

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Кафедра цитологии и генетики

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СО РАН
Лаборатория генетических основ онтогенеза

профессор
Серов Олег Леонидович

Генетика развития

Курс лекций
для студентов 3 курса
ФЕН НГУ

1998

Предисловие.

Предлагаемый курс «Генетика развития» формировался в течении многих лет. Первоначальный замысел курса ограничивался, если так можно выразится, чисто генетическими аспектами и преимущественно рассмотрением роли отдельных генов в развитии. Однако вскоре стало ясным, что рассмотрение генного контроля развития в отрыве от эмбриологии, данных по организации генома или молекулярных механизмов взаимодействия генов существенно обедняет понимание общих закономерностей индивидуального развития, не отражает реального прогресса в этой бурно развивающейся области биологии. Отсюда возникла необходимость найти стержень, вокруг которого можно было бы объединить экспериментальный материал смежных и несмежных областей генетики и биологии, чтобы представить наши современные знания о развитии на фоне общей картины феноменального прогресса биологии.

Одним из таких объединяющих элементов стала концепция **дифференциальной активности генов**. В отечественной литературе основы этой концепции были наиболее четко и ясно изложены в монографии Л.И.Корочкина «Взаимодействие генов в развитии», изданной в 1977 г. За прошедшие два десятилетия эта концепция получила добротное экспериментальное обоснование. В предлагаемом курсе дифференциальная активность генов рассматривается на всех уровнях: индивидуальных генов (на примере, стадио- и тканеспецифических генов), на уровне хромосом (инактивация X-хромосом млекопитающих) и родительских геномов (геномный импринтинг).

Важным элементом, позволившем автору увязать прогресс в области изучения организации эукариотического генома с проблемами индивидуального развития, был подход, который может быть выражен в виде вопросов: **«Какая доля (часть) генома осуществляет контроль развития? Существуют ли специальные гены развития и если да, то как много их?»**. Рассмотрение этих вопросов существенно расширяет рамки традиционных задач генетики развития: **изучения времени и места действия генов в онтогенезе**.

При изложении экспериментальных данных невозможно было обойтись без детального рассмотрения новых технологий манипулирования с эмбрионами клетками и генами - таких как **трансгенез, направленный мутагенез и получение генетических копий, клонирование животных**, поскольку именно разработка этих новых экспериментальных подходов обусловила прогресс в понимании главной проблемы развития - как из одной яйцеклетки возникает целый организм.

Электронный вариант курса лекций по «Генетике развития» разработан в качестве вспомогательного пособия для студентов при подготовке сдачи зачета, но ни коей мере не может заменить живого изложения материала автором. Данный курс находится на стадии разработки, поэтому часть материала еще не отражена. Однако уже опубликованные главы могут использоваться студентами и интересующимися проблемами генетики развития.

Создание электронной версии курса не было бы возможным без активного и квалифицированного участия аспирантов Ларкина Д.М и Аульченко Ю.С. Автор благодарен аспиранту Ивановой Е.В. за помощь в редактировании текста, Березикову Е.В. и Вагнеру А.Н. за помещение курса в Интернет.

Создание данного курса лекций финансировалось институтом «Открытого общества» программа «Обучение и исследования с использованием Интернет», грант I2A707 и Федеральной целевой программой «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки на 1997 - 2000г.г.»

Оглавление

ГЛАВА 2. ГЕНЫ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ

2.1.ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ	4
2.1.1. Созревание яйцеклетки дрозофилы	5
2.1.2. Ранний эмбриогенез дрозофилы	8
2.1.3. Поздний эмбриогенез дрозофилы	10
2.1.4. Личиночная стадия развития	13
2.1.5. Тотипотентность и детерминация в эмбриогенезе дрозофилы	15
2.2. ГЕННЫЙ КОНТРОЛЬ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ	31
2.2.1. Характеристика материнских генов	32
2.2.2. Роль генов сегментации в развитии	43
2.2.3. Гомеозисные гены и их роль в развитии	51
Список рекомендуемой литературы	65

ГЛАВА 2.**ГЕНЫ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ.**

Дрозофила, плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*), традиционный объект генетических исследований, и вполне понятно, что этот объект не мог не привлечь внимания исследователей, изучающих генный контроль развития. Более того, именно исследование на дрозофиле действия мутаций на нормальное развитие позволило ряду авторов сформулировать представление о существовании “генов развития”, то есть генов, функцией которых является контроль развития, реализация программы развития. Однако прежде чем перейти к рассмотрению природы такого рода генов и механизмов их действия, необходимо вкратце остановиться на характеристике нормального онтогенеза дрозофилы.

2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ.

Дрозофила относится к типу членистоногих, к классу двукрылых. Она имеет **мозаичный тип организации яйца**, и детерминация развития той или иной дефинитивной структуры происходит в ранние периоды развития. Принято различать следующие стадии развития дрозофилы:

1. Ранний эмбриогенез - первые 2,5 - 3 часа развития от момента оплодотворения до стадии целлюляризации;

2. Поздний эмбриогенез - от момента целлюляризации до вылупливания

личинки (20-22 часа от момента оплодотворения);

3. Личиночная стадия развития начинается от момента вылупливания личинки и продолжается до стадии окукливания (120 часов). Личиночная стадия, в свою очередь, подразделяется на три периода - личинка первого (стадия I), второго (стадия II) и третьего (стадия III) возрастов, причем переход одной личиночной стадии в другую сопряжен с линькой (сменой кутикулярных образований и внешнего покрова), находящейся под контролем главного гормона линьки - экдизона;

4. Стадия куколки начинается с момента окукливания и продолжается 70-72 часа до момента появления имаго, взрослой особи. Переход от личиночной стадии развития к куколке осуществляется под контролем, главным образом, экдизона.

Таким образом, развитие дрозофилы от момента оплодотворения до вылета имаго осуществляется за 9 дней. Продолжительность развития дрозофилы зависит от температуры окружающей среды.

Как отмечалось выше, дрозофила имеет мозаичный тип организации яйца, при котором поляризация цитоплазмы яйца играет ключевую роль в раннем эмбриогенезе. В связи с этим необходимо остановиться на характеристике овогенеза, начиная с ранних стадий дифференцировки примордиальной половой клетки до зрелой яйцеклетки.

2.1.1. Созревание яйцеклетки дрозофилы.

Примордиальная половая (презумптивная) половая клетка взрослой самки претерпевает 4 последовательных деления, в

начале будущей яйцеклетке, тогда как остальные 15 формируют популяцию так называемых **питающих** клеток. На рис.2.1 и 2.2 схематически представлены строение фолликула и созревание яйцеклетки. Хорошо видно, что передний полюс ооцита

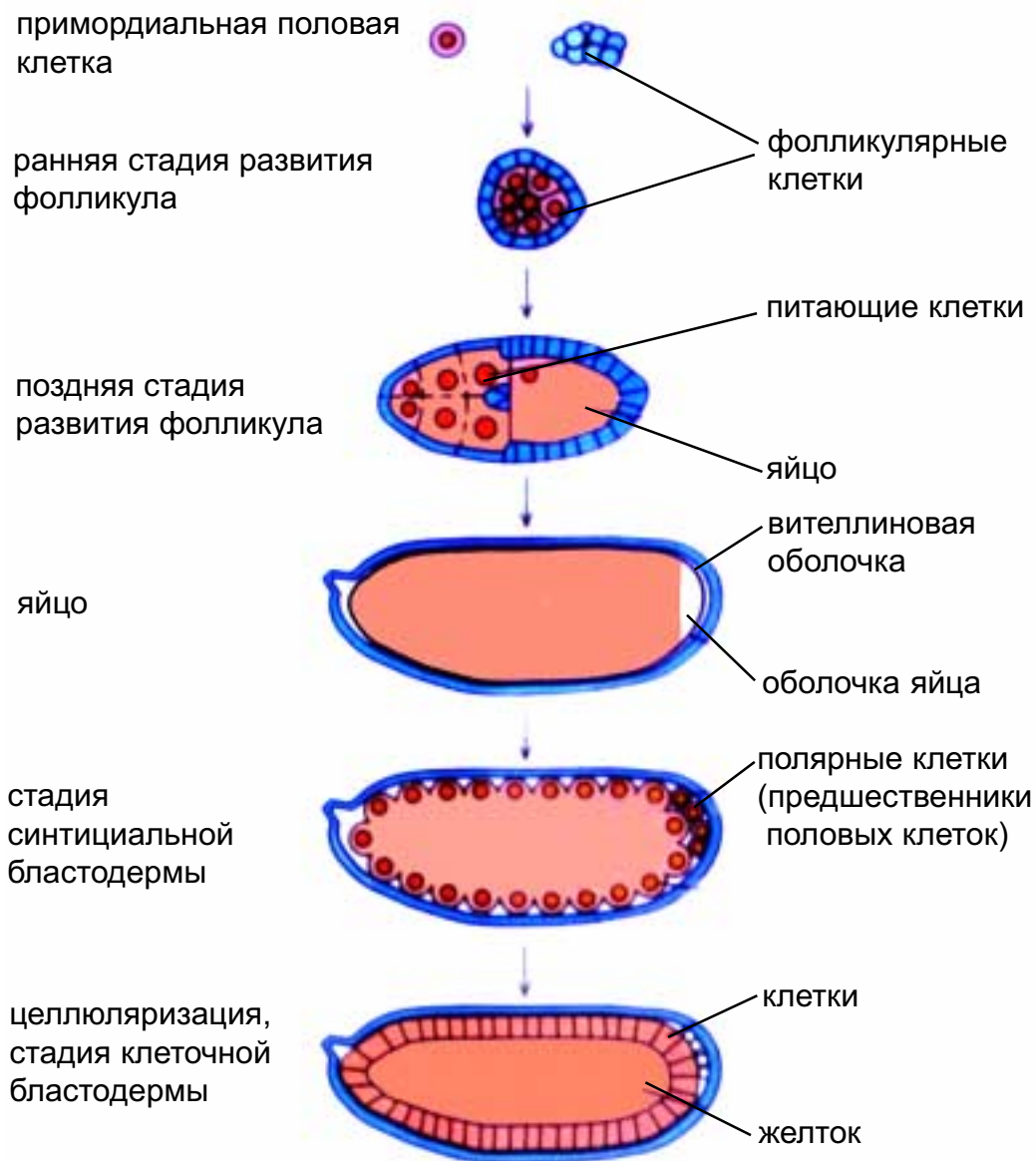


Рис.2.1. Яйцо дрозофилы состоит из примордиальной половой клетки с питающими и фолликулярными клетками, которые обеспечивают ооцит питанием и факторами, контролирующими развитие. Клеточная организация эмбриона формируется после 3-х часов с момента оплодотворения.

результате чего формируется 16 клеток. При этом следует отметить, что среди этих клеток **только одна** (как правило расположенная в центре) даст

контактирует и частично окружен питающими клетками, тогда как центральная часть и задний полюс покрыты слоем фолликулярных клеток.

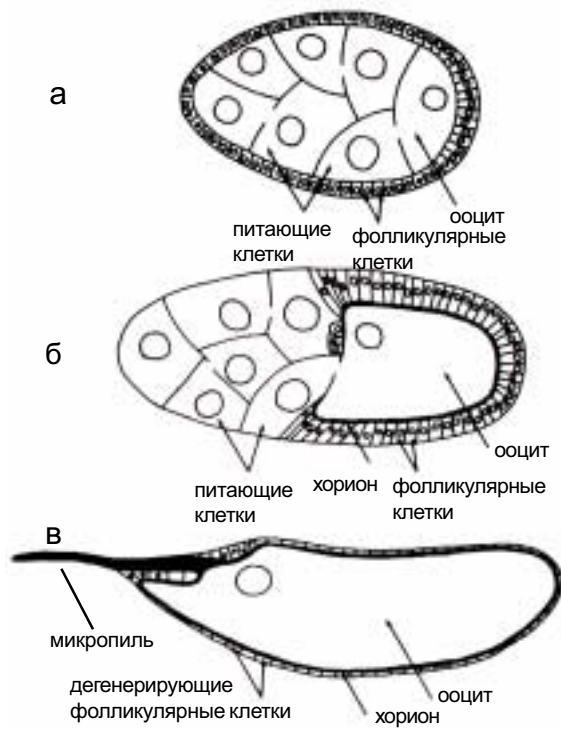


Рис.2.2. Ранняя, средняя и поздняя стадия овогенеза дрозофилы. Слева - передний полюс;верху -дорзальная сторона яйца.

А. Яйцевая камера содержит фолликулярные клетки (соматические по происхождению), которые окружают питающие клетки и ооцит. Питающие клетки и ооцит соединены «мостиками», практически образуя подобие синцития. На этой стадии питающие клетки начинают секретировать иРНК, белки и субклеточные элементы в ооцит.

Б. Яйцевая камера становится удлинённой, фолликулярные клетки мигрируют вокруг ооцита, и начинается образование хориона. В. На поздней стадии овогенеза питающие клетки дегенерируют и распадаются. После формирования хориона фолликулярные клетки также дегенерируют.

Фолликулярные клетки, в отличие от питающих, происходят из соматических клеток.

Функция питающих клеток, как это следует из их названия, заключается в питании созревающей яйцеклетки. Однако этим их функция не исчерпывается. Эти клетки принимают прямое, непосредственное

участие в формировании **полярности цитоплазмы ооцита**. Понятие “полярность яйца” или “полярность цитоплазмы яйца” подразумевает наличие градиентов концентраций различного рода белков и индивидуальных иРНК вдоль передне-задней и дорзально-вентральной осей.

Между созревающим ооцитом и питающими клетками имеются тесные межклеточные связи посредством так называемых “цитоплазматических мостов” (“cytoplasmic bridges”) или “кольцевых каналов” (“ring canals”). В процессе овогенеза из питающих клеток происходит перманентный транспорт белков, часто в комплексе с РНК, а также полисахаридов и липидов. Нуклео-протеидные

липидов. Нуклео-протеидные комплексы представляют собой ассоциации специфических иРНК (первичных транскриптов) и белков. Благодаря существованию “цитоплазматических мостов” между созревающей яйцеклеткой и питающими клетками наблюдается транспорт из последних даже субклеточных органелл, таких как рибосомы и митохондрии. Важно подчеркнуть также, что такой транспорт белков, РНК и субклеточных органелл осуществляется преимущественно через передний полюс ооцита, там где питающие клетки контактируют с ооцитом. Такого рода контакт ооцита и питающих клеток предопределяет характер его поляризации, формирование градиентов концентраций различных белков и РНК преимущественно в дорзально-заднем направлении. Что касается становления второй оси - дорзально-вентральной, то здесь

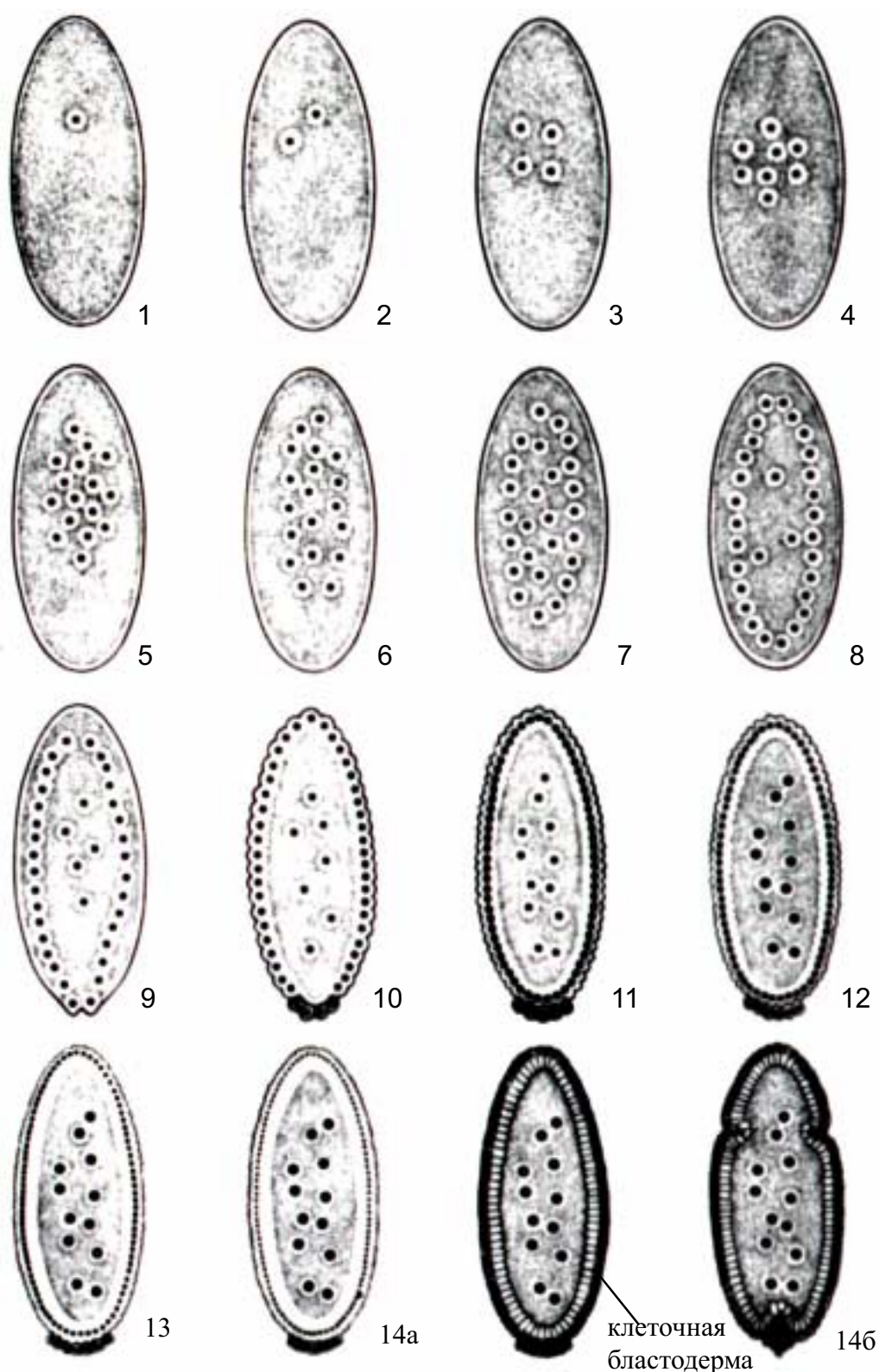


Рис.2.3. Ранние стадии эмбриогенеза дрозофилы, от момента оплодотворения до гастрюляции. Цифры показывают число делений. Каждый цикл начинается с интерфазы, а заканчивается митозом. Эмбрионы показаны в продольном положении и без виттелиновой оболочки. До 5-ого деления все ядра показаны черными кружочками, после 5-ого показана только часть ядер. Заметна свободная от клеток цитоплазма на периферии эмбриона (периплазма). (по Foe and Alberts, 1983).

ведущую роль играют контакты и транспорт белков и иРНК из фолликулярных клеток в ооцит.

2.1.2. Ранний эмбриогенез дрозофилы.

В ходе оплодотворения спермий проникает в яйцеклетку через микропиле (рис.2.2). Зрелый ооцит находится на стадии МI (мейоз-I). Ядерная оболочка разрушена и гаплоидный набор хромосом оказывается лежащим свободно в ооплазме, в передней трети яйца ближе к дорзальной его стороне. Эта структура называется **кариосфера**. Следующие фазы мейоза - два деления с образованием трех направительных телец и одного пронуклеуса - происходят после оплодотворения. При стандартных условиях от метафазы I до завершения второго мейотического деления требуется 12 мин. В течении следующих 3 мин. один из 4-х гаплоидных продуктов мейоза формирует пронуклеус. В течение этого 15-минутного периода головка спермиды увеличивается в размере и превращается в мужской пронуклеус.

Первые 9 зиготические деления синхронны, и продолжительность каждого митоза примерно 10 мин. (рис.2.3). Важно отметить, что эти деления ядер не сопровождаются цитокинезом и вследствие этого ядра находятся в общей цитоплазме, образуя синцитий. После 7-го деления наблюдается миграция ядер к периферии зиготы, в перикортикальную зону (рис.2.3). После 9-го деления группа ядер (около

40) достигает заднего полюса яйца, где находится так называемая **полярная плазма (polar plasm)** или **полярная зона** (рис.2.3). Ядра, достигшие полярной плазмы, немедленно приобретают клеточную структуру и дают начало **клеткам-предшественникам зародышевого пути (germ cells)** (рис.2.3). Таким образом, полярные клетки есть первые клетки в раннем развитии дрозофилы. Между 9 и 10-м делениями, мигрирующие ядра достигают периферии яйца и начинают образовывать единый слой, выстраиваясь в перикортикальном пространстве (рис.2.4). Последующие 4-деления также синхронны, хотя и распространяются в виде волны. Таким образом, в результате 13 делений

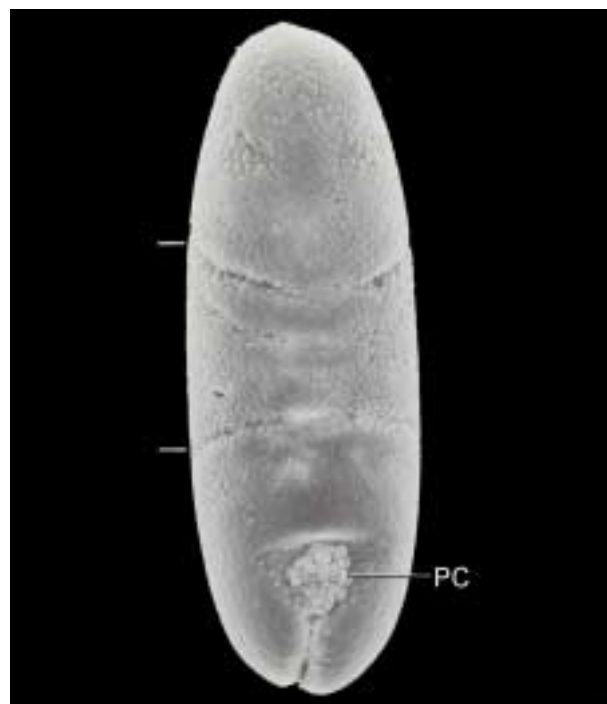


Рис.2.4. Вид с дорзальной стороны эмбриона на стадии появления зародышевого пояса («germ band»). PC - полярные клетки находятся около заднего впячивания первичной кишки.

образуется около 6000 ядер, которые находятся в перикортикальной зоне

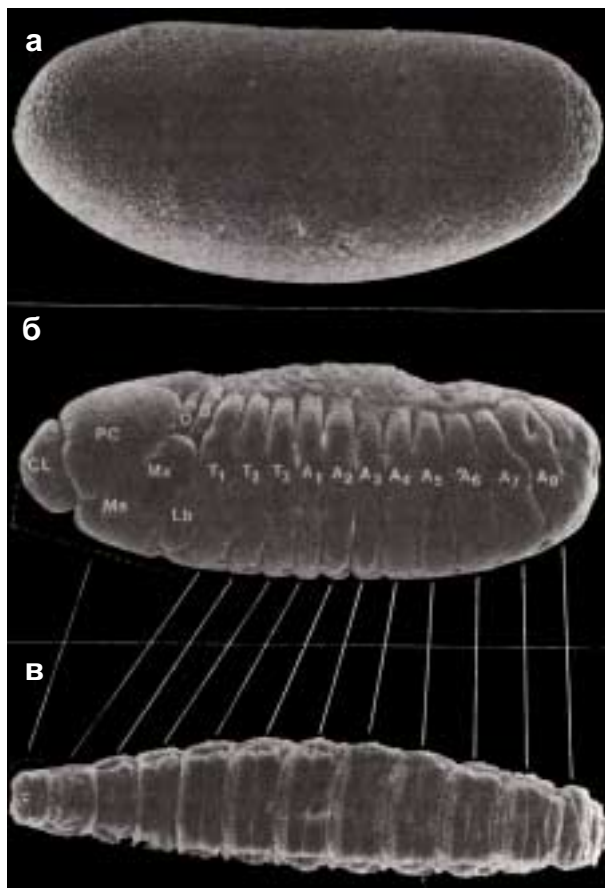


Рис. 2.5. Бластодерма (А), стадия сегментированной зародышевой полости (Б) и личинка I-ого возраста (В) *D.melanogaster*. Линиями соединены соответствующее друг другу сегменты 8-и часового эмбриона и личинки. Головы личинки и эмбриона показаны прерывистой линией. Обозначения сегментов: CL - клипеолабральный, PC - процефалический, Ma - мандибулярный, Lb - нижнегубной, O - глазной, T₁-T₃ - первый, второй и третий грудные, A₁-A₈ - от первого до восьмого брюшные, D - дорзальный валик.

эмбриона. Эта стадия развития называется **стадией синтициальной бластодермы**, поскольку все ядра продолжают находиться в единой, общей цитоплазме (рис.2.3).

В ходе интерфазы 14-го митоза происходит одно из ключевых событий раннего эмбриогенеза - **асинхронность деления ядер**, и **бластодерма приобретает клеточную организацию**. Именно после 14

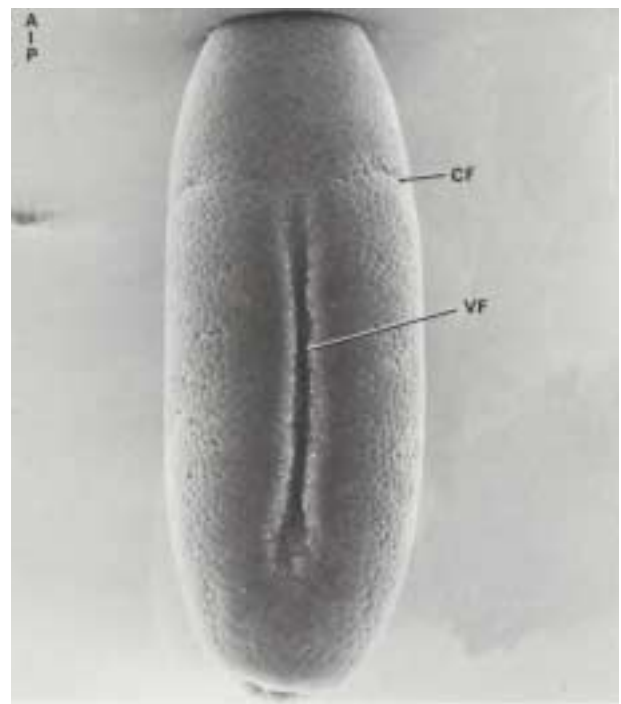


Рис.2.6. Вид с вентральной стороны эмбриона на стадии начала гастрюляции. Видна вентральная продольная борозда (VF) через которую мезодерма инвагинирует. А - передний полюс, Р - задний полюс, CF - цефалическая борозда.

деления вокруг каждого ядра образуется клеточная оболочка - стадия **целлюляризации**. Эмбрион на этой стадии развития приобретает клеточное строение - **стадия клеточной бластодермы**. Эмбрион напоминает мешок, окруженный оболочкой, состоящей из одного слоя клеток и не имеющей каких-либо морфологических ориентиров (рис.2.5). Целлюляризация означает также окончание раннего эмбриогенеза и переход эмбриона в стадию позднего эмбриогенеза.

Как видно из таблицы 2.1, продолжительность раннего эмбриогенеза дрозофилы около 2,5 часов. Существуют несколько классификаций стадий эмбриогенеза. В таблице 2.1 приведены две наиболее часто используемых номенклатуры

Таблица 2.1. Стадии эмбриогенеза дрозофилы (по Asburner, 1989)
(в сокращенном виде).

Стадия*	Стадия**	Продолжительность в мин.	Время час.мин.	Характерные признаки
1	1	25	0-0.25	1-е и 2-е деления-дробления
2	2	40	0.25-1.05	3-8 деления-дробления, «шапочка полярной цитоплазмы»
3	3	15	1.05-1.20	9-е деление-дробления, полярные клетки формируют почку
4	4	50	1.20-2.10	образование полярных клеток, синтициальная бластодерма
5	5	40	2.10-2.50	целлюризация, полярные клетки мигрируют
6	6	10	2.50-3.00	ранняя гастрюляция, инвагинация мезо- и энтодермы
7	7	10	3.00-3.10	окончание гастрюляции, инвагинация передней и задней первичной кишки
8	8 (часть)	30	3.10-3.40	сегментация
9	8 (часть)	40	3.40-4.20	дорзальные складки и исчезновение цефалической борозды
10	8 (часть)	60	4.20-5.20	образование парасегментных складок
11	10 (часть)	120	5.20-7.20	
12	10 (часть) - 11	240	7.20-9.20	
13	11 (часть)	60	9.20-10.20	полная сегментация
14	12 (часть)	60	10.20-11.20	начало инволюции головы
15	12 (часть)	100	11.20-13.00	
16	12 (часть)	180	13.00-16.00	
17	13-14		16.00- вылупл.	

* - стадии по Campos-Ortega and Hartenstein (1985), при 25°C.

** - стадии по Brownes (1975), при 22°C.

развития дрозофилы.

2.1.3. Поздний эмбриогенез дрозофилы.

Непосредственно по окончанию

целлюляризации клеточная бластодерма вступает в следующую стадию эмбриогенеза - **гастрюляцию**, то есть образование трех зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы. Началом гастрюляции является впячивание клеток вдоль

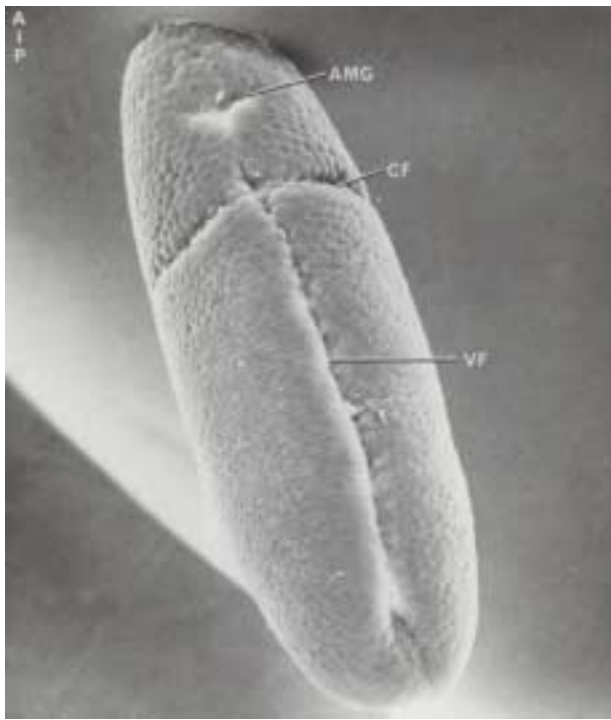


Рис.2.6а. Вид с вентральной стороны гастрюлы через 30 мин. после начала гастрюляции (предыдущий рис.2.5.). VF - вентральная борозда, CF - цефалическая борозда, AMG - переднее впячивание первичной кишки.

вентральной серединой линии - формирование **мезодермальной полоски** (рис.2.6 и 2.6а). Мезодермальная полоска включает по 8-10 клеток по обе стороны вентральной серединой линии, превращаясь в **вентральную борозду**. Эта борозда практически проходит вдоль всей длины эмбриона от переднего до заднего полюсов, и когда края борозды смыкаются формируется внутренняя трубка. Этот процесс совершается в течение нескольких минут. Мезодерма остается в контакте с поверхностным слоем эктодермальных клеток посредством тонкого перешейка шириной в одну-две клетки (рис.2.7). Таким образом, в результате гастрюляции формируется мезодерма вдоль передне-задней оси эмбриона. Вскоре начинается

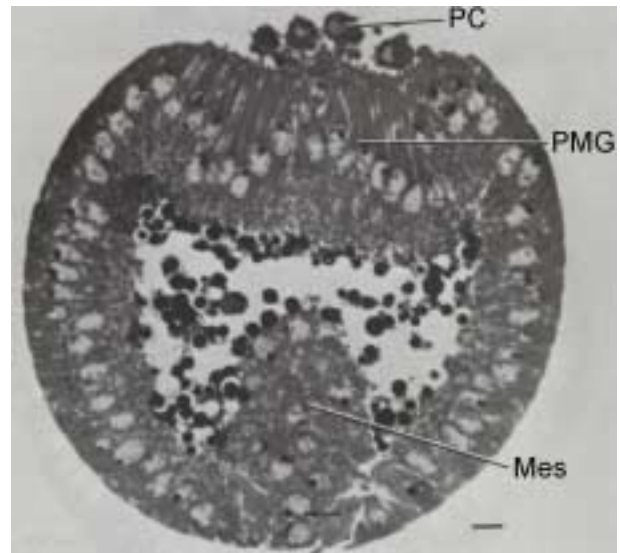


Рис. 2.7. Поперечный срез через эмбрион на ранней стадии формирования первичной кишки. Видно начало заднего впячивания (PGM) и вовлечение в этот процесс полярных клеток (PC). Mes - мезодерма.

инвагинация передней и задней частей зачатка кишки и образование личиночной кишки. Следует отметить, что передняя и задняя части личиночной кишки являются дериватами эктодермы и мезодермы, тогда как средняя является дериватом энтодермы и мезодермы. Дальнейшая дифференцировка кишки дает начало различным морфологическим структурам личинки, таким как рот, глотка, пищевод, кольцевая железа, желудок, мальпигиевы сосуды, анус и различные типы эпителиальных клеток (таблица 2.2).

Практически одновременно с образованием вентральной борозды происходит формирование **головной борозды (cephalic furrow)** на переднем конце зародыша (рис.2.6а). Эта борозда отделяет большую часть головы от туловища. Дорзальная часть головной борозды исчезает к 7-8-му часам эмбриогенеза.

Таблица 2.2. Производные первичной кишки (по Fullilove, et al., 1978)

Источник	Структура личинки
Стомодееум	рот глотка пищевод стомодеальная нервная система кольцевая железа слюнные железы (часть) двигаются через стомодеум
Передняя часть Некоторые полярные клетки и возможно клетки кишечника Задняя часть	прежелудок (часть) эпителий середнекишечной цеки эпителий средней кишки: 1. Большие клетки 2. Каликоциты 3. «железные» клетки мальпигиевые сосуды эпителий задней кишки анус

На 7-ом часу развития на другом конце начинается процесс сегментации. К 8-ому часу развития можно хорошо видеть, что имеется по меньшей мере 12 регулярных повторяющихся сегментов: три торакальных (грудных), T1 (переднегруди), T2 (среднегруди) и T3 (заднегруди), 8 абдоминальных (брюшных) (с A1 по A8) и 1 хвостовой (рис.2.5 и 2.8). В головной части эмбриона (примерно к 10 часу развития) можно видеть 6 сегментов, имеющих различную форму и как бы сливающиеся между собой: мандибулярный (Ma), максиллярный (Mx), нижнегубной (Lb), глазной (O), клипеолабральный (CL) и процефалический (PC) (рис.2.5 и 2.8). Из рис.2.5 можно видеть преемственность между сегментными структурами на поверхности эмбриона и преобразование их в сегментные структуры на теле личинки. Таким образом, эмбриогенез завершается

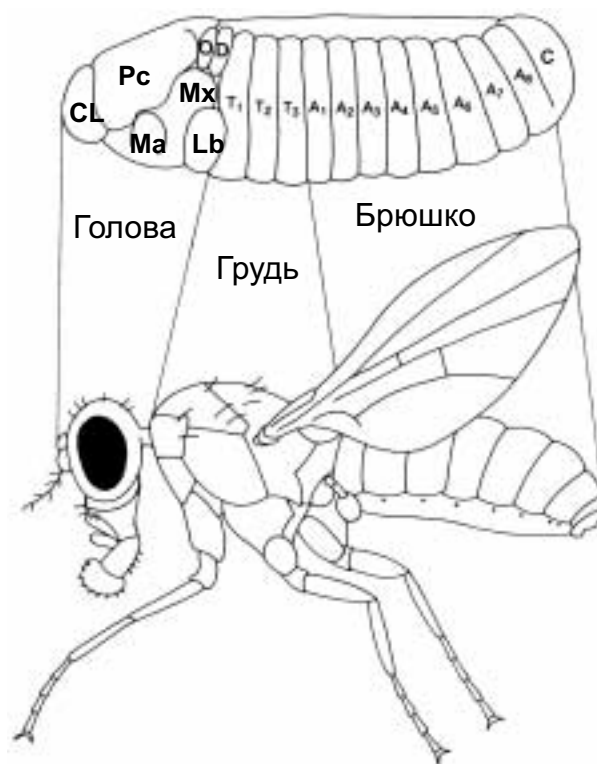


Рис. 2.8. Схема, показывающая соответствие между сегментами 8-и часового эмбриона и имаго. Обозначения сегментов те же, что и на рис. 2.5.

созданием метамерной структуры - образованием кутикулярных покровов и внутренних органов личинки.

Вылупливание личинки I-го возраста происходит через 22-24 часа от момента оплодотворения (рис.2.5). В таблице 2.1 приведены характеристики стадий эмбриогенеза дрозофилы и время протекания отдельных стадий.

2.1.4. Личиночная стадия развития.

На рис. 2.5 показана личинка I-го возраста. На переднем конце личинки находится рот с крюком (приспособление позволяющее личинке прикрепляться к субстрату), а на заднем конце анальное отверстие. Передний вентральный край каждого из 3 грудных и 8 брюшных сегментов окаймлен рядом **зубчиков (denticles)** - кутикулярных образований, хорошо видимых в поляризованном свете. Форма зубчиков различна в грудных и брюшных сегментах, что позволяет идентифицировать последние. Головные сегменты на поздних стадиях эмбриогенеза инвертируют таким образом, что голова оказывается внутри личинки, где 3 сегмента (Ma, Mx и Lb) дают начало ротовым структурам личинки. **Этот процесс называется инволюцией головы.**

Морфология личинки меняется незначительно в ходе развития, в основном увеличиваются ее линейные размеры. Конечно, это не исключает усложнение той или иной структуры. Например, можно отметить увеличение числа зубов в ротовом крюке у личинок I, II и III-го возрастов. Тем не менее именно рост характерен для личиночной стадии развития.

Необходимо, однако отметить, что в основе роста лежит не столько пролиферация и следовательно

увеличение числа клеток, сколько **полиплоидия и политенизация**. Гистологический анализ показывает, что большинство личиночных органов и тканей представлены либо полиплоидными клетками (например, мышцы, жировые тела) или клетками, имеющими политенные хромосомы (слюнные железы, мальпигиевые сосуды, эпителиальные клетки кишечника). Это результат либо эндополиплоидизации, при которой митоз не сопровождается цитокинезом, или нерасхождением хроматид (политенизация). Таким образом, при развитии личинки число клеток не увеличивается в большинстве органов и тканей, за исключением имагинальных дисков и их аналогов (гистобластов), нейробластов (клеток-предшественников нейральных клеток имаго) и клеток гонад. Имагинальные диски, гистобласты, нейробласты и клетки зачатков гонад представлены диплоидными клетками, которые однако слабо пролиферируют.

Заслуживают особого внимания типично личиночные образования, так называемые **имагинальные диски и их аналоги в абдоминальных сегментах- гистобласты**. Роль имагинальных дисков и гистобластов исключительно велика в онтогенезе дрозофилы. Именно эти личиночные образования являются материальными источниками формирования практически всех морфологических структур имаго (за исключением нервных ганглиев).

У личинки имеется 9 имагинальных дисков: лабиальный, клипеолабральный, глазо-антенный,

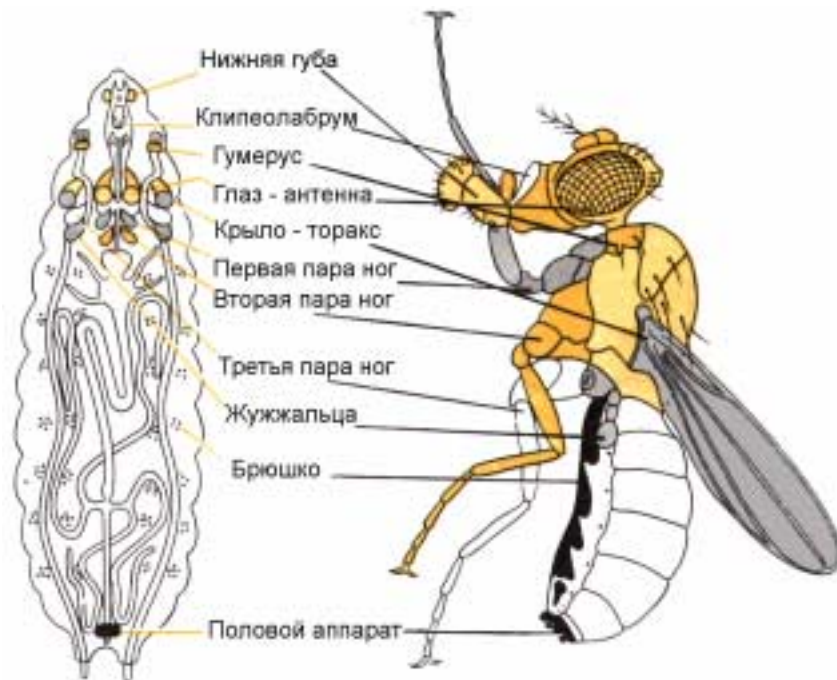


Рис.2.9. Имагинальные диски личинки *D. melanogaster* дают начало развитию различных структур на теле имаго. Абдоминальные стериты и тергиты развиваются из гистобластов (выделены в виде точек).

крыловой, галтерный, первый ножной, второй ножной, третий ножной и центральный или генитальный. Названия дисков указывают, источником каких структур взрослой мухи они являются. На рис.2.9 показано происхождение различных органов имаго из соответствующих имагинальных дисков. Например, видно, что различные ротовые структуры (“губы” (labrium) и их производные) развиваются из двух дисков - лабиального и клиполабрального. Глазо-антенный диск дает начало развитию антенны, ее производных и глаза. Гистобласты в каждом из 8 брюшных сегментов дают начало различным частям имагинальной кишки, клеток гемолимфы и многих других эпителиальных клеток соответствующих структур брюшных сегментов имаго (рис.2.9).

У личинки имагинальные диски

представляют собой небольшие группы диплоидных клеток, имеющих сходную морфологию. Вероятно, впервые имагинальные клетки появляются в позднем эмбриогенезе (примерно через 10 часов после оплодотворения), но как видимые морфологические структуры (диски), отделенные от других тканей и клеток, их можно идентифицировать только со стадии личинки первого возраста. Анализ мозаиков (соматических рекомбинантов, ниже этот подход будет рассмотрен более детально) позволяет определить число клеток, из которых состоят имагинальные диски в момент их детерминации. Оказалось, что, например, галтерный диск состоит из 10 клеток, которые уже на стадии клеточной бластодермы предетерминированы, чтобы дать начало развитию жужжальцам, а крыловой диск на этой же стадии представлен 20 клетками. Считается,

что презумптивные клетки будущих имагинальных дисков не пролиферируют в ходе эмбриогенеза; они пролиферируют на невысоком уровне у личинки до стадии окукливания. В ходе куколочной стадии (метаморфоза) происходит интенсивная пролиферация клеток во всех имагинальных дисках и их дифференцировка в дефинитивные структуры имаго. Клетки гистобластов не пролиферируют на личиночной стадии развития, но интенсивно делятся на куколочной стадии.

2.1.5. Тотипотентность и детерминация в эмбриогенезе дрозофилы.

Ядра до стадии синтициальной бластодермы являются **тотипотетными**. Такой вывод однозначно следует из экспериментов по трансплантации ядер, взятых от эмбрионов разных стадий развития, в энуклеированные яйца (неоплодотворенные яйцеклетки). Схема одного из таких экспериментов выглядит следующим образом. Донорами ядер были эмбрионы трех возрастов: 1) эмбрионы после 3-го деления дробления, когда 8 ядер находятся в центре цитоплазмы; 2) полярная зона синтициальной бластодермы после 7-го деления дробления, когда ядра впервые достигают заднего полюса; 3) латеральная сторона эмбриона на стадии синтициальной бластодермы (160 мин. после оплодотворения). Собственные ядра неоплодотворенных яйцеклеток удалялись с помощью микропипетки и затем в

энуклеированные яйца вводились донорские ядра. Все эмбрионы - доноры ядер имели генотип дикого типа, тогда как реципиентные энуклеированные яйца были генетически маркированы мутациями: yellow (y, желтый цвет тела), singed (sn, опаленные щетинки) и lozenge (lz^{50e} , маленькие глаза без ф а с е т о к). Большинство реконструированных яйцеклеток развивались нормально до вылупливания и личинки I-го возраста, и реже - до II- и III-го возрастов или окукливания. Таким образом, эти эксперименты показали, что донорские ядра от эмбрионов до стадии клеточной бластодермы способны обеспечить развитие реконструированных яйцеклеток до стадии личинки и даже куколки, то есть они несомненно обладали высокими потенциями. Анализ причин остановки развития реконструированных яиц показал, что процедура трансплантации и манипуляций с эмбрионами слишком травматичны и являются основной причиной гибели эмбрионов. В связи с этим, эксперименты были дополнены другим методическим приемом оценки потенциала развития тех или иных частей ранних эмбрионов. Речь идет о методе культивирования *in vivo* различных частей эмбрионов путем трансплантации их в брюшко взрослой самки. Трансплантированные таким способом эмбриональные клетки хорошо размножаются в гемолимфе брюшка реципиентной взрослой мухи. Более того, если такие эксплантаты ретрансплантировать личинкам III-го возраста (вступающих в метаморфоз)

клетки начинают дифференцироваться и давать начало дефинитивным структурам имаго. Комбинация методов пересадки ядер в энуклеированные яйца и культивирования *in vivo* разных частей дефективных эмбрионов, развившихся из реконструированных яиц позволила более полно раскрыть потенции донорских ядер. Результаты культивирования *in vivo* показали, что первичные трансплантаты, будучи перенесенными в метаморфизирующую личинку, дают начало развитию разнообразных структур имаго. Эти результаты убедительно показывают, что донорские ядра, в независимости от места их локализации в синтициальной бластодерме, обладают высоким потенциалом развития, то есть тотипотентны. В другом эксперименте по трансплантации ядер, взятых от эмбрионов на стадии ранней гаструлы, также наблюдалось развитие реконструированных яиц до личиночной стадии развития. Остановившиеся в развитии реконструированные эмбрионы или личинки были использованы в качестве доноров клеток. Донорские клетки были взяты из полярной плазмы или зачатка гонад и были трансплантированы в полярную область бластодермы или в область зачатка гонад личинки (рис.2.12 (нет)). После такой трансплантации донорские клетки перемешались с клетками реципиента и участвовали в формировании гонад, в результате чего у взрослых мух развиваются мозаичные гонады. Анализ этих мозаиков показал, что они

действительно способны продуцировать 2 типа гамет, одни гаметы генотипа реципиентного эмбриона (личинки), тогда как другие имеют генотип идентичный с донорскими клетками, которые в свою очередь берут начало от реконструированных яиц (рис.2.12 (нет)). Таким образом, вывод о том, что ядра до стадии синтициальной (и даже ранней клеточной) бластодермы тотипотентны (омнипотентны) достаточно обоснован.

Однако после целлюляризации большинство клеток бластодермы утрачивают тотипотентность и становятся **предерминированными (коммитированными)** к какому-то единственному пути развития (дифференцировки). Согласно определению В.Геринга (W.Gehring) процесс дифференцировки тотипотентной клетки можно разделить на 2 фазы: **первая фаза** - программирование клетки или собственно **детерминация** к развитию по одному единственному пути из множества возможных других. В современной литературе часто используется термин **коммитирование**, практически синоним детерминации, отражающий также ограничение путей развития. **Вторая фаза** - реализация программы развития, приводящая к появлению морфологических и биохимических характеристик (признаков) специализированной клетки. Применительно к дрозофиле, обе эти фазы значительно разобщены во времени: детерминация происходит на стадии клеточной бластодермы, тогда как появление разного рода

специализированных дифференцированных клеток и морфологических структур обнаруживается только у куколки перед вылетом имаго.

Какие же факты лежат в основе вывода, что клетки на стадии бластодермы становятся детерминированными к развитию тех или иных дефинитивных структур имаго? Существует немало экспериментальных данных (основанных на разных экспериментальных подходах), подтверждающих это положение. Например, если эмбрион (маркирован мутациями: *multiple wing hair*, множественные крыловые шетинки и *ebony* (е, черное тело)) на стадии клеточной бластодермы (3 часа развития) разрезать на две равные части (рис.2.13), а затем отдельно обе половинки смешать с клетками целых эмбрионов, маркированных другими мутациями (*ebony* (черное тело), *white* (w, белые глаза) и *forked* (вилчатые крылья)) и такую смесь трансплантировать в брюшко взрослой самки, то в этом случае можно наблюдать пролиферацию трансплантированных клеток. Однако, если клетки трансплантата поместить в метаморфизирующую личинку, то можно наблюдать их дифференцировку и образование различных структур имаго (рис.2.14). Гистологический анализ трансплантантов показал, что клетки передней части бластодермы дают начало только головным (антенна, глаза и др.) и торакальным (крылья, галтеры, и ноги) структурам, тогда как клетки задней области развиваются только в структуры задней

части имаго. Сходные данные были получены в экспериментах по смешиванию клеток передних и задних частей бластодермы, взятых от разных эмбрионов, маркированных разными мутациями. Смесь таких клеток была трансплантирована и в брюшко взрослой самки для культивирования *in vivo*. После достаточно продолжительного культивирования эксплантаты извлекались из брюшка и вводились в метаморфизирующие личинки. Как отмечалось выше, такой прием стимулирует клетки к дифференцировке. Гистологический анализ эксплантантов показал, что они давали начало различным имагинальным структурам: клетки, происходящие из передних частей бластодермы, развивались только в

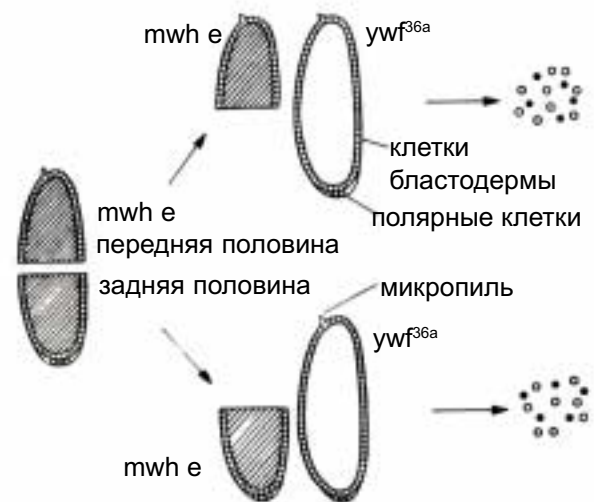


Рис.2.13. Экспериментальная процедура анализа состояния детерминации клеток разных районов бластодермы. Бластодерму генетически маркированных эмбрионов разрезали на две половины и отдельно соединили с целыми эмбрионами, несущими другие маркеры. Затем такие эмбрионы диссоциируют до однородной клеточной суспензии и культивируют *in vivo* (трансплантация в брюшко). Маркерные гены: *mwh* - *multiple wing hairs*; *e* - *ebony*; *w* - *white*; *f^{36a}* - *forked* (по Chan and Gehring, 1971).

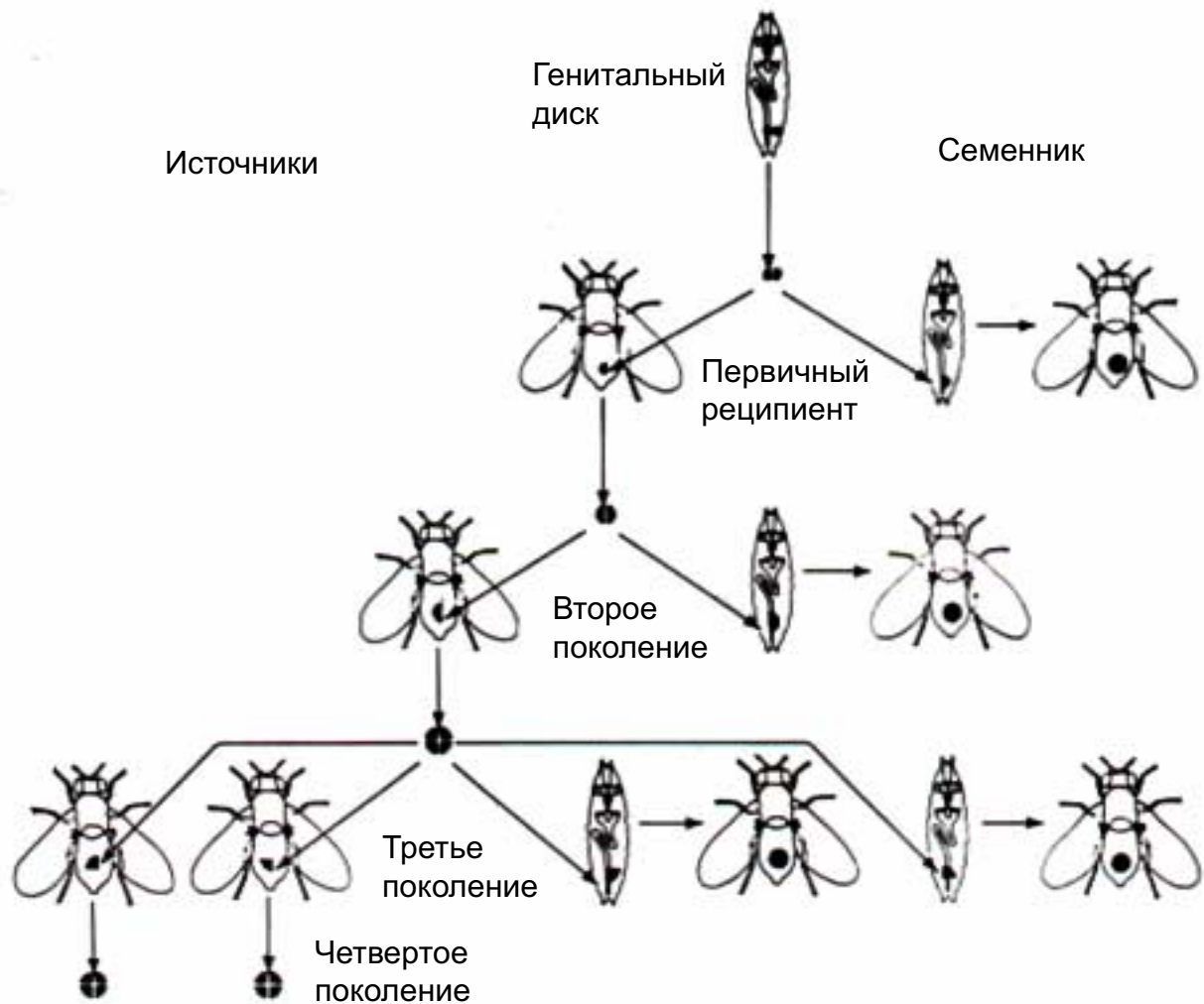


Рис.2.14. Схема культивирования *in vivo* в брюшке имаго на примере клеток генетального диска. Показана серия трансплантаций генитального диска в брюшко взрослых мух. В каждой генерации популяция клеток диска разделяется на две части; одна трансплантируется имаго, а другая - личинке. Таким образом, одна часть клеток культивируется и размножается в брюшке имаго, а другая часть клеток дифференцируется в эксплантате у личинки, формируя различные структуры (по Nadorn, 1968).

головные структуры, а из задних частей - только в структуры гонад и задние сегменты имаго. Существуют и другие приемы оценки детерминации клеток бластодермы, такие как, например, удаление или разрушение клеток в какой-либо части бластодермы. Как правило, это приводит к тому, что у имаго будет отсутствовать та или иная дефинитивная структура. Таким образом, **клетки, расположенные в разных частях бластодермы имеют индивидуальную судьбу в развитии, на этой стадии они**

предetermined к развитию в ту или иную дефинитивную структуру имаго.

Большой экспериментальный материал, подтверждающий это положение, был получен при исследовании генетических мозаиков. Это чисто генетический способ оценки детерминации. Известно, что эмбрионы дрозофилы, имеющие генотип XX, развиваются как самки, тогда как с генотипами XY и XO - как самцы. В лабораторных популяциях дрозофилы найдена мутация X

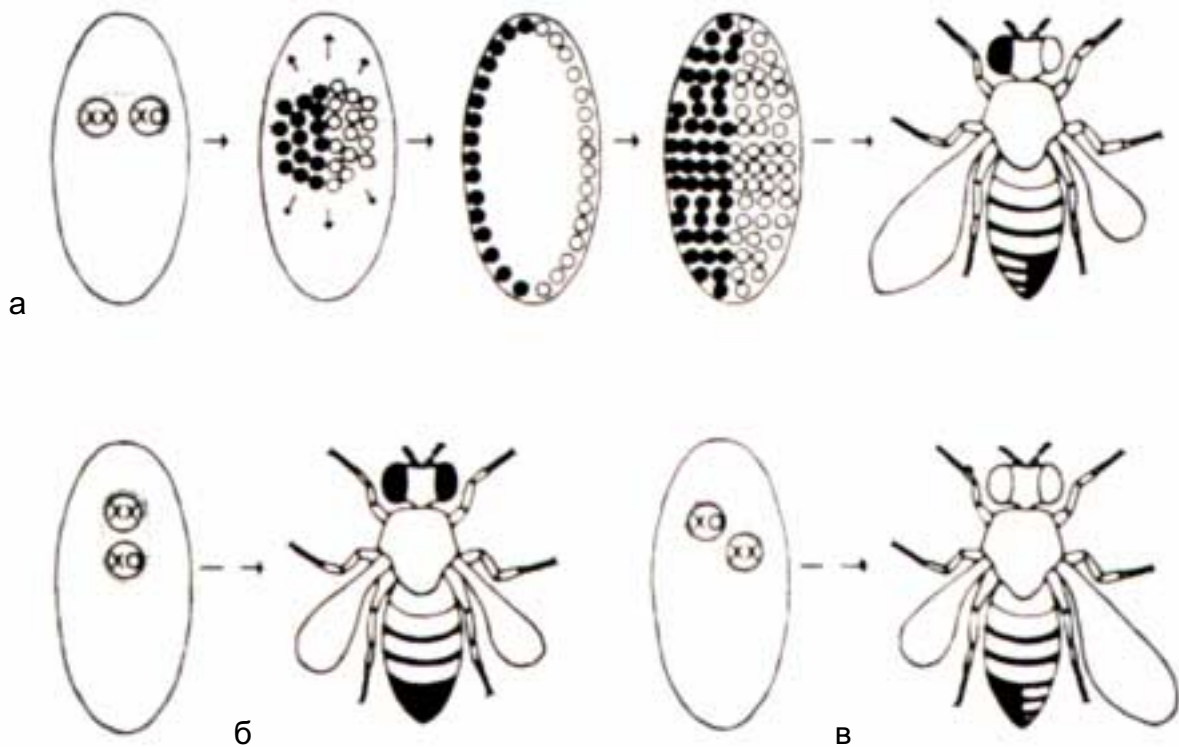


Рис.2.15. Образование гинандроморфов у *Drosophila melanogaster*. Утрата нестабильной кольцевой X-хромосомы при одном из ранних делений дробления приводит к образованию двух генотипически различных популяций ядер: XX (темные кружки) и XO (светлые кружки). Если в клеточной бластомере эти две популяции разделены по среднесагиттальной плоскости, то образуется мозаичная взрослая муха, у которой одна половина имеет мужскую, а другая - женскую морфологию. Если некольцевая X-хромосома несет рецессивные гены-маркеры, то они экспрессируются в мужской XO-половине. На это указывают укороченное крыло и белый глаз (муха в верхнем ряду). Две мухи в нижнем ряду иллюстрируют результаты утраты кольцевой X-хромосомы, за которой следует разделение гинандроморфов на женскую и мужскую части либо в передне-заднем (Б), либо в косом (В) направлении (Strckberger, 1976).

хромосомы, которая определяет ее кольцевую структуру. Анализ раннего развития гетерозигот по этой мутации показал, что при первых делениях дробления эмбрионы часто теряют кольцевую X хромосому. В результате элиминации кольцевой X хромосомы у эмбриона возникает два типа ядер (а позднее и клеток), одни имеют генотип XX, тогда как другие XO, то есть такие эмбрионы мозаичны и фенотипически развиваются как гинандроморфы, тело которых представлено структурами самки и самца. Рис.2.15 иллюстрирует

схематически возможные фенотипы гинандроморфов - мозаиков. Соотношение числа клеток обеих популяций определяется стадией, на которой элиминирует кольцевая X хромосома. Если ее потеря происходит после 1-го деления дробления, то взрослая муха будет иметь примерно равное число клеток женского и мужского типов. Если же ее потеря произошла на более поздней стадии развития, то доля клеток с мужским фенотипом (и соответственно структур на теле имаго) будет меньше по

сравнению с клетками женского типа. Визуализация клеточных клонов женского и мужского типов облегчается введением мутаций. Для этой цели используют рецессивные видимые мутации, например, yellow или/и white, введенные в нормальную X хромосому. В этом случае, потеря кольцевой X хромосомы сопровождается проявлением мутантного фенотипа в клетках XO, и тем самым, появляется возможность дискриминировать “женскую” и “мужскую” популяции в развитии мозаиков (рис.2.15).

Стертевант (A.Sturtevant) был пионером использования гинандроморфов для построения карты презумптивных зачатков структур взрослой мухи путем количественной оценки частоты, с которой появляются два органа с разнополюм фенотипом. Дальнейшее развитие этот подход получил благодаря работам Антонио Гарсиа-Белидо (Antonio Gracia-Belido) и Джона Мерриама (John Merriam), которые построили детальную “карту судьбы” клеточной бластодермы, то есть установили границы презумптивных зачатков на поверхности клеточной бластодермы, из которых развиваются различные дефинитивные структуры имаго. Они ввели меру физической близости на карте бластодермы презумптивных зачатков органов имаго (рис.2.16). Например, из экспериментальных данных следует, что у 10% проанализированных гинандроморфов первая и вторая пара ног имеют разнополюм фенотип, одна мужской, а другая женский, или наоборот. На “карте судьбы” это будет

соответствовать расстоянию между зачатками для первой и второй пар ног - **10 стертам** (рис.2.16). На рис.2.17 представлены суммарные данные по картированию презумптивных зачатков имагинальных органов на поверхности бластодермы. Хорошо видно сходство с организацией имаго вдоль передне-задней оси.

В настоящее время мало что известно о природе детерминации (коммитирования). Это одна из центральных проблем биологии развития. Роль отдельных факторов в становлении детерминации выявлена в экспериментах с пересадками ядер и цитоплазмы эмбрионов и анализе развития мозаиков.

Несомненно, в некоторых случаях, в детерминации существенную роль играет ооплазма (цитоплазма яйца). В качестве иллюстрации можно привести результаты опытов по микроинъекции цитоплазмы из заднего полюса синтициальной бластодермы в дорзальную или переднюю области другого эмбриона на этой же стадии развития (рис.2.17a). Как отмечалось выше, в заднем полюсе находится полярная плазма, место закладки будущих половых клеток. Эмбрионы - доноры цитоплазмы имели два маркера, доминантные мутации Bar (B) и Bar^s (B^s), в то время как эмбрионы-реципиенты несли две рецессивные мутации multiple wing hair и ebony в гомозиготном состоянии (рис.2.17a). На стадии клеточной бластодермы клетки, образовавшиеся на месте инъекции цитоплазмы (ооплазмы), были изъяты из реципиентных эмбрионов и ретрансплантированы

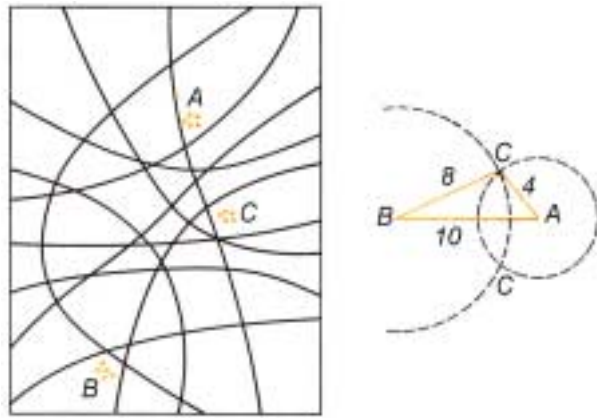


Рис. 2.16. Принципы построения карт зачатков органов. Двумерная непрерывная поверхность бластомеры построена из одного слоя клеток; слева на рисунке она показана в проекции на плоскость. На ней указаны три зачатка (А, В и С). На рисунке приведено несколько возможных линий, разделяющих бластомеру на два участка, один из которых состоит из клеток с фенотипом самки, а другой - с фенотипом самца; некоторые из этих линий находятся между зачатками. Чем больше расстояние между зачатками, тем больше вероятность, что у данного гинандроморфа разделительная линия пройдет между этими зачатками. В таком случае органы взрослого насекомого, возникшие из них, будут иметь различный пол и генотип. Частота гинандроморфов, у которых два данных органа различны по полу и генотипу, является мерой расстояния между их зачатками на карте. Один стерг - это единица, определяемая как такое расстояние между двумя сайтами, что разделительная линия между ними проходит у 1% всех гинандроморфов. На правой диаграмме сайты А и В расположены на расстоянии 10 стергов друг от друга; если расстояние между С и В - 8 стергов, то сайт С расположен на одной из двух точек пересечения, показанных на рисунке. Выбор между этими двумя точками можно сделать путем картирования данных трех сайтов относительно каких-либо дополнительных сайтов.

вторым реципиентным эмбрионам, несущим три рецессивные мутации yellow, maroonlike (коричневый цвет

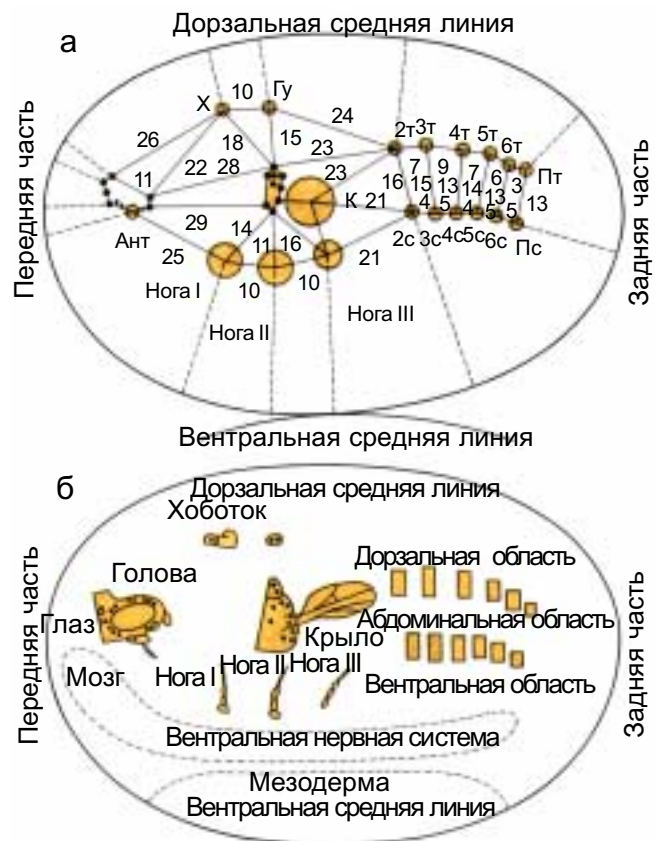


Рис.2.17. А. Карта зачатков бластомеры *D. melanogaster*, построенная по принципу, описанному на предыдущем рис.2.16; показаны сайты, из которых разовьются различные части тела имаго. Расстояние указано в стергах. Пунктиром обозначено расстояние до средней линии. Карта представлена как вид изнутри полой бластомеры. Ант - антенна, Г - глаз, Х - хоботок, Гу - гумерус, Н - нотум, К - крыло, Ж - жужжальца, Т - тергит, С - стернит, Гн - гениталии. Б - внешние части имаго наложены на поверхность бластомеры.

глаз) и *singed* (опаленные щетинки). Развившиеся взрослые мухи из таких эмбрионов давали потомство с фенотипом: множественные щетинки и черное тело, то есть имели идентичный генотип (*mwh e⁴*) с эмбрионами донорами клеток. Такие половые клетки могли сформироваться в эктопических местах только под воздействием инъекции полярной плазмы.

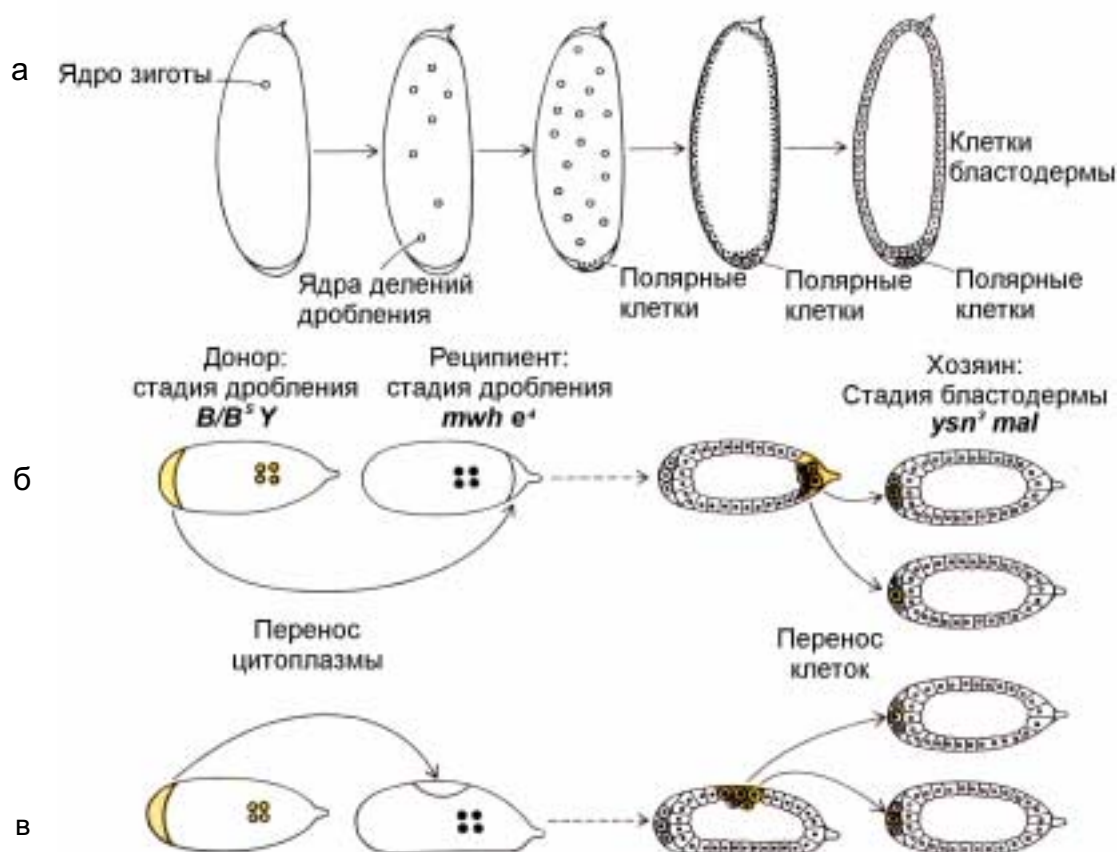


Рис. 2.17а. А. Полярные клетки в заднем полюсе эмбриона образуются до стадии клеточной бластодермы (после 10-11 деления-дробления) (Б и В). Присутствие детерминант полярных клеток в заднем полюсе эмбриона можно показать путем трансплантации ооплазмы из этой зоны в другие части зародыша, где они обычно не образуются (например, как на рисунке трансплантировать в район переднего полюса (Б), или дорзальную часть эмбриона (В)). Донором цитоплазмы (ооплазмы) были эмбрионы с X и Y хромосомами, маркированными доминантными мутациями *Var* (B и B^s). Яйца-реципиенты взяты из линии, гомозиготной по мутациям 3-й хромосомы: *multiple wing hair* (*mwh*) (множественные щетинки на крыльях) и *ebony* (*e⁴*) (черный цвет). Трансплантированная полярная ооплазма индуцирует образование полярных клеток в эктопическом месте, в переднем полюсе. Функциональную способность индуцированных полярных клеток можно выявить повторной трансплантацией этих клеток в задний полюс эмбрионов, маркированных рецессивными мутациями *yellow* (*y*) (желтый цвет тела), *singed* (*sn³*) (опаленные щетинки) и *maroonlive* (*mal*) (коричневый цвет глаз). Часть гамет, образуемых взрослыми мухами, развившимися из таких эмбрионов, несет маркеры *mwh e⁴*, а не *y sn³ mal*. Следовательно, индуцированные полярные клетки, генотип которых соответствует генотипу эмбрионов-реципиентов ооплазмы, являются истинными полярными клетками.

По мнению В.Фое (V.E.Foe), критическим моментом в раннем эмбриогенезе дрозофилы является асинхронность деления клеток эмбриона. Известно, что первые 13 делений дробления протекают синхронно, хотя последние 12-е и 13-е

проходят в виде “волны” вдоль передне-задней оси (рис.2.18). Затем наблюдается ярко выраженная асинхронность вхождения в 14-й митоз клеток различных частей бластодермы. Важно подчеркнуть, что происходит это за счет удлинения интерфазы. На

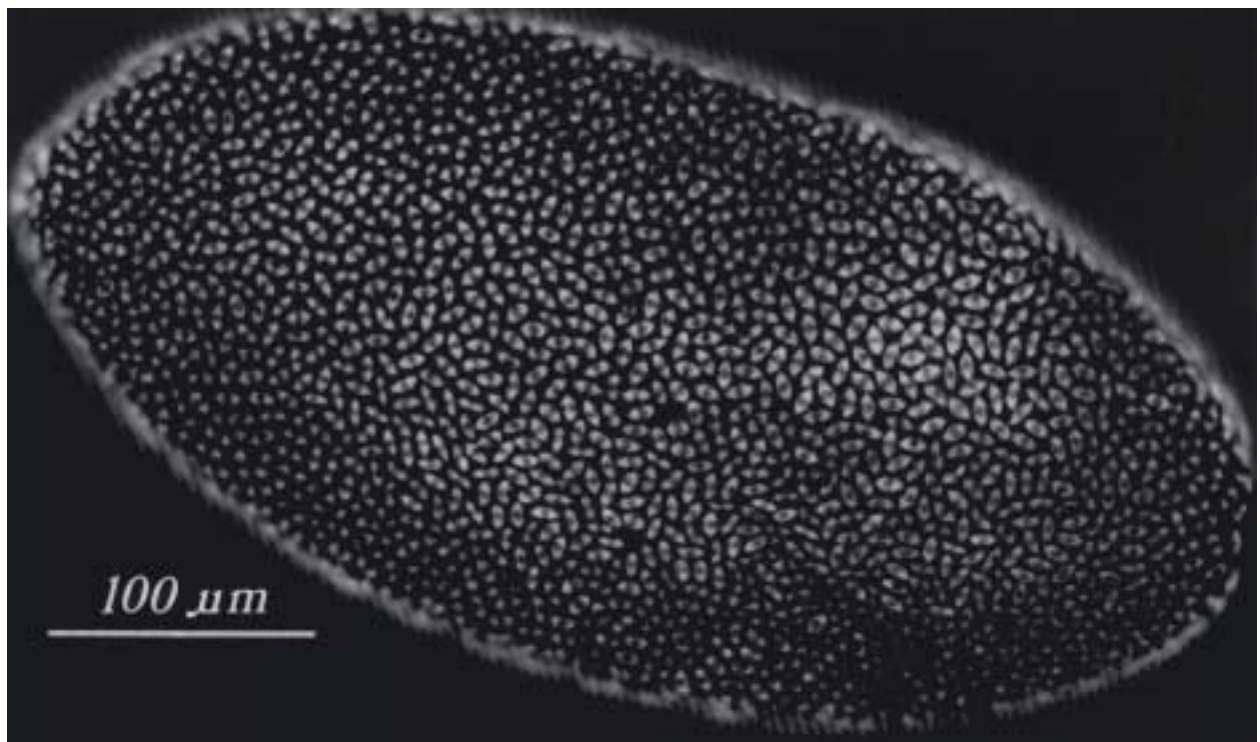


Рис. 2.18. Фиксированный эмбрион на стадии 13-ого деления, за 5 мин. до интерфазы 14-ого деления. Иммуно-флуоресцентная окраска с помощью антител против тубулина. Хорошо видно, что ядра синтициальной бластодермы делятся синхронно, все клетки находятся на стадии метафазы или начала анафазы.

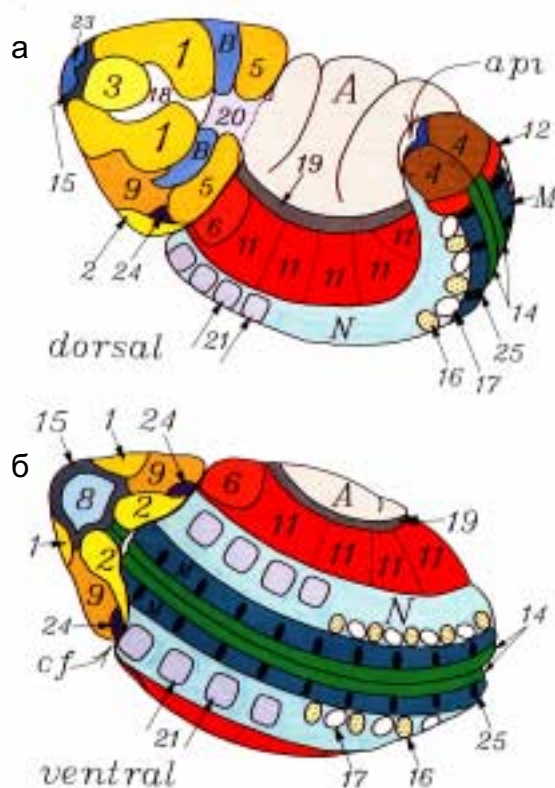


Рис.2.19. Митотические домены схематически спроецированные на эмбрион с дорзальной (А) и вентральной (Б) стороны. Головной конец слева. Различным цветом окрашены митотические домены. Цифры обозначают домены с синхронно делящимися клетками в соответствии с порядком вхождения их в митоз. N и M выделены домены, в которых клетки делятся менее синхронно, чем в пронумерованных доменах. А и В отмечены два домена, в которых клетки не делятся.

рис.2.19 показаны районы бластодермы, названные Фое “митотическими доменами”, в которых

14-й митоз протекает синхронно. Ею идентифицировано 25 таких доменов. На рис.2.20 показано время вступления каждого домена в 14-й митоз. Рис.2.21 иллюстрирует асинхронность деления в разных районах бластодермы и одновременно четкую синхронность внутри каждого домена. Более того, как видно из рис.2.22 в каждом домене можно наблюдать определенную ориентацию

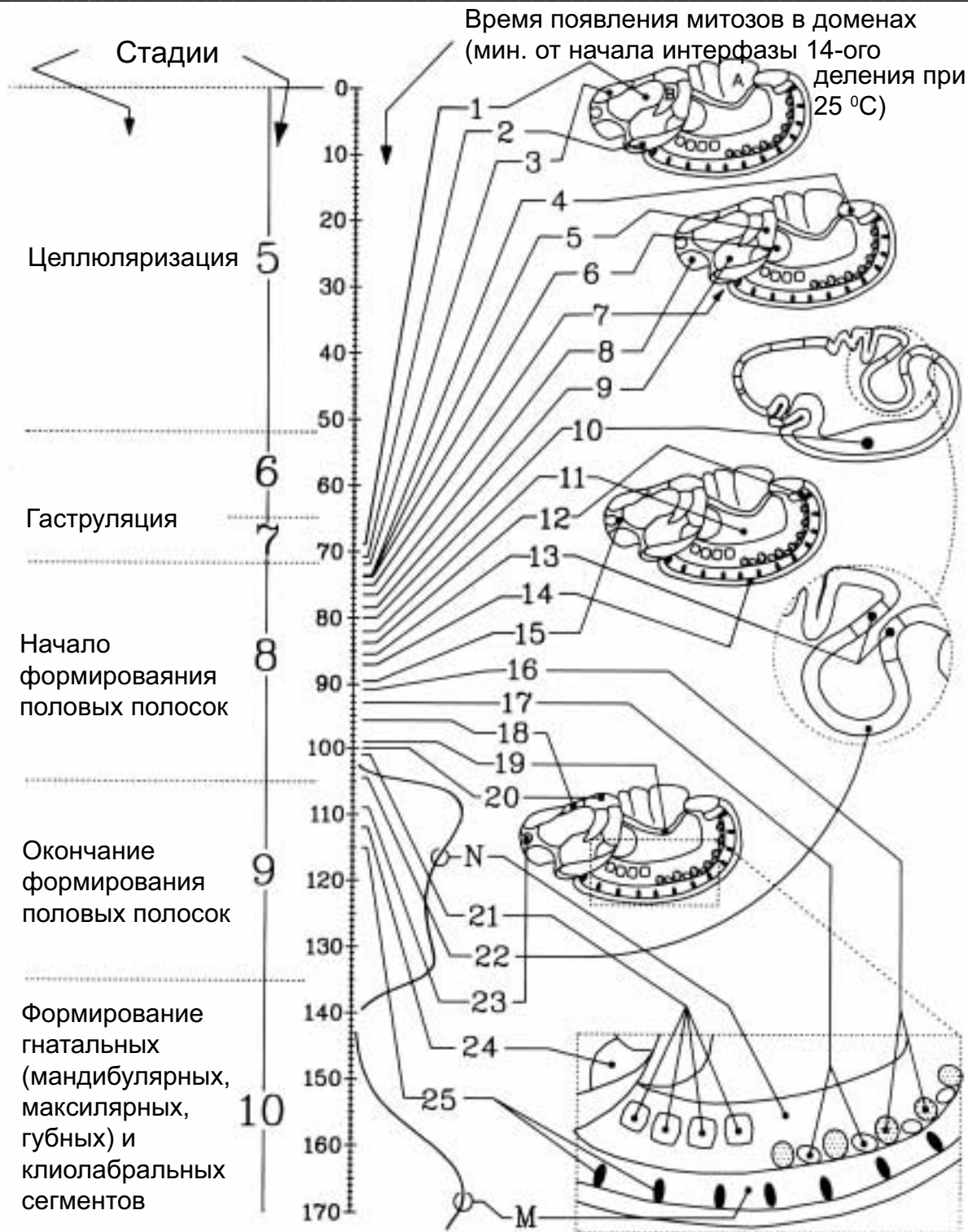


Рис.2.20. Графическое изображение разных стадий эмбриогенеза дрозофилы (слева указаны стадии с 5-ой по 10-ую и основные морфологические изменения, связанные с ними; справа схематически показаны эмбрионы в различных проекциях на этих стадиях) и «время появления митозов в митотических доменах» (временная шкала в центре дана в минутах от начала интерфазы 14-ого цикла деления). От временной шкалы проведены линии (с номером домена) к конкретному «митотическому домену» на поверхности эмбриона (по Фое, 1989)

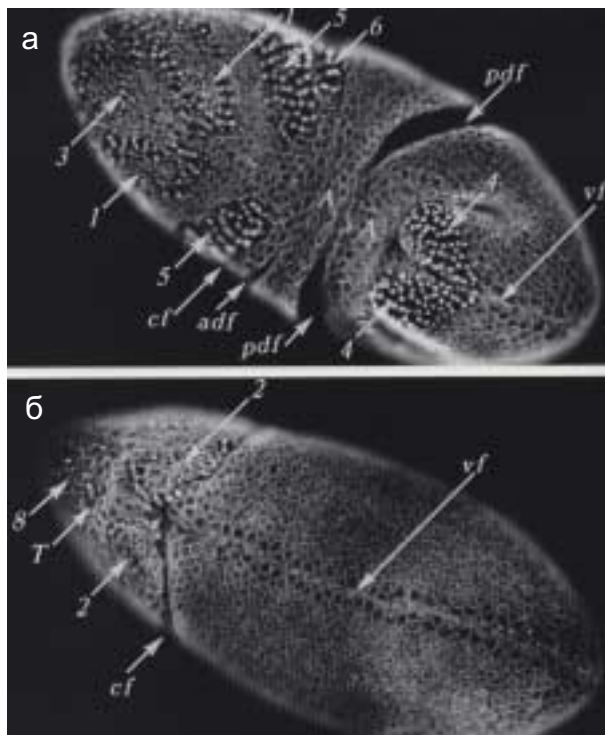


Рис 2.21. Вид эмбриона с дорзальной (А), вентральной (Б) сторон на 75-ой мин. начала интерфазы 14-ого деления. Большинство клеток домена 2 находятся на стадии телофазы, как и клетки в центре доменов 1 и 3. Клетки доменов 4,5,6 входят в метафазу, а небольшое число клеток доменов 8 и 9 находятся в профазе. Cf - цефалическая складка, pdf - задняя дорзальная складка, pc - полярные клетки, apf - амниопроктодеальная инвагинация.

экваториальных пластинок относительно передне-задней оси эмбриона. Учитывая, что асинхронность деления клеток бластодермы совпадает во времени с целлюляризацией и утратой клетками тотипотентности, М.Фое полагает, что эти явления каким-то образом взаимосвязаны. Даже при беглом взгляде, расположение “митотических доменов” на поверхности бластодермы удивительным образом совпадает с ее сегментацией и расположением зачатков будущих дефинитивных структур личинки и имаго. Более того, именно в этот период наблюдается

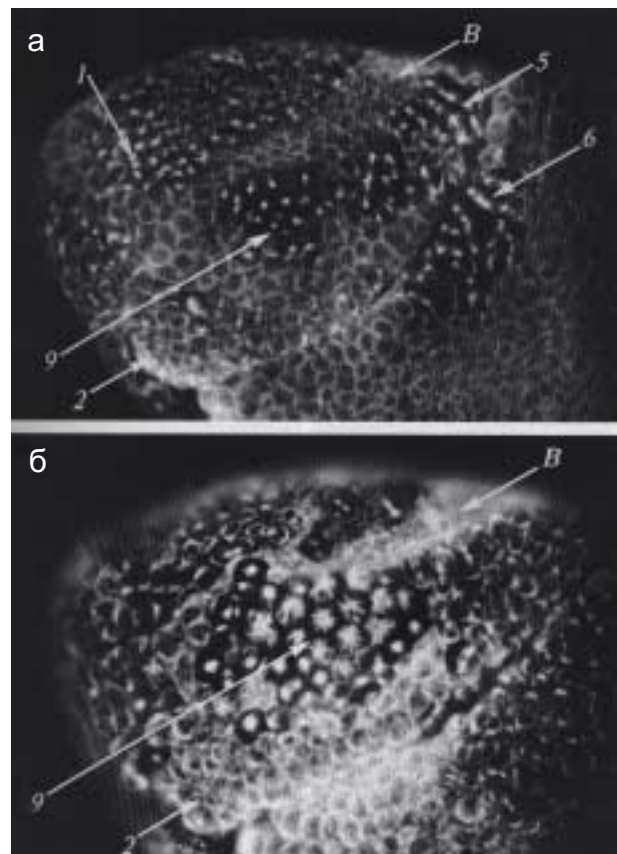


Рис.2.22. Радиально-расположенные митозы в домене 9 на 75 мин. (А) и 85 мин (Б) вхождения в 14-е деление. А - клетки в центре домена 9 входят в профазу. В - большинство клеток в анафазе. Анафазные клетки ориентированы под прямым углом к клеткам прилежащих доменов (сравни домен 9 в Б с доменами 5, 6 в А). Клетки домена 2 уже поделились. Клетки домена В не делящиеся.

активация многих зиготических генов, что контрастирует с предшествующим периодом, когда имеет место экспрессия единичных зиготических генов. Само по себе представление о связи репликации и генной экспрессии не ново, тогда как постулируемая связь утраты тотипотентности (коммитирование) и репликации не имеет еще надежного экспериментального обоснования, и требуются дополнительные исследования, чтобы внести ясность в решение этом интересном вопросе.

Как отмечалось выше, на

личиночной стадии развития имагинальные диски представлены недифференцированными клетками, которые предетерминированы дать начало тем или иным структурам взрослой мухи. В настоящее время мало что известно о ранних этапах формирования имагинальных дисков. На стадии личинки I-го возраста клетки

очень сложным морфологическим структурам имаго (ноги, крылья, различные части головы и т.д.), которые состоят из разного типа тканей и дифференцированных клеток - производных 2-х или 3-х зародышевых листков. Опыты по трансплантации разных частей одного диска или по локальному разрушению его клеток (с

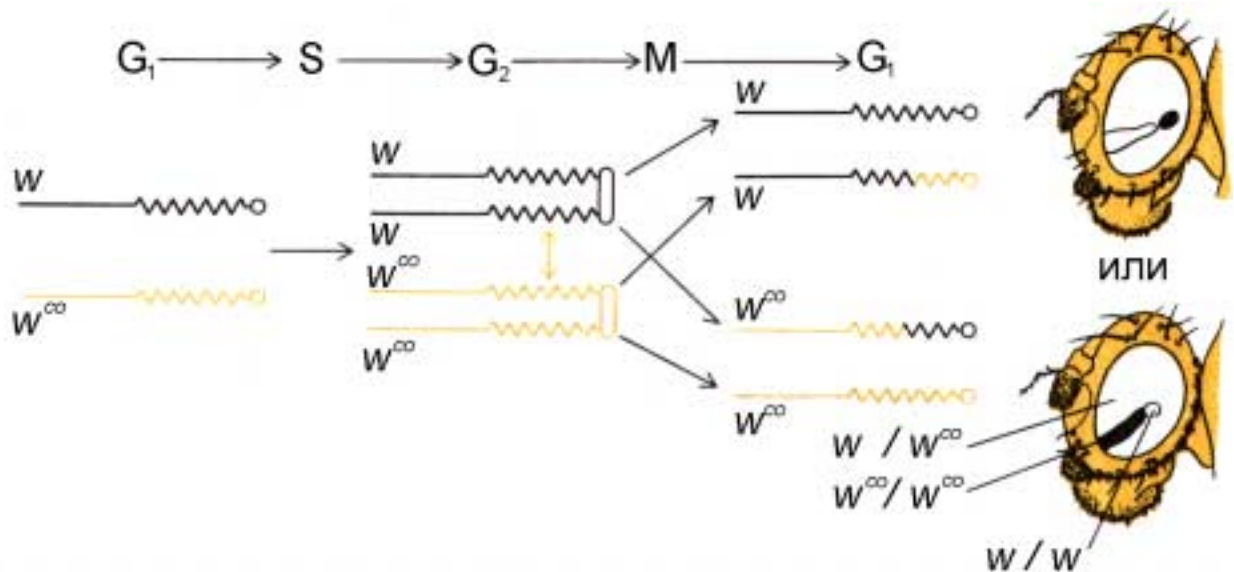


Рис.2.23. Митотическая рекомбинация в X-хромосоме *D. melanogaster*. Когда митотическая рекомбинация происходит в клетке глазного имагинального диска, нормальное расхождение хромосом в митозе приводит к развитию глаза с «парными пятнами». Аллели *w* и *w^{co}* принадлежат локусу *white*; глаза особи *w/w^{co}* имеют темно-красный цвет. Заметные различия в форме и размере пятен в задней и передней частях глаза свидетельствуют о влиянии положения клеток на их пролиферацию в процессе развития.

имагинальных дисков имеют сходную морфологию, и даже применение электронной микроскопии не позволяет выявить каких-либо морфологических признаков, позволивших бы дискриминировать разные части или индивидуальные клетки индивидуального диска. Несмотря на внешнее сходство клеток имагинальных дисков, пути их дифференцировки существенно различаются. В какой-то мере это можно было ожидать, поскольку индивидуальные диски дают начало

помощью тонкого пучка ультрафиолетового света) показали, что в первом случае зачастую из разных фрагментов одного диска развиваются разные структуры имаго и, следовательно, разные части одного диска имеют разные потенциалы развития. Во втором случае локальное разрушение клеток в одном диске приводило к тому, что у имаго не развивалась та или иная часть органа.

Сходные результаты были получены при анализе развития мозаичных эмбрионов, у которых была

индуцирована соматическая рекомбинация с помощью рентгеновского облучения. На рис.2.23 показана схема эксперимента по получения химерных мух посредством индукции соматической рекомбинации в X-хромосоме в глазном имажинальном диске. Эмбрионы гетерозиготные, например, по мутациям white (белые глаза) и white^{co} (кобальтовые глаза) были подвергнуты рентгеновскому облучению на личиночной стадии. В результате соматической рекомбинации (происходит в G₂) возникают 2 клон клеток гомозиготные по гену w и w^{co}, и как следствие у взрослой мухи возникают “парные пятна” белые и кобальтовые на темно-красном фоне окраски глаза. Размеры пятен зависят от стадии развития, на которой произошла рекомбинация; чем раньше произошло это событие, тем больше будут размеры пятен (клонов). Поскольку соматическая рекомбинация - событие редкое, то можно сделать вывод, что наблюдаемые “парные” пятна происходят из единственной презумптивной клетки. Анализ распределения “парных пятен” позволил сделать вывод, что глазоантенный диск представлен смесью клеток, которые предерминированы к дифференцировке в различные типы клеток и тканей, в частности, глаза и антенны развиваются из разных клеток этого диска.

Существует и другой экспериментальный подход, позволяющий выявить гетерогенность клеток как внутри индивидуального диска, так и между клетками,

принадлежащими к разным дискам. Метод заключается в смешивании в суспензии, например, клеток разных имажинальных дисков, предварительно меченых флюоресцентными красителями. Эти эксперименты показали, что клетки, принадлежащие к одному диску легко распознают друг друга и образуют ассоциации (агрегаты), не смешиваясь с клетками другого диска. Сходные результаты были получены в опытах по микроинъекциям красителей в клетки внешнего слоя диска. В этом случае краситель распределяется только среди клеток поверхностного слоя диска и не проникает в клетки, расположенные внутри диска. Результаты этих опытов показывают, что между клетками индивидуального диска существуют тесные контакты.

В настоящее время многие полагают, что специализация клеток внутри индивидуального диска происходит по типу прогрессирующей **компарментализации, формирования поликлонов**. На рис.2.24 схематически показана компартментализация разных частей презумптивного зачатка 2-го торакального сегмента, из которого разовьются вторая пара ног, крылья и структуры среднегруди. Согласно этой схеме, первоначально однородная группа клеток подразделяется на две группы вдоль передне-задней оси - поликлоны А и Р. Затем происходит сегрегация поликлонов, которые дадут начало развитию ног и крыльев. Далее, в каждом из дисков происходит компартментализация и выделение поликлонов вдоль дорзально-вентральной оси и, наконец, клетки

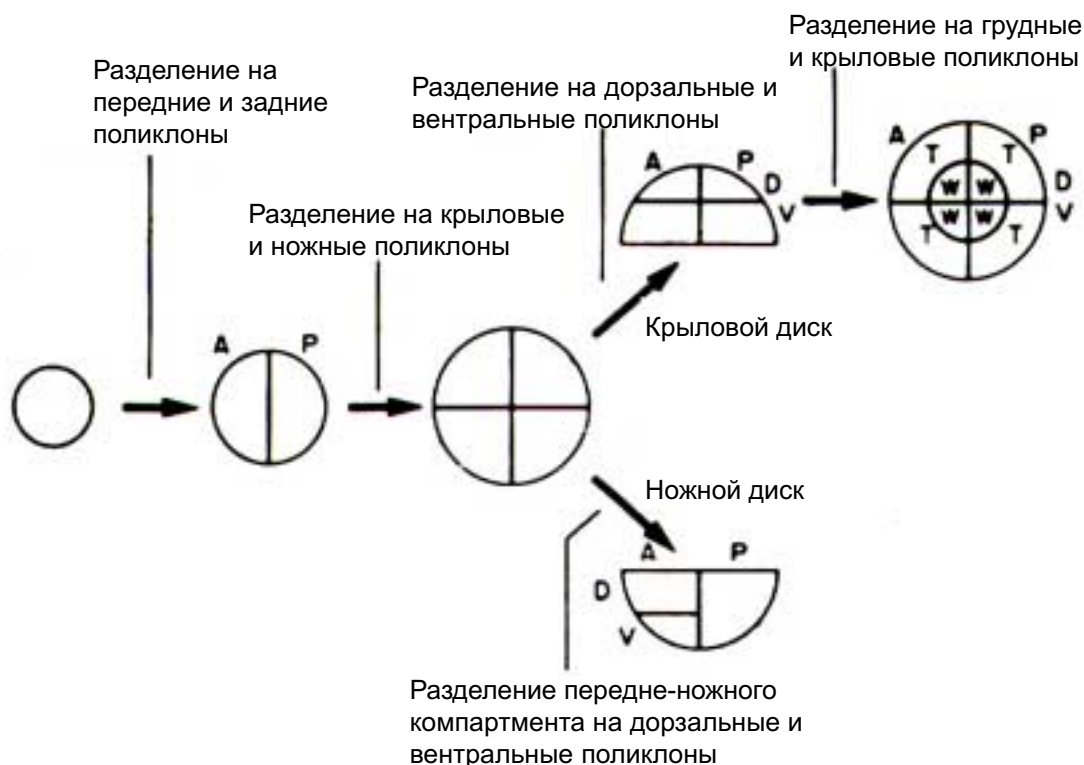


Рис.2.24. Способ компартментализации структур среднегруды у *D. melanogaster* (данные Morata и Laurence, 1977). А - передняя часть; Р - задняя часть; D - дорзальная сторона; V - вентральная сторона; Т - грудь; W - крыловая пластинка.

внешнего и внутреннего слоев в крыловом диске становятся различным образом преддетерминированными, в результате чего они дают начало развитию различных частей среднегруды: хитиновой структуры самой среднегруды, крыльев и более мелких структур таких как щетинки или ворсинки. В ходе компартментализации потенции индивидуальных компартментов (поликлонов) снижаются, происходит прогрессивное ограничение их возможностей давать развитие структуры как целого (среднегруды, ног и крыльев). Иными словами, в однородной первоначально группе клеток - предшественников (презюмтивных клеток) происходит формирование разных клонов клеток, преддетерминированных к развитию

какой-то частной структуры, и происходит это поэтапно путем увеличения числа этих компартментов (поликлонов).

В связи с явлением ранней детерминации презюмтивных клеток бластодермы и в последующем клеток имагинальных дисков, возникает вопрос: насколько стабильна детерминация в ходе пролиферации клеток-предшественников? Способна ли запрограммированная клетка, присущее ей уникальное состояние детерминации, передать в дочерние клетки? Выше был описан прием культивирования клеток в брюшке взрослой самки. Такой способ культивирования *in vivo* (в брюшке имаго) обеспечивает условия для пролиферации клеток, но при этом дифференцировка не происходит.

Дифференцировка таких клеток легко индуцируется переносом клеток в метаморфизирующую личинку. Опыты по длительному культивированию клеток генитального диска в брюшке имаго показали, что несмотря на многолетнее их культивирование (более 70 пассажей), как только такие клетки были трансплантированы личинкам входящим в метаморфоз, наблюдалась дифференцировка клеток в точном соответствии с их программой, детерминацией, давая начало развитию анальной пластинки, половым придаткам, семеизвергательному каналу или половым железам. Тем не менее, иногда наследование такой детерминации утрачивается в ходе культивирования. Например, часть клеток зачатка анальной пластинки может дать начало развитию ноги, антенне или глазу. Иными словами, презумптивные клетки генитального диска дифференцируются в структуры, которые в нормальных условиях развиваются из других имагинальных дисков. Такое явление получило название **трансдетерминации**. По своей сути, трансдетерминация означает смену программы развития, смену детерминации. Важно при этом отметить, что это не хаотическое случайное отклонение от первоначальной детерминации, а своего рода переключение на другую, альтернативную программу развития, свойственную в норме другой группе презумптивных клеток. **Единственное условие для нового раунда трансдетерминации - необходимость перманентной пролиферации**

клеток. Естественно, встает вопрос, возникают ли трансдетерминированные клетки в самом тестируемом пересаженном имагинальном диске, или же это клетки, которые мигрируют в него из реципиентного организма? Для того, чтобы дискриминировать клетки собственно имагинального диска от клеток реципиента, достаточно использовать генетические маркеры. Например, имагинальный диск взят от личинки, имеющей генотип *ebony*, а реципиент несет другую мутацию - *yellow*. В этом случае, все клетки дисков реципиента дифференцируются в желтые хитиновые структуры, тогда как клетки тестируемого диска формируют черные структуры и, таким образом, не представляет большого труда идентифицировать дериваты имагинальных дисков реципиента и тестируемого имагинального диска. Сложнее исключить возможность примеси клеток других имагинальных дисков при трансплантации клеток тестируемого диска. Тем не менее использование маркирования клеток с помощью соматического кроссинговера позволяет надежно дискриминировать контаминацию клетками других дисков от трансдетерминации, произошедшей в клетках тестируемого диска. В качестве примера можно разобрать результаты экспериментов с культивированием глазо-антенного диска. Донорами тестируемого имагинального диска были двойные гетерозиготы по генам *singed* и *yellow*. Личинки были подвергнуты рентгеновскому облучению, которое индуцировало соматический

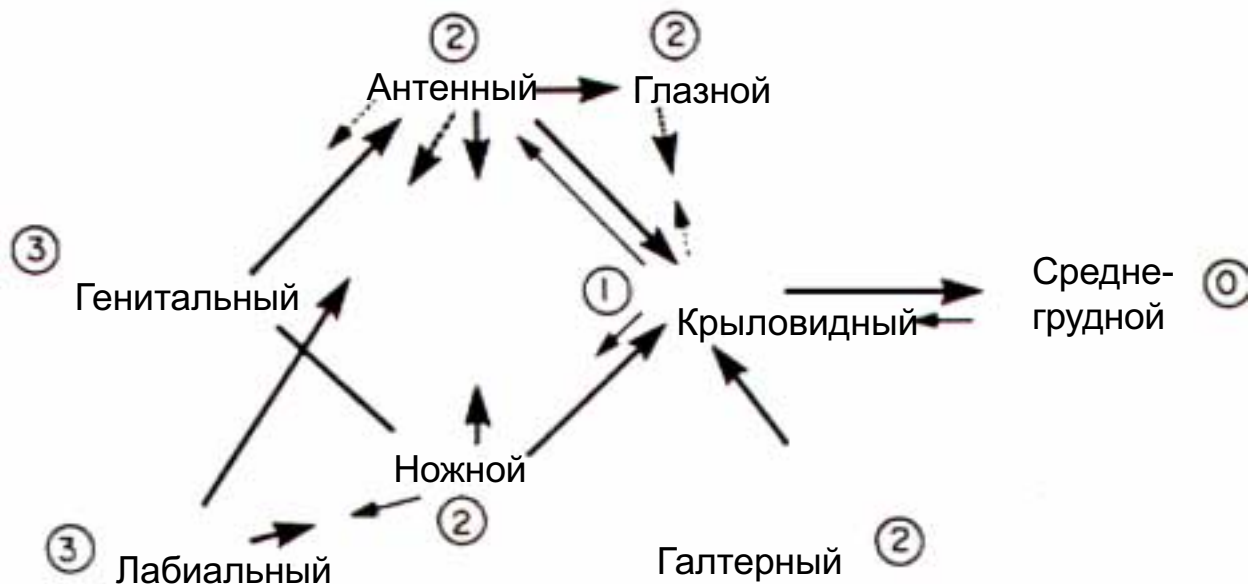


Рис.2.25. Пути трансдeterminации у дрозофилы. Длина стрелок пропорциональна частоте трансдeterminации. Стрелки, изображенные точками, указывают либо на исключительную редкость такого события, либо недостаточную доказанность. Цифры в кружочках показывают минимум шагов (этапов), необходимых, чтобы данный иммагинальный диск развился по типу среднегрудного (по Nadorn, 1978).

кроссинговер, в результате чего возникли клетки двойные гомозиготы по мутантным генам и двойные гомозиготы по аллелям дикого типа. Потомки таких клеток после дифференцировки были легко узнаваемы по цвету и форме щетинок. Соматический кроссинговер - явление редкое, сравнимое с частотой мутации. Из меченных таким образом клеток глазо-антенного диска при трансплантации *in vivo* развивались как нормальные, так и трансдeterminированные структуры (ноги, щупики и т.д.). Это исключает возможность примеси клеток из других иммагинальных дисков.

Изменение программы развития, трансдeterminация, в свою очередь достаточно стабильно передается в клеточных поколениях до следующего акта трансдeterminации. Таким образом, на вопрос «какова стабильность состояния

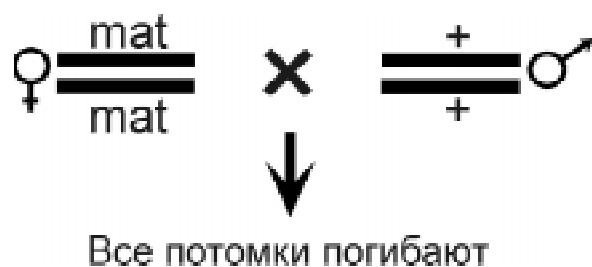
дeterminации?» можно ответить, что это состояние исключительно стабильно, но не абсолютно. С частотой не намного выше чем мутационная, возможна смена дeterminации на один из альтернативных путей дифференцировки.

Многочисленные эксперименты по трансдeterminации выявили также интересный феномен, который можно определить как **канализированность процесса трансдeterminации**. На рис.2.25 схематически показаны «пути трансдeterminации», то есть изменения программы развития иммагинальных дисков. Из рис.2.25 следует, что, например, генитальный диск может развиваться по типу глазо-антенного или ножного, но в то же время оба последних диска никогда не трансдeterminируют в генитальный. Иная ситуация складывается при трансдeterminации крылового диска.

Из рис.2.25 видно, что его клетки способны иногда развиваться в среднегрудь, тогда как обратный процесс происходит значительно реже. С другой стороны, клетки ножного и галтерного дисков способны к трансдетерминации по пути крылового диска, тогда как крыловой диск редко развивается по типу ножного и никогда - по типу галтерного. Согласно рис.2.25, необходимо несколько актов трансдетерминации, чтобы генитальный диск приобрел способность развиваться по типу среднегрудного. Такой путь включает 3 акта трансдетерминации, причем в определенной последовательности: первый акт трансдетерминации по пути антенного, затем крылового и, наконец, среднегрудного диска. Иными словами, **именно канализация трансдетерминации** в этом случае исключает “прямую” трансдетерминацию генитального диска в среднегрудной.

2.2. ГЕННЫЙ КОНТРОЛЬ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ.

Одним из подходов к поиску и идентификации генов, контролирующих развитие, является



анализ мутаций. Изучение 450 летальных мутаций, сцепленных с полом, показало, что остановка развития наблюдалась в 22% случаев на эмбриональной стадии, в 52% - на личиночной стадии и в 26% - на стадии куколки. Другая важная характеристика этих изученных мутаций связана с особенностями их наследования; более двух третей мутаций проявляли материнский эффект. Принципиальная схема выявления материнского эффекта любой мутации связана с 2-мя типами скрещиваний (рис.2.26).

Фенотипическое проявление мутаций материнских генов выражается в **женской стерильности (female sterile)**, то есть они не имеют какого-либо эффекта на мать, но необходимы для развития потомков, эмбрионов. Самки, несущие такие мутации, нормально откладывают яйца, но эмбрионы погибают на ранних стадиях развития. Общим свойством всех материнских генов является то, что они экспрессируются **перед оплодотворением**, хотя их продукты могут действовать как в ходе овогенеза, так и после оплодотворения, благодаря тому, что они могут сохраняться длительное время в цитоплазме и тем самым оказывать свое действие много



Рис.2.26. Передача летальной мутации, наследуемой по материнскому типу. Гомозиготность по гену *mat* (*mat/mat*) сама по себе не летальна, если материнская особь была гетерозиготна по этому гену (*mat/+*). Если же материнская особь была гомозиготна (*mat/mat*), то все потомки гибнут независимо от их генотипа.

позднее. Согласно Lewin (1994), гены с материнским эффектом делятся на **2 класса** в зависимости от места их экспрессии: гены, которые экспрессируются в соматических клетках матери, но имеют эффект на развитие яйца, называются **материнскими соматическими генами (“maternal somatic genes”)**, тогда как гены, которые экспрессируются в клетках зародышевого пути, называются **материнскими генами зародышевого пути (“maternal germline genes”)**. Первая группа генов экспрессируется в фолликулярных клетках (типичные соматические клетки) и принимает участие в формировании дорзально-вентральной оси эмбриона (см. ниже). Вторая группа генов активна в созревающем ооците или питающих клетках (клетки имеющие общее происхождение из презумптивного зачатка половых клеток, см. выше) и ответственна, в частности, за формирование передне-задней оси эмбриона.

В настоящее время все гены, контролирующие развитие дрозофилы, принято делить на 3 группы по их фенотипическому эффекту на развитие:

- 1. гены материнского эффекта или материнские гены**, главная функция которых контроль формирования полярности яйца (позиционной информации) и становление его пространственных координат;
- 2. гены сегментации**, которые определяют число и полярность сегментов эмбриона путем прочитывания позиционной информации и перевода ее в специфический паттерн сегментации;

3. гомеозисные гены, которые определяют сущность сегментов, характер и направление их дифференцировки.

2.2.1. Характеристика материнских генов.

Первая пространственная координата яйца, передне-задняя ось, формируется в процессе овогенеза путем поляризации цитоплазмы. Предполагается, что около 30 генов принимают участие в ее становлении. Следует иметь в виду, что индивидуальный вклад этих генов этот процесс различен, и потому ниже будут рассмотрены эффекты наиболее важных генов, ответственных за становление этой позиционной информации.

В настоящее время установлено, что **ген bicoid (bcd)** играет **решающую роль в формировании переднего полюса яйца и, тем самым, передне-задней оси**, что, в свою очередь, определяет развитие передних структур личинки и имаго - головы и груди. Мутации гена bicoid имеют летальный эффект, остановка развития происходит на стадии личинки. Морфологически мутантные личинки выглядят как симметричное образование, у которого передняя и задняя части представлены только абдоминальными сегментами с 5-го по 8-й, расположенными как зеркальное отображение. Мутантные личинки лишены головы и груди, а все органы, развивающиеся из задних абдоминальных сегментов, дублированы. Видимые отклонения от нормального развития у мутантных

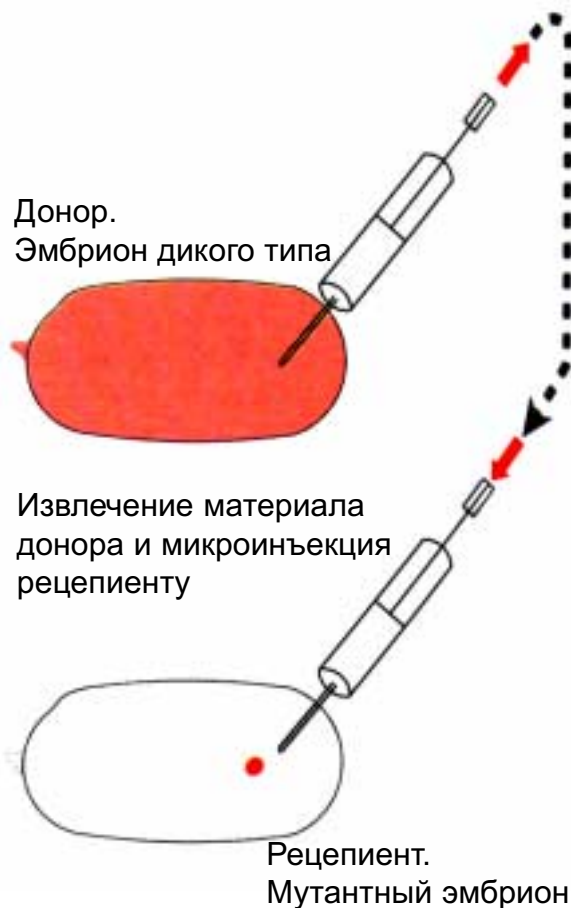


Рис.2.27. Коррекция мутантного фенотипа может быть осуществлена с помощью инъекции цитоплазмы, взятой от эмбрионов дикого типа.

эмбрионов начинаются со стадии гаструляции, когда наблюдается втягивание первичной кишки не только в задней части эмбриона, но и в передней. Важно отметить, что возможна коррекция мутантного фенотипа с помощью микроинъекций цитоплазмы, взятой из переднего полюса яйцеклеток дикого типа. Такая микроинъекция цитоплазмы в область переднего полюса мутантных яйцеклеток обеспечивает нормальное развитие мутантных эмбрионов. Схема такого эксперимента представлена на рис.2.27. Важно и то, что инъекции цитоплазмы, взятой из других частей цитоплазмы нормальных яиц, не вызывают коррекции развития

мутантов по гену *bicoid*. Эти данные показывают, что существует градиент этого морфогена в цитоплазме яйца с наивысшей его концентрацией в переднем полюсе. Под термином **“морфоген”** понимается такая **субстанция, локальная концентрация которой определяет судьбу или направление развития расположенных рядом с ним районов.**

Ген *bicoid* экспрессируется в ходе овогенеза в питающих клетках и затем его первичные транскрипты поступают в передний полюс яйца, в зону контакта питающих клеток и созревающего ооцита. Такой контакт питающих клеток с передним полюсом яйца предопределяет направление транспорта первичных транскриптов гена *bcd* непосредственно в передний полюс. В пользу такого предположения говорит тот факт, что мутантные яйца по гену *dicerphalic* имеют два микропиля, один в переднем конце, а другой в заднем, то есть наблюдается дупликация передних структур. При мутации *dicerphalic* питающие клетки разделяются на две группы и располагаются у обоих полюсов созревающего ооцита, тем самым создаются условия для транспорта транскриптов гена *bcd* в оба полюса яйца. Эффект мутации сравним с описанным выше эффектом микроинъекций цитоплазмы из переднего полюса в район заднего полюса, что индуцирует образование передних структур.

При нормальном развитии иРНК гена *bicoid* “заякоривается” на эндоплазматическом ретикулуме только в переднем полюсе. На рис.2.28

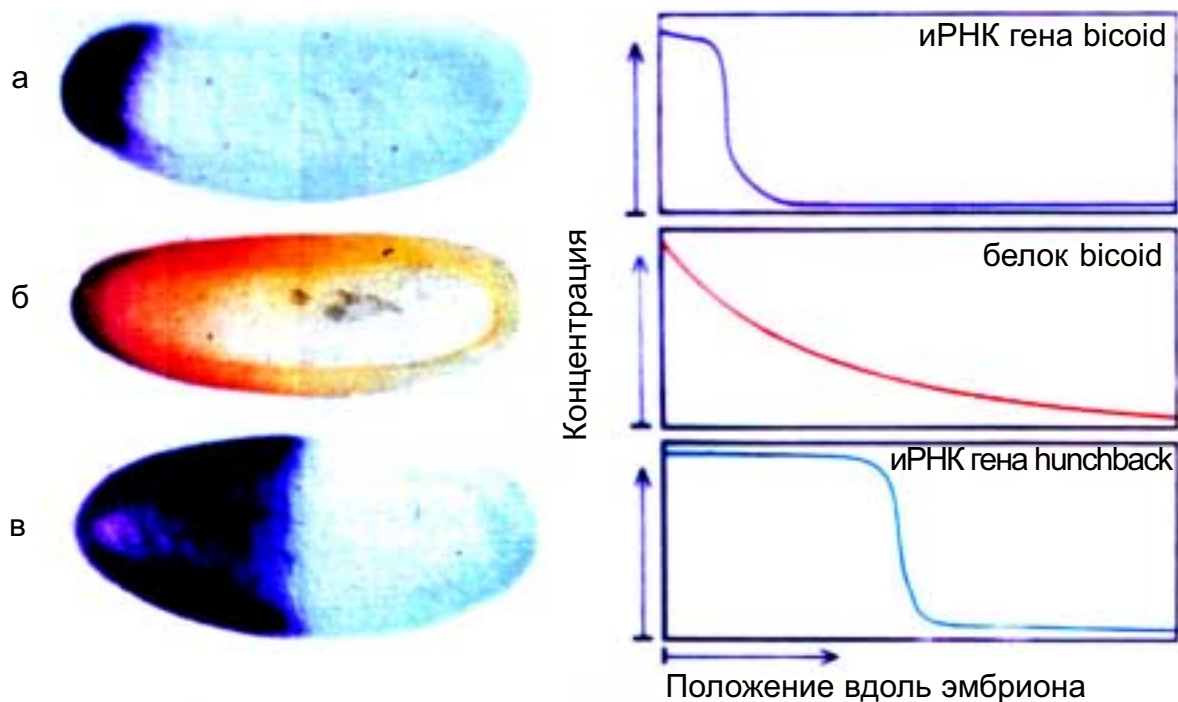


Рис.2.28. В только что отложенном яйце дрозофилы транскрипты гена *bicoid* находятся в переднем полюсе (А, слева). Через 2 часа после оплодотворения белок *bicoid* создает градиент в передне-заднем направлении (Б, слева). Белок *bicoid* только при определенной пороговой концентрации способен активировать ген *hunchback*, и потому ген *hunchback* активен только в половине эмбриона, прилежащей к переднему полюсу (В). Справа графическое изображение градиентов иРНК и белка *bicoid* и гена *hunchback*.

показаны результаты экспериментов по *in situ* гибридизации специфического зонда с иРНК гена *bicoid* в зрелой яйцеклетке. Хорошо видно, что транскрипты этого гена локализуются в очень узкой зоне переднего полюса. Предполагается, что такое локальное “заякоривание” осуществляется благодаря специфическому связыванию с белком, кодируемым геном *swallow* (*swa*). Мутации гена *swa* вызывают изменение локализации транскриптов гена *bcd*, так что зона их распределения выходит за пределы переднего полюса (рис.2.29). В настоящее время идентифицировано по-меньшей мере еще 2 гена, ответственных за транспорт и правильную локализацию первичных транскриптов гена *bcd*. На рис. 2.29

показаны эффекты мутаций трех генов: *exuperantia*, *swallow*, *staufen* на распределение транскриптов гена *bcd* в цитоплазме яйца дрозофилы. По-видимому 3' нетранслируемый район транскрипта гена *bicoid* также ответствен за специфическое “заякоривание” продукта этого гена в переднем полюсе.

Трансляция иРНК гена *bicoid* начинается вскоре после оплодотворения. Одновременно формируется градиент концентрации белка *bicoid* в передне-заднем направлении. На рис.2.28 показано распределение этого белка в цитоплазме яйца после 7-го деления дробления, и он сохраняется до стадии синтициальной бластодермы. На параметры градиента влияет число

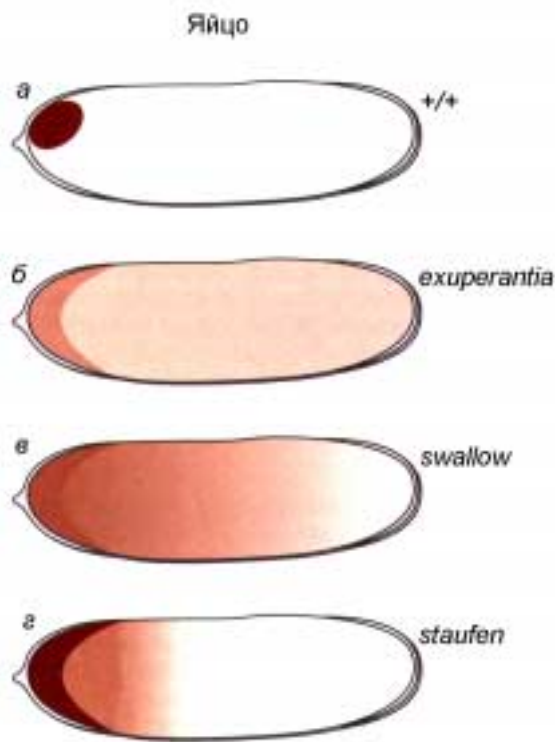


Рис.2.29. Схематическое изображение распределения первичных транскриптов гена *bicoid* в нормальном яйце (а), и мутантах по генам *exuperantia* (б), *swallow* (в) и *staufer* (г). Передний полюс слева, а задний справа.

копий гена *bcd*; увеличение числа копий повышает градиент (он становится круче) и вызывает расширение зоны формирования передних сегментов и, наоборот, снижение числа копий ослабляет его, что сопровождается увеличением зоны постериорных сегментов в переднем направлении. Таким образом, белок *bicoid* ведет себя как типичный морфоген, который в зависимости от его концентрации определяет формирование морфологических структур вдоль передне-задней оси.

Важным свойством белка *bicoid* является его способность связываться с ДНК, то есть это ядерный белок, который опознает специфические последовательности ДНК и связывается с ними. Ген *bcd* содержит

гомеобокс-содержащую последовательность сходную с таковой гена *paired* (*prd*) (ген *prd* принадлежит к группе генов сегментации). Более подробно регулирующая функция гена *bicoid* как транскрипционного фактора будет рассмотрена ниже.

За формирование заднего полюса эмбриона ответственна довольно большая группа генов (не менее 10), однако, продукты лишь некоторых из них обладают морфогенными свойствами. Мутации всех генов “задней группы” имеют сходство в своем фенотическом проявлении; мутации этих генов нарушают развитие структур из абдоминальных сегментов при абсолютно нормальном развитии головных и торакальных сегментов. Иными словами, эффект мутаций этих генов явно противоположен действию генов *bcd*, *swa* и *exu*, контролирующих становление переднего полюса.

Несомненно, ген *nanos* один из ключевых материнских генов, ответственных за формирование задней координаты яйца. Он экспрессируется в питающих клетках, а затем его иРНК транспортируется в задний полюс яйца, проходя через всю цитоплазму яйца в передне-заднем направлении. Транскрипты гена *nanos* локализуются исключительно в заднем полюсе яйца и у эмбрионов на ранних стадиях развития (рис.2.30). Трансляция иРНК гена *nanos* начинается вскоре после оплодотворения, и синтезированный белок, диффундируя, все же остается в пределах задней части эмбриона с наивысшей концентрацией в области локализации иРНК (рис.2.30).

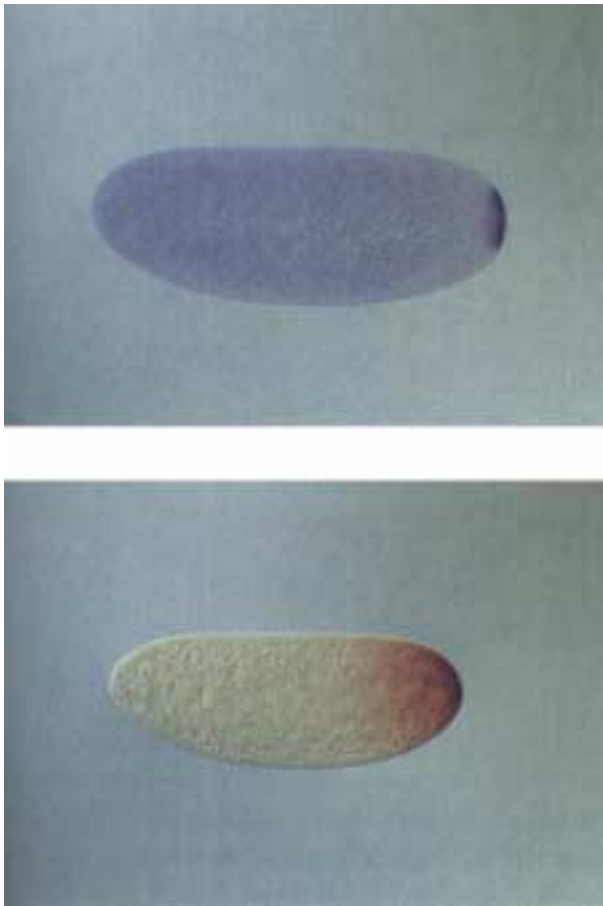


Рис.2.30. Первичные транскрипты гена *nanos*, они локализируются в заднем полюсе эмбриона. Верхний рисунок показывает распределение транскриптов методом гибридизации *in situ* у эмбриона на стадии 3-го деления-дробления. На нижнем рисунке показано распределение белка (с помощью меченых антител) *nanos* у эмбриона после 8-го деления дробления.

Имеются бесспорные экспериментальные данные, позволяющие сделать вывод, **что белок *nanos* является истинным морфогеном.** Это следует из опытов по инъекции цитоплазмы из заднего полюса нормальных яиц в цитоплазму задней части мутантных эмбрионов. В этих экспериментах наблюдалось нормальное развитие мутантных эмбрионов, причем не только по гену *nanos*, но и другим генам, контролирующим образование абдоминальных сегментов. Более того,

коррекция мутаций имеет место несмотря на то, что донорами цитоплазмы были мутантные эмбрионы (например, по гену *rumilio*), за исключением мутантов по самому гену *nanos*. Эти данные можно интерпретировать как то, что другие гены играют второстепенную роль в формировании заднего полюса, возможно участвуя лишь в регуляции транспорта или “заякоривания” продуктов гена *nanos*. Такая функция приписывается гену *rumilio*. Морфогенная активность иРНК гена *nanos* была показана в опытах по ее микроинъекции в другие участки цитоплазмы яйца. Такие инъекции индуцировали образование абдоминальных структур в эктопических местах личинки.

В отличие от переднего полюса, который содержит единственный морфоген *bicoid*, в заднем полюсе присутствует, по меньшей мере, два; один - упомянутый выше *nanos*, ответственный за контроль развития абдоминальных структур, и второй (до сих пор неидентифицированный)-ответственный за развитие полярных клеток, дающих начало развитию гонад. Мутации генов *sarussino*, *spire*, *staufen*, *oscar*, *vasa*, *valois* и *tudor* нарушают развитие как абдоминальных структур, так и формирование полярных клеток, тогда как *nanos* и *rumilio* - только абдоминальных структур. Многие исследователи полагают, что при формировании полярных клеток происходят последовательные взаимодействия между этими генами (рис.2.31). Так, например, активность генов *spire* и *sarussino* необходима,

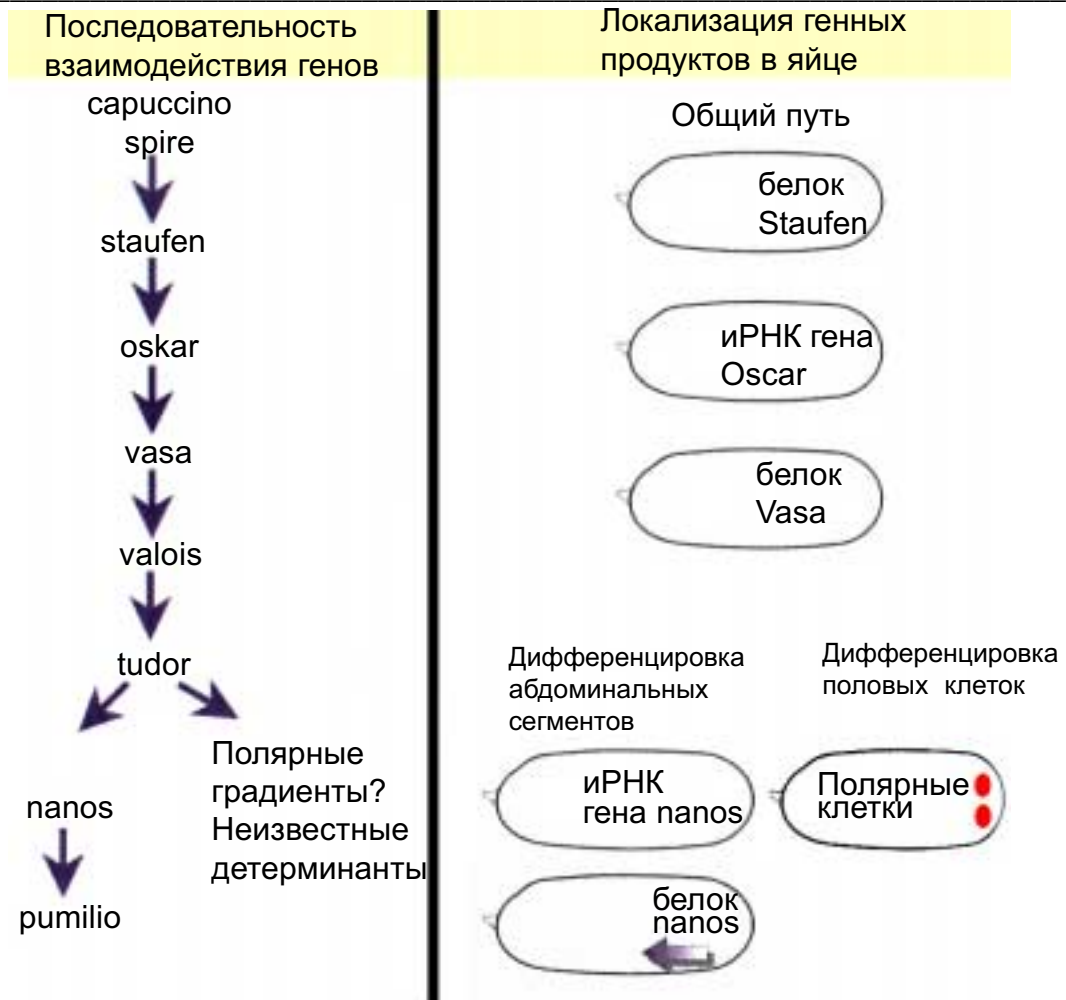


Рис.2.31. Схема взаимодействия генов, формирующих задний полюс, на основе которого в дальнейшем развиваются абдоминальные структуры и гонады имаго.

чтобы локализация белка Staufen (продукт гена *staufen*) была только в заднем полюсе. В свою очередь Staufen белок контролирует локализацию иРНК гена *oskar*, как предполагается через образование комплекса белка Staufen с иРНК гена *oskar*, образование которого происходит при участии гена *vasa*. Ген *vasa* кодирует РНК-связывающий белок. В случае избыточной экспрессии гена *oskar* или локализации его иРНК вне заднего полюса, наблюдается эктопическое образование полового зачатка. Однако при этом необходима активность генов *vasa* и *tudor* (рис.2.31). Это предполагает, что гены *capuccino*, *spire* и *staufen* определяют лишь

пространственную локализацию иРНК гена *oskar*, тем самым выступают как первые звенья цепочки взаимодействия генов в формировании полового зачатка (рис.2.31). Функция генов *tudor* и *valois* неизвестны.

Как полагает Nüsslein-Folhardt, ген *torso-like* играет также существенную роль в формировании передне-задней оси эмбриона и, возможно, обладает функцией морфогена. Интересно, что согласно ее данным, первичные транскрипты этого гена локализуются как в переднем, так и заднем полюсах эмбриона (рис.2.32). Однако функция этого гена не выяснена еще до конца, поскольку не идентифицирован белковый продукт

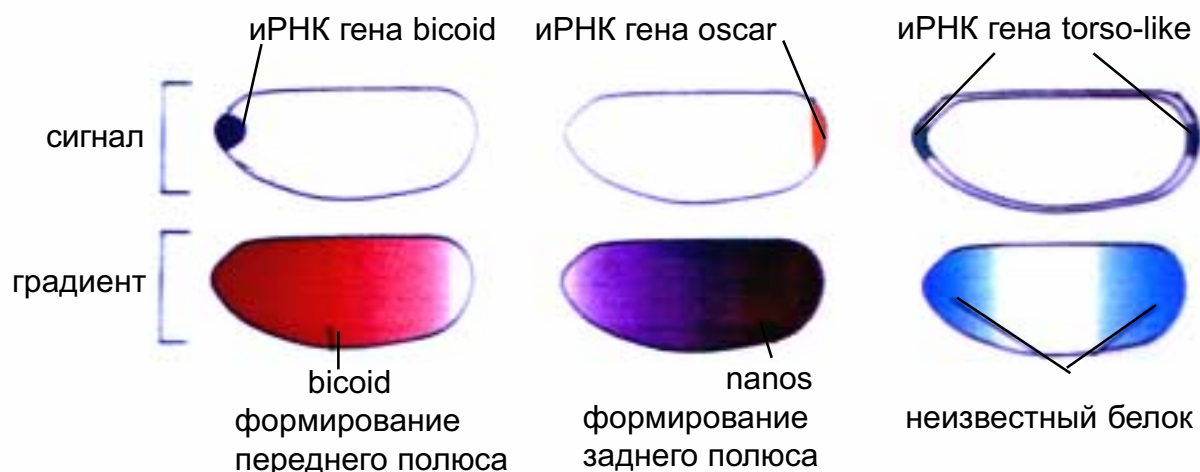


Рис.2.32. Три системы материнских генов организуют передне-заднюю ось эмбриона путем формирования градиентов транскриптов генов *bicoid*, *oscar*, *torso-like*. В свою очередь при трансляции иРНК этих генов создаются градиенты 4-х белков, что дает начало первому «разделению» эмбриона.

этого гена.

Суммируя данные о роли генов материнского эффекта в становлении передне-задней оси эмбриона, можно заметить, что небольшое число ключевых генов (вероятно, не более 4-х) ответственны за этот первый этап раннего развития - формирование позиционной информации.

Становление второй оси

эмбриона - дорзально-вентральной - осуществляется в период от момента оплодотворения до стадии клеточной бластодермы, то есть более растянуто во времени, нежели формирование передне-задней оси. На морфологическом уровне становление этой оси определяет развитие вентральных структур, основой которых является мезодерма и

Таблица 2.3. Гены дорзализации *D. melanogaster* (Anderson and Nüsslein-Volhard, 1984)

Локусы, контролирующие процесс гаструляции	Локализация на генетической или цитогенетической карте	Коррекция мутантных фенотипов с помощью инъекции	
		цитоплазмы	РНК
gastrulation defective	11A 1-7	-	н.о.
dorsal	36C	+	-
nudel	3-17	н.о.*	н.о.
tube	3-47	+	+
pipe	3-47	-	н.о.
snake	87D10-12	+	+
easter	88EF	+	+
Toll	97D	+	+
spätzle	97E	+	+
pelle	97F	+	+

*н.о. - не определялась.

нейроэктодерма. Дорзально-вентральная ось формируется при участии не менее 10 материнских генов (Таблица 2.3).

Большинство из этих генов рецессивные, и только ген Toll

этих мутаций наблюдается на стадии гаструляции, поскольку не формируется вентральная борозда и переднее впячивание кишки. Важно отметить, что инъекции цитоплазмы, полученной от эмбрионов дикого типа,

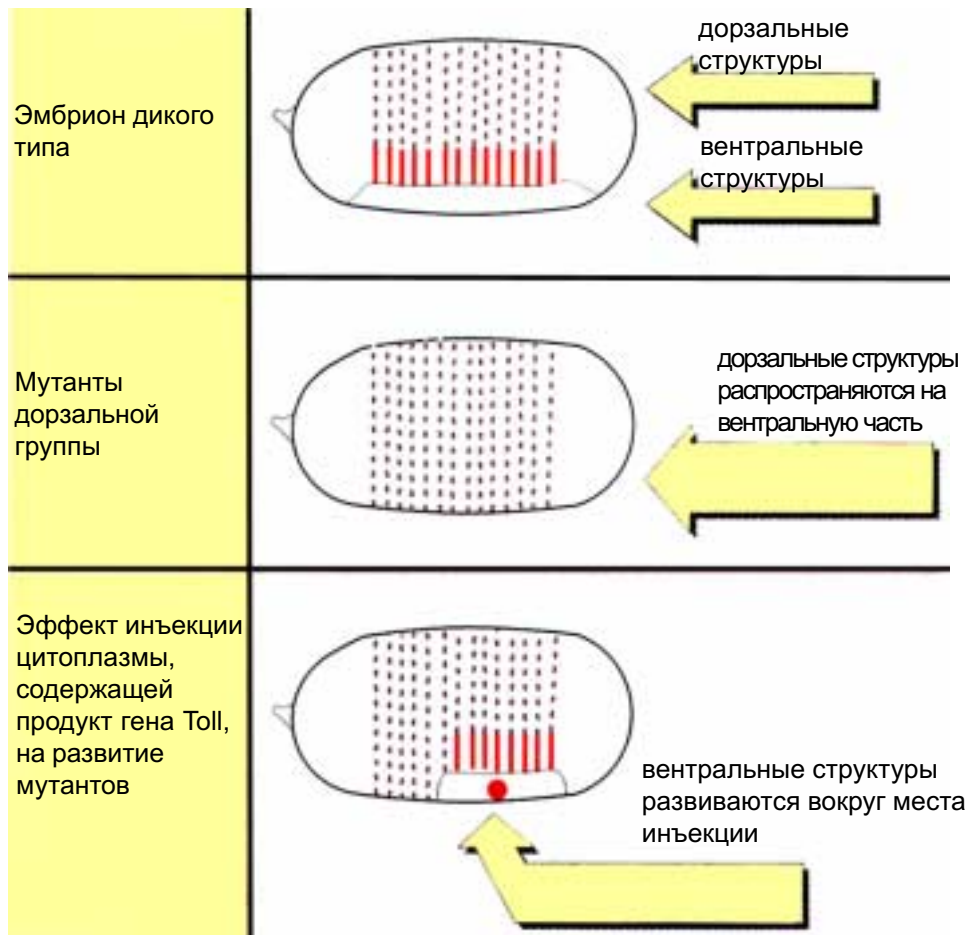


Рис2.33. У эмбрионов дрозофилы дикого типа дорзальные и вентральные структуры отчетливо различаются. Мутации по генам дорзальной группы препятствуют появлению вентральных структур, то есть происходит дорзализация вентральной стороны. Вентральные структуры могут быть восстановлены у мутантов посредством инъекции цитоплазмы от эмбрионов дикого типа, содержащих продукт гена Toll.

доминантный. Данная группа генов распределена равномерно по геному, и не наблюдается тенденции к их кластеризации (Таблица 2.3).

Мутации любого гена из этой группы вызывают нарушение формирования вентральных структур, и вместо них развиваются дорзальные - **феномен, называемый дорзализацией**. Видимое проявление

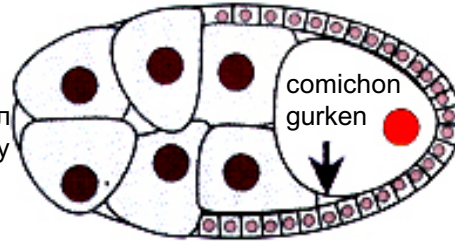
в той или иной мере способны корректировать эффект большинства мутаций (Таблица 2.3). Например, у мутантов по гену *snake*, такая инъекция полностью нормализует развитие. В случае мутации по гену Toll коррекция мутантного фенотипа с помощью инъекций зависит от места инъекции: если она сделана в вентральную область - развитие

полностью нормализуется, инъекции в дорзальную область эмбриона не оказывают корректирующего эффекта (рис.2.33).”Спасение” мутантов по гену *pelle* возможно только в случае,

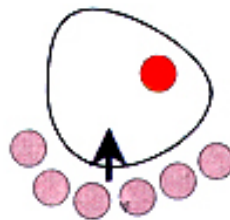
когда донором цитоплазмы служат эмбрионы, находящиеся на ранних стадиях развития до стадии поздней бластодермы. Предполагается, что на стадии бластодермы градиент иРНК

До оплодотворения

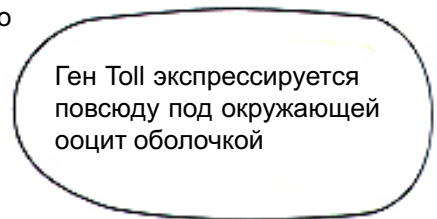
Гены в ооците посылают неидентифицированный сигнал фолликулярным клеткам к белку рецептору гена *torpedo*



Pipe, *nudel*, *windbeutel* в фолликулярных клетках посылают сигнал на вентральную сторону ооцита



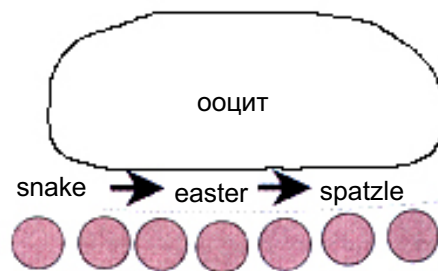
Ген *Toll* экспрессируется повсюду под окружающей ооцит оболочкой



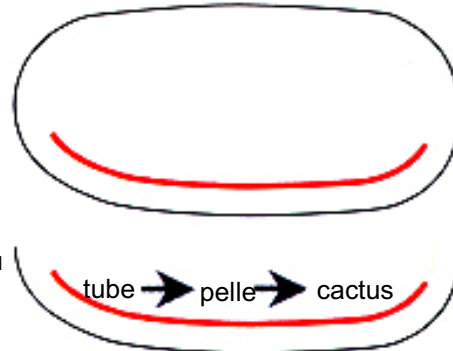
После оплодотворения

Гены *snake*, *easter* кодируют протеазы, которые способны активировать белок *spatzle*

Перивителлиновое пространство



Ген *spatzle* активирует белок *Toll* на вентральной стороне



Ген *Toll* действует через ген *tube* (функция неизвестна) и активирует ген *pelle*, кодирующий киназу, которая фосфорилирует белок *cactus*

Белок *cactus* высвобождает белок *dorsal*, который затем попадает в ядро

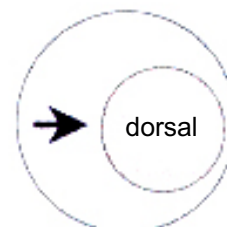


Рис.2.34. Становление дорзально-вентральной оси эмбриона происходит благодаря взаимодействию между фолликулярными клетками и ооцитом. Природа сигнала, который ответственен за появление белка *spatzle* на вентральной стороне, неизвестна, но затем *spatzle* связывается с белком *Toll*, что активирует этот морфоген. Цепь взаимодействия генов заканчивается тем, что транскрибируемый фактор *dorsal* достигает ядер.

гена *pelle* исчерпывается. Как следует из таблицы 2.3, инъекции суммарной РНК, или поли-А⁺РНК, выделенных из эмбрионов дикого типа, также способны нормализовать развитие мутантов.

Большинство генов этой группы экспрессируются в фолликулярных клетках и участвуют в сложных взаимодействиях фолликулярных клеток с созревающим ооцитом. Результатом такого взаимодействия является активация цепи молекулярных событий на вентральной стороне ооцита (рис.2.34). Взаимодействия фолликулярных клеток с ооцитом осложняются эффектами генов, которые контролируют формирование фолликулярных клеток самих по себе. Мутации таких генов, нарушающие развитие фолликулярных клеток, опосредовано через этот механизм вызывают также нарушение формирования дорзально-вентральной оси.

В настоящее время известно, что материнские гены *pipe*, *nudel* и *windbeutel* экспрессируются в фолликулярных клетках. Затем, неизвестным до сих пор образом, продукты этих генов участвуют в образовании сигнала, который поступает с вентральной стороны в яйцеклетку после ее оплодотворения (рис.2.34). Этот сигнал вызывает активацию серии протеолитических процессов на поверхности яйца. Показано, что продукт гена *snake* расщепляет белковый продукт гена *easter*, который в свою очередь активируется чтобы осуществить частичный протеолиз белка,

кодируемого геном *spatzle* (рис.2.34). Активированный благодаря частичному протеолизу, белок *spatzle* превращается в лиганд для рецептора, кодируемого геном *Toll* (рис.2.34). Ген *Toll* играет ключевую роль в дальнейшей передаче сигнала внутрь яйца. Белковый продукт гена *Toll* распределен по всей цитоплазме эмбриона. В то же время, по характеру своего действия такое равномерное распределение должно быть преобразовано в градиент с морфогенными свойствами. Как это достигается остается невыясненным. Тем не менее связывание лиганда есть абсолютно необходимое условие для формирования дорзально-вентральной оси. Процесс начинается на вентральной стороне эмбриона в перивителлиновом пространстве, то есть наиболее наружном слое (рис.2.34). Белок *spatzle* после частичного протеолиза либо остается фиксированным в перивителлиновом пространстве, либо очень быстро связывается с белком *Toll*. При этом важно отметить, что белок *Toll* активируется только на вентральной стороне эмбриона (рис.2.34). Как отмечалось выше, большинство мутаций гена *Toll* (тип “loss of function”) вызывает дорзализацию вентральной стороны эмбриона вследствие того, что рецептор не может быть активирован. Существует однако и противоположный эффект мутации гена *Toll*. Доминантная мутация *Toll^d* (тип “gain-of-function”) вызывает вентрализацию дорзальной стороны эмбриона. Такой необычный эффект связан с тем, что при мутации *Toll^d* происходит конститутивный синтез

белкового продукта. Эффект Toll осуществляется через взаимодействие с продуктами генов *tube* и *pelle*. Функция гена *tube* неизвестна, тогда как установлено, что ген *pelle* кодирует киназу (рис.2.34). “Мишенью” (the target) для этой киназы является белковый продукт гена *cactus*, который является регулятором транскрипционного фактора, кодируемого геном *dorsal* (рис.2.34). Не исключается также, что киназа (продукт гена *pelle*) может связываться непосредственно с транскрипционным фактором. **Продукты генов *dorsal* и *cactus* образуют взаимодействующую пару (“an interacting pair”) белков,** которая имеют значительное сходство с другой парой, транскрипционного фактора NF- κ B и его регулятора I κ B. NF κ B состоит из 2-х субъединиц (сходных по структуре), которые связываются в цитоплазме с I κ B. Когда происходит фосфорилирование I κ B, из комплекса освобождается NF κ B, который затем направляется в ядро, где функционирует как транскрипционный фактор генов, промоторы которых имеют так называемый мотив κ B. Многие исследователи полагают, что белок *cactus* регулирует *dorsal* тем же самым способом, как I κ B регулирует NF κ B, то есть комплекс *cactus-dorsal* неактивен в цитоплазме до тех пор, пока не произойдет фосфорилирование *cactus*, после чего освободившийся *dorsal* попадает в ядро. Таким образом, благодаря активации Toll устанавливается, в конце концов, градиент белка *dorsal* в ядрах эмбриона в вентрально-дорзальном направлении; на вентральной стороне *dorsal* локализуется в ядре, тогда как на



Рис.2.35. Белок *dorsal* образует градиент от вентральной к дорзальной стороне эмбриона. На вентральной стороне (внизу) белок находится в ядрах, на дорзальной стороне (вверху) ядра лишены этого белка, но он находится в цитоплазме.

дорзальной стороне - в цитоплазме. Этот градиент формируется на стадии синтициальной бластодермы и становится отчетливым в момент перехода синтициальной к клеточной бластодерме (рис.2.35). Таким образом, своеобразие дорзально-вентрального градиента состоит в том, что белок *dorsal* присутствует во всех клетках бластодермы, но на вентральной стороне он локализуется в ядрах клеток, тогда как на дорзальной стороне - в цитоплазме. Ген *dorsal* может выступать в роли как позитивного, так и негативного регулятора генной активности. Белок

dorsal способен активировать гены twist и snail, которые необходимы для развития вентральных структур, в то же время он подавляет транскрипцию генов decapentaplegic (dpp) и zerknüllt (zen), которые необходимы для развития дорзальных структур. Показано, что гены zen и dpp экспрессируются лишь на 40% на дорзальной стороне бластодермы. Продукт гена dpp является членом семейства ростовых факторов типа TGF β и контролируется геном dorsal так, что этот белок секретируется клетками только на дорзальной стороне. Белок dpp выступает в роли морфогена и детерминирует формирование дорзальных структур.

Суммируя данные по действию материнских генов, следует выделить их важнейшую функцию - **установление передне-задней и дорзально-вентральной осей эмбриона через формирование градиентов**, то есть действие этих генов детерминирует формирование пространственных координат эмбриона и градиенты, которые можно рассматривать как “запись” позиционной информации. В свою очередь, позиционная информация считывается зиготическими генами, среди которых **первыми активируются гены сегментации**.

2.2.2. Роль генов сегментации в развитии.

Согласно классификации генов, описанной выше, гены сегментации контролируют число и полярность сегментов. Существует, по меньшей мере, 2 типа терминов, обозначающих

полярность сегмента: согласно одному внутри одного сегмента можно выделить передний и задний компартменты (рис.2.36). Например, торакальный сегмент Т3 состоит из передней части А и задней Р или Т3А и Т3Р (рис.2.36). Такая картина сегментов более характерна для более поздних стадий развития (примерно к 10 часу). На начальных стадиях сегментации (на стадии гастрюляции) используют термин **парасегменты** со своей системой нумерации для обозначения первых морфологических признаков метамерии (рис.2.36). Например, те же части сегмента Т3 (Т3А и Т3Р) по этой номенклатуре будут обозначаться как парасегмент 4 или парасегмент 8, состоящий из двух компартментов А2Р и А3А (рис.2.36). К 4-5 часу развития эмбриона, когда только намечаются первые борозды на его поверхности, можно видеть формирование парасегментов. К 9 часам развития, когда сегменты хорошо выражены как морфологические структуры, можно заметить, что передняя часть (компартмент А) развивается из одного парасегмента, тогда как задний компартмент из последующего парасегмента. В соответствии с этим, происходит как бы “преобразование” (конечно условное, чисто терминологическое) пар Р-А из 2-х парасегментов в А-Р пару одного сегмента (рис.2.36).

В настоящее время установлено, что не менее 30 генов ответственны за процесс сегментации. В таблице 2.4 приведен список генов сегментации и эффекты мутаций этих генов в развитии.

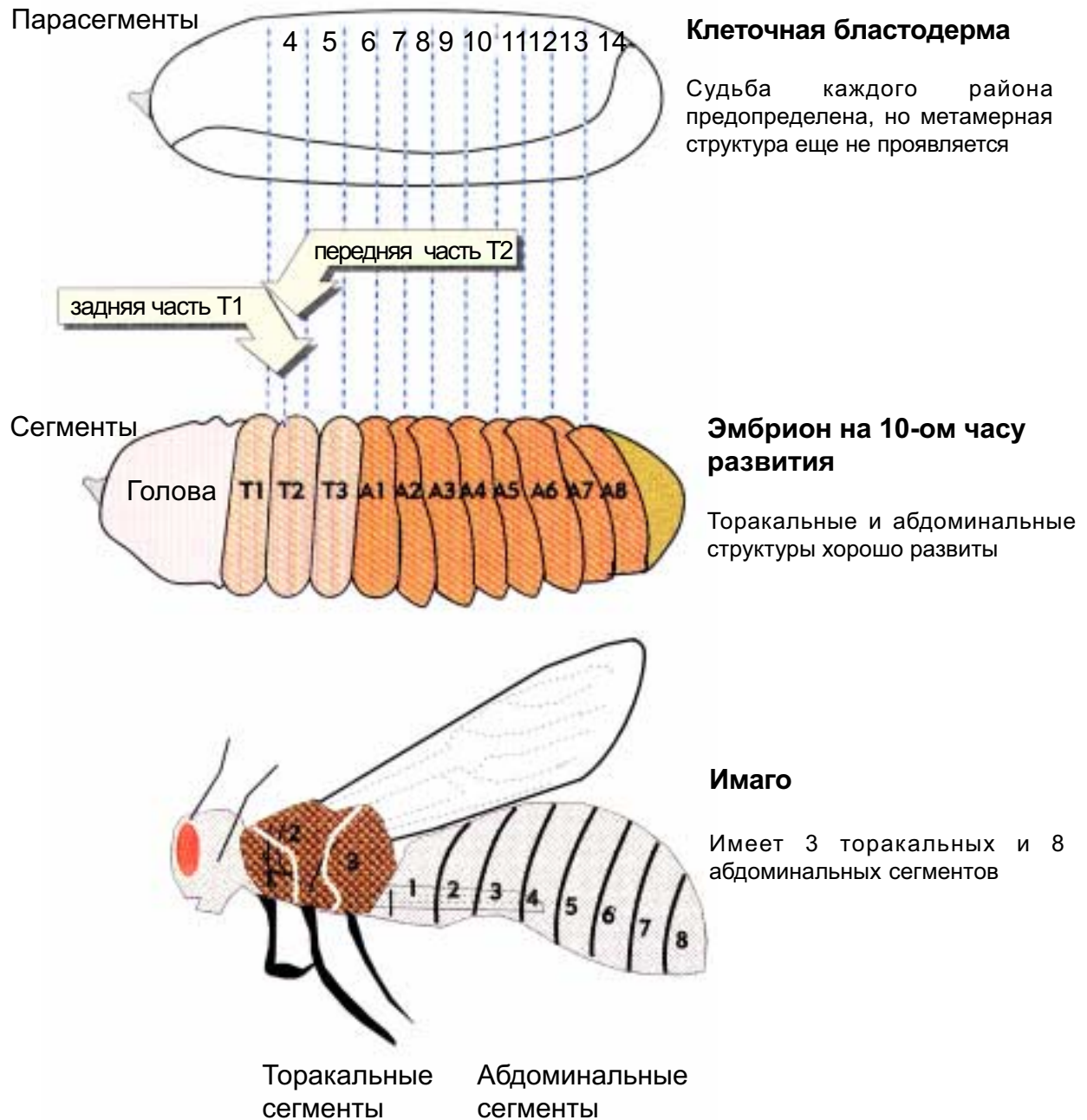


Рис.2.36. Развитие дрософилы проходит через стадию компартментализации, что приводит к образованию парасегментов и сегментов.

Большинство генов сегментации рецессивные. Принято разделять все гены сегментации на 3 большие группы:

1. Группа "gap" генов, мутации которых характеризуются совместным "выпадением" нескольких прилежащих друг к другу сегментов (рис.2.37). Например, при мутации гена Krüppel (Kr) у эмбрионов отсутствуют

все торакальные и первые 5 абдоминальных (с A1 по A5), но нормально развиваются A6, A7 и A8. У мутантных эмбрионов по гену hunchback отсутствуют T1 и T2 сегменты при нормальном развитии остальных.

2. Группа генов "pair-rule", мутации которых вызывают полное нарушение развития сегмента (ов), но оно следует

Таблица 2.4. Гены сегментации *D. melanogaster* (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Lewin 1995)

Класс	Локус	Позиция на генетической карте
Класс 1. Мутации полярности сегмента	fused (fu) wingless (wg) patch (pat) gooseberry (gsb) hedgehog (hh) cubitus interruptus (ci ^D)	1-59.5 2-30 2-55 2-104 3-90 4-0
Класс 2. Мутации pair-rule	hairy (h) runt (run) odd-skipped (odd) paired (prd) even-skipped (eve) engrailed (en) barrel (brr)	1-65 2-8 2-45 2-55 2-62 3-27
Класс 3. гар-мутации	Krüppel (Kr) knirps (kni) hunchback (hb) giant (gn)	2-107.6 3-47 3-48

правилу, согласно которому выпадение происходит либо четных или нечетных сегментов (рис.2.37). Например, у мутантов по гену *even-skipped* нормально развиваются сегменты: T2, A1, A3, A5, и A7, но отсутствуют нечетные торакальные и четные абдоминальные сегменты (рис.2.37).

3. Группа генов, контролирующих полярность сегментов. У мутантов этой группы генов число сегментов неизменено, но у них происходит замещение внутри одного сегмента одного компартмента другим, в результате чего формируется “зеркальная полярность” (рис.2.37).

Гены сегментации являются первыми зиготическими генами, которые экспрессируются на стадии синцитиальной бластодермы,

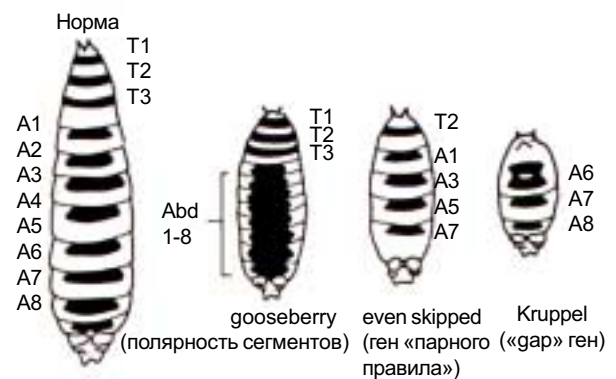


Рис.2.37. Мутации, вызывающие изменение числа и полярности сегментов у дрозофилы (по Nuslein-Volhard and Wreschans, 1980).

примерно за 2 деления до целлюляризации. Важно подчеркнуть также, что 3 группы генов сегментации экспрессируются последовательно, первыми активируются “гар” гены, затем группа “pair-rule” и, наконец, гены полярности сегментов (рис.2.38). “Gap” гены “прочитывают”



Рис.2.38. Взаимодействие материнских генов и генов сегментации в разных частях эмбриона.

позиционную информацию, подготовленную материнскими генами, и делят эмбрион на 4 части, гены “pair-rule” активируются несколько позднее “gap” генами и делят эмбрион на 7 “парных” сегментов, а гены полярности определяют границы индивидуальных сегментов к 15-ому делению (рис.2.38). Большинство “gap” и “pair-rule” генов кодируют ядерные белки, которые функционируют как транскрипционные факторы, выполняющие роль либо активаторов, либо репрессоров. Иногда обе функции совмещаются у одного белка, то есть он выступает как активатор для одного гена-мишени, но как репрессор - для

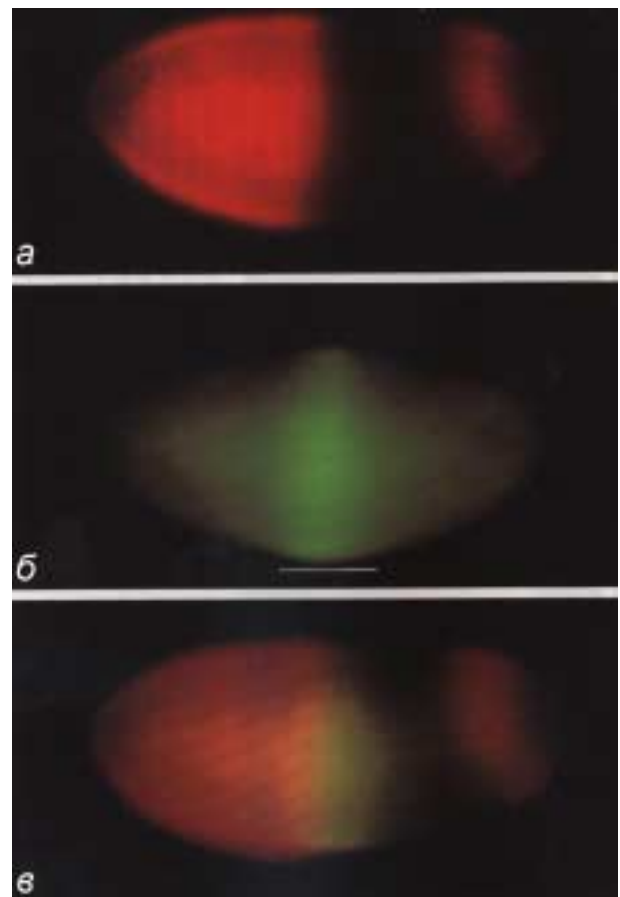


Рис.2.39. Распределение белковых продуктов генов hb (hunchback) (а), и Kr (Kruppel) (б) у эмбрионов *D. melanogaster* на стадии клеточной бластодермы. Передний полюс эмбрионов слева, а задний справа, вид с дорзальной стороны. Белок hb выявлен с помощью крысиных антител, а визуализация с помощью вторых антител - меченой ФИТЦ (флюоресцеин-изотиоцианатом) - козьей антисыворотки против иммуноглобулинов крысы; белок Kr - выявлен с помощью кроличьих антител, а визуализация с помощью вторых антител - меченой ФИТЦ (родамин-изотиоцианат) козьей антисывороткой против иммуноглобулинов кролика. Передний домен hb занимает 47% длины эмбриона начиная с переднего полюса и имеется позитивная реакция в заднем полюсе (а), Позиция белка Kr находится между 37% и 58% длины эмбриона (б). в - двойное флюоресцентное окрашивание с использованием антител к hb и Kr; зона перекрывания hb и Kr окрашена в желтый цвет.

другого.

На рис.2.28 и 2.39 показано

распределение первичных транскриптов гена *hunchback* (*hb*) и его белкового продукта. Хорошо видно, что они локализуются в переднем полюсе эмбриона, хотя можно видеть также присутствие небольшого количества белка в заднем полюсе. Активация гена *hb* осуществляется белком *bicoid*, который напрямую связывается с сайтом промотора гена *hb*. Транскрипция *hb* гена начинается только по достижении пороговой концентрации белка *bicoid* (рис.2.28). Последнее очень важно, поскольку белок *bicoid* имеет градиент концентрации вдоль передне-задней оси, и это автоматически подразумевает, что транскрипция гена *hb* возможна только в тех районах эмбриона, где пороговая концентрация белка *bicoid* достаточна высока. Такой простой механизм действия морфогена позволяет пространственно ограничивать экспрессию гена *hb*. **Иными словами, количественные различия морфогена вдоль передне-задней оси трансформируются в качественно различные состояния гена *hb* в разных районах цитоплазмы эмбриона.**

На рис.2.39 можно видеть, что следующая зона вдоль передне-задней оси эмбриона содержит белковый продукт гена *Krüppel* (*Kr*). Транскрипция гена *Kr* активируется белком *hb*. Однако, позитивная регуляция гена *Kr* белковым продуктом гена *hb* зависит от концентрации последнего; при высоких концентрациях (такой как в переднем полюсе) белок *hb*, наоборот, ингибирует активность гена *Kr* и тем самым обозначает переднюю границу

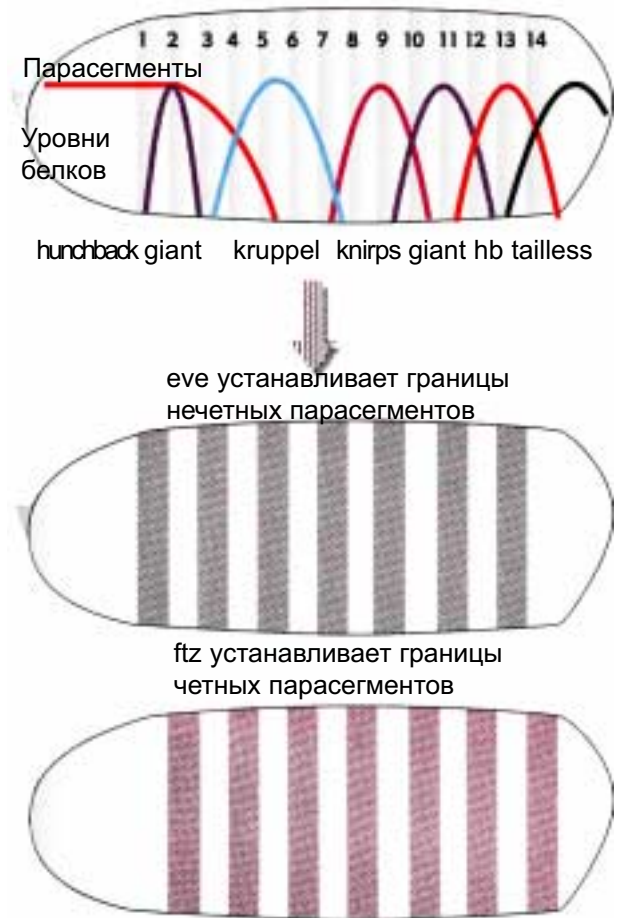


Рис.2.40. Экспрессия «gap» генов определяет границы прилежащих районов эмбриона. Они контролируют экспрессию генов «парного правила».

распределения продуктов гена *Kr*. На рис.2.40 схематически показана локализация белковых продуктов еще двух «gap» генов - *knirps* и *giant*. Белок *hb* является репрессором для этих генов, и потому они экспрессируются в задней части эмбриона. Любопытно, что материнский ген *nanos* выступает как репрессор экспрессии гена *hb* в задней части эмбриона, что также опосредовано ограничивает пространственную локализацию белков *knirps* и *giant* только задним

полюсом (рис.2.40).

На рис.2.38 и 2.40 показана трансформация 4-х зон локализации белковых продуктов “gap” генов в 7-полосный спектр пространственного распределения продуктов генов “pair-rule”. Как отмечалось выше, передняя граница распределения белка Kr определяется высокой концентрацией белка hb. Это соответствует зоне появляющегося позднее парасегмента 3. Однако, белок hb в умеренной концентрации необходим для экспрессии гена Kr и потому задняя граница распределения Kr заканчивается в месте локализации будущего парасегмента 5 (рис.2.40). Таким же сходным образом, ген giant ограничивает экспрессию hb в заднем полюсе, что в свою очередь определяет локализацию белка knirps, поскольку ген knirps ингибируется белком hb (рис.2.40). Важно подчеркнуть, что все описанные события происходят на стадии синтициальной бластодермы и следовательно те или иные границы распределения продуктов “gap” генов в общей цитоплазме выявляются лишь на молекулярном уровне, то есть до формирования будущих морфологических структур.

Первыми генами из группы “pair-rule” экспрессируются гены hairy (h) и even-skipped (eve). Первичные транскрипты этих генов появляются в интерфазе 14-го деления, непосредственно перед целлюляризацией. Возможно это ключевые гены в становлении сегментации, поскольку они устанавливают границы сегментов и влияют на экспрессию других генов этой группы. На рис.2.41 показано

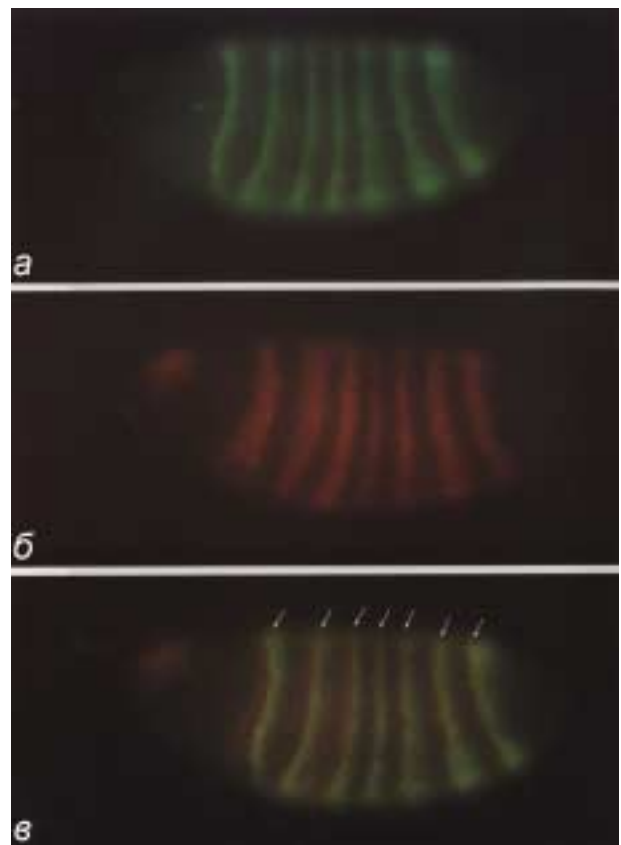


Рис.2.41. Распределение белковых продуктов генов eve (even-skipped) (а), и h (hairy) (б) в ядрах эмбрионов на стадии клеточной бластодермы. Белки h и eve выявлены с помощью первичных крысиных и кроличьих антител, соответственно, а визуализация с помощью вторых антител меченых ФИТЦ (а) или РИТЦ (б). в - результаты двойного флюоресцентного окрашивания белков h и eve. Стрелки показывают по меньшей мере два ряда ядер с позитивной окраской (желтый цвет) на белок h, представляют переднюю границу белковых полос eve.

распределение белковых продуктов генов h и eve. Хорошо видно, что каждый из них формирует 7 поперечных полос (в головном конце эмбриона находится небольшая зона локализации белка h), при этом они либо не перекрываются, либо перекрываются частично (рис.2.41). Результатом такого распределения формируется как бы 7 парных полос, состоящих из 2-х тесно прилегающих к друг другу. Расположение этих 7 полос

соответствует локализации будущих парасегментов, причем белок *eve* маркирует локализацию нечетных парасегментов, а *h* четных (рис.2.41). В процессе перехода ранней бластодермы к гастрюляции появляются белковые продукты гена *fushi tarazu* (*ftz*), которые локализуются в ядрах клеток, которые, в свою очередь, образуют 7 полос шириной в 3-4 клетки (рис.2.42). Таким образом, границы четных парасегментов, очерченные белковыми продуктами гена *h*, трансформируются в структуры с клеточной организацией, которые дадут начало будущим сегментам. Интересно отметить, что первоначально экспрессия гена *ftz* происходит равномерно во всех клетках эмбриона. Формирование описанных выше 7 полос происходит благодаря специфической деградации иРНК в клетках между полосами в передней и задней частях эмбриона. Как только оформляются эти полосы, транскрипция гена *ftz* прекращается, то есть экспрессия носит кратковременный транзитный характер.

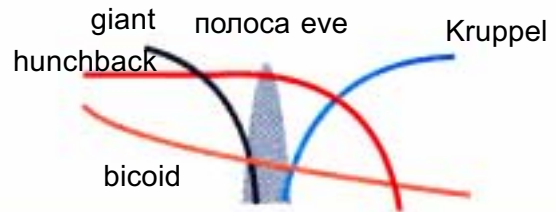
Регуляция экспрессии гена *eve* осуществляется на другой основе, нежели *ftz*. Во-первых, его экспрессия регулируется независимо в каждой индивидуальной полосе. На рис.2.43 приведена схема регуляции гена *eve* в полосе 2, которая даст начало развитию парасегмента 3. Транскрипция *eve* активируется белками *hunchback* и *bicoid*, но пространственные границы действия гена *eve* определяются репрессорами, передняя - *giant*, а задняя - *Kruppel* (рис.2.43). Кроме того,



Рис.2.42. Транскрипты гена *ftz*⁺ локализуются в виде поперечных полос соответствующих четким парасегментам. У мутантов по гену *ftz* не образуются эти 7 полос.

промотор гена *eve* имеет сложную организацию, которая делает

Полоса 2 (парасегмент 3) и окрашивающие ее белки



Мутация белками *hunchback* и *bicoid*

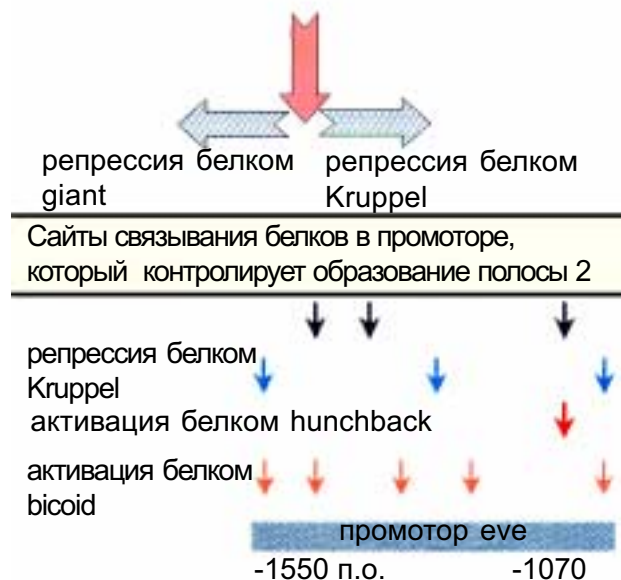


Рис.2.43. Появление полосы *eve* в парасегменте 3 происходит благодаря активации белками *hunchback* и *bicoid*. Репрессия белком *giant* устанавливает переднюю границу, а репрессия белком *Kruppel* заднюю границу.

возможным его дифференциальное о функционирование в индивидуальных полосах. На рис.2.43 можно видеть, что на участке промотора гена *eve* с -1550 по -1070 п.о. находится свыше 10 сайтов связывания либо активаторов (*bicoid*, *hunchback*), либо репрессоров (*giant*, *Kr*). Как отмечалось выше, локальная концентрация каждого из этих регуляторных белков значительно варьирует, и это создает предпосылки для возникновения уникальных комбинаций взаимодействия этих белков с сайтами промотора гена *eve* в каждой индивидуальной полосе.

Экспрессия генов “pair-rule” определяет молекулярные границы парасегментов. Следующей стадией формирования сегментов является установление их полярности. По-видимому, ключевыми генами в установлении полярности сегментов являются гены *engrailed* (*en*) и *wingless* (*wg*). Экспрессия гена *en* необходима во всех сегментах для разграничения А и Р компартментов. Его активность проявляется только в компартменте Р, но не А. Белковый продукт гена *en* локализуется в узкой зоне компартмента Р шириной только в один ряд клеток. Рис.2.44 показывает локализацию белка *en*, выявляемую с помощью моноклональных специфических антител. Легко заметить, что действительно только один ряд клеток очерчивает переднюю границу парасегмента Р в каждом из 14 сегментов. Экспрессия гена *en* исключительно важна, поскольку определяет границы компартментов, из которых разовьются будущие дефинитивные структуры

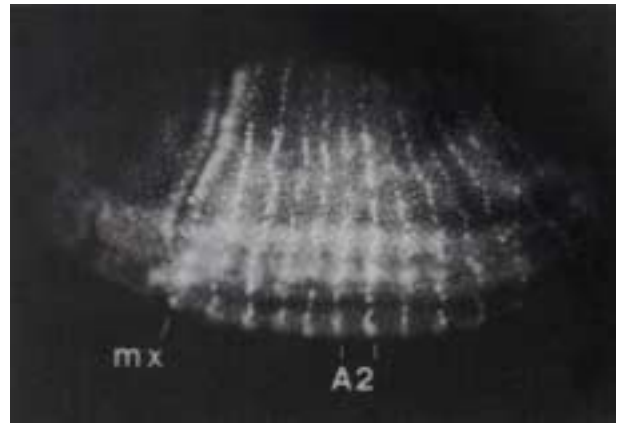


Рис.2.44. Локализация белка *engrailed* наблюдается в ядрах и полосы представлены только одним рядом клеток.

имаго. Изначально один ряд клеток образуются у передней границы полос *ftz* и *eve*, то есть там, где будет передняя граница компартментов Р. Какие механизмы лежат в основе такого точного пространственного распределения продуктов гена *en*? Существуют две модели, объясняющие этот феномен. Согласно первой модели предполагается, что различные “pair-rule” гены экспрессируются в виде “перекрывающихся” зон вдоль передне-задней оси эмбриона. В результате таких “перекрывающихся” зон активности генов “pair-rule” возникают их различные уникальные комбинации, которые определяют ответную реакцию клеток на следующей стадии развития. Иными словами, гены полярности контролируются генами “pair-rule” подобно тому (как описано выше), как гены “gap” контролируют экспрессию генов “pair-rule”. Вторая модель предполагает, что границы компартментов устанавливаются путем межклеточных взаимодействий, например, между клетками, в которых экспрессируется ген *ftz* или *eve*, и клетками, в которых отсутствует

экспрессия этих генов, что является триггером для экспрессии гена *en*.

Белковый продукт гена *en* является транскрипционным фактором, то есть выступает в роли регулятора активности других генов. Другой ген полярности *wingless* кодирует белок, который секретируется и накапливается вблизи клетки, что позволяет осуществлять локально взаимодействия между прилежащими клетками. Первоначально *wg* экспрессируется в ряду клеток, непосредственно находящихся впереди клеток, содержащих белок *en*, в результате чего устанавливается задняя граница впереди-прилежащего парасегмента. Любопытно, что ген *en* активируется белками *eve* и *ftz*, но затем с началом секреции *wg* транскрипция гена *en* контролируется белком *wg*. В настоящее время недостаточно изучена роль других генов полярности в становлении сегментации. Это довольно гетерогенная группа генов, кодирующих секреторные белки, белки цитоскелета, трансмембранные белки и киназы, а также транскрипционные факторы, но их действие реализуется преимущественно через межклеточные взаимодействия.

2.2.3. Гомеозисные гены и их роль в развитии.

Термин “гомеозис” был введен Уильямом Бэтсоном более 100 лет назад. В своей книге “Материалы к изучению изменчивости”, изданной в 1894 г., Бэтсон так обосновывал введение этого понятия: “Превращение антенны насекомого в ногу, глаза

ракообразного - в антенну, лепестка - в тычинку и тому подобное - все это примеры одного рода. Желательно и даже необходимо, чтобы такие изменения, состоящие в том, что один из членов ряда меристемных структур принимает форму или приобретает признаки, свойственные другим членам ряда, были выделены в особую группу явлений...Поэтому я предлагаю....термин **гомеозис...**, поскольку главное здесь не в том, что произошло некое изменение, а в том, что одно, изменившись, приобрело сходство с чем-то другим”. Бэтсон выделяет изменчивость гомеозисного типа в особую категорию, подчеркивая превращение одной метамерной структуры в другую. Таким образом, сами по себе **гомеозисные превращения не создают ничего нового в онтогенезе, но они изменяют характер регионального развития эмбриона.**

В случае дрозофилы к такой категории относятся мутации, вызывающие превращение структур, характерных для одного сегмента, в структуры, свойственные



Рис.2.45. Четырех-крылая муха развивается из яиц генотипа *abx*, *bx* и *rbx*.

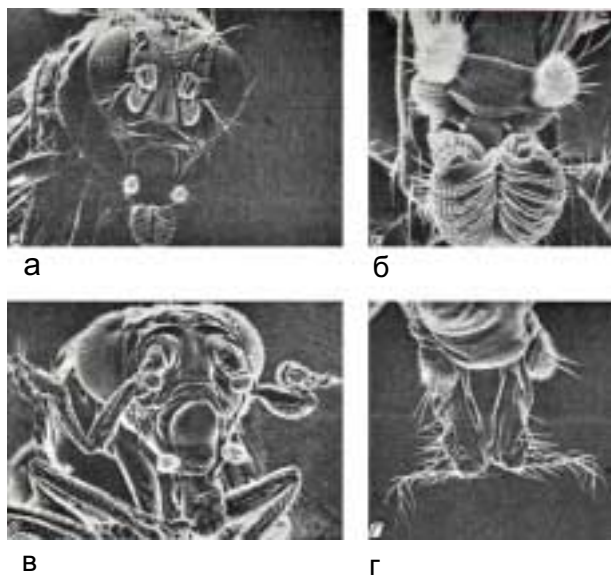


Рис.2.46. А, Б - голова имаго дикого типа при разном увеличении. В - мутация *Antp*, при которой антенны трансформируются в две пары ног; Г - мутация *proboscipedia*, превращение губы в тарзус.

близлежащим сегментам. Наиболее яркими примерами гомеозисных превращений являются развитие заднегруди по типу среднегруди, сопровождающееся превращением жужжалиц во вторую пару крыльев, или развитие на голове вместо антенны или щупиков передней пары ног. На рис.2.45 показаны эффекты мутаций *bithorax* (*bx*), *postbithorax* (*pbx*) и *anteriobithorax* (*abx*) (*Ubx*). Компаунд по этим мутациям имеет 4-е пары крыльев и развитую заднегрудь, показывая сходство с представителями другого таксона - тетраптера. В данном случае, мутации вызывают изменение направления развития 3-го грудного сегмента по пути 2-го торакального сегмента. На рис.2.46 показаны гомеозисные превращения вызванные мутациями *Antennapedia* (*Antp*) и *proboscipedia* (*pb*). Хорошо видно, что антенна развивается в ноги, а псевдотрахеальные ряды

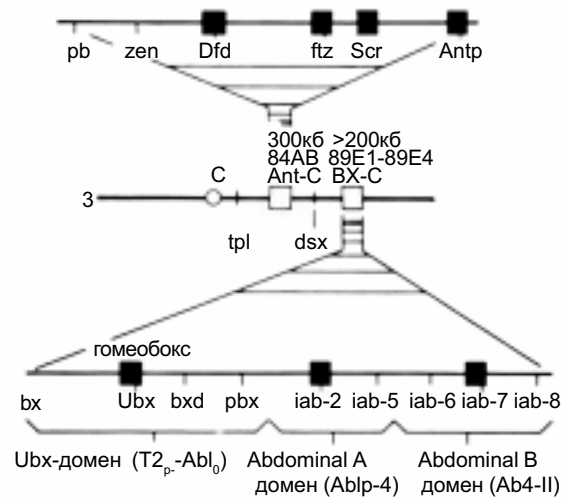


Рис.2.47. Схема организации комплекса ВХ-С и АНТ-С на третьей хромосоме дрозофилы. Распределение гомеобоксов (зачернены) в комплексах (белые).

микрощетинки нижней губы превращаются в аристы и концевые структуры антенны. Такого рода мутации не могли не привлечь внимание генетиков, поскольку представлялась уникальная возможность исследовать функцию генов, **контролирующих развитие сегментов, определяющих их суть.**

У дрозофилы гомеозисные гены представлены двумя кластерами генов или, как в настоящее время принято говорить, двумя комплексами генов, ВХ-С (*Bithorax-Complex*) и АНТ-С (*Antennapedia-Complex*). На рис.2.47 показана локализация и организация генов комплексов АНТ-С и ВХ-С в правом плече 3-й хромосомы. Видно, что комплекс АНТ-С расположен в районе 84АВ и имеет размеры около 350 тыс.п.о. На рис.2.48 показан район 84АВ на цитогенетической карте 3-й хромосомы. Видно, что этот район состоит из 2-х крупных дисков. Комплекс ВХ-С находится в районе 89ЕI - 89Е4 и имеет размеры более 200

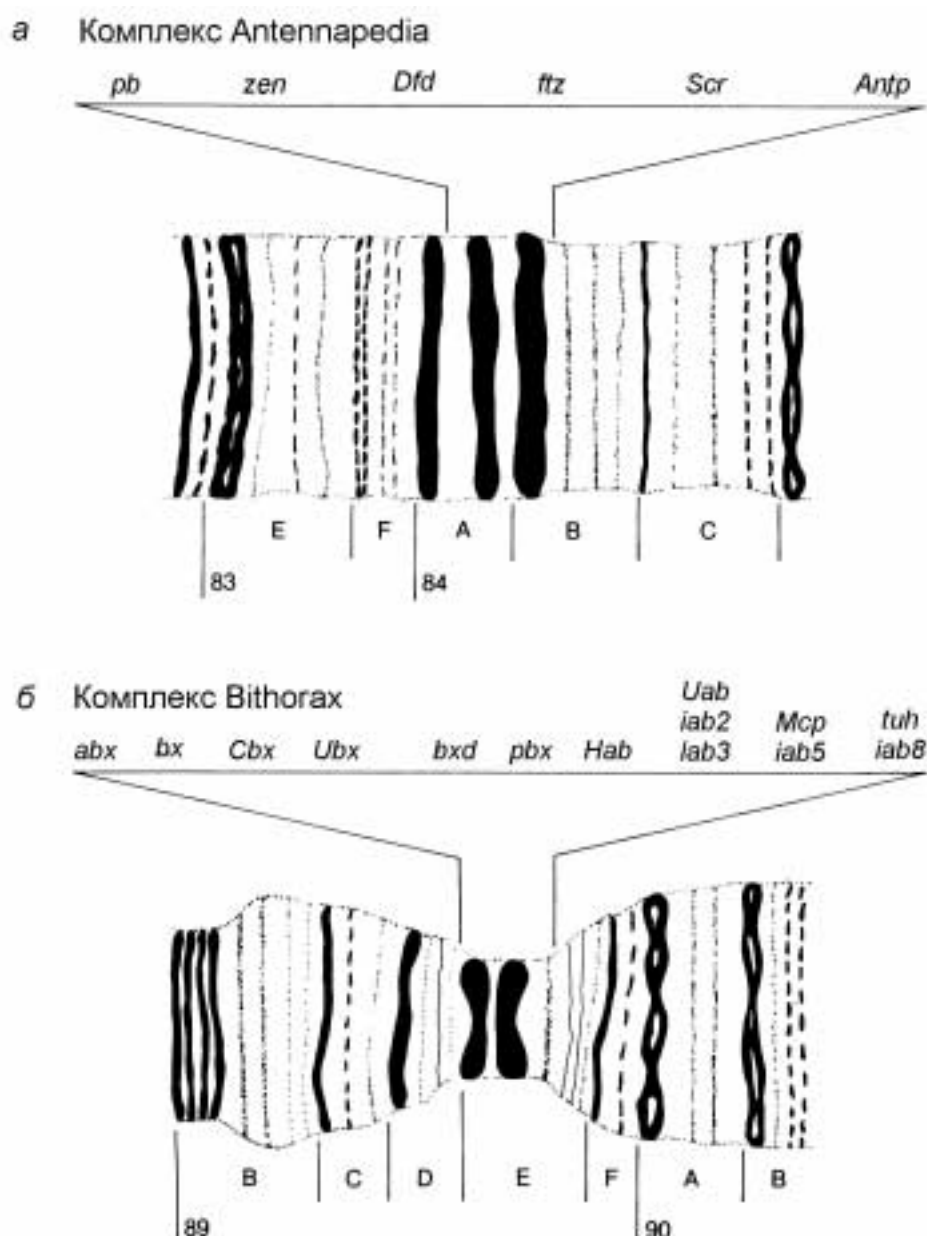


Рис.2.48. Схематическое изображение участков политенных хромосом *D. melanogaster*, в которых расположены комплексы ANT-C (А) и BX-C (Б). Расположение мутаций в комплексах: *pb* - proboscipedia, *Dfd* - Deformed, *ftz* - fishi-tarazu, *S* - Sex comb reduced, *Antp* - Antennapedia, *abx* - anteriobithorax, *bx* - bithorax, *Cbx* - Contrabithorax, *Ubx* - Ultrabithorax, *bxd* - bithoraxoid, *pbx* - postbithorax, *Hab* - Hyperabdomonal, *Uab* - Ultraabdominal, *Mcp* - Miscadestral - pigmentation, *tuh* - tumorous hed, *iab* - infraabdominal

тыс.п.о. На рис.2.48 показан район локализации комплекса ANT-C на цитогенетической карте 3-й хромосомы. Этот район представлен двумя крупными дисками и одним минорным.

В настоящее время в комплексе ANT-C идентифицировано 9 генов, расположенных в следующем порядке

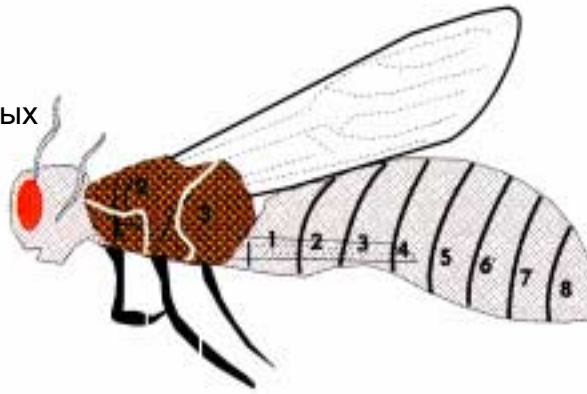
слева направо (рис.2.51): labial (*lab*), proboscipedia (*pb*), *zerknült* (*zen*), bicoid (*bcd*), *ama*, Deformed (*Dfd*), Sex combs reduced (*Scr*), fushi tarazu (*ftz*) и Antennapedia (*Ant*). Следует отметить, что гены *bcd*, *zen*, *ftz* (функции этих генов в раннем развитии описаны выше) и *ama* хотя и находятся в комплексе ANT-C, но они не являются

гомеозисными генами (рис.2.51); к собственно гомеозисным генам относятся только 5 генов: *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* и *Ant*. Мутации именно этих генов вызывают гомеозисные эффекты: *lab* вызывает появление на нижней губе арист, эффект *pb* проявляется в превращении нижнегубного сегмента в переднюю ногу, при мутации *Dfd* не развивается мандибулярный сегмент, *Scr* вызывает трансформацию переднегруди в среднегрудь, а *Antp*, как описано выше, изменяет развитие сегментов T2 и T3 по типу T1 (рис.2.51). Делеция всего комплекса генов ANT-C вызывает трансформацию T2, T3 и двух головных сегментов (максилярный и нижнегубной) в T1. Легко заметить, что **фокус действия гомеозисных генов ANT-C ограничен самыми передними сегментами тела эмбриона: головными и 3-мя торакальными (парасегменты 1-4) (рис.2.51).**

Комплекс генов BX-C показан на рис.2.47 и 2.49. Фокус действия генов этого комплекса распространяется от сегмента T2 до A8, то есть эти гены осуществляют контроль развития структур большей части тела имаго. В отличие от кластера генов ANT-C, комплекс BX-C содержит только 3 гена, и все они гомеозисного типа: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abdA*) и *abdominal B* (*abdB*) (рис.2.49). Исторически так сложилось, что комплекс BX-C принято делить на 2 домена: *Ultrabithorax* и *Infraabdominal*, который в свою очередь состоит из двух субдоменов, *abdA* и *abdB* (рис.2.47 и 2.49). Легко можно заметить, что домен *Ubx* и субдомены *abdA* и *abdB*

соответствуют генам *Ubx*, *abdA* и *abdB*, соответственно (рис.2.49). Предполагается, что в процессе эволюции домен *Ubx* появился первым, а затем в результате двух раундов дупликации появился *Infraabdominal*. Мутации домена *Ubx* вызывают гомеозисные превращения, ограниченные районом от T2P до A1A (парасегменты 5-6) (рис.2.49), эффекты мутации домена *abdA* проявляются в районе от A1P до A4 (парасегменты 7-9), а *abdB* от A4 до A8 (парасегменты 9-14) (рис.2.49). Следует остановиться на характеристике мутаций комплекса BX-C. В настоящее время известно, что эти мутации имеют разное происхождение, одни мутации затрагивают кодирующую часть генов *Ubx*, *abdA* и *abdB*, тогда как другие цис-действующие регуляторные сайты этих генов. На рис.2.48 и 2.49 показаны сайты мутаций *Contrabithorax* (*Cbx*), *anterabithorax* (*abx*), *bithorax* (*bx*), *bithoraxoid* (*bxo*) и *postbithorax* (*pbx*), которые находятся вне кодирующей части гена *Ubx*, но вовлекают регуляторные сайты в цис-положении, иногда расположенные на расстоянии до 10 тыс.п.о. от кодирующей части гена. Эффекты некоторых из этих мутаций показаны слева вверху рис.2.49. Делеция самого гена *Ubx* вызывает трансформацию сегментов T3 и A1 в T2. Такого же сорта мутации описаны в субдомене *abdA* (мутации серии *infraabdominal*: *iab2*, *iab3* и *iab4*) и в *abdB* (*iab5*, *iab6*, *iab7* и *iab8*). Фокус действия этих мутаций представлен справа вверху рис.2.49. Делеция всего же комплекса BX-C вызывает превращение всех абдоминальных и T3 в серию сегментов типа T2.

Комплекс ВХ-С содержит 3 транскрибирующихся гена. Серия мутаций в регуляторных зонах этих генов вызывает гомеозисные превращения абдоминальных сегментов. Места мутаций (делеций, инсерций и транслокаций) показаны на молекулярной карте ВХ-С.



Мутации

abx трансформация T2P/T3A в T2
bx трансформация T3A в T2A
bxl трансформация A1A в T3A

Мутации

iab6 трансформация A6 и A5
iab5 трансформация A5 в A4
iab4 трансформация A4 в A3
iab3 трансформация A3 в A2
iab2 трансформация A2 в A1

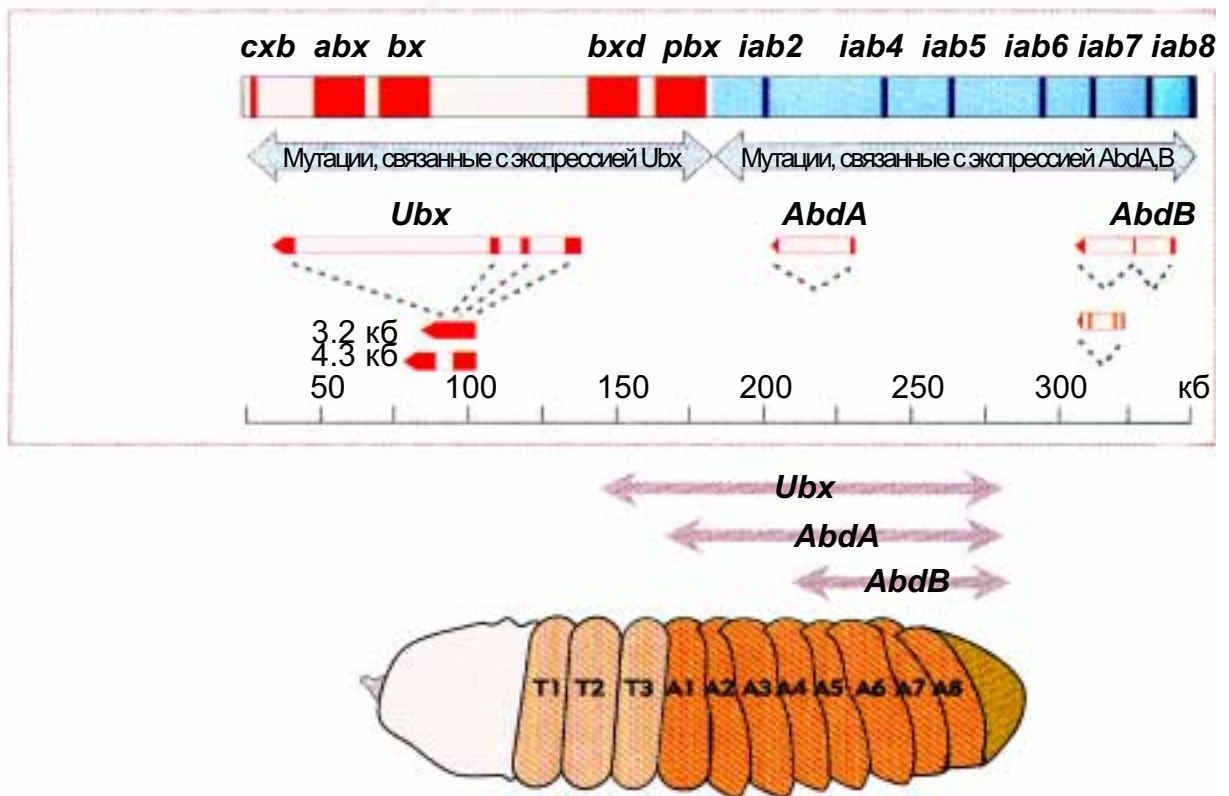


Рис.2.49. Комплекс ВХ-С содержит 3 транскрибирующихся гена. Серия мутаций в регуляторных зонах этих генов вызывают гомеозисные превращения абдоминальных сегментов. Сайты мутаций (делеций, инсерций и транслокаций) показаны на молекулярной карте ВХ-С.

Важнейшая и уникальная характеристика обоих комплексов ANT-C и ВХ-С, заключается в том, что чем правее расположен ген в

комплексе, тем сильнее распространяется его эффект в сторону задних частей тела личинки или имаго, то есть наблюдается **колинеарность в**

линейном расположении генов слева направо в кластере и их экспрессии вдоль передне-задней оси эмбриона. Основным принципом их взаимодействия заключается в том, что для образования любого компартмента требуются генные продукты как гена, расположенного слева и экспрессирующегося в более передних компартментах, так и близлежащего гена, но расположенного правее. Это объясняет эффекты мутаций, выражающиеся в том, что задняя структура (компартмент) развивается по типу более передней. Это хорошо видно на примере действия мутаций

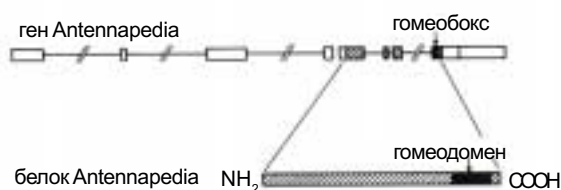


Рис.2.50. Молекулярная организация гена Antp. Ген имеет размер более 100 кб и содержит 8 экзонов (показаны светлыми прямоугольниками), разделенными интронами (показаны тонкой линией). Кодированная часть гена заштрихована. Гомеобокс (выделено черным цветом) - высококонсервативный фрагмент ДНК размером 180 п.о., находится в 8-ом экзоне. Гомеобокс кодирует гомеодомен, расположенный вблизи от карбоксильного конца в белке Antennapedia.

серии *infraabdominal*: *iab2*, *iab5*, *iab8* вызывают превращение сегментов A2, A5, A8 в A1, A4 и A7, соответственно.

Все гомеозисные гены кодируют ядерные белки, способные связываться с ДНК, и функционируют как транскрипционные факторы. Все эти гены содержат консервативный мотив - **гомеобокс** размером 180 п.о. Ген Antp

был один из первых гомеозисных генов, в котором был идентифицирован этот консервативный мотив, и свое название гомеобокс получил от названия этого типа генов. На рис.2.50 оказана схема организации гена Antp. Можно видеть, что ген размером 103 тыс.п.о. имеет 8 экзонов, разделенных протяженными интронами. Гомеобокс расположен недалеко от 3'-конца первичного транскрипта. Белковая последовательность, кодируемая гомеобоксом, называется **гомеодоменом** и находится вблизи карбоксильного конца белка Antennapedia (рис.2.50). Белок имеет молекулярный вес около 43 000 дальтон. Таким образом, кодирующая часть гена Antennapedia занимает всего около 1% полного размера гена. Гомеодомен белка Antennapedia, как и всех других гомеобокс-содержащих генов, способен специфически связываться с ДНК по типу виток-поворот-виток ("helix-turn-helix"). Интересно отметить, что гомеобоксы, кодирующие гомеодомены, исключительно консервативны в эволюции. Гомологичные последовательности ДНК найдены практически у всех изученных видов животных с метамерной организацией тела и даже у радиально-развивающихся видов, у которых отсутствует метамерия. Несомненно все гомеобокс-содержащие гены имеют общее происхождение. Это хорошо видно из сравнения первичных структур гомеобоксов. Например, гомеобокс гена Antp на 87% гомологичен с таковым гена Ubx. Вопросы эволюционного консерватизма гомеозисных генов

Мутантные фенотипы

- lab** дефекты головы
- pb** замещение лабиальных структур антенными
- Dfd** делеция мандибулярных сегментов
- Scr** трансформация T1 в T2
- Antp** трансформация T2-T3 в T1

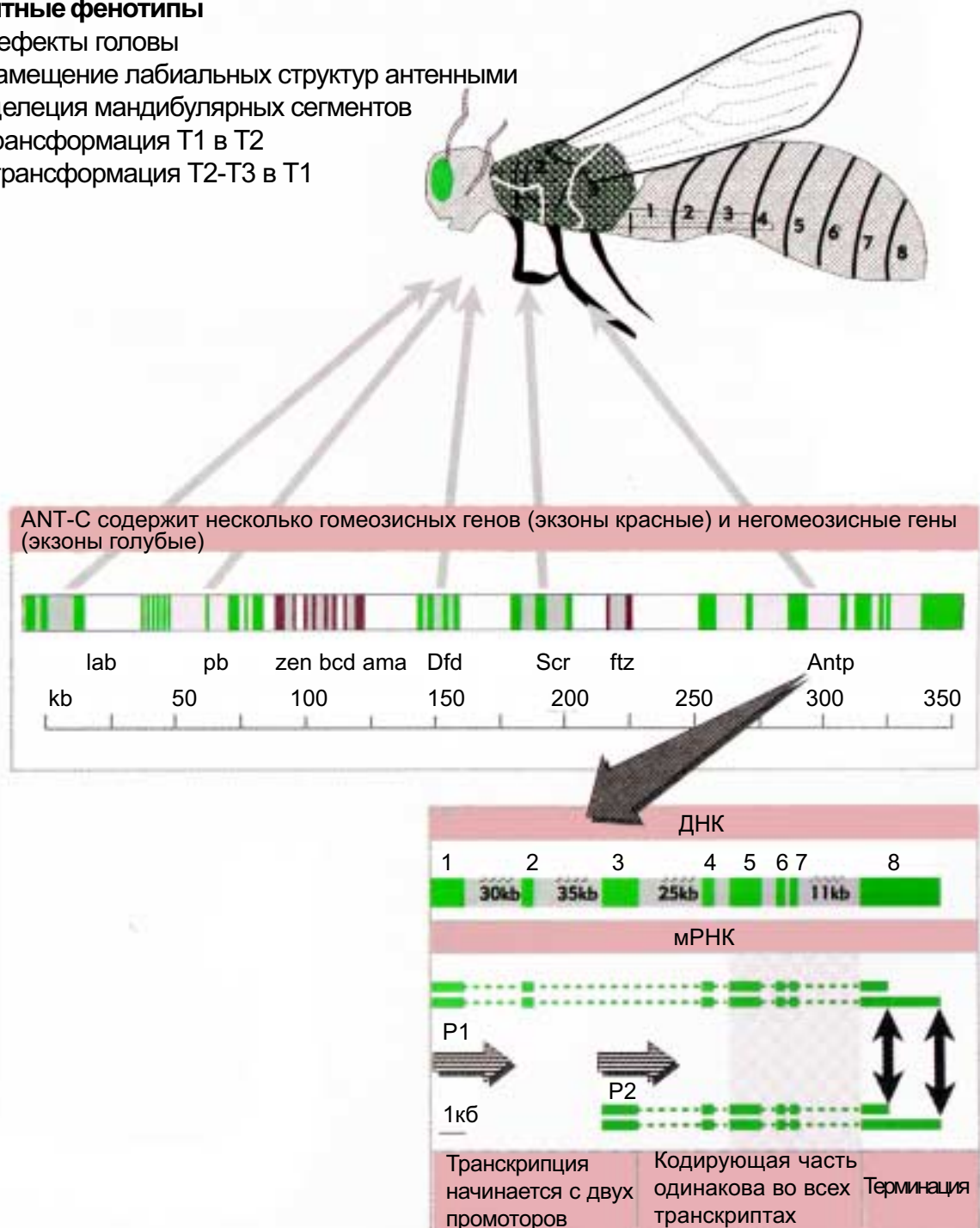


Рис.2.51. Гомеозисные гены комплекса ANT-C определяют дифференцировку передних сегментов. Гены варьируют в размерах и перемежаются другими, нехомеозисными генами. Ген *Antp* очень большой и дает альтернативные формы первичных транскриптов.

будут рассмотрены ниже.

Все гомеозисные гены имеют сложную экзон-интронную организацию, (см. выше организацию гена *Antp*), что нехарактерно для большинства генов дрозофилы. Также

зачастую для этих генов характерен сложный путь формирования зрелых иРНК. В качестве примера можно рассмотреть транскрипцию гена *Ubx*. Из рис.2.49 следует, что первичный транскрипт гена *Ubx* размером около

75 kb подвергается альтернативному сплайсингу, и возникает 3 типа иРНК с размерами 3.2 kb, 4.3 kb и 4.7 kb. Впервые транскрипционная активность гена *Ubx* обнаруживается около 3-х часов развития (стадия клеточной бластодермы), причем первоначально появляется транзиторная форма РНК (4.7 kb), которая исчезает к 8-ми часам развития. Несколько позднее появляется 3.2 kb, а затем и 4.3 kb РНК, которые прослеживаются на всех стадиях развития дрозофилы.

Любопытно, что оба последних типа иРНК содержат последовательности обоих концов гигантского первичного транскрипта (1-й и последний экзоны), но различаются тем, что включают последовательности разных внутренних экзонов. Предполагается, что разные формы иРНК гена *Ubx* дифференциально транслируются в разных компартментах. Использование флюоресцентных антител против общей части белков *Ubx* (часть, кодируемая 1-м экзоном) показало его неравномерное распределение вдоль тела эмбриона: слабое свечение в рТ2, сильное в рТ3 и аА1 и постепенное снижение свечения с аА2 к аА8.

Естественно возникает вопрос: как относительно небольшое число гомеозисных генов осуществляют контроль развития индивидуальных сегментов (компаратментов)? Как отмечалось выше, анализ мутаций в комплексах ANTP и BX **позволил выявить функциональную иерархию среди гомеозисных генов.** Наиболее отчетливо существование соподчиненности гомеозисных генов

между собой было выявлено при анализе мутаций локуса *extra sex combs (esc)* (локус оказывает транс-эффект на гомеозисные гены; характеристика транс-регуляторов гомеозисных генов будет рассмотрено позднее). Локус *esc* является членом группы генов *Polycomb*. Мутации локуса *esc* оказывают дерепрессирующий эффект на гомеозисные гены, что приводит к расширению границ их проявления, то есть за пределы их нормальных доменов. В том случае, когда несколько гомеозисных генов одновременно дерепрессируется под действием *esc*, сегментация протекает под контролем более постериорно-действующих генов. Так у мутантов по локусу *esc* в сочетании с нормальными аллелями всех гомеозисных генов, головные, торакальные и абдоминальные сегменты личинки развиваются по типу А8, то есть под контролем гена *abdB*, имеющего наиболее постериорный фокус действия из всех генов комплекса ВХ. У мутантов-компаундов по *esc* и делеции гена *abdB*, все сегменты личинки развиваются по типу А4, то есть определяются фокусом действия гена *abdA*, который является самым последним функционирующим членом комплекса ВХ у этих компаундов. У компаундов по гену *esc* и делеции всего комплекса ВХ наблюдается развитие всех сегментов по типу торакальных Т2 или Т1, то есть под контролем *Scr* или *Antp*, которые являются крайними функционирующими генами у такого типа компаундов. В случае делеции трех генов ВХ-С и *Scr* с *Antp* из ANTP-С на фоне мутации *esc* у личинки все сегменты превращаются в головные.

Легко заметить, что функционирование гомеозисных генов осуществляется иерархическим способом по типу $Scr < Antp < Ubx < abdA < abdB$, то есть гены расположенные более постериорно являются супрессорами для генов расположенных антериорно (“downregulation”). Также важно отметить, что несмотря на то что комплексы ANT и BX пространственно разобщены и формируют независимые кластеры, функциональная иерархия индивидуальных гомеозисных генов соответствует порядку генов слева направо в обоих комплексах или, иными словами, наблюдается

колинеарность в функционировании гомеозисных генов и их порядком на хромосоме 3.

Большую роль в понимании, супрессирующего действия постериорных генов в функциональной иерархии гомеозисных генов сыграли эксперименты с введением их дополнительных копий в геном дрозофилы. На рис.2.52 представлены результаты опытов на трансгенных дрозофилах, в геном которых были введены следующие конструкции: а) промотор гена *hsp70* (ген кодирует “heat-shock” белок с молекулярной массой 70 кД), слитый с кодирующей частью гена *Antp*, *hsp-Antp*; б) промотор гена *hsp*, слитый с

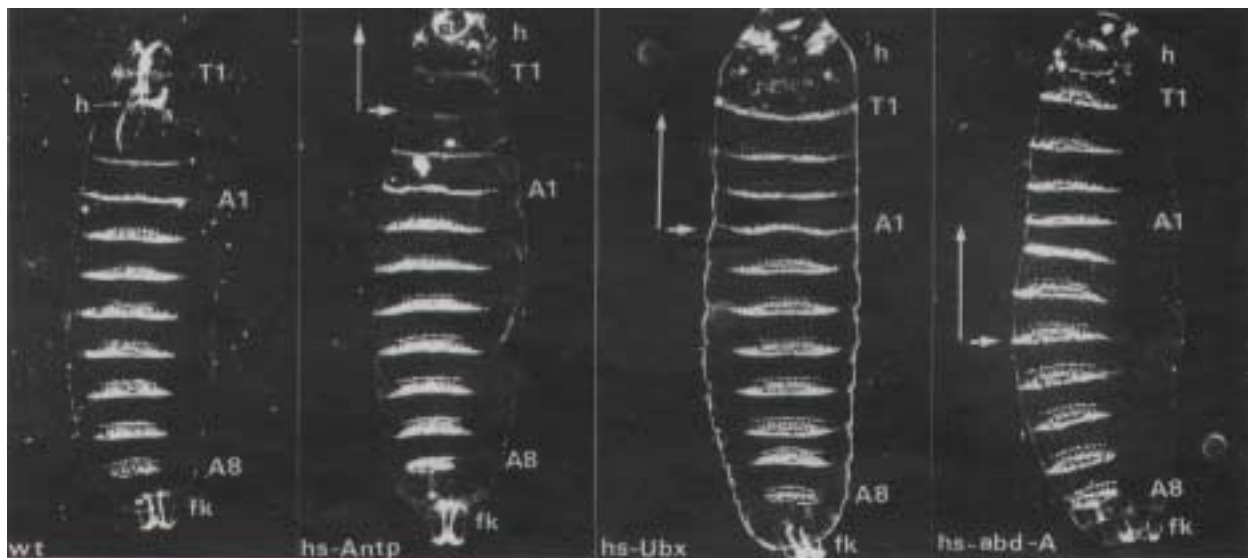


Рис.2.52. Сравнение гомеозисных эффектов трансгенов *hsp70-Antp*, *hsp70-Ubx* и *hsp70-abdA* (см.текст) на формирование сегментов у трансгенных личинок. Стрелками указаны границы морфологических изменений, вызванных эктопической экспрессией генов *Antp*, *Ubx* и *abdA*. У личинки дикого типа (wt) видно, что сегмент T1 расположен впереди головы. (h). Заметно, также, что дентикулы T1 тоньше, чем T2 и что T1 имеет центрально расположенную группу дентикул, которая не представлена в T2. A1 и A8 - абдоминальные сегменты, fk - filzkoper. Эффект трансгена *hsp70-Antp* ограничен районом впереди сегмента T2 (*hs-Antp*). Голова не инвагинирует на стадии бластодермы, и потому эктопическая экспрессия *hs-Ubx* вызывает изменения сегментации в районе, ограниченной A1. Остальные части тела личинки, включая A1, не отличаются от личинки дикого типа. Эктопическая экспрессия *abdA* (*hs-abdA*) вызывает изменения сегментации в районе, находящемся впереди сегмента A4; в фокусе действия трансгена *hs-abdA* все сегменты напоминают A4, что отчетливо видно в случае T1 и T2. У всех трансгенных личинок, включая *fitzkoper* абдоминальные сегменты с A5 по A8 не изменены (по Duboule and Morata, 1994).

кодирующей частью гена *Ubx*, *hsp-Ubx*; в) промотор гена *hsp*, слитый с кодирующей частью гена *abdA*, *hsp-abdA*. Согласно структуре этих трансгенов, их экспрессия носит конститутивный характер у трансгенных личинок, если развитие происходит при повышенной температуре. Экспрессия трансгена *hsp-Antrp* проявляется у личинок в превращении T2 в T1 и в отсутствии инвагинация цефалической борозды и, как результат, голова у личинки находится впереди T1, а не позади, как в норме (рис.2.52). Стрелка указывает на границы действия эктопической экспрессии трансгена *hsp-Antrp*. В норме экспрессия гена *Ubx* распространяется от парасегмента 5 до парасегмента 13, с наивысшим ее уровнем в A1 (парасегмент 6). Эктопическая экспрессия трансгена *hsp-Ubx* вызывает трансформацию головных и торакальных сегментов по типу A1, остальные абдоминальные сегменты развиваются нормально (рис.2.52). Эти результаты показывают, что дополнительная эктопическая экспрессия *Ubx* не влияет на развитие сегментов-мишеней гена *Ubx* (парасегменты 5-13), но расширяет фокус своего действия, трансформируя впереди лежащие сегменты (рис.2.52). Интересно, что эктопическая экспрессия *hsp-Ubx* не оказывает влияния на развитие самых задних парасегментов 14 и 15, несмотря на избыточное присутствие в них белка *Ubx*. Как отмечалось выше, в норме белок *Ubx* отсутствует в этих парасегментах. Таким образом, белок *Ubx* морфогенетически неактивен у трансгенных личинок *hsp-Ubx* в этих

парасегментах. Отсутствие фенотипического эффекта трансгена *hsp-Ubx* в парасегментах 14 и 15 связано с репрессирующим действием гена *abdB*, поскольку на фоне делеции гена *abdB* морфогенетический эффект трансгена *hsp-Ubx* проявляется. **Иными словами, в основе функциональной инактивации *Ubx* лежит супрессирующий эффект гена *abdB*.** С этим же согласуются данные по экспрессии гена *Ubx* в разных типах клеток. Например, хотя ген *Ubx* экспрессируется в эпидермисе в парасегментах 5-13, однако его экспрессия в висцеральной мезодерме ограничена только 7-ым парасегментом, тогда как экспрессия *abdA* в мезодерме имеет место в парасегментах 8-12. Вероятно, это есть результат репрессирующего действия гена *abdA*, поскольку у мутантов по гену *abdA* имеет место экспрессия гена *Ubx* в этих парасегментах. Это супрессирующее действие гена *abdA* реализуется опосредовано. Установлено, что активация гена *Ubx* в клетках мезодермы парасегмента 7 происходит благодаря белку *decapentaplegic (dpp)*. Ген *dpp* неактивен в парасегментах 8-12.

Фундаментальный вывод о функциональной иерархии гомеозисных генов подтверждается экспериментами по эктопической экспрессии трансгена *hsp-abdA*. Из рис.2.52 следует, что избыточная экспрессия гена *abdA* сопровождается превращением головных, торакальных и A1-A3 сегментов в A4. Таким образом, в этом случае также наблюдается супрессирующий эффект постериорно расположенного гена на

функцию всех генов, расположенных “downstream”, то есть с 5' -конца.

Другая группа экспериментальных данных, свидетельствующих в пользу представления о функциональной иерархии гомеозисных генов, была получена при сравнительном изучении действия гомеобокс-содержащих генов в развитии позвоночных. Выше уже отмечалось, что гомеозисные гены содержат консервативную последовательность - гомеобокс, что позволяет идентифицировать гомеобокс-содержащие гены в геномах

организованных в 4 кластера. На рис.2.53 показана схема организации генов мыши и их структурные взаимоотношения с гомеозисными генами дрозофилы. У мыши кластеры НОХА, НОХВ, НОХС и НОХД расположены на хромосомах 6, 11, 15 и 2, соответственно. Размеры кластеров варьируют от 20 до 200 kb. Хорошо видно, что у млекопитающих организация кластеров гомеобокс-содержащих генов мыши, НОХА, НОХВ, НОХС и НОХД, имеет значительное сходство с комплексами генов ANT-C и BX-C. Это прежде всего

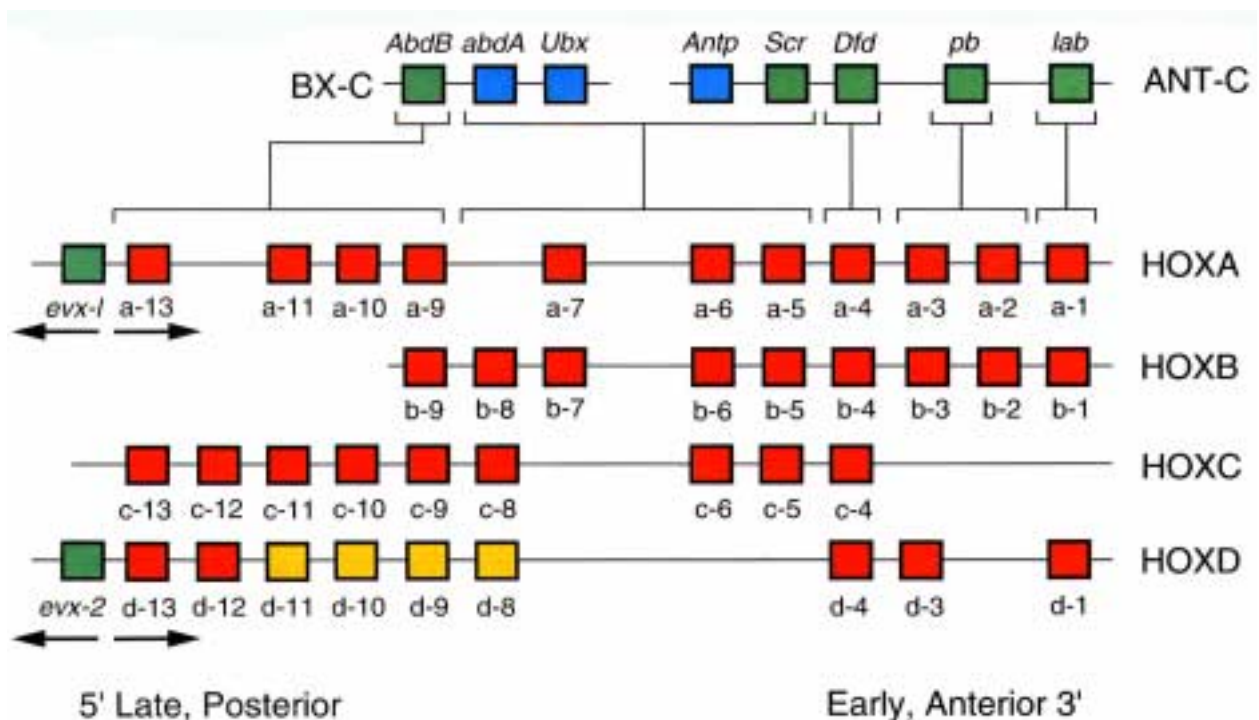


Рис.2.53. Диаграмма, показывающая организацию гомеозисных генов у *D. melanogaster* и у млекопитающих и их филогенетические взаимодействия. Вверху показаны комплекс генов BX-C и ANP-C у *D. melanogaster*: *Abd B* (abdominal B), *abdA* (abdominal A), *Ubx* (Ultrabithorax), *Antp* (Antennapedia), *Scr* (Sex comb reduced), *Dfd* (Deformed), *pb* (proboscipedia) и *lab* (labial). Четыре кластера гомеобокс-содержащих генов: НОХА, НОХВ, НОХС и НОХД выявлено в геноме млекопитающих. Все гомеобокс-содержащие гены транскрибируются от 5' к 3' концу.

у филогенетически далеких видов. Использование гомеобоксов в качестве зондов позволило выявить в геноме млекопитающих (человек, мышь) 38 гомеобокс-содержащих генов,

касается сохранения порядка генов, характерного для генома дрозофилы. Это удивительно, поскольку в геноме дрозофилы в комплексе ANT-C содержатся также гены (*bcd*, *ftz*, *ama*) с

другими типами гомеобоксов, и это предполагает, что в эволюции произошла сложная реорганизация этого участка предкового генома, сопровождавшаяся “аккуратным” вырезанием генов, лишенных гомеозисных функций, но при полном сохранении всех гомеозисных генов. Транскрипция в каждом кластере гомеобокс-содержащих генов у мыши, как и у дрозофилы, осуществляется в направлении слева направо от 5' - к 3' концу (рис.2.53). Можно заметить также, что в процессе эволюции произошли дубликации некоторых членов комплекса гомеозисных генов в геноме млекопитающих. Например, гомеолог гена *pb* дрозофилы представлен в двух копиях, *a-2* и *a-3*, в кластере НОХА, или *b-2* и *b-3* в кластере НОХВ (рис.2.53). Еще большее число копий имеется в геноме мыши генов, гомеологичных гену *AbdV* дрозофилы (4 гена: *a-9*, *a-10*, *a-11* и *a-13*, в кластере НОХА или 5 генов: *c-9*, *c-10*, *c-11*, *c-12* и *c-13*, в кластере НОХС). Однако наиболее впечатляющими являются данные по экспрессии членов семейств НОХА, НОХВ, НОХС и НОХ-С в процессе развития мыши. На рис.2.54 схематически показано распределение первичных транскриптов генов, членов семейства НОХА. Легко можно заметить коллинеарность в распределении этих транскриптов вдоль передне-задней оси эмбриона мыши (на стадии образования сомитов) и в линейном расположении генов в комплексе НОХА. Действие генов, расположенных более постериорно, таких как *a-4*, *a-5* и *a-6*, проявляется в значительной части позвоночного

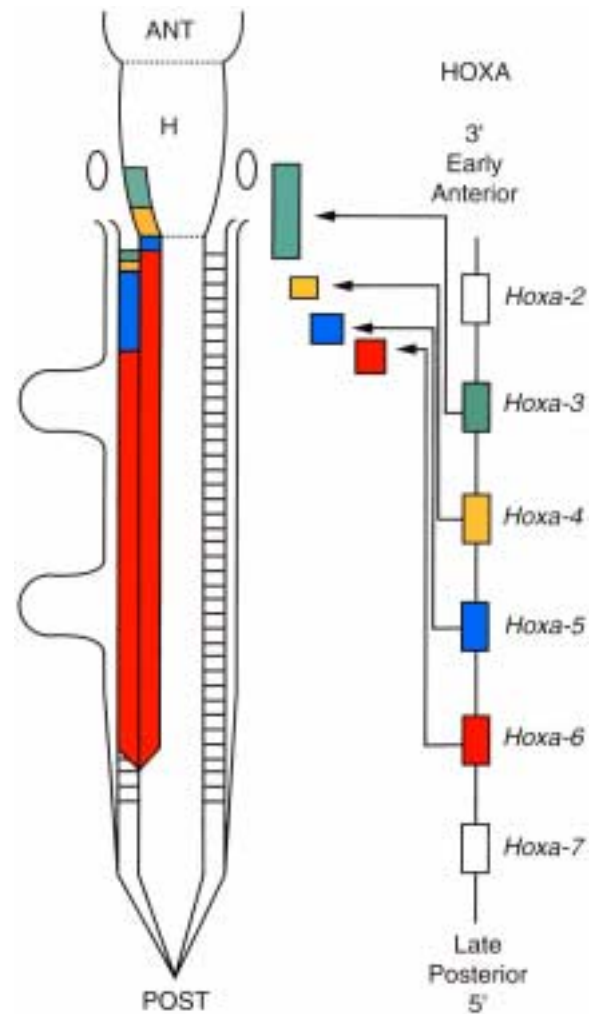


Рис.2.54. Схема экспрессии гомеобокс-содержащих генов, членов комплекса Ноха, вдоль превертебрального зачатка спинного мозга и нейральной трубки эмбриона мыши. Можно видеть коллинеарность расположения генов в комплексе Ноха и распределения первичных транскриптов этих генов вдоль передней (ANT) и задней (POST) оси эмбриона, с преобладанием экспрессии постериорных членов комплекса; в центре рисунка стрелки показывают передние границы распределения генов Ноха 2-6.

столба, но не затрагивает передней его части и не распространяется на закладку заднего мозга (рис.2.54). Наоборот, фокус действия гена НОХА-3 ограничен закладкой заднего мозга и крайней передней частью позвоночного столба (рис.2.54). Из рис.2.54 также видно преобладание экспрессии простериорных генов над

генами, расположенными более антериорно.

Недавно получены прямые доказательства эволюционного консерватизма функциональной иерархии между НОХ генами, прослеживающейся от дрозофилы до млекопитающих. Кодирующие части мышинных генов *Hoxd-8*, *Hoxd-9*, *Hoxd-10* и *Hoxd-11* были “слиты” с промотором *heat-shock* гена (*hsp70*) и введены в геном дрозофилы. Действие генов мыши, находящихся под контролем промотора *hsp70*, на развитие трансгенных мух показано на рис.2.55. Экспрессия *Hoxd-8* и *Hoxd-9* предотвращает инволюцию головы и трансформирует один головной сегмент, но не нарушает развития торакальных и абдоминальных сегментов (рис.2.55). Экспрессия *Hoxd-10* у трансгенных личинок вызывает трансформацию торакальных сегментов, но не абдоминальных, тогда как экспрессия *Hoxd-11* нарушает развитие абдоминальных структур (рис.2.55). Эти данные показывают коллинеарность экспрессии гомеобокс-содержащих генов мыши у трансгенных мух, то есть более постериорно экспрессирующиеся гены у мыши оказывают свой эффект также на постериорные структуры трансгенных дрозофил.

В настоящее время отсутствуют надежные данные о механизмах такого контроля. Общие представления базируются на предположении, что имеющиеся количественные различия в распределении гомео-бокс-содержащих белков вдоль передне-задней оси эмбриона потенциально могут обусловить дифференциальный

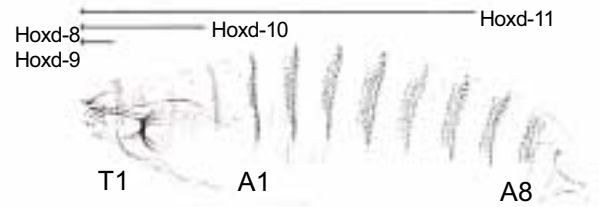


Рис.2.55. Районы личинки *D. melanogaster* испытывающие влияние трансгенов, состоящих из кодирующих частей генов *Hoxd-8*, *Hoxd-9*, *Hoxd-10* и *Hoxd-11* мыши и промотора гена белка *heat-shock*. Фокусы действия этих трансгенов отмечены линиями *Hoxd-8*, *Hoxd-9*, *Hoxd-10* и *Hoxd-11*. Эффект *Hoxd-8* и *Hoxd-9* вызывает трансформацию одного головного сегмента и предотвращает инволюцию головы, но отсутствует эффект на торакальные и абдоминальные сегменты. Экспрессия *Hoxd-10* вызывает трансформацию торакальных сегментов, но не абдоминальных, в то время как эффект *Hoxd-11* распространяется и на абдоминальные сегменты.

ответ генов-”мишеней” (“target genes”), как это описано выше для детерминации пространственных границ действия генов сегментации. Несомненно также, что в регуляции гомеозисных генов принимают участие гены сегментации и даже материнские гены. Например, изменяется экспрессия гена *Ubx* у мутантов по генам *bicoid*, *hunchback* и *Krüppel*. В определении передней границы этого гена принимает участие гены сегментации *fushi tarazu* и *even-skipped*.

Картина регуляции гомеозисных генов еще более усложняется, если принять во внимание существование достаточно большого **набора генов (более 20), которые влияют на их экспрессию транс-способом.** В таблице 2.5 приведен список таких генов. Как следует из данных этой таблицы, все эти гены относятся к

Таблица 2.5. Транс-регуляторные гены, влияющие на экспрессию гомеозисных генов.

Ген	Локализация
Гаплонедостаточные	
Asx - additional sex combs	51AB
Psc - posterior sex combs	49EF
Pd - Polycomb-like	3-47
Pc - Polycomb	
Scm - Sex comb on mid leg	85EF
ph - polyhomeiotic	2D2-4
Ubl - Unltrabithorax-like	
Гаплонедостаточные с материнским эффектом	
exc - extra sex combs	33B1.2
sxc - super sex combs	2-55

группе гаплонедостаточных: делеции по этим генам в гетерозиготном состоянии не обеспечивают нормального развития и ведут себя как эмбриолетали. Эта категория генов более или менее равномерно распределена по геному дрозофилы (таблица 2.5). Эффекты транс-действующих генов на сегментацию разнообразны: например, мутации Pc и esc вызывают трансформацию всех торакальных и абдоминальных сегментов в A8, тогда как мутации Asc, Pcl, Psc и Scm вызывают лишь частичную трансформацию задних абдоминальных сегментов. Однако, в последнем случае двойные мутанты (компаунды по этим генам) зачастую имеют фенотип, сходный с Pc. Это может указывать на **синергичность действия этих генов**.

Транс-регуляция экспрессии гомеозисных генов осуществляется разнообразными способами. Например, доминантная мутация гена Ubl, локализованного в X-хромосоме, имитирует мутацию Ubх. Однако в гомозиготном состоянии мутация проявляется как леталь и без каких

либо гомеозисных превращений. Более того некоторые аллели гена Ubl также не вызывают гомеозисных эффектов. В настоящее время известно, что ген Ubl кодирует одну из субъединиц РНК-полимеразы II, необходимую для транскрипции. Так как гомеозисным эффектом обладает лишь один аллель гена Ubl, а нуль-аллели им не обладают, предполагается, что этот единственный гомеозисный аллель обуславливает синтез измененного фермента, который в свою очередь оказывает влияние на транскрипцию гена Ubх. Этот вывод подтверждается тем, что этот аллель снижает скорость транскрипции и других негемозисных генов, локализованных в других хромосомах. Вероятно, транскрипция гена Ubх более чувствительна к измененной активности фермента, чем другие гомеозисные гены.

В настоящее время установлена функция гена Pc, этот ген кодирует белок, который преимущественно (если не исключительно) связывается с гетерохроматином посредством хромомена. Такая функция гена Pc предполагает репрессирующий

характер действия белка Рс на активность многих генов, включая гены комплекса ВХ-С.

Прогресс в исследовании молекулярных механизмов действия гомеозисных генов вскрыл новые пути регуляции и взаимодействия гомеозисных и негемеозисных генов. Например, недавно показано, что нога и антенна являются в некотором роде гомологичными структурами и различия между ними возникают благодаря действию гена *Antp*, который репрессирует гены *extradenticle (exd)* и *homothorax (hth)*, детерминирующие развитие антенны. Гены *exd* и *hth* содержат гомеобоксы, но другого типа, нежели гомеозисные гены. Нарушение функции гена *exd* или *hth* вызывает превращение антенны в ногу, причем это может происходить без активации гена *Antp*. Любопытно, что мышинный гомолог гена *hth* (*Meis1*) сохраняет эту функцию; эктопическая экспрессия гена *Meis1* вызывает трансформацию анальной пластинки в антенну и аристы. Можно ожидать, что в ближайшие годы будут расшифрованы молекулярные механизмы действия гомеозисных генов и будет понят принцип их иерархичной регуляции.

Список рекомендуемой литературы

- Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика. “Мир”, Москва, 1988.
- Гилберт С.** Биология развития. т.1, “Мир”, Москва, 1993.
- Рэфф Р., Кофман Т.** Эмбрионы, гены и эволюция. “Мир”, Москва, 1986.
- Ashburner M.** *Drosophila. A Laboratory Handbook.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Duboule D., Morata G.** Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in Genetics*, v.10, pp 358-364 (1994).
- Foe V.E.** Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Cell*, v.107, pp 1-22 (1989).
- Gehring W.J.** Imaginal discs: determination. In: *The Genetics and Biology of Drosophila.* Eds. M.Ashburner and T.R.F.Wright. Academic Press, New York. Vol.2c, pp 511-554.
- Fullilove L.S., Jacobson A.G., Turner F.R.** Embryonic development: descriptive. In: *The Genetics and Biology of Drosophila.* Eds. M.Ashburner and T.R.F.Wright. Academic Press, New York. Vol.2c, pp 103-228 (1978).
- Hadorn E.** Transdetermination. In: *The Genetics and Biology of Drosophila.* Eds.M.Ashburner and T.R.F.Wright. Academic Press, New York. Vol.2c, pp 555-617 (1978).
- Illmensee K.** Developmental potencies of nuclei from cleavage, preblastoderm, and syncytial blastoderm transplanted into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux’s Archiv*, v.170, pp 267-298 (1972).
- Illmensee K.** The potentialities of

transplanted early gastrula nuclei of *Drosophila melanogaster*. Production of their imago descendants by germ-line transplantation. Wilhelm Roux's Archiv, v.171, pp 331-343 (1973).

Ingham P.W. The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. Nature, v.335, pp 25-34 (1988).

Mahowald A.P., Hardy P.A. Genetics of *Drosophila* embryogenesis. Annual Review of Genetics, v.19, pp 149-177, (1985).

Nusslein-Folhard C. Gradient that organizes embryo development. Scientific American, August, pp 38-43 (1996).

Spradling A.C. Developmental genetics of oogenesis. In: Development of *Drosophila melanogaster*. Ed. Bate Martinez Arias, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 1-70 (1993).

Zalokar M. Transplantation of nuclei in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of National Academy of Sciences of USA, v.68, pp 1539-1541.

Оглавление

ГЛАВА 3. РАННЕЕ РАЗВИТИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	2
3.1. ПРЕДЗАРОДЫШЕВОЕ РАЗВИТИЕ.....	3
3.1.1. Общая характеристика развития млекопитающих	3
3.1.2. Характеристика первичных половых клеток	4
3.1.3. Половые клетки в индифферентных зачатках гонад	7
3.1.4. Инициация мейоза	9
3.1.5. Развитие половых клеток у человека	10
3.1.6. Мейоз	11
3.1.6.1. Ранняя профазы	12
3.1.6.2. Поздняя профазы	12
3.1.7. Созревание фолликулов	14
3.1.8. Созревание ооцита	17
3.1.9. Молекулярные процессы, ответственные за созревание ооцита	20
3.1.10. Оплодотворение и ранние этапы дробления эмбриона	22
3.1.10.1. Спермий	23
3.1.10.2. Строение зрелой яйцеклетки	23
3.1.11. Процесс оплодотворения у млекопитающих	27
3.1.12. Молекулярные механизмы активации яйцеклетки	32
3.1.12.1. Завершение мейоза	34
3.1.2. РАННИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ	35
3.1.2.1. Дробление	37
3.1.2.2. Двухбластомерный эмбрион	39
3.1.2.3. Образование морулы	40
3.1.2.4. Образование бластоцисты	41
3.1.2.5. Некоторые свойства клеток ТЭ и ВКМ	43
3.1.2.6. Тотипотентность бластомеров ранних эмбрионов	43
3.1.2.7. Монозиготные близнецы	44
3.1.2.8. Перспективные потенциалы различных частей бластоцисты	45
3.1.2.9. Преобразование бластоцисты в зародышевый цилиндр	48
Список рекомендуемой литературы	49

ГЛАВА 3

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.

Млекопитающие имеют регуляторный тип яйца, и развитие характеризуется асинхронностью дифференцировки различных частей эмбриона, а детерминация “судьбы” вступающих на путь дифференцировки клеток может происходить в течении всего эмбриогенеза и даже в постнатальном онтогенезе.

Принято разделять развитие млекопитающих на следующие периоды:

1) Процессы, предшествующие образованию зародыша, такие как возникновение первичных половых клеток, их размножение и дифференцировка, а также оплодотворение, - объединяют понятием **предзародышевое развитие или прогенез.**

2) **Ранний эмбриогенез**, который начинается от момента оплодотворения и завершается имплантацией зародыша в стенку матки.

3) **Внутриутробный период развития** охватывает период от момента имплантации до рождения.

4) **Постнатальный онтогенез** - это период развития от момента рождения до формирования дефинитивного взрослого организма.

Продолжительность этих периодов развития варьирует у разных видов млекопитающих. Как правило, у крупных животных внутриутробный период значительно длиннее (до 9

месяцев, например, человек, слон, корова), чем у мелких, таких как грызуны (от 3 до 4 недель). Имеет смысл также разделить всех млекопитающих на две большие группы, различающиеся типом внутриутробного и постнатального развития: у одной группы животных (например, некоторые виды грызунов, такие как мыши, хомячки, полевки, или, например, хищные или приматы) новорожденные животные имеют недоразвитую центральную систему и систему гуморального иммунитета, то есть у этой группы животных в постнатальном онтогенезе имеет место **тканевая дифференцировка и даже частично органогенез.** Вторая группа животных (например, некоторые виды грызунов, такие как морские свинки, нутрии, или многие виды парно- и непарнокопытных, олени, лошади, зебры) характеризуется тем, что новорожденные животные практически полностью приспособлены к самостоятельному образу жизни (за исключением питания молоком матери), то есть у них практически **завершены процессы органогенеза и тканевой дифференцировки, что обуславливает становление основных физиологических функций, а постнатальный онтогенез характеризуется преимущественно только ростом.** Однако следует иметь в виду, что у обеих групп животных происходит половое созревание в постнатальном онтогенезе, что подразумевает завершение процессов тканевой дифференцировки и морфогенеза в гонадах и структурах вторичных половых признаков.

Безусловно все перечисленные выше стадии индивидуального развития млекопитающих важны и имеют свою специфику. Тем не менее некоторые ключевые события, связанные с детерминацией и эмбриональной дифференцировкой (обособление первичных половых клеток, инактивация Х-хромосом, формирование собственно зародышевых и внезародышевых зачатков, некоторые элементы импринтинга), происходят в предзародышвом периоде и раннем эмбриогенезе. В связи с этим в дальнейшем наше внимание, в значительной мере, будет сосредоточено на этих стадиях развития.

3.1. ПРЕДЗАРОДЫШЕВОЕ РАЗВИТИЕ.

3.1.1. Общая характеристика развития млекопитающих.

Новый организм возникает в результате слияния двух половых клеток - спермия и яйца, то есть в результате оплодотворения. Предшественники половых клеток называются **первичными половыми клетками**. Эти клетки обособляются в отдельную группу на самых ранних этапах эмбриогенеза для осуществления репродуктивной функции или, как отмечалось в вводной лекции, для реализации второй программы развития. Все остальные клетки называются **соматическими**. Это разделение на соматические клетки (дающие начало индивидуальному организму,

реализация первой программы развития) и половые (обеспечивающие возникновение нового поколения организмов) вероятно представляет собой один из первых этапов эмбриональной дифференцировки, который имеет место задолго до формирования видимых морфологически зачатков гонад. Первоначально отделившаяся группа клеток в раннем эмбрионе в дальнейшем мигрирует в развивающиеся зачатки гонад, где они дифференцируются в гаметы - клетки, участвующие в оплодотворении. Развитие гамет называется **гаметогенезом**. Следует также отметить, что процессы, происходящие в гаметогенезе, могут оказывать существенное влияние на развитие эмбриона от момента оплодотворения и даже в постнатальном онтогенезе.

После оплодотворения начинается процесс деления дробления, при этом цитоплазма яйца «распределяется» между дробящимися бластомерами. Развивающийся доимплантационный зародыш по своим размерам не превышает размеров зрелой яйцеклетки, и, хотя гены зародыша начинают экспрессироваться у млекопитающих относительно рано, его жизнедеятельность обеспечивается и за счет продуктов, накопленных в яйцеклетке в процессе оогенеза. Показано, что развитие эмбриона *in vitro* от момента оплодотворения до бластоцисты возможно в простой питательной среде, содержащей только пируват и соли.

Как отмечалось выше, у млекопитающих яйцеклетка имеет

регуляционный тип организации, то есть в ее цитоплазме отсутствуют регионально сегрегированные детерминанты, как это имеет место у дрозофилы, имеющей мозаичный тип развития. В этом убеждают опыты по интенсивному перемешиванию цитоплазмы яйца, которое не приводит к заметным изменениям развития. Например, в многочисленных экспериментах по центрифугированию оплодотворенных яйцеклеток различных животных (свиньи, овцы, коровы, норки) показано, что несмотря на смещение к одному из полюсов субклеточных структур, желточных гранул и других компонентов цитоплазмы в результате этой процедуры, развитие из таких яиц возможно, и видимых отклонений не наблюдается. Еще более убедительно это было показано в экспериментах по перемешиванию цитоплазмы оплодотворенных яйцеклеток мыши. С этой целью в цитоплазму яйца вводили с помощью микроманипулятора микроиглу, соединенную с пьезоэлементом, вызывающим ее высокочастотное колебание (более 70 колебаний в секунду). В результате такой обработки (до 30 секунд) в цитоплазме яйца возникают потоки, как это происходит в стиральной машине, вызывающие интенсивное перемешивание цитоплазмы. Обработанные таким образом яйца культивировались *in vitro* и затем трансплантировались в матку приемным матерям. В большинстве случаев наблюдалось нормальное развитие из экспериментальных яиц.

Однако есть основания полагать, что в зрелой или уже оплодотворенной

яйцеклетке существуют неидентифицированные цитоплазматические факторы, которые оказывают влияние на продолжительность первого клеточного цикла (возможно, второго и даже третьего), что, в свою очередь, определяет дальнейший путь развития потомков первых двух бластомеров зародыша. **Потомки бластомера, который характеризуется более высокой скоростью клеточного деления, с большей вероятностью дадут начало развитию внутренней клеточной массы (ВКМ), тогда как потомки второго бластомера с большей вероятностью станут источником для формирования внезародышевых частей эмбриона.**

В настоящее время установлено, что нормальное развитие млекопитающих возможно только при объединении отцовского и материнского набора хромосом в зиготе, то есть ни диплоидный набор отцовских генов, ни диплоидный набор материнских генов недостаточен для нормального развития. Другими словами, родительские наборы хромосом млекопитающих комплементарны (дополняют друг друга). Феномен комплементарности связан со **специфическим импринтингом хромосом, который осуществляется в гаметогенезе.**

3.1.2. Характеристика первичных половых клеток.

Первичные половые клетки (ППК) имеют внегонадное происхождение и дают начало всей популяции гамет млекопитающих. От

соматических клеток ППК можно с уверенностью отличить лишь на фиксированных препаратах, используя гистохимические методы выявления в них активности щелочной фосфатазы, а у человека - и при окраске на полисахариды. Других надежных маркеров, позволяющих визуализировать ППК, не существует. После приобретения ППК фенотипа, который позволяет выявлять их на гистологических препаратах зародышей последовательных стадий развития, можно проследить за миграцией ППК до зачатка гонады.

Как уже говорилось, выделение линии ППК происходит на самых ранних стадиях эмбриогенеза. Однако, фенотипически они выявляются уже после имплантации зародыша. Вначале ППК обнаруживаются в первичной полоске и в основании аллантаоиса, затем в энтодерме желточного мешка и в задней кишке, затем в энтодерме средней кишки, в дорсальной брыжейке и целомической выстилке, после чего они попадают в эпителий, покрывающий зачаток гонады (так называемый, зачатковый эпителий) и, пройдя через этот эпителий, обнаруживаются в половых валиках, т.е. в зачатках гонад.

На ранних стадиях эмбриогенеза ППК, вероятнее всего, передвигаются пассивно, в результате перемещения клеточных слоев в процессе гастрюляции и с током крови через систему омфалоидных сосудов из желточного мешка. Попад в заднюю кишку, ППК приобретают способность к активным движениям (по-видимому, образуют филоподии и выпячивания, а затем волнообразно сокращают все

тело клетки). Механизмы, определяющие путь ППК к зачаткам гонад, неясны. Полагают, что это определяется какими-то химическими сигналами, исходящими от зачатков гонад. Эти сигналы, по-видимому, лишены видоспецифичности. Например, при трансплантации части раннего зародыша мыши, содержащего ППК, на хориоаллантаоис зародыша цыпленка, ППК мыши передвигаются к зачаткам гонад цыпленка. Вероятно также, что при продвижении ППК по кишке, они вступают в какие-то взаимодействия с базальными мембранами, что оказывает влияние на направление их движения. Механизм этого взаимодействия неясен.

Отнюдь не все ППК попадают в зачаток гонады. Их можно найти у зародышей мышей в составе кожной эктодермы, в мезенхиме, окружающей нервную трубку, в кишке, в мезонефросе, в надпочечнике и в других эктопических местах. Не попавшие в гонады ППК могут сохраняться не только в пренатальном, но и в постнатальном периоде и, как полагают, могут служить источником опухолей. Однако эта довольно распространенная среди онкологов точка зрения лишена строгих экспериментальных доказательств. Так, например, если трансплантировать в переднюю камеру глаза зачаток задней кишки мышинного зародыша, в котором находится много мигрирующих ППК, то через три-четыре дня ППК из трансплантата исчезают. Эти и другие опыты свидетельствуют о малой вероятности преобразования «заблудившихся» ППК

в столовые опухолевые клетки.

ППК млекопитающих (за исключением человека) проявляют высокую митотическую активность в процессе миграции. Например, у мыши первоначально небольшое количество ППК накануне начала миграции (8 сут.) к моменту внедрения в гонаду (11 сут.) увеличивается более чем в 50 раз. После попадания в гонаду пролиферация ППК продолжается. Различий в темпах пролиферации ППК мужского и женского пола не обнаружено. У человека мигрирующие ППК не проявляют существенной митотической активности, и их размножение в основном осуществляется в зачатке гонады.

ППК являются диплоидными клетками, то есть у эмбрионов женского пола они имеют XX, а у эмбрионов мужского пола - XY половые хромосомы.

О функциональном состоянии Y хромосомы в мигрирующих ППК мужского пола убедительных данных нет. В ППК, находящихся в зачатке гонады, Y хромосома по-видимому, активна.

О состоянии X хромосом в процессе развития женских половых клеток убедительные данные получены для зародышей человека. Использовались чувствительные цитологические методы, позволяющие с уверенностью выявлять наличие или отсутствие тельца полового хроматина - надежного показателя гетерохроматизации одной X хромосомы в клетках человека (но не в клетках мышей). Установлены четкие отличия ядер мигрирующих ППК

женского пола от ядер соматических клеток. Ядра ППК имеют более крупные размеры, округлую форму и центрально расположенное большое ядрышко. По своей организации они несколько напоминают ядра бластомеров ранних зародышей. В них не выявляется структурный гетерохроматин, а также тельце полового хроматина. Вместе с тем в ядрах соматических клеток тельце полового хроматина заметно очень четко.

Таким образом, цитологические данные свидетельствуют о том, что в мигрирующих к зачаткам гонад ППК женского пола обе X хромосомы активны (подробнее реактивация X хромосом в процессе гаметогенеза будет рассмотрена в главе "Инактивация X-хромосом, как пример дифференциальной активности генов на хромосомном уровне").

Когда ППК внедряются между клетками эпителия, покрывающего зачаток гонады, происходят ультраструктурные изменения и в ППК, и в клетках эпителия, что свидетельствует о каких-то взаимодействиях, природа которых не ясна. Заселение ППК зачатка гонады у зародыша человека происходит на 35 сут. развития. Затем начинаются последовательные изменения ядер ППК, в них появляется структурный гетерохроматин и возникает глыбка полового хроматина.

Гетерохроматизация одной X хромосомы знаменует превращение ППК в оогонии, и это происходит тогда, когда ППК уже находятся в зачатках гонад.

После дифференциации ППК в

оогонии начинается размножение оогоний. На протяжении всего периода размножения оогоний человека в гонаде, в них выявляется одна гетерохроматизированная X хромосома. Обе X хромосомы становятся активными, только когда оогония завершает предмейотический митоз и вступает в мейоз.

И у человека, и у мыши состояние X хромосом в ППК, находящихся в гонадах, примерно одинаково. О состоянии же X хромосом в мигрирующих к зачатку гонады ППК мыши и других млекопитающих неизвестно.

3.1.3. Половые клетки в индифферентных зачатках гонад.

Хорошо известно, что у млекопитающих вначале возникает **индифферентный зачаток половой системы, включающий в себя парные бипотенциальные закладки гонад**. Закладка гонад (половой валик) возникает в виде утолщения целомического эпителия на поверхности первичной почки - вольфова тела (mesonephros). От тела первичной почки к клоаке тянется вольфов проток (мезонефральный). От него отщепляется и идет параллельно мюллеров проток (парамезонефральный).

Половая система развивается под влиянием факторов, вырабатываемых зародышевыми гонадами при их дифференцировке в семенники или яичники.

При дифференцировке зародышевых гонад в тестис происходит редукция мюллеровых

протоков и прогрессивное развитие производных вольфовых протоков, из них образуются придатки семенника и семявыносящие протоки. При развитии зачатка гонад в яичник редуцируются вольфовые протоки, но развиваются производные мюллеровых протоков, из которых образуются маточные (фаллопиевые) трубы, матка и влагалище. Из недифференцированного мочеполювого синуса развиваются наружные мужские и женские половые органы.

Индифферентный зачаток гонады содержит ППК и три типа соматических клеток: клетки целомического эпителия, мезенхимы и мезонефроса. У зародышей обоего пола ППК вначале хаотически располагаются в периферических частях зачатка гонады среди соматических клеток. Затем начинается гистологическая дифференцировка соматических клеток гонад, что дает возможность различить их пол.

Строго говоря, **оогенезом (овогенезом) называют процесс развития женских половых клеток от оогоний и до зрелой яйцеклетки**. Половые клетки, **располагающиеся вне зачатка гонад или находящиеся в зачатке гонад до дифференцировки их в соматические клетки, принято относить к ППК**. Если исходить из этого принципа, то у зародышей мышей оогонии образуются на 11,5 - 12 сут. развития, а затем начинается их размножение.

Параллельно с размножением, гибнет значительное количество оогоний. Среди них нередко обнаруживаются двуядерные и

многоядерные клетки; некоторые оогонии, вступая в митоз, образуют полиплоидные метафазы.

У зародышей мышей, крыс и человека наблюдается примерно одинаковая картина при сопоставлении поведения мужских и женских гоний в зачатках гонад. Рассмотрим, как ведут себя гониальные клетки у крысы.

На тех стадиях эмбриогенеза, когда в зачатке яичника происходит пролиферация оогоний, в зачатке семенника осуществляется пролиферация просперматогоний. Эту генерацию просперматогоний называют просперматогониями-М. Оогонии и просперматогонии-М характеризуются одинаковой продолжительностью клеточного цикла, сходной ультраструктурой, интенсивностью синтеза РНК, содержанием кислой фосфатазы и некоторых других ферментов, а также чувствительностью этих двух видов клеток к ионизирующей радиации и цитостатическим препаратам.

Таким образом, на 14-16 сут. развития зародышей крыс в закладке яичника и в закладке семенника происходит интенсивная пролиферация, соответственно, оогоний и просперматогоний-М. Продолжительность всех фаз клеточного цикла популяций мужских и женских гоний одинакова. На 18 сут. просперматогонии-М вступают в митоз, в результате чего в зародышевом семеннике образуются просперматогонии-Т, которые входят в длительную фазу G1. Только на 5 сут. после рождения просперматогонии-Т вступают в фазу S и после короткой

фазы G2 вновь начинают делиться. После нескольких последовательных митотических делений возникает дефинитивная популяция стволовых мужских половых клеток (сперматогонии АО, А1). С этой популяции начинается сперматогенез уже у половозрелых животных, и далее, в семеннике, на протяжении всего периода половой активности из стволовых сперматогоний постоянно образуются спермии.

В женской гонаде зародышей крыс предмейотический митоз оогоний осуществляется на 17 сут. эмбриогенеза, в результате чего возникает популяция клеток, которая проходит фазу G1 и вступает в предмейотическую фазу синтеза ДНК S. После фазы S, которая приходится на 18 сут. внутриутробного развития, клетки вступают в профазу мейоза.

Процесс пролиферации оогоний и их преобразования в ооциты у таких животных, как мыши, крысы, морские свинки, коровы, овцы, свиньи, обезьяны, человек, заканчивается во внутриутробном периоде жизни. У кроликов, хорьков, золотистых хомячков пролиферация оогоний прекращается спустя короткое время после рождения.

Таким образом, взрослые особи млекопитающих характеризуются наличием в яичнике запаса половых клеток, неспособных пролиферировать, то есть пула первичных ооцитов.

3.1.4. Инициация мейоза.

Как отмечалось выше, в женских половых клетках мейоз инициируется на значительно более ранних стадиях онтогенеза, чем в мужских половых клетках. Инициация мейоза и дальнейший путь развития половых клеток млекопитающих несомненно зависят от окружающих соматических клеток. Полагают, что в яичнике эмбрионов млекопитающих образуется некий индуктор мейоза, а в тестикулах - ингибитор инициации мейоза.

Согласно одной из гипотез, все половые клетки изначально обладают способностью рано вступать в мейоз, но мужские половые клетки находятся под влиянием каких-то факторов тестикул, которые ингибируют мейоз. Полагают, что мужские половые клетки взаимодействуют с предшественниками клеток Сертоли, и это взаимодействие приводит к образованию ингибитора. Если семенные канальцы разрушаются, или предшественники клеток Сертоли утрачивают контакты с половыми клетками, то эти половые клетки вступают в мейоз, несмотря на наличие ХУ половых хромосом. Согласно другой гипотезе, фактор, инициирующий мейоз в женских половых клетках, вырабатывается клетками мезонефроса и затем диффундирует в зачаток гонады. Этот индуктор способен инициировать ранний мейоз и в мужских половых клетках. Однако мужские половые клетки находятся в зачатке тестикула в составе первичных семенных канальцев, поэтому они защищены от действия индуктора и не вступают в

мейоз одновременно с женскими половыми клетками в яичнике. В настоящее время проблема инициации мейоза у млекопитающих еще далека от своего решения. Существующий уровень знаний не позволяет объяснить механизмы переключения митотических циклов на мейотический цикл.

Ограничимся общими соображениями:

(1) При выделении у зародышей млекопитающих линий половых клеток создается программа их развития, которая предусматривает переключение митотических циклов на мейотический цикл. Для инициации мейоза половые клетки нуждаются в воздействии какого-то дополнительного сигнала со стороны соматических клеток, причем они приобретают компетентность отвечать на это воздействие только в определенном биологическом возрасте. Этот биологический возраст, по-видимому, измеряется количеством митотических циклов или раундов репликации ДНК, причем отсчет начинается с момента выделения клона ППК. Известно, что последний (предмейотический) раунд репликации ДНК является решающим, после этого клетки либо вступают в мейоз (оогонии), либо в них возникает длительная фаза торможения митотических циклов.

(2) Мейоз контролируется генами; у разных организмов найдены мутации, при которых половые клетки не вступают в мейоз и после ряда митотических циклов погибают. Возможно, что и у млекопитающих существуют «гены инициации мейоза»,

они должны активироваться у половых клеток в оогенезе раньше, чем в сперматогенезе. Эти гены, скорее всего, не локализованы в половых хромосомах, так как в инициации мейоза половые хромосомы не играют решающей роли. Однако для нормального сперматогенеза недопустимо наличие двух X хромосом. Это связано с тем, что если в клетках, вступивших в сперматогенез, хотя бы одна X хромосома сохраняет генетическую активность, такие сперматоциты гибнут. Кроме того, на Y хромосоме находятся гены, отвечающие за полноценную цитодифференцировку спермиев, поэтому Y хромосома необходима для полноценного развития спермиев.

(3) Для сперматогенеза необходимо, чтобы мейоз начинался значительно позже, чем в оогенезе, поскольку необходимым этапом является формирование популяции дефинитивных стволовых клеток (сперматогоний АО, А1 и т.д.). За счет пролиферации этих клеток на протяжении всего периода половой активности самца образуется огромное количество мужских гамет, на много порядков превосходящее запас первичных ооцитов, который обеспечивает оогенез на протяжении всей жизни самки.

(4) Существует биологический барьер, препятствующий тому, чтобы мужские гонии рано вступали в мейоз, и популяция митотически делящихся стволовых клеток не смогла бы образоваться. Если мужские половые клетки вступают в мейоз тогда же, когда и женские половые клетки, в таких клетках не образуется полового

пузырька. Половой пузырек образуется во время профазы мейоза при сперматогенезе и является морфологическим выражением изоляции и инактивации комплекса XY хромосом в сперматогенезе. Если X и Y хромосомы остаются активными, у мужских половых клеток нарушается баланс между продуктами экспрессии аутосом и половых хромосом в мейозе, что приводит к их гибели.

3.1.5. Развитие половых клеток у человека.

ППК человека выходят из желточного мешка на 27 сут. развития и мигрируют в гонадные валики. На 42-46 сут. происходит половая дифференцировка гонад, они становятся семенниками или яичниками,

Оогенез. Начиная с 3 мес. (75 сут.) первая популяция ооцитов вступает в профазу I мейоза. Те оогонии, которые в течение 7 месяцев не превратились в ооциты, дегенерируют. После рождения стволовые клетки (оогонии) превращаются в ооциты или дегенерируют. Общая популяция половых клеток эмбриона женского пола увеличивается от 6×10^5 на 2 мес. беременности до максимальной численности $6,8 \times 10^6$ к 5 мес. Однако к моменту рождения эта численность популяции оогоний уменьшается до 2×10^3 . От рождения до половой зрелости и оплодотворения женская ПК претерпевает только еще два деления (мейотические) независимо от того, в каком возрасте происходит оплодотворение.

Сперматогенез. У мужчин примерно в 15-16 лет полностью

устанавливается сперматогенез, то есть окончательно формируется популяция стволовых мужских половых клеток - сперматогоний Ad (dark). Их общее количество в двух семенниках оценивается примерно $1,2 \times 10^3$ клеток. Однако, в отличие от оогоний эти Ad сперматогонии способны к перманентной пролиферации на протяжении всего периода половой активности мужчины.

3.1.6. Мейоз.

Мейоз - ядерное деление особого типа, в результате которого формируются зрелые половые клетки. В отличие от митоза, мейоз состоит из двух клеточных делений, следующих за единственной фазой удвоения хромосом, так что из каждой клетки, вступающей в мейоз, образуется 4 гаплоидных клетки.

Как известно, биологический смысл мейоза заключается в рекомбинировании генов, что создает условия возникновения уникальных разнообразных генотипов

в гамет. В основе этого лежат два процесса: 1) случайное распределение разных материнских и отцовских гомологичных хромосом между дочерними клетками при первом делении мейоза; 2) кроссинговер, происходящий в продолжительной профазе первого мейотического деления, когда гомологичные хромосомы обмениваются участками.

Первое деление мейоза гораздо сложнее и длительнее второго. В профазе первого деления мейоза (профаза I) клетки могут находиться несколько дней, месяцев, лет в зависимости от организма и от типа образующихся гамет.

Рассмотрим особенности мейоза у млекопитающих, сосредоточившись преимущественно на процессах, происходящих в женских половых клетках. Во время профазы первого деления происходят изменения не только хромосомного аппарата, но и цитоплазмы ооцитов. Поэтому удобно разделить профазу I на следующие стадии:

I. Ранняя профаза
<ol style="list-style-type: none"> 1. Лептотена 2. Зиготена 3. Пахитена 4. Ранняя диплотена
II. Поздняя профаза
<ol style="list-style-type: none"> 1. Диктиотена (диффузная диплотена в примордиальных ооцитах) 2. Продвинутая диплотена (основной рост ооцитов) 3. Поздняя диплотена (прекращение роста ооцитов и формирование кариосферы) 4. Диакинез (начало созревания ооцитов)

3.1.6.1. Ранняя профазы.

Лептотема. На этой стадии хромосомы меняют свою интерфазную конформацию и становятся более конденсированными. Теломеры хромосом прикреплены к ядерной мембране. Обе сестринские хроматиды тесно сближены и неразличимы в световом микроскопе.

Зиготена. Эта стадия характеризуется началом процесса синапсиса - тесной конъюгации гомологичных хромосом. В результате образуются биваленты и формируется синаптонемальный комплекс.

Пахитена. На этой стадии происходит обмен участками несестринских хроматид гомологичных хромосом - кроссинговер. Пахитена ооцитов млекопитающих отличается от пахитены у сперматоцитов тем, что в ооцитах хромосомы проявляют более высокую транскрипционную активность. Для млекопитающих также характерна гибель значительного количества мейоцитов (ооцитов и сперматоцитов) на стадии пахитены. Элиминируются мейоциты, в которых содержатся хромосомы, неконъюгировавшие или не полностью конъюгировавшие на стадии пахитены. Это происходит как в овогенезе, так и в сперматогенезе. Сперматоциты элиминируются чаще, несмотря на то, что и в сперматогенезе осуществляется синаптическая подгонка хромосом, в результате которой происходит исправление ошибок конъюгации. Однако, в сперматогенезе мейоз блокируется на более короткий период, чем в овогенезе, и исправление ошибок конъюгации

происходит с меньшей эффективностью.

Диплотена. Основная генерация ооцитов млекопитающих блокируется на этой стадии на длительный период и участвует в фолликулогенезе. Начинается эта стадия с разделения двух конъюгировавших хромосом, синаптонемальный комплекс распадается, гомологи бивалента разделяются и становятся видны связывающие их хиазмы. В конце ранней профазы в ооцитах млекопитающих описаны хромосомы типа ламповых щеток, хромосомы на этой стадии проявляют явную транскрипционную активность, но она намного ниже, чем на стадии продвинутой диплотены.

3.1.6.2. Поздняя профазы.

Диктиотена является диффузной стадией диплотены в примордиальных ооцитах. Ядра ооцитов увеличиваются и приобретают интерфазную морфологию вследствие деконденсации хромосом. Транскрипционная активность их невысока, она обеспечивает лишь выживание покоящихся клеток. Диктиотена предшествует периоду роста ооцитов, и в это время ооциты находятся в некотором роде равновесном (дремлющем) состоянии. Стадия диктиотены характерна для овогенеза повзрелых. На этой стадии вокруг ооцита формируется слой фолликулярных клеток, то есть образуются примордиальные фолликулы.

Примордиальный (или первичный) фолликул состоит из

ооцита 1-го порядка (находится в состоянии покоя на стадии диктиотены), окруженного одним слоем уплощенных фолликулярных клеток. В форме примордиальных фолликулов ооциты персистируют в яичниках на протяжении всей жизни особи. Продолжительность диктиотены различна: у мышей от нескольких месяцев до полутора-двух лет, у человека от 14-15 до 45-50 лет. На протяжении репродуктивного периода ооциты, пребывавшие в различное время на стадии диктиотены, не отличаются по своим свойствам, включая способность к оплодотворению. Таким образом, биологический смысл диктиотены в создании такого состояния, при котором ооциты могут персистировать длительное время, не теряя способности завершить оогенез и участвовать в процессе оплодотворения. Механизмы блокирования мейоза на стадии диктиотены остаются неизвестными.

При выходе из стадии диктиотены и блокады мейоза наблюдается интенсивный рост ооцита; он переходит в стадию ооцита 1-го порядка. Как правило, рост ооцита сопровождается увеличением количества окружающих его фолликулярных клеток (клеток гранулезы) и, соответственно, увеличением размера фолликула. Окружающие ооцит 1-го порядка фолликулярные клетки увеличиваются и размножаются, образуя многослойную оболочку - зернистый слой фолликула (*stratum granulosum*). Сам ооцит растет, в его цитоплазме появляются кортикальные гранулы,

вокруг плазматической мембраны формируется блестящая оболочка (*zona pellucida*). Прилежащие вплотную к ооциту фолликулярные клетки имеют отростки, которые проходят сквозь блестящую оболочку и образуют щелевые контакты с ооцитом. По мере роста фолликула вокруг него образуется и разрастается соединительнотканная оболочка. Между зернистым слоем и соединительнотканной оболочкой обособляется базальная мембрана. В дальнейшем в соединительнотканную оболочку прорастают многочисленные капилляры. Во время периода роста объем ооцита мыши, например, увеличивается, примерно, в 300 раз. Происходит это благодаря высокой транскрипционной активности генома ооцитов (скорость транскрипции в растущих ооцитах мыши в 10 раз выше, чем в соматических клетках), а также за счет транспорта органических и неорганических соединений из фолликулярных клеток через щелевые контакты. Через щелевые контакты в ооцит поступают ионы и небольшие молекулы, такие, например, как субстраты углеводного обмена (пируват, оксалоацетат, нуклеотиды и т.п.). **Это явление получило название метаболической кооперации клеток или метаболического и ионного сопряжения клеток.** В результате такой метаболической сопряженности ооцит освобождается от необходимости выполнять многие метаболические реакции, так как более 30% веществ из среды метаболизируется фолликулярными клетками, а затем поступает в ооцит.

Перед наступлением половой

зрелости все примордиальные фолликулы, которые находились в стадии роста, дегенерируют, тогда как находившиеся в состоянии покоя сохраняются. В яичниках у половозрелых мышей, крыс, обезьян и других млекопитающих более 30% всех ооцитов находится в виде примордиальных фолликулов, и большинство из них никогда не вступает в период роста и подвергается атрезии. Из оставшихся 10% ооцитов в яичниках взрослого животного лишь незначительная часть проходит все стадии роста и формирования зрелого ооцита (яйцеклетки).

Поздняя диплотена характеризуется прекращением роста ооцита и началом формирования кариосферы. Этот процесс сопровождается снижением синтеза матричной и рибосомальной РНК. По мере увеличения размеров ооцита снижается активность РНК полимеразы II. Установлено, что фолликулярная жидкость антральных фолликулов угнетает активность РНК полимеразы II, следовательно, на заключительных стадиях роста резко снижается интенсивность экспрессии генов ооцита. Хромосомы утолщаются и отделяются от ядерной мембраны. Любой бивалент представляет собой тетраду, в которой все сестринские хроматиды соединены центромерой, а несестринские - хиазмами. Можно наблюдать явления, свидетельствующие об инактивации хромосомного аппарата ооцита - хромосомы гетерохроматизируются, объединяются в клубок вокруг ядрышка ооцита и формируют структуру, называемую кариосферой.

Завершение первого деления мейоза и переход на стадию метафазы второго мейотического деления у млекопитающих (как и у всех других животных) **называется созревaniem ооцитов**. Необходимо помнить, что в сперматогенезе созревaniem называют осуществление первого и второго мейотических делений, в результате чего из сперматоцитов образуются сперматиды.

Рассмотрим отдельно созревание фолликулов и ооцитов.

3.1.7. Созревание фолликулов.

У большинства млекопитающих ооциты, возобновляющие мейоз после диплотены (фазы покоя), находятся в крупных антральных фолликулах, причем это происходит незадолго до овуляции, то есть в конце фолликулярной фазы антрального цикла. В норме овуляция совпадает во времени с окончанием созревания ооцитов, то есть у большинства млекопитающих овулируют яйцеклетки на стадии метафазы второго деления созревания.

Как выглядит антральный фолликул? В утолщенном зернистом слое развивающегося фолликула, клетки которого интенсивно пролиферируют, начинается секреция фолликулярной жидкости. Сначала она накапливается в виде капель между клетками, но постепенно капли сливаются и образуют в толще зернистого слоя полость (antrum), заполненную фолликулярной жидкостью. Рост фолликулов зависит от строго **координированных взаимодействий между тремя**

полипептиднымм гормонами гипофиза (фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ) и пролактина), а также стероидными гормонами, которые находятся в фолликулярной жидкости (эстрогенами, андрогенами и прогестероном). Не вдаваясь в подробности, отметим, что гонадотропные гормоны гипофиза стимулируют пролиферацию клеток гранулезы и регулируют содержание половых стероидов, влияя на выработку стероидов клетками гранулезы и клетками теки. Половые стероиды тоже участвуют в регуляции процессов роста фолликулов, а также индуцируют образование в клетках гранулезы рецепторов к ФСГ и ЛГ.

В самом начале роста фолликулов (в начале фолликулярной фазы эстрального цикла) уровень циркулирующего в крови ФСГ на короткое время повышается, после чего количество ФСГ и ЛГ в крови

Рассмотрим сначала, что происходит с фолликулом в процессе антрального цикла. Гормональных механизмов этого процесса коснемся лишь в самых общих чертах, так как эта тема должна обсуждаться отдельно, в рамках самостоятельного курса.

У человека после достижения половой зрелости стимулируется созревание одного фолликула ежемесячно. Эстральные циклы женщины называются менструальными. Менструальные циклы продолжаются на протяжении 30-40 лет до наступления менопаузы. Гормональная регуляция менструального цикла определяет плодовитость женщины. Общеизвестно, что продолжительность менструального цикла может варьировать, однако нормальный или «модельный» цикл составляет 28 дней. Отсчет дней начинается от первого дня менструации.

Менструация	Фаза роста фолликула	Секреторная фаза (образование желтого тела)	Менструация
0	5	14	28

Время после начала менструального цикла, сут.

сохраняется на более или менее постоянном уровне. Незадолго до овуляции (в конце фолликулярной фазы эстрального цикла) происходит кратковременный но резкий подъем уровня ЛГ, а также некоторое увеличение уровня ФСГ. Именно этот пик выделения в кровь ЛГ является стимулом, который снимает блокаду мейоза, то есть является триггером инициирующим созревание ооцитов млекопитающих.

Итак, в начале цикла выработка гипофизом ФСГ повышается. Это вызывает в яичнике развитие фолликулов. Развивающиеся фолликулы выделяют повышенное количество эстрогена, что в свою очередь стимулирует секрецию гипофизом ЛГ. Примерно в середине менструального цикла резкий подъем уровня ЛГ стимулирует созревание 15-20 тыс. развивающихся фолликулов, но завершает созревание только один

антральный фолликул. Заключенный в нем ооцит 1-го порядка созревает, заканчивая первое деление мейоза. В антральном фолликуле быстро увеличивается полость, и ооцит с окружающим его одним слоем фолликулярных клеток оказывается как бы в пузырьке, заполненном фолликулярной жидкостью. Такой фолликул так и называется - граафов пузырек или зрелый фолликул. Зрелый фолликул достигает таких размеров, что даже выпячивает поверхность яичника. Ооцит с окружающими его фолликулярными клетками находится в поверхностной части фолликула, формируя яйценосный бугорок или кумулус (cumulus oophorus). Дальнейшее увеличение зрелого фолликула, переполненного фолликулярной жидкостью, приводит к истончению его оболочки и оболочки яичника, расположенной над этим фолликулом. **Затем происходит разрыв граафова пузырька и высвобождение ооцита из яичника - овуляция.** Это происходит примерно на 14 день цикла. Содержимое фолликула изливается в брюшную полость, но фимбрии яйцевода к этому времени располагаются так, что они подхватывают ооцит и по яйцеводу зрелая яйцеклетка переходит в матку.

После выброса ооцита остаточный **фолликул в яичнике превращается под действием лютеинизирующего гормона в гормонально активную ткань - желтое тело.** Наступает лютеальная фаза эстрального цикла (секреторная фаза менструального цикла). Фолликулярные клетки накапливают желтый пигмент лютеин (вещество из

группы липохромов). Сеть капилляров разрастается и охватывает каждую лютеиновую клетку, и желтое тело начинает продуцировать прогестерон. Кроме того, желтое тело продуцирует эстроген. Прогестерон и эстроген стимулируют слизистую оболочку матки (эндометрий), вызывая ее утолщение и секрецию богатой питательными веществами жидкости, то есть приводят слизистую матки в состоянии готовности к имплантации оплодотворенного яйца. Эти же гормоны подавляют выделение гипофизом ФСГ и ЛГ, и таким образом, тормозят созревание других фолликулов. Желтое тело функционирует у человека 12-14 дней и рубцуется, если не происходит оплодотворения. Если оплодотворение осуществляется, желтое тело функционирует более длительное время, превращаясь в желтое тело беременности.

У различных видов млекопитающих эстральные (овариальные) циклы существенно отличаются как по продолжительности, так и по частоте. У некоторых видов в течение года осуществляется один эстральный цикл, приуроченный к определенному сезону. У одних млекопитающих овуляции происходят спонтанно, а у других индуцируются спариванием. У мышевидных грызунов эстральные циклы очень короткие (4-6 сут) и в них отсутствует лютеальная фаза, так как если нет спаривания, желтые тела в яичниках развиваются плохо и функционируют короткое время, выделяя мало прогестерона.

Большинство млекопитающих

(грызуны, хищники, некоторые копытные) имеет многочисленный помет. Во время овуляции яйцники выделяют одновременно несколько яйцеклеток, каждая из которых может быть оплодворена одним спермием (полиовуляция). Например, у лабораторных мышей и крыс одновременно овулирует 8-10 яйцеклеток, у хомячков 6-8, у свиней 8-12. У высших копытных (лошадей и крупного рогатого скота) и высших приматов, включая человека, при овуляции образуется, как правило, только одна яйцеклетка.

Но иногда бывают исключения.

Дизиготные близнецы. Если одновременно созревают два ооцита, то при оплодотворении двумя разными спермиями возникают дизиготные (ДЗ) близнецы. У мартышек ДЗ близнецы рождаются регулярно. Полиовуляция приводит иногда к образованию тризиготных троен и квадризиготных четверен у человека. Частота рождения ДЗ близнецов повышается с возрастом матери; от практически нулевого значения в пубертантном периоде до 0,7-0,8% в возрасте 35-39 лет.

3.1.8. Созревание ооцита.

Мейоз возобновляется в ооцитах, находящихся в крупных антральных фолликулах, которые готовятся к овуляции. Однако компетентность к созреванию возникает у ооцитов, находящихся на преантральной стадии. Оценку компетентности ооцита можно провести *in vitro*. Компетентные ооциты созревают *in vitro* в любой

культуральной среде без добавления гормонов. Предполагается, что созревание ооцитов происходит из-за изменения природы и интенсивности сигналов, поступающих в ооцит из фолликулярных клеток. Возможно, что созревание стимулируется нарушением межклеточного сопряжения ооцита и фолликулярных клеток, возникающего при развитии фолликула и увеличении антральной полости. Как полагают, через щелевые контакты в ооцит поступают ингибиторы созревания, а при развитии фолликула их поступление в ооцит существенно понижается.

Для многих млекопитающих точно известна продолжительность созревания ооцитов. В норме овуляция совпадает с окончанием созревания ооцитов, то есть у большинства млекопитающих овулируют ооциты, находящиеся на стадии метафазы II. Продолжительность созревания ооцитов в зависимости от видов млекопитающих занимает от 9 - 11 до 36 - 40 часов.

Как уже говорилось, для млекопитающих, как и для большинства позвоночных, созреванием ооцита (созреванием яйцеклетки) считается процесс развития ооцита 1-го порядка, охватывающий период времени от первого деления мейоза до следующего блока ооцита на стадии метафазы II. На этой стадии теперь уже ооцит 2-го порядка остается до оплодотворения, под влиянием которого происходит завершение мейоза.

Первым морфологическим признаком созревания является

разрушение зародышевого пузырька. Это происходит в конце диплотены - диакинезе. Переход из диплотены в диакинез происходит плавно, поэтому он трудно различим.

Диакинез. На этой стадии наблюдается максимальная конденсация хромосом и терминализация хиазм, то есть диакинез завершает профазу первого деления мейоза. После разрушения ядерной оболочки становятся видны биваленты. Одновременно образуется веретено мейотического деления. Биваленты (тетрады) прикрепляются к веретену таким образом, что редукционная щель между гомологами располагается по экватору веретена. Затем начинается расхождение гомологичных хромосом (диад) к полюсам веретена таким образом, чтобы одна из гомологичных хромосом осталась в ооците, а другая попала в полярное тельце.

В первом делении созревания (как и во втором мейотическом делении) осуществляется асимметричный цитокинез. Это обуславливается тем, что контрактильное кольцо, благодаря которому происходит цитокинез, формируется не в центре, а ближе к одному из полюсов ооцита. Поэтому когда выделяется полярное тельце, его размеры значительно меньше размеров ооцита. Обнаружено, что в области, соответствующей будущему месту образования полярного тельца, локально меняется плазматическая мембрана.

Созревание ооцитов связано с целым рядом изменений в организации цитоплазмы, особенно организации цитоскелета. Сходная картина

наблюдается и при активации яйца, то есть при завершении 2-го мейотического деления. В обоих случаях система микрофиламентов - микротрубочек цитоскелета вовлечена в поддержание блока мейоза. Изменение цитоскелета осуществляется под влиянием меняющегося содержания в созревающем ооците двухвалентных катионов, циклических нуклеотидов, а также из-за изменения проницаемости плазматической мембраны и внутриклеточного pH. Процесс начинается с микрофиламентов в субкортикальном слое ооцита и распространяется на весь цитоскелет. Все три компонента цитоскелета (микротрубочки, филаменты f-актина и промежуточные филаменты) образуют единую систему, благодаря которой в ооците происходит передвижение не только хромосом, но также лизосом и других органелл. Лизосомы перемещаются и скапливаются в районе цитоплазмы, непосредственно окружающем зародышевый пузырек, прилегая к ядерной оболочке. Лизосомы принимают непосредственное участие в разрушении ядерной оболочки. При распаде ядерной оболочки биваленты теряют с ней связь, а из микротрубочек и организующих центров микротрубочек (Microtubule organizing centers - МТОС) формируется мейотическое веретено первого деления созревания.

При исследовании самосборки и строения мейотического веретена в первом и втором делениях созревания ооцитов мышей установлено, что в обоих случаях веретено отличается от

митотического веретена тем, что оно лишено центриолей и имеет «бочкообразную» форму, напоминая митотическое веретено растительных клеток. Вместо центриолей по полюсам мейотического веретена ооцитов располагаются по 10 и больше МТОС, совокупность которых образует на полюсе как бы обруч, разорванный на ряд частей.

Центриоли видны в пахитенных ооцитах млекопитающих, но на последующих стадиях роста ооцитов они дезинтегрируются. В отличие от оогенеза, в сперматогенезе млекопитающих центриоли сохраняются и функционируют на полюсах мейотического веретена во время обоих делений созревания. При оплодотворении у млекопитающих спермий приносит центриоль в яйцо, однако эта центриоль не принимает никакого участия ни в функции мейотического веретена второго деления созревания, ни в последующих делениях дробления и бесследно исчезает.

Мейотическое веретено ооцитов млекопитающих функционально менее совершенно, чем митотическое веретено соматических клеток. Это же относится и к веретену первых делений дробления зародыша, так как бластомеры в первых делениях дробления имеют митотическое веретено без центриолей, очень похожее на мейотическое веретено ооцитов. Типичное митотическое веретено с центриолями образуется в бластомерах только после третьего деления дробления. Во всех этих случаях отсутствие центриолей и наличие вместо них множественных

МТОС на полюсах веретена может способствовать неправильному расхождению хромосом. Комплекс МТОС - микротрубочки - хромосома может отделиться от веретена, сегрегация такой хромосомы нарушается, и она либо остается в ооците, либо целиком переходит в полярное тельце. В случае первого деления созревания неправильное расхождение касается бивалента, а во втором делении созревания - одной хромосомы (диады).

Есть основания полагать, что во время первого деления созревания может происходить избирательное расхождение некоторых хромосом, которые либо остаются в ооците, либо переходят в полярное тельце. Например, при созревании ооцитов от ХО мышей, унивалент X хромосомы предпочтительно сохраняется в ооците, а не попадает в первое полярное тельце.

Нарушение сегрегации хромосом во время первого мейотического деления значительно чаще служит причиной образования анеуплоидных гамет у человека и млекопитающих животных, чем нарушение сегрегации хромосом во время второго деления созревания. Поэтому есть основание полагать, что мейотическое веретено первого деления созревания менее совершенно и более чувствительно к некоторым альтерирующим агентам. Показано, что к таким агентам относится и этиловый спирт, который способен вызывать нерасхождение хромосом во время первого и второго мейотического деления ооцитов мышей. Изменяется состояние мейотического веретена и при

старении гамет.

После метафазы I быстро происходит анафаза I и телофаза I, во время которой формируется ядерная оболочка. Образовавшийся ооцит 2-го порядка содержит хромосомы, каждая из которых состоит из двух сестринских хроматид. Эти хромосомы визуальны как бы непосредственно переходят в метафазу второго мейотического деления. На самом деле, конечно, существует очень короткая интерфаза, во время которой ДНК не реплицируется, а хромосомы лишь несколько деспирализуются. За ней, как обычно, следует профазы II, она тоже очень короткая. Ядерная оболочка разрушается, когда формируется мейотическое веретено второго деления (оно отчетливо различимо в овулировавших яйцеклетках). На стадии метафазы II яйцеклетки млекопитающих блокируются, и завершение мейоза в них происходит только после оплодотворения или искусственной активации.

3.1.9. Молекулярные процессы, ответственные за созревание ооцита.

С наступлением половой зрелости, когда в крови появляются гонадотропины, происходит завершение мейоза I в созревающем ооците. Гонадотропины стимулируют выделение фолликулярными клетками вторичного медиатора, который воздействует на ооциты и индуцирует их созревание. Процесс созревания яйцеклетки наиболее полно изучен у амфибий. Гонадотропины, находящиеся под контролем гипофиза, инициируют выделение

фолликулярными клетками прогестерона. Прогестерон, как полагают, связывается с рецепторными белками плазматической мембраны. При этом происходит инактивация аденилатциклазы плазматической мембраны ооцита, в результате чего снижается концентрация сАМР в цитозоли, что приводит к снижению активности сАМР-зависимой протеинкиназы (А-киназы). Снижение А-киназы является необходимым и достаточным условием для запуска программы созревания ооцита. Эксперименты на мышинных ооцитах показали, что у млекопитающих действует аналогичный внутриклеточный механизм передачи сигналов.

Предполагается, что А-киназа фосфорилирует и таким образом поддерживает активность фосфопротеинов, ответственных за задержку ооцитов в профазе I. Падение уровня сАМР приводит к понижению активности А-киназы и, в конечном итоге, к дефосфорилированию этих белков. Известно, что в ооцитах лягушки инактивация А-киназы под действием прогестерона инициирует сложную последовательность событий. Механизм этого процесса не выяснен. В конце концов происходит активация белкового комплекса, называемого фактором инициации М-фазы. Фактор инициации М-фазы впервые был обнаружен в ооцитах *Xenopus* в качестве фактора, инициирующего созревание (MPF - maturation promoting factor). Предполагается, что он необходим для выхода ооцитов из профазы I мейоза. В настоящее время установлено, что MPF играет

ключевую роль в клеточном цикле, причем как митозе, так и мейозе. Этот белковый фактор исключительно консервативен и найден у всех эукариот и лишен видоспецифичности. Несмотря на то, что к настоящему времени MPF еще не изучен досконально, известно, что важная роль в активации MPF принадлежит фосфорилированию и что, по меньшей мере, один из компонентов MPF является протеинкиназой. Таким образом, MPF может сам себя фосфорилировать и, следовательно, активировать. Это важно, так как при инициации созревания происходит активация небольших количеств MPF, которые, в свою очередь, активируют значительно большие количества MPF, присутствующие в цитоплазме в неактивном состоянии. Ключевая роль MPF в обычном клеточном делении обусловлена тем, что он инициирует переход клетки из G_2 в М-фазу.

Как это происходит?

По-видимому, на молекулярном уровне фаза М инициируется каскадом фосфорилирования белков, запускаемых при появлении MPF, и заканчивается при дефосфорилировании, которое возвращает белки в их интерфазное состояние. В свою очередь фосфорилирование белков в течение М-фазы, вероятно, ответственно за многие морфологические изменения, сопровождающие митоз, в том числе и за конденсацию хромосом, разрушение ядерной оболочки и изменения цитоскелета. Первое хорошо видимое проявление наступающей М-фазы состоит в

постепенном уплотнении дисперсного интерфазного хроматина в нитевидные хромосомы. Эта конденсация хромосом необходима для их последующего упорядоченного расхождения в дочерние клетки и сопровождается фосфорилированием многочисленных молекул гистона H1, имеющих в клетке (до шести фосфатных групп на одну молекулу H1). Гистон H1 присутствует в количестве примерно одной молекулы на нуклеосому и известно, что он участвует в упаковке нуклеосом. Скорее всего его фосфорилирование киназой MPF в начале фазы М должно быть главной причиной конденсации хромосом. Возможно также, что MPF участвует и в синтезе неизвестной протеинкиназы, которая вызывает интенсивное фосфорилирование структурных белков ядерных оболочек и хромосом. В итоге ядерные оболочки разрушаются, а хромосомы конденсируются.

Профаза I мейоза очень похожа на фазу G_2 обычного клеточного цикла: ДНК уже реплицировалась и является активной в отношении транскрипции, ядерная оболочка интактна, а митотическое веретено деления еще не сформировалось. Более того, подобно переходу из G_2 в М-фазу делящейся соматической клетки, переход от профазы I к М-фазе мейоза запускается MPF. Считают, что циклические изменения активности MPF определяют моменты вступления клетки в митоз и выхода из него. По-видимому, при созревании ооцитов MPF претерпевает аналогичные циклические изменения. Увеличение количества MPF сначала запускает

прохождение ооцита через профазу и вступление его в метафазу первого деления мейоза. Затем последующая инактивация MPF позволяет ооцитам завершить деление ядра, а новая активация MPF инициирует переход клетки в М-фазу второго деления мейоза.

Полагают, что существует система задержки второго мейотического деления, то есть существует некий цитостатический фактор (CSF), свойства которого слабо изучены. Этот фактор предотвращает инактивацию MPF, приостанавливая таким образом зрелые яйцеклетки на стадии метафазы II.

Оплодотворение, возможно, благодаря повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле позволяет ооцитам завершить второе деление мейоза и вместе с последовательными сериями активации и инактивации MPF, определяющими прохождение клеток через повторяющиеся митотические деления, запускает процесс развития эмбриона.

Для нормального запуска активности MPF требуется, по-видимому, также синтез другого белка, называемого циклином. Циклин был обнаружен в дробящихся яйцах *Xenopus*, морских ежей и двустворчатых моллюсков. Активность циклина, как и MPF, зависит от фазы клеточного цикла. Хотя циклин синтезируется с большой постоянной скоростью на протяжении всего цикла, он внезапно распадается в середине М-фазы. Предполагают, что подъем MPF в М-фазе вызывается повышением концентрации циклина до некоторого порогового уровня, а разрушение

циклина связано с каким-то неизвестным событием в М-фазе; последующее исчезновение MPF может быть следствием разрушения циклина.

3.1.10. Оплодотворение и ранние этапы дробления эмбриона.

Оплодотворение представляет собой процесс слияния двух половых клеток (гамет), в результате чего возникает зигота, генотип которой представляет сумму генов обоих родителей.

Происходящие при оплодотворении события обычно сводятся к четырем основным процессам:

1. Контакт спермия с яйцом и их взаимное узнавание. Это этап качественного контроля. Спермий и яйцо должны принадлежать одному и тому же виду.

2. Регуляция проникновения спермия в яйцо. Это этап количественного контроля. Только один спермий должен в конечном счете оплодотворить яйцо. Все остальные спермии должны быть элиминированы.

3. Слияние генетического материала спермия и яйца.

4. Активация метаболизма яйца для его вступления на путь развития.

Однако прежде чем перейти к рассмотрению каждого события при оплодотворении, остановимся на строении спермия и яйца, двух типов клеток, которые специализированы для осуществления акта оплодотворения.

3.1.10.1. Спермий.

Известно, что каждый спермий содержит гаплоидное ядро, двигательную систему, обеспечивающую перемещение ядра, и набор ферментов, необходимых для проникновения спермия в яйцо. Большая часть цитоплазмы спермия элиминируется при его созревании, и сохраняются только некоторые органеллы, видоизмененные для выполнения спермием своей функции. В процессе формирования спермия центриоль дает начало длинному жгутику в той области, которая станет задним концом спермия. Митохондрии собираются около жгутика у основания гаплоидного ядра и входят в состав средней части спермия. Остальная цитоплазма сбрасывается, гаплоидное ядро приобретает обтекаемую (овальную) форму, а ДНК сильно уплотняется. **В передней части головки спермия находится акросомный пузырек**, произошедший от аппарата Гольджи и содержащий гидролитические ферменты. Это образование можно рассматривать как измененную лизосому. Запас ферментов в акросомном пузырьке служит для проникновения спермия через наружные покровы яйца.

Жгутики спермия имеет сложное строение. Главная двигательная структура жгутика **называется аксонемой**. Аксонеме образуют микротрубочки, отходящие от центриоли, которая находится в основании ядра. Стержень аксонемы состоит из двух центральных одиночных микротрубочек, окруженных кольцом из девяти

двойных микротрубочек. **Микротрубочки образованы димерным белком тубулином**. С микротрубочками связан также другой белок - **динеин**. Этот белок может гидролизовать молекулы АТФ, преобразуя выделяющуюся при этом химическую энергию в механическую, за счет которой и осуществляется движение спермия. Важная роль динеина очевидна на примере мужчин с генетическим синдромом, называемым триадой Картедженера. У таких мужчин динеин отсутствует во всех клетках, обладающих ресничками и жгутиками; соответственно, эти органеллы неподвижны. Мужчины, страдающие таким заболеванием, стерильны (т.к. спермии неподвижны), подвержены респираторным инфекциям (из-за неподвижности ресничек дыхательных путей), и у них в 50% случаев сердце располагается справа. Набор микротрубочек типа «3+2» с динеиновыми выступами сохранился во всем царстве эукариот, что свидетельствует об исключительной эффективности такой организации для передачи энергии, обеспечивающей движение. Энергия для движения жгутика исходит от кольца митохондрий, расположенных в области шейки спермия.

3.1.10.2. Строение зрелой яйцеклетки.

Многие элементы, необходимые для начальных стадий роста и развития зародыша, накапливаются в созревающем яйце в ходе оогенеза. Если при созревании спермия наблюдается снижение объема

цитоплазмы, то созревающееся яйцо активно увеличивает объем цитоплазмы. Яйцеклетки млекопитающих гораздо меньше яйцеклеток других позвоночных (вспомним, например, яйцо курицы), но крупнее большинства соматических клеток (их размеры в среднем не превышают 20 мкм). Для сравнения приведем средние размеры яйцеклеток некоторых млекопитающих; у кроликов, овец, свиней, лошадей - 120-140 мкм; у мышей, крыс и др. грызунов - 75-85 мкм; у кита - 140 мкм; у сумчатых млекопитающих - 140-240 мкм, у приматов - 110-140 мкм. Размеры яйцеклеток не коррелируют с продолжительностью внутриутробного развития и с темпами роста зародыша. Однако есть основания полагать, что более крупные яйцеклетки млекопитающих содержат больше веществ, необходимых для раннего эмбриогенеза, и в том числе больше макромолекул, обеспечивающих генетическую программу доимплантационного развития. Так например, геном зародышей грызунов активируется на более ранних стадиях развития, чем у зародышей других млекопитающих, имеющих более крупные размеры яйцеклеток.

Цитоплазма яйца окружена плазматической мембраной (оолеммой). Во время оплодотворения она регулирует поступление в яйцо некоторых ионов (главным образом Na^+) и способна сливаться с плазматической мембраной спермия. Вокруг плазматической мембраны находится блестящая оболочка (*zona pallucida*). Однако она не примыкает к мембране непосредственно, а

отграничена от нее перивителиновым пространством, которое значительно увеличивается после оплодотворения. Блестящая оболочка начинает формироваться на тех стадиях онтогенеза, когда примордиальные ооциты окружены сплошным слоем кубических фолликулярных клеток. Образуется как клетками гранулезы, так и самим ооцитом. Как уже говорилось, отростки клеток гранулезы проходят через блестящую оболочку и образуют щелевые контакты с плазматической мембраной ооцита. Толщина блестящей оболочки растет по мере роста ооцита и достигает максимума у зрелых, овулировавших яйцеклеток. Блестящая оболочка является сложным комплексом внеклеточных гликопротеинов. Наиболее изученным является химический состав блестящей оболочки яйцеклеток свиней, ввиду того, что входящие в ее состав гликопротеины используют для создания противозачаточных вакцин. У свиней описаны четыре различных гликопротеина, которые обозначают буквами ZP (от англ. *zona proteins*). Молекулярный вес ZP1 - 82000, ZP2 - 61000, ZP3 - 55000 и ZP4 - 21000. Преобладающим является ZP3, он выделен и используется для получения противозачаточных вакцин.

У мышей блестящая оболочка состоит из трех различных сульфатированных гликопротеинов (ZP1, ZP2, ZP3). ZP3 имеет молекулярный вес 83000. При помощи гликопротеина ZP3 спермии связываются с блестящей оболочкой, а после проникновения одного спермия в яйцеклетку блестящая оболочка теряет этот гликопротеин и становится

недоступной для другим спермиев. Блестящая оболочка растворяется протеолитическими ферментами. Ее устойчивость к этим ферментам существенно возрастает после оплодотворения, что, вероятно, обусловлено действием содержимого кортикальных гранул, попавшего в перивителиновое пространство. Предполагают, что овопероксидаза кортикальных гранул модифицирует ZP3 и, помимо этого, связываясь с остатками тирозина, модифицирует и ZP2, что и приводит к затвердеванию блестящей оболочки.

Благодаря наличию видоспецифических рецепторов, блестящая оболочка препятствует связыванию с ней чужеродных спермиев.

Блестящая оболочка не исчезает после оплодотворения и сохраняется вокруг зародыша на протяжении всего доимплантационного периода (зародыши мышей, крыс, хомячков) или в течение значительной части этого периода (зародыши кроликов, овец, свиней и др.). Благодаря блестящей оболочке бластомеры дробящегося зародыша располагаются компактно и упорядоченно, ориентируясь в ограниченном трехмерном пространстве, существующем внутри блестящей оболочки.

Это имеет немаловажное значение для взаимодействий бластомеров и образования между ними максимального количества контактов, что способствует нормальной компактизации и поляризации бластомеров. Если удалить блестящую оболочку, то дробление бластомеров будет продолжаться, однако во многих

случаях они располагаются в виде цепочки, и компактизация полностью нарушается либо резко запаздывает. Кроме того, блестящая оболочка мешает случайному слипанию соседних зародышей, то есть предотвращает образование спонтанных агрегационных химер, а также прилипанию зародышей к клеткам яйцевода или матки. Необходимо иметь в виду, что на начальных стадиях дробления, вплоть до стадии бластоцисты (наружный слой которой представлен трофэктодермой), бластомеры обладают высокой адгезивностью.

Если трансплантировать зародыш, лишенный блестящей оболочки, в яйцевод, то при этом неминуемо происходит адгезия бластомеров с эпителиальными клетками стенки яйцевода и зародыш гибнет.

Фолликулярные клетки, примыкающие непосредственно к блестящей оболочке, формируют лученостный венец (*corona radiata*), переходящий без резкой границы в яйценосный бугорок (*cumulus oophorus*), он образован более диффузно распределенными фолликулярными клетками, которые расположены на большем расстоянии от яйца. Клетки лучистого венца и яйценосного бугорка погружены в матрикс, состоящий преимущественно из гиалуроновой кислоты и гликопротеинов.

Гиалуровая кислота (называемая также гиалуронатом или гиалуронаном) относится к глюкозаминогликанам, которые представляют собой длинные неразветвленные полисахаридные

цепи, состоящие из повторяющихся дисахаридных звеньев. Эти цепи недостаточно гибки, чтобы складываться в компактные глобулярные структуры, и кроме того в высокой степени гидрофильны, поэтому они стремятся принять конформацию очень рыхлого, неупорядоченного клубка, который занимает огромный для своей массы объем, и образуют гели даже в очень низких концентрациях. Благодаря высокой плотности отрицательных зарядов, их молекулы притягивают множество таких осмотически активных ионов, как Na^+ , что ведет к всасыванию в матрикс большого количества воды. Это создает давление набухания (тургор), позволяющее матриксу противостоять сжимающим силам, обеспечивая ткани механическую опору, и, в то же время, не препятствуя быстрой диффузии водорастворимых молекул и миграции клеток. Гиалуроновая кислота состоит из повторяющейся последовательности несulfатированных дисахаридных единиц и может содержать до нескольких тысяч сахарных остатков. Она встречается в различных количествах во всех тканях и жидкостях тела взрослых животных. Но особенно много ее у ранних зародышей. Гиалуроновая кислота выполняет особую функцию там, где происходит миграция клеток, например, в процессах эмбрионального развития и при заживлении ран. В периоды клеточной миграции она образуется в больших количествах, а после прекращения миграции ее избыток разрушается ферментом гиалуронидазой. Полагают,

что локальное увеличение синтеза гиалуроновой кислоты, притягивающей воду и тем самым вызывающей набухание матрикса, облегчает миграцию клеток при морфогенезе и регенерации.

Благодаря наличию вокруг овулировавшего ооцита лучевого венца и кумулюса, возрастает общая масса клеток, и это, а также физические свойства матрикса, в который погружены все эти клетки, способствует захвату овулировавших яйцеклеток фимбриями фаллопиевой трубы. Кроме того, кумулюс играет существенную роль в транспорте яйцеклеток по ампулярной части яйцевода и нужен для того, чтобы реснички эпителиальных клеток фаллопиевой трубы могли участвовать в перемещении яйцеклеток. Когда яйцеклетки достигают места оплодотворения, они обычно теряют значительную часть клеток кумулюса, причем это происходит под влиянием гиалуронидазы спермиев или в результате механического действия ресничек эпителия фаллопиевой трубы.

Процесс утраты яйцеклетками кумулюса называется денудацией (от англ. denudation - обнажение). Процесс денудации видоспецифичен, у одних видов млекопитающих происходит раньше, чем у других, и это не коррелирует с тем временем, когда зародыши попадают в матку. Кумулюс может сохраняться 10-16 ч и растворяется только после оплодотворения, а у яйцеклеток крыс и кроликов исчезает через 4-6 ч после овуляции, причем вне зависимости от оплодотворения. У яйцеклеток собак и кошек кумулюс

частично дезинтегрируется после пенетрации спермиями, но 1-3 слоя фолликулярных клеток остаются связанными с блестящей оболочкой на протяжении первых делений дробления.

Слой цитоплазмы, располагающийся непосредственно под плазматической мембраной яйца, называется кортикальным слоем или кортексом. Цитоплазма этого слоя имеет более упорядоченное строение, чем цитоплазма более глубоких слоев, и в ней содержатся высокие концентрации глобулярных молекул актина. При оплодотворении молекулы актина полимеризуются, образуя длинные тяжи микрофиламентов.

Микрофиламенты необходимы для осуществления клеточного деления; кроме того, они участвуют в образовании выростов, увеличивающих клеточную поверхность, - микроворсинок, которые способствуют проникновению спермия в клетку. Кортикальная цитоплазма гораздо более вязкая, чем расположенная глубже основная масса цитоплазмы, и она не смещается при центрифугировании. В кортексе заключены кортикальные гранулы. Эти мембранные структуры гомологичны акросомному пузырьку спермия, так как они содержат протеолитические ферменты и формируются аппаратом Гольджи. Однако, если каждый спермий имеет один акросомный пузырек, то яйцо, например, у морского ежа содержит приблизительно 15 тыс. кортикальных гранул.

Для овулировавших яйцеклеток млекопитающих характерна своеобразная организация

цитоскелета, что в свою очередь приводит к мозаичной организации плазматической мембраны. Примерно от одной десятой до одной пятой общей поверхности яйцеклетки мыши представлено «лысым» районом, в котором нет микроворсинок. В субкортикальном районе этой области яйцеклетки располагается густая сеть микрофиламентов, а глубже находится мейотическое веретено метафазы II. У других млекопитающих «лысый» район также соответствует той области цитоплазмы, где располагается мейотическое веретено.

Лишь у немногих видов (собаки, лисицы) овулируют незрелые яйцеклетки во время поздней профазы I мейоза, в таких яйцеклетках хорошо заметно ядро (зародышевый пузырек). Эти яйцеклетки созревают после пенетрации спермиями, однако деконденсация головки спермия осуществляется лишь после завершения яйцеклеткой первого мейотического деления. У преобладающего большинства млекопитающих овулируют яйцеклетки, заблокированные на метафазе второго мейотического деления.

3.1.11. Процесс оплодотворения у млекопитающих.

Яйцеклетки млекопитающих оплодотворяются в ампулярной части яйцевода, куда доходит небольшое количество спермиев, хотя при эякуляции в половой тракт самки попадает многие миллионы спермиев. Например, у мыши из 50 млн. спермиев эякулята в ампуле яйцевода

обнаруживается меньше 100, а у человека из 200 млн. спермиев ампулы фаллопиевой трубы достигает около 200. Продолжительность времени, в течение которого овулировавшие яйцеклетки способны оплодотвориться, различна у разных видов млекопитающих, но обычно не превышает 24 час. Примерно за это же время спермии утрачивают оплодотворяющую способность, находясь в половом тракте самки. Это означает, что оплодотворение происходит в небольшой промежуток времени, поэтому у большинства млекопитающих спаривание (коитус) происходит непосредственно перед овуляцией.

У млекопитающих оплодотворение внутреннее, и процесс оплодотворения приспособлен к внутренней среде организма, поэтому половые пути самки принимают активное участие в процессе оплодотворения. Сразу после эякуляции спермии еще не способны к оплодотворению, так как вначале они должны подвергнуться процессу, который присущ только млекопитающим. Приобретение спермиями млекопитающих оплодотворяющей способности при их контакте с клетками и жидким содержимым яйцеводов и матки **называется капациацией**. При капациации происходят изменения структуры липидов клеточной мембраны спермия. Это выражается в изменении соотношения холестерина и фосфолипидов мембраны. Полагают, что молекулы альбумина, имеющиеся в половых путях самки, способны отнимать холестерин у спермия.

Снижение содержания холестерина дестабилизирует мембрану акросомного пузырька, и это является необходимым условием слияния мембран при акросомной реакции.

Известно, что важнейшее проявление капациации - приобретение спермием способности узнавать прозрачную оболочку яйца. На поверхности спермия, не прошедшего капациацию, находятся углеводы («coating factors»), которые препятствуют его прикреплению к яйцу. Эти углеводы представляют собой, по-видимому, полимер из повторяющихся остатков галактозы и N-ацетилглюкозамина. Они блокируют рецепторы спермия, узнающие прозрачную оболочку яйца. Рецепторами спермия являются молекулы фермента **N-ацетилглюкозамина галактозилтрансферазы (или кратко - гликозилтрансферазы)**. Молекулы гликозилтрансферазы встроены в плазматическую мембрану спермия непосредственно над акросомой, причем их активные центры обращены наружу. Гликозилтрансфераза узнает N-ацетилглюкозаминовые остатки белков прозрачной оболочки (возможно, гликопротеина ZP3). При капациации блокировавшие ее углеводы убираются, и гликозилтрансфераза на поверхности спермия обнажается. В норме этот фермент катализирует присоединение активированных остатков галактозы к углеводной цепи, оканчивающейся N-ацетилглюкозамином. Однако в половых путях самки активированные остатки галактозы отсутствуют. Поэтому гликозилтрансфераза спермия

просто присоединяется к N-ацетилглюкозаминовым остаткам прозрачной оболочки яйца и таким образом, по типу ключ-замок прикрепляет спермии к яйцу. Гликозилтрансфераза обнаружена в спермиях мыши, морской свинки и человека.

У хорошо изученных млекопитающих - мыши и хомячка - **акросомная реакция** происходит после прикрепления спермия к прозрачной оболочке. У некоторых видов акросомная реакция происходит, когда спермий находится на некотором расстоянии от яйца. В этих случаях акросомная реакция приводит к выделению ферментов, лизирующих связи между фолликулярными клетками, окружающими яйцо. Ферменты, выделенные из акросомного пузырька, называют лизинами. Они включают гиалуронидазу, расщепляющую гиалуроновую кислоту матрикса, и фермент, рассеивающий клетки лучистого венца. Кроме того, спермии всех млекопитающих содержат лизин, разрушающий прозрачную оболочку в месте прикрепления. Этот лизин, называемый акрозином, по аминокислотному составу напоминает протеолитический фермент трипсин. Полагают, что в спермиях находится проакрозин, который активируется под воздействием гликопротеина из половых путей самки. Таким образом, как и в процессе капацитации, в инициации акросомной реакции половые пути самки играют активную роль.

Морфологическим выражением акросомной реакции является разрыв

акросомного пузырька, который происходит в результате кальций-зависимого слияния наружной акросомной мембраны и прилежащей к ней плазматической мембраны спермия в фронтальной половине головки. Это по сути дела реакция экзоцитоза, заключающаяся в том, что пузырек приближается к клеточной поверхности и, сливаясь с плазматической мембраной, выделяет свое содержимое наружу. Такие реакции экзоцитоза наблюдаются при выделении инсулина клетками поджелудочной железы и при выделении нейромедиаторов из синаптических окончаний. Во время акросомной реакции плазматическая мембрана, покрывающая постакросомальную область головки (ее экваториальный сегмент), приобретает свойства, делающие возможным слияние этой части плазматической мембраны спермия с плазматической мембраной яйцеклетки. Возможно, что на дестабилизацию мембраны спермия влияет изменение ее липидного состава в процессе капацитации.

Спермии быстро проходят через блестящую оболочку, и, например, у хомячков это занимает лишь 5-10 мин (рис.3.1 и 3.2). Это прохождение осуществляется благодаря совместным действиям ферментов (вероятно акрозина), связанных с внутренней акросомной мембраной, и активных движений хвоста спермия. Пройдя через блестящую оболочку спермий попадает в перивителлиновое пространство. Если блок полиспермии функционирует на уровне блестящей оболочки, то в

перивителлиновое пространство попадает один спермий. Если полиспермия блокируется на уровне плазматической мембраны яйцеклетки, то в перивителлиновом пространстве можно найти много спермиев (например, при оплодотворении яйцеклеток кролика), хотя только один из них сольется с яйцеклеткой. Удаление блестящей оболочки приводит к исчезновению межвидовых барьеров при оплодотворении, хотя прикрепление спермия к прозрачной оболочке лишь относительно, а не абсолютно видоспецифично (при внутреннем оплодотворении видовая специфичность не является настолько важной проблемой, как при наружном оплодотворении).

У млекопитающих в отличие от других животных спермий сливается с плазматической мембраной яйцеклетки экваториальным постакросомальным районом головки. Процесс слияния происходит при взаимодействии этого специализированного района мембраны спермия и микроворсинок плазматической мембраны яйца и занимает несколько минут. У млекопитающих внутренняя акросомная мембрана, покрывающая после акросомной реакции переднюю часть головки спермия, по-видимому, обладает пониженной текучестью, поэтому она не сливается с оолеммой, а как бы фагоцитируется яйцеклеткой.

У большинства млекопитающих плазматическая мембрана хвоста сливается с оолеммой. И хотя аксиальные филаменты и вносимая спермием центриоль дезинтегрируются, наличие хвоста

спермия в цитоплазме яйца влияет на дальнейшую судьбу этого района. Полагают, что **бластомер, который получает этот участок цитоплазмы яйца, быстрее вступает во второе деление дробления, чем сестринский бластомер** (рис.3.1).

После проникновения в яйцеклетку головка спермия быстро теряет оболочки и хроматин начинает деконденсироваться. Возможно вследствие контакта деконденсирующегося хроматина спермия с цитоплазмой яйца происходят локальные изменения субкортикального слоя, в который попадает спермий. Молекулы глобулярного актина полимеризуются, образуя скопление микрофиламентов. Плазматическая мембрана яйцеклетки выпячивается, образуя «бугорок» и теряя микроворсинки, появляется так называемый конус оплодотворения. Этот участок очень напоминает «лысый» район оолеммы, покрывающий субкортикальный слой яйца, в котором располагается мейотическое веретено метафазы II. Подчеркнем, что спермий пенетрирует яйцеклетку в любом районе, кроме «лысого», то есть спермий не попадает в область яйца, где находится мейотическое веретено. Таким образом, и хроматин головки спермия, и конденсированные мейотические хромосомы яйца индуцируют формирование в яйцеклетке районов цитоплазмы, богатых микрофиламентами, и участков мембраны, лишенных микроворсинок.

В норме только один спермий сливается с яйцеклеткой и участвует в эмбриональном развитии (рис.3.1 и

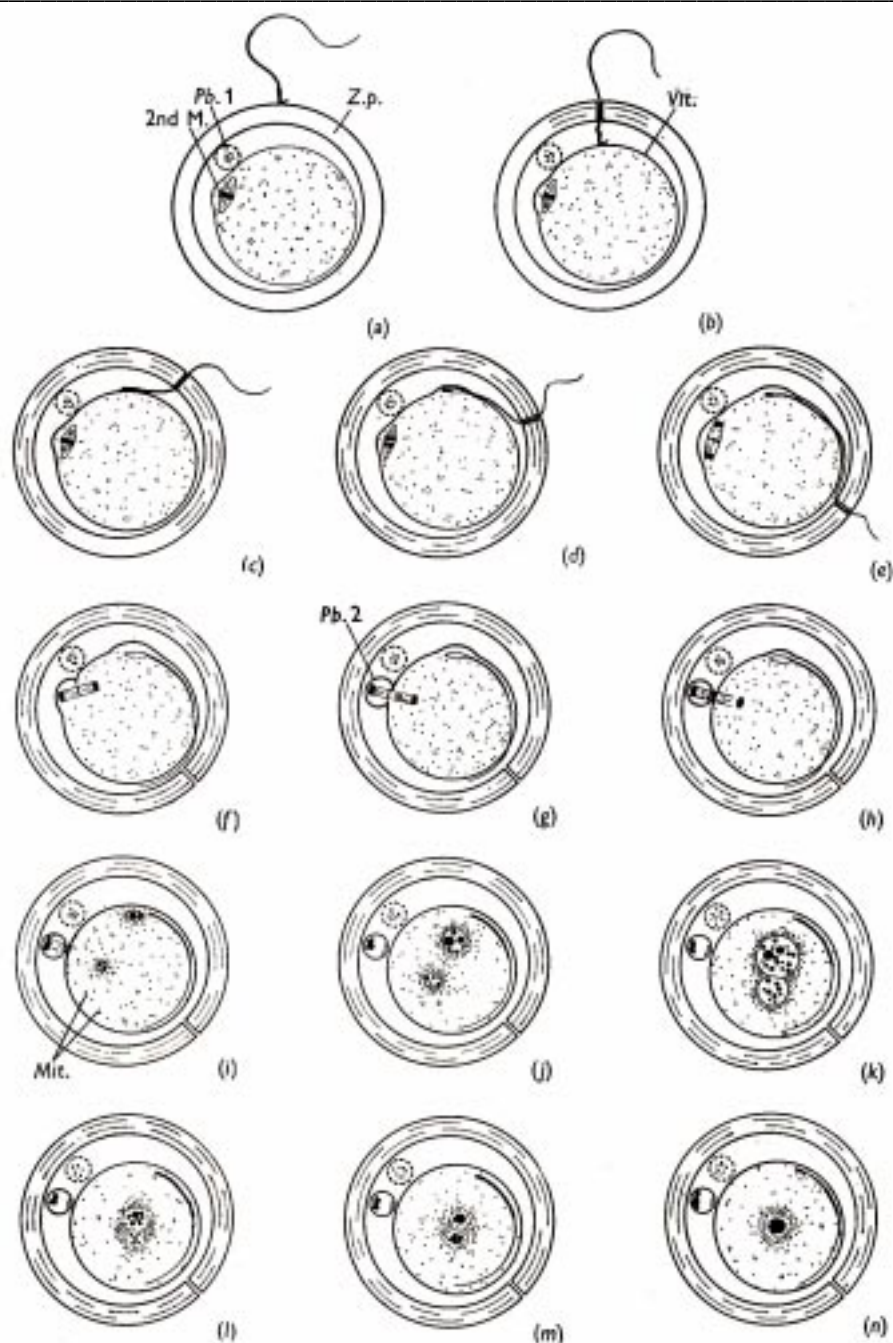


Рис.3.1. Схема оплодотворения яйцеклетки крысы. Хромосомные наборы становятся постепенно видимыми в районе пронуклеусов. Хромосомы видны как две группы и находятся на стадии профазы первого митоза, что означает окончание оплодотворения. Pb.1 - первое полярное тельце; 2ndM. - метафаза 2-ого мейотического деления. Vit. - вителлиновая оболочка; Z.p. - zona pellucida; Pb.2 - второе полярное тельце.

3.2). Полиспермные зародыши погибают. В процессе эволюции животные выработали разные способы защиты от полиспермии. У таких животных, как морские ежи и амфибии, имеется два механизма: быстрый блок, который осуществляется путем деполяризации

мембраны яйца в течении десятой доли секунды после прикрепления к ней первого спермия, и медленный блок полиспермии, вызываемый экзоцитозом кортикальных гранул.

У млекопитающих лишь небольшое число спермиев оказывается в состоянии достигнуть до

претерпевшей овуляцию яйцеклетки, поэтому необходимость в быстрой блокаде полиспермии несущественна: у млекопитающих не происходит быстрой деполяризации плазматической мембраны. С другой стороны, ферменты, высвобождающиеся при кортикальной реакции млекопитающих, изменяют структуру прозрачной оболочки, обеспечивая медленную блокаду полиспермии. Этот процесс сопровождается изменением свойств рецепторов прозрачной оболочки, с которыми связываются спермии, и так и называется - **реакция прозрачной оболочки**. Полагают, что кортикальные гранулы в яйцах мыши содержат фермент, который отщепляет концевые остатки сахара на ZP3, тем самым отделяя прикрепившиеся к прозрачной оболочке спермий и предотвращая прикрепление к ней новых спермиев.

Зрелая яйцеклетка является метаболически инертной. Спермий запускает программу развития, заложенную в яйце. Связывание спермия с поверхностью яйцеклетки индуцирует повышение ее метаболической активности, синтез ДНК и последующее дробление. Однако сам спермий служит лишь устройством для запуска уже заложенной в яйцеклетке программы. Яйцеклетку можно активировать и искусственно, с помощью множества неспецифических физических и химических воздействий. Например, для яйца лягушки эффективным стимулом может быть укол иглой, для яйца мыши присутствие в среде 7% этанола. У млекопитающих принято

различать первичные, вторичные и третичные эффекты активации.

Первичный эффект: вытеснение Ca^{2+} из плазматической мембраны яйцеклетки.

Вторичный эффект: резкое и кратковременное повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, которое распространяется от места внедрения спермия по всей яйцеклетке в виде кольцевой волны. Одновременно происходит экзоцитоз все новых кортикальных гранул. Вслед за пиком концентрации ионов кальция более медленно, но неуклонно повышается рН.

Третичный эффект: инактивация белка CSF (цитостатического фактора), который, как полагают, ответственен за задержку ооцитов на стадии метафаза II мейоза и поддерживает такое состояние ооцитов до активации.

3.1.12. Молекулярные механизмы активации яйцеклетки.

Спермий играет роль сигнального лиганда, который связывается с белковым рецептором плазматической мембраны, запуская следующую цепь событий. Активированный рецептор активирует G-белок (GTP-связывающий мембранный белок, который опосредует передачу в клетку внеклеточного сигнала). G-белок активирует фермент фосфоинозитид-специфическую фосфолипазу C. В мембране клетки содержатся инозитолфосфолипиды, они являются субстратами фосфолипазы C. Инозитолфосфолипиды состоят из сахарофосфатного остатка, который

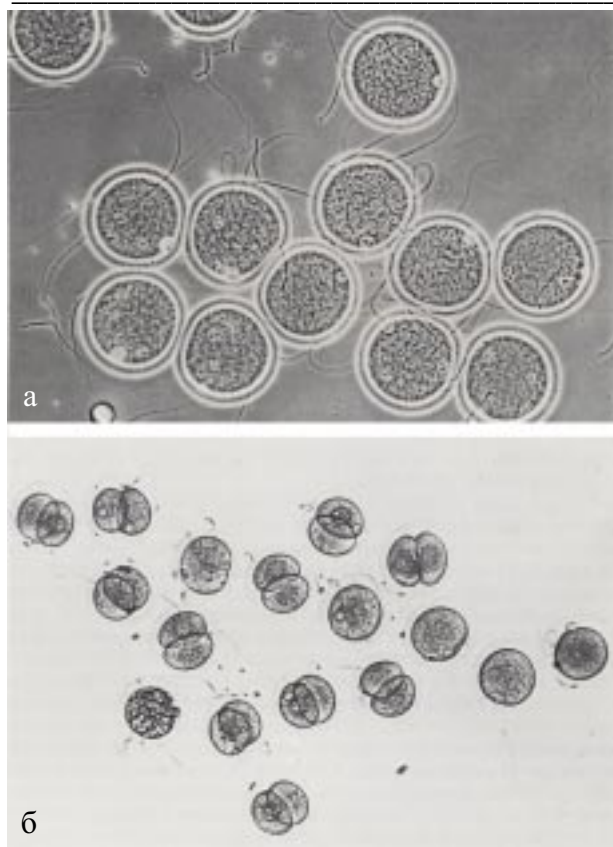


Рис.3.2. Результат оплодотворения *in vitro* яйцеклетки китайского хомячка. А – группа из 12-и яйцеклеток инкубируется в капле среды, в которую добавлены сперматозоиды из эпидидимуса. 11 яйцеклеток находятся на разных стадиях оплодотворения. Рядом с ними находятся хвосты сперматозоидов, все 11 яиц имеют два пронуклеуса и два полярных тельца. Б – группа яиц через 24 часа после оплодотворения *in vivo*. 11 из 17-и яиц были оплодотворены и претерпели одно деление дробления. Видны ядра в каждом бластомере. Одно яйцо фрагментировано.

находится на внутренней стороне плазматической мембраны и двух цепей жирных кислот, пронизывающих липидный монослой плазматической мембраны. Показано, что гидролиз инозитолфосфолипидов участвует в передаче сигнала более чем от 25 различных рецепторов клеточной поверхности. Активированная фосфолипаза С менее, чем за секунду гидролизует фосфатидилинозитолбисфосфат

(коротко PIP₂) на диацилглицерол и инозитолтрисфосфат (коротко Ins P₃). Ins P₃ (сахарофосфатный остаток) инициирует высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных хранилищ в цитозоль; диацилглицерол (остаток жирных кислот) активирует протеинкиназу С.

Концентрация свободных ионов кальция в цитозоли клеток очень низка (порядка 10⁻⁷ М), тогда как концентрация их во внеклеточной жидкости (более 10⁻³ М). Ионы кальция хранятся в специальных Са-запасающих органеллах в ассоциации с Са²⁺-связывающим белком кальсеквестрином (его емкость около 50 ионов Са²⁺ на молекулу). Ins P₃ связывается с рецептором на цитоплазматической поверхности Са-запасающей органеллы, что открывает кальциевые каналы в ее мембране. Диффузия Ins P₃ приводит к распространению выхода кальция по всему кортикальному слою яйца. Выход кальция приводит к экзоцитозу кортикальных гранул, что обеспечивает блок полиспермии. Другим кальций-зависимым эффектом является активация НАД⁺-киназы, что приводит к стимуляции биосинтеза липидов. В конечном итоге создаются новые компоненты плазматической мембраны, необходимые в процессе дробления.

Поскольку концентрация ионов Са²⁺ в цитозоли после оплодотворения повышается лишь ненадолго (примерно на 1 мин.), ясно, что это не может непосредственно приводить к событиям, происходящим на более поздних стадиях активации яйцеклетки. На поздних стадиях

активации важную роль играет протеинкиназа С, которая активируется диацилглицеролом.

Протеинкиназа С активирует (преимущественно посредством фосфорилирования) Na^+ - H^+ -ионообменник плазматической мембраны яйцеклетки (мембранный транспортный белок, откачивающий ионы H^+ из клетки). Отток протонов приводит к тому, что величина рН внутри клетки возрастает и при дальнейшем развитии зиготы поддерживается на этом уровне.

Повышение уровня рН в яйцеклетке приводит к усилению белкового синтеза и синтеза ДНК. Синтез белков усиливается в результате, по меньшей мере, двух независимых изменений: 1) ранее запасенные в яйце молекулы мРНК становятся доступными для синтеза белков; 2) происходит активация рибосом, что позволяет им быстрее транслировать мРНК.

3.1.12.1. Завершение мейоза.

Расхождение хромосом из метафазы II является автоматическим процессом и осуществляется вне зависимости от присутствия генетически инертного хроматина спермия (рис.3.1). Нормальное расхождение хромосом ооцита происходит и при искусственной активации яйцеклетки к партеногенетическому развитию, Мейотическое веретено метафазы II имеет такое же строение, как и мейотическое веретено метафазы I. Это веретено лишено центриоль, обладает бочкообразной формой и

располагается в тангенциальном положении недалеко от краевой зоны яйцеклетки. После активации, когда мейоз возобновляется и метафаза переходит в анафазу (т.е. начинается расхождение хроматид и их движение к полюсам) начинает формироваться контрактильное кольцо. Его формирование происходит в том месте, где находится мейотическая пластинка. Для образования борозды деления оказывается доступной лишь небольшая область плазматической мембраны. В результате **происходит асимметричная цитотомия**, то есть отделяется второе полярное тельце, в состав которого попадает около 1% цитоплазмы яйца (рис.3.1). Аналогичным образом происходит и выделение первого полярного тельца.

Выделение второго полярного тельца завершает второе мейотическое деление.

3.1.2. РАННИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ.

В результате оплодотворения возникает одноклеточный зародыш. С развития одноклеточного зародыша и начинается ранний эмбриогенез (рис.3.3). После завершения второго мейотического деления материнский набор хромосом преобразуется в ядро, называемое **женским пронуклеусом**, а головка спермия - в ядро, называемое **мужским пронуклеусом**.

Пронуклеусы - это ядра с особой организацией хроматина. Они отличаются не только от ядер соматических клеток взрослого животного, но и от ядер клеток зародыша. К особенностям пронуклеусов относятся их более крупные размеры, малая плотность, плохая окрашиваемость ядерными красителями и наличие проядрышек. Проядрышки образованы рыхло расположенными хроматиновыми фибриллами, они

отличаются от ядрышек тем, что не имеют отношения к транскрипции рибосомальной РНК и не выражают вообще никакой транскрипционной активности хромосом.

У мыши формирование пронуклеусов происходит примерно через 3-4 часа после оплодотворения или искусственной активации. При формировании мужского пронуклеуса происходит разрушение ядерной мембраны спермия, набухание и диспергирование хроматина, а затем образование вокруг диффузного хроматина новой ядерной оболочки. ДНК в составе хроматина головки спермия упакована не гистонами, а протаминами. Эти белки обладают резко выраженными основными свойствами и содержат большое количество аргинина, что сближает их в какой-то мере с соответствующей фракцией гистонов. От гистонов их отличает, однако, меньший

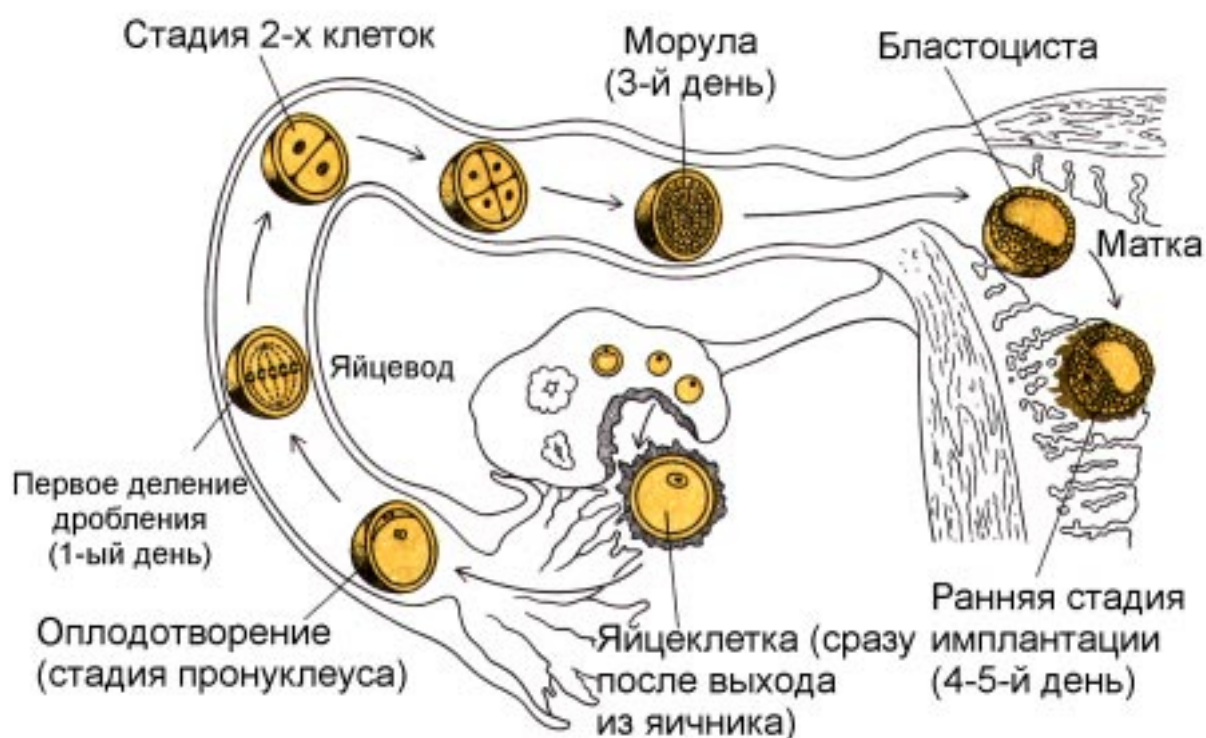


Рис 3.3. Ранние стадии развития мыши.

молекулярный вес, меньшая гетерогенность - по молекулярному весу и аминокислотному составу - и, наконец, видовая специфичность.

Спермии, находящиеся в семенных канальцах тестикул, еще не готовы к оплодотворению; окончательно **они дозревают в эпидидимусе (придатке семенника)**. Во время созревания, в частности, возрастает стабилизация хроматина, благодаря образованию множества дисульфидных связей между цистеинами протаминов. При деконденсации хроматина в процессе образования пронуклеуса происходит восстановление дисульфидных связей. Восстановление осуществляется при помощи глутатиона G-SH - известного в н у т р и м о л е к у л я р н о г о восстанавливающего агента. Это трипептид, основная функция которого состоит в постоянном восстановлении дисульфидных связей.

Важнейшим этапом деконденсации хроматина головки спермия является замена протаминов гистонами. С этим процессом связывают начало реактивации и структурно-функциональной реорганизации хроматина, что необходимо для последующей активации в эмбриогенезе отцовских генов зародыша. После деконденсации вокруг хроматина образуется ядерная мембрана и головка спермия превращается в мужской пронуклеус.

После завершения формирования оба пронуклеуса содержат по гаплоидному набору ДНК, а в митотическое деление зигота вступает с тетраплоидным количеством ДНК. Это происходит потому, что в каждом

пронуклеусе в начале осуществляется репликация ДНК, а затем хромосомы вступают в митоз. Таким образом одноклеточный зародыш содержит вначале 2 гаплоидных, а затем 2 диплоидных пронуклеуса. Один раунд репликации ДНК прежде, чем наступит дробление, происходит при оплодотворении всех видов животных (рис.3.4).

Репликация ДНК в пронуклеусах млекопитающих идет примерно с такой же скоростью, как и в ядрах соматических клеток. У рыб и амфибий скорости репликации ДНК в пронуклеусах значительно выше средней скорости репликации ДНК в ядрах соматических клеток. По ходу репликации ДНК пронуклеусы

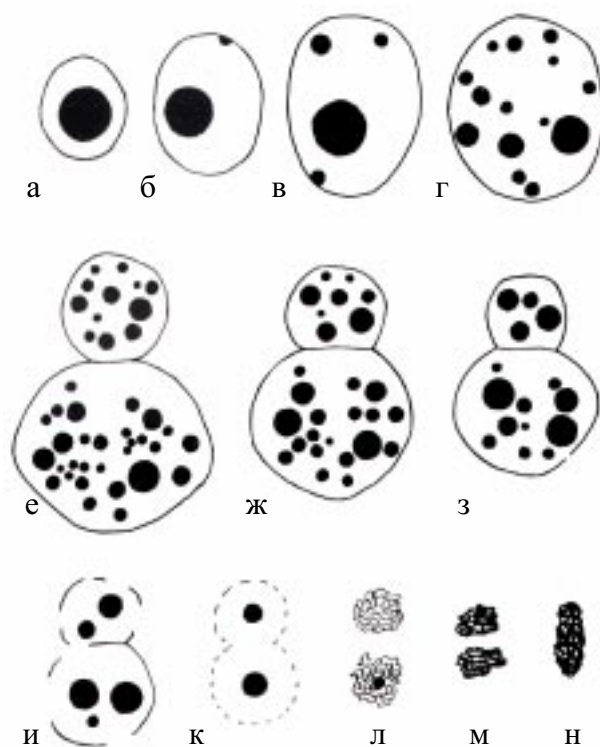


Рис.3.4. Формирование пронуклеусов и их слияние (сингамия) в яйце крысы. (а-г) поздняя фаза в росте мужского пронуклеуса; мужской пронуклеус (внизу) и женский пронуклеус (вверху) на разных стадиях их слияния (д-з); конденсация и конъюгация хромосом (л-н).

увеличиваются в размерах, и при этом становятся заметными различия между отцовским и материнским пронуклеусами. У мышей и у крыс мужской пронуклеус всегда отстает от женского, но имеет при этом более крупные размеры, так как степень гетерохроматизации в нем меньше, чем в женском пронуклеусе. У человека пронуклеусы имеют примерно одинаковые размеры.

На одноклеточной стадии фаза G_2 клеточного цикла отсутствует, то есть зиготы непосредственно вступают в профазу митоза, завершив фазу S. Как и у других животных, у млекопитающих наблюдается гетероцикличность родительских наборов хромосом, то есть циклы преобразования отцовского и материнского наборов хромосом асинхронны и независимы. Некоторое запаздывание перехода из профазы в прометафазу отцовского набора связывают с необходимостью дополнительных преобразований, которые претерпевает ядро спермия, а также влияние месторасположений в цитоплазме отцовского и материнского пронуклеусов.

Объединение родительских наборов хромосом осуществляется лишь во время метафазы, то есть после разрушения оболочек пронуклеусов и сближения хромосомных наборов для формирования единой метафазной пластинки. И даже во время метафазы хромосомы родительских наборов располагаются обособленно, то есть гомологи не контактируют друг с другом.

Геном одноклеточного зародыша транскрипционно

неактивен. Наблюдаемые изменения белкового спектра связаны с трансляцией РНК, запасенных в оогенезе. Регуляция осуществляется на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях. Трансляция осуществляется даже при полной энуклеации зиготы, происходит и дробление, однако борозд дробления образуется много. По-видимому, взаимодействие ядра и цитоплазмы необходимы для правильной организации микрофиламентов и для возникновения одной борозды дробления.

3.1.2.1. Дробление.

Дробление - серия митотических делений зиготы, в результате которых образуются клетки меньшего размера и округлой формы, называемые бластомерами (рис.3.5).

До создания методов культивирования зародышей млекопитающих *in vitro* их дробление изучать было очень трудно, так как яйцеклетки млекопитающих очень мелкие (в тысячу раз мельче размеров яйцеклеток шпорцевой лягушки, например), и по количеству зигот, которые могут быть получены от одной особи, млекопитающие не сравнимы с морскими ежами или лягушками. Обычно у самки млекопитающего одновременно овулируют меньше 10 яиц. Преодоление этих трудностей оказалось оправданным, так как выяснилось, что дробление у млекопитающих резко отличается от дробления у других животных.

Зародыш дробится внутри прозрачной оболочки (*zona pellucida*)

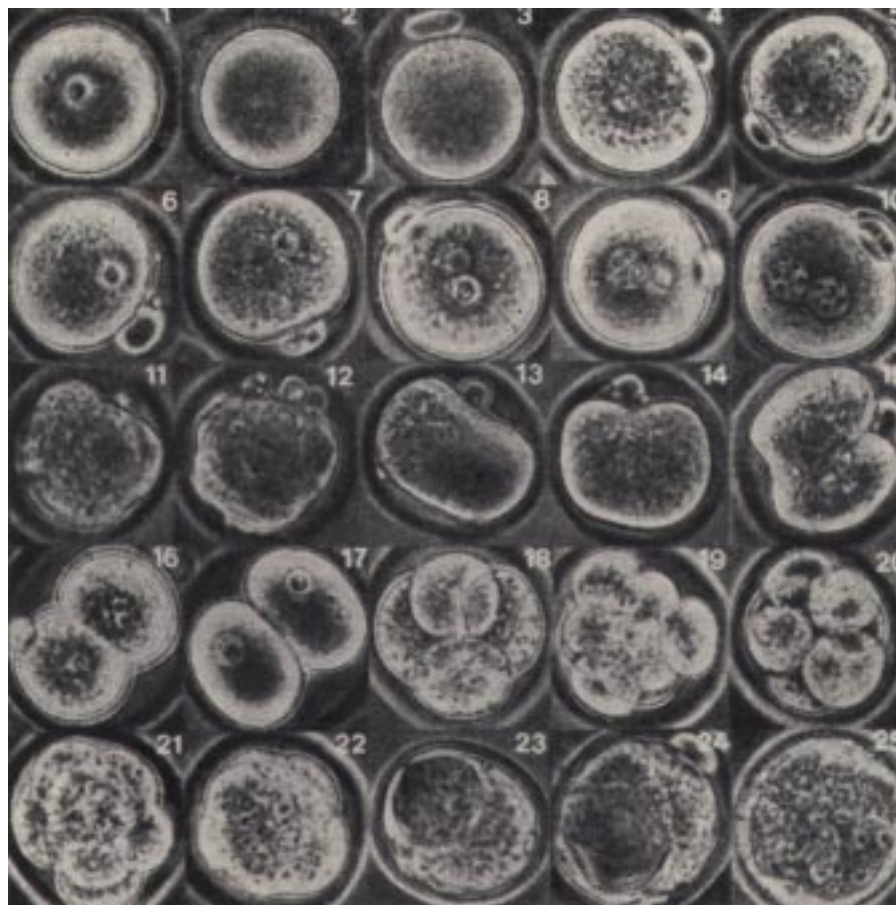


Рис. 3.5. Морфология развития нормального предимплантационного эмбриона мыши.

1. Преовуляторный ооцит с интактным зародышевым пузырьком. 2. Преовуляторный ооцит с разрушенным зародышевым пузырьком. 3, 4. Выделение первого полярного тельца и следующие за ним овуляция и оплодотворение. 5. Продолжение мейоза женским набором хромосом и выделение второго полярного тельца. 5,6. Деконденсация ядра спермия и формирование мужского пронуклеуса. 7. Формирование ядерной мембраны вокруг гаплоидного набора женских хромосом и образование женского пронуклеуса; последний занимает субкортикальное положение вблизи второго полярного тельца и имеет меньшие размеры по сравнению с мужским пронуклеусом. 8 - 10. Миграция пронуклеусов к центру яйца; репликация ДНК. 11,12. Разрушение мембран пронуклеусов; складчатость поверхности эмбриона указывает на реорганизацию цитоскелета, предшествующую делению. 13. Удлинение эмбриона. 14, 15. Формирование перетяжки. 16. Новообразованный 2-клеточный эмбрион с различимыми ядрами. 17. Более поздняя 2-клеточная стадия с четкими ядрами. 18 - 25. Более поздние стадии предимплантационного развития: 18 - 4-клеточный эмбрион; 19, 20 - 6 - 8-клеточные эмбрионы; 21 - компактизированный 8-клеточный эмбрион; 22 - переход от 8-клеточного компактизированного эмбриона к 16-клеточному; 23, 24 - ранняя бластоциста; 25 - поздняя бластоциста.

по ходу своего продвижения от места оплодотворения яйцеклетки к матке. Яйцеклетки млекопитающих относятся к изолецитальному типу, они содержат мало желточных включений, равномерно распределенных по цитоплазме, и осуществляют

голобластическое (полное) дробление. Размеры бластомеров в ходе каждого деления уменьшаются, уменьшается также и объем зародыша: у мыши - на 25%, у коровы - на 20%, у овцы - на 40%. Возможно, меняется степень обводнения цитоплазмы, возможно,

расходятся включения.

Дробление у млекопитающих отличается от других типов дробления по многим признакам. Наиболее важными из них являются следующие:

1. Замедленное течение дробления (каждый клеточный цикл приближается по продолжительности к клеточным циклам дефинитивных тканей). Наличие в клеточных циклах всех фаз (G_1 , S, M, G_2).

2. Тип дробления чередующийся (rotational): первое деление - нормальное меридиональное; при втором делении один из двух бластомеров делится меридионально, а другой - экваториально.

3. Отсутствие периода синхронного дробления (у амфибий первые 12 делений - синхронные). Из-за этого не происходит равномерного нарастания числа бластомеров от 2-клеточной к 4- и 8-клеточным стадиям; зародыши часто содержат нечетное число бластомеров.

У млекопитающих преддетерминация участков цитоплазмы яйцеклетки, по-видимому, отсутствует. И все же последствия ооплазматической сегрегации проявляются, хотя и не в столь заметной форме, как при дроблении зародышей других видов животных. Как известно, при оплодотворении возникает асимметричность плазматической мембраны в месте проникновения спермия. Напомним, что спермий сливается с мембраной яйцеклетки в любом месте, богатом микроворсинками, после чего образуется конус оплодотворения, микроворсинки исчезают, а компоненты мембраны спермия ос-

таются в этом участке, не диффундируя. Эта асимметричность мембраны зиготы, возникшая в результате оплодотворения, по-видимому, отражается на нескольких делениях дробления. Первые два бластомера имеют одинаковый размер, но не вполне одинаковую цитоплазму:

1) Во второе деление дробления один бластомер вступает на 20-60 мин. раньше другого;

2) Первые бластомеры имеют неодинаковый сухой вес, особенно во время интерфазы, синтез рибосомальной РНК в ядрышках происходит в разное время, продолжительность S-фазы (фазы репликации ДНК) неодинакова;

3) Мембранные антигены спермия у потомков одного из двух бластомеров сохраняются в их плазматических мембранах до 3-клеточной стадии;

4) Микроинъекциями коллоидных частиц золота показано, что цитоплазма яйцеклетки распределяется между двумя бластомерами, не перемешиваясь; возможно, неравномерная сегрегация каких-то факторов зиготы обуславливает более раннее деление одного из двух первых бластомеров;

5) Предполагается также, что первым вступает в деление тот бластомер, в плазматической мембране которого находятся антигены, а в цитоплазме - структурные компоненты хвоста спермия.

3.1.2.2. Двухбластомерный эмбрион.

До середины 2-клеточной стадии зародыши мыши полностью зависят от ооплазматических запасов белков и

мРНК. С середины 2-клеточной стадии активируются гены зародыша. В это же время начинают разрушаться мРНК ооцита, но белки, транслированные с этих мРНК сохраняются до стадии бластоцисты, а некоторые и позже. В конце двухбластомерной стадии в некоторых ядрах появляются типичные ядрышки, то есть активируются рибосомальные гены зародыша. Гены зародыша, которые экспрессируются на этой стадии, в основном необходимы для поддержания жизнедеятельности клеток. А ядра, находясь под контролем цитоплазматических факторов яйца, выполняют преимущественно функции клеточных органоидов, обеспечивающих упорядоченность дробления (рис.3.5, таблица 3.2).

3.1.2.3. Образование морулы.

После 8-клеточной стадии бластомеры формируют морулу (рис.3.5, таблица 3.1). Это происходит благодаря двум процессам: **компактизации и поляризации бластомеров**. На ранней 8-клеточной стадии бластомеры располагаются рыхло, между ними остаются большие пространства, сами бластомеры сохраняют округлую форму. В конце 8-клеточной стадии они внезапно сближаются, площадь контакта между ними максимально увеличивается, и они образуют компактный клеточный шар. Описанный процесс называется **компактизацией**. Компактизация, возможно, представляет самое важное отличие дробления зародышей млекопитающих от всех других типов дробления.

До компактизации у каждого из 8 бластомеров. наблюдаются далеко идущие изменения, известные под названием **поляризации**. Плазматическая мембрана каждого бластомера **покрыта** микроворсинками, которые возникают, благодаря образованию актиновых микрофиламентов. При помощи микроворсинок соседние бластомеры прикрепляются друг к другу. Медиаторами межклеточной адгезии служат **гликопротеины**, функционирующие на поверхностях микроворсинок. **Одним из этих гликопротеинов является увоморулин**. Антитела к увоморулину вызывают **декомпактизацию** бластомеров. При компактизации происходит **уплощение** контактирующих поверхностей соседним бластомеров, микроворсинки укорачиваются **путем** деполимеризации актина. Таким образом, бластомеры приобретают **полярность**, которая выражается в наличии микроворсинок только на наружной части их мембран, не контактирующей с другими бластомерами, а также в **асимметричном** расположении внутриклеточных компонентов.

Плоскость следующего деления ориентирована так, чтобы использовать эту асимметрию для создания двух различных потомков поляризованного бластомера - полярной клетки, которая располагается снаружи морулы, и аполярной, расположенной внутри нее.

Итак, **клетки** компактизированного зародыша делятся и образуют 16-и 32-клеточную

морулу (рис.3.5, таблица 3.1). После компактизации тесная упаковка бластомеров стабилизируется более совершенными межклеточными контактами. Между клетками внутри морулы возникают щелевые контакты (они образуются сразу после компактизации, в конце 8-клеточной стадии). Между клетками на поверхности морулы образуются плотные контакты, что приводит к изоляции внутренних клеток морулы.

3.1.2.4. Образование бластоцисты.

Во время 6-го - 7-го делений дробления морула преобразуется в бластоцисту. (рис.3.5, таблица 3.1) Бластоциста является стадией развития, необходимой для имплантации, и свойственна эмбриогенезу всех млекопитающих, хотя пути формирования бластоцисты могут быть различными. Образование бластоцисты является еще одной отличительной особенностью млекопитающих.

Стадия бластоцисты играет важную роль, так как при преобразовании морулы в бластоцисту происходит первый процесс дифференцировки у млекопитающих. **Большая часть потомков наружных клеток морулы становится клетками трофобласта или трофэктодермы (ТЭ).** Эта группа клеток не образует эмбриональных структур, а превращается в хорион, участвующий в образовании плаценты. Ткани плаценты обеспечивают получение плодом кислорода и питательных веществ от матери; секретируют гормоны, необ-

ходимые для того, чтобы материнская матка продолжала вынашивать плод; синтезируют регуляторы иммунного ответа, благодаря которым мать не отторгает зародыш, как это произошло бы с пересаженным органом. Однако клетки трофобласта не способны образовать ни одной клетки самого зародыша. Они необходимы для имплантации зародыша в стенку матки.

Потомки внутренних (аполярных) клеток 16-клеточной морулы, к которым иногда добавляется наружная клетка (при переходе к 32-клеточной стадии) образуют **внутреннюю клеточную массу (ВКМ).** Клетки ВКМ предназначены для развития зародыша и для индукции в ТЭ процессов, необходимых для полноценной имплантации и плацентации. ВКМ, вместе с ТЭ, участвует также в формировании зародышевых оболочек.

Установлено, что потомки того бластомера, который на 2-клеточной стадии делится первым, с большей вероятностью оказываются среди внутренних клеток морулы а значит и среди клеток ВКМ. Следовательно, они имеют большую вероятность попасть в состав тела зародыша.

Морула представляет собой шаровидное скопление бластомеров, лишённое полости, а бластоциста - пузырек, состоящий из стенки (ТЭ), полости с жидкостью (бластоцель) и скопления клеток ВКМ на одном из полюсов внутренней поверхности ТЭ.

Процесс образования полости, то есть образования бластоцисты, **называется кавитацией.** Накопление жидкости в зародыше требует затрат энергии и зависит от активного

переноса ионов Na во внутренние межклеточные пространства. В плазматических мембранах клеток ТЭ имеется натриевый насос (Na^+/K^+ -АТФаза), который переносит ионы Na внутрь зародыша; осмотическое давление повышается и сюда начинает поступать жидкость. Накапливаясь между бластомерами, жидкость отодвигает бластомеры к одному из полюсов ТЭ, здесь из них формируется ВКМ. Плотные контакты, которыми соединяются клетки ТЭ помогают удержать жидкость в полости.

Описанный только что способ кавитации присущ мышевидным грызунам, кролику и, по-видимому, человеку.

У других млекопитающих, например, свиней и коз, бластоциста формируется по другому. Уже на стадии морулы на одном из ее полюсов образуются более крупные бластомеры, из которых возникает первичная эмбриональная эктодерма, имеющая форму диска. Из остальных бластомеров развивается ТЭ, и она не окружает эмбриональный диск снаружи. Таким образом, термин ВКМ неприменим для зародышей свиней и коз, т.к. образования ВКМ не происходит.

Кавитация не определяется числом клеточных делений и происходит тогда, когда зародыш достигнет определенного биологического возраста. Поэтому у зародышей с заблокированным цитокинезом, но при продолжающихся раундах репликации ДНК (эндоредупликация), накопление жидкости начинается в то же время, что и у нормальных зародышей. Даже 2

бластомера, образуя плотные контакты, могут сформировать псевдобластоцисту (так называемый трофобластический пузырек), состоящую из ТЭ и полости.

Формирование полноценной бластоцисты зависит от количества бластомеров в начале кавитации. Если к этому моменту у зародышей мышей будет не менее 22-25 бластомеров, то 6 из них образуют полноценную внутреннюю клеточную массу, а остальные - трофэктодерму, т.е. морула превратится в нормальную бластоцисту. Если же количество бластомеров уменьшено, то кавитация осуществится, но морула преобразуется в трофобластический пузырек. Трофобластические пузырьки могут индуцировать децидуальную реакцию в матке, но погибают, не имплантируясь. Для имплантации необходимо, чтобы бластоциста содержала пороговое количество бластомеров в составе ВКМ.

Замечено, что триплоидные зародыши кавитируют раньше, чем диплоидные, хотя имеют при этом меньше клеток.

У гаплоидных партеногенетических зародышей, развивающихся *in vitro*, компактизация и кавитация осуществляется при значительно большем количестве бластомеров, чем у диплоидов.

Преобразование морулы в бластоцисту зависит от транскрипции генов зародыша во время 5 деления дробления, т.е. перехода от 16 к 32 клеткам. Если заблокировать транскрипцию на этой стадии, то бластоцисты не образуются.

3.1.2.5. Некоторые свойства клеток ТЭ и ВКМ.

В ранней (3,5 сут.) бластоцисте мыши (общее число клеток примерно 60) ВКМ состоит из 15-16 клеток, из которых 2-3 станут источником для построение тела зародыша. Из остальных клеток развиваются внезародышевые органы.

В ранних бластоцистах ВКМ состоят из сферических клеток, напоминающих по форме бластомеры ранних зародышей. Эти клетки соединены щелевыми контактами. Адгезивность их высока, они способны склеиваться с клетками ВКМ других зародышей, либо с ранними бластомерами. Полагают, что клетки ВКМ способны к метаболической кооперации; они не только не смещаются по отношению друг к другу, но и обладают эффективной системой передачи сигналов, благодаря которым ВКМ регулируется как единая клеточная популяция.

Клетки ТЭ в процессе цитодифференцировки приобретают полигональную форму и своеобразную организацию цитоскелета и плазматической мембраны, что, наряду с наличием плотных контактов между клетками, помогает эффективно удерживать жидкость в полости бластоцисты и по мере роста бластоцисты увеличивать ее количество.

Клетки ВКМ легко агрегируют друг с другом, а фрагменты ТЭ лишены этой способности.

Если трансплантировать по отдельности ВКМ и ТЭ в матку самкам-реципиентам с ложной

беременностью, то ТЭ индуцирует децидуальную реакцию и начинает «имплантироваться». ВКМ, попав в матку, погибает, не индуцируя децидуальной реакции в ней. Клетки ТЭ способны к фагоцитозу, а клетки ВКМ лишены этой способности. Как и следовало ожидать, спектр белков, синтезируемых ТЭ и ВКМ, различен.

3.1.2.6. Тотипотентность бластомеров ранних эмбрионов.

Клетки ранних эмбрионов млекопитающих (вплоть до 8-клеточной стадии) идентичны и обладают неограниченными потенциями к развитию, то есть они **тотипотентны**. Вплоть до 8-клеточной стадии зародыш обладает поразительной способностью к регуляции развития, то есть из каждого его бластомера может образоваться полноценное животное.

Если одну из клеток 2-клеточного зародыша мыши разрушить иглой, а оставшийся неполный зародыш имплантировать в матку для дальнейшего развития, то в большом числе случаев родится вполне нормальная мышь.

Даже один бластомер 3-клеточного зародыша кролика (до компактизации) может успешно развиваться в полноценную взрослую особь.

Вместе с тем можно объединить два 8-клеточных эмбриона мыши в одну гигантскую морулу, которая в результате развития образует мышь нормального размера. Было также показано, что три 4-клеточных зародыша могут слиться и образовать

общую компактную морулу. Из такой морулы может развиваться мышь, покровы которой имеют участки, окрашенные в цвета трех разных линий. **Животные, организм которых состоит из генетически различных клеток, называются химерами.** Вышеперечисленные животные развились из агрегатов генетически различных клеток. Такие химеры называются агрегационными. Существуют еще инъекционные химеры. Они образуются при инъекции ранних бластомеров или клеток внутренней клеточной массы (но не трофобласта) в раннюю бластоцисту иного генотипа. Введенные чужеродные клетки включаются в состав ВКМ эмбриона-реципиента, и в результате образуется химерное животное. Получение химер после инъекции одной клетки позволяет выяснить, насколько та или иная клетка сохраняет потенции к развитию.

Способность образовать полноценный зародыш из клеток, которые в норме участвовали бы в образовании только его части, называется регуляцией. Регуляцией является также способность двух или большего числа ранних зародышей образовать одну химерную мышь.

Таким образом, инъекционные и агрегационные химеры образуются вследствие способности ранних зародышей к регуляции своего развития.

Имеются данные в пользу того, что алофенная регуляция может происходить и у человека. Описаны индивидуумы, в организме которых имеются клетки двух разных

генетических типов (XX и XY), каждый из которых обладает собственным набором генетических характеристик. Самое простое объяснение существования такого явления заключается в том, что эти индивидуумы возникли в результате слияния двух зародышей мужского и женского пола, которые развивались одновременно. Если такое объяснение правильно, то в этих случаях два близнеца, брат и сестра, слились для образования одной химерной особи.

3.1.2.7. Монозиготные близнецы.

Как уже упоминалось, близнецов человека разделяют на две основные группы: монозиготные (однойцовые, идентичные) и дизиготные (двухайцовые, неидентичные) близнецы.

Дизиготные близнецы развиваются в результате двух независимых процессов оплодотворения, тогда как монозиготные происходят из одного зародыша, клетки которого каким-то образом разделились, например, вследствие деления бластомеров на ранних стадиях или даже деления ВКМ на две части в пределах одной бластоцисты. По-видимому, так и происходит развитие примерно 0,25% детей (частота рождения монозиготных близнецов).

Около 33% таких близнецов имеют два полноценных независимых хориона, что указывает на деление зародыша еще до образования трофобласта (на 5-е сут. беременности).

У оставшихся 67% идентичных

близнецов хорион общий. В этих случаях произошло разделение ВКМ после образования трофобласта.

К 3-ти сут. зародыш человека завершает формирование другого внезародышевого образования - амниона. Из этой ткани образуется амниотический мешок (или водная оболочка), заполненный амниотической жидкостью. Он окружает зародыш и защищает его от обезвоживания и последствий резких движений. У 2/3 идентичных близнецов разделение зародыша происходит между образованием хориона (на 5-е сут.) и амниона (на 3-е сут.).

Небольшой процент близнецов имеет общий хорион и общий амнион. Это означает, что разделение зародыша произошло после 9-ти сут. беременности. Такие новорожденные рискуют оказаться сросшимися между собой («сиамские близнецы»).

3.1.2.8.Проспективные потенции различных частей бластоцисты.

В бластоцисте различают два района ТЭ; район, который покрывает полюс с ВКМ, называется **полярной ТЭ**, тогда как район, который граничит с бластоцелом, называется **муральной ТЭ**.

Для нормального развития полноценного зародыша необходимы взаимодействия ВКМ и ТЭ, что вытекает из следующих фактов:

1) Без ВКМ не может образоваться тело зародыша.

2) Если разрезать бластоцисту по экватору и отделить муральную ТЭ, она образует *in vitro*

трофобластический пузырек. При трансплантации его в матку клетки ТЭ, лишенные связи с ВКМ, не пролиферируют, в них происходит эндоредупликация ДНК и они превращаются в первичные гигантские клетки трофобласта, которые индуцируют в матке децидуальную реакцию, а затем резорбируются.

Из второй половинки бластоцисты, содержащей полярную ТЭ и ВКМ, *in vitro* формируется «минибластоциста». При трансплантации ее в матку происходит нормальная имплантация и развитие зародыша может завершиться рождением нормального мышонка.

Если разрезать бластоцисту по меридиану, ее половинки *in vitro* восстанавливают целостность и из каждой такой «половинки» можно получить нормального мышонка.

В норме под индукционным влиянием ВКМ клетки полярной ТЭ продолжают пролиферировать и из них формируется внезародышевая эктодерма и эктоплацентарный конус. При отсутствии воздействия ВКМ, как уже говорилось, ТЭ трансформируется в первичные гигантские клетки трофобласта, и в норме это происходит в тех районах ТЭ, которые отдалены от ВКМ (муральная ТЭ).

3) Изолированные ВКМ не могут развиваться в зародыш без окружения ТЭ, т.к. не способны к имплантации и к образованию полноценных зародышевых оболочек.

ВКМ способны *in vitro* трансформироваться в полипотентные эмбриональные стволовые клетки (ES-cells, embryonic stem cells). А если инъецировать ВКМ в бластоцисту

Таблица 3.1. Последовательные стадии нормального развития крысы и мыши и время их наступления.

Стадия	Сроки беременности (сут.)	
	крысы	мыши
1 . Стадия зиготы. Одноклеточные зародыши располагаются в ампуле яйцевода.	1	1
2 . Стадия 2 бластомеров. Зародыши в верхней трети яйцевода.	2	1 , 5
3 . Стадия 4 бластомеров. Зародыши в средней трети яйцевода.	2 , 5	2 , 5
4 . Стадия 8 бластомеров. Зародыши в нижней трети яйцевода.	3	3
5 . Стадия морулы. 16-32 клеточные зародыши переходят в матку.	4	3 , 5
6 . Стадия однослойной бластоцисты. Зародыши (бластоцисты) подразделяются на эмбриобласт (ВКМ) и трофобласт. Стенка бластоцисты из одного слоя клеток трофэктодермы (трофобласта). Эмбриобласт не дифференцирован.	5	4 , 5
7 . Стадия двухслойной бластоцисты (или двух зародышевых листков). Зародыши теряют блестящую оболочку и имплантируются. В эмбриобласте обособились наружный (первичная эктодерма или эпибласт) и внутренний (первичная энтодерма или гипобласт) зародышевые листки.	6	5 , 5
8 . Стадия двухслойного зародышевого цилиндра. Возникает проамниотическая полость. Эктодерма и энтодерма разделены на зародышевые и внезародышевые части. Дистальная энтодерма обросла бластоцель. Завершается имплантация.	7	6
9 . Стадия первичной полоски и трех- слойного зародышевого цилиндра. Образовалась первичная полоска, закладывается внезародышевая и зародышевая мезодерма (третий зародышевый листок). В теле зародыша имеется проамниотическая полость.	8	6 , 5
10–22 . Органогенез.		
23 . Стадия рождения сформированного плода. Эмбриональный период закончен.	21	19
24 . Стадия новорожденности. Однодневные детеныши голые, морщинистые, веки сомкнуты, питаются молоком матери.	одни сутки после рождения	

контрастирующего генотипа, то они обнаруживаются в составе разных органов и тканей генетических химер, что говорит об их полипотентности.

Ни в одном случае не были получены подобные результаты, если в бластоцисты-реципиенты индуцировали ТЭ клетки от других бластоцист. Эти клетки

обнаруживались только в составе трофэктодермы и ее производных.

Таким образом ТЭ и ВКМ - две различные клеточные популяции, которые не могут превращаться друг в друга. Причем ВКМ сохраняет способность к тканевым дифференцировкам тела зародыша, в отличии от ТЭ.

На 4,5 сут. зародыши мышей представляют собой поздние бластоцисты (таблица 3.1). ВКМ в них дифференцируются на эпибласт (ранняя первичная эктодерма) и гипобласт (первичная энтодерма), который граничит с бластоцелом. Эти две клеточные популяции также не могут дедифференцироваться и превращаться друг в друга.

Из гипобласта может возникнуть только внезародышевая энтодерма. Из эпибласта могут сформироваться:

- 1) соматические и половые клетки зародыша;
- 2) амнион, аллантоис и мезодерма желточного мешка.

Примечания и дополнения (таблица 3.1).

Стадия 6. Однослойные бластоцисты распределяются по длине матки приблизительно на равных расстояниях друг от друга. В участках матки, где останавливаются бластоцисты, разыгрываются бурные морфогенетические процессы. Сосуды заметно расширяются, в слизистой оболочке матки резко возрастает синтез ДНК, усиливаются пролиферативные процессы. В то время, когда бластоцисты еще свободно лежат в полости матки, все эти изменения приводят к локальным набуханиям ее слизистой, т.е. к образованию мест имплантации - будущих плодместилищ.

Стадия 7. Стадия поздней (2-х слойной) бластоцисты. От нижней поверхности интенсивно пролиферирующей ВКМ (эмбриобласта) обособляется слой

клеток, являющихся зачатком внутреннего зародышевого листка (энтодермы). Остальная часть ВКМ составляет зачаток собственно эктодермы. Краевые клетки интенсивно пролиферирующей энтодермы перемещаются по внутренней поверхности трофобласта, образуя стенку первичного желточного мешка, которая тесно прилегает к трофобластическому слою. Стенка бластоцисты, таким образом, на этой стадии становится двухслойной, полость бластоцисты превращается в полость желточного мешка. На поверхности бластоцисты обнаруживаются первые гигантские клетки трофобласта. В местах прилегания бластоцисты к слизистой матки эпителий матки исчезает. Трофобластические клетки бластоцисты оказываются в непосредственной связи с тканью матки.

Стадия 8. С началом имплантации резко увеличивается полость желточного мешка, затем начинается бурный рост ВКМ и к стадии 8 образуется удлинённый так называемый яйцевой цилиндр. Он состоит из двух зародышевых листков - внутренней массы эктодермальных клеток и наружного слоя энтодермальных клеток. Т.е. происходит инверсия зародышевых листков. Вся энтодерма, выстилающая полость желточного мешка, разделяется на дистальную, прилежащую к стенке трофобласта, и проксимальную, покрывающую яйцевой цилиндр. Эктодерма состоит из двух частей - дорсальной (верхней), которая является внезародышевой

эктодермой и имеет трофэктодермальное происхождение, и вентральной - которая является эктодермой собственно зародыша. Во всей эктодерме зародышевого цилиндра обнаруживается длинная узкая щель - проамниотическая полость. Дорсальная внезародышевая эктодерма в наружной своей части образует эктоплацентарный конус. Самый дорсальный участок его разрыхлен, промежутки между тяжами клеток инфильтрированы материнской кровью. На этой стадии имплантация завершается.

Данные полностью приложимы только к эмбриогенезу мышевидных грызунов. Другие млекопитающие сходны на стадии ранних бластоцист, а потом возникают существенные изменения, характерные для каждого вида. Наиболее яркий пример - свиньи: на 3-16 сут. бластоцисты свиней увеличиваются более чем в 300 раз и из небольшого сферического пузырька превращаются в нитевидную трубку длиной более, чем 1 метр (на 13 сут. - 157 см), только небольшой участок которой занят эмбриональным диском. Лишь после этого происходит имплантация.

3.1.2.9. Преобразование бластоцисты в зародышевый цилиндр.

Преобразование бластоцисты в зародышевый цилиндр происходит по ходу имплантации (таблица 3.2). Бластоциста является стадией развития, приспособленной для имплантации, и свойственна эмбриогенезу всех млекопитающих.

Бластоциста не гомологична гастрoule. С гастрoulou низших позвоночных нужно сопоставлять не бластоцисту млекопитающих, а эмбрион, в котором происходит формирование зародышевых листков. Эта стадия развития в эмбриогенезе мышевидных грызунов носит наименование зародышевого (яйцевого) цилиндра.

Как происходит преобразование бластоцисты в зародышевый цилиндр? В то время, когда зародыш перемещается по яйцеводу по направлению к матке, бластоциста увеличивается в объеме. Это происходит, как уже упоминалось, благодаря наличию в плазматических мембранах клеток ТЭ натриевого насоса. В период перемещения зародышей большое значение имеет тот факт, что прозрачная оболочка предотвращает прилипание бластоцисты к стенкам яйцевода. У человека такое прилипание вызывает так называемую «трубную беременность». Это опасное явление, поскольку имплантация зародыша в яйцевод может вызвать угрожающее жизни кровотечение. Однако, когда зародыш достигает матки, он должен освободиться от прозрачной оболочки для того, чтобы прикрепиться к стенке матки.

Процесс освобождения от блестящей оболочки эмбриологи называют «вылуплением» бластоцисты. Это происходит путем лизиса в оболочке небольшого отверстия, через которое бластоциста как бы выдавливается при увеличении своего объема. Одна из клеток муральной ТЭ образует вырост, при помощи которого она «дотягивается»

до блестящей оболочки. На плазматической мембране этого выроста локализована трипсиноподобная протеаза, стрипсин, она и лизирует отверстие в оболочке.

Освободившись от оболочки, бластоциста может вступить в непосредственный контакт со стенкой матки. Эта фаза - адгезия и внедрение бластоцисты в слизистую матки - называется общим термином имплантация. Для того, чтобы бластоциста могла погрузиться в стенку матки, трофобласт секретирует другую трипсиноподобную протеазу, активатор плазминогена, который необходим для разрушения ткани матки. Возникающая при этом тесная связь трофэктодермы с эпителием матки оказывает влияние на рост зародыша и на морфогенетические процессы, в результате которых происходит преобразование бластоцисты в зародышевый цилиндр.

Решающее значение в преобразованиях бластоцисты в яйцевой цилиндр играют различия в пролиферативной активности полярной и муральной трофэктодермы.

Рассмотрим наиболее приемлемую и непротиворечивую в настоящее время модель формирования яйцевого (зародышевого) цилиндра.

На стадии трехслойного зародышевого цилиндра (6,3 - 7,5 сут.) из зпибласта формируются три зародышевых листка: дефинитивные эктодерма, энтодерма и мезодерма зародыша.

У большинства позвоночных количество клеток, необходимых для гастрюляции, должно быть достаточно

велико: например, у амфибий более 5.000, а у птиц более 80.000. У млекопитающих зародыши на стадии ранних яйцевых цилиндров состоят из небольшого количества клеток (у мышей из 500 - 600). Но через 24 часа количество клеток у зародыша мыши достигает 12.000 - 15.000, т.е. в процессе гастрюляции резко повышается скорость пролиферации клеток.

Одновременно осуществляются морфогенетические перемещения клеток, то есть выделяются зародышевые листки.

Список рекомендуемой литературы

Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. "Наука", Ленинград, 1988.

Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. "Наука", Москва, 1977.

Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo. Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1986.