. 117–128.
- Fairchild M.J., Islam F., Tanentzapf G. Identification of genetic networks that act in the somatic cells of the testis to mediate the developmental program of spermatogenesis // PLoS Genet. 2017. V. 13. № 9. P. e1007026.
- Fairchild M.J., Smendziuk C.M., Tanentzapf G. A somatic permeability barrier around the germline is essential for

- *Drosophila* spermatogenesis // Development. 2015. V. 142. P. 268–281.
- Feng L., Shi Z., Chen X. Enhancer of polycomb coordinates multiple signaling pathways to promote both cyst and germline stem cell differentiation in the *Drosophila* adult testis // PLoS Genet. 2017. V. 13. № 2. P. e1006571.
- Flaherty M.S. et al. chinmo is a functional effector of the JAK/STAT pathway that regulates eye development, tumor formation, and stem cell self-renewal in *Drosophila* // Dev. Cell. 2010. V. 18. № 4. P. 556–568.
- Flaherty M.S. et al. Genome-wide expression profiling in the *Drosophila* eye reveals unexpected repression of notch signaling by the JAK/STAT pathway // Dev. Dyn. 2009. V. 238. № 9. P. 2235–2253.
- Forbes A., Lehmann R. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells // Development. 1998. V. 125. № 4. P. 679–690.
- Fuller M.T. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis // Semin. Cell Dev. Biol. 1998. V. 9. № 4. P. 433–444.
- Gleason R.J. et al. Protecting and diversifying the germline // Genetics. 2018. V. 208. № 2. P. 435–471.
- Greenbaum M. et al. Germ cell intercellular bridges // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. № 8. P. a005850.
- Greenspan L.J., de Cuevas M., Matunis E. Genetics of gonadal stem cell renewal // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2015. V. 31. P. 291–315.
- *Griswold M.D.* The central role of Sertoli cells in spermatogenesis // Semin. Cell. Dev. Biol. 1998. V. 9. P. 411–416.
- Gönczy P., DiNardo S. The germ line regulates somatic cyst cell proliferation and fate during *Drosophila* spermatogenesis // Development. 1996. V. 122. № 8. P. 2437—2447.
- Götze M. et al. Translational repression of the Drosophila nanos mRNA involves the RNA helicase Belle and RNA coating by Me31B and Trailer hitch // RNA. 2017. V. 23. № 10. P. 1552–1568.
- Hardy R. et al. The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster* // J. Ultrastructure Res. 1979. V. 69. P. 180–190.
- Hasan S., Hétié P., Matunis E.L. Niche signaling promotes stem cell survival in the *Drosophila* testis via the JAK-STAT target DIAP1 // Dev. Biol. 2015. V. 404. № 1. P. 27–39.
- Hsu T.H. et al. The Hippo pathway acts downstream of the Hedgehog signaling to regulate follicle stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 4480.
- Hudson A.G. et al. A temporal signature of epidermal growth factor signaling regulates the differentiation of germline cells in testes of *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2013. V. 8. № 8. P. e70678.
- Ihry R.J., Sapiro A.L., Bashirullah A. Translational control by the DEAD Box RNA helicase belle regulates ecdysone-triggered transcriptional cascades // PLoS Genet. 2012. V. 8. P. e1003085.
- *Inaba M., Buszczak M., Yamashita Y.M.* Nanotubes mediate niche-stem-cell signalling in the *Drosophila* testis // Nature. 2015. V. 523. № 7560. P. 329–332.

- *Issigonis M. et al.* JAK-STAT signal inhibition regulates competition in the *Drosophila* testis stem cell niche // Science. 2009. V. 326. № 5949. P. 153–156.
- *Jiang X.H. et al.* Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically—modified mice // Asian J. Androl. 2014. V. 16. № 4. P. 572–580.
- *Jemc J.C.* Somatic gonadal cells: the supporting cast for the germline // Genesis. 2011. V. 49. № 10. P. 753–775.
- Kawase E. et al. Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the *Drosophila* testis // Development. 2004. V. 131. № 6. P. 1365–1375.
- Kiger A.A. et al. Stem cell self—renewal specified by JAK–STAT activation in response to a support cell cue // Science. 2001. V. 294. № 5551. P. 2542–2545.
- Kiger A.A., White-Cooper H., Fuller M.T. Somatic support cells restrict germline stem cell self—renewal and promote differentiation // Nature. 2000. V. 407. № 6805. P. 750–754.
- Kitadate Y., Kobayashi S. Notch and Egfr signaling act antagonistically to regulate germline stem cell niche formation in *Drosophila* male embryonic gonads // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. V. 107. P. 14241–14246.
- Kopera I.A. et al. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2010. V. 365. № 1546. P. 1593–1605.
- Kotov A.A. et al. Progress in understanding the molecular functions of DDX3Y (DBY) in male germ cell development and maintenance // Biosci. Trends. 2017. V. 11. № 1. P. 46–53.
- Kotov A.A. et al. The Drosophila RNA helicase belle (DDX3) non-autonomously suppresses germline tumorigenesis via regulation of a specific mRNA set // Cells. 2020. V. 9. P. 550.
- *Kusch et al.* Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions // Science. 2004. V. 306. P. 2084–2087.
- Kwon S.Y. et al. Alternative splicing of NURF301 generates distinct NURF chromatin remodeling complexes with altered modified histone binding specificities // PLoS Genet. 2009. V. 5. № 7. P. e1000574.
- Lai Z.C., Rubin G.M. Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the productof the yan gene, an ETS domain protein // Cell. 1992. V. 70. P. 609–620.
- La Marca J.E. et al. Strip and Cka negatively regulate JNK signalling during *Drosophila* spermatogenesis // Development. 2019. V. 146. № 13. P. dev174292.
- Leatherman J.L., Dinardo S. Germline self-renewal requires cyst stem cells and stat regulates niche adhesion in Drosophila testes // Nat. Cell. Biol. 2010. V. 12. № 8. P. 806–811.
- Leatherman J.L., Dinardo S. Zfh-1 controls somatic stem cell self-renewal in the Drosophila testis and nonautonomously influences germline stem cell self-renewal // Cell Stem Cell. 2008. V. 3. № 1. P. 44–54.
- Liao S.E. et al. DEAD-box RNA helicase Belle posttranscriptionally promotes gene expression in an ATPase activity-dependent manner // RNA. 2019. V. 25. P. 825– 839.
- Lim J.G., Fuller M.T. Somatic cell lineage is required for differentiation and not maintenance of germline stem cells

- in *Drosophila* testes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 45. P. 18477—18481.
- *Li M.A. et al.* The large Maf factor Traffic Jam controls gonad morphogenesis in *Drosophila* // Nat. Cell. Biol. 2003. V. 5. № 11. P. 994–1000.
- Li Y. et al. Steroid signaling promotes stem cell maintenance in the *Drosophila* testis // Dev. Biol. 2014. V. 394. № 1. P. 129–141.
- Lippai M. et al. The Ketel gene encodes a Drosophila homologue of importin-beta // Genetics. 2000. V. 156. P. 1889–1900.
- Liu Y. et al. Whole-animal genome-wide RNAi screen identifies networks regulating male germline stem cells in *Drosophila* // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 12149.
- Lu Y., Yao Y., Li Z. Ectopic Dpp signaling promotes stem cell competition through EGFR signaling in the *Drosophila* testis // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 6118.
- Lv X. et al. SUMO regulates somatic cyst stem cell maintenance and directly targets the Hedgehog pathway in adult *Drosophila* testis // Development. 2016. V. 143. № 10. P. 1655–1662.
- Ma Q., Wawersik M., Matunis E.L. The Jak-STAT target Chinmo prevents sex transformation of adult stem cells in the *Drosophila* testis niche // Dev. Cell. 2014. V. 31. № 4. P. 474–486.
- Matunis E.L., Stine R.R., de Cuevas M. Recent advances in Drosophila male germline stem cell biology // Spermatogenesis. 2012. V. 2. P. 137–144.
- McKearin D.M., Spradling A.C. bag-of-marbles: a Drosophila gene required to initiate both male and female gametogenesis // Genes Dev. 1990. V. 4. № 12B. P. 2242—2251.
- *Michel M. et al.* Hh signalling is essential for somatic stem cell maintenance in the *Drosophila* testis niche // Development. 2012. V. 139. № 15. P. 2663–2669.
- Michel M. et al. Local BMP receptor activation at adherens junctions in the *Drosophila* germline stem cell niche // Nat. Commun. 2011. V. 2. P. 415.
- Morrison S.J., Spradling A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life // Cell. 2008. V. 132. P. 598–611.
- Morris L.X., Spradling A.C. Steroid signaling within Drosophila ovarian epithelial cells sex-specifically modulates early germ cell development and meiotic entry // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. P. e46109.
- *Mo J.S.*, *Park H.W.*, *Guan K.L*. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer // EMBO Rep. 2014. V. 15. P. 642–656.
- Nel-Themaat L. et al. Sertoli cell behaviors in developing testis cords and postnatal seminiferous tubules of the mouse // Biol. Reprod. 2011. V. 84. P. 342–350.
- Ng C.L., Qian Y., Schulz C. Notch and Delta are required for survival of the germline stem cell lineage in testes of Drosophila melanogaster // PLoS One. 2019. V. 14. № 9. P. e0222471.
- Narlikar G.J., Sundaramoorthy R., Owen-Hughes T. Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes // Cell. 2013. V. 154. P. 490–503.
- Oatley J.M., Brinster R.L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes // Physiol. Rev. 2012. V. 92. P. 577–595.

- Ohlstein B., McKearin D. Ectopic expression of the Drosophila Bam protein eliminates oogenic germline stem cells // Development. 1997. V. 124. № 18. P. 3651–3662
- Oh H., Irvine K.D. In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization // Development. 2008. V. 135. P. 1081–1088.
- Okegbe T.C., DiNardo S. The endoderm specifies the mesodermal niche for the germline in *Drosophila* via Delta-Notch signaling // Development. 2011. V. 138. P. 1259—1267.
- Papagiannouli F, Berry C.W., Fuller M.T. The Dlg module and clathrin-mediated endocytosis regulate EGFR signaling and cyst cell-germline coordination in the *Drosophila* testis // Stem Cell Reports. 2019. V. 12. № 5. P. 1024–1040.
- Parisi M. et al. Paucity of genes on the Drosophila X chromosome showing male-biased expression // Science. 2003. V. 299. P. 697–700.
- Park J.K. et al. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells // Curr. Biol. 2007. V. 17. № 6. P. 533–538.
- Parrott B.B. et al. Control of germline stem cell division frequency—a novel, developmentally regulated role for epidermal growth factor signaling // PLoS One. 2012. V. 7. № 5. P. e36460.
- Phillips B.T., Gassei K., Orwig K.E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2010. V. 365. P. 1663–1678.
- *Qian Y. et al.* Ecdysone signaling opposes epidermal growth factor signaling in regulating cyst differentiation in the male gonad of *Drosophila melanogaster* // Dev. Biol. 2014. V. 394. № 2. P. 217–227.
- Ren F., Zhang L., Jiang J. Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms // Dev. Biol. 2010. V. 337. P. 303-312.
- Santos A.C., Lehmann R. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond // Curr. Biol. 2004. V. 14. № 14. P. R578–R589.
- Sarkar A. et al. Antagonistic roles of Rac and Rho in organizing the germ cell microenvironment // Curr. Biol. 2007. V. 17. № 14. P. 1253–1258.
- Schulz C. et al. Signaling from germ cells mediated by the rhomboid homolog stet organizes encapsulation by somatic support cells // Development. 2002. V. 129. № 19. P. 4523–4534.
- Sheng X.R. et al., Jak-STAT regulation of male germline stem cell establishment during *Drosophila* embryogenesis // Dev. Biol. 2009. V. 334. P. 335–344.
- Shields A.R. et al. The actin-binding protein profilin is required for germline stem cell maintenance and germ cell enclosure by somatic cyst cells // Development. 2014. V. 141. № 1. P. 73–82.
- Shilo B.Z. The regulation and functions of MAPK pathways in *Drosophila* // Methods. 2014. V. 68. № 1. P. 151–159.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell // Blood Bells. 1978. V. 4. P. 7–25.
- Shivdasani A.A., Ingham P.W. Regulation of stem cell maintenance and transit amplifying cell proliferation by

- TGF- $\beta$  signaling in *Drosophila* spermatogenesis // Curr. Biol. 2003. V. 13. P. 2065–2072.
- Singh S.R. et al. The novel tumour suppressor Madm regulates stem cell competition in the *Drosophila* testis // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 10473.
- Singh S.R. et al. Competitiveness for the niche and mutual dependence of the germline and somatic stem cells in the *Drosophila* testis are regulated by the JAK/STAT signaling // J. Cell Physiol. 2010. V. 223. № 2. P. 500–510.
- Spradling A. et al. Germline stem cells // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. P. a002642.
- Stine R.R., Matunis E.L. JAK-STAT signaling in stem cells // Adv. Exp. Med. Biol. 2013. V. 786. P. 247–267.
- Stine R.R. et al. Coordinate regulation of stem cell competition by Slit-Robo and JAK-STAT signaling in the *Drosophila* testis // PLoS Genet. 2014. V. 10. № 11. P. e1004713.
- Suárez-Quian C.A., Niklinski W. Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor receptor in mouse testis // Biol. Reprod. 1990. V. 43. № 6. P. 1087–1097
- Sun S., Zhao S., Wang Z. Genes of Hippo signaling network act unconventionally in the control of germline proliferation in *Drosophila* // Dev. Dyn. 2008. V. 237. P. 270–275.
- Tang Y. et al. Germline proliferation is regulated by somatic endocytic genes via JNK and BMP signaling in *Drosophila* // Genetics. 2017. V. 206. № 1. P. 189–197.
- Temme C., Simonelig M., Wahle E. Deadenylation of mRNA by the CCR4-NOT complex in *Drosophila*: molecular and developmental aspects // Front. Genet. 2014. V. 5. P. 143.
- *Timmons A.K. et al.* Phagocytosis genes nonautonomously promote developmental cell death in the *Drosophila* ovary // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016. V. 113. P. 1246–1255.
- *Tran J., Brenner T.J., DiNardo S.* Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis // Nature. 2000. V. 407. P. 754–757.
- Tulina N., Matunis E. Control of stem cell self-renewal in Drosophila spermatogenesis by JAK-STAT signaling // Science. 2001. V. 294. № 5551. P. 2546–2549.
- *Valli H. et al.* Germline stem cells: Toward the regeneration of spermatogenesis // Fertil. Steril. 2014. V. 101. P. 3–13.
- Voog J., D'Alterio C., Jones D.L. Multipotent somatic stem cells contribute to the stem cell niche in the Drosophila testis // Nature. 2008. V. 454. P. 1132–1136.
- Voog J. et al. Escargot restricts niche cell to stem cell conversion in the *Drosophila* testis // Cell Rep. 2014. V. 7. № 3. P. 722–734.
- Vorontsova Y.E. et al. Drosophila as a model system used for searching the genes, signaling pathways, and mechanisms controlling cytoskeleton formation // Russ. J. Dev. Biol. 2019. V. 50. P. 1–8.
- Wang Z., Lin H. The division of *Drosophila* germline stem cells and their precursors requires a specific cyclin // Curr. Biol. 2005. V. 15. P. 328–333.
- Wieschaus E., Szabad J. The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: a cell lineage study // Dev. Biol. 1979. V. 68. P. 29–46.

- Wen P., Quan Z., Xi R. The biological function of the WD40 repeat-containing protein p55/Caf1 in *Drosophila* // Dev. Dyn. 2012. V. 241. P. 455–464.
- Whitworth C., Jimenez E., Van Doren M. Development of sexual dimorphism in the *Drosophila* testis // Spermatogenesis. 2012. V. 2. № 3. P. 129–136.
- Wu S. et al. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway // Dev. Cell. 2008. V. 14. P. 388–398.
- Xie T., Spradling A.C. decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary // Cell. 1998. V. 94. № 2. P. 251–260.
- Xie T., Spradling A.C. A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary // Science. 2000. V. 290. P. 328-330.

- Xu T., Rubin G.M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues // Development. 1993. V. 117. P. 1223–1237.
- Yu J. et al. Protein synthesis and degradation are essential to regulate germline stem cell homeostasis in *Drosophila* testes // Development. 2016. V. 143. № 16. P. 2930—2945.
- Zhang Z. et al. Dual roles of Hh signaling in the regulation of somatic stem cell self-renewal and germline stem cell maintenance in *Drosophila* testis // Cell Res. 2013. V. 23. № 4. P. 573–576.
- Zoller R., Schulz C. The Drosophila cyst stem cell lineage: Partners behind the scenes? // Spermatogenesis. 2012. V. 2. № 3. P. 145–157.

### Somatic Cyst Cells as a Microenvironment for the Maintenance and Differentiation of Germline Cells in *Drosophila* Spermatogenesis

S. S. Bazylev<sup>1</sup>, V. E. Adashev<sup>1</sup>, A. S. Shatskikh<sup>1</sup>, L. V. Olenina<sup>1</sup>, and A. A. Kotov<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics, National Research Centre "Kurchatov Institute", 2 Kurchatov Sq., Moscow, 123182 Russia \*e-mail: kotov alexei@mail.ru

The functions of somatic niche cells in multicellular organisms are essential for the maintenance of germline stem cells and gamete formation, and ultimately for survival of the species. In the testes of *Drosophila*, two populations of somatic cells function as a microenvironment for germline cells. The group of terminally differentiated cells at the apical end of the testis, the hub, supports a direct contact with germline stem cells, regulating their self-renewal and proliferation by secretion of signaling molecules. Another population of somatic testis cells, cyst cells, plays an important role both in the maintenance of germiline stem cells and in the processes of directed differentiation of their offspring, modulating external signals, and creating a microenvironment for differentiated germ cells throughout the cycle of spermatogenesis. This review is focused on the analysis of modern data on molecular and cellular mechanisms and protein complexes necessary in somatic cyst cells for the non-autonomous regulation of germline cells.

Keywords: spermatogenesis, niche, cyst cells, germline stem cells, signaling pathways, Drosophila

#### ——— БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ ——

УЛК 591

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *NOGGIN* НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ГОЛОВНЫХ СТРУКТУР ЕВРОПЕЙСКОЙ РЕЧНОЙ МИНОГИ *LAMPETRA FLUVIATILIS*

© 2021 г. Г. В. Ермакова", А. В. Кучерявый, А. Г. Зарайский", А. В. Байрамов", \*

<sup>а</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997 Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.М. Северцова РАН, Ленинский проспект, 33, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: andrbayr@gmail.com
Поступила в редакцию 21.07.2020 г.
После доработки 27.08.2020 г.
Принята к публикации 04.09.2020 г.

В контексте изучения механизмов раннего развития нервной системы позвоночных, бесчелюстные (круглоротые) являются уникальной группой животных. Поскольку ветви бесчелюстных и челюстноротых разделились на самых ранних этапах эволюции позвоночных, у генов миног, как представителей бесчелюстных, с большой вероятностью, могли сохраниться древние экспрессионные паттерны, характерные для предков позвоночных. Предыдущие исследования генов семейства Noggin челюстноротых показали, что все три гена Noggin позвоночных (Noggin 1, Noggin 2 and Noggin 4) отличаются по паттерну экспрессии и функциональным свойствам. Было показано участие генов Noggin в широком спектре онтогенетических процессов, в том числе раннем развитии переднеголовных структур и отделов головного мозга позвоночных. В этой статье мы анализируем паттерны экспрессии четырех генов Noggin в головных структурах личинок европейской речной миноги Lampetra fluviatilis на ранних стадиях развития. Проведенный анализ обнаруживает много общих черт в паттернах экспрессии генов Noggin миног с их гомологами у челюстноротых. Ген Noggin В, демонстрируя высокий уровень экспрессии в конечном отделе мозга (теленцефалоне), может примененяться в качестве специфического маркера этого уникального отдела мозга позвоночных, впервые появляющегося в эволюции именно у бесчелюстных.

*Ключевые слова: Noggin*, конечный мозг, теленцефалон, бесчерепные, круглоротые, миноги, позвоночные, развитие конечного мозга

**DOI:** 10.31857/S0475145021010031

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Миноги, как представители бесчелюстных, являются очень привлекательной моделью для исследований эволюционных аспектов биологии развития в силу того, что разделение ветвей бесчелюстных и челюстноротых произошло на самых ранних стадиях эволюции позвоночных. На основании этого, можно предположить, что гены миног могли сохранить типы паттернов экспрессии, характерные для предковых позвоночных. Исследуя особенности экспрессии ранних регуляторных генов миног, как представителей круглоротых и их пространственную связь с какого-либо морфологического развитием признака, характерного для всех позвоночных, можно попытаться оценить, был ли этот ген изначально связан с появлением определенного признака в эволюции у предков современных позвоночных, или же экспрессия этого гена характерна только для челюстноротых. Такой подход может позволить выявить гены, участвовавшие в формировании признаков и структур у предковых позвоночных, а также выявить механизмы, обеспечившие появление того или иного признака в эволюции позвоночных.

Одним из важнейших эволюционных достижений позвоночных стало появление конечного мозга (теленцефалона), обеспечивающего высшие формы нервной деятельности у животных и человека. Вопрос наличия гомологов конечного мозга у ближайших родственников позвоночных — представителей бесчерепных и оболочников обсуждается, однако доминирующей на сегодняшний день является точка зрения, согласно которой, у современных бесчерепных (и, вполне возможно, у предковых форм хордовых) в качестве переднего отдела ЦНС выступает гомолог промежуточного

отдела мозга позвоночных, а конечный отдел мозга появляется в эволюции позже, только у позвоночных (Albuixech-Crespo et al., 2017). В то же время, есть свидетельства, что после метаморфоза в мозговом пузыре взрослого ланцетника был обнаружен домен, близкий по своей геноархитектуре нейроэпителию развивающихся коры и подкорковой области позвоночных (Benito Gutierrez et al., 2018). Что касается оболочников, то в сенсорном пузыре личинки асцидии была обнаружена экспрессия гена *Hroth* - единственного гомолога гена *Otx* позвоночных. Характер экспрессии обнаруженного гена HrPax2/5/8 отличался от гомологичных ему генов Pax2, Pax5 и Рах8 позвоночных. Были также обнаружены три *Нох* гена, гомологичные генам *Hoxb1*, *Hox3*, *Hox5* (Wada et al., 1998).

Полученные данные показывают, что сегментация нервной системы на основные отделы — передний (прозенцефалон + средний мозг), средний (продолговатый мозг) и задний (спинной мозг) отделы наблюдаются у всех хордовых что, по всей видимости, является отражением появления такой дифференцировки еще до эволюционного разделения бесчерепных, оболочников и позвоночных. Однозначных свидетельств наличия у беспозвоночных хордовых гомологов конечного мозга пока не выявлено, что позволяет считать этот отдел мозга уникальной структурой позвоночных.

В связи с этим, большое внимание исследователей привлекает строение головного мозга миног, и особенно конечного мозга, который морфологически впервые в эволюции появляется именно у этой группы животных.

На макроуровне, в плане сегментации на основные отделы, головной мозг миног имеет много общих черт с мозгом костистых рыб, за исключением ряда особенностей, таких как хорошо развитый эпифиз, расположенный сзади назального отверстия, и очень слабо развитый мозжечок (Sugahara et al., 2017). При исследовании геноархитектуры конечного мозга миног, в его дорсальной части была обнаружена экспрессия генов Pax6 (Murakami et al., 2001) и Emx (Tank et al., 2009), а в вентральной — генов Dlx (Miojin et al., 2001; Murakami et al., 2001; Neidert et al., 2002). Обнаружение зон экспрессии *Pax6* и *Dlx* и стало на ранних этапах исследований основным свидетельством наличия у миног структур, гомологичных конечному мозгу челюстноротых.

Поиск консервативных для позвоночных переднеголовных генов у миног, в сочетании с исследованиями на миксинах, привели к тому, что в последние годы у миног был обнаружен ряд новых для них генов, что внесло коррективы в сложившуюся ранее картину геноархитектуры передних отделов мозга. Были найдены два ортоло-

га гена Nkx2.1 — гены Nkx2.1/2.4B и Nkx2.1/2.4C, экспрессия которых наблюдается в вентральной зоне подкорковой области конечного мозга (Sugahara et al., 2016). Также у миног были обнаружены три ортолога гена Рах б. Все они экспрессируются в формирующихся глазных структурах и мозге, что соответствует экспрессии гена Рахб у челюстноротых, у которых этот ген является ключевым регулятором развития глаз и ЦНС (Osumi et al., 2008; Klimova and Kozmik, 2014). При этом паттерн экспрессии генов Рах 6 миног в других структурах различается. Экспрессия *Pax6a* обнаруживается в печени, указывая на то, что у предков позвоночных ген Рах6, по всей видимости, участвовал в формировании этого органа (Ravi et al., 2019).

Экспрессия раннего регулятора развития мозга — гена *Otx* у миног, начинается на самых ранних этапах онтогенеза, в районе спинной губы бластопора, а у личинки наблюдается в области переднего и среднего отделов мозга, до границы между средним и задним мозгом (Tomsa and Langeland, 1999; Suda et al., 2009).

Ингибитором экспрессии гена *Otx* у позвоночных и одним из ключевых регулятоорв ранней дифференцировки переднего мозга позвоночных являются гомеобоксные гены класса Anf/Hesx1 (далее Anf), обнаруженные в том числе у миног (Bayramov et al., 2016, Байрамов и др., 2017). Проведенные функциональные исследования гена  $Lanf(\underline{L}amprey \underline{Anf})$  показали, что этот ген миног по своим свойствам сходен с генами Anf челюстноротых, обладает ингибиторной активностью, подавляя экспрессию гена Otx и усиливая экспрессию ключевого регулятора развития конечного мозга — гена FoxG1. Это указывает на то, что появление генов класса Anf было существенным, если не ключевым, фактором в возникновении у позвоночных структур конечного мозга (Ваугаточ et al., 2016).

Белок, кодируемый геном FoxG1, относится к семейству Forkhead-связывающих транскрипционных факторов и играет ключевую роль в индукции и пространственной организации развития конечного мозга у позвоночных. Экспрессия FoxG1 в переднем отделе мозга достаточно консервативна у разных групп позвоночных и, поэтому этот ген часто применяется в качестве маркера данного отдела мозга (Kumamoto and Hanashima, 2017). У всех исследованных позвоночных *FoxG1* (ранее также известный как BF-1), является одним из первых транскрипционных факторов, экспрессирующихся в передней части нервной пластинки – области будущего конечного мозга и в дальнейшем его экспрессия сохраняется до зрелых стадий (Danesin and Houart, 2012). Было показано, что ген FoxG1 имеет важное значение для многих аспектов развития конечного мозга и выживания нейронов в коре головного мозга у взрослых организмов. Блокирование трансляции *FoxG1* у рыб и мышей приводит к редукции вентральной области конечного мозга, что отражается в вентральной экспансии маркеров дорсальной части конечного мозга (Martynoga et al., 2005; Danesin et al., 2009). У человека мутации гена *FOXG1* приводят к нарушениям развития, таким как синдром Ретта, эпилепсия, постнатальная микроцефалия, тяжелая умственная отсталость, нарушения речи, дискинезия и гипогенез мозолистого тела (Kortum et al., 2011; Danesin, Houart, 2012).

Пространственный паттерн экспрессии *FoxG1* у миног в целом соответствует паттернам экспрессии FoxG1 у других позвоночных, в том числе у шпорцевой лягушки (Ermakova et al., 2019). В тоже время имеется и ряд отличий. Так, экспрессия *FoxG1* у миноги впервые в развитии детектируется в формирующихся ушных плакодах и вентаральной части теленцефалона. При этом у миноги *FoxG1* совсем не экспрессируется в дорсальной части теленцефалона, тогда как у других позвоночных экспрессия этого гена в теленцефалоне носит градиентный характер, с возрастаниеми интенсивности от дорсальной части к вентральной (Danesin and Houart, 2012). Также у миноги в отличие от других позвоночных экспрессия *FoxG1* не обнаруживается в формирующихся глазных структурах, что может объясняться особенностью развития этих структур у миног. В отличие от челюстноротых у миног наблюдается двухступенчатое развитие глаза и зрительного нерва. На эмбриональной стадии глаз покрыт толстой непрозрачной кожей, хрусталик незрелый что, возможно, указывает на примитивное состояние зрительной системы позвоночных (Melendez-Ferro et al., 2002; Suzuki et al., 2015). В этот период образуется небольшое количество волокон зрительного нерва. Позже в онтогенезе формируются новые оптические волокна, и после метаморфоза у взрослых миног развиваются полноценные глазные камеры.

Важными регуляторами раннего развития структур переднего мозга позвоночных являются гены семейства Noggin. Noggin стал первым известным фактором, в норме секретирующимся в области Шпеманновского организатора, для которого была показана способность вызывать формирование дополнительных осей тела в случаях его экспериментальной эктопической экспрессии на вентральной стороне зародыша амфибий (Dale, Slack, 1987; Smith, Harland, 1992; Lamb et al., 1993; Smith et al., 1993; Slack, Tannahill, 1993). Впоследствии были описаны два гомолога гена Noggin - Noggin2 и Noggin4 (Fletcher et al., 2004; Eroshkin et al., 2006). Долгое время считалось, что основной (по сути – единственной описанной) функцией Noggin1 в развитии позвоноч-

ных является подавление сигнального каскада BMP (bone morphogenetic proteins) — группы ростовых факторов из суперсемейства TGF-beta. Модуляция активности ВМР каскада является необходимым условием для формирования нервной ткани и дифференцировки дорсальной мезодермы (Xanthos et al., 2002; Moreau and Leclerc, 2004). При исследовании гена Noggin 2 было показано, что он обладает способностью подавлять не только BMP, но также и Nodal/Activin и Wnt/beta-cathenin сигнальные каскады, играющих ключевые роли в клеточной дифференцировке и развитии головных структур позвоночных. Оверэкспрессия мРНК Noggin 2 в зародышах X. laevis приводит к формированию дополнительного комплекса осевых структур в которых наблюдается экспрессия переднеголовных генов (Bayramov et al., 2011).

В настоящей работе мы описываем особенности пространственной экспрессии генов семейства *Noggin* на ранних стадиях развития головных структур у личинок европейской речной миноги *L. fluviatilis*. У миног было обнаружено четыре гена семейства *Noggin* — *NogginA*, *NogginB*, *NogginC* и *NogginD*. Проведенный нами ранее анализ аминокислотных последовательностей выявил гомологию этих белков Noggin миног с тремя белками семейства Noggin (Noggin1, Noggin2, Noggin4) челюстноротых.

Анализ паттернов экспрессии генов *Noggin* миног с одной стороны обнаружил существенные различия в экспрессии четырех генов между собой, а с другой стороны — выявил ряд общих черт с экспрессией ортологов этих генов у челюстноротых.

Интенсивная экспрессия гена *NogginB* в конечном отделе мозга делает возможным использование этого гена в качестве специфического маркера этого отдела головного мозга миног. Исследование механизмов развития теленцефалона у миног вызывает большой интерес, поскольку как раз у них этот отдел переднего появляется впервые в эволюции.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Животные

Взрослые половозрелые особи *L. fluviatilis* были выловлены в Ленинградской области. Зародыши получались путем искусственного оплодотворения в лабораторных условиях. Икра половозрелых самок сдаивалась в контейнер и активировалась в растворе 0.1× MMR (температура 12°С) в течение 3 мин при постоянном помешивании. После активации в раствор добавлялась сперма половозрелого самца, икра инкубировалась 10 мин при постоянном помешивании. После оплодотворения икра дважды промывалась рас-

твором 0.1× ММR. Инкубация осуществлялась в чашках Петри (9 см) на 12°С. Стадии определялись согласно Tahara (Tahara, 1988). Для гибридизации *in situ* зародыши фиксировались в растворе МЕМFA.

#### Гибридизация in situ

Фрагменты генов *NogginA*, *NogginB*, *NogginC* и *NogginD* для гибридизации *in situ* были получены методом ОТ-ПЦР с использованием следующих пар праймеров:

```
Lf NgA full Frw1: ATTGGATCCGGTGCCCGCGGCTCCATGAA;
Lf NgA full Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGAACTGTGGTCGTGTGGA;
Lf NgA full Rev1: AATCTCGAGTACAGGGCTGGTCTCAG;
Lf NgA full Rev2: AATCTCGAGTCAGCAGCGCAGCGCA;
Lf NgB full Frw1: ATTGGATCCCGCGCCGAGACCATCAT;
Lf NgB full Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGCCGGGGTCCCTGCG;
Lf NgB full Rev1: AATCTCGAGCCCTCGTCGTCTCAGCAG;
Lf NgB full Rev2: AATCTCGAGTCAGCAGGAGCACCTGCACTCG;
Lf NgC full Frw1: ATTGGATCCCGTATGCCGAACAAATGGAG;
Lf_NgC_full_Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGGAGCAGTCGCAGTGTT;
Lf NgC full Rev1: AATCTCGAGCGGATGTCCCCCCATCAGC;
Lf_NgC_full_Rev2: AATCTCGAGTCAGCACGAGCATTTG;
Lf NgD full Frw1: ATTGAATTCACTTCGACGCAGCCATGGA;
Lf NgD full Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGGATGTGAAGAGC;
Lf NgD full Rev1: AATCTCGAGTTTGCTGCGGGGAGATTCA;
Lf NgD full Rev2: AATCTCGAGTCACTCCCATCCGTGTCC.
```

В первом раунде ПЦР (30 циклов) применялись праймеры Frw1 и Rev1. После этого полученный ПЦР продукт очищался и использовался в качестве матрицы в следующем раунде ПЦР (20 циклов) с праймерами Frw2 и Rev2.

Для ПЦР использовался набор фирмы Evrogen с полимеразой Encyclo. Полученные кДНК фрагменты было и клонированы в вектор pAL2-T (Evrogen) и отсеквенированы.

Гибридизация *in situ* была проведена на целых зародышах согласно протоколу, описанному в Sugahara et al., 2015. Оболочку зародышей удаляли микропинцетами до фиксации. Фиксацию проводили в растворе параформальдегида (МЕМГА) в течение ночи на 4°С. Предгибридизационный и гибридизационный буфер содержали: 50% формамид,  $5 \times SSC$ , 100 мкг/мл гепарин, 100 мкг/мл tRNA, 5 мМ EGTA, 1% chaps, 2% Tween20. После предгибридизации (1 ч 70°C), зародышы инкубировались ночь на 70°C в гибридизационном буфере содержащем 5 мкг/мл Dig-меченой РНК пробы, промывались (дважды в гибридизационном буфере, дважды в двухкратном растворе SSC на 70°C, дважды в 0.2-кратном растворе SSC при комнатной температуре, а также в растворе МАВ) и инкубировались в блокирующем буфере (МАВ + 2% блокирующего реагента (Roch) + 20% телячьей

сыворотки (Sigma)) 2 ч при комнатной температуре. Затем эмбрионы инкубировались с анти Dig-Fab фрагментом, конъюгированным с алкалиновой фосфатазой (фирмы Roche, разведение 1:1500 в блокирующем буфере) в течение ночи на 4°С.

Затем эмбрионы были 8 раз промыты в буфере MABT (MAB + 0.1% Triton X100) и помещены в алкалинфосфатазный буфер на 20 мин при комнатной температуре. Краситель BM purple (Roch) был использован для проявки.

30 мкм срезы гибридизованных эмбрионов выполнялись на вибратоме Microm HM 650 (зародыши помещались в 4% агарозные блоки).

Фотографирование производилось на стереомикорскопе Leica M205.

Анализ паттернов экспрессии на каждой стадии проводился не менее чем на 10 зародышах. В статье приведены паттерны, вопроизводившиеся не менее чем в 90% случаев.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственные паттерны экспрессии генов *Noggin* были проанализированы методом гибридизации *in situ* на целых зародышах речной миноги *L. fluviatilis* и срезах. В этих экспериментах мы анализировали экспрессию генов *Noggin* 

речной миноги на серии стадий, начиная со стадии 11 (стадия поздней бластулы по Tahara, 1988) и до стадии предличинки (стадия 29). В качестве зондов применялись dig-меченые антисмысловые полноразмерные мРНК генов *Noggin*. В качестве контроля использовали dig-меченые полноразмерные смысловые мРНК генов *Noggin*. Проведенный анализ дал следующие результаты.

Ни у одного из четырех проанализированных генов *Noggin* речной миноги не было обнаружено экспрессии на стадиях бластулы и гаструлы методом гибридизации *in situ*.

Экспрессия гена *NogginA* впервые обнаруживается в хордомезодерме начиная со на стадии ранней нейрулы (ст. 17). В дорзальной области зачатка будущего головного экспрессия впервые наблюдается на стадии поздней нейрулы (ст. 20).

На стадии головного выроста (ст. 22) отчетливо видна экспрессия в области промежуточного, среднего и заднего мозга.

На стадиях 23—24 в головном мозге экспрессия обнаруживается на границе конечного и промежуточного отделов — в области zona limitans intrathalamica (ZLI) и на границе промежуточного и среднего мозга и в заднем мозге по границам некоторых ромбомеров. Во всех этих районах экспрессия обнаруживается в клетках дорсальной и вентральной частей нервной трубки. На стадии 27 появляется экспрессия в формирующихся глазах. Кроме головных структур, экспрессия гена NogginA выявляется в сомитах и хорде.

Экспрессия гена *NogginB* впервые появляется на стадии ранней нейрулы в головном отделе нервной трубки. Предположительно, это могут быть клетки нервного гребня или клетки презумптивного головного мозга. В ходе нейруляции экспрессия *NogginB* усиливается в области всего презумптивного переднего и заднего мозга и в отдельных дорсальных клетках нервной трубки — в премиграторных клетках нервного гребня. К завершению нейруляции паттерн меняется — экспрессия в области переднего мозга усиливается, а экспрессия в дорсальной части заднего мозга ослабевает.

На стадии головного выроста (ст. 21) *NogginB* экспрессируется в области презумптивного переднего мозга и в дальнейшем, на стадиях 22—29 высокий уровень экспрессии сохраняется в дорсальной и вентральной части переднего мозга и в небольшой области вентрального гипоталамуса.

Обобщая, можно сказать, что NogginB экспрессируется в эволюционно молодых структурах — клетках нервного гребня и переднего мозга, которые появились впервые у позвоночных животных. Сравнение паттерна экспрессии гена NogginB с паттерном другого регуляторно гена переднего мозга, гена FoxGI, показывает, что в отличие от FoxGI, который экспрессируется в вентраль-

ной области теленцефалона, *NogginB* экспрессируется на высоком уровне во всем теленцефалоне, частично распространяясь на на вентральную область промежуточноого отдела мозга (рис. 1г).

Экспрессия *NogginC* наблюдается на стадии поздней нейрулы (ст. 20) в области ушных плакод и в клетках нервного гребня. На более поздних стадиях окрашивается нервная трубка и мезодерма сомитов и верхней и нижней губы.

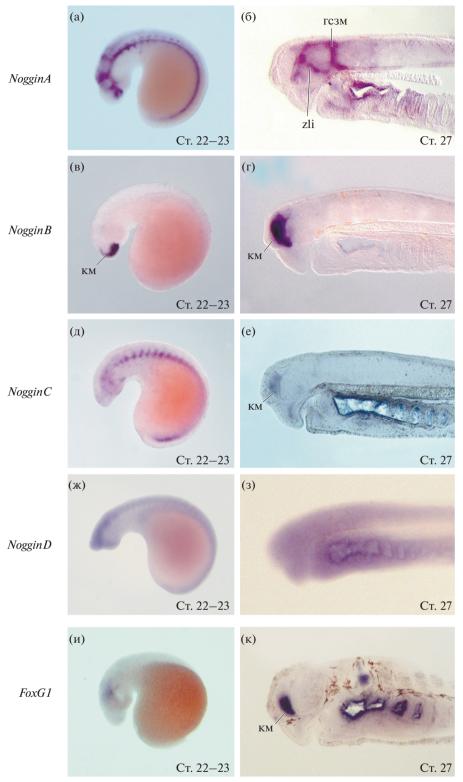
На стадии 24—25 появляется экспрессия *NogginC* в вентральной области конечного мозга и эпифизе. Также наблюдается слабое окрашивание в промежуточном отделе мозга в области ZLI и на границе среднего и заднего мозга. Экспрессия наблюдается также в конечном отделе мозга и здесь она более выражена в вентральной его части. Выявляется окраска в формирующихся ушах, но эндолимфатический проток не окрашивается.

Можно отметить, что, по своему характеру, паттерн экспрессии NogginC частично совмещает паттерны экспрессии генов NogginA (экспрессия в клетках нервного гребня, ZLI, на границе среднего и заднего мозга и в мезодерма) и NogginB (экспрессия в конечном мозге и клетках нервного гребня).

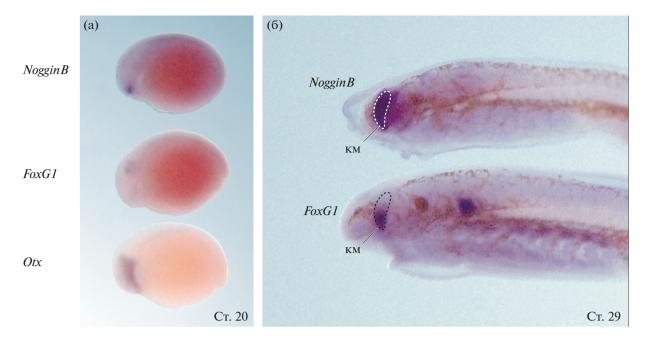
Экспрессия *NogginD*, как и у других генов *Noggin* речной миноги, обнаруживается начиная со стадии ранней нейрулы (ст. 17), однако имеет диффузный характер, равномерно окрашивая нервную пластинку. На следующих стадиях развития, вплоть до предличиночной стадии (ст. 29) мы наблюдали лишь слабое диффузное окрашивание во всей нервной системе. Такой паттерн очень похож на паттерн экспрессии гена *Noggin4* у челюстноротых.

Предыдущие исследования генов семейства Noggin челюстноротых показали, что все три гена Noggin позвоночных (Noggin1, Noggin2 и Noggin4) отличаются по паттерну экспрессии и функциональным свойствам. Было показано, что белки Noggin1 и Noggin2 обладают способостью ингибировать активность трех сигнальных каскадов BMP, Nodal/Activin, Wnt, что само по себе является важным условием формирования переднеголовных структур (Watanabe et al., 2005). Это подтверждается способностью мРНК Noggin1 и Noggin2 индуцировать формирование дополнительных осей тела, содержащих переднеголовные структуры при эктопической экспрессии в экспериментах с зародышами шпорцевой лягушки (Eroshkin et al., 2006, 2016; Bayramov et al., 2011).

Исследуя экспрессию гена *Noggin* у шпорцевой лягушки, Smith и Harland показали, что мРНК этого гена сначала локализуется в области дорсальной губы бластопора, т.е. в области Шпеманновского организатора, а затем в хорде (Smith, Harland, 1992).



**Рис. 1.** Паттерны экспрессии генов *NogginA*, *NogginB*, *NogginD* и *FoxG1* в раннем развитии европейской речной миноги, показаные методом гибридизации *in situ*. (а) На стадии головного выроста (ст. 22—23 по Tahara, 1988) ген *NogginA* экспрессируется в головных структурах и мезодермальных производных. (б) На стадии предличинки (ст. 27 по Tahara, 1988) ген *NogginA* экспрессируется в ZLI, на границе промежуточного и среднего мозга и в заднем мозге по границам некоторых ромбомеров. (в, г) Ген *NogginB* экспрессируется в области конечного мозга. (д) Ген *NogginC* экспрессируется в головных структурах и мезодермальных производных. (е) На стадии предличинки наблюдается экспрессия *NogginC* в области конечного мозга. (ж, з) Паттерн экспрессии гена *NogginD* носит диффузный характер. (и, к) На стадии головного выроста экспрессия гена FoxG1 наблюдается в ушной плакоде, а экспрессия в области вентрального конечного мозга начинается позже. гсзм — граница среднего и заднего мозга, км — конечный мозг, zli — *zona limitans intrathalamica*.



**Рис. 2.** Сравнение паттернов экспрессии гена NogginB с другими переднеголовными генами — FoxG1 и Otx. Граница конечного мозга на стадии предличинки обозначена пунктиром.

Ген *Noggin2* начинает экспрессироваться у шпорцевой лягушки на стадии нейрулы в области переднего нервного валика, а на более поздних стадиях обнаруживается в дорсальной области формирующегося переднего мозга, и, на более низком уровне — в районе заднего мозга, спинных участках сомитов и в формирующемся сердце (Eroshkin et al., 2006).

Ген Noggin4, не обладая способностью выступать в качестве антагониста ВМР сигнального каскада, обнаружил способность специфически связывать фактор Wnt8 и ингибировать канонический Wnt/бета-катенин — сигнальный каскад (Eroshkin et al., 2016). Было показано, что экспрессия гена Noggin4 у разных представителей позвоночных консервативна и в значительной степени комплементарна области экспрессии гена Noggin 1. Так, у шпорцевой лягушки экспрессия Noggin4 впервые обнаруживается на стадии гаструлы в эпидермальном слое анимального полушария и носит диффузный характер (Eroshkin et al., 2006). На стадии нейрулы экспрессия гена Noggin4 наблюдается в передней части нервной пластинки и области будущего нервного гребня. На более поздних стадиях ген Noggin4 экспрессируется в головном эпидермисе, нервной трубке, включая передний мозг, слуховых пузырьках, присоске и производных нервного гребня, включая жаберные дуги (Eroshkin et al., 2006). Экспрессия гена Noggin4 у куриного эмбриона начинается на стадии гаструлы (стадия 4+ (Chapman et al., 2002)) сначала в презумптивной, а затем и в дефинитивной нейроэктодерме, носит диффузный характер и проявляет тенденцию к широкому распространению на производные эктодермы и, частично, на некоторые структуры мезодермальной природы (сомиты) по мере развития зародыша (Borodulin et al., 2012).

На основе представленного анализа паттернов экспрессии генов семейства *Noggin*, можно заключить, что среди генов *Noggin* миног обнаруживаются гомологи всех трех ранее описанных генов *Noggin* позвоночных.

Гены NogginA по характеру экспрессии имеет много общих черт с геном Noggin1 челюстноротых.

Ген NogginB, экспрессирующийся в конечном и промежуточном отделах мозга очень похож на по своему паттерну на ген Noggin2 челюстноротых.

Паттерн экспрессии NogginC, в свою очередь, частично совмещает паттерны экспрессии генов NogginA и NogginB.

Экспрессия NogginD, подобно Noggin4, имеет диффузный характер и наблюдается начиная со стадии нейрулы в нервной пластинке, а позже — всей нервной системе.

В целом, можно отметить, что все четыре гена *Noggin* миног обладают уникальными особенностями паттерна экспрессии в головных структурах. В то же время, сравнивая их экспрессию с экспрессией генов *Noggin* шпорцевой лягушки (Eroshkin et al., 2006) можно отметить, что паттерны экспрессии генов *Noggin* у миног имеют много общих черт, с паттернами экспрессии их гомологов у других позвоночных.

Если сопоставить экспрессию гена *NogginB* с экспрессией другого переднеголовного гена миног — FoxG1, можно отметить, что экспрессия *NogginB* в области конечного мозга обнаруживается раньше, уже на стадии поздней нейрулы (ст. 20) и стадии раннего головного выроста (ст. 21), в то время как экспрессия FoxG1 на аналогичных стадиях наблюдается только в ушной и тройничной плакодах (рис. 2). Экспрессия *FoxG1* в конечном мозге начинается на стадии 23-24 (Ermakova et al... 2019). На более поздних стадиях, вплоть до стадии предличинки, NogginB экспрессируется во всем конечном мозге, в то время как FoxG1, только в его вентральной части (рис. 26). С технической точки зрения существенно, что NogginB экспрессируется в конечном мозге с высокой интенсивностью и специфичностью (практически нет фонового окрашивания в других областях зародыша). Это позволяет рассматривать NogginB в качестве перспективного маркерного гена при дальнейших исследованиях развития переднеголовных структур у миног.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой статье мы описываем особенности экспрессии четырех генов семейства *Noggin* на ранних стадиях развития переднеголовных структур у миног — одних из самых древних ныне живущих позвоночных.

Сравнивая наблюдаемую экспрессию генов *Noggin* речной миноги с экспрессией генов *Noggin* шпорцевой лягушки можно отметить, что паттерны экспрессии генов *Noggin* у миног и челюстноротых имеют много общих черт. Экспрессия трех генов *Noggin* миног обнаруживается в структурах и организационных центрах головного мозга на ранних этапах его формирования. Ген *NogginB*, демонстрируя высокий уровень экспрессии в конечном отделе мозга (теленцефалоне) начиная со стадии ранней нейрулы и до личиночной стадии, может примененяться в качестве специфического маркера этого уникального отдела мозга позвоночных, впервые появляющегося в эволюции именно у миног.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет гранта РФФИ (проект № 18-04-00015).

Получение серий образцов кДНК ранних стадий развития речной миноги выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 18-29-07014 МК). Синтез dig-меченых зондов для генов *Noggin* речной миноги выполнен за счет гранта РФФИ (проект № 20-04-00675A). Сравнительный анализ паттернов экспрессии генов *NogginB*, FoxG1 и Otx, представленный на рис. 2, выполнен за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00098).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними, принятые в ИБХ РАН, ASPA'1986 и Хельсинской декларацией, были соблюдены.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

- Г.В. Ермакова инкубация зародышей L. fluviatilis, синтез dig-меченых зондов и проведение гибридизации *in situ*, фотографирование, подготовка рисунков.
- А.В. Кучерявый получение половозрелых производителей и живых зародышей L. fluviatilis.
- А.Г. Зарайский планирование экспериментов, написание статьи
- А.В. Байрамов планирование экспериментов, получение полноразмерных кДНК генов *Noggin L. fluviatilis*, подготовка и написание статьи, подготовка рисунков.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Ерошкин Ф.М. и др. Гомеобоксный ген семейства Anf, обнаруженный у тихоокеанской миноги Lethenteron camtschaticum, подтверждает гипотезу о важности появления генов Anf для возникновения конечного мозга в эволюции позвоночных // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 4. С. 241—251
- Albuixech-Crespo B., Herrera-Úbeda C., Marfany G. et al., Origin and evolution of the chordate central nervous system: insights from amphioxus genoarchitecture // Int. J. Dev. Biol. 2017. V. 61. P. 655–664.
- Bayramov A.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M. et al. The presence of the Anf/Hesx1 homeobox in lampreys indicates that it may play important role in telencephalon emergence // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 39849.
- Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Martynova N.Y. et al. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling // Development. 2011. V. 138. P. 5345–5356.
- Benito Gutierrez E., Stemmer M., Rohr S.D. et al. Patterning of a elencephalon-like region in the adult brain of amphioxus // bioRxiv. 2018. V. 307629.
- Borodulin A.V., Eroshkin F.M., Bayramov A.V. et al. Noggin4 expression during chick embryonic development // The International J. Developmental Biology. 2013. V. 56. P. 403–406.
- Chapman S.C., Schubert F.R., Schoenwolf G.C. et al. Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos // Dev. Biol. 2002. V. 1. 245(1). P. 187–199.
- Dale L., Slack J.M.W. Regional specification within the mesoderm of early embryos of Xenopus laevis // Development. 1987. V. 100. P. 279–295.

- Danesin C., Houart C. A Fox stops the Wnt: implications for forebrain development and diseases // Curr. Opin. Genet. Dev. 2012. V. 22. № 4. P. 323–330.
- Danesin C., Peres J.N., Johansson M. et al. Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1 // Dev. Cell. 2009. V. 16. № 4. P. 576–587.
- Ermakova G.V., Kucheryavyy A.V., Zaraisky A.G., Bayramov A.V. The expression of FoxG1 in the early development of the European river lamprey Lampetra fluviatilis demonstrates significant heterochrony with that in other vertebrates // Gene Expr. Patterns. 2019. Sep 28; 34:119073.
  - https://doi.org/10.1016/j.gep.2019.119073
- Eroshkin F.M., Ermakova G.V., Bayramov A.V. et al. Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of noggin2 and noggin4 in *Xenopus* laevis // Gene Expr Patterns. 2006. V. 6. P. 180–186.
- Eroshkin F.M., Nesterenko A.M., Borodulin A.V. et al. Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus* laevis // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 23049.
- Fletcher R.B., Watson A.L., Harland R.M. Expression of Xenopus tropicalis noggin1 and noggin2 in early development: two noggin genes in a tetrapod // Gene Expr. Patterns, 2004. V. 5. P. 225–230.
- Klimova L., Kozmik Z. Stage-dependent requirement of neuroretinal Pax6 for lens and retina development // Development. 2014. V. 141. P. 1292–1302.
- Kortüm F., Das S., Flindt M. et al. The core FOXG1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis // J. Med. Genet. 2011. V. 8. № 6. P. 396–406.
- Kumamoto T., Hanashima C. Evolutionary conservation and conversion of Foxg1 function in brain development // Dev. Growth Differ. 2017. V. 59. № 4. P. 258–269.
- Lamb T.M., Knecht A.K., Smith W.C. et al. Neural induction by secreted polypeptide noggin // Science. 1993. V. 262. P. 713-718.
- Martynoga B., Morrison H., Price D.J. et al. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis // Dev. Biol. 2005. V. 283(1). P. 113–127.
- Meléndez-Ferro M., Villar-Cheda B., Abalo X.M. et al. Early development of the retina and pineal complex in the sea lamprey: comparative immunocytochemical study // J. Comp. Neurol. 2002. V. 442. № 3. P. 250–265.
- Moreau M., Leclerc C. The choice between epidermal and neural fate: a matter of calcium // Int. J. Dev. Biol. 2004. V. 48(2–3). P. 75–84.
- Murakami Y., Ogasawara M., Sugahara F. et al. Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates // Development. 2001. V. 128(18). P. 3521–3531.
- Myojin M., Ueki T., Sugahara F. et al. Isolation of Dlx and Emx gene cognates in an agnathan species, Lampetra japonica, and their expression patterns during embryonic and larval development: conserved and diversified regulatory patterns of homeobox genes in vertebrate head evolution // J. Exp. Zool. 2001. V. 15; 291(1). P. 68–84.

- Neidert A.H., Virupannavar V., Hooker G.W. et al. Lamprey Dlx genes and early vertebrate evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 13; 98(4). P. 1665–1670.
- Osumi N., Shinohara H., Numayama-Tsuruta K. et al. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator // Stem Cells. 2008. V. 26. P. 1663–1672.
- Ravi V., Bhatia S., Shingate P. et al. Lampreys, the jawless vertebrates, contain three Pax6 genes with distinct expression in eye, brain and pancreas // Sci. Rep. 2019. V. 9(1). P. 19559.
- Slack J.M., Tannahill D. Noggin the dorsalizer // Nature. 1993. V. 361. P. 498–499.
- Smith W.C., Knecht A.K., Wu M. et al. Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing Xenopus mesoderm // Nature. 1993. V. 361. P. 547–549.
- Smith W.C., Harland R.M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann orginizer in *Xenopus* embryos // Cell. 1992. V. 70. P. 829–840.
- Suda Y., Kurokawa D., Takeuchi M. et al. Evolution of Otx paralogue usages in early patterning of the vertebrate head // Dev. Biol. 2009. V. 1; 325(1). P. 282–295.
- Sugahara F., Murakami Y., Kuratani S. Gene Expression Analysis of Lamprey Embryo. N.Y.: Springer, 2015.
- Sugahara F., Pascual-Anaya J., Oisi Y. et al. Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain // Nature. 2016. V. 531. P. 97–100.
- Sugahara F., Murakami Y., Pascual-Anaya J. et al. Reconstructing the ancestral vertebrate brain // Dev. Growth Differ. 2017. V. 59(4). P. 163–174.
- Suzuki D.G., Murakami Y., Escriva H. et al. A comparative examination of neural circuit and brain patterning between the lamprey and amphioxus reveals the evolutionary origin of the vertebrate visual center // J. Comp. Neurol. 2015. V. 523. № 2. P. 251–261.
- Tahara Y. Normal stages of development in the lamprey, Lampetra reissneri (Dybowski) // Zoological Science. 1988. V. 5. P. 109–118.
- *Tank E.M., Dekker R.G., Beauchamp K. et al.* Patterns and consequences of vertebrate *Emx* gene duplications // Evol. Dev. 2009. V. 11(4). P. 343–353.
- Tomsa J.M., Langeland J.A. Otx expression during lamprey embryogenesis provides insights into the evolution of the vertebrate head and jaw // Dev. Biol. 1999. V. 1; 207(1). P. 26–37.
- Wada H., Saiga H., Satoh N. et al. Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of the placodes: Insights from ascidian Pax-2/5/8, Hox, and Otx genes // Development. 1998. V. 125. P. 1113–1122.
- Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A. et al. 2005. Direct differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells // Nature Neuroscience. V. 8. P. 288– 296.
- Xanthos J.B., Kofron M., Tao Q. et al. The roles of three signaling pathways in the formation and function of the Spemann Organizer // Development. 2002. V. 129(17). P. 4027–4043.

### Comparative Analysis of Expression Patterns of Genes of the *Noggin* Family at the Early Stages of Development of Head Structures of the European River Lampetra fluviatilis

G. V. Ermakova<sup>1</sup>, A. V. Kuchryavyy<sup>2</sup>, A. G. Zaraisky<sup>1</sup>, and A. V. Bayramov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>2</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect, 33, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: andrbayr@gmail.com

In the context of studying the mechanisms of early development of the nervous system of vertebrates, jawless (cyclostomes) are a unique group of animals. Since the branches of the cyclostomes and gnathostomes were divided at the earliest stages of vertebrate evolution, the genes of lampreys, as representatives of jawless, were likely to retain ancient expression patterns characteristic of the ancestors of vertebrates. Previous studies of genes in the *Noggin* family of gnathostomes have shown that all three vertebrate *Noggin* genes (*Noggin1*, *Noggin2* and *Noggin4*) differ in expression pattern and functional properties. The involvement of the Noggin genes in a wide range of ontogenetic processes, including the early development of the forehead structures and parts of the vertebrate brain, has been shown. In this article, we analyze the expression patterns of four *Noggin* genes in the head structures of the larvae of the European river lamprey *Lampetra fluviatilis* at early stages of development. The performed analysis reveals many common features in the expression patterns of the lamprey *Noggins* with their homologues in gnathostomes. The *NogginB* gene, demonstrating a high level of expression in telencephalon, can be used as a specific marker for this unique region of the vertebrate brain, which first appears in evolution in cyclostomes.

Keywords: Noggin, telencephalon, cranials, cyclostomes, jawless, lampreys, vertebrates, development of the telencephalon

#### **———** МЕТОДЫ И МОДЕЛИ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ **————**

УДК 576.7,611.77,611.78,611.018.7

## КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОЛНОСЛОЙНОГО КОЖНОГО ЛОСКУТА ЧЕЛОВЕКА — МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ И ШИКЛА ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ

© 2021 г. Е. П. Калабушева<sup>a</sup>, \*, А. Л. Риппа $^{a}$ , А. А. Цитрина $^{a}$ , А. Пинто $^{b}$ , А. В. Терских $^{b}$ , Э. С. Чермных $^{a}$ , Е. А. Воротеляк $^{a}$ 

<sup>a</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия <sup>b</sup>Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA 92037 USA

\*e-mail: Kalabusheva.e@gmail.com Поступила в редакцию 01.05.2020 г. После доработки 02.07.2020 г. Принята к публикации 20.07.2020 г.

Ксенотрансплантация кожи человека животным с иммунодефицитом — одна из наиболее успешных моделей для изучения тканей человека в норме и патологии. Основным ограничением данного подхода является размер трансплантата — в эксплантах кожи площадью более  $10 \times 10$  мм отсутствует нижняя часть дермы и подкожная жировая клетчатка, полнослойные ксенотрансплантаты редко превышают размер  $3 \times 3$  мм. В настоящем исследовании показано, что трансплантация полнослойных лоскутов размером  $15 \times 5$  мм обеспечивает успешную интеграцию и сохранение всех структур кожи: эпидермиса, дермы, кровеносных сосудов, волосяных фолликулов, сальных и потовых желез. Волосяные фолликулы в составе трансплантатов воспроизводят цикл физиологической регенерации. Данная модель подходит для изучения регенерации волосяных фолликулов, желез, интерфолликулярного эпидермиса и других структур кожи.

*Ключевые слова:* ксенотрансплантация, эпидермис, дерма, волосяные фолликулы, регенерация **DOI:** 10.31857/S0475145021010043

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Исследование тканей человека, в том числе кожи, в норме и патологии затруднено по многим причинам: ограниченное количество биологического материала не позволяет изучать процессы в динамике, невозможность использовать современные методы *in vivo* затрудняет возможность проводить трейсерный анализ и генетические манипуляции. Ученые разработали множество биологических моделей in vitro, in situ и in vivo (Salgado et al., 2017), расширяющих спектр проводимых научных работ. Эксперименты по ксенотрансплантации кожи человека проводятся с 1970x (Manning et al., 1973; Reed, Manning, 1973). Подобные операции позволили выявить пролиферативный потенциал стволовых клеток эпидермиса (Weinstein et al., 1984; Ghazizadeh, Taichman, 2005), исследовать динамику и механизмы ранозаживления (Démarchez et al., 1987; Shanmugam et al., 2015), подробно изучить цикл волосяного фолликула (Oh et al., 2016), а также моделировать заболевания, такие как псориаз (Nestle et al., 2005; Di Meglio et al., 2016), плоскоклеточная карцинома (Patel et al., 2012), меланома (Berking et al., 2002), разные виды алопеций (Sundberg et al., 1999; Keren et al., 2015; Gilhar et al., 2015), и др. Для каждого из исследований проводили тщательный анализ параметров трансплантата. Кожа человека и кожа мыши значительно отличается по толщине, плотности клеток, механизмам регенерации и т.д. (Rippa et al., 2019), разница в этих характеристиках ограничивает размеры трансплантата. Исследователи были вынуждены конкретизировать ткань или определенный клеточный тип как объект исследования, удаляя из трансплантата остальные структуры. В работах по изучению эпидермиса и пигментных клеток использовали биоптаты кожи площадью от 0.6 до 1 см<sup>2</sup>, не содержащие подкожной жировой клетчатки и ретикулярной дермы (Ghazizadeh, Taichman, 2005; Boyman et al., 2004). В то же время, при изучении волосяных фолликулов площадь трансплантата составляла в среднем менее 0.3 см<sup>2</sup> (Gilhar et al., 2015; Oh et al., 2016). Подобные модели позволяли решать определенный спектр задач. Накопление знаний о физиологии кожи лабораторных животных показало, что изоляция определенных клеточных типов или кожных дериватов приводит к потере значительного пула данных о реципрокном взаимодействии внутри кожи, что крайне важно в контексте изучения механизмов гомеостаза, регенерации и патологических процессов (Ito et al., 2005; Lawlor, Kaur, 2015; Roy et al., 2016; Foster et al., 2018). Разработка модели ксенотрансплантации, соответствующей современным требованиям, является целью данного пилотного исследования. Трансплантат должен обеспечивать микроокружение, состоящее из тканей человека и поддерживающее физиологические параметры цикла волосяных фолликулов.

Кожа человека состоит из трех основных слоев: эпидермиса, дермы и подкожной жировой клетчатки. Помимо этого, в коже располагаются пигментные клетки, меланоциты, иммунные клетки, сеть капилляров и лимфатических сосудов, мышечные и нервные волокна, а также множество кожных дериватов: волосяные фолликулы, сальные и потовые железы. В то время как основным предметом исследования волосяных фолликулов были их циклические изменения при физиологической регенерации, интерфолликулярные участки кожи рассматривали как статичные, равномерно обновляющиеся ткани. С накоплением знаний стало очевидным взаимодействие между фолликулярным и интерфолликулярным компартментами как при поддержании гомеостаза, так и при раневом заживлении. Цикл волосяного фолликула состоит из фазы роста — анагена, деградации – катагена и покоя – телогена. У большинства млекопитающих цикл волосяных фолликулов синхронизирован и ассоциирован с сезонными изменениями шерстяного покрова. В течение цикла эпителиальная часть фолликула редуцируется более чем на 50%, восстанавливаясь в следующую фазу анагена, что обеспечивается эпителиальными стволовыми клетками области балдж (Myung, Ito, 2012). Интерфолликулярный эпидермис также содержит пул эпителиальных стволовых клеток, поддерживающих физиологическую регенерацию (Sada et al., 2016). В 2005 г. при помощи лабораторных мышей, несущих ген В-галактозидазы под промотором кератина 15, специфического для стволовых клеток волосяного фолликула, группа Джорджа Котсареллиса показала, что стволовые клетки волосяных фолликулов участвуют в процессах ранозаживления (Ito et al., 2005). Однако, мигрируя в центр раны они быстро дифференцируются в короткоживущие предшественники и спустя несколько недель элиминируются, не внося существенный вклад в нормальный гомеостаз эпидермиса. Это было одним из первых ключевых фактов, показавших взаимодействие волосяных фолликулов с интерфолликулярными участками. Недавно исследователи выявили, что стволовые эпидермальные клетки, располагающиеся в интерфолликулярном эпидермисе, имеют разную пролиферативную активность в зависимости от удаления от фолликулов. Потомство клеток, прилежащих к

воронке фолликулов, формирует клоны большего размера в отличие от более удаленных. При этом основной пик пролиферации приходится на фазу роста волосяных фолликулов (Roy et al., 2016). Цикл волосяных фолликулов оказывает влияние не только на эпидермис. Кровеносные и лимфатические сосуды дермы меняют свое расположение, плотность и протяженность в зависимости от стадии цикла ближайших фолликулов (Li et al., 2019). Соответствующие гипертрофические и гиперплазические изменения наблюдаются и в жировой ткани (Foster et al., 2018). Все эти данные были получены с использованием модельных организмов — лабораторных мышей, так как для проведения значительной части работы было необходимо внесение генетических модификаций, инъекции флуоресцентных трейсеров, большой объем и стандартизация биологического материала. Проведение подобных исследований, по понятным причинам, на человеке невозможно, а результаты, полученные на мышиных моделях, требуют подтверждения. Модель ксенотрансплантации позволяет решить часть этих проблем. Важным моментом является возможность изучения поведения стволовых клеток волосяных фолликулов и межфолликулярного эпидермиса человека в условиях повреждения и последующей регенерации (Oh et al., 2016). Для проведения подобных исследований на коже человека требуется преодоление ограничений площади и толщины трансплантата, обсужденных выше. Следует отметить, что существенным также является выбор линии иммунодефицитных мышей, свойства которой могут повлиять на интенсивность реакции отторжения и динамику приживления трансплантата (Oh et al., 2016). Мы провели пилотное исследование по трансплантации полнослойных лоскутов кожи человека площадью 15 × 5 мм лабораторным мышам линии NOD/SCID с иммунодефицитом и полагаем, что данная модель может быть использована для проведения подобных работ в области исследований биологии кожи и ее дериватов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Трансплантация

Кожа волосистой части головы была получена после операции по круговой подтяжке лица из МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов. Биоптаты промывали раствором Хэнкса (ПанЭко) с добавлением 3мг/мл гентамицина, после чего при помощи скальпеля и изогнутых ножниц под бинокулярным контролем нарезали до необходимых размеров (рис. 1).

Лабораторные мыши линии NOD/SCID были получены из питомника Charles River, содержались в условиях SPF с соблюдением светового режима. Проведение эксперимента одобрено комиссией по



Рис. 1. Трансплантация юнитов и лоскута кожи человека. Схема операции и внешний вид.

контролю за содержанием и использованием лабораторных животных этического комитета по клиническим исследованиям РНИМУ им. Н.И. Пирогова (номер заявки 09/2019). Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением 2,2,2,-трибромэтанола (Sigma) (250 мг на кг массы тела). Для трансплантации лоскута кожи на спине мыши между лопаток проводили надрез длиной 1.5 см, куда помещали трансплантат, который фиксировали хирургическими швами (шелковая нить Волоть 4-0). Для трансплантации фолликулярных юнитов на спине мыши делали несколько надрезов диаметром 1-2 мм, в которые помещали трансплантат. Края раны фиксировали медицинским клеем БФ-6 (Вертекс) или шовным материалом. Площадь трансплантатов составляла не более 3 мм<sup>2</sup>, поэтому использование шовных техник при фиксации приводило к повреждению эпидермиса, однако позволяло надежно закрепить юниты. При трансплантации лоскута площадь трансплантата позволяла накладывать швы таким образом,

чтобы оставлять обширные участки неповрежденного эпидермиса. После трансплантации, кожу человека накрывали лоскутом кожи мыши, чтобы избежать высушивания (рис. 1). После операции наносили фиксирующий бандаж Тедаderm<sup>TM</sup>. Всего в работе было использовано 3 животных в группе кожного лоскута и 1 животное в группе фолликулярных юнитов. Животных выводили из эксперимента на 32 и 78 сут после операции.

#### Получение криосрезов

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН. Образцы трансплантатов промывали в DPBS (ПанЭко), далее удаляли лишнюю влагу, затем заключали в среду для формирования криоблоков (Tissue-Tek, SAKURA) и замораживали сначала в парах азота, далее окуная в жидкий азот 2—3 раза по 3—5 с. Криоблоки хранили при —70°С. С помощью криостата (Microm HM 525, Thermo Scientific) по-

лучали срезы толщиной 7–9 мкм. Полученные срезы высушивали при комнатной температуре в течение суток. Далее срезы хранили при –70°С или проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование. Предварительно срезы фиксировали в растворе 4% параформальдегида (Sigma) в течение 10 мин, далее промывали 3 раза по 5 мин DPBS и проводили анализ.

#### Гистологическое исследование

Для морфологического анализа срезы окрашивали гематоксилин-эозином (BioVitrum) по стандартному протоколу и заключали в витрогель (BioVitrum).

#### Иммуногистохимическое исследование

Срезы инкубировали с первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе (DPBS, 5% ЭТС (HyClone), 0.3% TRITON X-100 (Sigma)) во влажной камере при 4°С в течение 12—14 ч. Далее применяли вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами или с пероксидазой хрена (ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Peroxidase MP-7401 и ImmPACT® VIP Substrate, Peroxidase (HRP) SK-4605) по стандартному протоколу. Срезы с соответствующими вторичными флуоресцентными антителами инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра клеток докрашивали DAPI. Съемку гистологических препаратов осуществляли на микроскопе Keyence BZ-9000.

#### Список использованных в работе антител

Первичные антитела: Anti-Keratin 10 (Santa Cruz Biotechnology, sc23877); anti-Keratin 14 (Abcam, ab181595); anti-Ki67 (Abcam, ab16667); Anti-Nuclei Antibody, clone 235-1 (Millipore MAB 1281); CD 31 (Abcam, ab28364). Вторичные антитела: Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594 (Invitrogen).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Модель полнослойной ксенотрансплантации

Были проведены два типа операционных вмешательств — ксенотрансплантация фолликулярных юнитов и кожных лоскутов. Фолликулярные юниты являются наиболее распространенной моделью при изучении цикла волосяных фолликулов (Gilhar et al., 2015; Oh et al., 2016), они представляют собой несколько волосяных фолликулов с близлежащими устьями, с минимальным количеством окружающих тканей. Лоскуты кожи имели площадь 15 × 5 мм, содержали около 20 волосяных фолликулов (рис. 1). Обе модели содержали дерму и подкожную жировую клетчатку, в которую были погружены волосяные луковицы. Первый забор материала проводили на 32 сут после операционного вмешательства. Из 6 трансплантированных юнитов на животном сохранилось 2, которые изначально были зафиксированы шовным материалом. Лоскут кожи человека сохранился и интегрировался в кожу животного, на его поверхности наблюдали волосяные стержни (рис. 1). Таким образом, сама процедура трансплантации лоскута не является более трудоемкой, в сравнении с общепринятой моделью — фолликулярными юнитами. В дальнейшей работе мы сосредоточились именно на изучении и описании морфологии лоскута кожи.

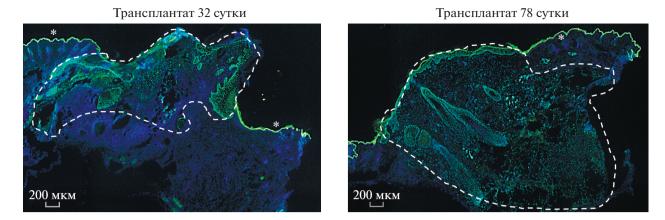
#### Морфология трансплантированного лоскута кожи человека

Материал фиксировали на 32 и 78 сут после трансплантации. Для детекции тканей трансплантата использовали антиген против ядер человека (Human Nuclei). Полученные изображения позволили определить характерные признаки трансплантата, которые мы в дальнейшем смогли использовать и в других окрашиваниях: утолщенный эпидермис, крупный размер волосяных фолликулов, рыхлая дермальная ткань (рис. 2).

Окрашивание гематоксилин-эозином показало полную интеграцию кожи человека в кожу мыши (рис. 3). На 32 сут по краям трансплантата наблюдаются эпителиальные валики, причиной появления которых может быть как регенерация эпидермиса человека, так и послеоперационные швы. На препаратах заметны волосяные фолликулы человека, по размерам значительно превышающие фолликулы мыши. Стоит отметить хорошую сохранность дермальной ткани и подкожной жировой клетчатки. На 32 сут дерма выглядит гомогенно, к 78 сут наблюдается разделение на более плотную папиллярную и рыхлую ретикулярную дерму (рис. 3).

Выявление маркера эндотелия сосудов CD31 показало хорошую васкуляризацию трансплантатов на исследуемых сроках (рис. 4). Это свидетельствует об отсутствии очагов некроза в центре биоптата. В трансплантате частые мелкие сосуды, видимые на 32 сут, сменяются на редкие оформленные на 78 сут.

Процесс приживления трансплантата можно рассматривать в контексте регенерации кожных ран. Заживление кожи мыши и кожи человека отличается. Кожа мыши в большей степени подвергается процессу контракции (стягивания), что сокращает площадь раны и ускоряет процесс заживления. Однако в целом, ранозаживление проходит следующие стадии: стадия воспаления (миграция макрофагов и гранулоцитов), стадия пролиферации (образование грануляционной ткани, миграция фибробластов и эндотелиальных клеток,



**Рис. 2.** Детекция ксенотрансплантата. Иммуногистохимия. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок — 200 мкм. Пунктирной линией обозначены границы трансплантата. \* — автофлуореценция эпидермиса мыши.



#### Трансплантат 78 сутки



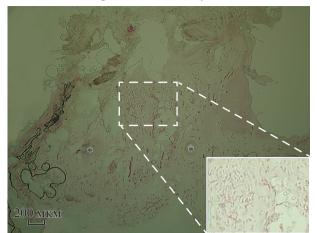
**Рис. 3.** Морфология трансплантата кожного лоскута человека. Гематоксилин-эозин. Световая микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. \* — волосяные фолликулы. Черным цветом обозначены структуры кожи человека, белым — кожи мыши. Фигурная скобка отмечает границы трансплантата.

замещение воспалительных клеток на противовоспалительные) и стадия ремоделинга (сжатие грануляционной ткани миофибробластами, реактивация миофибробластов, апоптоз, синтез и реорганизация внеклеточного матрикса фибробластами) (Zomer, Trentin, 2018). На 32 сут мы наблюдаем активную пролиферацию ткани трансплантата, сеть мелких сосудов в дерме, эпидермальные валики на стыке трансплантата с кожей реципиента, что напоминает стадию пролиферации при ранозаживлении. На 78 сут отмечается общее снижение пролиферации и отсутствие фиброзной ткани, наличие папиллярной и ретикулярной дермы, что позволяет предполагать, что стадия ремоделинга дермы (в терминах ранозаживления) завершилась. Волосяные фолликулы поддерживают цикл физиологической регенерации после трансплантации.

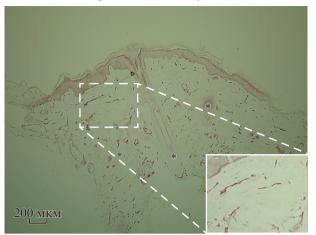
Ранее было показано, что при трансплантации небольших панч-биоптатов и фолликулярных юнитов животным с иммунодефицитом волосяные фолликулы в коже человека синхронизируют свой цикл, вступая в фазу деградации (Gilhar et al., 2013; Oh et al., 2016). Середина катагена приходится на 18 сут после трансплантации, на 33 сут фолликулы находятся на переходной стадии, стадия катагена завершается и фолликулы вступают в фазу роста, достигая ее середины к 47 сут. К 90-м суткам фолликулы достигают финальной стадии развития и максимального размера (Oh et al., 2016).

Морфологию волосяных фолликулов исследовали при помощи окрашивания на кератин 14, маркер фолликулярных эпителиальных клеток и кератиноцитов базального слоя эпидермиса. В качестве контрольного образца мы использовали

Трансплантат 32 сутки



#### Трансплантат 78 сутки



**Рис. 4.** Васкуляризация ксенотрансплантата. CD31 — положительные сосуды окрашены в фиолетовый цвет. Световая микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм. \* — волосяные фолликулы. В выносках в белой рамке располагаются увеличенные фрагменты среза.

интактную кожу человека (рис. 5). На 32 сут после трансплантации фолликулы соответствуют стадии позднего катагена: размер фолликула сокращен более чем в 2 раза, в фолликуле отсутствует выраженная луковица с клетками герминативного матрикса, редуцированная эпителиальная часть волосяного фолликула связана с мезенхимным регуляторным центром, дермальной папиллой, тонким столбиком эпителиальных клеток. Вокруг фолликула не наблюдается сальных желез. К 78 сут фолликулы значительно увеличиваются в размерах за счет прогрессивного роста. В них наблюдается сформированная луковица, в которую погружена дермальная папилла, присутствуют сальные железы и формирующийся стержень волоса. Морфологически стадия развития таких фолликулов может быть охарактеризована как анаген V.

Стадию развития фолликулов можно косвенно подтвердить при помощи детекции маркеров пролиферации. Количество пролиферирующих клеток волосяного фолликула значительно возрастает в фазу роста. Наши результаты показывают, что в фолликулах на 32 сут после трансплантации маркер пролиферирующих клеток Кі67 выявляется лишь в отдельных ядрах, в то время как на 78 сут наблюдается активное деление клеток в луковице волоса (рис. 6). Также на 78 сут в трансплантате впервые обнаруживаются потовые железы (рис. 6). Полученные результаты свидетельствуют о соответствии цикла волосяных фолликулов, описанному в подробном руководстве, полученном с использованием фолликулярных юнитов (Oh et al., 2016).

#### Регенерация трансплантата

Для оценки степени регенерации и приживления трансплантатов измерили уровень пролиферации в эпидермисе и дерме интерфолликулярных участков трансплантированной кожи человека. В качестве контроля использовали интактный биоптат кожи человека (рис. 7). Визуально можно отметить значительное уменьшение количества пролиферирующих ядер как в эпидермисе, так и в дерме на 78 сут в сравнении с 32 сут после операции.

Для количественной оценки пролиферации измерили количество пролиферирующих клеток на 1 мм эпидермиса и 1 мм² дермы (рис. 8). Уровень пролиферации как в дерме, так и в эпидермисе к 78 сут снижается более чем в 2 раза. Пролиферация клеток дермы практически достигает уровня интактной кожи, в то время как в эпидермисе даже на 78 сут сохраняется достаточно высокой. Таким образом, на 32 сут трансплантат находится в состоянии активной регенерации, которая постепенно замедляется к 78 сут. Полученные данные показывают, что реконструкция дермы на 78 сут завершается, и ее гомеостаз устанавливается, по-видимому, раньше эпидермиса, который к этому сроку еще активно пролиферирует.

#### Структура интерфолликулярного эпидермиса

Эпидермис человека обладает слоистой структурой: на базальной мембране располагается герминативный слой, маркером которого являются кератины 5 и 14. Базальные клетки при делении формируют шиповатый слой, клетки которого постепенно дифференцируются, теряя экспрессию кератинов 5/14. Специализированными маркерами шиповатого слоя являются кератины 1 и 10.

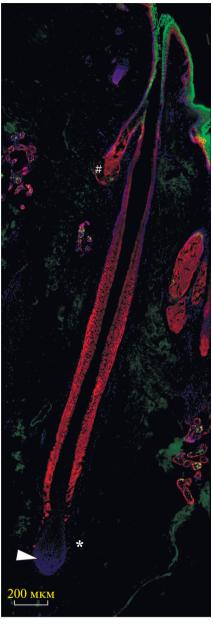
Трансплантат 32 сутки



Трансплантат 78 сутки



Интактная кожа



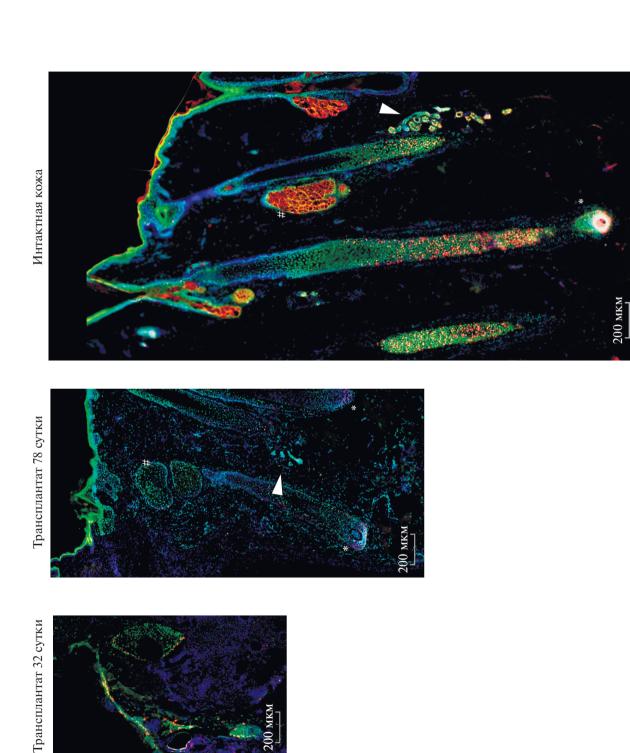
**Рис. 5.** Морфология волосяных фолликулов. Иммуногистохимия в сочетании с флуоресцентной микроскопией. Масштабный отрезок 200 мкм. Зеленое окрашивание — кератин 10, красное окрашивание — кератин 14. Ядра докрашены DAPI. Размер фотографий пропорционален размеру волосяных фолликулов. # — сальная железа. Стрелками указано расположение дермальной папиллы.

Толщина и соотношение слоев эпидермиса являются важнейшей характеристикой его физиологического состояния.

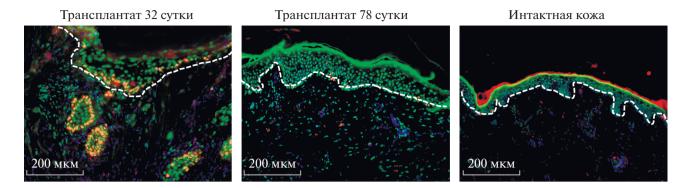
Произвели анализ строения эпидермиса в трансплантатах на исследуемых сроках. На 32 сут наблюдали наиболее радикальные отличия от интактной кожи человека, в эпидермисе отсутствовала экспрессия маркера шиповатого слоя, кератина 10. К 78 суткам выявлялось стойкое положительное окрашивание данного маркера (рис. 9).

Количественно оценили толщину кератин 14 и кератин 10 положительных слоев (рис. 10). Результаты подсчета показали значительное утолщение кератин 14 положительного слоя в трансплантатах на исследуемых сроках. Толщина шиповатого слоя (кератин 10+) на 78 сут также значительно превышала значение, полученное для интактной кожи человека.

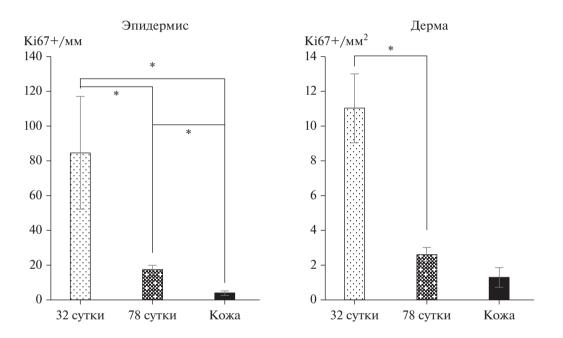
Другой важнейшей характеристикой является структура контакта между эпидермисом и дермой



**Рис. 6.** Пролиферация в волосяных фолликулах. Иммуногистохимия в сочетании с флуоресцентной микроскопией. Масштабный отрезок 200 мкм. Зеленое окрашивание — Ki67. Ядра докрашены DAPI. Размер фотографий пропорционален размеру волосяных фолликулов. \* — луковица волосяного фолликула, # — сальная железа. Стрелками указано расположение потовых желез.



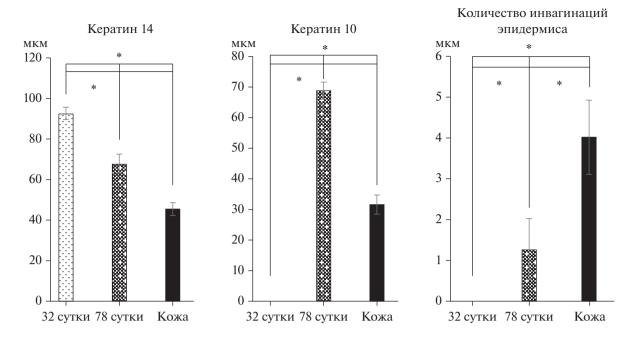
**Рис. 7.** Пролиферация эпидермиса и дермы в интерфолликулярных участках кожи человека. Иммуногистохимия в сочетании с флуоресцентной микроскопией. Масштабный отрезок 200 мкм. Зеленое окрашивание — Human Nuclei, красное окрашивание — Ki67. Ядра докрашены DAPI. Пунктирной линией обозначена граница эпидермиса.



**Рис. 8.** Количество пролиферирующих клеток в коже человека. Доверительный интервал — ошибка среднего. \* — статистически значимый результат при p ≤ 0.05, Mann—Whitney U test.



**Рис. 9.** Анализ экспрессии маркеров базального и шиповатого слоя эпидермиса в интерфолликулярных участках кожи человека. Иммуногистохимия в сочетании с флуоресцентной микроскопией. Масштабный отрезок 200 мкм. Зеленое окрашивание — кератин 10, красное окрашивание — кератин 14. Ядра докрашены DAPI.



**Рис. 10.** Количественные параметры эпидермиса ксенотрансплантата. Доверительный интервал — ошибка среднего. Правый и средний график — толщина кератин 14 и кератин 10 положительных слоев эпидермиса. Левый график — количество эпидермальных гребней на 1 мм трансплантата. \* — статистически значимый результат при  $p \le 0.05$ , Mann—Whitney U test.

Папиллярный слой дермы кожи человека формирует специализированные сосочки, между которыми наблюдается утолщение эпидермиса в виде гребней. Оценили количество подобных интердигитаций на разных сроках трансплантации и сравнили полученный результат с интактной кожей человека. Полученные данные свидетельствуют о недоразвитости эпидермальных гребней на всех исследуемых сроках после трансплантации. На 32 сут подобные интердигитации отсутствуют. На 78 сут эпидермальные гребни обнаруживаются, однако их значительно меньше чем в интактной коже (рис. 10).

На конечной точке наблюдений (78 сут) ряд объективных критериев: обособление папиллярной и ретикулярной дермы; появление эпидермальных гребней; восстановление сальных и потовых желез; вступление волосяных фолликулов в фазу активного роста; уменьшение уровня пролиферации клеток трансплантата в общем (пролиферация в дерме достигает уровня контроля) и формирование зрелой сосудистой сети (плотная сеть мелких сосудов замещается оформленными крупными сосудами): место контакта эпидермиса реципиента и донора приобретает непрерывную структуру без видимой области гиперпролиферации и/или инвагинации позволяет предполагать завершение процесса ремоделирования и достижение начальной фазы гомеостаза кожи. Следует отметить, что становление структуры дермы на 78 сут завершается, но интерфолликулярному эпидермису, вероятно, требуется более длительное время для достижения уровня пролиферации, близкого к интактной коже. Поддержание стабильного гомеостаза требует дополнительного экспериментального подтверждения. Определение физиологического состояния трансплантата необходимо для планирования дальнейших экспериментов. На сроке 78 сут после трансплантации еще рано проводить исследования, затрагивающие процессы, происходящие в здоровой коже. Определение характера приживления может быть интересной темой для дальнейших исследований.

Данная модель позволит исследовать финальные механизмы регенерации, такие как стратификация дермы (рис. 3), восстановление сальных и потовых желез (рис. 5 и 6), а также вовлеченность стволовых клеток волосяного фолликула области балдж в регенерацию эпидермиса. Дальнейшие исследования по увеличению размера трансплантата, анализу динамики его приживления и достижения гомеостаза могут позволить изучать процессы ранозаживления и формирование гипертрофических рубцов, характерных для кожи человека (Zhu et al., 2016; Alrobaiea et al., 2016).

В целом мы надеемся, что описанная модель гуманизированной кожи позволит преодолеть текущие ограничения в изучении цикла волосяного фолликула человека, интерфолликулярного эпидермиса, дермы и подкожной жировой клетчатки кожи человека.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанная модель трансплантации полнослойного лоскута кожи человека позволяет сохранить все структуры: эпидермис, дерму и подкожную жировую клетчатку, а также произволные кожи – волосяные фолликулы, сальные и потовые железы. Данная модель на сроках до 78 сут позволяет исследовать инициацию цикла волосяного фолликула и механизмы регенерации дермы и эпидермиса. Вероятно, определенное влияние на состояние трансплантата в ходе приживления оказывает и динамика химеризма, т.е. соотношение клеточных компонентов реципиента и донора, что представляется интересным для будущих исследований. Тенденции скорости регенерации трансплантата позволяют предположить, что на сроках более 90 сут, когда волосяные фолликулы достигнут максимальной стадии развития, данный способ трансплантации может быть пригоден для моделирования процессов, протекающих в здоровой коже человека.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00204).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Биологический материал человека был получен МНИОИ им. П.А. Герцена с информированного согласия пациентов. Проведение экспериментов по работе с лабораторными животными одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных этического комитета это по клиническим исследованиям РНИМУ им. Н.И. Пирогова (номер заявки 09/2019). Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.П. Калабушева, Э.С. Чермных, Е.А. Воротеляк разработали дизайн эксперимента. Е.П. Калабушева, Э.С. Чермных, А. Пинто и А.В. Терских разработали технологию трансплантации. А.Л. Риппа подготовила криосрезы, провела гистологический и иммуногистохимический анализ. А.А. Цитрина проводила количе-

ственные обсчеты. Все авторы участвовали в написании и обсуждении статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alrobaiea S.M., Ding J., Ma Z. et al. A novel nude mouse model of hypertrophic scarring using scratched full thickness human skin grafts // Adv. Wound Care (New Rochelle). 2016. V. 5. № 7. P. 299–313.
- Berking C., Takemoto R., Binder R.L. et al. Photocarcinogenesis in human adult skin grafts// Carcinogenesis. 2002. V. 23. № 1. P. 181–187.
- Boyman O., Hefti H.P., Conrad C. et al. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha // J. Expd. 2004. V. 199. № 5. P. 731–736.
- Démarchez M., Hartmann D.J., Herbage D. et al. Wound healing of human skin transplanted onto the nude mouse: II. An immunohistological and ultrastructural study of the epidermal basement membrane zone reconstruction and connective tissue reorganization // Dev. Biol. 1987. V. 121. № 1. P. 119–129.
- Di Meglio P., Villanova F., Navarini A.A. et al. Targeting CD8(+) T cells prevents psoriasis development // J. Allergy Clin. Immunol. 2016. V. 138. № 1. P. 274–276.
- Foster A.R., Nicu C., Schneider M.R. et al. Dermal white adipose tissue undergoes major morphological changes during the spontaneous and induced murine hair follicle cycling: a reappraisal // Arch. Dermatol. Res. 2018. V. 310. № 5. P. 453–462.
- Ghazizadeh S., Taichman L.B. Organization of stem cells and their progeny in human epidermis// J. Invest. Dermatol. 2005. V. 124. № 2. P. 367–372.
- Gilhar A., Keren A., Shemer A. et al. Autoimmune disease induction in a healthy human organ: a humanized mouse model of alopecia areata // J. Invest. Dermatol. 2013. V. 133. № 3. P. 844–847.
- Ito M., Liu Y., Yang Z. et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis // Nat. Med. 2005. V. 11. № 12. P. 1351–1354.
- Keren A., Shemer A., Ullmann Y. et al. The PDE4 inhibitor, apremilast, suppresses experimentally induced alopecia areata in human skin in vivo // J. Dermatol. Sci. 2015. V. 77. № 1. P. 74–76.
- Lawlor K. T., Kaur P. Dermal contributions to human interfollicular epidermal architecture and self-renewal // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. № 12. P. 28098–28107.
- Li K.N., Jain P., He C.H. et al. Skin vasculature and hair follicle cross-talking associated with stem cell activation and tissue homeostasis // Elife. 2019. V. 8. P. e45977.
- Manning D.D., Reed N.D., Shaffer C.F. Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin of congenitally athymic (nude) mice // J. Exp. Med. 1973. V. 138. № 2. P. 488–494.
- Myung P., Ito M. Dissecting the bulge in hair regeneration // J. Clin. Invest. 2012. V. 122. № 2. P. 448–454.
- Nestle F.O., Conrad C., Tun-Kyi A. et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production // J. Exp. Med. 2005. V. 202. № 1. P. 135–143.

- Oh J.W., Kloepper J., Langan E.A. et al. A guide to studying human hair follicle cycling in vivo // J. Invest. Dermatol. 2016. V. 136. № 1. P. 34–44.
- Patel G.K., Yee C.L., Yuspa S.H. et al. A humanized stromal bed is required for engraftment of isolated human primary squamous cell carcinoma cells in immunocompromised mice // J. Invest. Dermatol. 2012. V. 132. № 2. P. 284–290.
- Reed N.D., Manning D.D. Long-term maintenance of normal human skin on congenitally athymic (nude) mice // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1973. V. 143. № 2. P. 350—353.
- Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. Regeneration of dermis: scarring and cells involved // Cells. 2019. V. 8. № 6. P. E607.
- Roy E., Neufeld Z., Cerone L. et al. Bimodal behaviour of interfollicular epidermal progenitors regulated by hair follicle position and cycling // EMBO J. 2016. V. 35. № 24. P. 2658–2670.
- Sada A., Jacob F., Leung E. et al. Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin // Nat. Cell Biol. 2016. V. 18. № 6. P. 619–631.

- Salgado G., Ng Y.Z., Koh L.F. et al. Human reconstructed skin xenografts on mice to model skin physiology // Differentiation. 2017. V. 98. P. 14–24.
- Shanmugam V.K., Tassi E., Schmidt M.O. Utility of a human-mouse xenograft model and in vivo near-infrared fluorescent imaging for studying wound healing // Int. Wound J. 2015. V. 12. № 6. P. 699–705.
- Sundberg J.P., Beamer W.G., Uno H. Androgenetic alopecia: in vivo models // Exp. Mol. Pathol. 1999. V. 67. № 2. P. 118–130.
- Weinstein G.D., McCullough J.L., Ross P. Cell proliferation in normal epidermis // J. Invest. Dermatol. 1984. V. 82. № 6. P. 623–628.
- Zhu Z., Ding J., Zengshuan M. et al. The natural behavior of mononuclear phagocytes in HTS formation // Wound Repair Regen. 2016. V. 24. № 1. P. 14–25.
- Zomer H.Z., Trentin A.G. Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research // J. Dermatol. Sci. 2018. V. 90. № 1. P. 3–12.

### Full-Thickness Human Skin Strips Xenotransplantation — a Model for Studying Skin Regeneration and Hair Follicles Cycling

E. P. Kalabusheva<sup>1,\*</sup>, A. L. Rippa<sup>1</sup>, A. A. Tsitrina<sup>1</sup>, A. Pinto<sup>2</sup>, A. V. Terskikh<sup>2</sup>, E. S. Chermnykh<sup>1</sup>, and E. A. Vorotelyak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

<sup>2</sup>Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA 92037 USA

\*e-mail: Kalabusheva.e@gmail.com

Xenotransplantation of human skin onto animals with immunodeficiency is one of the most successful models for studying human tissues in normal and pathological conditions. The main limitation of this approach is the size of the graft — skin explants more than  $10\times 10$  mm lose the lower part of the dermis and subcutaneous fat, full-thickness xenografts rarely exceed size  $3\times 3$  mm. We found that transplantation of  $15\times 5$  mm full-thickness skin grafts provides successful integration and preservation of all structures: epidermis, dermis, blood vessels, hair follicles, sebaceous and sweat glands. The grafted hair follicles maintain the cycle of physiological regeneration. This model is suitable for studying regeneration of both hair follicles, glands, interfollicular epidermis and other skin structures.

Keywords: xenotransplantation, epidermis, dermis, hair follicles, regeneration

#### ——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ——

УЛК 611.81.013

### ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА РЕЦЕПТОРА УРОКИНАЗЫ uPAR В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШИ СТИМУЛИРУЕТ МИГРАЦИЮ НЕЙРОНОВ В КОРУ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

© 2021 г. А. А. Шмакова<sup>a</sup>, А. В. Балацкий<sup>a, d</sup>, М. А. Кулебякина<sup>b</sup>, Т. Шауб<sup>c</sup>, М. Н. Карагяур<sup>b</sup>, К. Ю. Кулебякин<sup>b</sup>, К. Д. Рысенкова<sup>a, b</sup>, В. С. Тарабыкин<sup>c, e</sup>, В. А. Ткачук<sup>a, b</sup>, Е. В. Семина<sup>a, b, \*</sup>

<sup>а</sup>Лаборатория молекулярной эндокринологии, ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, ул. Зя Черепковская, 15а, Москва, 121552 Россия

<sup>b</sup>Лаборатория генных и клеточных технологий, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Ломоносовский проспект, 27/1, Москва, 119991 Россия

<sup>c</sup>Институт клеточной биологии и нейробиологии клиники Шарите, Charitéplatz 1, Берлин, 10117 Германия <sup>d</sup>Отдел лабораторной диагностики, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, Ломоносовский проспект, 27/10, Москва, 119991 Россия

 $^e$ Лаборатория генетики развития мозга, Институт нейронаук,  $\Phi$ ГАОУ ВП "Нижегородский Государственный университет им. Н.И. Лобачевского", пр. Гагарина, 23/7, Нижний Новгород, 603950 Россия

\*e-mail: e-semina@yandex.ru
Поступила в редакцию 19.05.2020 г.
После доработки 29.06.2020 г.
Принята к публикации 07.07.2020 г.

Регуляция миграции молодых нейронов в коре головного мозга в процессе эмбрионального развития — один из самых важных, но малоизученных процессов, от которого зависит правильное формирование нейронных сетей и развитие когнитивных функций. Мутации гена рецептора урокиназы (uPAR) у мышей приводят к спонтанным судорогам, а у человека полиморфизмы гена *PLAUR*, кодирующего uPAR, ассоциированы с расстройствами аутистического спектра. Нами было исследовано влияние гиперэкспрессии гена uPAR на стимуляцию радиальной миграции нейронов в коре головного мозга в эмбриогенезе мышей. Была проведена оценка числа нейронов, мигрирующих из вентрикулярной зоны пролиферирующих предшественников в наружные слои коры головного мозга. Обнаружено, что гиперэкспрессия uPAR существенно стимулирует радиальную миграцию нейронов в дифференцирующуюся кору. Эти данные впервые показывают uPAR-зависимую регуляцию миграции нейронов в эмбриональном развитии коры головного мозга. Дальнейшее изучение роли uPAR в регуляции траектории миграции нейрональных предшественников позволит продвинуть наше понимание механизмов формирования головного мозга в норме и при патологии.

*Ключевые слова:* урокиназная система, урокиназный рецептор, миграция нейронов, эмбриогенез головного мозга, *in utero* электропорация

**DOI:** 10.31857/S0475145021010067

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Нейрогенез является многоступенчатым процессом, который начинается с образования нейральных прогениторных клеток (нейральных стволовых клеток), и, проходя стадии пролиферации, направленной миграции, дифференцировки, заканчивается формированием зрелого нейрона (Sauvageot, Stiles, 2002; Stiles, Jernigan, 2010). На настоящий момент выделяется два основных направления миграции нейрональных предшественников при развитии коры головного мозга: радиальная миграция из субвентрикулярной зоны наружу к кортикальной пластинке по каркасу радиальных глиальных клеток и тангенциальная

миграция, характерная для ГАМК-интернейронов, проходящая преимущественно из ганглионарного бугорка тангенциально к кортикальной пластинке (Міуагакі et al., 2016). Регуляция миграции нейронов и их предшественников в развивающемся головном мозге — один из самых сложных молекулярных процессов, от точности и координирования которого зависит дальнейшее функционирование нервной системы и организма в целом (Huang, 2009; Valiente, Marín, 2010; Miyazaki et al., 2016).

Урокиназная система является важным регулятором направленной клеточной миграции. Многочисленными исследованиями подтверждается и

продолжает изучаться важная роль урокиназной системы в нервной ткани в периоды ее развития, регенерации и патологической деформации (Семина и др., 2016; Шмакова и др., 2019). Урокиназная система состоит из активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназа, uPA) и ее рецептора (uPAR). uPA является сериновой протеазой, которая расщепляет плазминоген до активного плазмина, что стимулирует протеолиз внеклеточного матрикса, а взаимодействие uPA с рецептором uPAR увеличивает ее каталитическую активность, локализует протеолиз непосредственно рядом с клеткой, в том числе при ее миграции по градиенту хемоаттрактантов, одним из которых является лиганд uPAR урокиназа, а также может запускать передачу внутриклеточного сигнала (Blasi, Carmeliet, 2002; Smith, Marshall, 2010). Akтивация внутриклеточной сигнализации может осуществляться за счет латерального взаимодействия uPAR с мембранными рецепторами: интегринами, белками эндоцитоза, рецепторными тирозинкиназами и др. (Eden et al., 2011). Кроме того, растворимая форма uPAR сама по себе может быть хемокином, регулирующим клеточный сигналинг и миграцию (Klimovich, Semina, 2020).

Вовлечение урокиназной системы в различные патологические и физиологические процессы в нервной системе подтверждается изменением экспрессии и активности ее компонентов при травмах и заболеваниях нервной системы (Bruneau, Szepetowski, 2011; Merino et al., 2017; Pitkänen et al., 2014; Semina et al., 2016); изучением роли нокаута, блокирования или экзогенного введения компонентов урокиназной системы на животных и изолированных тканях (Powell et al., 2001, 2003; Levitt, 2005; Semina et al., 2016; Klimovich et al., 2020; Klimovich, Semina, 2020); обнаружением взаимосвязи между полиморфизмами генов компонентов урокиназной системы и различными неврологическими патологиями у людей (Roll et al., 2006; Campbell et al., 2008; Zandifar et al., 2014). Однако во многом роль и механизмы действия урокиназной системы в развивающейся и зрелой нервной системе остаются малоизученными.

Возможно, ввиду более широкого спектра латеральных партнеров и разнообразия механизмов реализации сигнальных эффектов (Шмакова и др., 2020), именно рецептор uPAR, а не урокиназа, играет основную роль в урокиназной системе как регулятор критических процессов в нервной ткани. Этому существует несколько подтверждений. На модели травмы периферического нерва у мышей отсутствие гена *Plaur* (кодирует uPAR), но не *Plau* (кодирует uPA), существенно замедляет регенерацию нерва, что говорит о том, что более критичным для роста и регенерации нервов служит способность uPAR латерально взаимодействовать с мембранными лигандами (Klimovich et al., 2020). На модели острых генерализованных судо-

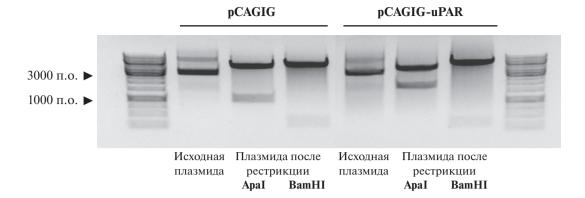
рог у мышей нами было обнаружено, что uPAR, но не иРА, является непосредственно ранним геном, индуцируемым в короткие сроки при активации нейронов в разных областях головного мозга, и это не зависит от дополнительного синтеза белка de novo (Shmakova et al., 2019). Такой быстрый и универсальный ответ подтверждает важную роль uPAR в регуляции нейронального ответа на возбуждение и/или повреждение. Наконец, нокаут по гену *Plaur* (Powell et al., 2001, 2003; Levitt, 2005; Ndode-Ekane, Pitkänen, 2013; Bolkvadze et al., 2016), но не по гену *Plau* (Lahtinen et al., 2010; Bolkvadze et al., 2015), вызывает у животных подверженность судорогам, более тяжелое течение индуцированных судорог и усиление нейродегенеративных процессов.

Изучение фенотипа нокаута гена *Plaur* у мышей указало на его важную роль в развитии головного мозга. Было обнаружено, что нокаут *Plaur* у мышей приводит к потере почти половины парвальбуминсодержащих ГАМК-интернейронов в коре головного мозга (Powell et al., 2003: Eagleson et al., 2005). Вероятно, одной из множества функций uPAR является регулирование направленной миграции нейронов в процессе эмбрионального развития. Однако, Eagleson et al. высказали предположение о том, что поскольку нейроны утрачивались постнатально, uPAR скорее вовлечен в регуляцию их созревания и выживаемости (Eagleson et al., 2005, 2011). В связи с тем, что модель традиционного нокаута гена имеет ограничения и не всегда указывает на прямое действие определенного белка (Eisener-Dorman et al., 2009), мы решили исследовать напрямую, как экспрессия uPAR в эмбриональном периоде влияет на миграцию нейронов. Для изучения этой роли был использован метод in utero электропорации плазмидой для гиперэкспрессии uPAR.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с лабораторными животными

Для получения образцов эмбрионального мозга мыши использовали мышей линии NMRI. Мыши данной линии отличаются сравнительно большим (в среднем 18) числом эмбрионов при беременности, что делает их удобным объектом для исследований процессов, связанных с эмбриональным и ранним постнатальным развитием (Rose et al., 2012). Эксперименты по получению датированной беременности и внутриматочной электропорации проводили в клинике Шарите, г. Берлин, Германия (Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité, Universitätsmedizin Berlin), конфокальную флуоресцентную микроскопию и анализ изображений проводили в МГУ имени М.В. Ломоносова и ФГБУ НМИЦ Кардиологии, г. Москва, Россия. Манипуляции с животными



**Рис. 1.** Рестрикционный анализ плазмиды pCAGIG-uPAR и контрольной плазмиды pCAGIG. Рестриктаза ApaI расщепляет контрольную плазмиду на фрагменты  $\sim 5000$  и  $\sim 1000$  п.о. и плазмиду со вставкой uPAR на фрагменты  $\sim 5000$  и  $\sim 2400$  п.о.; рестриктаза BamHI расщепляет контрольную плазмиду на фрагменты  $\sim 5600$  и  $\sim 400$  п.о. и плазмиду со вставкой uPAR на фрагменты  $\sim 7000$  и  $\sim 400$  п.о.

проводили в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. Всего в эксперименте было использовано 8 самок и 100 эмбрионов, у каждой самки эмбрионы примерно поровну распределялись на эксперимент и контроль (46 контроль, 53 эксперимент). Для наркоза использовали ингаляционный наркоз изофлуран (isoflurane IsoFlo®, USP, 0.1 мг/кг).

#### Работа с культурой линейных клеток Neuro2A

В работе была использована линия нейробластомы мыши Neuro2A (ATCC® CCL- $131^{TM}$ ). Клетки культивировали в среде DMEM (Hyclone), 10% фетальной бычей сыворотки,  $1\times$  MEM раствор незаменимых аминокислот,  $1\times$  раствор антибиотика-антимикотика (все от Gibco), 5% CO<sub>2</sub>,  $37^{\circ}$ C. Клетки высевали в концентрации  $1\times10^{5}$  клеток/мл. Трансфекцию клеток Neuro2A плазмидами проводили по протоколу Lipofectamine2000 (Life Technologies).

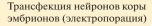
#### Создание плазмиды для гиперэкспрессии иРАК

Для изучения роли uPAR в миграции нейронов была создана плазмидная конструкция, позволяющая создать гиперэкспрессию uPAR в нейральных стволовых клетках, которые далее дифференцируются в нейроны и мигрируют в различные слои коры головного мозга. Для этого использовали последовательность кДНК uPAR мыши (NM\_01113.4), которая была получена из клеток Neuro2A (ATCC®CCL-131™) путем выделения тотальной PHK (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Германия), обратной транскрипции (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) и амплификации с использованием специфиче-

ских праймеров 5'-ACCATGGGACTCCCAAGG-CGGC-3' (прямой) и 5'-TCAGGTCCAGAGGAG-GACGCCCCATAG-3' (обратный). Последовательность кДНК была клонирована в плазмиду phCMV1 по сайтам рестрикции HindIII-HF и EcoRI. Последовательность вставки кДНК uPAR и ориентация была подтверждена секвенированием (Евроген) с использованием праймеров 5'-GAGTGACGTAAGTACCGCCT-3' (прямой), 5'-TCCAGAGCACAGAAAGGAGC-3' (прямой) (Евроген) Ладео чест (Евроген). Далее последовательность кДНК uPAR была переклонирована в плазмиду pCAGIG (Addgene) по сайтам XbaI и NotI. Данная плазмида также содержит ген GFP (Matsuda, Cepko, 2004) в качестве репортерного гена для экспрессии бицистронной мРНК, кодирующей uPAR и GFP. При клонировании в плазмиду pCAGIG к кДНК uPAR были добавлены сайты рестрикции, по которым требовалось провести клонирование (рестриктазы XbaI и NotI), а также последовательность Козак для увеличения стабильности мРНК и экспрессии белка uPAR. Последовательности праймеров, использованных для переклонирования кДНК uPAR из исходной плазмиды — 5'-GAATTCACCAT-GGGACTCCCAAGGCGGCTGCT-3' (прямой) и 5'-GCGGCCGCTCAGGTCCAGAGGAGGACG-ССС-3' (обратный). Анализ полученной плазмиды pCAGIG-uPAR проводили методом рестрикционного анализа с использованием рестриктаз АраІ, ВатНІ, а также методом секвенирования с использованием праймеров с последовательностями 5'-GCCTCTGCTAACCATGTTCAT-3' (прямой) и 5'-GCTTCGGCCAGTAACGTTAG-3' (обратный). В качестве контроля использовали плазмиду pCAGIG, кодирующую только GFP. На рис. 1 представлен рестрикционный анализ полученной плазмиды со вставкой uPAR и контрольной плазмиды.

Извлечение рога матки мыши под наркозом (E15.5)

Введение плазмидной ДНК



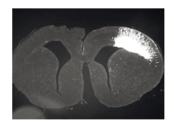
Выделение головного мозга эмбрионов (Е17.5) и иммунофлуоресцентная микроскопия











**Рис. 2.** *In utero* трансфекция нейрональных предшественников эмбриона мыши. Датируемую беременность запускали ссаживанием самок с самцом на трое суток. На сроке E15.5 беременных самок анестезировали, в асептических условиях проводили извлечение рога матки, визуализировали эмбрионы в матке. Далее стерильную плазмидную ДНК вводили в боковые желудочки эмбрионального мозга, проводили электропорацию, после чего рану зашивали и эмбрионы продолжали свое развитие в условиях *in vivo*. На сроке E17.5 самок летально анестезировали, выделяли эмбрионы и изолировали головной мозг. Для визуализации клеток, экспрессирующих плазмиду с GFP, проводили иммунофлуоресцентную съемку образцов с помощью широкопольного микроскопа с последующей конфокальной микроскопией.

Внутриматочная электропорация нейронов головного мозга эмбрионов in vivo плазмидой для гиперэкспрессии и PAR и иммунофлуоресцентная микроскопия

Метод внутриматочной электропорации (*in utero* electroporation) — метод изменения экспрессии генов путем введения плазмид в развивающийся мозг эмбриона *in vivo* (dal Maschio et al., 2012). Датируемую беременность получали ссаживанием 2—3 самок с одним самцом на трое суток; далее самок, имеющих вагинальные пробки, отсаживали. День спаривания определяли как E0.5. О наличии беременности судили по прибавке в весе в течение первых 10 дней.

В данном эксперименте использовали самок датированной беременности сроком Е15.5, на котором часть клеток предшественников нейронов головного мозга выходят из митотического цикла и начинают мигрировать из субвентрикулярной зоны в сторону кортикальной пластинки (Dwyer et al., 2016). На этом сроке вентрикулярная зона коры головного мозга содержит преимущественно предшественники нейронов верхних слоев коры головного мозга (II-IV), таким образом, данный подход позволяет трансфицировать избирательно нейроны этих слоев. Беременных самок анестезировали, в асептических условиях визуализировали эмбрионы в матке, далее стерильную плазмидную ДНК (pCAGIG-uPAR или pCAGIG, 0.5 мкг/мкл) вводили в боковые желудочки эмбрионального мозга, проводили электропорацию плазмидами, после чего рану зашивали и эмбрионы продолжали свое развитие в условиях in vivo (рис. 2). Электропорация 3-мм электродом состояла из 6 импульсов по 50 V в течение 40 мс с промежутками между импульсами 950 мс.

На сроке Е17.5 самки были летально анестезированы, эмбрионы выделены, головной мозг изолирован (рис. 2). Далее образцы инкубировали при 4°C в 4% растворе параформальдегида в течение ночи, затем в 15% растворе сахарозы в течение 6-8 ч, после чего в 30% растворе сахарозы в течение ночи. Приготовление срезов толщиной 50 мкм осуществляли на криотоме Leica CM1850 UV. Срезы монтировали на предметные стекла и окрашивали антителами кролика GFP и вторичными антителами, мечеными Alexa Fluor 488, а также ядерным красителем DRAQ5. Иммунофлуоресцентную съемку образцов осуществляли с помощью конфокального микроскопа (Leica SP5) при возбуждении 488 нм для детекции GFP и при возбуждении 647 нм для детекции DRAQ5. Полученные изображения анализировали с помощью программы Ітаде (США) и алгоритма на языке программирования R-3.6.0, разработанного нами, позволяющего в автоматическим режиме определять число зеленых клеток в выбранных областях поля зрения (RStudio 1.2.1335, США). Для анализа были отобраны образцы с выраженной различимой флуоресценцией GFP: 15 эмбрионов от трех разных самок (9 эмбрионов для pCAGIG-uPAR и 6 эмбрионов для pCAGIG), всего проанализировано 82 изображения срезов головного мозга (44 для pCAGIG-uPAR и 38 для контроля).

#### Иммунофлуоресцентное окрашивание Neuro2A клеток

Клетки Neuro2A высевали в лунки системы Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ в низкой концентрации ( $2 \times 10^4$ /мл) в полной ростовой среде. 24 ч спустя клетки последовательно фиксировали в 4% растворе формальдегида и обрабатывали 10% раствором сыворотки донора вторых антител для блокирования неспецифического окрашивания. Далее образцы последовательно инкубировали с первичными антителами анти-uPAR мыши (1: 100, MAB531, RD Systems) или с неиммунными IgG в качестве контроля специфичности окрашивания, затем со вторичными антителами (1:500, AlexaFluor®594, Invitrogen), промывая раствором Хэнкса. Ядра окрашены DAPI. Иммунофлуоресцентную съемку образцов осуществляли с помощью конфокального микроскопа (Leica SP5) при возбуждении 405 нм для детекции DAPI. 488 нм для детекции GFP и 594 нм для детекции uPAR.

#### Статистическая обработка данных

Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad software Inc., США). Непарный t-тест Student использовался для сравнения между двумя группами. Различия между несколькими группами определялись с помощью 2-way ANOVA, попарные сравнения проводили с использованием post hoc теста Sidak. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Критический уровень значимости принимали равным p < 0.05.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Подтверждение гиперэкспрессии иPAR на поверхности клеток при использовании плазмиды pCAGIG-иPAR

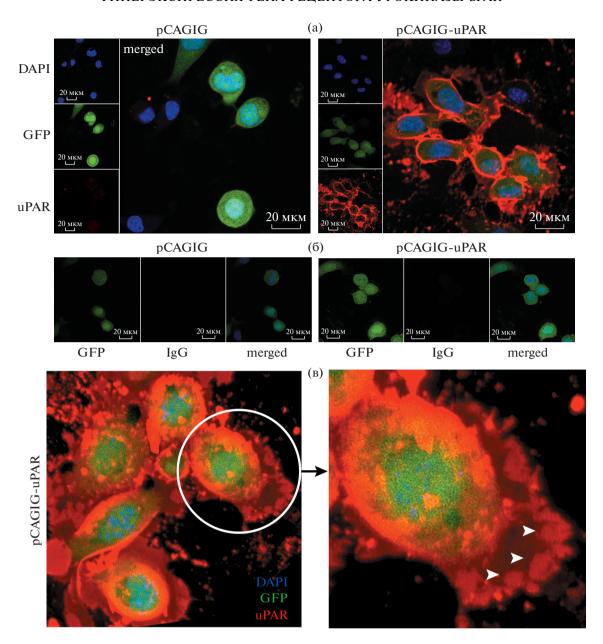
Для доказательства гиперэкспрессии uPAR на поверхности клеток при трансфекции их плазмидой pCAGIG-uPAR, были использованы клетки мышиной нейробластомы Neuro2A, которые представляют собой линию опухолевых клеток нейрального происхождения (симпатоадреналовый предшественник симпатических нейронов). Используя иммунофлуоресцентное окрашивание, мы показали, что трансфекция плазмидой pCAGIG-uPAR клеток Neuro2A уже через 24 часа значительно увеличивает экспрессию белка uPAR на мембране GFP-положительных клеток (рис. 2a). При этом, в клетках, трансфицированных контрольной плазмидой pCAGIG, также обнаруживалась экспрессия uPAR, но на более низком уровне (рис. 3a). Специфичность окрашивания была подтверждена с использованием неиммунных IgG антител (рис. 36). Совмещенное трехмерное изображение клеток

Neuro2A с гиперэкспрессией uPAR подтвердило мембранное расположение рецептора, в том числе его кластеризацию по краю ламеллоподий, что указывает на его функциональность и подтверждает его важную роль в адгезивных контактах и миграции (рис. 3в).

Таким образом, трансфекция плазмидой pCAGIG-uPAR позволяет идентифицировать клетки, гиперэкспрессирующие uPAR по экспрессии GFP, что было использовано нами в дальнейшем для оценки миграции GFP-положительных нейронов, гиперэкспрессирующих uPAR, в головном мозге *in vivo*.

#### Подход к созданию алгоритма для измерения количества мигрирующих GFPположительных нейронов

Для анализа и сравнения степени миграции GFP+ нейронов в эмбриональном периоде мы решили оценить количество нейронов в трех слоях головного мозга: желудочковом, или внутреннем слое, промежуточном слое и кортикальной пластинке, или наружном слое. Миграция нейронов происходила из желудочкового слоя, где проводилась электропорация, в область кортикальной пластинки и, для правильной оценки и сравнения миграции, расстояние (длина пути) миграции, должна быть одинаковой в каждом из слоев по выбранному направлению от желудочка до границы коры головного мозга. Поэтому нами был разработан алгоритм на языке программирования R, определяющий границы равноширинных слоев головного мозга, отражающих равные длины пути мигрирующих нейронов, и количество нейронов в каждом из этих слоев (рис. 4). Для этого на изображениях головного мозга вручную обозначали границы коркового и желудочкового слоев, выбирая минимум 100 точек с помощью инструмента multi-point selection ImageJ, и получали данные об ХҮ-координатах этих точек. Аналогичным образом определяли положение GFP+ нейронов. С помощью алгоритма проводили полиномиальную аппроксимацию, получая уравнение кривых границ коркового и желудочкового слоев. Далее вычисляли уравнения границ трех равноширинных слоев головного мозга, путем полиномиальной аппроксимации точек, делящих на три равные части линии, соединяющие между собой границы коркового и желудочкового слоев, построенные из 1000 автоматически рассчитанных равноудаленных между собой точек на каждой из кривых. Используя полученные ХҮ-координаты GFP+ нейронов, рассчитывали общее количество нейронов в каждом из трех слоев головного мозга.



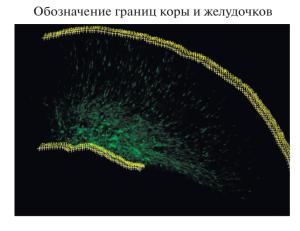
**Рис. 3.** Гиперэкспрессия uPAR на поверхности клеток Neuro2A при трансфекции плазмидой pCAGIG-uPAR или контрольной pCAGIG. а, б — иммунофлуоресцентное окрашивание клеток Neuro2A, трансфицированных плазмидами pCAGIG (контроль) и pCAGIG-uPAR. Ядра окрашены DAPI (синий канал). Обе плазмиды экспрессируют GFP (зеленый канал), в случае pCAGIG-uPAR наблюдается сильная гиперэкспрессия uPAR (красный канал). Масштабный отрезок 20 мкм. б — неиммунные IgG (красный канал) использовали в качестве контроля специфичности окрашивания. в — совмещенное трехмерное изображение, полученное на конфокальном микроскопе, клеток Neuro2A с гиперэкспрессией uPAR подтвердило мембранное расположение рецептора. Белыми стрелками обозначена кластеризация uPAR в мембране клетки по краю ламеллоподий.

### Гиперэкспрессия *uPAR* симулирует миграцию нейронов в кору головного мозга

Мы изучали миграцию GFP+ нейронов в норме и при гиперэкспрессии uPAR при развитии коры головного мозга у мышей на эмбриональном сроке E15.5—E17.5 (рис. 5а). На представленных репрезентативных микрофотографиях заметно, что гиперэкспрессия uPAR способствует радиаль-

ной миграции нейронов в сторону кортикальной пластинки. Морфология мигрирующих нейронов не отличалась в контроле и при гиперэкспрессии uPAR (рис. 5б).

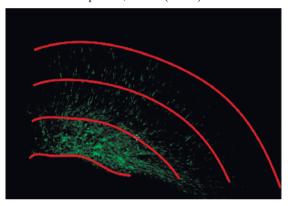
Оценивать абсолютное количество промигрировавших нейронов оказалось нецелесообразным, так как в каждом случае уровень трансфекции и общее количество GFP+ нейронов, попав-



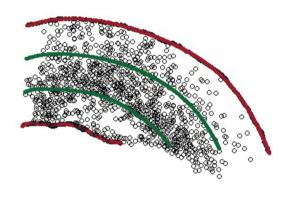
#### Обозначение положения GFP+ нейронов



Автоматическое вычисление координат границ слоев (n = 3)



Автоматический расчет количества нейронов в каждом слое

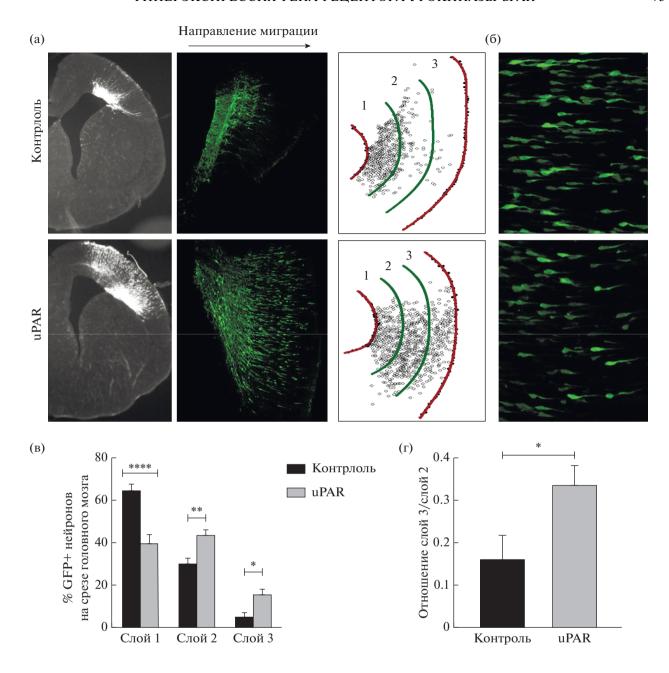


**Рис. 4.** Алгоритм расчета количества мигрирующих GFP-положительных нейронов по слоям головного мозга. На изображениях вручную обозначали границы коркового и желудочкового слоев, определяли положение GFP+ нейронов и получали данные об XY-координатах этих точек. Далее с помощью алгоритма проводили полиномиальную аппроксимацию, получая уравнение кривых границ коркового и желудочкового слоев, и вычисляли уравнения границ трех равноширинных слоев головного мозга. Используя полученные XY-координаты GFP+ нейронов, рассчитывали общее количество нейронов в каждом из трех слоев головного мозга.

ших на срез изображения головного мозга, могли варьироваться. Поэтому мы рассчитали процент нейронов в каждом из трех слоев головного мозга по отношению к общему количеству GFP+ нейронов на изображении (рис. 5в). При оценке относительного количества нейронов в трех слоях головного мозга мы обнаружили, что при гиперэкспрессии uPAR снижается относительное количество нейронов в первом (желудочковом) слое головного мозга по отношению к контролю (2-way ANOVA, \*\*\*\* p < 0.0001). Однако относительное количество нейронов во втором (промежуточном) и третьем (корковом) слоях, напротив, выше при гиперэкспрессии uPAR по сравнению с контролем (2-way ANOVA, \*\* p < 0.01, \* p << 0.05 соответственно). Это означает, что гиперэкспрессия uPAR способствует миграции нейронов в сторону коркового слоя.

В связи с тем, что электропорация плазмид проводилась в области желудочков, иногда оце-

нить точное количество окрашенных нейронов в первом (внутреннем, желудочковом) слое представлялось затруднительным из-за сильной флуоресценции (см. рис. 4). Поэтому для подтверждения полученных результатов мы также оценили такой параметр, как отношение количества нейронов в третьем (наружном, корковом) слое к количеству нейронов во втором (промежуточном) слое, который отражает относительный уровень миграции нейронов в кору (рис. 5г). Это отношение также было значимо выше при гиперэкспрессии uPAR (t-тест Student, \* p < 0.05), то есть нейроны, в которых экспрессия uPAR повышена, в большей степени мигрируют до наружного слоя коры головного мозга по сравнению с контрольными нейронами. Эти данные говорят о том, что экспрессия uPAR способствует миграции нейронов в кору при эмбриональном развитии головного мозга.



**Рис. 5.** Гиперэкспрессия uPAR стимулирует миграцию нейронов коры головного мозга. (а) Слева представлены репрезентативные ч/б микрофотографии срезов головного мозга, полученные на широкопольном микроскопе; в центре — увеличенные изображения среза головного мозга, полученные на конфокальном микроскопе при возбуждении 488 нм; справа — обозначение границ равноширинных слоев головного мозга для анализа, 1 — желудочковый, внутренний слой, 2 — промежуточный слой, 3 — корковый, наружный слой. (б) Морфология мигрирующих нейронов в контроле (сверху) и при гиперэкспрессии uPAR (снизу). (в) Относительное количество GFP+ нейронов на различных слоях головного мозга в контроле и при гиперэкспрессии uPAR. 2-way ANOVA, post hoc тест Sidak, \* p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*\* p < 0.0001. (г) Отношение числа GFP+ нейронов в 3 и 2 слоях головного мозга в контроле и при гиперэкспрессии uPAR. Непарный t-тест Student, \* p < 0.05. Контроль — in utero электропорация плазмидой pCAGIG, экспрессирующей только GFP, uPAR — in utero электропорация плазмидой pCAGIG-uPAR, экспрессирующей uPAR и GFP. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные доказывают полученные ранее результаты о том, что урокиназный рецептор может регулировать миграцию нейронов в эмбрио-

нальном периоде и опосредовать морфогенез коры головного мозга. В нескольких ограниченных исследованиях было показано, что нокаут uPAR снижает миграцию парвальбумин-экспрессиру-

ющих ГАМК-интернейронов в кору головного мозга (Powell et al., 2003), которые в норме экспрессируют uPAR, и в зрелом головном мозге составляют основную часть нейрональной экспрессии uPAR (Lahtinen et al., 2009). У мышей, нокаутных по гену Plaur, наблюдается повышенная тревожность, нарушенное социальное поведение, большая подверженность индуцированным судорогам по сравнению с мышами дикого типа (Powell et al., 2001, 2003). Несмотря на то, что ГАМК-интернейроны преимущественно мигрируют тангенциально (Miyazaki et al., 2016), полученные нами результаты говорят о том, что uPAR может быть также вовлечен в регуляцию радиальной миграции нейронов в коре, т.к. при гиперэкспрессии uPAR мы наблюдали увеличение миграции из желудочкового слоя в корковый слой. Однако до сих пор остается неясным, как экспрессия uPAR способствует корковому направлению миграции нейронов и по градиенту какого лиганда uPAR движется нейрон во время созревания коры головного мозга.

Точный механизм, с помощью которого uPAR регулирует миграцию нейронов в эмбриональном периоде, еще предстоит выяснить. Связывание uPA с рецептором uPAR активирует ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, что приводит к перестройкам цитоскелета и обеспечивает направленную миграцию различных клеток, в частности нейронов (D'Alessio, Blasi, 2009; Lino et al., 2014; Semina et al., 2016). Также существует предположение, что действие uPAR в эмбриональном периоде связано с фактором роста гепатоцитов (HGF), так как потеря uPAR в эмбриогенезе ассоциирована со сниженным уровнем HGF и его рецептора Met в головном мозге (Powell et al., 2001). В зрелом мозге также обнаружена корреляция между HGF и uPA/uPAR (Campbell et al., 2007; Russo, Pietsch, 2013). HGF и его рецептор Met являются важными регулятором пролиферации, дифференцировки и миграции нейронов в эмбриональном развитии головного мозга (Powell et al., 2001; Wang et al., 2011). Сигнальный путь HGF/Met оказывается критичным для нормального развития головного мозга, т. к. нокаут по гену HGF или его рецептору *Met* оказывается летальным, в то время как нокаут по гену Plaur связан лишь с уменьшением активности пути HGF/Met (Levitt, 2005). Считалось, что при миграции интернейронов uPAR участвует в регуляции экспрессии HGF и/или его протеолитической активации (Powell et al., 2001: Levitt, 2005), однако другие исследования не подтвердили участия иРА в протеолитической активации HGF (Owen et al., 2010) и присутствия Met рецептора на интернейронах (Eagleson et al., 2011). В эмбриональном периоде рецептор Met в основном экспрессируется на глутаматергических нейронах (Eagleson et al., 2011). Несмотря на это, постнатальное экзогенное введение

HGF нивелирует потерю интернейронов и неврологический дефицит v uPAR-дефицитных мышей (Bae et al., 2010; Bissonette et al., 2010). Эти данные могут отражать более сложные механизмы взаимодействия в системе HGF/Met. Действительно, было показано, что в норме в зрелом мозге существует положительная связь между экспрессией HGF и Met, в то время как при расстройствах аутистического спектра эта связь становится отрицательной (Campbell et al., 2007). Кроме того, наши предварительные данные говорят о том, что связь между системой HGF/Met и uPAR может существовать на уровне микроРНК, т.к. при нокауте Plaur повышается содержание mmu-miR-34с-5р (данные готовятся к публикации), существенно подавляющей экспрессию Меt.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, высокая экспрессия uPAR в эмбриональном периоде у мышей стимулирует радиальную миграцию нейронов в кортикальную пластинку. Это подтверждает важную роль урокиназной системы и, в частности, урокиназного рецептора, в эмбриональном развитии головного мозга. Дальнейшие изучение uPAR и его возможных лигандов, вовлеченных в регуляцию миграции, определение траектории нейронов и их предшественников, позволит расширить наше понимание развития головного мозга в норме и при неврологических патологиях, многие из которых ассоциированы с нарушением миграции нейронов в эмбриогенезе.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ (грант № 20-015-00186).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.С. Тарабыкин и Е.В. Семина придумали и разработали эксперимент. А.В. Балацкий, М.А. Кулебякина, Т. Шауб, Е.В. Семина, М.Н. Карагяур, К.Ю. Куле-

бякин, К.Д. Рысенкова проводили эксперименты. А.А. Шмакова составила алгоритм и обрабатывала данные. А.А. Шмакова и Е.В. Семина участвовали в подготовке и написании текста статьи. А.В. Балацкий, М.А. Кулебякина, В.С. Тарабыкин участвовали в правке текста статьи. В.А. Ткачук и Е.В. Семина внесли существенный вклад в концепцию рукописи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Программный код на языке R для анализа изображений, использованный в работе, доступен по ссылке https://osf.io/ahcg4/?view\_only=b6281fbf091c48f1ae96c743f5d 5d26a (DOI 10.17605/OSF.IO/AHCG4).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Семина Е.В., Рубина К.А., Степанова В.В., Ткачук В.А. Участие рецептора урокиназы и его эндогенных лигандов в развитии головного мозга и формировании когнитивных функций // Российский физиологический журн. им. И.М.Сеченова. 2016. Т. 102. № 8. С. 881—903.
- Шмакова А.А., Рубина К.А., Анохин К.В., Ткачук В.А., Семина Е.В. Роль системы активаторов плазминогена в патогенезе эпилепсии // Биохимия. 2019. Т. 84. № 9. С. 1211—1225.
- Шмакова А.А., Рубина К.А., Ткачук В.А., Семина Е.В. Рецептор урокиназы: от регуляции протеолиза до направленного роста аксонов и регенерации нервов. Механизмы взаимодействия с мембранными лигандами и внутриклеточная сигнализация // Цитология. 2020. Т. 62. № 6. С. 1—11.
- Bae M.H., Bissonette G.B., Mars W.M., Michalopoulos G.K., Achim C.L., Depireux D.A., Powell E.M. Hepatocyte growth factor (HGF) modulates GABAergic inhibition and seizure susceptibility // Exp. Neurol. 2010. V. 221. № 1. P. 129–135.
- Bissonette G.B., Bae M.H., Suresh T., Jaffe D.E., Powell E.M. Astrocyte-mediated hepatocyte growth factor/scatter factor supplementation restores GABAergic interneurons and corrects reversal learning deficits in mice // J. Neurosci. 2010. V. 30. № 8. P. 2918–2923.
- Blasi F., Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. № 12. P. 932–943.
- Bolkvadze T., Puhakka N., Pitkänen A. Epileptogenesis after traumatic brain injury in Plaur- deficient mice // Epilepsy Behav. 2016. V. 60. P. 187–196.
- Bolkvadze T., Rantala J., Puhakka N., Andrade P., Pitkänen A. Epileptogenesis after traumatic brain injury in Plau-deficient mice // Epilepsy Behav. 2015. V. 51. P. 19–27.
- Bruneau N., Szepetowski P. The role of the urokinase receptor in epilepsy, in disorders of language, cognition, communication and behavior, and in the central nervous system // Curr. Pharm. Des. 2011. V. 17. № 19. P. 1914—1923.
- Campbell D.B., D'Oronzio R., Garbett K., Ebert P.J., Mirnics K., Levitt P., Persico A.M. Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder // Ann. Neurol. 2007. V. 62. № 3. P. 243—250.

- Campbell D.B., Li C., Sutcliffe J.S., Persico A.M., Levitt P. Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder // Autism Res. 2008. V. 1. № 3. P. 159–168.
- D'Alessio S., Blasi F. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction // Front. Biosci. 2009. V. 14. P. 4575–4587.
- dal Maschio M., Ghezzi D., Bony G., Alabastri A., Deidda G., Brondi M., Sato S.S., Zaccaria R.P., Fabrizio E. Di, Ratto G.M., Cancedda L. High-performance and site-directed in utero electroporation by a triple-electrode probe // Nat. Commun. 2012. V. 3. № 1. P. 960.
- Dwyer N.D., Chen B., Chou S.J., Hippenmeyer S., Nguyen L., Ghashghaei H.T. Neural stem cells to cerebral cortex: Emerging mechanisms regulating progenitor behavior and productivity // J. Neuroscience Society for Neuroscience. 2016. V. 36. № 45. P. 11394—11401.
- Eagleson K.L., Bonnin A., Levitt P. Region- and age-specific deficits in γ-aminobutyric acidergic neuron development in the telencephalon of the uPAR—/— mouse // J. Comp. Neurol. 2005. V. 489. № 4. P. 449—466.
- Eagleson K.L., Campbell D.B., Thompson B.L., Bergman M.Y., Levitt P. The autism risk genes MET and PLAUR differentially impact cortical development // Autism Res. 2011. V. 4. № 1. P. 68–83.
- Eden G., Archinti M., Furlan F., Murphy R., Degryse B. The urokinase receptor interactome // Curr. Pharm. Des. 2011. V. 17. № 19. P. 1874–1889.
- Eisener-Dorman A.F., Lawrence D.A., Bolivar V.J. Cautionary insights on knockout mouse studies: the gene or not the gene? // Brain. Behav. Immun. 2009. V. 23. № 3. P. 318–324.
- Huang Z. Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development // Mol. Cell Neurosci. 2009. V. 42. № 1. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.06.003
- Klimovich P.S., Semina E.V., Karagyaur M.N., Rysenkova K.D., Sysoeva V.Y., Mironov N.A., Sagaradze G.D., Az'muko A.A., Popov V.S., Rubina K.A., Tkachuk V.A. Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with α5β1-integrin // Biomed. Pharmacother. 2020. V. 125. P. 110008.
- Klimovich P.S., Semina E.V. Mechanisms of participation of the urokinase receptor in directed axonal growth // Mol. Biol. 2020. V. 54. № 1. P. 89–98.
- Lahtinen L., Huusko N., Myöhänen H., Lehtivarjo A.-K., Pellinen R., Turunen M.P., Ylä-Herttuala S., Pirinen E., Pitkänen A. Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased during epileptogenesis in the rat hippocampus // Neuroscience. 2009. V. 163. № 1. P. 316–328.
- Lahtinen L., Ndode-Ekane X.E., Barinka F., Akamine Y., Esmaeili M.H., Rantala J., Pitkänen A. Urokinase-type plasminogen activator regulates neurodegeneration and neurogenesis but not vascular changes in the mouse hippocampus after status epilepticus // Neurobiol. Dis. 2010. V. 37. № 3. P. 692–703.
- *Levitt P.* Disruption of interneuron development // Epilepsia. 2005. V. 46. № s7. P. 22–28.
- Lino N., Fiore L., Rapacioli M., Teruel L., Flores V., Scicolone G., Sánchez V. uPA-uPAR molecular complex is involved in cell signaling during neuronal migration and neuritogenesis // Dev. Dyn. 2014. V. 243. № 5. P. 676—689.

- Matsuda T., Cepko C.L. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 1. P. 16–22.
- Merino P., Diaz A., Jeanneret V., Wu F., Torre E., Cheng L., Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) binding to the uPA receptor (uPAR) promotes axonal regeneration in the central nervous system // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. № 7. P. 2741–2753.
- Miyazaki Y., Song J.W., Takahashi E. Asymmetry of radial and symmetry of tangential neuronal migration pathways in developing human fetal brains // Front. Neuroanat. 2016. V. 10. № JAN. P. 2.
- Ndode-Ekane X.E., Pitkänen A. Urokinase-type plasminogen activator receptor modulates epileptogenesis in mouse model of temporal lobe epilepsy // Mol. Neurobiol. 2013. V. 47. № 3. P. 914–937.
- Owen K.A., Qiu D., Alves J., Schumacher A.M., Kilpatrick L.M., Li J., Harris J.L., Ellis V. Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA // Biochem. J. 2010. V. 426. № 2. P. 219–228.
- Pitkänen A., Ndode-Ekane X.E., Łukasiuk K., Wilczynski G.M., Dityatev A., Walker M.C., Chabrol E., Dedeurwaerdere S., Vazquez N., Powell E.M. Neural ECM and epilepsy // Prog. Brain Res. 2014. V. 214. P. 229–262.
- Powell E.M., Campbell D.B., Stanwood G.D., Davis C., Noebels J.L., Levitt P. Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy, and behavioral dysfunction // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 2. P. 622–631.
- Powell E.M., Mars W.M., Levitt P. Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon // Neuron. 2001. V. 30. № 1. P. 79–89.
- Roll P., Rudolf G., Pereira S., Royer B., Scheffer I.E., Massacrier A., Valenti M.-P., Roeckel-Trevisiol N., Jamali S., Beclin C., Seegmuller C., Metz-Lutz M.-N., Lemainque A., Delepine M., Caloustian C., Martin A. de Saint, Bruneau N., Depétris D., Mattéi M.-G., Flori E., Robaglia-Schlupp A., Lévy N., Neubauer B.A., Ravid R., Marescaux C., Berkovic S.F., Hirsch E., Lathrop M., Cau P., Szepetowski P. SRPX2 mutations in disorders of language cortex

- and cognition // Hum. Mol. Genet. 2006. V. 15.  $\mathbb{N}_{2}$  7. P. 1195–1207.
- Rose C., Schwegler H., Hanke J., Yilmazer-Hanke D.M. Pregnancy rates, prenatal and postnatal survival of offspring, and litter sizes after reciprocal embryo transfer in DBA/2JHd, C3H/HeNCrl and NMRI mice // Theriogenology. 2012. V. 77. № 9. P. 1883–1893.
- Russo A.J., Pietsch S.C. Decreased hepatocyte growth factor (HGF) and gamma aminobutyric acid (GABA) in individuals with obsessive-compulsive disorder (OCD) // Biomark. Insights. 2013. V. 8. P. BMI.S11931.
- Sauvageot C.M., Stiles C.D. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis // Curr. Opin. Neurobiol. 2002. V. 12. № 3. P. 244–249.
- Semina E., Rubina K., Sysoeva V., Rysenkova K., Klimovich P., Plekhanova O., Tkachuk V. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching // Eur. J. Cell Biol. 2016. V. 95. № 9. P. 295–310.
- Shmakova A.A., Rubina K.A., Rysenkova K.D., Gruzdeva A.M., Ivashkina O.I., Anokhin K. V., Tkachuk V.A., Semina E.V. Urokinase receptor and tissue plasminogen activator as immediate early genes in pentylenetetrazole-induced seizures in the mouse brain // Eur. J. Neurosci. 2019. P. ejn.14584.
- Smith H.W., Marshall C.J. Regulation of cell signalling by uPAR // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. V. 11. № 1. P. 23.
- Stiles J., Jernigan T.L. The basics of brain development // Neuropsychol. Rev. 2010. № 4. P. 327–348. https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4
- Valiente M., Marín O. Neuronal migration mechanisms in development and disease // Curr. Opin. Neurobiol. 2010. V. 20. № 1. P. 68–78. https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.12.003
- Wang T.-W., Zhang H., Gyetko M.R., Parent J.M. Hepatocyte growth factor acts as a mitogen and chemoattractant for postnatal subventricular zone-olfactory bulb neurogenesis // Mol. Cell. Neurosci. 2011. V. 48. № 1. P. 38–50.
- Zandifar A., Soleimani S., Iraji N., Haghdoost F., Tajaddini M., Javanmard S.H. Association between promoter region of the uPAR (rs344781) gene polymorphism in genetic susceptibility to migraine without aura in three Iranian hospitals // Clin. Neurol. Neurosurg. 2014. V. 120. P. 45–48.

### uPAR Overexpression in the Mouse Brain Stimulates the Migration of Neurons Into the Cortex during Embryogenesis

A. A. Shmakova<sup>1</sup>, A. V. Balatskiy<sup>1,4</sup>, M. A. Kulebyakina<sup>2</sup>, T. Schaub<sup>3</sup>, M. N. Karagyaur<sup>2</sup>, K. Yu. Kulebyakin<sup>2</sup>, K. D. Rysenkova<sup>1,2</sup>, V. S. Tarabykin<sup>3,5</sup>, V. A. Tkachuk<sup>1,2</sup>, and E. V. Semina<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Federal State Budgetary Organization National Cardiology Research Center Ministry of Health of the Russian Federation, Institute of Experimental Cardiology, 3rd Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121552 Russia

<sup>2</sup>Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy av. 27, bldg. 1, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup>Institute of Cell Biology and Neurobiology of Charité, Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, Berlin, 10117 Germany

- <sup>4</sup>Department of Laboratory Diagnostics, Medical Scientific and Educational Centre of Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy av. 27, bldg. 10, Moscow, 119991 Russia
  - <sup>5</sup>Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Gagarin av., 23, bldg. 7, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

\*e-mail: e-semina@yandex.ru

The regulation of neuronal migration in the cerebral cortex during embryonic development is one of the most important, but underinvestigated processes, which determines the correct formation of neural networks and the development of cognitive functions. Mutations of the urokinase receptor (uPAR) gene in mice lead to spontaneous seizures; polymorphisms of the *PLAUR* gene encoding uPAR in humans are associated with autism spectrum disorders. We have investigated the effect of uPAR overexpression on the radial migration of neurons in the cerebral cortex during mouse embryogenesis. The number of neurons migrating from the ventricular zone of proliferating progenitors to the outer layers of the cerebral cortex was evaluated. We found that uPAR overexpression significantly stimulates radial neuronal migration to the outer layers of differentiating cortex. These data for the first time show uPAR-dependent regulation of neuronal migration in the embryonic period of the cerebral cortex development. Further study of uPAR role in regulating the migration trajectory of neuronal precursors will advance our understanding of the mechanisms of brain formation in health and disease.

Keywords: urokinase system, urokinase receptor, neuronal migration, embryogenesis of the brain, in utero electroporation

#### **———** ПОТЕРИ НАУКИ **—**

УЛК 591.3

#### ИРИНА ВАСИЛЬЕВНА УРЫВАЕВА (1939-2020)



3 сентября 2020 г. скончалась Ирина Васильевна Урываева, доктор биологических наук, более 50 лет она была сотрудником Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Окончив 1-й Московский медицинский институт, И.В. Урываева была принята в аспирантуру Института морфологии человека АМН, но вскоре перешла в Лабораторию цитологии Института морфологии животных им. А.Н. Северцова, где сразу включилась в исследование клеточной полиплоидии в печени грызунов. Это направление исследований стало для нее главным на всю жизнь. И.В. Урываева стала крупнейшим специалистом по печени млекопитающих. В область научных интересов Ирины Васильевны помимо полиплоидизации клеток входило изучение амитоза и стволовых клеток печени.

Под руководством В.Я. Бродского в 1966 г. И.В. Урываева защитила диссертацию на степень кандидата медицинских наук: "Многоядерные клетки. Вопросы полиплоидизации и прямого деления ядер". В 1987 г. состоялась защита ее диссертации на степень доктора биологических наук "Клеточное размножение и полиплоидия в печени". Ирина Васильевна успешно проводила исследования со многими цитологами лаборатории и с сотрудниками Института цитологии РАН, где работы по клеточной полиплоидии широко проводили до недавнего времени.

Благодаря выдающимся исследованиям И.В. Урываевой Лаборатория цитологии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН стала ведущим центром по изучению клеточной полиплоидии, а ее работы приобрели всемирную известность. После публикации обстоятельного обзора по полиплоидии в International Review Cytology (V.Y. Brodsky and I.V. Uryvaeva "Cell Polyploidy: Its Relation to Tissue Growth and Function". 1977. V. 50. P. 275-332) по предложению Кембриджского университета в серии книг по биологии развития в 1985 г. вышла в свет монография: V.Y. Brodsky and I.V. Uryvaeva "Genome Multiplication in Growth and Development", Cambridge University Press.

Талантливый экспериментатор, виртуозно выполнявший сложнейшие операции на печени грызунов, Ирина Васильевна была склонна к существенным теоретическим обобщениям. В ее работах было показано, что полиплоидизация встречается в той или иной степени во всех тканях млекопитающих, причем феномен полиплоидизации играет важную роль в процессах роста, регенерации и дифференциации клеток и тканей.

Ирина Васильевна Урываева останется в нашей памяти как яркая личность, глубоко интеллигентный человек, выдающийся клеточный биолог, крупнейший специалист в области изучения печени млекопитающих.

А.В. Васильев, В.Я. Бродский, В.В. Терских brodsky.idb@bk.ru