

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Петри Наталия Дмитриевна

**Формирование лево-правого организатора в нормальном развитии
X. laevis и под воздействием ингибитора форминов**

1.5.23 – Биология развития, эмбриология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Кремнёв Станислав Валерьевич

Москва – 2024

Оглавление

Введение	4
Актуальность темы исследования и современное состояние проблемы.....	4
Цель и задачи работы.....	6
Положения, выносимые на защиту.....	7
Научная новизна работы.....	7
Теоретическая и практическая значимость работы.....	8
Достоверность результатов.....	8
Личное участие автора.....	9
Апробация работы и публикации.....	9
1. Обзор литературы	10
1.1. Молекулярная основа лево-правой асимметрии – каскад Nodal.....	10
1.2. Вторичноротые: строение и функции организаторов лево-правой асимметрии.....	14
1.2.1. Млекопитающие: лево-правый организатор – узелок.....	14
1.2.2. Рыбы: лево-правый организатор – купферов пузырьк.....	17
1.2.3. Морские ежи: лево-правый организатор – участок архентерона.	18
1.2.4. Модели установления асимметрии у позвоночных, не связанные с током жидкости.....	19
1.3. Лево-правый организатор у <i>Xenopus laevis</i>	20
1.4. Альтернативные гипотезы установления асимметрии у <i>Xenopus</i>	28
1.4.1. Формины определяют асимметрию улиток на ранних стадиях развития.....	30
1.4.2. Формины – белки-регуляторы цитоскелета.....	32
2. Материалы и методы	33
2.1. Материалы.....	33
2.1.1. Лабораторные организмы.....	33
2.1.2. Реактивы.....	33
2.1.3. Среды, буферы и растворы.....	35

2.1.4. Праймеры.....	36
2.1.5. Лабораторное оборудование.....	37
2.2. Методы.....	38
2.2.1. Получение зародышей.....	38
2.2.2. Воздействие ингибитором форминов.....	38
2.2.3. Фиксация образцов.....	39
2.2.4. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	40
2.2.5. Иммунофлуоресцентный анализ.....	40
2.2.6. Клонирование генов интереса и синтез антисмысловых РНК-зондов	41
2.2.7. Гибридизация <i>in situ</i>	49
2.2.8. Световая микроскопия.....	51
2.2.9. Морфометрические измерения.....	52
2.2.10. Статистический анализ данных.....	52
3. Результаты.....	53
3.1. Нормальное развитие лево-правого организатора со стадии поздней бластулы по стадию хвостовой почки.....	53
3.2. Участие форминов в установлении лево-правой асимметрии <i>X. laevis</i>	79
3.2.1. Влияние разных концентраций SMIFH2 на выживаемость эмбрионов.....	79
3.2.2. Формины необходимы для установления асимметрии на стадиях гаструлы-нейрулы.....	81
3.2.3. Ингибирование форминов на стадиях гаструлы и нейрулы вызывает преждевременное закрытие лево-правого организатора.....	86
4. Обсуждение.....	97
Заключение.....	108
Выводы.....	109
Список литературы.....	110
Благодарности.....	120

Введение

Актуальность темы исследования и современное состояние проблемы

Шпорцевые лягушки *Xenopus laevis* являются классическим модельным объектом в биологии развития. Эти животные легко разводятся в лабораторных условиях, позволяют получать большое количество синхронно развивающихся эмбрионов, которые развиваются в водной среде вне тела матери, что облегчает задачу экспериментального воздействия на шпорцевую лягушку на всех стадиях онтогенеза от яйцеклеток до взрослого животного.

Изучение процессов определения осей тела эмбриона и, в частности, установления лево-правой оси является одним из актуальных направлений эмбриологии. Согласно текущим представлениям, за установление лево-правой асимметрии тела у *Xenopus* отвечает постериорный дорсальный участок крыши гастроцеля, содержащий клетки презумптивной мезодермы, функционирующий на стадии нейрулы как лево-правый организатор. Он хорошо изучен на стадии нейрулы, когда представляет собой треугольный участок мезодермы на средней линии крыши гастроцеля вблизи бластопора. В это время он разделён на центральную и две боковые области. Клетки центральной области несут вращающиеся реснички, создающие в гастроцеле ток жидкости справа налево. Клетки боковых областей несут неподвижные реснички и отвечают за восприятие этого тока жидкости. Восприятие тока клетками на левой стороне приводит к асимметричной активации в них каскада Nodal, что определит в дальнейшем развитие левой стороны тела [Schweickert et al., 2007].

Формирование будущего лево-правого организатора начинается перед началом гастрюляционных движений, когда его материал расположен на поверхности зародыша в области будущей дорсальной губы бластопора и известен как поверхностная мезодерма. Клетки этой зоны экспрессируют ген-маркер ресничных клеток *foxj1* [Stubbs et al., 2008]. Известно, что в результате гастрюляции клетки поверхностной мезодермы проходят через дорсальную губу

бластопора и занимают своё итоговое положение в крыше гастроцеля, однако детального изучения этого перехода с упором на экспрессию генов-маркеров лево-правого организатора не проводилось.

К концу нейруляции зона организатора накрывается латеральными клетками энтодермы, а клетки поверхностной мезодермы смешиваются с материалом хорды и сомитов. По окончании нейруляции поверхностная мезодерма лево-правого организатора ингрессирует в глубокие слои мезодермы хорды и сомитов, а освободившуюся площадь крыши гастроцеля занимают энтодермальные клетки.

Структуры, по морфологии, функциям и набору экспрессирующихся генов сходные с лево-правым организатором шпорцевой лягушки, находят у многих млекопитающих, рыб и даже у морского ежа. В этом можно усмотреть эволюционную консервативность установления лево-правой асимметрии за счёт ресничного тока [Blum et al., 2009]. Однако отклонения от этой модели у некоторых позвоночных и многочисленные параллели установления асимметрии лягушки со способами раннего установления асимметрии у беспозвоночных не позволяют полностью закрыть вопрос о сроках и конкретном механизме установления лево-правой асимметрии у шпорцевой лягушки. Так, в недавнем исследовании была выдвинута гипотеза об установлении асимметрии у лягушки на ранних этапах дробления за счёт хиральности цитоскелета, а именно – белков-форминов, отвечающих за регуляцию цитоскелета [Davison et al., 2016]. Эта гипотеза сближает предполагаемый механизм установления асимметрии у лягушки с таковым у брюхоногих моллюсков, для которых показано как раннее установление асимметрии при дроблении, так и ключевая роль форминов в этом процессе. Однако для многих ранее выдвинутых гипотез раннего установления асимметрии у лягушек оказалось, что они укладываются в контекст гипотезы ресничного тока в левом организаторе, а ранние детерминанты асимметрии зачастую оказывались регуляторами морфогенеза поверхностной мезодермы [Beyer et al., 2012; Walentek et al., 2012]. Таким образом, гипотеза о роли

форминов в раннем установлении асимметрии у *Xenopus laevis* нуждалась в проверке.

Цель и задачи работы

Цель настоящей работы: выявить пространственную и временную динамику морфологии и молекулярно-генетической разметки лево-правого организатора, определить последствия ингибирования форминов для лево-правой асимметрии зародыша *Xenopus laevis*.

В рамках работы были поставлены следующие задачи:

1. Проследить динамику экспрессии комплекса маркеров области лево-правого организатора и сопоставить с морфогенетическими процессами на последовательных стадиях развития *X. laevis* от поздней бластулы до хвостовой почки;

2. Проследить дифференцировку области презумптивного лево-правого организатора на центральную и боковые сенсорные зоны на морфологическом и молекулярно-генетическом уровне;

3. Выявить период развития зародышей, во время которого частичное ингибирование активности форминов приводит к нарушениям установления лево-правой асимметрии тела;

4. Исследовать влияние ингибитора форминов на морфологию, молекулярную разметку и динамику формирования лево-правого организатора.

Положения, выносимые на защиту

1. Каждый маркер, входящий в комплекс спецификации лево-правого организатора, имеет свою уникальную пространственную и временную динамику экспрессии.

2. Клетки, составляющие область презумптивного лево-правого организатора, сохраняют поверхностное положение от поздней бластулы до конца нейруляции.

3. Морфологическое выделение боковых сенсорных зон лево-правого организатора совпадает с началом экспрессии в них специфических молекулярных маркеров.

4. Критическим периодом для установления лево-правой асимметрии с участием форминов являются стадии гастрюлы и нейрулы, а не стадии дробления.

5. Частичное ингибирование активности форминов приводит к нарушениям строения лево-правого организатора в крыше гастроцеля и последующему нарушению молекулярных и морфологических проявлений лево-правой асимметрии.

Научная новизна работы

В рамках исследования детально изучено развитие лево-правого организатора шпорцевой лягушки на последовательных стадиях развития. Впервые получены детальные пространственно-временные карты экспрессии ряда ключевых генов в лево-правом организаторе и последовательные изменения морфологии его поверхности. В работе прояснены противоречивые данные о влиянии ингибирования форминов на лево-правую асимметрию: изучен вклад активности форминов в нормальную асимметрию эмбриона лягушки на разных стадиях развития, охарактеризованы молекулярные и морфологические нарушения эмбриона при экспериментальном нарушении функционирования форминов, проведено детальное сравнение с морфологией и молекулярной

разметкой интактных эмбрионов на разных стадиях развития *X. laevis*. Впервые исследовано влияние ингибирования форминов на лево-правый организатор.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные детализируют и углубляют знания о развитии лево-правого организатора шпорцевой лягушки в целом и о сроках специализации его отдельных участков. Эти данные могут быть использованы для сравнения этапов развития, морфологии и молекулярной разметки лево-правого организатора амфибий с гомологичными органами других позвоночных и вторичноротых животных, расширяя научные представления о степени их эволюционного консерватизма. Исследование влияния ингибирования форминов на асимметрию и лево-правый организатор шпорцевой лягушки помещает гипотезу о роли форминов в установлении асимметрии в контекст общей гипотезы ресничного тока и подтверждает ключевую роль лево-правого организатора в установлении асимметрии у амфибий.

Сходство генетических основ и молекулярных механизмов установления лево-правой асимметрии, а также закономерностей расположения асимметричных органов у амфибий и млекопитающих позволяет проводить на шпорцевой лягушке эксперименты, сложные в исполнении или вовсе невозможные для плацентарных животных. Изучение как нормальных закономерностей установления лево-правой оси тела, так и различных отклонений от нормальной асимметрии тела амфибий позволяет провести параллели с аналогичными заболеваниями человека, связанными с неправильным установлением лево-правой асимметрии и строением асимметричных висцеральных органов в эмбриогенезе.

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается корректным применением современных молекулярных методов и протоколов исследования,

адекватным статистическим анализом полученных данных, а также публикациями результатов в рецензируемых научных журналах.

Личное участие автора

Все этапы работы были выполнены автором в лаборатории биофизики развития кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ. Все эксперименты, описанные в работе, были выполнены автором. Выводы были сформулированы на основе собственных полученных данных. Автор принимал непосредственное участие в написании статей и апробации материалов диссертации.

Апробация работы и публикации

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI (РИНЦ) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М. В. Ломоносова.

Результаты данной работы были представлены в виде 7 устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях.

1. Обзор литературы

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Петри Н. Д. Эволюционное разнообразие механизмов установления лево-правой асимметрии у животных //Онтогенез. – 2020. – Т. 51. – №. 2. – С. 96-112 [Petri N. D. Evolutionary Diversity of the Mechanisms Providing the Establishment of Left-Right Asymmetry in Metazoans //Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Т. 51. – С. 84-98].

1.1. Молекулярная основа лево-правой асимметрии – каскад Nodal

Установление лево-правой асимметрии у всех изученных позвоночных животных происходит благодаря асимметричной работе сигнального каскада Nodal. Его наличие и роль в установлении асимметрии показаны у представителей млекопитающих – домовый мыши *Mus musculus*, кролика *Oryctolagus cuniculus*, свиньи *Sus scrofa domesticus*, коровы *Bos taurus* [Blum et al., 2007, Schröder et al., 2016]; у курицы *Gallus gallus* [Levin et al., 1995]; у представителей амфибий – шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* и *X. tropicalis*, аксолотля *Ambystoma mexicanum* [Schweickert et al., 2007, Yu et al., 2002]; рыб – *Danio rerio*, *Oryzias latipes* [Essner et al., 2005, Hojo et al., 2007].

Сигнальный каскад Nodal у позвоночных функционирует на стадиях нейруляции и сомитогенеза. Ключевым звеном этого каскада является ген *nodal*, принадлежащий к суперсемейству TGF- β . *Nodal* экспрессируется на левой стороне тела эмбриона вблизи средней линии и обуславливает дальнейшее развитие левой стороны тела по соответствующему сценарию: если там не произойдет вспышки его экспрессии, у эмбриона сформируются две правые стороны [Saijoh et al., 2003]. Далее белок Nodal по внеклеточному матриксу

диффундирует в мезодермальные клетки на левой стороне тела [Oki et al., 2007] и там индуцирует экспрессию гомеобоксного гена *pitx2*, который будет постоянно экспрессироваться в клетках мезодермы боковой пластинки на левой стороне, управляя дальнейшим установлением асимметрии органов [Logan et al., 1998].

Вспышка экспрессии белка Nodal на левой стороне тела длится недолго (6-7 часов у мыши) [Shiratori, Hamada, 2006], поскольку он активирует экспрессию нескольких генов, продукты которых подавляют экспрессию и распространение Nodal по принципу отрицательной обратной связи. В клетках боковой мезодермальной пластинки он индуцирует экспрессию *lefty2*. Диффундировав в область средней линии эмбриона, он индуцирует экспрессию *lefty1*. *Lefty1* подавляет экспрессию *nodal* вблизи средней линии и тем самым не позволяет ему распространиться на правую сторону эмбриона [Meno et al., 1998], а *lefty2* подавляет его экспрессию в боковой мезодерме (рисунок 1.1), таким образом экспрессия *nodal* ограничивается с двух сторон. Помимо того, на правой стороне эмбриона экспрессируется ген *dand5*, продукт которого блокирует диффузию белка Nodal, связываясь с ним в комплексы. Этот ген, вначале экспрессирующийся на обеих сторонах тела, принимает первичный сигнал к установлению асимметрии на левой стороне, и уровень его экспрессии на левой стороне снижается. Благодаря этому белок Nodal высвобождается и усиливает экспрессию собственного гена на левой стороне тела [Shinohara et al., 2012; Schweickert et al., 2010]. В отсутствие любого из генов-репрессоров Nodal происходит его неконтролируемое просачивание на правую сторону, что приводит к ошибкам асимметризации и частичному или полному развитию правой стороны по «левому» сценарию.

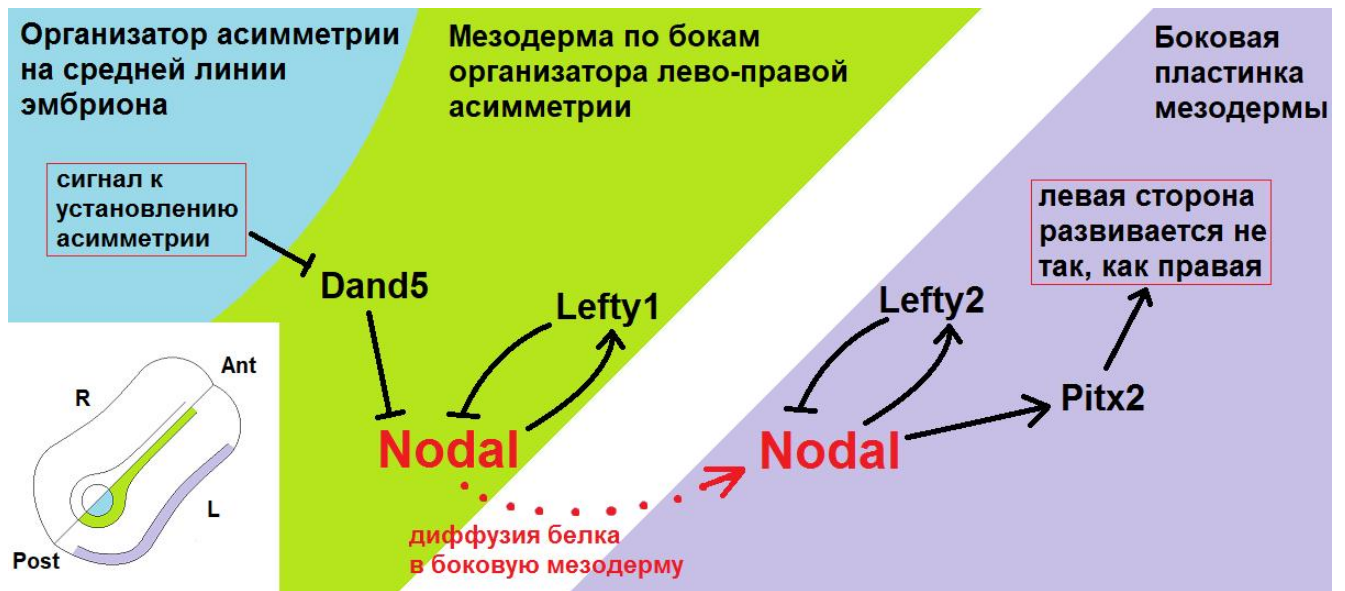


Рисунок 1.1. Схема биохимического сигнального каскада Nodal, инициирующего асимметричное развитие левой стороны тела эмбриона мыши. На врезке условная схема эмбриона мыши во время гастрюляции, вид с вентральной стороны. Ant, anteriорный конец; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона. По данным Lee, Anderson, 2008.

Гены, гомологичные генам сигнального каскада Nodal у позвоночных, участвуют в установлении лево-правой асимметрии у вторичноротых беспозвоночных: ланцетника *Amphioxus sp.*, оболочников – асцидий *Ciona intestinalis* и *Halocynthia roretzi* [Morokuma et al., 2002], иглокожих – морских ежей *Paracentrotus lividus* и *Strongylocentrotus pallidus* [Duboc et al., 2005; Tisler et al., 2016], что свидетельствует об его высокой эволюционной консервативности. У морских ежей *Nodal* маркирует правую сторону тела, а не левую, как у хордовых, что служит дополнительным аргументом в пользу гомологии дорсальной стороны хордовых и вентральной стороны иглокожих [Blum et al., 2009]. Помимо *nodal*, у морского ежа найден его репрессор *lefty*, который не позволяет сигналу Nodal распространяться на левую сторону тела личинки [Molina et al., 2013], и ген *pitx2*, который находится под контролем *nodal* и реализует асимметрию тела [Su, 2014].

Каскад Nodal обнаружен и у первичноротых животных. У брюхоногих моллюсков существуют виды с правозакрученной или левозакрученной раковиной, а также виды, у которых закрученность раковины индивидуально

изменчива. Помимо спиральной раковины, внутренние органы гастропод тоже асимметричны. Декстральные и синистральные особи являются зеркальным отражением друг друга, хотя зеркальность процессов эмбриогенеза оспаривается некоторыми авторами [Shibazaki et al., 2004]. У брюхоногих моллюсков отмечены гомологи генов *nodal* и *pitx*, которые у хордовых отвечают за асимметрию. В результате дробления зародыша гомологи *nodal* и *pitx* тоже экспрессируются асимметрично: на правой стороне у декстральных особей и на левой – у синистральных. Характерный для брюхоногих моллюсков торсионный поворот (то есть разворот внутренностного мешка на 180° в ходе онтогенеза), являющийся одним из проявлений морфологической асимметрии, долгое время считался результатом мышечного усилия личинки, однако показано [Kurita, Wada, 2011], что он происходит из-за интенсивной пролиферации потомков клеток, экспрессировавших *nodal* на более ранних этапах эмбриогенеза. Воздействие на личинку морского блюдечка *Nipponacmea fuscoviridis* ингибитора к белкам суперсемейства TGF- β , к которому относится Nodal, приводило к подавлению пролиферации этих клеток, и торсионного поворота не происходило.

Предпосылки к лево-правой асимметрии имеются и у сестринской с *Bilateria* группы – радиальносимметричных *Cnidaria*, или стрекающих [Watanabe et al., 2014]. Так, пресноводные полипы рода *Hydra* временно приобретают черты двусторонней симметрии при почковании. В зачатке почки дочернего полипа экспрессируется ген *ndr*, имеющий значительное сходство с *nodal* у билатерий. Более того, этот ген инициирует экспрессию гена *pitx*. Помимо этого, в геноме гидры найдены гены-репрессоры *nodal*, принадлежащие семействам Cerberus и Dan, и *smad2/3*, задействованные в передаче сигнала от Nodal. Таким образом, уже у гидры присутствует как минимум часть сигнального каскада Nodal.

1.2. Вторичноротые: строение и функции организаторов лево-правой асимметрии

Асимметричная экспрессия Nodal у большинства позвоночных животных (домовой мыши *Mus musculus*, кролика *Oryctolagus cuniculus*, шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* и *X. tropicalis*, аксолотля *Ambystoma mexicanum*, рыб: данио *Danio rerio*, медаки *Oryzias latipes* и осетра *Acipenser transmontanus*) возникает в результате функционирования так называемого лево-правого организатора. Это участок мезодермы, имеющий эпителиальное строение и покрытый подвижными ресничками, существующий на стадиях гастрюлы и нейрулы и создающий внеклеточный ток жидкости, который индуцирует сигнальный каскад в мезодерме левой стороны тела эмбриона (рисунок 1.2).

1.2.1. Млекопитающие: лево-правый организатор – узелок

Лево-правым организатором домовой мыши (*Mus musculus*) является так называемый узелок – участок мезодермы, не покрытый гипобластом, на вентральной стороне эмбриона, обнаруживаемый во время гастрюляции. Зрелый узелок выглядит как ямка на вентральной стороне эмбриона и состоит примерно из 250 клеток [Sulik et al., 1994], апикальная сторона которых, обращённая на вентральную сторону эмбриона, направлена в полость желточного мешка и не прикрыта гипобластом (рисунок 1.2А). Каждая из клеток узелка несёт на апикальной стороне по одной ресничке, причём эти реснички совершают вращательные движения по часовой стрелке со скоростью около 600 оборотов в минуту [Okada et al., 1999]. При потере ресничек (например, при выключении генов моторных белков KIF3A и KIF3B из суперсемейства кинезинов, необходимых для формирования ресничек) лево-правая ось нарушается, и латерализация органов происходит случайным образом, при этом эмбрионы оказываются нежизнеспособными [Nonaka et al., 1998]. Не столько важно, впрочем, наличие ресничек само по себе, сколько их подвижность: показано, что

неподвижность ресничек из-за поломки гена аксонемного динеина (*lrd*) приводит к таким же нарушениям, что и их полное отсутствие [Supp et al., 1997; Okada et al., 1999].

Суммарное вращение ресничек создаёт в узелке ток жидкости справа налево, причём достаточно быстрый: около 20 микрометров/сек [Okada et al., 1999; Shiratori, Hamada, 2006]. Именно асимметрично направленный ток является ключевым моментом, определяющим дальнейшее развитие асимметрии правой и левой сторон тела эмбриона [Blum et al., 2009]. Гипотеза о важности асимметричного тока получила название Nodal flow, то есть узелковый ток. Показано, что при создании в узелке мышши искусственного потока жидкости справа налево (то есть в обратном направлении), если он достаточно сильный, чтобы нивелировать эффект биения ресничек, все эмбрионы приобретают состояние *situs inversus*. Искусственный поток также позволяет произвольно задавать *situs inversus* или *situs solitus* у мышшей с неподвижными ресничками, в зависимости от направления тока [Nonaka et al., 2002].

Биофизическое моделирование показало, что левонаправленный ток возможен в том случае, если все реснички отклонены назад минимум на 5-25° [Cartwright et al., 2004]. При последующих наблюдениях оказалось, что апикальная поверхность каждой клетки имеет куполообразную форму; базальное тело каждой реснички смещено в постериорном направлении и из-за куполообразной формы клетки оказывается отклонено кзади в среднем на 26,6° [Nonaka et al., 2005]. В результате над поверхностью клеток ток становится более-менее однонаправленным.

Важную роль в расположении базальных тел ресничек играет цитоскелет, а именно сеть актиновых микрофиламентов. При мутациях белков Cofilin1, Vangl2, отвечающих за перестройки актинового цитоскелета, базальные тела ресничек остаются в центре клетки, и это приводит к нарушениям в определении лево-правой оси [Mahaffey et al., 2013].

По бокам от узелка расположены паракордальные клетки, несущие по одной неподвижной ресничке [McGrath et al., 2003]. Эти клетки отвечают за

восприятие тока жидкости, созданного биением ресничек. Предполагается, что передача сигнала от асимметричного тока жидкости осуществляется химическим или механическим путём. Согласно первой гипотезе, клетки узелка выделяют везикулы с ретиноевой кислотой и белком Shh, которые с током жидкости направляются на левую сторону и там сливаются с мембранами паракордальных клеток, активируя в них каскад Nodal [Nonaka et al., 1998; Tanaka et al., 2005]. Гипотеза восприятия механического воздействия тока предполагает, что неподвижные реснички играют роль антенн, непосредственно воспринимая давление тока жидкости в узелке. Механический сигнал от реснички передаётся через трансмембранный сенсорный белок Pkd1 на кальциевые каналы Pkd2 [Field et al., 2011], открытие которых приводит к кальциевому пику в паракордальных клетках левой стороны эмбриона и дальнейшей активации молекулярного каскада [McGrath et al., 2003]. Точный путь восприятия сигнала в боковых областях организатора остаётся предметом дискуссий. Так, белок Pkd2 действительно необходим для индукции каскада Nodal в паракордальных клетках, так же как наличие неподвижных ресничек и способность клеток создавать волну Ca^{2+} в цитоплазме [McGrath et al., 2003; Yoshida et al., 2012], однако другие исследования опровергают связь между неподвижными ресничками и кальциевыми волнами в цитоплазме [Delling et al., 2016].

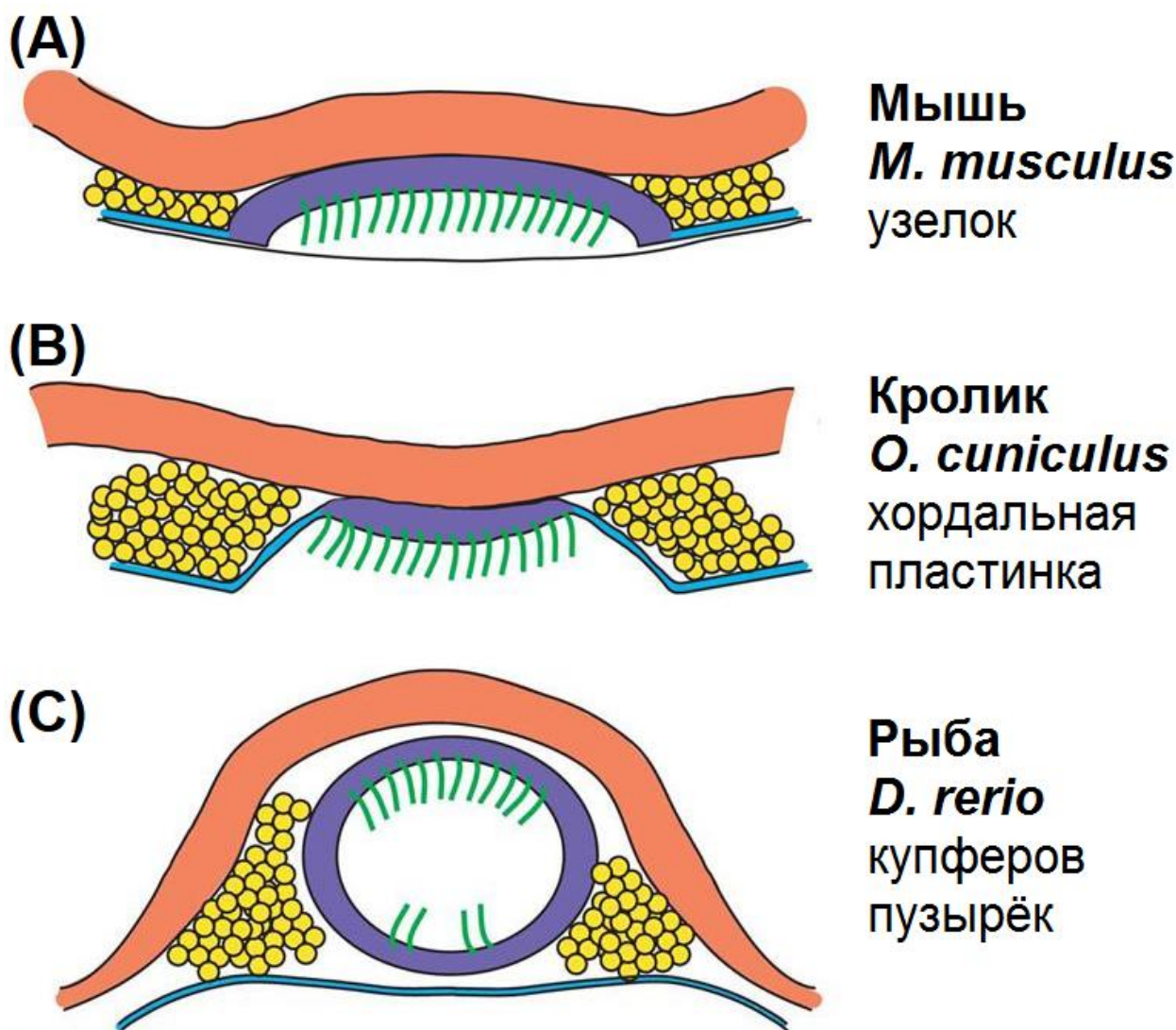


Рисунок 1.2. Строение лево-правых организаторов у отдельных представителей позвоночных животных. Оранжевый – эктодерма, голубой – энтодерма/гипобласт, жёлтый – боковая мезодерма, фиолетовый с зелёными ресничками – орган асимметрии [Lee, Anderson, 2008, с изменениями].

1.2.2. Рыбы: лево-правый организатор – купферов пузырьёк

У костистых рыб (данио *Danio rerio*, японской медаки *Oryzias latipes*) лево-правым организатором асимметрии является купферов пузырьёк [Essner et al., 2005]. Это специфичная для костистых рыб структура, формирующаяся в конце гаструляции в заднем отделе тела, вентральнее хорды (рисунок 1.2C). Купферов пузырьёк образован потомками клеток-лидеров, которые составляют фронт инволюирующей дорсальной бластодермы во время гаструляции. В конце

гастроляции эти клетки эпителизуются и образуют большую сферическую структуру с полостью внутри. Клетки купферова пузырька несут по одной ресничке, обращённой в полость пузырька и отклонённой назад [Lin et al., 2017]. Эти реснички вращаются по часовой стрелке, как и реснички эмбриона мыши, и создают левонаправленный ток в полости купферова пузырька [Lee, Anderson, 2008]. Левонаправленный ток приводит к асимметричной экспрессии генов сигнального каскада Nodal – например, *dand5*, гена-репрессора Nodal. У *Danio rerio* при правильном функционировании ресничек экспрессия гомолога *nodal* инициируется на левой стороне тела, и его активация запускает работу остальных компонентов сигнального каскада Nodal (*lefty1*, *lefty2*, *pitx2*) [Long et al., 2003]. В активации сигнального каскада Nodal у данио, как и у мыши, участвуют кальциевые каналы, кодируемые геном *pkd2* [Yuan et al., 2015].

1.2.3. Морские ежи: лево-правый организатор – участок архентерона

На роль лево-правого организатора у морских ежей претендует участок архентерона. У личинок морских ежей на стадии гастролы обнаружены реснички, расположенные на мезэктодермальных клетках переднего конца архентерона и обращённые в его полость. Каждая клетка несёт на апикальной поверхности по одной ресничке, смещённой к постериорному краю клетки, эти реснички совершают вращательные движения. В случае удаления ресничек с клеток архентерона нарушается правильная экспрессия *nodal* [Tisler et al., 2016]. Всё это позволяет предположить наличие у морского ежа механизма активации сигнального каскада Nodal при помощи подвижных ресничек и тока жидкости, схожего с таковым механизмом у позвоночных.

1.2.4. Модели установления асимметрии у позвоночных, не связанные с током жидкости

Несмотря на то, что механизмы установления асимметрии, в которых задействованы ресничные мезодермальные структуры и создаётся ток жидкости, показаны для представителей разных классов позвоночных и даже для типа Иглокожие, экстраполировать их на любого представителя позвоночных следует с осторожностью, поскольку встречаются и иные механизмы установления асимметрии без ресничек и тока жидкости.

У эмбриона курицы (*Gallus gallus*), в отличие от мыши, энтодерма, подстилающая первичный узелок, сплошная и не имеет разрывов. Мезодерма эмбриона курицы на стадиях гастрюляции и нейруляции представляет собой редкую мезенхимальную сеть, к которой с вентральной стороны прилегает слой энтодермы. В таких условиях мезодерма не формирует ресничек, как то наблюдается у мыши [Schröder et al., 2016; Tsikolia et al., 2012].

Основным механизмом установления асимметрии у эмбриона курицы является клеточная перестройка в районе гензеновского узелка. На стадии гастрюляции, во время которой длина первичной полоски максимальна, происходит быстрое (3-4 ч) перемещение клеток, окружающих узелок, на левую сторону, а сам узелок немного изгибается. В результате гены *shh* и *fgf8*, ранее экспрессировавшиеся симметрично с обеих сторон от узелка, увеличивают интенсивность экспрессии на левой стороне зародыша. *Shh* инициирует экспрессию *nodal* в мезодерме на левой стороне тела зародыша [Esteban et al., 1999]. Экспериментально показано, что при нарушении миграции клеток вокруг узелка сам узелок принимает более симметричную форму, а *shh* и *fgf8* продолжают экспрессироваться на одинаковом уровне с обеих сторон от узелка [Gros et al., 2009]. Причины этих клеточных движений на данный момент неизвестны.

Интересно, что у свиньи (*Sus scrofa domesticus*) также не найден мезодермальный ресничный организатор, и активация каскада *Nodal* на левой

стороне эмбриона свиньи вызывается миграциями клеток справа налево, как и у курицы [Schröder et al., 2016]. Показано, что наличие безресничного лево-правого организатора ассоциировано с потерей группы из пяти генов, в числе которых *dand5* [Szenker-Ravi et al., 2022]. Сравнительный анализ геномов позвоночных показал, что эта группа генов в эволюции позвоночных независимо исчезла дважды: у диапсид и у китопарнокопытных, что предполагает вторичный характер установления лево-правой асимметрии за счёт перемещения клеток.

1.3. Лево-правый организатор у Xenopus laevis

У эмбрионов *X. laevis* в качестве лево-правого организатора функционирует мезодермальный участок крыши гастроцеля [Schweickert et al., 2007]. Он происходит из потомков клеток презумптивной поверхностной мезодермы, находящихся на дорсальной поверхности бластулы (рисунок 1.3А). При гастрюляции этот участок инвагинирует через дорсальную губу бластопора и к началу нейруляции формирует вытянутую треугольную пластинку в поверхностном эпителиальном слое крыши гастроцеля вблизи бластопора, клетки которой обращены в полость гастроцеля и не прикрыты энтодермальным слоем (рисунок 1.3В). Из них центральные клетки несут подвижные реснички, создающие в гастроцеле ток жидкости справа налево, а боковые, для которых характерны неподвижные реснички, воспринимают ток жидкости и индуцируют на левой стороне каскад Nodal. В таком виде область лево-правого организатора существует недолго, и после окончания нейруляции поверхностные мезодермальные клетки погружаются в глубокие слои дорсальной мезодермы (рисунок 1.3С), а поверхность гастроцеля оказывается выстланной полностью энтодермальными клетками [Shook et al., 2004].

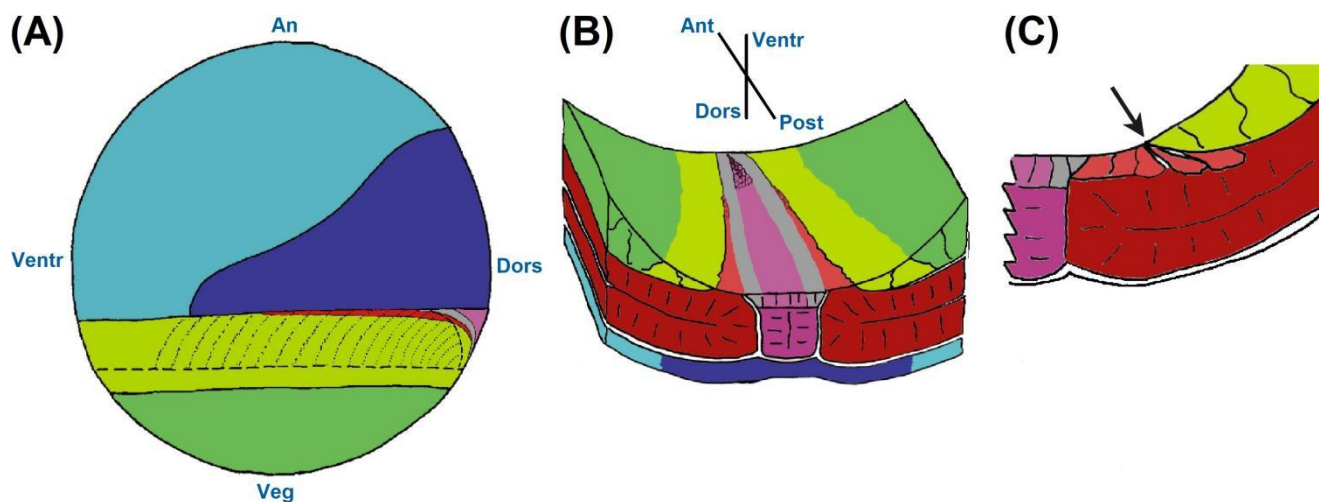


Рисунок 1.3. Схемы морфогенеза поверхностной мезодермы *Xenopus laevis*.

(A) Карта поверхностных презумптивных зачатков на стадии поздней бластулы. (B) Поперечный срез через крышу гастроцеля на стадии средней нейрулы. (C) Ингрессия клеток презумптивной поверхностной мезодермы.

Оттенки синего – презумптивная эктодерма, оттенки зелёного – презумптивная энтодерма, оттенки красного – презумптивная мезодерма (красный – сомиты, розовый – хорда), серый – презумптивный гипохорд. An, анимальный полюс; Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; Post, постериорный конец; Veg, вегетативный полюс; Ventr, вентральная сторона [Shook et al., 2004, с изменениями].

Материал будущего лево-правого организатора приобретает специализацию начиная со стадии поздней бластулы, когда в поверхностном слое отмечается экспрессия характерных генов-маркеров. Один из важнейших – ген *foxj1*, известный как регулятор цилиогенеза и подвижности ресничек на клетках [Stubbs et al., 2008]. Инициация и дальнейшая экспрессия *foxj1* в поверхностной мезодерме на стадиях поздней бластулы и ранней гастрюлы контролируются посредством *nodal3*, связывающегося с рецептором FGF в области поверхностной мезодермы, и действующего совместно с ним кальциевого канала Pkd2 [Vick et al., 2018]. Известно, что ингибирование FGF на поздней бластуле/ранней гастрюле нарушает формирование мезодермы, включая нарушение гастрюляционных движений, укорочение передне-задней оси и значительное снижение уровня экспрессии маркера презумптивной мезодермы сомитов *MyoD1* [Schneider et al., 2019]. Таким образом, инициация экспрессии *foxj1* в будущих клетках

лево-правого организатора является частью более широкого процесса FGF-зависимой специализации мезодермы перед и в начале гастрюляции. Кроме того, показано, что спецификация поверхностной мезодермы находится под контролем канонического Wnt-каскада, который, в свою очередь, зависит от серотонинового сигналинга. Блокирование рецепторов серотонина приводит к значительному снижению уровня экспрессии *Xnr3* и *Foxj1* в поверхностной мезодерме, а в дальнейшем развитии к нарушениям ресничного тока и каскада *Nodal* [Beyer et al., 2012].

Гены, впоследствии участвующие в установлении лево-правой асимметрии, также экспрессируются перед началом гастрюляции. Так, экспрессия *Nodal1* наблюдается в вегетативном полушарии преимущественно на дорсальной стороне; экспрессия *Lefty*, антагониста *nodal1*, также наблюдается на этой стадии в дорсальной губе бластопора. На данном этапе развития взаимодействие этих генов участвует в индукции мезодермы [Tanegashima et al., 2000].

В ходе гастрюляции поверхностная мезодерма подворачивается через дорсальную губу бластопора и занимает положение на средней линии эмбриона вблизи бластопора. К началу нейруляции (стадия 13) она приобретает форму вытянутой треугольной пластинки в крыше гастроцеля, характерную для лево-правого организатора амфибий. Непосредственно вентральнее хорды во всю длину области лево-правого организатора лежат клетки гипохорда, которые впоследствии войдут в состав дефинитивной хорды [Shook et al., 2004]. С обеих сторон от гипохорда лежат небольшие участки презумптивной поверхностной мезодермы сомитов, которые аналогичным образом расположены вентральнее глубинной мезодермы сомитов и впоследствии войдут в состав сомитов (рисунок 1.4). Область лево-правого организатора со всех сторон окружена энтодермальным эпителием, от которого отличается меньшим размером клеток [Schweickert et al., 2007].

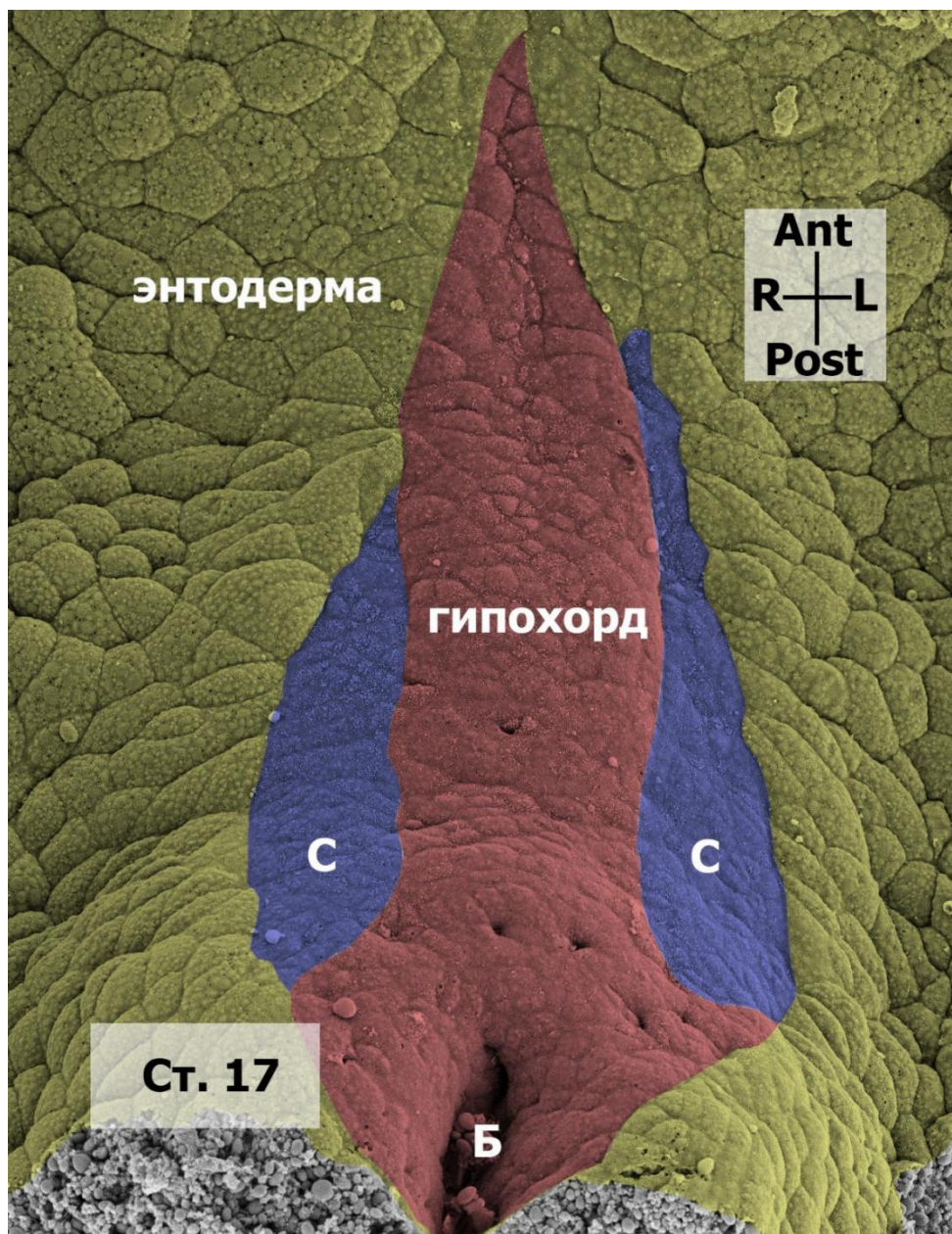


Рисунок 1.4. Морфология крыши гастроцеля шпорцевой лягушки на стадии нейрулы. С, поверхностная презумптивная мезодерма сомитов; Б, бластопор; Ant, anteriорный конец; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона.

На стадии 14 на апикальных поверхностях клеток лево-правого организатора начинают формироваться реснички, расположенные на этом этапе в центре апикальной поверхности клетки, по одной на клетку. Количество ресничных клеток увеличивается, достигая 250-270 к стадии 16, и выходит на плато. Длина ресничек также увеличивается, доходя до 5 микрометров на стадии 18. Кроме того, размещённые по центру клетки реснички постепенно смещаются

на постериорный конец клетки, и к стадии 18 доля постериорно смещённых ресничек на клетках гипохорда достигает 60% [Schweickert et al., 2007].

Реснички на центральных клетках организатора подвижны и вращаются по часовой стрелке с частотой 20-25 биений в секунду. Суммарное вращение ресничек создаёт над областью организатора ток жидкости справа налево, достаточно сильный, чтобы увлекать за собой не только молекулы, но и более крупные частицы, инъецированные в полость гастроцеля. Наличие левонаправленного тока является определяющим фактором для установления асимметрии тела эмбриона: в условиях экспериментального блокирования тока жидкости эмбрионы развивались с нарушениями асимметрии.

Для успешного формирования и позиционирования ресничек необходима активность генов *myo1d* и *vangl2*, отвечающих за планарную полярность клеток [Antic et al., 2010; Tingler et al., 2018]. При нарушении трансляции этих генов реснички формируются укороченными и остаются по центру клетки, что вызывает нарушения левонаправленного тока жидкости в гастроцеле и, как следствие, нарушения лево-правой асимметрии. Потеря аксонемного динеина (гомологичного таковому у мыши) вызывала также неподвижность ресничек и далее нарушения установления асимметрии. Кроме того, у эмбриона лягушки было показано наличие в клетках лево-правого организатора ионного канала *Pkd2* и его необходимость для правильной латерализации зародыша [Schweickert et al., 2007; Tingler et al., 2018].

Боковые зоны лево-правого организатора, образованные клетками презумптивной мезодермы сомитов, несут неподвижные реснички и служат для восприятия ресничного тока в гастроцеле. Приблизительно на стадии ранней нейрулы эти клетки начинают экспрессировать *Nodal1* и его антагонист *Dand5* [Vonica, Brivanlou, 2007], причём эта экспрессия симметрична на обеих сторонах лево-правого организатора. В клетках левой сенсорной зоны, которые воспримут ресничный ток жидкости в гастроцеле, произойдёт репрессия *Dand5* и высвобождение *Nodal1*, что индуцирует дальнейший каскад *Nodal* на левой

стороне тела [Schweickert et al., 2010]. Аналогичная репрессия *Dand5* как результат ресничного тока описана для мыши [Nakamura et al., 2012]. Посттранскрипционная репрессия *Dand5* осуществляется при помощи РНК-связывающего белка *Vicc1*, действующего совместно с белком *Dicer* [Maerker et al., 2021]. Таким образом, на левой стороне тела снижается трансляция белка *Dand5*, и белок *Nodal1*, связанный с белком *Gdf3*, высвобождается из клеток боковой сенсорной зоны и переносится в клетки боковой пластинки мезодермы на левой стороне тела, где индуцирует асимметричный каскад *Nodal* [Tanaka et al., 2007].

Известно, что специализация боковых сенсорных зон зависит от FGF-сигналинга на стадии поздней гаструлы [Schneider et al., 2019]: ингибирование FGF на стадии 12 приводило к полной утрате лево-правым организатором боковых сенсорных зон, выражающейся в отсутствии экспрессии *Nodal1*, *Dand5* и маркера презумптивной мезодермы сомитов *MyoD1* в поверхностных клетках крыши гастроцеля (рисунок 1.5А, В), зона экспрессии маркера ресничных клеток *Tekt2* сужалась, соответственно, до клеток центральной зоны (рисунок 1.5А', В'); в конечном итоге это приводило к нарушению левосторонней экспрессии *Pitx2* (рисунок 1.5С). Сходные результаты, полученные при блокировании экспрессии кальциевого канала *Pkd2*, предполагают индукцию боковых сенсорных зон за счёт FGF/ Ca^{2+} сигналинга [Vick et al., 2018]. Молекулярные механизмы, приводящие к специализации боковых сенсорных зон лево-правого организатора на стадии поздней гаструлы, отчасти совпадают с молекулярными механизмами индукции *foxj1* в поверхностной мезодерме перед началом гаструляции, однако масштаб и значение этого совпадения ещё предстоит исследовать.

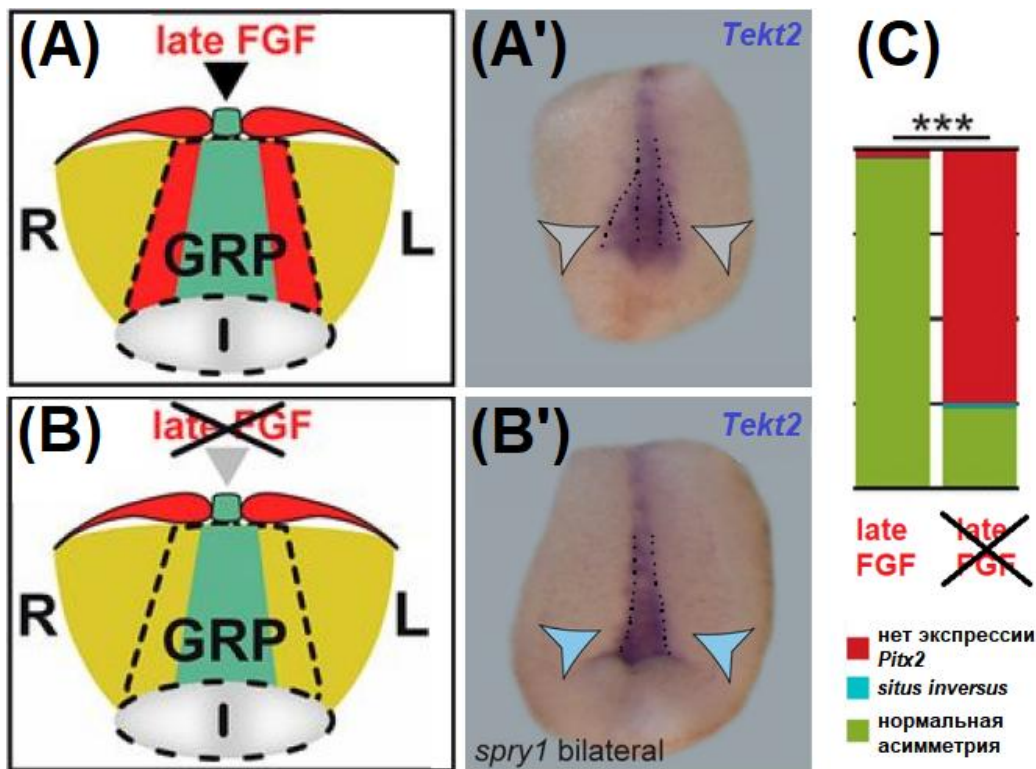


Рисунок 1.5. Нарушения морфологии лево-правого организатора при ингибировании FGF. (A, A') Схема нормального лево-правого организатора и экспрессия маркера ресничных клеток *Tekt2*. (B, B') Сужение области организатора и зоны ресничных клеток в крыше гастроцеля после ингибирования FGF. (C). Нарушения асимметричной экспрессии *Pitx2* в результате ингибирования FGF. GRP, лево-правый организатор; R, правая сторона; L, левая сторона [Schneider et al., 2019, с изменениями].

Лево-правый организатор у *X. laevis* достигает своего морфологического расцвета к стадиям поздней нейрулы (17-18), однако существует недолго, и уже к стадии 19 поверхностные мезодермальные клетки начинают погружаться в глубокие слои дорсальной мезодермы [Schweickert et al., 2007]. Этот процесс начинается в антериорной области и прогрессирует в сторону бластопора. По мере стягивания апикальных полюсов погружающихся клеток площадь их апикальной поверхности сокращается, что приводит к схождению краёв энтодермального пласта клеток, фланкирующего область лево-правого организатора. К стадии ранней хвостовой почки поверхностная мезодерма полностью уходит в глубокие слои, лево-правый организатор исчезает, и поверхность гастроцеля оказывается выстланной полностью энтодермальными клетками. Клетки гипохорда становятся частью дефинитивной хорды, а клетки

боковых сенсорных зон дифференцируются в горизонтальные миосепты, разделяющие сомиты на дорсальные и вентральные части [Shook et al., 2004].

Дальнейшее развитие лево-правой асимметрии у *X. laevis* связано с переносом экспрессии *Nodal1* в боковую пластинку мезодермы на левой стороне и активацией на левой стороне тела экспрессии гомеобоксного гена *pitx2*. В то время как экспрессия *Nodal1* достаточно быстро затухает, *Pitx2* регулирует дальнейшие асимметричные проявления органогенеза. Так, развитие асимметрии кишечника начинается с изменений в его левой стенке под воздействием *Pitx2*. Мезодерма на левой стороне кишечника утоньшается, а энтодерма активно пролиферирует с сохранением толщины стенки, из-за чего вся левая стенка кишечника увеличивается в длину. Это вызывает изгиб всего кишечника в левую сторону [Davis et al., 2017].

Сердце зародыша образуется на вентральной стороне тела на средней линии и вначале представляет собой симметричную мезодермальную трубку. На стадии 33 происходит изгиб сердца (так называемая декстральная петля), становящаяся выраженной к стадии 35 [Kolker et al., 2000]. К стадии 46 асимметрия сердца становится хорошо заметной с вентральной стороны эмбриона, различимы желудочек и расположенный антериорнее и правее его артериальный конус.

Кишечник и сердце служат удобным показателем асимметрии, поскольку их легко наблюдать у зародышей лягушек без применения дополнительных методов визуализации. На рисунке 1.6 представлены головастики *X. laevis* на стадии 45. У головастика на рисунке 1.6А оба органа имеют нормальную морфологию, называемую *situs solitus*: артериальный конус сердца находится на правой стороне тела относительно желудочка, спираль кишечника закручена против часовой стрелки. У головастика на рисунке 1.6В наблюдается полная зеркальная транспозиция органов, или *situs inversus*: артериальный конус сердца находится на левой стороне тела относительно желудочка, спираль кишечника закручена по часовой стрелке.

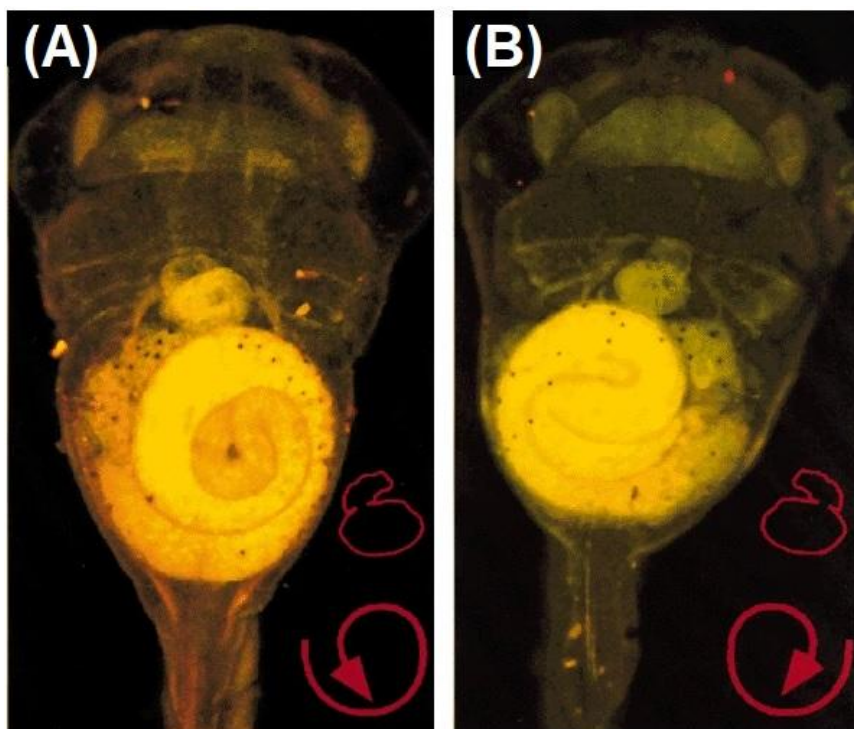


Рисунок 1.6. Асимметрия висцеральных органов у головастиков *X. laevis* на стадии 45, вид с вентральной стороны. (А) нормальная асимметрия (*situs solitus*); (В) зеркальное положение органов (*situs inversus*) [Ryan et al., 1998].

1.4. Альтернативные гипотезы установления асимметрии у Xenopus

Существующие данные об устройстве и функциях лево-правого организатора у *X. laevis* позволяют уверенно говорить о его ключевой роли в установлении лево-правой асимметрии. Однако существуют свидетельства об асимметричных явлениях в развитии *Xenopus*, наблюдающихся ранее сроков функционирования ресничного тока в гастронце. Так, на роль раннего детерминанта лево-правой асимметрии была выдвинута H^+/K^+ -АТФаза АТР4а, которая неравномерно распределена у раннего дробящегося эмбриона и создаёт асимметричное распределение протонов в клетках эмбриона. Было показано, что её функционирование необходимо для асимметричного распределения серотонина и поддержания его уровня в одном бластомере на стадии 32 клеток, а химическое ингибирование её функций приводит к последующим нарушениям лево-правой асимметрии [Adams et al., 2006]. Однако дальнейшие исследования не подтвердили неравномерное распределение АТР4а и показали, что активность

АТР4а необходима для корректной индукции поверхностной мезодермы с участием Wnt-каскада и регулирует расположение ресничек через механизмы планарной клеточной полярности [Walentek et al., 2012]. Серотонин также оказался необходим для индукции поверхностной мезодермы будущего лево-правого организатора [Beyer et al., 2012], что помещает оба ранних детерминанта в общий контекст установления асимметрии с помощью ресничного тока.

Другие возможные кандидаты на роль ранних детерминантов асимметрии – это различные компоненты цитоскелета. Многие гипотезы о роли цитоскелета в установлении лево-правой асимметрии у амфибий предпринимают попытки увязать участие цитоскелета в этом процессе с изученными механизмами установления асимметрии у первичноротых животных. Так, у дрозофилы асимметрия контролируется ключевым геном *myo1d*, гомологичным таковому у позвоночных. Белок Myo1D у дрозофилы связывается с клеточной мембраной через DE-кадгерин и β -катенин и за счёт перемещения вдоль актиновых микрофиламентов создаёт асимметричное натяжение мембраны клеток, которое в дальнейшем определяет асимметрию органов [González-Morales et al., 2015]. У аскариды лево-правая асимметрия устанавливается за счёт хиральных поворотов кортикального слоя цитоплазмы во время первых делений дробления, смещающих бластомеры друг относительно друга, и этот процесс также опирается на актин-миозиновые взаимодействия. Показано, что взаимодействия миозина с актином в кортикальном слое вызывают механические напряжения и вращательные смещения актиновой сети по часовой стрелке (кортикальный ток), что в конечном итоге приводит к смещению веретена деления [Naganathan et al., 2014]. У амфибий же активность генов *myo1d* и *vangl2*, отвечающих за планарную полярность клеток, необходима для формирования и правильного расположения подвижных ресничек на клетках лево-правого организатора [Tingler et al., 2018], что помещает их в контекст модели ресничного тока.

1.4.1. Формины определяют асимметрию улиток на ранних стадиях развития

Далее в поле зрения исследователей попали формины – белки-регуляторы актинового цитоскелета. Формины известны своей ключевой ролью в установлении лево-правой асимметрии у брюхоногих моллюсков, у которых возможны как правозакрученные (декстральные), так и левозакрученные (синистральные) варианты лево-правой разметки тела, а декстральные и синистральные особи являются зеркальным отражением друг друга. Хиральность эмбриона определена уже к первому делению, что легко наблюдается благодаря спиральному дроблению, и обусловлена одним «материнским» геном, причём декстральный аллель является доминантным. Если в синистральную яйцеклетку ввести немного цитоплазмы из декстральной, то яйцеклетка сменит хиральность на декстральную, в то время как обратная операция не приведёт к изменению хиральности [Coutelis et al., 2014].

На роль искомым факторов хиральности выдвигаются два гена, кодирующие формины *Lsdia1* и *Lsdia2* – белки, участвующие в построении актинового цитоскелета [Kuroda et al., 2016]. По последним данным, полученным с помощью технологии CRISPR/Cas9, нокаут гена формина *lsdia1* у декстральных улиток приводит к появлению у них строго синистрального потомства, наследующего это изменение. Таким образом, именно *lsdia1* является искомым «геном хиральности», определяющим доминантный декстральный фенотип, в то время как *lsdia2* присутствует и у декстральных, и у синистральных эмбрионов, но проявляется в виде синистрального фенотипа только в отсутствие *lsdia1*. Белковые продукты этих генов присутствуют в яйцеклетке и определяют будущую хиральность эмбриона уже на стадии зиготы на внутриклеточном уровне [Abe, Kuroda, 2019].

Исследование, проведённое с использованием ингибитора форминов на амфибиях, дало противоречивые результаты [Davison et al., 2016]. Согласно этому исследованию, ингибирование форминов во время дробления приводило к

нарушениям асимметрии органов у головастика *X. laevis*, в отличие от ингибирования на стадиях от поздней бластулы до ранней нейрулы, при этом ингибирование форминов по окончании нейруляции дало практически те же результаты, что и ингибирование во время дробления (рисунок 1.7). Однако авторы интерпретируют полученные результаты в пользу участия форминов в установлении асимметрии во время дробления, тем самым продвигая идею о раннем механизме установления лево-правой асимметрии у *Xenopus*, связанном с хиральностью цитоскелета и независимом от ресничного тока на стадиях нейрулы.

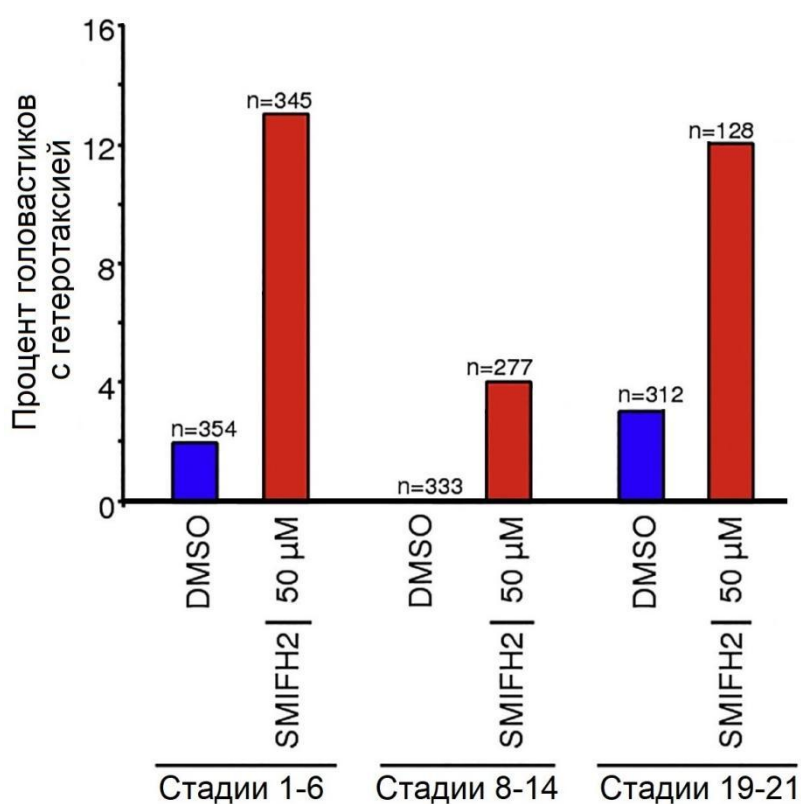


Рисунок 1.7. Эффекты обработки эмбрионов ингибитором форминов SMIFH2 на разных стадиях развития. DMSO – контроль с растворителем, в котором разведён ингибитор [Davison et al., 2016, с изменениями].

Таким образом, все выдвинутые ранее гипотезы раннего установления асимметрии у *Xenopus* укладываются в контекст модели ресничного лево-правого организатора, кроме гипотезы участия форминов, которая требует дальнейшей проверки.

1.4.2. Формины – белки-регуляторы цитоскелета

Формины – это эволюционно консервативное семейство белков, появившееся ещё у прокариот и представленное во всех царствах эукариот [Isogai, Innocenti, 2016]. Это длинные (более 1000 аминокислот), мультидоменные белки, состоящие из различных комбинаций нескольких функциональных доменов.

Из наиболее часто встречающихся доменов FH2-домен димеризуется и формирует кольцо на плюс-конце актинового филамента, ускоряя его элонгацию; домен FH1 связывает профилин-актиновые комплексы и стимулирует доставку мономеров актина к растущему концу филамента [Chalkia et al., 2008]. Прочие домены форминовых белков отвечают за локализацию форминов (в том числе трансмембранную), ауторегуляцию (в том числе аутоингибирование), связь с Rho-ГТФ-азами и другими компонентами сигнальных путей клетки.

Помимо стимуляции полимеризации актиновых филаментов, для форминов также показана активность в отношении микротрубочек: тот же домен FH2, который связывается с актином, способен стабилизировать микротрубочки, препятствуя их спонтанной разборке [Bartolini, Gundersen, 2010]. Таким образом, формины являются идеальными кандидатами на роль универсальных регуляторов цитоскелета.

Экспериментальное модулирование активности форминов *in vivo* стало возможным благодаря открытию и производству специфических ингибиторов. Ингибитор SMIFH2 взаимодействует с доменом FH2, нарушая его взаимодействие с микротрубочками и актиновыми филаментами [Rizvi et al., 2009]. Для SMIFH2 показана цитотоксичность в высоких дозах, рекомендуемые концентрации для позвоночных не превышают 25 μM [Isogai et al., 2015]. Кроме того, известно, что SMIFH2 способен ингибировать функции белков суперсемейства миозинов, а также влияет на концентрацию в клетках p53 и на JAK-STAT сигналинг [Innocenti, 2023], что требует дополнительного внимания к постановке эксперимента и тщательного подбора дозы [Nishimura et al., 2021].

2. Материалы и методы

Экспериментальная часть работы была выполнена в лаборатории биофизики развития на кафедре эмбриологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

2.1. Материалы

2.1.1. Лабораторные организмы

В работе использовали следующие организмы:

- *Xenopus laevis*, Daudin
- *Escherichia coli* XL1-Blue

2.1.2. Реактивы

Реактивы:

CaCl₂ (Helicon, Россия), CHAPS (Sigma, США), DIG RNA Labeling Mix 10x (Roche, Швейцария), EDTA (AppliChem, Германия), H₂O₂ (Sigma, США), HEPES (Fluka, Швейцария), HCl (Лавернастройинжиниринг, Россия), KCl (Helicon, Россия), L-цистеина гидрохлорид (Fluka, Швейцария), LiCl (Fluka, Швейцария), MgSO₄ (Helicon, Россия), NaCl (Panreac, Испания), NaOH (Chemapol, Чехия), OsO₄ (Реахим, Россия), PBS (Amresco, США), Taq Turbo буфер 10x (Евроген, Россия), Torula RNA (Sigma, США), Transcription buffer 5x (Thermo Scientific, Литва), Tris Base (Amresco, США), TRITC-phalloidin (Sigma, США), Tween-20 (Sigma, США), агароза (Amresco, США), ампициллин (AppliChem, Германия), ацетат натрия (Helicon, Россия), ацетон (Лавернастройинжиниринг, Россия), бета-меркаптоэтанол (Sigma, США), блокирующий реагент для *in situ* гибридизации (Roche, Швейцария), бромистый этидий (Helicon, Россия), буфер для нанесения проб нуклеиновых кислот на агарозный гель 4x gel loading dye

(Евроген, Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США), гепарин (Spofa, Чехия), глицерин (Лабтех, Россия), глутаровый альдегид (Sigma, США), диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma, США), дитиотриэтол (DTT) (Promega, США), диэтилпиروкарбонат (DEPC) (Amresco, США), изопропанол (Химмед, Россия), ингибитор РНКаз RiboLock (40U/мкл, ThermoScientific, США), ингибитор форминов SMIFH2 (Sigma, США), какодиловая кислота (Serva, Германия), краситель толуидиновый синий (Аурат, Россия), малеиновая кислота (Sigma, США), маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия), нормальная овечья сыворотка (Sigma, США), параформальдегид (Sigma, США), поливинилпирролидон (PVP) (AppliChem, Германия), реагент Extract RNA (Евроген, Россия), смесь нуклеотидов (dNTP) (10 mM каждого) (Fermentas, Германия), среда LB (Amresco, США), субстрат для щелочной фосфатазы (BM Purple) (Roche, Германия), триэтанолamina гидрохлорид (Sigma, США), уксусная кислота (Лавернастройинжиниринг, Россия), уксусный ангидрид (Sigma, США), фиколл 400 (Sigma, США), формальдегид (Sigma, США), формамид (Panreac, Испания), хлороформ (Реахим, Россия), цитрат натрия (Panreac, Испания), человеческий хорионический гонадотропин (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), этанол (Химмед, Россия).

Наборы реактивов:

Encyclo PCR Kit (Евроген, Россия), Mint kit (Евроген, Россия), Quick-TA kit (Евроген, Россия), SPI-Pon 812 Embedding Kit (SPI supplies, США), Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, США).

Ферментные препараты:

- Sp6 РНК-полимераза (Fermentas, Германия)
- T7 РНК-полимераза (Fermentas, Германия)
- Taq ДНК-полимераза (Fermentas, Германия)
- ДНКаза I (Fermentas, Германия)
- протеиназа К (Fermentas, Германия)

Антитела:

- первичные антитела против ацетилированного α -тубулина (мышь, 1 мг/мл, Sigma, США)
- вторичные антитела против IgG мыши, конъюгированные с флуорохромом DyeLight488 (коза, 1,5 мг/мл, Jackson ImmunoResearch, США)
- Anti-Digoxigenin-AP Fab фрагменты, конъюгированные с щелочной фосфатазой (овца, 150U/мкл, Roche, Швейцария)

2.1.3. Среды, буферы и растворы

Среды:

- Среда Лурия-Бертани (LB): 25 г сухой среды LB на 1 л дистиллированной воды, автоклавированная
- Среда LB с ампициллином: в холодную автоклавированную среду LB добавляли ампициллин (50 мкг/мл)
- Агаризованная среда LB: перед автоклавированием в среду LB дополнительно добавляли бактериальный агар до концентрации 1,5%

Буферы и растворы:

- L-цистеин: 2% водный раствор, pH 7,8
- MAB: 100 mM малеиновая кислота, 150 mM NaCl, pH 7,5
- MMR (модифицированный раствор Рингера для культивации зародышей амфибий) 1x: 0,1 M NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 5 mM HEPES, pH 7,4
- PBS: 1 таблетка на 1 литр дистиллированной воды
- PFA: 4% раствор параформальдегида в PTw, pH 7,0-8,0
- PTw: PBS с 0,1% Tween-20
- SSC 20x: 3 M NaCl, 0,3 M цитрат Na, pH 7,0

- TAE (50-кратный буфер для электрофореза в агарозном геле) 50x: 2 М Tris-HCl, 1,56 М уксусная кислота, 50 мМ EDTA, pH 8,2-8,4
- TEA: 0,1 М раствор триэаноламина, pH 7,0-8,0
- Гибридизационный буфер: 50% формамид, 5x SSC, 1x раствор Денхардта, 1 мг/мл Torula RNA, 100 мкг/мл гепарин, 0,1% CHAPS, 0,1% Tween-20
- Какодилатный буфер: 0,2 М какодиловой кислоты, pH 7,3
- Обесцвечивающий раствор: 5% H₂O₂, 5% формамид, 0,5x SSC
- Раствор бромистого этидия в воде для окрашивания ДНК в агарозных гелях 10 мг/мл
- Раствор Денхардта 100x: 2% фикоколл 400, 2% PVP, 2% BSA
- Раствор для фиксации зародышей для анализа морфологии висцеральных органов, иммунофлуоресцентного анализа, гибридизации *in situ*: 4% раствор формальдегида в PBS
- Раствор для фиксации зародышей для электронной микроскопии: 2,5% раствор глутарового альдегида в 0,1 М какодилатном буфере
- Эпоксидная смола SPI-Pon 812 для световой микроскопии: SPI-PON 812 – 9,8 мл, NMA – 6,9 мл, DDSA – 3,3 мл, DMP-30 – 0,35 мл

2.1.4. Праймеры

Все праймеры были синтезированы компанией «Евроген», Россия.

Стандартные праймеры T7, Sp6, M13_forward и M13_reverse были синтезированы согласно опубликованным компанией «Евроген» последовательностям.

Список специфических праймеров:

*Nodal1*_forward: TTAATGCAAACCCTCCTTCTACCA

*Nodal1*_reverse: TCAAAACAACCTCATCTCCCTCAT

*XlPitx2C*_forward: GCTGCAGATGGAACCGAAGGAA

*XlPitx2C*_reverse: GGGAGGTGTTGGGGGAGCATAA

*Sox17*_forward: TGGCAAGTCGTGGAAGTCTC

Sox17_reverse: CTATAGGGCACGGTGTTCAGTCT

MyoD1_forward: ACCCCCGACGACTTCTACG

MyoD1_reverse: GAGGGGCTTGGTTATTTACATTG

Lefty_forward: GGCTGGAGGAGCTTTGATGT

Lefty_reverse: TCCCAGAAGGAGCGGTGATA

Аmplицированные фрагменты были вставлены в вектор pAL2-T (Евроген, Россия).

ПЦР-продукты, получаемые с плазмид, были амплицированы при помощи стандартных праймеров T7 и Sp6 и использованы для синтеза меченных дигоксигенином РНК-зондов.

Dand5 и *tekt2* ПЦР-продукты были амплицированы с ранее опубликованных плазмид [Maerker et al., 2021; Stubbs et al., 2008].

Вектор Bluescript, содержащий вставку *foxj1*, был любезно предоставлен Philipp Vick (Гогенгеймский университет, Штутгарт, Германия).

2.1.5. Лабораторное оборудование

В работе использовали настольные центрифуги MiniSpin Plus и Centrifuge 5430R (Eppendorf, Германия), настольную центрифугу Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия), автоматический ПЦР-амплификатор Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия), автоматический ПЦР-амплификатор MJ Mini (Bio-Rad, США), блок питания для электрофореза PowerPac Basic (Bio-Rad, США), водяную баню GFL 1013 (GFL, Германия), орбитальный шейкер S-3LA20 (ELMI, Латвия), шейкер-инкубатор ES-20 (Biosan, Латвия), твердотельный термостат ThermoCell СНВ-202 (Bioer, Китай), термостат KB23 (Binder, Германия), УФ-трансиллюминатор ЕСХ-15.М (Vilber Lourmat, Франция), весы аналитические «Adventurer» (Ohaus, Китай), автоматические дозаторы Eppendorf Research (Eppendorf, Германия), спектрофотометр NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США), ультратом (Tesla, Чехословакия), конфокальный микроскоп Olympus

FluoView FV10i (Olympus, Япония), стереомикроскоп Olympus SZX9 (Olympus, Япония) с камерой TourCam E3CMOS (TourTek, Китай), микроскоп Olympus CX41 (Olympus, Япония) с камерой TourCam UNCCD05000KPA (TourTek, Китай), сканирующий электронный микроскоп CamScan S-2 (Tescan, USA).

2.2. Методы

2.2.1. Получение зародышей

В работе использовали зародышей шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*, Daudin), полученных методом гормональной стимуляции животных. Самкам инъецировали хорионический гонадотропин человека (650 ед. на самку). Через 12-15 часов получали икру и смешивали в сухих чашках Петри с суспензией сперматозоидов в 0,5х MMR, полученной при гомогенизации участка семенника. Через несколько минут чашку заливали раствором 0,1х MMR, активируя процесс оплодотворения.

Студенистые оболочки удаляли 2% раствором L-цистеина, после чего промывали зародышей 0,1х MMR 4-5 раз. После снятия студенистых оболочек зародышей культивировали в 0,1х MMR до необходимой стадии согласно таблице нормального развития [Nieuwkoop, Faber, 1994].

2.2.2. Воздействие ингибитором форминов

Экспериментальное воздействие на эмбрионы ингибитором форминов SMIFH2 производили согласно таблице 2.1: стоковый раствор SMIFH2 в DMSO разводили 0,1х MMR до конечной концентрации 1 μM , 5 μM , 10 μM или 50 μM . Чтобы исключить влияние различий концентрации DMSO на развитие зародышей, концентрацию DMSO в каждом случае доводили до 0,05% (в растворе 50 μM SMIFH2 эта концентрация растворителя была достигнута сразу при добавлении ингибитора). Контрольный раствор – 0,05% раствор DMSO в 0,1х MMR.

Таблица 2.1. Растворы ингибитора форминов SMIFH2

Образец	DMSO	SMIFH2			
		1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M
концентрация DMSO	0,05%				

Эмбрионы переносили в полученные растворы и инкубировали на стадиях дробления (2-6,5) или гаструлы-нейрулы (10-18). После этого зародыши переносили обратно в чистый 0,1x MMR.

2.2.3. Фиксация образцов

- *сканирующая электронная микроскопия*

Зародышей на стадиях 10,5-18 освобождали от желточной оболочки, фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в 0,1 М какодилатном буфере и хранили при +4 °С.

- *иммунофлуоресцентный анализ*

Зародышей на стадии поздней нейрулы (стадия 18) освобождали от желточной оболочки и фиксировали в растворе 4% формальдегида на PBS в течение ночи при +4 °С.

- *гибридизация in situ*

Зародышей на стадиях 9-28 освобождали от желточной оболочки и фиксировали в растворе 4% формальдегида на PBS в течение 3 ч при комнатной температуре или ночь при +4 °С, после чего фиксатор заменяли на 96% этанол. Материал хранили при -20 °С до проведения реакции.

- *анализ морфологии висцеральных органов*

Головастиков на стадии 46 фиксировали в растворе 4% формальдегида на PBS в течение ночи при +4 °С.

2.2.4. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Зафиксированные эмбрионы трижды по 15 минут отмывали в 0,1 М какодилатном буфере, вырезали участок крыши гастроцеля вблизи бластопора – дорсальный эксплант. Часть образцов раскалывали в поперечной плоскости. Полученные образцы затем дополнительно фиксировали 1% раствором OsO₄ на 0,1 М какодилатном буфере в течение 45 мин, трижды по 15 минут отмывали в 0,1 М какодилатном буфере, обезвоживали в этаноле восходящей концентрации и 100% ацетоне и высушивали в критической точке на базе межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Образцы монтировали на специальном столике, напыляли в вакууме Au и Pt и просматривали с использованием сканирующего электронного микроскопа CamScan S-2.

2.2.5. Иммунофлуоресцентный анализ

Эмбрионы фиксировали на стадии 18, вырезали участок крыши гастроцеля вблизи бластопора – область лево-правого организатора.

Образцы отмывали от фиксатора, инкубировали с первичными антителами против ацетилированного α -тубулина в течение ночи, затем отмывали их от излишков антител PBS. Результат визуализировали с помощью вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом DyeLight488, инкубировали в течение ночи. Образцы отмывали от излишков антител PBS и PTw и окрашивали на F-актин при помощи TRITC-фаллоидина 45 мин в темноте (таблица 2.2). Окрашенные образцы переводили в глицерин и хранили при -20°C .

Регистрацию флуоресценции проводили на микроскопе Olympus FluoView FV10i.

Таблица 2.2. Протокол окраски флуоресцентными метками

<u>День 1, окрашивание на ацетилованный тубулин</u>			
Отмывка	PBS	30 мин	комнатная температура, на шейкере
	PTw	1 ч	
	PTw + 20% сыворотка (инактивированная нагреванием)	2 ч	
Инкубация с первичными антителами	PTw + 20% сыворотка + AntiAcTubulin антитела 1:1000	на ночь	+4 °C
<u>День 2, окрашивание на ацетилованный тубулин</u>			
Отмывка	PBS	5x1 ч	комнатная температура, на шейкере
	PTw + 20% сыворотка (инактивированная нагреванием)	2 ч	
Инкубация с вторичными антителами	PTw + 20% сыворотка + AntiMouse антитела 1:1000	на ночь	+4 °C
<u>День 3, окрашивание на F-актин</u>			
Отмывка	PBS	3x15 мин	комнатная температура, на шейкере
	PTw	1 ч	
Окрашивание	PTw + TRITC-Phalloidin (0,005 мг/мл)	45 мин	в темноте
Отмывка	PBS	2 ч	комн. темп.
	глицерин	хранение	-20 °C

2.2.6. Клонирование генов интереса и синтез антисмысловых РНК-зондов

Выделение тотальной РНК с реагентом Extract RNA

I. К образцам эмбрионов добавляли 1 мл Extract RNA, гомогенизировали с помощью вортекса (Microspin FV-2400) и осаждали нерастворённые остатки: центрифугировали 10 мин при 14000 rpm (Eppendorf MiniSpin Plus), супернатант отбирали в новую пробирку.

II. Разделение фаз

К супернатанту добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали встряхиванием, смесь центрифугировали 10 мин при 14000 rpm, верхнюю водную фазу отбирали в новую пробирку.

К отобранной водной фазе добавляли 500 мкл хлороформа, перемешивали встряхиванием, смесь центрифугировали 5 мин при 14000 rpm, верхнюю водную фазу отбирали в новую пробирку.

III. Выделение РНК

К отобранной водной фазе добавляли 500 мкл изопропанола, перемешивали с помощью вортекса, смесь центрифугировали 10 мин при 14000 rpm, супернатант сливали и добавляли 1 мл 80% этанола, перемешивали при помощи вортекса, центрифугировали 5 мин при 7500 rpm и снова отбирали супернатант, отмывка 80% этанолом проводилась два раза.

Далее удаляли супернатант и высушивали РНК на воздухе 5 мин. РНК растворяли в 10–20 мкл H₂O (DEPC-treated), пипетировали при +55-60 °С 10-15 мин (если РНК плохо растворялась).

IV. Измерение концентрации РНК на спектрофотометре NanoDrop 2000.

Получение библиотеки дц-кДНК методом ПЦР с обратной транскрипцией

Для получения двухцепочечной кДНК использовали набор Mint kit.

<u>Реакционная смесь 1:</u>		<u>Реакционная смесь 2:</u>	
H ₂ O	до 5 мкл	5x First strand buffer	2 мкл
тотальная РНК	1,5 мкг	DTT (10 mM)	1 мкл
3' праймер (10 μM)	1 мкл	dNTP mix (10 mM each)	1 мкл
PlugOligo адаптер (15 μM)	1 мкл	Mint reverse transcriptase	1 мкл

Обратную транскрипцию проводили в ПЦР-амплификаторе Mastercycler gradient. Реакционную смесь 1 инкубировали при +70 °С 2 мин, при +42 °С 1 мин, вносили реакционную смесь 2. Смесь инкубировали при +42 °С 30 мин, вносили 5 мкл IP-solution, продолжали инкубацию при +42 °С 90 мин. Реакцию останавливали инкубацией смеси при +70 °С 10 мин.

Полученную первую цепь кДНК использовали для наработки двухцепочечной кДНК. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе Mastercycler

gradient, количество циклов ПЦР подбирали согласно протоколу производителя. Полученную библиотеку дц-кДНК хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ПЦР-смесь:

H ₂ O	40 мкл
10x Encyclo buffer	5 мкл
dNTP mix (10 mM each)	1 мкл
PCR M1 Primer (10 μM)	2 мкл
первая цепь кДНК	1 мкл
50x Encyclo polymerase mix	1 мкл

Программа ПЦР:

предварительная денатурация, 1 цикл	
+95 °C	1 мин
циклы ПЦР, 21 цикл	
+95 °C	15 сек
+66 °C	20 сек
+72 °C	3 мин
финальная элонгация, 1 цикл	
+66 °C	20 сек
+72 °C	3 мин

Получение целевого фрагмента исследуемого гена

Полученную библиотеку дц-кДНК использовали в качестве матрицы для наработки фрагментов исследуемых генов методом ПЦР с использованием набора Encyclo PCR kit. Для этого в работе были использованы специфичные праймеры. Смесь специфичной пары праймеров готовили, добавляя по 10 мкл раствора каждого праймера (100 мМ) к 40 мкл стерильной воды. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе Mastercycler gradient.

ПЦР-смесь:

H ₂ O	40 мкл
10x Encyclo buffer	5 мкл
50x dNTP mix (10 mM each)	1 мкл
смесь праймеров	2 мкл
дц-кДНК	2 мкл
50x Encyclo polymerase mix	1 мкл

Программа ПЦР:

предварительная денатурация, 1 цикл	
+95 °C	3 мин
циклы ПЦР, 35 циклов	
+95 °C	30 сек
+X °C	30 сек
+72 °C	N сек
финальная элонгация, 1 цикл	
+72 °C	3 мин

Температура отжига зависела от последовательности праймеров. Время элонгации зависело от длины продукта ПЦР из расчёта 60 сек на 1-1,5 тыс. п. н.

Очистка ДНК

Полученный целевой фрагмент гена очищали при помощи осаждения изопропанолом и ацетатом натрия. К ПЦР-смеси добавляли раствор ацетата натрия (3 М, рН 5,2) в пропорции 1 мкл на 10 мкл ПЦР-смеси, добавляли изопропанол в пропорции 50:50 к объёму раствора, вортексировали и охлаждали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение часа. Затем центрифугировали 30 мин при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 12000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5430R), удаляли супернатант. К осадку ДНК приливали 1 мл 75% этанола, центрифугировали 5 мин при 14500 rpm (Eppendorf MiniSpin Plus) и снова отбирали супернатант, отмывка 75% этанолом проводилась три раза. Далее удаляли супернатант и высушивали ДНК на воздухе 3 мин. ДНК растворяли в 10–20 мкл H_2O (DEPC-treated), концентрацию очищенного продукта измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000.

Электрофорез в агарозном геле

Анализ продукта ПЦР проводили методом электрофореза в агарозном геле. 1% агарозный гель готовили на 1x буфере TAE, для визуализации ДНК при приготовлении в гель добавляли раствор бромистого этидия из расчёта 5 мкл/50 г геля. Перед нанесением к образцам добавляли 4x буфер для нанесения проб. Напряжение выставляли из расчёта 5 В/см геля. Для оценки длины фрагментов ДНК использовали маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder. Гели просматривали с помощью УФ-транслюминатора ЕСХ-15.М.

Лигирование

Очищенный амплифицированный фрагмент целевого гена использовали для лигирования в pAL2-T вектор. Лигирование производили с помощью набора Quick-TA kit. Количество ДНК вставки рассчитывали, исходя из соотношения с векторной ДНК соответственно 10:1 (по количеству вещества).

Реакционная смесь:

H ₂ O	до 10 мкл
10x Overnight ligation буфер	1 мкл
pAL2-T вектор (50 нг/мкл)	1 мкл
ПЦР продукт (X нг/мкл)	X мкл
Quick-TA T4 ДНК лигаза	1 мкл

Реакционную смесь инкубировали в течение 12 часов при +4 °С. После окончания реакции пробирки помещали на –20 °С для инактивации лигазы.

Трансформация компетентных клеток

Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue, предоставленные лабораторией. Для трансформации к аликвоте компетентных клеток (50 мкл) добавляли 10 мкл лигазной смеси и 1 мкл 1 М бета-меркаптоэтанола и инкубировали на льду в течение 30 мин. Затем клетки подвергали тепловому шоку (+42 °С) в водяной бане в течение 1 минуты и снова инкубировали на льду в течение 5 мин. Затем смесь доводили до 1 мл средой LB и осторожно перемешивали. Клетки инкубировали в течение часа в бактериальном шейкере (+37 °С, 150 об/мин), после чего клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB и селективным антибиотиком ампициллином (50 мкг/мл) и инкубировали в термостате при +37 °С в течение 14-16 часов до появления видимых колоний.

Отбор клонов

Отбор клонов, несущих рекомбинантные плазмиды, проводили путём скрининга бактериальных колоний методом ПЦР. Для скрининга использовали смесь праймеров M13 (по 25 мМ каждого) и часть колонии, гомогенизированной в 10 мкл среды LB, в качестве образца ДНК. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе Mastercycler gradient.

ПЦР-смесь:

H ₂ O	до 25 мкл
10x Taq Turbo buffer	2,5 мкл
50x dNTP mix (10 mM each)	0,5 мкл
смесь праймеров M13	1 мкл
суспензия колонии	1 мкл
50x Taq polymerase	0,5 мкл

Программа ПЦР:

предварительная денатурация, 1 цикл
+95 °C 3 мин
циклы ПЦР, 28 циклов
+95 °C 30 сек
+60 °C 30 сек
+72 °C N сек
финальная элонгация, 1 цикл
+72 °C 3 мин

Время элонгации зависело от длины продукта ПЦР из расчёта 60 сек на 1-1,5 тыс. п. н.

Результат ПЦР анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Отобранные клоны, несущие рекомбинантные плазмиды, пересевали в 5 мл жидкой среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) и растили культуру в бактериальном шейкере в течение ночи (+37 °C; 300 об/мин). Плазмидную ДНК выделяли из клеток с помощью набора Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System согласно протоколу производителя. Очищенные плазмиды секвенировали в компании «Евроген», чтобы определить направление вставки.

Подготовка матрицы для синтеза РНК-зонда

Полученные рекомбинантные плазмиды использовали для амплификации исследуемого гена методом ПЦР. Для амплификации использовали смесь праймеров T7 и Sp6 (по 25 мМ каждого). Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе Mastercycler gradient.

ПЦР-смесь:

H ₂ O	до 50 мкл
10x Taq Turbo buffer	5 мкл
50x dNTP mix (10 mM each)	1 мкл
смесь праймеров T7/Sp6	1 мкл
кДНК	0,1 мкл
50x Taq polymerase	1 мкл

Программа ПЦР:

предварительная денатурация, 1 цикл
+95 °С 3 мин
циклы ПЦР, 35 циклов
+95 °С 30 сек
+49 °С 30 сек
+72 °С N сек
финальная элонгация, 1 цикл
+72 °С 3 мин

Время элонгации зависело от длины продукта ПЦР из расчёта 60 сек на 1-1,5 тыс. п. н. Линейный продукт очищали методом осаждения изопропанолом и ацетатом натрия по указанному выше протоколу очистки ДНК, результат ПЦР анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле, концентрацию очищенного продукта измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000. Полученную очищенную линейную ДНК хранили при -20 °С.

Синтез антисмыслового РНК-зонда

Очищенная линейная ДНК использовалась для приготовления антисмыслового РНК-зонда, меченного дигоксигенином, в ходе *in vitro* транскрипции. Выбор полимеразы зависел от направления вставки, определённого при секвенировании плазмиды. Реакцию проводили в ПЦР-амплификаторе MJ Mini.

Реакционная смесь:

H ₂ O	до 25 мкл
5x Transcription buffer	5 мкл
DTT (100 μM)	1 мкл
10x DIG RNA Labeling Mix	2,5 мкл
RiboLock	0,5 мкл
матрица ДНК	1000 нг
T7/Sp6 RNA polymerase	2 мкл

Реакцию проводили при +37 °С в течение 6 ч. Затем в реакционную смесь вносили 1 мкл ДНКазы I и инкубировали при +37 °С в течение 30 мин.

Очистка продукта транскрипции

Полученный продукт транскрипции переосаждали путём добавления 37,5 мкл 8 М LiCl, вортексировали и инкубировали ночь при –20 °С. Затем центрифугировали 30 мин при +4 °С и 12000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5430R), удаляли супернатант. К осадку РНК приливали 50 мкл 75% этанола, центрифугировали 5 мин при 14500 rpm (Eppendorf MiniSpin Plus) и снова отбирали супернатант, отмывка 75% этанолом проводилась три раза. Далее удаляли супернатант и высушивали РНК на воздухе 3 мин. РНК растворяли в H₂O (DEPC-treated), концентрацию очищенного продукта измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000.

Результат переосаждения анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Раствор РНК доводили H₂O до концентрации 100 нг/мкл, а затем разбавляли в два раза формамидом до итоговой концентрации 50 нг/мкл, готовый антисмысловый РНК-зонд хранили при –20 °С.

2.2.7. Гибридизация *in situ*

Детальная картина экспрессии генов была изучена методом гибридизации *in situ* согласно разработанному в лаборатории протоколу (таблица 2.3). В ходе гибридизации образцы находились в стеклянных баночках с завинчивающейся крышкой объёмом 1,5 мл. Объём используемых растворов в расчёте на одну баночку составлял 1 мл. Этапы, происходившие при комнатной температуре, проводили на орбитальном шейкере S-3L.A20. Этапы, происходившие при +60 °С, проводили в твердотельном термостате ThermoCell CHB-202.

Процедура гибридизации занимала около 5 дней. В первый день зафиксированные эмбрионы регидратировали. Для эмбрионов на стадиях 11-23 вырезали участок крыши гастроцеля вблизи бластопора – дорсальный эксплант. Образцы обрабатывали протеиназой К для облегчения проникновения зонда и антител внутрь зародышей, а также ТЕА с уксусным ангидридом для повышения специфичности окрашивания, повторно фиксировали в PFA. Далее эмбрионы помещали на +60 °С в гибридизационный буфер и оставляли на срок от одной ночи до пяти дней для лучшей пропитки.

Гибридизация проводилась в течение ночи при +60 °С в буфере, содержащем 0,5 мкг/мл антисмыслового РНК-зонда, меченного дигоксигенином.

Эмбрионы последовательно отмывали от неприсоединившегося зонда в гибридизационном буфере, в SSC, в буфере MAB, в буфере MAB с 1% блокирующего реагента, чтобы заблокировать участки неспецифического связывания антител. Связывание с антителами к дигоксигенину, конъюгированными с щелочной фосфатазой, разведёнными в 1000 раз, проводили в новой порции этого раствора при +4 °С в течение ночи.

На четвёртый день зародышей отмывали в MAB, затем в H₂O и проводили цветную реакцию с щелочной фосфатазой в темноте с визуальным контролем появления окраски. Эмбрионы на стадии 28 депигментировали в обесцвечивающем растворе на ярком свете под лампой; другие образцы не подвергались обесцвечиванию. Образцы повторно фиксировали в растворе 4%

формальдегида на PBS в течение 3 ч при комнатной температуре или ночь при +4 °С, после чего фиксатор заменяли на 96% этанол. Материал хранили при –20 °С. Препараты просматривали и фотографировали на стереомикроскопе Olympus SZX9, снабжённом камерой ToprCam E3CMOS.

Таблица 2.3. Протокол *in situ* гибридизации

<u>День 1, предгибридизация</u>				
Регидратация	75%, 50% этанол	по 5 мин	комнатная температура, на шейкере	
	25% этанол/PTw	5 мин		
	PTw	3x5 мин		
Обработка протеиназой К	10 мкг/мл протеиназы К в PTw	15 мин для стадии 28 10 мин для стадий 9-10,5 и дорсальных эксплантов		
	Обработка ТЕА	ТЕА		2x5 мин
Обработка ТЕА	0,25%, 0,5% уксусный ангидрид/ТЕА	по 5 мин		
	PTw	2x5 мин		
	Повторная фиксация	PFA		30 мин
Отмывка	PTw	4x5 мин		
	20% гибридизационный буфер/PTw	10 мин		
Предгибридизация	гибридизационный буфер	10 мин	+60 °С	
	гибридизационный буфер	на ночь		
<u>День 2, гибридизация с антисмысловым РНК-зондом</u>				
Гибридизация с зондом	0,5 мкг/мл антисмысл. РНК в гибр. буфере	на ночь	+60 °С	
<u>День 3, связывание с антителами к дигоксигенину</u>				
Отмывки	гибридизационный буфер	1 ч		
	2x SSC	3x20 мин		
	0,2x SSC	2x30 мин		
	MAB	2x15 мин		
	MAB + 1% блокирующего реагента	2,5 ч	комнатная температура, на шейкере	

Инкубация с антителами	MAV + 1% блокирующего реагента + anti-digoxigenin антитела 1:1000	на ночь	+4 °С
День 4, окрашивание			
Отмывка от антител	MAV	10x1 ч	комн. темп., на шейкере
	H ₂ O	ополоснуть	
Окрашивание	BM Purple	1-2 дня	+4 °С, в темноте
Фиксация и обесцвечивание			
	H ₂ O	ополоснуть	комнатная температура, на шейкере
фиксация	4% формальдегид в PBS	2 ч	
	H ₂ O	ополоснуть	на ярком свете
обесцвечивание	5% H ₂ O ₂ , 5% формамид в 0,5x SSC	2-6 ч	
фиксация	4% формальдегид в PBS	3 ч	комн. темп.
	96% этанол	хранение	-20 °С

2.2.8. Световая микроскопия

Образцы, полученные в результате гибридизации *in situ*, далее были изучены методом световой микроскопии. Образцы дегидратировали в 100% этаноле (2 раза по 15 минут), затем в смеси 100% этанола и ацетона 1:1 (2 раза по 15 минут), далее в ацетоне (2 раза по 15 минут) и переводили в смесь ацетона и эпоксидной смолы SPI-Pon 812 в соотношении 3:1 на сутки, до испарения ацетона. После этого образцы заключали в эпоксидную смолу SPI-Pon 812 и подвергали полимеризации при +60 °С в течение трёх суток. Гистологические срезы толщиной 4 мкм получали при помощи ультратома Tesla. Некоторые срезы дополнительно окрашивали 0,1% раствором толуидинового синего при +60 °С в течение 1 мин. Полученные срезы заключали в эпоксидную смолу SPI-Pon 812 под покровное стекло и фотографировали на микроскопе Olympus CX41, снабжённом камерой ToprCam UHCCD05000KPA.

2.2.9. Морфометрические измерения

Для морфометрических измерений использовали программу ImageJ. С помощью данной программы измеряли длину ресничек на клетках лево-правого организатора на фотографиях, полученных методом сканирующей электронной микроскопии.

2.2.10. Статистический анализ данных

Для статистической оценки количественных результатов использовали программу R [R Development Core Team, 2004]. Воздействие ингибитора форминов на экспрессию *Nodal1* и *Pitx2* на стадии 28 и на асимметрию висцеральных органов головастика оценивали при помощи теста пропорций с поправкой Бонферрони. Анализ количественных характеристик области лево-правого организатора на образцах со сканирующей электронной микроскопии проводили при помощи теста Стьюдента с поправкой Бонферрони. Пороговое значение p -value приняли равным 0,05.

3. Результаты

При работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Petri N., Nordbrink R., Tsikolia N., Kremnyov S. Abnormal left-right organizer and laterality defects in *Xenopus* embryos after formin inhibitor SMIFH2 treatment //Plos one. – 2022. – Т. 17. – №. 11. – С. e0275164.

Petri N., Vetrova A., Tsikolia N., Kremnyov S. Molecular anatomy of emerging *Xenopus* left–right organizer at successive developmental stages //Developmental Dynamics. – 2024.

3.1. Нормальное развитие лево-правого организатора со стадии поздней бластулы по стадию хвостовой почки

Формирование лево-правого организатора можно отслеживать ещё с этапа поздней бластулы, когда материал будущего лево-правого организатора расположен в будущей дорсальной губе бластопора (рисунок 3.1). Исследование молекулярной разметки проводилось методом гибридизации *in situ* на исследуемые гены с последующим заключением образцов в эпон и нарезкой на микротоме.

На стадии 9 (поздняя бластула) в вегетативной области эмбриона уже экспрессируются гены *sox17* (маркер энтодермы) и *nodal1*. Области их экспрессии на этом этапе развития совпадают, маркируя вегетативное полушарие эмбриона. Ген *foxl1*, известный как маркер клеток, несущих подвижные реснички, экспрессируется относительно узким полукольцом на дорсальной стороне эмбриона непосредственно анимальнее зоны экспрессии *Sox17* и *Nodal1*. Экспрессия *Foxl1* сосредоточена в поверхностном слое клеток и наиболее ярко проявляется на дорсальной стороне эмбриона. Согласно литературным данным,

именно клетки, экспрессирующие *Foxj1*, впоследствии сформируют функциональную область лево-правого организатора, поэтому экспрессия *Nodal1*, не совпадающая с зоной экспрессии *Foxj1*, на этих этапах развития не имеет отношения непосредственно к будущему лево-правому организатору. Ген *lefty*, известный как антагонист *Nodal*, экспрессируется на дорсальной стороне эмбриона в глубоких слоях клеток.

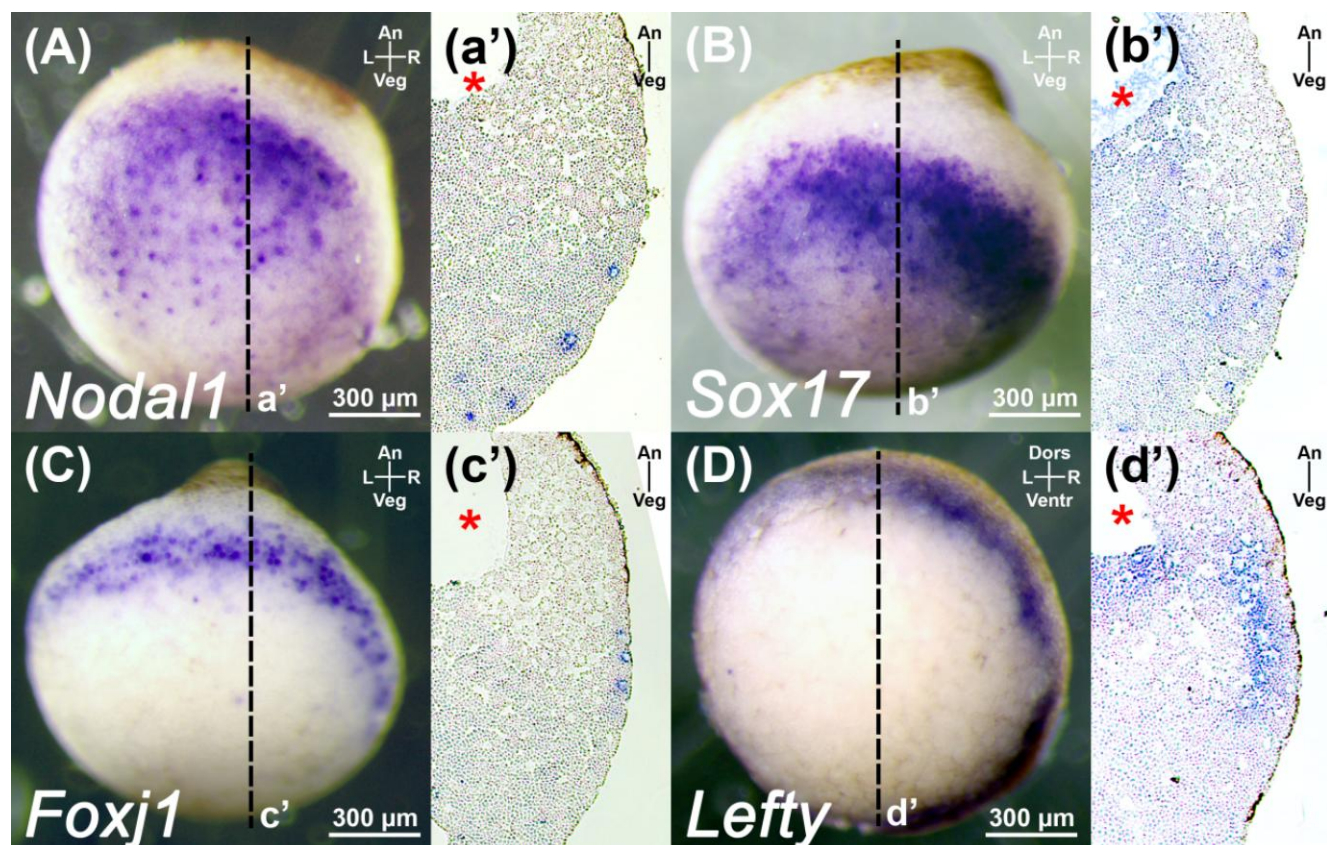


Рисунок 3.1. Молекулярная разметка поздней бластулы (стадия 9).

(A-b') Экспрессия *Nodal1* и *Sox17* в вегетативном полушарии. (C, c') Экспрессия *Foxj1* в поверхностной мезодерме. (D, d') Экспрессия *Lefty* в глубоких слоях мезодермы.

An, анимальный полюс; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; R, правая сторона; Veg, вегетативный полюс; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром обозначены плоскости срезов. Звёздочки маркируют бластоцель.

В начале гаструляции (стадия 10) на дорсальной стороне эмбриона образуются колбовидные клетки. Скопления поверхностных меланосом в них маркируют формирующийся бластопор (рисунок 3.2). Экспрессия *Sox17* и *Nodal1* наблюдается как вегетативнее бластопора, так и в самих колбовидных клетках и смежной с ними узкой полосе поверхностных клеток на дорсальной губе бластопора. Непосредственно анимальнее *Sox17* и *Nodal1*-положительных клеток на поверхности дорсальной губы бластопора находится область экспрессии *Foxj1*. *Lefty* экспрессируется в глубоких слоях клеток дорсальной губы бластопора под слоем клеток, экспрессирующих *Foxj1*, и анимальнее зоны экспрессии *Nodal1*.

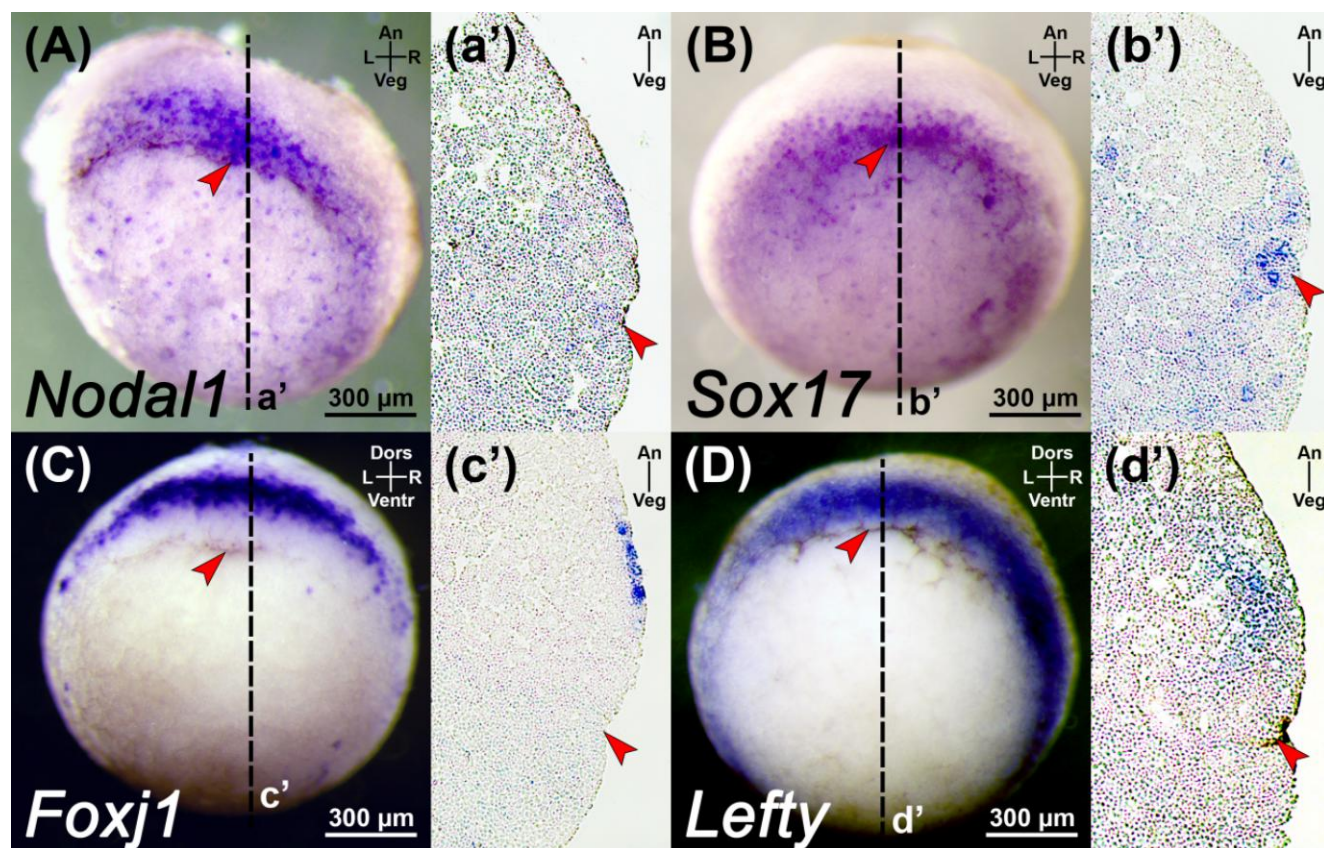


Рисунок 3.2. Молекулярная разметка эмбриона в начале гаструляции (стадия 10).

(A-b') *Nodal1* и *Sox17* экспрессируются в вегетативном полушарии, колбовидных клетках и супрабластопоральной энтодерме. (C, c') Экспрессия *Foxj1* в поверхностной мезодерме. (D, d') Экспрессия *Lefty* в глубоких слоях мезодермы.

An, анимальный полюс; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; R, правая сторона; Veg, вегетативный полюс; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром обозначены плоскости срезов. Стрелки указывают на колбовидные клетки, формирующие бластопор.

На стадии 10,5 колбовидные клетки погружаются внутрь, начинает формироваться гастроцель (рисунок 3.3). Вслед за фронтом колбовидных клеток первой вворачивается область с поверхности дорсальной губы бластопора, экспрессирующая *Sox17* и *Nodal1*. Вслед за ней в составе общего поверхностного пласта вворачиваются клетки, экспрессирующие *Foxj1*. Эти же клетки начинают экспрессировать ещё один маркер ресничных клеток *Tekt2*, известный как мишень гена *foxj1*. Под ними в глубоких слоях лежат мезодермальные клетки, экспрессирующие *Lefty*. По бокам от дорсальной губы бластопора впервые проявляется экспрессия *MyoD1* – маркера презумптивной мезодермы сомитов. На этой стадии он экспрессируется тонким кольцом, незамкнутым на дорсальной стороне, вокруг формирующегося бластопора. Поперечные срезы через его область экспрессии на дорсальной стороне показывают, что все *MyoD1*-положительные клетки находятся в глубинных слоях и не имеют выхода на поверхность.

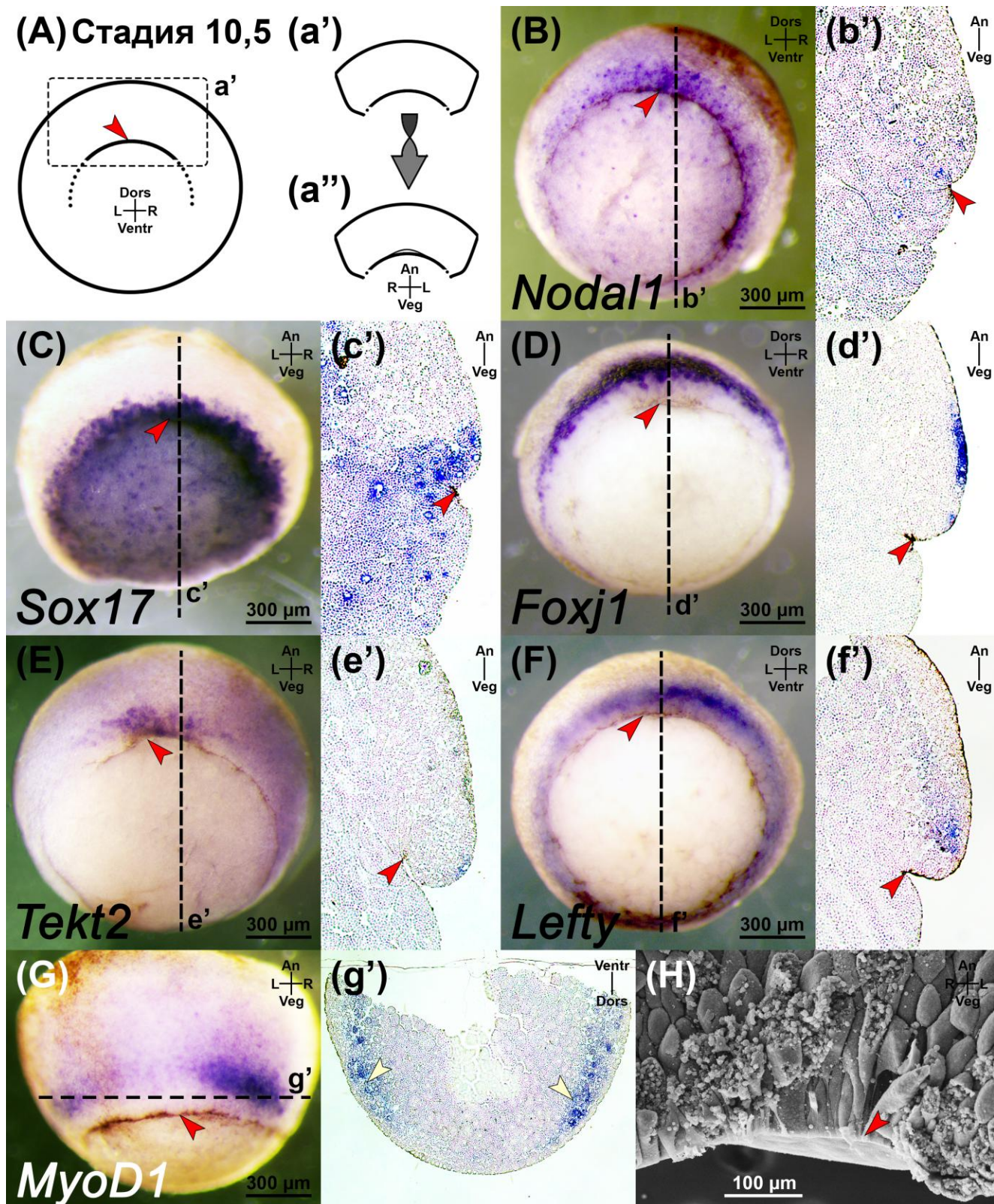


Рисунок 3.3. Молекулярная разметка ранней гастролы (стадия 10,5).

(A) Схема ранней гастролы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной стороны. (a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B-c') *Nodal1* и *Sox17* экспрессируются в вегетативном полушарии, колбовидных клетках и супрабластопоральной энтодерме. (D-e') Экспрессия *Foxj1* и *Tekt2* в поверхностной мезодерме. (F, f') *Lefty* экспрессируется в глубоких слоях осевой мезодермы. (G, g') *MyoD1* экспрессируется в

глубоких слоях параксиальной мезодермы. Жёлтые стрелки указывают области экспрессии. (Н) Формирующийся гастроцель, вид с вентральной стороны, СЭМ.

An, анимальный полюс; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; R, правая сторона; Veg, вегетативный полюс; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром обозначены плоскости срезов. Красные стрелки указывают на колбовидные клетки, формирующие бластопор.

По мере прохождения гастрюляции (стадия 11) материал дорсальной губы бластопора продолжает подворачиваться внутрь и формировать выстилку гастроцеля со спинной стороны (рисунок 3.4). Формирующийся гастроцель обрамлён колбовидными клетками, различимыми благодаря концентрации поверхностных меланосом и экспрессирующими *Sox17*, за ними следуют узкая полоса поверхностных *Sox17*-положительных клеток. Идущая следом область экспрессирует ресничные маркеры *Foxj1* и *Tekt2* в поверхностном слое. Под этим слоем на средней линии широким полем лежит область экспрессии *Lefty*, а по бокам от средней линии лежат области экспрессии *MyoD1*. Экспрессия *Nodal1* к стадии 11 полностью исчезает.

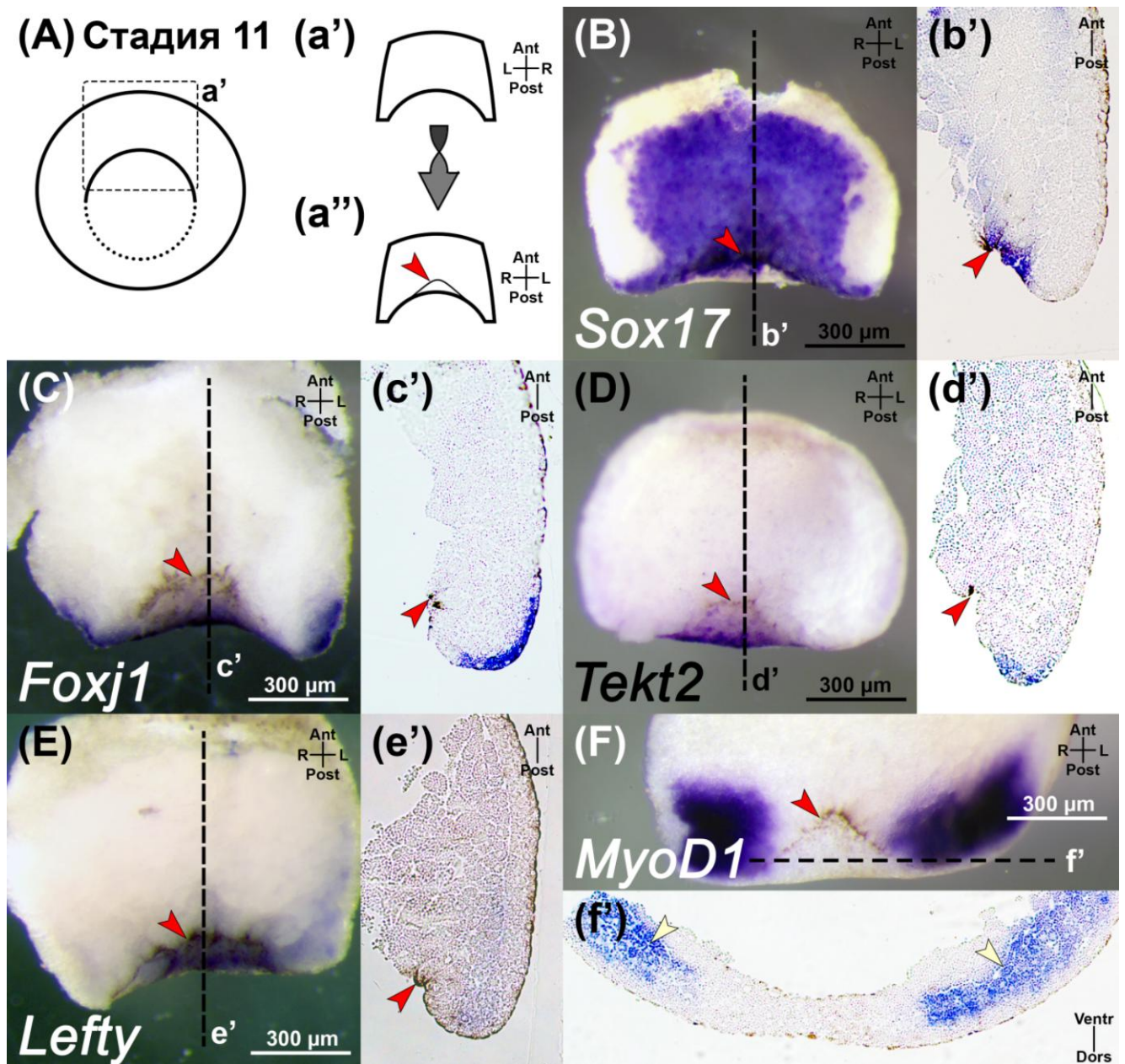


Рисунок 3.4. Молекулярная разметка крыши гастроцеля на стадии средней гастролы (стадия 11). (A) Схема средней гастролы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной стороны. (a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B, b') *Sox17* экспрессируется в больших желточных клетках, колбовидных клетках и супрабластопоральной энтодерме, подвернувшейся внутрь гастроцеля. (C-d') Экспрессия *Foxj1* и *Tekt2* в поверхностной мезодерме. (E, e') *Lefty* экспрессируется в глубоких слоях осевой мезодермы. (F, f') *MyoD1* экспрессируется в глубоких слоях параксиальной мезодермы. Жёлтые стрелки указывают области экспрессии.

Ant, anteriorный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром обозначены плоскости срезов. Красные стрелки указывают на колбовидные клетки, маркирующие передний край гастроцеля.

На стадии 11,5 продолжается инволюция материала с поверхности эмбриона. Формирующийся гастроцель вытягивается в антерио-постериорном направлении и приобретает форму треугольника; удлинение гастроцеля сопровождается возвращением части колбовидных клеток к изодиаметрической форме, пигмент при этом размывается (рисунок 3.5). По мере вовлечения в гастрюляцию боковых губ бластопора кайма *Sox17*-положительных клеток появляется не только на переднем конце гастроцеля, но и по бокам, обрамляя его со всех сторон. Область без экспрессии *Sox17* в постериорной части крыши гастроцеля совпадает с пятнами экспрессии *Foxj1* и *Tekt2*, это будущая область лево-правого организатора. На этом этапе развития будущие поверхностные клетки организатора и обрамляющие их энтодермальные клетки представляют собой общий сплошной слой без чётких границ на дорсальной поверхности гастроцеля, что хорошо видно на изображениях, полученных при помощи сканирующего электронного микроскопа (рисунок 3.5B). Область экспрессии *Lefty* вытягивается в длину и находится под поверхностью этого слоя на средней линии эмбриона, занимая весь объём глубоких слоёв клеток, а *MyoD1*-положительные клетки – по бокам от неё.

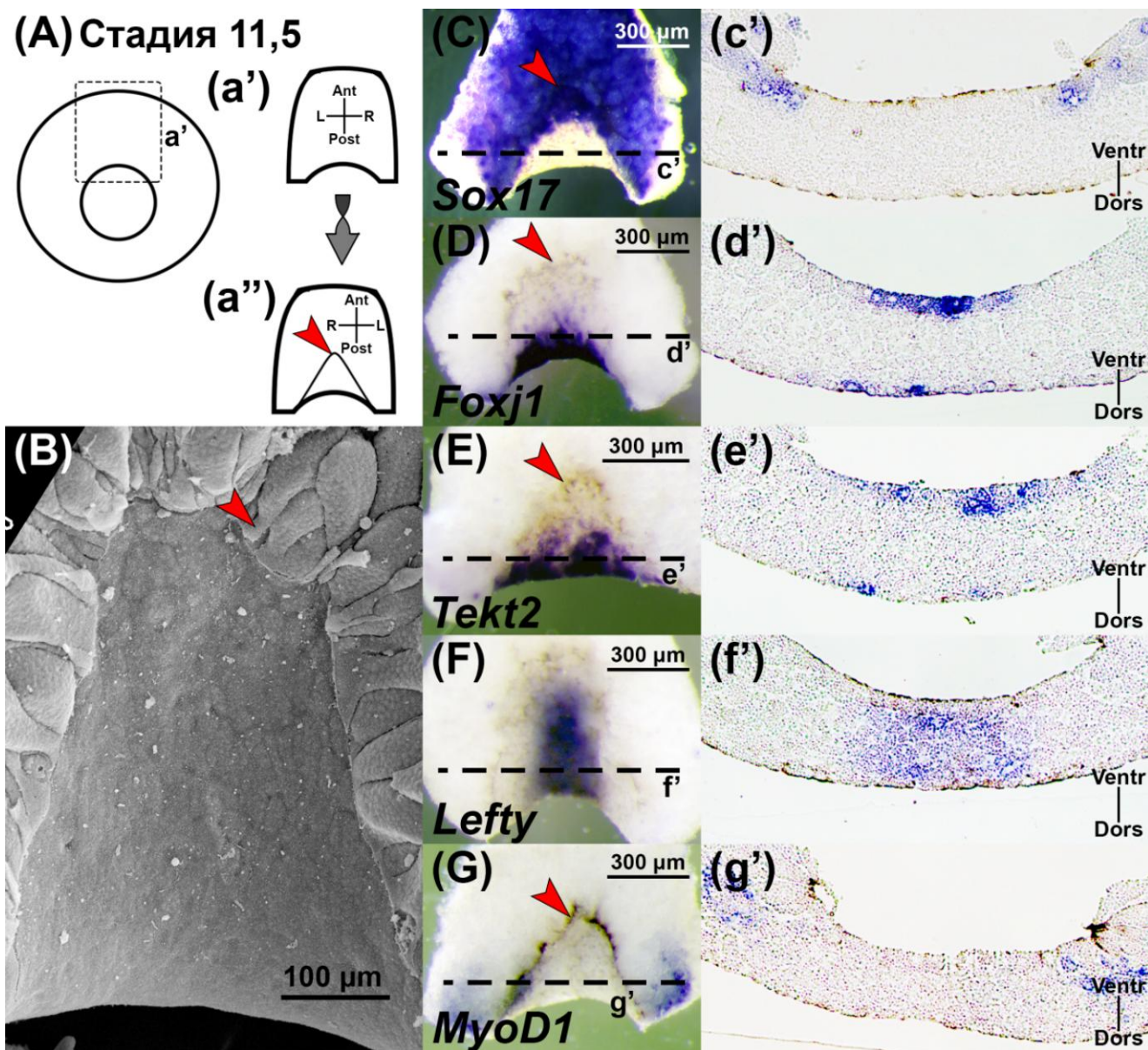


Рисунок 3.5. Молекулярная разметка крыши гастроцеля на стадии средней гастрюлы (стадия 11,5).

(A) Схема средней гастрюлы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной стороны. (a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Формирующаяся крыша гастроцеля, СЭМ. (C, c') *Sox17* экспрессируется в больших желточных клетках, колбовидных клетках и супрабластопоральной энтодерме, маркирующей края гастроцеля. (D-e') *Foxj1* и *Tekt2* экспрессируются в подворачивающейся поверхностной мезодерме. (F, f') Экспрессия *Lefty* в глубоких слоях осевой мезодермы. (G, g') *MyoD1* экспрессируется в глубоких слоях параксиальной мезодермы.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром обозначены плоскости срезов. Красные стрелки указывают на колбовидные клетки, маркирующие передний край гастроцеля.

На стадии поздней гаструлы (стадия 12) продолжается удлинение гастроцеля в anteriорном направлении. Основной вклад в удлинение вносит латеро-медиальная конвергенция клеток во всех слоях дорсальной стороны, при этом зона лево-правого организатора оттесняется в постериорном направлении. Миграция клеток через латеральные губы приводит к расширению гастроцеля (рисунок 3.6). Антериорная и боковые области гастроцеля выстланы энтодермальными клетками, экспрессирующими *Sox17*, в то время как область экспрессии *Foxj1* и *Tekt2* остаётся у средней линии крыши гастроцеля вблизи бластопора, вытягиваясь в anteriорном направлении. *Lefty* экспрессируется на средней линии эмбриона в глубоких слоях клеток, причём экспрессия начинает ослабевать на вентральной стороне крыши гастроцеля и по мере приближения к бластопору. *MyoD1*-положительные клетки по-прежнему находятся по бокам от средней линии эмбриона в глубоком мезодермальном слое и не имеют контакта с поверхностью.

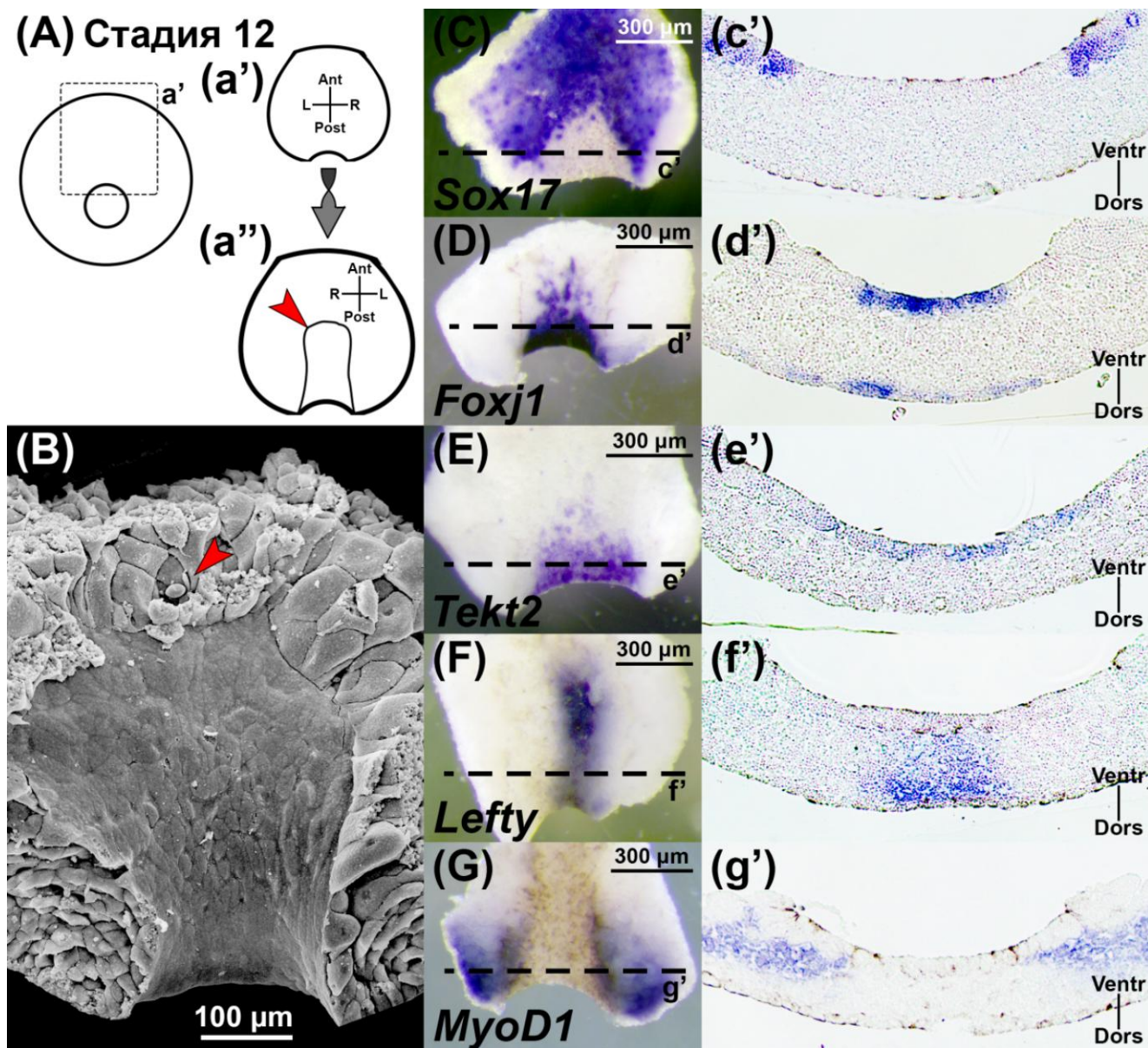


Рисунок 3.6. Молекулярная разметка постериорной области крыши гастроцеля на стадии поздней гастролы (стадия 12).

(A) Схема поздней гастролы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной стороны. (a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Формирующаяся крыша гастроцеля, СЭМ. (C, c') *Sox17* экспрессируется в больших желточных клетках и энтодерме, маркирующей края гастроцеля. (D-e') *Foxj1* и *Tekt2* экспрессируются в подворачивающейся поверхностной мезодерме. (F, f') Экспрессия *Lefty* в глубоких слоях осевой мезодермы. (G, g') *MyoD1* экспрессируется в глубоких слоях параксиальной мезодермы.

Ant, anteriorный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром обозначены плоскости срезов. Красные стрелки указывают на колбовидные клетки, маркирующие передний край гастроцеля.

В конце гаструляции (стадия 12,5) область будущего лево-правого организатора удлиняется, что хорошо видно по отсутствию экспрессии *Sox17* в этой области и по экспрессии в ней *Foxj1* и *Tekt2* (рисунок 3.7). На поверхности крыши гастроцеля начинают просматриваться границы будущего лево-правого организатора: его клетки заметно мельче соседних энтодермальных клеток (рисунок 3.7В). На поперечных срезах через крышу гастроцеля область поверхностных клеток организатора визуально хорошо отличается от окружающих энтодермальных клеток, однако всё ещё представляет собой единый пласт, явно отделённый от лежащих ниже слоёв глубокой мезодермы. Кроме того, впервые начинает просматриваться граница между будущей хордой и презумптивной мезодермой сомитов, экспрессирующей *MyoD1*. Экспрессия *Lefty* продолжает ослабевать в вентральных слоях глубоких клеток на средней линии эмбриона и вблизи бластопора.

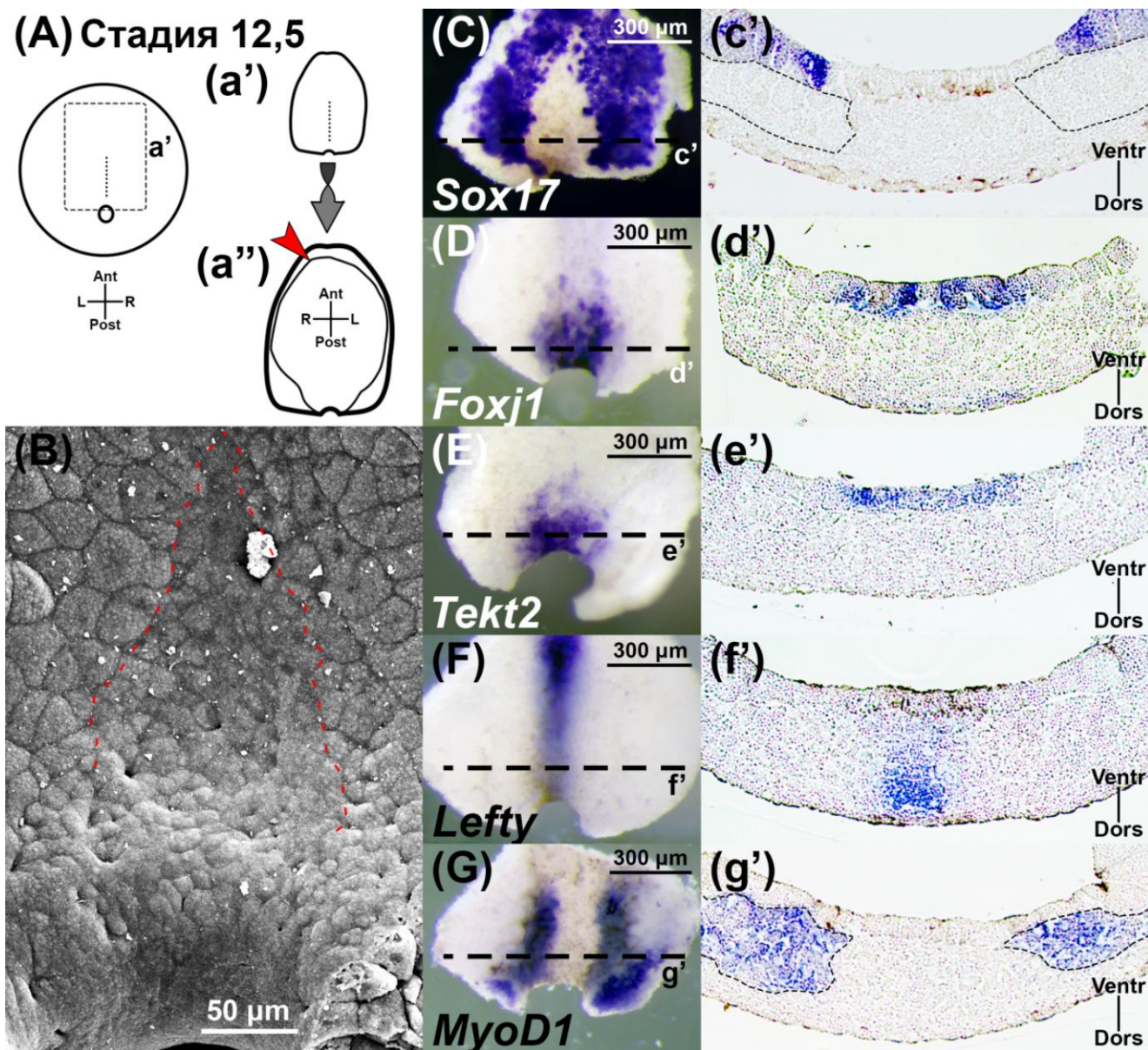


Рисунок 3.7. Молекулярная разметка постериорной области крыши гастроцеля в конце гастрюляции (стадия 12,5).

(A) Схема поздней гастрюлы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной стороны. (a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Область лево-правого организатора в крыше гастроцеля, СЭМ. (C, c') *Sox17* экспрессируется в больших желточных клетках и энтодерме, маркирующей края гастроцеля. (D-e') Экспрессия *Foxj1* и *Tekt2* в поверхностной мезодерме крыши гастроцеля. (F, f') Экспрессия *Lefty* в глубоких слоях осевой мезодермы. (G, g') *MyoD1* экспрессируется в глубоких слоях параксиальной мезодермы.

Ant, anteriorный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Красная стрелка указывает на колбовидные клетки, маркирующие передний край гастроцеля. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

К началу нейруляции (стадия 13) гастроцель достигает переднего конца зародыша и увеличивается в объёме. Крыша постериорного участка гастроцеля выстлана энтодермальными клетками, экспрессирующими *Sox17*, за исключением области лево-правого организатора вблизи бластопора (рисунок 3.8). Эта область, экспрессирующая *Tekt2* и *Foxj1*, продолжает сужаться и вытягиваться в anteriорном направлении. На сколах через крышу гастроцеля видно, что клетки энтодермы и клетки лево-правого организатора начинают отделяться друг от друга в составе поверхностного пласта, хотя эти границы пока слабо выражены по сравнению с границей между поверхностным слоем и более глубокими слоями (рисунок 3.8B). Визуализация границы между нейроэктодермой и мезодермой на поперечных срезах позволяет оценить, что экспрессия *Lefty* в постериорной области крыши гастроцеля остаётся только в гипоэктодерме в виде узкой полосы по средней линии эмбриона. На стадии 13 начинается специализация боковых сенсорных областей лево-правого организатора: клетки поверхностного слоя, расположенные над глубокими слоями презумптивной мезодермы сомитов, впервые начинают экспрессировать *MyoD1*. Кроме того, эти же клетки начинают экспрессировать ген *dand5*, являющийся антагонистом *nodal1*.

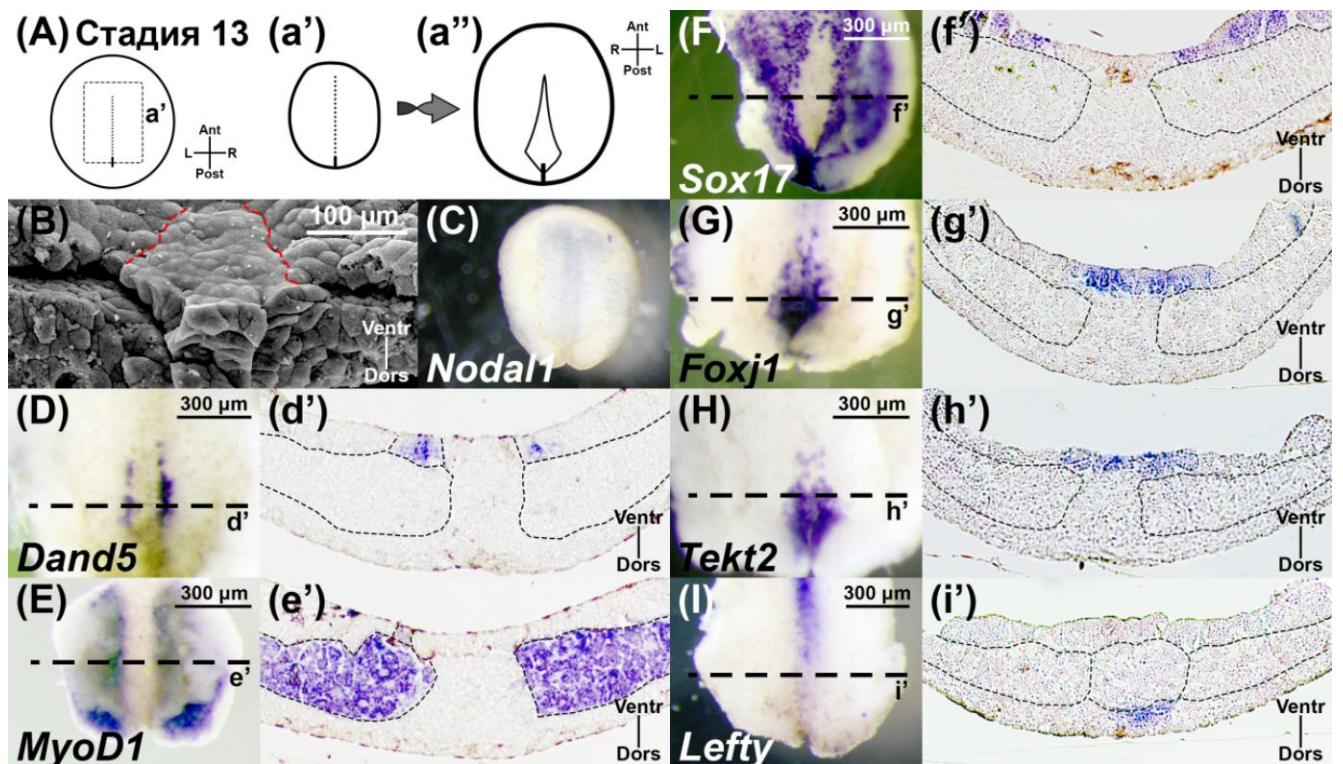


Рисунок 3.8. Молекулярная разметка области лево-правого организатора эмбриона в начале нейруляции (стадия 13).

(A) Схема ранней нейрулы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной стороны. (a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Скол постериорной области крыши гастроцеля, СЭМ. (C) Экспрессия *Nodal1* ещё не началась. (D, d') *Dand5* начинает экспрессироваться в боковых зонах поверхностной мезодермы. (E, e') *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и начинает экспрессироваться в боковых зонах поверхностной мезодермы. (F, f') *Sox17* экспрессируется в крыше гастроцеля. (G-h') *Foxj1* и *Tekt2* экспрессируются в поверхностной мезодерме крыши гастроцеля. (I, i') *Lefty* экспрессируется в нервной пластинке.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

При переходе к стадии 14 область экспрессии *Tekt2* и *Foxj1* приобретает треугольную форму, характерную для зрелого лево-правого организатора, эта область со всех сторон окружена энтодермальными клетками, экспрессирующими *Sox17* (рисунок 3.9) В боковых сенсорных зонах к экспрессии *MyoD1* и *Dand5* присоединяется экспрессия *Nodal1*, клетки этих зон чётко отграничены как от клеток гипохорда, так и от клеток окружающей поверхностной энтодермы.

Площадь их апикальной поверхности несколько меньше площади базальной поверхности. Экспрессия *Lefty* продолжает ослабевать.

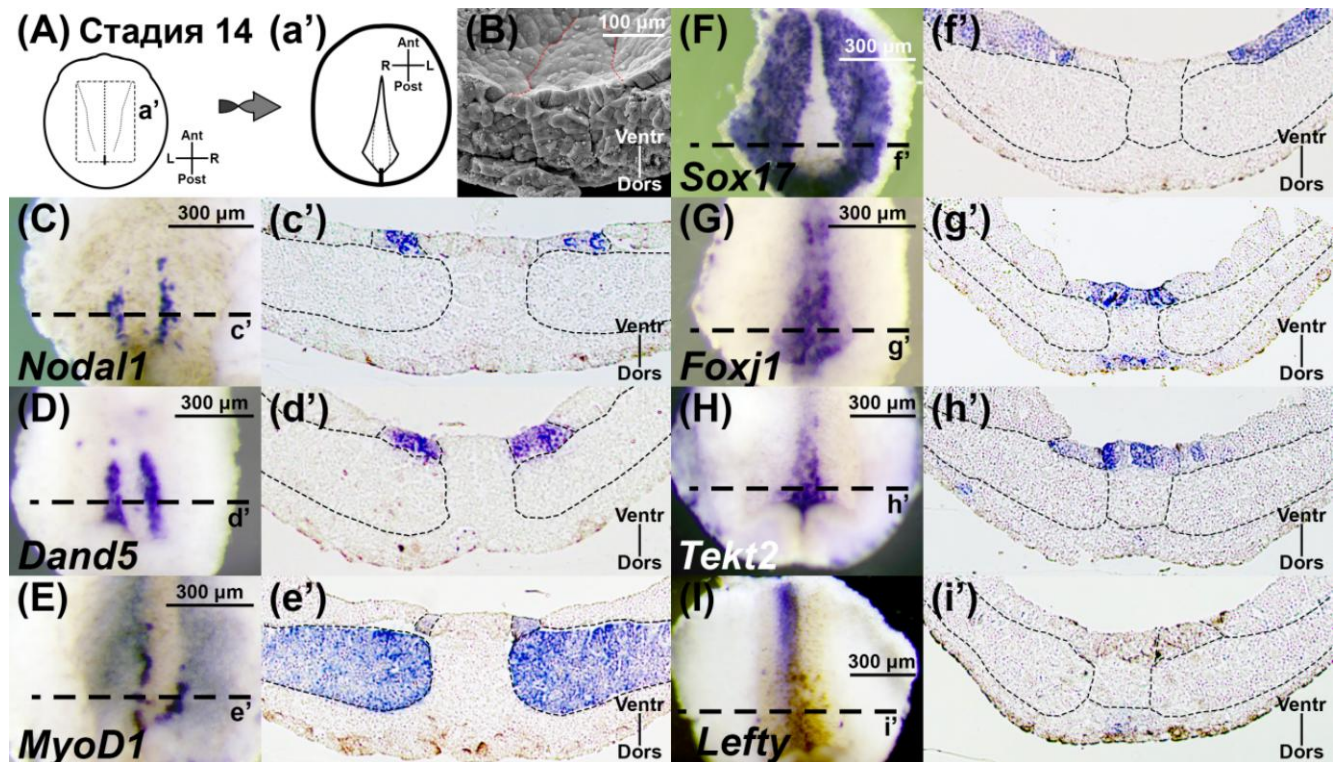


Рисунок 3.9. Молекулярная разметка области лево-правого организатора на стадии ранней нейрулы (стадия 14).

(A) Схема ранней нейрулы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Скол постериорной области крыши гастроцеля, СЭМ. (C-d') Экспрессия *Nodal1* и *Dand5* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора. (E, e') *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и боковых сенсорных зонах лево-правого организатора. (F, f') Экспрессия *Sox17* в энтодерме. (G, g') *Foxj1* экспрессируется в поверхностной мезодерме лево-правого организатора и в нервной пластинке. (H, h') *Tekt2* экспрессируется в поверхностной мезодерме лево-правого организатора. (I, i') Экспрессия *Lefty* в нервной пластинке.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

К средней нейруле (стадия 15) интенсивность экспрессии *Foxj1* в клетках боковых сенсорных зон организатора снижается, и его экспрессия наблюдается только в клетках гипохорда (рисунок 3.10). При этом второй маркер ресничных

клеток *Tekt2* продолжает экспрессироваться по всей поверхности лево-правого организатора. Боковые сенсорные зоны ярко экспрессируют *MyoD1*, *Dand5* и *Nodal1*; их граница с энтодермальными *Sox17*-положительными клетками по бокам из вертикальной постепенно становится скошенной из-за меньшей площади апикальной поверхности клеток боковых сенсорных зон по сравнению с базальной.

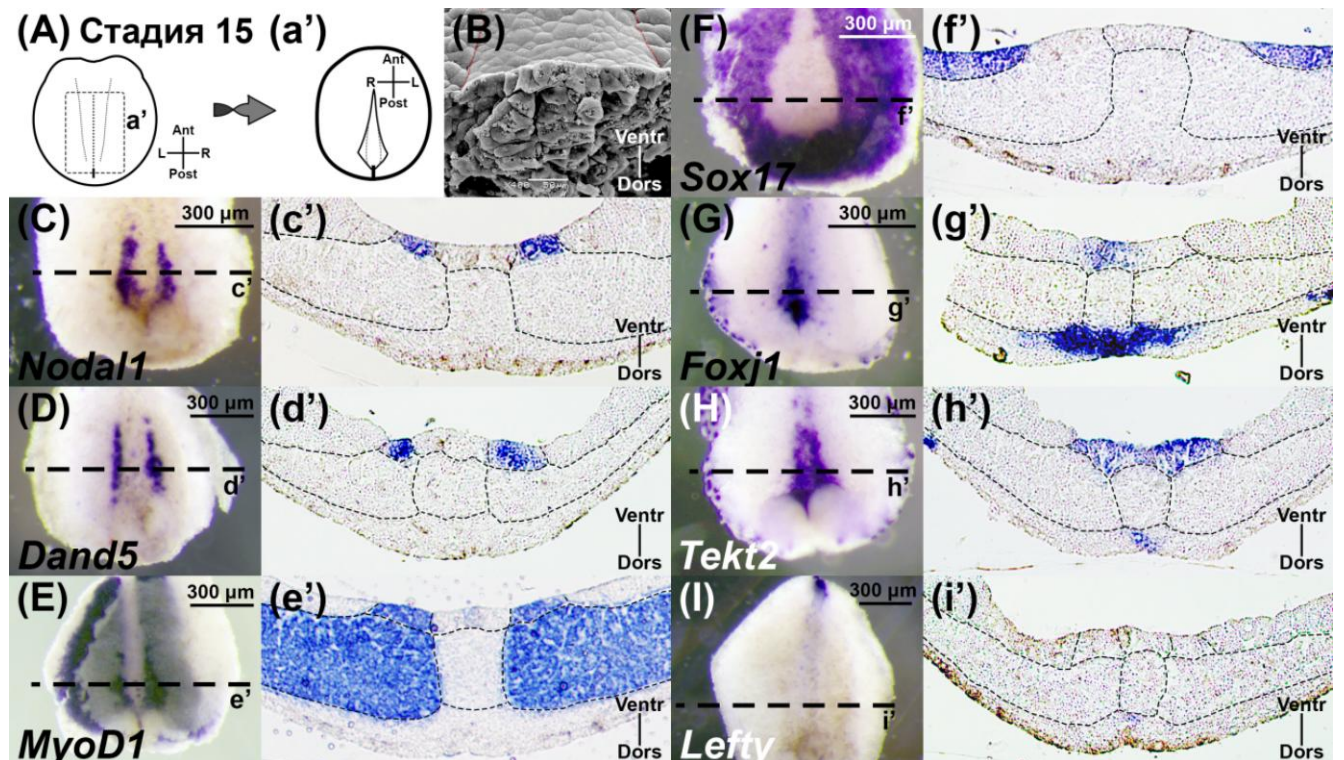


Рисунок 3.10. Молекулярная разметка области лево-правого организатора на стадии средней нейрулы (стадия 15).

(A) Схема средней нейрулы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Скол постериорной области крыши гастроцеля, СЭМ. (C-d') Экспрессия *Nodal1* и *Dand5* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора. (E, e') *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и боковых сенсорных зонах. (F, f') Экспрессия *Sox17* в энтодерме. (G, g') *Foxj1* экспрессируется в центральной зоне лево-правого организатора и в нервной пластинке. (H, h') *Tekt2* экспрессируется в лево-правом организаторе и в нервной пластинке. (I, i') Экспрессия *Lefty* в нервной пластинке.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

На стадии 16 продолжается снижение уровня экспрессии *Foxj1*, который теперь наблюдается не во всех клетках центральной зоны организатора; экспрессия *Tekt2* по-прежнему сохраняется во всём лево-правом организаторе (рисунок 3.11). Боковые сенсорные зоны, экспрессирующие *MyoD1*, *Dand5* и *Nodal1*, продолжают менять форму, становясь трапециевидными, и постепенно приобретают сродство к нижележащим глубоким слоям презумптивной мезодермы сомитов. Экспрессия *Lefty* в гипоектодерме наблюдается в единичных клетках.

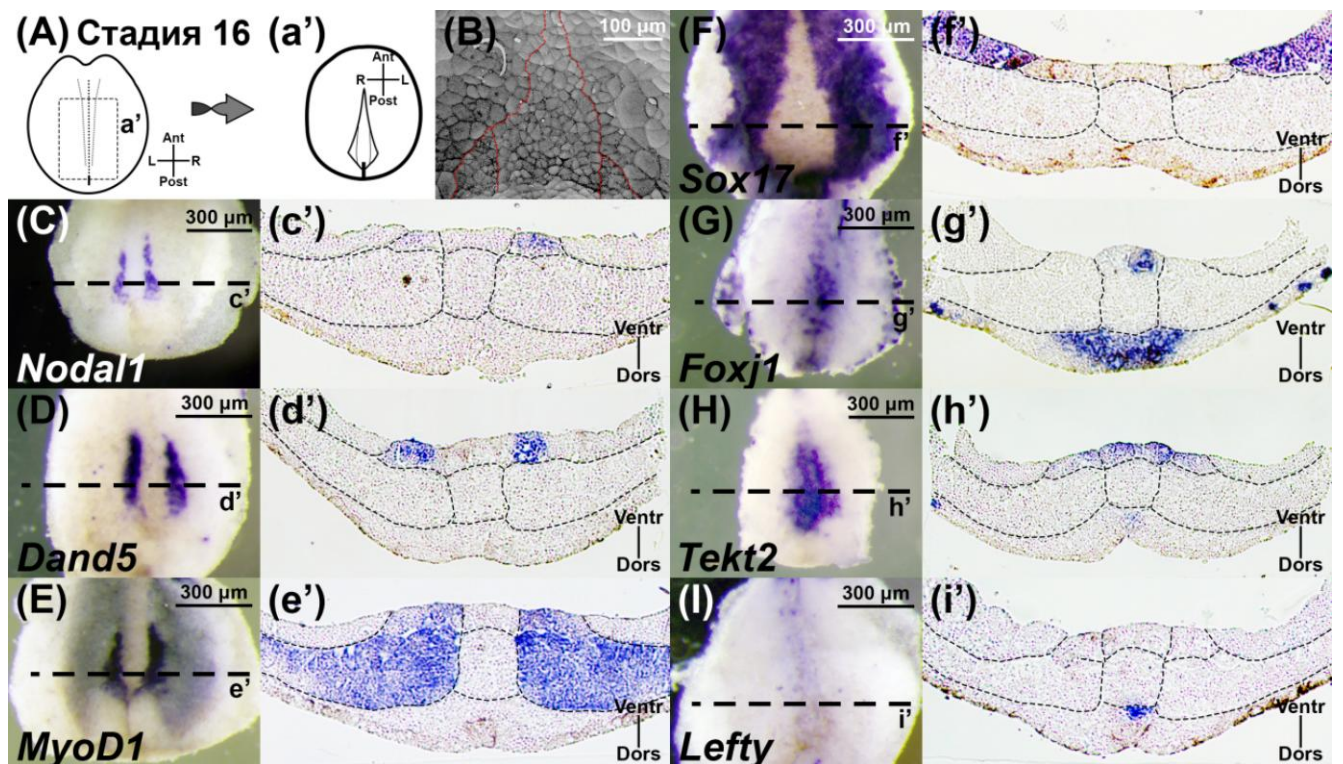


Рисунок 3.11. Молекулярная разметка области лево-правого организатора на стадии средней нейрулы (стадия 16).

(A) Схема средней нейрулы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Постериорная область крыши гастроцеля, СЭМ. (C-d') Экспрессия *Nodal1* и *Dand5* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора. (E, e') *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и боковых сенсорных зонах. (F, f') Экспрессия *Sox17* в энтодерме. (G, g') *Foxj1* экспрессируется в центральной зоне лево-правого организатора, в нервной пластинке и некоторых клетках эктодермы. (H, h') *Tekt2* экспрессируется в лево-правом организаторе, в нервной пластинке и в некоторых клетках эктодермы. (I, i') Экспрессия *Lefty* в нервной пластинке.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

На поздней нейруле (стадия 17) лево-правый организатор достигает своего расцвета (рисунок 3.12). Его ширина и длина максимальны, поверхность заполнена ресничными клетками, а сенсорные области по бокам ярко экспрессируют *Dand5*, *Nodal1* и *MyoD1* и отчётливо отграничены как от гипохорда, так и от энтодермальных *Sox17*-положительных клеток, причём граница между боковыми сенсорными зонами и энтодермой на поперечных

срезах сильно наклонена. Морфологическое разделение боковых сенсорных зон и нижележащей презумптивной мезодермы сомитов постепенно исчезает.

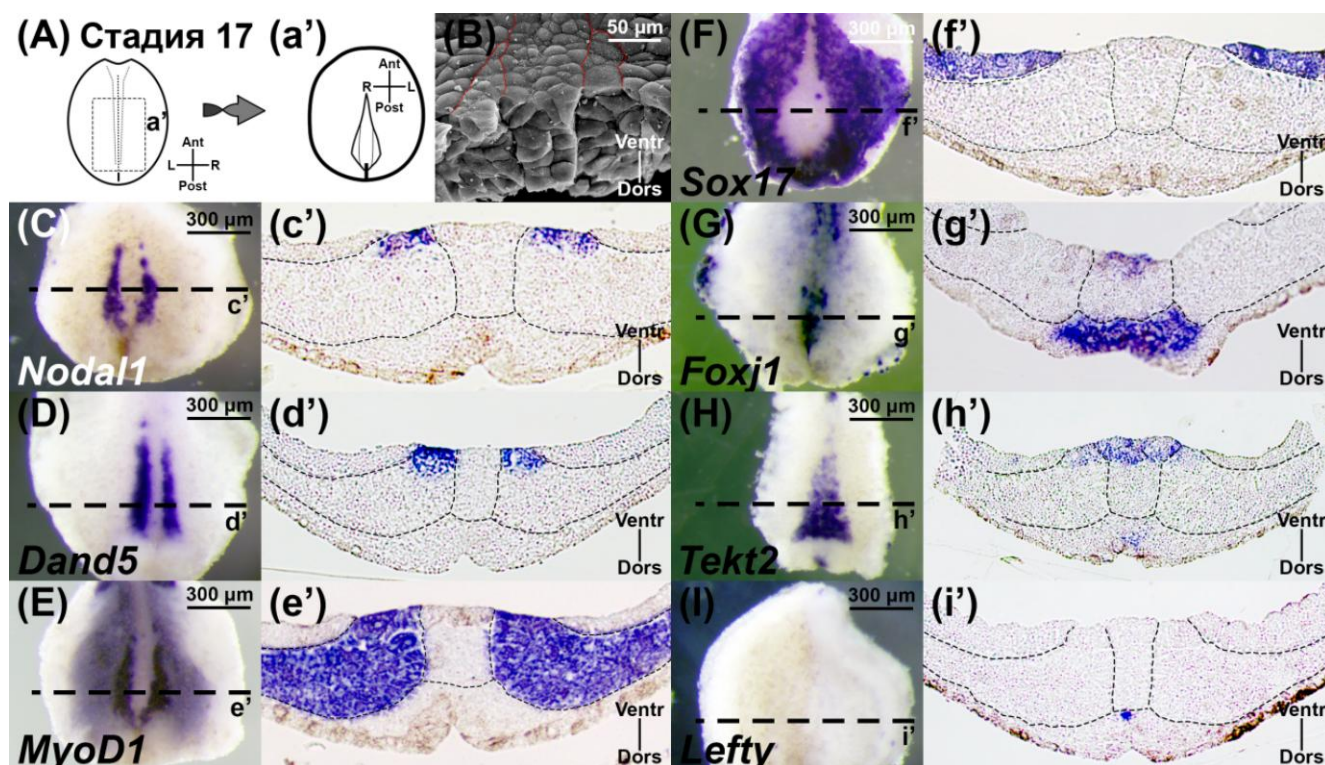


Рисунок 3.12. Молекулярная разметка области лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы (стадия 17).

(A) Схема поздней нейрулы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B) Скол постериорной области крыши гастроцеля, СЭМ. (C-d') Экспрессия *Nodal1* и *Dand5* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора. (E, e') *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и боковых сенсорных зонах. (F, f') Экспрессия *Sox17* в энтодерме. (G, g') *Foxj1* экспрессируется в центральной зоне лево-правого организатора, в нервной пластинке и некоторых клетках эктодермы. (H, h') *Tekt2* экспрессируется в лево-правом организаторе, в нервной пластинке и в некоторых клетках эктодермы. (I, i') Экспрессия *Lefty* в нервной пластинке.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

В антериорной области лево-правого организатора на стадии 18 начинается постепенное сокращение площади поверхности организатора и погружение его поверхностных клеток в глубокие слои (рисунок 3.13). Первыми в этот процесс вовлекаются клетки боковых сенсорных зон, которые сокращают апикальную поверхность, приобретая колбовидную форму, и погружаются к глубинным *MyoD1*-положительным клеткам, становясь частью общей группы клеток презумптивной мезодермы сомитов, но при этом продолжая экспрессировать *Dand5*, *Nodal1* и *Tekt2*. На поперечных срезах можно заметить скопление пигмента на сократившихся апикальных поверхностях этих клеток. По мере стягивания апикальных поверхностей клеток сенсорной зоны лежащие по их сторонам энтодермальные клетки, экспрессирующие *Sox17*, занимают положение ближе к средней линии эмбриона, как бы «наползая» на лево-правый организатор и перекрывая его сверху. Экспрессия *Foxj1* в клетках лево-правого организатора к стадии 18 исчезает, как и экспрессия *Lefty* в гипоектодерме.

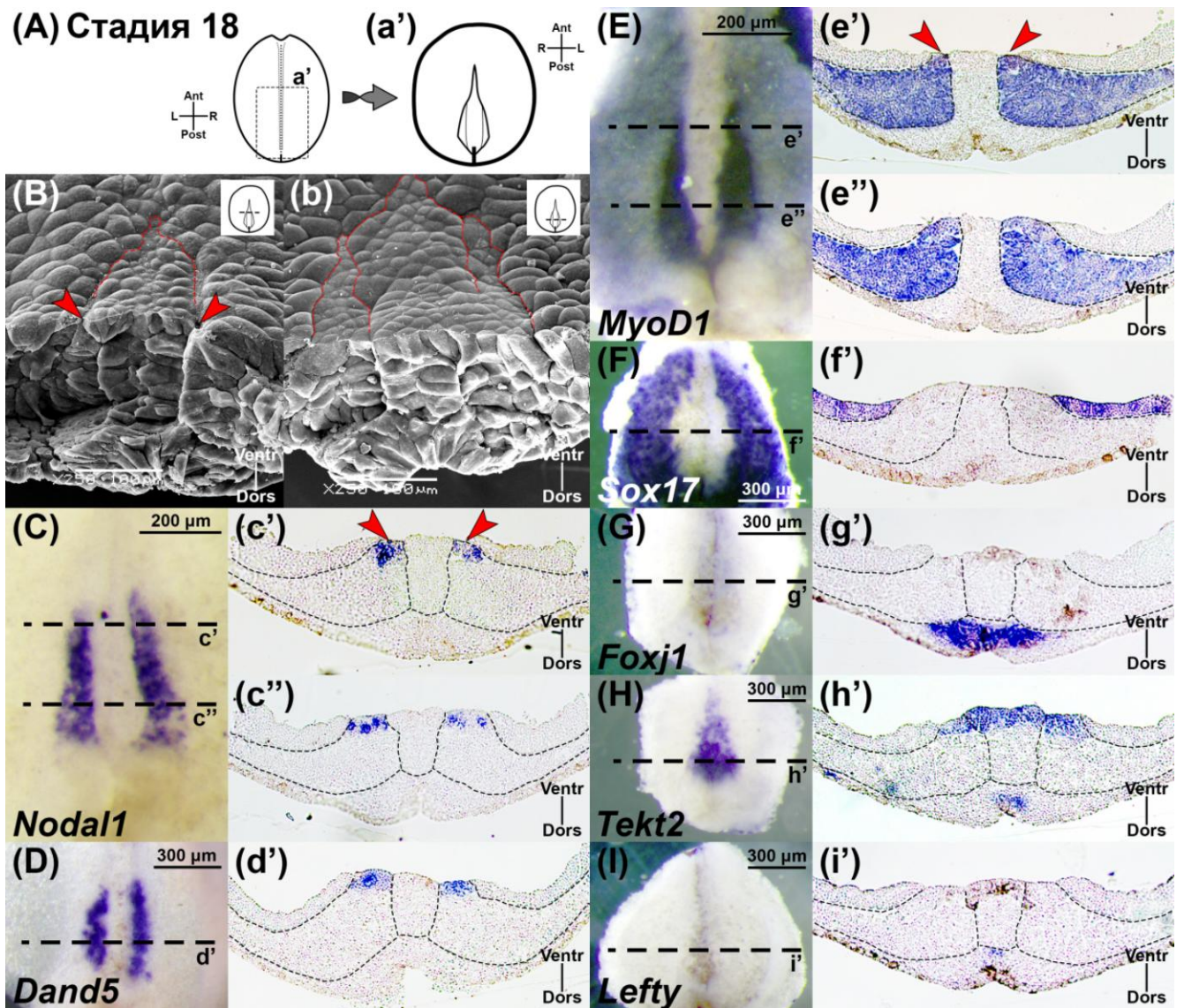


Рисунок 3.13. Молекулярная разметка области лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы (стадия 18).

(A) Схема поздней нейрулы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B, b) Сколы постериорной области крыши гастроцеля, СЭМ. (C-d') Экспрессия *Nodal1* и *Dand5* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора. (E-e'') *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и боковых сенсорных зонах. (F, f') Экспрессия *Sox17* в энтодерме. (G, g') Экспрессия *Foxj1* исчезает из мезодермы лево-правого организатора. (H, h') *Tekt2* экспрессируется в лево-правом организаторе, в нервной пластинке и в некоторых клетках эктодермы. (I, i') Экспрессия *Lefty* в нервной пластинке.

Ant, anteriorный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток. Стрелки указывают на сокращение апикальной поверхности клеток боковых сенсорных зон лево-правого организатора.

На стадии хвостовой почки (стадия 23) лево-правый организатор приобретает форму щели и полностью покрыт экспрессирующей *Sox17* энтодермой на anteriорном конце, в то время как на постериорном конце это покрытие неполное (рисунок 3.14). *Nodal1* и *Dand5* по-прежнему экспрессируются двумя удлинёнными доменами вдоль средней линии, аналогично предыдущим стадиям, однако теперь эти домены экспрессии расположены в пределах сомитов. Кроме того, срезы показывают, что на anteriорном уровне клетки, экспрессирующие *Nodal1* и *Dand5*, полностью покрыты энтодермой, а на постериорном уровне домены экспрессии сохраняют узкий контакт с гастроцелем. Визуализация экспрессии *MyoD1* показывает аналогичные результаты. Поперечные срезы через область экспрессии *Tekt2* на anteriорном и постериорном уровнях показывают, что ресничные клетки лево-правого организатора входят в состав нескольких участков мезодермы: клетки боковых сенсорных зон лево-правого организатора вклиниваются в общий блок сомитной мезодермы, а клетки центральной зоны вплотную прилегают к хорде. Интересно, что на этой стадии развития бывшие поверхностные клетки лево-правого организатора продолжают экспрессировать ресничный маркер *Tekt2*, даже полностью потеряв контакт с поверхностью.

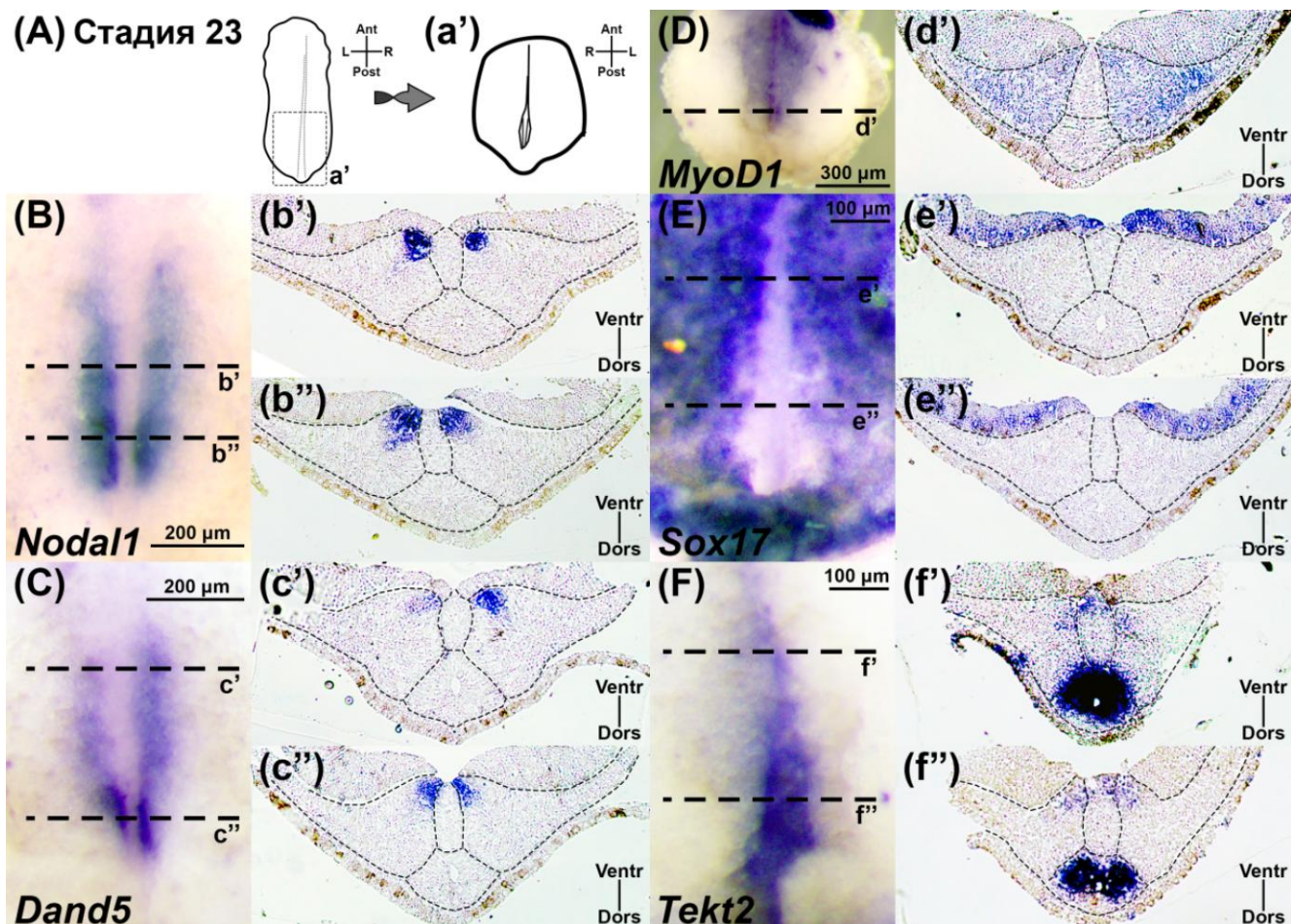


Рисунок 3.14. Молекулярная разметка области лево-правого организатора на стадии хвостовой почки (стадия 23).

(A) Схема эмбриона. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B-c'') Области экспрессии *Nodal1* и *Dand5* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора теряют связь с поверхностью. (D, d') *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и боковых сенсорных зонах. (E-e'') Энтодерма, экспрессирующая *Sox17*, перекрывает лево-правый организатор. (F-f'') Область экспрессии *Tekt2* входит в состав хорды и сомитов.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

Анализ последовательных стадий развития *X. laevis* от поздней бластулы до хвостовой почки позволил построить детальную картину развития лево-правого организатора, начиная от специализации клеточного материала будущего организатора и заканчивая ингрессией клеток организатора в глубокие слои мезодермы. Ключевые стадии развития лево-правого организатора, рассматриваемые через призму экспрессии основных генов-маркеров, представлены в схематическом виде на рисунке 3.15.

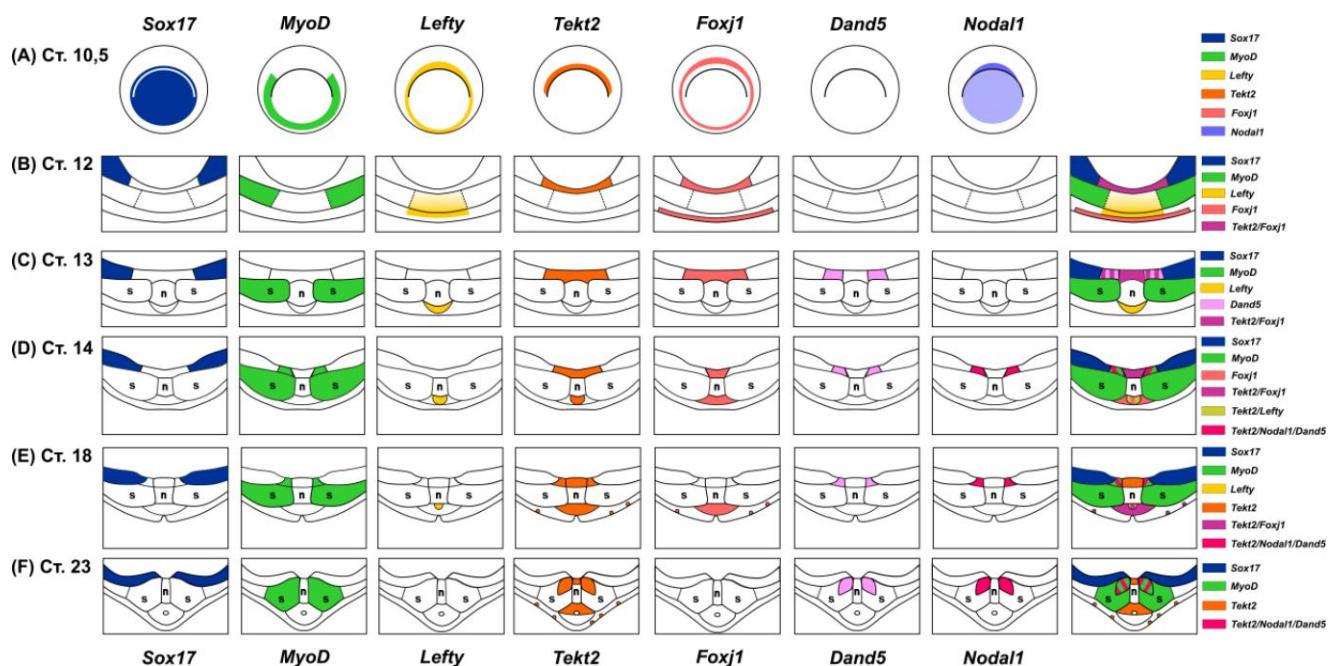


Рисунок 3.15. Схема паттернов экспрессии изучаемых генов на последовательных стадиях развития *X. laevis*.

(А) Схема паттернов экспрессии на ранней гастреле (стадия 10,5). *Nodal1* и *Sox17* совместно экспрессируются в вегетативном полушарии, колбовидных клетках и супрабластопоральной энтодерме. Экспрессия *Lefty* расположена в глубокой осевой мезодерме, а экспрессия *MyoD1* – в глубоких слоях параксиальной мезодермы. *Foxj1* и *Tekt2* совместно экспрессируются в поверхностной мезодерме.

(В) Схема паттернов экспрессии на поздней гастреле (стадия 12). *Sox17* экспрессируется в энтодерме вокруг формирующегося лево-правого организатора. Экспрессия *Lefty* расположена в глубокой осевой мезодерме, а экспрессия *MyoD1* – в глубоких слоях параксиальной мезодермы. Области экспрессии *Foxj1* и *Tekt2* в поверхностной мезодерме подвернулись в ходе гастрюляции и расположены на вентральной стороне крыши гастрюцеля.

(С) Схема паттернов экспрессии в начале нейруляции (стадия 13). *Sox17* экспрессируется в энтодерме вокруг формирующегося лево-правого организатора. Экспрессия *Lefty* расположена

в глубокой осевой мезодерме, а экспрессия *MyoD1* – в глубоких слоях параксиальной мезодермы. *Foxj1* и *Tekt2* экспрессируются в лево-правом организаторе с дополнительной экспрессией *Foxj1* в нервной пластинке. Экспрессия *Dand5* появляется в боковых сенсорных областях организатора.

(D) Схема паттернов экспрессии на ранней нейруле (стадия 14). *Sox17* экспрессируется в энтодерме, а *Lefty* – в нервной пластинке. Экспрессия *MyoD1* маркирует глубокие слои параксиальной мезодермы и появляется в боковых сенсорных областях организатора. *Foxj1* экспрессируется в лево-правом организаторе и нервной пластинке, а *Tekt2* – в лево-правом организаторе. *Dand5* экспрессируется в боковых сенсорных областях организатора, совместно с ним начинает экспрессироваться *Nodall*.

(E) Схема паттернов экспрессии на поздней нейруле (стадия 18). *Sox17* экспрессируется в энтодерме, а *Lefty* – в нервной пластинке. *MyoD1* экспрессируется в глубокой параксиальной мезодерме и в боковых сенсорных областях организатора. Экспрессия *Foxj1* исчезает из лево-правого организатора, а *Tekt2* экспрессируется по всей поверхности организатора. *Nodall* и *Dand5* совместно экспрессируются в боковых сенсорных областях организатора.

(F) Схема паттернов экспрессии на стадии хвостовой почки (стадия 23). Энтодерма, экспрессирующая *Sox17*, покрывает лево-правый организатор. *MyoD1* экспрессируется в презумптивной мезодерме сомитов. *Nodall* и *Dand5* совместно экспрессируются в боковых сенсорных областях организатора, которые постепенно покрываются слоем энтодермы. Клетки, экспрессирующие *Tekt2*, входят в состав хорды и презумптивной мезодермы сомитов.

n, хорда; s, презумптивная мезодерма сомитов.

3.2. Участие форминов в установлении лево-правой асимметрии *X. laevis*

Несмотря на значительное количество аргументов, свидетельствующих о ключевой роли лево-правого организатора в установлении асимметрии у *Xenopus laevis*, существуют свидетельства в пользу более раннего определения лево-правой оси. Так, показано, что формины играют ключевую роль в определении хиральности эмбрионов брюхоногих моллюсков на ранних этапах дробления [Abe, Kuroda, 2019], а в эксперименте с химическим ингибированием форминов у *X. laevis* [Davison et al., 2016] была выдвинута гипотеза об аналогичной роли форминов у шпорцевой лягушки и, следовательно, об установлении асимметрии во время дробления. Чтобы прояснить этот вопрос, мы применили химическое ингибирование форминов на разных стадиях развития *X. laevis* и исследовали влияние этого ингибирования на лево-правую асимметрию зародышей, на морфологию и на молекулярную разметку лево-правого организатора.

3.2.1. Влияние разных концентраций SMIFH2 на выживаемость эмбрионов

В ходе подготовки основного эксперимента мы произвели подбор оптимальных концентраций ингибитора форминов SMIFH2, поскольку литературные данные относительно рабочих концентраций и токсичности ингибитора для *X. laevis* противоречивы [Rizvi et al., 2009; Isogai et al., 2015, Davison et al., 2016].

Мы проанализировали воздействие на эмбрионы ингибитора форминов в концентрации 1 μM , 5 μM , 10 μM и 50 μM . Инкубацию эмбрионов в растворе ингибитора производили во время дробления (стадии 2-6,5) или во время гастрюляции и нейруляции (стадии 10-18), после чего вычисляли долю эмбрионов, доживших до стадии хвостовой почки.

Выживаемость контрольных эмбрионов, не подвергавшихся воздействию ингибитора, составила около 70%. Сходные значения выживаемости были

получены для эмбрионов, инкубированных в 1 μM , 5 μM и 10 μM растворе ингибитора форминов SMIFH2 независимо от стадии инкубации, поэтому данные концентрации были использованы в дальнейших экспериментах. При инкубации эмбрионов в 50 μM растворе SMIFH2 на всех изученных стадиях ингибитор оказывал на развивающиеся эмбрионы общетоксическое воздействие и приводил к их быстрой гибели, поэтому мы исключили эту концентрацию из дальнейших экспериментов (рисунок 3.16). Кроме того, мы убедились, что растворитель DMSO, применяемый при хранении ингибитора форминов SMIFH2, не оказывает воздействия на выживаемость эмбрионов независимо от стадии инкубации и может использоваться в качестве контроля.

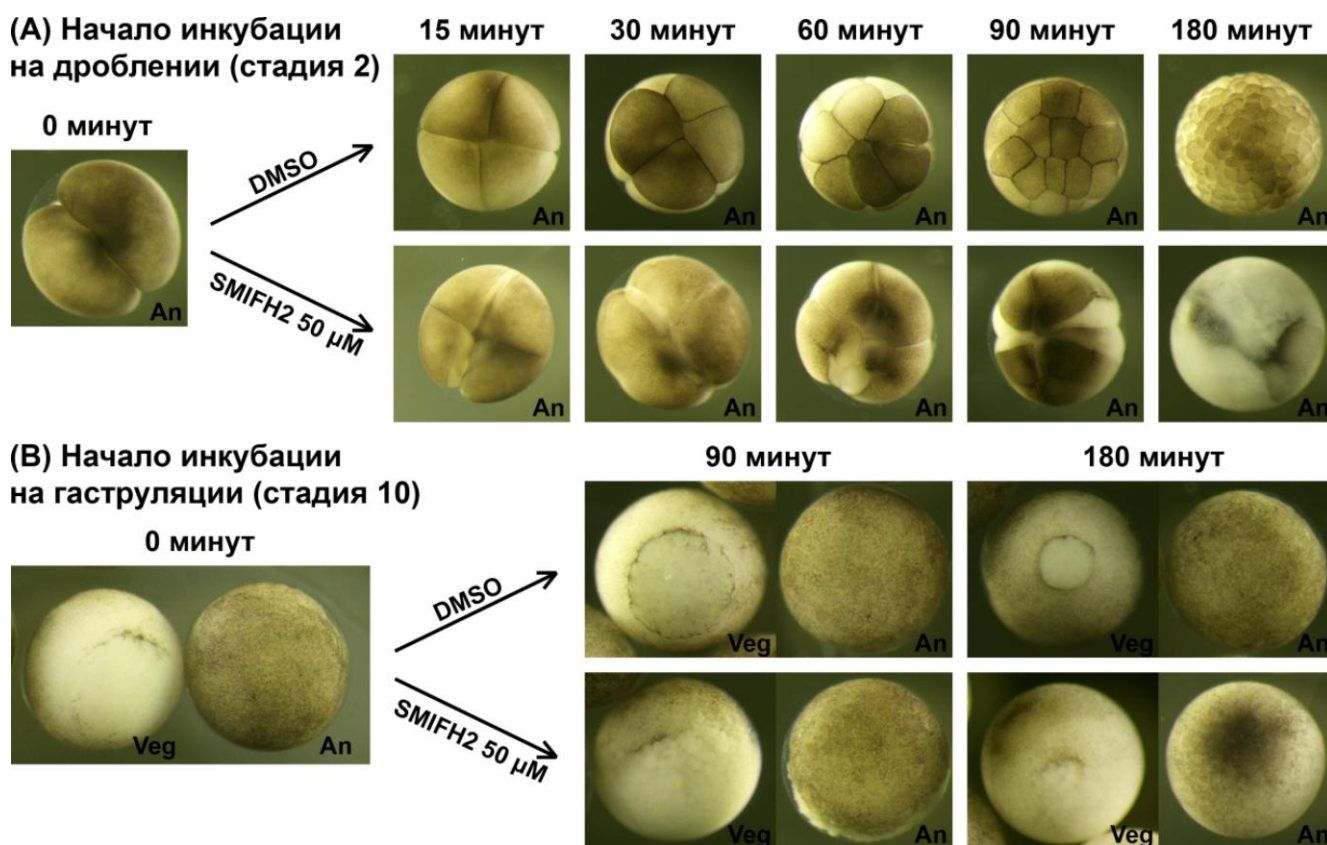


Рисунок 3.16. 50 μM раствор ингибитора форминов SMIFH2 приводит к гибели эмбрионов *X. laevis*.

(A) Развитие эмбрионов под воздействием 50 μM SMIFH2 или DMSO-контроля в начале дробления. (B) Развитие эмбрионов под воздействием 50 μM SMIFH2 или DMSO-контроля в начале гастрюляции. An, анимальный полюс; Veg, вегетативный полюс.

3.2.2. *Формины необходимы для установления асимметрии на стадиях гаструлы-нейрулы*

Чтобы определить период развития эмбрионов, во время которого активность форминов необходима для нормального установления асимметрии, мы подвергали эмбрионы воздействию нелетальных концентраций ингибитора форминов SMIFH2 во время дробления (стадии 2-6,5) либо во время гаструляции и нейруляции (стадии 10-18). После этого анализировали молекулярные и морфологические признаки асимметрии на более поздних стадиях развития (рисунок 3.17А).

В качестве основных молекулярных критериев установления асимметрии мы приняли экспрессию генов *nodall* и его мишени – гена *pitx2* на стадии хвостовой почки (стадия 28). В норме на данной стадии эти гены экспрессируются на левой стороне тела вблизи глотки, хотя встречается и удлинённая назад область экспрессии; правая сторона тела эмбриона к этому сроку полностью перестаёт экспрессировать *Nodall*, а экспрессия *Pitx2* в боковой пластинке мезодермы иницируется исключительно на левой стороне тела. Таким образом, по паттернам экспрессии *Nodall* и *Pitx2* можно судить о нормальном установлении лево-правой оси и о различных нарушениях этого процесса [Logan et al., 1998; Schweickert et al., 2007].

Мы разделили наблюдаемые фенотипы экспрессии *Nodall* на 4 типа: экспрессия на левой стороне, свидетельствующая о нормальном установлении асимметрии, а также правосторонняя экспрессия, двусторонняя экспрессия или её полное отсутствие (рисунок 3.17b).

Эмбрионы, обработанные SMIFH2 во время дробления, не показали существенных изменений экспрессии *Nodall*, тогда как инкубация в SMIFH2 на стадиях гаструлы-нейрулы привела к дозозависимому снижению доли эмбрионов с нормальной левосторонней экспрессией *Nodall* (рисунок 3.17B). Статистически

значимое уменьшение наблюдалось для концентрации ингибитора 10 μM ($p\text{-value} = 0,00000313$).

Аналогично *Nodal1* мы наблюдали 4 группы фенотипов экспрессии *Pitx2*: левосторонняя экспрессия, ассоциированная с нормальным установлением асимметрии, а также правосторонняя, двусторонняя или полное отсутствие экспрессии. Кроме того, у всех эмбрионов окрашивались глаза и присоска, однако паттерн экспрессии в этих областях оставался неизменным при экспериментальных воздействиях на эмбрионы, поэтому в рамках вопроса об асимметрии мы не рассматриваем эти области (рисунок 3.17с).

Результаты изучения экспрессии *Pitx2* оказались сходны с результатами для *Nodal1*. Воздействие SMIFH2 на эмбрионы во время дробления не оказало значимого влияния на экспрессию *Pitx2* на стадии хвостовой почки, тогда как инкубация эмбрионов на стадии гаструлы-нейрулы привела к значительному снижению доли эмбрионов с нормальной левосторонней экспрессией *Pitx2* для концентрации ингибитора 10 μM ($p\text{-value} = 0,0005445$) (рисунок 3.17С).

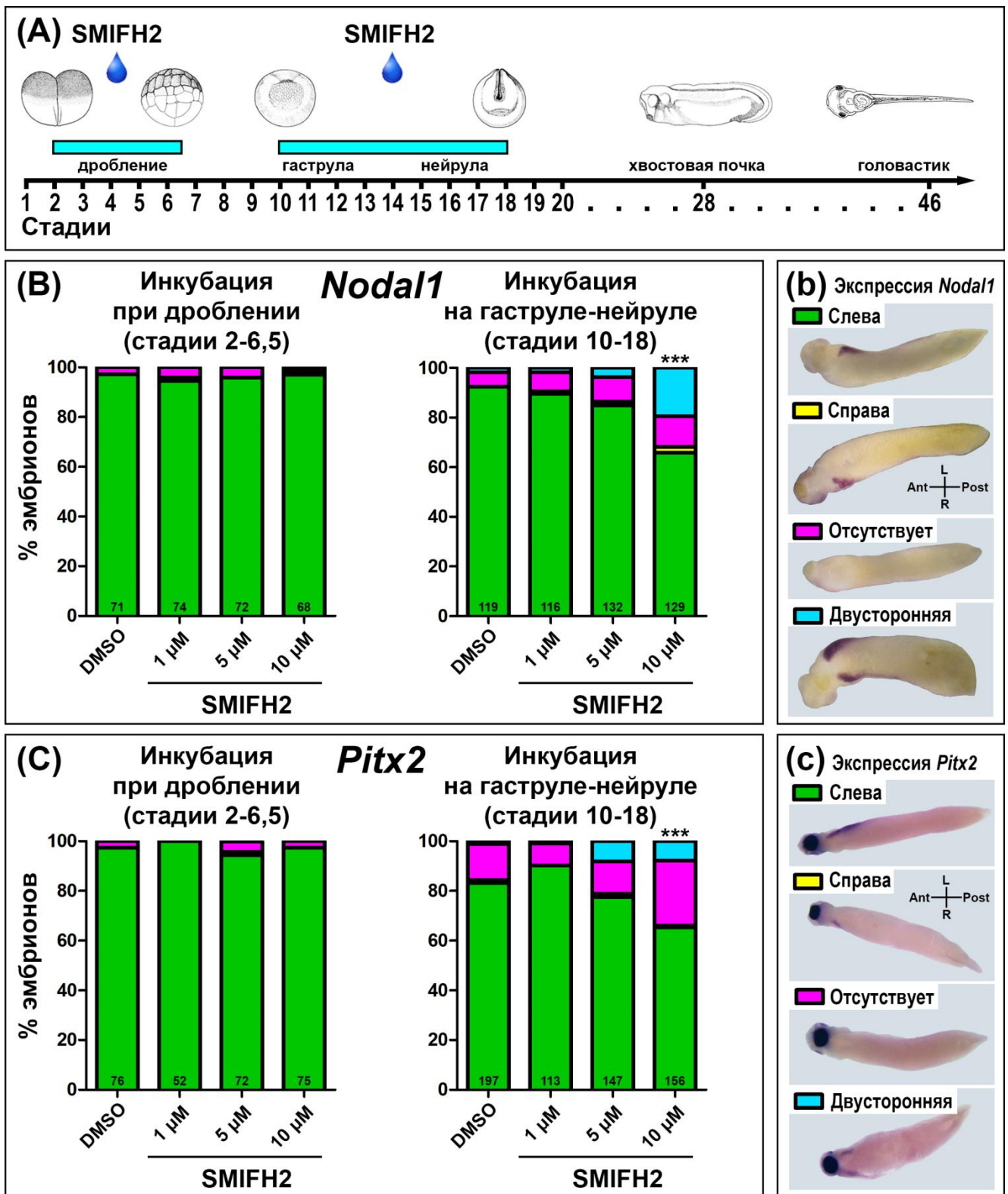


Рисунок 3.17. Молекулярные проявления лево-правой асимметрии после ингибирования форминов.

(A) Схема эксперимента. (B) Ингибитор форминов SMIFH2 не влияет на экспрессию *Nodal1* при воздействии во время дробления и уменьшает долю нормальной левосторонней экспрессии при воздействии на гастрюле-нейруле. (b) Паттерны экспрессии *Nodal1*, вид с вентральной стороны. (C) Ингибитор форминов SMIFH2 не влияет на экспрессию *Pitx2* при воздействии во

время дробления и уменьшает долю нормальной левосторонней экспрессии при воздействии на гастрoule-нейруле. (с) Паттерны экспрессии *Pitx2*, вид с вентральной стороны.

Ant, anteriорный конец; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона. ***, $p\text{-value} < 0.001$ по сравнению с DMSO-контролем, тест пропорций с поправкой Бонферрони. Цифры в основаниях столбцов – число эмбрионов.

Асимметрия, возникшая на молекулярном уровне в виде левосторонней экспрессии *Nodal1* и *Pitx2*, в дальнейшем проявляется на морфологическом уровне у головастиков *Xenopus*. Основные морфологические признаки лево-правой асимметрии у зародышей *Xenopus* впервые проявляются при развитии сердца и кишечника: в норме у головастиков на стадии 46 петли кишечника закручены против часовой стрелки, а артериальный конус сердца находится выше и левее желудочка.

Как и в эксперименте с анализом молекулярной асимметрии, мы воздействовали ингибитором форминов SMIFH2 на эмбрионы во время дробления (стадии 2-6,5) или на стадиях гастрoule-нейрулы (стадии 10-18). После этого мы дорастивали головастиков до стадии 46 и оценивали морфологию сердца и кишечника на интактных головастиках. Наблюдаемые фенотипы были объединены в три группы: *situs solitus* – нормальная асимметрия сердца и кишечника, *situs inversus* – зеркальное строение и сердца, и кишечника относительно нормы, гетеротаксия – рассогласование морфологической асимметрии сердца и кишечника (рисунок 3.18А).

Головастики, подвергавшиеся ингибированию форминов во время дробления, не показали значимых отличий доли особей с нормальной морфологической асимметрией от контроля. При воздействии ингибитора форминов на эмбрионы на стадиях гастрoule-нейрулы из этих эмбрионов вырастали головастики, чаще имеющие нарушения асимметрии по сравнению с контролем: доля головастиков с нормальной асимметрией (*situs solitus*) достоверно снижалась для концентрации ингибитора 10 μM ($p\text{-value} = 0,00006552$) (рисунок 3.18В). При этом особи с гетеротаксией, как правило, несколько отставали в развитии от особей с *situs solitus* или *situs inversus*, что согласуется с

литературными данными, по которым гетеротаксия органов является более тяжёлой патологией, чем полностью зеркальный относительно нормы организм.

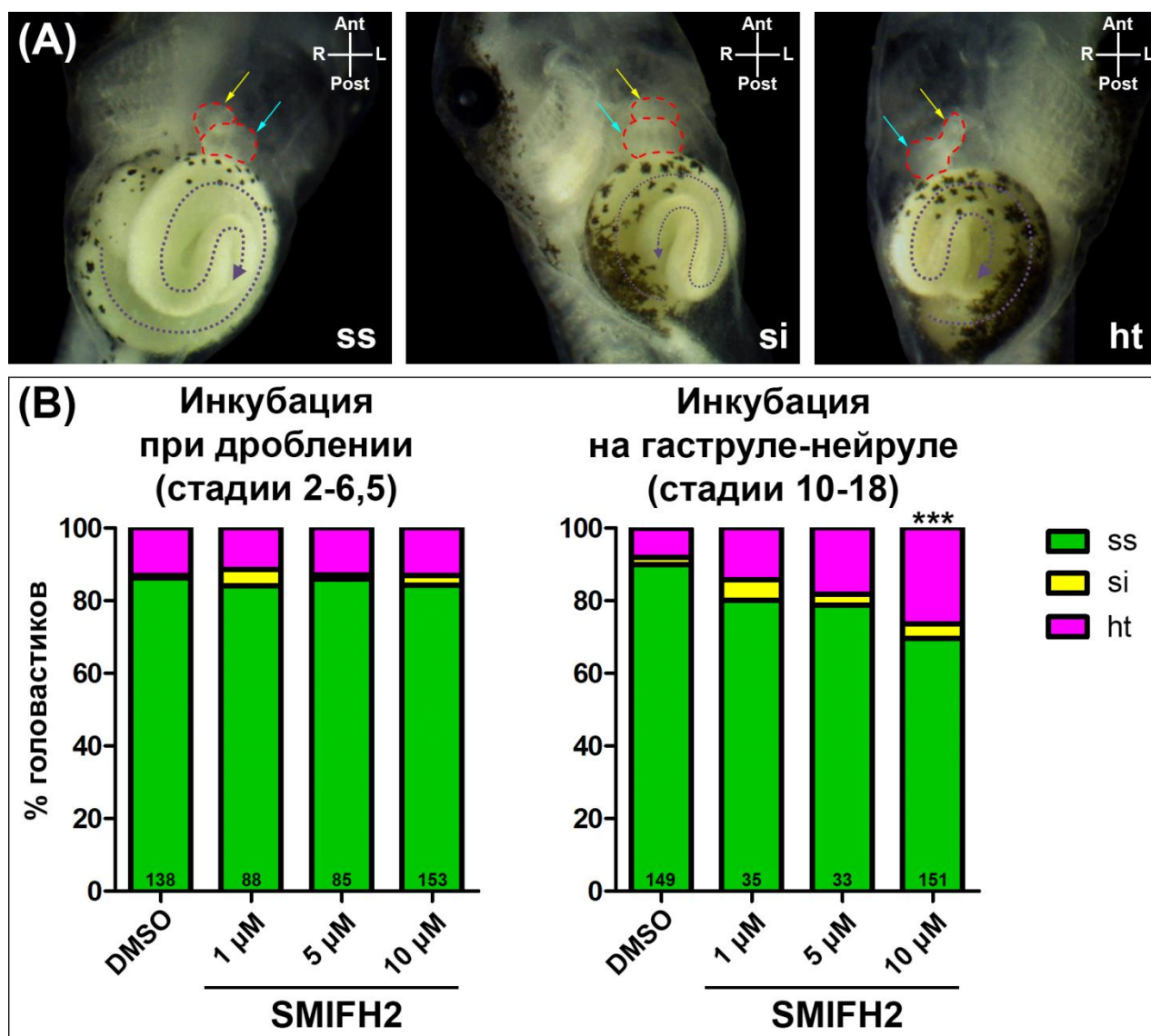


Рисунок 3.18. Морфологические проявления лево-правой асимметрии после ингибирования форминов.

(A) Морфология сердца и кишечника у головастиков на стадии 46. *ss*, *situs solitus*; *si*, *situs inversus*; *ht*, гетеротаксия. Фиолетовый пунктир – направление петель кишечника, красный пунктир – контуры сердца, голубая стрелка – желудочек, жёлтая стрелка – артериальный конус.

(B) Ингибитор форминов SMIFH2 не влияет на асимметрию висцеральных органов при воздействии во время дробления и уменьшает долю нормальной асимметрии органов при воздействии на гастрале-нейруле.

Ant, anteriорный конец; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона. ***, p -value < 0.001 по сравнению с DMSO-контролем, тест пропорций с поправкой Бонферрони. Цифры в основаниях столбцов – число эмбрионов.

Таким образом, мы показали, что воздействие ингибитором форминов SMIFH2 на стадиях дробления не влияет на дальнейшую асимметрию зародышей, в то время как ингибирование форминов на стадиях гаструлы-нейрулы нарушает как молекулярные, так и морфологические проявления асимметрии. Этот эффект свидетельствует о том, что формины нужны для установления асимметрии именно на тех стадиях, когда в крыше гастроцеля формируется и функционирует лево-правый организатор.

3.2.3. Ингибирование форминов на стадиях гаструлы и нейрулы вызывает преждевременное закрытие лево-правого организатора

Наблюдаемый эффект нарушения лево-правой асимметрии у эмбрионов, подвергнутых ингибированию форминов на гаструле-нейруле, позволяет предположить влияние ингибитора форминов SMIFH2 на лево-правый организатор в крыше гастроцеля в качестве возможного механизма нарушения асимметрии. Оптимальный срок развития эмбрионов для исследования возможных нарушений морфологии и молекулярной разметки лево-правого организатора – это стадии поздней нейрулы, когда лево-правый организатор в крыше гастроцеля в норме полностью сформирован, клетки его центральной области активно создают ток жидкости в гастроцеле при помощи биения ресничек, а боковые области организатора воспринимают этот ток жидкости. Для оценки развития лево-правого организатора и возможности его функциональной активности мы воздействовали ингибитором форминов SMIFH2 на эмбрионы во время дробления (стадии 2-6,5) или на стадиях гаструлы-нейрулы (стадии 10-18), после чего фиксировали эмбрионы на стадии поздней нейрулы (стадия 18) и изучали морфологию лево-правого организатора на дорсальных эксплантах и поперечных срезах через них, а также оценивали экспрессию гена-маркера энтодермы *sox17*, гена-маркера поверхностных клеток организатора *tekt2* и гена-маркера боковых сенсорных областей организатора *nodall*.

Для получения дополнительных данных об эффектах ингибирования форминов мы изучили состояние лево-правого организатора у эмбрионов на стадии поздней нейрулы (стадия 18), подвергнутых воздействию ингибитора форминов SMIFH2 во время дробления, и убедились, что ни молекулярная разметка лево-правого организатора, ни его морфология у таких эмбрионов не отличаются от контрольных (рисунок 3.19).

Инкубация при дроблении (стадии 2-6,5)

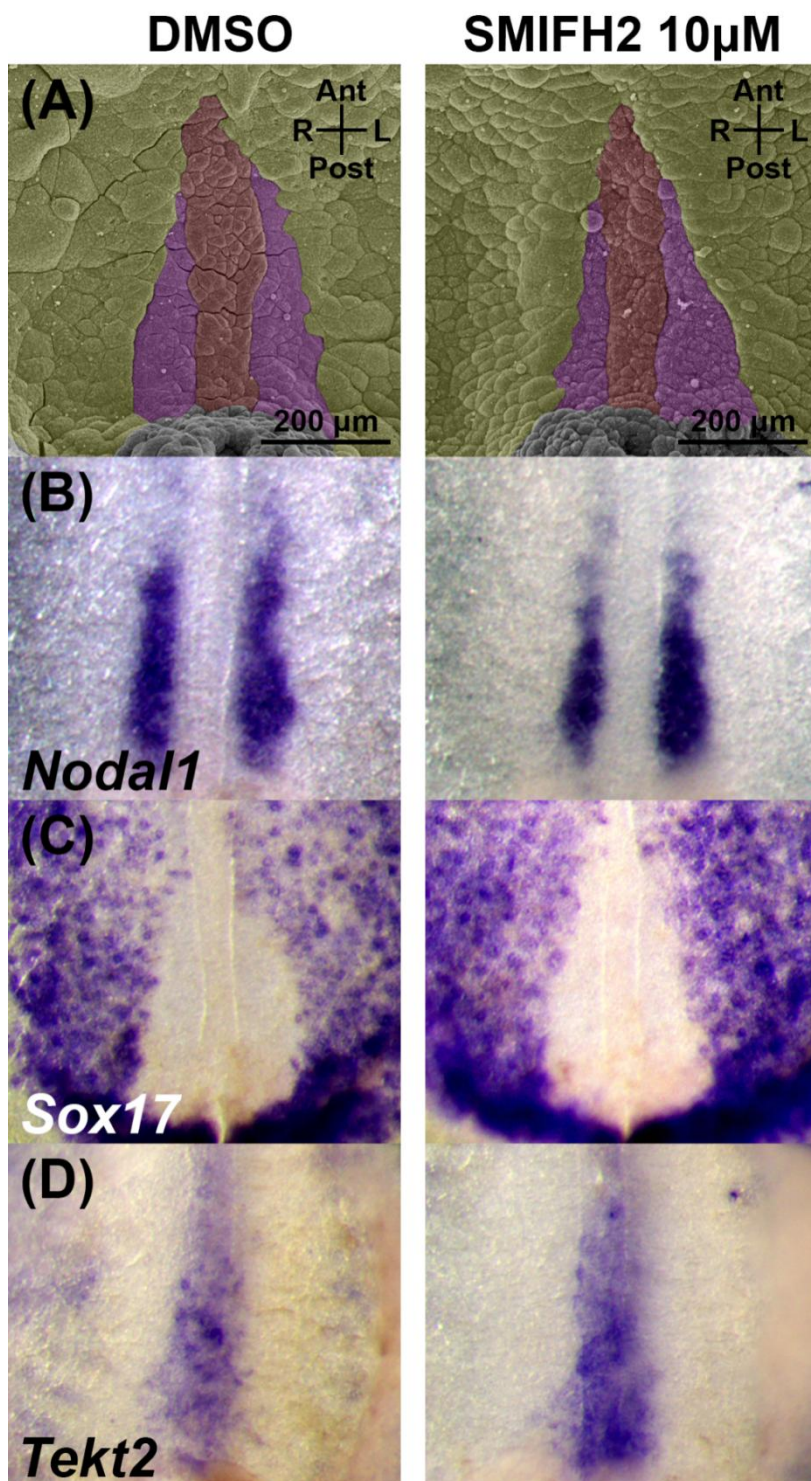


Рисунок 3.19. Ингибирование форминов при дроблении не влияет на морфологию и молекулярную разметку лево-правого организатора.

(A) Лево-правый организатор в крыше гастроцеля, СЭМ. Красный – хорда и гипохорд, фиолетовый – боковые сенсорные зоны, жёлтый – энтодерма. (B-D) Молекулярная разметка области лево-правого организатора, гибридизация *in situ* на *Nodal1* (B), *Sox17* (C) и *Tekt2* (D).

Ant, anteriорный конец; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона.

Эмбрионы, подвергнутые воздействию ингибитора форминов SMIFH2 на стадиях гаструлы-нейрулы, демонстрировали изменение морфологии крыши гастроцеля на стадии поздней нейрулы. Изображения со сканирующего электронного микроскопа показывают, что по сравнению с контрольной группой область лево-правого организатора в ингибированных эмбрионах оказывается значительно уже и имеет щелевидную форму, причём эффект проявляется уже для концентрации ингибитора форминов SMIFH2 5 μ M. Характерные для лево-правого организатора мелкие клетки остаются в виде узкой полосы на средней линии эмбриона, а по бокам их окружают клетки более крупного размера, характерного для энтодермы (рисунок 3.20А). Поперечные гистологические срезы через крышу гастроцеля подтверждают, что у образцов, подвергнутых ингибированию форминов, область лево-правого организатора, открытая в полость гастроцеля, значительно уже, чем в контроле. Крупные клетки, окружающие область лево-правого организатора по бокам, частично (а на некоторых образцах – полностью) прикрывают сверху презумптивную мезодерму сомитов, включая поверхностные области, отвечающие за восприятие тока жидкости, и частично перекрывают область гипохорда, отвечающие за создание тока жидкости в гастроцеле (рисунок 3.20В).

Поскольку зона лево-правого организатора в крыше гастроцеля у ингибированных эмбрионов была лишь частично перекрыта крупными клетками, а на средней линии сохранялись мелкие клетки, характерные для лево-правого организатора, мы смогли отметить на них реснички и изучить их длину и распределение. В качестве морфологических критериев были выбраны известные из литературы характеристики, напрямую связанные с созданием нормального тока жидкости в полости гастроцеля – доля ресничных клеток в центральной области, положение реснички на клетке, длина реснички.

Доля клеток, несущих реснички, в не перекрытой крупными клетками области крыши гастроцеля несколько снизилась у ингибированных эмбрионов по

сравнению с контролем, однако эта разница не была статистически значима (p -value = 0,295 для 10 μ M SMIFH2).

При исследовании положения ресничек мы приняли три возможных варианта позиционирования реснички на клетке (не считая случаев отсутствия реснички): постериорное положение, иное, а также более одной реснички на клетке; подобный выбор обусловлен тем, что только реснички в постериорном положении способны создавать эффективный левонаправленный ток. Доля клеток с постериорным положением ресничек не изменилась у ингибированных эмбрионов. Также не было обнаружено достоверных различий по длине ресничек между всеми изученными концентрациями (рисунок 3.20С).

Инкубация на гастрале-нейруле (стадии 10-18)

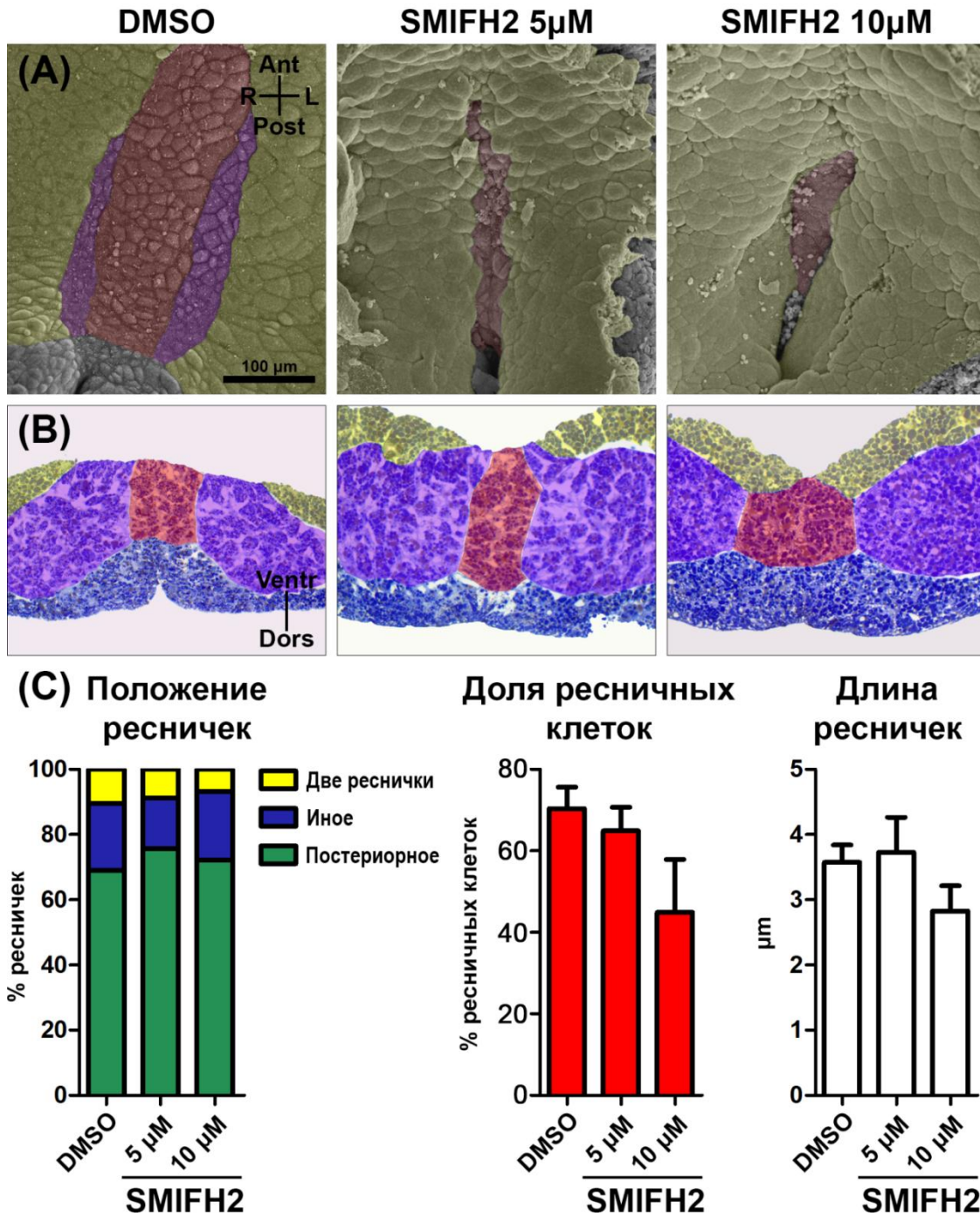


Рисунок 3.20. Ингибирование форминов на гастрале-нейруле нарушает морфологию лево-правго организатора на стадии поздней нейрулы.

(А-В) Область лево-правго организатора у эмбрионов после воздействия различных концентраций ингибитора форминов SMIFH2, СЭМ и поперечные срезы. Синий – эктодерма, красный – хорда и гипохорд, фиолетовый – боковые сенсорные зоны, жёлтый – энтодерма. (С) Ингибирование форминов не влияет на положение ресничек, длину ресничек и долю ресничных клеток среди клеток центральной области лево-правго организатора.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона.

У эмбрионов на стадии поздней нейрулы (стадия 18), подвергнутых ингибированию форминов на гастрале-нейруле, мы дополнительно изучили структуру тубулина и F-актина в области лево-правого организатора методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Изображения поверхности крыши гастроцеля с конфокального лазерного микроскопа подтверждают, что у ингибированных эмбрионов центральная область крыши гастроцеля с мелкими ресничными клетками значительно сужается по сравнению с контролем, однако сохранившиеся на поверхности вдоль средней линии клетки по-прежнему несут длинные реснички, смещённые к постериорному концу клетки (рисунок 3.21). Интересно, что обработка эмбрионов SMIFH2 не повлияла на сеть кортикального актина в клетках.

Инкубация на гастрале-нейруле (стадии 10-18)

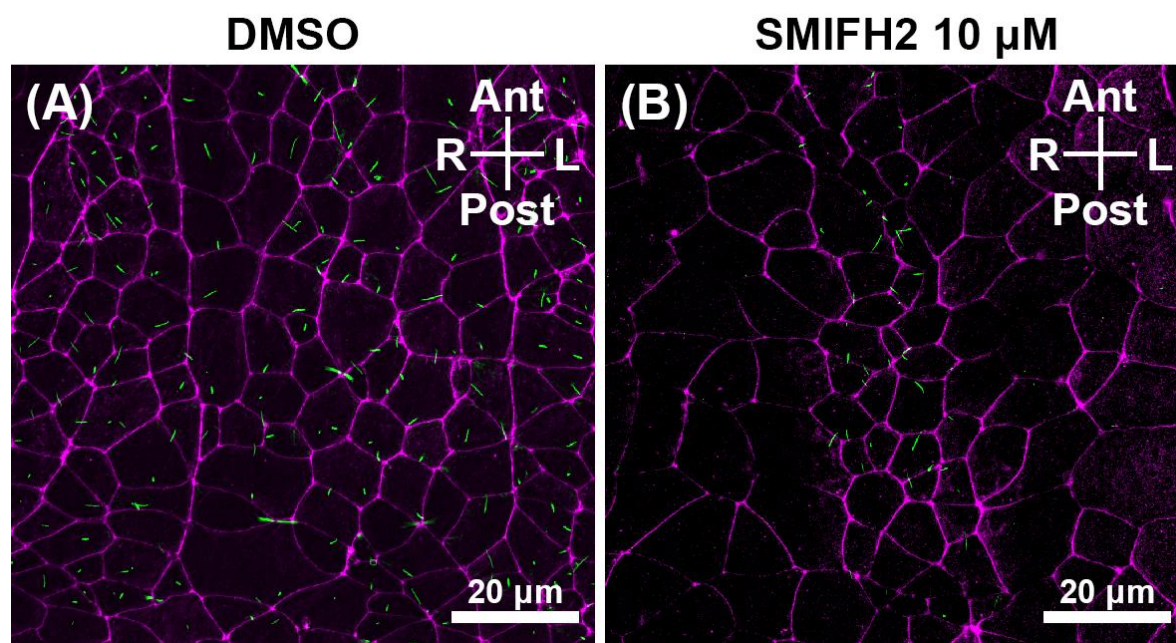


Рисунок 3.21. Распределение актиновых филаментов и ресничек в крыше гастроцеля после ингибирования форминов на гастрале-нейруле.

(А-В) Постериорная область крыши гастроцеля у образца после DMSO-контроля (А) и обработки 10 µM SMIFH2 (В). Малиновый – актиновые филаменты, зелёный – реснички.

Ant, anteriорный конец; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона.

Мы предположили, что ингибирование форминов на гастрале-нейруле приводит к перекрытию функциональных областей организатора, в то время как

те части организатора, которые всё же остаются на поверхности, не претерпевают значительных изменений в морфологии. Чтобы установить, какие именно функциональные области организатора теряют связь с поверхностью и какова принадлежность крупных клеток, перекрывших организатор с боков, мы проанализировали экспрессию энтодермального маркера *Sox17* и маркера ресничных клеток организатора *Tekt2* после обработки SMIFH2 на гастрале-нейруле. В то время как у контрольных эмбрионов экспрессия *Sox17* окружает неокрашенную треугольную область на средней линии эмбриона, соответствующую лево-правому организатору на этой стадии развития, у обработанных ингибитором эмбрионов эта неокрашенная область имеет вид щели на средней линии, указывая на сужение поверхности лево-правого организатора и его замещение энтодермальными клетками на поверхности гастроцеля (рисунок 3.22А). Аналогичные данные демонстрирует и экспрессия *Tekt2*: вместо треугольной области экспрессии, характерной для стадии поздней нейрулы и маркирующей поверхность лево-правого организатора, у обработанных ингибитором эмбрионов область экспрессии *Tekt2* сужается до тонкой полоски на средней линии эмбриона (рисунок 3.22В).

Далее мы проанализировали экспрессию генов *dand5* и *nodall*, которые в норме на стадиях нейрулы маркируют поверхностные клетки презумптивной мезодермы сомитов, функционирующие в качестве сенсорных областей лево-правого организатора. Экспрессия *Dand5* наблюдалась как у контрольных эмбрионов, так и у обработанных SMIFH2 (рисунок 3.22С). Экспрессия *Nodall* также наблюдалась и у контрольных эмбрионов, и у обработанных SMIFH2, при этом у ингибированных эмбрионов интенсивность экспрессии была визуально слабее (рисунок 3.22D). Поперечные срезы через область экспрессии *Nodall* показали, что если у контрольных эмбрионов *Nodall*-положительные клетки лежат на внутренней поверхности крыши гастроцеля, как и ожидается на стадии поздней нейрулы, то *Nodall*-положительные клетки у обработанных ингибитором эмбрионов частично или полностью теряют контакт с поверхностью, будучи перекрытыми сверху энтодермальными клетками (рисунок 3.22d').

Инкубация на гастрале-нейруле (стадии 10-18)

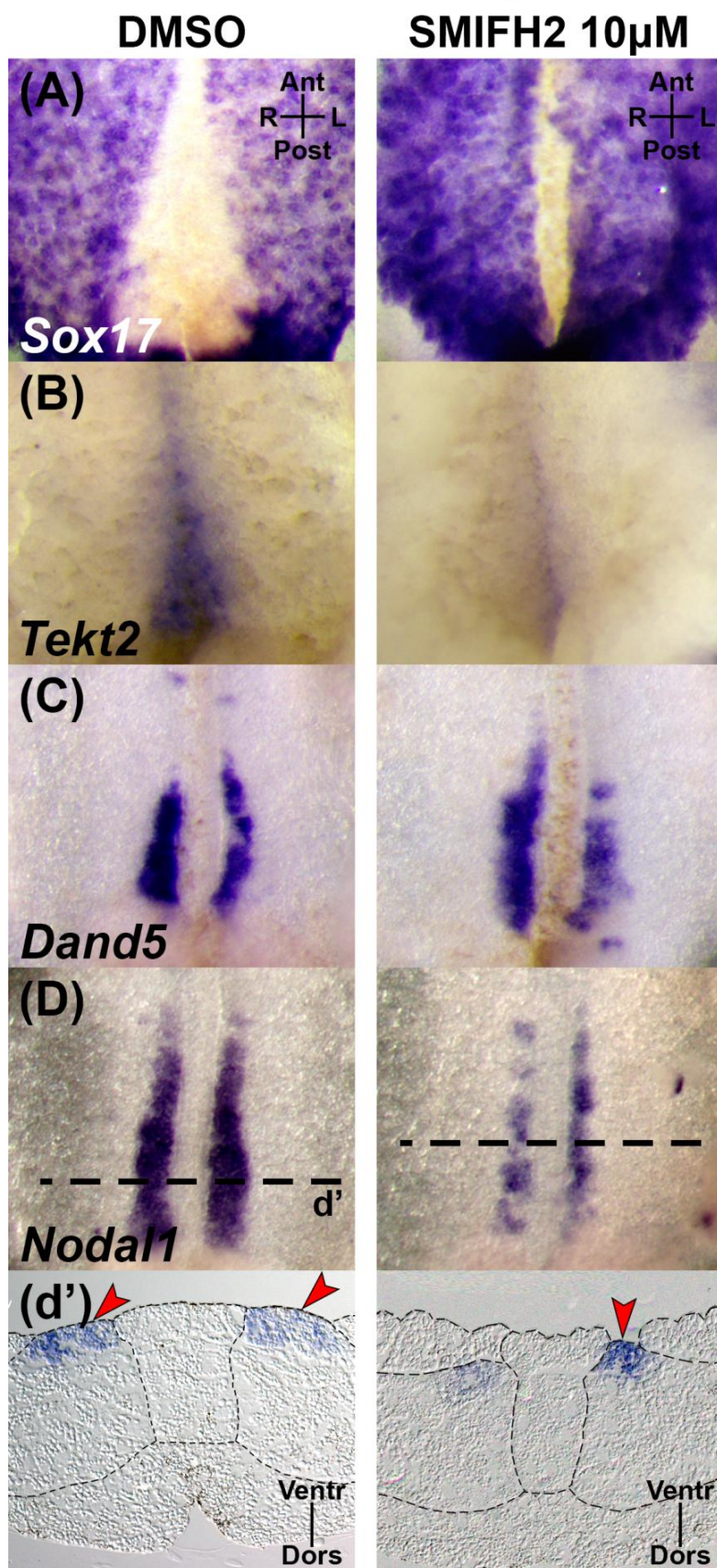


Рисунок 3.22. Ингибирование форминов на гастрале-нейруле нарушает нормальную молекулярную разметку в области лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы.

(A-D) Молекулярная разметка лево-правого организатора, гибридизация *in situ* на *Sox17* (A), *Tekt2* (B), *Dand5* (C) и *Nodal1* (D). (d') Срезы через область экспрессии *Nodal1*. Стрелки указывают на *Nodal1*-положительные клетки, сохраняющие контакт с поверхностью.

Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Ventr, вентральная сторона. Пунктиром на дорсальных эксплантах обозначены плоскости срезов. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

Таким образом, мы предположили, что наблюдаемые нарушения лево-правой асимметрии у эмбрионов, обработанных ингибитором форминов SMIFH2 на стадиях гаструлы-нейрулы (стадии 10-18), связаны с нарушениями функционирования лево-правого организатора в крыше гастроцеля, а именно с перекрытием энтодермой сенсорных областей организатора, что может приводить к невозможности восприятия ими ресничного тока жидкости в гастроцеле и, следовательно, к нарушениям индукции каскада *Nodal* на левой стороне тела.

В свете этих данных возник вопрос, когда именно происходит частичное перекрытие лево-правого организатора энтодермальными клетками: формируется ли лево-правый организатор закрытым с самого начала, или же он изначально формируется открытым, а потом преждевременно перекрывается энтодермой. Чтобы прояснить этот вопрос, мы использовали эмбрионы, инкубация которых в ингибиторе форминов SMIFH2 была начата на ранней гаструле (стадия 10), когда материал лево-правого организатора начинает гастрюляционные движения. Эмбрионы были зафиксированы либо на стадии ранней нейрулы (стадия 13), когда лево-правый организатор в крыше гастроцеля приобретает характерную форму и размеры и у него начинают специализироваться поверхностные области, либо на стадии поздней нейрулы (стадия 18), когда перекрытие лево-правого организатора энтодермой ярко выражено. Мы проанализировали у зафиксированных эмбрионов молекулярную разметку области лево-правого организатора на маркер энтодермы *Sox17* и маркер поверхностных клеток организатора *Tekt2* и показали, что к стадии ранней нейрулы ингибированные эмбрионы ещё не отличаются от контрольных: не окрашенная *Sox17* область на

средней линии у таких эмбрионов ещё не начала сужаться и имеет такую же форму и размеры, как и у контрольных эмбрионов, а область экспрессии *Tekt2* в обоих случаях имеет широкую треугольную форму, характерную для стадии 13 (рисунок 3.23А). К стадии 18 же эффекты от ингибирования форминов приводят к значительной разнице между контрольными и ингибированными эмбрионами: с широкой областью лево-правого организатора у контрольных эмбрионов и суженной у ингибированных (рисунок 3.23В).

Мы заключили, что в ходе ингибирования форминов на стадиях гастрюлы-нейрулы лево-правый организатор формируется нормальным образом, однако во время нейруляции преждевременно перекрывается энтодермой, предположительно до того, как он успеет выполнить свои функции.

Инкубация на гастрюле-нейруле (стадии 10-18)

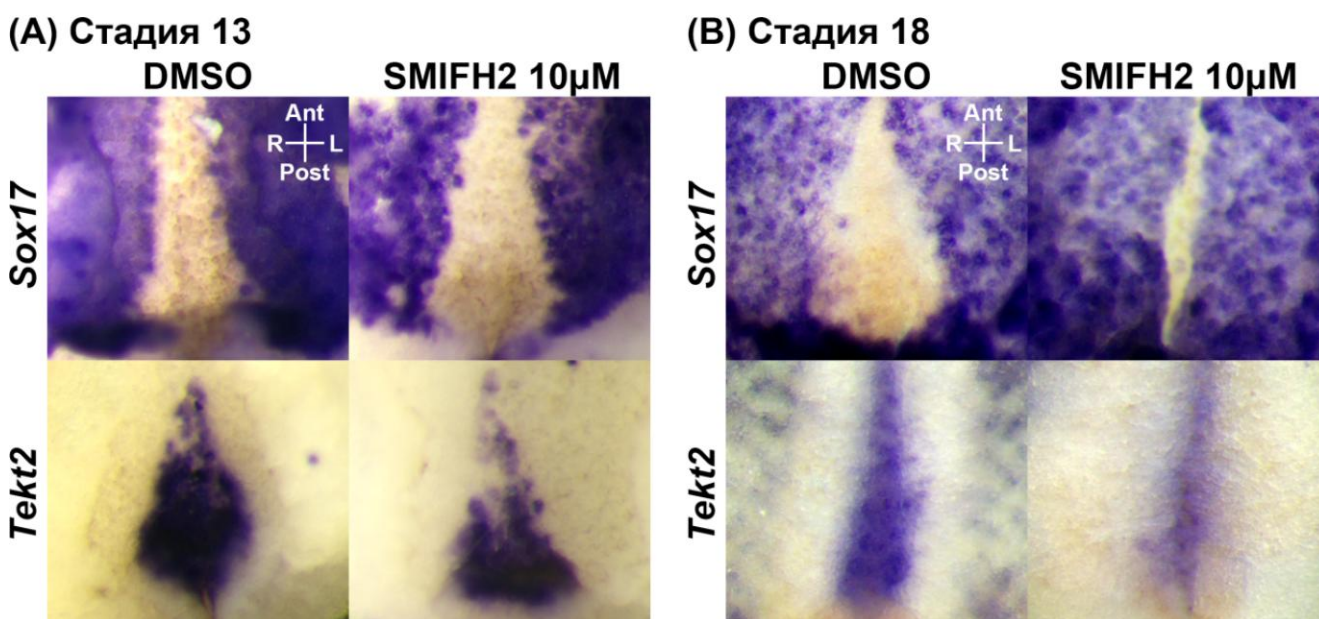


Рисунок 3.23. Ингибирование форминов на гастрюле-нейруле приводит к преждевременному закрытию лево-правого организатора.

Молекулярная разметка области лево-правого организатора в крыше гастроцеля на стадиях ранней нейрулы (А) и поздней нейрулы (В), гибридизация *in situ* на *Sox17* и *Tekt2*.

Ant, anteriорный конец; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона.

4. Обсуждение

Поверхностная мезодерма дорсальной стороны зародыша играет ключевую роль в установлении лево-правой асимметрии у амфибий, формируя лево-правый организатор в дорсальной задней части гастроцеля [Schweickert et al., 2010; Walentek et al., 2012]. Поверхностная мезодерма изначально располагается в дорсальной губе бластопора и экспрессирует *foxj1*, ген, необходимый для формирования подвижных ресничек [Stubbs et al., 2008]. После успешного установления молекулярной асимметрии в конце нейруляции поверхностная мезодерма перемещается с поверхности крыши гастроцеля в глубокие слои, где её центральная часть становится частью хорды, а боковые части встраиваются в мезодерму сомитов, в то время как крыша гастроцеля покрывается энтодермой [Shook et al., 2004]. Приведённый в данной работе анализ морфологии и экспрессии генов в поверхностной мезодерме и её окрестностях на последовательных стадиях развития от бластулы до хвостовой почки расширяет и уточняет наше представление о формировании лево-правого организатора.

В процессе гастрюляционных движений клетки поверхностной мезодермы перемещаются из супрбластопорального положения на дорсальную крышу гастроцеля, не теряя поверхностного положения, что продемонстрировано отсутствием экспрессии энтодермального маркера *Sox17* в соответствующей области и наличием непрерывной экспрессии генов-маркеров ресничных клеток. Ген-маркер ресничных клеток *foxj1* начинает экспрессироваться в поверхностной мезодерме уже на стадии поздней бластулы. Его экспрессия продолжается до конца гастрюляции, затухая в течение нейруляции. Ген *tekt2*, который находится под контролем *foxj1* и также известен как ресничный маркер, включается в клетках поверхностной мезодермы на стадии ранней гастрюлы и продолжает непрерывно экспрессироваться в них вплоть до стадии хвостовой почки. *Tekt2* изначально был охарактеризован как ген, необходимый для подвижности ресничек, поскольку мутация его гомолога у мышей вызывала нарушение

структуры внутренней ручки динеина в ресничках и жгутиках мышинных клеток и приводила к потере подвижности ресничек и жгутиков [Tanaka et al., 2004]. Однако детальные поперечные срезы в нашем исследовании показывают экспрессию *Tekt2* не только в центральной зоне лево-правого организатора, несущей подвижные реснички, но также и в клетках боковых сенсорных зон организатора, реснички которых неподвижны и служат для механического восприятия тока жидкости в гастроцеле. Более того, *Tekt2* продолжает экспрессироваться в этих клетках даже после того, как они встраиваются в глубокие слои мезодермы сомитов и полностью теряют связь с поверхностью на стадии хвостовой почки.

Мы не обнаружили непрерывности между областью экспрессии *Nodall* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора и более ранней экспрессией *Nodall* в дорсальной губе бластопора, которая прекращается на стадии 11. Область экспрессии *Nodall* перед гастрюляцией и в её начале совпадает с областью экспрессии маркера энтодермы *Sox17*, а маркеры поверхностной мезодермы *Foxj1* и *Tekt2* в дорсальной губе бластопора экспрессируются непосредственно антериорнее клеток, экспрессирующих *Nodall*; но именно в клетках поверхностной мезодермы будет активироваться экспрессия *Nodall* на ранней нейруле. Таким образом, мы проследили на последовательных стадиях развития, что *Nodall*-положительные клетки на ранней гастрюле и на ранней нейруле – это разные клетки. Известно, что экспрессия *Nodall* в вегетативном полушарии на стадиях поздней бластулы и ранней гастрюлы связана с индукцией мезодермы, причём малые концентрации белка *Nodall* индуцируют образование вентральной мезодермы, а большие – образование дорсальной мезодермы [Agius et al., 2000].

Интересно, что ген *lefty*, который, согласно литературным данным, активируется *nodall* и является его антагонистом [Cheng et al., 2000], экспрессируется анимальнее области экспрессии *Nodall* на поздней бластуле и ранней гастрюле в глубоких слоях презумптивной мезодермы, но не в клетках

поверхностной мезодермы. В отличие от *Nodall*, *Lefty* демонстрирует непрерывную экспрессию от поздней бластулы до поздней нейрулы. Однако поле его экспрессии непрерывно сужается от всех глубинных слоёв клеток на осевой линии тела, включая материал будущей хорды, в начале гаструляции, до гипоектодермы нервной пластинки во время нейруляции. Поскольку функции *Nodall* в начале гаструляции и во время нейруляции различаются, мы предполагаем, что *lefty* в начале гаструляции может выступать как антагонист *nodall* в мезодермальных индуцирующих взаимодействиях, а экспрессия *lefty* в нервной пластинке во время нейруляции может предотвращать просачивание сигнала *Nodal* на правую сторону аналогично механизму, описанному у мыши [Cheng et al., 2000].

Клетки поверхностной мезодермы частично приобретают свою специализацию ещё на поздней бластуле. В частности, экспрессия *Foxj1* в клетках поверхностной мезодермы находится под контролем FGF [Schneider et al., 2019] и канонического пути Wnt [Beyer et al., 2012]. Тем не менее, поскольку клетки боковых сенсорных зон поверхностной мезодермы начинают экспрессию гена-маркера мезодермы сомитов *myod1* и гена лево-правой асимметрии *dand5* только в начале нейруляции, а экспрессию гена *nodall* ещё позже, мы можем предполагать необходимость дополнительной индукции клеток боковых сенсорных зон лево-правого организатора ближе к началу нейруляции.

Молекулярная спецификация боковых сенсорных зон лево-правого организатора отмечена нами на стадии ранней нейрулы (стадия 13) в виде старта экспрессии маркера презумптивной мезодермы сомитов *MyoD1* и антагониста *nodall Dand5*, что совпадает с началом морфологического выделения боковых сенсорных зон в пределах поверхностного пласта крыши гастроцеля. На стадии 14 в этих зонах включается собственно экспрессия *Nodall*, и боковые сенсорные зоны окончательно отделяются как от окружающей энтодермы, так и от гипохорда, лежащего между ними. Наблюдаемое начало экспрессии *Dand5*

раньше начала экспрессии *Nodal1* находит объяснение во взаимодействии продуктов этих генов: *Dand5*, будучи антагонистом *Nodal1* [Schweickert et al., 2010], связывает его и не позволяет преждевременно активировать каскад *Nodal*, поэтому появление *Dand5* раньше *Nodal1*, вероятно, предотвращает случайную активацию каскада *Nodal* на стадии ранней нейрулы.

Позднее появление экспрессии *MyoD1*, *Nodal1* и *Dand5* в боковых сенсорных зонах лево-правого организатора указывает на индуктивное взаимодействие, необходимое для спецификации этих областей. Наши данные согласуются с более ранними исследованиями, показывающими, что специализация боковых сенсорных зон зависит от FGF-сигналинга со стадии 12 по стадию 13 [Schneider et al., 2019].

Постепенное закрытие лево-правого организатора начинается на стадии 18 и прогрессирует в виде сужения мезодермальной поверхности крыши гастроцеля и замещения её энтодермальной выстилкой гастроцеля, так что к стадии хвостовой почки бывший лево-правый организатор представляет собой узкую щель на поверхности крыши гастроцеля, а большая часть поверхностной мезодермы перекрыта сверху энтодермальными клетками. Наше исследование показывает практически полностью открытый лево-правый организатор на стадии 18, в то время как ранние исследования для этой стадии демонстрируют организатор закрытым [Shook et al., 2004]. Кажущееся противоречие разрешается тем, что процесс закрытия лево-правого организатора прогрессирует в передне-заднем направлении, и срезы в ранних исследованиях могли быть сделаны гораздо anteriорнее, чем в нашем.

Nodal1 и *Dand5* продолжают экспрессироваться в клетках бывших боковых сенсорных зон лево-правого организатора после его закрытия. Кроме того, там же продолжает экспрессироваться *Tekt2*, экспрессия которого на стадии 23 также отмечается в гипохорде. Эти наблюдения отражают судьбу поверхностной мезодермы, что хорошо согласуется с более ранними наблюдениями и детализирует их [Shook et al., 2004].

Принципы формирования лево-правого организатора, по-видимому, достаточно консервативны в эволюции позвоночных животных, несмотря на кажущиеся различия в механизмах нарушения симметрии [Blum, Ott, 2018; Szenker-Ravi et al., 2022]. Так, параксиальная экспрессия *Nodal* в лево-правом организаторе проявляется у всех изученных позвоночных животных [Schroder et al., 2016, Tsikolia et al., 2012], хотя происхождение и дальнейшая судьба этой области зачастую требует дальнейшего изучения. Подобно исчезновению *Nodal* в дорсальной губе бластопора и последующему его включению в параксиальной поверхностной мезодерме у *Xenopus*, у амниот *Nodal* вначале экспрессируется в первичной полоске, а затем его экспрессия в этой области пропадает и включается позже сбоку от средней линии эмбриона. У эмбрионов многих млекопитающих от опоссума до мыши экспрессия *Nodal* формирует непрерывную подковообразную область вокруг лево-правого организатора в так называемых клетках короны, в то время как у эмбриона свиньи и у всех изученных диапсид экспрессия *Nodal* индуцируется только слева от ното хорда [Kajikawa et al., 2020]. Показано, что экспрессия *Nodal* является результатом сигнализации через *Shh* у цыпленка, мыши и данио и зависит от *FGF* у шпорцевой лягушки и мыши.

В отличие от боковой области с консервативной экспрессией *Nodal* в лево-правом организаторе, центральная область у позвоночных различается. У рыб, амфибий и многих млекопитающих центральная область лево-правого организатора несёт подвижные реснички и способна создавать над собой левонаправленный поток жидкости, вызывающий активацию каскада *Nodal* на левой стороне тела. Этот механизм установления лево-правой асимметрии, вероятно, можно считать базовым для позвоночных и, более того, для всех вторичноротых, поскольку аналогичный механизм был обнаружен у морского ежа [Tisler et al., 2016]. Однако у некоторых млекопитающих (отряд Китопарнокопытные) и всех изученных диапсид центральная область лево-правого организатора лишена подвижных ресничек, и лево-правая асимметрия устанавливается за счёт клеточных перемещений в районе

гензеновского узелка или гомологичных структур [Gros et al, 2009; Shylo et al., 2023]. Интересно, что при этом маркер *Tekt2* экспрессируется в хорде цыплёнка, где, как считается, нет подвижных ресничек. Наличие безресничного лево-правого организатора ассоциировано с потерей группы из пяти генов, включая *dand5* [Szenker-Ravi et al., 2022]. Поскольку эта группа генов в эволюции позвоночных исчезала у диапсид и у китопарнокопытных независимо друг от друга, механизм безресничного установления лево-правой асимметрии не может считаться предковым для позвоночных животных, и на эту роль следует выдвинуть ресничный лево-правый организатор.

Несмотря на многочисленные свидетельства в пользу функционирования лево-правого организатора на стадии нейрулы у амфибий и наличие сходных ресничных организаторов асимметрии у большинства позвоночных, предпринимаются попытки связать установление лево-правой асимметрии у *Xenopus* с более ранними детерминантами и предположить установление асимметрии на значительно более ранних стадиях, до начала функционирования лево-правого организатора. Зачастую оказывается, что предполагаемые «ранние» детерминанты регулируют специализацию мезодермальных предшественников лево-правого организатора [Schweickert et al., 2012, Beyer et al., 2012].

Гипотеза о вовлечении форминов в раннее установление лево-правой асимметрии у *Xenopus* представляет особый интерес в свете недавно открытой ключевой роли форминов в установлении асимметрии у брюхоногих моллюсков. [Abe, Kuroda, 2019]. Предшествующее исследование химического ингибирования форминов у *Xenopus* дало противоречивые результаты, не позволяющие однозначно отнести наблюдавшийся эффект нарушения асимметрии после ингибирования форминов во время дробления к проявлению раннего определения асимметрии [Davison et al., 2016]. Опираясь на это исследование, мы провели ингибирование форминов у эмбрионов *Xenopus* при помощи того же химического ингибитора форминов SMIFH2, тщательно подыдя к выбору концентраций ингибитора и стадий для воздействия.

Эксперименты, проведённые в ходе данной работы, показали, что ингибирование активности форминов нарушает дальнейшее установление асимметрии только при сроках воздействия на стадии гастрюлы и нейрулы, то есть во время формирования, специализации и активного функционирования лево-правого организатора в крыше гастроцеля. Воздействие ингибитором форминов на этих стадиях приводило к нарушениям нормальной левосторонней экспрессии *Nodal1* и *Pitx2* и к аномалиям в асимметричном развитии висцеральных органов. Ингибирование активности форминов во время дробления не влияло на экспрессию *Nodal1* и *Pitx2* и не оказывало воздействия на асимметрию при органогенезе. Эти данные косвенно подтверждают гипотезу о том, что ключевым явлением для установления асимметрии у *Xenopus* является именно ресничный ток в крыше гастроцеля [Blum et al., 2014].

Полученные нами результаты не согласуются с ранее полученными данными, согласно которым ингибирование форминов во время дробления и на стадиях после окончания нейруляции сильнее влияет на гетеротаксию органов головастиков, чем ингибирование форминов от поздней бластулы до ранней нейрулы [Davison et al., 2016]. Одно из возможных объяснений этого противоречия заключается в разнице используемых концентраций ингибитора: мы показали, что SMIFH2 в концентрации 50 μM , которая использовалась в работе Davison et al., 2016, токсичен для развивающихся эмбрионов *X. laevis*, что согласуется с более ранними данными [Rizvi et al., 2009; Isogai et al., 2015]; таким образом, наблюдавшиеся проявления гетеротаксии могли быть обусловлены неспецифической токсичностью ингибитора для развивающихся эмбрионов. В нашем эксперименте SMIFH2 в концентрации 50 μM приводил к 100% летальности эмбрионов *X. laevis* как во время дробления, так и в начале гастрюляции. Наличие выживших эмбрионов в работе Davison et al., 2016 отчасти можно объяснить тем, что длительное хранение ингибитора форминов SMIFH2 ослабляет его эффект на эмбрионы, и для экспериментов предпочтительно

использовать свежий ингибитор (личные наблюдения автора). Также известно, что SMIFH2 подвержен внутриклеточному распаду или инактивации [Isogai et al., 2015].

Таким образом, мы полагаем, что разница в эффектах ингибирования форминов, полученная в работе Davison et al., 2016, отражает различную чувствительность эмбрионов к общетоксическому действию высоких концентраций ингибитора на разных стадиях развития, а не специфические эффекты от нарушения функционирования форминов в областях, необходимых для установления лево-правой асимметрии. Кроме того, выбранные в этой работе стадии не отражают сроков функционирования лево-правого организатора: так, авторы считают временем существования ресничного тока в крыше гастроцеля стадии 19-21, в то время как на стадии 19 ресничный ток в крыше гастроцеля начинает затухать и к стадии 21 пропадает [Schweickert et al., 2007].

Результаты нашего исследования показывают, что аномалии лево-правой асимметрии у *X. laevis* после ингибирования форминов не могут быть истолкованы в пользу предполагаемого раннего установления асимметрии во время дробления, но подтверждают гипотезу о ключевой роли лево-правого организатора в крыше гастроцеля.

Анализ морфологии лево-правого организатора и экспрессии ключевых генов в крыше гастроцеля после ингибирования форминов на гастрале-нейрале показал частичное перекрытие энтодермой области лево-правого организатора, в первую очередь его боковых сенсорных зон. Поскольку степень этого покрытия была вариабельна, и у многих эмбрионов центральная часть организатора оставалась открытой в полость гастроцеля, мы предположили два возможных последствия, исходя из функций структурных элементов лево-правого организатора. Во-первых, нарушения могли возникнуть на этапе генерирования левонаправленного тока клетками центральной области лево-правого организатора; во-вторых, могло нарушиться восприятие этого тока боковыми сенсорными зонами организатора. У большинства эмбрионов, обработанных

SM1FH2 на гастрале-нейруле, центральная область лево-правого организатора всё ещё остаётся открытой в гастроцель, и её клетки несут постериорно расположенные реснички обычной длины, то есть морфология оставшихся непокрытыми клеток центральной области не отличается от обычной. Следовательно, мы предполагаем, что эти клетки так же, как и в норме, способны генерировать левонаправленный ток жидкости в гастроцеле. Несмотря на уменьшение количества не покрытых энтодермой клеток центральной области у некоторых образцов, вероятно, даже такие сильно перекрытые участки крыши гастроцеля способны создавать ресничный ток достаточной интенсивности для восприятия его боковыми сенсорными зонами. Известно, что механизм ресничного тока у других позвоночных настолько чувствителен, что у мыши для создания эффективного ресничного тока в лево-правом организаторе достаточно всего двух ресничек [Shinohara et al., 2012], а у рыбы *Danio rerio* – тридцати [Coutelis et al., 2014]. Таким образом, более вероятное нарушение вследствие частичного перекрытия лево-правого организатора энтодермой – это нарушение восприятия ресничного тока боковыми сенсорными зонами организатора и, следовательно, нарушение дальнейшей активации каскада Nodal.

Нарушения лево-правой асимметрии, связанные с потерей боковых сенсорных зон лево-правого организатора, были отмечены в работе с подавлением сигнала FGF на стадии поздней гастралы [Schneider et al., 2019]. Однако в указанной работе подавление FGF приводило к полному исчезновению экспрессии *Nodal1* в крыше гастроцеля, что, по-видимому, было обусловлено нарушением индукции боковых сенсорных зон лево-правого организатора, в то время как в нашей работе экспрессия *Nodal1* сохранялась, как и экспрессия других маркеров боковых сенсорных зон – *Dand5* и *MyoD1*, хотя экспрессирующие их клетки были частично или полностью перекрыты энтодермой и лишены связи с поверхностью гастроцеля. Визуальное снижение уровня экспрессии *Nodal1* у ингибированных эмбрионов по сравнению с

неизменной интенсивностью экспрессии *Dand5* может объясняться подавлением самоусиления Nodal из-за перекрытия энтодермой [Nakamura et al., 2006].

Наши данные показывают, что в нормальном развитии поверхностная мезодерма, впоследствии образующая лево-правый организатор, закладывается и проходит гастрюляцию, никогда не перекрываясь энтодермой, и уходит с поверхности в глубокие слои только по окончании нейруляции и после завершения функционирования лево-правого организатора. Кроме того, анализ эмбрионов, подвергавшихся ингибированию форминов с начала гастрюляции, показал, что на стадии ранней нейрулы лево-правый организатор ещё не отличается от контроля, что можно оценить по широкому треугольнику отсутствия экспрессии энтодермального маркера *Sox17* в крыше гастроцеля и соответствующему широкому треугольнику экспрессии маркера поверхности лево-правого организатора *Tekt2*. Вместе эти данные свидетельствуют о том, что сужение лево-правого организатора к поздней нейруле не связано с изначальными нарушениями его формирования, и гастрюляция у таких эмбрионов проходит при сохраняющемся поверхностном положении материала организатора.

Вместо этого морфология и молекулярная разметка лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы (стадия 18) у эмбрионов после обработки ингибитором форминов в значительной степени напоминает состояние лево-правого организатора у контрольных эмбрионов на стадии хвостовой почки (стадия 23): боковые сенсорные зоны перекрыты энтодермой, но продолжают экспрессировать характерные для них молекулярные маркеры (в частности, *Nodal1* и *Dand5*), а энтодермальные пласты по бокам от организатора сходятся навстречу друг другу, оставляя от поверхности лево-правого организатора узкую щель вдоль средней линии эмбриона. Таким образом, мы предполагаем, что наблюдаемые нарушения асимметрии после ингибирования форминов на стадиях гастрюлы-нейрулы связаны с нарушением восприятия ресничного тока боковыми сенсорными зонами лево-правого организатора, которые преждевременно теряют связь с поверхностью гастроцеля, вероятно, до того, как они успеют воспринять сигнал тока жидкости и активировать каскад Nodal.

Детальное изучение механизма воздействия ингибитора форминов SMIFH2 на развитие лево-правого организатора выходит за рамки данного исследования. Известно, что SMIFH2 ингибирует белки суперсемейства миозинов, однако в нашей работе планарная клеточная полярность в клетках гипохорда не была затронута, судя по нормальной длине ресничек и их положению на клетках на открытых участках лево-правого организатора. Таким образом, подобранная концентрация, по-видимому, позволила избежать побочного воздействия на миозины. Интересно, что сеть кортикального актина в клетках лево-правого организатора не демонстрировала существенных отличий от контрольных образцов, согласно иммунофлуоресцентному анализу. Было показано, что обработка культуры раковых клеток человека ингибитором форминов SMIFH2 ускоряет их миграцию [Isogai et al., 2015]. Возможно, преждевременное перекрытие лево-правого организатора энтодермой отчасти связано с ускорением миграции клеток.

Заключение

Полученные в работе данные углубляют научное понимание развития лево-правого организатора у *Xenopus laevis*. Было продемонстрировано, что поверхностная мезодерма будущего лево-правого организатора проходит гастрюляцию, не теряя поверхностного положения, боковые сенсорные зоны претерпевают позднюю специализацию в начале нейруляции, и после окончания нейруляции материал лево-правого организатора уходит в глубокие слои мезодермы, становясь частью хорды и сомитов. На основании полученных данных об ингибировании форминов можно утверждать, что установление асимметрии у амфибий происходит с участием лево-правого организатора, а ингибирование форминов приводит к морфологическим нарушениям организатора и дальнейшим проявлениям нарушений асимметрии тела. Таким образом, результаты работы могут быть применены в дальнейших исследованиях лево-правого организатора амфибий, а также при сравнительных исследованиях способов установления асимметрии у животных.

Выводы

1. Впервые охарактеризована временная и пространственная динамика экспрессии комплекса маркеров презумптивного лево-правого организатора *X. laevis* на стадиях от поздней бластулы до хвостовой почки. Показано, что данная область сохраняет поверхностное положение от поздней бластулы до конца нейруляции.

2. Боковые сенсорные зоны лево-правого организатора морфологически отличимы от центральной зоны с начала нейруляции, что совпадает с началом экспрессии в них дополнительных маркеров *Dand5*, *Nodal1* и *MyoD1*.

3. Критическим периодом для установления лево-правой асимметрии с участием форминов у *X. laevis* являются стадии гастролы и нейрулы.

4. Ингибирование активности форминов на стадиях гастролы и нейрулы приводит к преждевременному закрытию лево-правого организатора и последующему нарушению инициации каскада *Nodal* на левой стороне тела.

Список литературы

1. Петри Н. Д. Эволюционное разнообразие механизмов установления лево-правой асимметрии у животных //Онтогенез. – 2020. – Т. 51. – №. 2. – С. 96-112. [Petri N. D. Evolutionary Diversity of the Mechanisms Providing the Establishment of Left-Right Asymmetry in Metazoans //Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Т. 51. – С. 84-98].
2. Abe M., Kuroda R. The development of CRISPR for a mollusc establishes the form in *Lsdia1* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling //Development. – 2019. – Т. 146. – №. 9. – С. dev175976.
3. Adams D. S., Robinson K. R., Fukumoto T., Yuan S., Albertson R. C., Yelick P., Kuo L., McSweeney M., Levin M. Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. – 2006.
4. Agius E., Oelgeschläger M., Wessely O., Kemp C., Robertis E. D. Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus* //Development. – 2000. – Т. 127. – №. 6. – С. 1173-1183.
5. Antic D., Stubbs J. L., Suyama K., Kintner C., Scott M. P., Axelrod J. D. Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis //PloS one. – 2010. – Т. 5. – №. 2. – С. e8999.
6. Bartolini F., Gundersen G. G. Formins and microtubules //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2010. – Т. 1803. – №. 2. – С. 164-173.
7. Beyer T., Danilchik M. V., Thumberger T., Vick P., Tisler M., Schneider I., Bogusch S., Andre P., Ulmer B., Walentek P., Niesler B., Blum M., Schweickert A. Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus* //Current Biology. – 2012. – Т. 22. – №. 1. – С. 33-39.
8. Blum M., Andre P., Muders K., Schweicker, A., Fischer A., Bitzer E., Bogusch S., Beyer T., van Straaten H. W. M., Viebahn C. Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo //Differentiation. – 2007. – Т. 75. – №. 2. – С. 133-146.

9. Blum M., Ott T. Animal left–right asymmetry //Current Biology. – 2018. – T. 28. – №. 7. – C. R301-R304.
10. Blum M., Schweickert A., Vick P., Wright C. V., Danilchik M. V. Symmetry breakage in the vertebrate embryo: when does it happen and how does it work? //Developmental biology. – 2014. – T. 393. – №. 1. – C. 109-123.
11. Blum M., Weber T., Beyer T., Vick P. Evolution of leftward flow //Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2009. – T. 20. – №. 4. – C. 464-471.
12. Cartwright J. H. E., Piro O., Tuval I. Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – T. 101. – №. 19. – C. 7234-7239.
13. Chalkia D., Nikolaidis N., Makalowski W., Klein J., Nei M. Origins and evolution of the formin multigene family that is involved in the formation of actin filaments //Molecular biology and evolution. – 2008. – T. 25. – №. 12. – C. 2717-2733.
14. Cheng A. M. S., Thisse B., Thisse C., Wright C. V E. The lefty-related factor Xatv acts as a feedback inhibitor of nodal signaling in mesoderm induction and LR axis development in xenopus //Development. – 2000. – T. 127. – №. 5. – C. 1049-1061.
15. Coutelis J. B., González-Morales N., Géminard C., Noselli S. Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa //EMBO reports. – 2014. – T. 15. – №. 9. – C. 926-937.
16. Davis A., Amin N. M., Johnson C., Bagley K., Ghashghaei H. T., Nascone-Yoder N. Stomach curvature is generated by left-right asymmetric gut morphogenesis //Development. – 2017. – T. 144. – №. 8. – C. 1477-1483.
17. Davison A, McDowell G. S., Holden J. M., Johnson H. F., Koutsovoulos G. D., Liu M. M., Hulpiou P., Van Roy F., Wade C. M., Banerjee R., Yang F., Chiba S., Davey J. W., Jackson D. J., Levin M., Blaxter M. L. Formin is associated with left-right asymmetry in the pond snail and the frog //Current Biology. – 2016. – T. 26. – №. 5. – C. 654-660.
18. Delling M., Indzhykulian A. A., Liu X., Li Y., Xie T., Corey D. P., Clapham D. Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors //Nature. – 2016. – T. 531. – №. 7596. – C. 656-660.

19. Duboc V., Röttinger E., Lapraz F., Besnardeau L., Lepage T. Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side //Developmental cell. – 2005. – T. 9. – №. 1. – C. 147-158.
20. Essner J. J., Amack J. D., Nyholm M. K., Harris E. B., Yost H. J. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. – 2005.
21. Esteban C. R., Capdevila J., Economides A. N., Pascual J., Ortiz Á., Belmonte J. C. I. The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry //Nature. – 1999. – T. 401. – №. 6750. – C. 243-251.
22. Field S., Riley K. L., Grimes D. T., Hilton H., Simon M., Powles-Glover N., Siggers P., Bogani D., Greenfield A., Norris D. P. Pkd111 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2 //Development. – 2011. – T. 138. – №. 6. – C. 1131-1142.
23. González-Morales N., Géminard C., Lebreton G., Cerezo D., Coutelis J. B., Noselli S. The atypical cadherin dachsous controls left-right asymmetry in Drosophila //Developmental Cell. – 2015. – T. 33. – №. 6. – C. 675-689.
24. Gros J., Feistel K., Viebahn C., Blum M., Tabin C. J. Cell movements at Hensen's node establish left/right asymmetric gene expression in the chick //Science. – 2009. – T. 324. – №. 5929. – C. 941-944.
25. Hojo M., Takashima S., Kobayashi D., Sumeragi A., Shimada A., Tsukahara T., Yokoi H., Narita T., Jindo T., Kage T., Kitagawa T., Kimura T., Sekimizu K., Miyake A., Setiamarga D., Murakami R., Tsuda S., Ooki S., Kakihara K., Naruse K., Takeda H. Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle //Development, growth & differentiation. – 2007. – T. 49. – №. 5. – C. 395-405.
26. Innocenti M. Investigating Mammalian Formins with SMIFH2 Fifteen Years in: Novel Targets and Unexpected Biology //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – T. 24. – №. 10. – C. 9058.
27. Isogai T., Innocenti M. New nuclear and perinuclear functions of formins //Biochemical Society Transactions. – 2016. – T. 44. – №. 6. – C. 1701-1708.

28. Isogai T., Van Der Kammen R., Innocenti M. SMIFH2 has effects on Formins and p53 that perturb the cell cytoskeleton //Scientific reports. – 2015. – T. 5. – №. 1. – C. 9802.
29. Kajikawa E., Horo U., Ide T., Mizuno K., Minegishi K., Hara Y., Ikawa Y., Nishimura H., Uchikawa M., Kiyonari H., Kuraku S., Hamada H. Nodal paralogues underlie distinct mechanisms for visceral left–right asymmetry in reptiles and mammals //Nature ecology & evolution. – 2020. – T. 4. – №. 2. – C. 261-269.
30. Kolker S. J., Tajchman U., Weeks D. L. Confocal imaging of early heart development in *Xenopus laevis* //Developmental biology. – 2000. – T. 218. – №. 1. – C. 64-73.
31. Kurita Y., Wada H. Evidence that gastropod torsion is driven by asymmetric cell proliferation activated by TGF- β signalling //Biology letters. – 2011. – T. 7. – №. 5. – C. 759-762.
32. Kuroda R., Fujikura K., Abe M., Hosoiri Y., Asakawa S., Shimizu M., Umeda S., Ichikawa F., Takahashi H. Diaphanous gene mutation affects spiral cleavage and chirality in snails //Scientific Reports. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 34809.
33. Lee J. D., Anderson K. V. Morphogenesis of the node and notochord: the cellular basis for the establishment and maintenance of left–right asymmetry in the mouse //Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. – 2008. – T. 237. – №. 12. – C. 3464-3476.
34. Levin M., Johnson R. L., Sterna C. D., Kuehn M., Tabin C. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis //Cell. – 1995. – T. 82. – №. 5. – C. 803-814.
35. Lin C. Y., Tsai M. Y., Liu Y. H., Lu Y. F., Chen Y. C., Lai Y. R., Liao H.C., Lien H.W., Yang C.H., Huang C.J., Hwang S. P. L. Klf8 regulates left-right asymmetric patterning through modulation of Kupffer’s vesicle morphogenesis and spaw expression //Journal of Biomedical Science. – 2017. – T. 24. – C. 1-14.
36. Logan M., Pagán-Westphal S. M., Smith D. M., Paganessi L., Tabin C. J. The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals //Cell. – 1998. – T. 94. – №. 3. – C. 307-317.

37. Long S., Ahmad N., Rebagliati M. The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. – 2003.
38. Maerker M., Getwan M., Dowdle M. E., McSheene J. C., Gonzalez V., Pelliccia J. L., Hamilton D. S., Yartseva V., Vejnar C., Tingler M., Minegishi K., Vick P., Giraldez A. J., Hamada H., Burdine R. D., Sheets M. D., Blum M., Schweickert A. *Bicc1* and *Dicer* regulate left-right patterning through post-transcriptional control of the Nodal inhibitor *Dand5* // *Nature communications*. – 2021. – T. 12. – №. 1. – C. 5482.
39. Mahaffey J. P., Grego-Bessa J., Liem Jr K. F., Anderson K. V. *Cofilin* and *Vangl2* cooperate in the initiation of planar cell polarity in the mouse embryo // *Development*. – 2013. – T. 140. – №. 6. – C. 1262-1271.
40. McGrath J., Somlo S., Makova S., Tian X., Brueckner M. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse // *Cell*. – 2003. – T. 114. – №. 1. – C. 61-73.
41. Meno C., Shimono A., Saijoh Y., Yashiro K., Mochida K., Ohishi S., Noji S., Kondoh H., Hamada H. *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal* // *Cell*. – 1998. – T. 94. – №. 3. – C. 287-297.
42. Molina M. D., de Crozé N., Haillet E., Lepage T. Nodal: master and commander of the dorsal–ventral and left–right axes in the sea urchin embryo // *Current opinion in genetics & development*. – 2013. – T. 23. – №. 4. – C. 445-453.
43. Morokuma J., Ueno M., Kawanishi H., Saiga H., Nishida H. *HrNodal*, the ascidian nodal-related gene, is expressed in the left side of the epidermis, and lies upstream of *HrPitx* // *Development genes and evolution*. – 2002. – T. 212. – C. 439-446.
44. Naganathan S. R., Fürthauer S., Nishikawa M., Jülicher F., Grill S. W. Active torque generation by the actomyosin cell cortex drives left–right symmetry breaking // *elife*. – 2014. – T. 3. – C. e04165.
45. Nakamura T., Mine N., Nakaguchi E., Mochizuki A., Yamamoto M., Yashiro K., Meno C., Hamada, H. Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system // *Developmental cell*. – 2006. – T. 11. – №. 4. – C. 495-504.
46. Nieuwkoop P. D., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis*. – 1994. – C. 268

47. Nishimura Y., Shi S., Zhang F., Liu R., Takagi Y., Bershadsky A. D., Viasnoff V., Sellers J. R. The formin inhibitor SMIFH2 inhibits members of the myosin superfamily //Journal of cell science. – 2021. – T. 134. – №. 8. – C. jcs253708.
48. Nonaka S., Shiratori H., Saijoh Y., Hamada H. Determination of left–right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow //Nature. – 2002. – T. 418. – №. 6893. – C. 96-99.
49. Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y., Takeda S., Harada A., Kanai Y., Kido M., Hirokawa N. Randomization of left–right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein //Cell. – 1998. – T. 95. – №. 6. – C. 829-837.
50. Nonaka S., Yoshida S., Watanabe D., Ikeuchi S., Goto T., Marshall W. F., Hamada H. De novo formation of left–right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia //PLoS biology. – 2005. – T. 3. – №. 8. – C. e268.
51. Okada Y., Nonaka S., Tanaka Y., Saijoh Y., Hamada H., Hirokawa N. Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice //Molecular cell. – 1999. – T. 4. – №. 4. – C. 459-468.
52. Oki S., Hashimoto R., Okui Y., Shen M. M., Mekada E., Otani H., Saijoh Y., Hamada H. Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo. – 2007.
53. Petri N., Nordbrink R., Tsikolia N., Kremnyov S. Abnormal left-right organizer and laterality defects in *Xenopus* embryos after formin inhibitor SMIFH2 treatment //Plos one. – 2022. – T. 17. – №. 11. – C. e0275164.
54. Petri N., Vetrova A., Tsikolia N., Kremnyov S. Molecular anatomy of emerging *Xenopus* left–right organizer at successive developmental stages //Developmental Dynamics. – 2024.
55. Rizvi S. A., Neidt E. M., Cui J., Feiger Z., Skau C. T., Gardel M. L., Kozmin S. A., Kovar D. R. Identification and characterization of a small molecule inhibitor of formin-mediated actin assembly //Chemistry & biology. – 2009. – T. 16. – №. 11. – C. 1158-1168.

56. Ryan A. K., Blumberg B., Rodriguez-Esteban C., Yonei-Tamura S., Tamura K., Tsukui T., de la Peña J., Sabbagh W., Greenwald J., Choe S., Norris D. P., Robertson E. J., Evans R. M., Rosenfeld M. G., Belmonte J. C. I. Pitx2 determines left–right asymmetry of internal organs in vertebrates //Nature. – 1998. – T. 394. – №. 6693. – C. 545-551.
57. Saijoh Y., Oki S., Ohishi S., Hamada H. Left–right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node //Developmental biology. – 2003. – T. 256. – №. 1. – C. 161-173.
58. Schneider I., Kreis J., Schweickert A., Blum M., Vick P. A dual function of FGF signaling in Xenopus left-right axis formation //Development. – 2019. – T. 146. – №. 9. – C. dev173575.
59. Schröder S. S., Tsikolia N., Weizbauer A., Hue I., Viebahn C. Paraxial nodal expression reveals a novel conserved structure of the left-right organizer in four mammalian species //Cells Tissues Organs. – 2016. – T. 201. – №. 2. – C. 77-87.
60. Schweickert A., Vick P., Getwan M., Weber T., Schneider I., Eberhardt M., Beyer T., Pachur A., Blum M. The nodal inhibitor Coco is a critical target of leftward flow in Xenopus //Current Biology. – 2010. – T. 20. – №. 8. – C. 738-743.
61. Schweickert A., Weber T., Beyer T., Vick P., Bogusch S., Feistel K., Blum M. Cilia-driven leftward flow determines laterality in Xenopus //Current biology. – 2007. – T. 17. – №. 1. – C. 60-66.
62. Shibasaki Y., Shimizu M., Kuroda R. Body handedness is directed by genetically determined cytoskeletal dynamics in the early embryo //Current Biology. – 2004. – T. 14. – №. 16. – C. 1462-1467.
63. Shinohara K., Kawasumi A., Takamatsu A., Yoshida S., Botilde Y., Motoyama N., Reith W., Durand B., Shiratori H., Hamada H. Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left–right symmetry in the mouse embryo //Nature communications. – 2012. – T. 3. – №. 1. – C. 622.
64. Shiratori H., Hamada H. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. – 2006.

65. Shook D. R., Majer C., Keller R. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* // *Developmental biology*. – 2004. – T. 270. – №. 1. – C. 163-185.
66. Shylo N. A., Smith S. E., Price A. J., Guo F., McClain M., Trainor P. A. Morphological changes and two Nodal paralogs drive left-right asymmetry in the squamate veiled chameleon (*C. calytratus*) // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2023. – T. 11. – C. 1132166.
67. Stubbs J. L., Oishi I., Izpisua Belmonte J. C., Kintner C. The forkhead protein *Foxj1* specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos // *Nature genetics*. – 2008. – T. 40. – №. 12. – C. 1454-1460.
68. Su Y. H. Telling left from right: Left-right asymmetric controls in sea urchins // *Genesis*. – 2014. – T. 52. – №. 3. – C. 269-278.
69. Sulik K., Dehart D. B., Inagaki T., Carson J. L., Vrablic T., Gesteland K., Schoenwolf G. C. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate // *Developmental Dynamics*. – 1994. – T. 201. – №. 3. – C. 260-278.
70. Supp D. M., Witte D. P., Potter S. S., Brueckner M. Mutation of an axonemal dynein affects left–right asymmetry in *inversus viscerum* mice // *Nature*. – 1997. – T. 389. – №. 6654. – C. 963-966.
71. Szenker-Ravi E., Ott T., Khatoo M., Moreau de Bellaing A., Goh W. X., Chong Y. L., Beckers A., Kannesan D., Louvel G., Anujan P., Ravi V., Bonnard C., Moutton S., Schoen P., Fradin M., Colin E., Megarbane A., Daou L., Chehab G., Di Filippo S., Rooryck C., Deleuze J. F., Boland A., Arribard N., Eker R., Tohari S., Ng A. Y. J., Rio M., Lim C. T., Eisenhaber B., Eisenhaber F., Venkatesh B., Amiel J., Crollius H. R., Gordon C. T., Gossler A., Roy S., Attie-Bitach T., Blum M., Bouvagnet P., Reversade B. Discovery of a genetic module essential for assigning left–right asymmetry in humans and ancestral vertebrates // *Nature Genetics*. – 2022. – T. 54. – №. 1. – C. 62-72.
72. Tanaka H., Iguchi N., Toyama Y., Kitamura K., Takahashi T., Kaseda K., Maekawa M., Nishimune Y. Mice deficient in the axonemal protein *Tektin-t* exhibit male infertility and immotile-cilium syndrome due to impaired inner arm dynein function // *Molecular and cellular biology*. – 2004. – T. 24. – №. 18. – C. 7958-7964.

73. Tanaka Y., Okada Y., Hirokawa N. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left–right determination //Nature. – 2005. – T. 435. – №. 7039. – C. 172-177.
74. Tanaka C., Sakuma R., Nakamura T., Hamada H., Saijoh Y. Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1 //Genes & development. – 2007. – T. 21. – №. 24. – C. 3272-3282.
75. Tanegashima K., Yokota C., Takahashi S., Asashima M. Expression cloning of Xantivin, a Xenopus lefty/antivin-related gene, involved in the regulation of activin signaling during mesoderm induction //Mechanisms of Development. – 2000. – T. 99. – №. 1-2. – C. 3-14.
76. Tingler M., Kurz S., Maerker M., Ott T., Fuhl F., Schweickert A., LeBlanc-Straceski J. M., Noselli S., Blum M. A conserved role of the unconventional myosin 1d in laterality determination //Current Biology. – 2018. – T. 28. – №. 5. – C. 810-816. e3.
77. Tisler M., Wetzel F., Mantino S., Kremnyov S., Thumberger T., Schweickert A., Blum M., Vick P. Cilia are required for asymmetric nodal induction in the sea urchin embryo //BMC developmental biology. – 2016. – T. 16. – C. 1-12.
78. Tsikolia N., Schröder S., Schwartz P., Viebahn C. Paraxial left-sided nodal expression and the start of left–right patterning in the early chick embryo //Differentiation. – 2012. – T. 84. – №. 5. – C. 380-391.
79. Vick P., Kreis J., Schneider I., Tingler M., Getwan M., Thumberger T., Beyer T., Schweickert A., Blum M. An early function of polycystin-2 for left-right organizer induction in Xenopus //iScience. – 2018. – T. 2. – C. 76-85.
80. Vonica A., Brivanlou A. H. The left–right axis is regulated by the interplay of Coco, Xnr1 and derriere in Xenopus embryos //Developmental biology. – 2007. – T. 303. – №. 1. – C. 281-294.
81. Walentek P., Beyer T., Thumberger T., Schweickert A., Blum M. ATP4a is required for Wnt-dependent Foxj1 expression and leftward flow in Xenopus left-right development //Cell reports. – 2012. – T. 1. – №. 5. – C. 516-527.

82. Watanabe H., Schmidt H. A., Kuhn A., Höger S. K., Kocagöz Y., Laumann-Lipp N., Özbek S., Holstein T. W. Nodal signalling determines biradial asymmetry in Hydra //Nature. – 2014. – T. 515. – №. 7525. – C. 112-115.
83. Yoshida S., Shiratori H., Kuo I. Y., Kawasumi A., Shinohara K., Nonaka S., Asai Y., Sasaki G., Belo J. A., Sasaki H., Nakai J., Dworniczak B., Ehrlich B. E., Pennekamp P., Hamada H. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2 //Science. – 2012. – T. 338. – №. 6104. – C. 226-231.
84. Yu J. K., Holland L. Z., Holland N. D. An amphioxus nodal gene (AmphiNodal) with early symmetrical expression in the organizer and mesoderm and later asymmetrical expression associated with left-right axis formation //Evolution & development. – 2002. – T. 4. – №. 6. – C. 418-425.
85. Yuan S., Zhao L., Brueckner M., Sun Z. Intraciliary calcium oscillations initiate vertebrate left-right asymmetry //Current biology. – 2015. – T. 25. – №. 5. – C. 556-567.

Благодарности

Я благодарю моего научного руководителя Станислава Валерьевича Кремнёва, лабораторию биофизики развития за предоставленную возможность работы.

Благодарю моих коллег по лаборатории, особенно Н. Н. Лучинскую, Д. В. Бредова и А. А. Ветрову, за помощь в экспериментах и за дополнительные объяснения методик.

Благодарю Ирину Жегалову за консультацию по методам статистики.

Выражаю благодарность профессору Филиппу Вику за любезно предоставленную плазмиду с геном *foxJ1*.

Сердечно благодарю мою семью и друзей за неоценимую поддержку на всём пути обучения, работы и написания диссертации.