

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель – **Кремнёв Станислав Валерьевич**, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты – **Исаева Валерия Васильевна**, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии и экологии морских беспозвоночных ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН»

Вершинин Владимир Леонидович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией функциональной экологии наземных животных ФГБУН «Институт экологии растений и животных УрО РАН»

Ерошкин Федор Михайлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»

Защита диссертации состоится 17 декабря 2024 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: tlipina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М. В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3249>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т. В. Липина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 зоны. Клетки центральной зоны несут вращающиеся реснички, создающие в гастроцеле ток жидкости справа налево. Клетки боковых зон 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 области 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 *X. 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.

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

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Организмы. В работе использовали зародышей шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*, Daudin), полученных методом гормональной стимуляции животных. Зародышей и головастиков содержали в 0,1x MMR.

Ингибирование форминов производили путём инкубации эмбрионов в растворе ингибитора форминов SMIFH2 в 0,1x MMR. В ходе эксперимента использовали рабочие концентрации 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M. На контрольные эмбрионы действовали 0,05% раствором DMSO в 0,1x MMR. Зародыши инкубировали на стадиях дробления (2-6,5) или гастрюлы-нейрулы (10-18), после чего зародыши переносили обратно в 0,1x MMR.

Сканирующая электронная микроскопия. Зародышей на стадиях 10,5-18 фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в 0,1 М какодилатном буфере, трижды отмывали в 0,1 М какодилатном буфере, вырезали участок крыши гастроцеля вблизи бластопора – дорсальный эксплант. Часть образцов раскалывали в поперечной плоскости. Полученные образцы дополнительно фиксировали 1% раствором OsO₄ на 0,1 М какодилатном буфере в течение 45 мин, трижды минут отмывали в 0,1 М какодилатном буфере, обезвоживали в этаноле восходящей концентрации и 100% ацетоне и высушивали в критической точке. Образцы напыляли в вакууме Au и Pt и просматривали с использованием сканирующего электронного микроскопа CamScan S-2.

Иммунофлуоресцентный анализ. Эмбрионы на стадии 18 фиксировали в растворе 4% формальдегида на PBS, вырезали дорсальные экспланты, образцы отмывали от фиксатора в PBS. Для визуализации микротрубочек проводили окрашивание первичными антителами против ацетилированного α -тубулина (12 ч, +4 °C) и вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом DyeLight488 (12 ч, +4 °C). Образцы отмывали от излишков антител и окрашивали на F-актин при помощи TRITC-фаллоидина (45 мин в темноте), после чего переводили в глицерин. Регистрацию флуоресценции проводили на микроскопе Olympus FluoView FV10i.

Синтез антисмысловых РНК-зондов проводили в несколько этапов. Тотальную РНК *X. laevis*, выделенную при помощи реагента Extract RNA, использовали для синтеза дц-кДНК при помощи коммерческого набора Mint kit согласно протоколу производителя. Целевой фрагмент исследуемого гена получали путём амплификации с дц-кДНК с использованием коммерческого набора Encyclo PCR kit и специфичных праймеров. Продукт ПЦР очищали при помощи осаждения изопропанолом и ацетатом натрия и анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Очищенный амплифицированный фрагмент целевого гена лигировали в рAL2-T вектор с помощью набора Quick-TA kit согласно протоколу производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Отбор клонов, несущих рекомбинантные плазмиды, проводили путём скрининга бактериальных колоний методом ПЦР с использованием праймеров M13. Отобранные клоны, несущие рекомбинантные плазмиды, использовали для получения ночной культуры бактерий. Плазмидную ДНК выделяли из клеток с помощью набора Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System согласно протоколу производителя. Очищенные плазмиды секвенировали в компании «Евроген». С полученной рекомбинантной плазмиды с использованием смеси праймеров T7 и Sp6 амплифицировали ДНК-матрицу для синтеза антисмыслового РНК-зонда, меченного дигоксигенином. Транскрипцию *in vitro* проводили с помощью РНК-полимеразы T7 и Sp6 в зависимости от направления вставки. Для удаления матрицы ДНК после завершения транскрипции в реакционную смесь вносили ДНКазу, продукт транскрипции очищали методом переосаждения с хлоридом лития. 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.

Гибридизацию *in situ* проводили согласно разработанному в лаборатории протоколу. Зародышей на стадиях 9-28 фиксировали в растворе 4% формальдегида на PBS и переводили в 96% этанол до проведения реакции,

для эмбрионов на стадиях 11-23 вырезали дорсальные экспланты. Процедура гибридизации занимала около 5 дней. Образцы регидратировали, обрабатывали протеиназой К (15 мин для стадии 28, 10 мин для остальных образцов), ТЕА и растворами 0,25% и 0,5% уксусного ангидрида на ТЕА по 5 мин на раствор. Образцы дофиксировали в 4% параформальдегиде на РТw в течение 30 мин, отмывали в РТw четыре раза по 5 мин и переводили в гибридизационный буфер (12 ч, +60 °С). Гибридизация проводилась в буфере, содержащем 0,5 мкг/мл антисмыслового РНК-зонда, меченного дигоксигенином (12 ч, +60 °С). После гибридизации образцы последовательно отмывали при +60 °С в гибридизационном буфере 1 ч, в 2х SSC трижды по 20 мин, в 0,2х SSC дважды по 30 мин, охлаждали до комнатной температуры, промывали в буфере МАВ дважды по 15 мин, в буфере МАВ с 1% блокирующего реагента в течение 2,5 ч. Далее образцы инкубировали в новой порции этого раствора с антителами к дигоксигенину, конъюгированные с щелочной фосфатазой (1:1000, 12 ч, +4 °С). Образцы отмывали от излишков антител в МАВ десять раз по 1 ч, 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. Образцы повторно фиксировали в растворе 4% формальдегида на PBS, переводили в 96% этанол. Препараты просматривали и фотографировали на стереомикроскопе Olympus SZX9, снабжённом камерой TourCam E3CMOS.

Световая микроскопия. Образцы, полученные в результате гибридизации *in situ*, дегидратировали в 100% этаноле и в ацетоне, переводили в смесь ацетона и эпоксидной смолы SPI-Pon 812 и заключали в эпоксидную смолу SPI-Pon 812. Гистологические срезы толщиной 4 мкм получали при помощи ультратома Tesla, некоторые срезы дополнительно окрашивали 0,1% раствором толуидинового синего. Полученные срезы фотографировали на микроскопе Olympus CX41, снабжённом камерой TourCam UNCCD05000KPA.

Морфометрические измерения выполняли в программе ImageJ: измеряли длину ресничек на клетках лево-правого организатора на фотографиях, полученных методом СЭМ.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы R [R Development Core Team, 2004]. Воздействие ингибитора форминов на экспрессию *Nodal1* и *Pitx2* на стадии 28 и на асимметрию висцеральных органов головастиков 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

В ходе этого этапа работы было подробно описано нормальное развитие лево-правого организатора *X. laevis* от закладки его материала на стадии поздней бластулы до исчезновения зрелого лево-правого организатора с поверхности гастроцеля, методами гибридизации *in situ* и СЭМ.

Поверхностная мезодерма, включающая материал будущего лево-правого организатора, закладывается перед гастрულიей на поверхности будущей дорсальной губы бластопора и экспрессирует маркер ресничных клеток *Foxj1*, а с началом гастрულიи - ресничный маркер *Tekt2*. Вегетативнее этих клеток находятся области экспрессии *Sox17* и *Nodal1*, маркирующие энтодерму. С началом гастрულიи область экспрессии *Sox17* и *Nodal1* вворачивается первой и слагает передний край крыши гастроцеля, а вслед за ней в составе общего поверхностного пласта вворачиваются клетки будущего лево-правого организатора (рисунок 1).

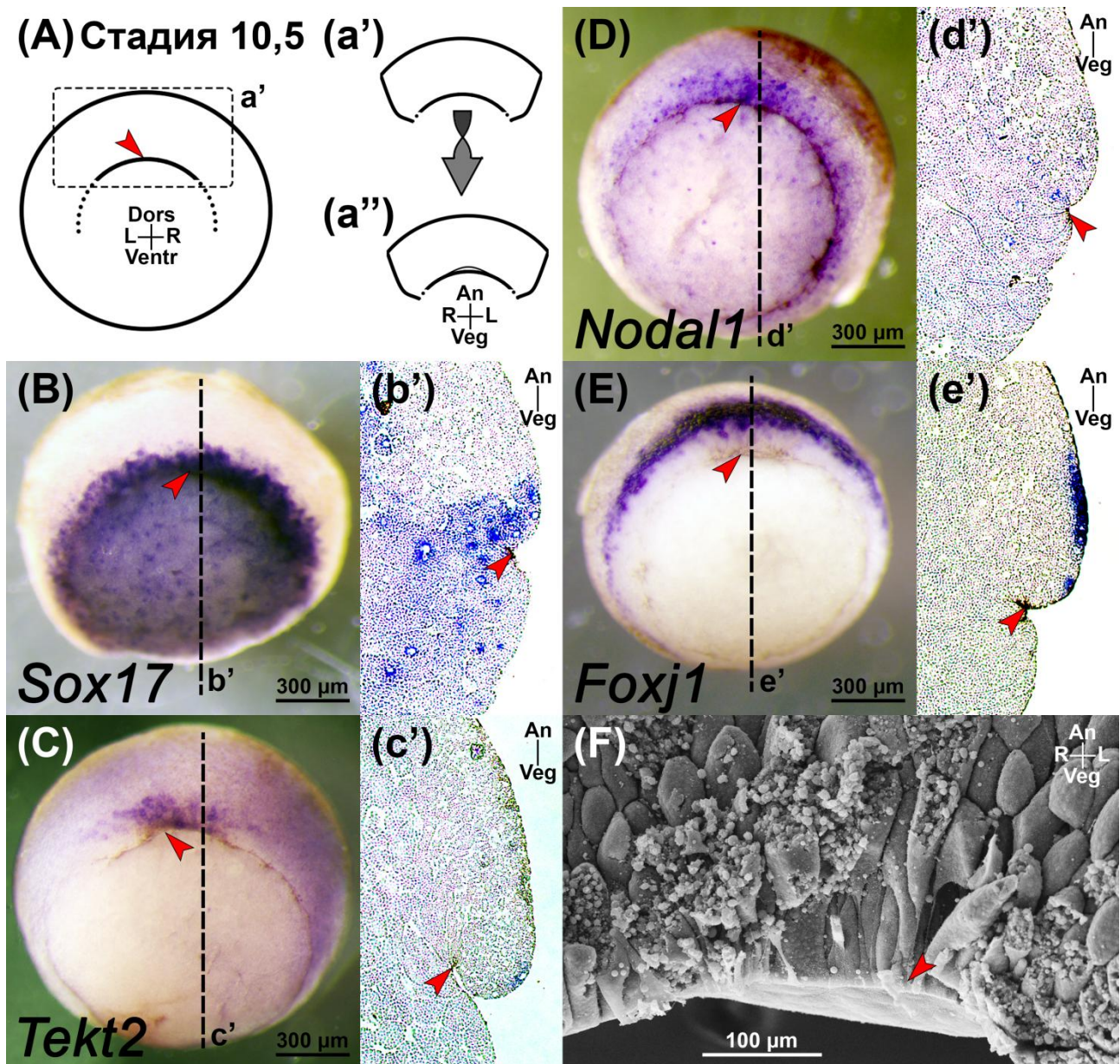


Рисунок 1. Молекулярная разметка ранней гастролы (стадия 10,5).

(A) Схема ранней гастролы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной стороны. (a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B-e') Паттерны экспрессии *Sox17*, *Tekt2*, *Nodal1*, *Foxj1*; общий вид и сагиттальные срезы через дорсальную губу бластопора. (F) Формирующийся гастроцель, вид с вентральной стороны, СЭМ. Красные стрелки указывают на колбовидные клетки, формирующие бластопор.

По мере прохождения гастрюляции энтодермальные клетки, экспрессирующие *Sox17*, выстилают всю поверхность гастроцеля, кроме будущей области лево-правового организатора, а экспрессия *Nodal1* в энтодерме исчезает. Область экспрессии *Foxj1* и *Tekt2* остаётся на поверхности крыши гастроцеля вблизи бластопора и приобретает треугольную форму, характерную для лево-правового организатора. Маркер презумптивной мезодермы сомитов

MyoD1 экспрессируется в течение всей гастрюляции в глубоких слоях клеток крыши гастроцеля, но не на поверхности. В течение всей гастрюляции энтодермальные клетки и клетки будущего лево-правого организатора составляют единый нерасчленённый поверхностный пласт и отделены от подлежащих клеток презумптивной хорды и сомитов (рисунок 2).

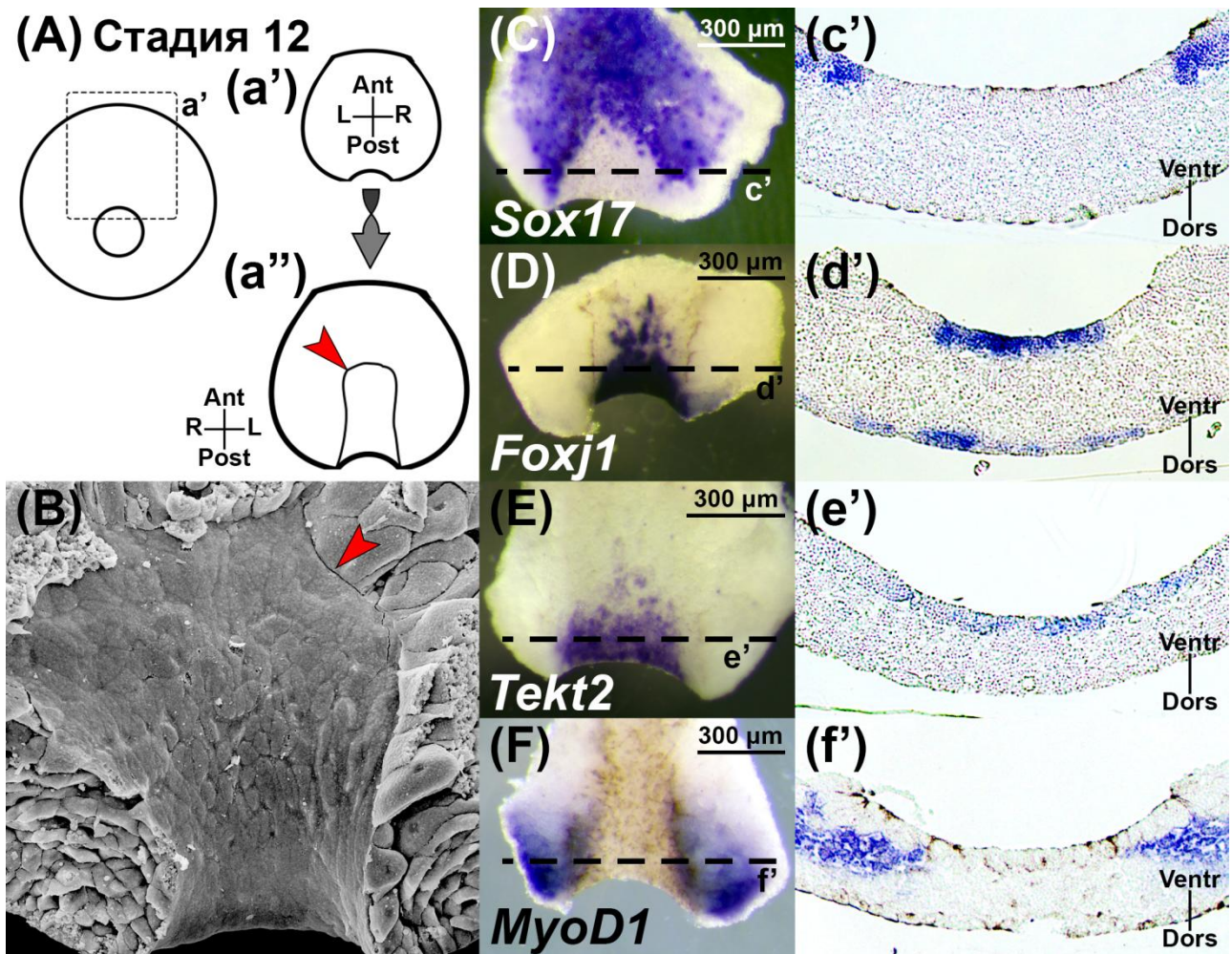


Рисунок 2. Молекулярная разметка постериорной области крыши гастроцеля на стадии поздней гастрюлы.

(A) Схема поздней гастрюлы. (a'-a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной (a') и вентральной (a'') стороны. (B) Формирующаяся крыша гастроцеля, СЭМ. (C-f') Паттерны экспрессии *Sox17*, *Foxj1*, *Tekt2*, *MyoD1*; общий вид и поперечные срезы через крышу гастроцеля.

Красные стрелки указывают на колбовидные клетки, маркирующие передний край гастроцеля.

В начале нейруляции клетки энтодермы и клетки лево-правого организатора начинают отграничиваться друг от друга в составе

поверхностного пласта, а в на поверхности самого лево-правого организатора впервые просматриваются центральная зона и две боковых. Это совпадает с началом молекулярной специализации боковых зон лево-правого организатора: клетки поверхностного слоя, расположенные над глубокими слоями презумптивной мезодермы сомитов, впервые начинают экспрессировать маркер презумптивной мезодермы сомитов *MyoD1*, а также специфические маркеры этих зон *Nodal1* и его антагонист *Dand5*. Позднее появление экспрессии этих генов в боковых зонах лево-правого организатора указывает на индуктивное взаимодействие, необходимое для спецификации этих зон (рисунок 3).

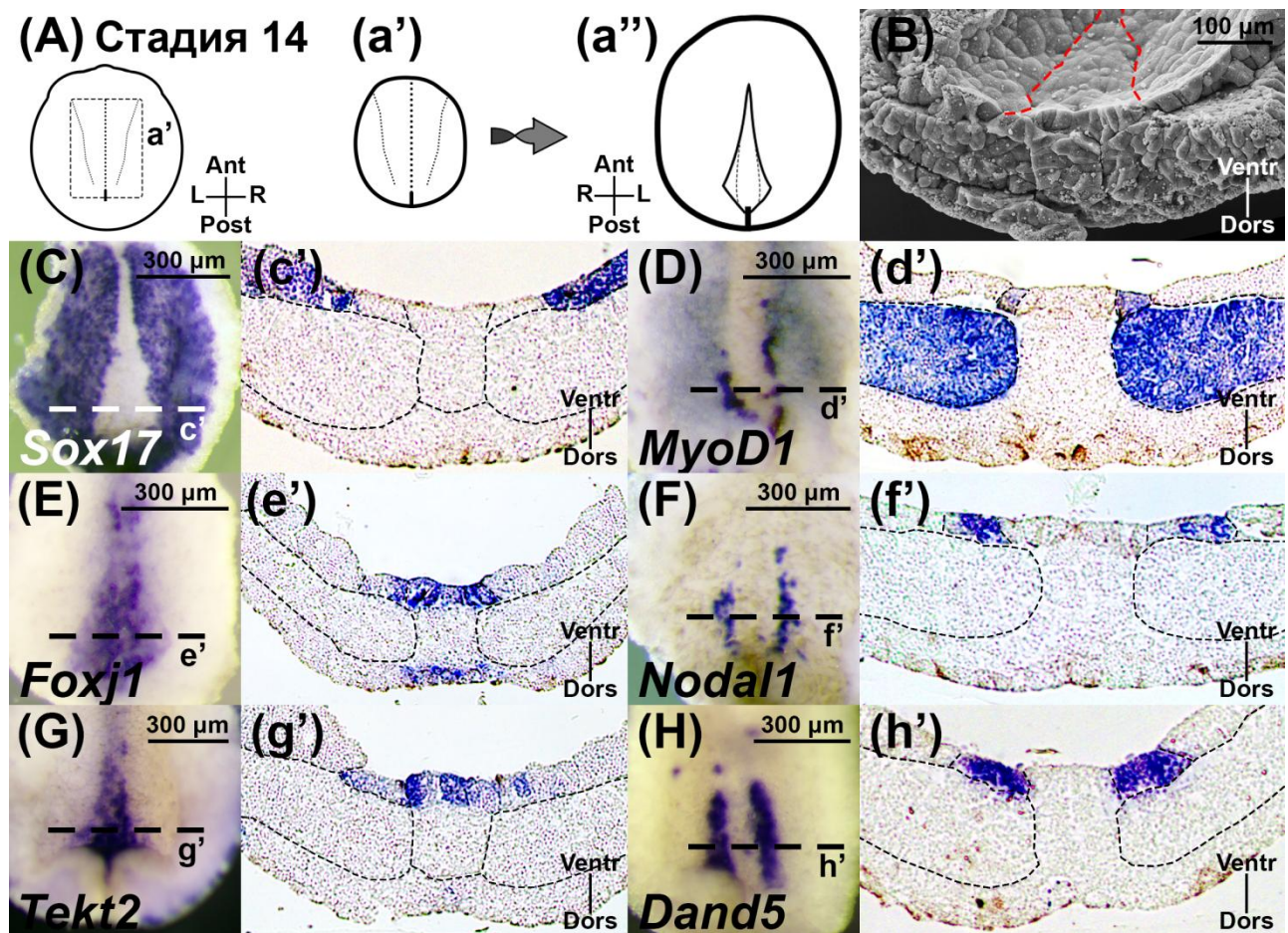


Рисунок 3. Молекулярная разметка лево-правого организатора на стадии ранней нейрулы. (A) Схема поздней гастрюлы. (a'-a'') Схема дорсального экспланта, взгляд с дорсальной (a') и вентральной (a'') стороны. (B) Скол постериорной области крыши гастроцеля, СЭМ. (C-h') Паттерны экспрессии *Sox17*, *Foxj1*, *Tekt2*, *MyoD1*, *Nodal1*, *Dand5*; общий вид крыши гастроцеля с вентральной стороны и поперечные срезы через крышу гастроцеля. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

Согласно литературным данным, лево-правый организатор функционирует на стадии поздней нейрулы. В это время площадь, занимаемая им на поверхности крыши гастроцеля, достигает максимума, поверхность лево-правого организатора заполнена ресничными клетками. Экспрессия ресничного маркера *Foxj1* в ходе нейруляции сужается до центральной зоны лево-правого организатора и далее затухает, в то время как экспрессия ресничного маркера *Tekt2* маркирует всю поверхность лево-правого организатора. Боковые сенсорные зоны ярко экспрессируют *Dand5*, *Nodal1* и *MyoD1* и отчётливо отграничены как от центральной зоны, так и от энтодермальных клеток, морфологическое разделение боковых сенсорных зон и нижележащей презумптивной мезодермы сомитов постепенно исчезает. Между тем в anteriорной области лево-правого организатора начинается постепенное сокращение площади поверхности организатора и погружение его поверхностных клеток в глубокие слои. Первыми в этот процесс вовлекаются клетки боковых сенсорных зон, которые сокращают апикальную поверхность и погружаются к глубинным *MyoD1*-положительным клеткам, становясь частью общей группы клеток презумптивной мезодермы сомитов, но при этом продолжая экспрессировать *Dand5*, *Nodal1* и *Tekt2*. 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 (рисунок 4).

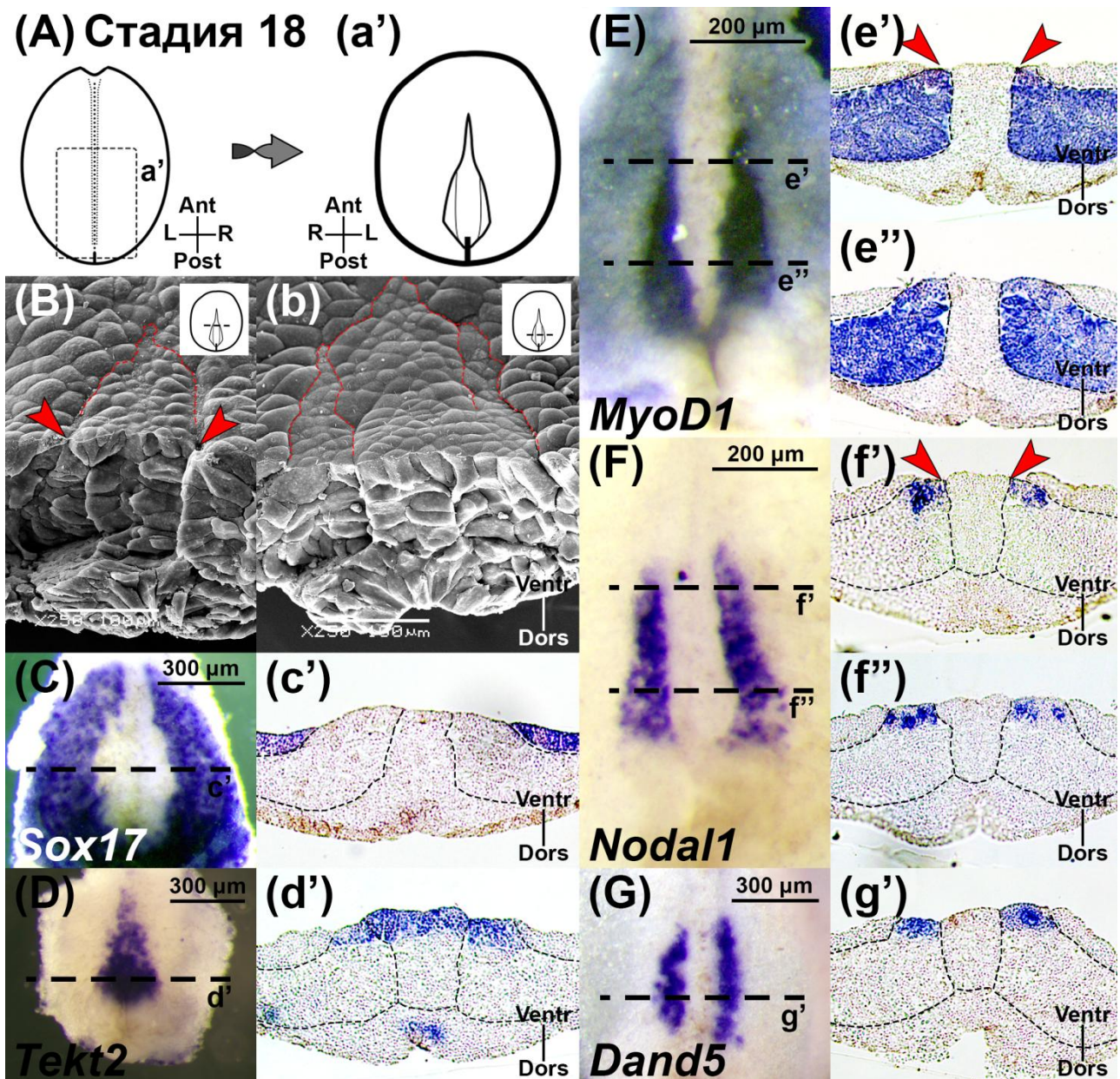


Рисунок 4. Молекулярная разметка лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы. (A) Схема поздней нейрулы. (a') Схема дорсального экспланта, взгляд с вентральной стороны. (B, b) Сколы постериорной области крыши гастроцеля, СЭМ. (C-g') Паттерны экспрессии *Sox17*, *Tekt2*, *MyoD1*, *Nodal1*, *Dand5*; общий вид крыши гастроцеля с вентральной стороны и поперечные срезы через крышу гастроцеля. 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 лево-правый организатор приобретает форму щели и почти полностью покрыт экспрессирующей *Sox17* энтодермой. Поверхностные клетки лево-правого организатора, экспрессирующие *Tekt2*, входят в состав нескольких участков мезодермы: клетки центральной зоны вплотную прилегают к хорде, а клетки боковых сенсорных зон лево-правого

организатора вклиниваются в общий блок сомитной мезодермы. Боковые сенсорные зоны некоторое время продолжают экспрессировать *Nodal1* и *Dand5*, даже располагаясь в пределах сомитов и сохраняя узкий контакт с гастроцелем только вблизи бластопора (рисунок 5).

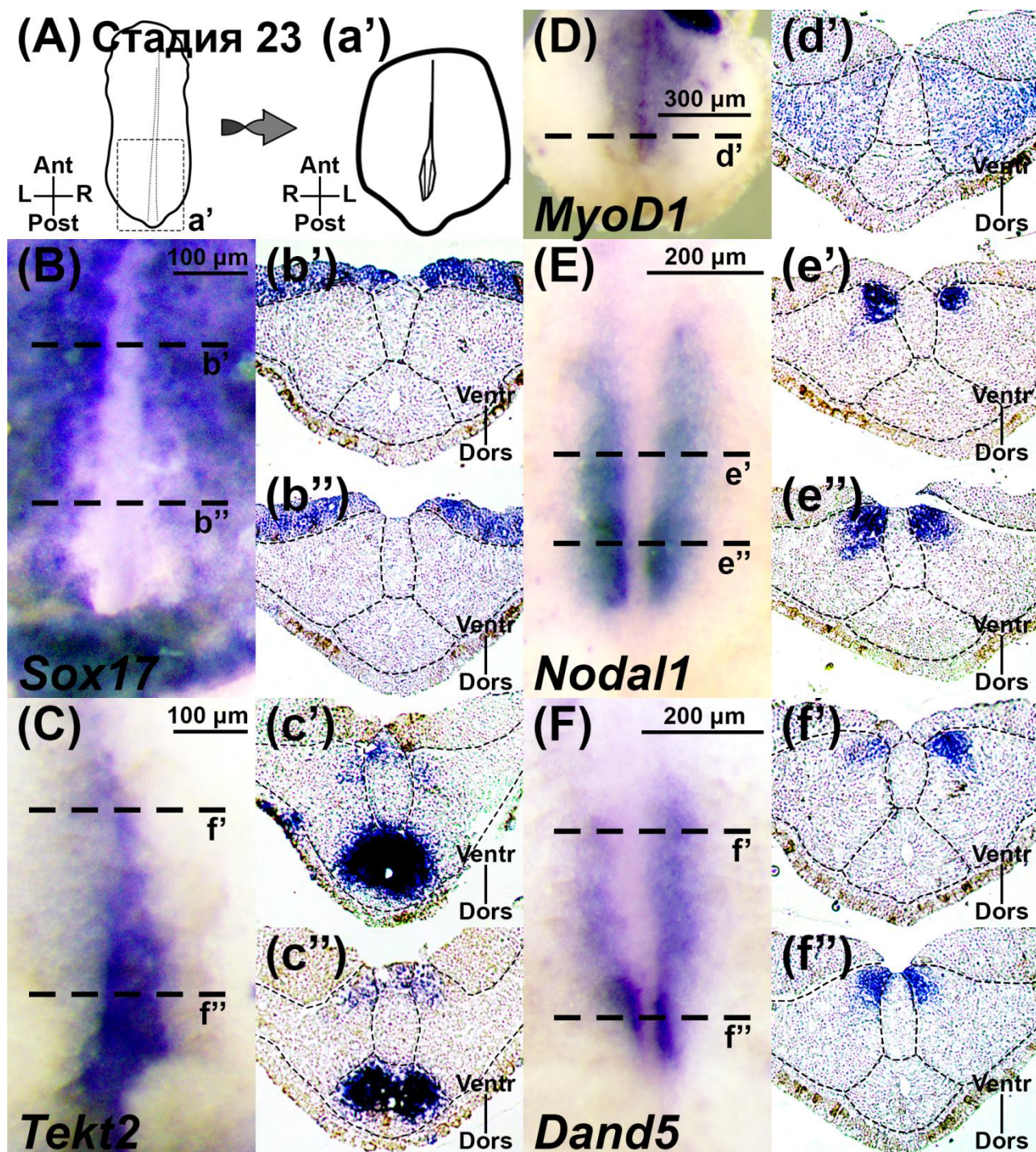


Рисунок 5. Молекулярная разметка лево-правого организатора на стадии хвостовой почки. (A) Схема эмбриона. (a') Схема дорсального эксплантата, взгляд с вентральной стороны. (B-f') Паттерны экспрессии *Sox17*, *Tekt2*, *MyoD1*, *Nodal1*, *Dand5*; общий вид крыши гастроцеля с вентральной стороны и поперечные срезы через крышу гастроцеля. Пунктиры на срезах маркируют границы между группами клеток.

Формины необходимы для установления асимметрии на стадиях гаструлы и нейрулы

Несмотря на значительное количество аргументов, свидетельствующих о ключевой роли лево-правого организатора в установлении асимметрии у *Xenopus laevis*, существуют свидетельства в пользу определения лево-правой оси во время дробления и ключевой роли форминов в этом процессе [Davison et al., 2016]. 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.

В ходе подготовки основного эксперимента мы проанализировали воздействие на эмбрионы разных концентраций ингибитора форминов SMIFH2 и определили, что концентрация 50 μM , использовавшаяся в работе Davison et al., 2016, приводит к быстрой гибели эмбрионов независимо от стадии воздействия, а для эксперимента допустимы концентрации 1 μM , 5 μM , 10 μM .

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 6А).

В качестве основных молекулярных критериев установления асимметрии мы приняли экспрессию генов *nodall* и его мишени – гена *pitx2* на стадии хвостовой почки. 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 инициируется 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 (рисунок 6b, c).

Эмбрионы, обработанные SMIFH2 во время дробления, не показали изменений экспрессии *Nodall*, тогда как инкубация в SMIFH2 на стадиях гаструлы и нейрулы привела к достоверному снижению доли эмбрионов с нормальной левосторонней экспрессией *Nodall* для 10 μ M SMIFH2 (p-value = 0,00000313). Аналогичные результаты были получены для экспрессии *Pitx2* (p-value = 0,0005445 для 10 μ M SMIFH2) (рисунок 6B, C).

Асимметрия, возникшая на молекулярном уровне в виде левосторонней экспрессии *Nodall* 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 (рисунок 7A). 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 гаструлы-нейрулы (стадии 10-18). После этого мы доращивали головастиков до стадии 46 и оценивали морфологию сердца и кишечника на интактных головастиках.

Головастики, обработанные SMIFH2 во время дробления, не показали значимых отличий доли особей с нормальной морфологической асимметрией от контроля. После воздействия ингибитора форминов на эмбрионы на стадиях гаструлы-нейрулы доля головастиков с нормальной асимметрией достоверно снижалась для концентрации ингибитора 10 μ M (p-value = 0,00006552) (рисунок 7B).

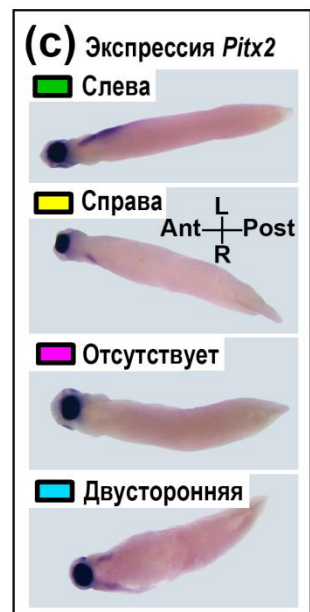
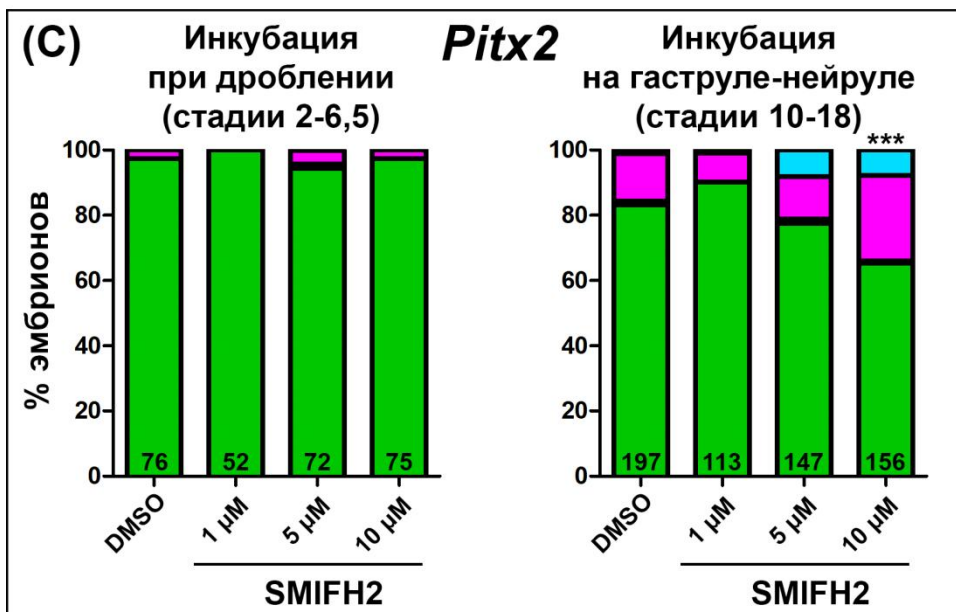
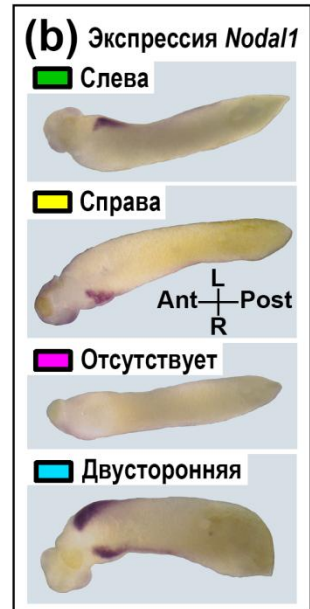
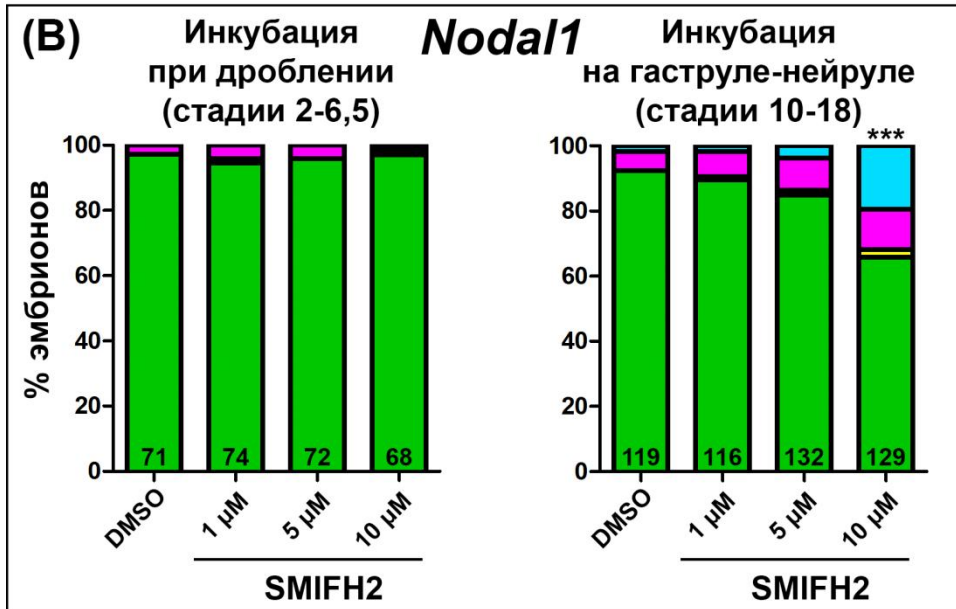
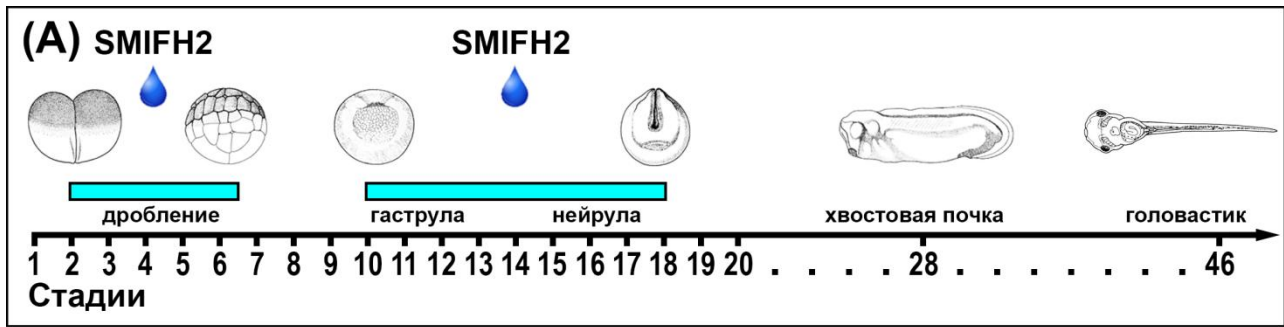


Рисунок 6. Молекулярные проявления лево-правой асимметрии после ингибирования форминов.

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

***, p -value < 0.001 по сравнению с DMSO-контролем, тест пропорций с поправкой Бонферрони. Цифры в основаниях столбцов – число эмбрионов.

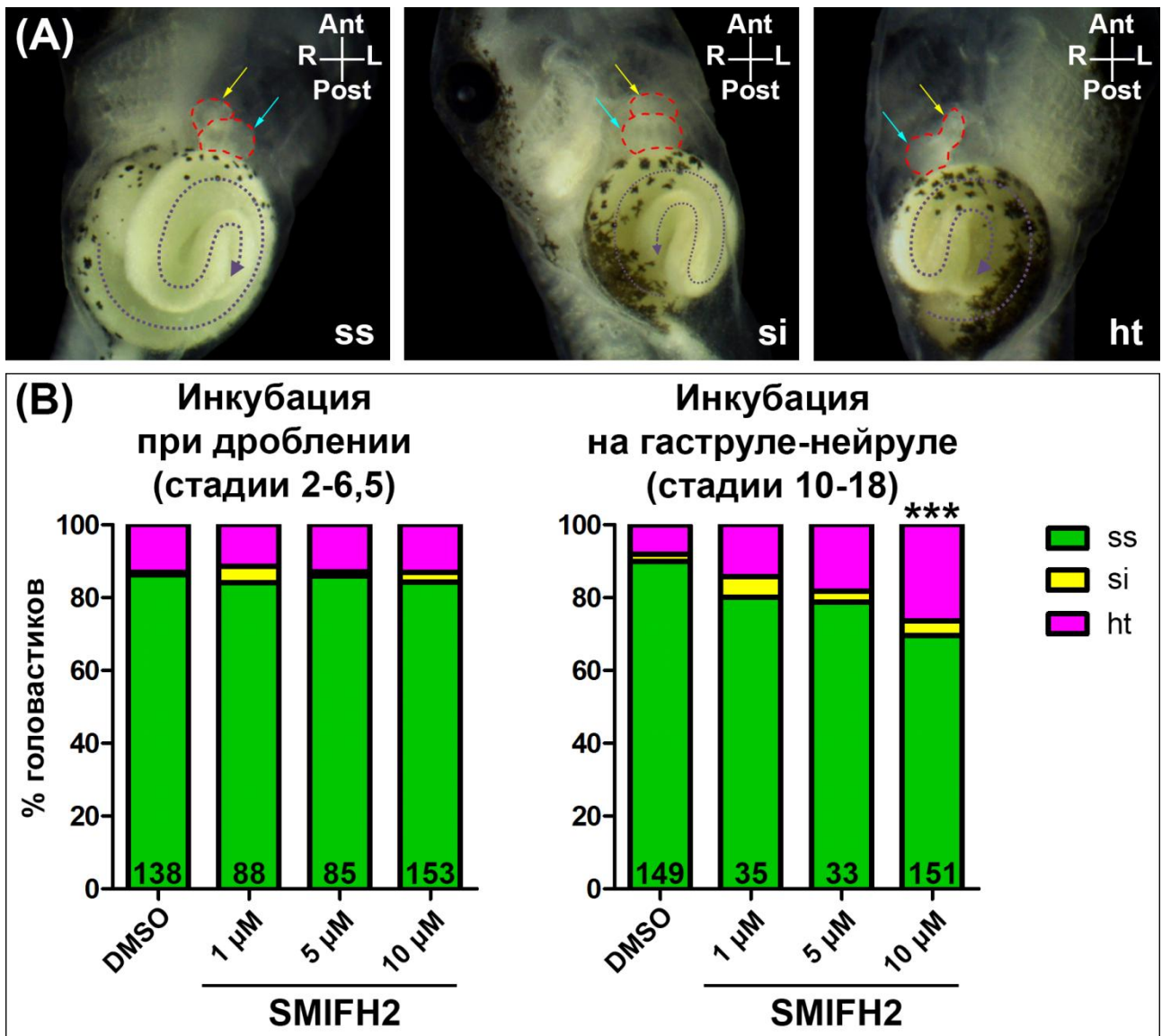


Рисунок 7. Морфологические проявления лево-правой асимметрии после ингибирования форминов.

(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.

***, 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 и нейрулы нарушает как молекулярные, так и морфологические проявления асимметрии. Эти данные свидетельствуют о том, что формины нужны для установления асимметрии именно на тех стадиях, когда в крыше гастроцеля формируется и функционирует лево-правый организатор, и подтверждают гипотезу о том, что ключевым явлением для установления асимметрии у *Xenopus* является именно ресничным ток в крыше гастроцеля.

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 и нейруле, позволяет предположить влияние ингибитора форминов SMIFH2 на лево-правый организатор в крыше гастроцеля в качестве возможного механизма нарушения асимметрии. Для оценки развития лево-правого организатора и возможности его функциональной активности мы воздействовали ингибитором форминов SMIFH2 на эмбрионы на стадиях гаструлы и нейрулы, после чего изучали морфологию и молекулярную разметку лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы.

Изображения со сканирующего электронного микроскопа и поперечные срезы показывают, что по сравнению с контрольной группой у обработанных ингибитором эмбрионов область лево-правого организатора оказывается значительно уже и имеет щелевидную форму. Характерные для лево-правого организатора мелкие клетки остаются в виде узкой полосы на средней линии эмбриона. Клетки более крупного размера, характерного для энтодермы, окружают область лево-правого организатора по бокам и частично или полностью перекрывают с поверхности боковые зоны лево-правого организатора, отвечающие за восприятие тока жидкости (рисунок 8А, В).

Кроме того, энтодермальные клетки частично перекрывают центральную зону лево-правого организатора, отвечающую за создание тока жидкости в гастроцеле, однако морфологические характеристики клеток центральной зоны при этом не были нарушены: доля ресничных клеток в центральной зоне, нормальное постериорное положение ресничек на клетках и длина ресничек не отличались у ингибированных и контрольных эмбрионов.

Также мы дополнительно изучили структуру тубулина и F-актина в области лево-правого организатора методом иммунофлуоресцентного окрашивания и убедились, что у ингибированных эмбрионов 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 8С). Следовательно, мы предполагаем, что эти клетки так же, как и в норме, способны генерировать левонаправленный ток жидкости в гастроцеле. Известно, что механизм ресничного тока у других позвоночных крайне чувствителен и требует всего нескольких десятков ресничек для успешного установления асимметрии. Таким образом, несмотря на уменьшение количества не покрытых энтодермой клеток центральной зоны у некоторых образцов, вероятно, даже такие сильно перекрытые участки крыши гастроцеля способны создавать ресничный ток достаточной интенсивности.

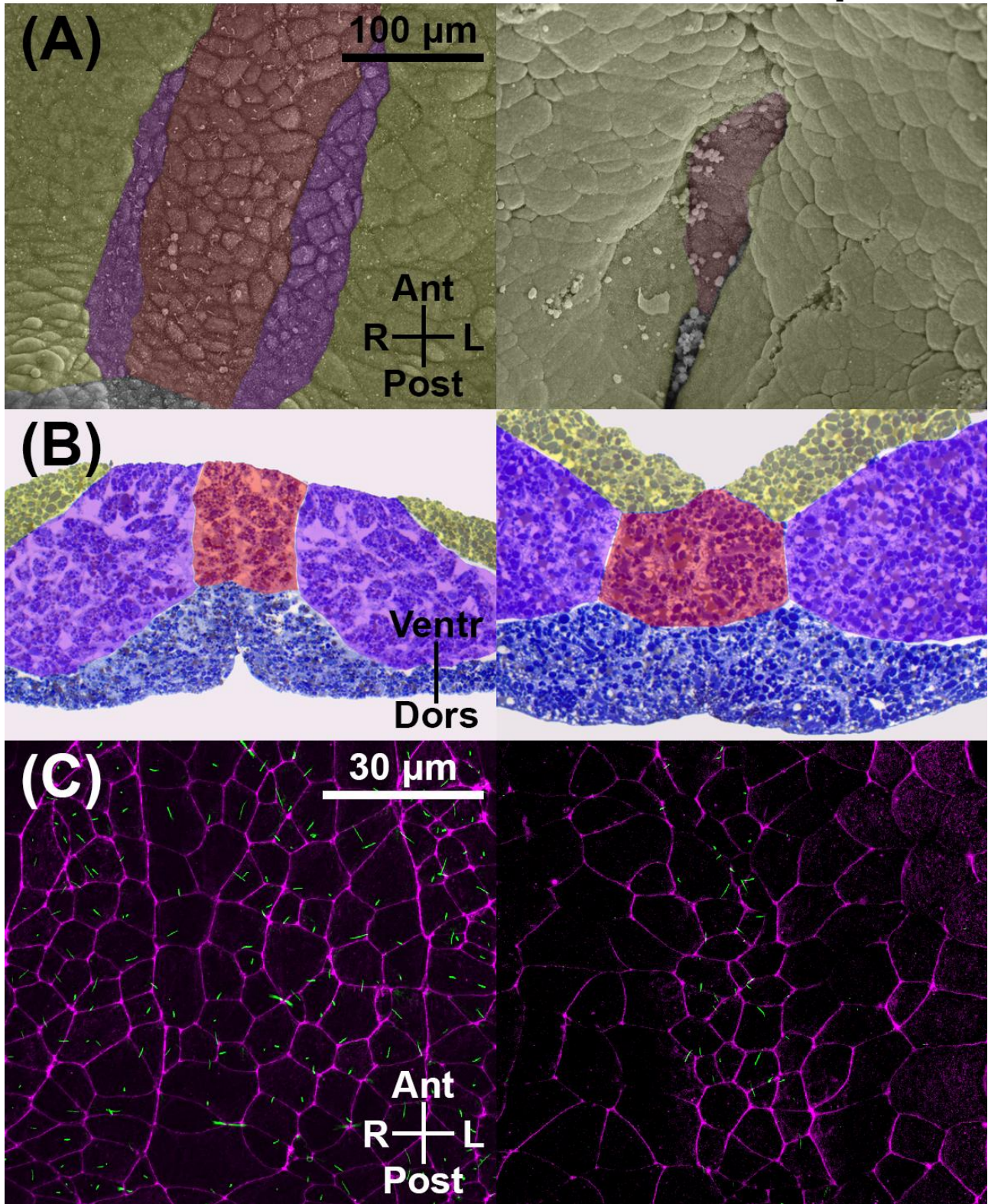
DMSO**SMIFH2 10 μ M**

Рисунок 8. Ингибирование форминов на гастрале-нейруле нарушает морфологию лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы.

(А-В) Область лево-правого организатора, СЭМ и поперечные срезы. Синий – эктодерма, красный – хорда и гипохорд, фиолетовый – боковые сенсорные зоны, жёлтый – энтодерма.
 (С) Область лево-правого организатора, ИФА. Малиновый – актиновые филаменты, зелёный – реснички.

Исследование молекулярной разметки лево-правого организатора после ингибирования форминов на гастрале-нейруле показало, что поверхность лево-правого организатора сужается в первую очередь за счёт потери клетками боковых зон связи с поверхностью, а перекрывающие организатор клетки действительно имеют энтодермальную природу. У контрольных эмбрионов область на средней линии эмбриона, экспрессирующая ресничный маркер *Tekt2*, имеет треугольную форму, характерную для лево-правого организатора на этой стадии развития, и окружена областью экспрессии энтодермального маркера *Sox17* (рисунок 9А, В). У обработанных ингибитором эмбрионов область экспрессии *Tekt2* сужается до тонкой полоски на средней линии эмбриона, и, соответственно, экспрессия *Sox17* занимает всю поверхность крыши гастроцеля, кроме узкой полоски на средней линии (рисунок 9а, б). Экспрессия маркеров боковых зон лево-правого организатора *Dand5* и *Nodal1* наблюдалась как у контрольных, так и у ингибированных эмбрионов. Однако поперечные срезы показали, что боковые зоны у обработанных ингибитором эмбрионов частично или полностью теряют контакт с поверхностью, будучи перекрытыми сверху энтодермальными клетками, что лишает их возможности воспринимать ток жидкости в гастроцеле и может привести к нарушениям активации каскада *Nodal* (рисунок 9С-Д', с-д').

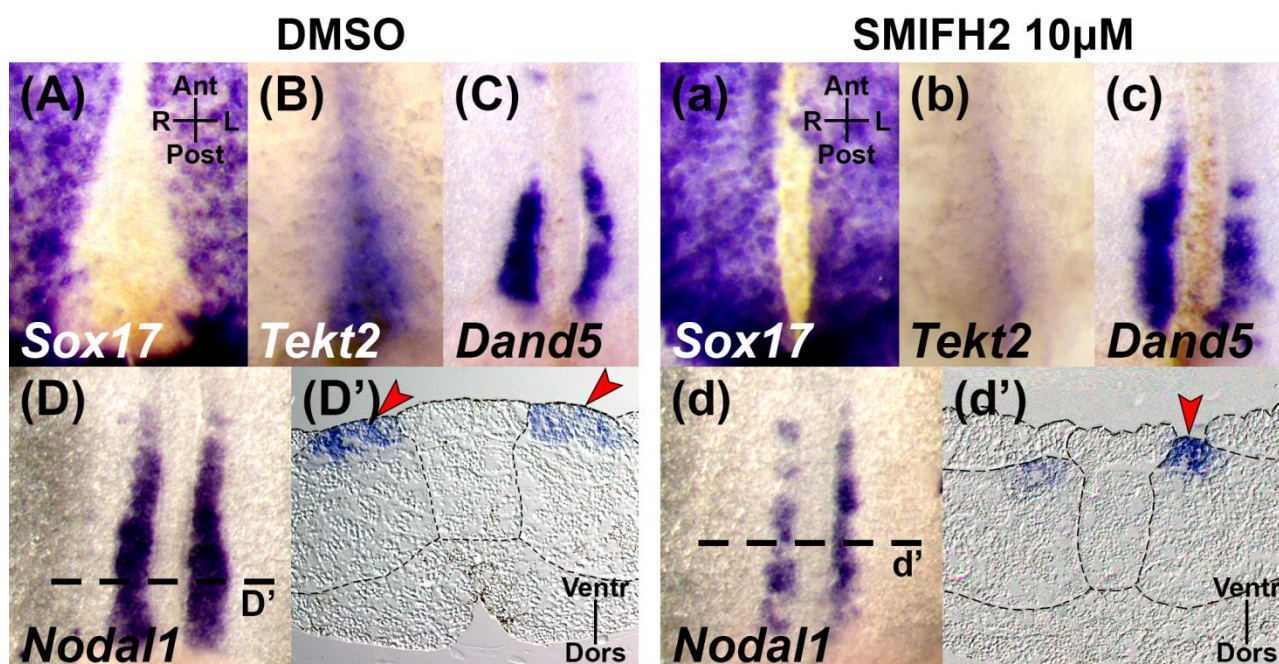


Рисунок 9. Ингибирование форминов на гастрале-нейруле нарушает нормальную молекулярную разметку в области лево-правого организатора на стадии поздней нейрулы.

(A-D, a-d) Паттерны экспрессии *Sox17*, *Tekt2*, *Dand5* и *Nodal1*; общий вид постериорной области крыши гастроцеля с вентральной стороны. (D', d') Поперечные срезы через область экспрессии *Nodal1*.

Стрелки указывают на *Nodal1*-положительные клетки, сохраняющие контакт с поверхностью. 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 гастралы-нейрулы, 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.

Чтобы выяснить, когда именно происходит частичное перекрытие лево-правого организатора энтодермальными клетками, мы использовали эмбрионы, инкубация которых в ингибиторе форминов SMIFH2 была начата на ранней гастрале, и зафиксировали их либо на стадии ранней нейрулы, когда лево-правый организатор в крыше гастроцеля приобретает характерную форму и размеры и у него начинают специализироваться поверхностные области, либо

на стадии поздней нейрулы, когда перекрытие лево-правого организатора энтодермой ярко выражено. Анализ молекулярной разметки области лево-правого организатора показал, что к стадии ранней нейрулы ингибированные эмбрионы ещё не отличаются от контрольных: область экспрессии *Tekt2* в обоих случаях имеет широкую треугольную форму, характерную для ранней нейрулы, а область экспрессии *Sox17* у ингибированных эмбрионов ещё не начала распространяться к средней линии (рисунок 10А). К стадии же поздней нейрулы эффекты от ингибирования форминов приводят к значительным отличиям ингибированных эмбрионов от контрольных: с широкой областью лево-правого организатора у контрольных эмбрионов и суженной у ингибированных (рисунок 10В).

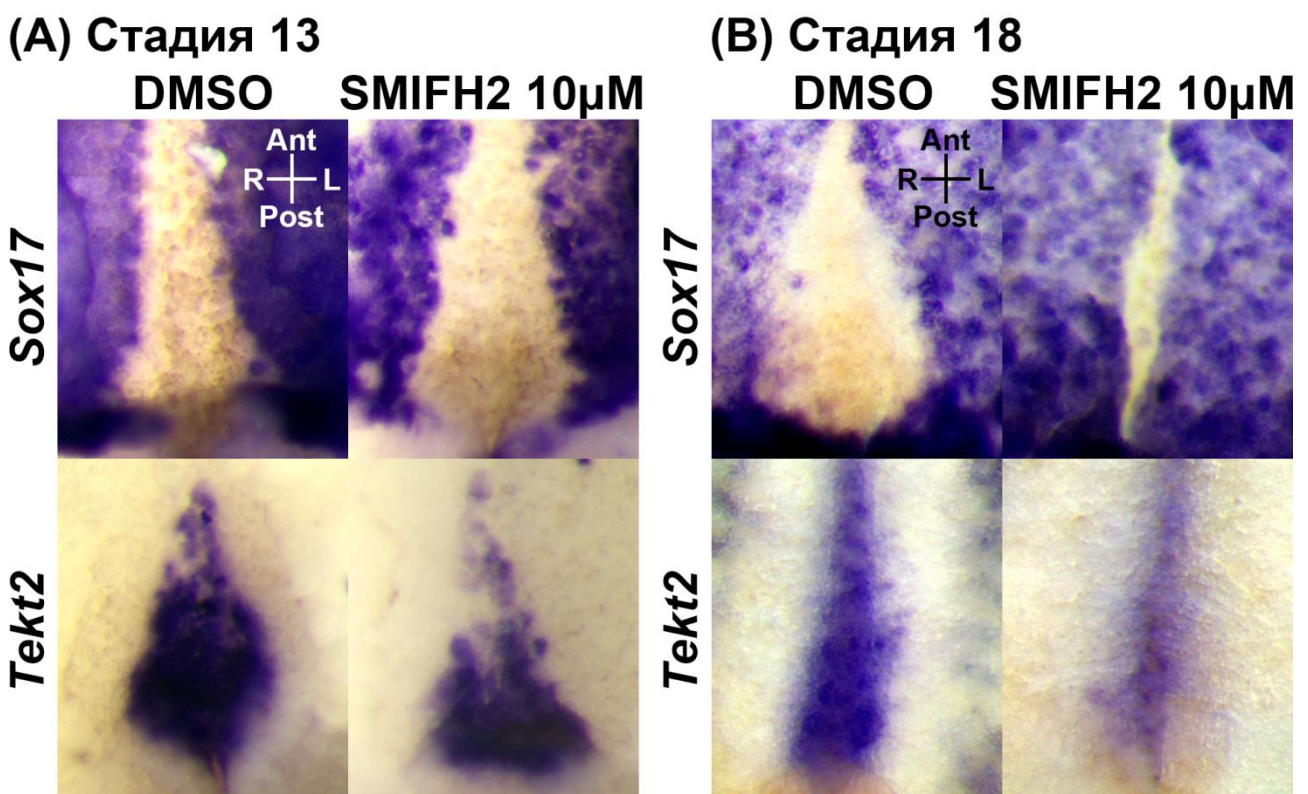


Рисунок 10. Ингибирование форминов на гастрале-нейруле приводит к преждевременному закрытию лево-правого организатора.

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*.

Мы заключили, что в ходе ингибирования форминов на стадиях гастрюлы-нейрулы лево-правый организатор формируется нормальным образом, однако во время нейруляции его боковые зоны преждевременно перекрывается энтодермой, предположительно до того, как они успеют воспринять сигнал тока жидкости и активировать каскад Nodal.

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 гастрюлы и нейрулы.

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

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

An, анимальный полюс; Ant, anteriорный конец; Dors, дорсальная сторона; L, левая сторона; Post, постериорный конец; R, правая сторона; Veg, вегетативный полюс; Ventr, вентральная сторона.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

1. Петри Н. Д. Эволюционное разнообразие механизмов установления лево-правой асимметрии у животных //Онтогенез. – 2020. – Т. 51. – №. 2. – С. 96-112. **ИФ РИНЦ = 0,695** (1,975/1,975)*

[**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. **Q4, IF (WoS) = 0,5** (1,733/1,733)*]

2. **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. **Q1, IF (WoS) = 2,9** (1,733/1,155)*

3. **Petri N.**, Vetrova A., Tsikolia N., Kremnyov S. Molecular anatomy of emerging *Xenopus* left–right organizer at successive developmental stages //Developmental Dynamics. – 2024. **Q3, IF (WoS) = 2** (1,733/1,213)*

* В скобках приведён объём публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.