

На правах рукописи

КИПРЮШИНА
Юлия Олеговна

**ФАКТОРЫ РОСТА ИЗ СЕМЕЙСТВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ
СОСУДОВ И ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ, Si-VEGF2
И Si-FGF, И ИХ РЕЦЕПТОРЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ МОРСКОГО ЕЖА
*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ВЛАДИВОСТОК – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией Одинцова
Нэлия Адольфовна

Официальные оппоненты:

Долматов Игорь Юрьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, зав. лабораторией сравнительной цитологии

Шкрыль Юрий Николаевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится «24» декабря 2013 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: 7 (423) 231-09-05, факс: 7 (423) 231-09-00, электронный адрес: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «21» ноября 2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из важнейших задач современной биологии является понимание молекулярных механизмов процессов развития. В многочисленных работах показано, что управление ключевыми событиями в раннем развитии животных происходит через сигнальные каскады, запускаемые факторами роста посредством связывания с соответствующими высокоспецифическими рецепторами. Факторы роста и их рецепторы представляют обширную группу белков, которые обнаружены у всех многоклеточных организмов.

Среди морских беспозвоночных иглокожие занимают ключевое положение в филогенетическом дереве (Wray, Lowe, 2000), являясь вторичноротыми животными (Bromham, Degnan, 1999). Именно поэтому классическим объектом для эмбриологических и молекулярно-биологических исследований, в частности для изучения сигнальных путей, давно стали эмбрионы и личинки морских ежей. Известно, что нормальное эмбриональное развитие этих животных связано с включением специфических сигнальных каскадов, таких, как Notch, Hedgehog, Wnt и MAPK, в которых особую роль играют факторы роста. В последнее время появляется все больше работ, посвященных изучению тонких механизмов эмбриогенеза морских ежей, однако, работ, посвященных изучению роли факторов роста в процессе развития морских ежей, немного, а данные об экспрессии генов факторов роста в различных тканях взрослых морских ежей представлены только в одной статье (McCoon et al., 1998). В связи с этим, исследование роли факторов роста и их рецепторов в онтогенезе морского ежа важно и актуально. Кроме фундаментальной значимости, такие работы могут обладать и практической значимостью при разработке методов получения длительно переживающих или постоянных культур клеток морских беспозвоночных, а также при разработке методов направленной дифференцировки клеток иглокожих в культуре. Наибольший интерес представляет группа гепарин-связывающих факторов роста, участвующих в регуляции деления клеток – фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста тромбоцитов (PDGF), исследование которых в онтогенезе морских ежей – в центре нашего внимания.

В 2006 г. группой исследователей был секвенирован полный геном морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* (Sodergren et al., 2006). На основании этих данных методами биоинформатики было предсказано существование трёх генов из семейства фактора роста эндотелия сосудов (*Sp-Vegf1*, *Sp-Vegf2* и *Sp-Vegf3*) и двух генов рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (*Sp-Vegfr-7* и *Sp-Vegfr-10*), а также существование одного гена семейства фактора роста фибробластов (FGF) и двух генов рецепторов (*Sp-Fgfr1* и *Sp-Fgfr2*) (Lapraz et al., 2006). Функции гомолога *Sp-Vegf3* (*Pl-Vegf3*) и гомолога *Sp-Vegfr-10* (*Pl-Vegfr*) достаточно полно охарактеризованы в раннем развитии у морского ежа *Paracentrotus lividus* (Duloquin et al., 2007), однако информация о генах двух других факторов и рецептора, а также сведения о белках, которые они кодируют, в литературе полностью отсутствуют.

Экспрессия генов семейства FGF и гена рецептора FGF (*Fgfa* и *Fgfr2*) описана только в раннем развитии морского ежа *P. lividus* (Lapraz et al., 2006; Röttinger et al., 2008), а гена рецептора *Fgfr1* – в раннем развитии морских ежей *S. purpuratus* и в некоторых тканях взрослых особей (McCoon et al., 1996; McCoon et al., 1998;). Учитывая, что экспрессия этих генов была исследована в ограниченном наборе тканей взрослых особей морских ежей, а также то, что сроки появления определённой мРНК в онтогенезе могут различаться у разных видов морских ежей, необходимо исследовать экспрессию *Fgf* и *Fgfr* в онтогенезе конкретного вида морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*.

Цель и задачи исследования. Цель работы – поиск и характеристика факторов роста, участвующих в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток иглокожих.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. провести филогенетический анализ белков из семейств VEGF и PDGF разных животных и на основании предсказанной аминокислотной последовательности фактора роста эндотелия сосудов морского ежа *S. intermedius* (*Si-Vegf2*) определить его место на филогенетическом дереве;
2. охарактеризовать экспрессию гена *Si-Vegf2* и гена его рецептора *Si-Vegfr*, а также гомологов генов *Fgf* и *Fgfr*, в онтогенезе морских ежей и установить локализацию *Si-Vegf2* транскриптов в раннем эмбриональном и личиночном развитии;
3. определить возможные функции белков из семейств *Vegf* и *Fgf* в онтогенезе морских ежей;
4. выявить факторы, влияющие на реализацию программы спикулогенеза в культуре эмбриональных клеток морских ежей, и оценить их влияние на развитие спикулогенной дифференцировки.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые охарактеризована кДНК транскрипта *Si-Vegf2*, принадлежащего к семейству генов факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), морского ежа *S. intermedius*. С помощью методов ОТ-ПЦР и *in situ* гибридизации установлен временной паттерн экспрессии гена *Si-Vegf2*, а также описана локализация его транскриптов в процессе развития. Обнаружено, что после стадии мезенхимной бластулы, *Si-Vegf2* экспрессируется только в клетках первичной мезенхимы эмбрионов и личинок морских ежей, а затем в различных клетках, тканях и органах у взрослых особей. Показано, что сигналы, опосредованные через взаимодействие факторов роста VEGF и FGF с их рецепторами, играют важную роль в раннем развитии морского ежа, регулируя образование архентерона, дифференцировку клеток первичной мезенхимы и в последующем спикулогенез.

Впервые установлено, что эмбриональную сыворотку, традиционно используемую в экспериментах по изучению спикулогенной дифференцировки морских ежей *in vitro*, можно заменить комплексом индивидуальных факторов роста и лектинов.

Результаты данной работы расширяют представления о механизмах контроля роста и дифференцировки у морских беспозвоночных животных. Полученные данные могут быть включены в курсы лекций по биологии развития, молекулярной биологии, и могут быть использованы как раздел практического спецкурса «Биотехнология морских организмов» в Дальневосточном федеральном университете.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы: им в полном объеме выполнена экспериментальная часть исследования (выделение РНК, синтез кДНК, проведение ПЦР и электрофореза, гибридизация *in situ*, эксперименты с ингибированием развития морского ежа, а также получение первичных клеточных культур из эмбрионов морского ежа), обработка, анализ и интерпретация данных.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на 9 конференциях: на VIII региональной конференции по актуальным проблемам биологии, экологии и биохимии (Владивосток, Россия, 2009 г.), на отчетной конференции «Перспективные направления развития нанотехнологий в ДВО РАН» (Владивосток, Россия, 2009 г.), ежегодной конференции Американского общества клеточной биологии (Денвер, США, 2011 г.), II международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Новосибирск, Россия, 2011 г.), конференции Испанского общества биологии развития (Гранада, Испания, 2012 г.), международном симпозиуме «Культуры клеток морских беспозвоночных» (Конкарно, Франция, 2012), на ежегодных конференциях ИБМ ДВО РАН (2011, 2012, 2013 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, из которых две статьи в реферируемых журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 201 цитируемых работ, а также приложения. Диссертация изложена на 128 страницах печатного текста, иллюстрирована 32 рисунками и содержит 2 таблицы. Данная работа частично выполнена в ЦКП «ХРОМАС» (Санкт-Петербург, Санкт-Петербургский государственный университет) и при финансовой поддержке гранта компании ОПТЭК для молодых исследователей, грантов РФФИ (12-04-00363а, 14-04-31748), Президиума ДВО РАН (09-1-П22-04, 09-П-СО-06-001, 12-И-П6-07, 12-Ш-В-06-031 и 13-Ш-В-06-030) и Программы ДВФУ (№ 11 G34.31.0010).

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю Нэлии Адольфовне Одинцовой за внимательное и конструктивное руководство; Константину Владимировичу Яковлеву (ИБМ ДВО РАН) и Кулаковой Милане Анатольевне (СПбГУ, Санкт-Петербург) за помощь в освоении молекулярно-генетических методов исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. В качестве объектов исследования были использованы яйцеклетки, эмбрионы, личинки и взрослые особи морского ежа *S. intermedius*. Эмбрионы получали искусственным оплодотворением и культивировали в климатической камере при 18°C до определенных стадий развития: зигота (20 мин после оплодотворения), 8 бластомеров (3–4 ч), плавающая бластула (13 ч), мезенхимная бластула (16 ч), гастрюла (24 ч), призма (36 ч) и ранний плутеус (3 сут).

Выделение РНК из эмбрионов, личинок, а также клеток, тканей и органов взрослых особей морского ежа. К каждой пробе (50–100 мкл) добавляли 1 мл TRI Reagent (Ambion, США) и инжесктировали, после этого образцы быстро замораживали в жидком азоте и переносили на -70°C, где хранили до выделения. После оттаивания РНК выделяли по стандартной методике. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (Fermentas, Литва) в течение 30 мин при 37°C и пересаждали при помощи набора Zymoresearch. Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза, а количество РНК определяли при помощи спектрофотометра Biophotometr (Eppendorf, Германия).

ОТ-ПЦР и условия проведения ПЦР. Синтез первой цепи кДНК проводили с тотальной РНК (1 мкг), используя транскриптазу MINT (Евроген, Россия) по методике производителя. Реакцию амплификации проводили при помощи Таq-полимеразы (Евроген) и ген-специфических праймеров (см. таблицу 1), подобранных при помощи программы Primer Premier 5. Первоначальный этап денатурации кДНК проводили в течение 1 мин при 94°C, а в дальнейшем – 30 с при 94°C, температура отжига праймеров составила 58 °C для *Si-GAPDH*, 62.2°C для *Si-Fgf*, 55.8°C для *Si-Vegf2* и *Si-Fgfr1*, и 54.1°C для *Si-Vegfr*, элонгацию осуществляли при 72°C 40 с, количество циклов составляло 35. Доработку продуктов амплификации проводили 5 мин при 72°C.

Таблица 1 – Праймеры, использованные в работе

Название гена	Gene ID	Праймеры
<i>Si-Fgf</i>	NM_00112476 4.1	5'-ССААСТТТСГССТТГССГТТСА-3'* 5'-ГТСТССГТСГСТТГСТГГТГСТ-3'***
<i>Si-Fgfr1</i>	NM_214537.1	5'-ААГАТГГСГТТСАГААГТГГГАА-3'* 5'-ГААСТСГТСГААГТСАГСАТТ-3'***
<i>Si-Vegf2</i>	XM_00119373 7.1	5'-GCTGCCACTGGTGTATCTTTGTT-3'* 5'-CAGAAGAGTGTTTGCCTGTAGGG-3'***
<i>Si-Vegfr</i>	XM_00119449 5.1	5'-САСТТАТТТГТГССАССАГААТГ-3'* 5'-ССААСССТСААГААССТСАГТАГ-3'***
<i>Si-GAPDH</i>	KC775387	5'-AGGТТСАГГТГГТГГСАГТС-3'* 5'-СТТСТГГГТГГСГГТГАА-3'***

* Прямой праймер, ** обратный праймер.

ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (RACE) и секвенирование. Для 3'-RACE мы синтезировали и амплифицировали двухцепочечную кДНК при помощи набора Mint (Евроген). Для 5'-RACE мы синтезировали двухцепочечную кДНК с использованием праймера, состоящего из адаптора, совместимого с китом Mint, и ген-специфической части (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACACCCACGTACAАСТСG-3'). Полученные таким образом матрицы были использованы в Step-Out RACE для амплификации концов *Si-Vegf2* кДНК с использованием Encyclo полимеразы (Евроген) и комбинации ген-специфических праймеров и адапторов из кита Mint RACE (Евроген). Последовательность фрагментов ДНК определяли на секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) на базе ЦКП ИБМ ДВО РАН. Последовательность кДНК *Si-Vegf2* была составлена при сложении последовательностей фрагментов кДНК, полученных методами ОТ-ПЦР, 5'- и 3'-RACE после секвенирования.

Филогенетический анализ белков семейств VEGF и PDGF. Для поиска консервативных доменов белков семейств VEGF и PDGF была использована база данных Conserved Domain Search Service, созданная National Center for Biotechnical Information (NCBI). Множественное выравнивание консервативных доменов было проведено при помощи программы ProbCons v1.12 (Do et al., 2005) с использованием WEB-сервиса Phylogeny.fr (www.phylogeny.fr) (Dereeper et al., 2008). Филогенетическое дерево было сконструировано при помощи байесовского анализа в программе MrBayes v3.2.0 (Ronquist et al., 2012) на основании 2500000 генераций по методу MCMC (Monte Carlo Markov Chain), используя смешанную модель замещения аминокислот (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Построенное филогенетическое дерево было визуализировано с помощью программы FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Гибридизация *in situ*. Для синтеза зонда использовали фрагмент *Si-Vegf2* размером 861 н.п., содержащий последовательность промотора для T3 или T7 РНК полимераз. РНК зонд, меченный дигоксигенином, получали при помощи *in vitro* транскрипции с использованием T3 и T7 РНК полимераз (Fermentas). Отчистку от невключившихся нуклеотидов проводили при помощи набора RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, США).

Материал фиксировали в фиксаторе (4% параформальдегид и 0.05% глутаровый альдегид на фосфатном буфере) при +4°C в течение ночи. После фиксации образцы несколько раз промывали и проводили по батарее этиловых спиртов повышающей концентрации. Дегидратированный материал хранили в 96% этиловом спирте при -20°C. В качестве основы для проведения *in situ* гибридизации была выбрана методика Thisse и Thisse (2008), в которую были внесены некоторые изменения в связи с её адаптацией для эмбрионов и личинок морского ежа.

Эксперименты по ингибированию факторов роста и их рецепторов в эмбриогенезе морского ежа. Для определения роли сигнальных путей, запускаемых факторами роста из семейств VEGF и FGF в развитии морского ежа, эмбрионы *S. intermedius* культивировали с неспецифическим ингибитором

рецепторов гепарин-связывающих факторов роста – сурамино (Sigma, США), а в последующих экспериментах – с сурамино и факторами роста PDGF-AB (Sigma) либо FGFb. В момент достижения контрольными эмбрионами стадии поздней гаструлы, производили подсчёт числа пигментных клеток в эмбрионах и измерение длины архентерона.

Получение первичных культур клеток из эмбрионов морских ежей и индукция спикулогенной дифференцировки. Первичные клеточные культуры из эмбрионов морских ежей (находящихся на стадии бластулы или гаструлы) двух видов – *S. intermedius* и *S. nudus* – получали по стандартной методике (Одинцова, 2001). Для культивирования клеток использовали среды разного состава и различные субстраты. Кроме того, в некоторых экспериментах в среду добавляли вместо эмбриональной сыворотки (ЭС) бычий сывороточный альбумин, БСА (0.125%), инсулин (100 мкг/мл) и холо-трансферрин (80 мкг/мл) (все реактивы фирмы Sigma) либо набор этих же компонентов в комплексе с лектинами, такими как маннозо-специфичный лектин, конканавалин А (1.5 мкг/мл, Sigma), или глюкозамин-специфичный лектин из асцидии *Didemnum ternatanum* (2.5 мкг/мл; ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток).

Клетки культивировали в течение 3 сут при температуре 17–18°C. Количество образовавшихся спикул подсчитывали через 3 сут после высева клеток на субстраты.

Статистический анализ полученных результатов. Статистические данные обработаны с помощью программы Statistica 6.0. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетический анализ факторов из семейств факторов роста эндотелия сосудов и факторов роста тромбоцитов

Для того чтобы установить, к какому классу факторов роста принадлежит исследуемый фактор, в первую очередь было необходимо установить нуклеотидную последовательность его кДНК. Для этого с помощью методов ОТ-ПЦР, 5'- и 3'-RACE и последующего секвенирования была определена последовательность кДНК *Si-Vegf2*, размер которой составил 2.3-кб. Последовательность кДНК исследуемого гена состоит из кодирующей области (1587 н.п.), а также 5' некодирующего региона (143 н.п.) и 3' некодирующего региона (569 н.п.). Данная последовательность кДНК *Si-Vegf2* была депонирована в базу данных (GenBank Ac. No. JX173728.1).

На основании последовательности кДНК была предсказана аминокислотная последовательность белка *Si-Vegf2*. Он состоит из 528 аминокислотных остатков (GenBank Ac. No. AFP95339.1), и его м.м. составляет

58.9 кДА. В данном белке присутствует участок, который соответствует домену PDGF/VEGF, что дает основание отнести этот белок к суперсемейству cysteine-knot белков. Домен PDGF/VEGF находится в районе с 122 по 216 а.к., и его размер составляет 95 а.к. (рис. 1).

```

MACYALTYSISILVILWYRMWVGVAVINSKRTLTRMEEELLQAYRMQVARKLTAVESSRD      60
FLRIFVFNNEIEPRFTSMVNATVQKKKGRISHGITLDFDEEISDRAMA AWIKHGASVGC S    120
EPQPRMLDMFEELGLSRGIGTYIYPSC TWVRRCGGSGCCTSDLQECASVPGTRTNVTKPF    180
VMITETGIDDSHHVTMKDQFLNYTFYEDTACTCLNRPESELPCSH TTCPSNQGF SVAACG    240
CKCLKDCPVPYMQDPETCQCDCSSGDKPCLKVMRGRRLPTEECLRVGHGF EKPKCRRHW     300
SFSTTHNCRCEERAPPTVWAR MYKVNNEVPVETLPETGDEPGEELINEYASGITPPLTTAE    360
ATTIITPLIPEEDEEEVEEDTTRRDTSSSSSVDETL PQDPDFDPLVMLPVAP EQRYTG     420
GDEYQQVQHETR TKGISSSNHTSAGEGTVSKDSSGRGSRLEEVVEGTTSTNHDTTETTT     480
TTTTPRQDTYQHRRGRFLGRV GLEDDDDDEVVAELGEFGSGSTAVDDDD                528

```

Рис. 1. Предсказанная аминокислотная последовательность Si-Vegf2. Домен PDGF/VEGF находится с 122 по 216 а.к., выделен серым цветом.

Согласно полученному филогенетическому дереву (рис. 2), все проанализированные белки семейств VEGF и PDGF позвоночных и беспозвоночных животных можно разделить на четыре группы. Первую группу составили все белки, относящиеся к семейству VEGF позвоночных, а также гомологи двух из трёх факторов этого семейства у морского ежа, Vegf2 и Vegf3. Вторая группа образована белками семейства PDGF А и PDGF В позвоночных, PVF1 нематоды *Caenorhabditis elegans* и VEGF асцидии *Ciona intestinalis*. В третью группу вошли белки семейства PDGF С и PDGF D позвоночных, а также фактор роста морского ежа Sp-Vegf. Таким образом, Sp-Vegf имеет большее сходство с белками семейства PDGF, чем VEGF, что является первым указанием на существование белка семейства PDGF у морского ежа. Однако это предположение требует дальнейшего тщательного анализа. Четвёртая группа образована белками VEGF, которые обнаружены как у позвоночных животных, так и беспозвоночных, таких как актинии, насекомые, клещи и пиявки.

Si-Vegf2 был отнесён к семейству VEGF, так как имеет большую гомологию с его представителями, чем с представителями семейства PDGF, которое также относится к надсемейству cysteine-knot содержащих факторов роста. Кроме этого, было установлено, что Si-Vegf2 имеет большее сходство с факторами VEGF-А и В позвоночных, чем с VEGF-С и D.

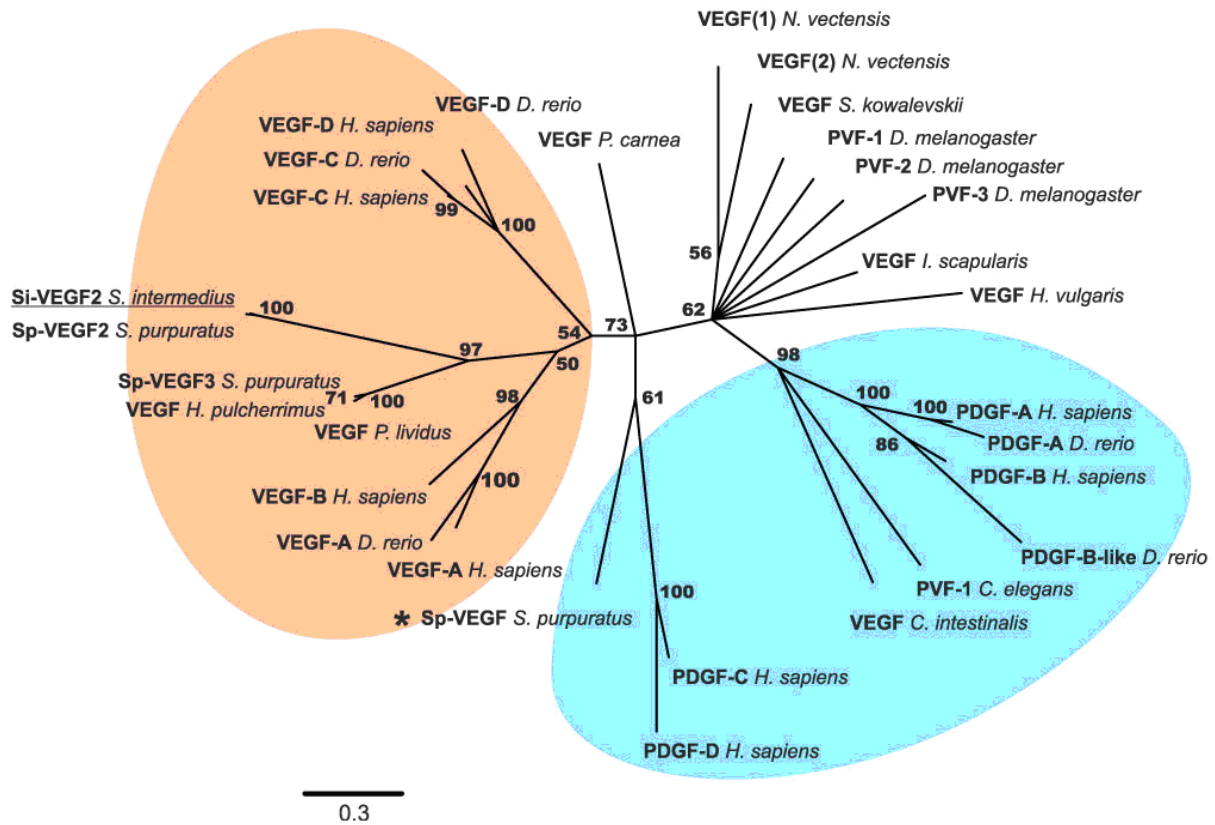


Рис. 2. Филогенетический анализ белков, содержащих PDGF/VEGF доменов, у различных животных. Филогенетическое древо, построенное при помощи байесовского анализа доменов надсемейства PDGF/VEGF. PDGF-A: *Homo sapiens* (NP_002598.4), *Danio rerio* (AAG43478.1); PDGF-B: *H. sapiens* (CAG30424.1), *D. rerio* (ABG34342.1); PDGF-C: *H. sapiens* (AAF80597.1); PDGF-D: *H. sapiens* (AAK56136.1); VEGF-A: *H. sapiens* (AAH65522.2), *D. rerio* (AAI62258.1); VEGF-B: *H. sapiens* (AAC50721.1); VEGF-C: *H. sapiens* (CAA63907.1), *D. rerio* (NP_991297.1); VEGF-D: *H. sapiens* (BAA24264.1), *D. rerio* (NP_001035268.1); предсказанная последовательность VEGF: асцидия *C. intestinalis* (XP_002128012.1), VEGF: *Ixodes scapularis* (XP_002411998.1), PVF-1 у *Drosophila melanogaster* (AAF48892.3), PVF-2 у *D. melanogaster* (AAF52484.2), PVF-3 у *D. melanogaster* (NP_001097108.1), PVF-1 у *C. elegans* (CCD73778.1); факторы роста эндотелия сосудов: *H. vulgaris* (ACN87994.1), *Nematostella vectensis* (EDO31946.1 и XP_001639080.1), VEGF: *Podocoryna carnea* (AAS79435.1), *Saccoglossus kowalevskii* (XP_002733316.1), *Paracentrotus lividus* (CAL91936.1), *H. pulcherrimus* (BAI67115.1), Si-Vegf2 у *S. intermedius* (AFP95339.1). Sp-Vegf (SPU_014978), Sp-Vegf2 (SPU_005737) и Sp-Vegf3 (SPU_030148) последовательности *S. purpuratus* были взяты из базы данных www.spbase.org.

Экспрессия генов факторов роста, *Si-Vegf2* и *Si-Fgf*, и генов их рецепторов *Si-Vegfr* и *Si-Fgfr*, в раннем развитии морского ежа *S. intermedius*

Мы проанализировали экспрессию гена фактора роста *Si-Vegf2* и гена его рецептора *Si-Vegfr* на различных стадиях эмбрионального и личиночного развития морского ежа *S. intermedius*.

Экспрессию гена *Si-Vegf2* наблюдали на всех исследованных стадиях развития (рис. 3). Транскрипты *Si-Vegf2* были обнаружены в яйцеклетке, что свидетельствует о материнском вкладе в экспрессию этого гена. В отличие от материнской экспрессии *Si-Vegf2*, экспрессия генов других факторов роста морских ежей, *Sp-Vegf3* и *Pl-Vegf3* (ортолог *Sp-Vegf3*), начинается позже – только на стадии бластулы, после выхода эмбрионов из оболочки оплодотворения (Duloquin et al., 2007; Li et al., 2012).

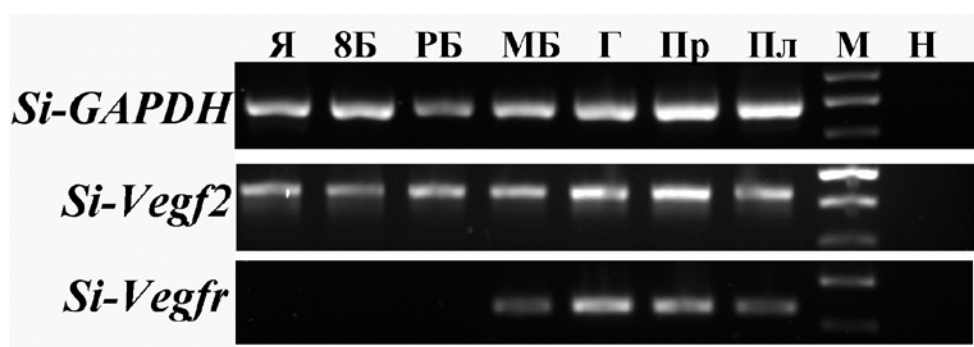


Рис. 3. Экспрессия генов *Si-Vegf2* и *Si-Vegfr* во время раннего эмбрионального и личиночного развития морского ежа. Я – яйцеклетка; 8Б – эмбрион из 8 бластомеров; РБ – ранняя бластула; МБ – мезенхимная бластула; Г – гастрюла; Пр – призма; Пл – плутеус; М – ДНК маркер с шагом в 100 н.п.; Н – негативный контроль. *Si-GAPDH* был амплифицирован в качестве положительного контроля.

Экспрессия гена рецептора *Si-Vegfr* начинается на стадии бластулы и продолжается на всех последующих стадиях развития (рис. 3), что указывает на отсутствие материнского вклада в экспрессию гена этого рецептора. Одновременная экспрессия фактора *Si-Vegf2* и его рецептора начинается со стадии бластулы.

Кроме проведенного анализа временной экспрессии тестируемых генов методами ОТ-ПЦР, мы изучили локализацию транскриптов *Si-Vegf2* в раннем развитии морского ежа при помощи *in situ* гибридизации.

Обнаружено равномерное распределение транскриптов на стадии яйцеклетки (рис. 4). В эмбрионах на стадиях раннего дробления и на стадии бластулы мРНК *Si-Vegf2* также была распределена равномерно во всех клетках эмбрионов (рис. 4 Б-В). Однако уже в самом начале выселения клеток первичной мезенхимы в бластоцель, локализация *Si-Vegf2* становится

неоднородной – транскрипт постепенно «исчезает» во всех клетках, кроме района, где располагаются клетки первичной мезенхимы (рис. 4 Г). Транскрипты *Si-Vegf2* на стадии гастрюлы локализованы в двух билатеральных кластерах первичной мезенхимы (рис. 4 Е), которые, как показано ранее (Killian et al., 2010), являются центрами спиккулогенеза. На ранних личиночных стадиях развития (призма, ранний плутеус) мРНК *Si-Vegf2* была обнаружена

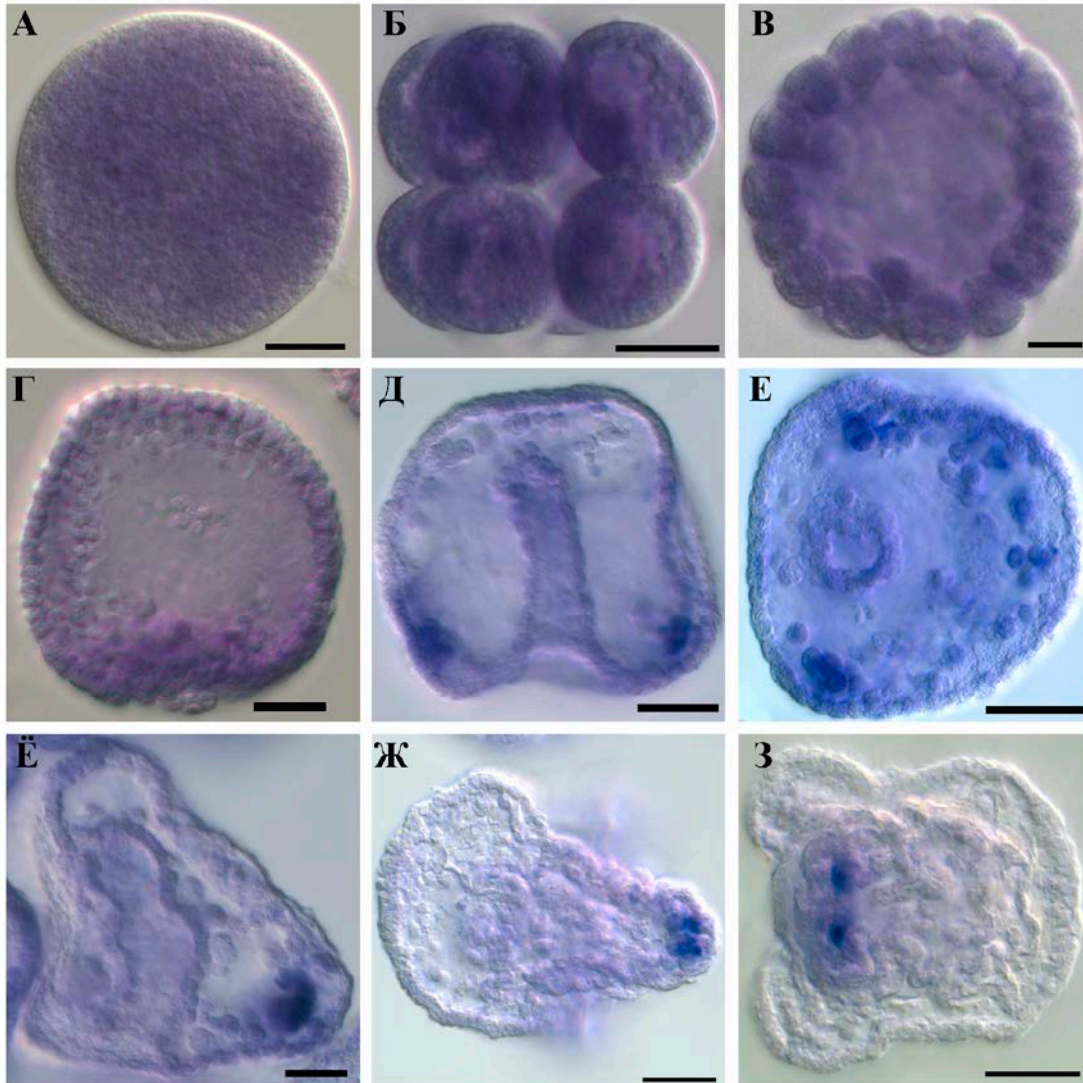


Рис. 4. Локализация транскриптов *Si-Vegf2* в процессе раннего развития морского ежа. А – яйцеклетка; Б – эмбрион из 8 бластомеров; В – ранняя бластула. Транскрипты *Si-Vegf2* на данных стадиях распределены равномерно во всех клетках. Г – мезенхимная бластула; Д, Е – гастрюла. Транскрипты *Si-Vegf2* обнаружены в вентролатеральных кластерах первичной мезенхимы. Ё – призма; Ж, З – плутеус. Экспрессия *Si-Vegf2* обнаружена в двух группах мезенхимных клеток на апикальной стороне личинки. А–Г, Ё, Ж, – эмбрионы и личинки показаны с латеральной стороны; Е – эмбрионы показаны с вентральной стороны; З – плутеус показан с апикальной стороны. Масштабная линейка 20 мкм.

на апикальном полюсе в двух группах клеток, состоящих из 3-6 клеток каждая (рис. 4 Ё–3). Мы предполагаем, что *Si-Vegf2* может играть важную роль в морфогенезе личинок, а также участвовать в регуляции спикулогенеза. В отличие от наших данных, у морского ежа *P. lividus* транскрипты другого фактора роста, *Pl-Vegf3*, описаны в другом зародышевом слое – эктодерме (Duloquin et al., 2007). Таким образом, факторы роста морских ежей *Pl-Vegf3* и *Si-Vegf2* могут быть вовлечены в различные события в процессе развития морских ежей.

Экспрессия гомологов генов *Fgf* и *Fgfr1* в раннем развитии была изучена у близкородственных видов морского ежа (McCoon et al., 1996; Rottinger et al., 2008). Необходимо было повторить эксперименты для *S. intermedius*, так как сроки экспрессии у разных видов морских ежей могут различаться (как это уже показано на примере гена *Si-Vegf3*). Нами установлено, что экспрессия гена *Si-Fgf* начинается со стадии яйцеклетки (рис. 5). Экспрессия гена рецептора *Si-Fgfr* также начинается со стадии яйцеклетки (рис. 5).

Одновременная экспрессия фактора и его рецептора на стадии яйцеклетки указывает, что начиная с этой стадии развития, *Si-Fgf* может взаимодействовать со своим рецептором и участвовать в передаче сигналов.

Экспрессия генов факторов роста, *Si-Vegf2* и *Si-Fgf*, и генов их рецепторов *Si-Vegfr* и *Si-Fgfr*, в клетках, тканях и органах взрослого морского ежа *S. intermedius*

Продолжая исследования экспрессии генов факторов роста и генов рецепторов факторов роста в онтогенезе морского ежа *S. intermedius*, мы проанализировали экспрессию гена *Si-Vegf2* и гена *Si-Vegfr* в различных тканях, органах и клетках взрослых морских ежей (рис. 6).

Транскрипты *Si-Vegf2* были обнаружены в большинстве тканей и органов морского ежа: иглах и пузырьках амбулакральной системы, семенниках, яичниках, целомическом эпителии, пищеводе и в целомоцитах. Экспрессия этого гена отсутствовала в амбулакральных ножках и мышцах Аристотелева фонаря.

Экспрессия гена рецептора *Si-Vegfr* (рис. 6) обнаружена одновременно с экспрессией гена *Si-Vegf2* в семенниках, целомическом эпителии, пищеводе и в целомоцитах. Так же, как и транскрипты самого гена, транскрипты гена его рецептора, отсутствовали в амбулакральных ножках. Кроме того, экспрессия данного гена не обнаружена в иглах и пузырьках амбулакральной системы.

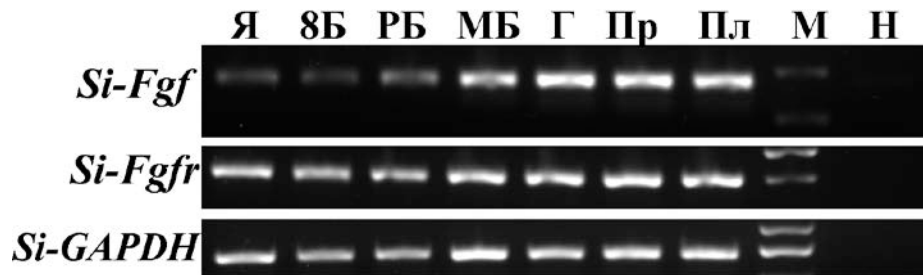


Рис. 5. Экспрессия генов *Si-Fgf* и *Si-Fgfr1* во время раннего эмбрионального и личиночного развития морского ежа. Я – яйцеклетка; 8Б – эмбрион из 8 бластомеров; РБ – ранняя бластула; МБ – мезенхимная бластула; Г – гастрюла; Пр – призма; Пл – плутеус; М – ДНК маркер с шагом в 100 н.п.; Н – негативный контроль. *Si-GAPDH* был амплифицирован в качестве положительного контроля.

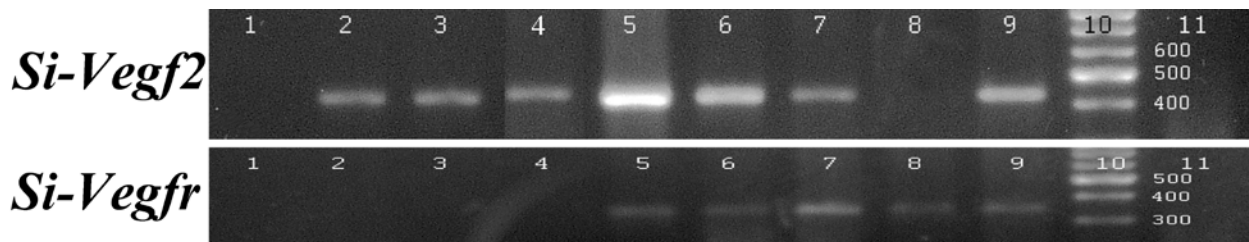


Рис. 6. Экспрессия гена *Si-Vegf2* и гена *Si-Vegfr* в клетках, тканях и органах взрослого морского ежа *S. intermedius*: 1 – амбулакральные ножки, 2 – иглы, 3 – пузыри амбулакральной системы, 4 – яичники, 5 – семенники, 6 – целомический эпителий, 7 – пищевод, 8 – мышцы Аристотелева фонаря, 9 – целоמוциты, 10 – маркер, 11 – негативный контроль.

Кроме этого, мы проанализировали экспрессию гена *Si-Fgf* и гена его рецептора в различных тканях взрослого морского ежа *S. intermedius* (рис. 7). Установлено, что данный фактор экспрессируется в яичниках, семенниках и пищеводе. Экспрессия гена *Si-Fgf* не обнаружена в амбулакральных ножках, иглах, пузырях амбулакральной системы, целомическом эпителии, мышце Аристотелева фонаря и в целоמוцитах.

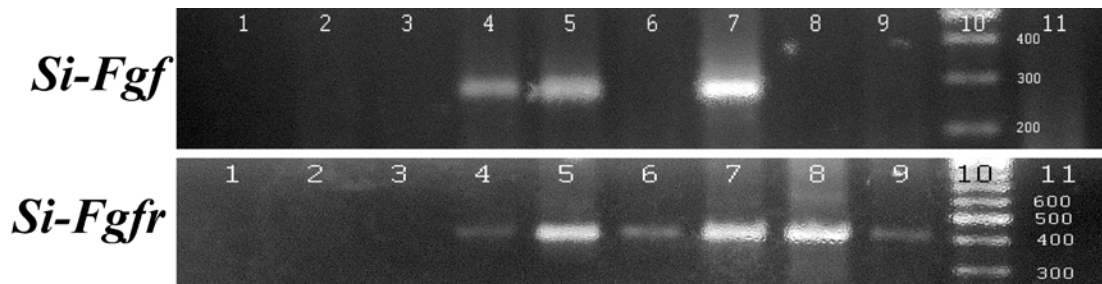


Рис. 7. Экспрессия гена *Si-Fgf* и гена *Si-Fgfr* в клетках, тканях и органах взрослого морского ежа *S. intermedius*: 1 – амбулакральные ножки, 2 – иглы, 3 – пузыри амбулакральной системы, 4 – яичники, 5 – семенники, 6 – целомический эпителий, 7 – пищевод, 8 – мышцы Аристотелева фонаря, 9 – целоמוциты, 10 – маркер, 11 – негативный контроль.

В отличие от экспрессии гена самого фактора, экспрессию гена рецептора (*Si-Fgfr*) мы наблюдали в значительно большем числе тканей: яичниках, семенниках, целомическом эпителии, пищеводе, мышце Аристотелева фонаря и в целомоцитах (рис. 7). Экспрессия отсутствовала в амбулакральных ножках, иглах и пузырях амбулакральной системы.

Таким образом, гены исследуемых факторов роста и гены рецепторов факторов роста (*Si-Fgf*, *Si-Vegf2*, *Si-Fgfr* и *Si-Vegfr*) экспрессируются не только в период эмбриогенеза и формирования личинок, но и в норме у взрослого морского ежа *S. intermedius* в различных клетках, тканях и органах. Обращает на себя внимание материнская экспрессия гена *Si-Vegf2*, тогда как транскрипт гена рецептора появляется позже – на стадии бластулы. У взрослых особей морских ежей полное отсутствие экспрессии хотя бы одного из данных генов показано только в амбулакральных ножках.

Влияние сурамина на раннее развитие морского ежа

Обнаружено, что инкубация эмбрионов морского ежа *S. intermedius* с сурамином нарушает нормальный ход эмбрионального развития, причем эффект сурамина проявляется на определенных стадиях развития. Подобные нарушения были описаны ранее у других видов морских ежей (Katow, Aizu, 2002).

Добавление сурамина на стадии зиготы не нарушало ход раннего эмбрионального развития (рис. 8А–Г). Однако в дальнейшем у экспериментальных личинок происходит заметное замедление развития, и нормальная гастрюла не формируется. Развитие останавливается на стадии мезенхимной бластулы: форма личинки не меняется, в дальнейшем не формируются спиккулы и полноценный кишечник. В некоторых случаях инкубация личинок с сурамином или с сурамином и одним из факторов роста приводит к экзогастрюляции (рис. 8К, Л).

Наши эксперименты показали, что сурамин полностью блокирует образование спикул, которые формируют личиночный скелет. Ни у одной личинки, ни на одном этапе развития не удалось обнаружить спикулы (рис. 8Й–Л). Добавление в морскую воду помимо этого ингибитора факторов роста (FGF или PDGF) не меняло картину – спикулы отсутствовали (рис. 8М).

Кроме влияния на спикулогенную дифференцировку, установлен эффект сурамина на длину архентерона. В то время, как в контроле высота архентерона достигала до 1/2 всей личинки (рис. 8Е), у эмбрионов, инкубированных с сурамином, наблюдали лишь небольшое скопление клеток на одном из полюсов (рис. 8Ж). Добавление сурамина к эмбрионам на стадии поздней гаструлы приводило к еще более ярко выраженным изменениям: длина архентерона была в среднем в два раза меньше, чем в контрольных личинках. На стадии призмы у некоторых личинок, инкубированных с сурамином, было зафиксировано некоторое увеличение длины архентерона (рис. 8Й), но, тем не менее, формирование нормального кишечника на более поздних стадиях не происходило (рис. 8И, К).

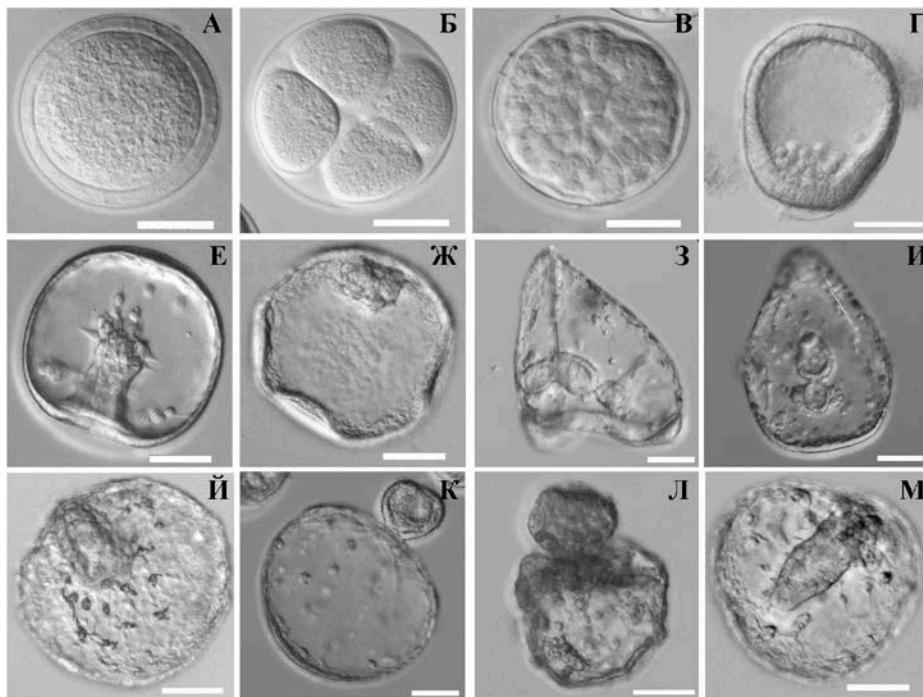


Рис. 8. Влияние сурамина (300 мкМ), и сурамина и PDGF на развитие морского ежа *S. intermedius*. Контрольные эмбрионы и личинки: А – стадия зиготы, Б – стадия 4 бластомеров, В – стадия морулы, Г – мезенхимная бластула, Е – гаструла (24 ч), З, И – призма (40 ч). Инкубация с сурамином: Ж – эмбрионы (24 ч), инкубация с сурамином со стадии бластулы; Й, К, Л – личинки (48 ч), инкубация с сурамином со стадии бластулы, К, Л – экзогастрюляция; М – личинка (48 ч) после инкубации с сурамином и PDGF (50 нг/мл). Масштабные линейки 50 мкм.

Нами показано, что сурамин блокирует дифференцировку клеток первичной мезенхимы у морского ежа (образование спикул), но существенно не влияет на дифференцировку клеток вторичной мезенхимы (на примере пигментных клеток). В отличие от наших результатов, японские коллеги обнаружили воздействие сурамина на дифференцировку клеток вторичной мезенхимы: в их экспериментах сурамин блокировал образование пигментных клеток (Katow, Aizu, 2002).

Таким образом, наши результаты показывают, что сигналы, запускаемые непосредственно гепарин-связывающими факторами, важны для миграции клеток и формирования архентерона, а также для дифференцировки клеток первичной мезенхимы, но не клеток вторичной мезенхимы. Ингибирование этих сигнальных путей нарушает ключевые события, происходящие в эмбриональном развитии морского ежа *S. intermedius*.

Дифференцировка клеток морского ежа *in vitro*

Для того, чтобы выявить факторы, влияющие на реализацию программы спикулогенеза в культуре эмбриональных клеток морских ежей, и оценить их влияние на развитие спикулогенной дифференцировки, был проведён ряд экспериментов в условиях *in vitro*. Через 1 сут после начала культивирования часть диссоциированных клеток объединялась и образовывала эмбриоидо-подобные агрегаты. Данную картину наблюдали на всех тестируемых субстратах, кроме поли-L-лизина. Клеточный ответ на внешний гуморальный стимул (сыворотку) мы регистрировали в определенном временном интервале (36–50 ч после начала культивирования). Это соответствует стадии *in vivo*, когда клетки начинают агрегировать и формировать кольцевой синцитий (Page, Venson, 1992).

Культивирование диссоциированных клеток бластулы или гастролы в морской воде в присутствии ЭС (1–32%) приводило к стабильному появлению спикул, которые можно было различить на вторые сутки культивирования. На рисунке 9Б–В представлен внешний вид спикул, которые образовывались в первичной культуре клеток бластулы морского ежа *S. nudus*, культивированных в морской воде в присутствии 10% ЭС. В личинке морского ежа каждая спикула представляет собой трёхосное образование, а в наших экспериментах большинство спикул были, в основном, правильной трёхосной формы, а после трёх суток культивирования некоторые спикулы ветвились и образовывали отростки. В культуре клеток другого вида морского ежа, *S. intermedius*, трёхосные спикулы наблюдали редко, зато в большом количестве формировались длинные одноосные спикулы (длиной более 50 мкм) (рис. 9Г). Это доказывает, что кроме внешних гуморальных стимулов в реализации программы спикулогенеза важную роль играет пространственное положение клеток и их микроокружение. Следует отметить, что при культивировании клеток, полученных с более поздней стадии развития – гастролы, спикул

образуется значительно больше, чем в культуре клеток, полученной со стадии бластулы.

Установлена прямая зависимость между используемой концентрацией ЭС в среде культивирования, а также типом субстрата, и количеством образовавшихся спикул для обоих видов морских ежей. При этом в культуре клеток *S. nudus* спикул образуется значительно меньше, чем в культуре клеток *S. intermedius*.

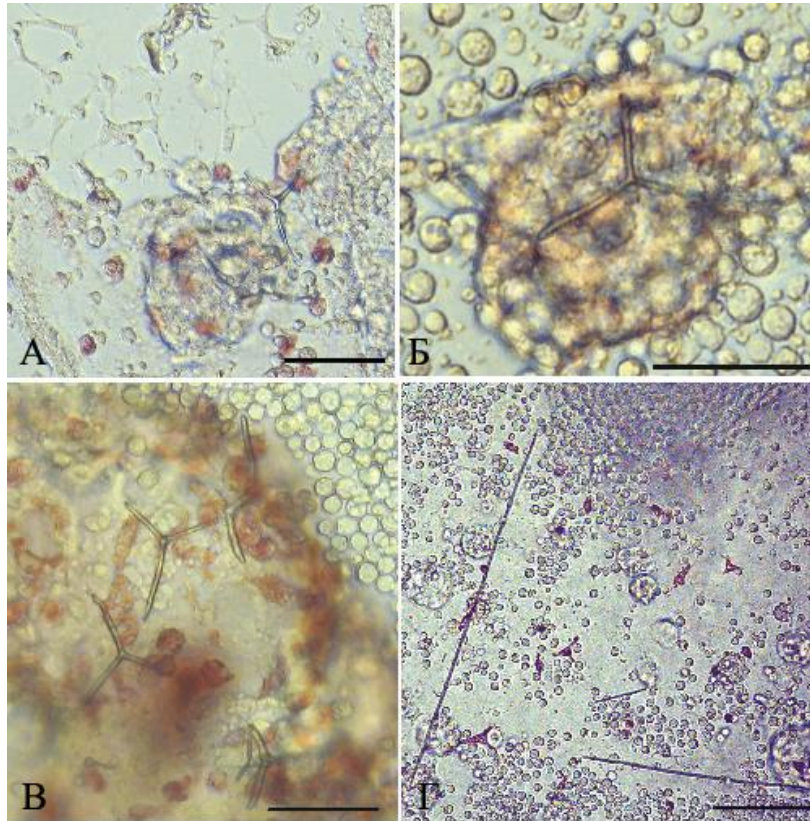


Рис. 9. Спикулогенез в культуре эмбриональных клеток морских ежей, полученных со стадии бластулы: А, Б, В – культура эмбриональных клеток морского ежа *S. nudus*; Г – культура эмбриональных клеток морского ежа *S. intermedius*. Клетки культивировали в течение 72 ч. Масштабные линейки: 20 мкм (А, В), 30 мкм (Б), 100 мкм (Г).

Количество спикул в культуре увеличивается по мере увеличения содержания сыворотки в среде (до достижения концентрации примерно 16%, рис. 10). При использовании высоких концентраций сыворотки (16–32%) наблюдался обратный эффект – количество образовавшихся спикул снижалось. Данный эффект, возможно, объясняется токсичным действием некоторых компонентов таких высоких концентраций сыворотки.

Наиболее эффективно программа спикулогенеза реализовалась при культивировании клеток на фибронектине, тогда как на пластике и в лунках,

поверхность которых была покрыта другими адгезинами, количество распластанных клеток и спикул было значительно меньше.

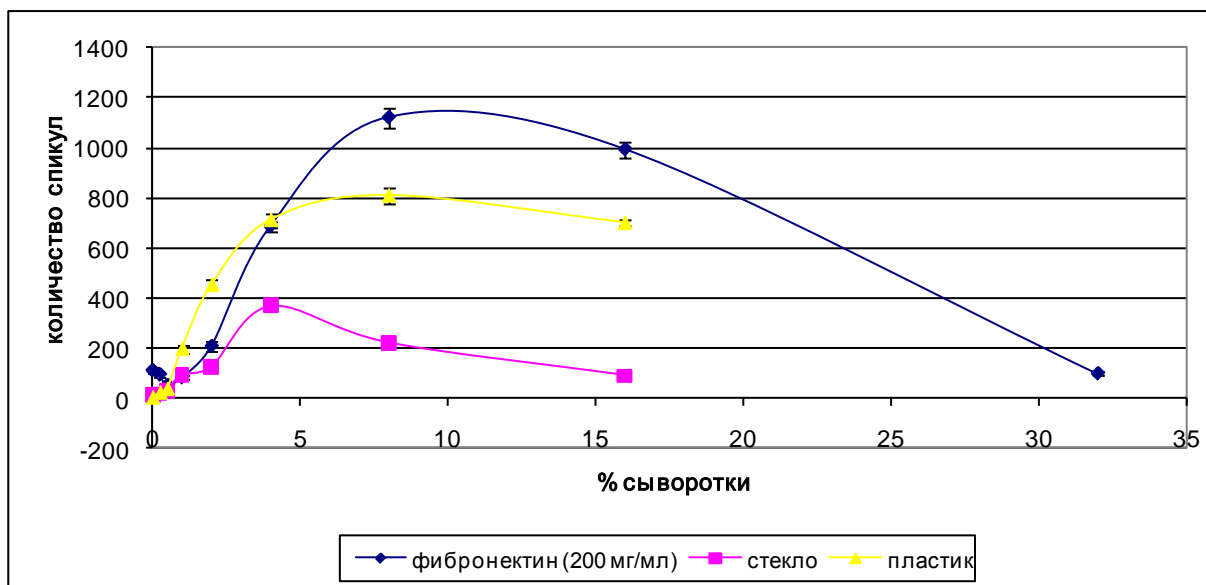


Рис. 10. Зависимость количества образовавшихся спикул в культуре клеток гастролы морского ежа *S. intermedius* от содержания сыворотки в среде культивирования и типа субстрата (клетки культивировали в течение 3 сут на пластике, либо на фибронектине, либо на стекле). Культуры клеток получены со стадии гастролы. Вертикальные линии – стандартное отклонение.

При культивировании клеток в питательной среде в присутствии сыворотки спикулы не образовывались. Однако, вводя в питательную среду, а не в морскую воду, комплекс факторов, состоящий из инсулина, трансферрина и лектинов, можно индуцировать образование спикул и заменить сыворотку. Мы впервые показали, что принципиальным при культивировании в питательной среде является наличие комплекса факторов роста с лектинами, без которых эффект отсутствует. Учитывая, что *in vivo* в органическом матриксе в полости спикул морских ежей присутствуют гликопротеины полиманнозного типа (Decker et al., 1987), можно объяснить способность экзогенных лектинов индуцировать спикулогенез в условиях культуры.

ВЫВОДЫ

1. Впервые охарактеризован транскрипт гена из семейства факторов роста эндотелия сосудов, *Si-Vegf2*, у морского ежа *S. intermedius*: последовательность кДНК состоит из открытой рамки считывания (1587 н.п.) и небольших нетранслируемых участков на 5' и 3' концах.
2. На основании предсказанной аминокислотной последовательности и присутствия в составе домена PDGF/VEGF, фактор роста морского ежа *S. intermedius* *Si-Vegf2* отнесен к семейству VEGF.
3. Обнаружено частичное несовпадение экспрессии генов фактора роста *Si-Vegf2* и его рецептора в процессе развития морского ежа *S. intermedius*: транскрипты *Si-Vegf2* обнаружены уже на стадии яйцеклетки, а экспрессия гена его рецептора (*Si-Vegfr*) начинается только на стадии бластулы. В то же время, экспрессия гена *Si-Fgf* и гена его рецептора начинается одновременно на стадии яйцеклетки. Среди тестируемых тканей взрослых особей установлено полное отсутствие экспрессии исследованных генов факторов роста и их рецепторов в амбулакральных ножках.
4. Распределение транскриптов *Si-Vegf2* равномерно до стадии мезенхимной бластулы. Со стадии гастролы экспрессия этого гена отмечена только в клетках первичной мезенхимы, которые являются центрами спиккулогенеза. Установлено, что неспецифический ингибитор рецепторов данной группы факторов роста, сурамин, приводит к остановке эмбрионального развития, ингибируя рост архентерона и блокируя дифференцировку клеток первичной мезенхимы. Функция фактора роста *Si-Vegf2* в развитии до конца не определена, однако выдвинуто предположение о его участии в спиккулогенезе.
5. Обнаружено, что экзогенные факторы влияют на реализацию программы спиккулогенеза в первичной культуре эмбриональных клеток морского ежа. Впервые показано, что комплекс факторов, состоящий из инсулина, трансферрина и лектинов, может индуцировать образование спиккул в культуре, что в дальнейшем может быть использовано для решения практических задач, связанных с получением культур клеток – продуцентов минеральных структур.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Кипрюшина Ю.О., Одинцова Н.А. Влияние экзогенных факторов на индукцию спикүлогенеза в культурах эмбриональных клеток морских ежей // *Онтогенез*. 2011. Т. 42, № 5. С. 390–396.
2. Kipryushina Y.O., Yakovlev K.V., Kulakova M.A., Odintsova N.A. Expression pattern of vascular endothelial growth factor 2 during sea urchin development // *Gene Expression Patterns*. 2013. Vol. 13, № 8. P. 402–406.

Публикации в материалах конференций:

1. Кипрюшина Ю.О., Одинцова Н.А. Спикүлогенез в культуре эмбриональных клеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Материалы VIII региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии». Владивосток, 11-13 декабря 2008. Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2008. С. 68.
2. Одинцова Н.А., Кипрюшина Ю.О. Индукция спикүлогенеза в культурах клеток морских беспозвоночных // Перспективные направления развития нанотехнологий в ДВО РАН: Результаты отчетной конференции в рамках ЦКП ДВО РАН. Владивосток: ИАПУ ДВО РАН, 2009. С. 135–142.
3. Одинцова Н.А., Агеенко Н.В., Дячук В.А., Кипрюшина Ю.О. Направленная дифференцировка клеток морских беспозвоночных животных в культуре // Тезисы II Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика». Новосибирск, 14-17 ноября 2011. Новосибирск, 2011. С. 63.
4. Kipryushina Y.O., Yakovlev K.V., Odintsova N.A. Expression of new growth factor of the VEGF family in sea urchin development // Abstracts of 51 Annual Meeting of American Society of Cell Biology (Denver, USA), 3-7 December 2011 // *Molecular Biology of the Cell*. 2011. Vol. 22 (suppl). Abstract № 2940.
5. Odintsova N., Ageenko N., Boroda A., Kiprushina Y. Spicule formation and pigment cell differentiation in primary cell cultures of sea urchin embryos. Cryopreservation of the cultures // Abstracts of the Symposium «Marine Invertebrate Cell Culture», Corcarneau, France, August 30-31 2012. France, 2012. *Cytotechnology*. 2013. Vol. 65. P. 676.
6. Kipryushina Y.O., Yakovlev K.V., Kulakova M.A., Odintsova N.A. Identification of a new gene *Si-Vegf2* of the vascular endothelial growth factor family, its temporal and spatial expression during sea urchin development // IX Meeting of the Spanish Society for Developmental Biology, Granada, Spain, November 12-14 2012. Abstract Book, 2012. P. 118.

КИПРЮШИНА
ЮЛИЯ ОЛЕГОВНА

**ФАКТОРЫ РОСТА ИЗ СЕМЕЙСТВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ
СОСУДОВ И ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ, SI-VEGF2 И SI-
FGF, И ИХ РЕЦЕПТОРЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ МОРСКОГО ЕЖА
*STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS***

АВТОРЕФЕРАТ

Подписано в печать 18.11.2013г.
Формат 60x84 1/16. Усл. п. л. 3,08. Тираж 120
Заказ 644
Отпечатано в Дирекции публикационной деятельности ДВФУ
690990, г. Владивосток, ул. Пушкинская, 10