

Загадка развития эмбриона: что диктует клетке ее судьбу?

...

Володяев И.В.

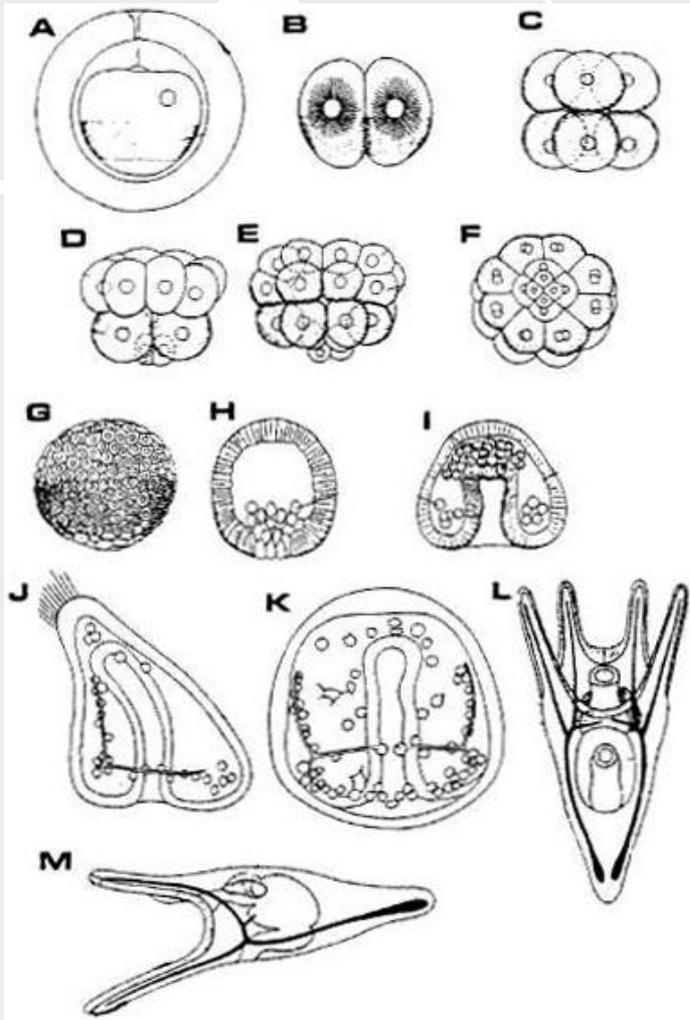
эмбриолог, отделение Репродуктивной медицины ЕМС
к.б.н., ст.н.с. каф. эмбриологии МГУ



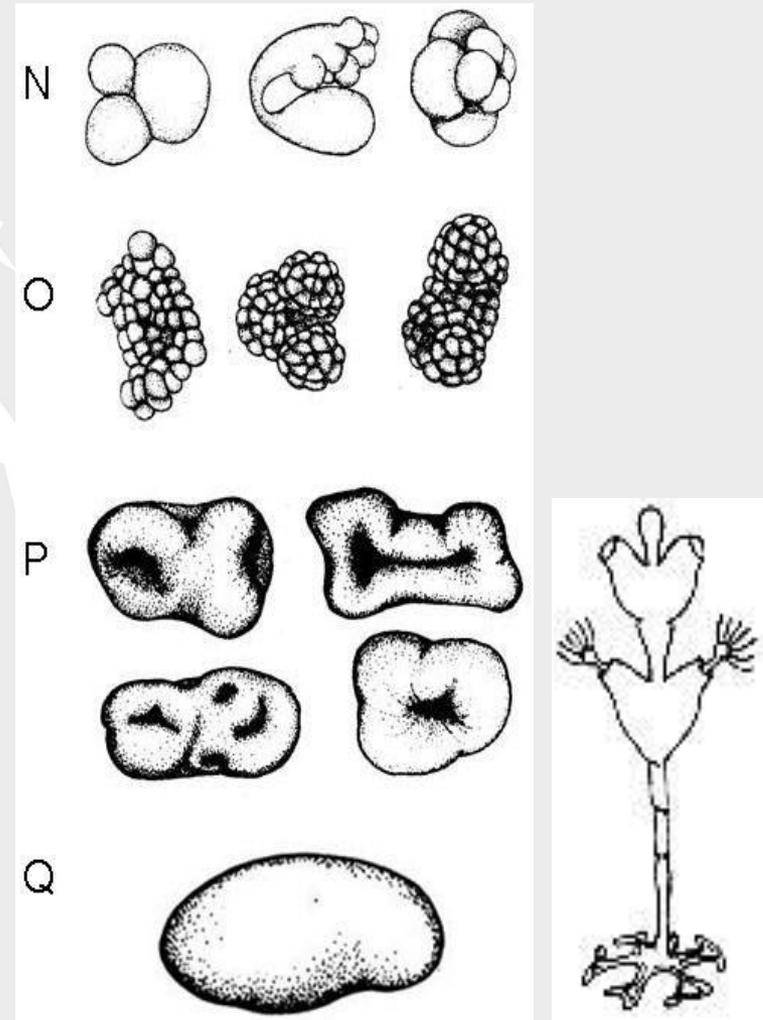
Два типа процессов в биологии развития

Детерминированные

Эквифинальные

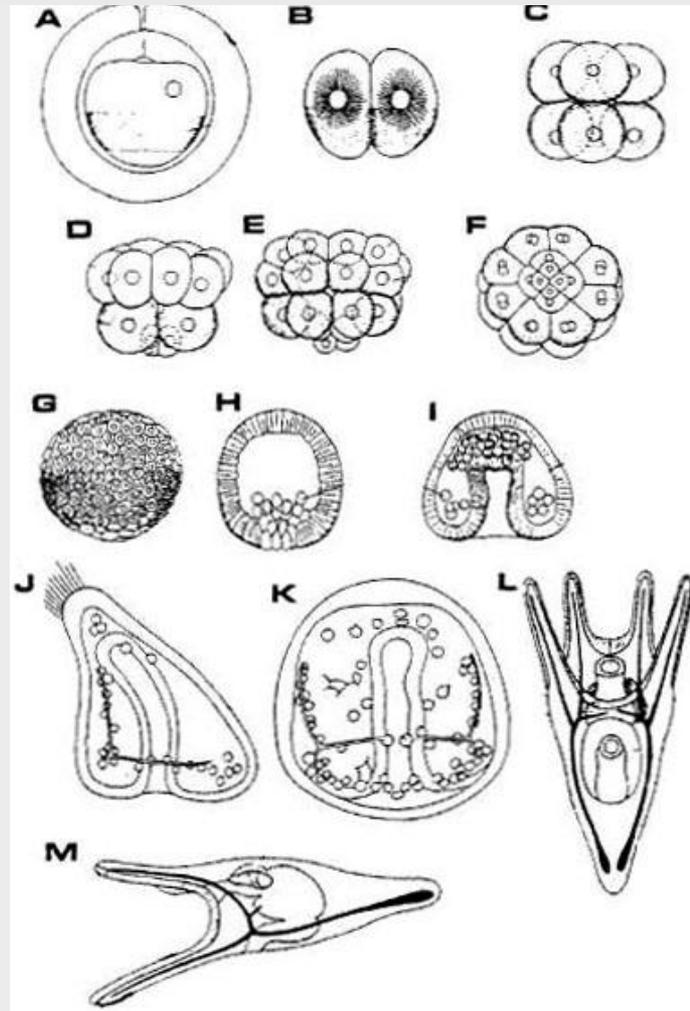


Морской ёж



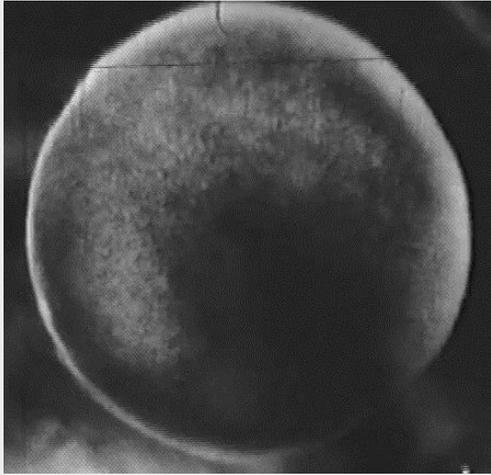
Гидроидный полип

Детерминированные процессы



Развитие морского ёжа

Детерминированные процессы



Дробление
Xenopus laevis



Гастрюляция
Xenopus laevis

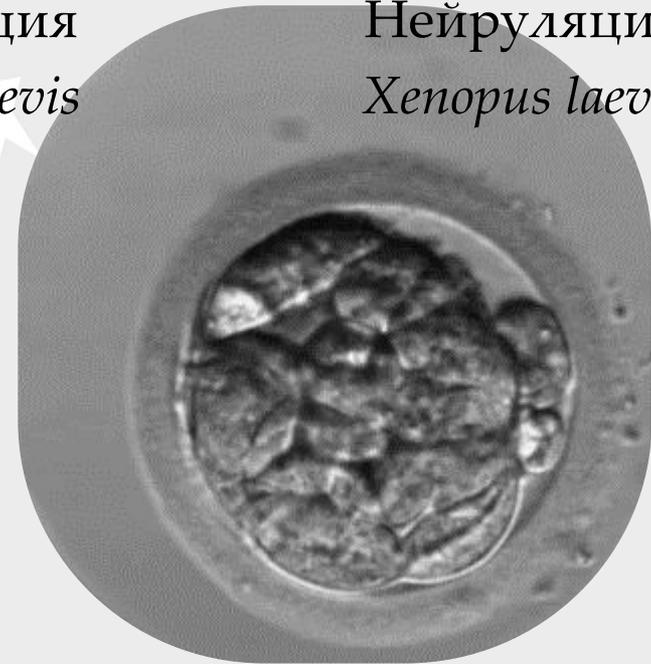


Нейруляция
Xenopus laevis

Человек



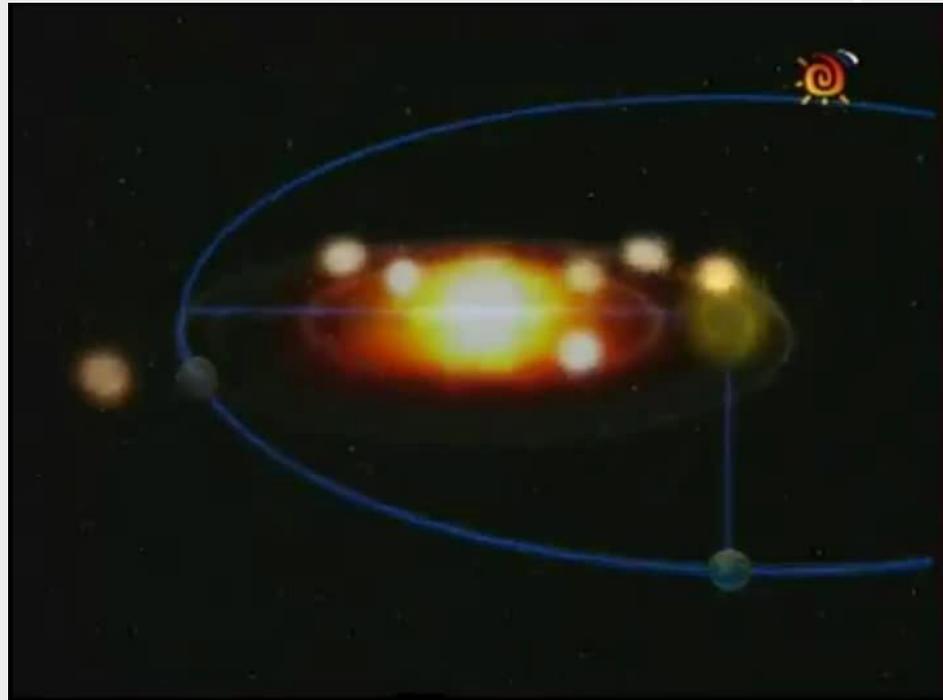
Дробление



Образование полости бластоцисты

•

Детерминированные процессы в физике



Детерминированные процессы в физике



Однозначный детерминизм



René Descartes
(1596 – 1650)

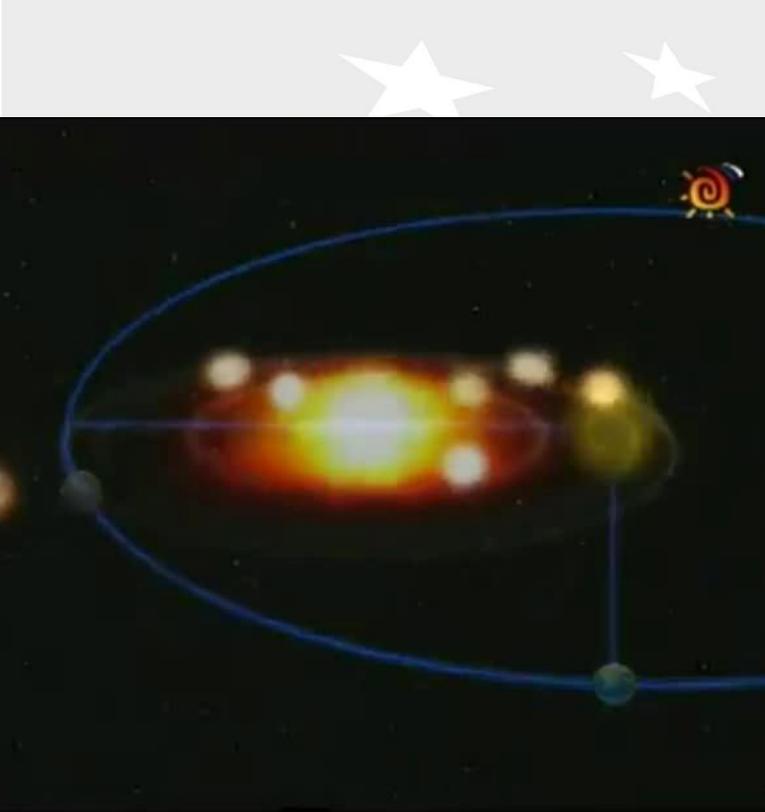
...Я не признаю никакой разницы между машинами, изготовленными ремесленниками, и различными телами, которые творит лишь одна природа.



Pierre-Simon
de Laplace
(1749 – 1827)

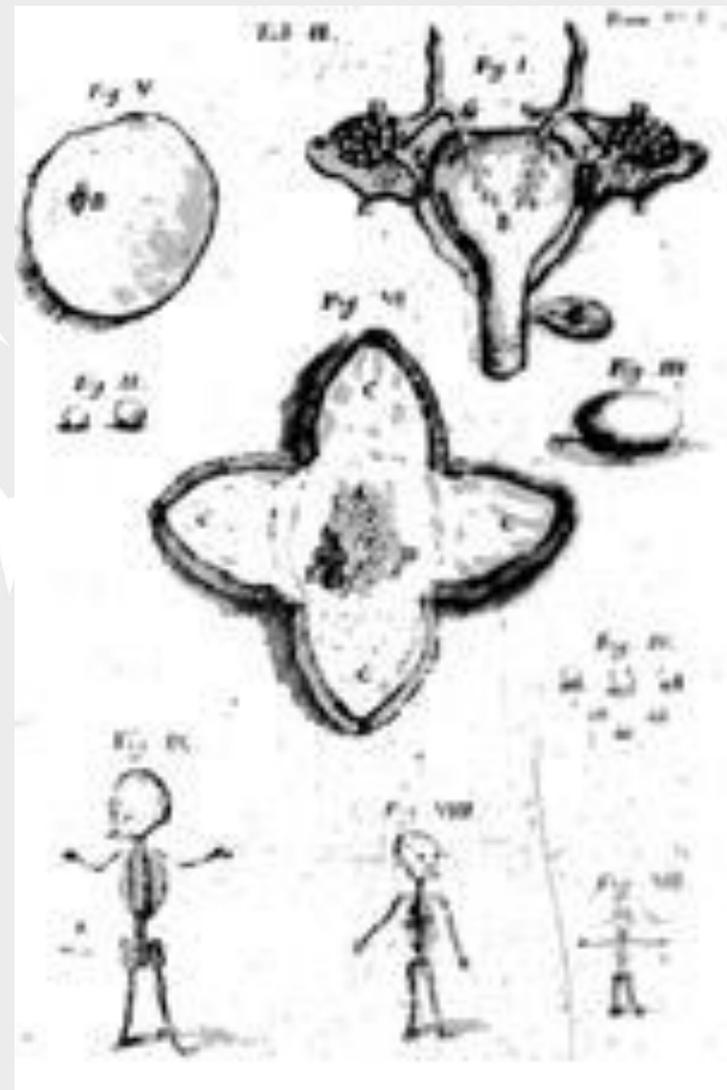
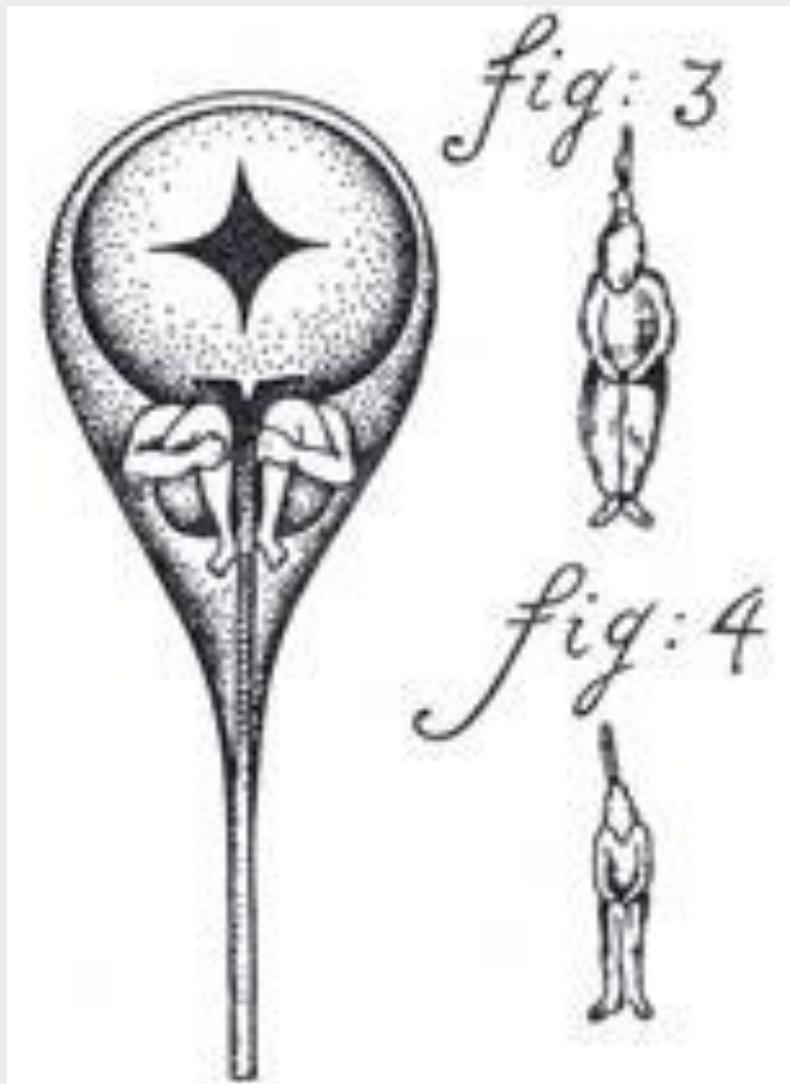
Разум, которому... были бы известны все силы... и положение всех тел..., смог бы объять единым законом движение величайших тел Вселенной и мельчайшего атома... и будущее существовало бы в его глазах точно так же, как прошлое..

Однозначный детерминизм

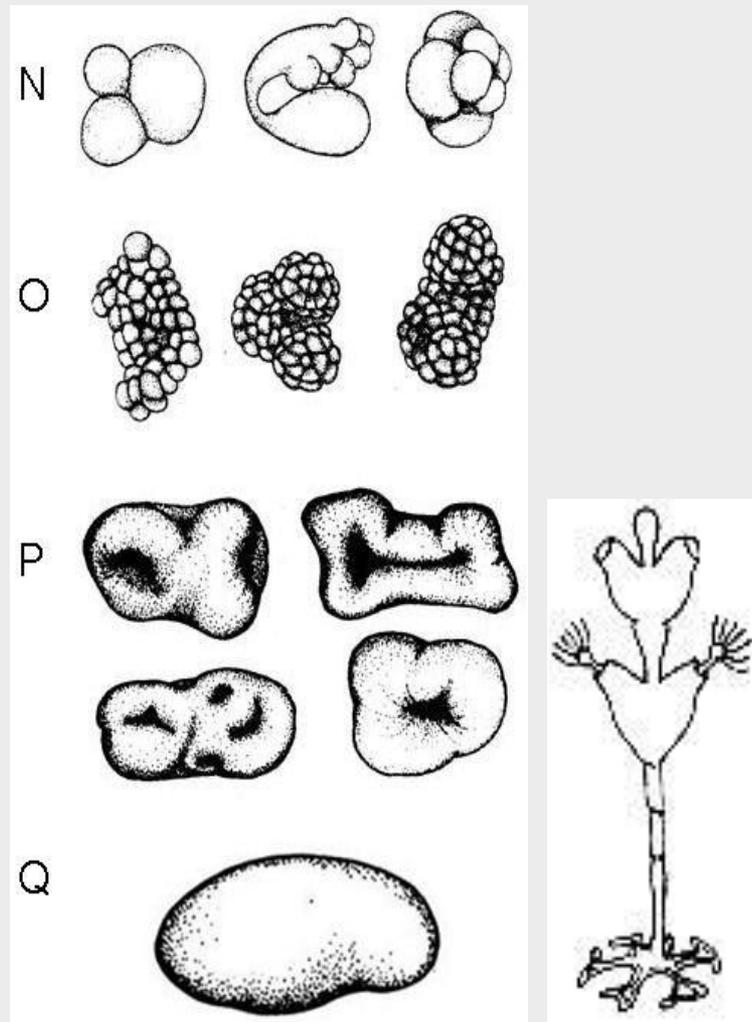


Вселенная –
огромный «часовой механизм»

Преформизм

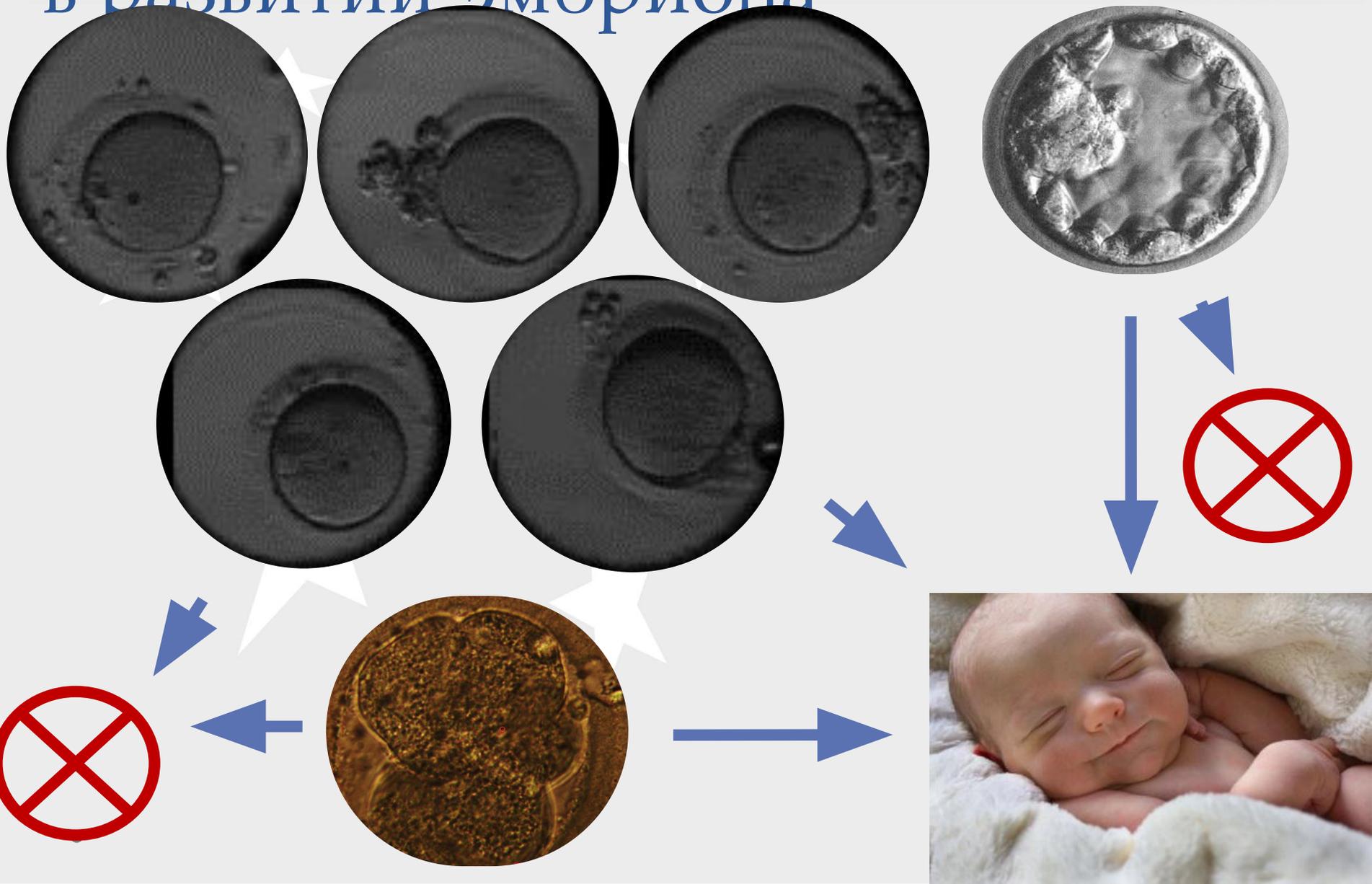


Эквифинальные процессы



Развитие гидроидного
полипа

Периоды вариабельности в развитии эмбриона



Развитие эмбриона

Детерминизм или
вариабельность?



Гастрюляция у амфибий

Карта презумптивных зачатков

Эктодерма

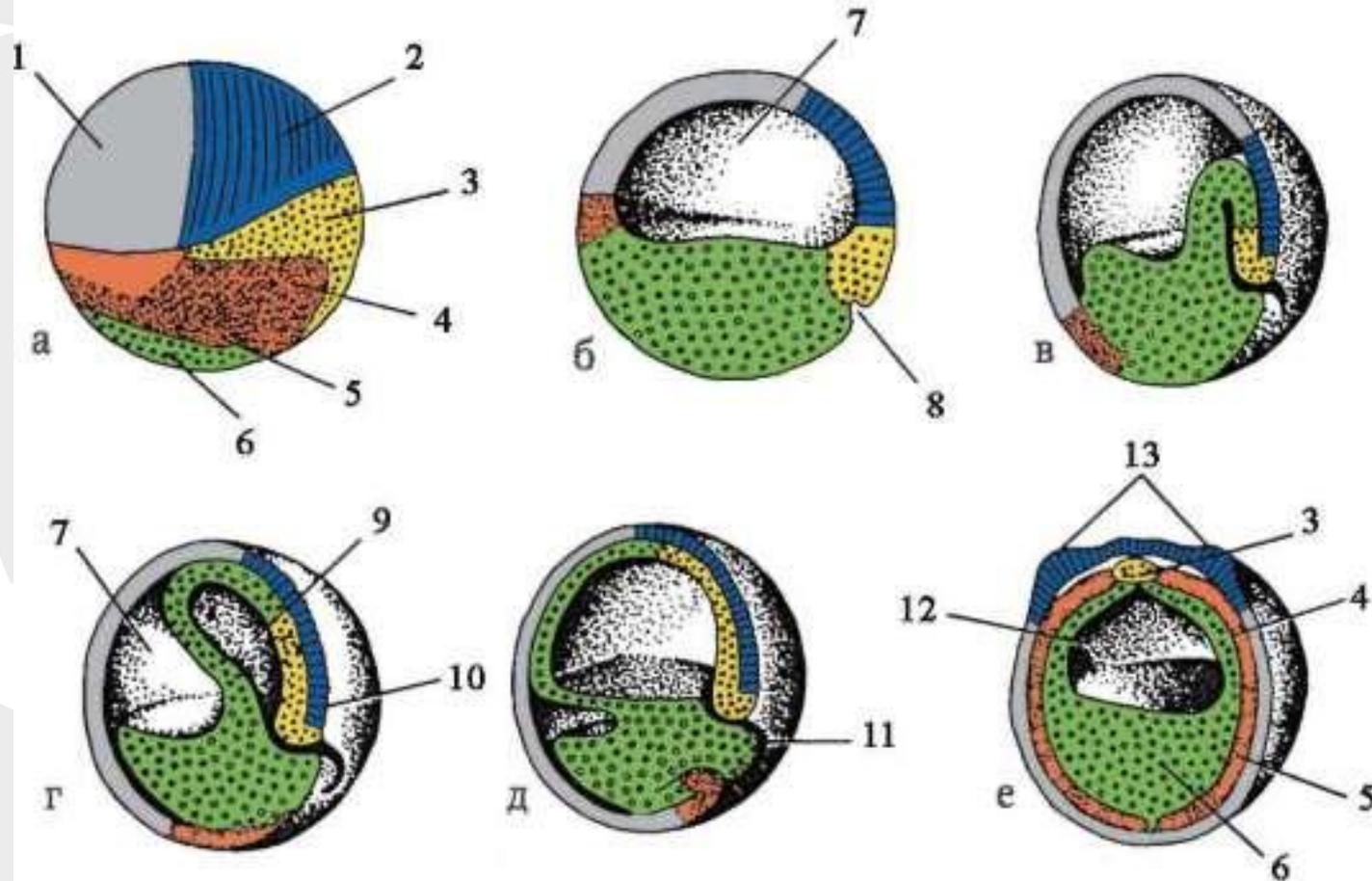
- 1 – покровная
- 2 – нейральная

Мезодерма

- 3 – хорда
- 4 – сомиты
- 5 – вентральная

Энтодерма

- 6 – Энтодерма
- 7 – бластоцель
- 8 – дорсальное впячивание
- 9 – гастроцель



10 – дорсальная губа бластопора

11 – желточная пробка

12 – полость вторичной кишки

13 – нервные валики

Гастрюляция у амфибий

Вариабельность презумптивных зачатков

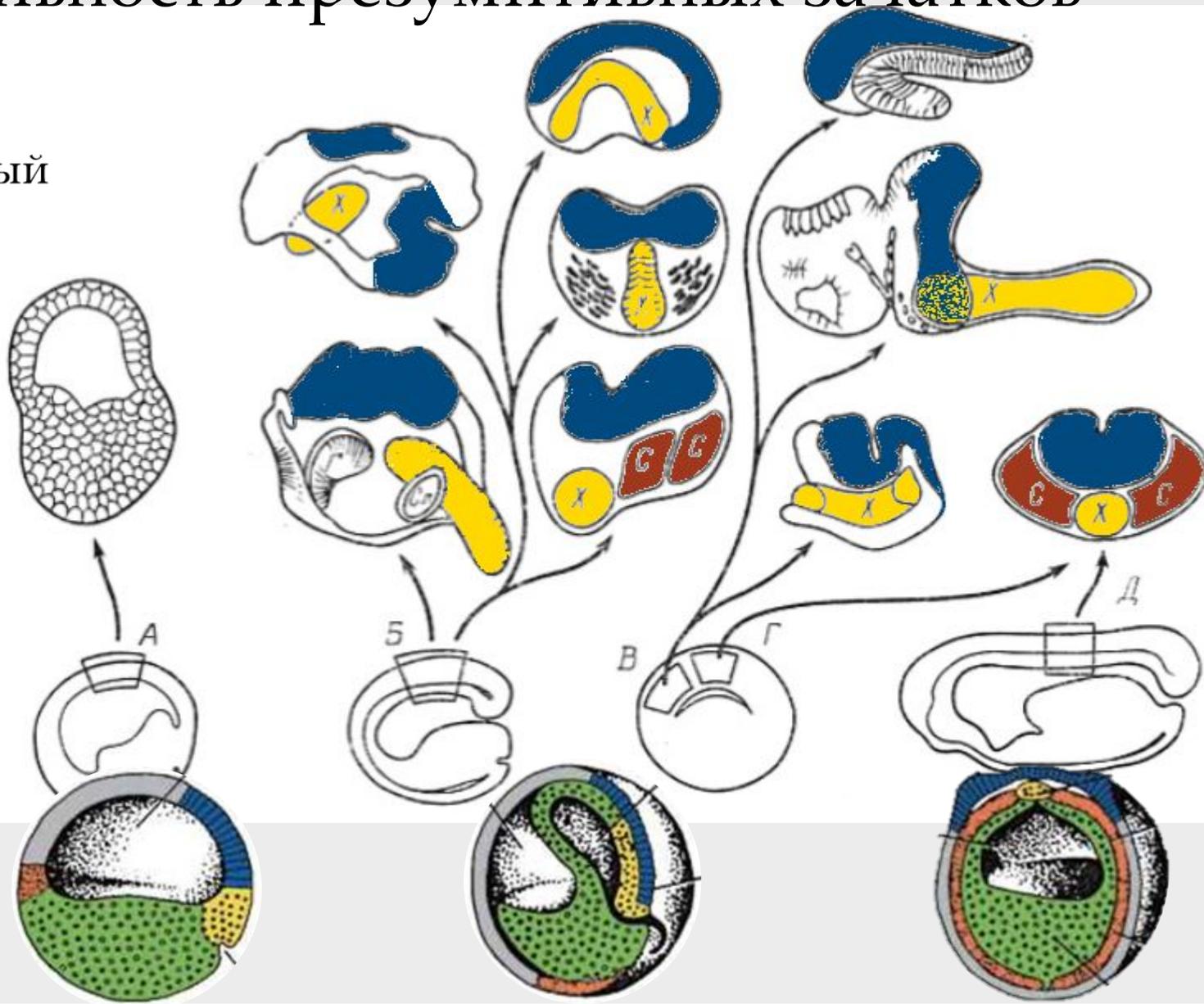
Эктодерма

■ Н – нейральный зачаток

Мезодерма

■ Х – хорда

■ С – сомиты

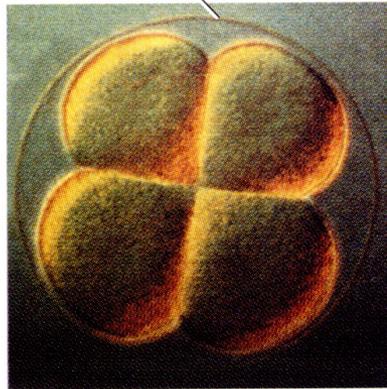


Эмбриональные регуляции



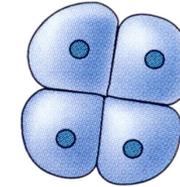
Hans Driesch
(1867—1941)

(A) Fertilization envelope

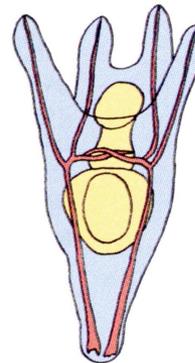
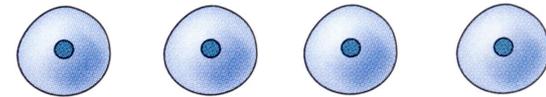


(B)

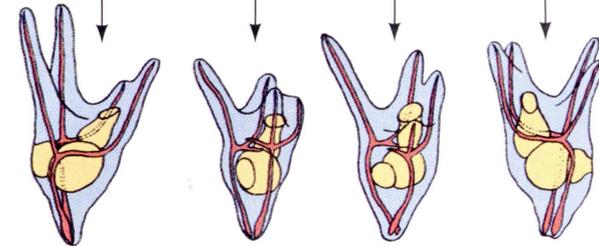
Remove
fertilization
envelope



Separate
into 4 cells



Normal pluteus
larva

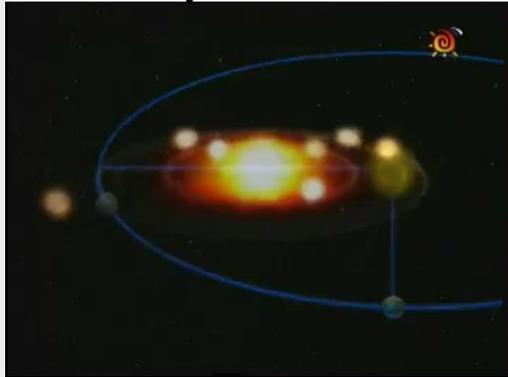


Plutei developed from
single cells of 4-cell embryo

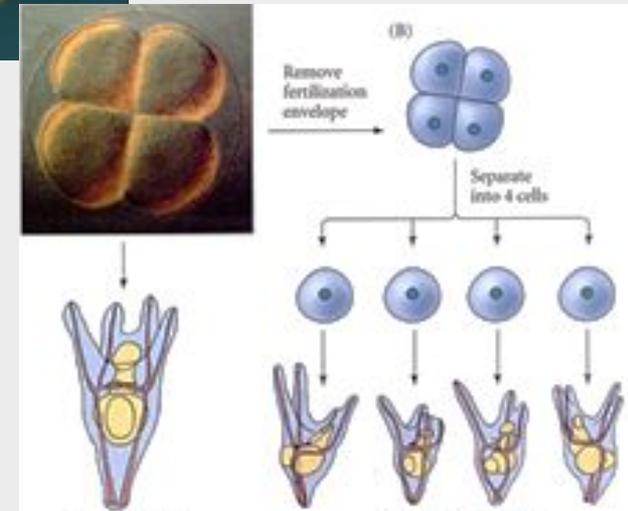
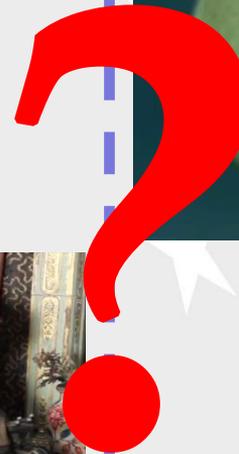
«Судьба зачатка есть функция его
положения в целом»

Физика и биология

Однозначный
детерминизм



Вариабельность и
регуляции



Законь физики нарушаются в живых
организмах???



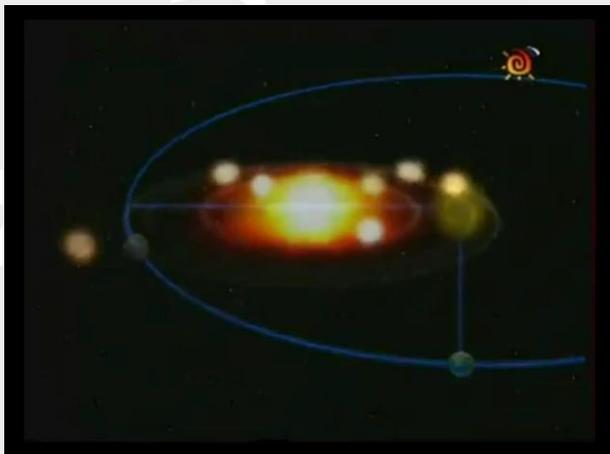
Время в физике и биологии



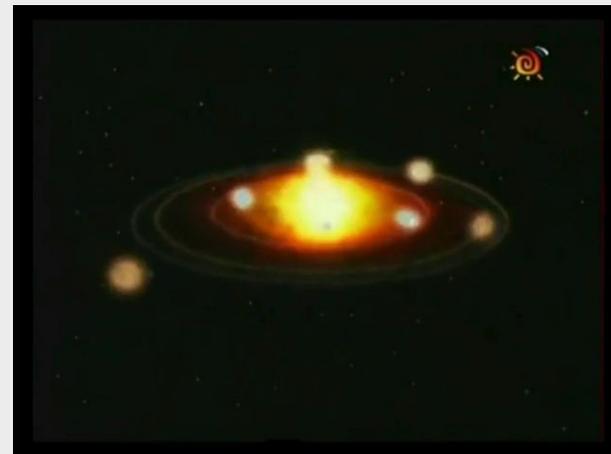
Направление времени

Детерминированные системы

★ $t \rightarrow$ ★



← t

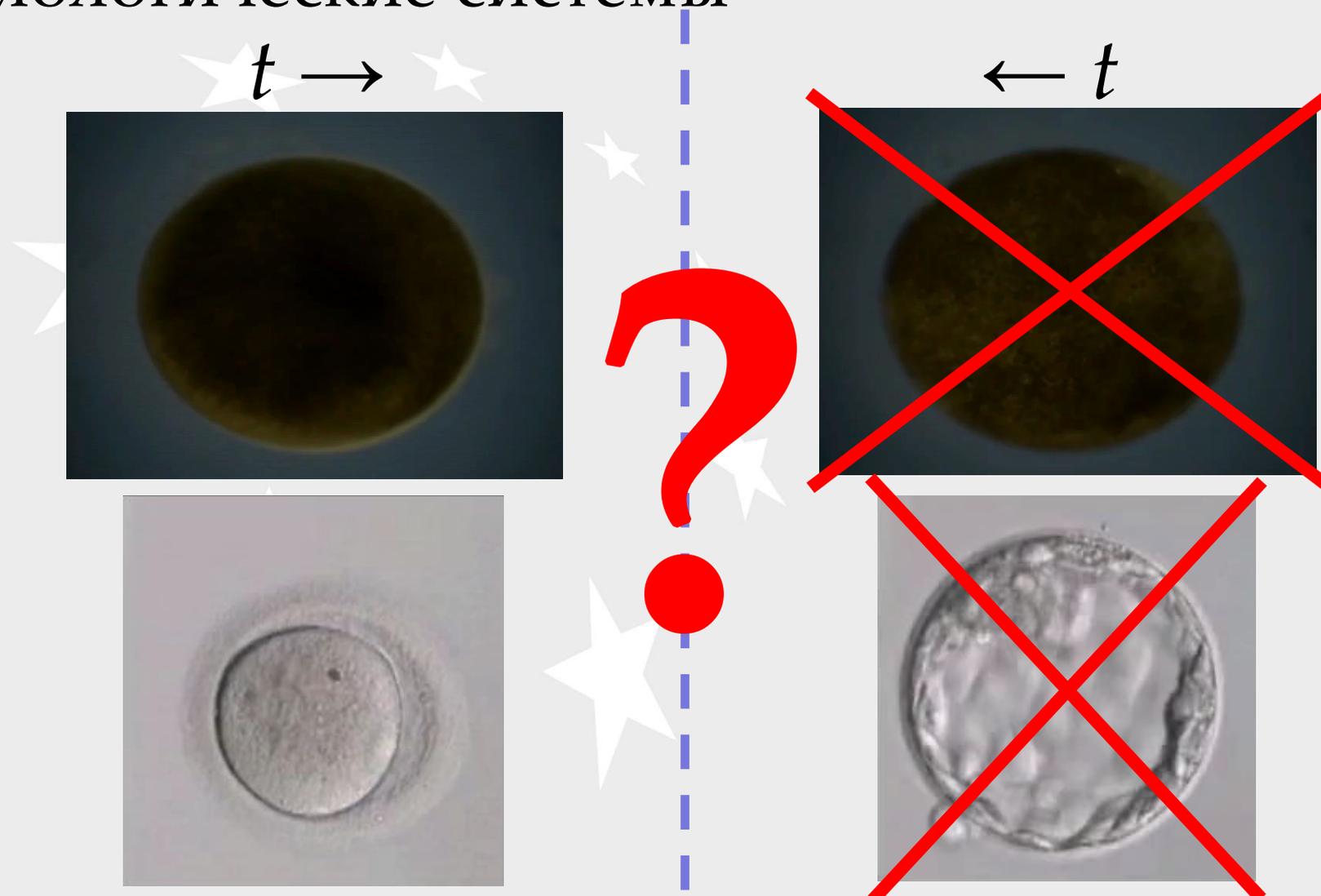


• **Возможно**

• **Возможно**

Направление времени

Биологические системы



Откуда берется эта «стрела времени»???

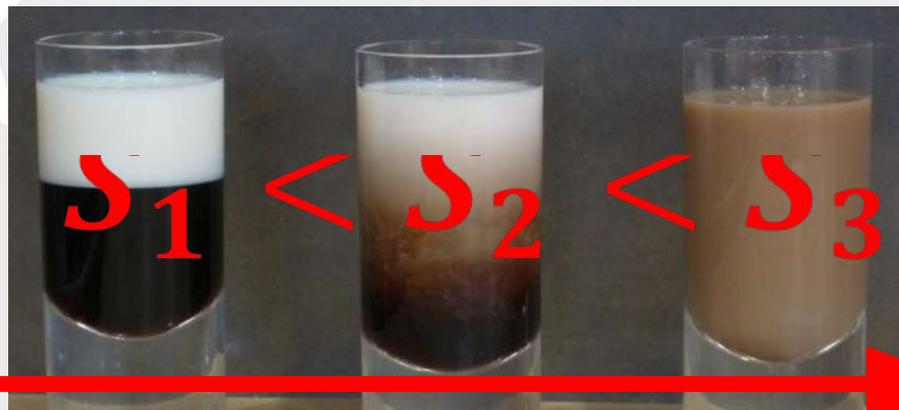
Направление времени

в термодинамике



Arthur Stanley
Eddington
(1882 – 1944)

...Увеличение хаотичности
<с течением времени> –
единственное, что нельзя отменить.
Я буду использовать понятие «стрела
времени», чтобы выразить эту
однонаправленность, для которой нет
аналогий в пространстве.

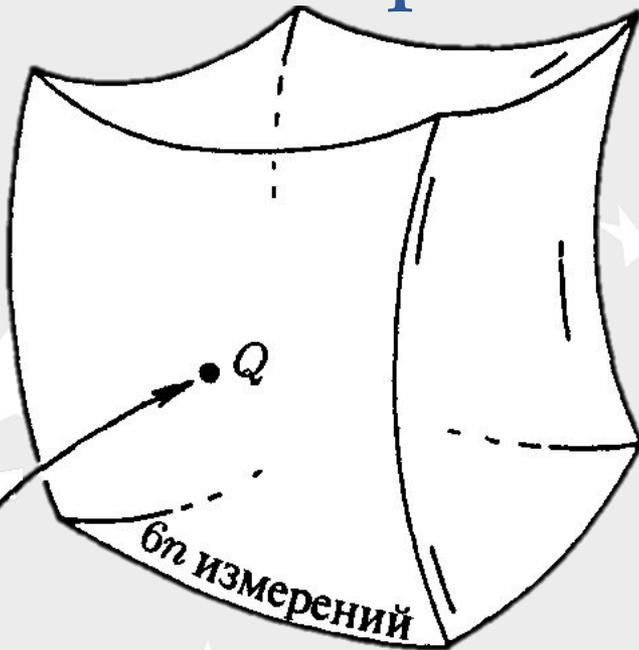


прошлое

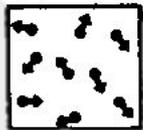
будущее

Направление времени

II начало термодинамики

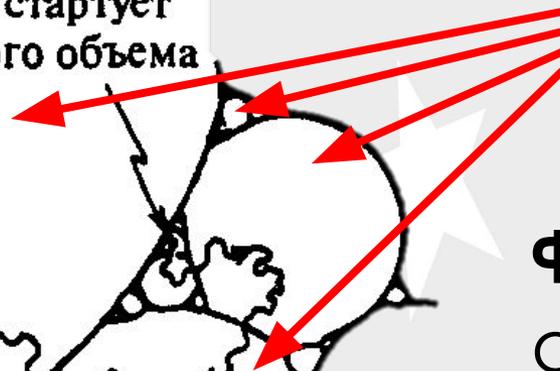


n частиц



$6n$ измерений

Точка стартует
из малого объема



Тепловое
равновесие

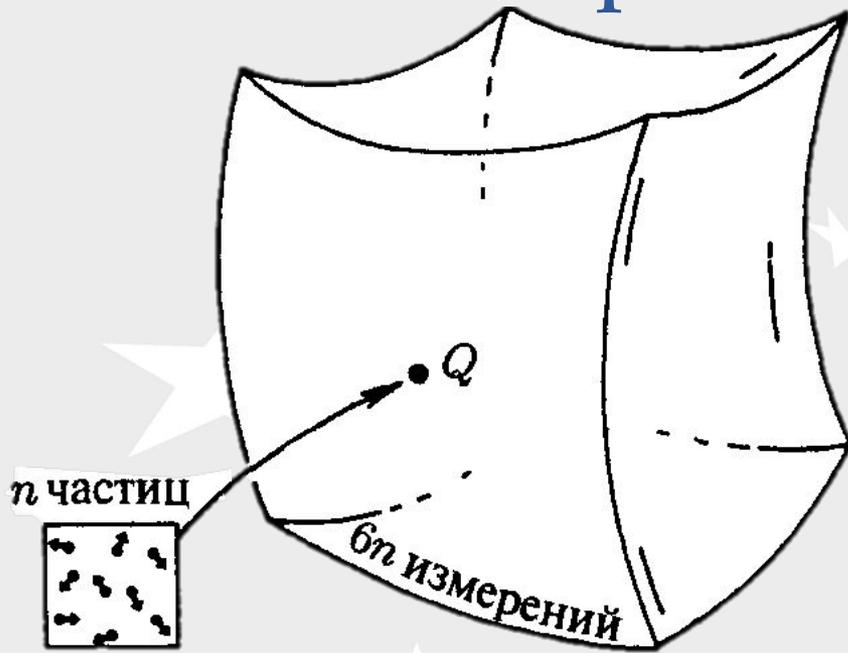
Фазовое пространство (ф.п.) – абстрактное пространство всех переменных системы.

Эволюция системы – движение точки в ф.п.

Области ф.п., внутри которых состояние системы неотличимо.

Фазовый объем области ф.п. – вероятность найти систему в данном состоянии.

II начало термодинамики



Точка стартует из малого объема

Тепловое равновесие



$$S = k \ln W$$

$$S_1 < S_2 < S_3$$

$$W_1 \ll W_2 \ll W_3$$

$$W_{3 \rightarrow 1} \sim \frac{W_1}{W_3} \sim \underbrace{0,00 \dots 001}_{10^{24} \text{ нулей!!!}}$$

10^{24} нулей!!!

II начало термодинамики



Если я позволю своим пальцам
праздно блуждать по клавишам
пишущей машинки, может
случиться, что у меня получится
напечатать какое-нибудь
осмысленное предложение.

Если армия обезьян будет бить по клавишам
пишущих машинок, они могут напечатать все
книги Британского музея.

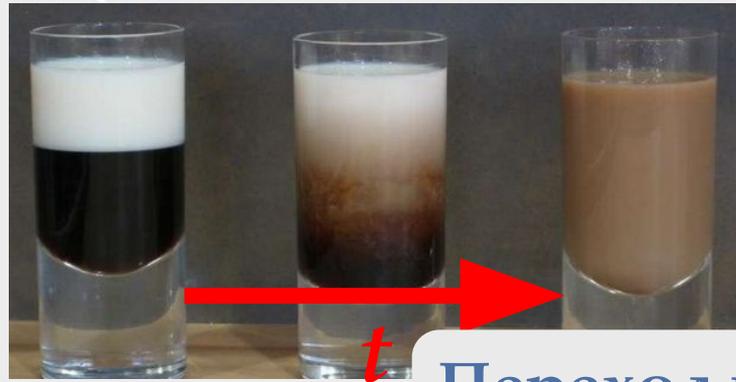
**Шанс, что они сделают это, определённо
больше, чем вероятность того, что все
молекулы соберутся в одной половине
сосуда.**

Eddington, 1928, "The nature of the physical world"

«Стрела» времени

Термодинамика

Более организованные системы
Порядок

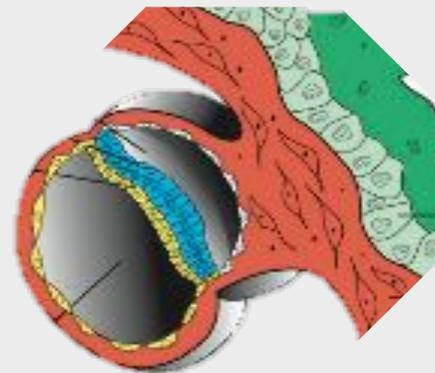


Менее организованные системы
Хаос

Переход в более вероятное состояние

Биология развития

Менее организованные системы
Простое



Более организованные системы
Сложное

t ???

В разные стороны?!?! Почему?



Самоорганизация в физических системах

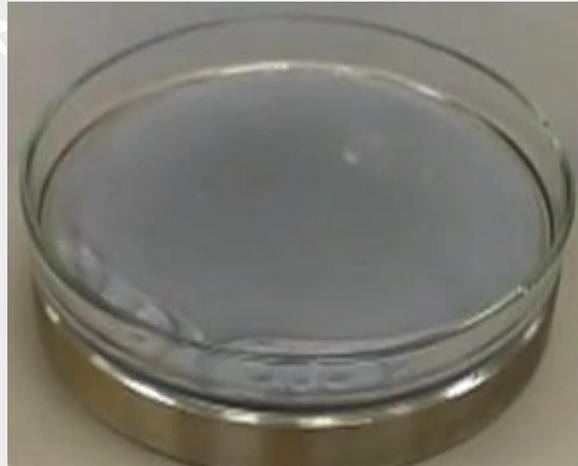


Самоорганизация в физике

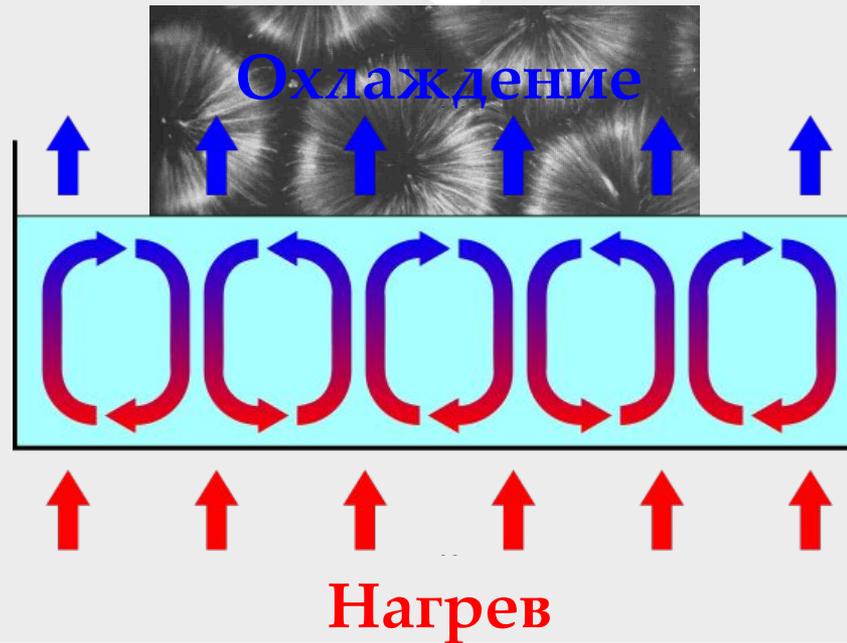
Ячейки Релея-Бенара



Henri Claude Bénard
(1874—1939)



John William Strutt,
Rayleigh
(1842—1919)



Конвекционные
ТОКИ

Самоорганизация в физике

Реакция Белоусова-Жаботинского



GEMC
GROUP OF COMPANIES
EUROPEAN MEDICAL CENTER



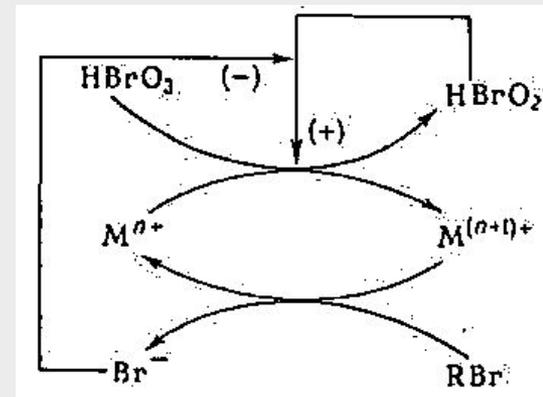
Борис Павлович
Белоусов
(1893—1970)



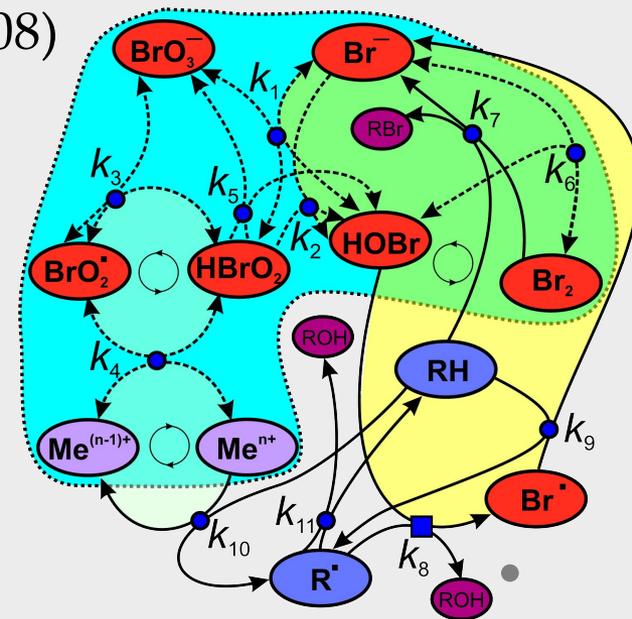
Симон Эльевич
Шноль
(род. 1930)



Анатолий Маркович
Жаботинский
(1938—2008)



Спонтанное усложнение
Появление новых структур



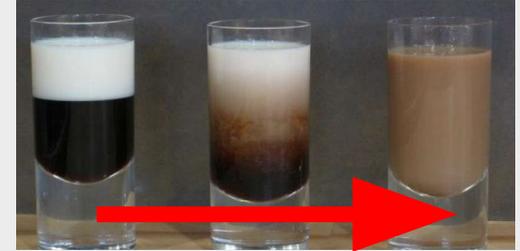
Условия самоорганизации:

1. поток (запас) энергии

Изолированные системы

$$\frac{dS}{dt} \geq 0$$

процессы
 $S \uparrow$



Открытые системы

$$dS = d_i S + d_o S$$



процессы
 $S_i \uparrow$

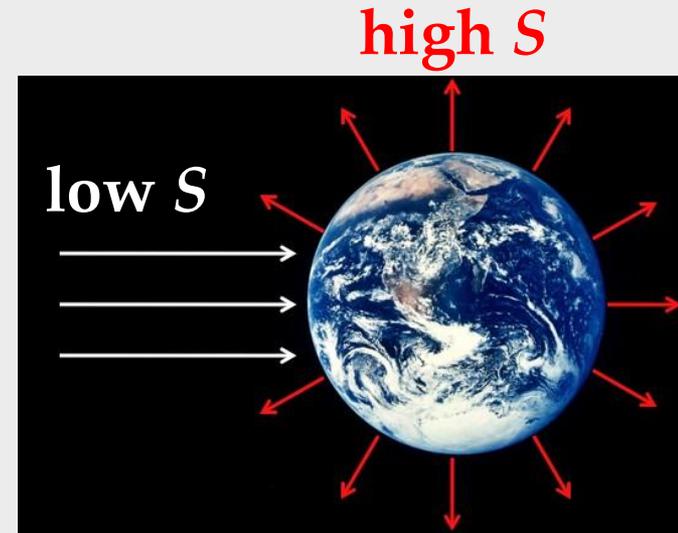


Поток вещества
и энергии

Неорганиз.
системы
high S

Организ.
системы
low S

$S_o \downarrow$



- $\frac{d_i S}{dt} \geq 0,$

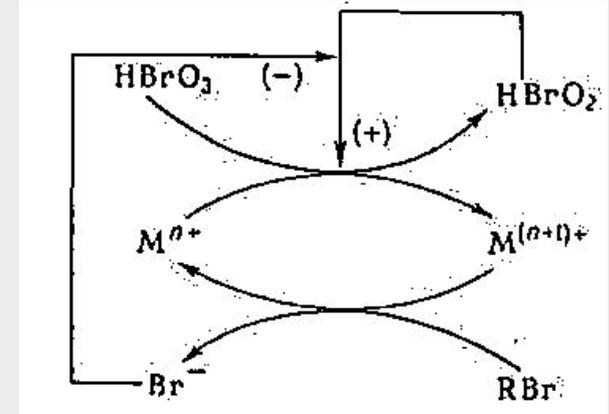
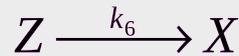
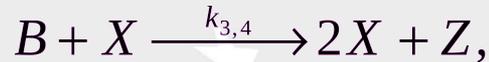
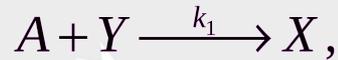
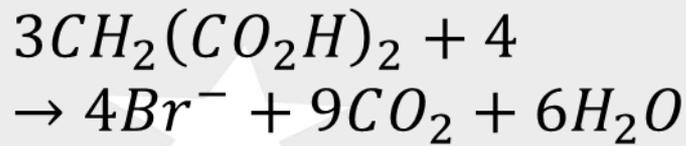
$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_i S}{dt} - \frac{d_o S}{dt} \leq 0$$

high S

Условия самоорганизации:

2. Обратные связи

Реакция Белоусова-Жаботинского

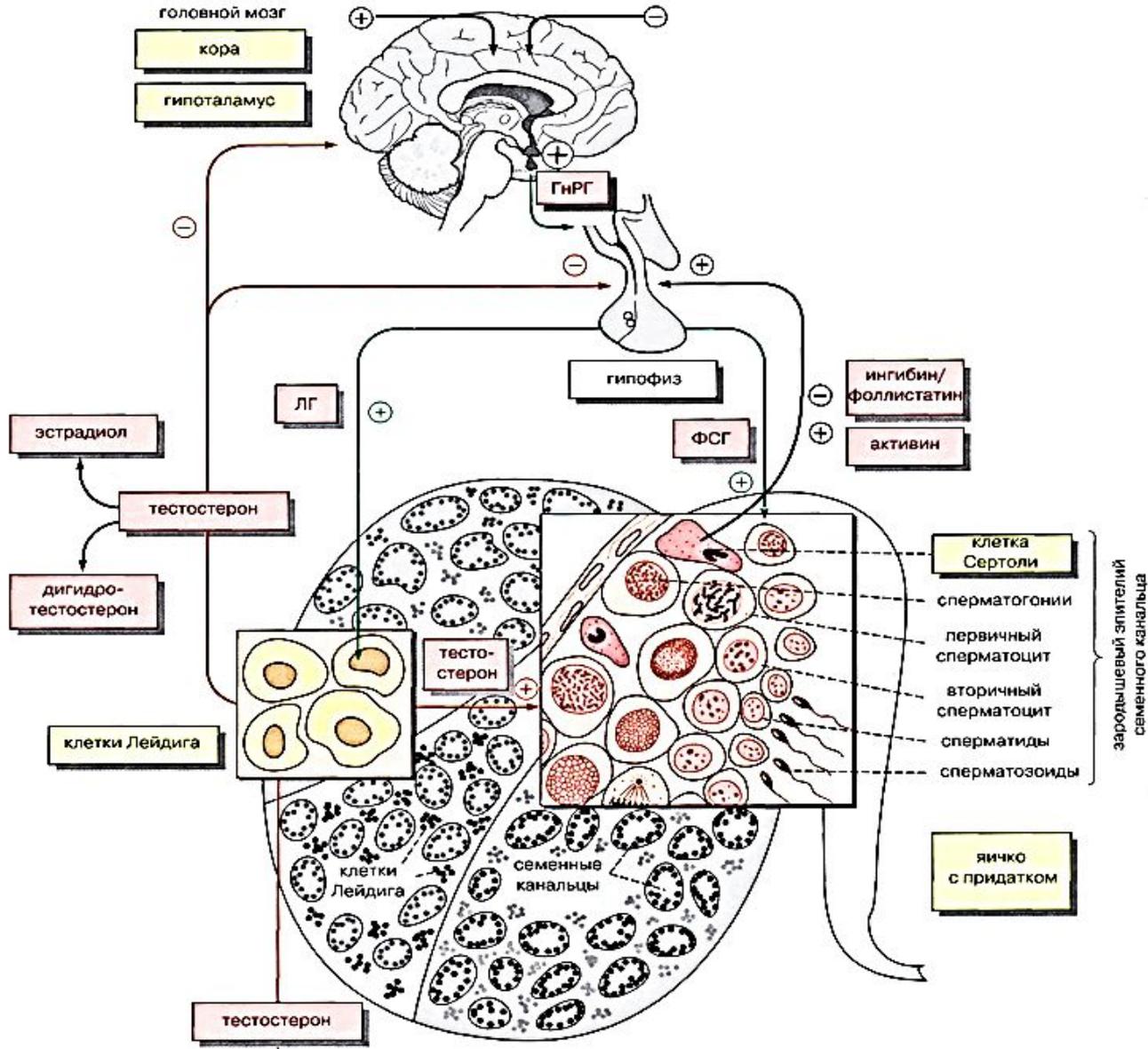


Эндокринная система



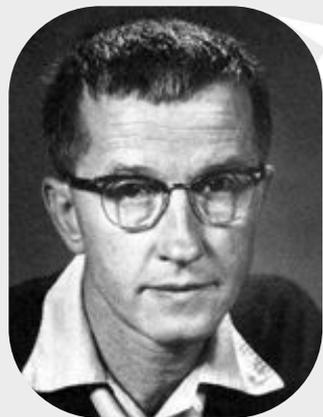
Система обратных связей

Регуляция репродуктивной системы человека

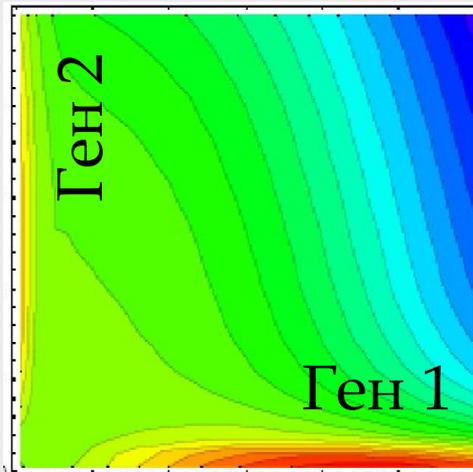
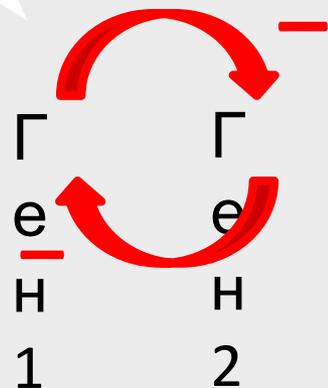


Генетический триггер

Взаимное ингибирование двух генов



Max Delbrück
(1906—1981)



Два **стабильных**
состояния:

активен ген 1

или

активен ген 2

Промежуточные

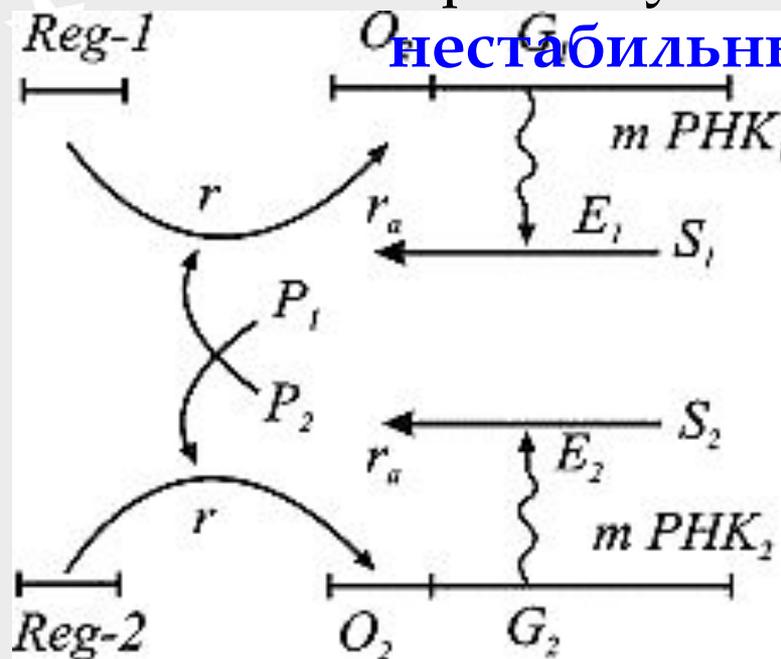
нестабильны



François Jacob
(1920—2013)



Jacques Monod
(1910—1976)

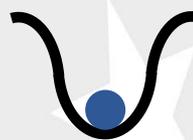
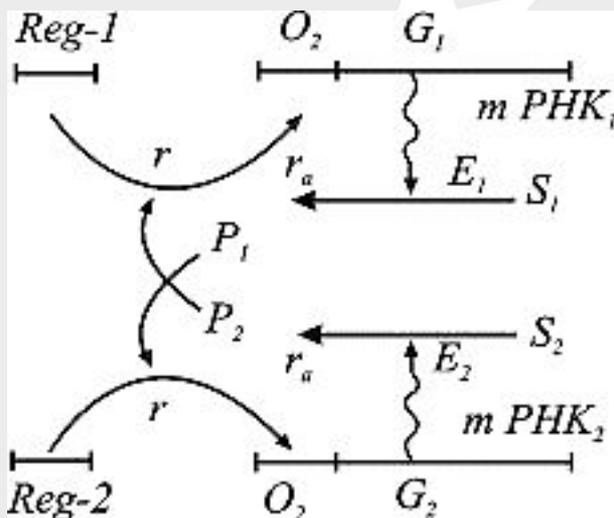
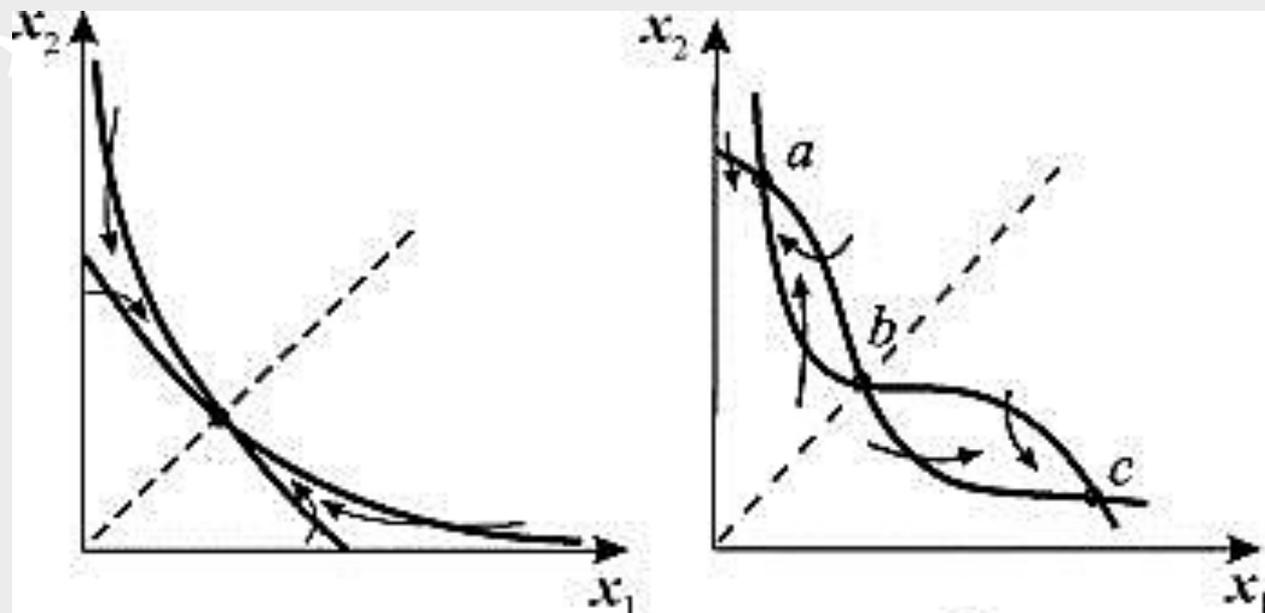


Генетический триггер

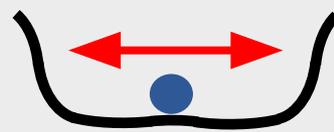
Взаимное ингибирование двух генов



Дмитрий Сергеевич
Чернавский
(1926—2016)



Одно
устойчивое
состояние



Бифуркация
Область
вариабельно
сти



Два
возможных
устойчивых
состояния

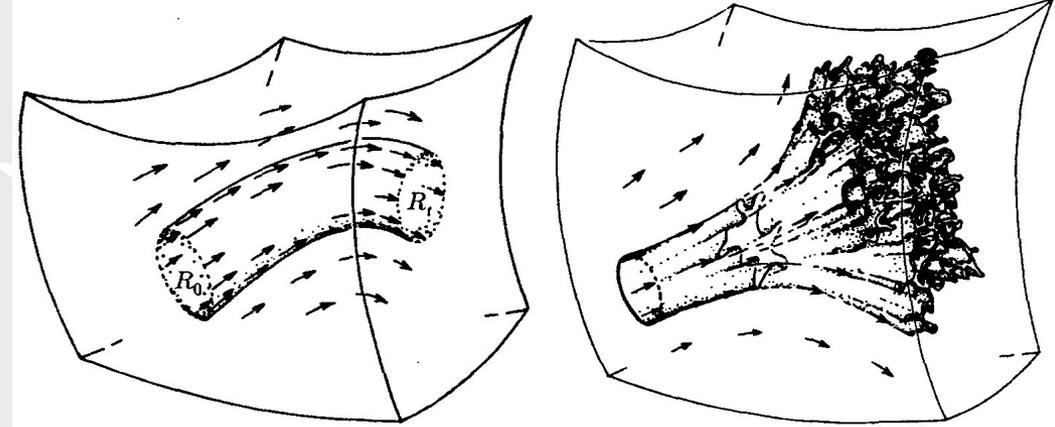
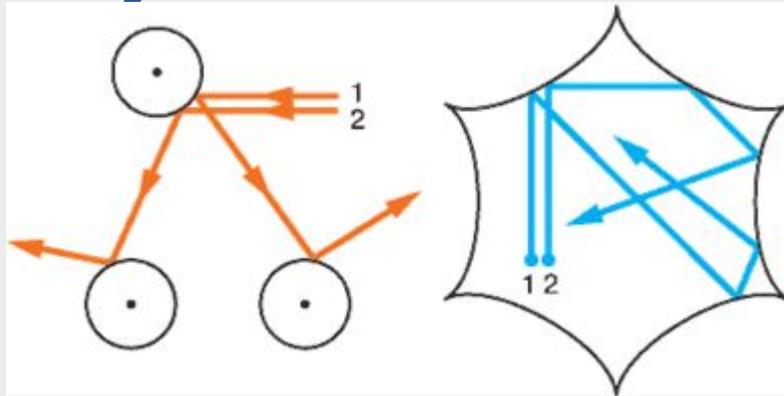
Словарь «биология — математика»

Параллели в ключевых понятиях

- **Компетенция** – способность клетки (ткани) развиваться в нескольких направлениях
- **Бифуркация** – появление новых состояний в потенциальном рельефе системы
- **Детерминация** – определение судьбы клетки (ткани)
- **Переход в бассейн притяжения** одного из новых состояний
- **Дифференцировка** – реализация генетической программы, определяющей специфический фенотип клетки
- **Достижение** нового устойчивого состояния



Рождение нового в неустойчивых системах



Рассеивающий бильярд (бильярд Синая).

Незначительное отклонение в начальных условиях ведет к значительному изменению следствий.

При любой (конечной) точности задания начальных условий через несколько столкновений предсказание станет невозможным.

Появление «стрелы времени» возможно только в системах с неустойчивой динамикой (неинтегрируемых системах).

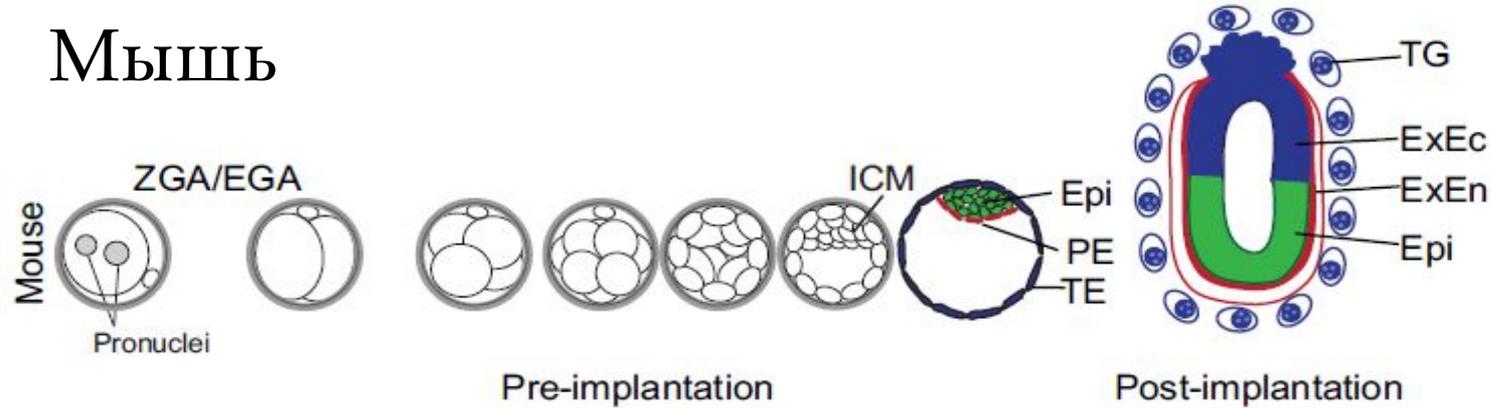


Самоорганизация в развитии эмбриона

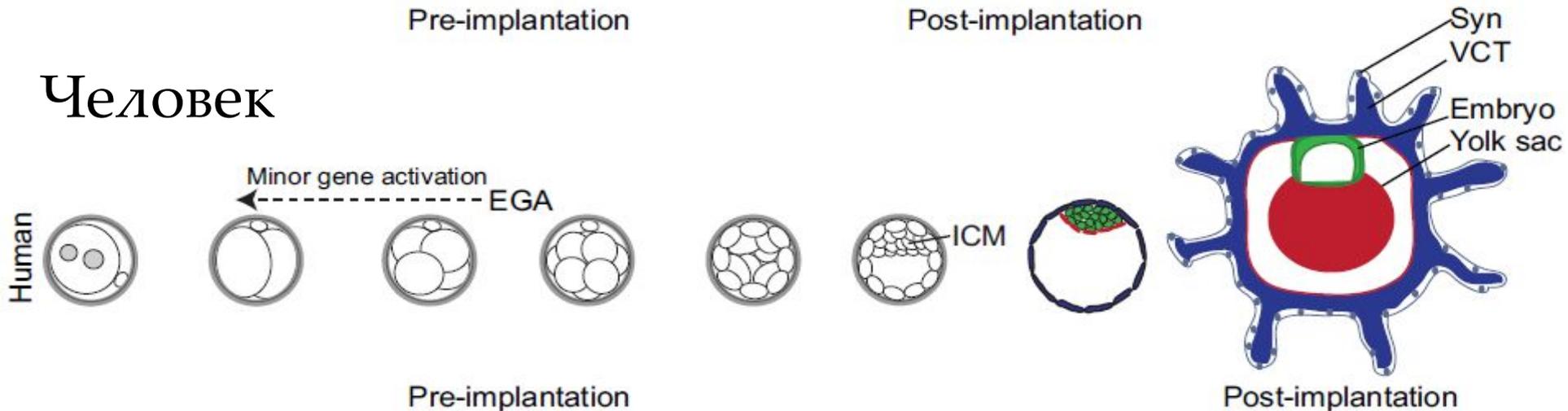


Общая схема преимплантационного развития млекопитающих

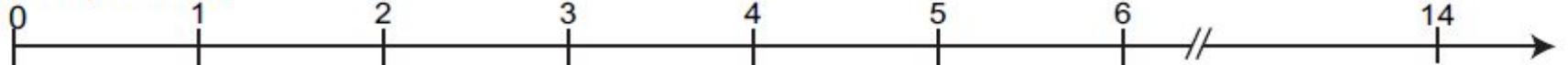
Мышь



Человек



Embryonic day



Развитие эмбриона млекопитающих

Этапы качественного усложнения



MI

1



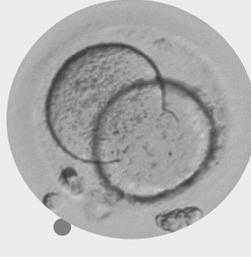
MII

2



2PN

3

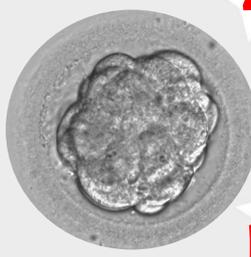


2 бласто-
мера



8 бласто-
меров

4

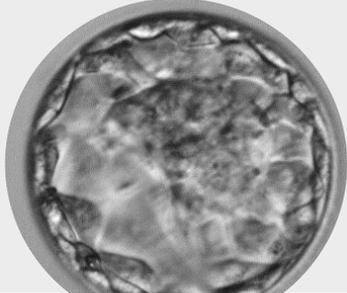


морула

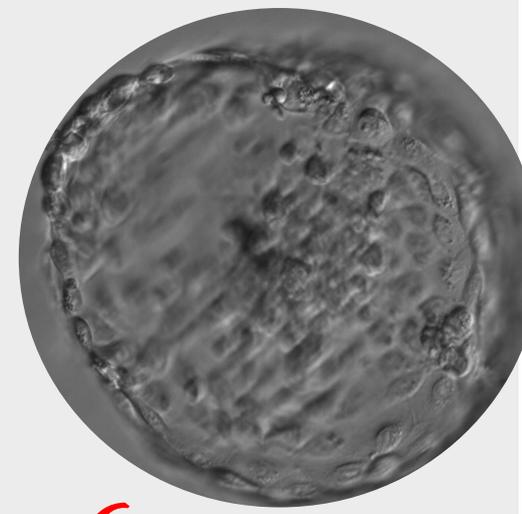
5



начало
кавитаЦИИ



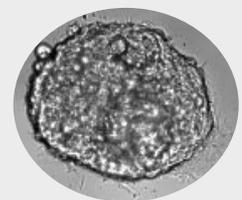
бласто-
циста



6



7



Раннее дробление клетки (почти) идентичны



NATURE

October 24, 1959

Vol. 184

EXPERIMENTS ON THE DEVELOPMENT OF ISOLATED BLASTOMERES OF MOUSE EGGS

By DR. ANDRZEJ K. TARKOWSKI

Zoological Institute, University of Warsaw, and Mammals Research Institute,
Polish Academy of Sciences, Bialowieza

Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst

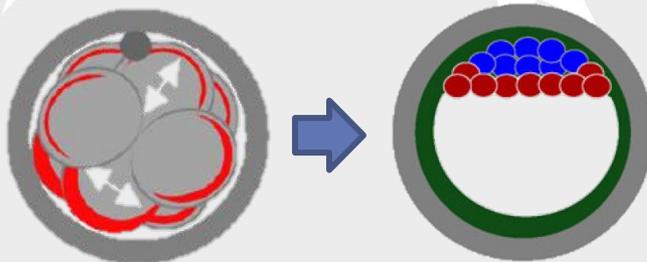
Guoji Guo,^{1,2,4} Mikael Huss,^{3,4} Guo Qing Tong,^{2,5} Chaoyang Wang,² Li Li Sun,² Neil D. Clarke,³ and Paul Robson^{1,2,*}

Functional Genomics of 5- to 8-Cell Stage Human Embryos by Blastomere Single-Cell cDNA Analysis

Amparo Galán¹, David Montaner², M. Eugenia Póo¹, Diana Valbuena¹, Verónica Ruiz¹, Cristóbal Aguilar¹, Joaquín Dopazo², Carlos Simón^{1,3*}

4—8 бластомеров

- Поляризация клеток
апикальный полюс – ↑ aPKC, Par3, Jam1
базальный полюс – ↑ Par1
- EGA – активация генома эмбриона
Nanog – маркер эпибласта
Cdx2 – маркер трофобласта
- Начало компактизации

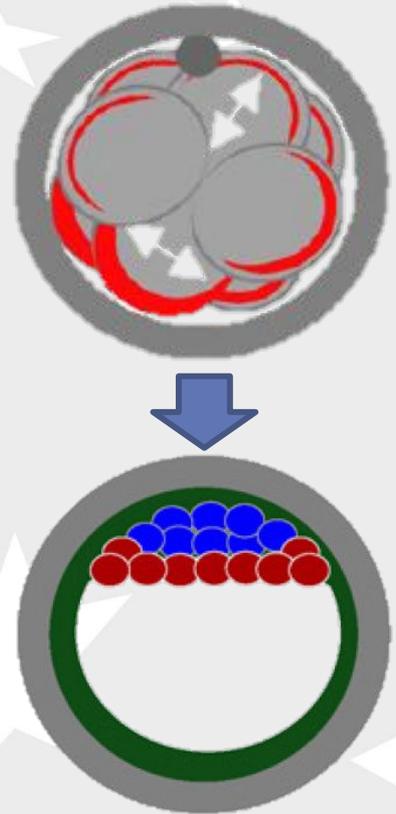
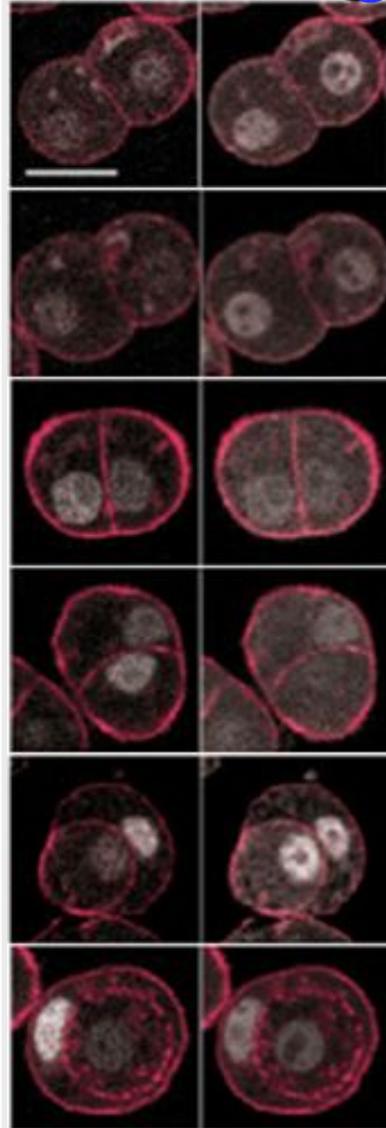


эпибласт
гипобласт
трофобласт

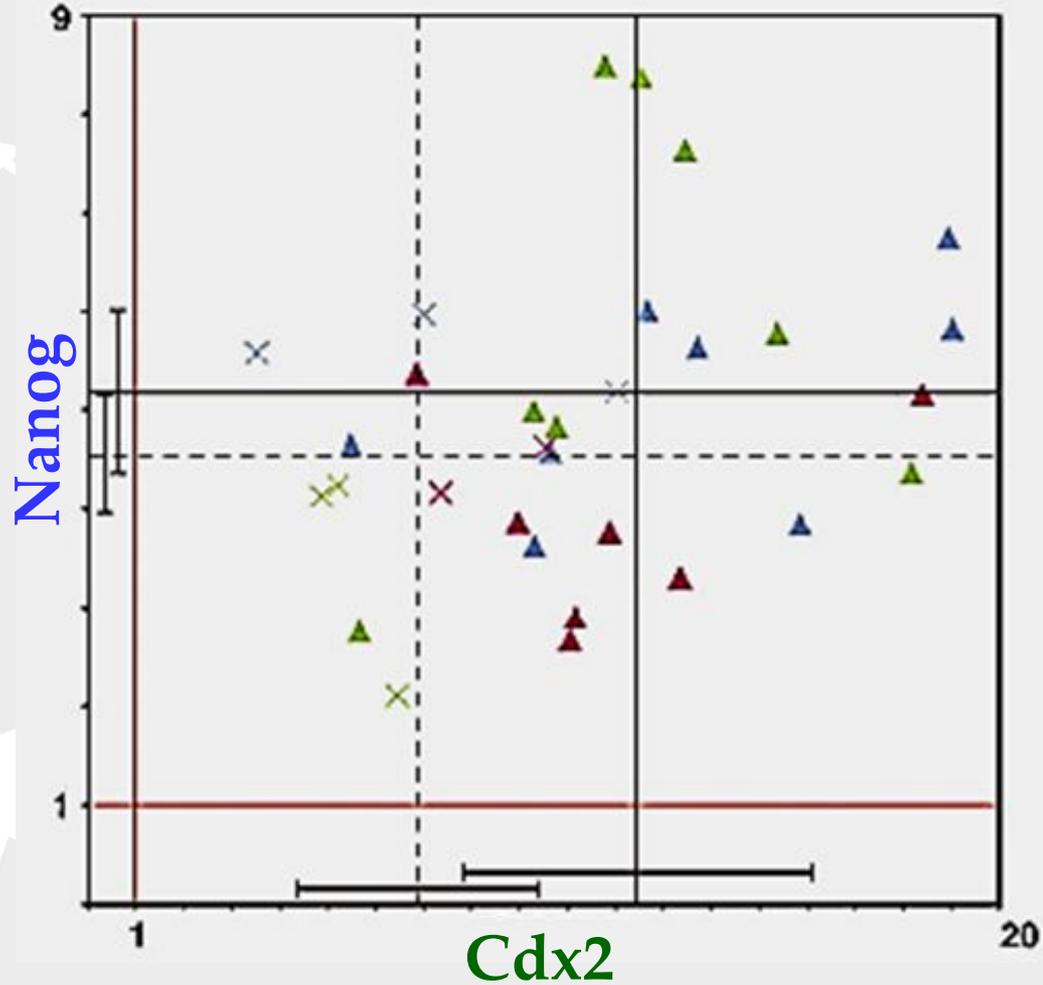
8 бластомеров

Вариабельность: полярность, экспрессия генов

Cdx2 Nanog



эпибласт
гипобласт
трофобласт
Dietrich et al., 2007



Δ Полярные бластомер × Аполярные бластомеры

Связь полярности клеток и экспрессии генов

- Поляризация клеток
апоикальный полюс – ↑ aPKC,
Par3, Jam1

базальный полюс – ↑ Par1



high aPKC

↓ кортикального
миозина

↓ сократимость

симметричное
деление

aPKC

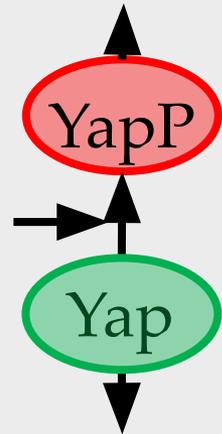


кортикальный
• миозин

Lats
~~другие
киназы~~

HIPPO

в цитоплазме
неактивен



в ядро



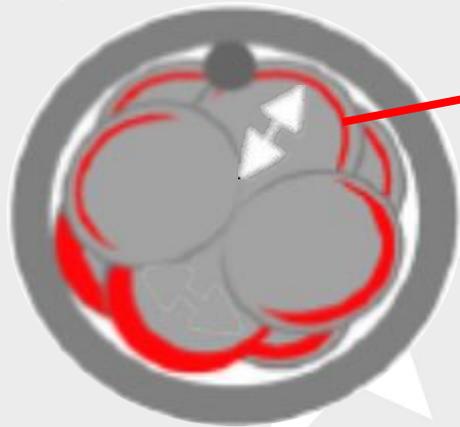
Транскрипция
Cdx2

Трофобласт•

Связь полярности клеток и экспрессии генов

- Поляризация клеток
апоикальный полюс – ↑ аPKC,
Par3, Jam1

базальный полюс – ↑ Par1



low аPKC



↑ кортикального
миозина



↑ сократимость

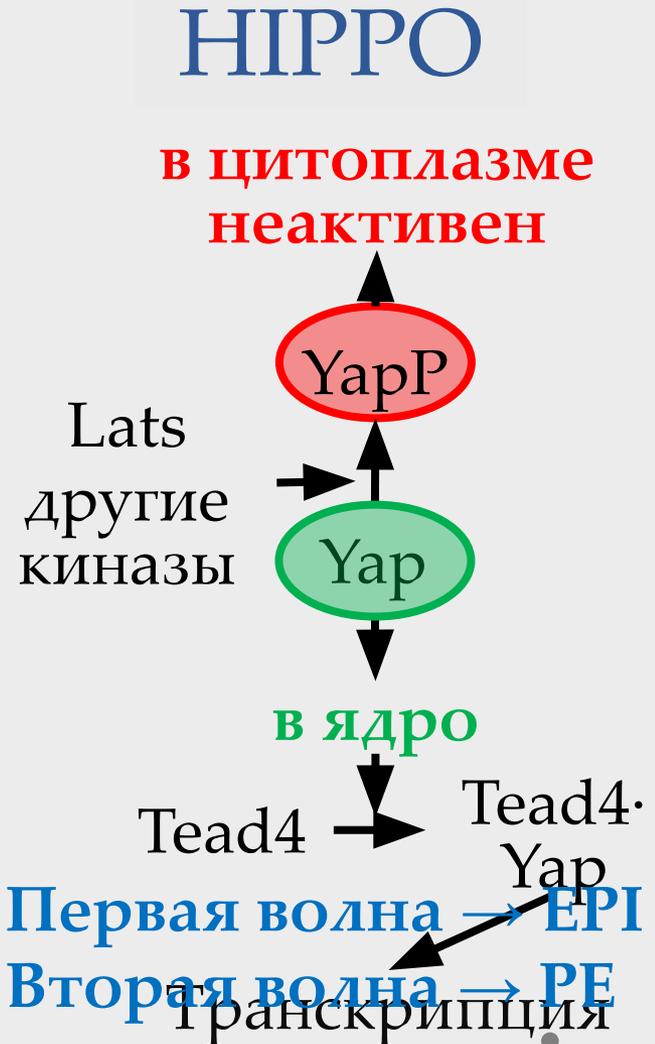


асимметричное
деление

аPKC

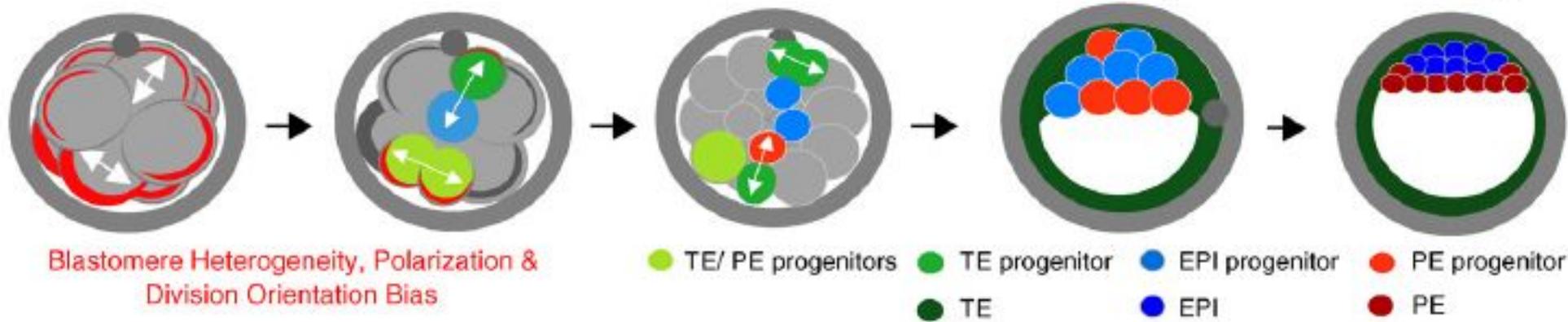


кортикальный
• МИОЗИН



8 бластомеров

связь полярности с экспрессией генов



Bruce et al., 2010

$\downarrow \text{Cdx2} \Rightarrow \downarrow \text{aPKC, Par3} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \text{асимм. деление} \\ \text{уход клетки внутрь} \end{array} \right. \Rightarrow \text{кл} \rightarrow \text{EPI}$

\uparrow плюрипотентность, \uparrow жизнеспособность химер

$\uparrow \text{Cdx2} \Rightarrow \uparrow \text{Полярность} \Rightarrow \text{симм. деление} \Rightarrow \text{кл} \rightarrow \text{ТЭ}$
(экспрессия, апикальн. локализ. **aPKC, Par3**) $\Rightarrow \uparrow \text{Cdx2}$

химеры нежизнеспособны, но вместе с $\downarrow \text{Cdx2}$ кл – ок

Cdx2 – \exists собственная экспрессия и материнские

8 бластомеров

появление различий между клетками

- Поляризация клеток

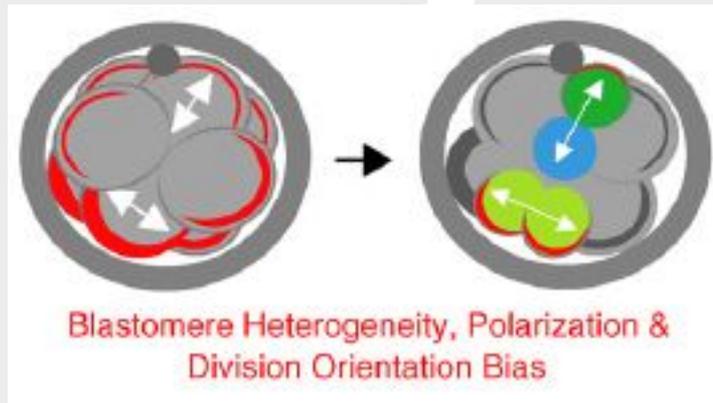
апикальный полюс – ↑ aPKC, Par3, Jam1

базальный полюс – ↑ Par1

- Симметричные и асимметричные деления

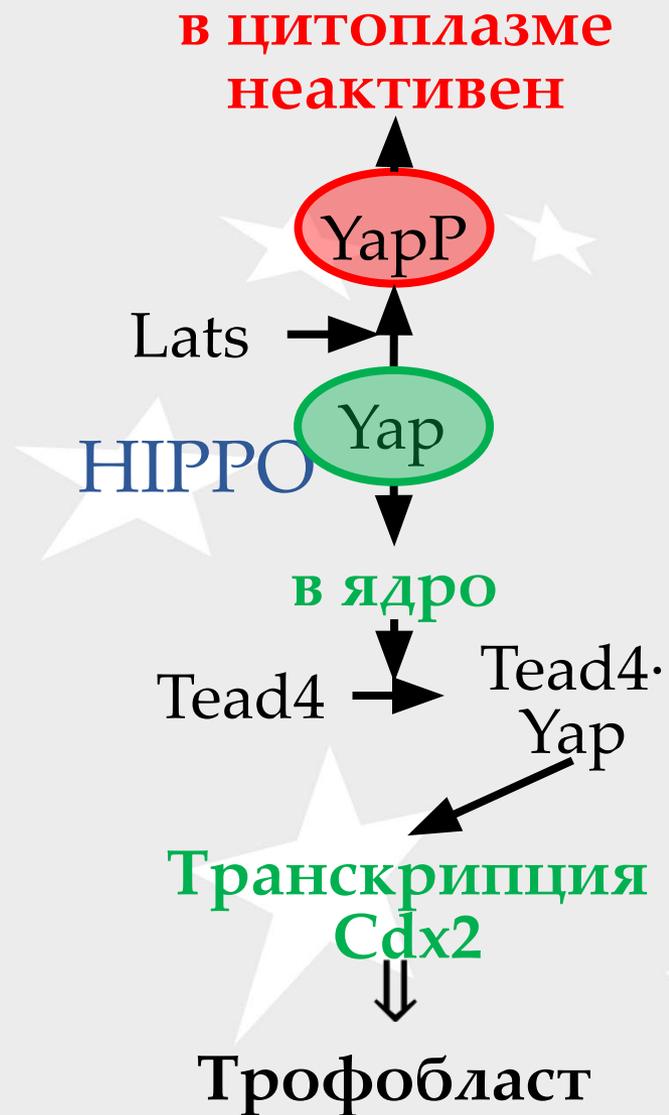
симметричное ⇒ дочерние клетки идентичны

асимметричные ⇒ **внутренняя клетка → EPI** (первая волна)



↑ aPKC, Par3 ⇒ симм. деление

↓ aPKC, Par3 ⇒ асимм. деление ⇒ **внутренние клетки → EPI**

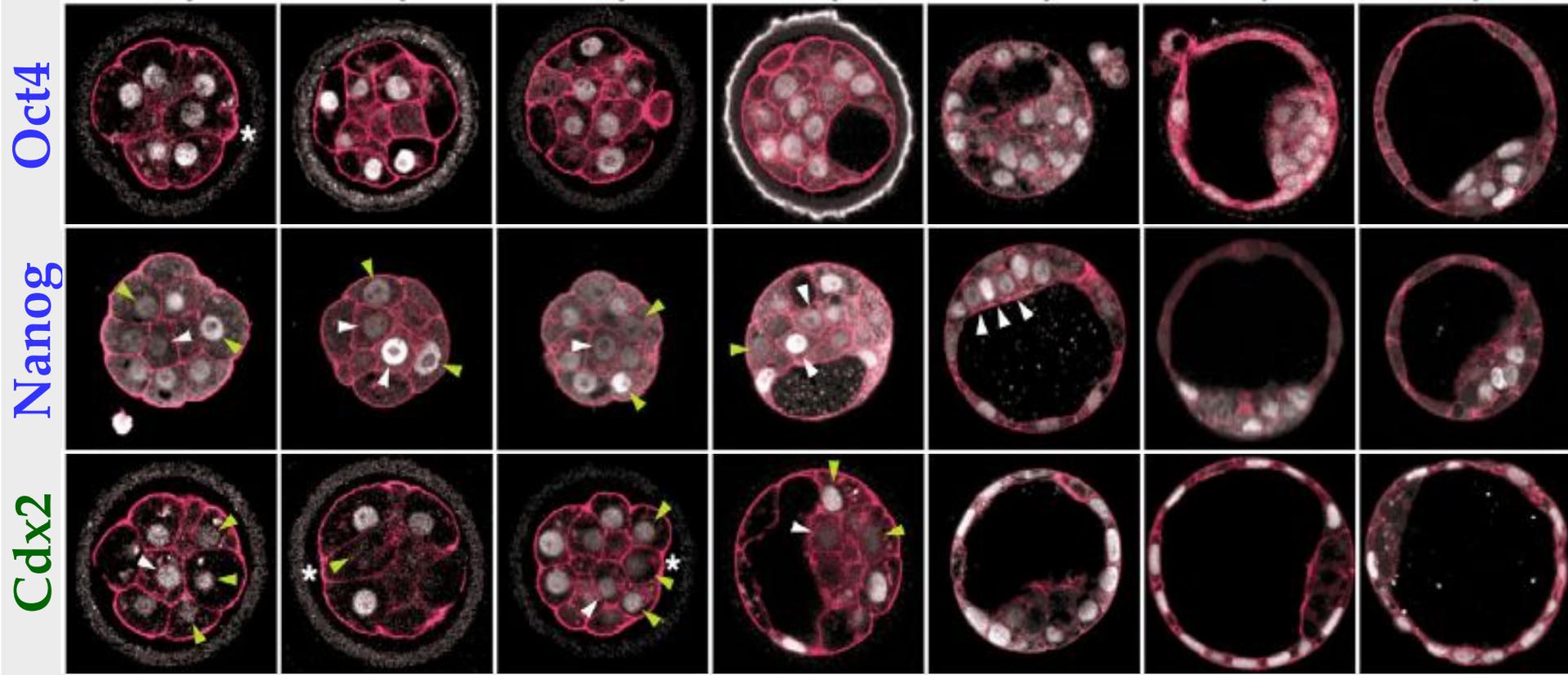


HIPPO



8 бластомеров → бластоциста

Квазистохастические паттерны экспрессии генов перед их детерминацией (мышь)



эпибласт
гипобласт
трофобласт



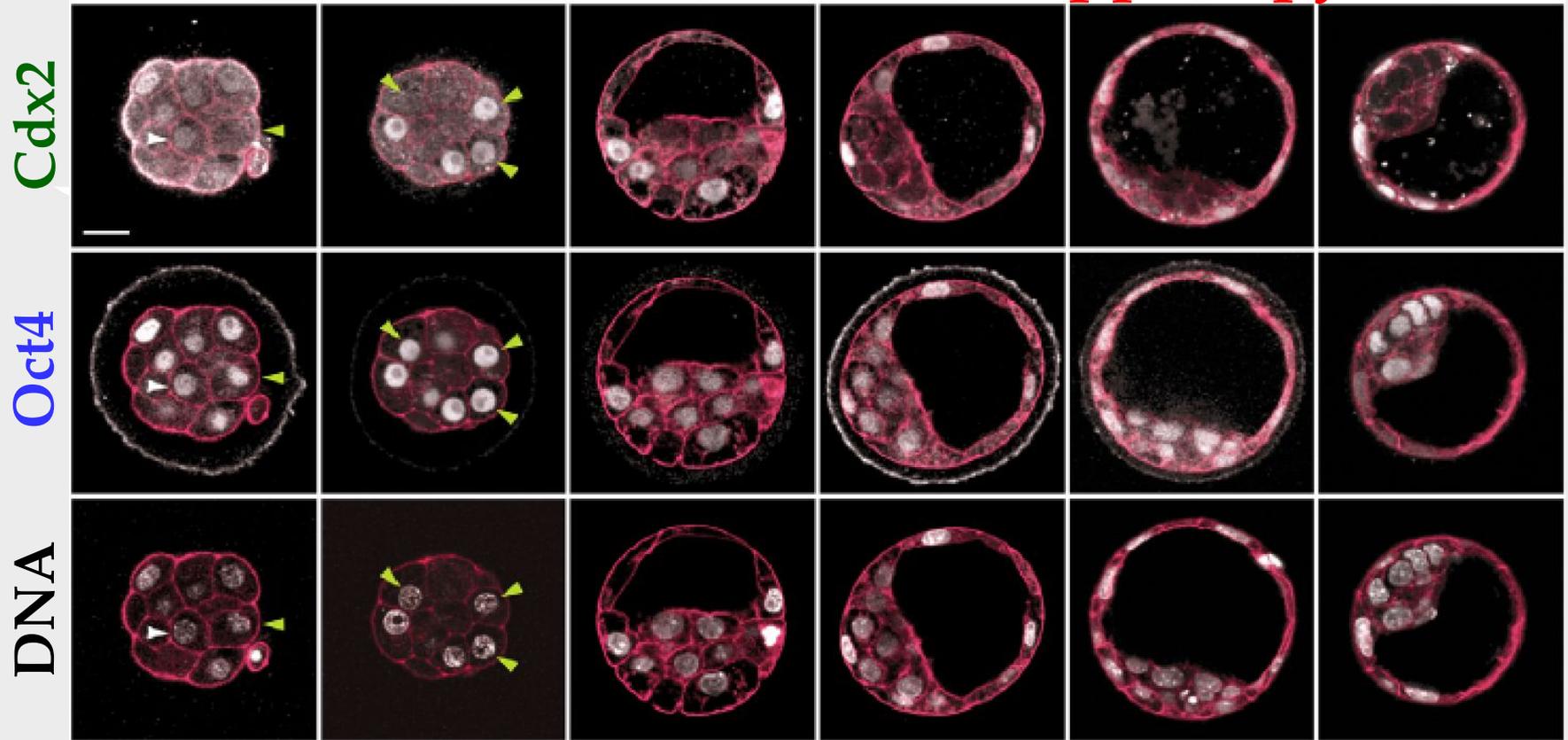
E 3.5

E 4.5

8 бластомеров → бластоциста (МЫШЬ)

8 бластомеров – **Oct4** и **Cdx2** не коррелируют

Бластоциста – **Oct4** и **Cdx2** антикоррелируют



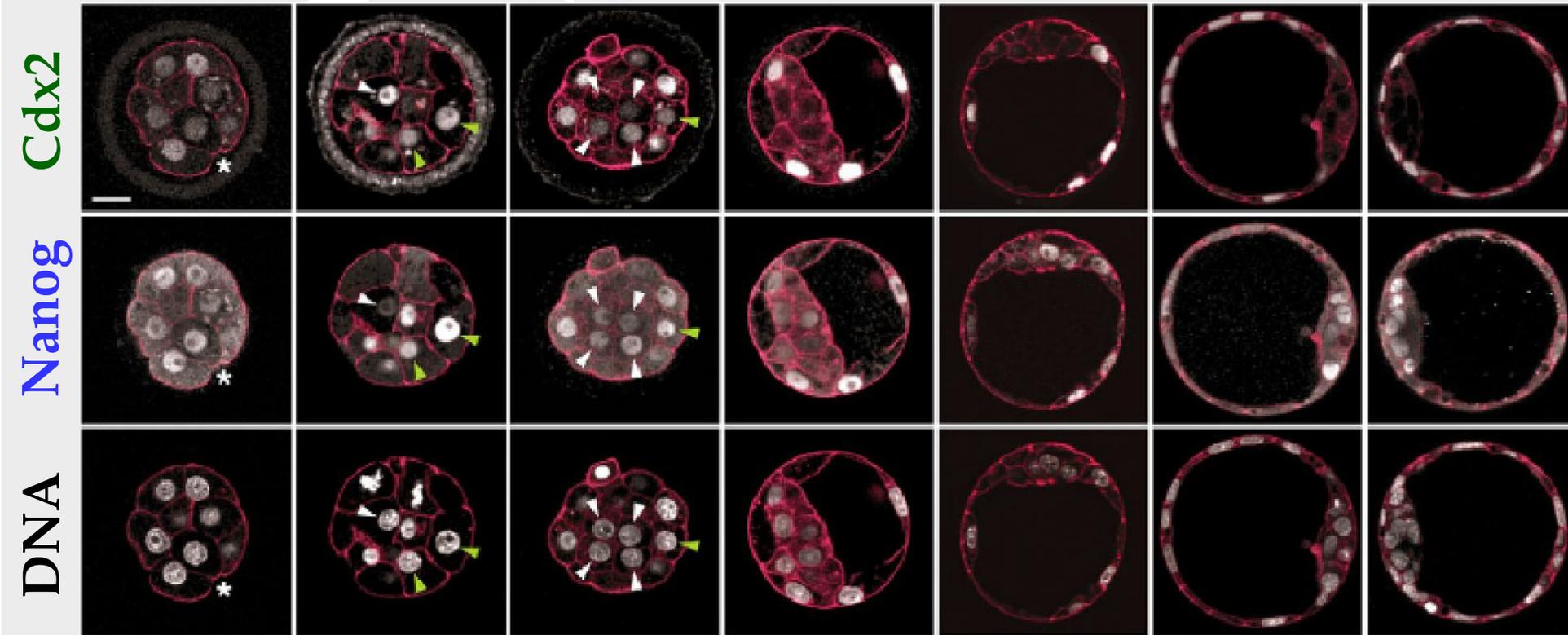
эпибласт
гипобласт
трофобласт



8 бластомеров → бластоциста (мышь)

8 бластомеров – **Nanog** и **Cdx2** не коррелируют

Бластоциста – **Nanog** и **Cdx2** антикоррелируют



E 3.5

E 4.5

эпибласт
гипобласт
трофобласт



Dietrich et al., 2007

Самоорганизация в развитии эмбриона

Усложнение через бифуркации



Условие – обратные связи



Бифуркация – область variability



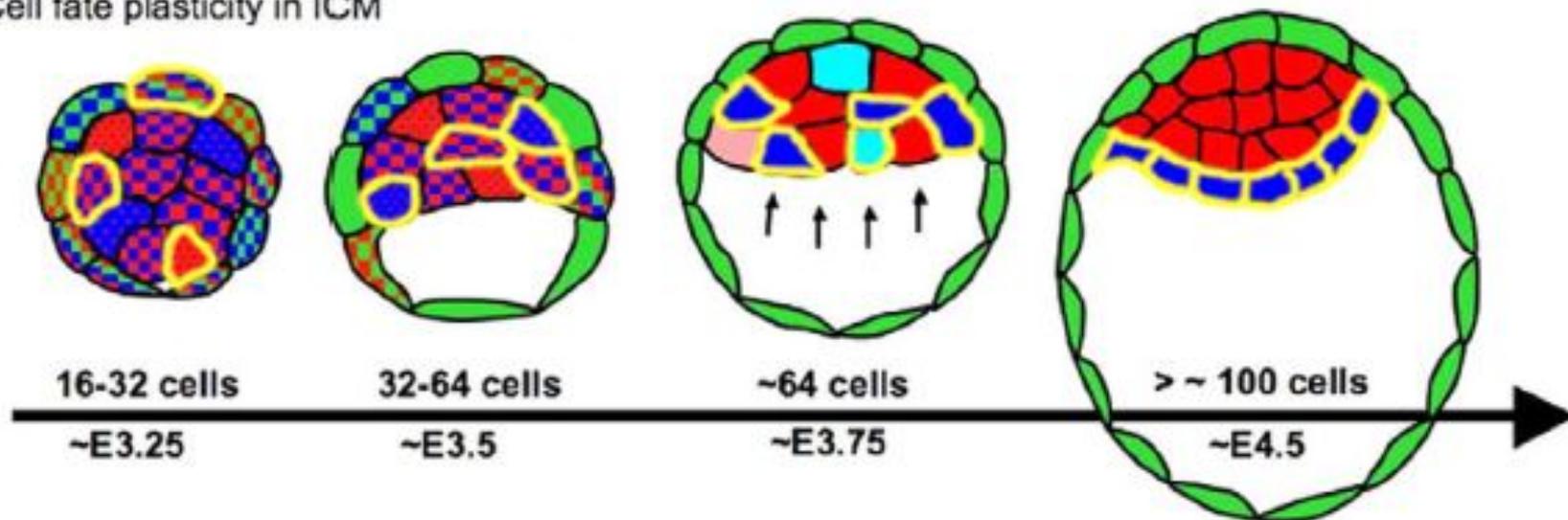
Порядок из хаоса

Постепенная детерминация паттернов экспрессии генов (мышь)

Plusa et al., 2008

Definitive specification to PrE or EPI

Cell fate plasticity in ICM



Cdx2

Cdx2 + Nanog

Cdx2 + Gata6

Cdx2 + Nanog + Gata6

Nanog

Nanog & low Gata6

low Nanog

Nanog & Gata6

Gata6

Gata6 & low Nanog

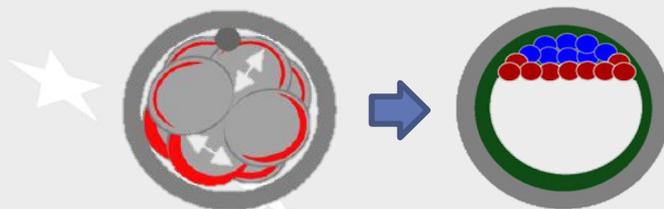
low Gata6

Pdgfr α

Порядок из хаоса

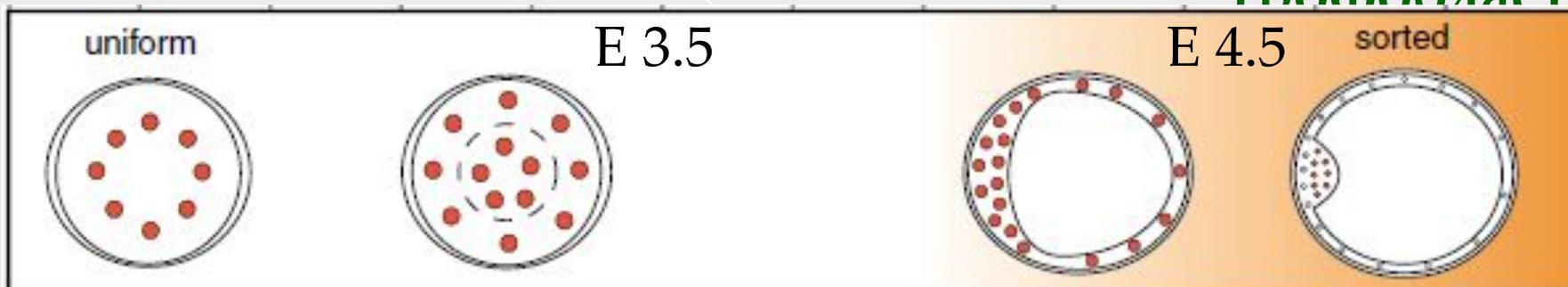
Периоды variability в экспрессии генов (мышь)

Dietrich et al., 2007

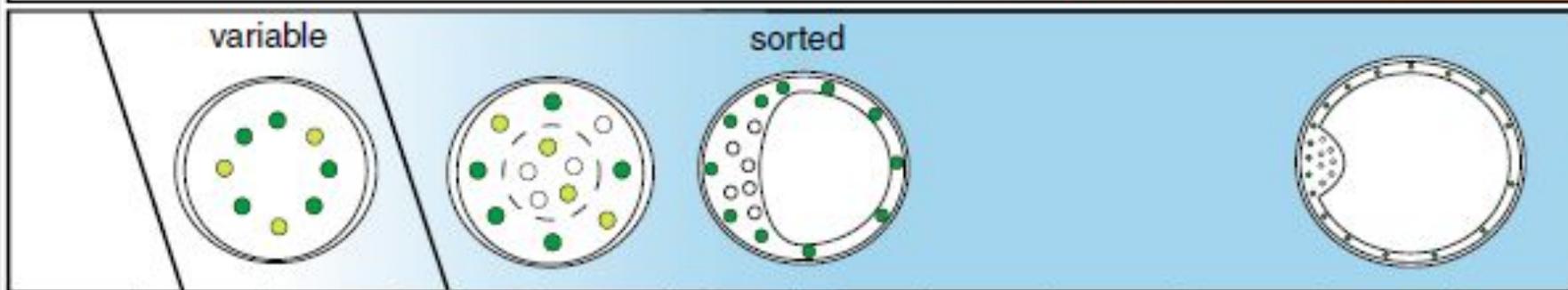


эпибласт
гипобласт
трофобласт

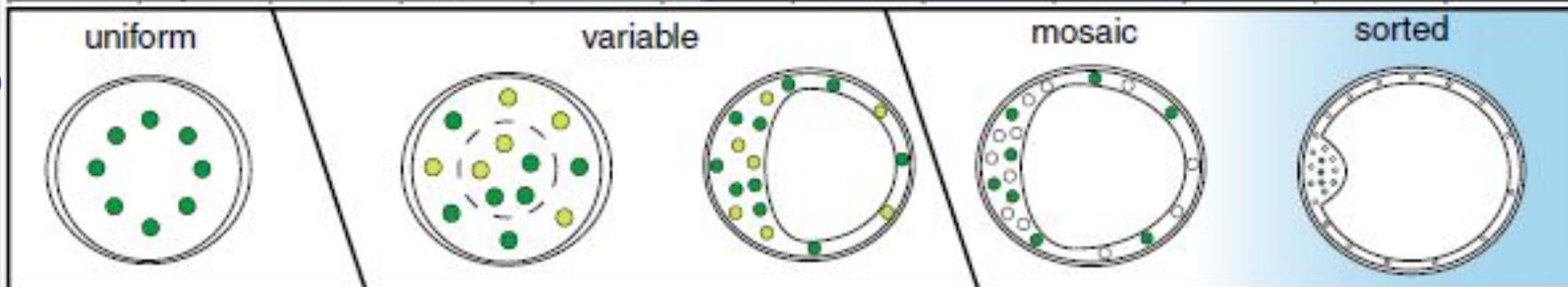
Oct4



Cdx2

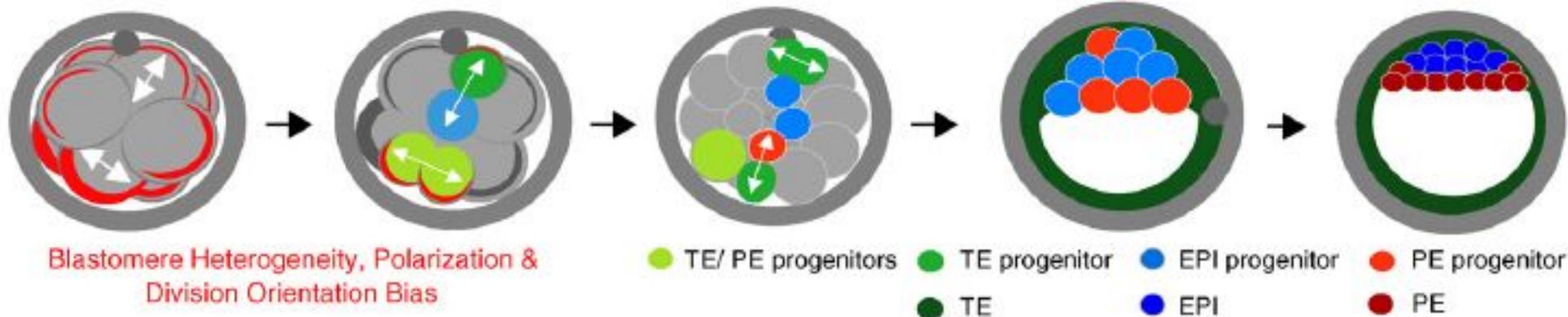


Nanog



Компактизация, разделение на ВКМ и ТЭ (млекопитающие):

- появление внешних и внутренних клеток
- детерминация клеток: появление популяций ***Oct4⁺Gata6⁻*** (эпибласт), ***Gata6⁺Oct4⁻*** (гипобласт), ***Cdx2⁺*** (трофобласт) – мышь

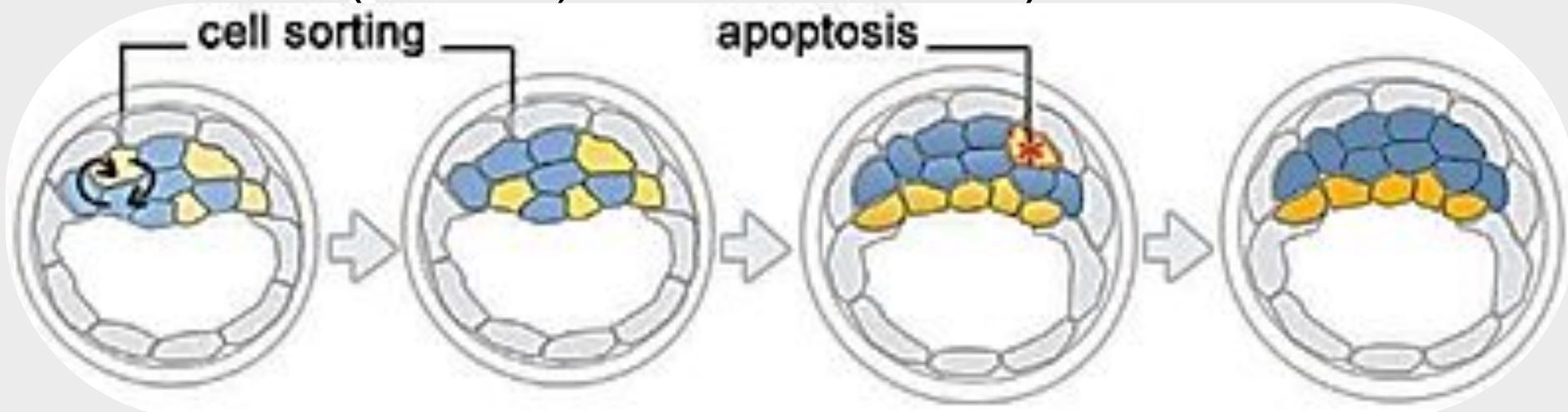


Разделение на эпибласт и гипобласт

Мышь: поздняя бластоциста (до имплантации)

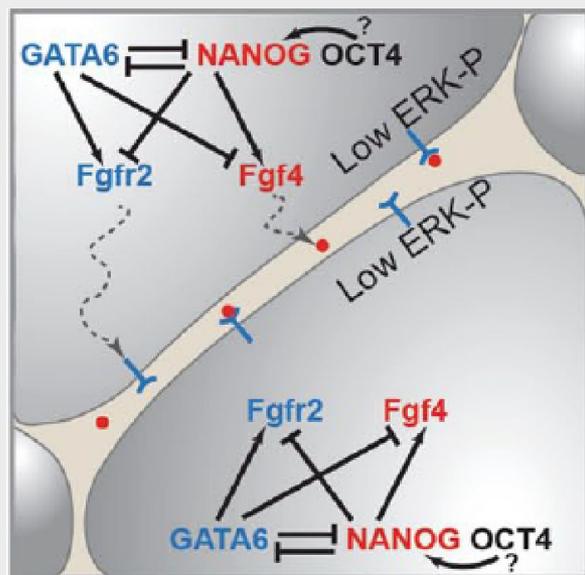
Механизмы сегрегации клеток EPI (эпибласт) и PE (первичная энтодерма = гипобласт):

- изменение экспрессии генов
- активные клеточные движения (актин, миозин)
- апоптоз (в ВКМ; в ТЭ почти нет)

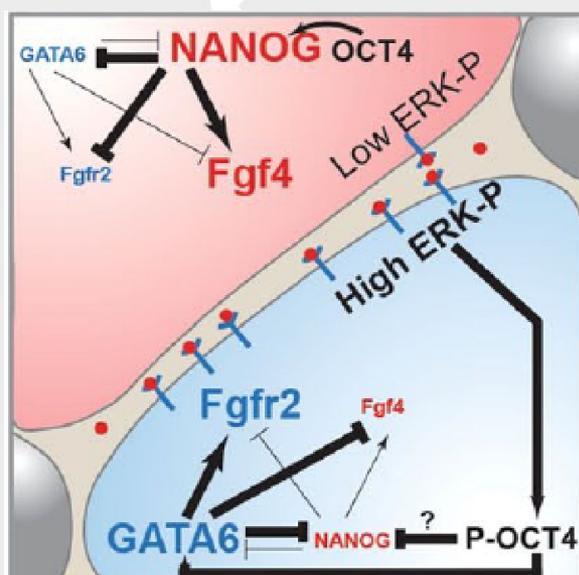


Механизмы разделения на эпибласт и гипобласт

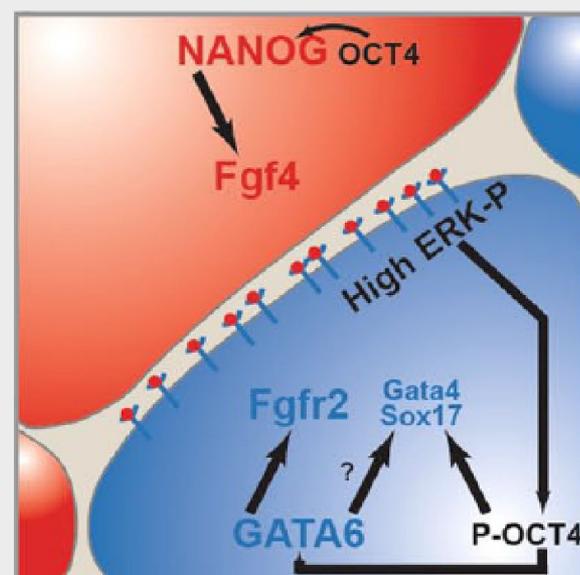
Мышь: поздняя бластоциста (до имплантации)



E 3,0

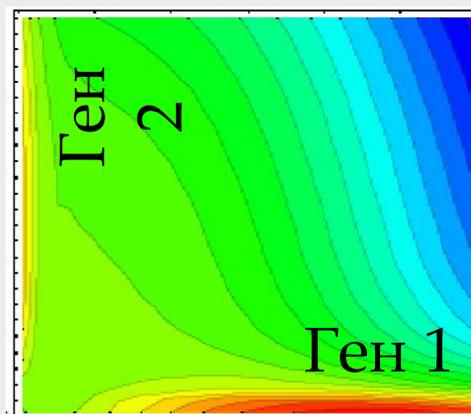
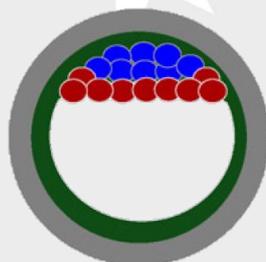


E 3,5



E 3,75

Эпибласт – Nanog
Гипобласт – Gata6



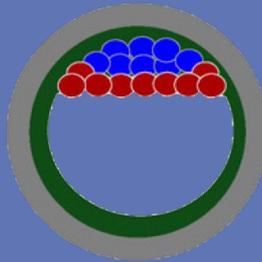
Человек

формирование бластоцисты

Морфология эмбриона



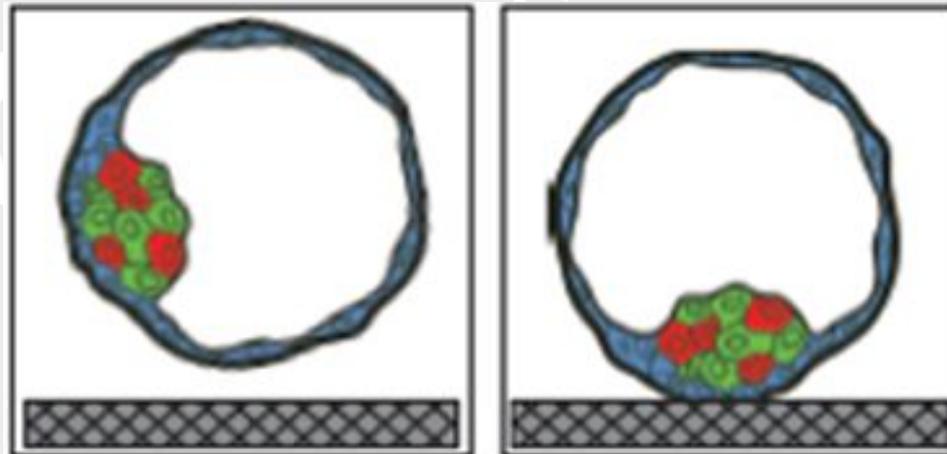
Экспрессия генов



Разделение на эпибласт и гипобласт

Человек:

- **Бластоциста** – паттерн экспрессии “salt and pepper”
- **Имплантация** – сегрегация на EPI (эпибласт) и PE (первичная энтодерма = гипобласт)



Самоорганизация в развитии эмбриона

Усложнение через бифуркации



Условие – обратные связи

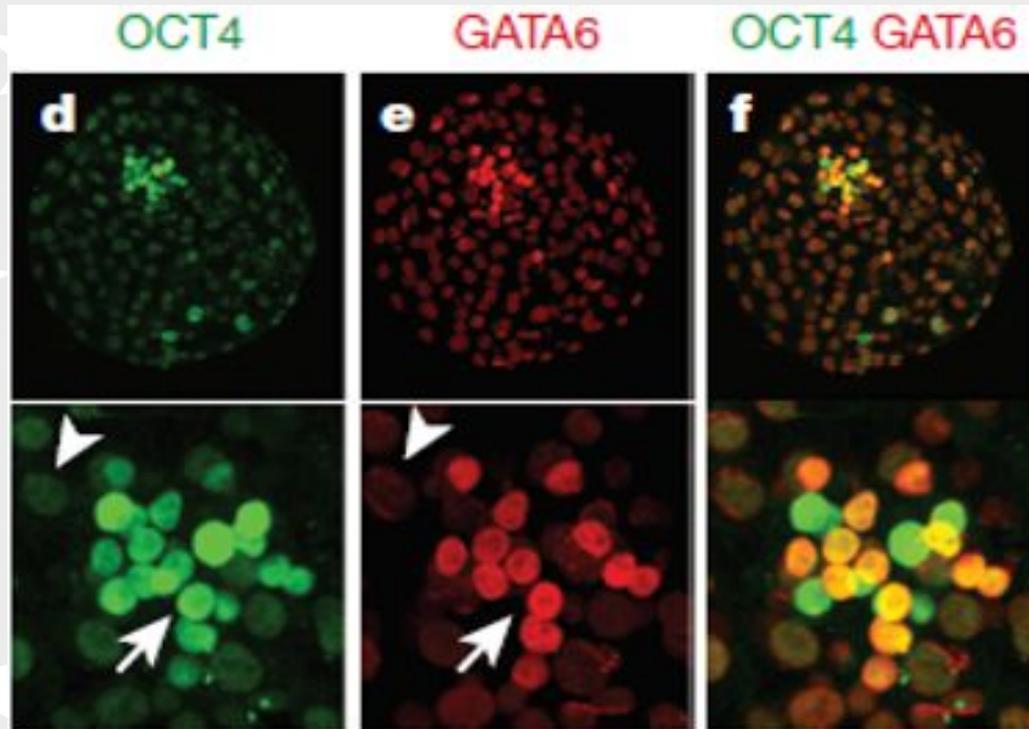


Бифуркация – область variability

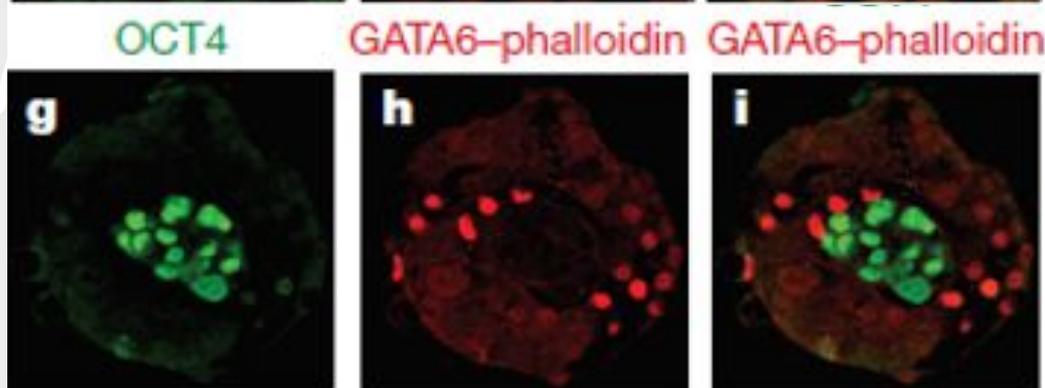


Сегрегация клеток ВКМ: эпибласт и гипобласт (человек)

DPF 6–7



DPF 8



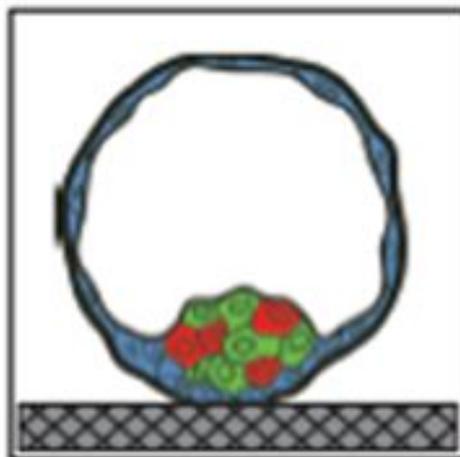
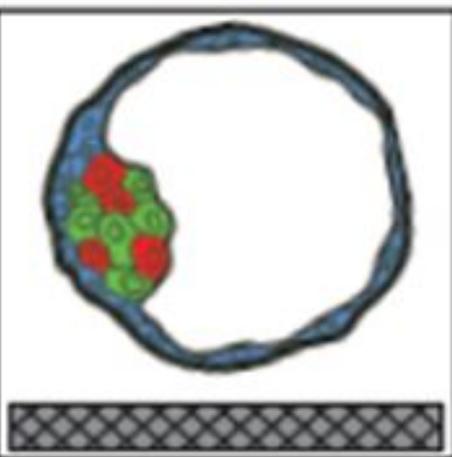
Морфогенез: образование полостей

Человек: в период имплантации

- Сегрегация клеток EPI (эпибласт) и PE (первичная энтодерма = гипобласт)
- Образование проамниотической полости, желточного мешка

Эпибласт

Проамнион



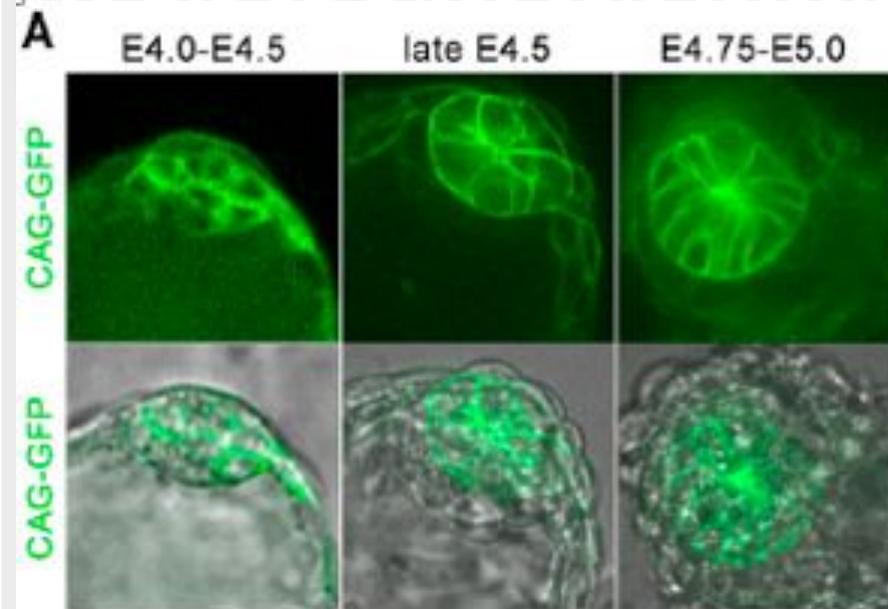
Формирование про-амниотической полости



Не связано с апоптозом

- **Образование базальной мембраны вокруг эпибласта**
- **Поляризация клеток эпибласта под действием базальной мембраны (через интегрины)**
- **Активное выстраивание клеток в розетки (актин, миозин)**
- **Образование плотных контактов (кадгерин)**
- **Расхождение апикальных мембран клеток – образование полости (появление заряженных молекул анти-адгезинов на апикальных мембранах клеток – подокаликсин)**

Формирование полостей – процесс пространственной самоорганизации

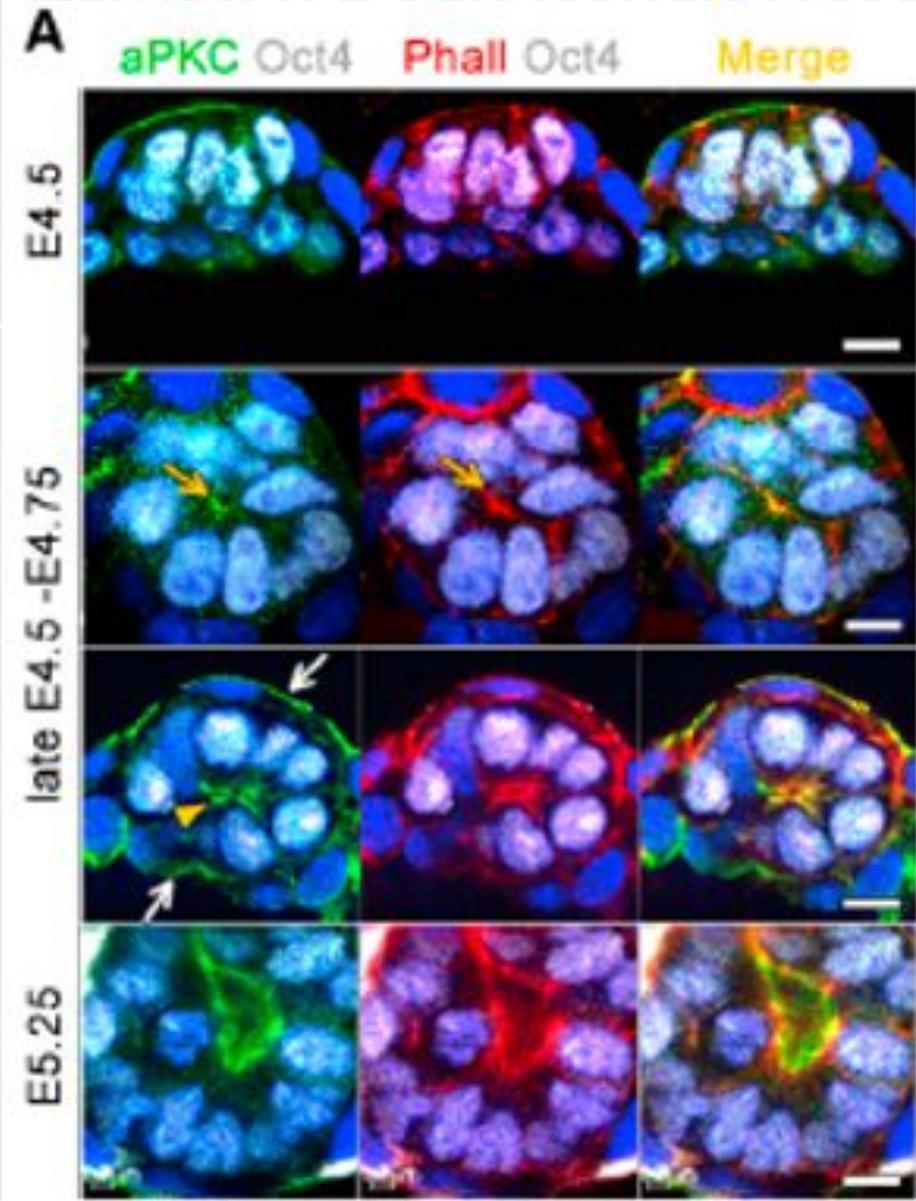


Актин

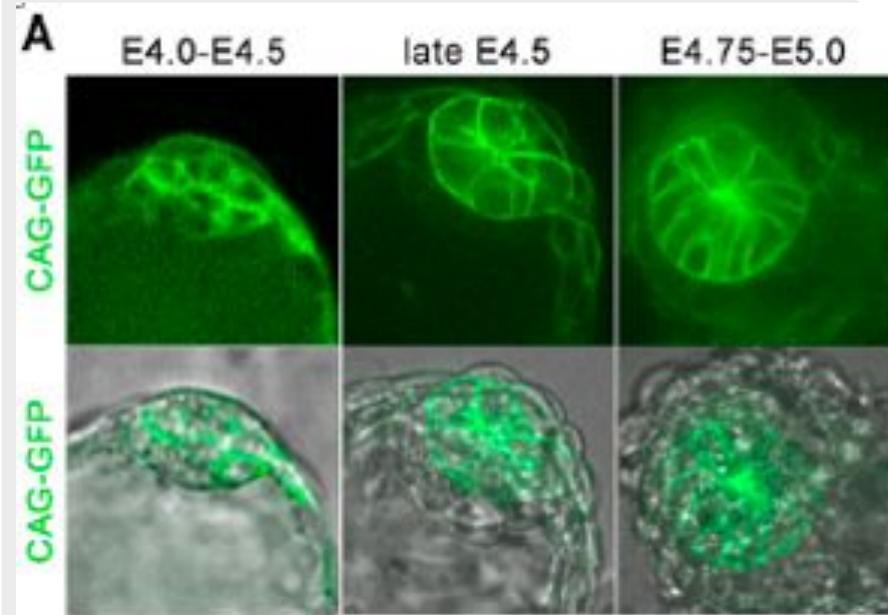
Oct4 – маркер клеток эпибласта

aPKC – маркер апикальных концов клеток

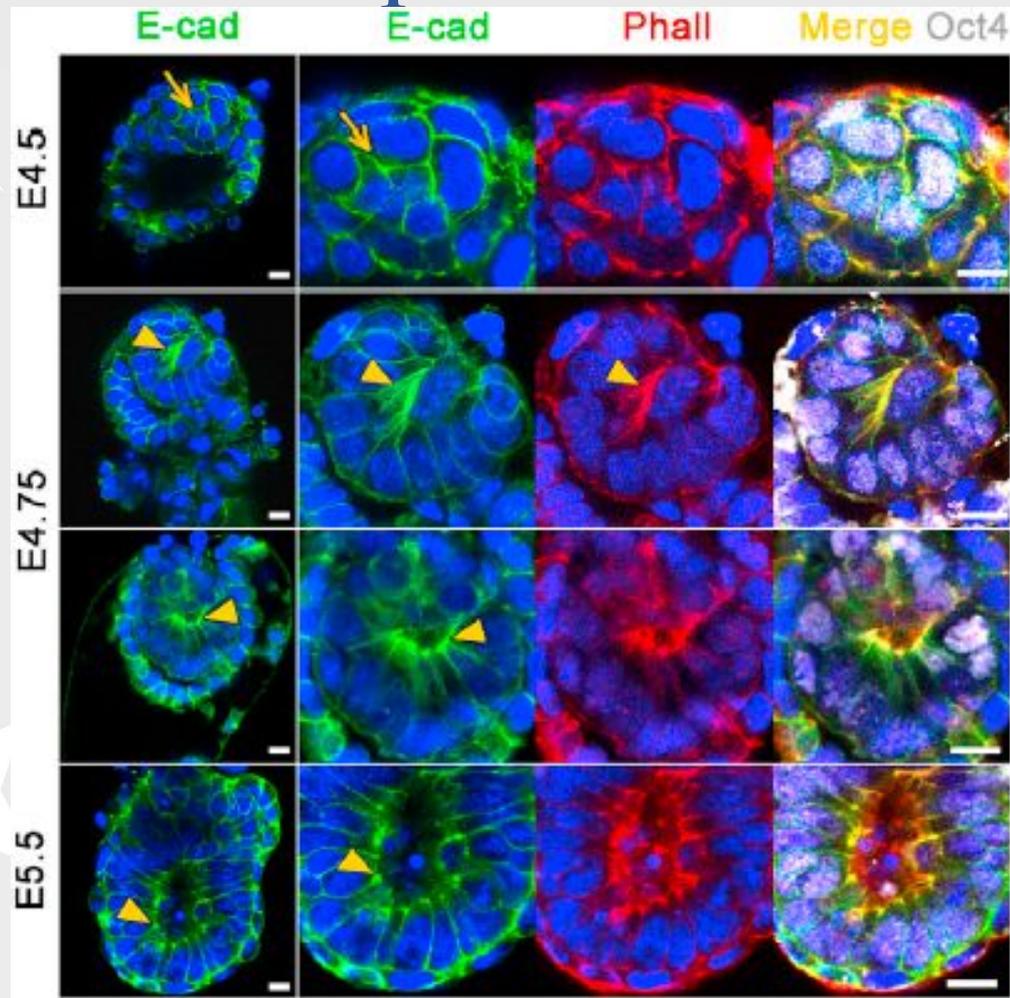
Phall – окраска на актин



Формирование полостей – процесс пространственной самоорганизации



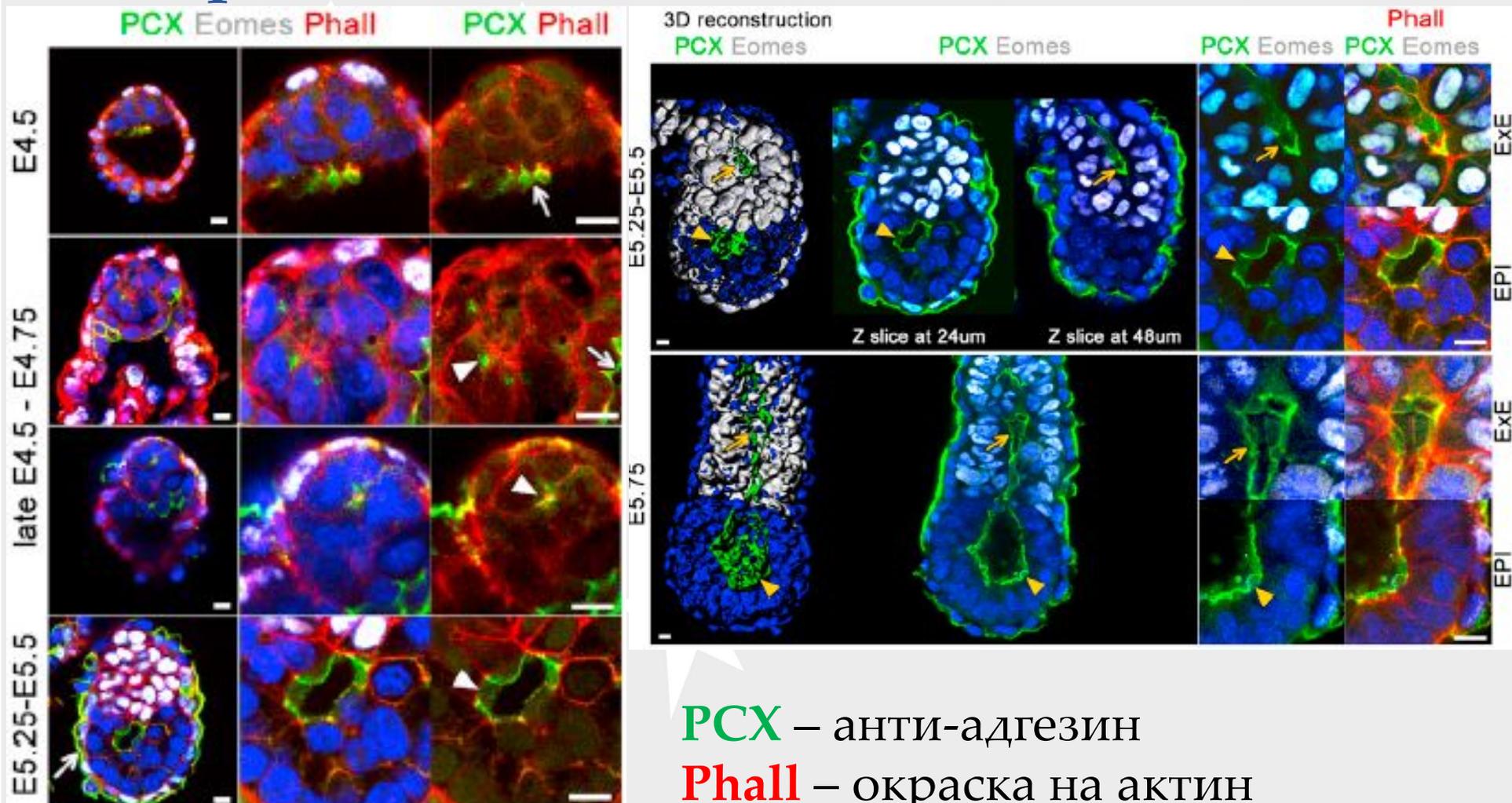
АКТИН



E-cad – ПЛОТНЫЕ КОНТАКТЫ

Phall – окраска на актин

Расхождение апикальных мембран – образование полости (мышь)



PCX – анти-адгезин

Phall – окраска на актин

Oct4 – маркер клеток эпибласта

Формирование про-амниотической полости

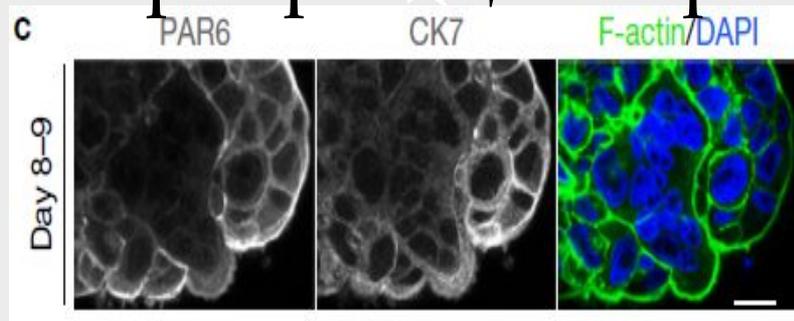


- **Образование базальной мембраны вокруг эпибласта**
- **Поляризация клеток эпибласта под действием базальной мембраны (через интегрины)**
- **Активное выстраивание клеток в розетки (актин, миозин)**
- **Образование плотных контактов (кадгерин)**
- **Расхождение апикальных мембран клеток – образование полости (появление заряженных молекул анти-адгезинов на апикальных мембранах клеток – подокаликсин)**

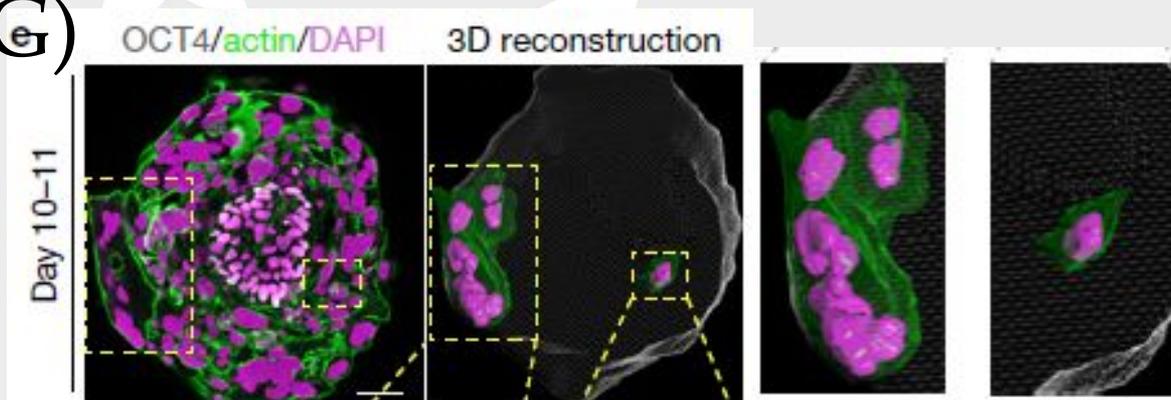
Не связано с апоптозом

Трофобласт (человек)

DRPF8—9. Поляризация клеток трофобласта, экспрессия маркеров цитотрофобласта (CK7)

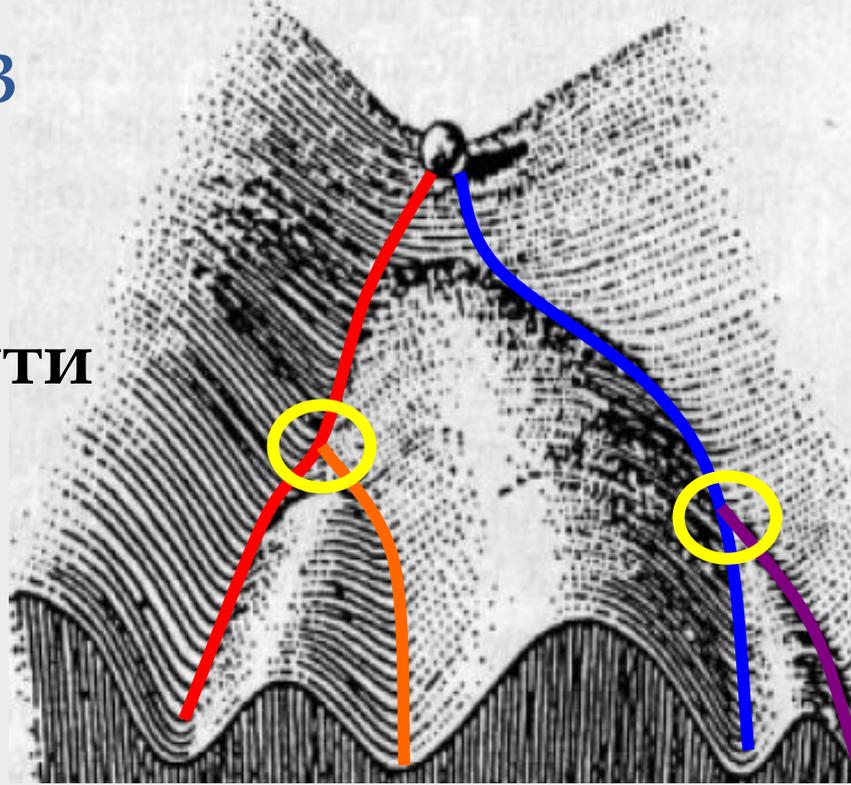
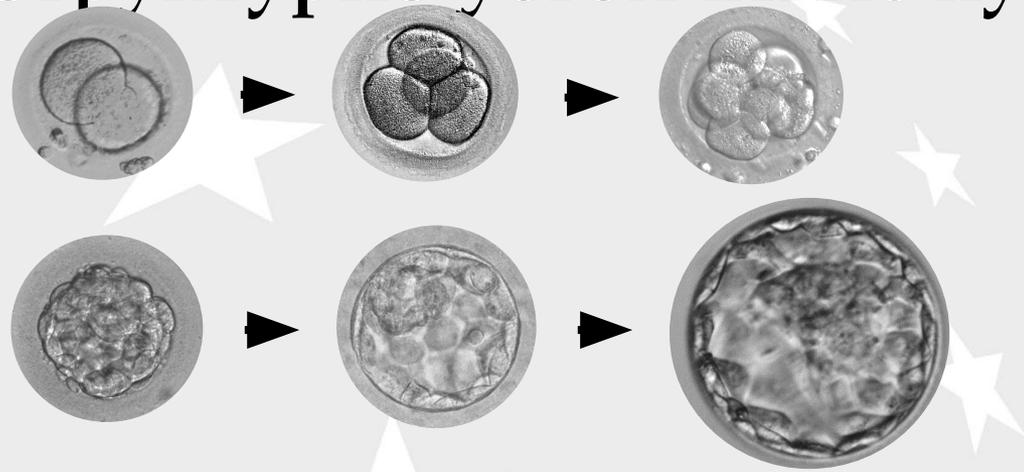


DRPF10—11. Появление многоядерных клеток, экспрессия маркеров синцитиотрофобласта (β -НСГ)

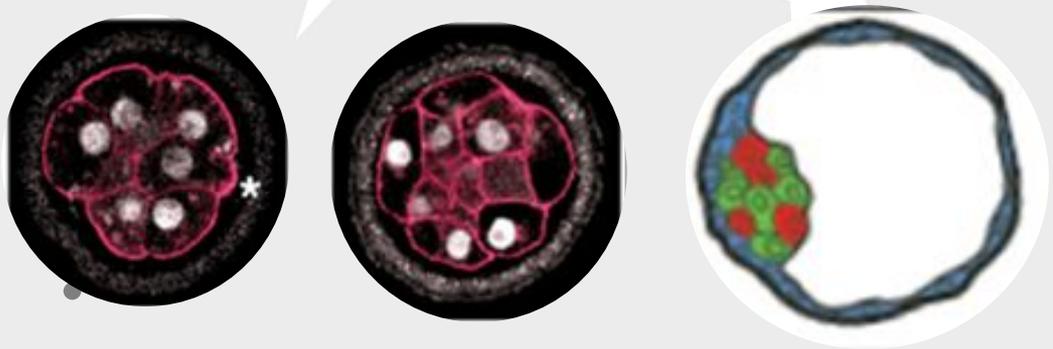


Два типа процессов в развитии эмбриона

Детерминированные – Структурно-устойчивые пути



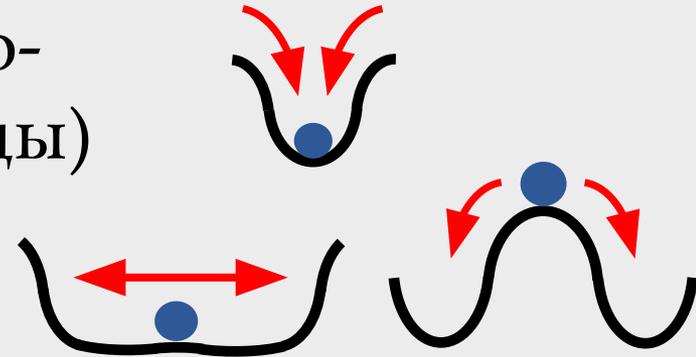
Стохастическая динамика – Периоды variability, эквифинальность



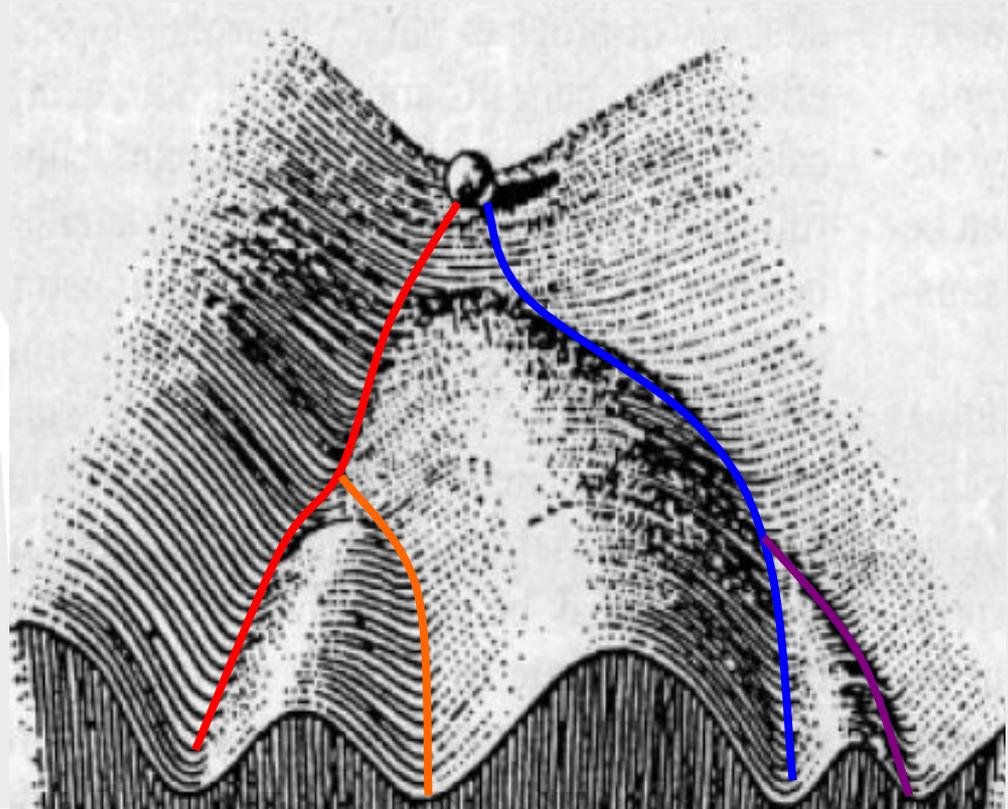
Двойная роль обратных связей:

Стабилизирующая – структурно-устойчивые пути развития (креоды)

Дестабилизирующая – области стохастической динамики



Konrad Waddington
(1905 – 1975)



Физика сегодняшнего дня освещает
менее половины нашего предмета...



...но серп растет



Спасибо за внимание