

УДК 57.017.642

УСТАНОВЛЕНИЕ ЛЕВО-ПРАВОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: РОЛЬ БИЕНИЯ РЕСНИЧЕК И ЛЕВОСТОРОННЕГО ТОКА ЖИДКОСТИ В ОБЛАСТИ ГЕНЗЕНОВСКОГО УЗЕЛКА

© 2013 г. А. С. Ермаков

Université Montpellier 1, 5 bd Henri IV – CS 19044
34967 Montpellier Cedex 2

E-mail: ermakov99@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.13 г.
Окончательный вариант получен 17.04.13 г.

В ходе индивидуального развития позвоночных последовательно устанавливаются передне-задняя, дорсо-вентральная и лево-правая оси тела. Хотя представители позвоночных билатерально-симметричны снаружи, их внутреннее строение асимметрично. Особый интерес представляет изучение процесса установления висцеральной лево-правой асимметрии у млекопитающих, так как оно имеет, помимо фундаментального, и прикладное медицинское значение. Еще в 1976 году было выдвинуто предположение о возможной связи между биением ресничек и установлением лево-правой асимметрии у млекопитающих. В настоящее время большинство исследователей признает, что биение ресничек в области гензеновского узелка и порождаемый этим биением левосторонний ламинарный ток жидкости играют ведущую роль в потере билатеральной симметрии и запуске экспрессии генов специфического для левой стороны эмбриона сигнального каскада Nodal-Ptx2. Конкретный механизм этого явления к настоящему времени не понят до конца. Существуют три конкурирующих взгляда на то, как левосторонний ток жидкости индуцирует экспрессию ряда генов в левой стороне тела эмбриона. Гипотеза градиента морфогена постулирует, что левосторонний ток создает высокую концентрацию сигнальной биомолекулы в левой части гензеновского узелка, что, в свою очередь, стимулирует запуск экспрессии генов каскада Nodal-Ptx2. Биомеханическая гипотеза (или “модель двух типов ресничек”) гласит, что неподвижные реснички, расположенные по периферии гензеновского узелка, работают как механосенсоры, активируют механочувствительные ионные каналы и запускают процессы кальциевой сигнализации в левой части тела эмбриона. Наконец, “челночная модель” утверждает, что левосторонний ток жидкости переносит липидные везикулы, которые разбиваются при столкновении с неподвижными ресничками периферии гензеновского узелка и высвобождают находящиеся внутри сигнальные биомолекулы. Примечательно также, что за последние годы связь биения ресничек и установления асимметрии открыта также у представителей низших позвоночных. В данной статье автор рассматривает эволюцию представлений о механизмах установления лево-правой висцеральной асимметрии млекопитающих с 1976 года по настоящее время и критически переосмысливает современные представления в этой области науки. По мнению автора, в последние годы получены серьезные аргументы в пользу биомеханической гипотезы установления лево-правой асимметрии млекопитающих.

Ключевые слова: лево-правая асимметрия, морфогенез, мышь, реснички, эмбриология млекопитающих, биомеханика, Nodal, Ptx2, Lefty-1, Lefty-2.

DOI: 10.7868/S0475145013050030

ПЛАН СТРОЕНИЯ ТЕЛА ПОЗВОНОЧНЫХ И ЛЕВО-ПРАВАЯ АСИММЕТРИЯ

Установление трехмерного плана строения и спецификации судьбы зародышевых тканей относительно трех ортогональных осей в ходе эмбрионального развития животных требует четкого согласования множества биологических и биохимических процессов на разных уровнях организации — от молекулярного до макроморфо-

логического. В ходе индивидуального развития позвоночных животных последовательно устанавливаются передне-задняя, дорсо-вентральная и лево-правая оси.

Хотя внешне позвоночные животные билатерально-симметричны, в их внутреннем строении присутствует лево-правая асимметрия (Neville, 1976; Levin, 2005; Raya, Belmonte, 2006; Norris, 2012), многие внутренние органы у позвоночных

животных имеют асимметричное строение или расположение. Если говорить о млекопитающих, то с левой стороны у представителей этой группы позвоночных сердце, желудок, поджелудочная железа, селезенка, с правой — печень и желчный пузырь. Легкие у млекопитающих имеют асимметричное строение, в частности, в случае мыши одна большая доля легких расположена в левой стороне тела и четыре маленьких доли в правой (Kaufman, Bard, 1999).

Принципы установления лево-правой асимметрии сходны для всех групп хордовых, хотя конкретные детали асимметричности органов могут отличаться. Примечательно также, что для нормальных представителей того или иного вида лево-правая асимметрия устанавливается в определенной ориентации (Neville, 1976). Феномен лево-правой асимметрии вызывает много вопросов (Neville, 1976; Mercola, 2003; Levin, 2004; Levin, 2005). Как порождается асимметрия в ходе эмбрионального развития? Зачем она вообще нужна? Когда она появляется в эволюции? Связана ли как-то морфологическая лево-правая асимметрия с хиральной асимметрией биологических молекул (Pasteur, 1948)? Каковы молекулярные механизмы установления лево-правой асимметрии? (Burdine, Schier, 2000; Mercola, Levin, 2001; Norris, 2012). Почему лево-правая асимметрия существует у такого большого числа разных групп организмов? Почему в природной популяции встречается один из асимметричных вариантов, а не оба варианта в отношении 50% на 50%? Ведь гораздо проще представить механизм установления асимметрии со случайным соотношением лево- и право-сторонней ориентации органов, но в природе это не так. Насколько велика роль генов в формообразовании сложноустроенных органов, таких как, например, сердце и какую роль в этом процессе играют биофизические факторы — например, гемодинамика?

Особенно важно понять установление лево-правой висцеральной асимметрии у млекопитающих и человека (Mercola, 2003; Hamada, 2002). Помимо фундаментального, изучение установления лево-правой асимметрии у млекопитающих имеет и важное прикладное значение — среди людей встречаются представители с аномалиями установления лево-правой асимметрии (Levin, 2004; Cassey, Hackett, 2000). Аномалии в установлении лево-правой висцеральной асимметрии встречаются примерно у одного на 8000 новорожденных.

Situs inversus встречается примерно у 1 новорожденного из 20000 (Burn, 1991). При этой аномалии происходит полная инверсия внутренних органов относительно передне-задней оси. Поскольку инверсия органов в данном случае абсо-

лютная, то их работа скоординирована, и урона здоровья такая аномалия не наносит. Скорее всего, оценка встречаемости *Situs inversus* у человека занижена, так как часть людей с таким симптомом не выявляется медиками. Другие типы аномалий, такие как изомеризм (потеря асимметрии), инверсия отдельных органов и гетеротаксия (потеря согласованности органов) часто приводят к серьезным осложнениям здоровья.

ИСТОРИЯ ВОПРОСА. ГИПОТЕЗА БРАУНА И ВОЛЬПЕРТА

В начале 1990х Браун и Вольперт выдвинули теоретическую модель, объясняющую установление лево-правой асимметрии у млекопитающих. Согласно этой модели, установление асимметрии включает в себя три ключевых процесса: 1) конверсию, переводящую асимметрию молекул в асимметрию на клеточном и многоклеточном уровне; 2) рандомизацию или случайное порождение асимметрии (асимметрия на клеточном и надклеточном уровне) и 3) интерпретацию, в ходе которой клетки и органы распознают информацию о симметричности и в соответствии с этим развиваются морфологические структуры (Brown, Wolpert, 1990).

Браун и Вольперт исходили из простой предпосылки — если уже определены дорсо-вентральная и передне-задняя оси, то лево-правая ось задана автоматически. Из этого следует также, что, если одна из этих осей будет инвертирована, то и лево-правая ось будет инвертирована. Ученые предположили, что должна существовать асимметричная молекула, которая ориентируется по отношению к дорсо-вентральной и передне-задней оси, и которая участвует в детерминации лево-правой оси. С другой стороны, к началу 1990х известно было уже о существовании мутации *lv* у мышей, при которой инвертирование лево-правой асимметрии происходит в 50% случаев, что натолкнуло авторов на мысль о существовании механизма случайной генерации асимметрии на клеточном и надклеточном уровнях.

Конверсия (conversion). Авторы выдвинули гипотезу о механизме, переводящем асимметрию молекул в различия в распределении определенных веществ в левой и правой стороне тела. Согласно этой гипотезе, должна существовать асимметричная молекула, способная ориентироваться определенным образом относительно уже существующих установившихся осей. Наглядно пояснить это можно так: представим себе молекулу в форме латинской буквы F, которая обладает пространственной асимметрией (рис. 1a).

Теперь представим себе зародыш в виде пласта клеток, в котором уже установились переднезадняя ось, дорсовентральная ось и билатеральная сим-

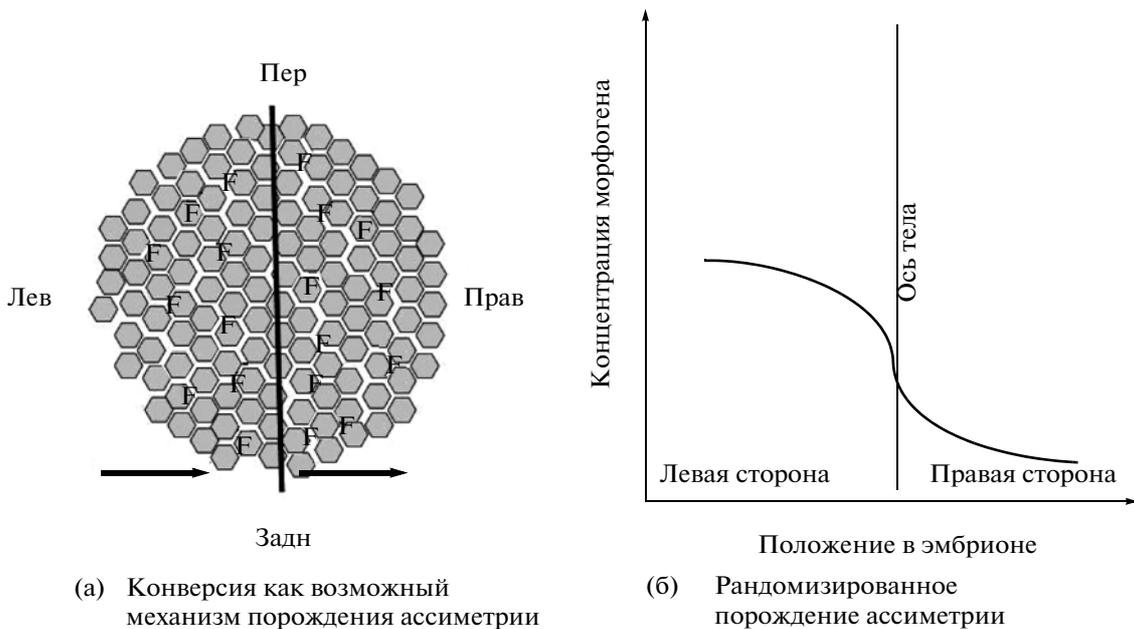


Рис. 1. Модель Брауна–Вольперта. (а) Механизм конверсии. Зародыш представлен состоящим из одного слоя клеток. Уже установились передне-задняя и дорсо-вентральная оси. Предположим, что F-образная молекула обладает стереоизомерией и ориентируется определенным образом относительно этих осей. Распределение F-образных молекул задаст лево-правую асимметрию, так как их ориентация с левой стороны не является зеркальным отражением ориентации молекул с правой стороны. Если ориентация таких молекул может влиять на направление молекулярного транспорта, то такой транспорт будет ориентирован в направлении к передне-задней оси на одной стороне тела и от передне-задней оси на другой стороне. (б) Механизм рандомизированного порождения асимметрии. Представим градиент морфогена вдоль лево-правой оси, образующийся по реакционно-диффузионному механизму. Если такой градиент пересекает передне-заднюю ось тела, то концентрация морфогена на одной из сторон будет выше, чем на другой, то есть, возникает неэквивалентность левой и правой сторон зародыша. При небольших отклонениях в начальных условиях реакции направление градиента может меняться на противоположное. Это значит, что порождение асимметрии в такой системе в значительной степени случайное (рандомизированное). Однако направление градиента морфогена может быть скорректировано с помощью механизма конверсии.

метрия. Клетки определенным образом поляризованы по отношению к средней линии. Предположим, что F-образная молекула ориентируется определенным образом по отношению к переднезадней и дорсовентральной осям. В реальности такое может быть, например, если определенный участок молекулы встраивается в мембрану клеток с вентральной стороны, и, кроме того, у молекулы есть домен, который связывается с фибриллами, ориентированными в передне-заднем направлении.

В этом случае билатеральная симметрия по отношению к центральной оси на уровне ориентации таких молекул теряется. Асимметричная ориентация F-образных молекул может затем спровоцировать изменения в биохимических и физиологических процессах — например, направить транспорт молекул в сторону средней линии на одной из сторон тела и от средней линии — на другой стороне. Авторы назвали такой гипотетический механизм потери билатеральной симметрии конверсией.

Рандомизированное порождение асимметрии (random generation of asymmetry). В той же статье

(Brown, Wolpert, 1990) авторы предположили, что конечным итогом потери симметрии должно быть различие в распределении определенных химических веществ между левой и правой сторонами тела. Браун и Вольперт применили выдвинутую в отношении морфогенеза дрозофилы в 1970х Кауфманом идею градиента морфогена (Kauffman et al., 1978). Если такой градиент распределится вдоль лево-правой оси и пересечет ось билатеральной симметрии, то зародыш разбивается на две зоны — с высоким уровнем морфогена (одна из сторон) и с низким уровнем (противоположная сторона) (рис. 1б).

Выбор того, на какой именно стороне концентрация будет высокая, а на какой — низкая, в такой модели случаен. Однако, небольшая степень асимметрии, возникшая в результате конверсии, может послужить триггером для правильной ориентации установления лево-правого градиента морфогена.

Интерпретация (interpretation). Интерпретацией Браун и Вольперт называют процесс, в ходе которого клетки меняют свои свойства в зависимо-

сти от полученной информации. После того, как устанавливаются различия между левой и правой стороной на молекулярном уровне, начинается процесс формирования различий на уровне морфологии. Стороны получаются разными, однако, как считали Браун и Вольперт, нельзя в таком случае говорить о доминировании одной стороны над другой.

Модель Брауна–Вольперта и влияние генов на установление лево-правой асимметрии. Некоторые авторы ставили под сомнение утверждение, что гены могут непосредственно влиять на установление лево-правой асимметрии тела (Morgan, 1977; Morgan, Corballis, 1978).

Браун и Вольперт считали, что такое влияние может осуществляться на уровне конверсии. Если представить себе два изомерических варианта F-образной молекулы, которые по-разному ориентируются относительно передне-задней оси, то мы получим “переворачивания конверсии” и изменение лево-правой асимметрии на противоположную. Более вероятно мутация, в ходе которой функция белка (F-образной молекулы) теряется. В таком случае следует ожидать рандомизацию в установлении симметрии (то есть оба варианта в равных соотношениях) либо отсутствие асимметрии.

Гены могут воздействовать на этот процесс также на уровне интерпретации и рандомизированного порождения асимметрии. Очень трудно представить, однако, что генетические нарушения на уровне интерпретации приведут к полному переворачиванию асимметрии. Скорее в таких случаях следует ожидать различные типы нарушений в установлении асимметрии. В случае нарушения механизма рандомизированного порождения асимметрии возможно отсутствие асимметрии либо рандомизация асимметрии.

ЭТАПЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ЛЕВО-ПРАВОЙ АСИММЕТРИИ У МЫШИ. ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ СХЕМА

Мышь (*Mus musculus*) – основной модельный объект для изучения ранних процессов формирования лево-правой висцеральной асимметрии у млекопитающих. В ходе эмбрионального развития мышцы лево-правая асимметрия устанавливается примерно на стадии 8.25 dpc (дней индивидуального развития). На этой стадии зародыш выглядит просто (Norris, 2012): передняя часть с уже обозначенными головой и зачатком сердца, далее идет средняя часть с оформившейся хордой и задняя часть, заканчивающаяся структурой под названием гензеновский узелок. По сторонам от средней линии тела, вдоль которой протянулась хорда, располагаются структуры параксиальной мезодермы – ближе к хорде сомиты (из них разовьются потом мышцы, кости и дермальная часть

кожи), а вдоль краев идет мезодерма боковых пластинок, которая включится в состав парных внутренних органов (таких как, например, почки). Над мезодермальными структурами расположена эктодерма, а под ними – эндодерма.

Сильно огрубляя ситуацию, можно сказать, что процесс установления лево-правой асимметрии осуществляется, по крайней мере, в два этапа (Hamada et al., 2002; Shiratori, Hamada, 2006; Norris, 2012): сначала (примерно на стадиях 7.5–8.25 dpc) происходит потеря билатеральной симметрии и порождается лево-правая асимметрия, а затем включаются каскад генов с асимметричной экспрессией, что приводит к запуску нижестоящих генных каскадов, и в конечном итоге включаются гены, ответственные за морфологические перестройки, и образуются специфические морфологические структуры (рис. 2а, 2б).

Потеря билатеральной симметрии. В ходе первого этапа, который приходится примерно на 7.5–8.25 дней эмбрионального развития, изначально симметричная структура (эмбрион на ранней стадии развития) становится асимметричной, происходит нарушение зеркальной симметрии тела (Shiratori, Hamada, 2006). Генерируется сигнал, который стимулирует экспрессию определенных генов в левой части тела. В ходе второго этапа разворачивается каскад экспрессии специфических генов в левой стороне эмбриона, а затем эта асимметрия реализуется в строении конкретных морфологических структур (сердца, легких, кишечника). Каков конкретный механизм этого процесса, до конца непонятно. Большинство исследователей признает ведущую роль биения ресничек в области гензеновского узелка в этом процессе. На природе процессов, происходящих на стадии потери билатеральной симметрии, мы и постараемся сконцентрироваться в данной статье.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ

После того, как осуществилась потеря билатеральной симметрии, в мезодерме левой латеральной пластинки активируется экспрессия генов каскада Nodal-Ptx2 (рис. 2б). Поскольку эмбриологические эксперименты на млекопитающих ранних стадий эмбрионального развития затруднены, многие особенности сигнального каскада Nodal-Ptx2 были открыты в прямых экспериментах на куриных эмбрионах, а их основные выводы подтверждены затем в генетических экспериментах на мутантных линиях мышей. В норме Nodal экспрессируется у эмбрионов млекопитающих в мезодерме левой, но не правой, латеральной пластинки (Collignon et al., 1996).

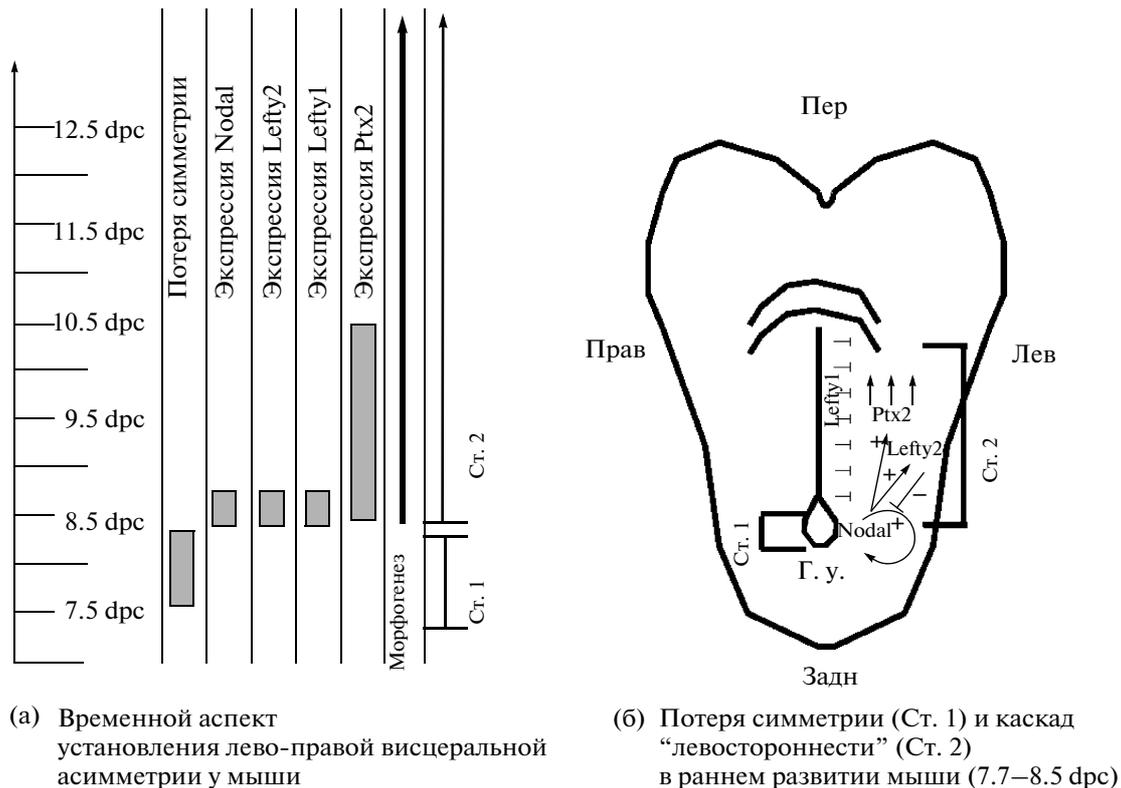


Рис. 2. Принципиальная схема установления лево-правой асимметрии в развитии мыши. (а) Временной аспект. На первой стадии (Ст. 1, 7.5–8.25 дрс) происходит потеря билатеральной симметрии. События второй стадии (Ст. 2) начинаются примерно на 8.5 дрс, в ходе этой стадии происходит экспрессия генов каскада “левосторонности” и специфические морфогенетические перестройки. (б) Пространственно-морфологический аспект. Схематическое изображение эмбриона мыши примерно на 8.25–8.5 дрс, вид с вентральной стороны. События первой стадии, в ходе которой происходит потеря симметрии (Ст. 1) разворачиваются в гензеновском узелке (Г. у.). Экспрессия генов каскада “левосторонности”, с которой начинается вторая стадия (Ст. 2), происходит в мезодерме левой латеральной пластинки. Продукт гена *Nodal* активирует экспрессию самого себя и гена *Lefty 2*, а продукт гена *Lefty 2* ингибирует экспрессию *Nodal*. Паттерн экспрессии этих генов формируется в левой латеральной пластинке по реакционно-диффузионному механизму. Экспрессия *Lefty 1* (продукт которого тоже ингибирует экспрессию *Nodal*) вдоль средней линии тела ограничивает распространение этой реакции левой стороной зародыша и не дает перейти на правую. Продукт *Nodal* активирует также экспрессию гена *Ptx2*, продукт которого является ДНК-связывающим фактором и, в свою очередь, активирует комплекс генов, работа которых необходима для формирования морфологических структур левой стороны тела мыши.

У эмбрионов мутантных линий мышей с нарушениями установления лево-правой асимметрии его экспрессия может наблюдаться в тканях противоположной стороны тела (Lowe et al., 1996).

Nodal – представитель семейства Трансформирующих Ростовых Факторов (TGF-β). Функционирует он как димер, для его работы необходим кофактор – белок EGF-CFC. Продукт *Nodal* запускает сигнальные каскады через так называемые рецепторы первого типа *Alk4* и *Alk7* и через рецепторы второго типа *ActRIIa* и *ActRIIb*, активируя при этом транскрипционные факторы *Smad2*, *Smad4* и *Fast* (известный также как *Foxh1*) (Hamada 2002).

В клетках левой латеральной пластинки *Nodal* активирует экспрессию самого себя, экспрессию гена *Lefty2*, а также экспрессию гена *Ptx2* (Hamada, 2002; Norris, Robertson, 1999; Saijoh et al., 1999;

Saijoh et al., 2000; Adachi et al., 1999; Pedra et al., 1998). Продукт *Lefty2* – мономер, что необычно для представителей семейства TGF-β, экспрессия этого белка в эмбрионе мыши асимметрична, и он тоже экспрессируется в левой латеральной пластинке эмбриона (Meno et al., 1996; Meno et al. 1997).

Так как продукт гена *Lefty2* – мономер, он распространяется быстрее димера продукта *Nodal* (Sakuma et al., 2002; Muller et al., 2012; Marjoram et al., 2011), при этом белок-продукт гена *Lefty2* подавляет экспрессию гена *Nodal* (Meno et al., 2001).

Экспрессия как *Nodal*, так и *Lefty2* начинается на стадии 2–3 сомитов в небольшой части левой латеральной пластинки, примыкающей к гензеновскому узелку, паттерн экспрессии растет вдоль передне-задней оси. Экспрессия этих генов пре-

крашается на стадии 6–7 сомитов. Взаимодействие продуктов Nodal и Lefty2 можно рассматривать как реакционно-диффузную систему на схеме активатор (Nodal)—ингибитор (Lefty2) (Saijoh et al., 2000), в ходе такой самоорганизации образуется устойчивый паттерн экспрессии гена Nodal в клетках левой латеральной пластинки.

Lefty1 экспрессируется вдоль оси тела в левой части основания нервной трубки на тех же стадиях развития (Meno et al., 1997; Hamada et al., 2002). У эмбрионов линии мутантных по этому гену мышей наблюдаются дефекты в установлении лево-правой асимметрии, наиболее распространенным из которых является левосторонний изомеризм. Кроме того, у таких эмбрионов наблюдается билатеральная экспрессия Nodal, Lefty-2, Ptx2 (Meno et al., 1998). Таким образом, можно считать, что экспрессия гена Lefty1 играет роль дополнительного ограничителя экспрессии каскада Nodal-Ptx2 в левой стороне эмбриона. Такой феномен получил название “срединного барьера”.

Экспрессия генов Lefty1, Nodal и Lefty2 продолжается в течение примерно 6–8 часов. В отличие от этих генов, асимметричная экспрессия Ptx2 в левой части тела эмбриона продолжается в течение двух суток и, кроме того, наблюдается корреляция между его экспрессией и установлением асимметричности органов (Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998).

Продукт этого гена является ДНК-связывающим фактором. Еще в конце 1990х была выдвинута гипотеза о том, что продукт гена Ptx2 активирует определенные каскады генов, в результате работы которых сторона тела, в которой он экспрессируется, становится левой по морфологическим признакам (Ryan et al., 1998; Logan et al., 1998).

Согласно этой гипотезе, Ptx2 инициирует работу генов, ответственных за установление лево-правой асимметрии, связываясь с регуляторными участками ДНК (промоторами и энхансерами) и активируя экспрессии нижестоящих в каскаде генов. Экспрессия этих нижестоящих генов влияет на морфологическую структуру левой части тела. Эта часть тела становится левосторонней по морфологическим критериям (например, сердце выдвигается в эту сторону, с этой стороны формируется (в случае мыши) одна крупная доля легких, а не четыре небольших доли, как с правой стороны).

Это значит, что для того, чтобы сторона тела стала левой по морфологическим признакам, необходима экспрессия генов каскада Nodal-Ptx2, связывание белка Ptx2 с определенными участками ДНК и запуск экспрессии комплекса определенных (но пока не открытых) генов. Если этого каскада нет, то сторона будет правой. Упрощая ситуацию, можно сказать, что по умолчанию каж-

дая сторона тела имеет свойство стать правой (по морфологическим признакам), а, чтобы сделать ее левой, необходим сигнальный каскад “левосторонности” Nodal-Ptx2.

Гипотеза о главенствующей роли Ptx2 в запуске специфического “левостороннего” морфогенеза доминирует и в настоящее время.

ВЕДУЩАЯ РОЛЬ БИЕНИЯ РЕСНИЧЕК ГЕНЗЕНОВСКОГО УЗЕЛКА В УСТАНОВЛЕНИИ ЛЕВО-ПРАВОЙ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ

Гензеновский узелок — гомолог шпемановского организатора (дорсальной губы бластопора) у амфибий. Пересадка гензеновского узелка индуцирует у млекопитающих образование дополнительной оси тела (Beddington, 1994). Структура эта привлекает пристальное внимание эмбриологов. Гензеновский узелок у млекопитающих представляет из себя впадину, покрытую ресничками (Bellomo et al., 1996; Sulik et al., 1994).

О возможной связи между ресничками и установлением лево-правой асимметрии догадывались еще начиная с 1970х. Тогда исследование пациентов с синдромом Картагенера, при котором наблюдается инвертирование внутренних органов, показало, что у таких людей жгутики сперматозоидов теряют подвижность (Afzelius, 1976; Afzelius, 1995). У пациентов также не наблюдалось активности ресничек в дыхательных путях, они страдали синуситами и другими респираторными заболеваниями. Афзелиус, изучив сперму четырех пациентов с нарушением подвижности спермы под электронным микроскопом показал, что в микротрубочках жгутиков отсутствуют динеиновые ручки. К тому времени было известно, что реснички присутствуют в некоторых клетках эмбрионов млекопитающих. Сопоставив эти факты и зная, что при данном синдроме наблюдается инвертированное положение органов, Афзелиус выдвинул гипотезу о том, что реснички могут влиять на установление лево-правой асимметрии в эмбриональном развитии.

В 1990х американскими исследователями из группы Брюкнер было открыто, что мутация в гене лево-правого динеина (left/right-dynein (Ird)) может приводить к инвертированному положению внутренних органов у мышей с мутацией *iv* (Supp et al., 1997). Наблюдались аномалии в установлении лево-правой висцеральной асимметрии и при другой мутации в этом гене — *legless* (*lgl*). Данное открытие явилось дополнительным аргументом в пользу гипотезы об участии микротрубочек в процессе установления лево-правой асимметрии, хотя сами авторы открытия говорили о такой возможности в осторожной форме, больше склоняясь к предположению о возможной роли

этого белка во внутриклеточном транспорте при установлении лево-правой асимметрии.

Клетки в вентральной части гензеновского узелка покрыты ресничками, направленными вонне от поверхности эмбриона. Эти реснички принадлежат к классу ресничек 9+0. Сначала считали, что реснички в области гензеновского узелка неподвижны, но потом группой японских исследователей было показано, что они бьются с частотой примерно 600 раз в минуту (Nonaka et al., 1998). Кроме того, с помощью метода генетического нок-аута авторы создали линию мышей *kif3B*—/— и изучили особенности биения ресничек у таких генномодифицированных мышей. Белок KIF3B входит в состав KIF3 комплекса, принимает участие во внутриклеточном транспорте и необходим для развития и нормального функционирования микротрубочек. Гетерозиготы *kif3B*—/— погибают примерно в середине срока беременности, у эмбрионов наблюдается при этом раздувание перикарда, замедление роста, незамыкание нервной трубки, а также рандомизация в установлении лево-правой асимметрии. Кроме того, паттерн экспрессии гена *Lefty-2* на стадии 8.5 dpc тоже нарушался — в норме этот ген экспрессируется в левой стороне тела, а в случае *kif3B*—/— эмбрионов его экспрессия либо отсутствовала, либо была билатеральной.

Было показано, что у эмбрионов *kif3B*—/—, в отличие от эмбрионов дикого типа, отсутствует биение ресничек. Наблюдая за траекториями движения флуоресцентных частиц, авторы открыли, что биение ресничек создает у эмбрионов дикого типа левосторонний ток жидкости, а у эмбрионов *kif3B*—/— такой ток жидкости отсутствовал. Поскольку гензеновский узелок по-английски называется *node*, такой ток жидкости получил название “*nodal flow*”. Авторы предположили тогда, что именно левосторонний ток жидкости в области гензеновского узелка и является причиной потери билатеральной симметрии.

Почему ток жидкости именно левосторонний? Первоначально авторы открытия тока (*nodal flow*) объяснили это физическими параметрами системы (реологические свойства жидкости, сила и траектория биения ресничек) и, в первую очередь, — каплевидной формой гензеновского узелка, суженного в передней части. Параметры системы таковы, считали они, что в суженной передней части гензеновского узелка ток жидкости правосторонний, а в расширенной задней части — левосторонний. Доказательством в пользу такой гипотезы авторы считали отсутствие левостороннего тока жидкости в гензеновском узелке на более поздних стадиях, когда он теряет каплевидную форму.

В начале 2000х Нонака и Ширатори (Nonaka et al., 2002) подтвердили гипотезу о ведущей роли левостороннего тока жидкости в процессе потери билатеральной симметрии с помощью прямого физического воздействия. Ученые создали уникальную камеру для культивирования мышечных эмбрионов, в которой можно искусственно менять направление и скорость циркуляции жидкости в гензеновском узелке. В исследовании использовали генно-модифицированные мыши линии *Ptx2-lacZ*, у эмбрионов таких мышей легко проследить экспрессию гена *Ptx2*, в норме экспрессирующегося в левой стороне тела и играющего важную роль в идентификации данной стороны как левой. Эмбрионов на стадиях 7.7–8.5 dpc в течение 12 часов подвергали одному из четырех режимов тока жидкости: левосторонний медленный, левосторонний быстрый, правосторонний медленный и правосторонний быстрый. Затем эмбрионов дополнительно инкубировали в течение 32 часов и оценивали их морфологию, часть из них инкубировали течение 10 часов и отслеживали экспрессию *Ptx2*.

В условиях режима быстрого левостороннего тока у эмбрионов наблюдалось нормальное установление лево-правой висцеральной асимметрии (правосторонняя сердечная петля, нормально ориентированный поворот эмбриона, экспрессия *Ptx2* в левой латеральной пластинке).

При режиме быстрого правостороннего тока, напротив, у большинства эмбрионов наблюдалось инвертированное формирование сердечной петли и инвертированный поворот, *Ptx2* экспрессировался в правой латеральной пластинке. Примечательно, что такой эффект наблюдался только при воздействии на до-сомитные стадии развития эмбрионов.

Медленный ток, как левосторонний, так и правосторонний, вызывал лишь незначительные аномалии в установлении лево-правой асимметрии эмбрионов.

Почему ток жидкости левосторонний?

К середине 2000х стало понятно, что левостороннее направление тока жидкости нельзя объяснить формой гензеновского узелка и тем, что жидкость возвращается вправо в его передней, зауженной части. Компьютерное моделирование показало (Cartwright et al., 2004), что несколько десятков вертикально ориентированных ресничек будут создавать десятки микровихреней, но не ламинарный поток.

Более корректные наблюдения Окады с соавторами (Okada et al., 2005) показали, что левосторонний ток, перпендикулярный оси тела, идет очень близко от поверхности покрывающей ген-

зеновский узелок жидкости, всего лишь в 5 микрометрах. Он достигает левой части тела, а затем жидкость возвращается назад вправо на уровне примерно 20 микрометров от поверхности, и такой правосторонний ток гораздо медленнее. В передней же, суженной части гензеновского узелка, тока жидкости не наблюдается — хотя у клеток этой части тоже есть реснички, но они не бьются.

Поняв, что дело не в каплевидной форме гензеновского узелка, авторы попытались разобраться подробнее в динамике биения ресничек. Высокоскоростная микросъемка показала, что ось биения ресничек не перпендикулярна поверхности, а почти параллельна ей и направлена назад.

Чтобы количественно оценить это явление, на основании материала записей многочисленных сверхскоростных видеосъемок авторы проанализировали особенности траектории, которую описывает кончик реснички, создав своего рода “усредненный портрет” реснички во время работы. Кончик реснички движется по кругу вокруг оси, расположенной под углом $40^\circ \pm 10^\circ$ к поверхности и направленной назад под углом $180^\circ \pm 40^\circ$, ресничка при этом описывает конус с вершинным углом примерно 40° . Полученные данные позволили выдвинуть предположение, что не форма гензеновского узелка, а наклон осей биения ресничек под углом к поверхности приводит к созданию левостороннего тока жидкости. Биение ресничек идет по часовой стрелке, и наиболее сильный удар ресничка наносит, когда она почти вертикальна и близка к поверхности жидкости, покрывающей гензеновский узелок, это так называемый “эффективный удар”, как раз он-то и порождает быстрый левосторонний ток жидкости. Во второй половине цикла биения ресничка движется близко от поверхности клеток в правостороннем направлении, это так называемый “восстановительный удар”, который слабее и который создает более медленный правосторонний ток жидкости.

ПЕРЕНОС ИНФОРМАЦИИ И АКТИВАЦИЯ КАСКАДА “ЛЕВОСТОРОННОСТИ”? ОСНОВНЫЕ ГИПОТЕЗЫ

Роль биения ресничек как ведущей силы процесса потери билатеральной симметрии у млекопитающих признается к настоящему времени большинством исследователей. Однако до сих пор нет единого понимания того, как ток жидкости в гензеновском узелке передает сигнал в ткани эмбриона и нет единого мнения о том, каков механизм запуска сигнального каскада левосторонности в левой стороне тела. На этот счет в настоящее время существует три гипотезы (рис. 3).

Гипотеза переноса морфогена исторически была первой (рис. 3а). Она высказана в 1990х груп-

пой японских исследователей, показавших, что нарушения в установлении лево-правой асимметрии у эмбрионов, мутантных по гену KIF3B мышей, связаны с аномальным строением ресничек и отсутствием левостороннего тока жидкости в области гензеновского узелка (Nonaka et al., 1998). Авторы тогда предположили, что, благодаря создаваемому биением ресничек левостороннему току жидкости, в левой части гензеновского узелка увеличивается концентрация важной сигнальной молекулы, которая и запускает сигнальный каскад “левосторонности” в левой части тела эмбриона.

Возможности создания такого градиента морфогена в результате биения ресничек были показаны в работах по математическому моделированию (Cartwright et al., 2004). Точная природа данной сигнальной молекулы пока не известна. Экспериментальные исследования по изучению распределения молекул флуоресцентного полимера показали, что циркуляция жидкости в области гензеновского узелка как у мыши, так и у кролика может создать градиентное распределение для белковой молекулы размером порядка 40 килодальтон (Okada et al., 2005).

“Гипотеза двух типов ресничек” или биомеханическая гипотеза. В начале нулевых коллективом американских ученых под руководством Брюкнера была высказана альтернативная гипотеза — биомеханическая (рис. 3б), согласно которой реснички в области гензеновского узелка работают не только как генераторы механического сигнала (порождая левосторонний ток жидкости), но и как и его рецепторы, запуская затем процесс повышения концентрации ионов кальция в клетках левой стороны тела (McGrath et al., 2003).

Авторы создали генно-модифицированную линию мышей, у которых белок лево-правый динеин сшит с зеленым флуоресцентным белком, потому у таких мышей легко проследить за положением молекулы лево-правого динеина. Ранее было известно, что часть ресничек в области гензеновского узелка способна к биению, а другая часть неподвижна. Исследователи обнаружили, что есть две группы ресничек: расположенные в средней части гензеновского узелка и содержащие в своем составе лево-правый динеин и расположенные по периферии без лево-правого диненина (таких примерно треть от общего количества).

Как подвижные, так и неподвижные реснички содержат в своем составе белок polycystin-2, который выполняет функцию катионного канала. Известно, что реснички обладают механочувствительностью и что, если на ресничку подействовать механически, то в клетке происходит всплеск концентрации внутриклеточного кальция (Praetorius, Spring, 2001). Белок polycystin-2 является катионным каналом для двувалентных катионов,

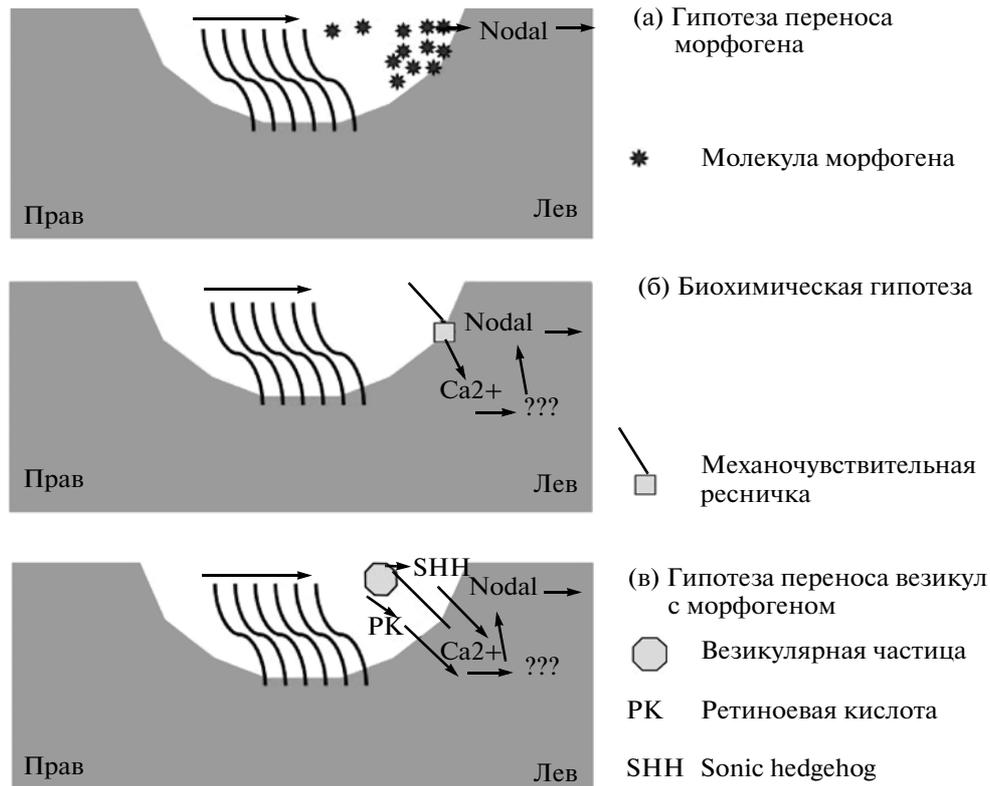


Рис. 3. Три гипотезы механизма запуска каскада “левосторонности”. (а) Гипотеза переноса морфогена. Биение ресничек в области гензенковского узелка и порождаемый ими ток жидкости концентрируют молекулы морфогена в левой части гензенковского узелка. Высокая концентрация морфогена стимулирует экспрессию гена *Nodal* в левой части эмбриона. (б) Биомеханическая гипотеза (модель “двух типов ресничек”). Биение подвижных ресничек в средней части гензенковского узелка порождает левосторонний ток жидкости, а неподвижные реснички на периферии гензенковского узелка работают как механосенсоры. В ответ на механическое воздействие происходит открытие кальциевого канала, повышение концентрации внутриклеточного кальция и запуск неизвестных пока процессов, стимулирующих экспрессию гена *Nodal* в левой части эмбриона. (в) Гипотеза переноса везикул с морфогеном (“челночная модель”). Порождаемый биением ресничек левосторонний ток жидкости переносит везикулы, которые разбиваются, натываясь на неподвижные реснички, расположенные на периферии левой стороны гензенковского узелка. При нарушении целостности везикулы из нее выделяются сигнальные молекулы РК (ретиноевая кислота) и SHH (Sonic hedgehog). Эти молекулы стимулируют повышение внутриклеточного кальция, что, в свою очередь, запускают неизвестные пока процессы, приводящие к активации экспрессии гена *Nodal* в левой части эмбриона.

активируемый ионами кальция (Hanaoka et al., 2000; Gonzalez-Perret et al., 2001; Koulen et al., 2002) и, кроме того, это механо-чувствительный канал, который в ответ на механическое воздействие запускает повышение концентрации внутриклеточного кальция (Nauli et al., 2003). У зародышей линии мыши, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2*, развивается правосторонний изомеризм, то есть обе стороны тела морфологически становятся правыми (Pennekamp et al., 2002).

Авторы (McGrath et al., 2003) показали активацию внутриклеточного кальция в тканях левой половины нормальных эмбрионов как раз на стадиях, соответствующих этапу потери билатеральной симметрии. Этот паттерн был нарушен как у эмбрионов, мутантных по гену лево-правого ди-

ненина (всплеск внутриклеточного кальция наблюдался не только с левой, но и билатерально, либо отсутствовал вовсе), так и у эмбрионов линии мышей, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2* (у них всплеск внутриклеточного кальция вообще отсутствовал).

Получается, что для нормального развития лево-правой асимметрии важна не только способность ресничек производить левосторонний ток жидкости в области гензенковского узелка, но и их механочувствительная способность. Это заставляет нас совершенно в новом свете взглянуть на популяцию неподвижных, но содержащих *polycystin-2* ресничек — они работают как сенсоры.

На основании полученных данных авторы выдвинули гипотезу или модель “двух типов ресничек”, которую можно назвать также биомехани-

ческой гипотезой. Согласно этой гипотезе, подвижные, Ird-содержащие реснички генерируют ток жидкости в области гензеневского узелка, а неподвижные polycystin-2 содержащие реснички работают как механосенсоры; в результате рецепции механического сигнала открываются механочувствительные ионные каналы в клетках левой части эмбриона, происходит повышение концентрации внутриклеточного кальция, что в свою очередь запускает важные сигнальные процессы, приводящие к активации экспрессии ряда генов и, в частности, экспрессии генов *Nodal*, *Lefty-2* и *Ptx2* и запуска сигнального “каскада левосторонности”.

Гипотеза переноса везикул с морфогеном или “челночная модель”. Высказана в середине нулевых Танакой с соавторами (Tanaka et al., 2005), эта гипотеза была в какой-то степени реабилитацией идеи о градиенте морфогена в процессе установления лево-правой асимметрии млекопитающих (рис. 3в).

Пометив мембрану клеток с помощью прижизненной флуоресцентной краски и наблюдая поверхность клеток гензеневского узелка мыши на стадии 1–3 сомитов, авторы обнаружили, что под действием левосторонного тока жидкости передвигались липидные гранулы размером 0.3–5 микрометров, которые достигали левой стороны эмбриона. Авторы назвали такие липидные гранулы “везикулярными частицами гензеневского узелка” (*nodal vesicular parcels* или *NVPs*).

Если заблокировать рецепторы FGF-сигнализации, то блокируется и показанный в работах лаборатории Мартины Брюкнер всплеск концентрации внутриклеточного кальция. Образование липидных частиц при этом сильно замедляется, но обработка зародышей белком SHH (*Sonic hedgehog*) и ретиноевой кислотой восстанавливает скорость образования таких частиц. Примечательно, что обработка этими сигнальными молекулами зародышей после блокировки FGF-сигнализации восстанавливает феномен повышения внутриклеточного кальция в клетках левой части тела эмбриона. Более того, авторы продемонстрировали, что как SHH, так и ретиноевая кислота присутствуют в самих этих частицах!

У мутантных эмбрионов мышей линии *iv* с нарушением работы ресничек такие частицы образовывались, однако их движения влево не наблюдалось. На основании полученных данных авторы выдвинули модель, которую сами называли “челночной” (*shuttle-bus model*): липидные гранулы под действием левостороннего тока жидкости доставляют сигнальные молекулы SHH и ретиноевой кислоты в левую часть гензеневского узелка, там они наталкиваются на неподвижные реснички и разбиваются о них, при этом сигнальные мо-

лекулы выделяются в большой концентрации в левой части гензеневского узелка и индуцируют затем всплеск внутриклеточного кальция и сигнальные процессы, необходимые для запуска генов, отвечающих за “левосторонний морфогенез”. Остатки липидных частиц после доставки морфогенов к нужному месту встраиваются в клеточную мембрану и могут затем вновь использоваться для формирования везикулярных гранул.

КАКАЯ ИЗ ГИПОТЕЗ НАИБОЛЕЕ ПРАВДОПОДОБНА?

Какая из трех вышеприведенных гипотез наиболее верна? Пока единого и окончательного мнения по данному вопросу нет. За ушедший год, однако, биомеханическая гипотеза получила серьезный аргумент — с помощью ряда тонких экспериментов на генно-модифицированных линиях мышей было показано, что, как и предполагали авторы “модели двух типов ресничек”, именно продукт гена *Pkd2* активирует запуск каскада левосторонности в краевых клетках гензеневского узелка, и что происходит этот запуск через кальциевую сигнализацию.

В недавнем исследовании Йошиба и его коллеги (Yoshida et al., 2012) попытались разобраться, каким образом клетки левой части гензеневского узелка ощущают ток жидкости (*nodal flow*). Они поставили ряд остроумных экспериментов на линии мышей, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2*. Сначала они внедрили векторную конструкцию с геном *Nodal* в клетки небольшого участка правой латеральной пластинки и показали, что экспрессия *Nodal* активировалась во всей латеральной пластинке. Этот результат доказывает, что клетки латеральной пластинки у линии мышей, у которых был проведен нок-аут гена *Pkd2*, обладают способностью к экспрессии *Nodal*.

С помощью методов генной инженерии исследователи создали три линии мышей, экспрессирующих *Pkd2* в определенных регионах зародыша. В трансгенной линии *Foxa2NNE-hsp-Pkd2-IRES-LacZ*, *Pkd2* экспрессируется по средней линии эмбриона включая гензеневский узелок. При скрещивании такой линии с мышами, у которых проведен нок-аут гена *Pkd2*, у потомков от скрещивания восстанавливается паттерн экспрессии *Nodal* и *Ptx2* в левой латеральной пластинке.

У второй трансгенной линии, *NDE-hsp-Pkd2-IRES-LacZ*, экспрессия *Pkd2* активировалась в краевых клетках гензеневского узелка, и при скрещивании мышей этой линии с мышами, у которых проведен нок-аут гена *Pkd2*, экспрессия *Nodal* и *Ptx2* в левой латеральной пластинке тоже восстанавливалась.

Наконец, у третьей линии генно-модифицированных мышей, dgFoxa2-hsp-Pkd2-IRES-LacZ, Pkd2 экспрессировался только в центральной части гензеневского узелка. Скрещивание таких мышей с мышами, у которых проведен нок-аут гена Pkd2, не приводило к восстановлению паттерна экспрессии Nodal и Ptx2. Это значит, что для инициирования паттерна экспрессии Nodal и Ptx2 необходимо присутствие продукта гена Pkd2 именно в краевых клетках гензеневского узелка. Авторы показали также, что в Pkd2-сигнализации в краевых клетках гензеневского узелка принимает участие продукт гена Cer12.

Затем с помощью генно-модифицированной линии, у которой ген Pkd2 был сшит с геном сигнального белка Venus protein, было показано, что меченый Pkd2 локализуется в неподвижных ресничках краевых клеток гензеневского узелка.

В качестве модели для изучения запуска каскада левосторонних генов исследователи использовали линию генно-модифицированных мышей со встроенным энхансером гена Lefty1, сшитым с геном бета-лактозидазы; у эмбрионов таких мышей об активации генов каскада левосторонности можно судить по изменению окраски субстрата после расщепления его бета-галактозидазой.

В экспериментах по действию направленного (правостороннего и левостороннего) тока жидкости энхансер Lefty1 специфически активировался в той стороне тела, которая подвергалась действию тока жидкости у нормальных эмбрионов, но не у эмбрионов мышей, нок-аутных по Pkd2. Кроме того, паттерн активности этого энхансера нарушался при обработке зародышей веществами, влияющими на кальциевую сигнализацию — ионами Gd^{3+} , 2-аминоэтоксидифенилборатом и тапсигаргином. Это доказывает как ведущую роль механочувствительности через белок-продукт гена Pkd2 (polycystin-2), так и участие кальциевой сигнализации в активации каскада левосторонности.

В заключительной серии экспериментов авторы создали генно-модифицированных мышей, у которых реснички присутствовали только в краевых клетках гензеневского узелка. Для этого они использовали знание того факта, что для формирования ресничек необходима экспрессия гена Kif3a, который кодирует белок, участвующий во внутривесничном транспорте. У гомозиготных мышей линии, у которых был проведен нок-аут гена Kif3a, реснички в области гензеневского узелка не образуются. На этом фоне авторы заставили Kif3a экспрессироваться только в клетках периферии гензеневского узелка, и у эмбрионов таких мышей именно в этих клетках восстанавливались реснички.

Приложив искусственный ток жидкости, исследователи показали, что у таких эмбрионов происходит активация каскада левосторонности в левой части эмбриона в случае левостороннего тока и в правой части эмбриона в случае правостороннего тока.

Таким образом, основные положения “модели двух типов ресничек”, высказанные группой Мартини Брюкнер: сенсорная роль ресничек в краевой области гензеневского узелка и участие в этом Pkd2 и кальциевой сигнализации, блестяще подтвердились в данном исследовании. Идеи о возможной роли механических факторов в раннем морфогенезе позвоночных выдвигались Белоусовым еще в 1970е годы (Belousov et al., 1975) и получают все большее признание в наше время (Belousov et al., 2006; Keller, 2006; Davidson, Keller, 2007).

Для потери билатеральной симметрии достаточно всего двух бьющих ресничек

Еще одним из сильных аргументов в пользу биомеханической теории было открытие лабораторией Хамада того факта, что для установления лево-правой асимметрии достаточно, чтобы билилось всего две реснички (Shinohara et al., 2012), а для того, чтобы принять сигнал достаточно лишь нескольких ресничек-реципиентов. В своем исследовании японские ученые использовали нетоксичный вязкий раствор метилцеллюлозы и показали с помощью анализа траекторий движущихся частиц, что все реснички перестают биться при концентрации метилцеллюлозы в 1%, а при ее концентрации в 0.5% лишь часть из них продолжает биться, однако, при этом сохраняется, хотя и ослабленный, ток жидкости в области гензеневского узелка.

У зародышей после такой обработки, тем не менее, сохранялся левосторонний паттерн экспрессии Ptx2 (об экспрессии этого гена судили с помощью генно-модифицированных мышей, у которых энхансер гена Ptx2 был сшит с геном бета-галактозидазы).

Это открытие заинтриговало исследователей, и они попытались оценить минимальное количество ресничек, необходимое для инициации лево-правой асимметрии. При внимательном скрининге мутантных линий они выяснили, что у некоторых эмбрионов линий *dpcd* и *rfx3* в области гензеневского узелка бьются всего несколько ресничек. Авторы изучали биение ресничек у отдельных эмбрионов поштучно, а затем оценивали у каждого индивидуально экспрессию генов Cer12 и Ptx2. Ученые показали, что для установления асимметричного паттерна экспрессии этих генов достаточно биения всего 2х ресничек.

Это хотя и не прямой, но тоже аргумент в пользу биомеханической модели, так как теоретические расчеты показывают, что для создания градиента сигнальных молекул необходим более сильный ток, чем тот, что порождают две бьющиеся реснички. Кроме того, у таких зародышей было сильно снижено и число неподвижных ресничек, расположенных в краевой области гензеновского узелка. Это значит, что установление лево-правой асимметрии необходимо всего несколько ресничек как для создания тока жидкости, так и для приема сигнала.

Насколько консервативен такой механизм?

Хотя еще в 2002 году выдвигались предположения о том, что биение ресничек и ток жидкости может быть ведущим механизмом порождения лево-правой асимметрии других групп позвоночных животных (Essner et al., 2002), до середины 2000х большинство исследователей лево-правой асимметрии позвоночных считало, что механизм инициации лево-правой асимметрии через биение ресничек и создание левостороннего тока жидкости уникален для млекопитающих.

Однако уже в 2005 году появляется работа Эсснера и его американских коллег (Essner et al., 2005), в которой было показано, что в купферовом пузырьке рыбы-зебры (*Danio rerio*), так же как в гензеновском узелке млекопитающих, происходит биение ресничек, и что реснички эти необходимы для нормального установления лево-правой асимметрии.

Во-первых, американские исследователи продемонстрировали, что ген лево-правого динеина *Lfd* экспрессируется в клетках купферовского пузырька, имеющих реснички. Кроме того, сняв движение микрочастиц в области купферовского пузырька и проанализировав их траектории, исследователи показали, что биение ресничек создает левосторонний поток жидкости, подобно тому как это организовано и у млекопитающих. Данные результаты заставили Эсснера предположить, что функция ресничек у рыб похожа на ту, что они играют у млекопитающих, и что они играют ведущую роль в инициации лево-правой асимметрии.

Используя тонкий луч лазера, исследователи научились аккуратно срезать реснички с клеток, из которых формируют купферовский пузырек непосредственно перед началом формирования этой структуры. Более чем у 80% эмбрионов после такой процедуры наблюдались дефекты в формировании лево-правой асимметрии. Обработка развивающихся эмбрионов с помощью блокирующих синтез лево-правого диненина морфолина приводит как к ослаблению и даже исчезновению потока жидкости, так и к аномали-

ям в установлении лево-правой асимметрии и, в частности, к аномалиям сердечного поворота и в экспрессии генов *lft2* и *lft1*. Эти результаты убедительно доказали, что не только у млекопитающих, но и у представителей другого класса позвоночных — рыб, биение ресничек необходимо для установления лево-правой асимметрии.

Роль биения ресничек в раннем развитии амфибий была открыта еще через несколько лет. Этот феномен не так просто наблюдать у амфибий, так как бьются реснички клеток крыши гастроцеля, то есть и биение ресничек и порождаемый ими ток спрятаны внутри эмбриона. Крышу гастроцеля амфибий образуют свернувшиеся клетки шпемановского организатора амфибий — гомолога гензеновского узелка млекопитающих.

Наблюдая над дорсальными эксплантатами крыши гастроцеля зародышей ксенопуса (*Xenopus laevis*), Блум и его немецкие коллеги с помощью прижизненной микровидеосъемки показали, что реснички бьются в этой области и порождают левосторонний ток жидкости (Schweickert et al., 2007; Blum et al., 2009). Реснички начинают появляться в клетках этого региона зародыша на стадии 14, достигают своего максимума в 250–270 ресничек на стадии 16, а на стадии 20 исчезают. Большая часть ресничек, как и у эмбрионов мыши, ориентирована назад. В этих клетках присутствует лево-правый диненин и ионный канал *polycystin-2*, играющие важную роль в установлении лево-правой асимметрии у млекопитающих.

С помощью анализа траекторий микрочастиц была получена информация о направлении тока жидкости. На стадии 14 наблюдалось только броуновское движение. Ощутимый левосторонний ток появляется на стадиях 15–16, на стадиях 17–18 он достигает максимума, а к стадии 20 сильно слабеет и затем исчезает.

Примечательно, что и у мыши и у ксенопуса почти совпадают как длина ресничек (5 микрометров), так и их количество (200–300 у мыши (Shiratori, Hamada, 2006; Nonaka et al., 1998) и 240–270 у *Xenopus* (Schweickert et al., 2007)).

Вкалывание раствора метилцеллюлозы высокой вязкости на стадиях 14–18 приводило к высокой степени аномалий установления лево-правой асимметрии у зародышей и нарушениям в паттернах экспрессии генов *Nodal* и *Ptx2*. Вкалывание раствора метилцеллюлозы на стадиях 19–20 также приводило к аномалиям в установлении лево-правой асимметрии, но лишь в небольшой степени. Результаты свидетельствуют о том, что порождаемый биением ресничек левосторонний ток жидкости в крыше гастроцеля необходим для запуска левостороннего каскада *Nodal-Ptx2* в левой боковой пластинке и для корректного установления лево-правой асимметрии у амфибий.

Открытие биения ресничек и левостороннего тока не только у млекопитающих, но и у рыб и амфибий позволяет выдвинуть гипотезу о том, что такой механизм слома симметрии возник у позвоночных давно и довольно широко распространен (Blum et al., 2009).

ОТКРЫТЫЕ ВОПРОСЫ МОДЕЛИ

Наиболее адекватной моделью установления лево-правой асимметрии у млекопитающих, на наш взгляд, представляется 4х этапная схема лево-правого асимметричного морфогенеза, предложенная Хамада с соавторами (Hamada et al., 2002).

Авторы данной модели выделяют четыре стадии:

Стадия 1. Потеря билатеральной симметрии и порождение лево-правой асимметрии. Биение ресничек в области гензеновского узелка, ток жидкости (nodal flow).

Стадия 2. Перенос сигнала. В ходе этой стадии сигнал передается из области гензеновского узелка в мезодерму левой боковой пластинки.

Стадия 3. Каскад с участием генов Nodal и Lefty2 в левой боковой пластинке. Активация экспрессии Ptx2.

Стадия 4. Асимметричный морфогенез. Формирование сердца и поворот сердечной трубки, формирование разных долей сердца, асимметричная регрессия симметричных структур, формирование асимметричных легких и пищеварительной системы.

Идея о ведущей роли биения ресничек в слома симметрии и установлении лево-правой асимметрии у млекопитающих в настоящее время наиболее популярна. За прошедшие с открытия в 1998 году тока жидкости в области гензеновского узелка (nodal flow) сделан большой прогресс в изучении механизма потери симметрии и установлении лево-правой асимметрии, однако до сих пор остаются огромные пробелы в нашем понимании этого феномена. Как уже упоминалось, недавно в работах лаборатории Хамады было убедительно показано, что механический сигнал передается с помощью кальциевого канала polycystin-2 и что при этом повышается внутриклеточный кальций, однако до сих пор неясно, как именно кальциевый каскад запускает экспрессию гена Nodal (Yoshida et al., 2012).

Непонятно, что именно происходит на последнем, заключительном этапе и каким образом экспрессия Ptx2 направляет левосторонний морфогенез.

Не так все однозначно и с исключительностью роли Nodal в запуске экспрессии Ptx2. В работах лаборатории Бхаттачарья с линией мышей, мутантных по гену Cited2 (Vamforth et al., 2004), было показано, что у эмбрионов таких мышей тоже развиваются серьезные аномалии в установлении

лево-правой асимметрии, теряется экспрессия Ptx2 и Nodal в левой латеральной пластинке. Результаты позволяют предположить, что продукт этого гена либо запускает сигнальный каскад Nodal-Ptx2, либо в значительной степени перекрывается с этим каскадом. Кроме того, Ptx2 не влияет на левостороннее позиционирование сердца (Liu et al., 2001), что говорит о том, что этот процесс должен контролироваться другим сигнальным каскадом, запускаемым Nodal.

Высказываются аргументы и в пользу существования независимого от Nodal каскада контроля над установлением левостороннего морфогенеза. В работе группы Норриса было показано, что ген Ablim1 экспрессируется в мезодерме левой, но не правой латеральной пластинки, причем как в присутствии, так и в отсутствие экспрессии гена Nodal (Stevens et al., 2010).

Косвенным доказательством того, что могут существовать и другие сигнальные пути, ответственные за установление лево-правой асимметрии у млекопитающих, является открытие в ходе рецессивного скрининга группы мутантных линий мышей *gasp* (6 мутантных линий *gpg 1–6*), у эмбрионов которых нарушено не только установление лево-правой висцеральной асимметрии, но также развитие мозга (экзенцефалия) и конечностей (полидактилия) (Ermaikov et al., 2009). Такой результат позволяет предположить существование сигнального каскада, влияющего не только на формирование лево-правой асимметрии, но и на организацию мозга и конечностей.

Установление лево-правой асимметрии млекопитающих – сложно организованный биологический морфогенез, в котором тончайшим образом сочетаются биохимические и морфогенетические процессы. Этот процесс до сих пор плохо понятен. Для более полного понимания механизмов установления лево-правой асимметрии у млекопитающих необходимо объединение усилий не только эмбриологов и генетиков, но и биофизиков, математиков, механиков, реологов, структурных биохимиков, кристаллографов и специалистов по компьютерному моделированию. Изучение этого морфогенеза – замечательный пример того, насколько тесно генетика и молекулярная биология могут смыкаться с механикой молекулярных машин, непосредственно участвующих в построении морфологических структур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adachi H., Saijoh Y., Mochida K., et al. Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 12. P. 1589–600.

- Afzelius B.A.* A human syndrome caused by immotile cilia // *Science*. 1976. V. 193. № 4250. P. 317–319.
- Afzelius B.A.* Situs inversus and ciliary abnormalities: what is the connection? // *Int. J. Dev. Biol.* 1995. V. 39. № 5. P. 839–844.
- Bamforth S.D., Braganca J., Farthing C.R. et al.* Cited2 controls left-right patterning and heart development through a Nodal-Pitx2c pathway // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 11. P. 1189–1196.
- Beddington R.* Induction of a second neural axis by the mouse node // *Development*. 1994. V. 120. № 3. P. 613–620.
- Bellomo D., Lander A., Harragan I. et al.* Cell proliferation in mammalian gastrulation: the ventral node and notochord are relatively quiescent // *Dev. Dyn.* 1996. V. 205. № 4. P. 471–485.
- Belousov L.V., Dorfman J.G., Cherdantzev V.G.* Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1975. V. 34. № 3. P. 559–574.
- Belousov L.V., Luchinskaya N.N., Ermakov A.S., et al.* Gastrulation in amphibian embryos, regarded as a succession of biomechanical feedback events // *Int. J. Dev. Biol.* 2006. V. 50. № 2–3. P. 113–122.
- Blum M., Beyer T., Weber T., et al.* *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left-right asymmetry // *Dev. Dyn.* 2009. V. 238. № 6. P. 1215–1225.
- Brown N., Lewis Wolpert L.* The development of handedness in left/right asymmetry // *Development*. 1990. V. 109. № 1. P. 1–9.
- Burdine R., Schier A.* Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation // *Genes Dev.* 2000. V. 14. № 7. P. 763–776.
- Burn J.* Disturbance of morphological laterality in humans // *CIBA Found Symp.* 1991. V. 162. P. 282–296.
- Cartwright J.H., Piro O., Tuval I.* Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 19. P. 7234–7239.
- Casey B., Hackett B.P.* Left-right axis malformations in man and mouse // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. V. 10. № 3. P. 257–261.
- Collignon J., Varlet I., Robertson E.J.* Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning // *Nature*. 1996. V. 381. № 6578. P. 155–158.
- Davidson L., Keller R.* Measuring mechanical properties of embryos and embryonic tissues // *Methods. Cell Biol.* 2007. V. 83. P. 425–439.
- Ermakov A., Stevens J.L., Whitehill E. et al.* Mouse mutagenesis identifies novel roles for left-right patterning genes in pulmonary, craniofacial, ocular, and limb development // *Developmental Dynamics*. 2009. V. 238. № 3. P. 581–594.
- Essner J.J., Vogan K.J., Wagner M.K. et al.* Conserved function for embryonic nodal cilia // *Nature*. 2002. V. 418. № 6893. P. 37–38.
- Essner J.J., Amack J.D., Nyholm M.K. et al.* Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut // *Development*. 2005. V. 132. № 6. P. 1247–1260.
- González-Perrett S., Kim K., Ibarra C. et al.* Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 3. P. 1182–1187.
- Hamada H., Meno C., Watanabe D. et al.* Establishment of vertebrate left-right asymmetry // *Nature Reviews Genetics*. 2002. V. 3. № 2. P. 103–113.
- Hanaoka K., Qian F., Boletta A., Bhunia A.K. et al.* Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents // *Nature*. 2000. V. 408. № 6815. P. 990–994.
- Kauffman S.A., Shymko R. and Trabert K.* Control of sequential compartment formation in *Drosophila* // *Science*. 1978. V. 199. № 4326. P. 259–270.
- Kaufman M., Bard B.* *The Anatomical Basis of Mouse Development*. San Diego: Academic Press., 1999. 291 p.
- Keller R.* Mechanisms of elongation in embryogenesis // *Development*. 2006. V. 133. № 12. P. 2291–2302.
- Koulen P., Cai Y., Geng L. et al.* Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel // *Nat. Cell Biol.* 2002. V. 4. № 3. P. 191–197.
- Levin M.* Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review // *Mechanisms of Development*. 2005. V. 122. № 1. P. 3–25.
- Levin M.* The Embryonic Origins of Left-Right Asymmetry // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2004. V. 15. № 4. P. 197–206.
- Logan M., Pagan-Westphal S.M., Smith D.M. et al.* The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals // *Cell*. 1998. Vol. 94. № 3. P. 307–317.
- Liu C., Liu W., Lu M.F., Brown N.A., Martin J.F.* Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity // *Development*. 2001. V. 128. № 11. P. 2039–2048.
- Lowe L.A., Supp D.M., Sampath K. et al.* Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus // *Nature*. 1996. V. 381. № 6578. P. 158–161.
- Marjoram L., Wright C.* Rapid differential transport of Nodal and Lefty on sulfated proteoglycan-rich extracellular matrix regulates left-right asymmetry in *Xenopus* // *Development*. 2011. V. 138. № 3. P. 475–485.
- McGrath J., Somlo S., Makova S. et al.* Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse // *Cell*. V. 114. № 1. P. 61–73.
- Meno C., Saijoh Y., Fujii H. et al.* Left-right asymmetric expression of the TGFβ-family member lefty in mouse embryos // *Nature*. 1996. V. 381. № 6578. P. 151–155.
- Meno C., Ito Y., Saijoh Y. et al.* Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal link-

- age and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos // *Genes Cells*. 1997. V. 2. № 8. P. 513–524.
- Meno C., Shimono A., Saijoh Y. et al. Lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal // *Cell*. 1998. V. 94. № 3. P. 287–297.
- Meno C., Takeuchi J., Sakuma R. et al. Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2 // *Dev. Cell*. 2001. V. 1. № 1. P. 127–138.
- Mercola M., Levin M. Left-right asymmetry determination in vertebrates // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001. V. 17. P. 779–805.
- Mercola M. Left-right asymmetry: Nodal points // *Journal of Cell Science*. 2003. V. 116. № 16. P. 3251–3257.
- Morgan M.J. Embryology and inheritance of asymmetry. In *Lateralization in the Nervous System* (ed. S.R. Hardnad, et al.). New York: Academic Press. 1977. P. 173–194.
- Morgan M.J., Corbalius M.C. On the biological basis of human laterality II. The mechanism of inheritance // *Behav. Brain Sci.* 1978. V. 1. № 2. P. 270–277.
- Muller P., Rogers K.W., Jordan B.M. et al. Differential diffusivity of Nodal and Lefty underlies a reaction-diffusion patterning system // *Science*. 2012. V. 336. № 6082. P. 721–724.
- Nauli S.M., Alenghat F.J., Luo Y. et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. № 2. P. 129–137.
- Neville A.C. *Animal Asymmetry*, The Institute of Biology's Studies in Biology. No. 67. London: Arnold, 1976. 60 p.
- Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y. et al. Randomization of left–right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein // *Cell*. 1998. V. 95. № 6. P. 829–837.
- Nonaka S., Shiratori H., Saijoh Y. et al. Determination of left–right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow // *Nature*. 2002. V. 418. № 6893. P. 96–99.
- Norris D.P. Cilia, calcium and the basis of left-right asymmetry // *BMC Biology*. 2012. V. 10. № 102. P. 1–8.
- Norris, D.P., Robertson E.J. Asymmetric and nodespecific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements // *Genes Dev*. 1999. V. 13. № 12. P. 1575–1588.
- Okada Y., Takeda S., Tanaka Y. et al. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination // *Cell*. 2005. V. 121. № 4. P. 633–644.
- Pasteur L. *Researches on molecular asymmetry*. Alembic Club Reprint. Vol. 14. Edinburgh, Livingstone, 1948. 46 p.
- Pennekamp P., Karcher C., Fischer A. et al. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice // *Curr. Biol*. 2002. V. 12. № 11. P. 938–943.
- Piedra M.E., Icardo J.M., Albajar M. et al. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry // *Cell*. 1998. V. 94. № 3. P. 319–324.
- Praetorius H.A., Spring K.R. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium // *J. Membr. Biol.* 2001. V. 184. № 1. P. 71–79.
- Raya A., Izpisua Belmonte J.C. Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration // *Nat. Rev. Genet.* 2006. V. 7. № 4. P. 283–293.
- Ryan A.K., Blumberg B., Rodriguez-Esteban C. et al. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates // *Nature*. 1998. V. 394. № 6693. P. 545–551.
- Saijoh Y., Adachi H., Mochida K. et al. Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left–right asymmetric expression of lefty-1 and lefty-2 // *Genes Dev*. 1999. V. 13. № 3. P. 259–269.
- Saijoh Y., Adachi H., Sakuma R. et al. Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2 // *Mol. Cell*. 2000. V. 5. № 1. P. 35–47.
- Sakuma R., Ohnishi Y., Meno C. et al. Inhibition of by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion // *Genes Cells*. 2002. V. 7. № 4. P. 401–412.
- Shinohara K., Kawasumi A., Takamatsu A. et al. Two rotating cilia in the node cavity are sufficient to break left-right symmetry in the mouse embryo // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. № 622. P. 1–8.
- Shiratori H., Hamada H. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology // *Development*. 2006. V. 133. № 11. P. 2095–2104.
- Sulik K., Dehart D.B., Inagaki T. et al. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate // *Dev. Dyn.* 1994. V. 201. № 3. P. 260–278.
- Supp D.M., Witte D.P., Potter S.S. et al. Mutation of an axonemal dynein affects left–right asymmetry in inversus viscerum mice // *Nature*. 1997. V. 389. № 6654. P. 963–966.
- Schweickert A., Weber T., Beyer T. et al. Cilia driven leftward flow determines laterality in *Xenopus* // *Curr. Biol*. 2007. V. 17. № 1. P. 60–66.
- Stevens J., Ermakov A., Braganca J. et al. Analysis of the asymmetrically expressed Ablim1 locus reveals existence of a lateral plate Nodal-independent left sided signal and an early, left-right independent role for nodal flow // *BMC Dev. Biol.* 2010. V. 10. № 54. P. 1–12.
- Tanaka Y., Okada Y., Hirokawa N. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination // *Nature*. 2005. V. 435. № 7039. P. 172–177.
- Yoshida S., Shiratori H., Kuo I.Y. et al. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2 // *Science*. 2012. V. 338. № 6104. P. 226–231.
- Yoshioka H., Meno C., Koshiba K. et al. Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry // *Cell*. 1998. V. 94. № 3. P. 299–305.

Establishment of Visceral Left–Right Asymmetry in Mammals: The Role of Ciliary Action and Leftward Fluid Flow in the Region of Hensen’s Node

A. S. Ermakov

Université Montpellier 1, 5 bd Henri IV, CS 19044 34967 Montpellier Cedex 2 France

e-mail: ermakov99@mail.ru

Received March 19, 2013; in final form, April 17, 2013

Abstract—During individual development of vertebrates, the anteroposterior, dorsoventral, and left–right axes of the body are established. Although the vertebrates are bilaterally symmetric outside, their internal structure is asymmetric. Of special interest is the insight into establishment of visceral left–right asymmetry in mammals, since it has not only basic but also an applied medical significance. As early as 1976, it was hypothesized that the ciliary action could be associated with the establishment of left–right asymmetry in mammals. Currently, the majority of researchers agree that the ciliary action in the region of Hensen’s node and the resulting leftward laminar fluid flow play a key role in the loss of bilateral symmetry and triggering of expression of the genes constituting the Nodal–Ptx2 signaling cascade, specific of the left side of the embryo. The particular mechanism underlying this phenomenon is still insufficiently clear. There are three competing standpoints on how leftward fluid flow induces expression of several genes in the left side of the embryo. The morphogen gradient hypothesis postulates that the leftward flow creates a high concentration of a signaling biomolecule in the left side of Hensen’s node, which, in turn, stimulates triggering of gene expression of the Nodal–Ptx2 cascade. The biomechanical hypothesis (or two-cilia model) states that the immotile cilia located in the periphery of Hensen’s node act as mechanosensors, activate mechanosensory ion channels, and trigger calcium signaling in the left side of the embryo. Finally, the “shuttle-bus model” holds that leftward fluid flow carries the lipid vesicles, which are crashed when colliding immotile cilia in the periphery of Hensen’s node to release the contained signaling biomolecules. It is also noteworthy that the association between the ciliary action and establishment of asymmetry has been recently discovered in representatives of the lower invertebrates. In this paper, the author considers evolution of concepts on the mechanisms underlying establishment of visceral left–right asymmetry since 1976 until the present and critically reexamines the current concepts in this field of science. According to the author, serious arguments favoring the biomechanical hypothesis for determination of left–right asymmetry in mammals have been obtained.

Keywords: left–right asymmetry, morphogenesis, mouse, cilia, mammalian embryology, biomechanics, Nodal, Ptx2, Lefty-1, Lefty-2