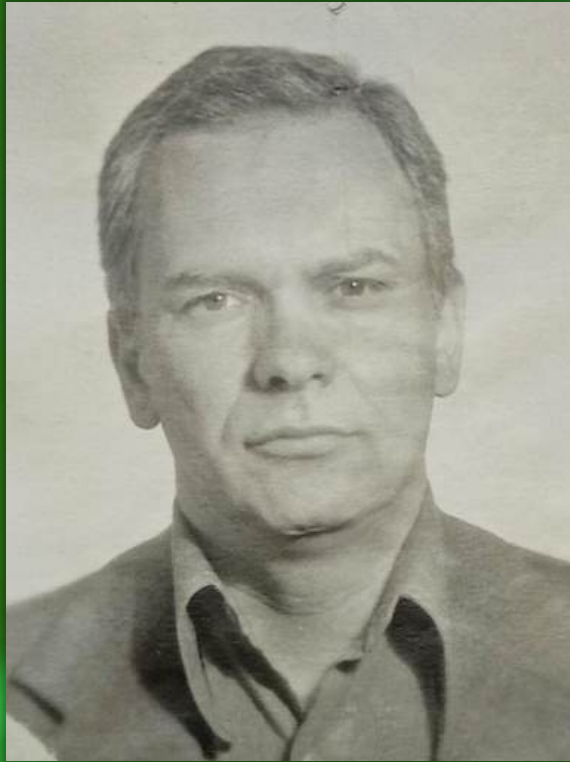


Библиотека Института общей генетики РАН
Отдел Библиотеки по естественным наукам РАН



Личность в генетике
К 60-летию Института общей
генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Платонов Евгений Семенович

Виртуальная книжная выставка к 85-летию со дня рождения

Платонов Евгений Семенович (1941г. – 2018г.)

Окончил в 1964г. 2-ой Московский Медицинский институт и был направлен по распределению в ординатуру Института экспериментальной биологии АМН СССР. Платонов успешно начал работать в новой области медицинской генетики — моделировании наследственных болезней человека, освоил ряд новых методов исследования, проводил экспериментальные исследования по изучению механизмов развития катаракт наследственной этиологии.

В 1966 году поступил в аспирантуру (1966–1969) Института экспериментальной биологии АМН СССР.

С 1969 года Евгений Семенович – сотрудник Института общей генетики АН СССР.

В 1971 г. успешно защитил кандидатскую диссертацию. В диссертации был рассмотрен ряд интересных вопросов, посвященных биохимическому исследованию белкового состава хрусталиков в норме и при катаракте у мышей мутантных линий и человека.

С 1988 г. Платонов - заместитель директора Института по научной работе и ведущий научный сотрудник Лаборатории генетики развития ИОГен РАН.

В 2003 году Евгений Семенович защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук «Модуляция эффектов геномного импринтинга у млекопитающих: Исследования на модельной системе - партеногенетических эмбрионах мышей».

Платонов Е.С. специализировался в области генетики развития млекопитающих, изучал особенности дерепрессии генов в процессах клеточной дифференцировки и морфогенеза млекопитающих, экспрессию генов в процессах детерминации и дифференцировки эктодермальных клеточных клонов в онтогенезе мыши, разрабатывал методы микрохирургии зигот и ранних зародышей млекопитающих, базирующиеся на использовании микроманипуляционной техники.

Совместно с группой ученых Платонов изучал экспрессию кристаллиновых генов после микрохирургической трансплантации ядер клеток зачатка хрусталика 12-дневных эмбрионов в энуклеированные зиготы мыши. В процессе работы ими была разработана новая нетравматичная модификация пересадки ядер в зиготу. Результаты этой разработки оформлены как авторское свидетельство.

Е.С. Платонов – автор более 60 научных работ, опубликованных в нашей стране и за рубежом. В серии исследований им получены важные данные о модулировании эффектов геномного импринтинга при изменении генетической среды, при воздействии деметилирующих ДНК соединений и ростовых факторов, контролирующих ключевые этапы эмбриогенеза. Исследования выполнялись на модельной системе партеногенетического развития эмбрионов мышей, а также на партеногенетических клеточных клонах в составе химерных организмов. За цикл работ, опубликованных в журналах «Онтогенез» и «Генетика» в 1999-2000 гг. Е.С. Платонову, в составе авторского коллектива, была присуждена премия издательства «Интерпериодика».

Платонов принимал активное участие в научно-организационной и общественной работе, являясь заместителем председателя секции Онтогенеза Научного совета по генетике и селекции АН СССР и членом Ревизионной Комиссии ЦС ВОГиС им. Н.И. Вавилова.

Konyukhov, B. V. Soluble lens proteins of mutant stock mice in cataract development / B. V. Konyukhov, E. S. Platonov // *Experimental Eye Research*. - 1971. – Vol. 11, Issue 2. – P. 230-238. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(71\)80027-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(71)80027-1)

Платонов Е.С. Изучение синтеза кристаллинов в хрусталике новорожденных мышей / Е.С. Платонов, Л.П. Евсеев, Б.В. Конюхов // *Биохимия*. – 1975. – Т. 40, № 5. – С. 923-926. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=360732>



Exp. Eye Res. (1971) **11**, 230–238

Soluble Lens Proteins of Mutant Stock Mice in Cataract Development

B. V. KONYUKHOV AND E. S. PLATONOV
Institute of General Genetics, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, U.S.S.R.

(Received 11 May 1970, and in revised form 19 October 1970, Boston)

Changes in soluble proteins of the maturing cataract were studied in mice of the mutant stocks: ocular retardation (gene symbol *or*); white (*M^oW*); fidget (*β*); and dominant cataract-Fraser (*Cat^F*). Crystallin fractions of the normal lens were first identified by polyacrylamide gel electrophoresis. In the course of cataract development in mice of the studied mutant stocks, a diminution or loss of some crystallin fractions was observed. The maturation of secondary cataracts in *or/or*, *M^oW/M^oW*, and *β/β* mice was accompanied by a significant increase in serum albumin, which preceded visible lens opacity. In agar electrophoresis, albumin and α -crystallin were found to migrate together, simulating quantitative maintenance of α -crystallin in the maturing cataract. Another serum protein, electrophoretically similar to transferrin, also penetrated into the lens during cataract development. Maturation of primary nuclear cataract in *Cat^F/Cat^F* mice was not accompanied by increased penetration of serum proteins into the lens. Apparently, penetration of serum proteins into the lens participates in the pathogenesis of secondary subcapsular cataracts, while primary nuclear cataracts have a different etiology.

1. Introduction

The soluble proteins of the mammalian lens are grouped into 3 classes: α -, β - and γ -crystallins (Spector, 1965; Waley, 1969), and each of these subdivided into fractions. Many communications have reported a decrease in the concentration and even disappearance of some crystallin fractions in the process of cataract development in humans and in animals (Waley, 1969). Investigating the development of galactose cataracts in rats, Wittgenstein and Rowe (1963, 1965) discovered an increase in the amount of rapidly migrating fraction of lens protein by agar and polyacrylamide gel electrophoresis. Konyukhov and Wachtel (1963) found changes in soluble lens proteins during cataract formation in mice of mutant stocks "brain hernia" and "recessive cataract", noting an increase in the concentration of the rapidly migrating fractions on polyacrylamide gel. Moser and Gluecksohn-Waelsch (1967), however, reported that electrophoregrams of soluble proteins of cataractous lenses from mice with recessive cataract did not differ from those of normal lenses. They believed that this type of cataract was not due to a change in genes controlling soluble lens proteins, but rather a "secondary" effect of a gene involved in the morphogenesis of the lens capsule. We did not agree with this interpretation and decided to investigate in more detail changes in soluble lens proteins during the maturation of both primary and secondary cataracts in mice. We used the terms "primary" and "secondary" to emphasize different gene manifestations in the development of lens opacities. "Primary" cataract is due to the action of the initial mutant gene in lens cells. "Secondary" cataract develops as a result of heritable abnormalities of other ocular structures or metabolic processes.

Primary cataracts develop in mice with the dominant gene *Cat^F*. In mice of the mutant stock *A/Jax*, Fraser and coworkers (Fraser and Schabttach, 1962; Verruso

230

Volume 69, Number 4
 April 2024

ISSN 0006-2979
 CODEN: BIOCRK

BIOCHEMISTRY (Moscow)

Editor-in-Chief
 Olga A. Dontsova

Pleades Publishing Group
 over 50 years
 in the service of science and education

PLEIADES GROUP OF COMPANIES
 Distributed by SPRINGER NATURE

Т. 40, вып. 5 БИОХИМИЯ 1975

УДК 577.11

ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА КРИСТАЛЛИНОВ В ХРУСТАЛИКЕ НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ

Е. С. ПЛАТОНОВ, Л. П. ЕВСЕЕВ и Б. В. КОНЮХОВ
Институт общей генетики АН СССР, Москва

Хрусталики новорожденных мышей инкубировали в течение различного времени в растворе Хенкса с добавленным смесью С¹⁴-аминокислот. Показано, что синтез γ -кристаллина и субъединиц α -кристаллина начинается уже на первой минуте инкубации. После 5 мин инкубации интенсивность включения С¹⁴-аминокислот в γ -кристаллин в 2 раза выше, чем в α -кристаллин. Сборка тетрамерных молекул α -кристаллина происходит через 5 мин после начала инкубации. Преприбувание хрусталиков с актиномицином D в течение 3 и 6 часов снижало включение С¹⁴-аминокислот только в γ -кристаллин. Это показывает, что синтез γ -кристаллина происходит как на коротко-, так и на долгоживущих иРНК. Субъединицы α -кристаллина синтезируются, вероятно, только на долгоживущих иРНК.

Гены, контролирующие синтез кристаллинов, активируются в клетках зинтелиа хрусталика, в которых белковый синтез идет на короткоживущих иРНК [1–3]. По мере приближения хрусталиковых волокон к их конечной стадии дифференцировки, короткоживущие иРНК замещаются долгоживущими, за счет которых осуществляется синтез белков в глуболежащих хрусталиковых волокнах [3–5]. В хрусталике млекопитающих синтезируется три класса специфических белков: α -, β - и γ -кристаллины [6]. Все три класса белков отличаются друг от друга иммунологически. α -Кристаллин состоит из четырех полипептидных цепей [7], каждая из которых имеет сходную с α -кристаллином иммунологическую специфичность [8]. γ -Кристаллин состоит из одной полипептидной цепи [9] и его молекулярный вес сходен с молекулярным весом полипептидных цепей α -кристаллина [6, 7].

Существуют противоречивые данные о последовательности синтеза кристаллинов. Показано, что в развивающемся хрусталике птиц и регенерирующем хрусталике амфибий первыми синтезируются белки с малым молекулярным весом, у птиц δ - [10, 11], а у амфибий γ -кристаллин [12]. С другой стороны, отмечено, что в клетках зинтелиа хрусталика быка в первую очередь синтезируются крупномолекулярные белки — α -кристаллины [4].

Целью настоящей работы было исследование последовательности и особенностей синтеза кристаллинов в хрусталиках новорожденных мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хрусталики выделали из энуклеированных глаз новорожденных мышей random-бредного разведения. 100 штук хрусталиков инкубировали в течение различного времени в растворе Хенкса, содержащем в 1 мл 5 мкюри смеси С¹⁴-аминокислот с добавлением по 1 мкмолю L-glu(NH₂), L-asn(NH₂), L-thr и L-met. В ряде опытов проводили преприбувание хрусталиков с актиномицином D (30 мкг/мл) в течение 3 и 6 часов или добавляли в инкубационную смесь пурамицин (100 мкг/мл). Хрусталики после инкубации гомогенизировали в 1 мл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,0 и гомогенат центрифугировали при 105 000 g в течение 1 часа для удаления избыточного материала. Белковые экстракты исследовали методом фальтграфии через софадекс G-100 (колонка 1,4×90 см, 0,005 М фосфатный буфер, pH 7,0) и методом хроматографии на ДЭАЭ-цел-

923

Платонов Е.С. Изучение действия мутантных генов на синтез кристаллинов в формирующемся хрусталике мыши / Е.С. Платонов, М.И. Яковлев, Б.В. Конохов // Онтогенез. – 1976. – Т. 7, № 5. – С. 484-489.

<https://viewer.benran.ru/ru/beno1000496377?page=62&rotate=0&theme=white>



ОНТОГЕНЕЗ

Том 7, № 5
1976

УДК 575.113:576.3:591.3

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ НА СИНТЕЗ КРИСТАЛЛИНОВ В ФОРМИРУЮЩЕМСЯ ХРУСТАЛИКЕ МЫШИ.

СООБЩЕНИЕ 1. ГЕН DOMINANT CATARACT-Fr

Е. С. ПЛАТОНОВ, М. И. ЯКОВЛЕВ и Б. В. КОНОХОВ

Институт общей генетики АН СССР, Москва

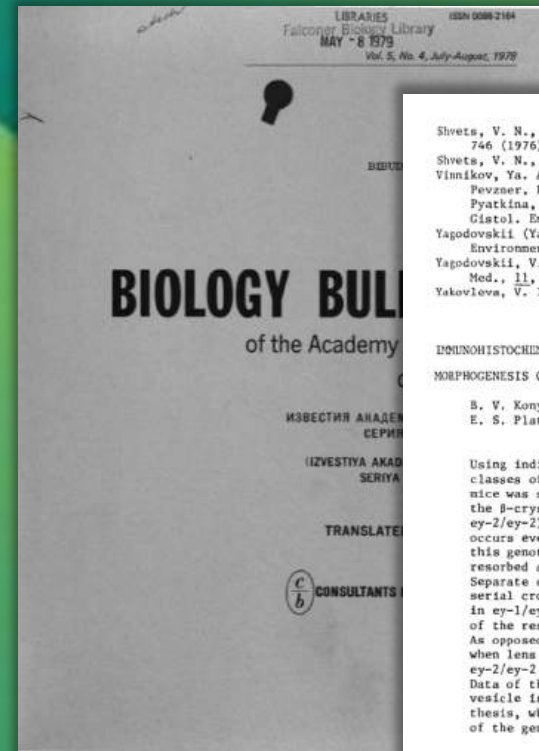
Методами иммунофлуоресценции и электрофореза в полиакриламидном геле изучали начало синтеза, локализацию и содержание кристаллинов в развивающихся хрусталиках 9–13- и 15-суточных эмбрионов мышей генотипов *Cat^{Fr}/Fr* и *+/+*. Показано, что мутантный ген *Cat^{Fr}* не влияет на синтез кристаллинов. Первыми синтезируются α -кристаллины в диплоплазме клеток проксимальной части хрусталикового пузырька (10-суточные эмбрионы). γ -Кристаллины впервые выявляются у 11-суточных эмбрионов в цитоплазме формирующихся хрусталиковых волокон, утративших способность к делению.

В хрусталике млекопитающих синтезируется 3 класса тканеспецифических белков: α -, β - и γ -кристаллины, каждый из которых отличается иммунологически друг от друга. В хрусталике взрослой мыши, как было показано методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержится 13 фракций кристаллинов: 2— α -, 7— β - и 4— γ -кристаллинов (Конохов и Платонов, 1971). Методом иммунофлуоресценции установлено время появления и локализация кристаллинов в развивающемся хрусталике мыши (Van de Kamp & Zwaan, 1973). Барабанов с соавторами (1974) показали, что отдельные белки каждого класса кристаллинов, характерных для птиц и млекопитающих, появляются в течение короткого периода формирования и отщипования хрусталикового пузырька от покровного эпителия головы.

У мыши известен ряд мутантных генов, которые нарушают развитие хрусталика в результате непосредственного действия в его клетках или первичного поражения других структур глаза. В частности, ген *arkia* (символ гена *ak*) вступает в действие на 10-е сутки эмбрионального развития в клетках хрусталикового пузырька. У мутантных эмбрионов развитие хрусталика останавливается на этой стадии, хрусталиковые волокна не образуются, а полость хрусталикового пузырька заполняется вышедшими из его стенок клетками (Varnum & Stevens, 1968). Зваан (Zwaan, 1975) при помощи непрямого метода иммунофлуоресценции установил, что в клетках ненормально формирующегося хрусталика у эмбрионов мышей генотипа *ak/ak* кристаллины отсутствуют. Мутантный ген *dominant cataract-Fr* (символ гена *Cat^{Fr}*) включается в действие у гомозигот несколько позднее. Электронно-микроскопическое изучение показало, что наиболее ранним проявлением данного мутантного гена являются ультраструктурные изменения ядерной оболочки первичных хрусталиковых волокон у 12-суточных эмбрионов (Конохов и Колесова, 1976). К 14-м суткам эмбрионального развития в центральной зоне хрусталика мутантных эмбрионов появляются пикнотические

Immunohistochemical study of crystallin synthesis during morphogenesis of the crystalline lens in mice / B. V. Konyukhov, N. A. Malinina, E. S. Platonov, M. I. Yakovlev // Biology Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. – 1978. – Vol. 5, No. 4. – P. 397-405.

https://books.google.ru/books?id=ZAtLAQAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=ru&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false



Shvets, V. N., and Portugalov, V. V. *Aviation, Space and Environmental Medicine*, **47**, No. 7, 746 (1976).
Shvets, V. N., and Portugalov, V. V. *Byull. Eksp. Biol. Med.*, **83**, No. 2, 238 (1977).
Vinnikov, Ya. A., Gazenko, O. G., Titova, L. K., Bronshtein, A. A., Govardovskii, V. I., Pevzner, R. A., Gribakin, F. G., Aronova, M. Z., Kharkevich, T. A., Tsirulnik, T. P., Pyatkina, G. A., Lychakov, D. V., Pal'mbakh, L. R., and Anichin, V. F. *Arkh. Anat., Gistol. Embriol.*, **74**, No. 1, 22 (1978).
Yagodovskii (Yagodovsky), V. S., Trifanidi, L. A., and Gorokhova, G. P., *Aviation, Space and Environmental Medicine*, **47**, No. 7, 734 (1976).
Yagodovskii, V. S., Trifanidi, L. A., and Gorokhova, G. P., *Kosm. Biol. Aviakosmicheskaya Med.*, **11**, No. 1, 14 (1977).
Yakovleva, V. I. *Arkh. Anat., Gistol. Embriol.*, **73**, No. 10, 39 (1977).

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF CRYSTALLIN SYNTHESIS DURING MORPHOGENESIS OF THE CRYSTALLINE LENS IN MICE

B. V. Konyukhov, N. A. Malinina,
E. S. Platonov, and M. I. Yakovlev

UDC 575.113:576.3:591.3

Using indirect immunofluorescence, the sequence of the synthesis of various classes of crystallins during normal morphogenesis of the crystalline lens in mice was shown: The α - begin to be synthesized first, then the γ -, and finally the β -crystallins. Using mice with hereditary anophthalmia (genotype *ey-1/ey-1 ey-2/ey-2*) permitted it to be established that the synthesis of α -crystallins occurs even when there is no morphogenesis of the crystalline lens. In mice of this genotype, the lens placode, which is reduced as compared to the norm, is resorbed as a rule, and does not develop into the crystalline lens vesicle. Separate cells containing α -crystallins were found in cranial epithelium on serial cross sections of the eye area of 13-day-old mutant embryos. Consequently, in *ey-1/ey-1 ey-2/ey-2* embryos, α -crystallin synthesis takes place even in cells of the resorbed lens placode after brief inducing influence of the optic vesicle. As opposed to α -crystallins, synthesis of γ - and β -crystallins is detected only when lens fibers have formed. This is characteristic for embryos of *ey-1/ey-1 ey-2/ey-2* genotype, as well as for mouse embryos homozygous for the *fr* gene. Data of the present work indicate that the inducing influence of the optic vesicle is necessary for activation of the genes controlling α -crystallin synthesis, while the influence of the retinal rudiment is necessary for derepression of the genes for γ - and β -crystallin synthesis.

The formation of the crystalline lens in mammals begins with thickening of the cranial ectoderm above the optic vesicle; as a result, the lens placode forms, which backs up into the eye cavity and joins the vesicle. After the separation of the lens vesicle from the cranial ectoderm, the cells of its proximal wall, which are adjacent to the retinal rudiment, elongate and form the primary lens fibers. The anterior (distal) wall of the lens vesicle gives rise to the lens epithelium; because of the multiplication and differentiation of the epithelial cells, formation of secondary lens fibers and growth of the crystalline lens occur. The formation of the complicated structure of tissue-specific proteins (crystallins) of the crystalline lens is associated with the passage of specific stages of morphogenesis, particularly with differentiation of lens fibers. Three classes of tissue-specific proteins are contained in the crystalline lens of mammals: α -crystallins, which feature a tetrameric structure and a molecular weight of 1,000,000; γ -crystallins, with a molecular weight of 20,000 and which are described as one polypeptide chain; and the most heterogeneous class, the β -crystallins, with a molecular weight from 50,000 to 500,000. All of these classes of

Institute of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow. Translated from *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Biologicheskaya*, No. 4, pp. 507-517, July-August, 1978. Original article submitted March 13, 1978.

Yakovlev, M.I. Activation of genes of γ - and β -crystallins in morphogenesis of the mouse lens / M.I. Yakovlev, E.S. Platonov, B.V. Konyukhov // Bull Exp Biol Med. – 1981. - V. 92. – P. 1427–1429. <https://doi.org/10.1007/BF00827498>

Effect of opioids on development of preimplantation mouse embryos / A.E. Kalyuzhnyi et al. // Bull Exp Biol Med. - 1989. – V. 108. - P. 1654–1655. <https://doi.org/10.1007/BF00839716>

EXPERIMENTAL GENETICS

ACTIVATION OF GENES OF γ - AND β -CRYSTALLINS IN MORPHOGENESIS OF THE MOUSE LENS

M. I. Yakovlev, E. S. Platonov,
and B. V. Konyukhov

UDC 575.113:576.3:591.3

KEY WORDS: activation of genes; morphogenesis; lens; crystallins.

The anlage of the lens (the placode) arises from cells of the cranial ectoderm as a result of the inductive action of the entomesoderm and optic vesicle on them, and the influence of the retina is necessary for the formation of fibers of the developing lens [3, 5]. In chick embryos the RNA for the δ -crystallins appear for the first time in the lens ectoderm 8–9 h after the beginning of induction by the optic vesicle [10]. However, the connection of induction with activation of the genes of the crystallins has not been studied in mammals. In the developing mouse lens, α -crystallins are synthesized first in cells of the proximal wall of the newly formed lenticular vesicle, whereas synthesis of γ - and β -crystallins begins later – in the primary lenticular fibers [2, 4, 8]. The discovery of synthesis of α -crystallins in mouse embryos of the mutant eyeless line, in which development of the lens ceases as a rule at the placode stage, indicates derepression of the genes of these proteins at the stage of formation of the lens placode [2]. One approach to determination of gene activation time is by studying the effect of inhibition of transcription by actinomycin D on the development of a certain trait [6]. The manifestation of gene effect after treatment with actinomycin D indicates that activation of the gene (genes) took place before the inhibitor was used.

The object of this investigation was to study expression of the genes of γ - and β -crystallins in anlagen of the mouse lens cultured after treatment with actinomycin D.

EXPERIMENTAL METHOD

Mouse embryos of inbred line CC57BR at the age of 10.5 days were divided into three groups, depending on the stage of development of the lens, defined on the basis of the degree of pigmentation of the outer layer (POL) of the optic cup. During this period of embryogenesis POL, starting on the dorsal aspect of the optic cup, gradually spreads to the ventral part. As a preliminary histological investigation showed, POL corresponded to the following stages of morphogenesis of the lens: the lens vesicle with walls of equal thickness (1/3 POL), the proximal wall of the lens vesicle 1.5 times thicker than the distal wall (1/2 POL), the proximal wall twice as thick as the distal wall (2/3 POL). The lenses were isolated from the eyes treated with 0.02% versene solution, and cultured in medium consisting of 60% Eagle's medium with glutamine, 20% homologous embryonic extract, and 20% inactivated embryonic calf serum, in an atmosphere containing 5% CO₂. Analogen of the lenses were treated for 1 h with actinomycin D in a dose of 1 μ g/ml which, as was shown by autoradiography, completely inhibits RNA synthesis. The nutrient medium was then changed and the lenses were cultured for 15, 18, or 20 h. After culture of the lenses, crystallins were determined in them by the indirect immunofluorescence method, using antibodies against γ - and β -crystallins obtained by the methods described previously [2, 4]. In control experiments the lenses were cultured without treatment with actinomycin D.

EXPERIMENTAL RESULTS

Cytological analysis of the 10.5-day embryos showed that dividing cells were present in the proximal wall of the lens vesicle in all cases. At the stage of development when the

Laboratory of Phenogenetics, Institute of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow. (Presented by Academician of the Academy of Medical Sciences of the USSR N. P. Bochkov.) Translated from *Byulleten' Éksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, Vol. 92, No. 10, pp. 482–484, October, 1981. Original article submitted April 15, 1981.

EFFECT OF OPIOIDS ON DEVELOPMENT OF PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYOS

A. E. Kalyuzhnyi, E. S. Platonov,
O. V. Mironova, and G. T. Sukhikh

UDC 612.631.014.46:615.31:
[547.95:547.943]

KEY WORDS: preimplantation development; agonists and antagonists of opiate receptors

Endogenous opioid peptides are distributed not only in the CNS, but also in sex cells: molecules of Met-enkephalin [2] are distributed on the surface of human spermatozoa and the follicular cells surrounding the oocyte containing β -endorphin [4]. β -Endorphin also is present in endometrial cells, from which it is secreted during implantation [7]. It has been shown that hamster embryos at the 2–4-cell stage contain the tetrapeptide kerstin, which possesses opioid-like activity when injected into an animal's brain [1]. It is not yet clear, however, how opioid compounds act on preimplantation embryos.

The aim of this investigation was to study the sensitivity of mouse embryos, developing in vitro, to the mu-opiate receptor agonist D-Ala²-N-Me-Phe³-oi-enkephalin (DAGO), the delta-opiate receptor agonist D-Ala²-D-Leu³-enkephalin (DADL), and naloxone, an antagonist of mu-, delta-, and kappa-receptors.

EXPERIMENTAL METHOD

Early CRA mouse embryos were used. Single-cell embryos were taken from the oviduct on day 0 of pregnancy, i.e., on the day when a vaginal plug was found. After removal of the cumulus cells with a 0.1% solution of hyaluronidase ("Reanal," Hungary) the embryos were washed out 4 times in Dulbecco's medium and transferred to Whitten's medium in the modification of Hoppe and Pitts [3], saturated with a mixture of 90% N₂ + 5% O₂ + 5% CO₂, and incubated in an ultrathermostat (37°C). The number of late morulas and blastocysts was determined on the 4th and 5th days. The opioids DAGO, DADL, and naloxone were from "Sigma" (USA). Results of one of five experiments in each of which no fewer than 10 embryos developed in the presence of a particular opioid are described.

EXPERIMENTAL RESULTS

The opioid compounds were found to inhibit development of the embryos (Fig. 1). Of all the opioids tested, the mu-, delta-, and kappa-receptor antagonist naloxone had the strongest action: after its addition to embryos at the "zygote" stage in a concentration of 3×10^{-5} M until the "late morula-blastocyst" stage only 6.7% of embryos developed, which is 13.1 times fewer than in the control ($p < 0.001$).

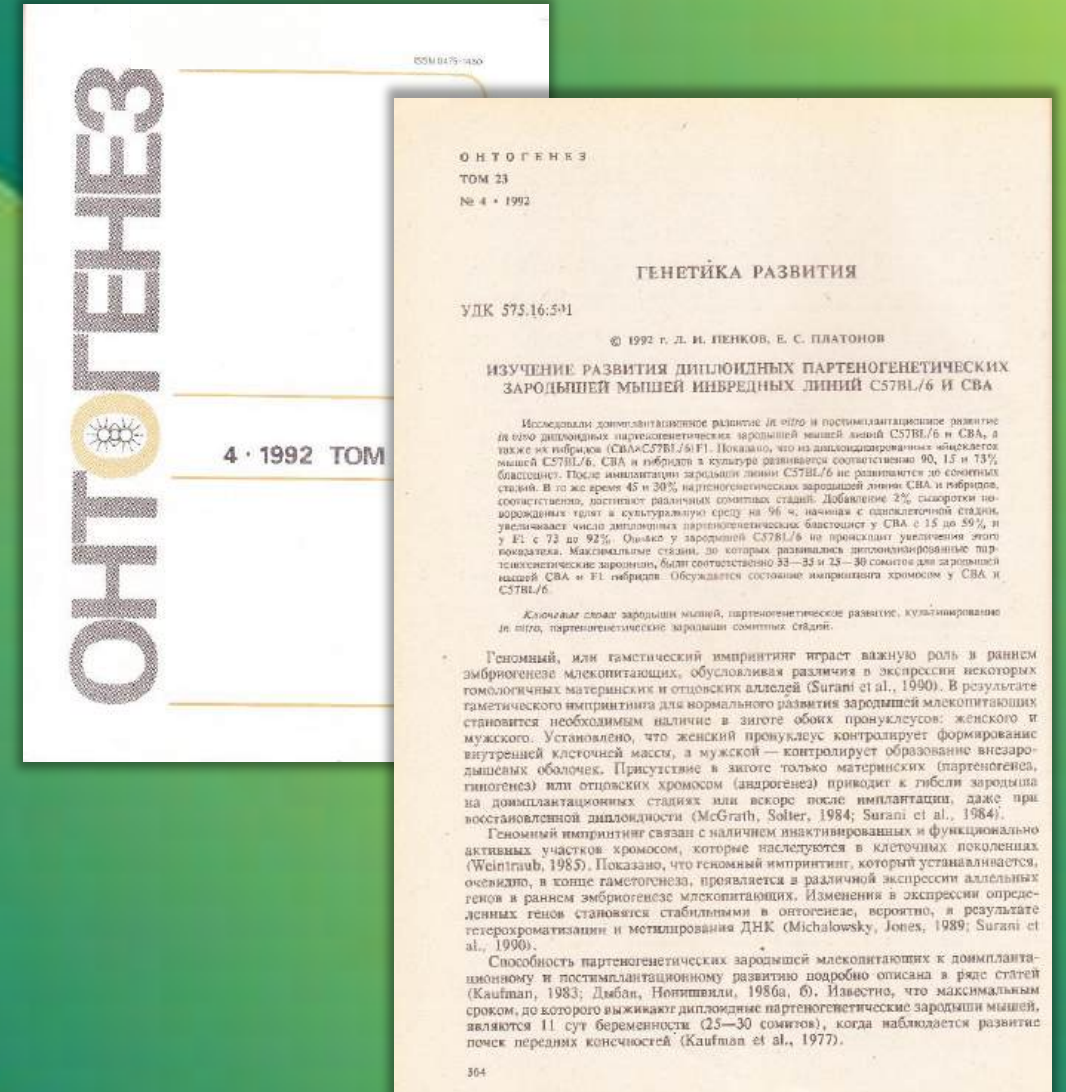
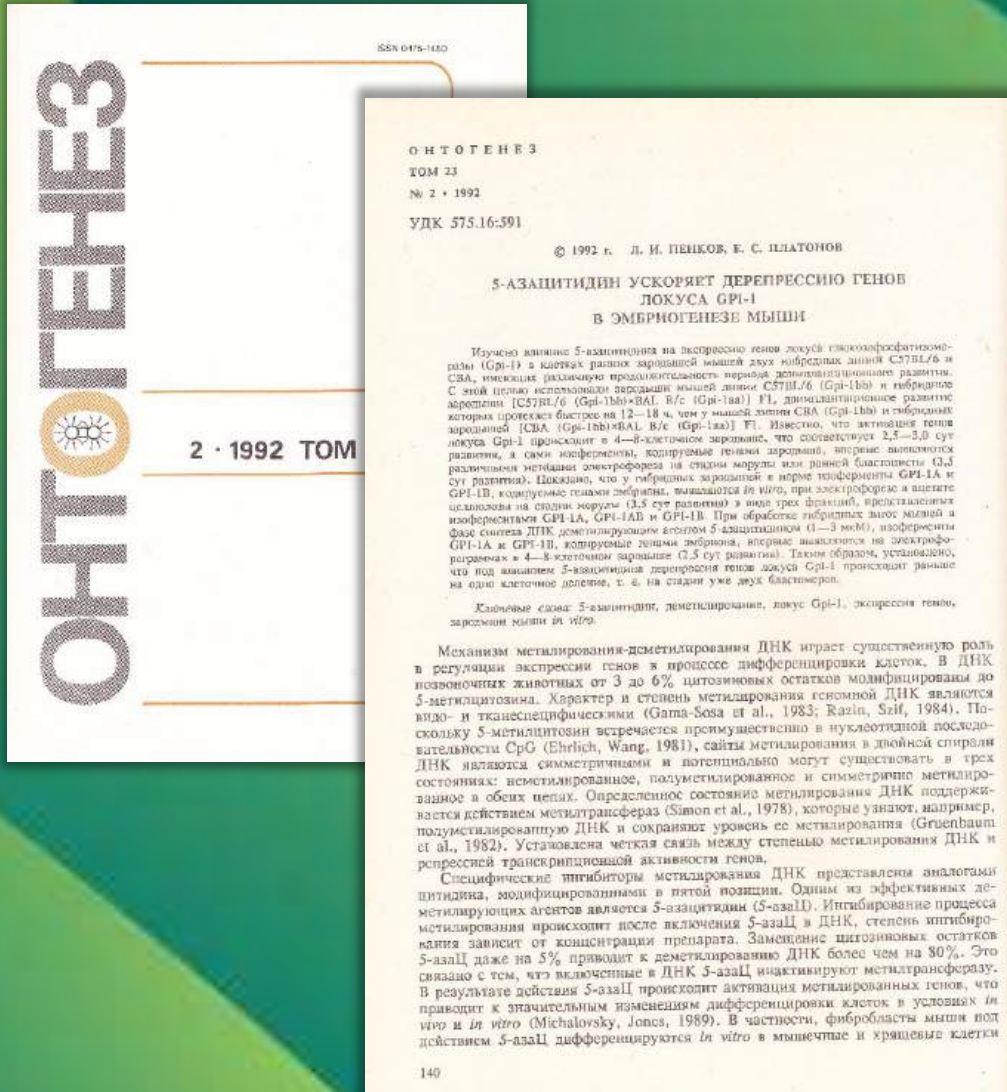
The mu-receptor agonist DAGO had a weaker action, for after its addition (3×10^{-5} M) to zygotes, 36.8% of embryos reached the "late morula-blastocyst" stage ($p < 0.001$), and the rest of the embryos, as after addition of naloxone, remained at the stages of two, four, and, less frequently, eight cells.

When naloxone was added to 4-cell embryos their sensitivity to its action was 7.5 times lower ($p < 0.001$) than that of zygotes: the "late morula-blastocyst" stage was reached by 50% of the embryos.

All-Union Research Center for Maternal and Child Care, Ministry of Health of the USSR. N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow. (Presented by Academician of the Academy of Medical Sciences of the USSR E. M. Vikhlyayeva.) Translated from *Byulleten' Éksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, Vol. 108, No. 11, pp. 622–624, November, 1989. Original article submitted February 28, 1989.

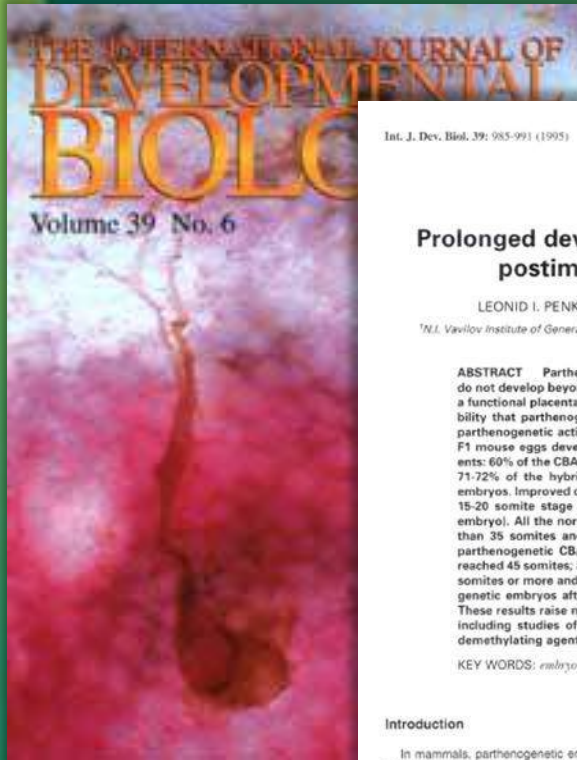
Пенков, Л.И. 5-Азацидин ускоряет дерепрессию генов локуса Gri-1 в эмбриогенезе мыши / Л.И. Пенков, Е.С. Платонов // Онтогенез. – 1992. – Т. 23, № 2. – С. 140–145. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=496260>

Пенков, Л.И. Изучение развития диплоидных партеногенетических зародышей мышей инбредных линий C57BL / Л.И. Пенков, Е.С. Платонов // Онтогенез. – 1992. – Т. 23, № 4. – С. 364. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=496258>



Penkov L. I. Prolonged development of normal and parthenogenetic postimplantation mouse embryos *in vitro* / L. I. Penkov, E. S. Platonov, D.A. New // The International Journal of Developmental Biology. - 1995. – V. 39, Issue 6. – P. 985-991.

<https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=973760>



Int. J. Dev. Biol. 39: 985-991 (1995)

985

Original Article

Prolonged development of normal and parthenogenetic postimplantation mouse embryos *in vitro*

LEONID I. PENKOV¹, EUGENE S. PLATONOV¹ and DENIS A.T. NEW^{2*}

¹N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia and ²The Physiological Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

ABSTRACT Parthenogenetic mammalian embryos show reduced placental development and do not develop beyond the 25-somite stage. But non-parthenogenetic embryos in culture, without a functional placenta, can develop to 40 somites or more. We have therefore examined the possibility that parthenogenetic embryos might also show prolonged development in culture. After parthenogenetic activation and diploidization, 23% of CBA and 56-58% of hybrid (CBAx57BL/6) F1 mouse eggs developed in culture to blastocysts. When transferred to pseudopregnant recipients: 60% of the CBA blastocysts implanted and 26% of these developed to somite stage embryos; 71-72% of the hybrid blastocysts implanted and 11-17% of these developed to somite stage embryos. Improved development of postimplantation embryos explanted into culture at about the 15-20 somite stage was obtained by opening the visceral yolk sac (without exteriorizing the embryo). All the normal (non-parthenogenetic) embryos cultured in this way developed to more than 35 somites and many reached 45-55 somites. Under the same conditions, 11/17 diploid parthenogenetic CBA embryos developed in culture to more than 35 somites and 5 of these reached 45 somites; and 9/28 diploid parthenogenetic (CBAx57BL/6) F1 embryos developed to 35 somites or more and 5 of these reached 45 somites. The size and protein content of the parthenogenetic embryos after culture was less than that of the normal embryos of equivalent stages. These results raise new possibilities for the analysis of parthenogenesis and genomic imprinting, including studies of the effects of adding to the culture medium specific growth factors and demethylating agents.

KEY WORDS: embryo culture, genomic imprinting, parthenogenesis

Introduction

In mammals, parthenogenetic embryos usually die before or shortly after implantation. Few develop as far as the 25-somite stage (Kaufman *et al.*, 1977; Surani and Barton, 1983).

Death of parthenogenetic embryos results from the absence of the paternal genome. Because of genomic imprinting, there are differences in the expression of some homologous maternal and paternal alleles and both are necessary for normal development (DeChiara *et al.*, 1991; Ferguson-Smith *et al.*, 1993; Surani *et al.*, 1993).

One result of the lack of the paternal genome in parthenogenetic rodent embryos is poor development of the trophoblast, ectoplacental cone and placenta (Surani and Barton, 1983; Surani *et al.*, 1984), and this is probably the main reason for the failure of development of the embryo around the 25-somite stage. Barton *et al.* (1985) and Gardner *et al.* (1990) have shown that, if a composite embryo is made by combining a parthenogenetic inner cell mass with normal trophoblast (and endoderm), development may be prolonged to 40-44 somites (though the

embryos die shortly after this stage – see Allen *et al.*, 1994 for further discussion).

When normal non-parthenogenetic rat or mouse embryos at head fold or early somite stages are explanted and grown in culture, there is usually reduced development of the trophoblast/ectoplacental cone. Nevertheless, such embryos may develop 40 somites or more (New, 1978, 1992; Hunter *et al.*, 1988). Since the trophoblast appears to be essential to the embryo in these cultures, we thought it would be interesting to see whether cultured postimplantation parthenogenetic embryos, also lacking in trophoblast, would develop to a similar extent. If so, it could provide a useful new approach to the investigation of the mechanisms of genomic imprinting and parthenogenetic development. We therefore made the following experiments, using mouse eggs parthenogenetically activated, diploidized and transferred to the uterus of a foster mother by standard methods, then explanted at early somite stages and grown in culture. Parthenogenetic embryos were obtained from inbred CBA and from hybrid (CBAx57BL/6) F1 mice. It was known from previous studies that, although the

*Address for reprints: The Physiological Laboratory, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EG, United Kingdom; FAX: 44 1223 333040.

Effects of 5-azacytidine on the development of parthenogenetic mouse embryos / L.I. Penkov et al. // Development, Growth & Differentiation. – 1996. – V. 38. – P. 263-270.

<https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1996.101-2-00005.x>



Develop. Growth Differ. (1996) 38, 263–270

Effects of 5-azacytidine on the development of parthenogenetic mouse embryos

Leonid I. Penkov, Evgeni S. Platonov, Oksana V. Mironova and Boris V. Konyukhov*

Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 3 Gubkin Street, 117809 GSP-1, Moscow B-333, Russia.

This study describes the effects of 5-azacytidine (5-azaC) on the development of diploid parthenogenetic embryos (PE) of CBA, C57BL/6 and (CBA x C57BL/6)F₁ mice *in vitro* at the 1-cell or the blastocyst stage or *in vivo* after implantation. Our findings indicate that genomic imprinting is modulated by genetic background. Non-fertilized C57BL/6 eggs form diploid parthenogenetic blastocysts at a much higher frequency than CBA eggs. Eggs from F₁ hybrid females form parthenogenetic blastocysts at an approximately intermediate level between these inbred strains of mice. C57BL/6 PE do not develop to the somite stages. In contrast, CBA PE and F₁ PE develop to various somite stages. Following administration of 5-azaC at 1.0 μmol/L *in vitro* at the 1-cell stage, the number of implantations of C57BL/6 PE transferred to pseudopregnant females increased. In contrast, the number of implantations and somite F₁ PE did not significantly change following exposure to 5-azaC. However, administration of 5-azaC at the 1-cell stage stimulates development of somite F₁ PE. Administration of 5-azaC at 0.2 and 1.0 μmol/L *in vitro* at the blastocyst stage did not change the number of implantations of C57BL/6 PE. However, the number of implantations and somite CBA PE decreased. After injection of 5azaC at 0.24 mg/kg *in vivo* at day 8 of gestation, some F₁ PE developed to 26–35 somites compared with a maximum of 25 somites in controls. The different effects of 5-azaC on the development of PE depend upon the mouse strain used and the stage of development.

Key words: 5-azacytidine, genomic imprinting, parthenogenetic mouse embryos.

Introduction

In all classes of vertebrates, except mammals, there are species in which parthenogenetic development to the adult is possible. The death of parthenogenetic (gynogenetic) and androgenetic embryos in mammals is attributed to differential activity of genes of the paternal and maternal genomes during development (McGrath & Solter 1984; Surani *et al.* 1984). The mechanism regulating functional differences of the parental genomes has been called genomic imprinting (Surani *et al.* 1984). Autosomal regions susceptible to genomic imprinting have been located in the mouse karyotype and at least 10 imprinted regions and four tentative ones have been identified (Beechey & Cattanaach 1993). Also, some specific genes affected by imprinting have been identified (Barlow *et al.* 1991; Bartolomei *et al.* 1991; DeChiara *et al.* 1991; Ferguson-Smith *et al.* 1993). Monoallelic expression is not determined only by the imprint during gametogenesis, but requires an additional

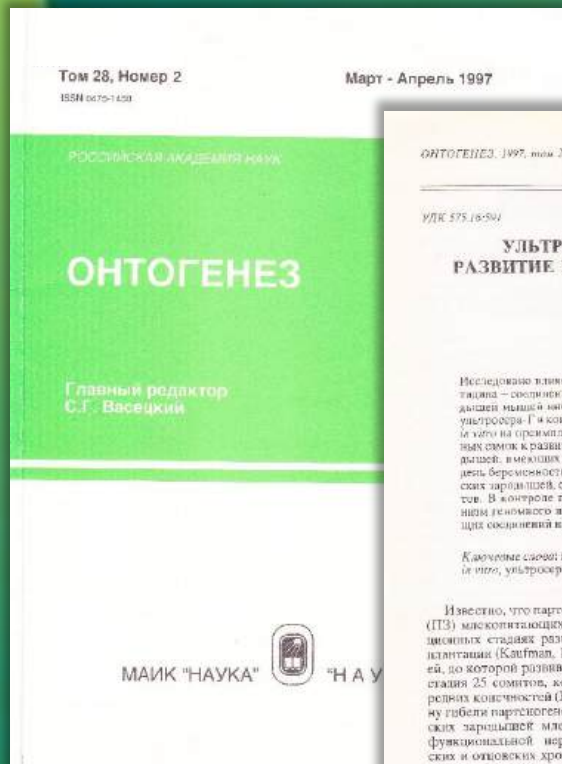
series of post-fertilization and even postimplantation events (Surani *et al.* 1990a; Allen & Mooslehner 1992; Latham *et al.* 1994). Jinno *et al.* (1995) have demonstrated a stage-specific alteration in allele-specificity of *H19* gene expression in developing human placentae. These authors have found that the *H19* gene can be expressed biallelically until 10 weeks of gestation and monoallelically (maternal) after 10 weeks of gestation or more. They consider that the establishment of functional imprinting requires further modifications in addition to the putative primary gametic imprint.

Genomic imprinting is correlated with DNA methylation, which is a heritable epigenetic modification involving different gene expression (Howlett *et al.* 1989; Sapienza 1990; Brandeis *et al.* 1993; Stoger *et al.* 1993; Surani *et al.* 1993; Allen *et al.* 1994; Norris *et al.* 1994). DNA methylation is a strong candidate for the imprinting mechanism (Szabo & Mann 1994). It has been suggested that imprinting and transcriptional inactivation may be achieved through a mechanism that involves DNA methylation (Reik *et al.* 1990; Surani *et al.* 1990b). Parental gametes have different degrees of DNA methylation. After fertilization the level of genomic DNA methylation significantly declines and reaches a mini-

*Author to whom all correspondence should be addressed. Vavilov Institute of General Genetics, 3 Gubkin Street, 117809 GSP-1, Moscow B-333, Russia.

Пенков, Л.И. Ультросер-Г и 5-азациитдин пролонгируют развитие партеногенетических зародышей мышей / Л.И. Пенков, Е.С. Платонов // *Онтогенез*. – 1997. – Т. 28, № 2. – С. 142-143. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=496555>

Анализ партеногенетических клеточных клонов у химерных мышей C57BL/6(PG) - BALB/c / Д.А. Исаев, О.В. Миронова, Е.С. Платонов, Б.В. Конохов // *Онтогенез*. – 1999. – Т. 30, №. 1. – С. 64-70. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=496542>



ОНТОГЕНЕЗ. 1997, том 28, № 2, с. 138-143
ПАРТЕНОГЕНЕЗ
 ИЛК 575.18-594

УЛЬТРОСЕР-Г И 5-АЗАЦИТИДИН ПРОЛОНГИРУЮТ РАЗВИТИЕ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ
 © 1997 г. Л. И. Пенков, Е. С. Платонов
 Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
 117809 Москва ул. Губкина, д. 3
 Поступила в редакцию 16.04.96 г.
 Оригинальный вариант принят 04.11.96 г.

Исследовано влияние ультросера-Г (Ultraser-G) – замещенной эмбриональной сыворотки и 5-азациитдина – солицидина, деацетилирующего ДНК, на развитие диплоидных партеногенетических зародышей мышей гибридной линии СВА и гибридной СВА x C57BL/6J1. Показано, что добавление ультросера-Г в количестве концентрации 0,5% к питательной среде при культивировании зародыша и 10 мкг/мл на преемплантационных стадиях приводит после их срисовывания в матку донорбеременных самок к развитию в постимплантационном периоде 30–35 сомитных партеногенетических зародышей, в которых почти поровну и задних конечностей. Дополнительное введение самок на 8-й день беременности 5-азациитдина в дозе 0,24 мг/кг продлевает развитие на которых партеногенетических зародышей, обработанных ультросером-Г и преемплантационном периоде, до стадии 45 сомитов. В контроле партеногенетических зародыши развиваются до 25 сомитов. Обсуждается необходимость включения ультросерина и в качестве компонентов эмбриональной сыворотки и деацетилирующего оксидина на жизнеспособности партеногенетических зародышей.

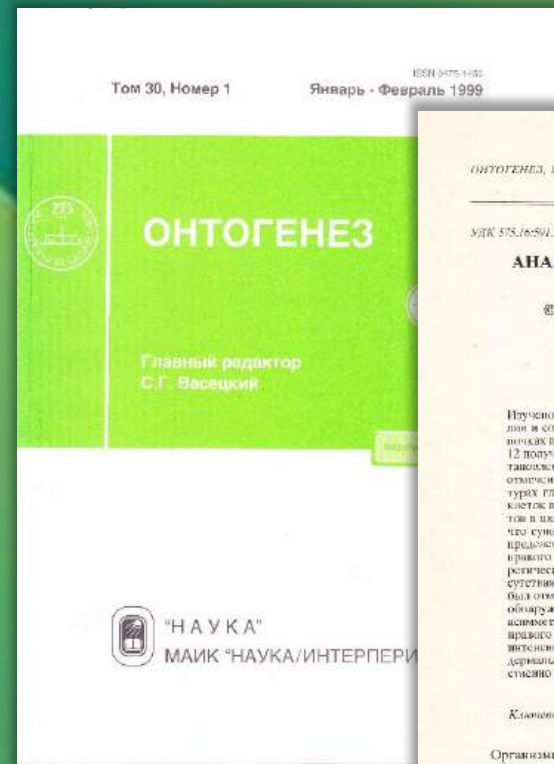
Ключевые слова: партеногенетические зародыши мышей, генетический импринтинг, культивирование *in vitro*, ультросер-Г, 5-азациитдин.

Известно, что партеногенетические зародыши (ПЗ) млекопитающих погибают на доимплантационных стадиях развития или сразу после имплантации (Kauffman, 1983). Максимальной стадией, до которой развиваются ПЗ мышей, является стадия 25 сомитов, когда появляются почки передних конечностей (Kauffman et al., 1977). Причину гибели партеногенетических и импринтированных зародышей млекопитающих связывают с функциональной, нерепроductive материальной и отцовских хромосом в развитии. Эти различия возникают в результате геномного импринтинга, который начинается в гаметогенезе и завершается на ранних стадиях эмбриогенеза (Suzuki et al., 1986; Selzer, 1988). Метилирование ДНК является одним из основных механизмов возникновения феномена геномного импринтинга (Suzuki et al., 1990, 1993). На проявление геномного импринтинга влияют гены-модификаторы (Sarinaga, 1990; Penkov et al., 1996). В соматических и в ряде скелетных тканей генов коррелируется в ряду скелетных тканей и проявляется (Морова, 1995). Показано, что импринтированные гены эмбриональных стволовых клеток имеют высокий уровень метилирования ДНК (Seabo, Mao, 1994). С помощью деметилирующих соединений, в частности 5-азациитдина (5-азаЦ), была установлена связь между уровнем метилирования

ДНК и агрессивной импринтированной геном (Jones, Taylor, 1980; Michalowsky, Jones, 1989). Однократная интубринования шестидесяти самок на восьмой сутки беременности 5-азаЦ в дозе 0,24 мг/кг приводила к пролонгации развития ПЗ значительно дальше стадии 25 сомитов (Penkov et al., 1996).

Отметим, также факторы участвуют в инициации, доиниции импринтинга. Предполагается, что это могут быть морфогены и факторы, регулирующие рост клонов (Episkov, 1995). Поэтому представляет интерес изучение влияния ростовых факторов на развитие ПЗ. Исходным вариантом исследования в этом случае может стать анализ влияния эмбриональной сыворотки, в которой отмечено повышенное содержание ростовых факторов и других веществ, стимулирующих деление клонов (Moses et al., 1980), на развитие ПЗ. Перспективна представляется применение препарата ультросера-Г (УС-Г) – замещенная эмбриональная сыворотка, который имеет известный состав и содержит в пять раз более высокую концентрацию ростовых факторов, чем нативная эмбриональная сыворотка (Sene et al., 1982).

В настоящей работе изучено влияние ультросера-Г и 5-азациитдина на пре- и постимплантационное развитие партеногенетических зародышей мышей.



ОНТОГЕНЕЗ. 1999, том 30, № 1, с. 64-70
ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ
 ИЛК 575.18-594.3

АНАЛИЗ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КЛОНОВ У ХИМЕРНЫХ МЫШЕЙ C57BL/6(PG) — BALB/c¹
 © 1999 г. Д. А. Исаев, О. В. Миронова, Е. С. Платонов, Б. В. Конохов
 Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
 117809 Москва В-333, ул. Губкина, д. 3
 Поступила в редакцию 18.06.98 г.
 Оригинальный вариант принят 23.07.98 г.

Изучено распределение партеногенетических клеточных клонов в ретиальном пигментном эпителии и сосудистой оболочке глаза на ранних гистологических срезах, а также в головном мозгу, почках и печени путем электрофоретического анализа изоферментов глюкозофосфатизомеразы у 12 полученных ранее 6-месячных химерных мышей C57BL/6(PG) — BALB/c. Так же, как и в通常情况下, ранее распределение партеногенетических клонов эмбриональных мезенхимных, отмечена асимметрия в распределении партеногенетических клеточных клонов и нормальных клеток в ретиальном пигментном эпителии правого и левого глаза и эпидермальных мезенхимных клетках в шеретном эпителии соответствующей половины тела химеры. Эти данные указывают на то, что генетически определяемые взаимодействия между процессами, приводящими к характерному распределению актозеральных партеногенетических клонов в ретиальном пигментном эпителии правого и левого глаза и эпидермальных мезенхимных и партеногенетических химер. Электрофоретический анализ изоферментов глюкозофосфатизомеразы не выявил ни у одной из 12 химер присутствия партеногенетического компонента в печени и почках и только у двух химер, у которых был отмечен высокий процент парногенетических клеток эпидермального происхождения, был обнаружен партеногенетический компонент в головном мозгу. В этих случаях только отмечены асимметрия в правой и левой половинах головного мозга, как в ретиальном пигментном эпителии правого и левого глаза. Полученные данные показывают, что в течение развития химер происходит интенификация эмбриональных партеногенетических клеток C57BL/6 в тканях эпидермального и мезодермального происхождения. У химерных мышей C57BL/6(PG) — BALB/c сохраняется промежуточно партеногенетически-интегрированные клоны эпидермального происхождения.

Ключевые слова: химерные мыши, партеногенез, клеточный клонинг.

Организмы, состоящие из двух и более генотипически различных клеточных популяций, в экспериментальной биологии называют химерами (McLaren, 1976). Экспериментальные химеры, получаемые главным образом путем агрегации разных зародышей мышей, широко используются для решения проблем генетического развития и клеточного анализа онтогенеза (Конохов и др., 1988; Конохов, 1989). Химерных мышей, состоящих из нормальных и партеногенетических клеток, называют партеногенетическими химерами. Диплоидные партеногенетические эмбрионы обычно гибнут вскоре после имплантации, но партеногенетические химеры способны развиваться до рождения и полной зрелости. Партеногенетические клетки участвуют и формирования

ни многих тканей и органов, в том числе и гонад, продуцируя полноценные гаметы (Suzuki et al., 1977). Однако даже в составе химерного организма партеногенетические клетки проявляют ограниченные потенциалы в развитии (Suzuki et al., 1987, 1988), что связывают с эффектами геномного импринтинга в развитии млекопитающих, т.е. с дифференциальной активностью отцовских генов материнского и отцовского происхождения. Для нормального развития млекопитающих необходимо наличие обеих типов генов как материнского, так и отцовского (Suzuki et al., 1990, 1993).

В соматических клетках млекопитающих транскрипционная активность некоторых генов лейкоцитов характеризуется аутентичной специфичностью, обусловленной импринтированием материнского или отцовского аллеля. Импринтированные гены составляют примерно 0,1% геномной организации, что ограничивает экспрессию примерно 100 генов на различных стадиях онтогенеза¹.

Конюхов, Б.В. Геномный импринтинг у млекопитающих / Б.В. Конюхов, Е. С. Платонов // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 5-17.
<https://viewer.benran.ru/ru/ben01000389624?page=7&rotate=0&theme=white>



Платонов Е.С. Трансформирующий ростовой фактор α (TG α) моделирует эффекты геномного импринтинга и пролонгирует развитие партеногенетических эмбрионов мышей / Е.С. Платонов, Л.И. Пенков, Б.В. Конюхов // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 10. – С. 1358-1363.
<https://viewer.benran.ru/ru/ben01000389623?page=4&rotate=0&theme=white>



ГЕНЕТИКА, 2001, том 37, № 1, с. 5-17

ISSN 0016-8758
 Январь 2001

ГЕНЕТИКА

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.16+591.3:599.3

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2001 г. Б. В. Конюхов, Е. С. Платонов

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 117809;
 факс: (095) 132-89-62; e-mail: konukhov@vigg.ru
 Поступила в редакцию 22.05.2000 г.

Приведен обзор данных по изучению механизмов и эффектов геномного импринтинга – эпигенетического феномена, регулирующего развитие плацентарных млекопитающих. В отличие от большинства генов локусов, экспрессирующихся биаллельно, импринтированные локусы экспрессируются моноаллельно. У человека и мыши идентифицировано более 30 импринтированных локусов, материнские или отцовские аллели которых в ходе развития могут экспрессироваться или находиться в репрессированном состоянии. Импринтинг устанавливается в гаметогенезе и репрессирование одного из аллелей импринтированного локуса обусловлено метилированием его ключевого регуляторного элемента. Для нормального развития млекопитающих требуются оба набора хромосом – материнский и отцовский. Поэтому партеногенез и андрогенез в природе невозможны. В результате дифференциальной экспрессии генов многих импринтированных локусов возникает соответствующий баланс генной активности, необходимый для нормальной пролиферации и дифференцировки различных клеточных клонов в эмбриогенезе. Многие аномалии развития и синдромы у человека обусловлены нарушением геномного импринтинга. В частности, потеря импринтов, сопровождающаяся возникновением биаллельной экспрессии некоторых импринтированных локусов, может приводить к появлению раковых опухолей.

Эффекты родительского импринтинга были известны более 3000 лет назад, когда в результате скрещивания лошади (кобылы) с ослом получали мулов, которые отличаются высокой работоспособностью и выносливостью и по своим характеристикам относятся скорее к ослу, чем к лошади [1]. В то же время лошак – гибрид от скрещивания ослицы с жеребцом – больше похож на лошадь. Несмотря на столь давно известные наблюдения, указывающие на неэквивалентность материнского и мужского геномов у млекопитающих, достоверные доказательства существования родительского импринтинга были получены на мышах только в 80-х годах нашего столетия путем изящных экспериментов с пересадкой пронуклеусов.

Исследования двух групп ученых – Сурани с соавт. [2-5] и МакГрата и Солтера [6, 7], выполненные на зиготах мышей с пересадкой пронуклеусов, показали, что только комбинация мужского и женского пронуклеусов обеспечивает нормальное развитие мышей. Однако комбинация двух мужских или двух женских пронуклеусов, взятых из разных оплодотворенных яйцеклеток мышей, приводят к остановке эмбриогенеза. При этом в случае андрогенеза (комбинация двух мужских пронуклеусов) формировался мелкий зародыш и практически нормального размера производные трофобласта – внезародышеские оболочки и плацента, а в случае гиногенеза (комбинация двух женских пронуклеусов), наоборот, развивался довольно крупный зародыш и очень

небольшого размера внезародышеские оболочки и плацента (рис. 1).

Следовательно, для нормального развития млекопитающих требуется два набора хромосом – материнский и отцовский. Это объясняет тот факт, что ни у одного из известных более чем 4500 видов млекопитающих не описан партеногенез. Гибель диплоидных партеногенетических (гиногенетических) и андрогенетических зародышей млекопитающих обусловлена нарушением у них баланса дифференциальной активности ауто-сопных аллельных генов импринтированных локусов материнского и отцовского геномов. Механизм, регулирующий функциональные различия родительских геномов, был назван геномным импринтингом [4].

Импринтированными генами называют те ауто-сопные гены млекопитающих, которые наследуются от матери или отца в репрессированном, или "молчащем", состоянии. В отличие от большинства локусов, экспрессирующихся в соматических диплоидных клетках биаллельно, экспрессия импринтированных локусов проявляется моноаллельно: один из двух родительских аллелей (материнский или отцовский) находится в репрессированном, или неактивном, состоянии. Считается, что эти гены импринтированы их родителями и поэтому данный феномен называют родительским импринтингом, геномным импринтингом или гаметическим импринтингом. В последнее время для описания данного явления чаще используют

ГЕНЕТИКА, 2001, том 37, № 10, с. 1358-1363

ISSN 0016-8758
 Октябрь 2001

ГЕНЕТИКА

ОБЩАЯ
 ГЕНЕТИКА

УДК 575.16+599.323.4

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ РОСТОВОЙ ФАКТОР α (TG α) МОДУЛИРУЕТ ЭФФЕКТЫ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА И ПРОЛОНГИРУЕТ РАЗВИТИЕ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ

© 2001 г. Е. С. Платонов¹, Л. И. Пенков^{1,2}, Б. В. Конюхов¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991;
 факс: (095)132-89-62; e-mail: platonov@vigg.ru
² Институт генетики Болгарской академии наук, София 1113, Болгария
 Поступила в редакцию 30.05.2001 г.

Исследовали влияние трансформирующего ростового фактора α (TG α) на развитие диплоидных партеногенетических эмбрионов мышей (CBA \times C57BL/6J). Партеногенетические эмбрионы обрабатывали TG α *in vitro* на стадии морулы и после развития до стадии бластоцисты трансплантировали в матку ложнобеременных самок. Установлено, что TG α в дозе 5 нг/мл улучшает развитие партеногенетических эмбрионов на преимплантационных стадиях, достоверно увеличивает число формирующихся бластоцист, и активирует процесс имплантации эмбрионов в матку. В результате применения TG α в дозе 10 нг/мл 4% партеногенетических эмбрионов достигли стадии 30-45 сомитов и имели почки передних и задних конечностей, а размеры эмбрионов от темени до крестца составляли 2.0-3.8 мм. У 6% партеногенетических эмбрионов, обработанных TG α в дозе 10 нг/мл, на 12-е сутки беременности диаметр плаценты равнялся 4.0-4.2 мм, что примерно соответствует размерам плаценты нормальных (оплодотворенных) 11-суточных зародышей мышей. Полученные данные показывают, что экзогенный TG α способен модулировать эффекты геномного импринтинга, существенно улучшая формирование производных трофобласта и пролонгируя развитие партеногенетических эмбрионов мышей на постимплантационных стадиях.

Млекопитающие являются единственным классом позвоночных, у которых в результате геномного импринтинга, контролирующего функциональные различия материнского и отцовского геномов, невозможно развитие партеногенетических организмов [1, 2]. Диплоидные партеногенетические эмбрионы (ПЭ) мышей погибают обычно на преимплантационных стадиях и вскоре после имплантации (10 сут беременности) в результате нарушения формирования паретальной эндодермы зародыша [3], а также сильного недоразвития производных трофобласта, в частности плаценты [4, 5]. Только менее 20% эмбрионов развиваются до сомитных стадий, редко достигая стадии 25 сомитов.

Геномный импринтинг регулирует развитие плацентарных млекопитающих. В отличие от большинства генов локусов, экспрессирующихся биаллельно, импринтированные локусы экспрессируются моноаллельно. В настоящее время у человека и мыши идентифицировано более 30 импринтированных локусов, материнские или отцовские аллели которых в ходе развития могут экспрессироваться или находиться в репрессированном состоянии [6]. Одним из первых эндоген-

ных импринтированных генов у мыши были идентифицированы гены *Igf2*, *Igf2r* и *H19* [7-9]. Генный локус *Igf2* контролирует синтез инсулиноподобного ростового фактора 2 (IGF2), который играет важную роль в процессах роста зародышей. При этом в нормальном зародыше экспрессируется отцовский аллель, а материнский репрессирован. Поэтому у ПЭ не наблюдается экспрессии *Igf2*.

Многие аспекты механизма реализации геномного импринтинга в развитии млекопитающих остаются неизученными. Предполагается, что в эту цепь процессов могут быть вовлечены морфогены и факторы, регулирующие рост клеток [10]. Пептидные ростовые факторы представляют собой сигнальные молекулы, играющие важную роль в эмбриогенезе млекопитающих. Они координируют клеточный рост и регулируют ряд важных морфогенетических процессов, стимулируя пролиферацию и дифференцировку клеточных популяций [11, 12]. Синтез многих ростовых факторов наблюдается уже на ранних стадиях эмбриогенеза млекопитающих и продолжается на постимплантационных стадиях. Экспрессия гена трансформирующего ростового фактора α (Tg α)

Penkov, L. I. Effects of fibroblast growth factor 2 and insulin-like growth factor II on the development of parthenogenetic mouse embryos in vitro / L. I. Penkov, E. S. Platonov, D.A.T. New // In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal. – 2001. – Vol. 37, No. 7. – P. 440-444. –

[https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2001\)037<0440:EOFGFA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2001)037<0440:EOFGFA>2.0.CO;2)



In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal 37:440–444, July/August 2001
© 2001 Society for In Vitro Biology
1071-2690/01 \$10.00+0.00

EFFECTS OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2 AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR II ON THE DEVELOPMENT OF PARTHENOGENETIC MOUSE EMBRYOS IN VITRO

LEONID I. PENKOV, EVGENY S. PLATONOV, AND DENIS A. T. NEW

N.I. Vavilov Institute of General Genetics, 3 Gubkina Street, 117809 GSP-7, Moscow B-333, Russian Federation (L. I. P., E. S. P.), Institute of Genetics, 1113 Sofia, Bulgaria (L. I. P.), and The Physiological Laboratory, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge, United Kingdom CB2 3EG (D. A. T. N.)

(Received 16 November 2000; accepted 29 May 2001)

SUMMARY

Most parthenogenetic embryos (PEs) in mammals die shortly after implantation, and this failure to develop is associated with genomic imprinting. We have examined the influence of human recombinant basic fibroblast growth factor 2 (FGF-2) and human recombinant insulin-like growth factor II (IGF-II) on the development of (CBA × C57BL/6)F1 parthenogenetic mouse embryos. Embryos were treated in vitro at the morula stage with different doses of FGF-2 and, after their development to blastocysts, transferred to pseudopregnant recipients. The optimal doses of FGF-2 did not affect the number of forming and implanting blastocysts, but increased, from 20 to 42%, the number of embryos developing to somite stages. PEs (18–21 somites) treated with an optimal dose of FGF-2 were explanted for further development in culture by treatment with the second growth factor, IGF-II. Eighty-three percent of those embryos cultured with IGF-II (2.5 µg/ml) developed to 35 or more somites, as compared with 36% of embryos cultured without any growth factors ($P < 0.01$). Also, a significantly higher proportion of PEs developed to 40–50 somites in this case. These results show that the in vitro treatment of PEs with FGF-2 at the morula stage increases the number of somite embryos, and the second treatment of somite PEs with IGF-II in culture medium prolongs their development significantly.

Key words: growth factors; parthenogenesis; genomic imprinting.

INTRODUCTION

The failure of the growth of mammalian parthenogenetic embryos (PEs) is associated with genomic imprinting (McGrath and Solter, 1984; Surani et al., 1984), the mechanism regulating the functional differences between maternal and paternal genomes. The genes are affected by imprinting during gametogenesis, postfertilization, and even postimplantation development (Surani et al., 1993; Tilghman, 1999). The regions of the autosomes affected by genomic imprinting have been identified (Cattanach and Beechey, 1990), and some of the genes under imprinting control have been studied (e.g., DeChiara et al., 1991; Miyoshi et al., 1998; Arima et al., 2000). Many workers now believe that the conservation of certain genes in a repressed state by deoxyribonucleic acid methylation is one of the mechanisms of genomic imprinting (Surani et al., 1984; Norris et al., 1994; Mayer et al., 2000). But much is still uncertain about this and other aspects of the link to development in PEs (Surani et al., 1993; Caspari et al., 1998).

Parthenogenetic mouse embryos die at different key stages of development. Usually very few (<25%) develop to somite stages, and none beyond 25 somites. They show poor development of the trophoblast, extraembryonic membranes, and mesodermal derivatives (Surani and Barton, 1983). Using the method for growing postimplantation mouse embryos, both normal (fertilized) and parthenogenetic, in vitro, their development up to 55 and 45 somites, re-

spectively, has been demonstrated (Penkov et al., 1995). This greatly increases the possibilities for investigating the block in mammalian parthenogenetic development.

Polypeptide growth factors play a fundamental role during embryogenesis and regeneration by stimulating the proliferation and differentiation of certain cell populations (Kenshalo and Broomira, 1999). Taking into account the high death rate of PEs before mesoderm formation (Newman-Smith and Werh, 1995) or the considerable retardation of their growth (Surani and Barton, 1983), we decided to explore the possibility of prolongation of PE development by means of exogenous introduction of two different types of growth factors.

First, fibroblast growth factor 2 (FGF-2) is a representative of a large family of FGFs constituted of at least 17 distinct polypeptide growth factors that play pivotal roles in a variety of developmental events, including mesodermal induction and growth of mesodermal derivatives, organogenesis, and angiogenesis (Basiglio and Muscatelli, 1992; Hoshikawa et al., 1998). The prototypes of FGFs, FGF-1 and FGF-2, are widely expressed throughout development and continue to be expressed in adult tissues, implicating that they may be important for normal tissue homeostasis (Dono et al., 1998; Lovicu and Overbeck, 1998). In early postimplantation mouse embryos, FGF-2 has beneficial effects, and it has been shown that they have functional receptors for it (Nielsen et al., 1991). By the use of an in vitro differentiation assay, Bardouf et al. (1998) showed that exogenous FGF-2 alters the fate of mouse epiblast from the ectoderm to the mesoderm. In mammals, the *Fgf* genes are expressed after

¹ To whom correspondence should be addressed at E-mail: platonov@vigg.ru

Платонов, Евгений Семенович. Модуляция эффектов геномного импринтинга у млекопитающих : Исследования на модельной системе - партеногенетических эмбрионах мышей : диссертация ... доктора биологических наук : 03.00.15. - Москва, 2003. - 221 с. : ил.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И.ВАВИЛОВА

на правах рукописи
УДК 575.16:591.3

ПЛАТОНОВ
Евгений Семенович

МОДУЛЯЦИЯ ЭФФЕКТОВ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ИССЛЕДОВАНИЯ НА МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ – ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНАХ МЫШЕЙ.

03.00.15 - генетика,
03.00.30 - биология развития,
эмбриология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор КОНЮХОВ Б.В.

Москва 2003

TGF α Reactivates Imprinted *Igf2* in the Parthenogenetic Mice Embryos and Placenta / J. Rostam Zadeh, L. I. Penkov, E. A. Klimov, E.S. Platonov, G.E. Sulimova // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 10. – С. 1387-1391.
<https://viewer.benran.ru/ru/ben01000389571?page=93&rotate=0&theme=white>

Платонов, Е. С. Геномный импринтинг в эпигенетике млекопитающих / Е. С. Платонов, Д. А. Исаев // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1235-1249.
<https://viewer.benran.ru/ru/ben01000389548?page=87&rotate=0&theme=white>



ГЕНЕТИКА, 2005, том 41, № 10, с. 1387-1391

ГЕНЕТИКА
ЖИВОТНЫХ

УДК 575.16:577.21:575.113

TGF α REACTIVATES IMPRINTED *Igf2* IN THE PARTHENOGENETIC MICE EMBRYOS AND PLACENTA

© 2005 г. J. Rostam Zadeh^{1,2}, L. I. Penkov^{1,3}, E. A. Klimov¹, E. S. Platonov¹, G. E. Sulimova¹

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 119991;

fax: (095) 132-89-62; e-mail: klimov_eugeney@mail.ru, galina_sulimova@mail.ru

² Kurdistan University, Sanandaj, Iran; e-mail: rostamzadeh2001@yahoo.com

³ Institute of genetics, Bulgarian Academy of science, Sofia, Bulgaria; e-mail: penkov@vigg.ru

Received May 20, 2005

Imprinted genes play important roles in the mammalian development. In the parthenogenetic embryos (PE) there is only expression of maternally expressed genes. Therefore, PEs are appropriate experimental models to study genomic imprinting controlling mechanisms. The maternally expressed *H19* and paternally expressed *Igf2* are reciprocally imprinted genes in normal embryos. Here we studied effect of transforming growth factor alpha (TGF α) treatment *in vitro* (10 ng/ml at the morula stage) on the expression of *Igf2/H19* locus in mice PE (9.5-days of gestation, 25 somites) and their placentas (PP). Using RT-PCR we showed that TGF α reactivated maternally imprinted *Igf2* gene in parthenogenetic embryos and placentas. In spite of similar Tgf α expression in the pre-implantation stages, its expression in the 9.5-day parthenogenetic embryos is significantly less than in normal embryos (NE). In our experiments it was shown that reactivation of *Igf2* gene occurred independently of *H19* gene. *In vitro* TGF α treatment of mouse PE reactivated paternally expressed *Igf2* gene in the PE and PP. In the PE and PP both *Igf2* and *H19* were expressed. It seems that TGF α can play an important role as modulator of the *Igf2/H19* locus.

The use of parthenogenetic embryos, as experimental models, allows us to follow gene expression from maternal allele only and to get an idea about genomic imprinting controlling mechanisms. Imprinted genes are a class of genes found in placental mammals, marsupials and seed plants whose expression depends on their parental origin [1–4]. In mammals, many imprinted genes are involved in the control of fetal growth, and are expressed in both fetal and placental tissues. Recent work in mice has indicated that the roles of imprinted genes in fetal and placental tissues can be genetically separated, and that in the placenta these genes regulate both growth and specific nutrient transfer [5]. In the present time, the list of imprinted genes grows fast and more than 70 imprinted genes are now reported in the mouse [http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/imprin-viewdata.html]. Most of them are conserved in humans.

The mouse Insulin like growth factor 2 gene (*Igf2*) is located on distal chromosome 7 and closely linked with *H19* gene. *H19* and *Igf2* are reciprocally imprinted genes. The paternally expressed *Igf2* encodes a potent fetal growth factor and the maternally expressed *H19* encodes a non-coding RNA [6]. Mouse *Igf2* gene has 4 promoters (P0, P1, P2 and P3), 2 pseudo-exons and 6 exons (Acc. No. U71085). The peptide-coding region is in the exons 4–6. All transcripts are spliced to exon 4, leading to the same peptide. Promoters P1–P3 are transcribed in fetal mesodermal, endodermal and extra-embryonic tissues whereas P0 is transcribed in the placen-

ta [7]. *Igf2* has mitogenic, morphogenic and metabolic properties [8] and plays an important role in the early stages of mammalian development. *Igf2* expression begins at the blastocyst stage of embryo development [9]. The *Igf2* gene is regulated at the transcription and translation levels [10, 11]. In the adult mouse *Igf2* expression stops in most of the tissues with the exception of the leptomeninges and choroid plexus of the brain which express both paternal and maternal alleles [11]. Humans exhibit similar patterns of expression with one major exception, adults continue to express *IGF2* in the liver, and the maternal allele is expressed through the use of an alternate non-imprinted promoter [12, 13]. Over expression of *IGF2* has been observed in tumours of the lung, ovary, breast and liver [14].

Transforming growth factor alpha (TGF α) is a single polypeptide of 50 amino acids that is derived from a 160-amino-acid transmembrane precursor by proteolytic cleavage. TGF α is structurally and functionally related to the epidermal growth factor (EGF) family and binds to the epidermal growth factor receptor (EGFR). A possible autocrine/paracrine growth mechanism was investigated *in vitro* with cloned human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines [15].

In this work we studied the effect of *in vitro* TGF α treatment on the *Igf2* gene expression in the parthenogenetic mice embryos and placentas.

ГЕНЕТИКА, 2006, том 42, № 9, с. 1235-1249

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.16:591.3:599

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ В ЭПИГЕНЕТИКЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2006 г. Е. С. Платонов, Д. А. Исаев

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991;

e-mail: platonov@vigg.ru

Поступила в редакцию 24.04.2006 г.

Геномный импринтинг – один из наиболее ярких и значительных эпигенетических феноменов. Очевидным следствием геномного импринтинга является наличие биологического запрета на парthenогенетическое и андрогенетическое развитие у млекопитающих. Нарушения геномного импринтинга могут приводить к аномалиям развития и патологическим синдромам, к опухолевому росту у человека; к синдрому “крупных потомков” и увеличению смертности при манипуляциях *in vitro* с ранними зародышевыми млекопитающих. Дифференциальная экспрессия родительских аллелей в индивидуальном развитии подразумевает механизм обратимого избирательного маркирования аллелей генов. Эти относительно стабильные эпигенетические модификации, не затрагивающие первичной последовательности нуклеотидов ДНК, могут наследоваться в соматических клеточных линиях и воспроизводиться в зародышевом пути. Механизм геномного импринтинга может быть реализован в других эпигенетических процессах, таких как эпигенетическое наследование, исключающая аллельная сегрегация, мейотический дрейф и пр. Искусственная модуляция эффектов геномного импринтинга при помощи ростовых факторов и деметилирующих агентов позволяет осуществлять частичное нормализирование при развитии парthenогенетических зародышей у мыши. Направленные регулируемые изменения транскрипционной активности импринтированных генов создают предпосылки для эпигенетической коррекции синдромов и болезней, вызванных нарушениями геномного импринтинга.

Изучение механизмов эпигенетического контроля экспрессии генов в процессе развития сложных организмов представляет собой относительно новое направление генетических исследований [1]. К эпигенетике относят самые разнообразные процессы, которые приводят к изменению активности генов путем относительно стабильных в ряду клеточных поколений модификаций, не затрагивающих первичной последовательности ДНК [2]. Эпигенетические механизмы контроля, в частности геномный импринтинг, принимают участие во многих процессах нормального и патологического развития человека и животных [3].

Геномный импринтинг (от англ. *imprint* – отпечаток, запечатление) называется механизм обратимой избирательной модификации аллелей генов в зависимости от их родительского происхождения, приводящий к их дифференциальной экспрессии в развитии [4].

Геномный импринтинг (от англ. *imprint* – отпечаток, запечатление) называется механизм обратимой избирательной модификации аллелей генов в зависимости от их родительского происхождения, приводящий к их дифференциальной экспрессии в развитии [4].

Проблема геномного импринтинга активно разрабатывается с начала 80-х годов прошлого столетия, причем по мере получения новых данных интерес к геномному импринтингу усиливается и ему посвящается все большее число экспериментальных и обзорных работ [4–10]. Теория геномного импринтинга является в настоящее время общепризнанной благодаря работам Surani и дру-

Экспрессия импринтированных генов *Igf2* и *Peg1/Mest* у постимплантационных партеногенетических эмбрионов мышей после обработки *in vitro* трансформирующим ростовым фактором / Л. И. Пенков, М. С. Кондрахина, О. В. Миронова, Е. С. Платонов // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 8. – С. 1148-1152.

<https://viewer.benran.ru/ru/beno1000389523?page=142&rotate=0&theme=white>



ISSN 0016-8758
Том 44, Номер 8
Август 2008

ГЕНЕТИКА. 2008, том 44, № 8, с. 1148–1152

УДК 575.16+591.3:599.323.4

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ЭКСПРЕССИЯ ИМПРИНТИРОВАННЫХ ГЕНОВ *Igf2* И *Peg1/Mest* У ПОСТИМПЛАНТАЦИОННЫХ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ *in vitro* ТРАНСФОРМИРУЮЩИМ РОСТОВЫМ ФАКТОРОМ α

© 2008 г. Л. И. Пенков¹, М. С. Кондрахина², О. В. Миронова², Е. С. Платонов²

¹Институт генетики Болгарской академии наук, София 1113, Болгария; e-mail: penkov@abv.bg
²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991; e-mail: platonov@vige.ru

Поступила в редакцию 21.12.2007 г.

Изучено влияние трансформирующего ростового фактора α (TGF α) на экспрессию импринтированных генов *Igf2* и *Peg1/Mest* у диплоидных партеногенетических эмбрионов (ПЭ) мышей (CBA \times C57BL/6J), в постимплантационном периоде эмбрионального развития. ПЭ были обработаны TGF α *in vitro* на стадии морулы и после развития до стадии бластоцисты трансплантированы в матку ложнобеременных самок. На 10-е сутки беременности ПЭ были экплантированы для дальнейшего культивирования *in vitro* на 24 или 48 ч. Экспрессию импринтированных генов *Igf2* и *Peg1/Mest* изучали методом гибридизации *in situ* на тотальных препаратах эмбрионов с использованием меченых дуплексом антисмысловых РНК. Экспрессию импринтированных генов *Igf2* и *Peg1/Mest* определяли у эмбрионов на 10-е сутки развития *in utero* перед началом культивирования и через 24 и 48 ч культивирования *in vitro*. Показано, что до начала культивирования у 60% ПЭ на 10-е сутки беременности (стадия 21–25 сомитов) экспрессия гена *Igf2* была обнаружена только в головном мозге, экспрессия же *Peg1/Mest* не определялась. У контрольных, необработанных TGF α ПЭ на тех же стадиях 21–25 сомитов экспрессия генов *Igf2* и *Peg1/Mest* отсутствовала. Через 24 ч культивирования у ПЭ на стадиях 30–35 сомитов экспрессия *Igf2* была обнаружена у 71% ПЭ в головном мозге, а экспрессия генов *Peg1/Mest* не наблюдалась. В контроле у ПЭ, необработанных TGF α , на стадиях 30–35 сомитов не установлено экспрессии импринтированных генов *Igf2* и *Peg1/Mest*. После 48 ч культивирования у всех ПЭ, обработанных TGF α и развившихся до стадий 40–45-сомитов, была обнаружена экспрессия *Igf2* в зоне головного мозга, формирующихся челюстей, сердца, печени и сомитов, а экспрессия *Peg1/Mest* наблюдалась в головном мозге, сердце и печени. У контрольных, необработанных TGF α ПЭ на сходных стадиях развития экспрессия генов *Igf2* и *Peg1/Mest* не обнаруживалась. Паттерны экспрессии импринтированных генов *Igf2* и *Peg1/Mest* у ПЭ, наиболее продвинутой в развитии (40–45-сомитов), и у нормальных (оплодотворенных) эмбрионов на тех же стадиях были сходными, однако уровни их экспрессии у ПЭ были существенно ниже, чем в норме. Полученные данные указывают на способность экзогенно введенного TGF α реактивировать экспрессию двух импринтированных генов, что приводит к модулированию эффектов геномного импринтинга, улучшая и существенно продвигая развитие ПЭ.

Геномный импринтинг контролирует развитие плацентарных млекопитающих и выражается в дифференциальной экспрессии или репрессии импринтированных генов. В отличие от большинства генов, которые экспрессируются биадально, импринтированные локусы экспрессируются моноадально [1, 2]. К настоящему времени у человека и мыши идентифицировано более 70 импринтированных генов. Действие большинства этих генов характеризуется тем, что если экспрессируется материнский аллель, то отцовский репрессирован, и наоборот [3]. Подверженный импринтингу генный локус *Igf2* контролирует синтез инсулиноподобного ростового фактора 2 (IGF2), который играет важную роль в росте собственно эмбриона, особенно его мезодермальных

производных, и плаценты. У нормально развивающихся оплодотворенных эмбрионов экспрессируется *Igf2*-аллель отцовского происхождения, в то время как материнский аллель репрессирован. Поскольку у диплоидных ПЭ в геноме представлены аллели только материнского происхождения, экспрессия гена *Igf2* не происходит. Известно, что IGF2 является мощным стимулятором клеточной пролиферации в эмбриогенезе млекопитающих [4, 5]. При обработке ПЭ *in vitro* экзогенным IGF2 на стадии сомитов мы установили существенное удлинение периода развития ПЭ, а также увеличение их размеров по сравнению с контролем [6]. Другим импринтированным геном, при действии которого экспрессируется только отцовский аллель, является генный локус *Peg1/Mest* [7]. Этот

Головатенко-Абрамов, П. К. Генные регуляторные сети, контролирующие морфогенез волосяного фолликула у мыши / П. К. Головатенко-Абрамов, Е. С. Платонов // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 129, № 2. – С. 144-157. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=643958>



ISSN 0042-1824
Том 129, Номер 2
Март - Апрель 2009

УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ. 2009, том 129, № 2, с. 144–157

УДК 640.875.218.012.799.1.000.323.451

УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ

ГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СЕТИ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ МОРФОГЕНЕЗ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА У МЫШИ

© 2009 г. П. К. Головатенко-Абрамов, Е. С. Платонов
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Ключевыми генными регуляторными сетями (или сигнальными путями), необходимыми для развития и функционирования волосяных фолликулов у млекопитающих, являются сети, контролируемые белковыми молекулами семейства SHN, WNT и BMP. Морфогенез волосяного фолликула поддерживается благодаря постоянной работе этих сетей, которые, в свою очередь, позволяют осуществлять дифференциальную экспрессию их участников. В данной статье мы представили попытку систематизировать накопленные данные о функционировании SHN-, WNT- и BMP-зависимых генных сетей и развитии волосяного фолликула и в ходе его цикла у мыши, обратив особое внимание на возможные взаимодействия между этими сигнальными путями.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наиболее популярным представителем, позволяющим систематизировать взаимодействующие гены в развитии организмов, является концепция генных регуляторных сетей. Генные регуляторные сети (или сигнальные пути) в общем случае являются собой сложные системы взаимодействия, состоящие из белков-лигандов (активаторов и ингибиторов), их рецепторов, посредников и факторов транскрипции, связывающихся с ДНК и активирующих транскрипцию генов-эффекторов. Дифференциальная экспрессия генов в ходе всего онтогенеза, от протекции генов домашнего хозяйства в раннем эмбриогенезе до селективной активации тканеспецифичных генов в позднем пренатальном развитии и физиологической регенерации интенсивно обновляемых органов и тканей в зрелом периоде, является результатом функционирования в организме взаимодействующих сетей. Изучение механизмов работы генных регуляторных сетей представляет большой интерес для понимания генетического контроля развития отдельных органов или их систем. Кроме этого, понимание таких механизмов предоставляет широкие возможности для направленного модулирования транскрипционной активности конкретных генов, что является своей привлекательной особенностью различной этиологии.

Эмбриогенез ВФ (рис. 1) контролирует функционирование взаимодействующих между собой молекулами кератинизующим из которых формируется эпителиальная часть фолликула, а инволюция мезенхимных клеток, образующих дермальный сосочек [23, 30]. Эти взаимодействия приводят к тому, что клетки эпителия претерпевают фазированный рост, образуя цилиндр, который соединяется со своей базальной частью со скелетом мезенхимных клеток будущего дермального

сом, и морфогенез волосяного фолликула осуществляется в ходе всего индивидуального развития организма. Поэтому генные регуляторные сети, контролирующие путь дифференцировки и миграции клеток, предшественны в этих органах еще задолго до стадии развития и созревания организма.

Ключевыми генными регуляторными сетями, функционирующими в коже млекопитающих, являются сети, включающие белковые молекулы семейства SHN, WNT и BMP. Нарушение работы этих сетей приводит к различным аномалиям кожи и волосяных фолликулов от искривления определенных компонентов до формирования злокачественных новообразований. В настоящем обзоре мы представили попытку систематизировать накопленные знания о функционировании и взаимодействиях таких сетей в коже и волосяном фолликуле мыши.

МОРФОГЕНЕЗ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА У МЫШИ

Волосяной фолликул (ВФ) млекопитающих – сложная структурно-функциональная единица, морфогенез которой инициируется в эмбриогенезе и продолжается и циклически повторяется в течение всего индивидуального развития организма.

Эмбриогенез ВФ (рис. 1) контролирует функционирование взаимодействующих между собой молекулами кератинизующим из которых формируется эпителиальная часть фолликула, а инволюция мезенхимных клеток, образующих дермальный сосочек [23, 30]. Эти взаимодействия приводят к тому, что клетки эпителия претерпевают фазированный рост, образуя цилиндр, который соединяется со своей базальной частью со скелетом мезенхимных клеток будущего дермального

Влияние 5-азадезоксицитидина и ретиноевой кислоты на проявления геномного импринтинга у партеногенетических эмбрионов мышей / Л. И. Пенков, Т. К. Тасева, Я. М. Койчева, Е. С. Платонов // Онтогенез. – 2010. – Т. 41, № 2. – С. 107-113. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=496464>

Дермальные кисты участвуют в репаративной регенерации эпидермиса у мышей генотипа Hr^{hr}/Hr^{hr} / П. К. Головатенко-Абрамов, Е. А. Жиркова, Е. Г. Колокольчикова, В. С. Бочарова, Е. С. Платонов // Онтогенез. – 2010. – Т. 41, № 4. – С. 285-291. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=496462>

ОНТОГЕНЕЗ, 2010, том 41, № 2, с. 107–113

ПАРТЕНОГЕНЕЗ

УДК 575.16.591

ВЛИЯНИЕ 5-АЗАДЕЗОКСИЦИТИДИНА И РЕТИНОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА У ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ¹

© 2010 г. Л. И. Пенков, Т. К. Тасева, Я. М. Койчева, Е. С. Платонов*

Институт генетики им. академика Д. Костова Болгарской академии наук

1113 София, Болгария

* Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

E-mail: platonov@vigg.ru; iprenkov@abv.bg

Поступила в редакцию 23.04.09 г.

Окончательный вариант получен 10.08.09 г.

Изучали действие двух типов веществ – 5-азадезоксицитидина и ретиноевой кислоты, оказывающих деметилирующее влияние на ДНК в процессе развития диплоидных партеногенетических эмбрионов мышей. Изучено влияние 5-азадезоксицитидина на гибридных мышей (СВАхС57BL/6)F1, введенного в среду с одноклеточными партеногенетическими эмбрионами *in vitro* на 6 ч во время S-фазы клеточного цикла. После развития *in vitro* до стадии бластоцисты партеногенетические эмбрионы были трансплантированы в матку ложнобеременным самкам. Установлено, что в доимплантационном периоде 5-азадезоксицитидин в концентрации 0,1 мкМ активирует развитие зародышей до стадии бластоцисты (69% – в опыте, 61% – в контроле), а в постимплантационном – увеличивает число мест имплантации в матку (76% – в опыте, 63% – в контроле). Эффекты ретиноевой кислоты изучали на партеногенетических эмбрионах, полученных от мышей инбредных линий С57BL/6 или СВА, добавляя ее в среду к одноклеточным эмбрионам *in vitro* на 96 ч. Обработка партеногенетических эмбрионов С57BL/6 кислотой в концентрациях 0,1 или 0,5 мкМ статистически значимо увеличивала число мест имплантации зародышей – 76 и 78% соответственно против 57% у необработанных эмбрионов. Добавление сходных доз ретиноевой кислоты в питательную среду к партеногенетическим эмбрионам мышей линии СВА (в отличие от эмбрионов С57BL/6) не ухудшает процесс имплантации, причем ее концентрация 2,0 мкМ является токсической для зародышей. В течение постимплантационного периода партеногенетические эмбрионы мышей линии С57BL/6, подвергнутые обработке ретиноевой кислотой, так же как и контрольные, не развиваются до соматических стадий. У мышей линии СВА 45% контрольных зародышей развиваются до продвинутых соматических стадий, однако число обработанных ретиноевой кислотой эмбрионов не увеличивается. Таким образом, обработка партеногенетических эмбрионов двух инбредных линий мышей и их гибридов деметилирующими ДНК соединениями (5-азадезоксицитидином и ретиноевой кислотой) создает предпосылки для частичной модуляции геномного импринтинга и повышения выживаемости таких зародышей.

Ключевые слова: 5-азадезоксицитидин, ретиноевая кислота, метилирование ДНК, геномный импринтинг, партеногенетические эмбрионы мышей.

Метилирование ДНК является важной эпигенетической модификацией генома, которая регулирует ключевые аспекты его функционирования. Паттерны метилирования генома в дифференцированных соматических клетках являются стабильными и наследуются в последующих клеточных поколениях. У млекопитающих существуют как минимум два периода развития, когда в геноме происходит об-

ширное репрограммирование паттернов метилирования и образуются клетки с тотипотентными свойствами, – в первичных половых клетках и в эмбрионах доимплантационных стадий развития. Метилирование ДНК играет основную роль в осуществлении механизмов геномного импринтинга (Surani et al., 1990; Howlett, Reik, 1991; Li et al., 1993). Реализация этого процесса накладывает биологический запрет на осуществление партеногенеза и андрогенеза у млекопитающих (McGrath, Solter, 1984; Surani et al., 1984).

Метилирование ДНК в норме осуществляется с помощью ДНК метилтрансферазы, а тотальное демети-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 04-04-48612, 01-04-48760), Болгарским министерством образования и науки (проект № ВСО(ОНО)07.73.02.25/25) и Федеративной программой ЕС "Развитие человеческих ресурсов".

ОНТОГЕНЕЗ, 2010, том 41, № 4, с. 285–291

РЕГЕНЕРАЦИЯ

УДК 57.084.1

ДЕРМАЛЬНЫЕ КИСТЫ УЧАСТВУЮТ В РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ЭПИДЕРМИСА У МЫШЕЙ ГЕНОТИПА Hr^{hr}/Hr^{hr}

© 2010 г. П. К. Головатенко-Абрамов, Е. А. Жиркова*, Е. Г. Колокольчикова*, В. С. Бочарова*, Е. С. Платонов

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

119991 Москва, ул. Губкина, д. 3

* Научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. В. Скляфосовского

129010 Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3

E-mail: p.golovatenko@gmail.com

Поступила в редакцию 26.10.09 г.

Окончательный вариант получен 24.12.09 г.

Одним из фенотипических проявлений мутации в гене Hr у мыши является дезинтеграция волосных фолликулов и их перерождение в незамкнутые воронкообразные образования (утрикулы), открывающиеся на поверхности кожи, и кисты, расположенные в толще дермы. Цель работы заключалась в изучении процесса репаративной регенерации кожи у мышей, гомозиготных по одному из мутантных аллелей гена Hr – Hr^{hr} . Показано, что эпителиальные клетки, составляющие внутреннюю выстилку кист, участвуют в процессе эпителизации глубоких ран кожи. Это свидетельствует о том, что компетенция эктодермальных клеток в отношении индуктивных сигналов, исходящих из травмированной кожи, сохраняется у мышей, гомозиготных по мутантному аллелю Hr^{hr} , несмотря на существенные анатомические аномалии волосных фолликулов.

Ключевые слова: волосные фолликулы, регенерация кожи.

Волосной фолликул млекопитающих – сложная структурно-функциональная единица, в которой постоянно протекают процессы клеточной дифференцировки. Развитие волосного фолликула начинается в эмбриогенезе и продолжается в циклической манере в течение всей жизни индивида. С самого рождения и до смерти волосной фолликул подвергается повторяющимся стадиям роста (анагена), дегенерации (катагена) и покоя (телогена) (Chase et al., 1953). Такая периодичность обусловлена наличием в нем собственных камбиальных элементов – стволовых клеток (СК) волосного фолликула, которые располагаются в области выпячивания наружного корневого влагалища (НКВ) (рис. 1). Вместе с салыной железой эту область не затрагивают постоянно сменяющиеся друг друга процессы дегенерации и роста (Paus, Coatsaris, 1999). Однако так как именно эти клетки составляют основу для каждой следующей стадии роста фолликула, то и процессам, протекающим в их нише, также свойственна определенная периодичность. После очередной дегенерации структуры волосного фолликула СК выпячивания подвергаются пролиферативной активации, после чего половина дочерних клеток спускается в область дермального сосочка, и волосной фолликул снова начинает расти (Matsuzaki, 2008). Известно также, что СК волосного фоллику-

ла участвуют не только в физиологической, но и в репаративной регенерации самого волосного фолликула, а также салыной железы и даже межфолликулярного эпидермиса в случае травмы (Oshima et al., 2001; Blanpain et al., 2004; Morris et al., 2004).

Несмотря на определенные межвидовые различия в хронометраже морфогенетического цикла волосного фолликула, основные его стадии и ключевые факторы, индуцирующие переходы между ними, очень консервативны. Поэтому мышь наряду с другими лабораторными животными является вполне адекватным модельным объектом для изучения особенностей развития и физиологии этого органа, а существование огромного числа мутантных линий мышей с наследственными нарушениями роста волос делает этих животных незаменимым инструментом в исследовании морфогенеза волосного фолликула и разработке подходов к лечению заболеваний кожи и волос у человека.

Регрессивный мутантный ген hr (*hairless*) был впервые описан у мышей в 1926 г. (Brooke, 1926). Наиболее инвасивным проявлением этого мутантного гена является полное и необратимое выпадение волос в течение первых трех недель жизни животного. Относительно недавно было охарактеризовано нормальный аллель Hr этого гена у мыши (Cachon-Gonzalez

Морфофункциональная оценка влияния биологической повязки на основе коллагена 1-го типа на регенерацию кожи после ожоговой травмы у мышей двух генетических линий / Е. Г. Колокольчикова, Е. А. Жиркова, П. К. Головатенко-Абрамов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 1. – С. 47-54. <https://koha.benran.ru/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=457386>

Патент № 2425880 С2 Российская Федерация, МПК С12N 15/00. способ получения трансгенных мышей : № 2009129235/10 : заявл. 30.07.2009: опубл. 10.08.2011 / А. П. Нестерова, П. К. Головатенко-Абрамов, Е. С. Платонов [и др.] ; заявитель Учреждение Российской Академии Наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. <https://elibrary.ru/item.asp?id=37753666>



МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОВЯЗКИ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА 1-ГО ТИПА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОЖИ ПОСЛЕ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЫ У МЫШЕЙ ДВУХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

Е.Г. Колокольчикова¹, Е.А. Жиркова¹, П.К. Головатенко-Абрамов¹, Е.С. Платонов¹, В.С. Бичарова¹, В.Б. Кватен¹

¹ИИИ старей повязки им. Н.И. Вавилова РАН; ²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Цель морфофункциональной оценки влияния биологической повязки на основе коллагена 1-го типа на заживление ожоговой раны III степени у беспородных мышей и мышей мутантной линии *H^h/H^h* (безволосые) с помощью гистологического метода и световой микроскопии. Показан выраженный стимулирующий эффект повязки на регенерацию кожи у мышей. По данным радиолографии, у мышей *H^h/H^h* при использовании повязки на ранней стадии после ожога отмечена активная пролиферация эпителиальных клеток дермального слоя и эндотелиоцитов сосудов. Выдвинута гипотеза о механизме стимулирующего влияния повязки с коллагеном на заживление раны.

Ключевые слова: регенерация кожи, биологическая повязка, *H^h/H^h*, биологическая повязка, коллаген I типа, эпителиальные клетки.

Физиологическая регенерация эпидермиса кожи осуществляется за счет стволовых клеток его базального слоя. При повреждении базального слоя в восстановлении эпидермиса участвуют стволовые клетки придатков кожи — волосяных фолликулов (ВФ), сальных и потовых желез [12]. Показано, что мутация в гене *Hes1* (*H^h*) у мышей вызывает разрушение нормально сформированного в эмбриогенезе ВФ, что приводит к полному облысению животных [16]. Такая линия мышей, гомозиготных по мутантному аллелю гена *H^h*, используется в качестве модели для изучения механизмов функционирования ВФ и разработки методов лечения болезни роста волос. Фенотипическое проявление мутации гена *H^h* у мышей имеет сходство с наследственной облысением человека — патологией атрофией [17]. В этой связи исследование функциональных свойств гена *H^h* расширяет понимание нормальной физиологии кожи человека.

В клинической практике для местного лечения ожоговых ран успешно применяют биологически активные повязки. Так, трансплантация живых аллогенных фибробластов или повязка

на основе коллагена 1-го типа с тромбоцитарным фактором роста (PDGF—BB) и ранние сроки (1–2-е сутки) после ожога IIIA степени у человека значительно ускоряют процесс заживления кожной раны [1]. Мы предполагаем, что одним из механизмов воздействия таких повязок является активация стволовых клеток (СК) придатков кожи.

Цель работы — сравнительный морфофункциональный анализ влияния биологической повязки на основе коллагена 1-го типа на процесс регенерации кожи после ожога IIIA степени у беспородных и безволосых мышей мутантной линии *H^h/H^h*.

Методика исследования

Работа выполнена на белых беспородных мышак массой 20–25 г и безволосых мышак мутантной линии *H^h/H^h* массой 18–22 г. Всего использовано 20 животных в возрасте 3–5 мес. Эксперименты проведены в соответствии с Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1976.

Под общим интраперитонеальным наркозом (азертин в дозе 0,25 мг/кг массы тела) животным наносили ожог на спину (3% повязочной тела) с помощью аппликатора в течение 6 с пачетки диаметром 19 мм, нагретой до 95–100°C,

Адрес для корреспонденции: kkolki@pmail.ru, Колокольчикова Е.Г.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ, ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009129235/10, 30.07.2009
(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 30.07.2009
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 30.07.2009
(43) Дата публикации заявки: 10.08.2011 Бюл. № 4
(45) Опубликовано: 10.08.2011 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: НЕСТЕРОВА А.П. «Получение трансгенных мышей с микроуацей в гене IGF2 методом электропорации оплодотворенных ооцитов», Вавиловские чтения - 2008, Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию Саратовского государственного университета, подписано в печать 01.11.2008, с.284-286. US 2002046414 A1, 18.04.2002.

Адрес для переписки:
119991, Москва, ул. Губкина, 3, Учреждение Российской Академии Наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, А.П.Нестерова

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

(57) Реферат:
Способ относится к области генной инженерии и биологии развития. Способ предусматривает трансплантацию зародышей, все клетки которых содержат дополнительную генетическую информацию, реципиентной самке. При этом введение дополнительной генетической информации в одноклеточный зародыш проводят в среде, содержащей 150

(19) RU (11) 2 425 880 (13) C2
(51) МПК C12N 15/00 (2006.01)

(72) Автор(ы):
Нестерова Анастасия Петровна (RU), Головатенко-Абрамов Павел Кириллович (RU), Платонов Евгений Семенович (RU), Клямов Евгений Александрович (RU), Брускин Сергей Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Учреждение Российской Академии Наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (RU)

RU 2 425 880 C2

Библиотека Института общей генетики РАН
Отдел Библиотеки по естественным наукам РАН

e-mail: biblioteka@vigg.ru



<https://vk.com/bibliogen>



<https://max.ru/join/ZyK36XMIWq5luHmjKcfsnrXop6oCmGx8onlXf88r-al>

2026