

Нервный гребень против мезодермы: битва за череп

Малашичев Егор Борисович

Санкт-Петербургский государственный университет
кафедра зоологии позвоночных

2018 г.

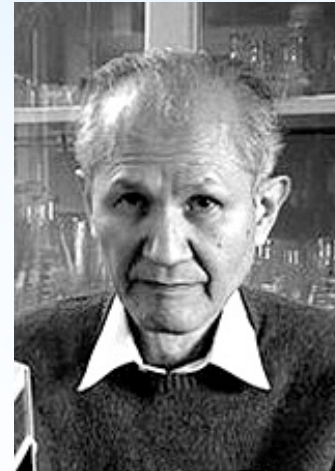
*Трансгенные ПОЗВОНОЧНЫЕ – зачем?

- * Исследование функций генов и генных каскадов (новое окружение, нехарактерные взаимодействия)
- * Исследование биохимических превращений гормонов (свиньи с геном соматотропина)
- * Получение ГМ организмов для сельского хозяйства и медицины (новые свойства, продукция ценных белков в т.ч. с лечебными свойствами – фармацевтические биореакторы)
- * Ксенотрансплантация (свиньи с человеческими поверхностными антигенами)
- * Составление карт презумптивных зачатков органов, эволюционная эмбриология

* Зелёный флуоресцентный белок



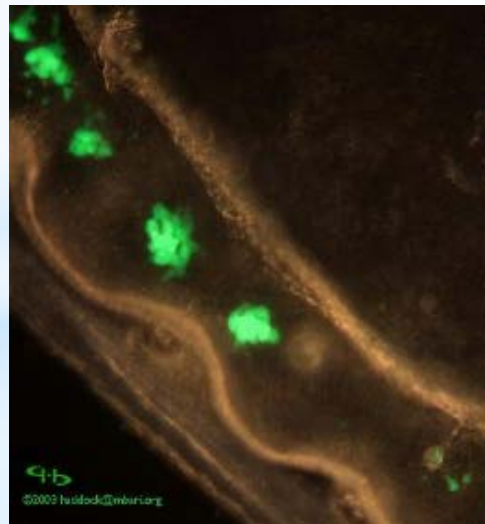
Aequorea victoria
1962 - **GFP**



Osamu Shimomura

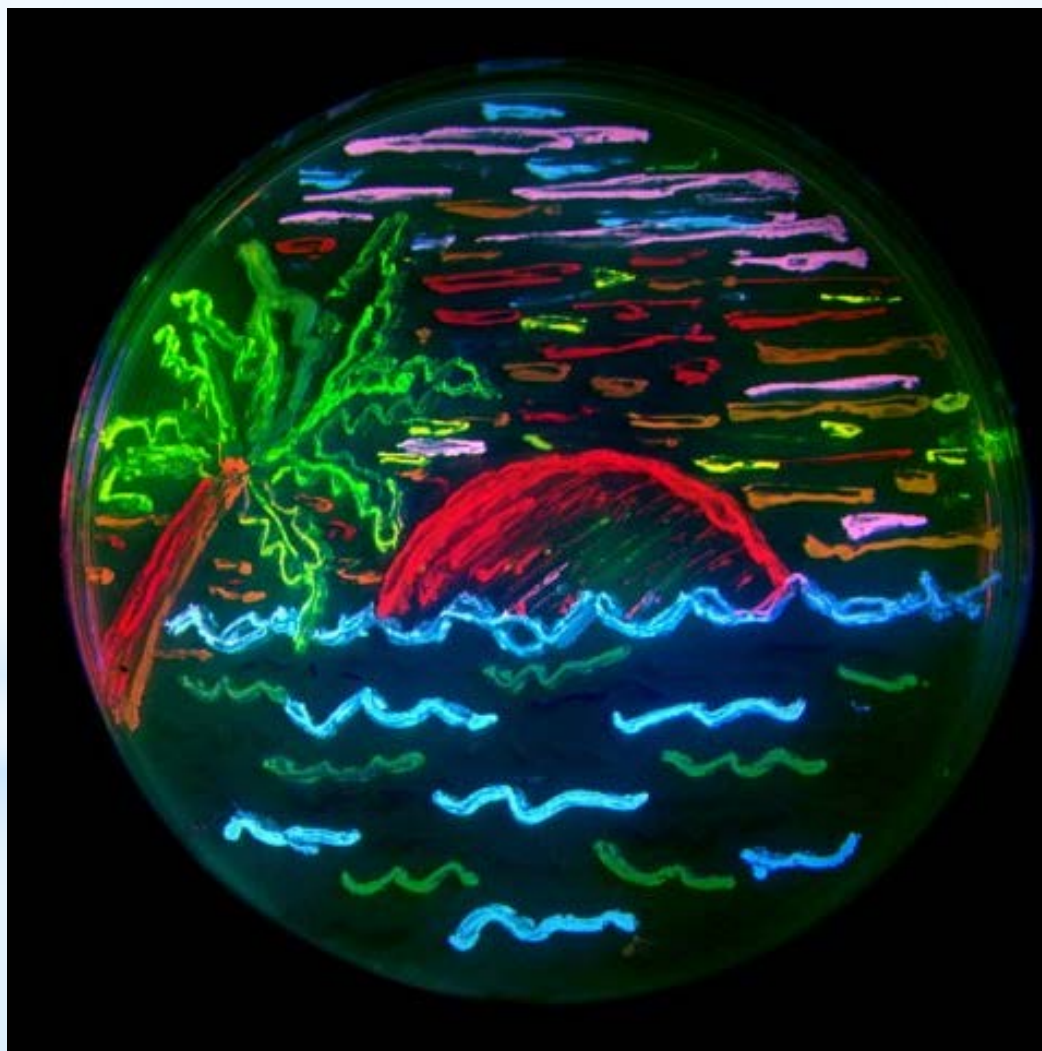
Marine Biological Laboratory Woods
Hole, MA, USA

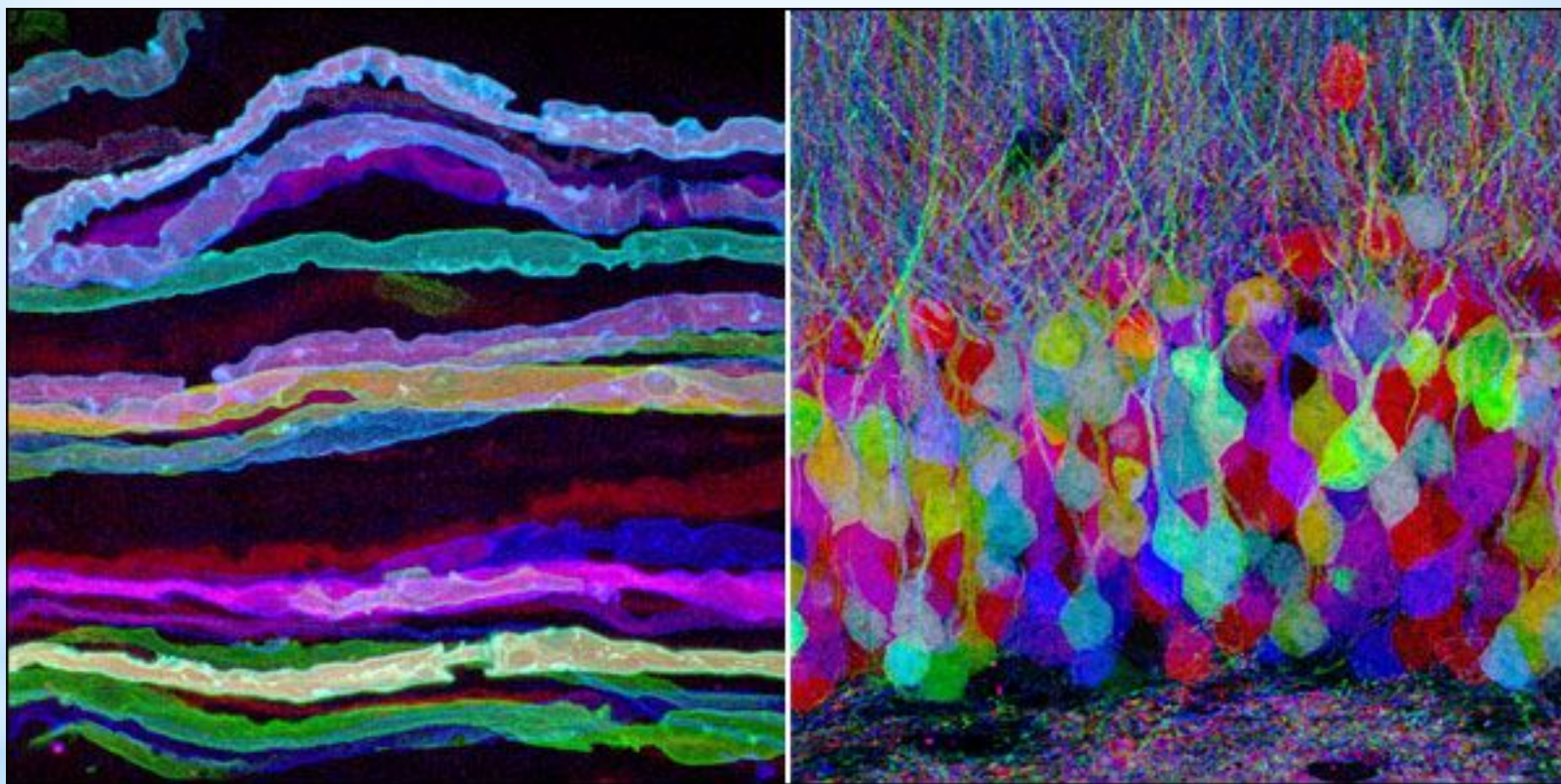
b. 1928
(in Kyoto, Japan)



Михаил Мац и Сергей Лукьянов – dsRED

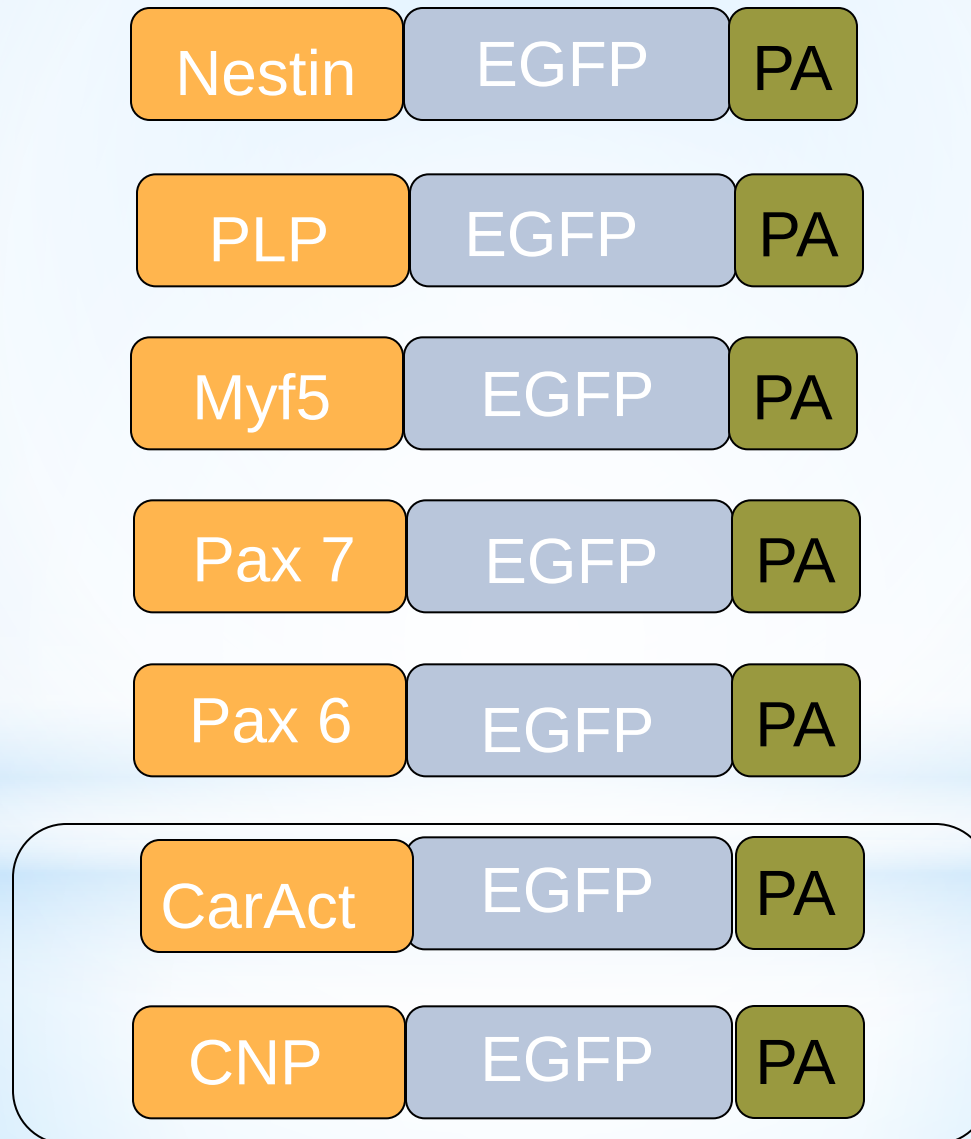
Tsien - mPlum, mCherry, mStrawberry, mOrange and mCitrine





методом Brainbow (Ж. Ливе,
2007)

- Mouse/Xenopus промоторы.

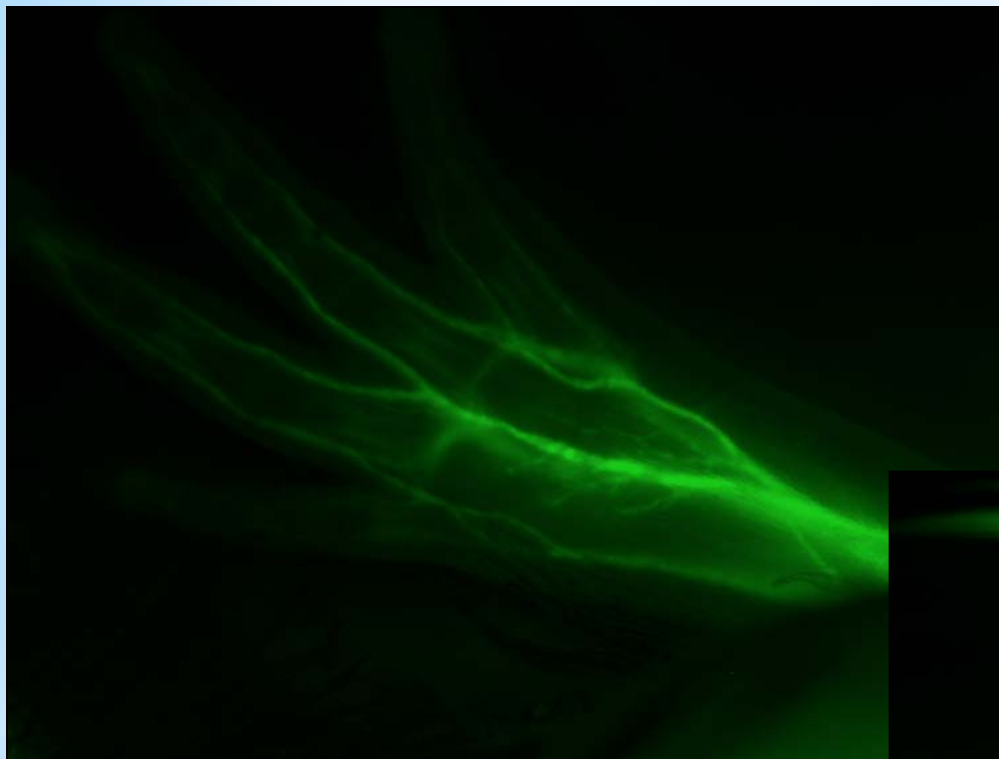


CNP

eGFP

PAd

2,3-cyclic nucleotide 3-phosphohydrolase



Задняя конечность

Передняя конечность

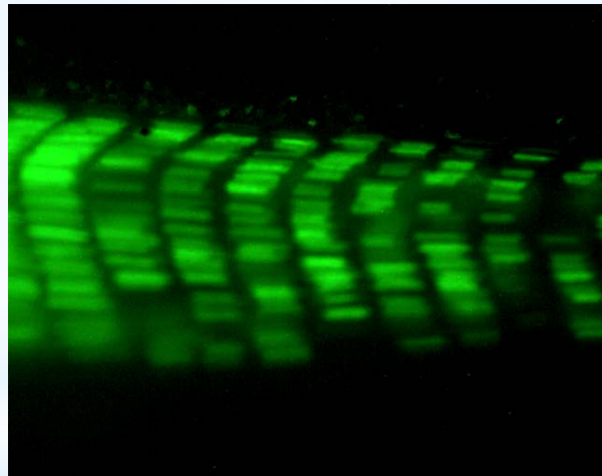


Khattak S. ©

Car Act

eGFP

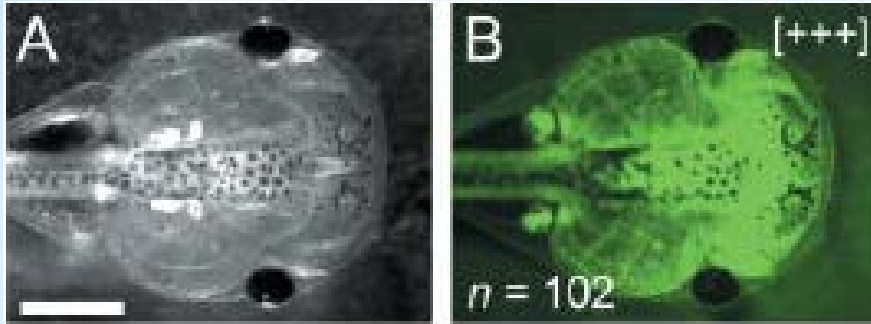
PAd



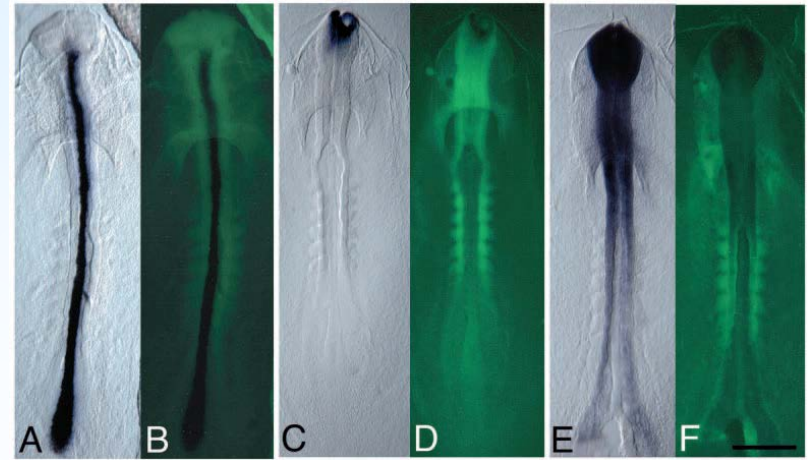
Мышцы хвоста личинки аксолотля, выявленные с помощью GFP

Xenopus Cardiac Actin-GFP

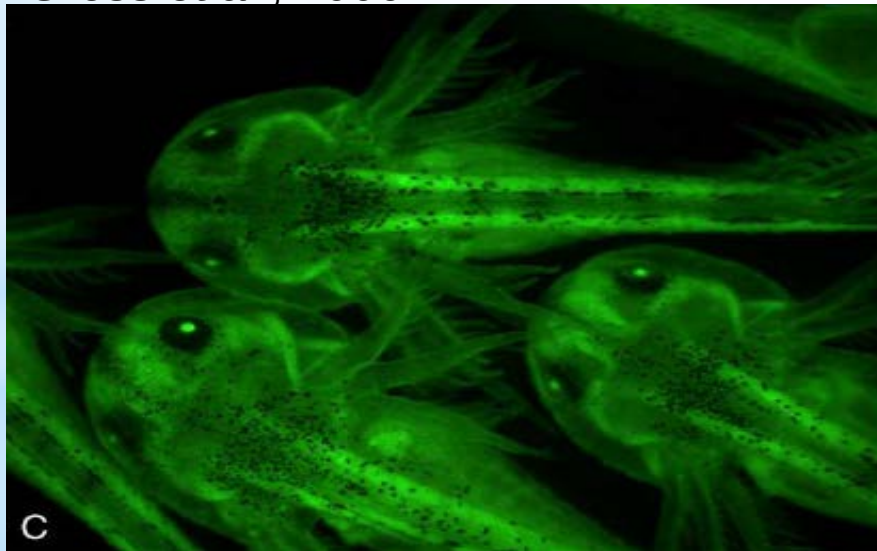
Трансгенные «светлячки»



Gross et al., 2006

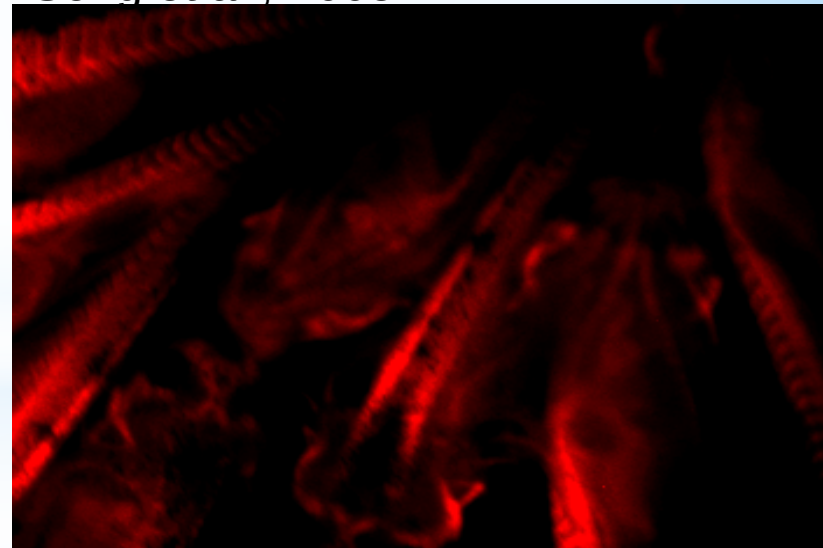


Song et al., 2005



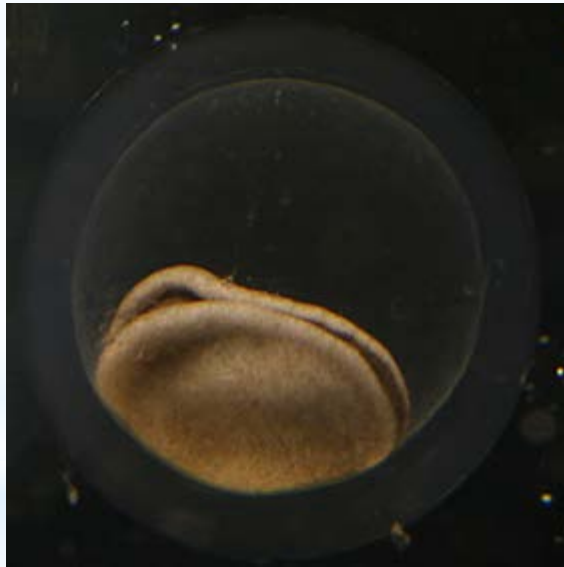
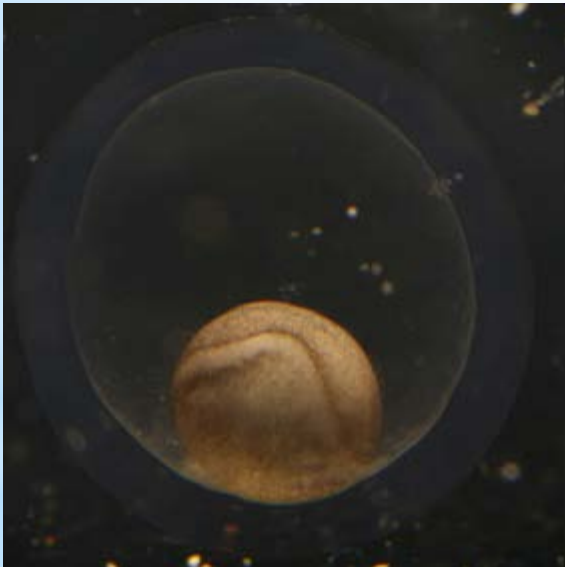
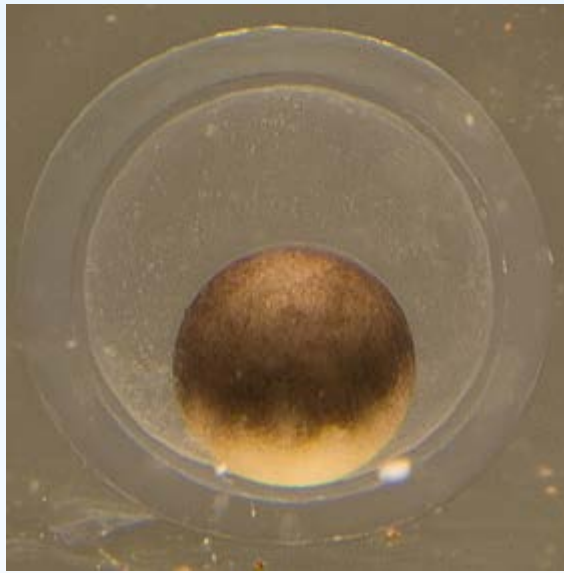
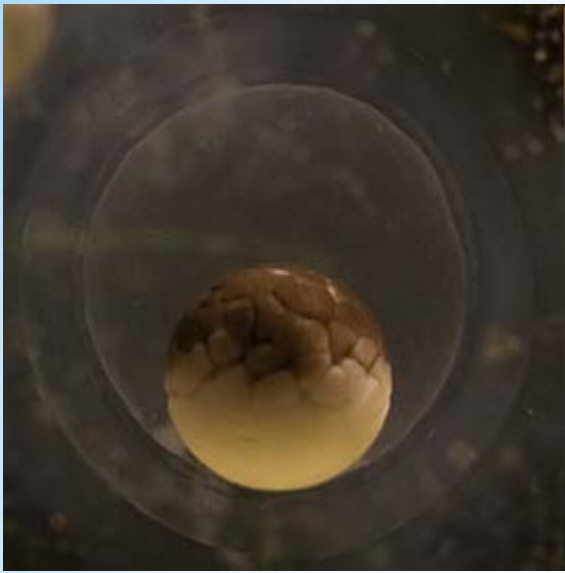
GFP – ядерные трансгены

Sobkow et al., 2006



Cherry – ядерные трансгены

Kragl et al., 2009



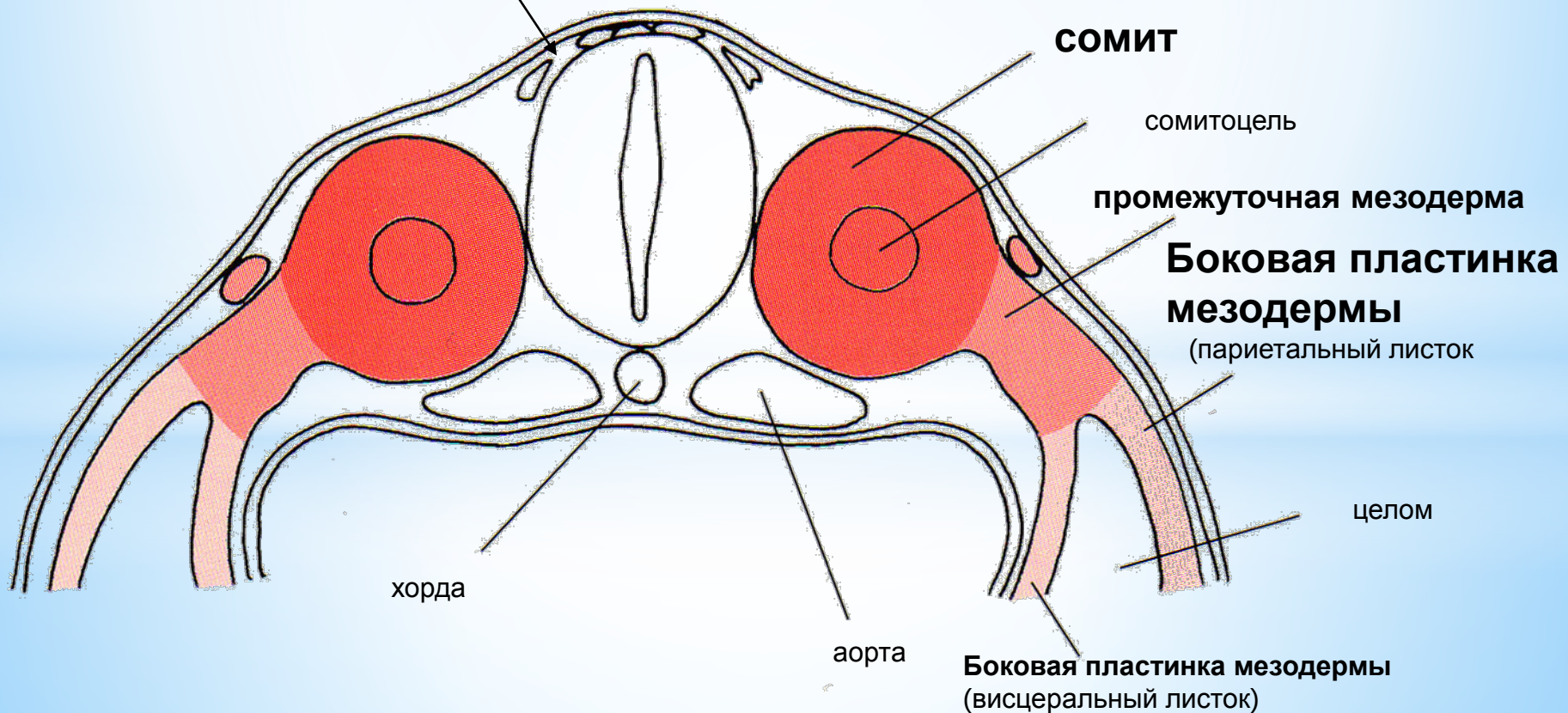
Ambystoma mexicanum

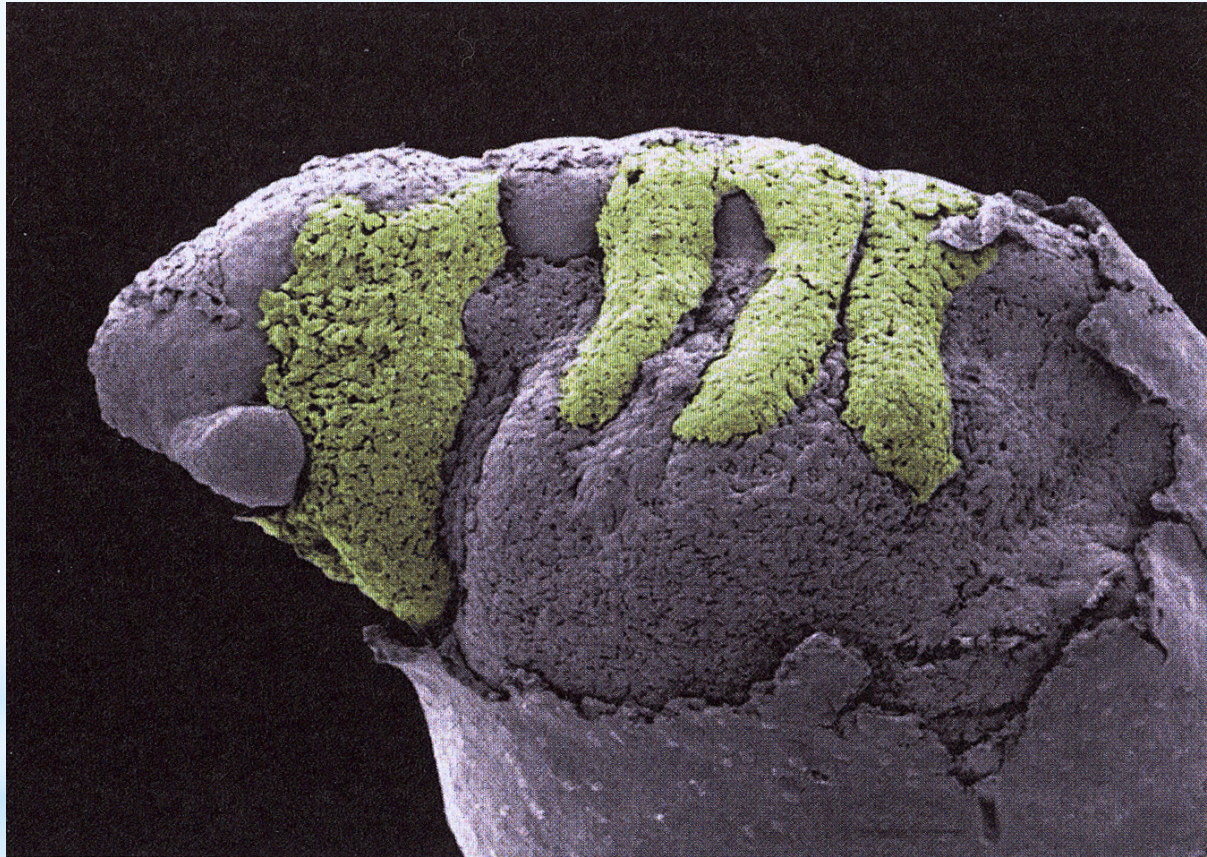
Возможные эмбриональные источники скелетных тканей

→ Боковая пластинка мезодермы

→ Мезодермальные сомиты

→ Нервный гребень





ного
бня

Полосы миграции клеток нервного гребня (выделены цветом с помощью графического редактора), соответствующие будущим челюстной, гиоидной и жаберным дугам зародыша *Ambystoma mexicanum*. Эктодерма удалена. Фото P. Falck и L. Olsson.

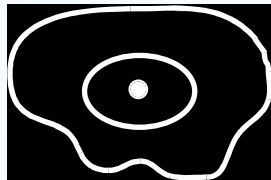
Система перепел-курица по исследованию происхождения эмбриональных тканей

Le Douarin, N.M. (1969). *Bull. Biol. Fr. Belg.* 103, 435-52

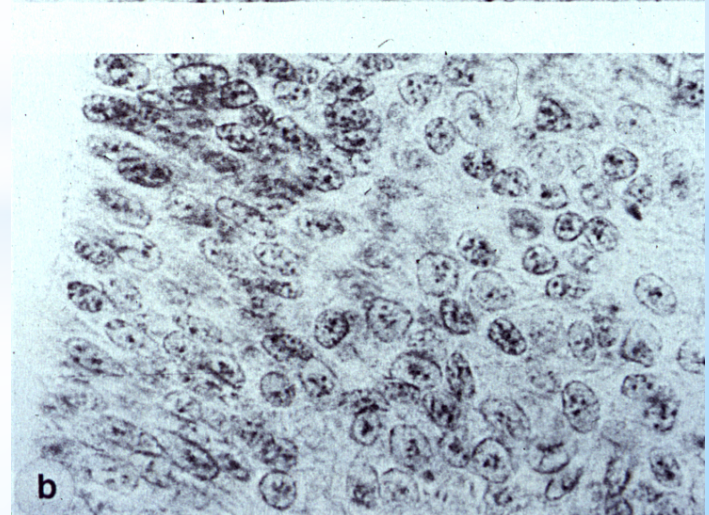
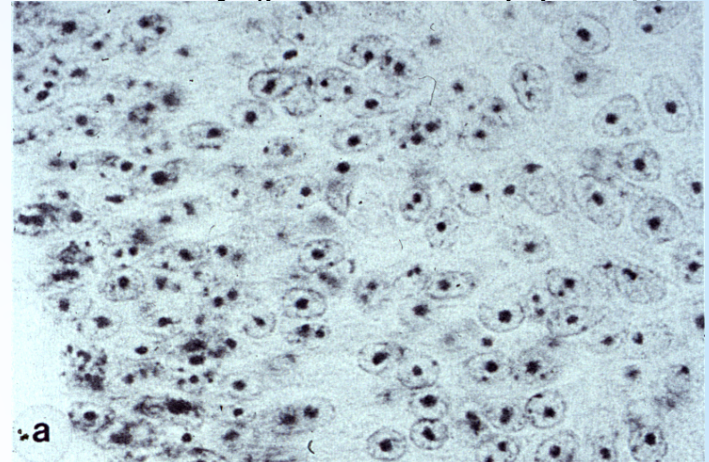
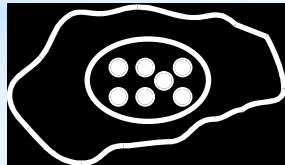
Принцип Окраска ядер клеток с помощью окраски по Фельгену (реагент Шиффа – ДНК)

Характеристики окраски

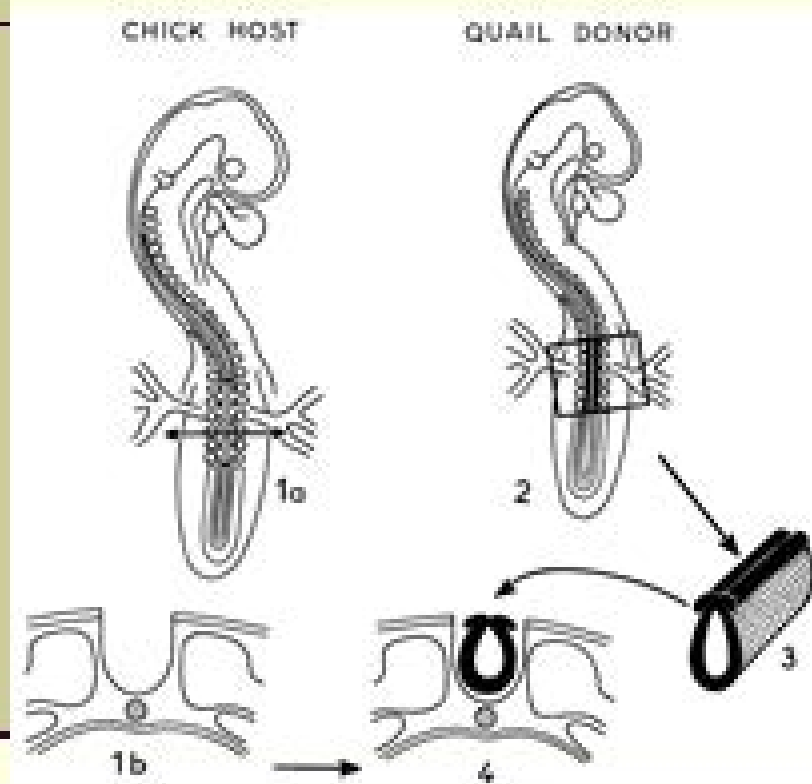
Перепел: одна гетерохроматиновая точка



Курица: рассеянный гетерохроматин



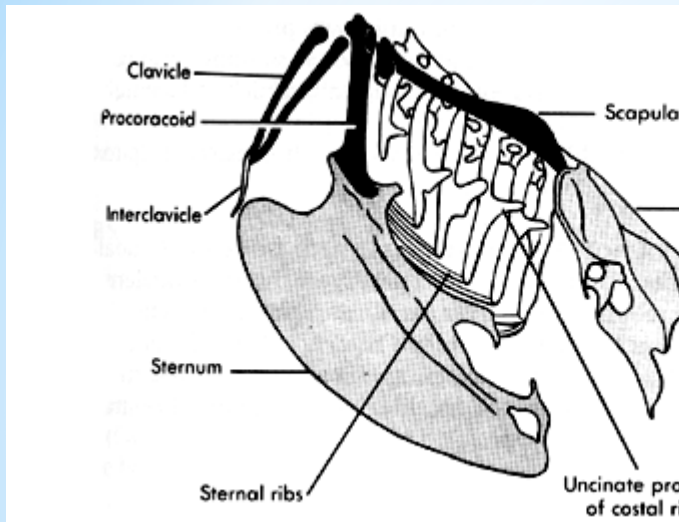
Перепел-курица маркирующая система



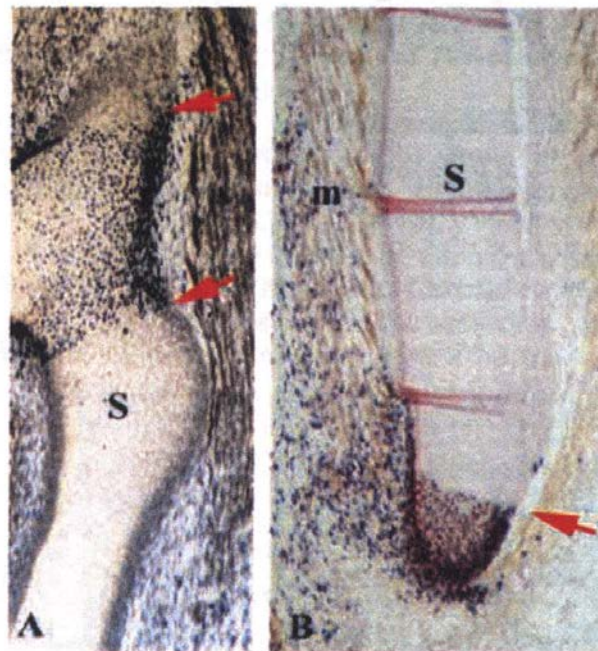
Операции



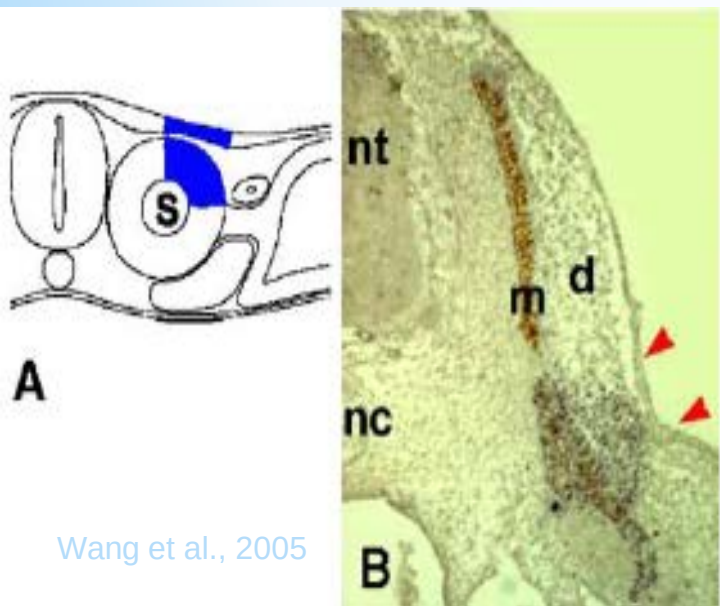
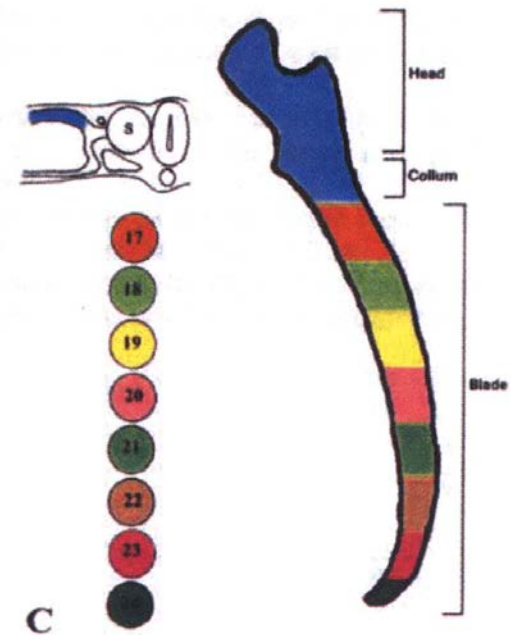
Белый Леггорн хозяин/ перепел донор



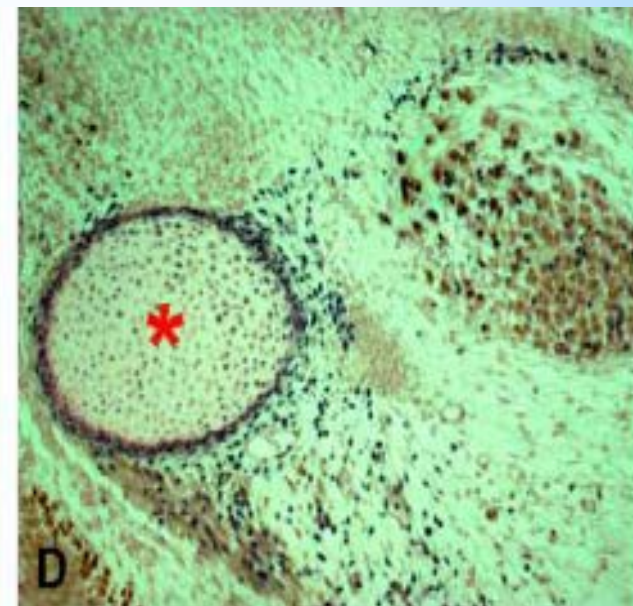
Chevalier, 1977

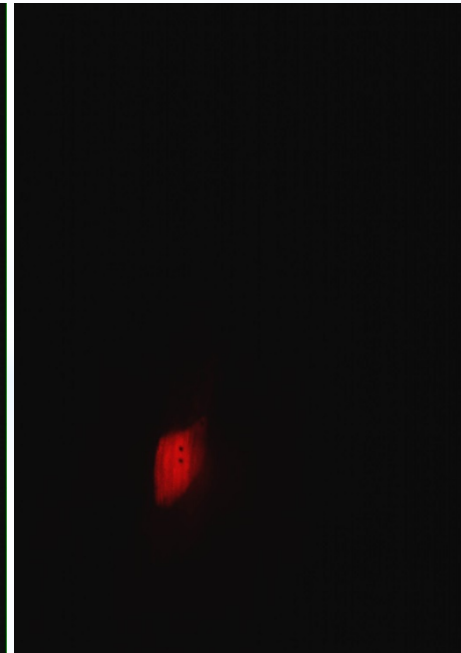
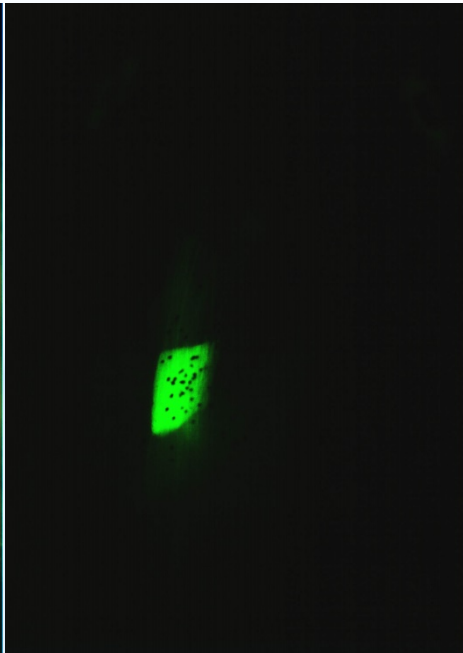
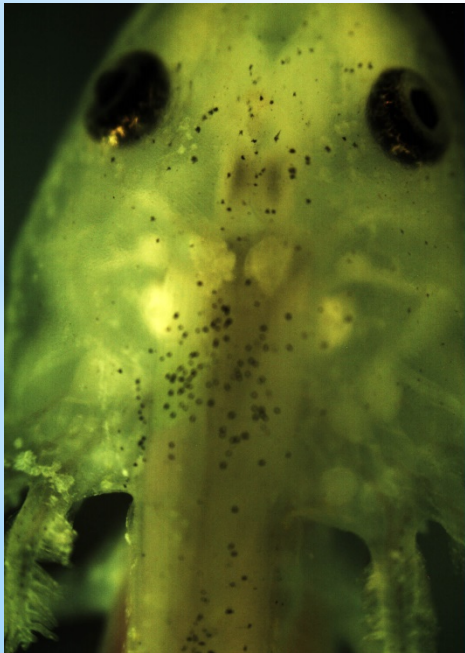
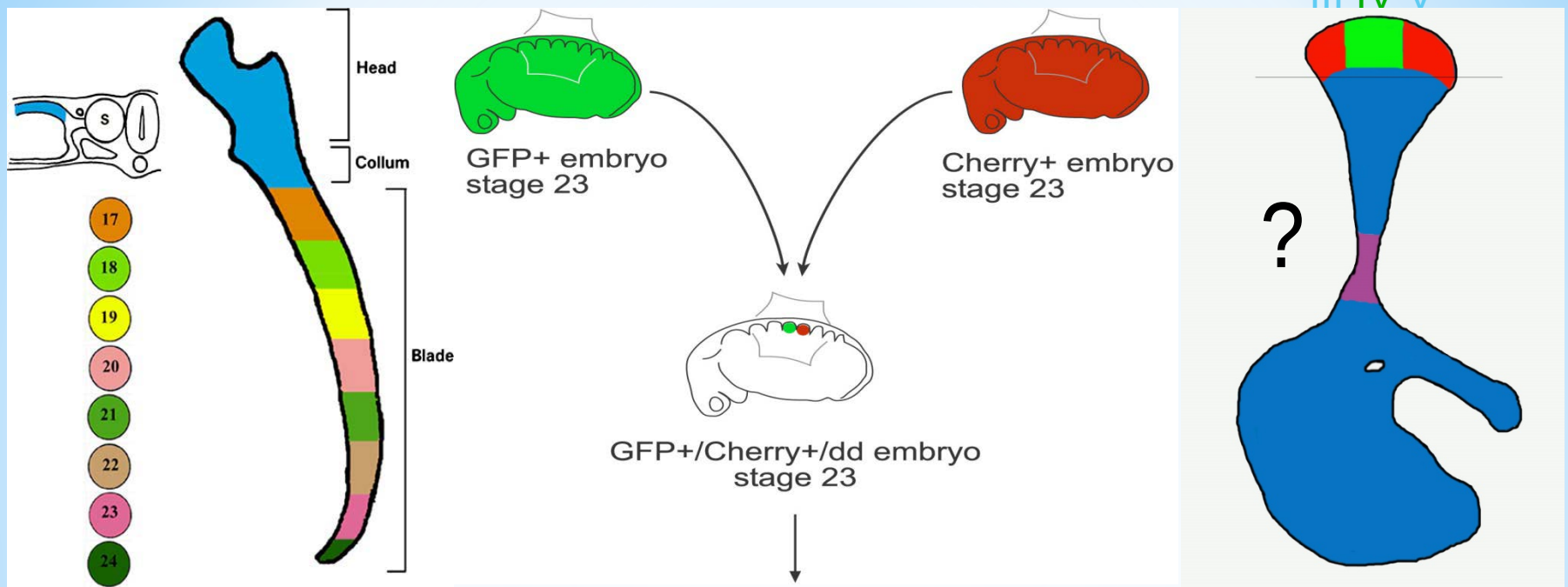


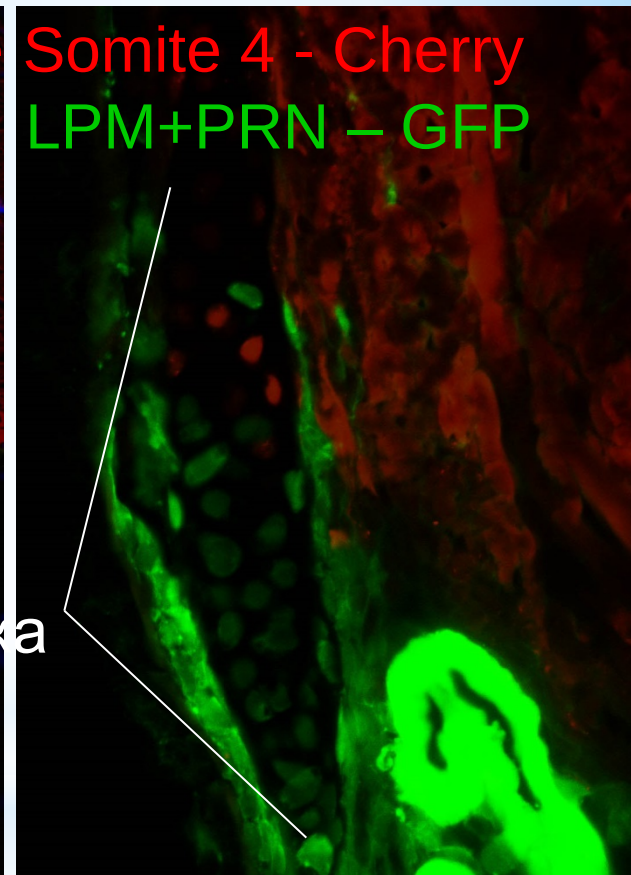
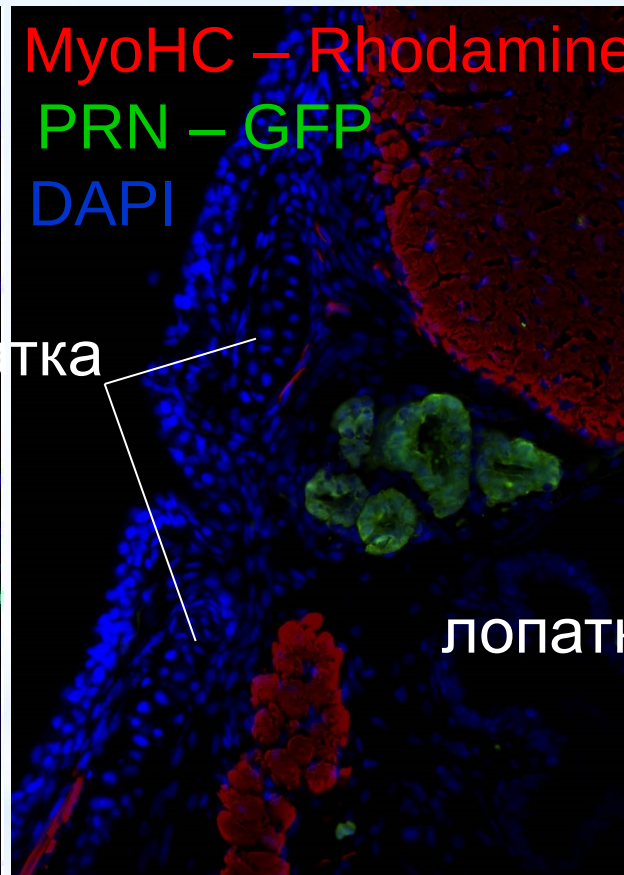
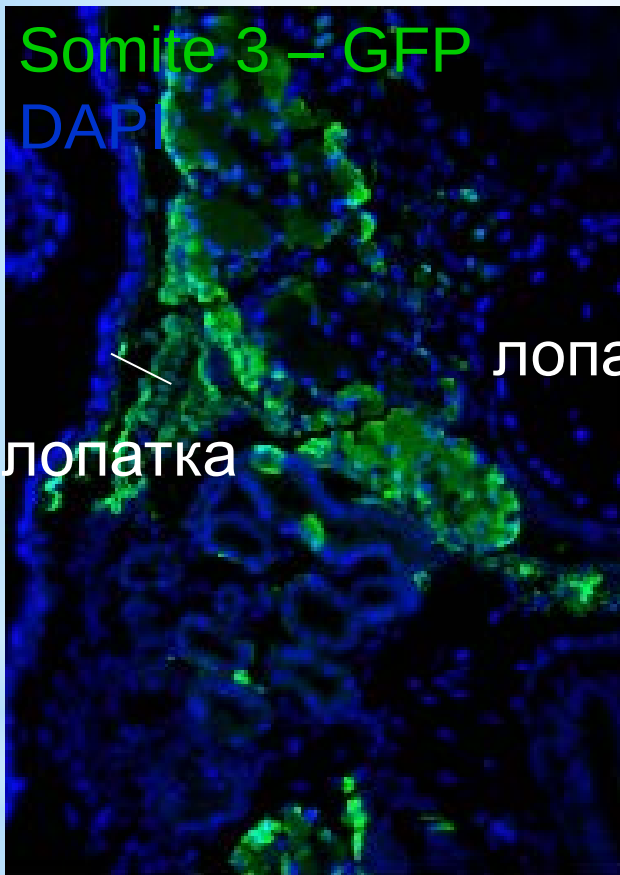
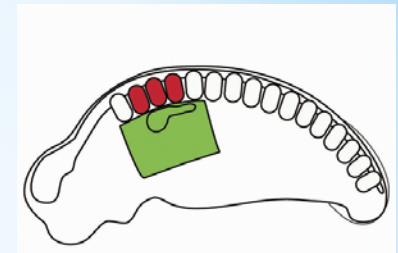
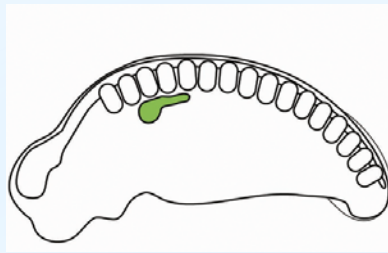
Huang et al., 2000



Wang et al., 2005

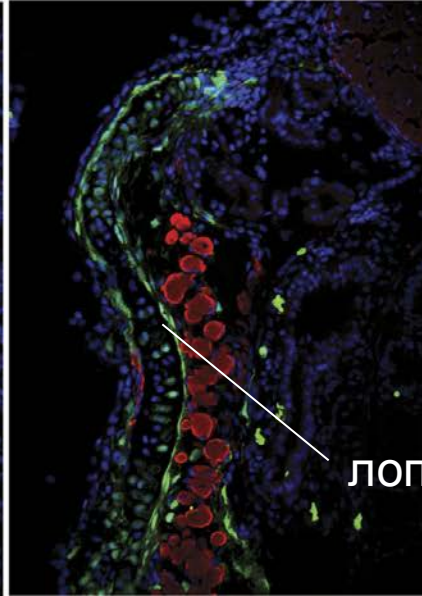
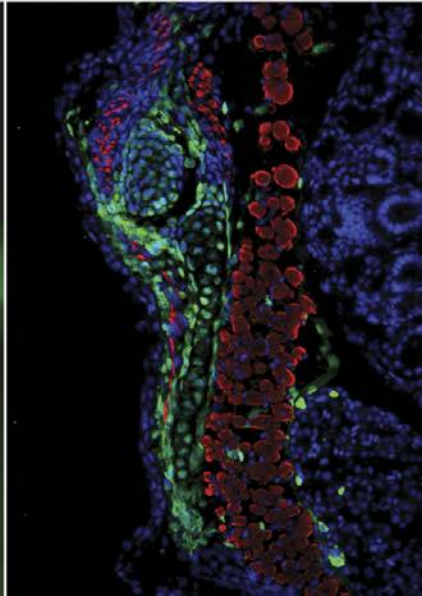
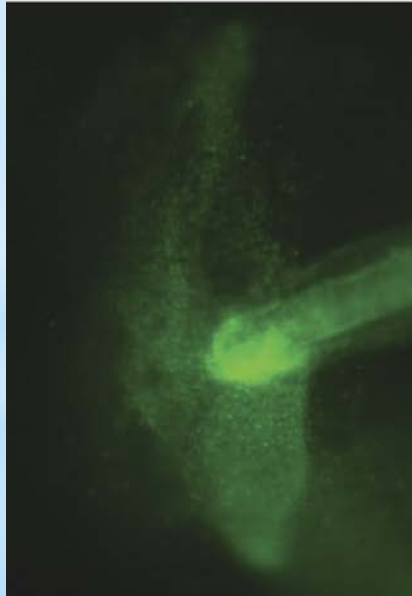
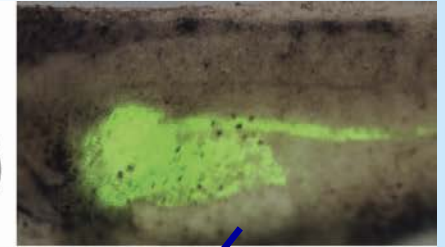
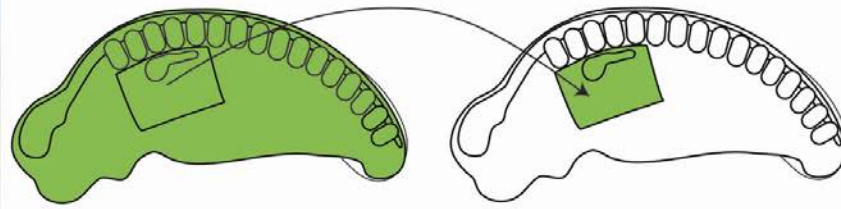




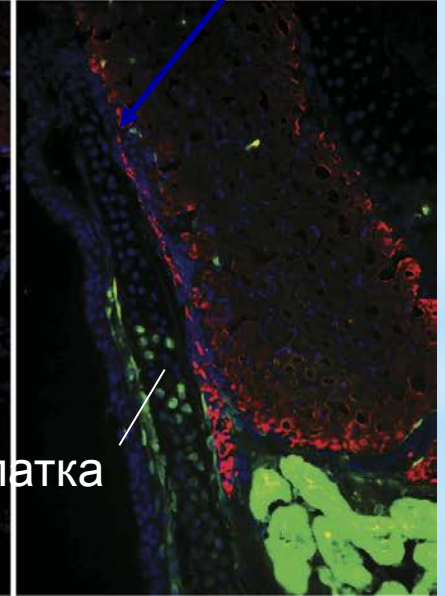


Malashichev, Epperlein, Khattak, Tanaka, unpublished

* Боковая пластинка – основной источник скелета пояса конечностей

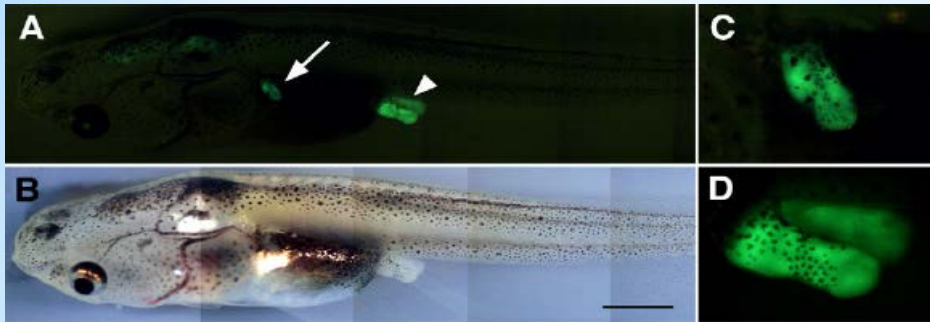


лопатка



Prx1

Suzuki et al., 2007



Xenopus

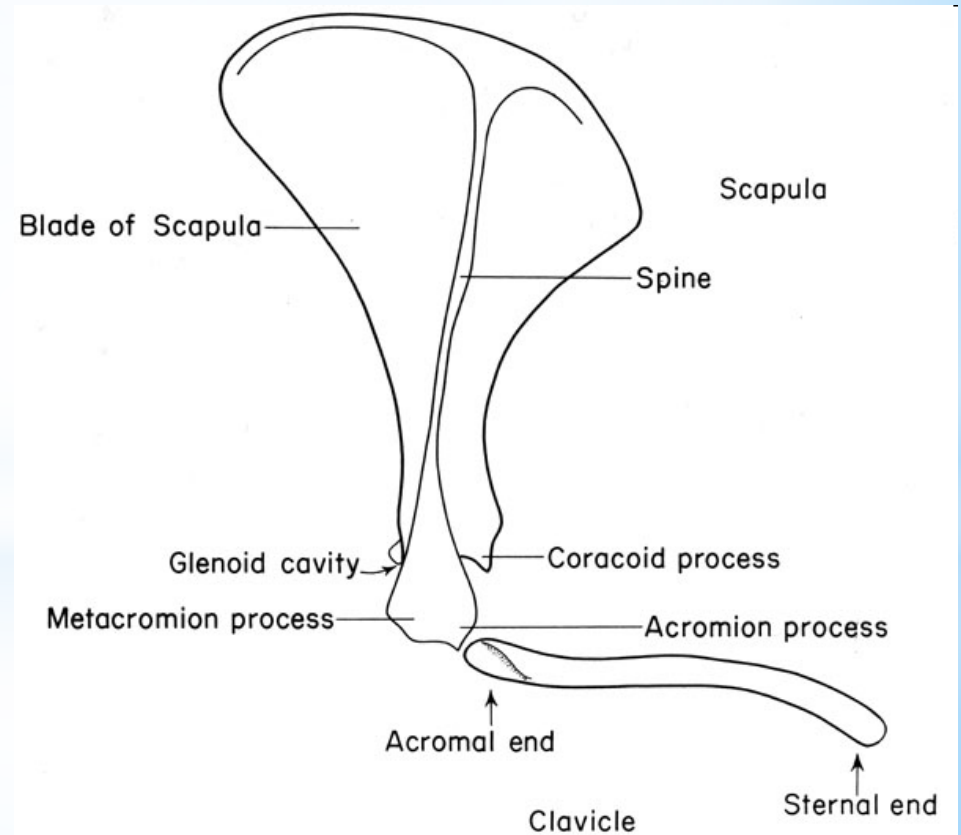
Mus

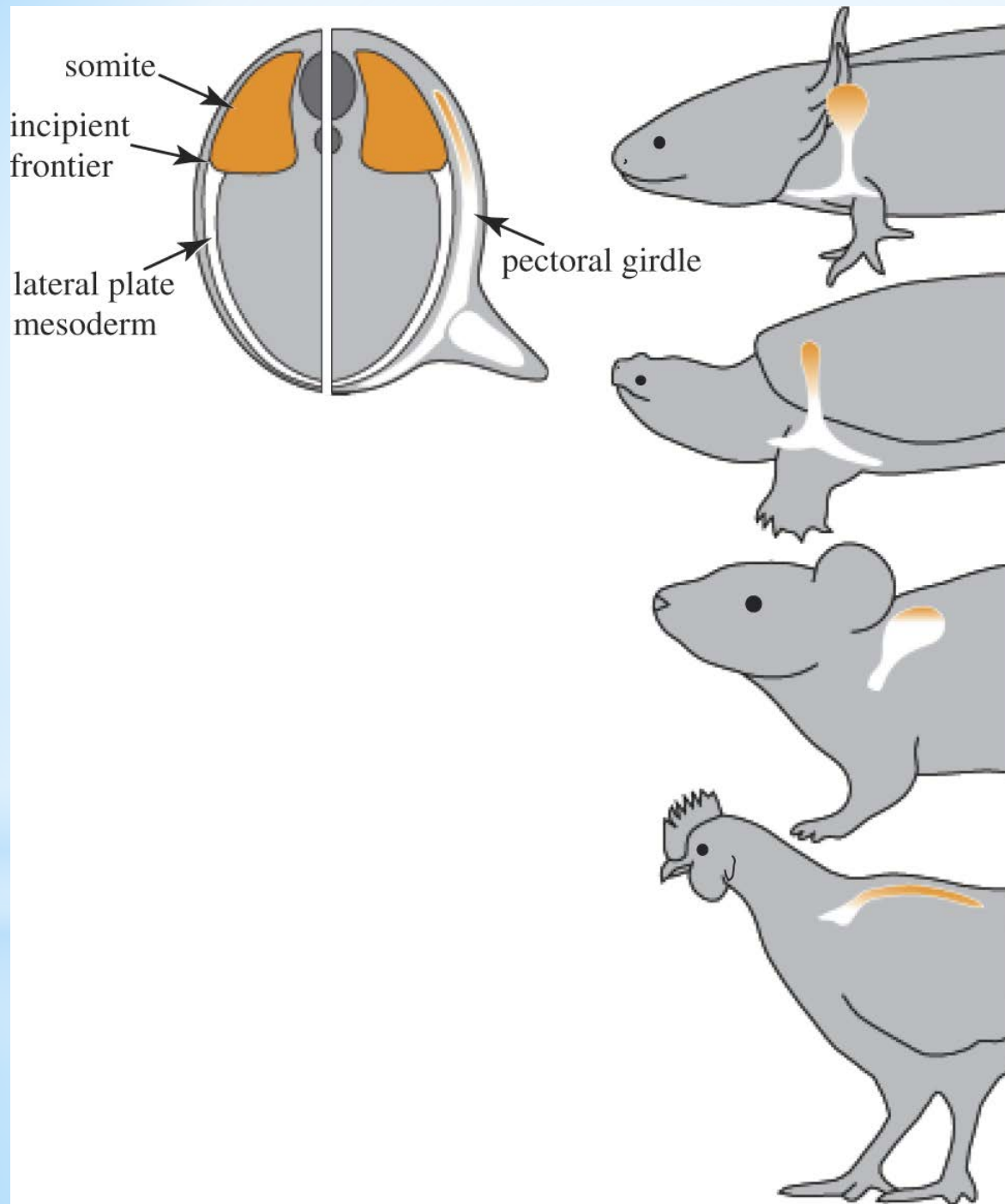
Pax3
Valasek et al., 2010

HoxD4

Matsuoka et al., 2005

Prx1
Durland et al., 2008





CARTILAGINOUS FISH

BONY FISH

FROGS

SALAMANDERS

TURTLES

BIRDS

MAMMALS

■ endochondral
■ dermal

When known:

■ neural crest-derived endochondral
■ neural crest-derived dermal
■ somite derived endochondral

Squalus

Danio

Rana

Ambystoma

Chelydra

Gallus

Mus

Neoceratodus

†*Tulerpeton*

†*Cacops*

†*Acanthostega*

STEM-GROUP
TETRAPODA

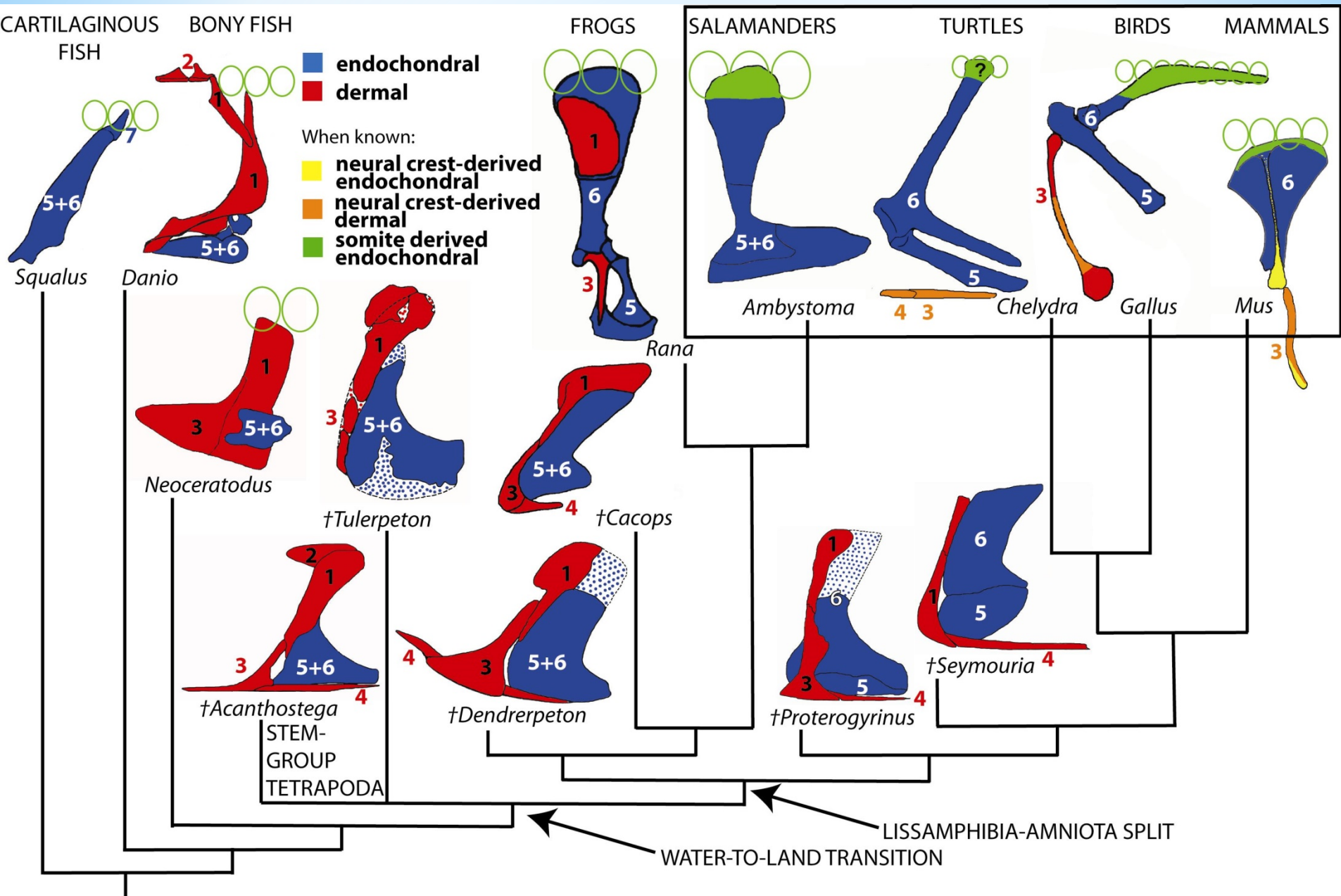
†*Dendrerpeton*

†*Proterogyrinus*

†*Seymouria*

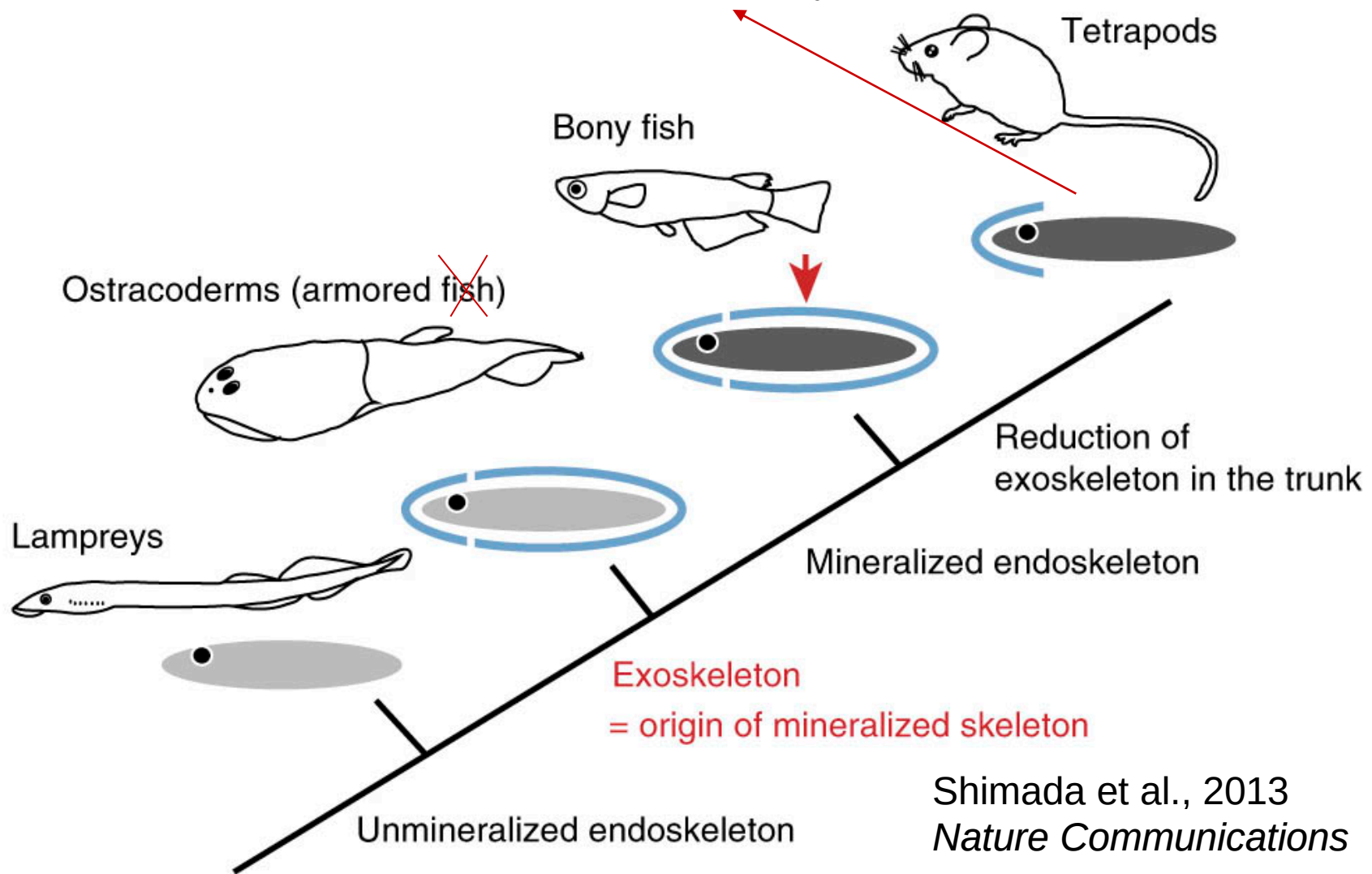
WATER-TO-LAND TRANSITION

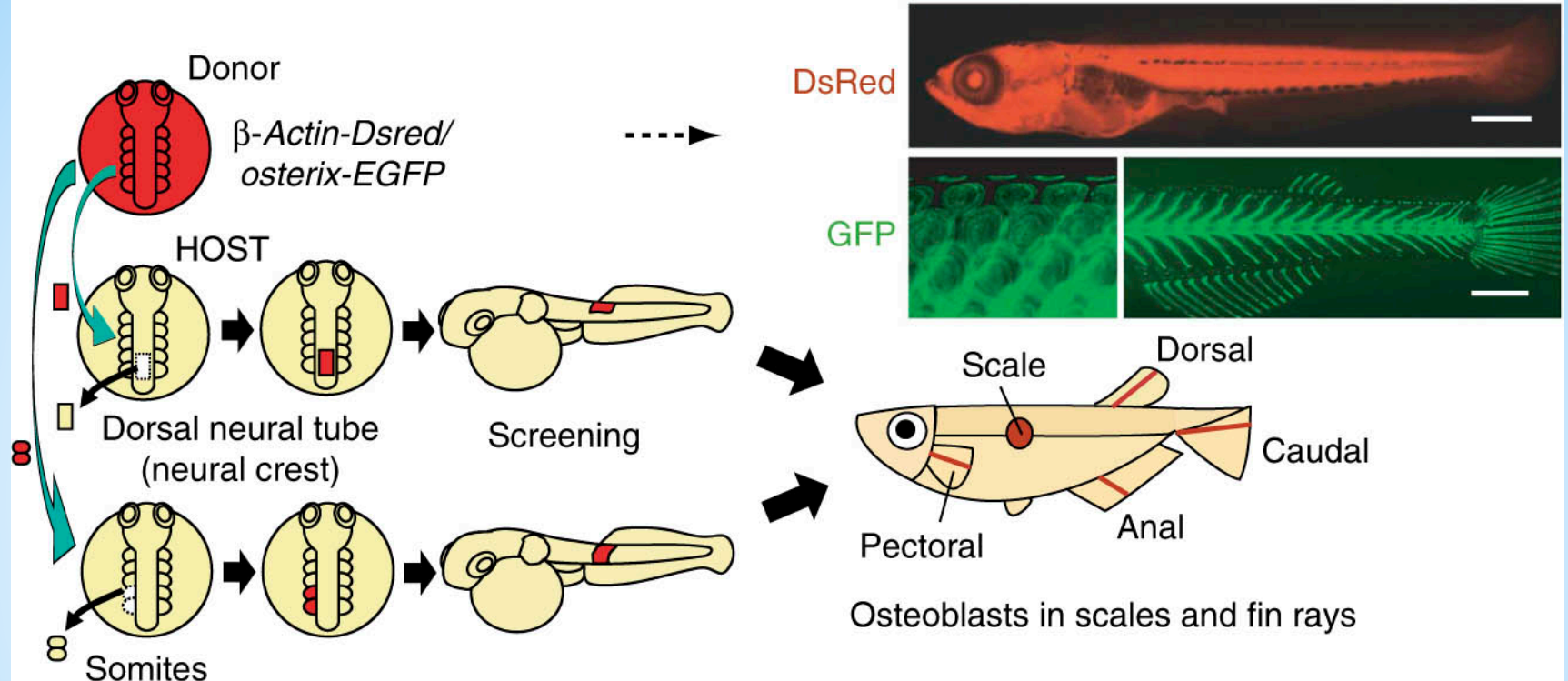
LISSAMPHIBIA-AMNIOTA SPLIT



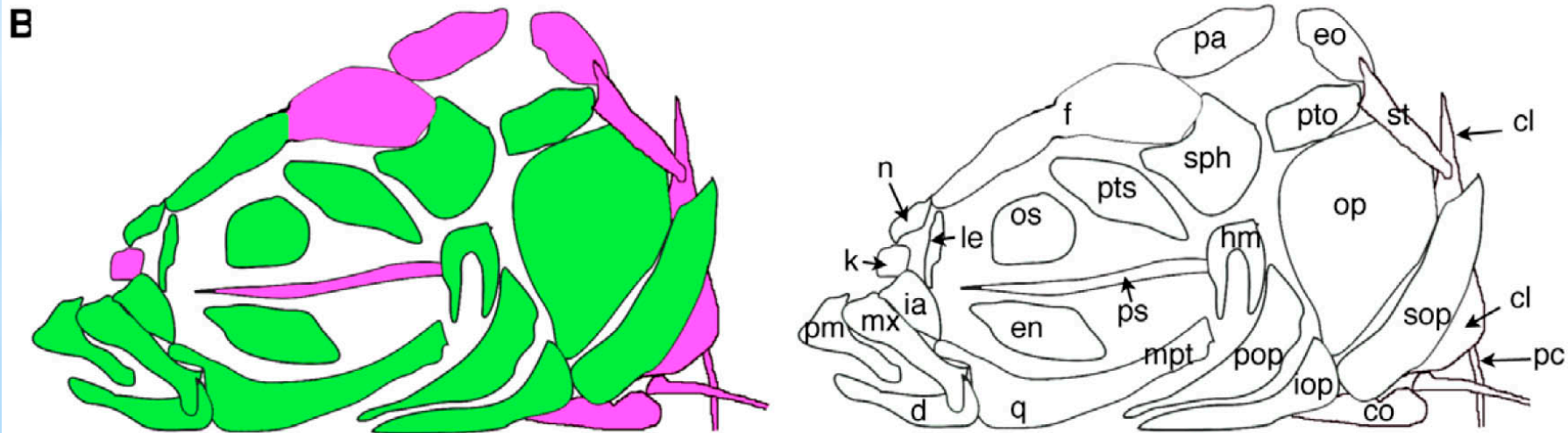
* Откуда пошла идея о том, что нервный гребень
– основной источник для экзоскелета
позвоночных?

Исключения, поддерживающие правило: пластрон и края карапакса черепах, гастралии крокодилов, ключицы у всех наземных тетрапод.



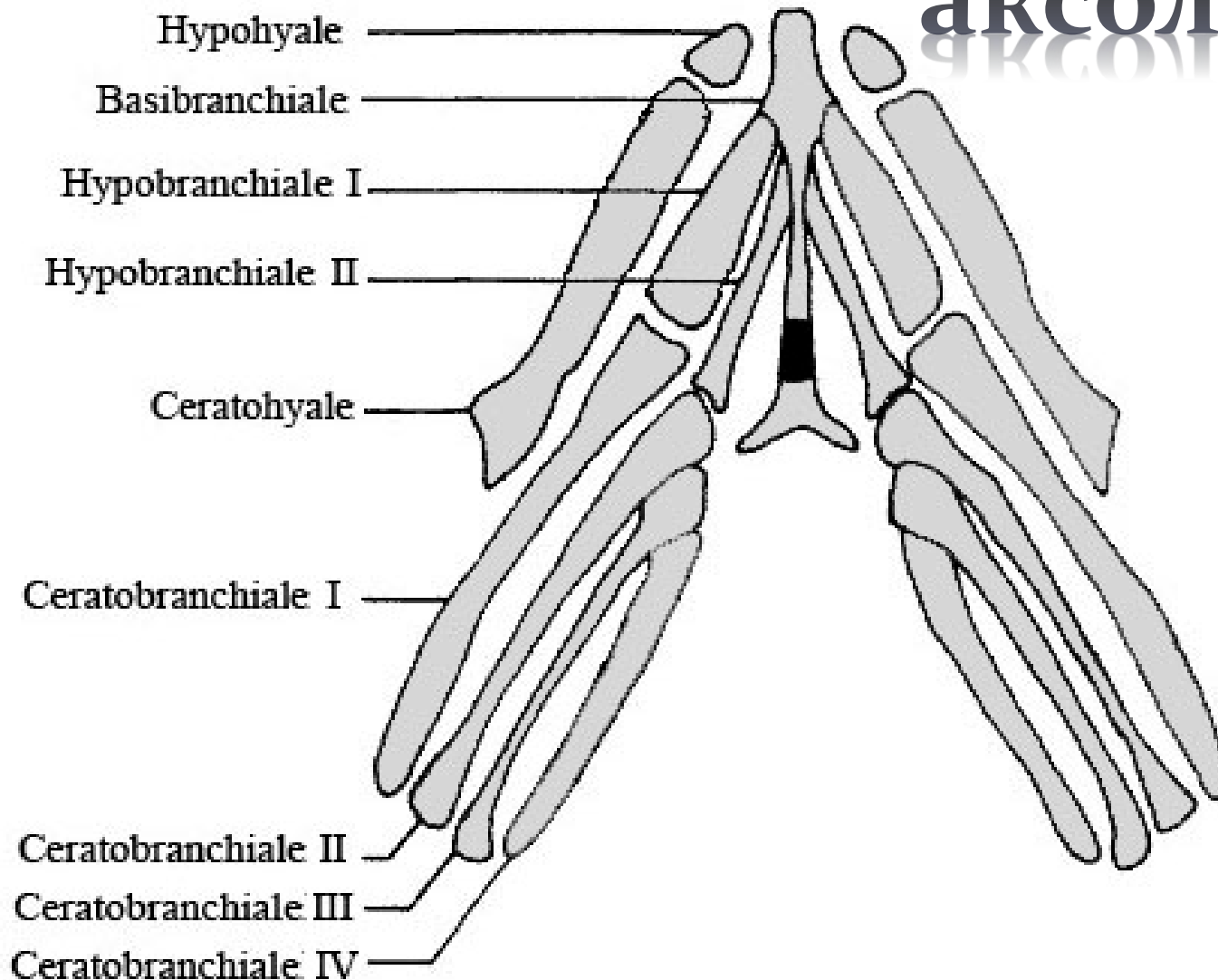


Shimada et al., 2013



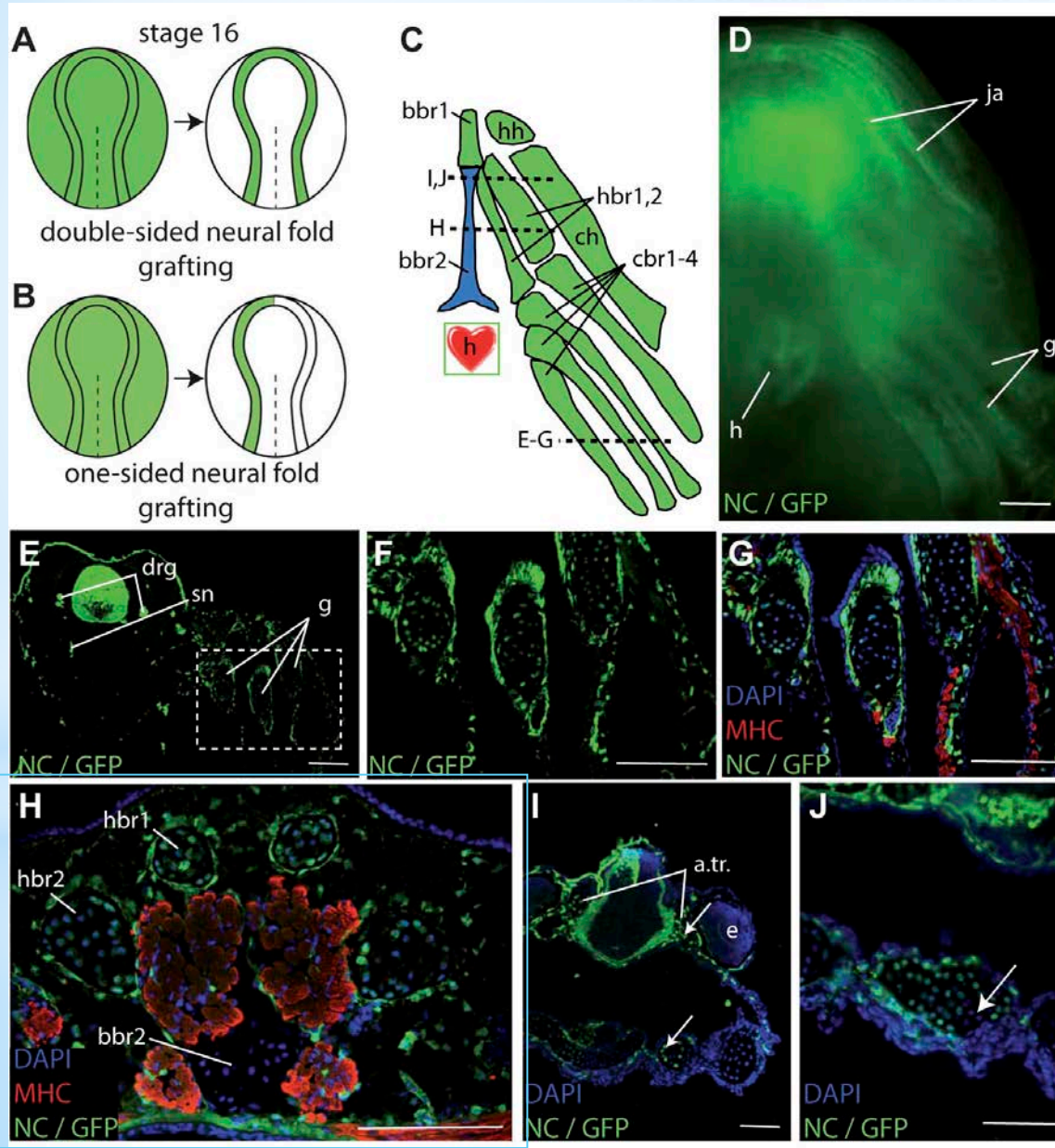
Kague et al., 2012; Mongera et al., 2013

* Гиобранхиальный аппарат аксолотля



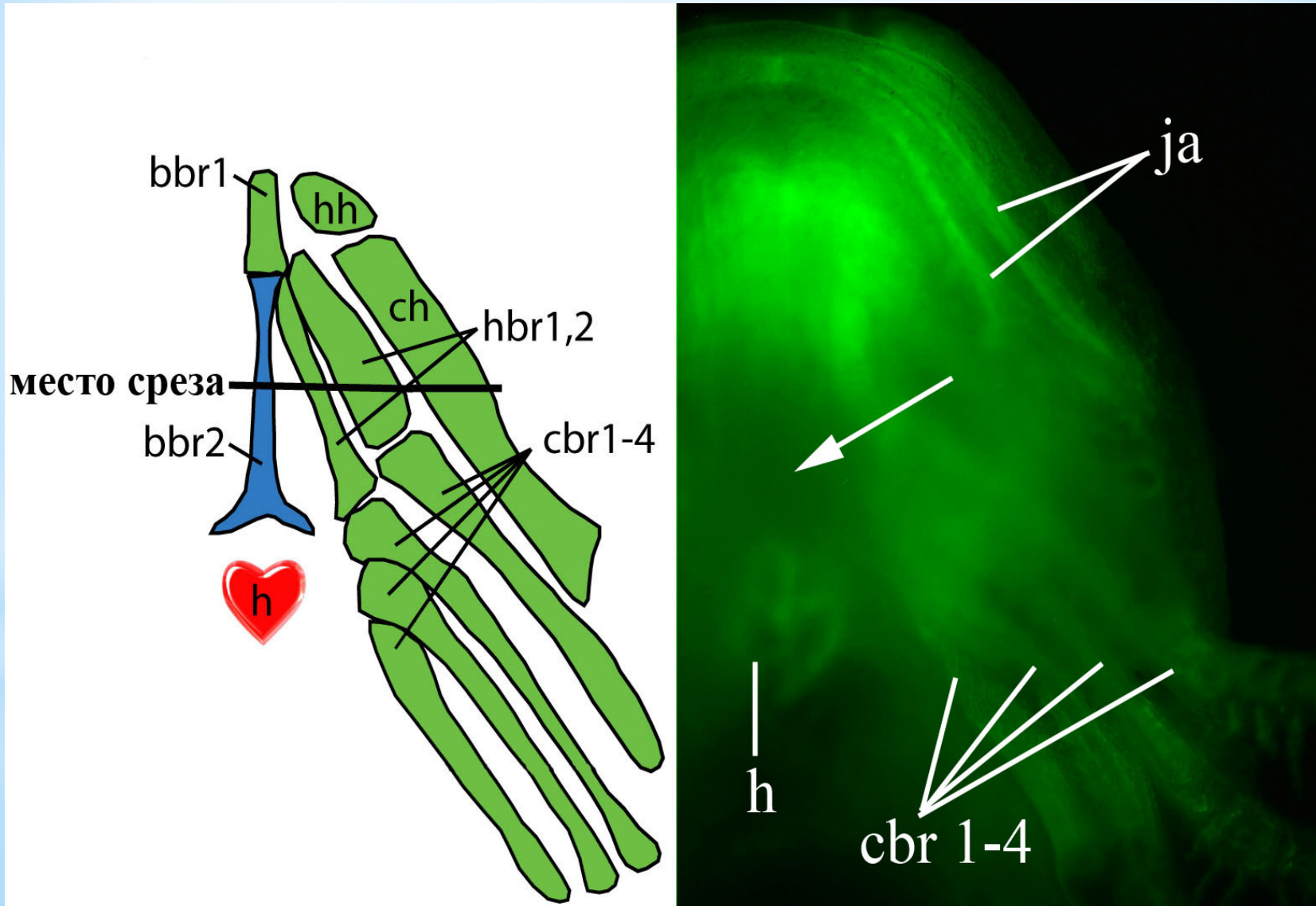
По работе Stephen M. Reilly, 1987 (с изменениями)

* Анализ трансгенных химер после пересадки
презумптивного нервного гребня показывает
его отсутствие в basibranchiale 2.

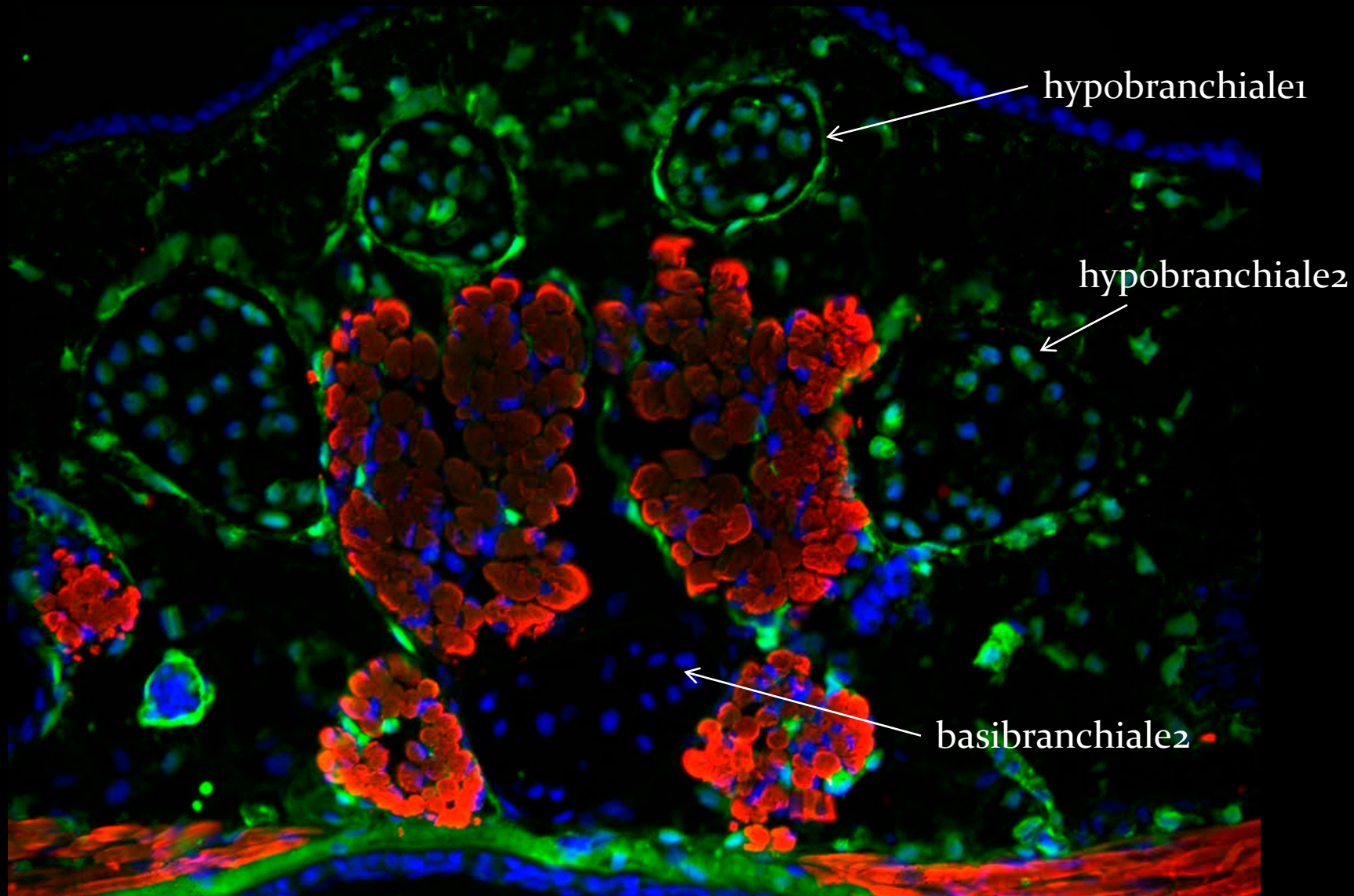


Davidian, Malashichev, 2013

* Анализ трансгенных химер в опыте по трансплантации нервного валика показал отсутствие клеток нервного гребня в basibranchiale 2.

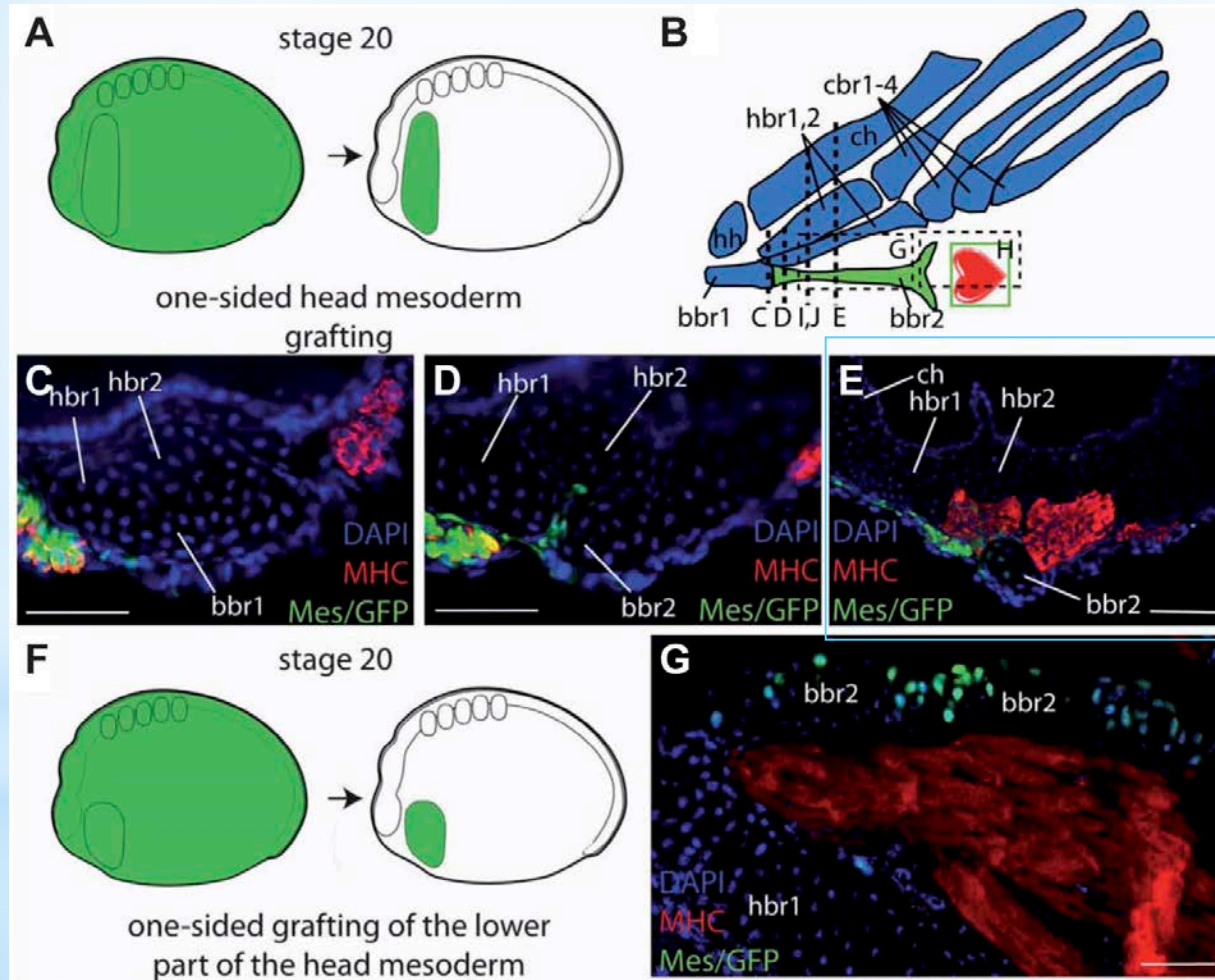


Поперечный срез в районе basibranchiale2

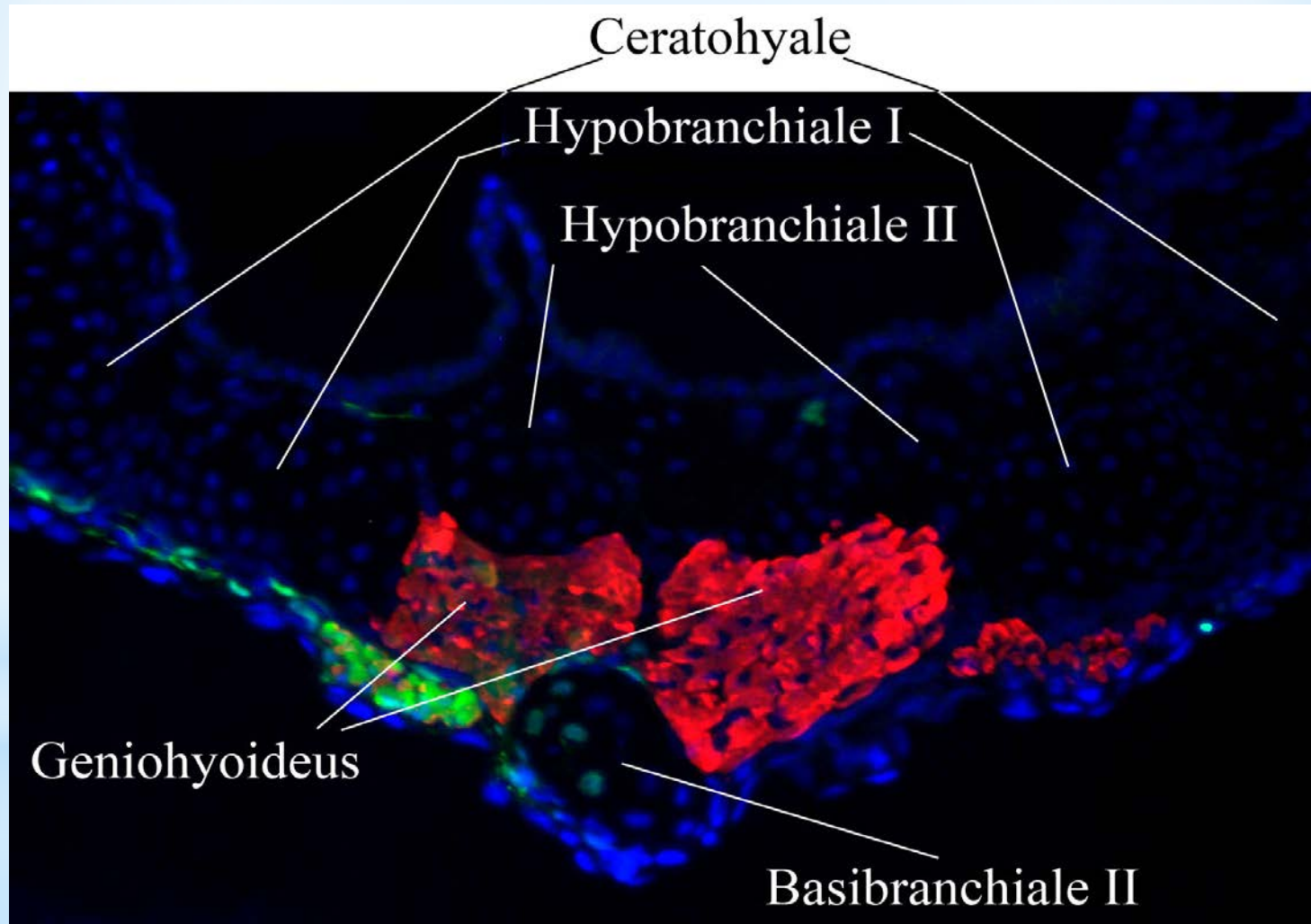


Красный – мышцы, зеленый – нервный гребень (GFP), синий – ядра клеток (DAPI)

* В результате операций по пересадке головной мезодермы боковой пластинки, у химер в 100% случаев было обнаружено мечение половины basibranchiale 2 на стороне операции.

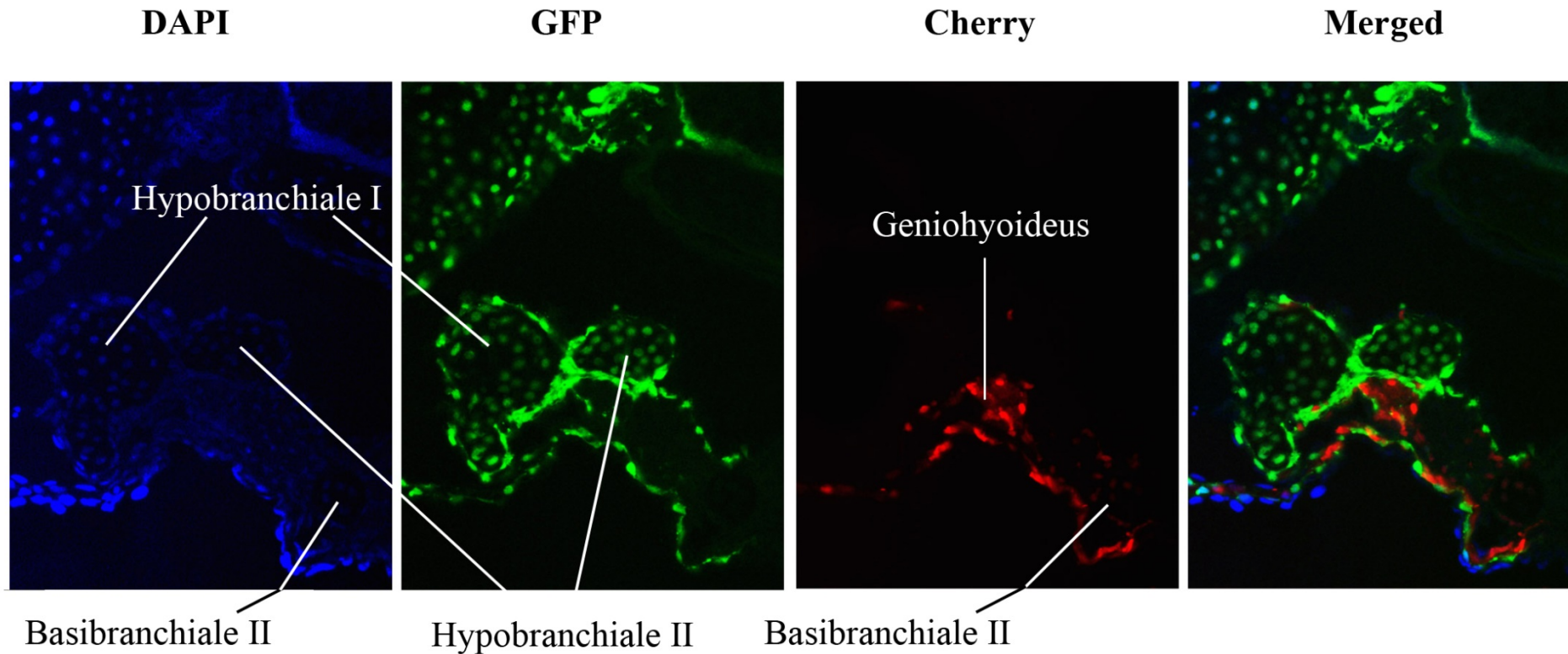


- * В результате операций по пересадке всей головной мезодермы боковой пластинки, у химер в 100% случаев было обнаружено мечение половины basibranchiale 2 на стороне операции.



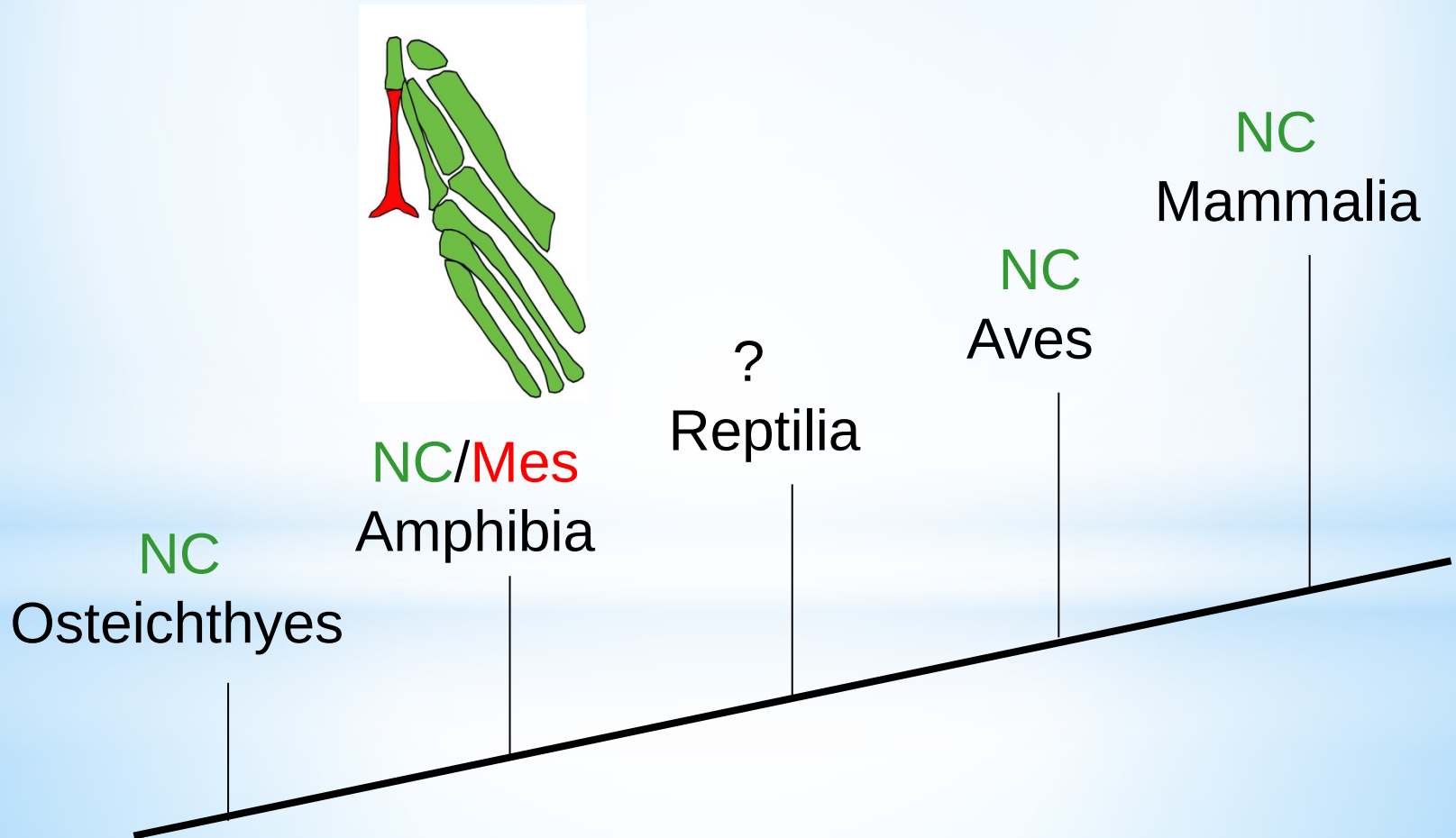
Красный — мышцы; зеленый — пересадка (GFP); синий — ядра клеток (DAPI)

- * Двойная трансплантация: 1. Нервного валика от **GFP** донора к белому эмбриону (d/d) на стадии 16. При достижении реципиентом стадии 19, ему подсаживают 2. Головную мезодерму боковой пластинки от **Cherry** донора.

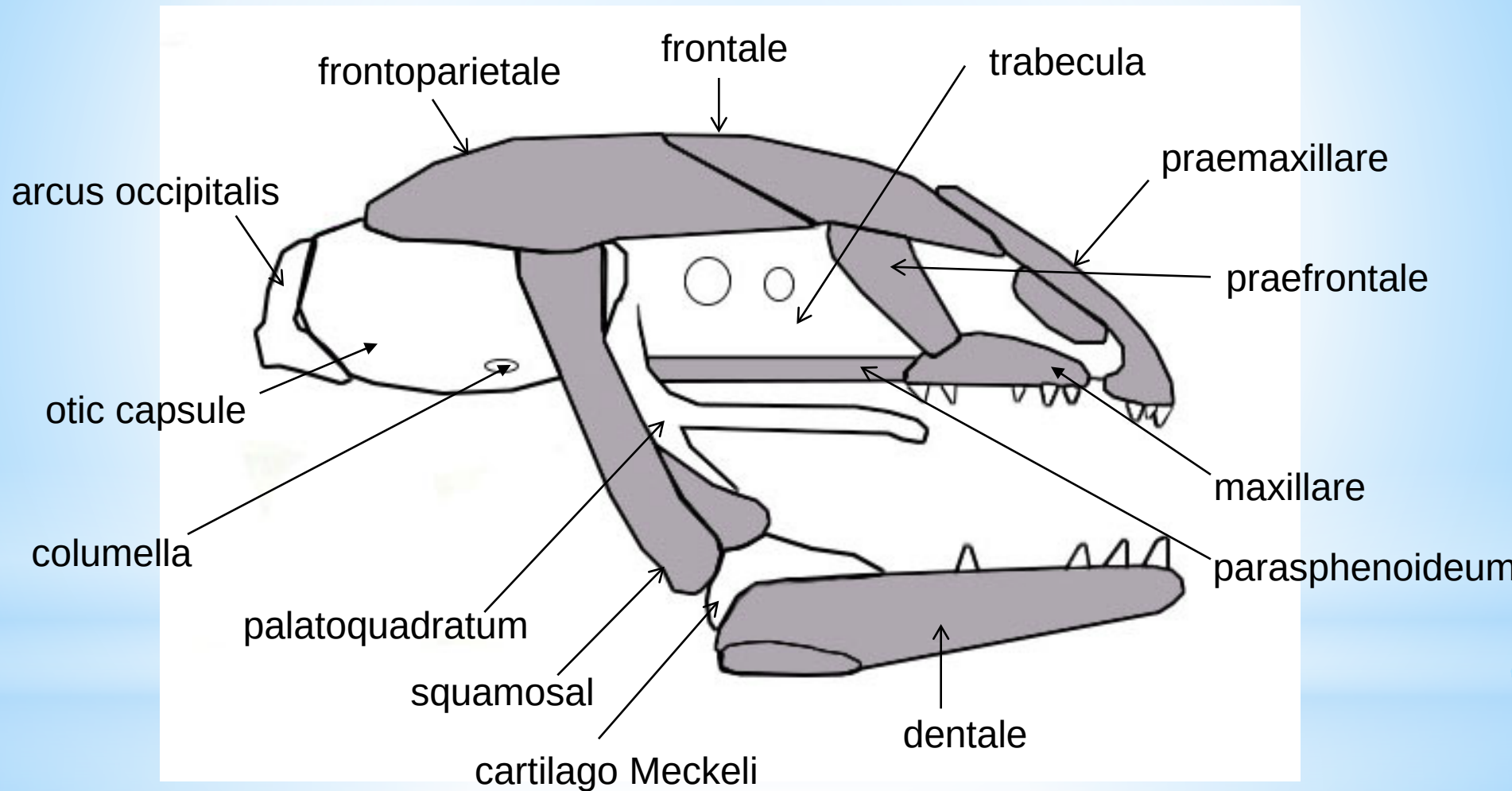


Красный – пересадка головной мезодермы **Cherry**; зеленый – пересадка нервного валика **GFP**; синий – ядра клеток (DAPI)

Вклад мезодермы и нервного гребня в гиобранхиальный аппарат и его производные у разных групп челюстноротых



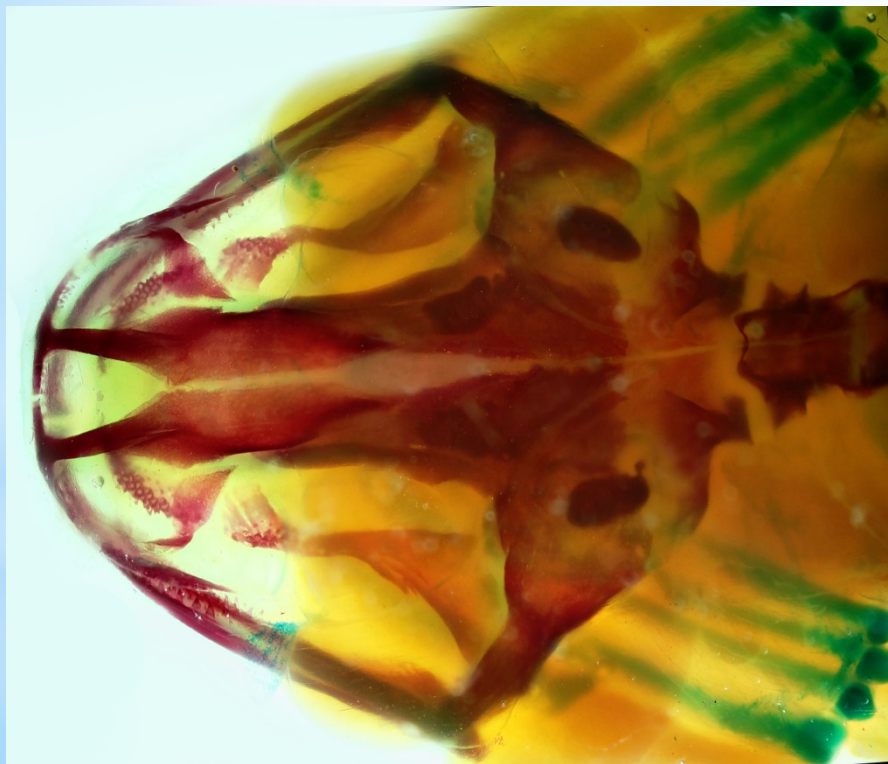
* Мозговой скелет аксолотля



Белым цветом – хрящ; серым - кость

Из книги Harold Heatwole и Margaret Davies «Amphibian Biology: Osteology» (с изменениями)

Для понимания топологии элементов черепа была проведена визуализация элементов скелета на тотальных препаратах личинок аксолотлей с помощью окраски альциановым синим на хрящ и ализариновым красным на костную ткань.

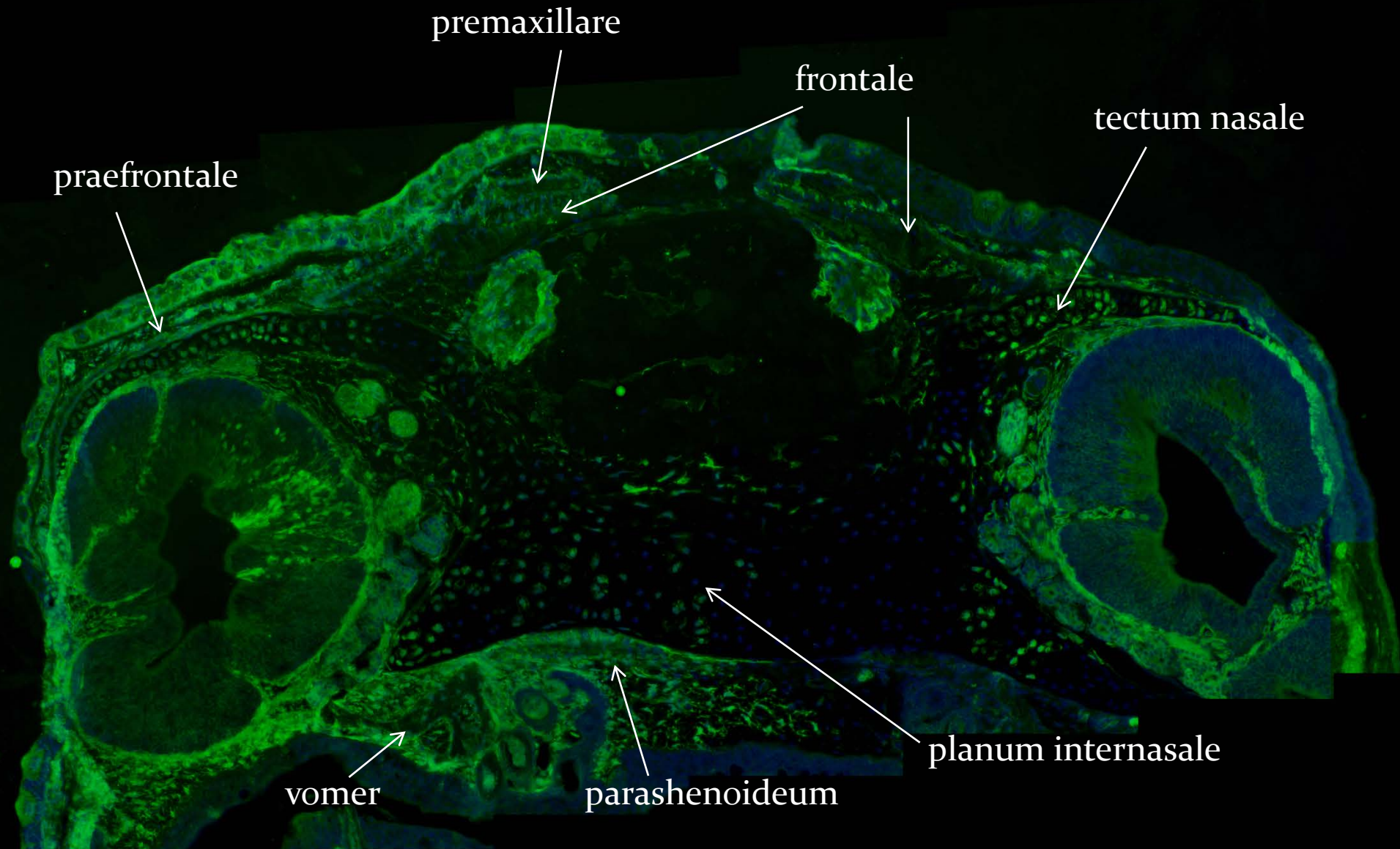


Вид сверху



Вид сбоку

Покровные кости и хрящи в этмоидном отделе черепа развиваются из
нервного гребня

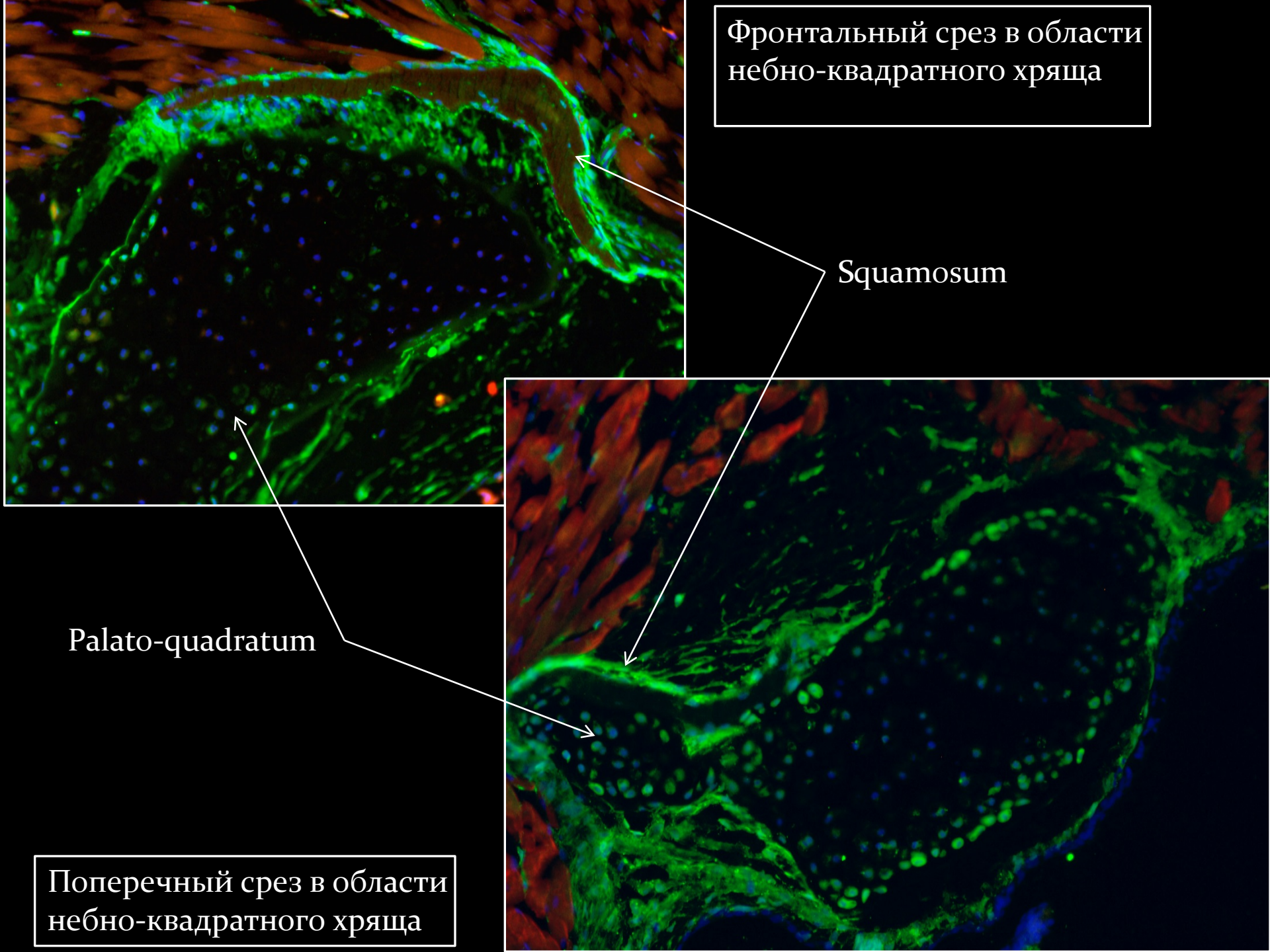


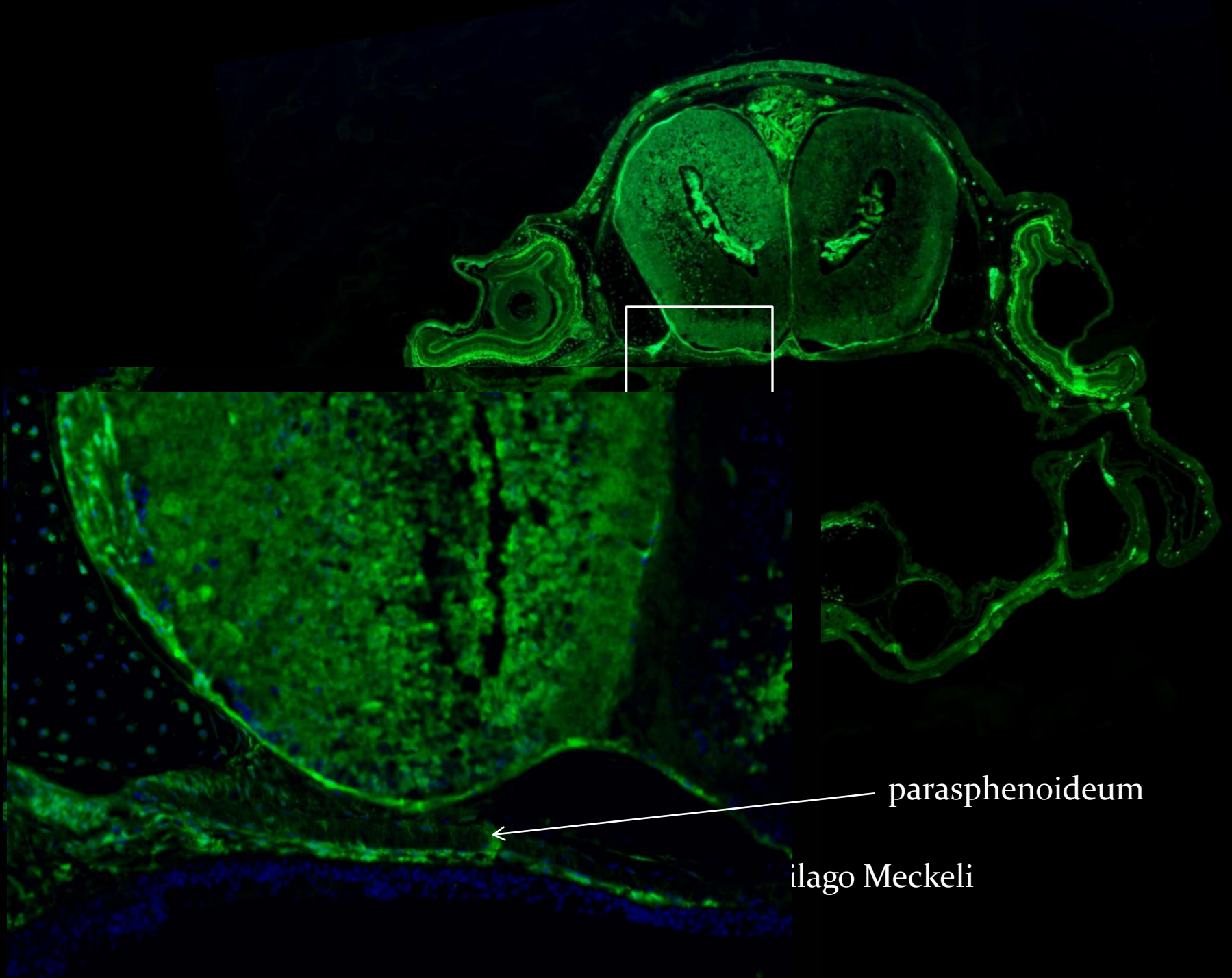
Фронтальный срез в области
небно-квадратного хряща

Squamosum

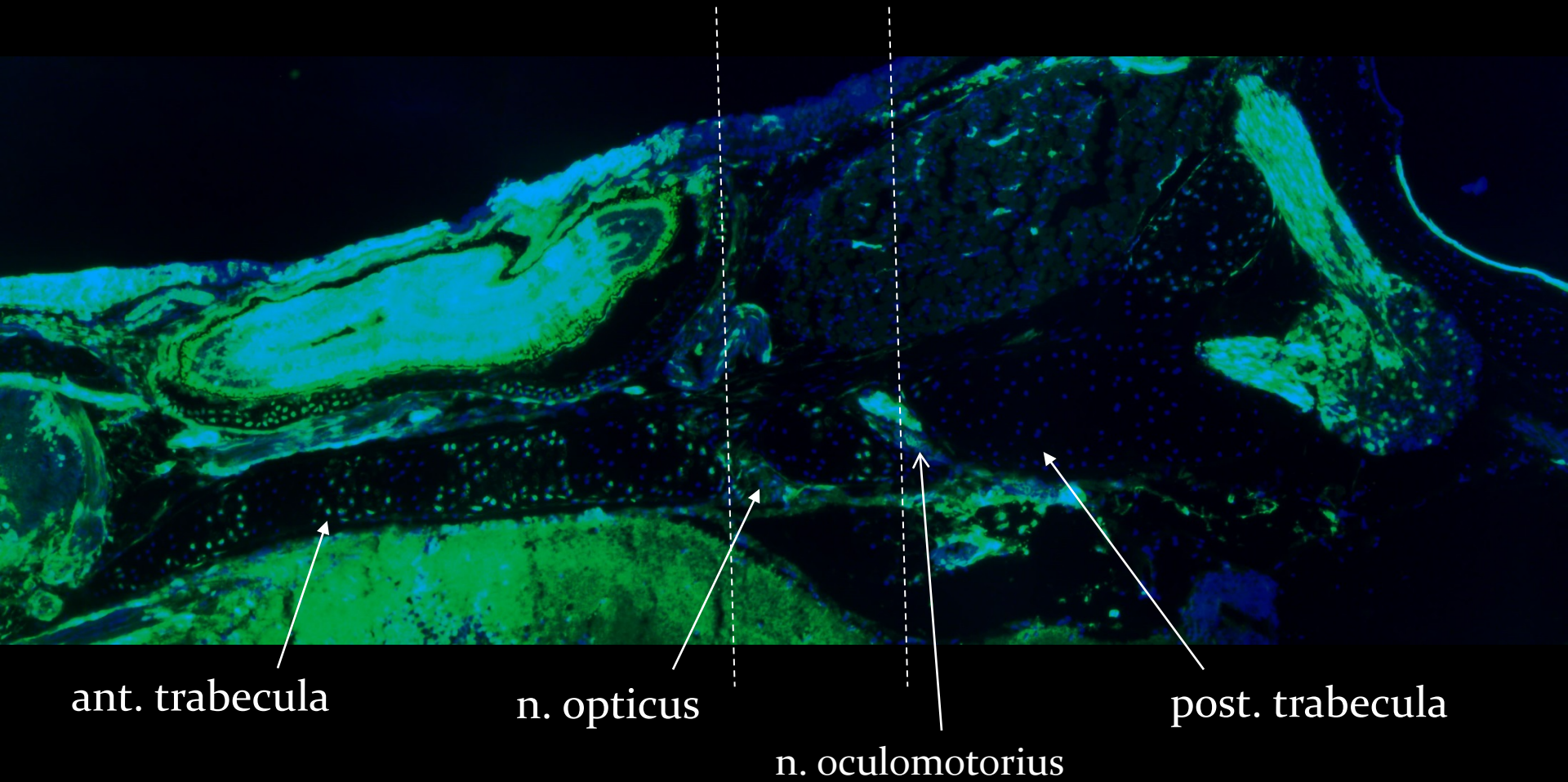
Palato-quadratum

Поперечный срез в области
небно-квадратного хряща



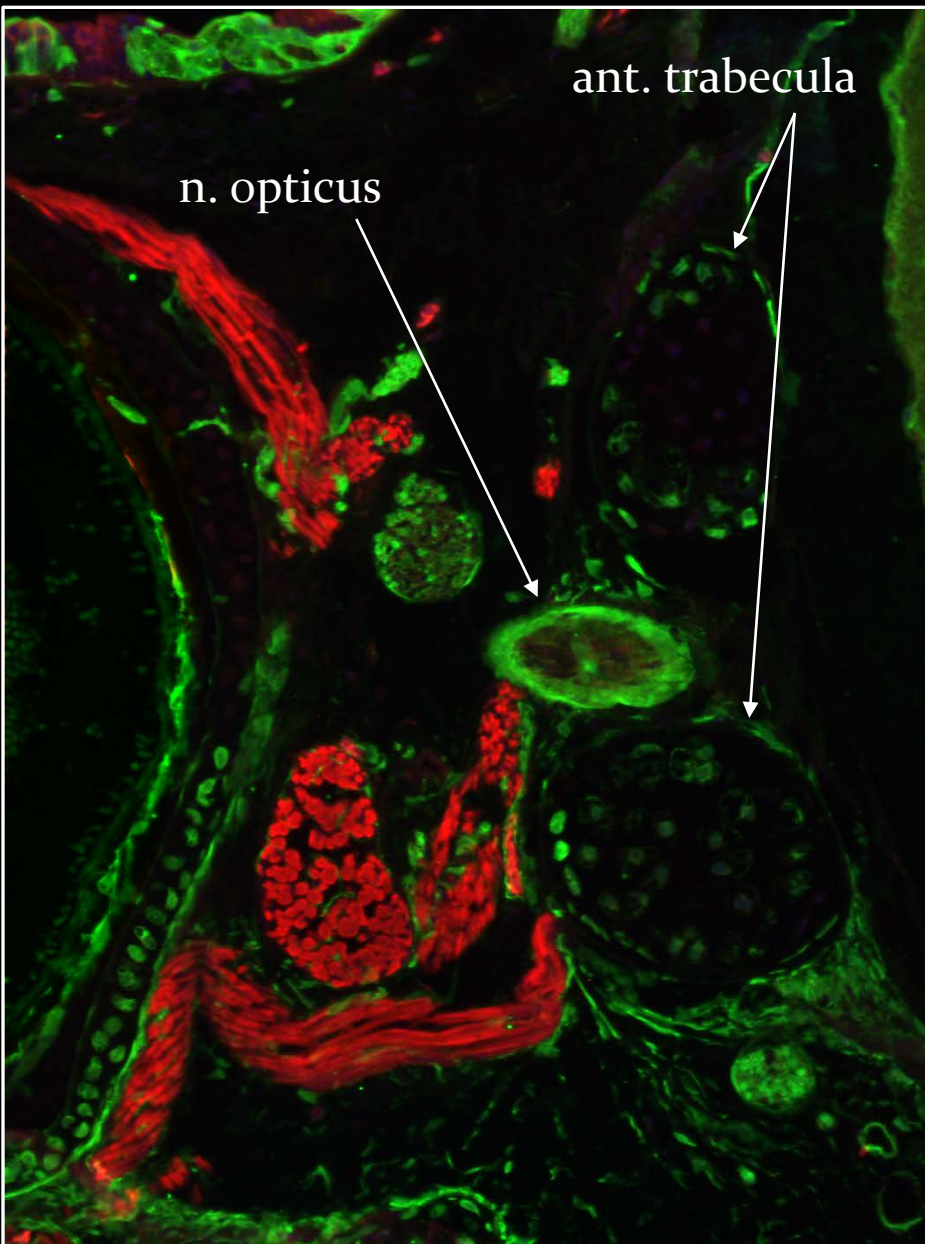


Фронтальный срез в районе трабекулы на стороне пересадки



Зеленый – нервный гребень (GFP), синий – ядра клеток (DAPI)

Поперечные срезы в районе трабекулы



Красный – мышцы, зеленый – нервный гребень (GFP), синий – ядра клеток (DAPI)

Реконструкция трабекулы по срезам

Posterior

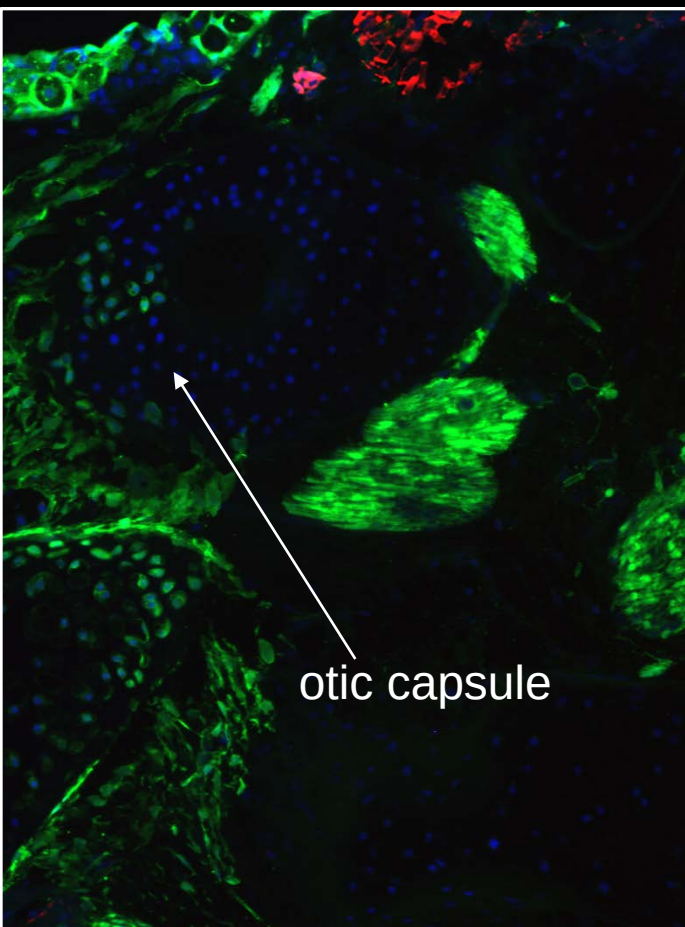
Anterior

n. oculomotorius

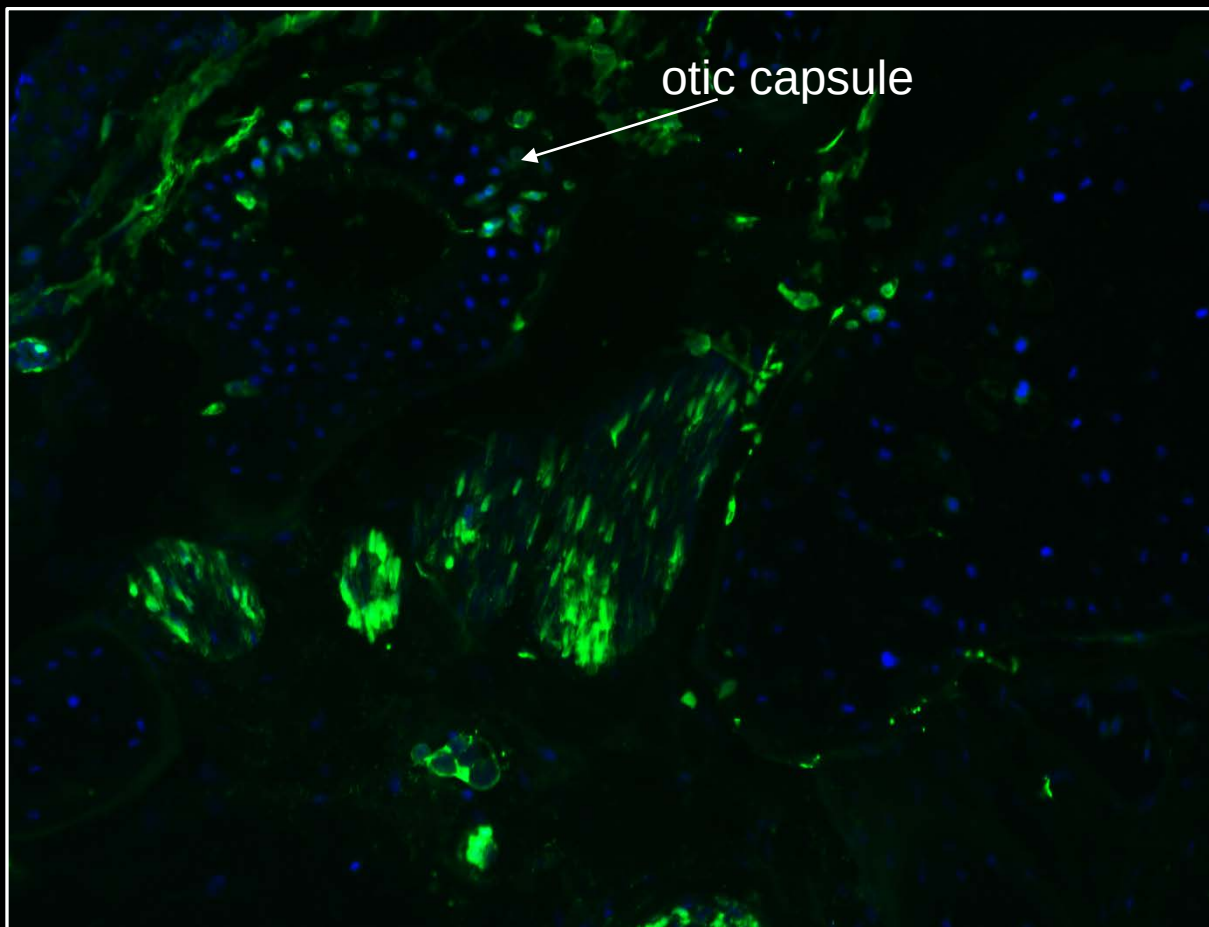
n. opticus



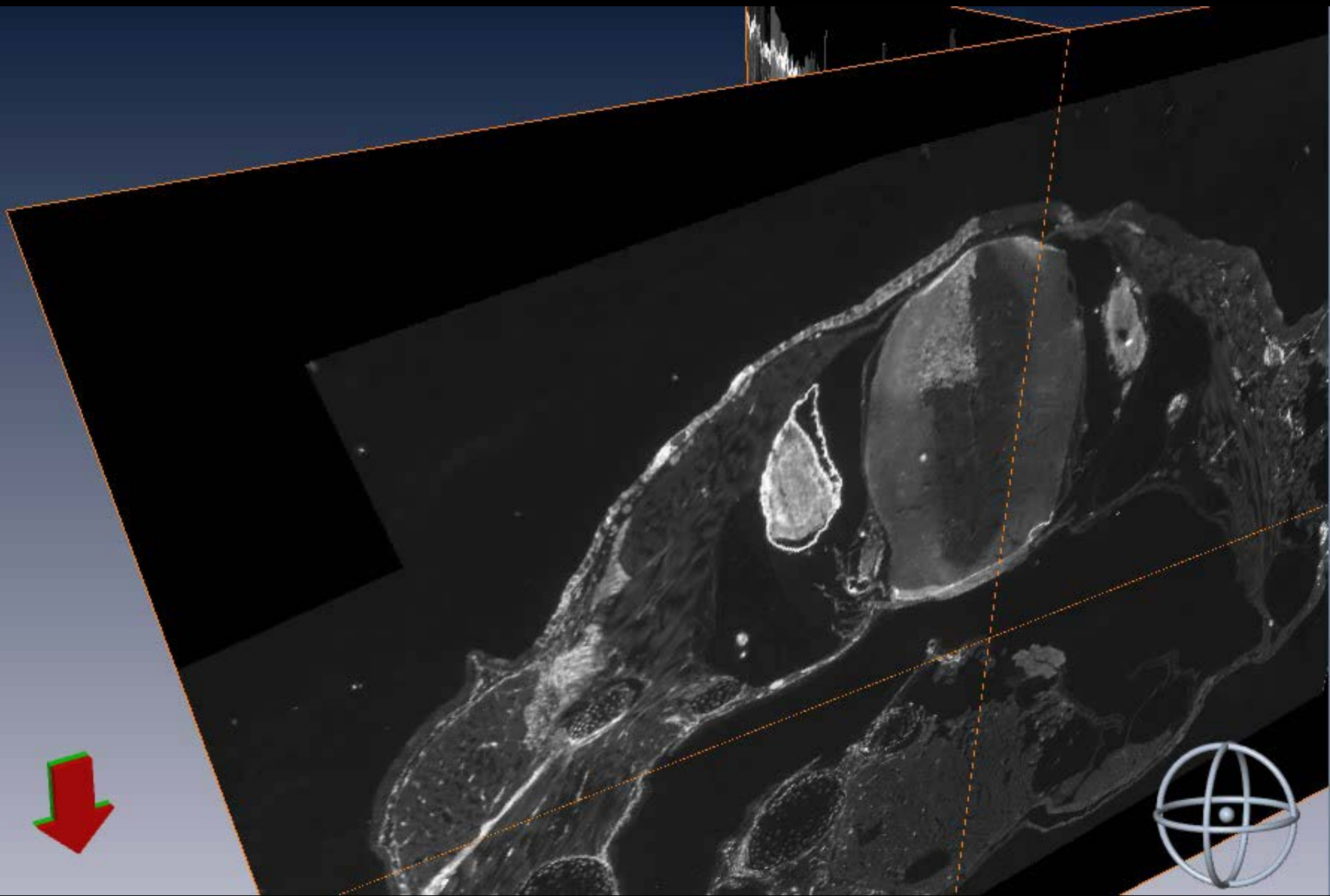
Слуховая капсула на
стороне операции



Слуховая капсула на не оперированной
стороне

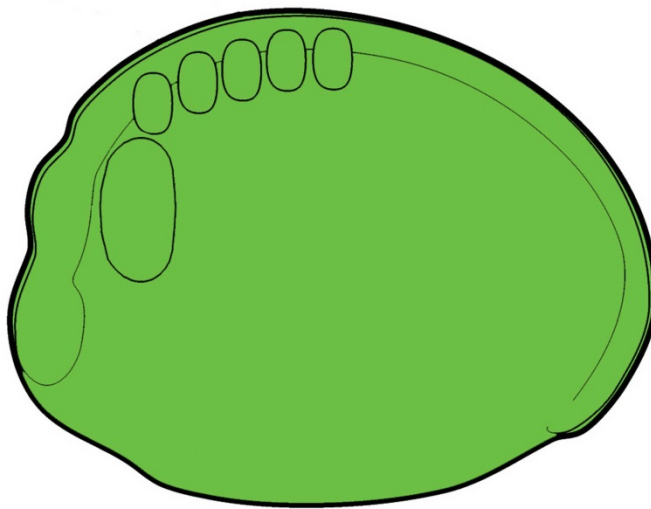


Красный – мышцы, зеленый – нервный гребень (GFP), синий – ядра клеток (DAPI)

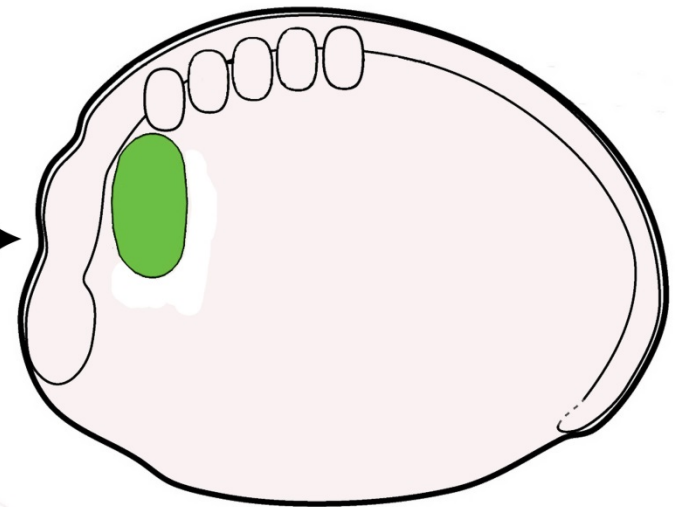


Опыт по трансплантации дорсальной части головной мезодермы боковой пластинки

Стадия 19



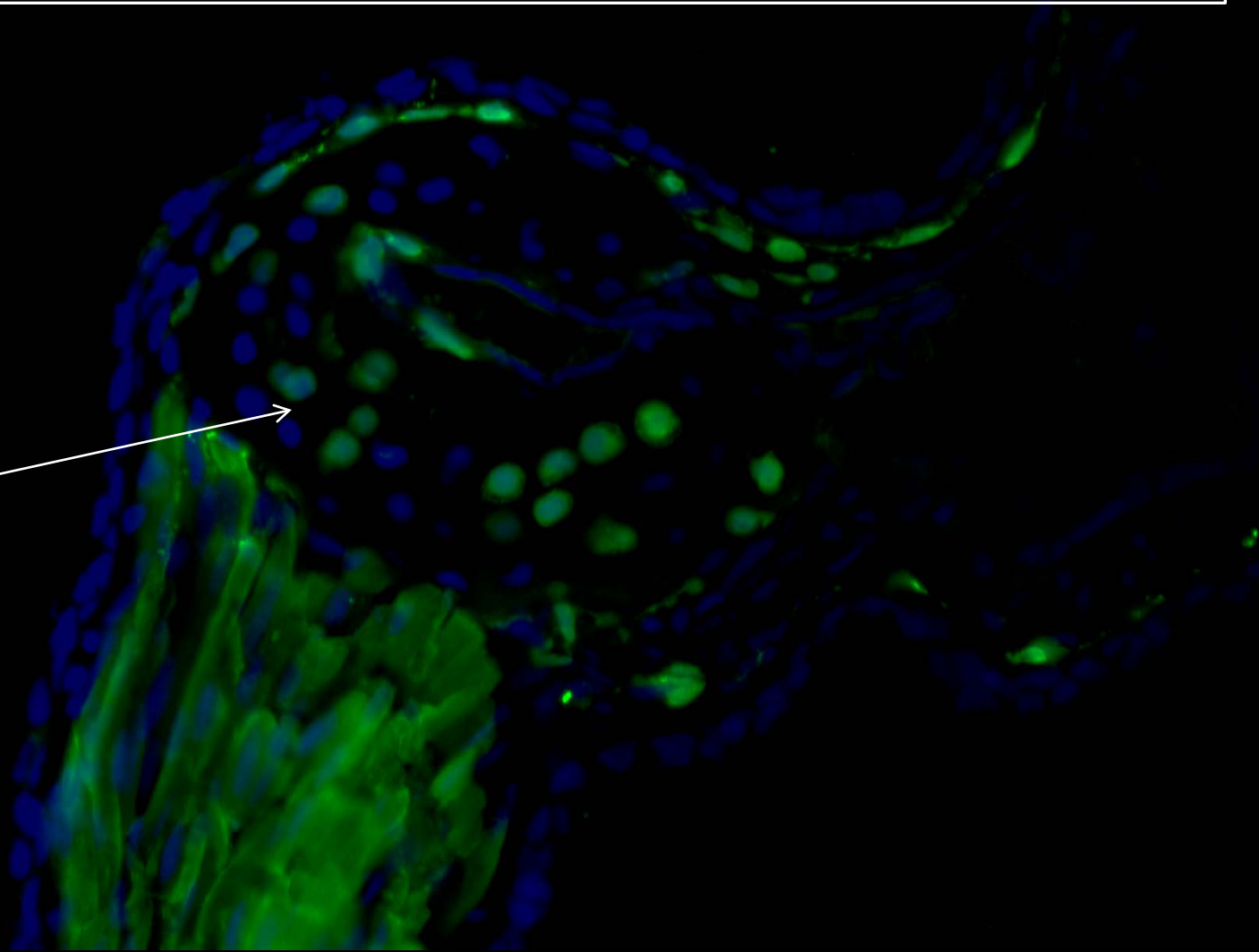
GFP донор



dd реципиент

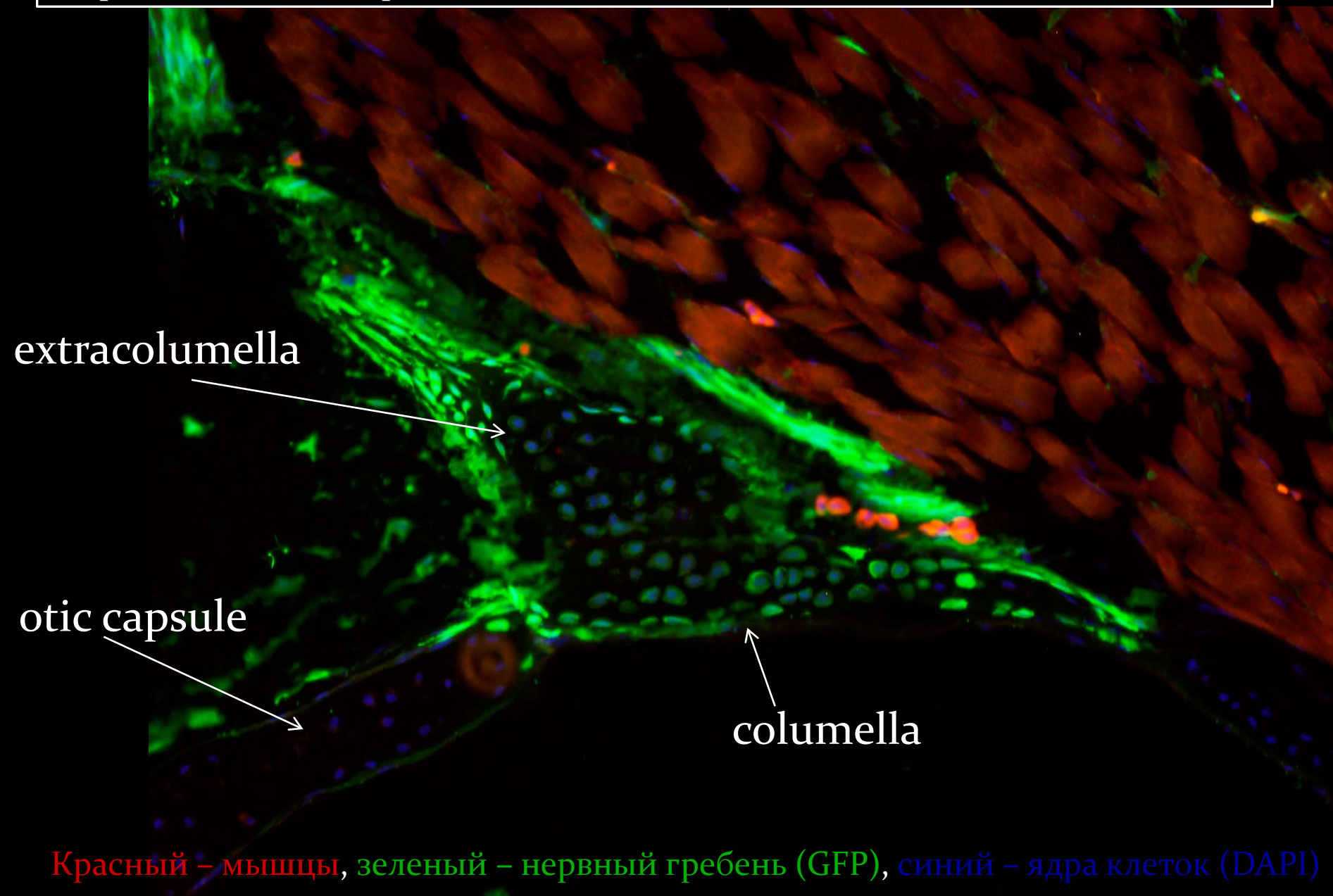
В опытах по трансплантации дорсальной части головной мезодермы боковой пластинки ушная капсула метится GFP+

otic capsule

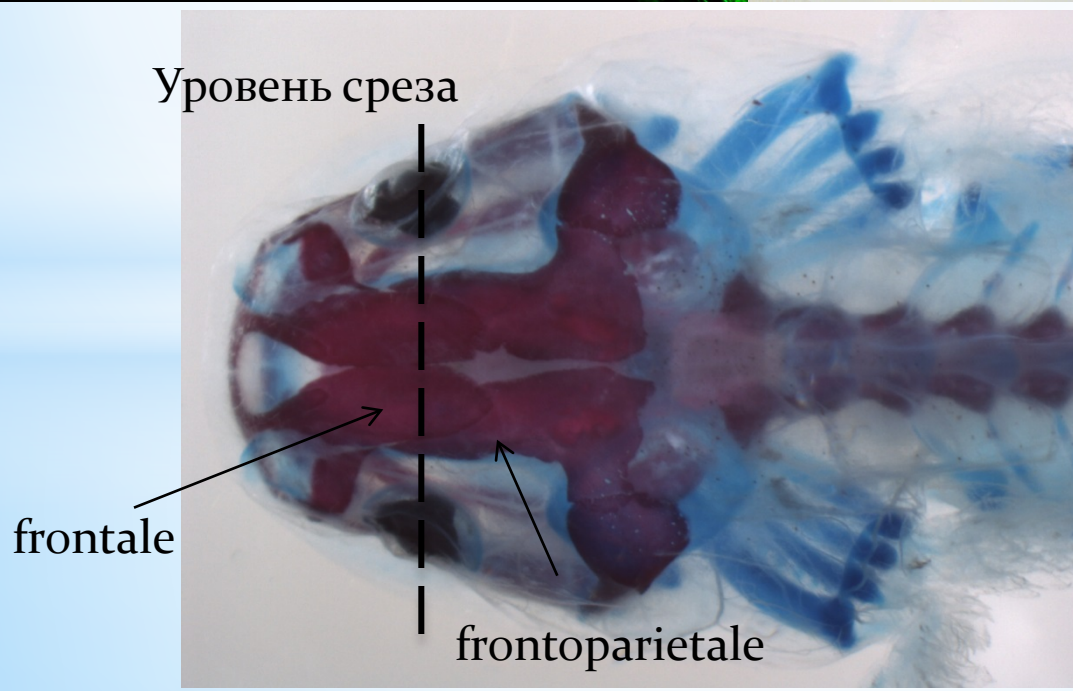
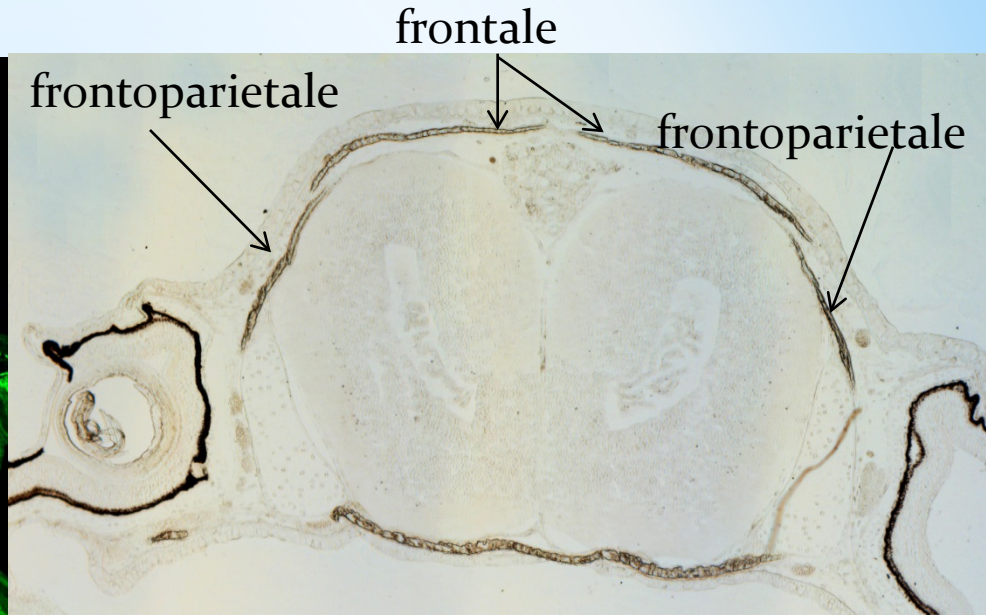


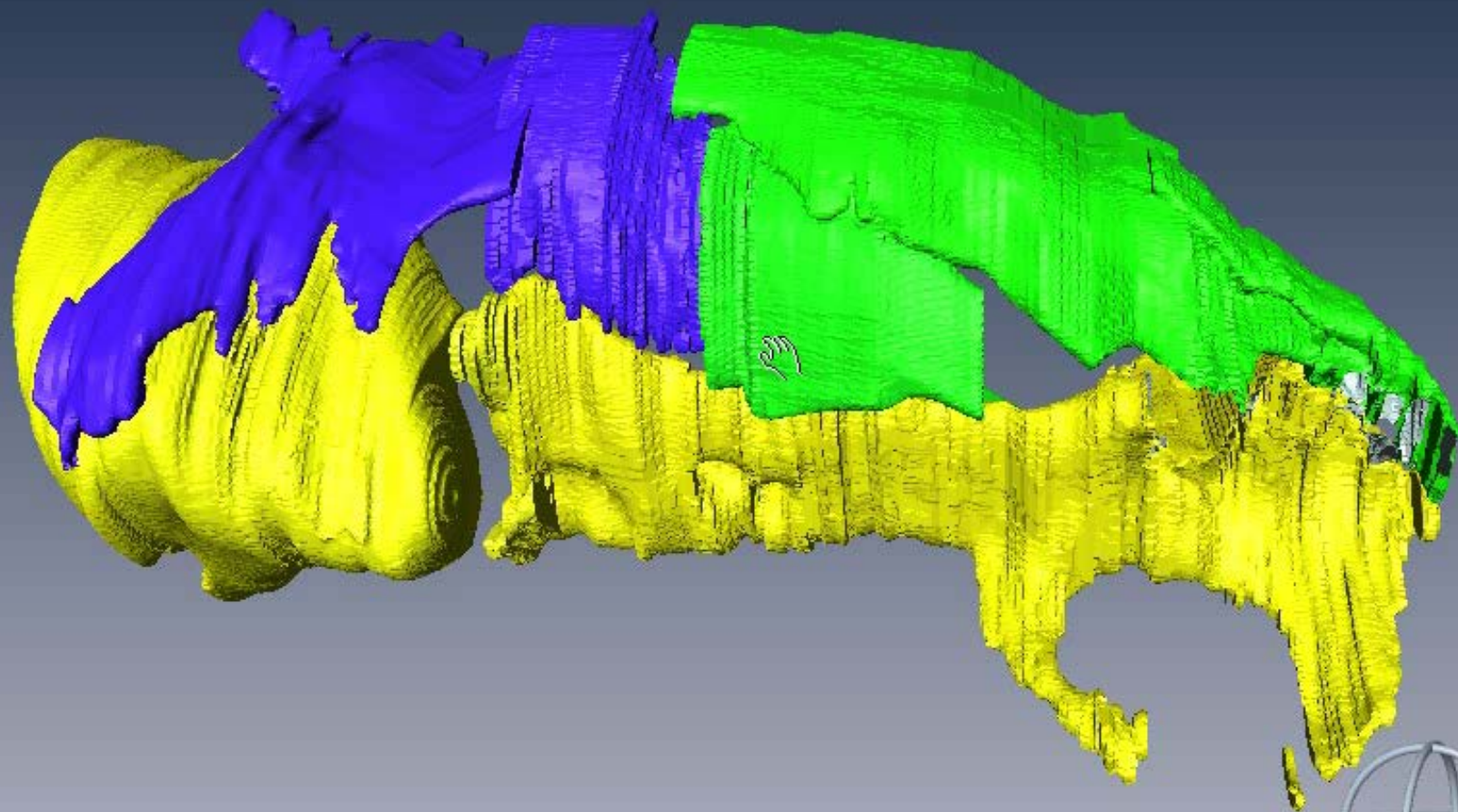
Зеленый – головная мезодерма боковой пластинки (GFP), синий – ядра клеток (DAPI)

Фронтальный срез в области ушной капсулы в опыте по односторонней
трансплантации нервного валика

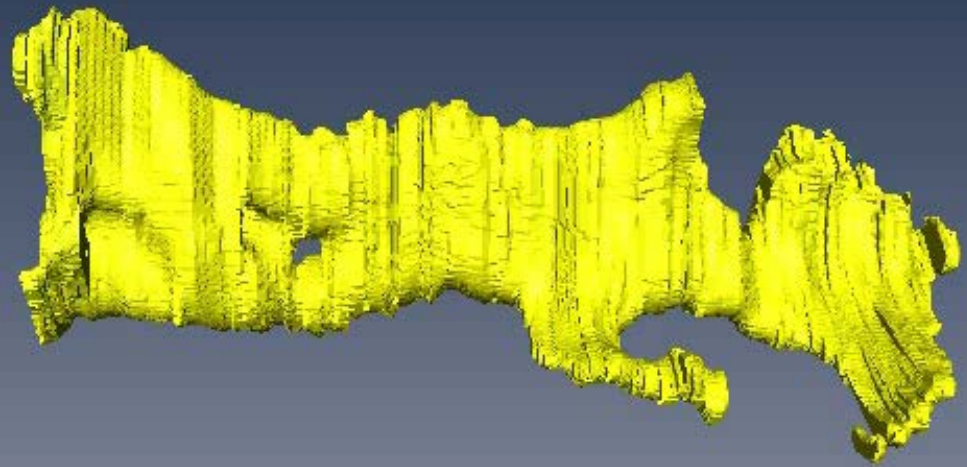


Frontoparietale в передней своей части происходит из клеток нервного гребня



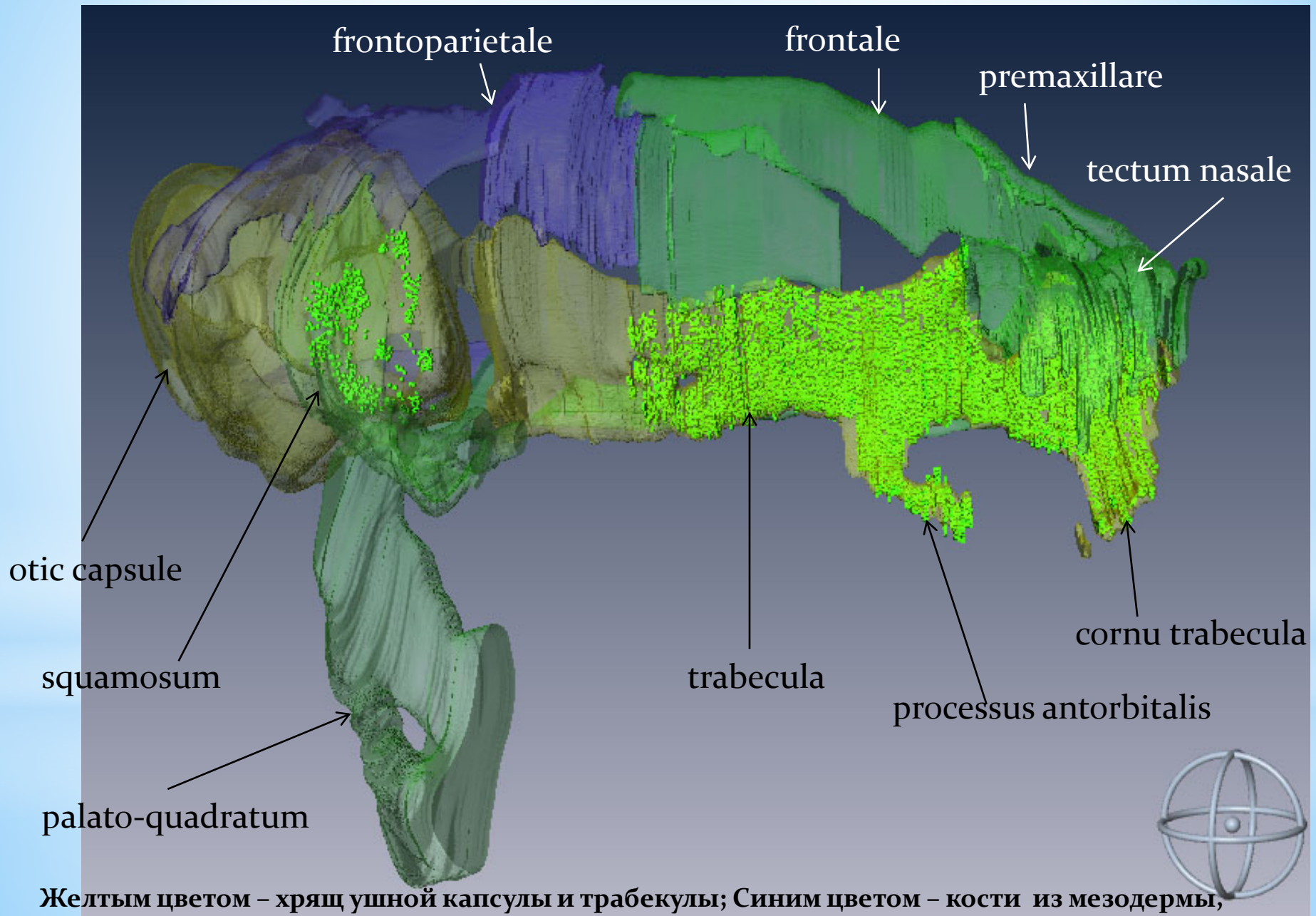


* Картированный череп аксолотля



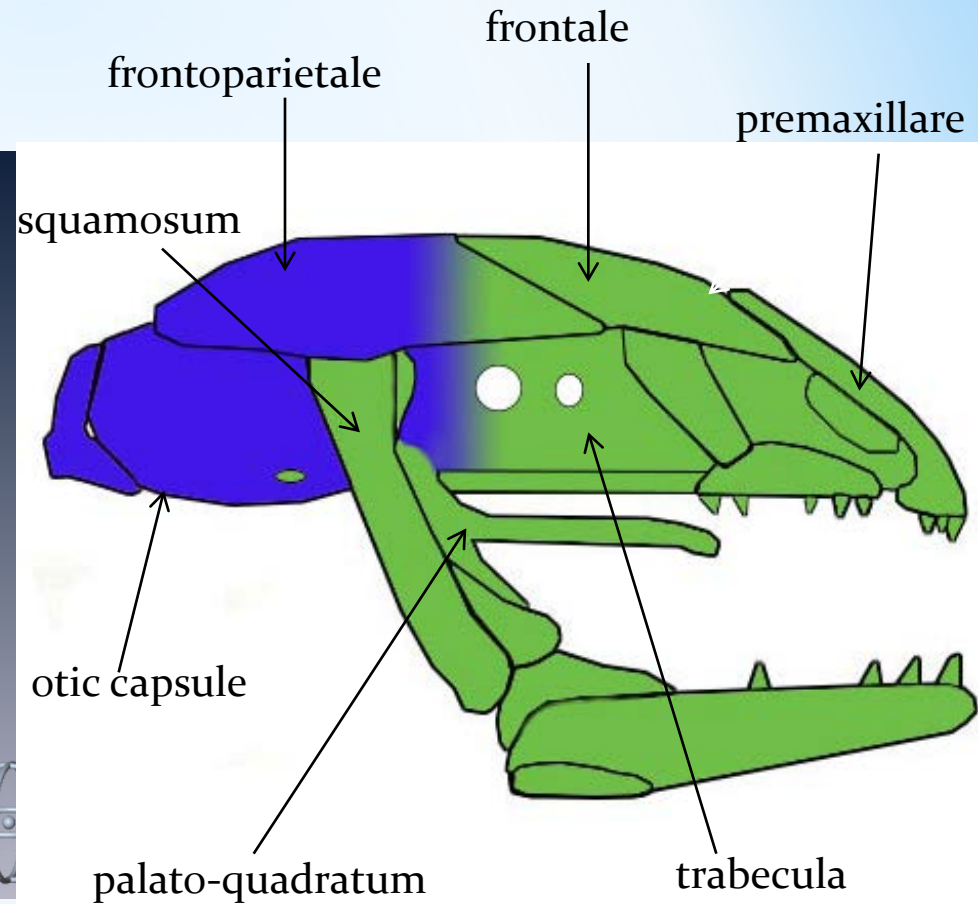
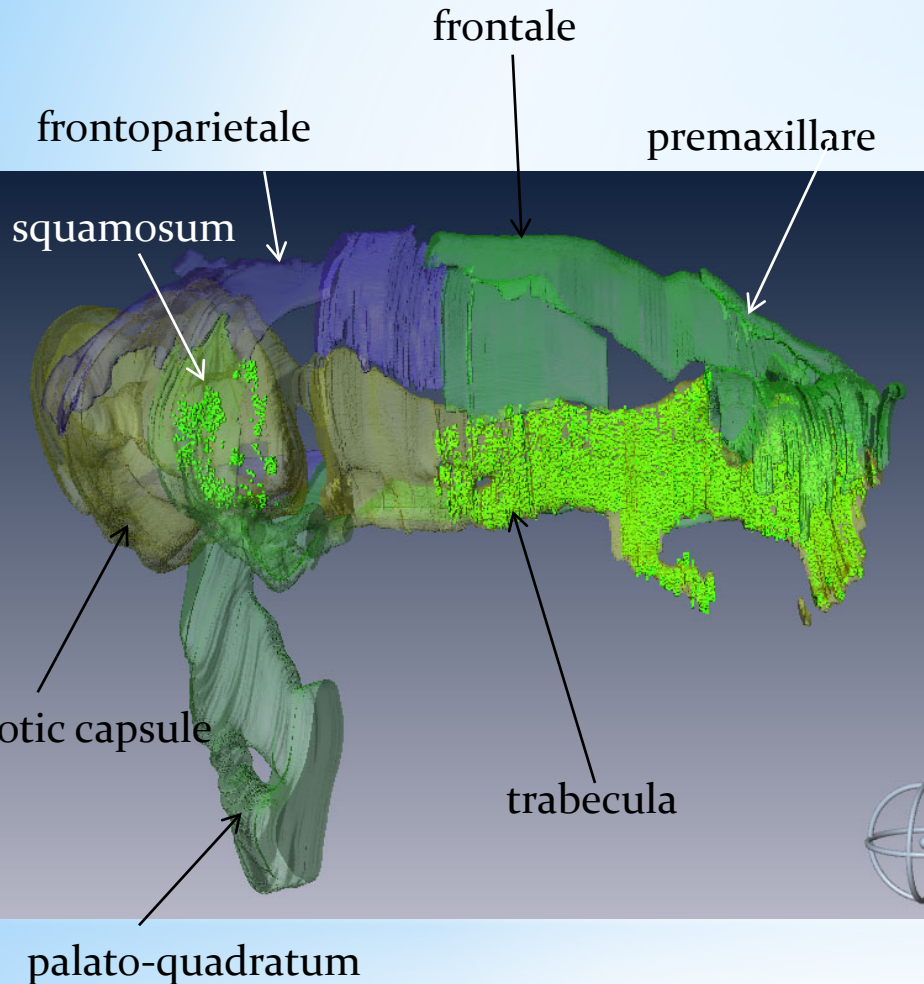
Желтым цветом – хрящ ушной капсулы и трабекулы; Синим цветом – кости не из нервного гребня, Зеленым – кости и хрящи из нервного гребня

* Картированный череп аксолотля, вид сбоку



Желтым цветом – хрящ ушной капсулы и трабекулы; Синим цветом – кости из мезодермы, Зеленым – кости и хрящи из нервного гребня

* Картированный череп аксолотля, вид сбоку

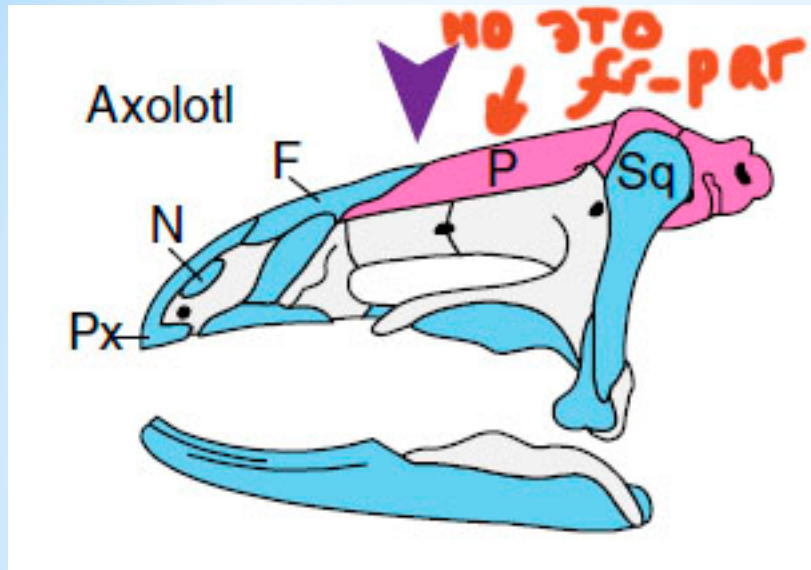


Из книги Harold Heatwole и Margaret Davies «Amphibian Biology: Osteology» (с изменениями)

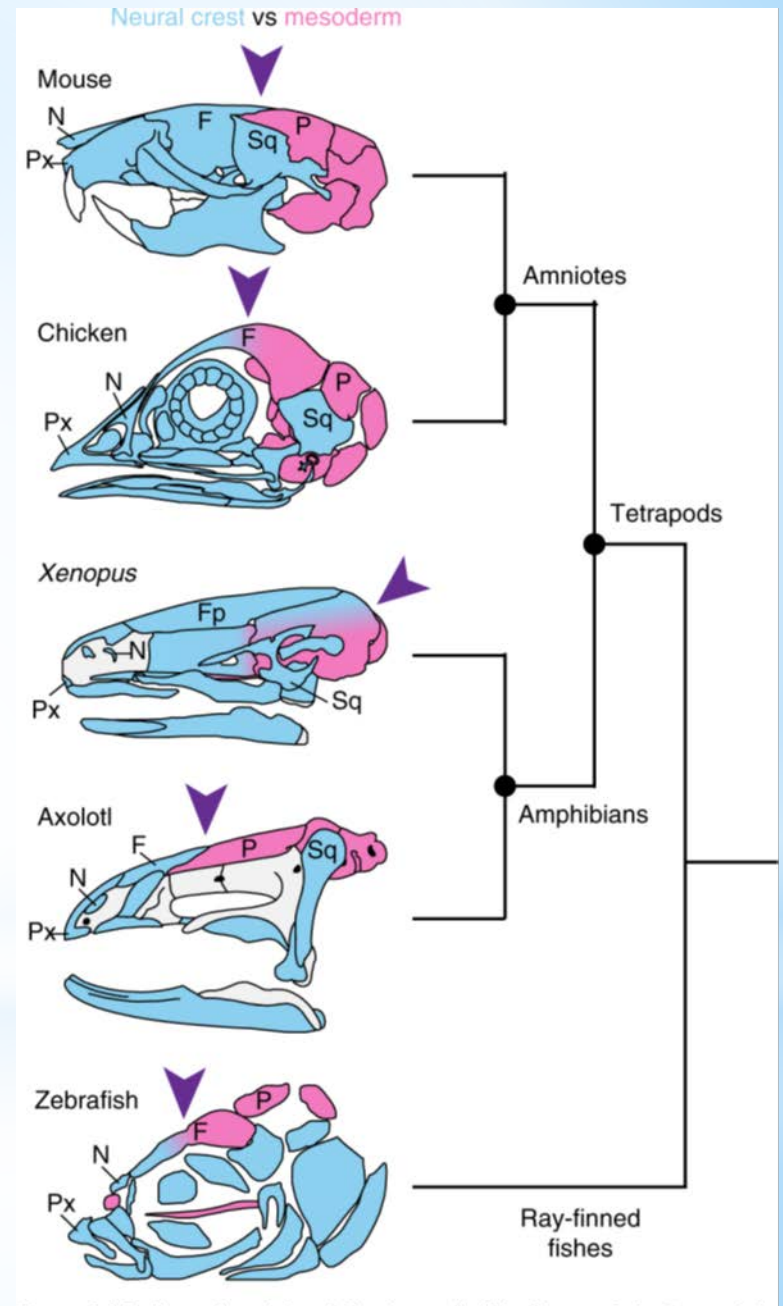
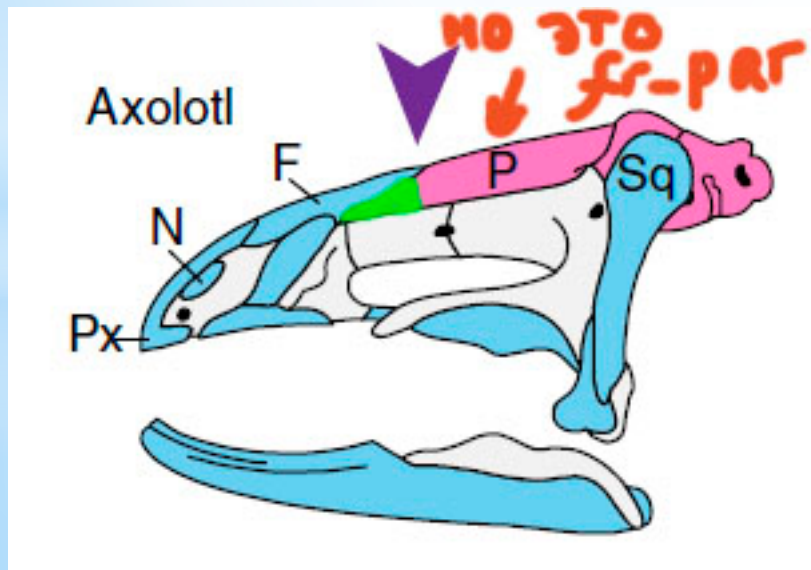
Желтым цветом – хрящ ушной капсулы и трабекулы; Синим цветом – кости из мезодермы, Зеленым – кости и хрящи из нервного гребня

американцы

Piekarski, Gross, Hanken, 2015



Мы



- По-видимому, каждой закладке костного элемента соответствует определенное эмбриональное происхождение. Передняя часть frontoparietale (по Н.С. Лебедкиной), происходящая из клеток нервного гребня, соответствует закладке frontale 2; задняя ее часть, соответствующая закладке parietale, формируется из мезодермы. Парасфеноид основания черепа имеет двойное происхождение: в передней своей части развивается из клеток нервного гребня, а в более каудальной, вероятно, – из мезодермы.

Клеточные источники некоторых хрящей/костей черепа среди костистых рыб, амфибий, птиц и млекопитающих

Область черепа	Хрящ / кость	<i>Zebrafish</i>	<i>A. mexicanum</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Mus musculus</i>
Мозговой череп	Trabeculae	NC/Mes	NC/Mes	NC/Mes	NC/Mes
	Otic capsule	NC/Mes	NC/Mes	NC/Mes	NC/Mes
	Frontale	NC/Mes	NC	NC/Mes ¹ NC ²	NC
	Parietale	Mes	NC/Mes - frontoparietale	NC/Mes ¹ NC ²	Mes
	Parasphenoideum	Mes	NC/Mes	NC/Mes	NC
Висцеральный череп	Basibranchiale 2	NC	Mes	NC	NC
	Columella	-	NC	NC/Mes ¹ NC ³	NC/Mes

¹- Noden, 1984; ² - Couly, 1993; ³- Le Lievre, 1978