

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 611.013.1/2.

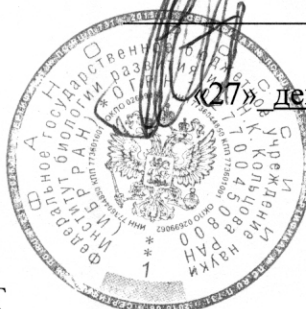
№ ИНГЗ 0108-2016-0006

№ НИОКТР АААА-А16-116120810091-2

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

\_\_\_\_\_ А.В. Васильев



«27» декабря 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 5. РЕГУЛЯЦИЯ ГАМЕТОГЕНЕЗА, ОПЛОДОТВОРЕНИЯ И РАННИХ ЭТАПОВ  
РАЗВИТИЯ У ЖИВОТНЫХ

(заключительный отчет)

Руководитель темы: д.б.н., г.н.с.

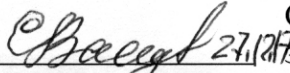
Васецкий 27.12.17 С.Г. Васецкий

подпись, дата

Москва, 2017


## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:  
Доктор биологических наук, г.н.с.


  
С.Г. Васецкий (введение,  
заключение)  
подпись, дата

Ведущие исполнители темы:

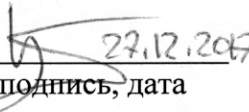
Кандидат биологических наук, н.с.

  
27.12.2017 Д.А. Никишин (раздел 1)  
подпись, дата

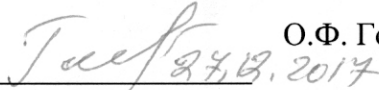
Кандидат биологических наук, с.н.с.

  
27.12.2017 Н.С. Мюге (раздел 2)  
подпись, дата

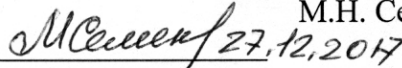
Кандидат биологических наук, с.н.с.

  
27.12.2017 А.Ю. Кулибин (раздел 3)  
подпись, дата

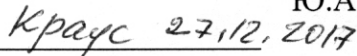
Доктор биологических наук, с.н.с.

  
27.12.2017 О.Ф. Гордеева (раздел 4)  
подпись, дата

Кандидат биологических наук, с.н.с.

  
27.12.2017 М.Н. Семенова (раздел 5)  
подпись, дата

Кандидат биологических наук, с.н.с.

  
27.12.2017 Ю.А. Краус (раздел 6)  
подпись, дата

## СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	4
Введение	5
Раздел 1. Регуляторные механизмы формирования половых клеток и ранних стадий зародышевого развития у позвоночных животных	6
Раздел 2. Изучение процессов дифференцировки и дедифференцировки клеток Сертоли мышцы	14
Раздел 3. Механизмы детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих и человека	18
Раздел 4. Использование зародышей морского ежа для поиска веществ с антимитотическим действием, обусловленным дестабилизацией микотрубочек.	19
Раздел 5. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза в развитии представителей низших многоклеточных животных.	24
Заключение	30
Публикации по теме	32

## Реферат

Отчет 33 с, 9 рис, 1 табл, 20 источников (в том числе, 10 публ по теме)

Ключевые слова: нейротрансмиттеры, серотонин, зародышевое развитие, клетки Сертоли, соматические клетки, половые клетки, плюрипотентные стволовые клетки, тератокарциномы, вещества с антимитотическим действием, дестабилизация микротрубочек, морфогенез, низшие многоклеточные животные, млекопитающие, человек.

Проведен полный обзор экспрессии мРНК всех компонентов серотонинергической системы в фолликулярных клетках; исследована динамика их экспрессии в ходе фолликулогенеза, и при лютеинизации; проведено исследование экспрессии и функциональной активности мембранного транспортера серотонина Sert в развивающемся овариальном фолликуле мыши.

Изучен компартмент семенника мыши, содержащего сеть семенника и транзиторную зону, в постэмбриональном развитии; проведен анализ пролиферативной активности КС и клеток сети семенника у мышей разных возрастов; изучена экспрессия цитокератина 8/18 в ТЗ КС *in vivo* и *in vitro*, а также осуществлена проверка способности ТЗ КС формировать семенные каналцы и поддерживать развитие половых клеток в условиях 3D культуры.

Для исследования механизмов неполной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток был проведен анализ потенциала к дифференцировке и опухолевому росту эмбриональных стволовых и тератокарциномных клеток.

На тест-системе зародышей морского ежа проведен оригинальный фенотипический скрининг, позволяющий быстро идентифицировать молекулы, способные нарушать деление клеток, и дающий информацию о механизме антимитотической активности и клеточной мишени. Данная тест-система предоставляет возможность выявлять: а) дестабилизаторы микротрубочек, или ингибиторы полимеризации тубулина; б) вещества с антипролиферативной/антимитотической активностью, не связанной с нарушением структуры и функции микротрубочек; в) молекулы, избирательно воздействующие на различные процессы дифференцировки и морфогенеза; г) соединения, обладающие системной токсичностью.

Проведены эксперименты по диссоциации-реагрегации эмбрионов актинии *Nematostella vectensis* для проверки уровня регуляторных возможностей эмбриональных клеток квидарий,

## Введение

Исследование предзародышевого и зародышевого развития позвоночных животных – оогенеза, сперматогенеза, оплодотворения и ранних этапов развития, регуляции морфогенеза – имеет большое значение не только для фундаментальной науки, но и для понимания причин возникновения различных аномалий и, как следствие, для применения полученных знаний в прикладной биологии, в частности для реализации программ по сохранению и воспроизводству редких и исчезающих видов животных, по развитию вспомогательных репродуктивных технологий у человека, для понимания механизмов тератогенеза и регенерации, для разработки новых тест-систем с целью оценки эмбриотоксичности новых лекарственных средств и для поиска новых синтетических и природных веществ с антипролиферативной активностью с перспективой их использования в химиотерапии онкологических заболеваний. Для разработки этих вопросов необходимо изучение потенциала развития ооцитов и яйцеклеток в условиях *in vitro* и *in vivo* и, в частности, регуляции созревания и овуляции яйцеклеток, активации и оплодотворения у позвоночных животных и человека, сперматогенеза и регенерации сперматогенного эпителия, детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих и человека, а также изучение клеточных и молекулярных механизмов морфогенеза в развитии представителей низших многоклеточных животных. В этих направлениях уже получены важные результаты, позволяющие надеяться на успешное решение поставленных задач, что обусловлено, во-первых, применяемыми оригинальными подходами и, во-вторых, использованием современных адекватных методов, включая методы экспериментальной эмбриологии, биохимии и молекулярной биологии.

## **Раздел 1. Регуляторные механизмы формирования половых клеток и ранних стадий зародышевого развития у позвоночных животных**

### **Введение**

На различных моделях показано, что серотонин обладает активирующим действием на функционирование фолликулярных клеток, в том числе у человека. Конкретные механизмы функционирования серотонинергической сигнальной системы в компонентах овариальных фолликулов описаны в литературе далеко не полно. Данных о динамике экспрессии компонентов серотонинергической системы в развивающемся овариальном фолликуле фактически нет, так как большая часть работ выполнена на фолликулярных клетках, выделенных из преовуляторных фолликулов, или ооцит-кумулясных комплексах.

Важным для понимания регуляторной функции серотонина является вопрос об источнике серотонина в овариальном фолликуле. Потенциальными источниками экзогенного по отношению к овариальному фолликулу серотонина являются тромбоциты кровяного русла, тучные клетки, локализующиеся в строме яичника, а также немногочисленные нервные волокна, сопровождающие крупные медуллярные сосуды. Одним из вероятных механизмов накопления серотонина в тканях яичника является его захват из межклеточной среды с помощью специфического мембранного транспортера Sert (Slc6a4). Известно, что этот транспортер экспрессируется и обладает специфической активностью в зрелых ооцитах, доимплантационных эмбрионах и клетках кумулюса. Однако пока неизвестно, в каких конкретно клеточных компонентах яичника экспрессируется транспортер серотонина и активен ли он на ранних стадиях оогенеза. Тем не менее, существуют литературные данные о возможной роли мембранного транспорта серотонина в регуляции функциональной активности яичника. У мышей, с нокаутом гена транспортера серотонина Sert, угнетена экспрессия ароматазы Cyp19a1 и, как следствие, уменьшается содержание эстрадиола в крови. Приведенные данные, однако, не отвечают на вопрос, каким образом реализуются эти эффекты – непосредственно путем прямого воздействия на яичник или косвенно через мозг и гипоталамо-гипофизарную систему.

С целью решения этих вопросов, и для устранения имеющихся пробелов, нами были поставлены следующие задачи на 2017 год:

- полный обзор экспрессии мРНК всех компонентов серотонинергической системы в фолликулярных клетках;
- исследование динамики их экспрессии в ходе фолликулогенеза, и при лютеинизации;
- исследование экспрессии и функциональной активности мембранного транспортера серотонина Sert в развивающемся овариальном фолликуле мыши.

## Материал и методы

В работе использовали самок мышей-гибридов F1 линий C57BL/6J и CBA/J в возрасте 2-4 мес. Содержание лабораторных животных и проведение экспериментов проводилось в соответствии с международными правилами в одинаковых стандартных условиях вивария, получение материала проводили с применением стандартных методик.

Для молекулярно-генетического анализа первичные многослойные фолликулы размером 100-175 мкм изолировали механически двумя острыми иглами и диссоциировали на клетки в растворе коллагеназы I и ДНКазы I. Клетки гранулезы из антральных и преовуляторных фолликулов размером 200-250 мкм и 400-450 мкм, соответственно, получали посредством пункции тонкой иглой. Желтые тела выделяли микрохирургически из яичников беременных (5,5 сут.) самок. Положительный контроль – РНК, выделенная из целого плода на 18 день эмбрионального развития. Тотальную РНК из полученных проб выделяли тризольным методом и обрабатывали ДНКазой I. Библиотеки кДНК синтезировали с помощью ревертазы M-MLV, с использованием рандомных гексаолигонуклеотидов. ПЦР проводили с применением HotStartTaq-полимеразы. Продукты ПЦР анализировали с помощью агарозного гель-электрофореза. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе 7500 Real-TimePCRSystem с использованием смеси, содержащей интеркалирующий краситель SYBRGreen и пассивный референсный краситель ROX. Относительную экспрессию генов рассчитывали методом dCt, с нормировкой по контрольному гену Hprt. Специфические олигонуклеотиды для проведения ПЦР (представлены в Табл. 1) подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST с учетом экзон-интронной структуры генов. Каждый эксперимент проведен в пяти повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе GraphpadPrism 5 с применением U критерия Манна-Уитни.

**Таблица 1.** Специфические олигонуклеотиды для проведения ПЦР. Температура отжига для всех праймеров 60°C

Название гена NCBIGeneID	Последовательности прямых (f) и обратных (r) праймеров (5'→3')	Длина продукта ПЦР, пн
Tph1 21990	f TGCGACATCAGCCGAGAACAGT r GGCGCAGAAGTCCAGGTCAGA	162
Tph2 216343	f CATGGCTCCGACCCCTCTACA r ATACGCCCGCAGTTGACCCCTT	219
Ddc 13195	f TCCCCACGGCTAGCTCATACCC r TCCCCAGCCAGTCCATCATCA	133
Sert (Slc6a4) 15567	f GGGAGACCTGGGGCAAGAAG r CAGGGCGAGCTCCATGTAGAAGA	182
Vmat1 (Slc18a1) 110877	f AGAGGCCACGAAGGAGTT r TGCCAGAGGAGAGGAAAGT	180
Vmat2 (Slc18a2) 214084	f CCACTGTCCAGCTCCTACCAACC r GGCGATCAGCAGGAAGGCATAGC	149

Maoa 17161	f GCTGAGGAATGGGACAAGATAACC r TACCTCCACACTGCCTCACATAACC	166
Htr1a 15550	f TGCCAGCGAATCAGGAG r GCCAAAGACCGAGCCAATAA	374
Htr1b 15551	f GACCCGAGCCAGTTGATA r TAGCGGCCATGAGTTTCTTC	170
Htr1d 15552	f ACCCGCACCTGGAACCTT r CAGACGGCCGCAATCAT	188
Htr1f 15557	f CCAAGGAACTAGCCGTGATGATGA r AGGGTAGTGGCTGCTTTGCGTTCT	396
Htr2a 15558	f GAAAATCATTGCGGTGTGGAC r ATGATGGTTAGGGGGATGAAAAA	168
Htr2b 15559	f GAGGGACAGGGGCATACAGT r CAATCGGCATCACAACAATC	401
Htr2c 15560	f GTGCTATTTTCAACTGCGTCCATC r AACACTTTGCTTTCGTCCCTCAG	200
Htr3a 15561	f TGGCGATCACCGGAAGAAGT r AGGAAGATACTGGGCAGCAAGAGG	200
Htr4 15562	f TACCACAGCATCGATCTTTCACCT r ACCCAGCAGCCTCCCAACATT	132
Htr5a 15563	f GCAAGCGTGTCTCCAATGTGATGA r GGGTACGGGGGAGACGCTGTT	276
Htr5b 15564	f CCTCTGGCGGTGGTGTCTCTTC r CTCGGCGACGGGCTGTGA	157
Htr6 15565	f AACTGGGCAAAGCTCGAACATCTG r CCGTAGCCGTGCCCGTGGTGAG	192
Htr7 15566	f TCCCGTCTAGGCTTTGTGGTA r TGTTCGCTGATGACTGGTTTCT	161
Hprt 15452	f GCTGAGGCGGCGAGGGAGAG r GCTAATCACGACGCTGGGACTGC	148

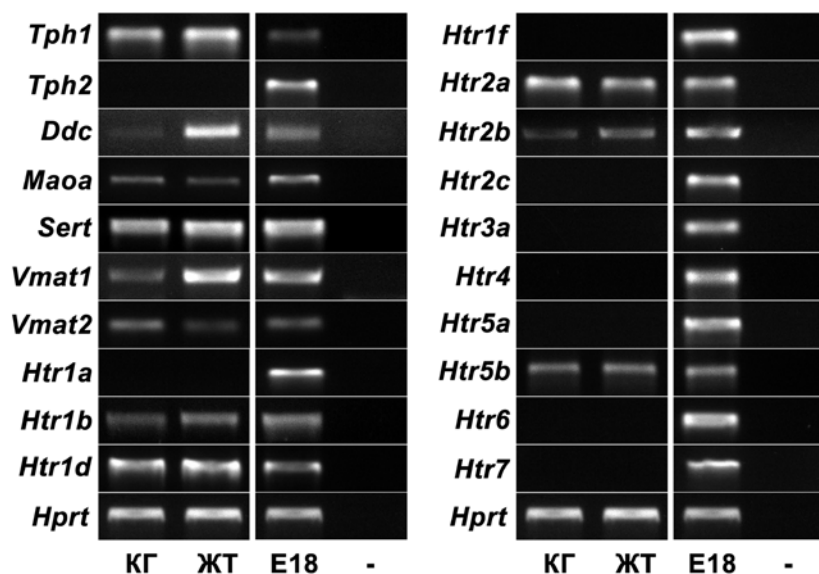
Яичники для исследования локализации серотонина и мембранного транспортера Sert-методами иммуногистохимии и гибридизации *insitu* фиксировали в 4% параформальдегиде, после чего получали криосрезы толщиной 10 мкм. Для исследования функциональной активности мембранного транспорта серотонина мышам предварительно ежедневно в течение 5 дней подкожно вводили серотонин (25 мг/кг). Смысловой и антисмысловой РНК-зонды, меченые дигоксигенином, синтезировали путем транскрипции *in vitro*. В качестве матрицы использовали линейаризованную плазмиду pAL2-T, в которую был клонирован продукт ПЦР (1033 пн), полученный с помощью следующих праймеров: прямой 5`-GGGATGAAGCGCCACACTCTACG-3` и обратный 5`-TCTTTGGCCACCTCGGACACG-3`. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов проводили поликлональными антителами кролика против серотонина (AB938 Milipore) или против Sert (ab174770 Abcam), и вторичными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с дальним красным флуорофором AlexaFluor®



647 (ab150079 Abcam). Препараты просматривали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5.

## Результаты и обсуждение

В результате проведенного ОТ-ПЦР исследования экспрессии всех основных компонентов серотонинергической сигнальной системы (Рис. 1) было обнаружено, что в клетках гранулы преовуляторных фолликулов и желтых тела экспрессируется мРНК ряда ключевых компонентов серотонинергической системы. Среди них гены ферментов триптофангидроксилазы *Tph1*, декарбоксилазы ароматических аминокислот *Ddc* и моноаминоксидазы *Maoa*, транспортеров *Sert*, *Vmat1* и *Vmat2*, рецепторов серотонина *Htr1b*, *Htr1d*, *Htr2a*, *Htr2b*, *Htr5b* и *Htr7*. Гены *Tph2*, *Htr1a*, *Htr1f*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr5a* и *Htr6* не экспрессируются в исследуемых пробах. Таким образом, в фолликулярных клетках развивающегося овариального фолликула экспрессируется целый ряд компонентов серотонинергической системы, которые могут составить функционально полноценную сигнальную систему. Полученные результаты позволяют полагать, что в фолликулярных клетках активны системы мембранного и везикулярного транспорта, деградации и рецепции серотонина, а в желтых телах, возможно, появляется синтез транмиттера.

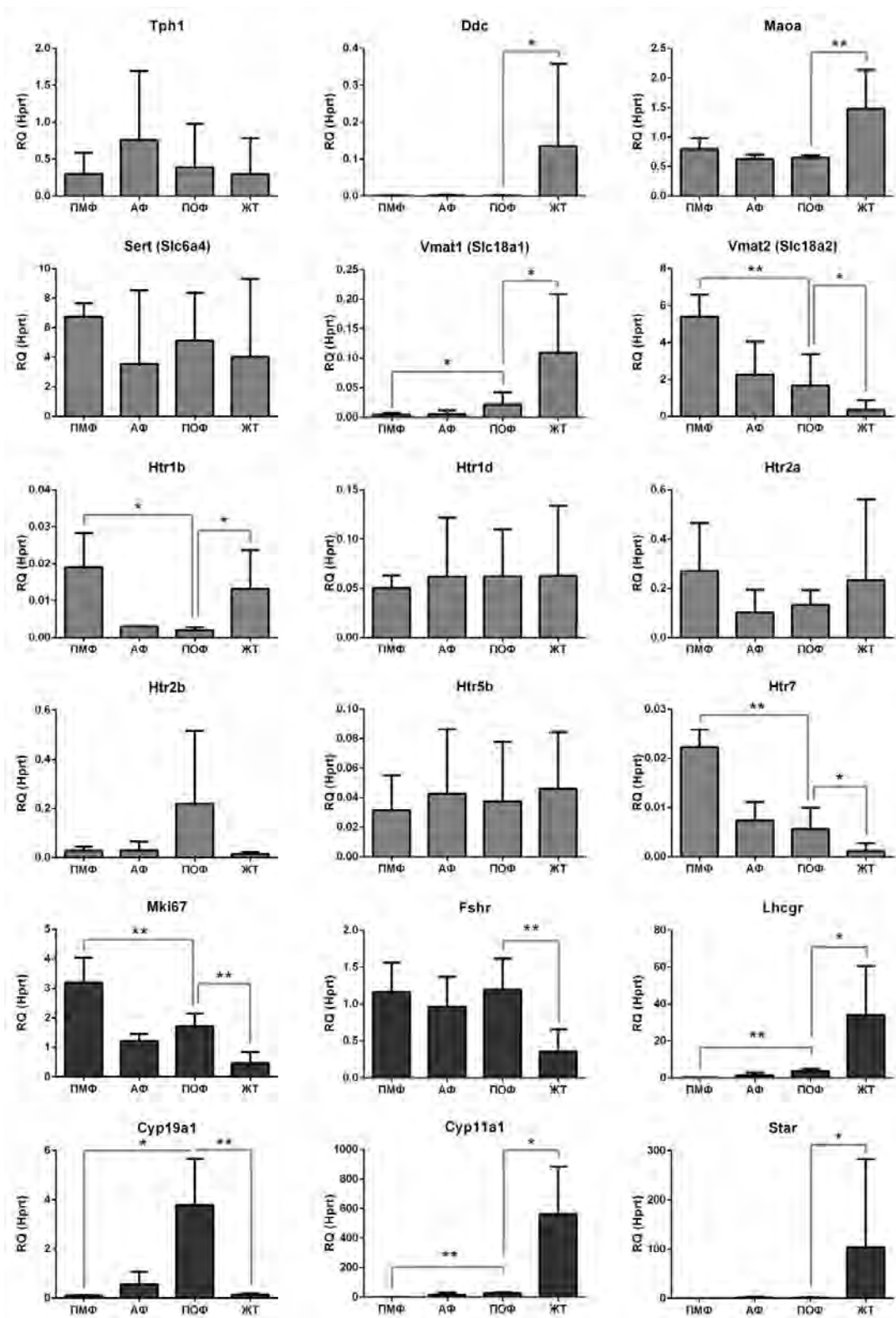


**Рисунок 1.** Экспрессия компонентов серотонинергической системы в клетках гранулы (КГ) развивающегося овариального фолликула и желтом теле (ЖТ). Положительный контроль – эмбрион 18 дней внутриутробного развития (E18), отрицательный контроль – ПЦР без матрицы (-). Контрольный ген домашнего хозяйства – гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза *Hprt*.

Динамика экспрессии гена является важным показателем его функциональной активности. Выраженные изменения уровня экспрессии гена могут свидетельствовать о его функциональной активности на той или иной стадии. Для выявления динамики экспрессии мРНК генов серотонинергической системы в ходе фолликулогенеза и оценки изменения их экспрессии при лютеинизации был проведен количественный анализ методом ПЦР в реальном времени (Рис. 2).

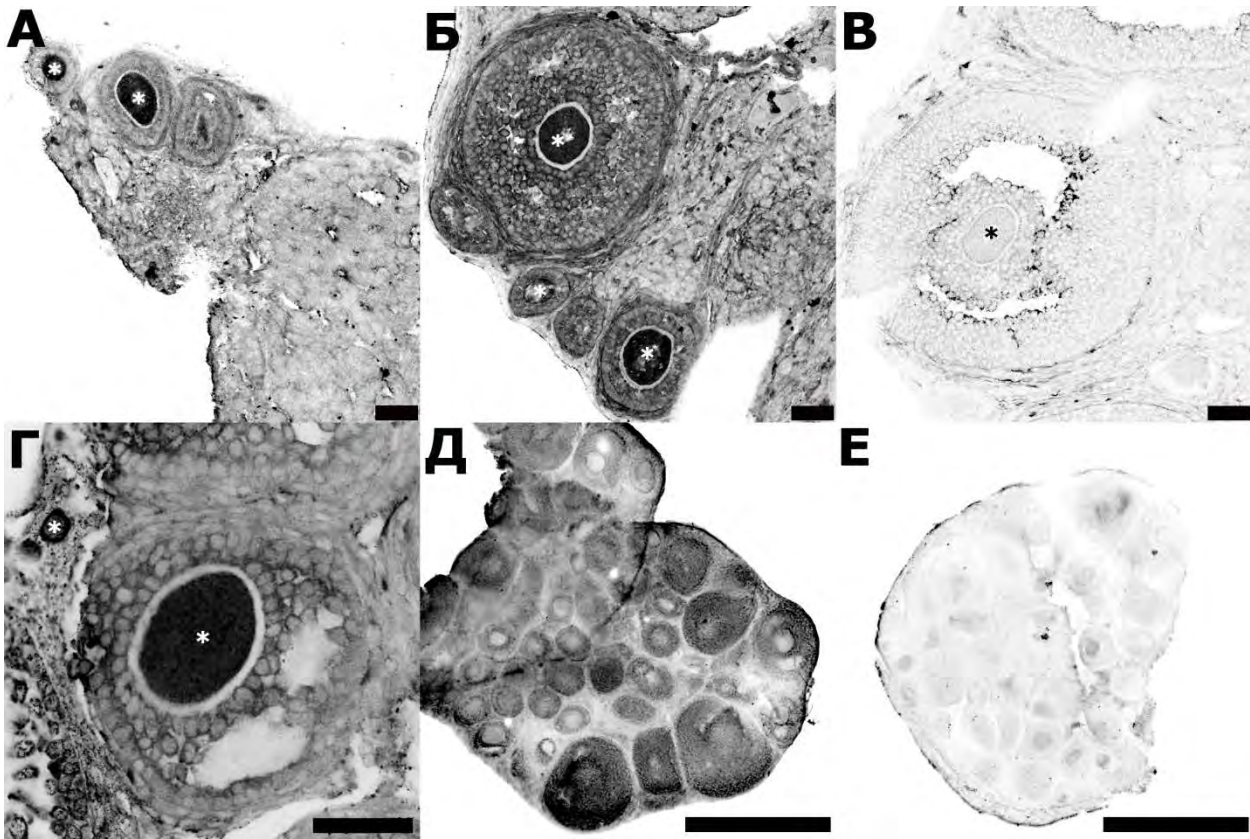
Полученные результаты свидетельствуют о том, что ряд генов серотонинергической системы – *Tph1*, *Ddc*, *Maoa*, *Sert*, *Htr1d*, *Htr2a*, *Htr2b* – не обладают выраженной динамикой экспрессии в ходе фолликулярного роста. Это справедливо и для генов рецептора фолликулостимулирующего гормона *Fshr* и гена *Star*. При этом для мРНК гена *Vmat1* наблюдается тенденция к увеличению количества на поздних стадиях, что характерно для таких маркеров функционального состояния фолликулярных клеток, как рецептор лютеинизирующего гормона *Lhcgr* и ключевые ферменты синтеза стероидных гормонов *Cyp11a1* и *Cyp19a1*. Это может указывать на роль *Vmat1* в регуляции стероидогенной активности фолликулярных клеток на поздних стадиях фолликулогенеза. В то же время, относительное количество мРНК генов *Vmat2*, *Htr1b* и *Htr7* уменьшается в ходе фолликулогенеза. Такая же динамика прослеживается для маркера пролиферации *Mki67*. Это может говорить о возможной роли этих генов в регуляции пролиферативной активности клеток гранулезы на ранних стадиях фолликулогенеза. В пользу этого предположения говорит то, что серотонин является регулятором пролиферативной активности различных типов клеток, как в норме, так и при патологиях.

В норме после овуляции фолликулярные клетки достигают терминальной стадии дифференцировки и становятся большими клетками желтого тела. Преждевременная лютеинизация известна как одна из причин бесплодия и считается негативным явлением при культивировании клеток гранулезы. Процесс лютеинизации сопряжен с изменением уровня экспрессии ряда генов. В желтых телах, по сравнению с клетками гранулезы преовуляторного фолликула, экспрессия генов *Tph1*, *Sert*, *Htr1d*, *Htr2a* и *Htr2b* значимо не изменяется. Однако для генов *Htr1b*, *Maoa*, *Vmat1*, *Ddc* наблюдается увеличение относительной экспрессии, как и в случае классических маркеров лютеинизации *Lhcgr*, *Star*, *Cyp11a1*, что говорит о возможной роли перечисленных генов в функционировании желтого тела. Количество мРНК генов *Htr7*, *Vmat2*, также как и маркеров функционального состояния фолликулярных клеток *Mki67*, *Cyp19a1* и *Fshr*, уменьшается при лютеинизации. Именно эти гены можно считать возможными эффекторами серотонинергической регуляции функционального состояния фолликулярных клеток во время фолликулогенеза.



**Рисунок 2.** Динамика экспрессии компонентов серотонинергической системы (светло-серые) и маркеров функциональной активности фолликулярных клеток (темно-серые) в клетках гранулезы в ходе фолликулогенеза и при лютеинизации. ПМФ – первичные многослойные фолликулы, АФ – антральные фолликулы, ПОФ – преовуляторные фолликулы, ЖТ – желтое тело. Относительная экспрессия (RQ) генов нормирована по гену домашнего хозяйства Hprt. M±SD. Статистическая значимость по U критерию Манна-Уитни: \* p<0,1; \*\* p<0,05.

При иммуногистохимическом окрашивании криосрезов яичника мыши антителами против серотонина было выявлено, что трансмиттер локализуется в овариальных фолликулах – как в ооцитах, так и в окружающих его клетках гранулезы и теки (Рис. 3А). Иммунореакция против серотонина также выявляется в строме яичника – в кровеносных сосудах и тучных клетках. При предварительном введении серотонина подкожно в течение пяти дней наблюдается увеличение степени иммунореактивности, но локализация серотонина при этом остается неизменной. Таким образом, мембранный транспорт серотонина активен в яичнике и локализуется в развивающихся овариальных фолликулах. Для подтверждения наличия экспрессии мРНК мембранного транспортера серотонина в яичнике была проведена гибридизация *in situ*. Позитивная реакция выявляется как в овариальных фолликулах на всех стадиях фолликулярного роста, так и в желтых телах (Рис. 3Б). Интересно, что в пределах фолликула интенсивность реакции больше в клетках гранулезы, но гораздо менее выражена в ооцитах и клетках теки. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против Sert выявило, что транспортер локализуется в овариальных фолликулах, причем в гораздо большей степени иммунореактивность представлена в ооцитах (Рис. 3В). Иммунореактивность наблюдается как в растущих ооцитах, так и в ооцитах примордиальных фолликулов, находящихся в состоянии блока мейоза. Полученные результаты демонстрируют, что в овариальных фолликулах выявляется как мРНК транспортера серотонина, так и сам мембранный белок, а также его функциональная активность. Несмотря на то, что мРНК транспортера в большей степени выявляется в клетках гранулезы, белок и его активность выявляются на более высоком уровне в ооцитах. По всей вероятности, в данном случае имеет место регуляция экспрессии этого гена на уровне трансляции. Полученные результаты указывают на наличие и функциональную активность транспортера серотонина в развивающихся овариальных фолликулах и позволяют предполагать, что его регуляторная роль появляется уже на самых ранних этапах оо- и фолликулогенеза. Это представляет особый интерес в связи с потенциальным влиянием широко распространенных антидепрессантов из ряда ингибиторов обратного захвата серотонина на репродуктивную функцию.



**Рисунок 3.** Серотонин и его мембранный транспортер Sert в яичнике мыши. А-Б иммуноокрашивание серотонина в нативном яичнике (А) и в яичнике самки после 5-дневной системной введения серотонина (Б); В – негативный контроль иммуногистохимического окрашивания без первичных антител; Г – иммуноокрашивание мембранного транспортера серотонина Sert; Д – выявление экспрессии мРНК Sert в яичнике методом гибридизации *in situ*; Е – негативный контроль гибридизации *in situ* с использованием смыслового зонда. \* - ооциты. Масштабный отрезок: А-Г – 50 мкм; Д-Е – 500 мкм.

## **Раздел 2. Изучение процессов дифференцировки и дедифференцировки клеток Сертоли мышши**

### **Введение**

По данным ВОЗ, в мире около 15% пар страдает бесплодием, причем в 50% случаев причиной бесплодия являются нарушения мужской репродуктивной функции. Одной из причин развития мужского бесплодия является гибель или нарушение функции поддерживающих клеток сперматогенной системы, клеток Сертоли (КС). КС образуют нишу для стволовых сперматогенных клеток, необходимы для поддержания развития половых клеток вплоть до образования сперматозоидов, а также выполняют в мужских гонадах ряд других важных функций, таких как структурная и иммуносупрессирующая. КС было принято считать не возобновимой терминально дифференцированной клеточной популяцией у взрослых млекопитающих, и в том числе человека. Однако исследования последнего десятилетия заставили взглянуть на дифференцировку КС с новой стороны. Выяснилось, что она до некоторой степени обратима. Так, повышение температуры приводит к разборке гематотестикулярного барьера, являющегося одним из отличительных признаков дифференцировки КС, а длительное изменение гормонального фона в организме способствует вступлению части КС в клеточный цикл. Кроме того, нами в семенниках половозрелых мышшей была обнаружена минорная популяция недифференцированных клеток, способных к активной пролиферации в культуре, и в то же время экспрессирующих все основные маркеры КС – КС транзитной зоны (ТЗ КС). Отличительным свойством этих клеток является сниженная экспрессия *Dmrt1*, транскрипционного фактора, участвующего в дифференцировке КС. Эти клетки располагаются в компартменте семенника, где происходит переход извитых семенных канальцев в сеть семенника, по которой сперматозоиды транспортируются в выносящие канальцы. Помимо фундаментальной значимости, изучение ТЗ КС имеет значение для биомедицинских исследований, так как эти клетки могут стать источником поддерживающих соматических клеток для технологии сперматогенеза *in vitro*, а также других клеточных технологий в области репродуктивной биологии.

Однако до настоящего времени область семенника, включающая в себя ТЗ КС, была изучена только на морфологическом и ультраструктурном уровнях. Нет данных о специфических белковых маркерах этой области, степени дифференцировки ее клеток и уровне их пролиферативной активности в онтогенезе. Однако, по нашим предварительным данным (ПЦР анализ), одними из возможных маркеров ТЗ КС являются белки промежуточных филаментов цитокератин 8 и 18, последний экспрессируется в недифференцированных пролиферирующих КС млекопитающих и человека, а также появляется у КС взрослых экспериментальных животных после теплового воздействия, имитирующего крипторхизм человека и вызывающего частичную дедифференцировку КС.

В связи с перечисленным выше, задачами исследования на 2017 г. стали: изучение компартмента семенника мыши, содержащего сеть семенника и транзиторную зону, в постэмбриональном развитии; анализ пролиферативной активности КС и клеток сети семенника у мышей разных возрастов; изучение экспрессии цитокератина 8/18 в ТЗ КС *in vivo* и *in vitro*, а также проверка способности ТЗ КС формировать семенные каналы и поддерживать развитие половых клеток в условиях 3D культуры.

### **Материал и методы**

**Животные.** В работе использовали самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2, 4, 6, 9, 12, 18, 25, 38, 45 и 60 сут, а также самцов мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J, экспрессирующих GFP под промотором гена бета-актина, в возрасте 60 сут. Мышей содержали в стандартных условиях вивария с режимом день/ночь 12 ч/12 ч, воду и корм животные получали *ad libitum*. Все эксперименты с животными проводились в соответствии с нормами, изложенными в “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” и в “Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных” Комиссии по биоэтике ИБР РАН.

Иммунофлуоресцентная окраска криосрезов семенников, 2D культур ТЗ КС, 3D кокультур ТЗ КС и клеток яичек мышат и тотальных препаратов семенников 2-3-месячных мышей. Образцы фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и окрашивали в соответствии с рекомендациями фирм-производителей антител. Использовали первичные антитела против Wt1 (Santa Cruz, США, 1 : 100), Dmrt1 (Santa Cruz, 1 : 50), BrdU (Santa Cruz, 1 : 100), цитокератина 8/18 (Abcam, Великобритания, 1 : 200), DDX4 (Abcam, 1 : 200), Sox9 (Millipore, США, 1 : 200), виментина (Thermo Fisher Sci, США, 1 : 500) и GFP (Thermo Fisher Sci, 1 : 500) и соответствующие им вторичные антитела, конъюгированные с AlexaFluor меткой (Thermo Fisher, США, 1 : 500). Препараты просматривали и фотографировали на эпифлуоресцентном микроскопе Keyence BZ-9000 (Япония) или на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5.

2D и 3D клеточные культуры. 2D культуру ТЗ КС получали из семенников 2-3-месячных мышей по ранее описанной методике (Kulibin, Malolina, 2016, doi: 10.1530/REP-16-0013). Для 3D культуры ТЗ КС получали из семенников 2-3-месячных GFP мышей и, на 5-е сут 2D культивирования, соединяли их с одноклеточной суспензией семенников 4-суточных C57Bl/6 мышей в коллагеновом геле по методике, описанной ранее (Kulibin, Malolina, 2016, doi: 10.1530/REP-16-0013).

### **Результаты и обсуждение**

Компартмент семенника, содержащий ТЗ КС и сеть семенника, был изучен с помощью иммунофлуоресцентного метода. Установлено, что на маркер КС транскрипционный фактор Wt1 положительно окрашиваются не только КС извитых семенных канальцев, но и клетки сети

семенника 2, 4, 6, 9, 12, 18 и 25-суточных мышей. Собственно транзиторная зона как концевой участок семенного канальца, в котором последовательно исчезают дифференцированные половые клетки, начинает быть отчетливо видна, начиная с 18-х сут постнатального развития. Начиная с 25-х сут, экспрессия *Wt1* в клетках сети семенника значительно снижается, в то время как в КС семенных канальцев и в транзиторных зонах остается на высоком уровне (Рис. 1 А, сравнить уровень окраски в СК и КС). Экспрессия *Wt1* в клетках сети семенника практически не детектируется, начиная с 38 сут постэмбрионального развития мыши: только в единичных клетках наблюдается слабый положительный сигнал, не сравнимый с ярким окрашиванием КС семенных канальцев (Рис. 1 Б). Другой маркер КС *Sox9* ведет себя схожим образом, и у 60-суточных мышей экспрессируется в сети семенника на значительно более низком уровне, чем в извитых семенных канальцах.

Чтобы изучить экспрессию *Dmrt1* в КС мыши были проведены двойные иммунофлуоресцентные окраски срезов семенников на *Wt1* и *Dmrt1*, так как *Dmrt1* является маркером не только КС, но и гоноцитов и недифференцированных сперматогониев. На все проанализированные сроки (2, 4, 6, 9, 12, 18, 25, 38, 45 и 60 сут постэмбрионального развития) окраска на *Dmrt1* отсутствовала в клетках сети семенника, вне зависимости от того, окрашивались они на *Wt1* или нет. КС семенных канальцев положительно окрашивались на *Dmrt1*, однако на ранние сроки уровень экспрессии *Dmrt1* в них сильно варьировал, такая же картина наблюдалась в зоне перехода семенных канальцев в сеть семенника. На 18 сут, когда впервые можно было выделить точные границы транзиторной зоны, в части канальцев ТЗ КС положительно окрашивались на *Dmrt1*, в то время как в других канальцах экспрессия *Dmrt1* в ТЗ КС резко снижалась до недетектируемого уровня (Рис. 1 В). Начиная с 25 сут постэмбрионального развития, ТЗ КС не окрашивались на *Dmrt1* уже во всех проанализированных канальцах (Рис. 1 Г).

Подсчеты включения BrdU метки, инъецировавшейся мышам за 1 сут до фиксации семенников, показали, что в период активных делений КС (2 и 6 сут постэмбрионального развития) уровень пролиферации клеток сети семенника был в 2–3 раза ниже, чем КС (Рис. 1 Д). На 12 и 18 сут, когда деления КС уже почти полностью прекратились, уровень пролиферации в семенных канальцах и сети семенника был одинаково низким. Отдельно была подсчитана доля BrdU+ клеток среди КС семенных канальцев, открывающихся в сеть семенника и, таким образом, имеющих в своем составе ТЗ КС. На 2 и 6 сут процент пролиферирующих клеток в таких канальцах не отличался от наблюдаемого в остальных семенных канальцах. В то же время на 18 сут уровень пролиферативной активности КС из семенных канальцев, содержащих транзиторную зону, был хоть и низким, но все же статистически значимо выше как уровня сети семенника, так и семенных канальцев без транзиторной зоны (Рис. 1 Д).



Анализ экспрессии цитокератинов 8/18, а также виментина, еще одного белка промежуточных филаментов, характерного для клеток мезодермального происхождения, в семенниках 60-суточных мышей показал, что цитокератины 8/18 экспрессируются в клетках прямых канальцев (начальный отдел сети семенника) и собственно в сети семенника, но отсутствуют в КС извитых семенных канальцев и в транзитной зоне. Напротив, виментин ярко окрашивает КС семенных канальцев и транзитной зоны, а в сети семенника его экспрессия резко падает (Рис. 2 А). Иммунофлуоресцентное окрашивание колоний ТЗ КС на цитокератины 8/18 в культуре продемонстрировало, что часть клеток в колониях экспрессируют цитокератины (Рис. 2 Б). Сравнивая результаты иммунофлуоресцентного анализа культур ТЗ КС и препаратов семенников, можно заключить, что цитокератин 8/18-положительные клетки сети семенника принимают участие в формировании колоний ТЗ КС в культуре, хотя бы отчасти.

Для тестирования способности ТЗ КС поддерживать развитие половых клеток их кокультурировали в 3D условиях с клетками семенников 4-суточных мышат. Последние служили источником половых клеток, а также перитубулярно-мышечных клеток и клеток Лейдига – дополнительных компонентов, необходимых для формирования семенных канальцев и поддержания функции половых клеток. Чтобы отличить клетки ТЗ КС от КС мышат в условиях кокультуры, культуры ТЗ КС получали от GFP мышей. Анализ 3D кокультур проводили с помощью иммунофлуоресцентного метода и конфокальной микроскопии. Установили, что на 7-е сут 3D-культуры Sox9-положительные клетки формируют канальцеподобные структуры *de novo*, причем многие из них GFP-положительны, то есть являются ТЗ КС. Как правило, эти клетки слабо экспрессируют Dmrt1 (Рис. 2 В). В канальцах, в окружении Sox9+/Dmrt1+ КС, встречались также группы Sox9-/Dmrt1+ клеток. Это сперматогонии (Рис. 2 Г). На 14-е сут культуры количество половых клеток увеличилось. Для их идентификации была использована окраска на белок DDX4, маркер половых клеток на всех стадиях дифференцировки. DDX4+ клетки формировали кластеры внутри семенных канальцев, сформированных GFP+ ТЗ КС и КС мышонка (Рис. 2 Д). Наиболее дифференцированными клетками, обнаруженными в культуре, были мейоциты, положительные на DDX4 и отрицательные на Dmrt1 клетки (Рис. 2 Е). В контрольных кокультурах, где с клетками мышонка смешивали GFP+ КС, полученные из извитых семенных канальцев, в сформированные *de novo* канальцы встраивались лишь единичные КС взрослых животных (Рис. 2 Ж). Так было продемонстрировано, что ТЗ КС способны не только принимать участие в формировании семенных канальцев *de novo*, но и поддерживать жизнеспособность и дифференцировку половых клеток внутри этих канальцев.

### Раздел 3. Механизмы детерминации соматических и половых клеток в раннем развитии млекопитающих и человека

Существенной проблемой для разработки безопасных терапий плюрипотентных стволовых клеток является неполная дифференциация *in vitro* плюрипотентных стволовых клеток и наличие остаточных недифференцированных клеток, инициирующих развитие тератомы после трансплантации у реципиентов.

Для исследования механизмов неполной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток был проведен анализ потенциала к дифференцировке и опухолевому росту эмбриональных стволовых и тератокарциномных клеток. Были выявлены существенные различия экспрессии генов *Nanog* и *Mvh*, а также факторов *ActivinA* и *BMP4* в ходе индуцированной дифференцировки эмбриональных стволовых и тератокарциномных клеток. Стимуляция сигнальных каскадов *Activin / Nodal* и *BMP* и ингибирование сигнальных путей *MEK / ERK* и *PI3K / Akt* приводили к значительному снижению остаточных недифференцированных клеток и потере туморогенности клеточной популяции после трансплантации в иммунодефицитных мышей-биомоделей. Проведенное исследование демонстрирует эффективность стратегии модуляции сигнальных путей, регулирующих баланс процессов пролиферации и дифференцировки, которая может быть эффективной для устранения опухолевых клеток и для развития безопасной терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток.

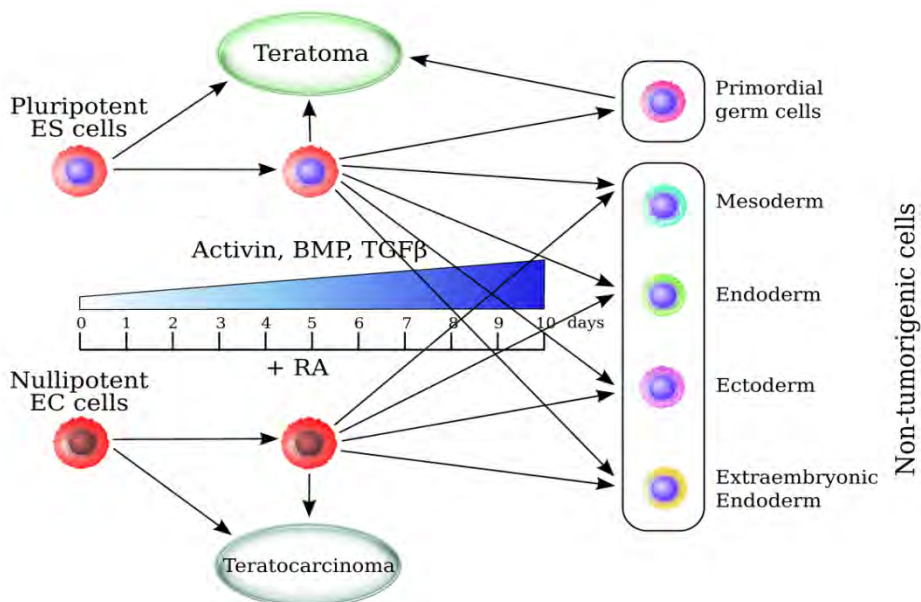


Рис .1. Сигнальные каскады *Activin / Nodal* и *BMP*

## **Раздел 4. Использование зародышей морского ежа для поиска веществ с антимиотическим действием, обусловленным дестабилизацией микротрубочек**

### **Введение**

Поиск новых биологически активных химических соединений невозможен без выбора адекватной экспериментальной модели. Тест-модель должна быть доступной, дешевой, удобной в применении, давать воспроизводимые результаты, обеспечивать экстраполяцию результатов испытаний на клетки человека. Зародыши морского ежа обладают вышеперечисленными достоинствами. Возможность получения большого количества гамет, простота искусственного оплодотворения и выращивания, крупные размеры яйцеклеток, быстрое синхронное деление клеток на ранних стадиях развития, высокая проницаемость для различных веществ, прозрачность зародышей и личинок обеспечили широкое применение данного объекта не только в различных областях биологии развития, но и в медико-биологических исследованиях.

Скрининг природных и синтетических химических соединений является важной проблемой медицинской химии. Первоначальные доклинические испытания веществ проводятся по двум направлениям: молекулярно-биологический подход со стороны возможной клеточной мишени (target-based screening) и фенотипический скрининг на клеточных культурах и модельных организмах. Молекулярный скрининг предоставляет информацию о клеточной мишени и механизме действия, однако в клетке и тем более в организме биологический эффект исследуемого химического агента может быть совершенно другим или отсутствовать вообще. Фенотипический скрининг, как правило, не позволяет установить клеточную мишень, но дает представление о реальном действии вещества на клеточном или организменном уровне. Первостепенное значение фенотипический скрининг имеет для исследования биологической активности представителей новых классов химических соединений («first-in-class small molecules»). Процессы дифференцировки и морфогенеза зародышей морского ежа детально изучены, что облегчает интерпретацию наблюдаемых нарушений развития и позволяет делать предположения о механизме действия испытуемых агентов. Фенотипический метод тестирования химических соединений на модели зародышей морского ежа с целью выявления веществ-антимиотиков, дестабилизирующих микротрубочки, дает хорошо воспроизводимые результаты, сходные с результатами, полученными с использованием общепринятых тест-систем, таких как культуры опухолевых клеток и полимеризация очищенного тубулина *in vitro*.

### **Материал и методы**

В работе использовали оригинальный фенотипический метод тестирования, позволяющий быстро идентифицировать молекулы, способные нарушать деление клеток, и дающий информацию о механизме антимиотической активности и клеточной мишени (Semenova M.N.,

Kiselyov A., Semenov V.V. Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators. - BioTechniques, 2006, v. 40, № 6, pp. 765–774). Данная тест-система предоставляет возможность выявлять: а) дестабилизаторы микротрубочек, или ингибиторы полимеризации тубулина; б) вещества с антипролиферативной/антимитотической активностью, не связанной с нарушением структуры и функции микротрубочек; в) молекулы, избирательно воздействующие на различные процессы дифференцировки и морфогенеза; г) соединения, обладающие системной токсичностью.

Опыты проводили в биологической лаборатории ИБР им. Н.К.Кольцова РАН на Кипре. Взрослых морских ежей *Paracentrotus lividus* L. (Echinidae, Echinodermata) собирали в прибрежной зоне и содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой. Перест стимулировали инъекцией в полость тела животных 1–2 мл 0.5 М КСl. Полученные яйцеклетки отмывали профильтрованной через нейлоновый фильтр морской водой и оплодотворяли добавлением нескольких капель разбавленной спермы. Зародышей (400–1600/мл) инкубировали в профильтрованной морской воде при комнатной температуре (18–23 °С) до стадии перехода к активному питанию (36–40 ч, средний плутеус 2). В течение всего периода инкубации суспензию зародышей перемешивали с помощью лопасти из оргстекла со скоростью вращения 60 об/мин, приводимой в движение электромотором. Исходные растворы гидрофобных химических соединений готовили в ДМСО, после чего разводили в 10 раз 96% этанолом. Такая процедура способствует увеличению растворимости веществ в солосодержащих средах (морской воде). Маточные растворы водорастворимых соединений готовили на дистиллированной или профильтрованной морской воде. Растворимость исследуемых соединений контролировали с помощью стереомикроскопа МБС-10.

Обработку веществами проводили в 6-луночных культуральных платах. В каждую лунку помещали 5 мл суспензии яйцеклеток или зародышей и добавляли соответствующий объем раствора исследуемого вещества для достижения требуемой конечной концентрации. При этом максимальная концентрация растворителя не превышала предельно допустимую (1% для этанола и 0.05% для ДМСО). Для оценки антимитотической активности яйцеклетки обрабатывали веществами через 8–15 мин после оплодотворения, и через 2.5–6 ч регистрировали нарушение и/или остановку дробления. О способности веществ воздействовать на тубулин и дестабилизировать микротрубочки судили по характерному изменению плавательного поведения бластул, обработанных веществами сразу после вылупления в возрасте 8.5–10 ч. Прекращение прямолинейного плавания зародышей у поверхности воды, оседание на дно сосуда и быстрое вращение (спиннинг) вокруг анимально-вегетативной оси является свидетельством антитубулинового механизма действия исследуемых химических соединений. При исследовании фенотипических признаков ингибирования МАПК-сигнализации использовали стандартные ингибиторы MEK1/2, RAF, Erk1/2, Erk5, приобретенные в Selleckchem и MedChemExpress (USA).

В тестах использовали последовательно понижающиеся в два раза концентрации веществ до исчезновения эффекта. Активность оценивали по наименьшей (пороговой) концентрации ЕС, вызывающей соответствующий биологический эффект. Наблюдения проводили с помощью оптического микроскопа Биолам ЛОМО (г. Санкт-Петербург, Россия) до перехода к активному питанию (средний плутеус 2). Микрофосъемку осуществляли с помощью микроскопа AmScope с цифровой фотокамерой MU500 (United Scopes LLC, Irvine, CA, USA).

Использование зародышей морского ежа в качестве объекта удовлетворяет требованиям лабораторной этики. Зародыши развиваются вне материнского организма, отнерестившиеся особи сохраняют жизнеспособность и возвращаются в естественную среду обитания.

## Результаты и обсуждение

### 1. Поиск веществ с антимитотической активностью и оценка токсичности различных химических агентов на модели зародышей морского ежа.

На модели зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus* испытано 129 веществ из библиотеки химических соединений Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Были продолжены испытания соединений класса стильбенов - аналогов природных антимитотиков комбретастинов, в которых этиленовый «мостик» заменен на пространственно стабильный гетероцикл (пиррол, пиразол, изоксазол) (Рис. 1).

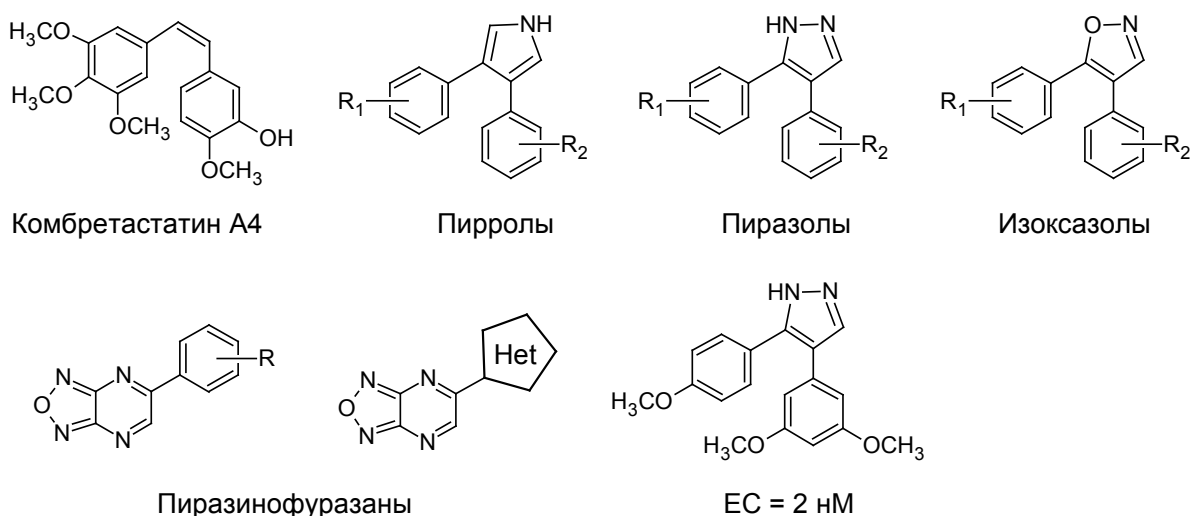


Рис. 1. Структура молекул комбретастина А4, его гетероциклических аналогов и пиразинофуранов.

Начаты испытания соединений класса пиразинофуранов (Рис. 1). Обнаружено 18 веществ-антимитотиков, механизм действия которых обусловлен дестабилизацией микротрубочек. Выявлен пиразольный аналог комбретастина, угнетающий деление яйцеклеток морского ежа в концентрации 2 нМ (Рис. 1). Проведено исследование зависимости активности от химической структуры пиразинофуранов. Показано, что антимитотическим

антитубулиновым действием обладали соединения, содержащие метокси-замещенный фенильный фрагмент или тиенил, а введение гидроксила в пиразиновый цикл приводило к потере активности.

## **2. Изучение развития зародышей морского ежа при ингибировании различных компонентов митоген-активируемого протеинкиназного сигнального пути.**

На зародышах морского ежа исследовано действие 26 ингибиторов ряда компонентов митоген-активируемого сигнального пути, в том числе 6 ингибиторов RAF, 13 ингибиторов MEK1/2, 5 ингибиторов ERK1/2 и 2 ингибитора ERK5. Цель исследования состояла в выявлении специфических фенотипических признаков, характерных для угнетения MAPK-сигнализации, на основании которых можно было бы строить предположение о влиянии химических соединений на этот сигнальный путь. Было установлено, что при обработке оплодотворенных яйцеклеток ингибиторы всех компонентов каскада MEK1/2, но не ERK5, угнетали формирование клеток первичной мезенхимы и последующий спикулогенез, при этом не влияя на дробление, формирование бластул, вылупление и подвижность зародышей (Рис. 2).

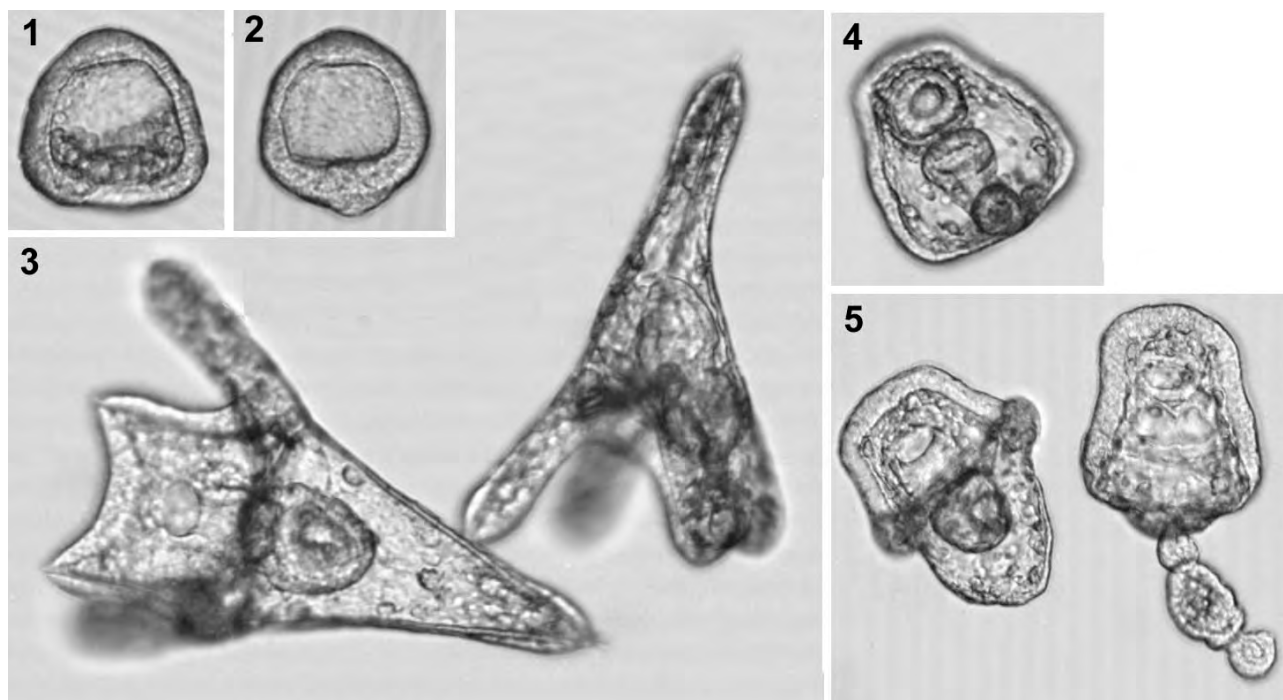


Рис. 2. Фенотипические изменения зародышей морского ежа после обработки ингибиторами MEK1/2 на стадии зиготы. 1, 3 - Интактные зародыши. 1- Ранняя гастрюла (13 ч) с клетками первичной мезенхимы и зачатком архентерона. 2 - Ранняя гастрюла (13 ч) в присутствии траметиниба (20 нМ); клетки первичной мезенхимы, ответственные за спикулогенез, отсутствуют. 3 - Ранний плутеус 3 (34 ч). 4- Ранний плутеус 3 (34 ч) в присутствии траметиниба (20 нМ) с выраженной дифференцировкой кишечника и отсутствием спикул скелета. 5 - Ранний плутеус 3

(34 ч) в присутствии TAK733 (50 нМ); слева - плутеус без спикул, с дифференцированной кишкой и развитым ресничным шнуром; справа - экзогастроляция с дифференцировкой кишечника.

Вещества, действующие на MEK1/2, оказались наиболее активными и подавляли формирование спикул в концентрации 2.5–50 нМ. Пять ингибиторов MEK1/2 и один ингибитор RAF вызывали ~50% экзогастроляцию с четко выраженной дифференцировкой желудочно-кишечного тракта.

## **Раздел 5. Клеточные и молекулярные механизмы морфогенеза в развитии представителей низших многоклеточных животных.**

### **Введение**

Эмбриональное развитие животных можно рассматривать как устойчивую серию морфогенетических процессов, контролируемую активностью регуляторных молекул и физических характеристик клеток и тканей. Эти морфогенетические процессы образуют траекторию развития, позволяющую сформировать определенный план строения, характерный для каждого таксона. Поразительно то, что каждый план строения может быть сформирован с помощью сильно различающихся траекторий развития. Так, очень разнообразные траектории развития приводят к формированию типичного плана строения хордовых. Например, у головохордовых (Cephalochordata) радиальное голобластическое дробление приводит к образованию полый целобластулы, которая гастрულიрует путем инвагинации. В то же время у птиц дискоидальное дробление приводит к образованию дискобластулы, лежащей на поверхность желтка и гастрულიрующей за счет иммиграции клеток через первичную полосу. У представителей кишечнополостных можно найти практически все известные способы гастрულიации. В то время как инвагинация преобладает среди представителей классов Anthozoa и Scyphozoa, для класса Hydrozoa характерны униполярная и мультиполярная иммиграция клеток, а также первичная и вторичная деламинация. Тем не менее, после гастрულიации, все кишечнополостные (за исключением немногих видов с прямым развитием) формируют типичную личинку планулу. Как эволюционировали такие разнообразные траектории развития и как они способствовали эволюционному формированию различных планов строения, остается одним из открытых вопросов биологии развития. Большой объем экспериментальных данных показывает, что спектр потенциально возможных дифференцировок и вариантов поведения эмбриональных клеток значительно шире спектра их дифференцировок и поведения, реализуемых в ходе нормального развития. Мы полагаем, что новые траектории развития могут появляться в тех случаях, когда клетки, способные к регулятивному развитию, реагируют на новые физические ограничения, такие, как увеличение количества желтка в упомянутом примере с хордовыми животными. Соответственно, новые траектории развития могут использоваться и в том случае, если эмбриональные клетки сталкиваются с новым контекстом в эксперименте.

Предельный случай пластичности развития - способность некоторых животных развиваться из скопления диссоциированных клеток, когда первичный план строения полностью нарушается, а затем восстанавливается *de novo* путем самоорганизации. Чтобы проверить уровень регулятивных возможностей эмбриональных клеток кишечнополостных, мы провели эксперименты по диссоциации-реагрегации эмбрионов актинии *Nematostella vectensis*.



*Nematostella* - это модельный объект, доступный для функциональных исследований эмбриогенеза кишечнополостных. В ходе дробления эмбрионы *Nematostella* формируют целобластулу, затем гастрингулируют за счет инвагинации, превращаются в личинку планулу и метаморфозируют в первичный полип. Наши трансплантационные эксперименты показали, что губа бластопора гастрингулы *Nematostella*, подобно Шпемановскому организатору позвоночных, обладает способностью к индукции вторичной оси тела, опосредованной сигнальными молекулами Wnt1 и Wnt3. Чтобы оценить потенциал различных эмбриональных клеток, мы диссоциировали среднюю гастрингулу *Nematostella* (в этот момент энтодерма только начинает инвагинировать), на отдельные клетки или небольшие кластеры из 2-9 клеток (~ 80% и ~ 20%, соответственно) и агрегировали их центрифугированием на малых оборотах. Сразу после центрифугирования у агрегатов не было признаков осевой полярности или сегрегации зародышевых листков ни на морфологическом, ни на молекулярном уровне. В нашем исследовании мы использовали комбинацию методов микрохирургии и анализа экспрессии трансгенных репортерных генов. Благодаря использованию этих методов, удалось охарактеризовать спектр перспективных потенциалов эмбриональных клеток *Nematostella*, а также процессы дифференцировки осей тела и зародышевых листков при развитии агрегата диссоциированных эмбриональных клеток.

### Материалы и методы

Половозрелых полипов *Nematostella* культивировали по стандартной методике [1]. Микрохирургическую изоляцию различных частей гастрингулы проводили с использованием офтальмологического скальпеля Microfeather и стереомикроскопа Nikon SMZ18. Для экспериментов по диссоциации к 100 мкл среды *Nematostella* medium (NM, 16 ‰ искусственная морская вода) с эмбрионами добавляли 200 мкл морской воды, свободной от ионов Ca-Mg (27 г / л NaCl, 1 г / л Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 г / л KCl, 0,18 г / л NaHCO<sub>3</sub> в воде MilliQ) и диссоциировали путем пипетирования. Затем клеточную суспензию переносили в 2-миллилитровую пробирку Эппендорф, пробирку заполняли до 2 мл NM и центрифугировали при 730 gcf в течение 30 минут. Осадок (собранные в агрегаты клетки) переносили в чашку Петри с NM, разрезали на мелкие фрагменты с помощью скальпеля и давали возможность развиваться при 21 ° C. Эксперименты по трансплантации губы бластопора проводили так же, как описано в [2]. Прижизненное фотографирование и микроинъекции выполнялись на микроскопе Nikon TS100F, оснащенном камерой Nikon DS-Qi1Mc. В эксперименте по инъекции единичного бластомера, смесь, содержащую по 20 нг / мкл плазмид со встроенными EF1alpha :: Wnt1 и EF1alpha :: Wnt3, а также флуоресцентный декстран-Alexa488, вводили в случайно выбранные бластомеры 8-ми клеточных эмбрионов, как описано в [2].

В ходе функциональных экспериментов в оплодотворенные яйцеклетки вводились BMP2/4 - морфолино, Chd - морфолино, beta-catenin - морфолино и контрольное морфолино (GATGTGCCTAGGGTACAACAACAAT) в концентрации 250  $\mu$ M [2, 3, 4].

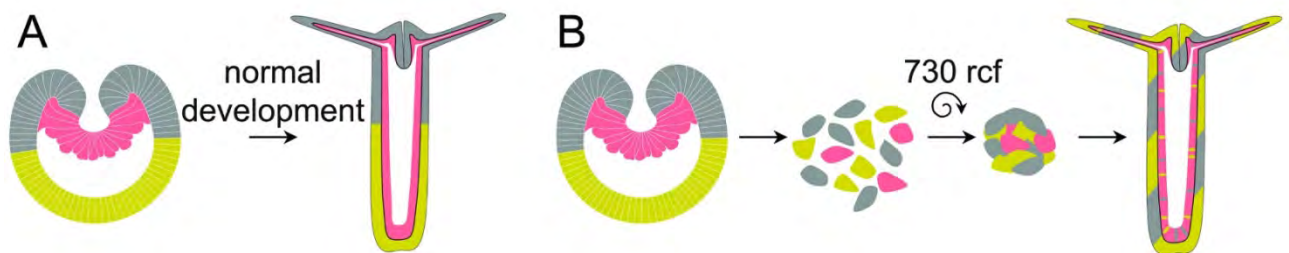
Для оценки эффективности диссоциации все клетки в пределах 3-х неперекрывающихся полей зрения при 200-кратном увеличении были подсчитаны на 9 независимых диссоциированных образцах (всего 27 измерений). Чтобы оценить количество клеток гастрюлы во время диссоциации, средние гастрюлы фиксировали 3,7% формальдегидом / NM и окрашивали DAPI. Конфокальные z-стеки с шагом 2 мкм были получены с помощью конфокального микроскопа Leica SP5X LSM, и общее число ядер определялось у шести эмбрионов в программе FIJI (<https://imagej.net/Fiji/>). Количество клеток в одном ряду в изгибе губы бластопора определяли на 10 эмбрионах, окрашенных Phalloidin-Alexa488.

Для генерации трансгенной линии EF1alfa :: Lifeact-mOrange2 последовательность Lifeact вместе с гибким линкером (GDPPVAT) была встроена между последовательностями праймеров и использовалась для амплификации последовательности mOrange2. Затем мы клонировали Lifeact-mOrange2 в вектор трансгенеза *Nematostella* ниже EF1alfa-промотора и вводили его в зиготы [5, 6]. Мозаично трансгенные животные F0 скрещивались для получения полностью трансгенных гетерозиготных животных F1, которые были скрещены для получения поколения F2. Зародыши F2 были подвергнуты скринингу под люминесцентным микроскопом Nikon SMZ18, и для экспериментов по диссоциации использовались только сильно светящиеся гастрюлы.

Гибридизацию *in situ* и окрашивание F-актина проводили по стандартной методике [7]. Ядрабылиокрашены TO-PRO-3 (Life Technologies, T3605) или DAPI (Sigma, D8417). При двойной *in situ* гибридизации, РНК зонды, меченые Dig и FITC, добавляли одновременно, а метки затем визуализировали последовательно. Визуализацию экспрессирующих mOrange2 клеток с помощью антител проводили как описано в [8]. Агрегаты фиксировали в течение 1 часа в 4% PFA / PBS-Tx (1x PBS / 0,2% TritonX100), промывали 5 раз в течение 5 минут в PTx, блокировали в течение 2 часов в 5% -ной инактивированной sheep serum / 1% BSA в PTx, и гибридизовали с антителами мыши против белка mcherry (Clontech, 632543), разбавленными 1: 500 в блокирующем растворе в течение ночи при 40 ° C. Несвязанные первичные антитела удаляли 8-ю 10-минутными промывками в PTx, а затем эмбрионы блокировали и окрашивали с козым антимышиным IgG, конъюгированным с Alexa568 (Life Technologies, A-11004), промывали 8 раз PTx и заключали в среду в Vectashield (Vectorlabs). Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica SP5X. Фиксированных 4%PFA на PBS эмбрионов гидроида *Dynamena* дегидратировали в серии изопропанола и помещали в бензилбензоат / бензиловый спирт, изображения получали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1. Для SEM агрегаты *Nematostella* фиксировали и обрабатывали, как в [9, 10].

## Результаты и обсуждение

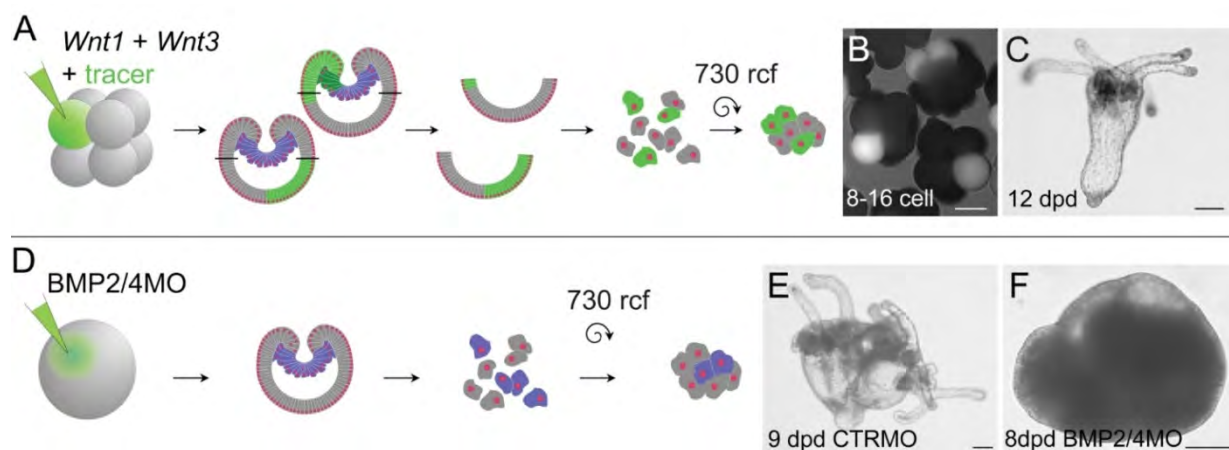
В экспериментах по диссоциации - реагрегации эмбриональных клеток актинии *Nematostella vectensis* были получены новые данные, касающиеся пластичности траекторий развития, поведения и дифференцировки эмбриональных клеток. Наши эксперименты показали, что агрегаты эмбриональных клеток способны формировать зародышевые листки и восстанавливать первичный план строения, утраченный при диссоциации. Благодаря использованию трансгенных линий, экспрессирующих гены-маркеры, нам удалось показать, что дифференцировка клеток эндодермы необратима. Агрегаты, состоящие только из эндодермальных клеток, не развивались, а их клетки превращались в мезенхиму. Напротив, эктодермальные клетки были способны трансдифференцироваться в эндодерму, и состоящие из них агрегаты развивались в нормальные полипы (Рис. 1).



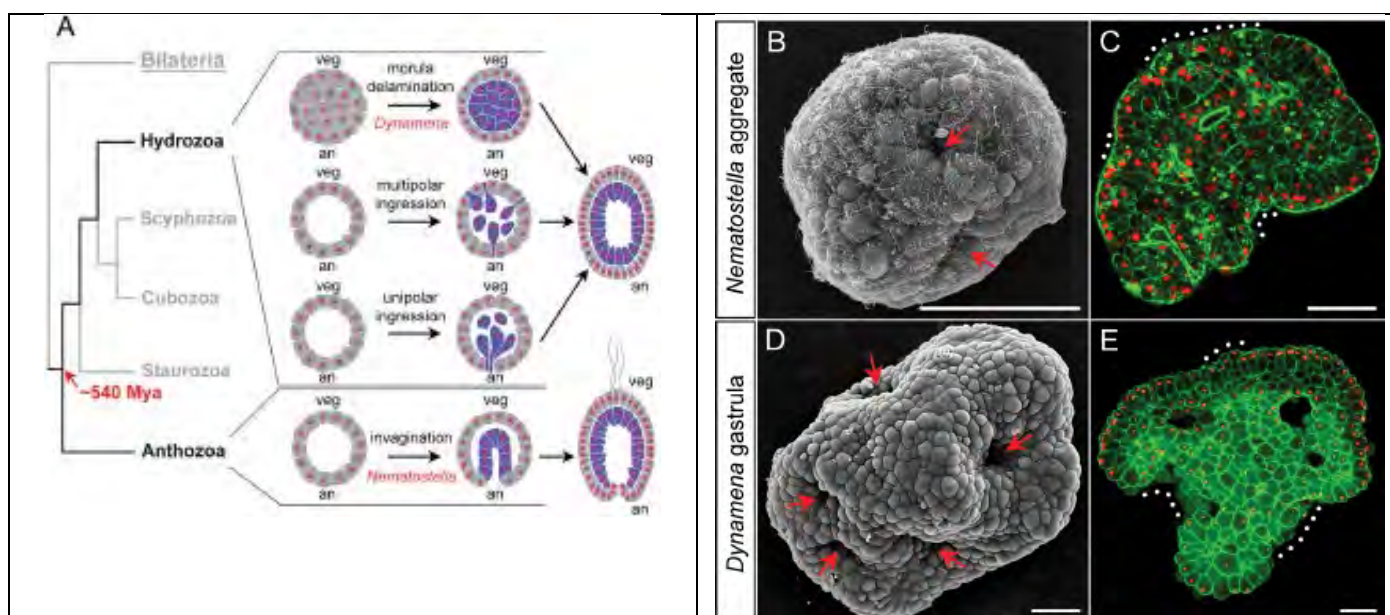
**Рис.1.** Судьба клеток презумптивных эктодермы и эндодермы эмбриона *Nematostella* в нормальном развитии (A) и в эксперименте по диссоциации - реагрегации (B).

Мы показали, что формирование осей у агрегатов регулируется Wnt-сигналингом, источником которого является эктодерма губы бластопора, обладающая свойствами региона - организатора (Рис. 2A - C).

Наши эксперименты также выявили важную роль BMP - сигналинга для поддержания Wnt-зависимой орально - аборальной полярности у эмбрионов и агрегатов (Рис. 2D - F).



**Рис.2.** Роль сигнальных каскадов Wnt и BMP в формировании осевой организации у агрегата диссоциированных клеток. Эктопическая экспрессия Wnt1 и Wnt3 приводит к "спасению" клеток эктодермы - они формируют первичный полип в отсутствие клеток региона - организатора (A - C). Нокдаун BMP2/4 приводит к тому, что агрегаты не способны восстановить первичный план строения (D - F).



**Рис.3.** Схематическое изображение гастрюляционных морфогенезов, характерных для типа Cnidaria (A); сравнение морфологии и морфогенетических процессов у агрегата эмбриональных клеток актинии *Nematostella* (B, C) и у нормально развивающегося эмбриона гидроида *Dynamenapumila* (D, E). Красные стрелки на B и D, а также пунктирные линии на C и E показывают на участки поверхности, где не завершилось формирование эпителиальной эктодермы.

Гастральная полость формируется у агрегатов шизоцельно. Любопытно, что развитие агрегатов *Nematostella* напоминает нормальное развитие филогенетически далеких представителей класса Hydrozoa, которые гастрюлируют путем мультиполярной иммиграции клеток или вторичной деламинации (Рис. 3А - Е).

Как эмбрионы, так и агрегаты используют в развитии один и тот же набор молекул - продуктов регуляторных генов. Мы считаем, что эти гены являются частью самоорганизующейся регуляторной генетической сети, обеспечивающей как высокую пластичность развития, так и его способность подстраиваться под меняющиеся условия. Так, нереализуемость инвагинации приводит к активации альтернативной траектории развития: агрегаты используют для сегрегации зародышевых листков вторичную деламинацию и мультиполярную иммиграцию.

Судя по всему, альтернативные траектории развития легко доступны для эмбрионов, и такая пластичность была характерна для процессов развития уже на первых этапах эволюции многоклеточности. Способность изменять развитие без необратимых последствий для его конечного результата могла способствовать эволюционной диверсификации траекторий развития животных.

### Список ссылок

- 1 Genikhovich G., Technau U. Induction of spawning in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*, in vitro fertilization of gametes, and dejellying of zygotes // Cold Spring Harb. Protoc. 2009. DOI: pdb.prot5281.
2. Kraus Y., Aman A., Technau U., Genikhovich G. Pre-bilaterian origin of the blastoporal axial organizer // Nat. Commun. 2016. V. 7. DOI: 10.1038/ncomms11694
3. Saina M., Genikhovich G., Renfer E., Technau U. BMPs and chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 106. pp. 18592–18597.
4. Leclère L., Bause M., Sinigaglia C., Steger J., Rentzsch F. Development of the aboral domain in *Nematostella* requires  $\beta$ -catenin and the opposing activities of six3/6 and frizzled5/8 // Development. 2016. V. 143. pp. 1766–1777.
5. Riedl J. Lifeact: A versatile marker to visualize F-actin // Nat Methods. 2008. V. 5. pp. 605–607.
6. Shaner N.C. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins // Nat. Methods. 2008. V. 5. pp. 545–551.
7. Genikhovich G., Technau U. In situ hybridization of starlet sea anemone (*Nematostella vectensis*) embryos, larvae, and polyps // Cold Spring Harb. Protoc. 2009. DOI: pdb.prot5282.
8. Genikhovich G., Technau U. Anti-acetylated tubulin antibody staining and phalloidin staining in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis* // Cold Spring Harb. Protoc. 2009. DOI: pdb.prot5283.
9. Kraus Y.A. Morphomechanical programming of morphogenesis in cnidarian embryos // Int. J. Dev. Biol. 2006. V. 50. pp. 267–275.
10. Fritzenwanker J.H., Genikhovich G., Kraus Y., Technau U. Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis* // Dev. Biol. V. 310. pp. 264–279.

## Заключение

Раздел 1. В ходе фолликулярного роста и при лютеинизации экспрессируются гены, которые могут составить функционально полноценную серотонинергическую сигнальную систему. Отдельные ее компоненты, а именно Vmat1, Vmat2, Htr1b, Htr2b, Htr7, обладают выраженной динамикой экспрессии мРНК в ходе фолликулярного роста, что указывает на их возможную роль в качестве регуляторов функционального состояния фолликулярных клеток на той или иной стадии фолликулогенеза. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о перестройке серотонинергической системы, происходящей во время лютеинизации. Ряд генов, такие как Ddc, Maoa, Vmat1, Htr1b, можно считать количественными маркерами лютеинизации и использовать для контроля этого процесса в работах по культивированию фолликулярных клеток. При этом гены Vmat2 и Htr7, напротив, можно считать маркерами фолликулярной стадии. В яичнике мыши в составе овариальных фолликулов выявляется как мРНК транспортера серотонина Sert, так и сам мембранный белок. Более того, в эксперименте выявляется и его функциональная активность, что говорит о роли Sertv регуляции серотонином процесса фолликулогенеза.

В 2018 году планируется дальнейшая работа по исследованию роли отдельных компонентов серотонинергической системы в регуляции фолликулогенеза. В частности, будут проведены эксперименты *in vitro* по выявлению активности систем синтеза и мембранного транспорта серотонина в изолированных развивающихся овариальных фолликулах. Наряду с этим, будут проведены работы по исследованию влияния серотонина на функциональное состояние фолликулярных клеток в культуре.

Раздел 2. Исследования, проведенные в 2017 г., были посвящены изучению компартмента семенника мыши, содержащего популяцию недифференцированных клеток, обладающих свойствами КС и в то же время способных к активному росту в культуре. Было установлено, что по крайней мере часть этих клеток, судя по экспрессии цитокератинов 8/18, происходит из сети семенника, являющейся первым участком системы протоков, по которым идет транспорт сперматозоидов. Продемонстрировано, что сеть семенника и прилегающие к ней семенные каналцы претерпевают значительные изменения в постэмбриональном развитии: в сети семенника снижается экспрессия маркеров КС Wt1 и Sox9; к 18 сут на границе сети семенника и извитых семенных каналцев появляются транзиторные зоны со сниженной экспрессией Dmrt1 в КС; пролиферативная активность клеток сети семенника и транзиторной зоны снижается с возрастом, однако клетки транзиторной зоны снижают пролиферативную активность несколько медленнее, чем КС семенных каналцев. Кроме того, показано, что культивированные ТЗ КС способны, совместно с клетками семенника мышонка, формировать семенные каналцы и поддерживать в них начальные этапы дифференцировки половых клеток. Таким образом, в 2017 г.

были получены новые данные о дифференцировке КС в постэмбриональном развитии, а также о структуре и изменениях в онтогенезе региона семенника, содержащего популяцию недифференцированных клеток, которая может быть использована для разработки клеточных технологий терапии мужского бесплодия. В 2018 г. исследование этого компартмента семенника будет продолжено с целью установить время появления, точную локализацию в семеннике и маркеры ТЗ КС, а также выбрать оптимальную схему культивирования этих клеток.

Проведенное исследование демонстрирует эффективность стратегии модуляции сигнальных путей, регулирующих баланс процессов пролиферации и дифференцировки, которая может быть эффективной для устранения опухолевых клеток и для развития безопасной терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток.

Фенотипический скрининг на модели зародышей морского ежа позволяет быстро, легко и с минимальными материальными затратами выявлять вещества, угнетающие деление клеток за счет воздействия на тубулин и дестабилизации микротрубочек. Обнаруженные антимиототики могут найти применение при разработке новых противоопухолевых лекарственных средств.

Исследование связи активности веществ с химической структурой (structure-activity relationship, SAR) показало важную роль полиметоксибензольного фрагмента в проявлении антитубулинового эффекта. Для синтеза таких соединений легкодоступным исходным материалом служат аллилполиалкоксибензолы, содержащиеся в экстрактах семян петрушки и укропа.

Предполагается, что совокупность фенотипических признаков, таких как нормальное дробление, подавление выселения клеток первичной мезенхимы, отсутствие спикул скелета и экзогастрюляция с дифференцировкой кишечника, может свидетельствовать о воздействии химического соединения на митоген-активируемый сигнальный путь.

Полученные в 2017 году данные по пластичности развития эмбрионов актинии *Nematostella vectensis* позволили сделать ряд интересных выводов, касающихся эволюции траекторий развития и планов строения животных. Наши результаты заложили основу для дальнейших сравнительных исследований молекулярных механизмов, обеспечивающих переключение между альтернативными траекториями развития в зависимости от меняющихся условий среды.

## Публикации по теме

1. Chernysheva N.B., Maksimenko A.S., Andreyanov F.A., Kislyi V.P., Strelenko Y.A., Khrustalev V.N., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Synthesis of 3,4-diaryl-5-carboxy-4,5-dihydroisoxazole 2-oxides as valuable synthons for anticancer molecules // *Tetrahedron*. 2017. V. 73. P. 728-735. DOI: 10.1016/j.tet.2017.10.016. (WoS, Scopus)
2. Chernyshova N.B., Tsyganov D.V., Khrustalev V.N., Raihstat M.M., Konyushkin L.D., Semenov R.V., **Semenova M.N.**, Semenov V.V. Synthesis and antimetabolic properties of ortho-substituted polymethoxydiarylazolopyrimidines // *Arkivoc*. 2017. V. 2017. N 3. P. 151-165. DOI: 10.3998/ark.5550190.p010.031. (WoS, Scopus)
3. Eurtivong C., Semenov V., **Semenova M.**, Konyushkin L., Atamanenko O., Reynisson J., Kiselyov A. 3-Amino-thieno[2,3-b]pyridines as microtubule-destabilising agents: Molecular modelling and biological evaluation in the sea urchin embryo and human cancer cells // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017. V. 25. N 2. P. 658-664. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.11.041. (WoS, Scopus)
4. **Gordeeva O.**, Khaydukov S. Tumorigenic and differentiation potentials of embryonic stem cells depend on TGF  $\beta$  family signaling: lessons from teratocarcinoma cells stimulated to differentiate with retinoic acid // *Stem Cells International*. 2017. Article ID 7284872. 14 pages. DOI: 10.1155/2017/7284872 (WoS, Scopus)
5. Sabutski Y.E., **Semenova M.N.**, Yurchenko E.A., Polonik N.S., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Semenov V.V., Polonik S.G. Synthesis and comparative evaluation of polymethoxy substituted 1,4-naphthoquinones and their acetyl-o-glucosides as cytotoxic agents // *Natural Product Communications*. 2017. V. 12. No.7. P. 1081-1088. (WoS 0,773, Scopus)
6. Semenov V.V., Lichitsky B.V., Komogortsev A.N., Dudinov A.A., Krayushkin M.M., Konyushkin L.D., Atamanenko O.P., Karmanova I.B., Strelenko Y.A., Shor B., **Semenova M.N.**, Kiselyov A.S. Synthesis and anti-mitotic activity of 6,7-dihydro-4H-isothiazolo[4,5-b]pyridin-5-ones: *in vivo* and cell-based studies // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017. V. 125. P. 573-585. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.09.075. (WoS, Scopus)
7. Testai L., Strobykina I., Semenov V.V., **Semenova M.**, Da Pozzo E., Martelli A., Citi V., Martini C., Breschi M.C., Kataev V.E., Calderone V. Mitochondriotropic and cardioprotective effects of triphenylphosphonium-conjugated derivatives of the diterpenoidisosteviol // *Intern. J. Molecular Sciences*. 2017. V. 18. No. 10. DOI: 10.3390/ijms18102060. (WoS, Scopus)
8. Балашов Д.А., Виноградов Е.В., Ковалев К.В., Барминцева А.Е., Рекубратский А.В., **Грунина А.С.** Для получения индуцированного андрогенеза у осетровых рыб можно использовать ультрафиолетовое излучение // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 5. С. 386-396. DOI:



- 10.7868/S0475145017050020. (РИНЦ). (Balashov D.A., Vinogradov E.V., Kovalev K.V., Barmintseva A.E., Recoubratsky A.V., **Grunina A.S.** Induced androgenesis in acipenserids may be obtained by ultraviolet radiation // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. V. 48. 5. P. 330-339. DOI: 10.1134/S1062360417050022. (WoS, Scopus)
9. **Гордеева О.Ф., Почаев В.А.** Экспрессия раково-тестикулярных антигенов семейства Mage в ооцитах и ранних эмбрионах мыши // Онтогенез. 2017. Т. 48. № 4. С. 335-342. DOI: 10.7868/S047514501704005X. (РИНЦ). (**Gordeeva O.F., Pochaev V.A.** Expression of cancer-testis antigens of the Mage family in mouse oocytes and early embryos // Russian Journal of Developmental Biology. 2017. V. 48. N 4. P. 287-294. DOI: 10.1134/S1062360417040051. (WoS, Scopus)
10. Захидов С.Т., Муджири Н.М., Рудой В.М., Дементьева О.В., Макаров А.А., Зеленина И.А., **Маршак Т.Л.** Наночастицы золота: мутаген, антимутаген, комутаген? // Известия РАН. Серия биологическая. 2017. № 3. С. 213-217. DOI: 10.7868/S0002332917030122. (РИНЦ). (Zakhidov S.T., Mudzhiri N.M., Rudoy V.M., Dement'eva O.V., Makarov A.A., Zelenina I.A., **Marshak T.L.** Gold nanoparticles: Mutagen, antimutagen, or comutagen? // Biology Bulletin. 2017. V. 44. 3. P. 233-236. DOI: 10.1134/S1062359017030128. (WoS, Scopus)

Отчет утвержден Ученым советом 06 декабря 2017 г., протокол № 9