

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 577.353

Рег. № ГЗ 0088-2019-0005

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119101690032-9

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«29» декабря 2020 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И АКТИВАЦИИ
АДАПТИВНЫХ РЕСУРСОВ ОРГАНИЗМА

по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»
Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научный сотрудник,
доктор биологических наук

Е.Е.В. 29.12.2020

Е.Е. Воронежская

подпись, дата

Москва 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук ЕвмЕД 29.12.2020 Е.Е. Воронежская
подпись, дата

Исполнители:
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук Л.П. Незлин 29.12.2020
подпись, дата

Младший научный сотрудник А.Л. Обухова 29.12.2020
подпись, дата

Младший научный сотрудник А.М. Соколова 29.12.2020
подпись, дата

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук В.И. Мельникова 29.12.2020
подпись, дата

Научный сотрудник, кандидат биологических наук С.Н. Воронова 29.12.2020
подпись, дата

Научный сотрудник, кандидат биологических наук А.И. Куртова 29.12.2020
подпись, дата

Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук Е.Б. Абрамова 29.12.2020
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 40 с., 15 рисунок., 1 табл., 33 источника, 0 приложений, 8 отчетных публикаций

МОЛЛЮСКИ, ГУБКИ, МОРСКИЕ ЕЖИ, ЛИЧИНКИ, СПЕРМАТОЗОИДЫ, ГАСТРУЛЯЦИЯ, ПОДВИЖНЫЕ РЕСНИЧКИ, СЕРОТОНИН, ДОФАМИН, СЕРОТОНИЛИРОВАНИЕ, НЕЙРОНАЛЬНЫЕ МОНОАМИН-СОДЕРЖАЩИЕ СТРУКТУРЫ

Целью исследования является детализация внутриклеточных механизмов, обеспечивающих долговременные эффекты действия моноаминов, проявляющиеся в процессе развития и лежащие в основе нейрогуморальной регуляции и активации адаптивных ресурсов организма. В качестве модельных объектов использовались зародыши пресноводных моллюсков, личинки губок и морских ежей, жгутиковые клетки взрослых губок (хоаноциты), ткани семенников и зрелые сперматозоиды крыс.

В работе использовали комбинацию современных методов экспериментальной эмбриологии, фармакологические воздействия, морфологический анализ целых эмбрионов и их структур, иммунохимическое маркирование и конфокальную микроскопию, анализ внутриклеточных структур с помощью электронной микроскопии.

Повышение уровня серотонина в материнском организме и в бластомерах приводит к нарушению морфогенетических движений при гастрюляции у пресноводных моллюсков. Внутриклеточные структуры, содержащие дофамин, сосредоточены в аппарате Гольджи в непосредственной близости от кинетида жгутика в эпителиальных клетках личинок и в хоаноцитах взрослых губок. Показано участие внутриклеточных моноамин-содержащих структур в модуляции активности подвижных ресничек. Синтетические вещества (производные индибулина с алкильной группировкой, трифенилфосфониевые конъюгаты аналогов пиримидиновых нуклеозидов) обладают способностью дестабилизировать микротрубочки и обладают потенциалом для разработки перспективных противоопухолевых агентов. Отработана уникальная методика выявления серотонилированных белков с использованием деривата серотонина - пропаргил-серотонина и клик-реакции - для целостных тканей и зрелых клеток. Показано присутствие серотонилированных белков в сперматогенном эпителии извитых канальцев семенников крыс, в акросомальной части головки и проксимальной части жгутиков зрелых сперматозоидов.

Полученные данные раскрывают механизмы участия внутриклеточного серотонина в регуляции морфогенетических движений, а дофамина - в обеспечении подвижности ресничек. Обнаружение серотонилированных белков в семенниках указывает на роль

серотонина в регуляции процесса гаметогенеза и предполагает его важное значение в контроле подвижности сперматозоидов.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
РАЗДЕЛ 1 МОНОАМИН-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ДРОБЛЕНИЯ И ОНТОГЕНЕЗА РЕСНИЧНЫХ СТРУКТУР У МОДЕЛЬНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ.....	7
1.1 Введение	7
1.2 Материалы и методы	10
1.3 Результаты и обсуждение.....	14
1.4 Список использованных источников	23
РАЗДЕЛ 2 НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТИВНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ОНТОГЕНЕЗЕ МОДЕЛЬНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ.....	26
2.1 Введение	26
2.2 Материалы и методы	28
2.3 Результаты и обсуждение.....	31
2.4 Список использованных источников	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	38
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ	39

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения

ДА – дофамин

ДМСО - диметилсульфоксид

5-НТ – серотонин

5-НТР – непосредственный биохимический предшественник синтеза серотонина

5-РТ – пропаргил-серотонин, дериват серотонина

Click-реакция (клик-реакция) – реакция между алкинным производным и азидо-производным с меткой в присутствии ионов Cu^+

Cyst – цистамин, ингибитор трансглутаминазы

LCSM – лазерный сканирующий конфокальный микроскоп

L-DOPA – непосредственный биохимический предшественник синтеза дофамина

TG – трансглутаминаза

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1 МОНОАМИН-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ДРОБЛЕНИЯ И ОНТОГЕНЕЗА РЕСНИЧНЫХ СТРУКТУР У МОДЕЛЬНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

1.1 Введение

Значительная часть интегративных функций в организме осуществляется через моноаминергические системы – комплекс из низкомолекулярного медиатора – биогенного амина (серотонина и дофамина), ферментов его метаболизма и рецепторов. Это делает моноамины важнейшей компонентой нервной и эндокринной системы в организме, определяющей адаптационные способности организма в непрерывно меняющихся условиях окружающей среды. На сегодняшний день на молекулярном уровне изучены: процессы синтеза и деградации серотонина и дофамина; мембранный транспорт, упаковка и выброс из везикул этих веществ; особенности работы широкого спектра рецепторов к серотонину и дофамину. В последние десятилетия было показано, что регулярные механизмы действия моноаминов также включают в себя сложные многокомпонентные системы, в которых важную роль играет баланс моноаминов внутри и снаружи клеток [1, 2]. Такие системы могут работать как в пределах одной клетки, так и на тканевом, органном и даже организменном уровнях [3]. Это позволяет говорить о моноаминах как о системных интегративных модуляторах. Моноамины обнаруживаются уже на самых ранних стадиях развития в ооцитах и дробящихся эмбрионах животных самых разных таксономических групп; они вовлечены в регуляцию широкого спектра процессов на донервных стадиях развития [4, 5]. Наличие рецепторов к моноаминам и мембранных транспортеров создает возможность для локальной регуляции процессов, происходящих в клетках зародыша во время развития. Причем такая система способна чутко реагировать на изменение уровня моноаминов как в организме родителя (непосредственно во время прохождения или нахождения зародыша в репродуктивных путях), так и во внешней среде (в случае развития зародыша вне материнского организма, например, в отложенном яйце). В свою очередь, уровень моноаминов в материнском организме отражает изменения в физиологии и функциональном состоянии конкретной особи. Так, уровень серотонина, например, зависит от сезона [6], существенно меняется при состоянии сытости-голодности, после активной физической нагрузки [7, 8]. Таким образом, наличие полноценно функционирующих компонентов моноаминергической системы, динамическое изменение уровня моноаминов вокруг зародыша в процессе развития, создает все предпосылки для участия серотонина и дофамина в долговременных

регуляторных процессах, таких как морфогенетические движения и формирование и функционирование ресничных структур.

Гастрюляция - одно из основных морфогенетических событий в развитии всех живых существ, обладающих как минимум двумя зародышевыми листками. Хотя все больше данных демонстрирует регулируемую роль определенных генов и их продуктов в формировании структуры тела во время гастрюляции, влияние малых молекул, таких как моноамины, все еще недооценивается. Ресничные (в частности моноцилиарные) клетки являются одним из наиболее примитивных типов соматических клеток Metazoa. Они формируются на самых ранних стадиях развития и сохраняются практически без изменений во многих тканях взрослых беспозвоночных и позвоночных животных, обеспечивая выполнение множества жизненно важных функций. Показано, что моноамины играют ключевую роль в регуляции биений локомоторных ресничек у животных с моноцилиарной ресничкой, например, личинок морских ежей [9]. Во всех известных случаях, источником моноаминов считают дифференцирующиеся клетки нервной системы, а регуляторные механизмы запускаются после связывания моноаминов с рецепторами на поверхности клетки. Однако в своих последних исследованиях, мы показали, что моноамины участвуют в регуляции развития, начиная с самых ранних стадий развития, а источником моноаминов изначально является организм матери [6]. Текущей задачей является исследование влияние повышения уровня серотонина на стадиях дробления на морфогенетические движения и формирование ресничных структур у зародышей.

Губки занимают особое место среди беспозвоночных животных, используемых в качестве модельных объектов для реализации поставленных перед нами задач. Как древнейший тип многоклеточных животных, возникший более 500 млн лет назад, губки - Porifera стоят у истоков происхождения всех многоклеточных животных. Организация их своеобразна и не имеет аналогов среди других Metazoa. Они имеют пористую поверхность и паренхиматозное, часто асимметричное, тело, пронизанное каналами водоносной системы. Важнейшим элементом этой системы являются камеры, выстланные жгутиковыми воротничковыми клетками - хоаноцитами. Хотя воротничковые клетки не редкость у Eumetazoa (встречаются также у Cnidaria, Echinodermata), только хоаноциты губок по ряду морфологических признаков считались гомологичными воротничковым жгутиконосцам (Choanoflagellata). После открытия у них сперматогенеза, губки стали рассматриваться как самые примитивные Metazoa, возникшие из хоанофлагеллятоподобного предка. Роль биогенных аминов в поведенческих реакциях губок до

настоящего времени до конца не ясна [10]. Однако показано присутствие отдельных элементов пути синтеза (при отсутствии рецепторов) моноаминов в исследованных транскриптомах и геномах губок [11]. Несомненным является факт, что губки реагируют на аппликацию внешних моноаминов [10]. Такой уникальный набор свойств позволяет использовать эту модель для исследования нерцепторного действия моноаминов.

Анализ имеющихся в литературе данных и результатов наших собственных исследований дает все основания предполагать, что внутриклеточные моноамины являются важными регуляторными веществами как при прохождении зародышем ранних стадий развития (дробление, морфогенетические движения), так и в дальнейшем при формировании ресничных структур личинки и взрослой особи.

1.2 Материалы и методы

При выполнении запланированных работ использовалась комбинация классических эмбриологических методов, в сочетании с современными методами экспериментальной биологии развития, высокочувствительных методов специфического иммунохимического маркирования, совмещенной с конфокальной микроскопией, электронно-микроскопические методы.

Объекты исследования. Личинок морских ежей получали индуцированным оплодотворением половозрелых морских ежей *Paracentrotus lividus* L. и *Mesocentrotus nudus*, собранных в природе: в прибрежной зоне залива Петра Великого, Дальний Восток, биостанция «Восток» ННЦМБ ДВО РАН и биологической лаборатории ИБР им. Н.К. Кольцова РАН на Кипре. Животных содержали в аквариумах с аэрируемой морской водой, нерест стимулировали инъекцией в полость тела животных 1–2 мл 0.5 М KCl. Полученные яйцеклетки отмывали профильтрованной через нейлоновый фильтр морской водой и оплодотворяли добавлением нескольких капель разбавленной спермы. Для некоторых экспериментов яйцеклетки ежей перед оплодотворением дехореинизировали 10 мин инкубацией в триазола (1 мг/мл) с последующим пропусканием через нейлоновый фильтр и тщательной отмывкой морской водой. Зародышей (400–2000/мл) инкубировали в профильтрованной морской воде при комнатной температуре (18–23°C) до стадии перехода к активному питанию (36–40 ч, средний плутеус 2). В течение всего периода инкубации суспензию зародышей перемешивали с помощью лопасти из оргстекла со скоростью вращения 60 об/мин, приводимой в движение электромотором или при помощи направленной на поверхность воды воздушной струи из компрессора.

Пресноводных губок проращивали из собранных в природе геммул в чашки Петри с прозрачным дном. Геммулы для исследований получали в достаточном количестве при сборах на заранее определённых точках (местах естественного обитания широко распространённых в европейской России видов *Spongilla lacustris*/*Ephydatia fluviatilis*/*E. muelleri*/*Eunapius fluviatilis*) в октябре 2019 г. и затем содержали в лаборатории в холодильной камере до момента проведения экспериментов. Взрослых морских губок собирали на ББС МГУ им. Перцова, в прибрежной зоне Каспийского моря. Губок содержали в аквариумах с проточной морской водой. Личинок получали или спонтанным выходом, или доставали из тканей взрослых губок аккуратным пипетированием.

Зародышей большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L получали при сборе кладок из культуральной лабораторной культуры моллюсков. Культура половозрелых животных поддерживается в проточной системе аквариумов на базе ИБР РАН. Животных регулярно кормили листьями салата, световой режим 16:8, температура постоянная +22±1°C. Стадии

развития определяли по таблицам нормального развития большого прудовика [12]. Инкубации и наблюдения проводили в пластиковых чашках Петри в объеме 2 мл при постоянной температуре +25°C в термостате. Повышение внутриклеточного уровня серотонина проводили на стадиях раннего дробления (зигота-4 бластомера), полученный эффект анализировали на стадии гастрюлы.

Функциональные эксперименты. Функциональные фармакологические эксперименты проводили с экспериментальными объектами отобранных стадий развития. Инкубирование образцов в растворах целевых веществ позволяло моделировать уровень серотонина и дофамина в клетках экспериментальных образцов: зародышах большого прудовика, личинках морских ежей, в тканях личинок и взрослых губок. Тестировалось действие серотонина, дофамина, их непосредственных биохимических предшественников, а также блокаторов синтеза: параклорфенилаланина (ингибитор триптофангидроксилазы) и гидроксibenзилгидразина (ингибитор декарбоксилазы ароматических аминокислот). Для каждой конкретной модели концентрации действующих веществ подбирались индивидуально и составляли 1-10 мкМ для моноаминов, 100 мкМ - 1мМ – для биохимических предшественников, 10^{-8} - 10^{-6} М – для ингибиторов синтеза. Вовлечение в эффект транскламиназ-опосредованного моноаминирования тестировалось с использованием ингибитора транскламиназы широкого спектра действия – цистамина - в концентрации 2,5-5 мМ. Для предотвращения окисления при длительных инкубациях к растворам добавлялась аскорбиновая кислота. Растворы менялись раз в сутки.

Тестируемые растворы гидрофобных химических соединений готовили в ДМСО, после чего разводили в 10 раз 96% этанолом. Такая процедура способствует увеличению растворимости веществ в солесодержащих средах, в том числе в морской воде. Растворимость исследуемых соединений контролировали с помощью стереомикроскопа МБС-10, позволяющего визуально определять выпадение кристаллов или помутнение инкубационного раствора. Обработку веществами проводили в 6-луночных культуральных планшетах или чашках Петри. В каждую лунку помещали 5 мл суспензии яйцеклеток или зародышей и добавляли соответствующий объем раствора исследуемого вещества для достижения требуемой конечной концентрации. При этом максимальная концентрация растворителя не превышала предельно допустимую (1% для этанола и 0.1% для ДМСО. Отсутствие эффекта таких растворов было многократно доказано ранее).

Для оценки антимиотической активности яйцеклетки морского ежа обрабатывали веществами через 8–15 мин после оплодотворения, и через 2.5 и 5.5 ч регистрировали нарушение и/или остановку дробления. О способности веществ воздействовать на тубулин и дестабилизировать микротрубочки судили по характерному изменению

плавательного поведения бластул, обработанных веществами сразу после вылупления в возрасте 8.5–10 ч. Прекращение прямолинейного плавания зародышей морских ежей у поверхности воды, оседание на дно сосуда и быстрое вращение (спиннинг) вокруг анимально-вегетативной оси является свидетельством антитубулинового механизма действия исследуемых химических соединений. В тестах использовали последовательно понижающиеся в два раза концентрации веществ до исчезновения эффекта. Активность оценивали по наименьшей (пороговой) концентрации ЕС, вызывающей соответствующий биологический эффект.

Морфологический анализ. Трансмиссионная электронная микроскопия. Образцы префиксировали в 0,25% растворе тетроксид осмия, приготовленного на 0,1М какодилатном буфере для пресноводных губок и разбавленном в 4 раза 0,1М буфере для морских (3 мин.). Затем проводили фиксацию 2,5% раствором глутарового альдегида, приготовленного на том же буфере (1 ч.) и постфиксацию 4% раствором тетраоксида осмия (1 ч.) и отмывку в буфере. После этого образцы будут переводили в спирт (30-50-70 %), затем постепенно в ацетон и смолу Spurr. Методики фиксации уже были отработаны нами в ходе предыдущих работ. Смоляные блоки резали на полутонкие (для ориентирования в препарате) и ультратонкие срезы и монтировали на бленды с формваровой подложкой. Затем срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали под трансмиссионным электронным микроскопом (ТЭМ). Особое внимание уделяли строению кинетиды, расположению и числу митохондрий, расположению и форме аппарата Гольджи, структуре внешней мембраны клетки, наличию, расположению и структуре клеточных контактов.

Иммуноцитохимическое маркирование проводили по методике, отработанной для личинок. Образцы фиксировали в 4% параформе, приготовленном на 0,01 М фосфатном буфере для зародышей моллюсков и пресноводных губок и буфере с 10% морской воды для морских губок и личинок морских ежей. Затем образцы отмывали буфером, инкубировали в растворе первичных антител с детергентом Triton, снова отмывали и инкубировали в растворе вторичных антител с флуоресцентными маркерами Alexa. При необходимости присоединяли маркирование актина фаллоидином и ядерными маркерами DAPI/ToTo. Изготовленные тотальные препараты заключали в глицерин.

Для иммунохимического маркирования использовали антитела против серотонина, предшественника серотонина (для выявления специфических элементов серотонинергической системы), дофамина, ацетилированного альфа-тубулина (маркера жгутиков зрелых хоаноцитов и локомоторных ресничек личинок). Для маркирования контуров клеток, длины и формы воротничков хоаноцитных клеток использовали

меченный Alexa 488 фаллоидин. Первичные антитела визуализировали соответствующими вторичными антителами с флуоресцентной меткой Alexa. Ядра клеток подкрашивали DAPI или ToTo, в зависимости от флуоресцентных маркеров вторичных антител.

Анализ препаратов проводили с использованием лазерного конфокального микроскопа (LCSM), что позволило идентифицировать тонкие структуры на всех стадиях развития личинки, взаимное расположение иммунопозитивных элементов. Полученные иммунофлуоресцентные многоцветные препараты исследовали с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и последующим 3D моделированием с помощью оригинального программного обеспечения (Zeiss, Leica, ImageJ). Проведенное двойное и тройное иммуномечение, сочетающее окраску нескольких систем на последовательных стадиях развития, позволило установить паттерн распределения выявленных элементов на ключевых стадиях развития, а также их изменение после определенных фармакологических воздействий.

Статистическая достоверность полученных результатов определялась повторением экспериментов как минимум в трех независимых группах, с последующим стандартным иммунохимическим маркированием, выполнением всех необходимых контролей и анализом полученных препаратов двойным слепым методом.

1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1 Внутриклеточный серотонин как регулятор морфогенеза у пресноводных моллюсков

Серотонин обнаруживается в локальной сети, окружающей созревающие яйцеклетки, в гонадах большого прудовика (рисунок 1А). В процессе созревания позитивная реакция с антителами к серотонину выявляется в цитоплазме яйцеклетки (рисунок 1Б). Повышение уровня серотонина в материнском организме (в определенное время года или фармакологически-индуцированное) приводит к повышению уровня серотонина в формирующихся яйцеклетках и затем в бластомерах (рисунок 2).

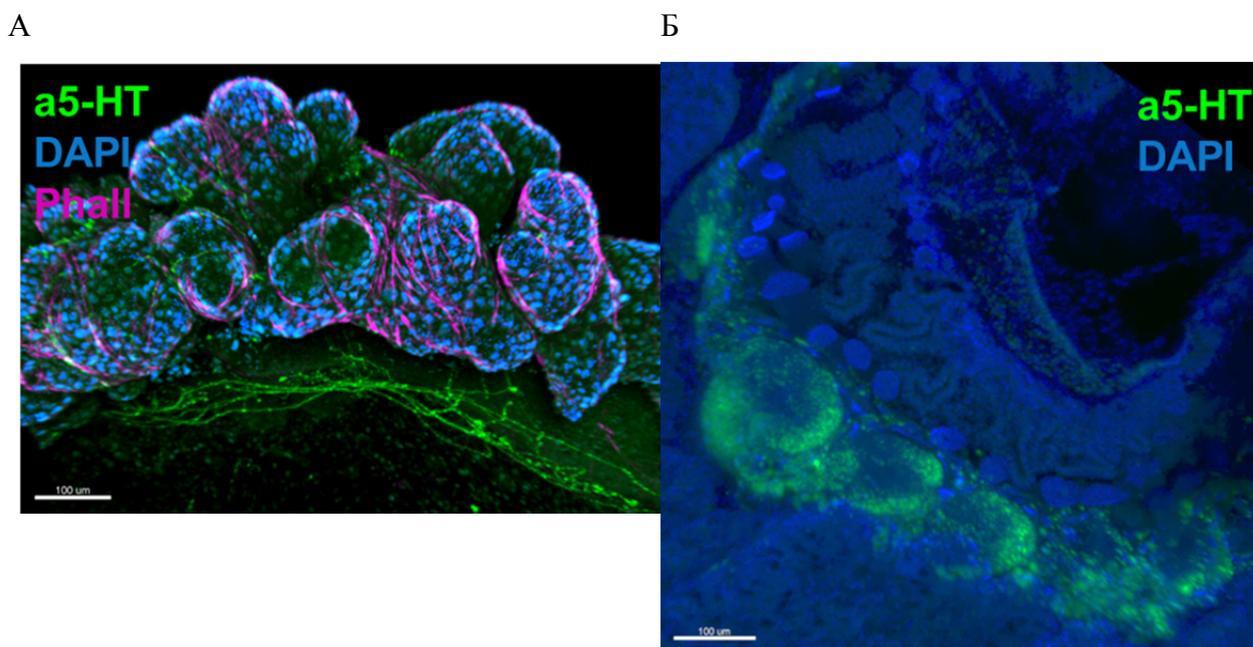


Рисунок 1 - Серотонин в гонадах (А) и формирующейся яйцеклетке (Б) большого прудовика

Позитивная реакция к серотонину показана зеленым, мышцы – мажента, ядра клеток – синим.

Инкубация с 5-НТР увеличивала уровень 5-НТ во всех эмбриональных клетках (рисунок 2) и приводили к необратимым изменениям на стадии гастролы (рисунок 3). При этом не наблюдалось актин-зависимого сокращения апикального полюса клеток, которое обычно является предпосылкой образования бластопора в области региона-организатора (рисунок 3). Кроме того, наблюдалось нарушение дифференцировки клеток, замедление скорости пролиферации, изменение количества контактов и формы клеток вегетативного полюса (рисунок 4).

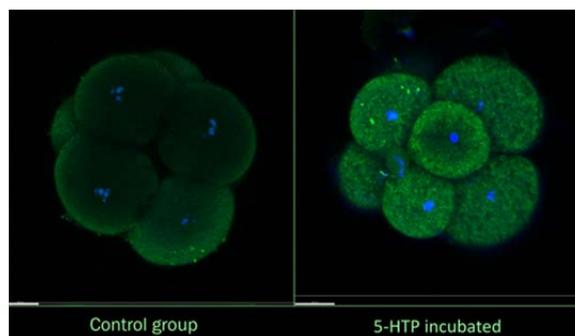


Рисунок 2 - Повышение уровня серотонина (зеленый) во всех бластомерах зародыша при инкубации яиц на стадии раннего дробления в 5-НТФ
Синий – ядра, меченые DAPI.

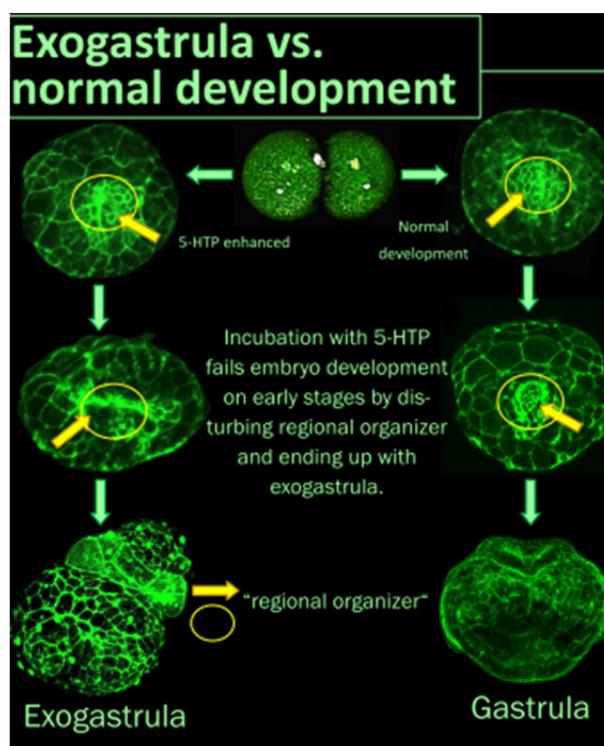


Рисунок 3 - Нарушения в развитии, наблюдаемые при повышении внутриклеточного уровня серотонина на ранних стадиях дробления
Желтым кругом и стрелкой отмечен регион-организатор, в котором наблюдается актин-зависимое сокращение апикальных частей клеток. Зеленый - окрашивание актина фаллоидином, меченым Alexa 488.

Обнаруженные изменения, вызванные внутриклеточным повышением уровня серотонина, приводили к аномальным движениям клеточных слоев во время гастрულიации и последующему образованию экзогастрюлы. Ингибирование транслутаминазы цистамином восстанавливает нормальное развитие, что указывает на участие процесса

серотонилирования в возникновении нарушений морфогенетических движений. Мы предположили, что внутриклеточный серотонин используется как субстрат для транскламиназ-опосредованного серотонилирования. Определение конкретных мишеней модификации: структурные белки (например, актин, белки клеточных контактов) или регуляторные (МАРК, малые GТРаы) – будет являться дальнейшей задачей наших исследований.

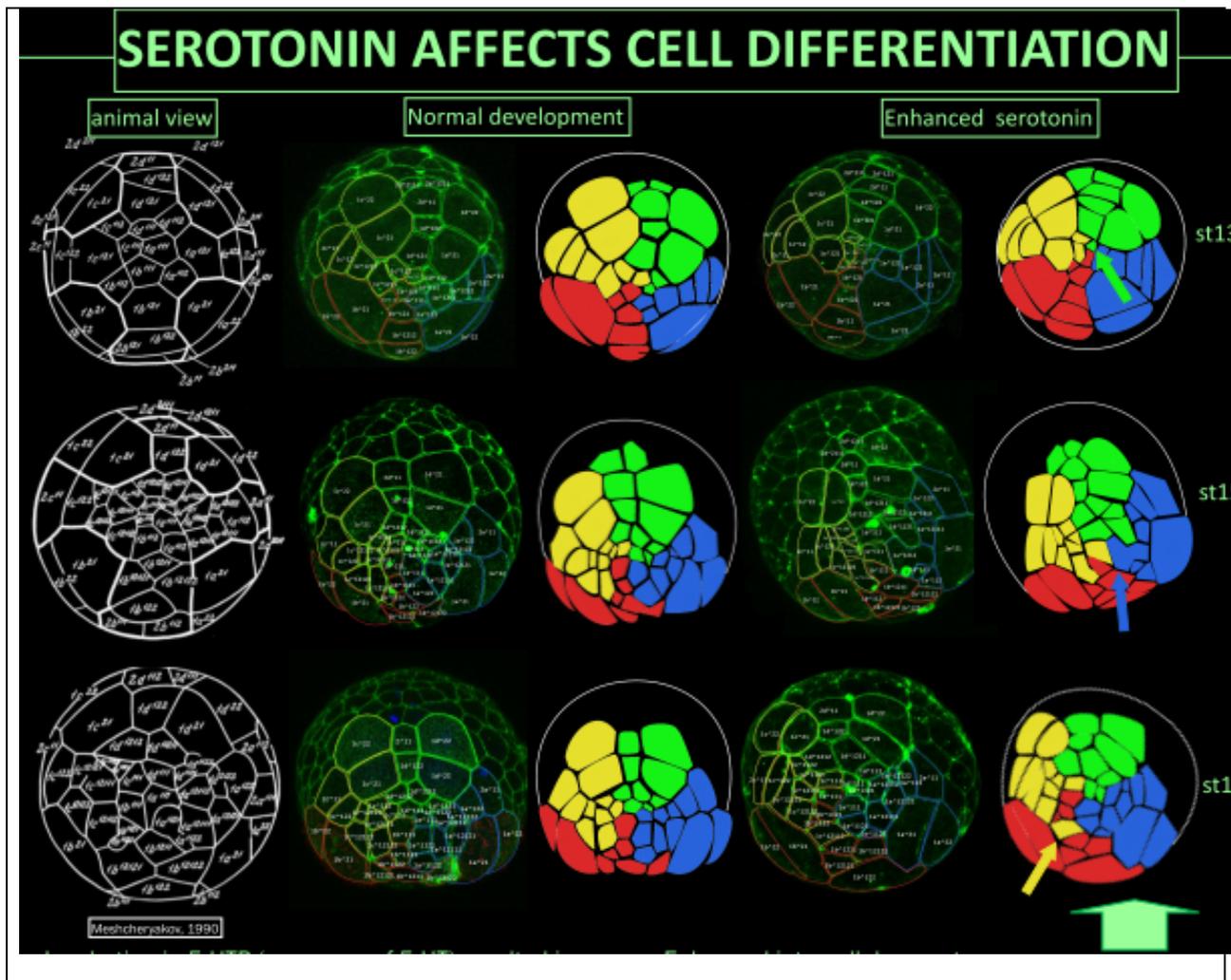


Рисунок 4 - Положение blastомеров в норме и при повышении внутриклеточного уровня серотонина на ранних стадиях дробления

Наиболее выраженные изменения у потомков blastомера С (желтый) и А (синий). Стрелками отмечено смещение blastомеров относительно расположения в норме.

Результаты вошли в базу данных по анатомии животных [13] и были представлены в виде постерного доклада на международной конференции Society for Developmental Biology 79th Annual Meeting.

1.3.2 Структура кинетиды и внутриклеточные моноаминсодержащие структуры у губок

Биоинформационный анализ показал, что в геноме модельной пресноводной губки присутствуют ферменты, необходимые для синтеза моноаминов. При этом наиболее вероятным претендентом оказался дофамин. Серотонин может или синтезироваться при помощи не основного пути синтеза ферментом фенилаланингидроксилазой, или захватываться из среды с помощью транспортера (таблица 1).

Таблица 1 - Элементы пути синтеза серотонина и дофамина в геноме пресноводной губки *Ephydatia muelleri*

Зеленым помечены гены, для продуктов которых доказана роль в синтезе моноаминов.

Step of synthesis	Serotonin (5-HT)		Dopamine	
	Enzyme	Product	Enzyme	Product
First step: amino acid transformations	-	-	phenylalanine hydroxylase PAH	tyrosine
Second step: transformation of amino acid to the precursor	tryptophan hydroxylase	5-HTP	tyrosinase	L-DOPA
	phenylalanine hydroxylase	5-HTP	catechol oxidase	L-DOPA
			tyrosine 3-monoxygenase	L-DOPA
Third step: transformation of the precursor to the monoamine	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	5-HT	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	Dopamine

Молекулярно-биоинформационный анализ, совмещенный с морфологическими данными по строению спикул, показал, что эндемичные губки Каспия имеют пресноводное происхождение, а не морское [14]. По всей видимости, они ведут свое происхождение от космополитичного вида, что может считаться характерным для эндемичных озёрных губок. Это позволяет предположить, что системы синтеза моноаминов сходны в широком ряду различных видов губок, как пресноводных, так и морских форм.

Проведен подробный сравнительно-морфологический анализ структуры кинетид (жгутиковых аппаратов) хоаноцитов губок семейства Oscarella (Homoscleromorpha, Porifera) [15]. По выявленной структуре кинетиды хоаноцитов семейства Oscarellidae четко подразделяется на две группы. В первую группу входят *Oscarella lobularis*, *O. tuberculata*, *O. bergenensis*, *O. viridis*, *O. rubra*, *O. malakhovi*, *O. microlobata*, *O. carmela*, *O. filipoi* и *O. zoranja*. У этих видов ядра расположены базально, без какой-либо связи с кинетосомой. Во вторую группу входят *O. balibaloii*, *O. nicolae*, *O. kamchatkensis*, *O. pearsei*, *O. imperialis* и *Pseudocortidium jarrei*. У представителей этой группы ядра связаны

с кинетосомой (рисунок 5). Морфологическая структура кинетосомы хоаноцитов является важным филогенетическим и диагностическим морфологическим признаком, а также может свидетельствовать о разной роли кинетосомы в регуляции активности жгутика хоаноцита. Однако независимо от расположения ядра, у губок этой группы обнаруживаются серотонин-положительные гранулы в основании жгутика (рисунок 6). Результаты представлены в виде постерного доклада на международной конференции Society for Developmental Biology 79th Annual Meeting.

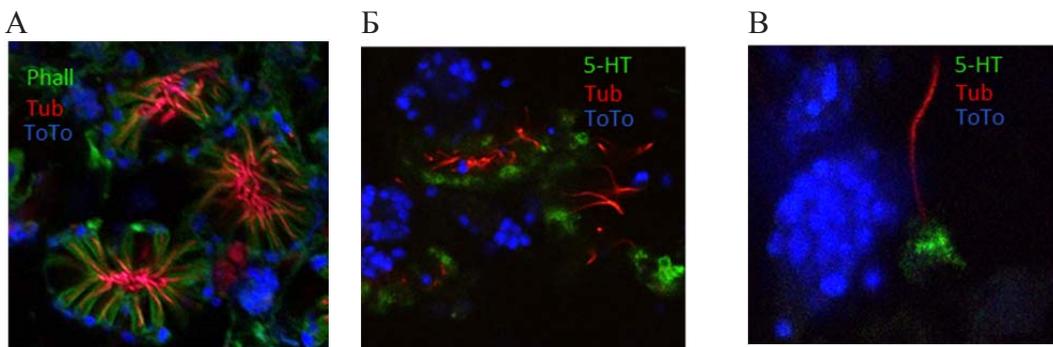
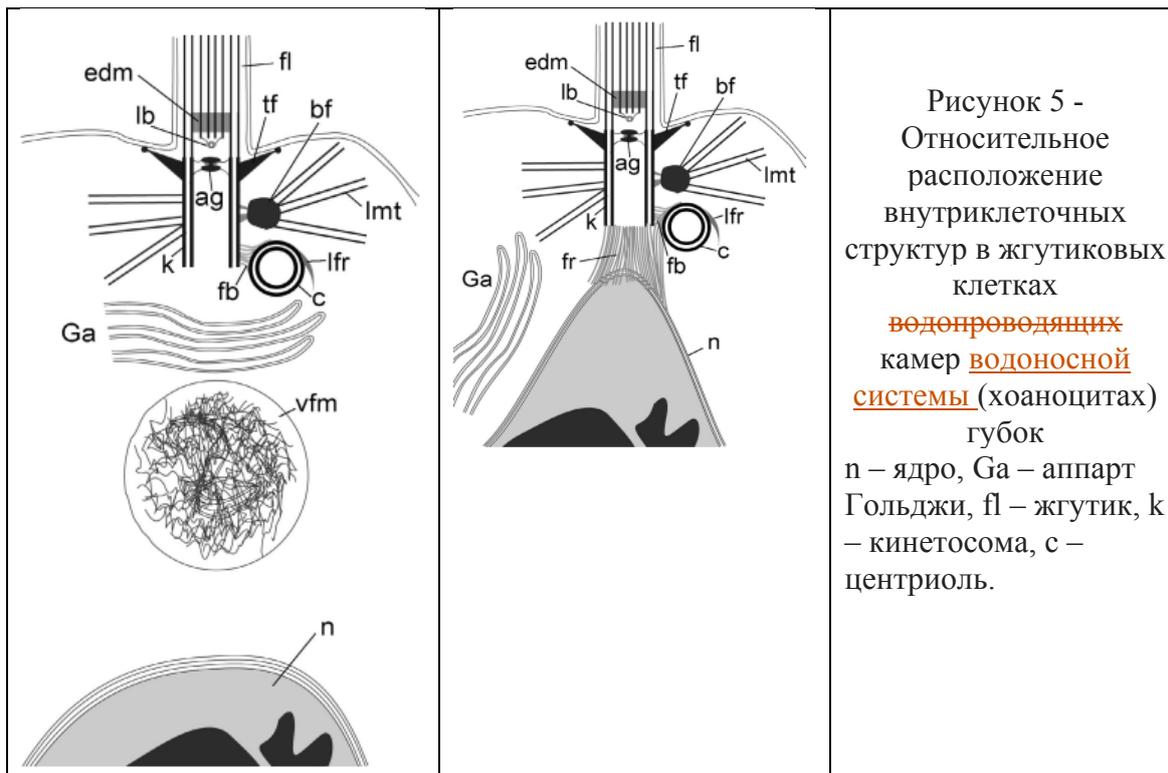


Рисунок 6 - Клетки-хоаноциты объединены в сферические структуры, которые обеспечивают захват пищи из среды посредством биения жгутика
 А - зеленым промаркирован актиновый воротничок хоаноцита, красным – реснички, синим – ядра клеток. Б, В - в основании каждой реснички в каждой клетке хоаноцита находятся серотонин-иммунореактивные гранулы. Зеленым промаркирован серотонин, красным – реснички, синим – ядра клеток.

Провели морфологическое исследование личинок губок, представителей класса *Nomoscleromorpha* и *Calcarea*. Гомосклероморфы – это один из четырех классов губок, считающихся эволюционно продвинутыми, их личинка имеет настоящий эпителий. Калькарееи – это кальциевые губки, у их личинок нет настоящего эпителия, но есть межклеточные контакты. Детальный анализ структуры кинетиды личинок двух близкородственных видов гомосклероморф позволяет предположить, как выглядела предковая кинетида личинок этой ветви губок [16]. Сравнение морфологии кинетиды личинок классов *Nomoscleromorpha* и *Calcarea* и личинок класса *Demospongiae* дает полную информацию о консервативных структурах жгутикового аппарата личинок губок [17]. Сравнение полученных электронно-микроскопических данных и данных иммунохимического маркирования позволяет предположить, что дофамин-иммунопозитивные гранулы, обнаруживаемые у личинок, локализируются именно в аппарате Гольджи (рисунок 7).

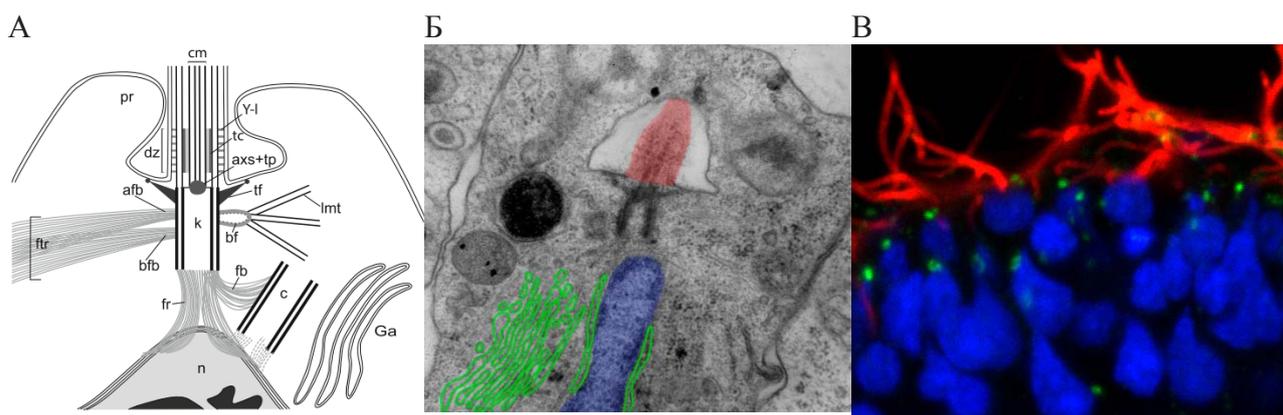


Рисунок 7 - Строение ресничной эпителиальной клетки личинки губки *Eunapius fragilis*. А – схематическое представление о распределении внутриклеточных структур; n – ядро, Ga – аппарат Гольджи, fl – жгутик, k – кинетосома, с – центриоль. Б – электронно-микроскопическая фотография эпителиальной клетки. Синим подкрашено ядро, зеленым – аппарат Гольджи. В – иммунохимическое маркирование антителами к дофамину. Зеленый – дофамин-иммунопозитивные гранулы в основании жгутика, красный – тубулин в жгутике, синий – ядро.

Сопоставление локализации иммунопозитивных гранул и расположения внутриклеточных органелл указывает на аппарат Гольджи, как наиболее вероятное место конденсации ненейрональных внутриклеточных моноамин-содержащих структур.

1.3.3 Эффекты синтетических химических соединений на структуру микротрубочек

С помощью компьютерного моделирования, молекулярного докинга и расчета аффинности связывания была предсказана способность монометоксизамещенных о-дифенилизоксазолов взаимодействовать с колхициновым сайтом тубулина. В ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН были синтезированы соответствующие молекулы, и их антимитотическое действие было подтверждено *in vivo* на модели зародышей морского ежа. Исследованные вещества обладали способностью дестабилизировать микротрубочки, а активность двух соединений была сопоставима с активностью мощного природного антимитотика комбретастина А-4. Проведенные в Национальном институте рака (США) (NCI USA) испытания одного из изоксазолов выявили высокую цитотоксичность по отношению к 60 линиям опухолевых клеток человека. Особенно чувствительными оказались клетки меланомы MDA-MB-435 (рисунок 8).

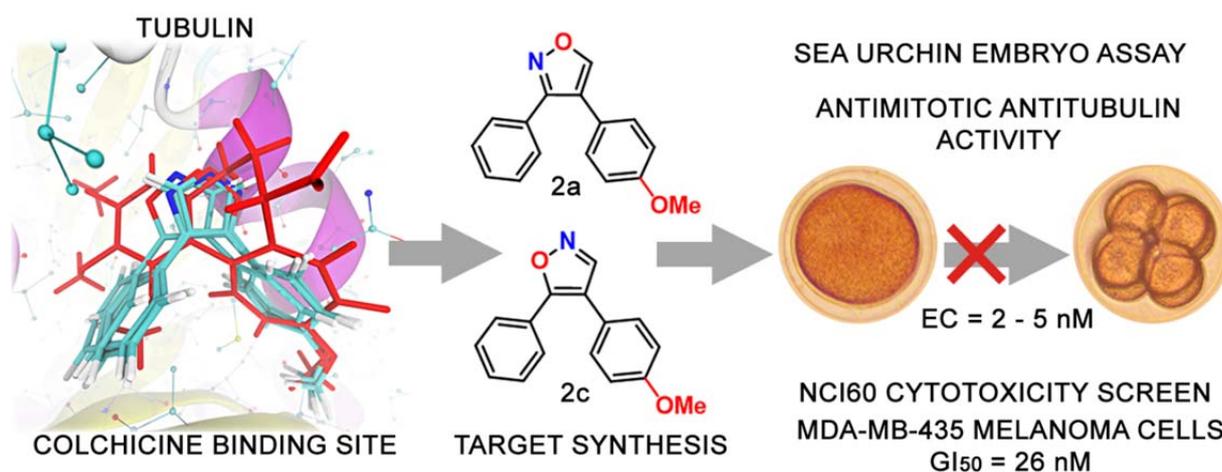


Рисунок 8 - Монометоксизамещенные о-дифенилизоксазолы: взаимодействие с колхициновым сайтом тубулина

Антимитотическая антитубулиновая активность выявлена на зародышах морского ежа, подтверждено ингибирование роста клеток меланомы человека в культуре.

Впервые было показано, что производные комбретастина А-4 с изоксазольным «мостиком» и лишь одним метокси-заместителем являются мощными антимитотиками – дестабилизаторами микротрубочек. Такие молекулы можно рассматривать как перспективные структуры для дальнейшей оптимизации при разработке новых химиотерапевтических лекарственных средств [18].

Ранее было обнаружено, что индолилглиоксиламид индибулин взаимодействует с колхициновым сайтом тубулина, разрушает микротрубочки митотического веретена и нарушает деление клетки с последующей индукцией апоптоза. Индибулин обладает

выраженной цитотоксичностью *in vitro* по отношению к опухолевым клеткам человека, включая клетки с множественной лекарственной устойчивостью, и противораковой активностью *in vivo*. Многообещающие свойства индибулина побудили компанию ZIOPHARM Oncology Inc. начать клинические испытания I/II фазы. Однако эти испытания были прекращены из-за недостаточной эффективности препарата, вероятнее всего, вследствие низкой растворимости индибулина (ссылки на литературные источники приведены в работе [4]). С учетом литературных данных в ИОХ им. Н. Д. Зелинского РАН был проведен синтез производных индибулина с алкильной группировкой, связанной с бисфосфонатным фрагментом, что должно было обеспечить увеличение растворимости в воде (рисунок 9).

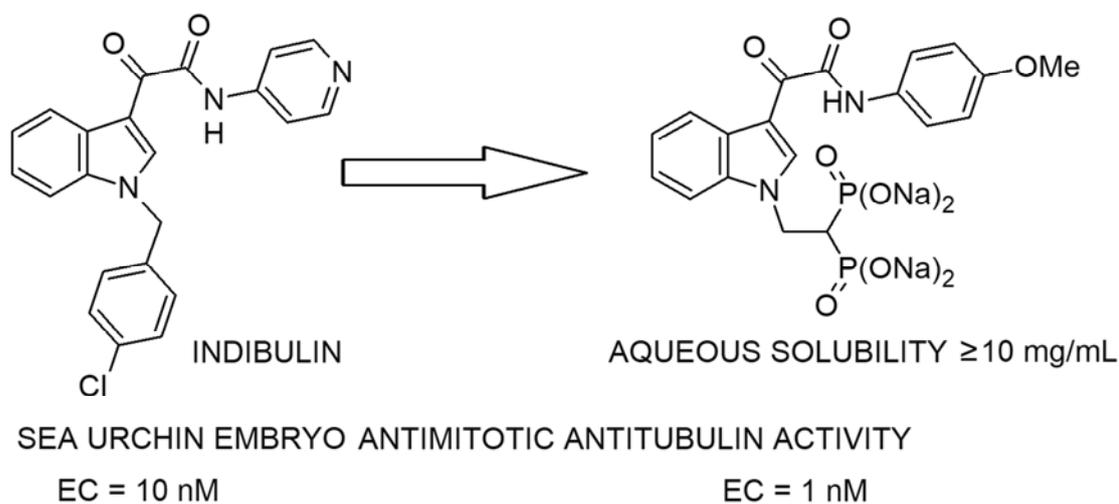


Рисунок 9 - Бисфосфонатное производное индибулина и его биологическая активность, протестированная на зародышах морского ежа

Биологические испытания полученных соединений на модели зародышей морского ежа показали, что при введении в молекулу индибулина бисфосфонатной группы антимитотический антитубулиновый эффект сохраняется. Наиболее активная тетракислота при физиологическом pH образовывала тетранатриевую соль (рисунок 9) с растворимостью в воде не менее 10 мг/мл, то есть примерно на 3 порядка выше, чем у индибулина. Это вещество оказалось более активным, чем индибулин, по отношению к зародышам морского ежа, а также обладало выраженной цитотоксичностью по отношению к клеткам карциномы легкого A549 и меланомы A375 [19].

В Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова были синтезированы трифенилфосфониевые конъюгаты аналогов пиримидиновых нуклеозидов урацила и тимина. Была исследована цитотоксичность полученных соединений *in vitro* по отношению к 7 линиям опухолевых клеток человека. Клетки карциномы простаты DU-145

и меланомы A375 были наиболее чувствительны к трифенилфосфониевым конъюгатам. При этом все протестированные соединения не угнетали рост нормальных фибробластов человека WI-38 и не нарушали развития зародышей морского ежа при добавлении к оплодотворенным яйцеклеткам. Предполагается, что трифенилфосфониевые конъюгаты производных урацила и тимина представляют интерес для дальнейшей разработки в качестве противоопухолевых лекарственных средств [20].

1.4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Walther D.J., Peter J.U., Winter S., Holtje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinckel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm C.S., Ahnert-Hilger G., Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release // *Cell*. – 2003 – Vol. 115, N 7. – P. 851–862.
2. Duerschmied D, Bode C. // The role of serotonin in haemostasis. – *Hamostaseologie*. – 2009 – Vol. 29, N 4 – P. 356-359.
3. Paulmann N., Grohmann M., Voigt J.P., Bert B., Vowinckel J., Bader M., Skelin M., Jevsek M., Fink H., Rupnik M., Walther, D.J. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation // *PLoS Biol.* – 2009. – Vol. 7, N 10. e1000229.
4. Buznikov G.A., Lambert H.W., Lauder J.M. // Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. – *Cell and Tissue Res.* – 2001. – Vol. 305, N 2 – P. 177-186.
5. Бузников Г.А. // Донервные транмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. – *Онтогенез*. – 2007. – Т. 38, N 4 – С. 262-270.
6. Ivashkin E., Khabarova M. Y., Melnikova V., Nezlin L. P., Kharchenko O., Voronezhskaya E. E., Adameyko I. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails. // *Cell Rep.* – 2015. – Vol. 12, N 7. – P. 1144–1158.
7. Дьяконова В.Е. // Нейротрансмиттерные механизмы контекст-зависимого поведения. – 2012. – *Журн. высш. нерв. деят.* – Т.62, N 6 – P. 1-17.
8. Aonuma H., Mezheritskiy M., Boldyshev B., Totani Y., Vorontsov D., Zakharov I., Ito E., 8. Dyakonova V. // The role of serotonin in the influence of intense locomotion on the behavior under uncertainty in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. – *Frontiers in Physiology*. 2020. – Vol. 11. Art. 221.
9. Katow H., Suyemitsu T., Ooka S., Yaguchi J., Jin-Nai T., Kuwahara I., Katow T., Yaguchi S., Abe H. // Development of a dopaminergic system in sea urchin embryos and larvae. – *J Exp Biol.* – 2010 – Vol. 15, N 213 – P 2808-2819.
10. Leys S. P. // Elements of a ‘nervous system’ in sponges. – *J Exp Biol.* – 2015 – Vol. 218 – P. 581-591.
11. Riesgo A., Farrar N., Windsor P.J., Giribet G., Leys S.P. // The analysis of eight transcriptomes from all poriferan classes reveals surprising genetic complexity in sponges. – *Mol Biol Evol.* – 2014 – Vol.31, N 5 – P. 1102-1120.

12. Meshcheryakov V. N. The common pond snail *Lymnaea stagnalis* //Animal species for developmental studies. – Springer, Boston, MA, 1990. – С. 69-132.
13. Зайцева О.В., Воронежская Е.Е.1 «Открытая электронная база данных по нейроморфологии как перспективный ресурс для научных исследований и образовательного процесса»//Вестник РФФИ. Специальный сборник «БИОРАЗНООБРАЗИЕ КАК РЕСУРС: ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ». – 2020. – Т. 2. – Is. 106. – С. 126-134.
14. Sokolova A.M.1, Palatov D.M., Itskovich V.B. Genetic analysis confirms the freshwater origin of the endemic Caspian sponges (Demospongiae, Spongillida, Metschnikowiidae)//ZooKeys. – 2020 – Vol. 915 – P. 1-16.
15. Pozdnyakov I.R., Sokolova A.M.1, Ereskovsky A.V.3, Karpov S.A. The kinetid structure of two oscarellid sponges (Class Homoscleromorpha) unveils plesiomorphies in kinetids of Homoscleromorpha–Calcarea lineage//Invertebrate Biology. – 2020. DOI: 10.1111/ivb.12299.
16. Pozdnyakov I., Sokolova A.1, Karpov S., Ruiz C., Perez Th., Ereskovsky A.3 The kinetid structure of larval cells in two Oscarellid sponges (class Homoscleromorpha) unveils plesiomorphies in kinetids of Homoscleromorpha-Calcarea lineage//Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2020. DOI: 10.1111/jzs.12417. – Q1
17. Sokolova A.1, Pozdnyakov I., Schepetov D.1, Pozdnyakov I., Ereskovsky A.3, Karpov S. Kinetid in larval cells of Spongillida (Porifera: Demospongiae): tracing the ancestral traits//Organisms Diversity & Evolution. – 2020. DOI: 10.1007/s13127-020-00460-1
18. Stroylov V. S., Svitanko I. V., Maksimenko A. S., Kislyi V. P., Semenova M. N., Semenov V. V. Computational modeling and target synthesis of monomethoxy-substituted o-diphenylisoxazoles with unexpectedly high antimitotic microtubule destabilizing activity//Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2020. - Vol. 30. - P. 1276078. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127608.
19. Brel V. K., Oleg I. Artyushin O. I., Chuprov-Netochin R. N., Leonov S. V., Semenova M. N., Semenov V.V. Synthesis and biological evaluation of indolylglyoxylamide bisphosphonates, antimitotic microtubule-targeting derivatives of indibulin with improved aqueous solubility//Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2020. - Vol. 30. - P. 127635. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127635.
20. Strobykina I.Y., Andreeva O.V., Belenok M.G., Semenova M.N.1, Semenov V.V., Chuprov-Netochin R.N., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Dobrynin A.B., Semenov V.E., Kataev V.E. Triphenylphosphonium conjugates of 1,2,3-triazolyl nucleoside analogues.

Synthesis and cytotoxicity evaluation//Med. Chem. Res. - 2020. - Vol. 29. - P. 2203-2217. DOI:
10.1007/s00044-020-02629-x.

РАЗДЕЛ 2 НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТИВНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ОНТОГЕНЕЗЕ МОДЕЛЬНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

2.1 Введение

Данная тема была выделена в отдельное направление в 2020 г, соответственно, представленные результаты отражают начальный период развития этого нового направления исследований. Основное внимание при развитии этой тематики будет уделяться неканоническому механизму действия серотонина – через трансглутаминазопосредованную посттрансляционную модификацию белков.

Традиционно серотонин рассматривают в рамках классического пути его действия - через мембранные рецепторы. Однако в последние десятилетия появились данные о важности неканонических механизмов реализации эффектов серотонина - через его участие в посттрансляционной модификации белков (серотонилировании) [1]. Ковалентное присоединение серотонина к аминокислоте глутамин катализируется ферментом трансглутаминазой (TG) и приводит к структурно-функциональным изменениям в белках (рисунок. 10). С химической точки зрения, серотонилирование это реакция переаминирования между серотонином и остатком глутамина белка. При этом между аминогруппой серотонина и γ -карбоксильной группой остатка глутамина образуется специфическая связь (N- ϵ -(γ -L-глутамин- L-лизиновая)). Помимо серотонина субстратами для TG могут служить аминокислота одного белка и остаток лизина другого белка, а также другие моноамины: дофамин, гистамин, норадреналин [1, 2]. У человека существуют девять генов, кодирующих восемь активных ферментов (TG1-7 и фактор XIIIa), а также один каталитически неактивный белок мембраны эритроцитов. Экспрессия TG2 наблюдается практически во всех тканях, что дает основание предполагать, что именно эта изоформа фермента ответственна за серотонилирование большинства белков [3]. Серотонилирование приводит к структурно-функциональным изменениям в белках.

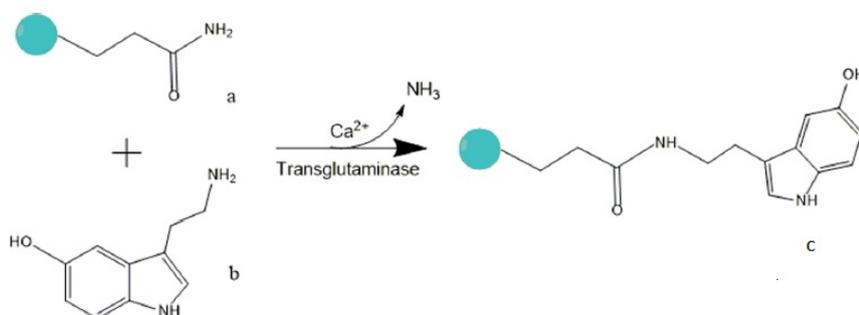


Рисунок10 - Схема реакции серотонилирования
a – остаток глутамина целевого белка, b – моноамин (серотонин), c – серотонилированный белок [3].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что серотонилированию могут подвергаться многие белки организма. Установлено, что серотонилирование некоторых ферментов влияет на их активность, а серотонилирование структурных белков способно изменять их пространственную организацию и физико-химические характеристики. Показано серотонилирование белков внеклеточного матрикса, некоторых ферментов, например, малых GTP-аз. Установлена роль серотонилирования белков в регуляции секреции инсулина, сократимости гладкомышечных клеток, активации тромбоцитов [4]. Обнаружено, что серотонилирование гистона 3 влияет на присоединение к ДНК транскрипционных факторов и, как следствие, на экспрессию генов [5]. Последние исследования, проведенные в нашей лаборатории, впервые показали, что серотонилирование ядерных белков в ранних зародышах беспозвоночных животных участвует в реализации эпигенетических регуляций программы развития и формирования поведенческих паттернов потомства [6, 7].

Несмотря на то, что существует множество работ, свидетельствующих о том, что серотонилирование белков играет огромную роль в физиологических процессах взрослого организма, значение этого процесса в раннем развитии остается малоизученным. Исследовательская группа из нашей лаборатории показала, что серотонилированные белки присутствуют на ранних стадиях эмбриогенеза некоторых групп беспозвоночных (моллюски и иглокожие), а также позвоночных животных (рыбы) [6, 7]. Однако роль серотонилирования белков в раннем развитии млекопитающих не изучена, несмотря на актуальность этой проблемы для биологии развития и современных репродуктивных технологий.

Детекция серотонилированных белков в клетках сопряжена с определенными методическими трудностями. Для этого применяются методы, включающие масс-спектрометрию, использование радиоактивно-меченого серотонина, антител к серотонину, конъюгата серотонина с биотином или клик-реакции с пропаргилированным серотонином с последующим электрофорезом и блоттингом. Для каждого метода характерны свои достоинства и недостатки. В последние годы получил распространение метод с использованием Click-реакции (клик-реакции) между алкильным производным серотонина, 5-PT [5, 8, 9] и азидо-производным метки. Катализатором реакции являются ионы Cu^+ . В качестве метки могут быть использованы различные флуоресцентные красители, биотин или другие молекулы содержащие азидную группу. Преимущества данного метода включают высокую специфичность (реакция происходит только между белком, связанным с 5-PT и азидной меткой), биологическую инертность, стабильность (благодаря образующейся триазольной связи).

В своей работе мы впервые применили описанный метод визуализации серотонилированных белков в тканях семенника и взрослых сперматозоидах крыс для выявления локализации модифицированных белков (рисунок 11).

2.2 Материалы и методы

Животные. В экспериментах были использованы крысы *Wistar* (питомник "Столбовая" РАН). Животных содержали в стандартных условиях с контрольным режимом освещения (свет с 5 до 19 часов). Эксперименты проводились в течение всего года. При выполнении исследований все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике. План экспериментов одобрен Комиссией по биоэтике ИБР им Н.К. Кольцова РАН (экспертное заключение №22 от 15 марта 2018г.). Выделение экспериментального материала выполняли под изофлурановым ингаляционным наркозом.

Получение срезов семенников крыс. Перед иссечением семенников крыс под изофлурановым наркозом перфузировали через сердце физиологическим раствором (0,9 NaCl, $t_{\text{комн}}$), а затем 4% раствором параформальдегида (PAF) на фосфатном буфере (PBS) для удаления крови из сосудов. Выделенные семенники постфиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 2 часов, а затем замораживали и подвергали криотомии (толщина срезов – 10 мкм). В дальнейшем срезы подвергали иммуногистохимическому маркированию.

Выделение и культивирование сперматозоидов крыс. Выделенные в стерильных условиях придатки семенника помещали в чашки Петри диаметром 35мм, содержащие культуральную среду 199 (Биолот, Россия), и измельчали скальпелем. После того, как сперматозоиды вытекали в среду, остатки тканей удаляли, а суспензию пропускали через нейлоновый фильтр (70 μm Falcon, США), промывали средой и центрифугировали (200g, 10 мин, $t_{\text{комн}}$). Полученную суспензию клеток культивировали 2 часа в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10^{-6} М 5-РТ, 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота (Gibco, Великобритания), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США).

В отдельных чашках Петри сперматозоиды культивировали 1) без добавления 5-РТ (контроль), 2) в присутствии 5-РТ и цистамина (ингибитор трансглутаминазы). По окончании культивирования клетки отмывали центрифугированием в растворе PBS,

получали мазки на предметных стеклах, фиксировали 4% PAF 20 мин и в дальнейшем использовали для проведения клик-реакции или иммуногистохимического маркирования.

Клик-реакция. Фиксированные клетки предварительно пермеабилizировали раствором PBS с 0,2% Triton X100 20 мин при комн. температуре, затем промывали PBS. Далее на стекла наливали раствор для клик-реакции, содержащий 0,2 М PBS; 20% ДМСО; 0,5 М Bis-Tris-HCl pH 7.0; 4 мМ аскорбата натрия; azide-Alexa488 10^{-6} М; 4 мМ CuSO₄. Клик реакцию проводили в темноте при $t_{\text{комн}}$ в течение 30 мин. Для удаления ионов меди клетки отмывали 2 раза по 15 мин 0,1 М PBS с 20 мМ ЭДТА и 10% ДМСО. Несвязавшийся избыток метки отмывали PBS с 2% додецилсульфата натрия (SDS) в течение 48-72 часов (под контролем микроскопии). В качестве азидо-производных использовали азид-Alexa488. Полуколичественный анализ интенсивности мечения (интенсивность флуоресценции при использовании флуоресцентной метки) проводили с помощью программы ImageJ. В отдельных экспериментах после клик-реакции проводили иммуногистохимическое маркирование.

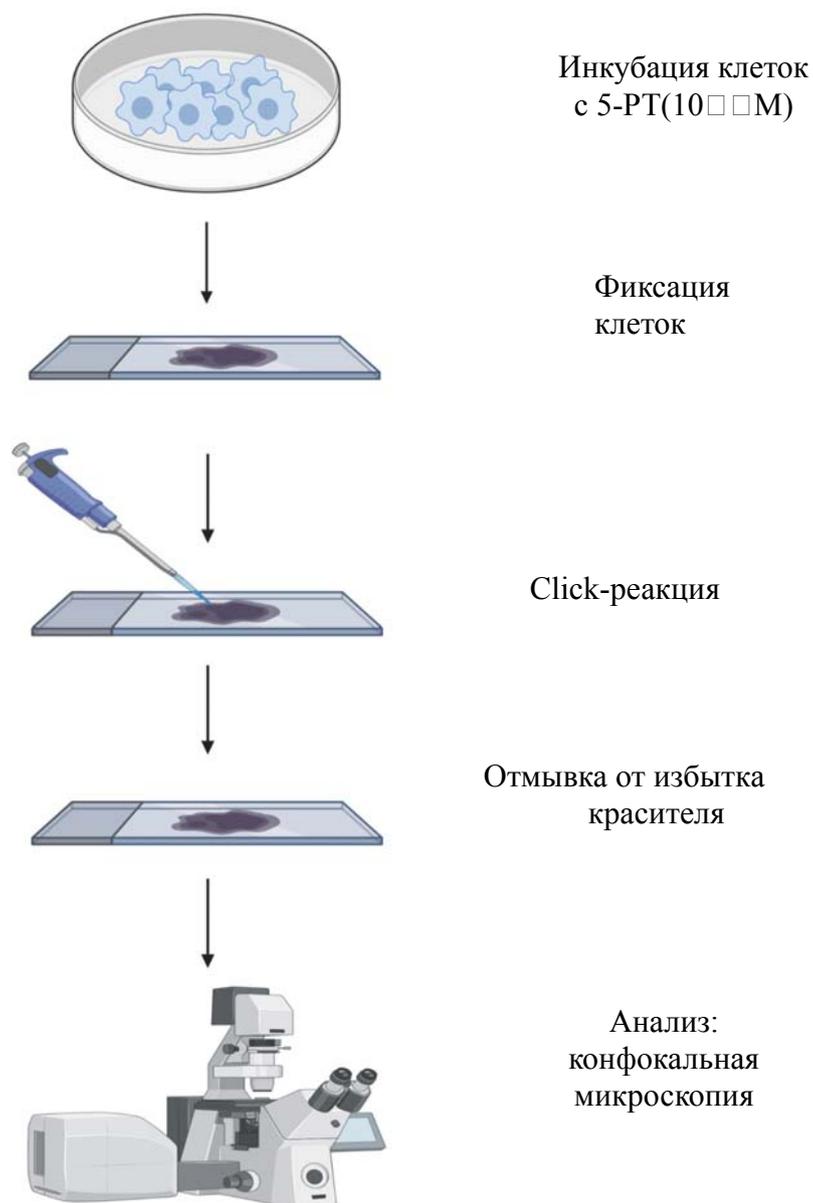


Рисунок 11 - Схема эксперимента по визуализации серотонилированных белков

Иммуногистохимическое маркирование. Были использованы следующие первичные антитела: поликлональные антитела кролика к серотонину (Sigma, 1:2000, и Immunostar, 1:2500), моноклональные антитела мыши к Тубулину (Sigma, 1:4000), моноклональные антитела мыши к N-ε-(γ-L-глутамин-L-лизиновой)-связи (Abcam, 1:150). Для выявления первичных антител были использованы соответствующие вторичные антитела, связанные с разными флюорофорами: антитела овцы к IgG кролика, меченные Alexa488 (Jackson ImmunoResearch, 1:500), антитела козы к IgG мыши, меченные Alexa555 (Jackson ImmunoResearch, 1:1000). Использование первичных антител, произведенных в разных животных, позволяло проводить как одиночное, так и комбинированное

маркирование. Например совместное выявление серотонина и тубулина, SPEC и тубулина, серотонина и N-ε-(γ-L-глутамин-L-лизиновой)-связи.

Срезы или мазки клеток преинкубировали 30 мин в PBS с 0,2% Triton X100 для пермеабиллизации. Затем проводили процедуру демаскирования антигена путем преинкубации: 1) в PBS с 2% SDS 5 мин, 2) в метаноле (50%, 70%, 90%, последовательно по 2 мин). Этот этап необходим для денатурации белков в клетках и лучшего обеспечения доступа для антител. Далее срезы или клетки инкубировали с первичными антителами на PBS с 0,2 Triton X100 и 1% сывороткой плодов крупного рогатого скота (Gibco) в течение ночи при температуре +8°C, и затем в растворе соответствующих вторичных антител в течение 2-х часов при комнатной температуре. По окончании инкубации стекла многократно отмывали PBS, подкрашивали ядра раствором DAPI и заключали под покровное стекло в среде Mowiol (Calbiochem). Для контроля специфичности мечения реакцию проводили в отсутствие первичных антител.

Анализ изображения проводили с помощью конфокального микроскопа Zeiss 880 (Карл Цейсс, Германия) при соответствующих флуорофору настройках возбуждения и эмиссии. Толщина оптических срезов подбиралась таким образом, чтобы обеспечить детализацию всех структур интереса (0,3-0,7 мкм). При комбинированном маркировании яркости в разных каналах подбирались равными друг другу, чтобы обеспечить возможность колокализационного анализа. Колокализационный анализ производился с помощью программного обеспечения ZEN Black (Карл Цейсс, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерных программ Excel и Statistica 7.0. Данные представлены в виде: среднее значение ± стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

2.3 Результаты и обсуждение

Иммуногистохимическое мечение срезов семенников крыс антителами к N-ε- (γ-L-глутамин-L-лизиновой) связи позволило обнаружить модифицированные белки в сперматогенном эпителии извитого канальца семенника крыс (рисунок 12). Наибольшая интенсивность метки наблюдалась на периферии канальцев и во внутреннем слое, соответствующем расположению наиболее зрелых сперматозоидов (рисунок 12).

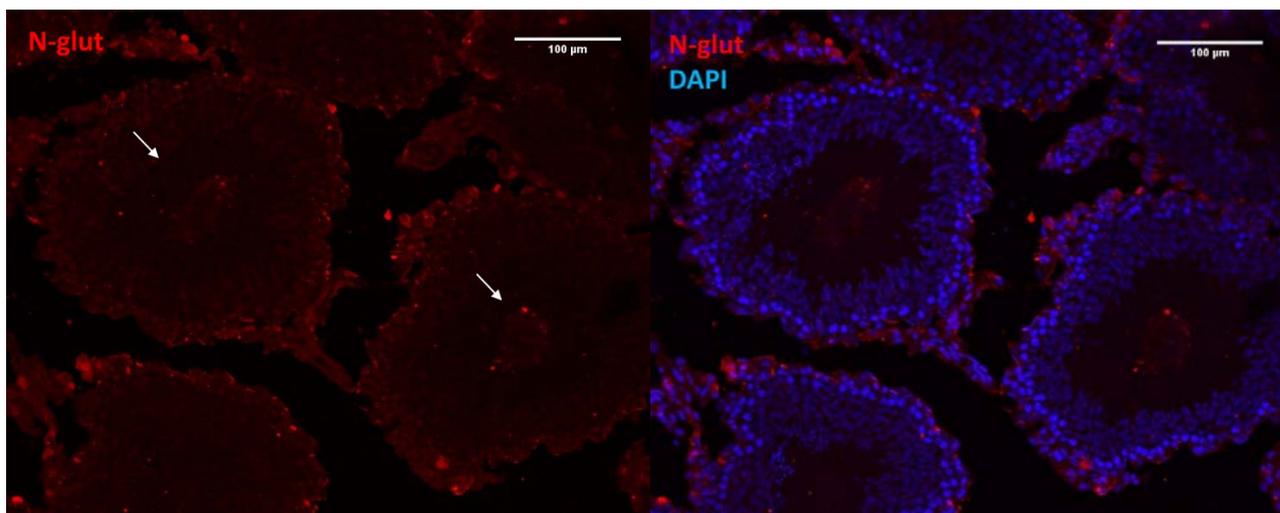


Рисунок 12 - Паттерн распределения белков, модифицированных трансглутаминазой, в семенниках крыс
Иммуногистохимическое маркирование с использованием антител к N-ε-(γ-L-глутамин-L-лизиновой)-связи (N-glut). Ядра окрашены DAPI.

С помощью клик-реакции в изолированных сперматозоидах серотонилированные белки обнаружены главным образом в акросоме и проксимальной части жгутика. В ядрах сигнал отсутствовал (рисунок 13). Иммуногистохимическое мечение антителами к N-ε-(γ-L-глутамин-L-лизиновой) связи и к серотонину выявило аналогичное распределение сигнала (рисунок 14).

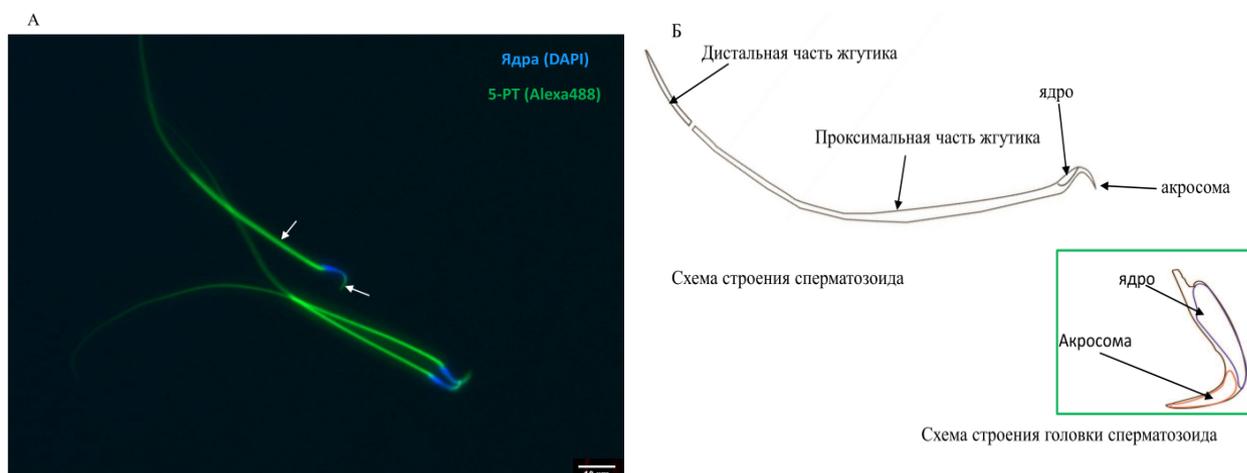


Рисунок 13 - Паттерн распределения серотонилированных белков в сперматозоидах крыс
А - клик-реакция с азид-Alexa488. Ядра окрашены DAPI. Б – схема строения сперматозоида.

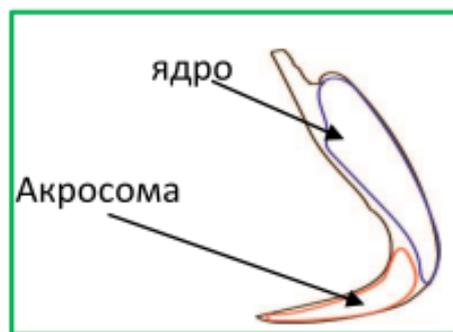
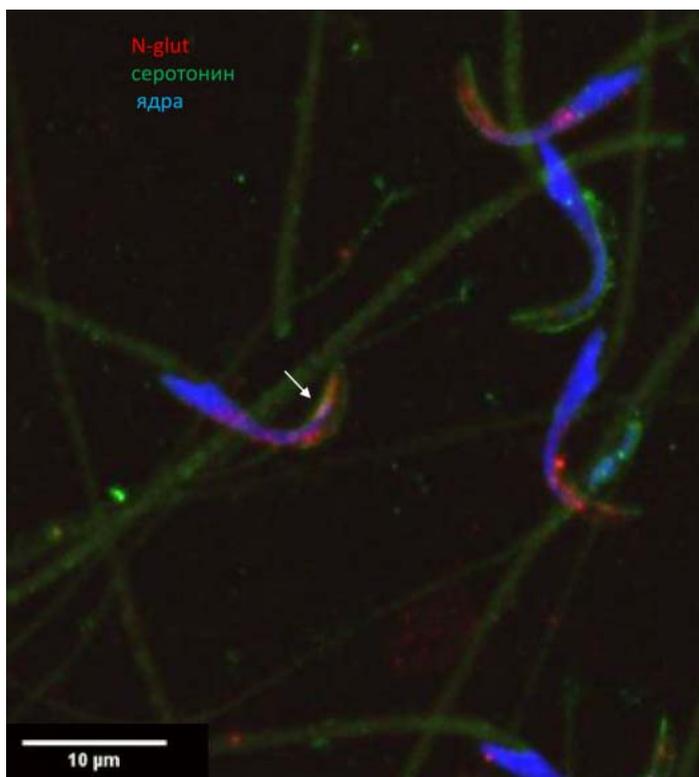


Рисунок 14 - Паттерн распределения серотонина и белков, модифицированных трансглутаминазой, в изолированных сперматозоидах. Ядра окрашены DAPI. Стрелкой отмечена колокализация сигнала.

Специфичность мечения серотонилированных белков с помощью клик-реакции была подтверждена сравнением интенсивности сигнала в норме и при подавлении активности трансглутаминазы. Добавление в среду цистамина (Cyst) достоверно снижало интенсивность флуоресценции (рисунок 15). В контрольных клетках (инкубация без 5-PT) окрашивания не наблюдалось (рисунок 15).

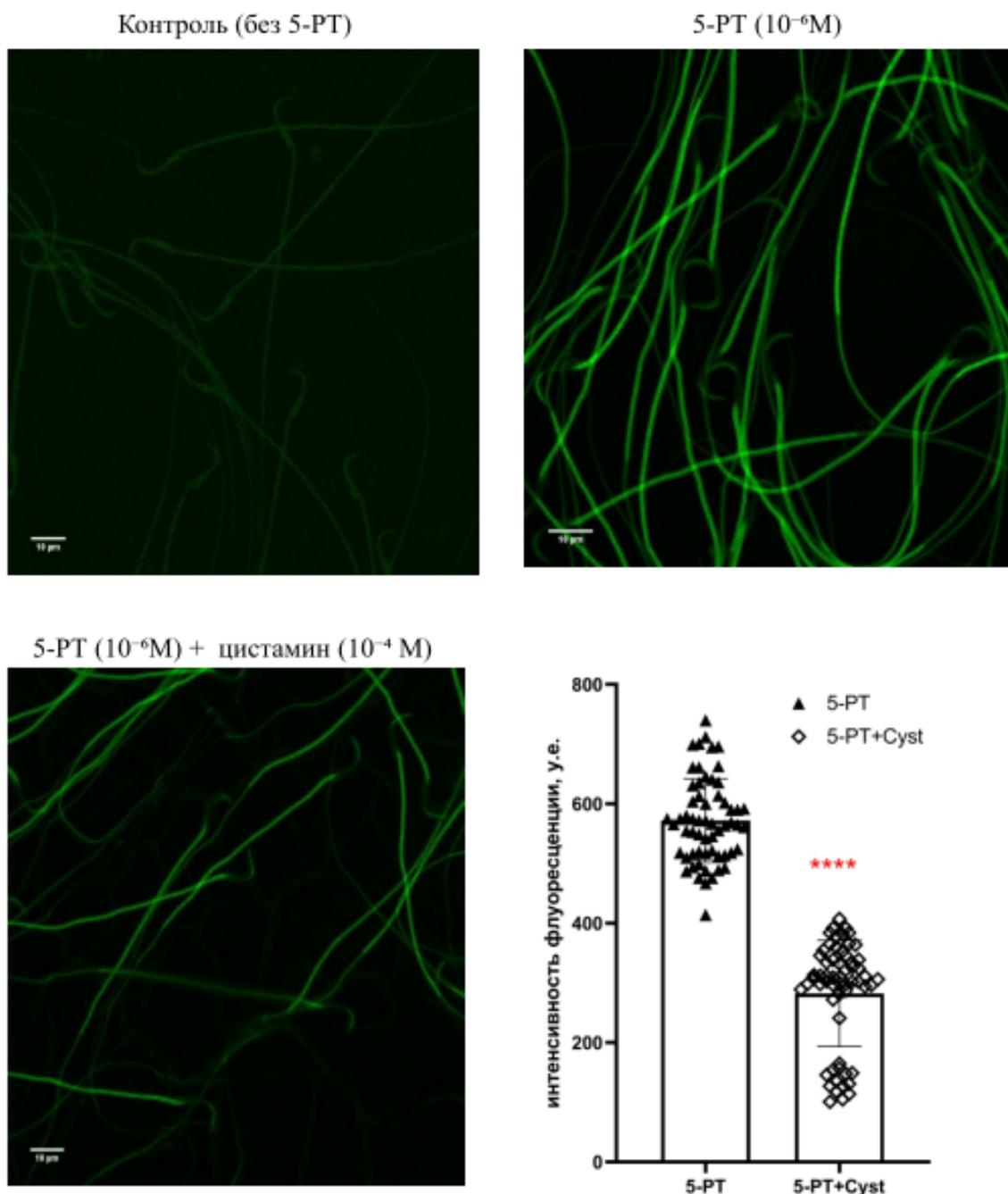


Рисунок 15 - Сравнение интенсивности мечения серотонилированных белков в сперматозоидах в норме и при ингибировании трансглутаминазы цистамином (Cyst) (клик-реакция с азид-Alexa488). **** $p < 0.05$

Таким образом, в процессе работы методика выявления серотонилированных белков с помощью клик-реакции была адаптирована для возможности анализа распределения серотонилированных белков в клетках с помощью микроскопии. Ранее метод клик-реакции применяли для детекции серотонилированных белков с помощью Вестерн-блоттинга, и, как выяснилось, он не был пригоден для микроскопического анализа по причине очень высокого фонового окрашивания. Для решения этой проблемы

в данной работе были подобраны минимальные концентрации 5-РТ и красителей, а также подходящий режим отмывки клеток для получения оптимального соотношения сигнал/шум.

Полученные результаты согласуются с представлениями о том, что серотонин является важным участником в процессах гаметогенеза и раннего развития у млекопитающих. На срезах семенника модифицированные транскляминазой белки были выявлены во внутренней зоне извитого канальца, где находятся наиболее зрелые сперматозоиды, что свидетельствует об участии серотонина в процессах их дифференцировки. Дальнейшее более детальное изучение серотонилированных белков в изолированных сперматозоидах выявило характерный паттерн распределения метки. Серотонилирование было выявлено главным образом в акросомальной части головки и в проксимальной части жгутика. Жгутик сперматозоида можно подразделить на четыре морфологически различимые части: шейка (neck), средняя часть (midpiece), основная часть (principal piece), концевая часть (end piece) [10]. Средняя часть содержит митохондрии вокруг аксонемы, а основная часть волокнистую оболочку (fibrous sheath), состоящую из структурных белков, участвующих в движении жгутика. Концевая часть свободна от вспомогательных структур. Таким образом, именно midpiece и principal piece, находящиеся в проксимальной части жгутика, ответственны за движения сперматозоида [11]. Полученные нами данные о серотонилировании структурных белков с проксимальной части жгутика свидетельствуют о том, что влияние серотонина на движение сперматозоидов может осуществляться не только через взаимодействие с мембранными рецепторами [12], но и посредством посттрансляционной модификации белков, способной изменять их физико-химические свойства. Интересно отметить, что в ядрах сперматозоидов, в отличие от других типов клеток [5, 19], не обнаружены серотонилированные белки. Особенность организации ядра в сперматозоиде заключается в отсутствии транскрипции и высокой степени компактизации хроматина, достигаемой среди прочего заменой ядерных гистонов на протамины [13].

Таким образом, полученные данные впервые демонстрируют наличие серотонилированных белков в гаметах млекопитающих, что может являться цитоморфологической основой для эпигенетических эффектов серотонина в раннем развитии.

Результаты были представлены в виде устного доклада на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» и в виде постерного доклада на международной конференции Society for Developmental Biology 79th Annual Meeting. По результатам готовится статья в рецензируемый журнал.

2.4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Walther D.J., Peter J.U., Winter S., Holtje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinckel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm C.S., Ahnert-Hilger G., Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release // *Cell*. – 2003b. – Vol. 115, N 7. – P. 851–862.
2. Walther D.J., Stahlberg S., Vowinckel J. Novel roles for biogenic monoamines: from monoamines in transglutaminase-mediated post-translational protein modification to monoamination deregulation diseases // *FEBS J*. – 2011. – Vol. 278, N 24. – P. 4740–4755.
3. Muma N.A., Mi Z. Serotonylation and transamidation of other monoamines // *ACS Chem Neurosci*. – 2015. – Vol. 6, N 7. – P. 961–969.
4. Bader M. Serotonylation: serotonin signaling and epigenetics // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2019. – Vol. 12, N. 288.
5. Farrelly L. A., Thompson R. E., Zhao S., Lepack A. E., Lyu Y., Bhanu N. V., et al. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3 // *Nature* – 2019. – Vol. 567, N 7749. – P. 535–539.
6. Ivashkin E., Khabarova M. Y., Melnikova V., Nezhlin L. P., Kharchenko O., Voronezhskaya E. E., Adameyko I. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails. // *Cell Rep*. – 2015. – Vol. 12, N 7. – P. 1144–1158.
7. Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N. R., Obukhova A., Khabarova M. Y. Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates // *ACS Chem. Neurosci*. – 2019. – Vol. 10, N 8. – P. 3888–3899.
8. Lin J.C., Chou C.C., Gao S., Wu S.C., Khoo K.H., Lin C.H. An in vivo tagging method reveals that Ras undergoes sustained activation upon transglutaminase-mediated protein serotonylation // *ChemBioChem*. – 2013. – Vol. 14, N 7. – P. 813–817.
9. Lin J.C., Chou C.C., Tu Z., Yeh L. F., Wu S.C., Khoo K.H., Lin C. Characterization of protein serotonylation via biorthogonal labeling and enrichment // *J. Proteome Res*. – 2014. – Vol. 13, N 8. – P. 3523–3529.
10. Gage M. Mammalian sperm motility.// *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 1998. – Vol. 265, N 1391. – P. 97-103.
11. Gu N., Zhao W., Wang G., Sun F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2019. – Vol. 17, N 1.

12. Fujinoki M. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm // *Reproduction*. – 2011. – Vol. 142, N 2. – P. 255–266.

13. Sidney R., Grimes J.R. Nuclear proteins in spermatogenesis // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1986. – Vol. 83. – P. 495-500.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачи этапа 2020 г темы НИР решены полностью.

Впервые показано наличие нелейрональных моноамин-содержащих структур в ассоциации с подвижной ресничкой (жгутиком) у представителей древнейших многоклеточных – губок. Наличие таких структур как у личинок, так и у взрослых губок, и их концентрация, в аппарате Гольджи, позволяет предположить важное физиологическое значение внутриклеточных моноаминов в функционировании локомоторной реснички. Показано, что повышение уровня моноаминов на ранних стадиях дробления существенным образом нарушает процесс гастрюляции у модельных моллюсков. По всей видимости, затрагиваются сразу несколько систем, принципиально важных для корректного прохождения морфогенетических движений, включая формирование апикального актинового слоя в клетках региона-органаизера, изменение клеточных контактов, скорость клеточных делений. Конкретные механизмы и мишени, вовлеченные в проявление эффектов внутриклеточных моноаминов на регуляцию дробления и онтогенеза ресничных структур у модельных беспозвоночных будут выясняться. Выявленный антимиогенный эффект синтезированных химических соединений указывает на их перспективность для дальнейшей оптимизации при разработке новых химиотерапевтических лекарственных средств.

Отработанный нами метод выявления серотонилированных белков в тканях позволил установить наличие этой посттрансляционной модификации в семенниках позвоночных. Локализация серотонилированных белков в зрелых сперматозоидах указывает на важное функциональное значение внутриклеточных моноаминов в активности сперматозоида. Наличие серотонилированных белков в гаметах млекопитающих было показано впервые и является цитоморфологической основой для проявления эпигенетических эффектов серотонина в раннем развитии, и лежит в основе нейрогуморальных механизмов адаптивной пластичности в онтогенезе позвоночных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

*отчетные публикации

1. *Зайцева О.В., **Воронежская Е.Е.**¹ «Открытая электронная база данных по нейроморфологии как перспективный ресурс для научных исследований и образовательного процесса»//Вестник РФФИ. Специальный сборник «БИОРАЗНООБРАЗИЕ КАК РЕСУРС: ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ». – 2020. – Т. 2. – Is. 106. – P. 126-134. DOI: 10.22204/2410-4639-2020-106-02-126-134. - V
2. *Brel V.K., Artyushin O.I., Chuprov-Netochin R.N., Leonov S.V., **Semenova M.N.**¹, Semenov V.V. Synthesis and biological evaluation of indolylglyoxylamide bisphosphonates, antimetabolic microtubule-targeting derivatives of indibulin with improved aqueous solubility//Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2020. – Vol. 30. – Is. 23. – Art. no 127635. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127635. – Q2
3. *Pozdnyakov I.R., **Sokolova A.M.**¹, **Ereskovsky A.V.**³, Karpov S.A. The kinetid structure of two oscarellid sponges (Class Homoscleromorpha) unveils plesiomorphies in kinetids of Homoscleromorpha–Calcarea lineage//Invertebrate Biology. – 2020. DOI: 10.1111/ivb.12299. – Q2
4. *Pozdnyakov I., **Sokolova A.**¹, Karpov S., Ruiz C., Perez Th., **Ereskovsky A.**³ The kinetid structure of larval cells in two Oscarellid sponges (class Homoscleromorpha) unveils plesiomorphies in kinetids of Homoscleromorpha–Calcarea lineage//Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2020. DOI: 10.1111/jzs.12417. – Q1
5. ***Sokolova A.M.**¹, Palatov D.M., Itskovich V.B. Genetic analysis confirms the freshwater origin of the endemic Caspian sponges (Demospongiae, Spongillida, Metschnikowiidae)//ZooKeys. – 2020 – Vol. 915 – P. 1-16. DOI: 10.3897/zookeys.915.47460. – Q3
6. ***Sokolova A.**¹, Pozdnyakov I., **Schepetov D.**¹, Pozdnyakov I., **Ereskovsky A.**³, Karpov S. Kinetid in larval cells of Spongillida (Porifera: Demospongiae): tracing the ancestral traits//Organisms Diversity & Evolution. – 2020. DOI: 10.1007/s13127-020-00460-1. – Q1
7. *Strobykina I.Y., Andreeva O.V., Belenok M.G., **Semenova M.N.**¹, Semenov V.V., Chuprov-Netochin R.N., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Dobrynin A.B., Semenov V.E., Kataev V.E. Triphenylphosphonium conjugates of 1,2,3-triazolyl nucleoside analogues. Synthesis and cytotoxicity evaluation// Medicinal Chemistry Research. – 2020. – Vol. 29, Is. 12. – P. 2203-2217. DOI: 10.1007/s00044-020-02629-x. - Q4
8. *Stroylov V.S., Svitanko I.V., Maksimenko A.S., Kislyi V.P., **Semenova M.N.**¹, Semenov V.V. Computational modeling and target synthesis of monomethoxy-substituted o-

diphenylisoxazoles with unexpectedly high antimitotic microtubule destabilizing activity//Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2020. – Vol. 30. – Art. no. 1276078. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127608. – Q2

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «29» декабря 2020 г.,
Протокол № 10.