

УДК 577.218:57.017.35

НОХ-ГЕНЫ И РЕГЕНЕРАЦИЯ У ЖИВОТНЫХ

© 2016 г. Е. Л. Новикова*, Н. И. Бакаленко, А. Ю. Нестеренко, М. А. Кулакова

*Санкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д. 7–9***E-mail: elena.novikova.03.06@gmail.com*

Поступила в редакцию 10.10.2015 г.

Окончательный вариант получен 20.12.2015 г.

Понятие регенерации тесно связано с представлениями о позиционной информации, то есть распределении в теле зародыша или взрослого организма разного рода сигналов, которые указывают клеткам их местоположение. Прекрасными кандидатами на роль факторов, создающих позиционную информацию, могут быть Нох-гены. Считается, что основная их функция состоит в эмбриональной регионализации и спецификации передне-задней оси тела билатеральных животных в соответствии с правилами временной и пространственной коллинеарности. В то же время, показана постэмбриональная экспрессия Нох-генов и установлено их участие во многих процессах, идущих в дефинитивном теле некоторых животных, в том числе и в процессах регенерации у представителей разных эволюционных ветвей. В восстановительных процессах Нох-гены заняты не только разметкой новообразующихся структур, что является отражением их эмбриональной функции. Картины распределения транскриптов Нох-генов у некоторых взрослых животных и динамика их экспрессии при повреждении указывает на роль Нох-генов в создании позиционной информации во взрослом организме. Эта информация способствует корректному прохождению регенерации, а возможность ее быстрой реорганизации, вероятно, положительно влияет на скорость восстановительного процесса.

Ключевые слова: Нох-гены, регенерация, регенерационные потенциалы, полихеты, позиционная информация, дефинитивная экспрессия Нох-генов.

DOI: 10.7868/S0475145016040078

ВВЕДЕНИЕ

Способность животных к регенерации, то есть к восстановлению утраченных или поврежденных частей тела, — одно из важнейших свойств живых организмов. Регенерация — процесс сложный, многогранный и происходящий на самых разных уровнях организации животных. Начиная с момента, когда Рене Антуаном Реомюром на примере конечности омара были выполнены первые научные наблюдения за процессом регенерации, исследователи стали активно интересоваться восстановлением конечностей насекомых (сверчок, таракан), хвостов и конечностей рыб и земноводных, частей тела кольчатых червей и планарий. У большинства животных регенерация происходит за счет размножения клеток в области ранения (Иванов, 1937). Такой способ репаративной регенерации называется эпиморфозом. Эпиморфная регенерация имеет ряд этапов, общих у всех видов животных. На первом этапе происходит заживление раны при участии клеток раневого эпителия. Далее под раневым эпителием скапливаются недифференцированные, активно пролиферирующие клетки, формирующие регенерационную бластему, которая дает начало новым структурам (Carlson, 2007).

Механизмы регенерационных процессов интересовали исследователей, начиная с момента открытия этого явления. Именно репаративная регенерация органов и тканей оказалась доступна для остроумных экспериментов, которые в домолекулярную эпоху исследований привели к построению моделей, объясняющих события, происходящие в ходе восстановления частей тела разных животных. Например, такие модели были созданы для регенерации конечности таракана (интаркаляционная модель) (French, 1976), имгинальных дисков плодовой мушки (модель полярных координат) (Iten, Bryant, 1975), конечностей амфибий (модель границы) (Steiner, 1976, цит. по Campbell, Tomlinson, 1995) или концов тела планарии (градиентная модель) (Slack, 1987). В основу моделей регенерации легли представления о позиционной информации, то есть о распределении в пространстве тела разного рода сигналов, сообщающих каждой клетке ее местоположение в зародыше или у взрослого животного.

Важность определения позиций клеток в регенерате наглядно демонстрируют эксперименты с активной производной витамина А — ретиноевой кислотой (РК), одним из первых морфогенов, обнаруженных у позвоночных (Niederreither, Dolle,

2008). Впервые влияние витамина А на регенерацию конечности было показано на примере головастиков разных видов лягушек, обитающих в Индии: при воздействии ретиноевой кислотой формировалась аномально длинная конечность (Niazi, Saxena, 1978). Несколько лет спустя эти эксперименты были подтверждены Маденом на примере аксолотля *Ambystoma mexicanum* (Maden, 1982). При воздействии пальмитатом ретинола на переднюю конечность, разрезанную в середине зигоподия, происходила проксимализация регенерирующих структур, причем при увеличении концентрации и времени воздействия уровень, на котором начиналась регенерация передней конечности, становился все более проксимальным. В итоге от места разреза отрастала целая конечность. Позднее другая группа индийских исследователей проводила эксперименты с головастиком надутого узкорота (*Uperodon systoma*). При обработке головастика витамином А в течение первых двух дней после ампутации хвоста на его месте развивалась задняя конечность (Mohanty-Hejmadi et al., 1992). Таким образом, эксперименты на регенерирующих амфибиях выявили химическое вещество, которое опосредует передачу позиционной информации, причем в дозо-зависимой манере. Для понимания молекулярной природы этой информации необходимо было найти адресата химических сигналов.

Нох-ГЕНЫ – РЕГУЛЯТОРНЫЙ ФУНДАМЕНТ ЭМБРИОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ

Замены одной части тела на другую при восстановительных процессах, наблюдаемые в вышеописанных экспериментах, являются примерами гомеозисной регенерации у позвоночных. Механизм гомеозисной регенерации, так же как и проксимализации регенерирующей конечности, не был понятен, однако эти явления прекрасно объяснялись гипотезой позиционной информации и сдвигом позиционных значений относительно передне-задней оси тела и оси конечности. Возникло предположение, что возможность точной регенерации утраченных частей зависит от позиционной памяти клеток, лежащих на уровне разреза, и что континуум позиционных значений существует во взрослых конечностях хвостатых амфибий (Maden, 1993). Только с открытием гомеозисных мутаций у *Drosophila* и описанием Нох-генов стало ясно, что причина гомеозисных трансформаций и гомеозисной регенерации лежит в изменении Нох-кода (Okada, 1996).

Нох-ГЕНЫ В РЕГЕНЕРАЦИИ Protostomia

Несмотря на то, что Нох-гены очевидно должны быть вовлечены в репаративные процессы у разных животных, исследований, направленных

на изучение участия этих кластерных консервативных регуляторов в регенерации билатеральных животных не так уж много. В настоящий момент среди первичноротых экспрессия Нох-генов описана при регенерации планарии *Dugesia japonica* (Nogi, Watanabe, 2001), земляного червя *Perionyx excavatus* (Cho et al., 2009) и полихет *Platynereis dumerilii* и *Alitta virens* (Pfeifer et al., 2012; Novikova et al., 2013).

Наиболее полно экспрессия Нох-генов исследована при регенерации родственных бродячих полихет *P. dumerilii* и *A. virens* (Pfeifer et al., 2012; Novikova et al., 2013), которые умеют быстро восстанавливать заднюю часть тела. Интересно, что у *A. virens* “ответ” Нох-генов на повреждение начинается задолго до морфологического проявления самого восстановительного процесса (Novikova et al., 2013). Для обеих полихет было показано распределение транскриптов Нох-генов в теле ювенильного червя в виде разнонаправленных градиентов, главным образом, в нервной системе и покровной эктодерме (Kulakova et al., 2007; Bakalenko et al., 2013). Эти градиенты начинают менять свою форму в соответствии с новыми пропорциями и размерами тела всего через несколько часов после разрезания червя на две части. Например, гены, которые в интактном теле максимально экспрессировались в задней части червя – пигидии, зоне роста и молодых сегментах, активируются *de novo*, в области разреза, то есть в той части, которая в укороченном животном становится задней (рис. 1). Некоторые же гены меняют свои паттерны экспрессии только с появлением новых структур – включаются в формирующейся бластеме, пигидии и зоне роста (Novikova et al., 2013). Для *P. dumerilii* было показано только позднее включение Нох-генов в ходе регенерации полихеты, главным образом, в формирующейся нервной системе (Pfeifer et al., 2012). Однако такое расхождение в результатах между двумя родственными видами связано, скорее всего, с тем, что исследования на *P. dumerilii* проводились, начиная с 24 часов после операции. В этот момент уже формируется бластема, происходит закладка терминальных структур и начинается дифференцировка тканей и органогенез. Кроме того, в работе использовались не целые черви, а отрезанные регенерирующие структуры, включая один старый сегмент. Также, авторы вообще не обнаруживают транскрипцию Нох-генов в старых сегментах тела, что, вероятно, связано с особенностями постановки гибридизации *in situ*.

У планарии *D. japonica* Нох-гены во взрослом теле и при регенерации работают сходным с полихетами образом. Была показана экспрессия всего трех генов планарии – двух генов центральной группы (*Plox4-Dj* и *Plox5-Dj*) (Orii et al., 1999) и заднего гена *DjAbd-Ba* (Nogi, Watanabe, 2001). В нормальном развитии они работают в задней части животного, в мезенхимных клетках, и демон-

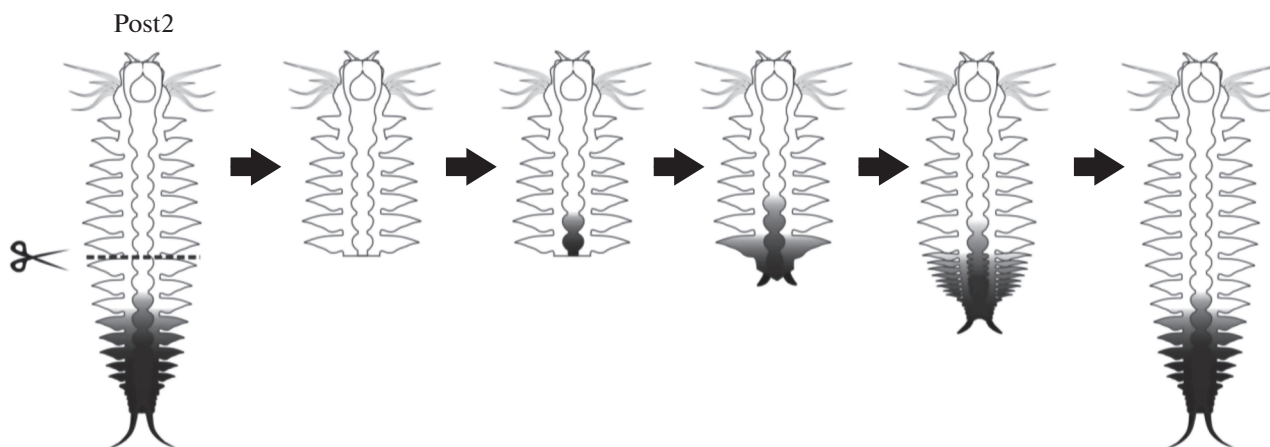


Рис. 1. Экспрессия гена *Nvi-Post2* в ходе восстановления задней части тела *A. virens* после ее ампутации. Ген активируется *de novo* у места разреза, постепенно восстанавливая градиентную экспрессию в задней части червя. Через две недели размеры и пропорции тела и градиент *Nvi-Post2* полностью соответствуют таковым у интактного животного (по Novikova et al., 2013).

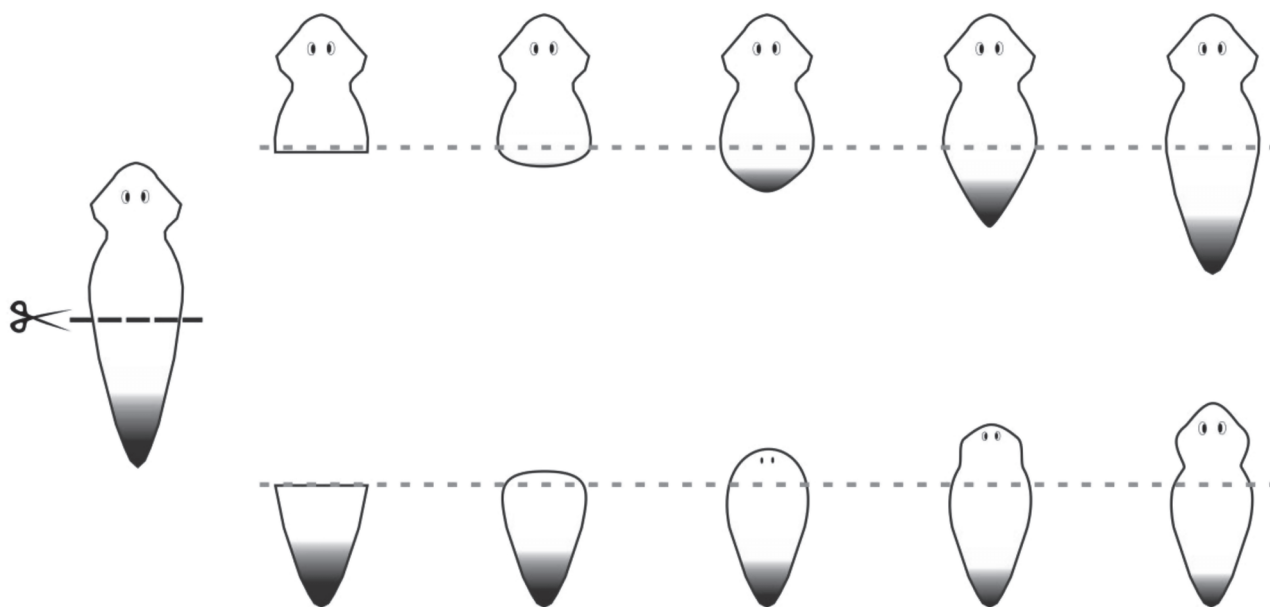


Рис. 2. Восстановление градиентной экспрессии Нох-гена *DjAbd-Ba* при регенерации заднего (верхний ряд) и переднего (нижний ряд) концов тела планарии *Dugesia japonica* (по Nogi, Watanabe, 2001).

стрируют задне-передний градиент экспрессии. При регенерации заднего конца тела планарии примерно через сутки вновь возникает домен экспрессии *DjAbd-Ba* перед зоной разреза, интенсивность которого значительно возрастает к третьему дню регенерации. В задней части регенерирующей планарии постепенно восстанавливается задне-передний градиент экспрессии, как и в интактном животном, но с учетом новых пропорций тела (рис. 2, верхний ряд). При регенерации переднего конца тела градиент экспрессии *DjAbd-Ba* сохраняется в задней части животного, но его пе-

редняя граница смещается назад (рис. 2, нижний ряд) (Nogi, Watanabe, 2001). Аналогичная ситуация при регенерации *D. japonica* была продемонстрирована для генов *Plox4-Dj* и *Plox5-Dj* (Orii et al., 1999).

Еще одной прекрасной моделью для изучения восстановительных процессов является земляной червь *Perionyx excavatus* (Oligochaetae). В отличие от планарии, олигохеты состоят из большего числа клеточных типов, организованных в настоящие ткани и системы органов. Тем не менее, этот червь способен быстро регенерировать как перед-

ною, так и заднюю части тела всего за 22 дня (Cho et al., 2009). В ходе регенерации этого животного методом полуколичественной RT-PCR изучена экспрессия трех генов *labial* (*Pexlab-01*, *Pexlab-02* и *Pexlab-03*). Все три ортолога *labial* экспрессируются при регенерации головы и не выявляются при регенерации хвостовой части. Экспрессия генов *Pexlab-01* и *Pexlab-02* не определяется в черве сразу после операции, но возникает *de novo* в новообразующихся тканях и через несколько часов затухает. Напротив, экспрессия гена *Pexlab-03* наблюдается сразу после операции, когда органогенез еще не начался, и через 1 час достигает максимального значения. Затем интенсивность его экспрессии постепенно снижается до уровня, показанного для интактного червя (Cho et al., 2009).

Для описанных выше видов животных не существует функциональных тестов, напрямую доказывающих влияние Нох-генов на регенерацию. Тем не менее, картина и динамика экспрессии Нох-генов позволяют сделать некоторые обобщения. Так, сохранение их экспрессии в постларвальный возраст у нерейдных полихет и у взрослых планарий, а также быстрая перестройка этой экспрессии в ответ на изменение размеров животных указывает на роль Нох-генов в создании и поддержании позиционной информации. Использование Нох-генов в качестве маркеров позиционных значений может быть адаптивным. Известно, что в природе, как и в условиях лабораторной культуры, нерейдные полихеты часто теряют туловищные сегменты. За счет Нох-кода каждый сегмент ювенильного червя “знает” свое местоположение относительно передне-задней оси тела, а быстрое изменение этого Нох-кода может быстро запустить восстановительные процессы. Кластер Нох-генов — удобный инструмент для координации ростовых и регенерационных процессов. Это внутренняя “линейка”, сверяясь с которой, червь быстро восстанавливает сначала “виртуальную”, а затем и реальную осевую целостность. Вероятно, животные, способные смещать позиционные координаты тела во взрослом возрасте, должны обладать выдающимися регенерационными способностями. Планария, свободноживущий плоский червь — хороший тому пример.

Планария при регенерации использует тотипотентные клетки необласты, которые распределены по всему телу и при нанесении повреждения, по-видимому, получают сигнал о необходимости активной пролиферации. Из их потомков, мигрирующих к месту повреждения, формируется бластема. Однако было показано, что бластема не восстанавливает все недостающие части тела (Agata et al., 2003). Например, при регенерации передней части из бластемы образуются только головные структуры. Недостающие же предглоточная и глоточная области возникают внутри

“хвоста”, из потомков необластов, путем интеркалярной регенерации. Подобный процесс требует реорганизации пропорций тела животного. Удивительно, но инструктивная функция Нох-генов может реализовываться через дефинитивные, специализированные клетки, поскольку экспрессия этих генов наблюдается как в делящихся, так и в уже дифференцированных клетках. Дифференцированные клетки, вероятно, могут передавать необластам сигнал об их позиции внутри тела путем создания градиентов сигнальных молекул (Agata et al., 2003). Также и у земляного червя *Perionyx excavatus* один из ортологов *labial* экспрессируется в интактном теле и эта экспрессия изменяется в ответ на повреждение, что может играть роль в определении позиций клеток при регенерации головной части тела (Cho et al., 2009).

Таким образом, Нох-гены — наиболее вероятные координаторы процесса регенерации в целом, и позиционно-зависимых дифференцировок в частности. У большинства исследованных первичноротых животных, способных к эффективному восстановительному морфогенезу, Нох-гены экспрессируются на протяжении всей жизни и уровень их транскрипции достоверно изменяется в процессе регенерации.

НОХ-ГЕНЫ В РЕГЕНЕРАЦИИ Deuterostomia

Участие Нох-генов в регенерации было показано как для низших, так и для высших позвоночных. Нох-гены экспрессируются при регенерации хвостового плавника рыб (*Danio rerio*) и конечности и хвоста Urodela (*Pleurodeles waltl*, *Ambistoma mexicanum*, *Notophthalmus viridescens*). Высшие позвоночные не способны к эпиморфной регенерации частей тела во взрослом состоянии, хотя новорожденные мыши и дети могут восстанавливать пальцы после ампутации части дистальной фаланги или при травматическом повреждении. Это объясняется особенностями заживления раны, которое у молодых животных происходит на фоне меньшего воспалительного ответа и при более низком уровне экспрессии TGF- β (Martin, 1997; Han et al., 2008). Будучи неспособными заново отрастить хвост или конечность, млекопитающие, тем не менее, могут репарировать внутренние органы после повреждения и обновлять ткани, то есть способны к физиологической регенерации (Awgulewitsch, 2003; Brun et al., 2004; Morgan, Whiting, 2008). В этих процессах Нох-гены принимают самое активное участие.

Нох-гены и регенерация низших позвоночных

Непосредственная значимость экспрессии Нох-генов для регенерации хвостового плавника костистой рыбы *Danio rerio* была доказана приме-

нением фенотипического нокаута. Морфолиновый нокаут по генам *Hoxc13* (а и b ортологи) приводит к уменьшению размеров бластемы, причем в случае нокаута по *Hoxc13a* происходит уменьшение мезенхимального компартмента, а многие мезенхимные клетки имеют пикнотические ядра (Thummel et al., 2007).

Единственные позвоночные, которые могут во взрослом состоянии регенерировать хвост и конечности, — это хвостатые амфибии. Регенерация конечности — процесс двухфазный. На первом этапе происходит очень быстрое, по сравнению с млекопитающими, закрытие раны и формирование регенерационной бластемы из дедифференцированных клеток (Bryant et al., 2002). Вторая фаза связана с восстановлением осей будущей конечности внутри бластемы. Этот период характеризуется экспрессией многих эмбриональных генов (Bryant et al., 2002; Endo et al., 2004). У позвоночных гены Нох-кластера активны как в период формирования бластемы, так и в процессе паттернирования органа в пределах бластемы, что сделало противоречивой трактовку их функций. Так, экспрессия *HoxA13* и *HoxA9* в раннем регенерате конечности не следует правилу пространственной коллинеарности (Gardiner, Bryant, 1996). Активность обоих генов обнаруживается через 1–2 дня после ампутации конечности аксолотля в мезенхимных клетках непосредственно под раневым эпидермисом. В период накопления клеток бластемы, области экспрессии генов совпадают. В этот период их роль может заключаться в создании и поддержании регенерационной бластемы, либо их экспрессия может быть связана с установлением дистальной границы регенерата. На этапе регионализации зачатка экспрессия этих же генов становится коллинеарной и повторяет эмбриональный рисунок.

Интересно, что в первой фазе регенерации конечности могут принимать участие те гены, которые никогда не экспрессировались в этой области в эмбриогенезе или у взрослого животного. Так, у позвоночных *HoxC10* не экспрессируется в ходе развития передней конечности, но участвует в развитии задних конечностей и хвоста. Однако у аксолотля *Ambystoma mexicanum* при регенерации передней конечности экспрессия этого гена появляется в первой фазе регенерации и исчезает во второй фазе (Bryant et al., 2002).

И низшие и высшие позвоночные экспрессируют Нох-гены не только в эмбриогенезе, но и во взрослом состоянии. У взрослого тритона *P. waltl* четыре гена *Hoxa9*, *Hoxc10*, *Hoxc12* и *Hoxc13* экспрессируются в центральной нервной системе, в перекрывающихся доменах, с сохранением определенной пространственной коллинеарности. Экспрессия 5'-генов *PwHoxc10* и *PwHoxc13* обнаруживалась также в мышцах и покровных тканях.

При регенерации хвоста уровень экспрессии НохС5'-генов в нервной системе увеличивался (Nicolas et al., 2003).

Поддержание градиентной экспрессии Нох-генов во взрослом теле тритона напоминает Нох-градиенты у ювенильных полихет и планарии, причем у всех этих животных уровень Нох-экспрессии меняется в ответ на повреждение. В случае тритона было показано, что при восстановлении хвоста количество регенерирующих позвонков соответствует числу ампутированных. Кроме того, при пересадке бластемы хвоста в более проксимальную позицию ее дальнейшее развитие происходит согласно месту ее происхождения (Nicolas et al., 2003). Это означает, что хвостовая бластема представляет собой самоорганизующуюся систему, клетки которой несут позиционную память о своем положении относительно передне-задней оси тела. Транскрипты Нох-генов могут играть роль в поддержании этой позиционной информации.

Экспрессия Нох-генов в интактных хвосте и конечностях Urodela была впервые обнаружена еще в 1988 году (Savard et al., 1988). Был описан транскрипт *NvHbox1* (согласно современной номенклатуре *NvHoxc3*), который в онтогенезе тритона *N. viridescens* подвергается альтернативному сплайсингу. Транскрипт, содержащий первый и второй экзон, экспрессируется в интактных передних и задних конечностях, в бластеме передней конечности, но не обнаруживается в хвосте, бластеме хвоста, сердце, печени и селезенке. Напротив, транскрипт, содержащий второй экзон, работает во взрослых тканях хвоста и хвостовой бластеме. При этом в более проксимальной бластеме передней конечности экспрессия транскрипта в 3 раза превышает уровень экспрессии в более дистальной бластеме. Крайне примечательно то, что у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, которая, как известно, к регенерации конечности во взрослом состоянии не способна, гомолог гена *NvHbox1* не обнаруживается во взрослой конечности (Savard et al., 1988). Вероятно, поддержание экспрессии Нох-генов в дефинитивных тканях каким-то образом определяет потенции хвостатых амфибий к регенерации. К такому же выводу приходят авторы работы, показавшие дифференциальную экспрессию Нох-генов, принадлежащих С и D кластерам, в интактной и регенерирующей конечности тритона *N. viridescens* (Simon, Tabin, 1993). Экспрессия гена *Hox-3.6* (*Hoxc6*) обнаруживается в интактной задней конечности и ее бластеме. Более активно ген транскрибируется в проксимальной части конечности. Транскрипт *Hox-4.5* (*Hoxd5*) выявляется в бластемах передней и задней конечности, причем уровень его экспрессии в проксимальных частях в 4–5 раз выше, чем в дистальных. По всей видимости, сохранение экспрессии Нох-генов С-кластера в дифференцированных тканях необходимо для создания

позиционной информации, отличающей передние и задние конечности и обеспечивающей корректную их регенерацию. В то же время Нох-гены D-кластера размечают территорию бластемы и задают позиционные значения внутри регенерационного поля (Simon, Tabin, 1993).

Известно, что любой из плавников *D. rerio* прекрасно регенерирует и эта способность сохраняется на протяжении всей жизни. Транскриптом плавника *D. rerio*, опубликованный в 2013 году (Nachtrab et al., 2013), выявил, что в фибробластах и остеобластах вдоль передне-задней оси плавника поддерживается дифференциальная экспрессия ряда генов в течение взрослой жизни рыбы. Каждый луч плавника транскрибирует свою уникальную комбинацию генов, в числе которых обнаружены Нох-гены – *Hoxc8a*, *Hoxd11a* и *Hoxd13a* (Nachtrab et al., 2013). Это означает, что Нох-гены *D. rerio* не только участвуют в формировании бластемы, что было доказано фенотипическим нокаутом (Thummel et al., 2007), но и создают позиционную информацию в плавнике за счет сохранения экспрессии во взрослом состоянии.

Таким образом, даже беглый сравнительный анализ обнаруживает, что у Bilateria способность к полноценной регенерации связана с деятельностью Нох-генов. Если эти гены принимают участие в построении тела животного и остаются активными во взрослом состоянии, то животное легко восстанавливает позиционную информацию. Однако из этого правила есть важное исключение – амниоты.

Нох-гены в физиологической регенерации высших позвоночных

Для высших позвоночных, главным образом для млекопитающих, была показана экспрессия Нох-генов во взрослом возрасте. Она затрагивает те ткани, которые способны к ремоделированию и/или постоянному обновлению. Таким образом, гены Нох-кластера у позвоночных задействованы в процессах физиологической регенерации, например, в циклическом обновлении волосяных фолликулов (Awgulewitsch, 2003) или гематопоэзе (Brun et al., 2004; Morgan, Whiting, 2008). В настоящий момент показана экспрессия 30 из 39 Нох-генов в эмбриональной и дефинитивной коже млекопитающих (Yang et al., 2010). Нох-гены играют роль в постоянном обновлении кожного покрова. Они являются переключателями с программы пролиферации на программу дифференцировки и наоборот (Mark et al., 1997). Кроме того, миграция клеток эпидермиса также может регулироваться Нох-генами (Klausen et al., 2009). В ряде исследований по регенерации кожи млекопитающих было обнаружено, что Нох-гены связаны с пролиферацией клеток, формированием внеклеточного мат-

рикса и секрецией факторов роста (La Celle, Polakowska, 2001; Hara et al., 2007, цит. по Yang et al., 2010).

В последние годы была показана значимая роль Нох-генов в пролиферации, дифференцировке и миграции клеток костного мозга (ККМ). Эти клетки не только обеспечивают гематопоэз, но могут дифференцироваться в самые разные типы клеток организма в ответ на повреждение и способны восстановлению органов. Тем самым ККМ поддерживают некоторые, хотя и ограниченные, потенции млекопитающих к регенерации (Mahdipour, Mace, 2011). На ранних этапах развития гематопоэтических клеток в них экспрессируются почти все гены Нох-кластеров А, В и С, что обеспечивает поддержание гомеостаза, гематопоэза и коммитирование клеточных линий на протяжении всей жизни организма (Argiropoulos, Humphries, 2007). Для гематопоэтических клеток человека CD34+ было показано, что гены, расположенные ближе к 3' концу кластера, такие как *Hoxb3* и *Hoxb4*, экспрессируются в первичных клетках, тогда как гены 5' конца кластера (*Hoxa7*, *Hoxa10*) обнаруживаются в более дифференцированной субпопуляции клеток CD34+ человека (Mahdipour, Mace, 2011). Гены-паралоги (например, *Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxc4* и *Hoxd4*) зачастую могут иметь сходные функции и компенсировать экспрессию друг друга при отсутствии одного из генов. Тем не менее, утрата некоторых генов приводит к значительным нарушениям гематопоэза. Например, *Hoxa9* является одним из самых активно экспрессирующихся генов в ранней популяции гематопоэтических стволовых клеток (ГСК) и, вероятно, играет ключевую роль в самоподдержании этой популяции (Argiropoulos, Humphries, 2007). Отсутствие его экспрессии приводит к серьезным нарушениям гематопоэза, в том числе дефектам развития клеток миелоидного, лимфоидного и эритроидного ряда. Было показано также, что сбалансированная экспрессия гена *Hoxb3* необходима для корректного прохождения лимфопоэза и миелопоэза, так как недостаточность его экспрессии в ГСК приводит к снижению пролиферации предшественников В-клеток, а сверхэкспрессия – к сверхактивной миелопролиферации (Ko et al., 2007). В целом, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что Нох-гены 3' конца кластера осуществляют сдвиг дифференцировки миелоидных клеток в сторону гранулоцитов, а гены 5' конца кластера способствуют формированию моноцитарного ряда.

Нох-гены в регенерации органов и тканей млекопитающих

Известно, что ККМ играют важную роль в организме млекопитающих, так как они участвуют в разного рода репарационных процессах, таких как заживление поверхностных ран или восста-

новлении сердца после инфаркта (Mahdipour et al., 2011). При этом ККМ могут вносить свой вклад опосредовано, через продукцию цитокинов или факторов роста, или напрямую дифференцируясь в разные клеточные типы – кератиноциты, фибробласты, клетки сосудов крови. Очевидно, что Нох-гены играют в этих процессах важную роль. Например, было показано, что сверхэкспрессия *Hoxa3* обеспечивает дифференцировку ГСК в гранулоциты Gr-1+ CD11b+. Клетки Gr-1+ CD11b+ стимулируют неоваскуляризацию и продуцируют проангиогенные факторы, такие как VEGF и MMP9. Также эти клетки могут дифференцироваться непосредственно в эндотелиальные клетки и встраиваться в новые сосуды (Mahdipour et al., 2011).

Нох-гены могут регулировать поведение мезенхимных стволовых клеток костного мозга (МСККС). Экспрессия генов *Hoxb2*, *Hoxb5*, *Hoxb7* и *Hoxc4* в МСККС связана с расширением популяции этих клеток и ее самообновлением, в то время как другие члены Нох-семейства, включая *Hoxa7*, *Hoxb3*, *Hoxa3* и *Hoxb13*, участвуют в регуляции дифференцировки мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека в клетки эндотелия. Анализ экспрессии Нох-генов в ходе *in vitro* дифференцировки МСК человека показал, что экспрессия *Hoxa7* и *Hoxb3* активировалась, а экспрессия *Hoxa3* и *Hoxb13* подавлялась по мере того, как предшественники становились более дифференцированными (Chung et al., 2009). Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования для оценки функциональной роли Нох-генов в МСК-опосредованном восстановлении и регенерации тканей.

Экспрессия Нох-генов в фибробластах, клетках мезодермального происхождения и мезенхимных стволовых клетках млекопитающих, по-видимому, создает позиционную информацию, необходимую для корректного прохождения регенерационных процессов. Анализ экспрессии генов в дермальных фибробластах человека показал дифференциальную экспрессию Нох-генов в фибробластах с разной локализацией (Chang et al., 2002). Экспрессия *HoxA* и *HoxD* генов отражает размещение фибробластов вдоль проксимо-дистальной оси рук и ног, а дифференциальная экспрессия *HoxC* генов главным образом коррелирует с расположением вдоль передне-задней оси тела. Экспрессия *HoxB* генов в свою очередь определяет происхождение фибробластов из внутренних органов. Например, *Hoxa13* экспрессируется в фибробластах пальцев ноги и крайней плоти, в то время как *Hoxd9* экспрессируется в фибробластах плеча. Таким образом, для каждого анатомического участка создается своя позиционная информация через создание “Нох-кода”, который поддерживается на протяжении всей жизни (Chang et al., 2002). Мезенхимные стволовые клетки, локализованные в костном мозге, могут дать начало фибробластам, хондроцитам и

клеткам кости. МСК, относящиеся к разным типам костей, похоже, имеют различные потенциалы в развитии, и это коррелирует с различиями в экспрессии множественных Нох-генов (Ackema, Charité, 2008).

Важность определения позиций стволовых клеток была показана в работах, выполненных на мышцах, у которых экспериментально повреждались костные ткани разного происхождения (Leucht et al., 2008). Кости лицевого скелета млекопитающих формируются из клеток черепного нейрального гребня, в то время как кости скелета конечностей имеют мезодермальное происхождение (Leucht et al., 2008). При повреждении челюсти и большой берцовой кости мышцы первая восстанавливается за счет стволовых клеток нейрального гребня, в то время как вторая – за счет мезодермальных стволовых клеток. При пересадке стволовых клеток нейрального гребня в место повреждения большой берцовой кости все равно происходило заживление. Однако мезодермальные клетки, пересаженные в поврежденную челюсть, были не способны восстановить нарушенную костную структуру. Оказалось, что клетки скелета конечностей, включая стволовые, экспрессируют ген *Hoxa11*, что, по-видимому, определяет их позицию и ограничивает регенерационные потенциалы. Нох-негативные стволовые клетки нейрального гребня обладают более широкими возможностями и способны к восстановлению костных структур разного происхождения. Следует отметить, что стволовые клетки нейрального гребня, оказавшись в окружении Нох-положительных клеток берцовой кости, начинали также экспрессировать *Hoxa11*. Однако мезодермальные Нох-положительные клетки никогда не меняли своего статуса в окружении Нох-негативных клеток челюсти.

Принимая во внимание столь значительную роль Нох-генов в обновлении разных тканей организма, очевидно, что сбой в их работе на уровне физиологической регенерации вызывает множественные нарушения, в том числе и онкогенез. Было показано, например, что сверхэкспрессия *Hoxa10* и *Hoxb3* в клетках костного мозга мыши блокирует дифференцировку В- и Т-клеток, вызывает нарушения эритропоэза и индуцирует развитие миелопролиферативных заболеваний и лейкемии (Fischbach et al., 2005). Сверхэкспрессия *Hoxa5* и *Hoxb6* в ГСК также ингибирует эритропоэз, а постоянная чрезмерная экспрессия *Hoxb6* приводит к развитию острой миелоидной лейкемии (Fischbach et al., 2005).

Сбой в экспрессии Нох-генов индуцирует развитие злокачественных образований в постоянно обновляющейся ткани яичников. Ченг и соавт. оценили экспрессию белков 5' НОХА-кластера в разных тканях нормального репродуктивного

тракта мышцы и человека и карцином яичника различных гистологических подтипов (Cheng et al., 2005). Иммуногистохимическими методами было показано, что ни один из 5' НОХА белков не экспрессируется в нормальном эпителии яичника, но демонстрирует специфичный пространственно-временной характер экспрессии по всей длине половых путей. Напротив, НОХА7 и НОХА9 экспрессируются во всех исследованных подтипах карцином яичников, НОХА10 специфично экспрессируется в тканях эндометриоидной и слизеобразующей аденокарцином, а НОХА11 – специфично в слизеобразующей аденокарциноме. Таким образом, каждый из подтипов аденокарцином демонстрирует экспрессию какого-либо Нох-белка, специфичного для определенного участка половых путей. Пространственное нарушение экспрессии Нох-генов, вероятно, запускает дифференцировку поверхностного эпителия яичника по пути, характерному для других участков женского репродуктивного тракта, но не самого яичника. Эта пространственно некорректная дифференцировка может запускать процесс опухолеобразования (Shah, Sukumar, 2010).

Таким образом, для некоторых типов стволовых клеток высших позвоночных характерно наличие Нох-кода, который был получен еще в период эмбриогенеза (Chang et al., 2002). Будучи раз установленным, этот Нох-код сохраняется на протяжении всей жизни. За счет Нох-кода стволовые клетки коммитированны на восстановление только определенных тканей и их позиция четко детерминирована (Chang et al., 2002; Leucht et al., 2008). Стойкость позиционной памяти, необходимая для правильной дифференцировки клеток в контексте их окружения, обеспечивает организму отлаженную физиологическую и органную регенерацию в ущерб регенерации эпиморфной. Для млекопитающих, с их большим разнообразием тканей и необходимостью поддерживать их гомеостаз и целостность, раннее коммитирование стволовых клеток при помощи Нох-кода оказалось более выгодным эволюционным приобретением, чем способность к реорганизации позиционных значений во взрослом теле. Создается впечатление, что интенсивность метаболизма амниот, количество клеточных типов в их тканевом репертуаре и, в конечном счете, их морфологическая сложность – результат регуляторной стратегии, адаптировавшей древние эмбриональные гены для утилитарных целей дифференцировки возобновляемых клеточных линий дефинитивного тела.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всем многообразии животного мира, количество регенерационных стратегий вполне постигаемо. Эти стратегии часто зависят от программ развития животных и от эволюционных

путей, которыми шли их очень далекие предки. Сравнивая данные по дефинитивной экспрессии Нох-генов у представителей разных эволюционных ветвей, можно предположить, что у общего предка всех билатеральных уже существовала система создания и поддержания позиционной информации во взрослом теле за счет Нох-кода. Современные Bilateria по-разному используют этот регуляторный инструмент. Изученные представители Lophotrochozoa – полихеты и планарии – используют Нох-кластер для быстрой реорганизации позиционной информации, необходимой при восстановлении утраченных частей тела. Среди позвоночных есть группы, также способные к осевой регенерации (амфибии), но есть и такие, например, млекопитающие, которые используют Нох-зависимую систему позиционной памяти для поддержания тканевого гомеостаза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ББС ЗИН РАН “Картеш” и ЦКП “Хромас” за содействие в проведении полевых и исследовательских работ.

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-31683 и № 14-04-01531-а и грантом СПбГУ № 1.38.209.2014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванов П.П. Общая и сравнительная эмбриология. Л.: Биомедгиз, 1937. 811 с.
- Ackema K.B., Charité J. Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. P. 979–991.
- Agata K., Tanaka T., Kobayashi C. et al. Intercalary regeneration in planarians // *Developmental Dynamics.* 2003. V. 226. P. 308–316.
- Argiropoulos B., Humphries R.K. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis // *Oncogene.* 2007. V. 26. P. 6766–6776.
- Angewilewitsch A. Hox in hair growth and development // *Naturwissenschaften.* 2003. V. 90. P. 193–211.
- Bakalenko N.I., Novikova E.L., Nesterenko A.Y. et al. Hox gene expression during postlarval development of the polychaete *Alitta virens* // *EvoDevo.* 2013. V. 4. P. 13.
- Brun A.C., Björnsson J.M., Magnusson M. et al. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells // *Blood.* 2004. V. 103. P. 4126–4133.
- Bryant S.V., Endo T., Gardiner D.M. Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells // *Int. J. Dev. Biol.* 2002. V. 46. P. 887–896.
- Campbell G., Tomlinson A. Initiation of the proximodistal axis in insect legs // *Development.* 1995. V. 121. P. 619–628.
- Carlson B.M. Principles of Regenerative Biology. Burlington, MA: Academic Press, 2007. P. 1–24.
- Chang H.Y., Chi J.T., Dudoit S. et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. V. 99. P. 12877–12882.

- Cheng W., Liu J., Yoshida H. et al. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract // *Nature Med.* 2005. V. 11. P. 531–537.
- Cho S.J., Koh K.S., Lee E. et al. Differential expression of three labial genes during earthworm head regeneration // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009. V. 73. P. 2609–2614.
- Chung N., Jee B.K., Chae S.W. et al. HOX gene analysis of endothelial cell differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Mol. Biol. Rep.* 2009. V. 36. P. 227–235.
- Endo T., Bryant S.V., Gardiner D.M. A stepwise model system for limb regeneration // *Developmental Biology.* 2004. V. 270. P. 135–145.
- Fischbach N.A., Rozenfeld S., Shen W. et al. HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor *in vitro* and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia *in vivo* // *Blood.* 2005. V. 105. P. 1456–1466.
- French V. Leg regeneration in the cockroach, *Blattella germanica*. II. Regeneration from a non-congruent tibial graft host junction // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1976. V. 35. P. 267–301.
- Gardiner D.M., Bryant S.V. Molecular mechanisms in the control of limb regeneration: the role of homeobox genes // *Int. J. Dev. Biol.* 1996. V. 40. P. 797–805.
- Han M., Yang X., Lee J. et al. Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice // *Dev. Biol.* 2008. V. 315. P. 125–135.
- Iten L.E., Bryant S.V. The interaction between the blastema and stump in the establishment of the anterior–posterior and proximal–distal organization of the limb regenerate // *Dev. Biol.* 1975. V. 44. P. 119–147.
- Klausen C., Leung P.C., Auersperg N. Cell motility and spreading are suppressed by HOXA4 in ovarian cancer cells: possible involvement of beta1 integrin // *Mol. Cancer. Res.* 2009. V. 7. P. 1425–1437.
- Ko K.H., Lam Q.L., Zhang M. et al. Hoxb3 deficiency impairs B lymphopoiesis in mouse bone marrow // *Exp. Hematol.* 2007. V. 35. P. 465–475.
- Kulakova M., Bakalenko N., Novikova E. et al. Hox gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa) // *Dev. Genes. Evol.* 2007. V. 217. P. 39–54.
- Leucht P., Kim J.B., Amasha R. et al. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration // *Development.* 2008. V. 135. P. 2845–2854.
- Maden M. Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb // *Nature.* 1982. V. 295. P. 672–675.
- Maden M. The effect of vitamin A (retinoids) on pattern formation implies a uniformity of developmental mechanisms throughout the animal kingdom // *Acta Biotheor.* 1993. V. 41(4). P. 425–445.
- Mahdipour E., Charnock J.C., Mace K.A. Hoxa3 promotes the differentiation of hematopoietic progenitor cells into proangiogenic Gr-1+ CD11b+ myeloid cells // *Blood.* 2011. V. 117. P. 815–826.
- Mahdipour E., Mace K.A. Hox transcription factor regulation of adult bone-marrow-derived cell behaviour during tissue repair and regeneration // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011. V. 11. P. 1079–1090.
- Mark M., Rijli F.M., Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis // *Pediatr. Res.* 1997. V. 42. P. 421–429.
- Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration // *Science.* 1997. V. 276. P. 75–81.
- Mohanty-Hejmadi P., Dutta S.K., Mahapatra P. Limbs generated at site of tail amputation in marbled balloon frog after vitamin A treatment // *Nature (London).* 1992. V. 355. P. 352–353.
- Morgan R., Whiting K. Differential expression of HOX genes upon activation of leukocyte sub-populations // *Int. J. Hematol.* 2008. V. 87. P. 246–249.
- Nachtrab G., Kikuchi K., Tornini V.A. et al. Transcriptional components of anteroposterior positional information during zebrafish fin regeneration // *Development.* 2013 Sep; 140(18):3754–64.
- Niazi I.A., Saxena S. Abnormal hind limb regeneration in tadpoles of the toad, *Bufo andersoni*, exposed to excess vitamin // *Folia Biol. (Krakow).* 1978. V. 26. P. 3–8.
- Nicolas S., Papillon D., Perez Y. et al. The spatial restrictions of 5'HoxC genes expression are maintained in adult newt spinal cord // *Biol Cell.* 2003. V. 95. P. 589–594.
- Niederreither K., Dollé P. Retinoic acid in development: towards an integrated view // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 541–553.
- Nogi T., Watanabe K. Position-specific and non-colinear expression of the planarian posterior (Abdominal-B-like) gene // *Develop. Growth Differ.* 2001. V. 43. P. 117–184.
- Novikova E.L., Bakalenko N.I., Nesterenko A.Y. et al. Expression of Hox genes during regeneration of nereid polychaete *Alitta (Nereis) virens* (Annelida, Lophotrochozoa) // *EvoDevo.* 2013. V. 4. P. 14.
- Okada T.S.J. A brief history of regeneration research—for admiring Professor Niazi's discovery of the effect of vitamin A on regeneration // *J. Biosci.* 1996. V. 21. P. 261–271.
- Orii H., Kato K., Umesono Y. et al. The planarian Hom/Hox Homeobox genes (Plox) expressed along the anteroposterior axis // *Developmental Biology.* 1999. V. 210. P. 456–468.
- Pfeifer K., Dorresteijn A.W., Fröbuis A.C. Activation of Hox genes during caudal regeneration of the polychaete annelid *Platynereis dumerilii* // *Dev. Genes Evol.* 2012. V. 222. P. 165–179.
- Savard P., Gates P.B., Brockes J.P. Position dependent expression of a homeobox gene transcript in relation to amphibian limb regeneration // *EMBO J.* 1988. V. 7. P. 4275–4282.
- Simon H.G., Tabin C.J. Analysis of Hox-4.5 and Hox-3.6 expression during newt limb regeneration: differential regulation of paralogous Hox genes suggest different roles for members of different Hox clusters // *Development.* 1993. V. 117. P. 1397–1407.
- Shah N., Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis // *Nat. Rev. Cancer.* 2010. V. 10. P. 361–371.
- Slack J.M.W. Morphogenetic gradients—past and present // *Trends Biol. Sci.* 1987. V. 12. P. 200–204.
- Thummel R., Ju M., Sarras M.P.Jr. et al. Both Hoxc13 orthologs are functionally important for zebrafish tail fin regeneration // *Dev. Genes Evol.* 2007 V. 217. P. 413–420.
- Yang M., Li Q.F., Zhang F. HOX genes in the skin // *Chin. Med. J. (Engl.).* 2010. V. 123. P. 2607–2612.

Hox Genes and Animal Regeneration

E. L. Novikova*, N. I. Bakalenko, A. Y. Nesterenko, and M. A. Kulakova

St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7-9, 199034 St. Petersburg

**e-mail: elena.novikova.03.06@gmail.com*

The concept of regeneration is intimately associated with ideas about positional information, that is, the distribution of various signals prescribing cells their location in an embryo or an adult organism. Hox genes are perfect candidates for the role of factors creating positional information. Their main function is thought to be regionalization of the embryo and the determination of the anterior/posterior (A/P) axis of the bilaterian body according to the rules of temporal and spatial colinearity. At the same time, Hox genes are also expressed postembryonically and may participate in various processes in the adult body. In particular, Hox genes are involved in regeneration, as shown on animals from different evolutionary clades. During reparation Hox genes are responsible for regionalization and specification of the newly formed structures, which reflects their embryonic role. This is not all, however. Hox transcription patterns in some adult organisms and their expression dynamics after damage suggest that Hox genes are involved in creating positional information in the adult body. This information is necessary for consistent reparation, while its fast reorganization may accelerate the reparative process.

Keywords: Hox genes, regeneration, regeneration potential, polychates, positional information, adult Hox gene expression