

XV ШКОЛА “АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ”

I Школа по биологии развития была проведена в 1971 г. по инициативе академика Б.Л. Астаурова, до 1991 г. состоялось 13 Школ, пользовавшихся широкой популярностью и признанием научной общественности страны. XIV Школа была проведена в 2005 г. после 15-летнего перерыва. Возрождение этой традиции стало возможным благодаря активной помощи и поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, компаний “Технолаб” и “САФ-ЛАБ” и издательства “Springer”. 19–24 октября 2008 г. на базе пансионата “Звенигородский” РАН состоялась XV Школа “Актуальные проблемы биологии развития и биотехнологии”, подготовленная и проведенная Институтом биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Участники XV Школы выразили надежду, что значимость фундаментальных исследований в науке, являющихся обязательным и необходимым базисом любого прикладного направления, будет понята и поддержана Правительством РФ, а молодые участники Школы смогут реализовать свои интересы и научный потенциал в России.

В работе Школы приняли участие ведущие специалисты страны по проблемам клеточной биологии и биологии стволовой клетки; иммуногенеза; регенерации; взаимодействия генов в развитии; межклеточных взаимодействий, регуляторных и сигнальных систем; технологии живых систем; нейрогенеза и формирования поведенческих программ; эволюционных аспектов онтогенеза. Тематически обсуждаемые вопросы были разделены на пять секций, каждой из которых был посвящен один день работы Школы. 20 октября участники Школы заслушали доклады по теме “Молекулярные механизмы морфогенеза”, 21 октября – “Клеточные аспекты морфогенеза, канцерогенеза и регенерации; проблемы изучения клонально размножающихся позвоночных”, 22 октября – “Стволовая клетка”, 23 октября – “Нейрогенез” и 23 октября – “Генетические аспекты онтогенеза”. Несмотря на широкий круг рассматриваемых проблем, с первого и до последнего дня участники школы практически в полном составе принимали самое активное участие в обсуждении представленных докладов. Успех Школы связан с удачным тематическим объединением лекций, представленных специалистами из десяти Институтов РАН и РАМН и Московского государственного университета, их высоким уровнем, а также всесторонним обсуждением проблем.

На открытии Школы с приветствием к участникам обратился директор Института биологии разви-

тия профессор Н.Д. Озернюк. Он сделал общий обзор основных проблем биологии развития и новых научных направлений, связанных с открытием факторов дедифференцировки стволовых клеток, накоплением огромного массива данных по генетической регуляции онтогенеза, бурным развитием эпигенетики, новыми эффективными методами регуляции детерминации и дифференцировки стволовых клеток, связанными с применением микроРНК. Современная биология развития представляет собой междисциплинарную область научного знания и требует применения широкого спектра современных высокотехнологичных подходов и методов. Эти требования диктуют необходимость существенно более глубокой и всесторонней подготовки молодых специалистов, поэтому основная задача Школы – ознакомление участников с последними достижениями фундаментальной науки и современными методологическими подходами.

Лекция В.Я. Бродского была посвящена механизмам прямых межклеточных взаимодействий, выражающимся для одноклеточных организмов в различных формах “социального” поведения, что особенно четко видно у колониальных форм. При этом факторами, участвующими в индукции тех или иных реакций членов сообщества одноклеточных, являются нейротрансмиттеры (такие как серотонин, дофамин, инсулин, норадреналин), общие с медиаторами, осуществляющими передачу нервных импульсов у высших эукариот. Очевидно, механизмы регуляции межклеточных взаимодействий существовали еще на заре становления многоклеточных организмов и играли принципиальную роль в ходе специализации тканей и органов многоклеточных.

Ю.С. Ченцов рассказал участникам школы о достижениях в области изучения механизмов митоза. В последние годы все более детально раскрывается сложная динамическая картина этого процесса. Конгрессия хромосом в метафазную пластинку осуществляется после латерального захвата микротрубочками кинетохоров и последующего их транспорта с помощью белков семейства кинезинов. Процесс репликации хромосом в составе метафазной пластинки сопровождается сложными реакциями разборки–сборки кинетохоров, прикрепления их к латеральному концу микротрубочек и проходит под непрерывным контролем сигнала “задержки анафазы”, генерируемым незакрепленными кинетохорами. Точность биполярного прикрепления кинетохоров контролируется несколькими белковыми ком-

плексами, находящимися в составе кинетохора, например Aurora-B-INCENP. По завершении bipolarного прикрепления всех сестринских хроматид осуществляется экспорт части белковых комплексов, в том числе Mad2, из состава кинетохоров с помощью динеинов и освобождаются активаторы комплекса APC, обеспечивающего прохождение анафазы. Комплекс белков Cdc20-APC взаимодействует с белками-секуринами, осуществляющими их убиквитирование. В результате освобождается сефараза, которая обладает каспазной активностью и разрушает кохесин-белковый комплекс, связывающий сестринские хроматиды. Рекрутизация и экспорт белковых комплексов в/из кинетохора находится под динамической регуляцией физических процессов натяжения, вызванных, с одной стороны, силами “слипания” сестринских хроматид и, с другой – силами их растяжения микротрубочками. После разделения сестринских хроматид осуществляется их перемещение к полюсам клетки с помощью как динеинов, так и кинезинов со специфической АТФазной активностью, способных к деполимеризации микротрубочек.

Тема структуры и функции цитоскелета клетки была продолжена в лекциях А.А. Минина и Е.С. Надеждиной. А.А. Минин рассказал о значимости виментина, составляющего промежуточные или микрофиламенты в клетках позвоночных. На клеточном уровне виментиновые микрофиламенты участвуют в стабилизации основных механических процессов – движении ядра и органелл. В отсутствие виментина наблюдаются ускоренные и хаотичные движения митохондрий, вращение ядра. Промежуточные филаменты выполняют опорную, или “якорную”, функцию, обеспечивая не только структурную, но и метаболическую стабильность в соответствующих компартментах клетки. Виментин обладает способностью связывания ДНК, чем, вероятно, объясняется его участие в регуляции транскрипции в ядре и связывания белков, в частности малых ГТФаз. Ядерные филаменты, создающие ядерный матрикс и обеспечивающие компартментализацию ядра, связаны с цитоплазматическими промежуточными филаментами через ядерные поры. Таким образом, вся система ядро–цитоплазма функционирует как единое целое. Собственно виментин – относительно недавнее эволюционное приобретение, он отсутствует у беспозвоночных, где его роль предположительно могут играть ламин, кератины и другие эволюционные гомологи белков, составляющих микрофиламенты у позвоночных. На организменном уровне в экспериментах с мышами, имеющими нокаут по гену виментину, было показано, что отсутствие виментина не фатально, но резко сужает адаптивную норму для животных: у них нарушается заживление ран и они выживают в значительно более узких температурных и пищевых границах.

Лекция Е.С. Надеждиной была посвящена участию цитоскелета в движении клетки. Способность

клеток к перемещению определяется устройством фокальных контактов, включающих интегритиновые рецепторы, которые специфически связывают с различными белками внеклеточного матрикса, и связанных с их интрацеллюлярными доменами актиновыми филаментами. Этот контакт обеспечен скэффолд-белком паксиллином, благодаря этой связи клетка приобретает способность к распластыванию и перемещению по субстрату. Одновременно паксиллин обеспечивает связь рецепторов с внутриклеточным матриксом – тубулиновыми микротрубочками. Показано, что в области фокальных контактов происходит быстрая перестройка актин-миозинового цитоскелета клетки, сопряженная с изменением конфигурации тубулиновых микротрубочек. Рост микротрубочек в клетке оказывает влияние на систему Rac-Rho, определяющую активность актин-миозинового цитоскелета, т. е. на молекулярную регуляцию натяжения. Это подтверждается экспериментами с обработкой клетки малыми ГТФазами, фосфатидилинозитолкиназами и другими белковыми участниками сигнальных каскадов, которые определяют активность фибриллярных белков. Е.С. Надеждина привела также примеры расшифровки молекулярных сигналов – меток, присутствующих на поверхности клеточных органелл, мембранных пузырьков и разного рода гранул, позволяющих осуществлять адресную доставку частиц в различные компартменты клетки с помощью динеинов и кинезинов.

Б.Ф. Ванюшин в лекции “Метилирование ДНК: механизмы и биологическая роль” обсудил проблему регуляции наследуемых признаков эпигенетическими механизмами, определяющими зависимость экспрессии генов от структурной модификации родительских хромосом и их отдельных сегментов под действием метилирования и ацетилирования оснований ДНК и гистонов. Он осветил историю изучения эпигенетических механизмов и рассказал о последних достижениях эпигенетики. Механизмы метилирования ДНК и гистонов оказываются тесно связанными в единый каскад регуляторных реакций, осуществляющих гетерохроматинизацию участка хромосомы, причем избирательность этих реакций приводит к отличию профилей экспрессии генов отцовской и материнской хромосом. Метилирование ДНК, или метилирование “bona fide”, осуществляется по цитозину, а в последние годы было открыто также метилирование адениновых оснований. Непрямое метилирование осуществляется по гистоновым белкам. Нарушение нормального для данной ткани уровня метилирования приводит к изменению транскрипционной активности генов и митотической активности клеток, а в конечном счете – к канцерогенезу. Метилирование может резко изменять мутационную активность данного сайта, и здесь прослеживается переход от эпигенетических регуляций к генетическим. Метилирование также связано со старением: с возрастом количество метилирован-

ных участков ДНК уменьшается. Сейчас хорошо известен механизм наследования состояния метилирования хромосом, а в последние годы появляется все больше информации по механизмам эпигенетического репрограммирования хромосом в ходе онтогенеза. Оказалось, что при удвоении хромосом часть новых копий не метилирована, в результате чего образуются полуметилированные ДНК. В интерфазе статус метилирования восстанавливается с помощью ДНК-метилаз поддерживающего типа, а при дифференцировке клеток специализированные ферментные системы: аминоксидазы и диоксигеназы для ДНК и пептидиларгининдезаминаза 4 (PADI4) для гистонов – производят деметилирование некоторых последовательностей, тогда как ДНК-метилазы метилируют новые. Специфичность этих реакций поддерживается при помощи различных микроРНК, в том числе пиРНК (piRNA), хотя детали этих сложнейших взаимодействий пока неизвестны. Наконец, в лекции было представлено одно из наиболее загадочных и интригующих направлений – специфическое метилирование определенных участков ДНК в различных зонах головного мозга в ходе обучения, как показано в экспериментах на крысах.

С.Г. Васецкий прочел специальную лекцию памяти нашего соотечественника, выдающегося эмбриолога Бориса Балинского. Его учебник “Introduction to Embryology” использовался в качестве учебного пособия в ведущих университетах мира и выдержал рекордное количество переизданий: семь – на английском языке, по два – на японском и итальянском и одно – на испанском. В лекции рассказано о нелегкой судьбе этого талантливого эмбриолога. Семья молодого многообещающего ученого Бориса Балинского подверглась репрессиям в 1930-е гг. В годы Великой Отечественной войны он остался в зоне оккупации и работал в Киевском университете, затем эмигрировал в Познань, также оккупированную немецкими войсками, и далее – в Мюнхен. Позже он работал в Институте генетики животных и в Университете Эдинбурга, а с 1949 г. – в Университете Витватерсранда в Йоганнесбурге, ЮАР. Борис Балинский был и остается одним из самых известных и наиболее уважаемых эмбриологов XX века.

Морфомеханическое направление в биологии развития было освещено в докладе Л.В. Белоусова. Принципы самоорганизации развивающихся систем объяснимы при условии существования обратных связей, контролирующих все этапы морфогенеза. Л.В. Белоусов рассмотрел проблемы межклеточных и межтканевых взаимодействий, обеспечивающих на уровне физических контактов тот комплекс физиологических условий, который позволяет эмбриону осуществить свою программу развития. Он подробно изложил гипотезу гипертонического восстановления механических напряжений и привел экспериментальные подтверждения значимости этого явления в эмбриогенезе. Существенное внимание было уделе-

но клеточным механорецепторам и сигнальным каскадам, обеспечивающим направленность морфогенеза и движения клеточных пластов в ходе дифференцировки и роста. Изменения натяжения цитоскелета клетки ведут к принципиальному изменению экспрессионного паттерна ядерных генов. Были приведены примеры участия интегриновых рецепторов, белков адгезионных комплексов и других “механозависимых” генов в качестве биологической основы реакций на растяжение–сжатие.

В лекции И.Ю. Долматова рассматривались вопросы, связанные с участием стволовых и дифференцированных клеток в восстановительных процессах у животных. Основной проблемой регенерации является проблема происхождения клеток, из которых развиваются утраченные структуры. Существуют две точки зрения на клеточные источники регенерации. Согласно одной из них, поврежденные ткани и органы восстанавливаются за счет специальных недифференцированных клеток, сохранившихся в тканях с эмбрионального периода (стволовые клетки), т. е. именно стволовые клетки определяют наличие восстановительных способностей животных. Согласно другой, регенерация может осуществляться за счет специализированных клеток, сохранившихся после повреждения. Анализ полученного автором фактического материала показывает, что восстановительные процессы у многих видов морских беспозвоночных протекают без участия стволовых клеток. Основную роль в восстановлении играют механизмы дедифференцировки, редифференцировки, а также трансдифференцировки. Докладчик провел сравнительный анализ изменения восстановительных реакций у иглокожих, в частности у голотурии, показал соотношения морфогенезов при регенерации, их несводимость к онтогенетической последовательности морфогенеза в случаях аутономии и эвисцерации в классе Holothuroidea. Так, клетки целомического эпителия, имеющие мезодермальное происхождение, трансдифференцируются у голотурий из энтодермальных клеток выстилки клоаки.

А.П. Рысков в лекции “Геномика клонально размножающихся позвоночных” раскрыл современные молекулярно-генетические подходы к изучению явления партеногенеза. Он обсудил основные критерии, по которым различаются партеногенетические виды, – степень вовлеченности самцов в размножение (истинный партеногенез, гино- и гибридогенез), молекулярно-генетические механизмы поддержания пloidности генома (способы восстановления пloidности при наличии редукционного деления) и облигатный, факультативный или циклический характер естественного партеногенеза. Остановившись на активно изучаемом партеногенезе позвоночных животных, А.П. Рысков отметил, что практически все известные случаи естественного партеногенеза позвоночных связаны с гибридным происхождением видов, нарушением гаметогенеза и

увеличением плоидности, необходимым для восстановления нормального онтогенеза. Особенно подробно были изложены методы анализа происхождения конкретных однополо-женских видов и оценки молекулярных основ генетического и клонального разнообразия однополых популяций. На основе полученных геномных клонотек были выбраны и секвенированы мини- и микросателлитные локусы, используемые в дальнейшем для таксономического анализа. По результатам секвенирования были определены родительские виды для каждого изучаемого однополого вида. С использованием специфических праймеров, фланкирующих сателлитные участки, был предпринят анализ геномного полиморфизма как по числу микросателлитных повторов, так и по наличию одиночных нуклеотидных замен в амплифицируемой последовательности. В частности, удалось найти микросателлитный локус, проявляющий супернестабильность у одного партеногенетического вида (у остальных видов этот эффект не проявлялся), и показать, что большинство мутаций у однополых видов происходит в клетках зародышевого пути и выражается в делециях мономерного звена в микросателлитном кластере. Мутации во фланкирующих последовательностях накапливаются со значительно меньшей скоростью вопреки результатам, известным для двуполых видов.

Л.А. Захарова остановилась на формировании и структурных особенностях иммунной системы млекопитающих. Значительная часть лекции была посвящена анализу отличий и характерных признаков систем врожденного и приобретенного иммунных ответов. Л.А. Захарова отметила, что врожденный иммунный ответ обладает неспецифичной реакцией на определенные классы патогенов, в том числе на бактериальные гликолипиды, пептидогликаны и липопротеины, развивает немедленную максимальную реакцию и не имеет иммунологической памяти. Он обеспечен фагоцитами (макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки), тучными клетками, базофилами, эозинофилами и естественными киллерами. Ведущую роль в распознавании “чужого” играют паттернраспознающие рецепторы, в том числе T_ool. Сигнальные каскады от этих рецепторов одновременно приводят к выработке компонентов гуморального ответа – цитокинов, участвующих в поражении эффекторных клеток и развитии воспалительной реакции, и интерлейкинов, служащих для привлечения других клеточных составляющих иммунного ответа. Связующим звеном между системами врожденного и приобретенного иммунитета можно рассматривать систему комплемента, способную активироваться как зависимым, так и независимым от антител образом, а также дендритные клетки, осуществляющие помимо фагоцитозной функции представление антигена Т-клеткам. Приобретенный, или адаптивный, иммунный ответ обладает строгой антигенной специфичностью, ла-

тентным периодом в ходе развития иммунной реакции и имеет иммунологическую память. Он обеспечен активностью В- и Т-лимфоцитов (в том числе Т-киллеров и Т-хелперов) и антигенпрезентирующих клеток. Презентация антигена в ходе специфического иммунного ответа связана с двумя группами рецепторов – иммуноглобулиновыми рецепторами на поверхности В-лимфоцитов и Т-клеточными рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов. Иммуноглобулиновые рецепторы, лишенные трансмембранного домена в результате действия специфических эндопептидаз или альтернативного сплайсинга, образуют антитела, принимающие участие в гуморальном ответе. Л.А. Захарова уделила внимание механизмам клональной селекции лимфоцитов, развитию органов иммунной системы в онтогенезе, механизмам активации Т-киллеров в ходе последовательного взаимодействия антиген – В-лимфоцит – Т-хелпер, особенностям созревания рецепторов главного комплекса гистосовместимости и их типирования Т-клеточным рецептором. Среди последних достижений фундаментальной иммунологии были отмечены механизмы формирования и роль иммунных синапсов, а также открытие лимфоцитов Т-reg, экспортирующих в большом количестве транскрипционный фактор Foxp3, который подавляет активность аутореактивных Т-клеток и усиливает выработку противовоспалительных цитокинов.

Н.Л. Лазаревич в лекции “Гепатоцитарные ядерные факторы в развитии и канцерогенезе” рассказала об изучении экспрессии генов в тканях в норме и при патологии на примере анализа транскрипционных факторов, регулирующих сигнальные и метаболические каскады в клетках печени. В настоящее время к гепатоцитарным ядерным факторам относят шесть семейств транскрипционных факторов (HNF1, C/EBP, HNF3, HNF4, HNF6, FTF), сайты связывания которых обнаружены в регуляторных элементах многих генов, специфичных для печени. Тканевая специфичность каждого из факторов значительно шире, но гепатоцитарная специфичность достигается благодаря совместному действию нескольких факторов. Н.Л. Лазаревич охарактеризовала свойства каждого из семейств транскрипционных факторов, привела примеры влияния изменения их активности на состояние клеток в культуре и показала участие некоторых из них в процессах эмбриональной индукции зачатка печени. В ходе дифференцировки гепатоцитов факторы HNF образуют регуляторный каскад со сложной взаимной регуляцией, где ключевым является фактор HNF4. Последний играет также принципиальное значение в ходе опухолевой трансформации гепатоцитов. Интересно, что сигнальные каскады от TGFβ-цитокинов, индуцирующие в норме подавление пролиферации и трансформации, а также апоптоз гепатоцитов, в ткани гепатоцеллюлярной карциномы либо бло-

кированы, либо оказывают противоположный эффект.

Н.П. Шарова обсудила в своей лекции структуру и функции протеасом, изменение их состава и активности в нормальных и трансформированных клетках, а также роль протеасом в онтогенезе. Протеасомы – сложные мультибелковые структуры, выполняющие функцию протеолиза белков. Классификация протеасом и их структурных субъединиц основана на коэффициенте седиментации Сведберга. 26S-Протеасомы состоят из коровой 20S-субъединицы и связанных с ней 19S- или 11S-регуляторных субъединиц и выполняют протеолиз белков, несущих убиквитиновую метку. Коровая субъединица протеасомы способна к протеолизу неубиквитинированных белков, а самостоятельная активность 11S-субъединицы ограничена только короткими олигопептидами. Комплекс 20S-11S известен под названием иммунопротеасом, он участвует в подготовке олигопептидных лигандов главного комплекса гистосовместимости. В лекции был изложен механизм сборки протеасом, показана значимость отдельных белковых компонентов в осуществлении реакций узнавания белка, протягивания его через протеасому и расщепления на олигопептиды. Н.П. Шарова рассказала о многочисленных биологических функциях, в регуляции которых принимают участие протеасомы, – клеточный цикл, апоптоз, злокачественная трансформация клеток, транскрипция, иммунный ответ, ответ на хит-шок, репарация ДНК. В частности, подавление функции протеасом с помощью ингибитора Bortezomib приводит к индукции апоптоза и используется при лечении различных форм рака. В ходе онтогенеза в клетках органов иммунной системы происходит замена пула протеасом, связанная с замещением конститутивных регуляторных субъединиц на иммунные. Наоборот, в клетках злокачественных опухолей пул иммунных протеасом резко уменьшен. Можно ожидать, что соотношение разных классов протеасом в клетках имеет тканевую специфичность, связанную в функциональной значимостью данных классов протеасом.

“Может ли фибробласт стать эмбриональной стволовой клеткой?” – так называлась лекция О.Л. Серова, посвященная последнему открытию в клеточной биологии, а именно получению индуцированных стволовых клеток (IPS) из фибробластов млекопитающих. В 2006 г. группа японских исследователей под руководством проф. Яманака обнаружила ключевые гены, активация которых приводит к изменению клеточного статуса фибробластов в сторону стволовости. Было показано, что при активации в соматических клетках четырех ключевых генов – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* – происходит реорганизация клеточной программы, и клетка приобретает свойства эмбриональных стволовых клеток. Позже схожие результаты были получены и американскими исследователями под руководством Томсона.

В отличие от японцев американские исследователи использовали другой набор генов: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *Lin28*, исключив таким образом так называемые онкогены *c-Myc* и *Klf4*, активность которых часто наблюдается при различных онкологических заболеваниях. О.Л. Серов рассмотрел перспективы этого направления для медицины будущего: открывается возможность получения высокодифференцированных клеток той или иной специализации, которые можно использовать в тканевой и генной терапии. Отпадают проблемы иммунной совместимости и этических норм, которые были связаны с использованием эмбриональных стволовых клеток.

Лекция И.В. Викторова была посвящена нейральным стволовым и глиальным клеткам: их свойствам, культивированию и трансплантации. В последние годы активно обсуждается вопрос использования нейральных стволовых и прогениторных клеток при терапии травматических повреждений спинного мозга и дегенеративных заболеваний центральной нервной системы. Возможные перспективы такой терапии подтверждаются успешным использованием трансплантации эмбриональных, гемопоэтических и мезенхимных стволовых клеток в модельных экспериментах с лабораторными животными. Однако наиболее приемлемым материалом для трансплантаций являются аутологичные нейральные стволовые и прогениторные клетки. Обонятельные эпителий и луковица млекопитающих могут быть использованы в качестве источника таких клеток. И.В. Викторов продемонстрировал данные собственных исследований рецепторных нейронов обонятельного эпителия. Оказалось, что для обонятельного эпителия характерна высокая скорость замены рецепторных нейронов на протяжении всей жизни. Область стволовых клеток – доноров рецепторных нейронов – локализована на границе обонятельного эпителия и *lamina propria*. И.В. Викторов охарактеризовал ниши стволовых клеток обонятельных нейронов, подчеркнув роль обкладочных глиальных клеток (OECs), обеспечивающих восстановление утраченных синаптических связей регенерирующих аксонов. Эти клетки имеют признаки астроцитов и шванновских клеток, продуцируют комплекс нейроростовых факторов и молекул клеточной адгезии. Пересаженные с участком обонятельного эпителия, они обеспечивают регенерацию и миелинизацию поврежденных аксонов спинальных трактов и частичное восстановление нарушенных моторных, сенсорных и вегетативных функций. Результаты последних исследований показывают, что регенерация под действием пересаженного эпителия находится под влиянием многокомпонентного клеточного комплекса, включающего помимо OECs фибробласты обонятельного нерва, шванновские клетки и, вероятно, стволовые и прогениторные клетки обонятельного эпителия.

Проблемы сперматогенеза были освещены в лекции С.Т. Захидова. Кратко остановившись на

возникновении и эволюции сперматогенеза, он детально обсудил клеточные и молекулярные механизмы сперматогенеза млекопитающих. Приведя схему сперматогенеза, С.Т. Захидов связал стадии мейоза с клеточными и молекулярными событиями, характерными для этих стадий. В ходе последовательных превращений сперматогоний → сперматцит 1-го и 2-го порядков → сперматиды → спермии хромосомный набор подвергается редукционному делению, клетки постепенно теряют значительную часть цитоплазмы, которая выделяется на стадии сперматид в виде остаточного тельца, поглощаемого клетками Сертоли, и формируется акросома. При этом делящиеся клетки сохраняют связи между собой в виде цитоплазматических мостиков. Таким образом, все потомство одного сперматогония представляет собой синцитий, что облегчает клеткам синхронное прохождение отдельных стадий созревания. На всех этих стадиях действует строгий контроль “правильности сборки”, осуществляемый клетками Сертоли. При обнаружении дефектного сперматозоида уничтожению может подвергнуться вся серия, имеющая общее происхождение. Обусловленная клетками Сертоли гибель сперматозоидов может также быть механизмом контроля переизбытка сперматозоидов. Гормональная регуляция сперматогенеза осуществляется гипоталамусом, секретирующим фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны, воздействующие на клетки Лейдига и Сертоли. Стимулированные действием гормонов, клетки Лейдига и Сертоли выделяют тестостерон и андрогенсвязывающий белок (ABP) соответственно. ABP переносит мужские половые гормоны к сперматогенным клеткам. Недавно в экспериментах на крысах получены интригующие данные о том, что при регенерации яичка восстановление стволовых сперматогониев может происходить за счет клеток Сертоли, т.е. за счет дедифференцировки и трансдифференцировки.

О.В. Паюшина прочитала лекцию “Мультипотентные мезенхимные стромальные (МСК) клетки: биологические характеристики, потенции к дифференцировке и перспективы клинического использования”. МСК представляют собой способные к длительному самоподдержанию предшественники клеток различных типов. Эти клетки используются как модель для исследования механизмов самоподдержания стволовых клеток и регуляции их дифференцировки. В докладе обсуждались проблемы культивирования МСК *in vitro*, гетерогенность культур МСК, механизмы пластичности МСК. Касаясь проблемы самоподдержания мультипотентных свойств клеток, О.В. Паюшина обсудила механизмы старения клеточных культур и участия теломераз в этом процессе, механизмы взаимодействия с микроокружением в нишах стволовых клеток *in vivo*, в трехмерном пространстве и *in vitro* – на плоскости. Важно, что в культуре на твердой подложке можно стандартизировать микроусловия окружения клеток, в

частности, исключать из нее сыворотку с заменой определенными факторами роста, стимулирующими дифференцировку МСК в заданном направлении. В настоящее время обсуждается вопрос о степени сходства МСК, полученных из разных источников, а также насколько интерпретируемы сравнения их характеристик, полученных в одинаковых условиях. О.В. Паюшина рассказала о механизмах адгезии клеток к внеклеточному матриксу, способах восприятия клеткой этих сигналов через интегрины, кадгерины и другие механорецепторы. Были обсуждены вопросы участия МСК в регенерации тканей и перспективы использования их в медицине.

Лекция М.А. Шишкина была посвящена проблеме интерпретации целостности развития в рамках современных эволюционных представлений. М.А. Шишкин изложил эволюционную концепцию, согласно которой основную роль в эволюции играет изменение признаков, или онтогенезов, вне зависимости от их генетической детерминированности, а изменение генетических систем “подстраивается” вслед за признаками. Концепция вызвала бурную дискуссию и в основном не была поддержана большинством участников Школы. Сложность восприятия темы была связана с проблемой терминологических несоответствий. В частности, термин “эпигенетический” был использован лектором в контексте эпигенетической теории, предполагающей независимость морфогенеза от наследственности, тогда как современное употребление этого термина подчеркивает связь соответствующего процесса или признака с эпигенетикой, имеющей строго генетические основы. Тем не менее, обсуждение принципиально новых концепций (или старых, но изложенных на новой методологической и фактологической основах) имеет, несомненно, большое значение. Исключая наиболее ортодоксальные позиции докладчика, такие как независимость формообразования и онтогенеза от действия генов, следует отметить, что основная идея – апробация эволюционно новых признаков на основе “старых” полиморфизмов, еще не зафиксированных отбором и не проявляющихся в нормальных для популяции условиях, но вскрываемых действием внешних факторов, например стресса, – весьма перспективна. Эта идея отражает возросший интерес к парадигме соответствия фенотипического и генотипического пространств, озвученной более 30 лет назад Ричардом Левонтиным.

Именно анализу проблем развития и эволюции признаков в рамках последней парадигмы была посвящена лекция К.В. Анохина. Хотя сложные количественные признаки формируются на основе имеющейся генетической изменчивости, они в течении длительного времени могут оставаться в “латентном” состоянии, при котором признак неустойчиво воспроизводится в ходе индивидуального развития, и только под влиянием некоторых внешних воздействий. В отношении поведенческих признаков в качестве внешних факторов может выступать обуче-

ние. После апробации отбором, ведущим к селекции адаптивных в новых условиях генотипов, такие признаки способны к переходу в устойчиво наследуемое состояние. На примере эволюции высшей нервной деятельности К.В. Анохин убедительно показал, что ряд поведенческих признаков может возникать в ходе эволюции в постнатальном онтогенезе, в ходе обучения, а затем переводиться в наследуемые в виде безусловных рефлексов. Мозг является уникальным органом, в развитии и функционировании которого задействовано около (или даже больше) 80% генома млекопитающих. В связи с этим существенно меняются наши взгляды на направленность эволюции: поскольку абсолютное большинство генов реализует свою информацию в развитии и функционировании нервной системы, то функция высшей нервной деятельности занимает приоритетное направление среди признаков, тестируемых отбором. Однако на пути исследования эволюции мышления стоят серьезные проблемы. Четыре основных вопроса: организация нервной системы в онтогенезе, функционирование ее по обеспечению безусловных рефлексов у взрослых индивидуумов, реорганизация ее в постнатальном онтогенезе при формировании новых поведенческих программ, и ее эволюция – формируют в гносеологическом контексте циркулярную ловушку. Каждый отдельный вопрос не решаем без понимания трех остальных. Единственным выходом представляется комплексное решение проблемы, требующее формирования теории, связывающей воедино эмбриологию, морфологию, физиологию и психологию. Развивая теорию системогенеза, предложенную П.К. Анохиным в 1949 г., К.В. Анохин рассмотрел несколько механизмов, участвующих в переводе признаков из “латентного” в наследуемое состояние. Это – гетерохронная закладка компонентов функциональной системы, фрагментация органов в развитии, консолидация функциональных систем и минимальное обеспечение функций. Исходя из приведенных данных, К.В. Анохин делает вывод о том, что новые поведенческие программы возникают в процессе эволюции исключительно во время индивидуального обучения, а затем подхватываются и фиксируются отбором.

А.Г. Зарайский остановился в своей лекции “Механизмы развития и эволюции центральной нервной системы позвоночных: ингибирование ингибиторов” на молекулярных основах макроэволюционных событий, которые привели к формированию высокоорганизованной нервной системы и, в частности, головного мозга у высших позвоночных и человека. В первой части лекции были изложены механизмы нейральной индукции и регионализации нервной системы на ранних стадиях онтогенеза, во второй – новейшие достижения в области изучения особенностей развития переднего мозга. А.Г. Зарайский продемонстрировал, что филогенетически новые формы морфогенезов возникают вследствие сочетанного действия эволюционно-консерватив-

ных и новых генов, причем новые гены выступают в роли репрессоров предковых сигнальных каскадов, обеспечивающих формирование более примитивной структуры. В лекции блестяще показан каскад событий последовательных репрессий сигнальных путей BMP, Wnt и Otx2 на ранних этапах нейральной дифференцировки и далее – в дистальных сегментах отделов развивающегося мозга, приводящий к запуску морфогенеза новых дистальных структур. И в данном случае эволюционный подход помог разобраться в сложной системе взаимных регуляций: каждому эволюционно новому отделу мозга соответствует новый ингибитор, отсутствующий у таксонов с более примитивной организацией нервной системы. Так, секретируемые клетками организатора Шлемана белки *Cerberus* и *Dickkopf* являются репрессорами Wnt-сигнального каскада, и их действие обеспечивает формирование среднего мозга. Гомеобоксные транскрипционные факторы семейства ANF являются репрессорами транскрипционного фактора Otx2, участвующего в индукции среднего и промежуточного мозга, и его репрессия приводит к индукции структур переднего мозга у позвоночных. Последние достижения в области изучения эмбриональных индукторов переднего мозга связаны с открытием у позвоночных новых эволюционных гомологов гена *noggin*, кодирующего ингибитор BMP-сигнального каскада, с изучением роли ГТФазы Ras-dva, негативно регулируемой транскрипционными факторами ANF, с открытием LIM-доменного белка Zuxin, участвующего в переносе сигналов от клеточных контактов в ядро клетки и связывающего таким образом морфогенетические движения клетки с экспрессией генов.

В лекции И.С. Захарова “Онтогенез поведения и экспрессия нейроспецифических генов” слушателям был представлен материал о формировании сложных поведенческих реакций и развертывании обеспечивающих их генетических программ под влиянием внешних факторов. Эта тема логично продолжила дискуссию о роли внешней среды как активного участника формообразования, предложенную П.К. Анохиным. На примере полового и оборонительного поведения прудовика и виноградной улитки И.С. Захаров продемонстрировал принципиальное влияние условий, при которых осуществляется онтогенез нервной системы, на форму поведенческого ответа особи на те или иные стимулы. В каудодорсальных нейронах улиток, отвечающих за реализацию программ полового поведения, экспрессируются специфические пептиды (APGWamide – у прудовика и GFAD – у виноградной улитки), обеспечивающие развертывание половой поведенческой программы. В норме своевременная экспрессия этих пептидов приводит к полиплоидизации соответствующих нейронов, их нормальному функционированию, развитию сложного комплекса признаков, включающего как морфологические, так и поведенческие признаки, и к частичному блокированию ней-

ронов, отвечающих за пищевое поведение. Внесение в систему повышенного количества нейропептида Y (за счет заражения трематодами в экспериментах с прудовиком и экзогенно – виноградной улитке) вызывает сходное у обоих видов моллюсков подавление экспрессии половых пептидов, атрофию половых признаков и увеличение размеров тела за счет усиленного питания. Таким образом нейропептиды осуществляют централизованное управление системой, запуская одни каскады в нейронах и подавляя другие, тогда как количество самих нейропептидов меняется под действием факторов внешней среды. Оборонительное поведение моллюсков зависит от Ca^{2+} -связывающего пептида HSC2, экспрессирующегося в управляющих нейронах. Уровень экспрессии пептида находится под контролем активности модуляторных серотониновых нейронов. Формирование обоих типов нейронов в онтогенезе разнесено во времени, и молодые улитки с меньшим количеством модуляторных нейронов хуже обучаются и чаще демонстрируют активный тип оборонительной реакции. Следовательно, активность модуляторных нейронов, находящаяся в зависимости от внешних и внутренних факторов, определяет на генетическом уровне развёртывание поведенческой оборонительной реакции. Модуляция внешними факторами морфогенетических программ, определяющих скорость и направленность развития, также осуществляется через нервную систему.

Е.Е. Воронежская обсудила в своей лекции нейрхимическую регуляцию личиночного развития беспозвоночных животных, обусловленную преимущественно биотическими факторами внешней среды. В качестве моделей были предложены: формирование дауровской личинки у нематоды *Caenorhabditis elegans*, метаморфоз и оседание у моллюсков и иглокожих, регуляция зародышевого развития у пресноводных легочных моллюсков. Оказалось, что все изученные морфогенезы на определенных этапах личиночного развития обладают одинаковой способностью воспринимать модулирующий сигнал, выделяемый взрослыми особями или сибсами. Причем для моллюсков было показано, что специфичность выделяемого сигнала зависит от физиологического состояния особи: голодные взрослые животные выделяли феромон, предположительно липопротеин, существенно влияющий на развитие личинок. Для морских ежей и асцидий интенсивность этого сигнала определяется, по крайней мере, плотностью популяции. Хемосенсорные рецепторы, воспринимающие феромоны и другие сигналы (например, запахи пищи), находятся на переднем конце тела всех личинок, что заставляет задуматься о гомологии этого участка с предковой зоной обонятельного эпителия позвоночных. Влияние хемосенсорных сигналов на морфогенез зависит от соотношения сигналов от взрослых особей и от пищи: программа изменения морфогенеза включалась только в случае неблагоприятного прогноза

(мало пищи и много особей). Апикальные нейроны, составляющие апикальный сенсорный орган – своеобразный личиночный мозг, как раз и управляют морфогенезом. Они могут различаться у разных видов и по количеству, и по выделяемому медиатору, но во всех случаях именно действие данного медиатора определяет включение или остановку тех или иных стадий морфогенеза. Эффект зависит от состояния клеток-мишеней; одно и то же воздействие медиатора на разных стадиях развития приведет к разным эффектам – смене морфогенеза, задержке или ускорению или останется без ответа, – что говорит о согласованной смене специфичных к сигналу рецепторов и замене сигнальных каскадов на разных стадиях онтогенеза соответственно.

С обзорной лекцией по нейроэндокринному контролю развития выступил М.В. Угрюмов. В лекции было дано представление о структуре и функциях нейроэндокринной системы и особенностях ее онтогенеза. Задача нейроэндокринной системы состоит в обеспечении гомеостаза развивающегося и функционирующего организма, сводя воедино посредством гуморальных регуляций физиологически разобщенные органы и ткани. Сигнальные молекулы – пептиды, стероиды и моноамины, а также их рецепторы – эволюционно консервативны, но физиологические эффекты у разных групп организмов принципиально различны. Формирование сложной сети регуляторных взаимоотношений в организме базируется на двух основных механизмах: внутриклеточной трансдукции сигналов от мембранных рецепторов и прямом действии на геном ядерных стероидных рецепторов. Остановившись на эволюции нейроэндокринной регуляции, М.В. Угрюмов отметил, что наиболее древняя паракринная регуляция представлена в организме высших позвоночных APUD-клетками, но основную роль играет централизованная эндокринная регуляция в цепи гипофиз → периферические эндокринные железы → органы-мишени, обладающая прямыми и обратными связями. “Дирижером” в ней выступают мозг и его центральный интегративный отдел – гипоталамус. Впервые ведущую роль мозга и гипоталамуса в нейроэндокринных регуляциях предположил Ганс Селле, а доказал Эрнст Шарер, открывший нейросекреторные нейроны в гипоталамусе костистых рыб. Функция контроля гипофиза была определена позже, с открытием мелкоклеточных пептидергических нейронов гипоталамуса. Их локальное действие на нейроэндокринные клетки гипофиза связано со снижением концентрации пептидных гормонов до физиологически незначимых концентраций при выходе из портальной гипоталамо-гипофизарной системы циркуляции в периферийный кровоток. Регуляция нейроэндокринной функции гипоталамуса находится под тонким трехуровневым контролем: модулирующие нейроны осуществляют аксосоматические и аксодендритические контакты, аксоаксональные контакты и контакты с эндотели-

альными клетками, обеспечивая тем самым регуляцию синтеза и выделения пептидов из секреторных нейронов и функциональную проницаемость их через фенестрирующий эпителий капилляров. Кроме этого, высшие позвоночные имеют рудиментарные прямые контакты секреторных нейронов с клетками гипофиза – предковую систему регуляции гипофиза, реализованную у рыб. Среди последних достижений нейроэндокринологии М.В. Угрюмов выделил открытие функции парного кооперативного синтеза дофамина некоторыми дофаминергическими нейронами аркуатного ядра гипоталамуса. Каждый из нейронов в паре обладает только одним из ферментов, участвующих в катаболизме серотонина в дофамин. Кооперация осуществляется в условиях тесного топографического взаимоотношения нейронов и используется в качестве компенсаторного механизма как при возрастающей потребности в нем, так и при развитии патологий, например болезни Паркинсона. В онтогенезе происходит последовательное формирование APUD-системы, эндокринных желез, гипофизарного контроля на более поздних стадиях развития и, наконец, общего гипоталамического контроля в пренатальный период развития. М.В. Угрюмов отметил потенциальную роль плаценты в нейроэндокринной регуляции, чему, однако, до сих пор не получено прямых доказательств. Тем не менее, в самое последнее время в работах М.В. Угрюмова найдено подтверждение гипотезы раннего участия нейронов дифференцирующегося гипоталамуса и клеток всего мозга в нейроэндокринной регуляции эмбриогенеза. В период между формированием нейронов и гемато-энцефалического барьера нейроны свободно выделяют весь профиль биоактивных веществ в кровеносное русло, воздействуя на уже сформированные на периферии клетки-мишени, чему в серии экспериментов автора получено прямое подтверждение.

П.В. Авдонин в своей лекции рассказал об истории открытия и методологии применения явления РНК-интерференции для изучения функции отдельных генов. В настоящий момент использование специфической двунитовой РНК является наиболее эффективным способом подавления функции гена на стадии транскрипции и посттранскрипционного созревания РНК. Последним методическим достижением в этой области является применение производных нуклеотидов с повышенной устойчивостью конформации (locked nucleic acid) и соответственно прочностью связи с заданными участками ДНК. Впервые явление посттранскрипционного подавления генов было открыто в лаборатории Р. Йоргенсена в опытах с введением петунии конструкции с гиперэкспрессирующимся геном *Chalcone Synthase*. Это явление было названо авторами косупрессией, его механизм открыли в 1998 г. Э. Файр и К. Мело в экспериментах с двухцепочечной РНК на нематоде и получили за это открытие в 2006 г. Нобелевскую премию. Они наблюдали резкое подавление экс-

прессии генов под действием двухцепочечных РНК и усиление этого эффекта во времени, в том числе в следующем поколении. В основе явления РНК-интерференции лежит расщепление двухцепочечной РНК (микроРНК) РНКазой III Dicer. Полученные 19–21-нуклеотидные фрагменты (миРНК) образуют RISC-комплекс с белком Argonaute2, расщепляясь в его составе на одонитевые фрагменты и способны после этого к связыванию гомологичных последовательностей иРНК, подавляя тем самым трансляцию и/или вызывая расщепление комплекса эндонуклеазами. Усиление эффекта было связано с действием РНК-зависимой РНК-олимеразы, подвергшей амплификации фрагменты микроРНК. Трудности, первоначально возникшие на пути использования микроРНК, были вызваны активацией РНК-зависимой протеинкиназы R (ПКР), усилением синтеза поли-А-цепей, неспецифическим ответом иммунной системы, в который оказались вовлечены TLR-рецепторы (например, TLR7). Эти проблемы были решены при непосредственном использовании микроРНК. Эндогенная микроРНК выполняет регуляторные функции в онтогенезе, участвует в элиминации и метилировании ДНК, образовании гетерохроматина путем метилирования гистона H3 в составе комплекса с белками семейства Argonaute и другими. Она образуется из предшественника – микроРНК, имеющего шпильчатую структуру, путем обрезания петли и краев шпильки РНКазой Drosha. Во второй части лекции П.В. Авдонин поделился со слушателями своим собственным опытом изучения микроРНК. Используя специфическое подавление экспрессии, ему удалось доказать активную роль белка ионного канала Orai-1 в транспорте ионов Ca^{2+} в клетках скелетной мускулатуры мыши. Он рекомендовал использовать программу SMART-vector для подбора последовательностей микроРНК, метод ферментативного синтеза микроРНК, трансдуктор jet-PEI/HUVES на основе катионного полиэтиленимина и флуоресцентно меченную РНК в качестве метки. В конце лекции были обсуждены перспективы использования микроРНК в качестве метода борьбы с онкологическими и вирусными заболеваниями.

И.Ю. Баклушинская обратилась в своей лекции к теме эволюции систем определения пола у позвоночных. За последние десятилетия представления о генетической системе определения пола существенно расширились. Эволюция системы определения пола включает, с одной стороны, формирование и изменение половых хромосом, а с другой – эволюцию каскадов генов, детерминирующих морфогенез гонад и вторичных половых признаков, включая морфологические и поведенческие. Разделение на генетическое определение пола и определение пола посредством факторов внешней среды (например, температуры у некоторых рептилий) условно, поскольку сигнал внешней среды также должен приниматься и обрабатываться генетической системой. Согласно современным данным, полученным с по-

мощью методов генного картирования и хромосомного пэинтинга, гипотеза Оно о том, что X-хромосома высококонсервативна, подтверждается, по крайней мере, для плацентарных млекопитающих, как и консервативность Z-хромосомы для птиц, но предположение о том, что хромосомы Z и X имеют общее происхождение, оказалось неверным. У однопроходных млекопитающих, наиболее примитивных представителей этого класса, описаны множественные половые хромосомы, выявлена гомология их участков с разными фрагментами половых хромосом и аутосом плацентарных млекопитающих. У плацентарных млекопитающих эмбриональные гонады имеют смешанную популяцию первичных половых и соматических клеток (это предшественники поддерживающих и стероидогенных клеток, а также мезенхимные клетки). Особенностью этих клеток является их бипотенциальность, они могут дифференцироваться как в линию клеток яичников, так и в линию клеток семенников. При формировании семенников включается регуляторный каскад, центральную роль в котором играет ген *Sry*, транскрипционный фактор семейства SOX, расположенный на Y-хромосоме. Именно этот ген считается ключевым, так как он “запускает” сложный каскад генов, результатом взаимодействия которых является формирование семенников. При отсутствии *Sry* начинается развитие по женскому типу, формируются яичники. Вместе с тем известны исключения: грызуны (колючие мыши рода *Tokudaia*, слепушонки рода *Ellobius*), у которых отсутствует Y-хромосома и ген *Sry*, но детерминация пола осуществляется. Исключения такого рода могут свидетельствовать в пользу существования “запасного” варианта регуляции генов, входящих в каскад детерминации пола.

Лекция С.В. Тиллиба была посвящена белкам триторакса и поликомба (trxG/PcG) как ключевым эпигенетическим факторам поддержания клеточной дифференцировки. Белки группы триторакса и поликомба – факторы модуляции хроматина, которые играют ключевую роль в регуляции транскрипции генов в ходе развития. Они связываются со сайтспецифическими участками ДНК (PRE и TRE), в результате чего изменяется упаковка хроматина, вследствие которой происходит активация транскрипции генов-мишеней, в частности гомеотических. Нарушение регуляции генов групп триторакса и поликомба в свою очередь приводит к нарушениям апоптоза, аномальной пролиферации и онкогене-

зу. Кроме того, факторы trxG и PcG играют важную роль в различных эпигенетических процессах, таких как плюрипотентность и пластичность стволовых клеток, геномный импринтинг и инактивация X-хромосомы. Как было показано на *D. melanogaster*, эти две группы белков являются антагонистами. Комплекс группы белков триторакса поддерживает активность экспрессии генов-мишеней, в то время как группа поликомба противостоит этой активации и играет репрессивную функцию. Такого рода взаиморегуляция стабильна на протяжении многих поколений клеток и может быть преодолена только в процессе дифференцировки. Также показано, что эти белки связываются не только с хроматином, но и взаимодействуют с белками ядерного матрикса.

Можно отметить, что на Школе удалось обсудить огромный объем информации, связанный с биологией развития животных. Отдельное заседание было посвящено стендовым сообщениям, числом около 70 и практически по всем представленным на Школе направлениям. Такое число и сжатые сроки не дали возможности детально обсудить эти сообщения на заседаниях, но на предварительной встрече и в последующих обсуждениях перед стендами кураторы направлений обсудили возникшие вопросы со всеми желающими. Авторы лучших стендовых сообщений были награждены почетными грамотами Школы: Адонин Л.С. – за сообщение “Что может объединять высших многоклеточных и кишечнополостных кроме многоклеточности?”, Иванов Р.С. – за “Анализ ARG-X-протеолиза в супраструктурах клеточного ядра при инициации ростового морфогенеза зрелых зародышей пшеницы *in vivo*”, Лисковых М.А. – за сообщение “На пути к получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) крысы”, Чермных Э.С. – за сообщение “Реконструкция волосяного фолликула в культуре”, Ефимова О.И. – за “Молекулярное картирование зон нейрональной пластичности в пренатальном и неонатальном мозгу мышей”, Соколова О.А. – за “Исследование новых компонентов РНК-сайленсинга у *D. melanogaster*”. Победителям также была предложена внеочередная публикация в журнале “Онтогенез”.

Школа закончилась. И, по единодушному мнению участников, все мы будем с надеждой ждать следующей.

А.М. Куликов, А.С. Микаелян
E-mail: arsmikael@gmail.com