

Гены и свет: много лет спустя

А.О. Рувинский

Университет Новой Англии, Армидэйл, Новый Южный Уэльс, Австралия

Статья написана к 100-летию со дня рождения Д.К. Беляева и затрагивает его работы, посвященные влиянию фотопериодических условий на размножение и эмбриональное развитие млекопитающих. В качестве одной из моделей в этих исследованиях была использована грузинская белая мутация у лисиц (W^G). В контрольных условиях способность гомозигот по этой мутации успешно пройти имплантацию резко снижена. Экспериментальное удлинение светового дня для беременных самок из $W^G/w \times W^G/w$ скрещиваний ведет к значительному возрастанию частоты мутантных гомозигот в потомстве. В статье предпринята попытка анализа результатов этой работы в свете современных данных. Грузинская белая мутация, вероятно, обуславливает снижение экспрессии гена *KIT*. Рассмотрение молекулярных и клеточных взаимодействий с участием белка *KIT*, его лиганда *KITLG* и их влияния на развитие бластоцист указывает на возможность замедленного развития W^G/W^G бластоцист и, как следствие, опоздание к началу имплантации. Изменение фотопериодических условий может через стимулирование развития W^G/W^G гомозиготных бластоцист, замедление роста трофобласта у зрелых бластоцист, повышение готовности эндометрия и вероятную задержку начала имплантации создавать более благоприятные обстоятельства для успешной имплантации W^G/W^G бластоцист.

Ключевые слова: мутация; ген *KIT*; *KIT* лиганд; имплантация; фотопериод; *Vulpes vulpes*.

Genes and light: many years later

A.O. Ruvinsky

University of New England, Armidale, New South Wales, Australia

This paper commemorates centenary anniversary of Professor D.K. Belyaev and discusses his studies of photoperiodic changes on mammalian reproduction and embryonic development in the realm of modern data. Georgian white mutation (W^G) in silver-black foxes was used as a model for such investigations. Ability of W^G/W^G homozygotes in standard photoperiodic conditions to go successfully through the implantation process is sharply reduced. Experimental elongation of daily light period for pregnant females from $W^G/w \times W^G/w$ crosses led to a very significant increase of W^G/W^G homozygotes in the progeny. Georgian white mutation likely causes a low expression of *KIT* gene. Presented here considerations of *KIT* protein and its ligand *KITLG* molecular and cellular interactions suggest a possibility for slow development of W^G/W^G blastocysts; hence many such blastocysts might be late and miss an opportunity for successful implantation. The discussed experimental photoperiodic change might influence a number of processes including developmental acceleration of W^G/W^G blastocysts, slow down trophoblast outgrowth of almost mature blastocysts, promotion of endometrial readiness and possible delay of the implantation start. All these processes could create more supportive conditions for successful implantation of W^G/W^G blastocysts.

Key words: mutation, gene *KIT*; *KIT* ligand; implantation; photoperiod; *Vulpes vulpes*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Рувинский А.О. Гены и свет: много лет спустя. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(4):462-476. DOI 10.18699/VJ17.265

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ruvinsky A.O. Genes and light: many years later. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(4):462-476. DOI 10.18699/VJ17.265

УДК 575.164

Поступила в редакцию 20.12.2016 г.

Принята к публикации 10.02.2017 г.

© АВТОР, 2017

За третья века, прошедшие после смерти Дмитрия Константиновича Беляева, его идеи получили значительное распространение и широкое международное признание. Сегодня, когда отмечается 100-летие со дня рождения этого талантливого ученого и замечательного человека, желание рассмотреть работы Д.К. Беляева с позиции современных знаний особенно понятно. Именно такого рода анализ представлен в данной статье, которую я с глубоким почтением и благодарностью посвящаю его памяти.

Нет сомнений, что главным научным достижением Д.К. Беляева стало формулирование принципов, которые раскрывают суть процессов, происходящих в ходе доместикации животных. Это направление проанализировано в статьях исследователей, которые активно продолжали и развивали комплекс доместикационных работ, в первую очередь Л.Н. Трут. Однако кроме этих блестящих исследований существовали и другие направления, которым Дмитрий Константинович уделял внимание на протяжении многих лет. Среди них следует отметить работы по изучению влияния фотопериодических факторов на эмбриональное развитие млекопитающих. Мне повезло стать аспирантом Д.К. Беляева, когда один из таких проектов только начинался.

Речь идет об исследовании трех мутаций у серебристо-черных лисиц и влиянии модификаций фотопериода на эмбриональную смертность. В этой работе кроме Д.К. Беляева участвовала Л.Н. Трут, а также несколько сотрудников Сибирского отделения АН СССР, которым я искренне признателен. Первые результаты были опубликованы в 1973 г. в журнале «Генетика», а итоговая статья появилась в журнале американской генетической ассоциации «The Journal of Heredity» в 1975 г. Насколько мне известно, это была первая публикация советских генетиков в журнале с конца 1930-х годов. Спустя несколько лет подробное описание этого исследования было включено в известный учебник «Animal Genetics» (F.B. Hutt and B.A. Rusmusen. J. Willey & Sons, 1982. Second Edition. P. 242–245).

Изучение мутаций окраски меха у лисиц. Работы Д.К. Беляева с сотрудниками (1969–1975) и результаты недавних исследований

Предметом нашей работы были три доминантные мутации, вызывающие изменение окраски меха у серебристо-черных лисиц (рис. 1). Платиновая и беломордая мутации имеют весьма похожие характеристики, включая фенотипическое сходство и постимплантационную летальность гомозигот. У компаундов, несущих оба мутантных аллеля, комплементация не наблюдалась, и они также гибли в ходе эмбрионального развития. На основе обнаруженных фактов было сделано заключение об аллельности этих мутаций (Беляев и др., 1973а; Belyaev et al., 1975). Грузинская белая мутация фенотипически отличается от двух других, и многие гомозиготы гибнут до или во время имплантации. Компаунды, несущие один аллель грузинской белой, а другой – беломордой или платиновой мутаций, рождались, но отличались низкой постнатальной жизнеспособностью (рис. 2). Только некоторым из них удалось дожить до репродуктивного возраста. В анализирующем скрещивании таких компаундов отсутствовали

потомки дикого фенотипа и наблюдалось соотношение двух мутантных классов, не отличающееся от 1 : 1. Следовательно, грузинская белая мутация и платиновая и беломордая мутации расположены близко друг от друга на одной хромосоме.

Молекулярное картирование позволило установить, что грузинская белая мутация расположена на хромосоме 2, в районе, содержащем ген *KIT* (Kukekova et al., 2016). Несколько раньше было обнаружено, что платиновая мутация вызвана заменой нуклеотида в 17 экзоне гена *KIT* и приводит к появлению укороченного белка, ответственного за фенотипические эффекты этой мутации (Johnson et al., 2015, рис. 3). Платиновая и беломордая мутации были обозначены в исходной работе (Belyaev et al., 1975) как W^P и W , указывая на вероятную гомологию с ранее описанным у мышей геном W . Теперь, когда ген W идентифицирован как *KIT* сначала у мышей (Chabot et al., 1988), а затем и у других видов, согласно требованиям генетической номенклатуры эти мутации у лисиц следует обозначать как KIT^P и KIT^{Wf} . Грузинская белая мутация изначально была обозначена как W^G . Весьма вероятно, что она тоже является мутацией гена *KIT*, и если это будет экспериментально установлено, то ее следует обозначить как KIT^G .

Краткая характеристика гена *KIT* и кодируемого им белка KIT

Ген *KIT* несет информацию о белке, принадлежащем семейству тирозин протеинкиназных рецепторов, которые участвуют в передаче сигналов внутрь некоторых типов клеток. Через KIT белок (KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase) осуществляется стимуляция роста, размножения, жизнеспособности и миграции репродуктивных клеток, стволовых эмбриональных клеток крови, мастоцитов, интерстициальных клеток кишечника (interstitial Cajal cells – ICC) и меланоцитов (Bernstein et al., 1990; Reith et al., 1990; Sanders, Ward, 2006; da Silva et al., 2014). Именно это разнообразие клеточных типов, в которых экспрессируется *KIT*, создает плейотропные эффекты, столь характерные для обсуждаемых здесь мутаций у лисиц и многих других видов млекопитающих. KIT белок обычно связан с клеточной мембраной таким образом, что протяженный сегмент расположен вне клетки, а тирозин протеинкиназный домен – внутри клетки.

Важнейший процесс, приводящий KIT в функциональное состояние, – это связывание двух рядом расположенных KIT молекул с двумя молекулами KIT лиганда (KL, KITLG) – белка, также называемого стволовым клеточным фактором (stem cell factor – SCF). KITLG существует не только в форме, связанной с клеточной мембраной, но и как растворимый белок (Huang et al., 1992; Lu et al., 1992), что является результатом альтернативного сплайсинга. Экспериментально установлено, что KITLG связывается с KIT молекулами в области первых трех Ig-подобных сегментов экстраклеточного домена (рис. 3), запуская процесс димеризации (Lemmon et al., 1997), в котором существенную роль играет четвертый Ig-подобный сегмент (Blechman et al., 1995). Результатом такого связывания оказывается контакт двух молекул KITLG/KIT и формирование функционального димера. Нарушения в

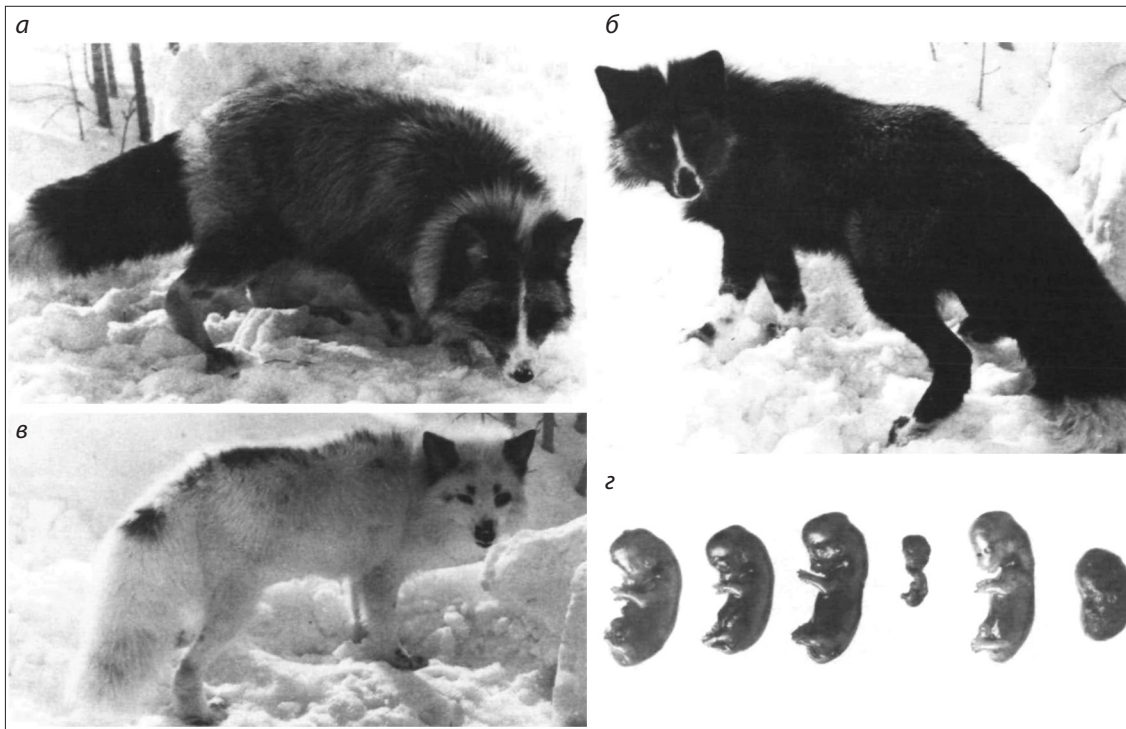


Рис. 1. Фенотипы лисиц и эмбрионов с мутациями в гене *W* (вероятно, *KIT* ген):

a – платиновая мутация (W^P/w); *б* – беломордая мутация (W/w); *в* – грузинская белая мутация (W^G/w); *з* – эмбрионы из скрещивания $W/w \times W/w$, 30-й день развития, видны два погибших эмбриона (Belyaev et al., 1975).



Рис. 2. Компаннды по грузинской белой и беломордой мутации W^G/W (слева), грузинской белой и платиновой мутации W^G/W^P (справа) (Belyaev et al., 1975).

строении и регуляции *KIT* гена и соответствующего белка могут приводить к существенным отклонениям в размножении и жизнеспособности некоторых типов клеток, а в определенных ситуациях – к канцерогенезу, поэтому *KIT* (*c-KIT*) попадает в категорию онкогенов (Yarden et al., 1987; Yuzawa et al., 2007).

Для многих видов млекопитающих установлено, что мутации *KIT* ведут к разнообразным формам депигментации. Мутации гена *KIT* часто влияют не только на фенотип, но и на жизнеспособность гомозигот. У собак,

близкого к лисицам вида, первая мутация гена *KIT* была обнаружена совсем недавно. Она расположена во втором экзоне и приводит к появлению сильно укороченной и, вероятно, нефункциональной формы *KIT* белка, ведущей к эмбриональной гибели гомозигот (Wong et al., 2013). Ген *KIT* у собак картирован на хромосоме 13 в районе, гомологичном соответствующему участку хромосомы 2 у лисиц.

Фенотип, очень похожий на грузинскую белую мутацию, описан у кроликов породы Checkered Giant с так называемой английской пятнистостью (рис. 4). Этот тип пятнистости тоже демонстрирует неполную доминантность, низкую жизнеспособность гомозигот в раннем постнатальном периоде, связанную с редуцированной экспрессией *KIT* в ИСС кишечника (рис. 5), что затрудняет перистальтику и, как следствие, ведет к развитию мегаколона (Fontanesi et al., 2014). Хотя твердо установлено, что изменение гена *KIT* у кроликов ответственно за формирование характерного фенотипа, молекулярная природа этой мутации пока неизвестна. Все до сих пор обнаруженные SNP (single nucleotide polymorphism), за исключением одного, являются синонимическими заменами, а единственная несинонимическая замена в 4 экзоне представляется авторам исследования маловероятной в качестве каузальной мутации (Fontanesi et al., 2014). Таким образом, остается невыясненным, какое именно структурное или функциональное изменение ведет к формированию пятнистости у кролика. Догадки о существовании мутации в 5'-регуляторной зоне гена *KIT* у Checkered Giant могут оказаться полезными для понимания грузинской белой мутации у лисиц.

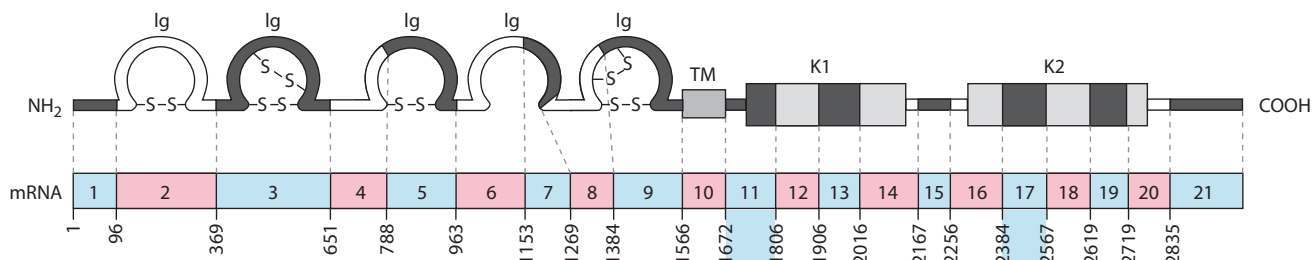


Рис. 3. мРНК с указанием границ экзонов гена *KIT* и соответствующий белок.

KIT белок имеет экстраклеточный сегмент (1–9-й экзоны), включающий в себя пять Ig-подобных повторов, трансмембранный сегмент ТМ (10-й экзон) и внутриклеточный домен с двумя киназными компонентами K1 и K2 (11–14-й и 16–20-й экзоны соответственно). Структура гена *KIT* у позвоночных консервативна. Платиновая мутация у лисиц обусловлена заменой первого нуклеотида в 17 экзоне, что вызывает аномальный сплайсинг и укороченный вариант белка (Johnson et al., 2015). Ig1–3 вступают в высокоаффинное связывание с *KIT* лигандом (*KITLG* или *SCF*), запуская процесс димеризации, в котором существенную роль играет сегмент Ig4.



Рис. 4. Кролик с английской пятнистостью, гетерозиготный по мутации, затрагивающей ген *KIT*, возможно регуляторную зону гена (Fontanesi et al., 2014).

Очевидно значительное фенотипическое сходство с грузинской белой окраской у лисиц.

KIT и другие белки в процессе оогенеза и имплантации

В рамках данной работы нас в первую очередь интересует информация, касающаяся функции гена *KIT* в развивающихся ооцитах, бластоцистах и во время имплантации. *KITLG/KIT* взаимодействия и эффекты довольно подробно изучены в оогенезе и фолликулогенезе (Hutt et al., 2006). В процессе роста ооцита функционирует механизм отрицательной обратной связи. Кроме *KITLG* и *KIT* этот механизм включает по крайней мере еще один компонент – *BMP15* (bone morphogenetic protein 15). *BMP15* активирует производство *KITLG*, который стимулирует формирование *KIT/KITLG*, ингибирующего в свою очередь *BMP15* (рис. 6) (Otsuka, Shimasaki, 2002; Hutt et al., 2006). Поскольку сигналы распространяются между гранулёзными клетками и ооцитом, имеет смысл говорить о существовании паракринного взаимодействия. Результатом его являются рост ооцита, размножение гранулёзных

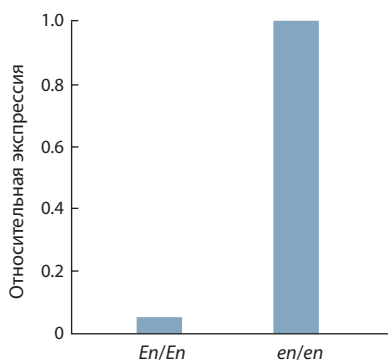


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии гена *KIT* в проксимальном отделе толстого кишечника у кролика с английской пятнистостью.

En/En гомозиготы характеризуются пониженной жизнеспособностью в связи с развитием у них мегаколона, похожего на патологию, наблюдаемую у гомозигот по грузинской белой мутации у лисиц (Fontanesi et al., 2014).

клеток и, как следствие, активация либо ингибирование множества других функций. Несколько дополнительных молекулярных факторов могут участвовать в сложных регуляторных контурах с обратной связью, влияющих на передачу сигналов через *KITLG/KIT*. Среди них *GDF9* (growth differentiation factor 9), способный ингибировать экспрессию *KITLG* (Tuck et al., 2015).

Ооциты, достигшие достаточного размера, у большинства видов млекопитающих возобновляют первое мейотическое деление (MI) в ответ на выброс лютеинизирующего гормона (LH) и к моменту овуляции достигают МП. Паракринная активность *KITLG*, производимого в гранулёзных клетках, и *KIT* в ооцитах содействует возобновлению мейотического процесса и выделению первого полярного тельца в преовуляторных ооцитах (Ye et al., 2009). Не так обстоит дело у изученных видов *Canidae*, например собак, лисиц и песцов. У них процессы созревания ооцита идут медленнее, и MI происходит после овуляции (Leung, Adashi, 2004). У собак к моменту овуляции ооциты оказываются в незрелом состоянии, и выделение первого полярного тельца завершается не раньше чем через два-три дня после овуляции (Rijnberk, Kooistra, 2010; England, 2012). Следует учитывать динамику экспрессии *KITLG*

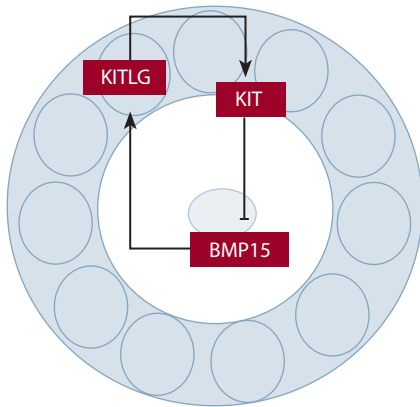


Рис. 6. KITLG/KIT/BMP15 регуляторный контур с отрицательной обратной связью.

Ооцитарный BMP15 активирует в гранулёзных клетках продукцию белка KITLG, который в свою очередь, будучи лигандом KIT, действует через расположенный на мембране ооцита KIT как фактор, ингибирующий синтез BMP15 (Hutt et al., 2006).

и *KIT*, которая может оказывать сильное и меняющееся влияние на разных стадиях фолликулогенеза и в последующих процессах развития (Hutt et al., 2006). KITLG также оказывает воздействие на созревание ооцита через NPPC (natriuretic peptide precursor C), а ооцит регулирует синтез KITLG мРНК в клетках кумулюса (de Lima et al., 2016).

У лисиц (*Vulpes vulpes*) во время овуляции ооциты еще пребывают в профазе первого мейотического деления – MI (Pearson, Enders, 1943). Созревание ооцита, включая прохождение MI, у лисиц завершается в пределах 24–48 ч после овуляции. На это указывает высокий уровень успешных оплодотворений, если скрещивания осуществляются именно в этом временном интервале (Farstad, 1998). Другая особенность собак и, вероятно, лисиц состоит в неодновременной овуляции созревающих яйцеклеток. В результате процесс овуляции занимает от 24 до 96 ч (Linde Forsberg, Reynaud, 2012). Это может означать, что некоторые ооциты оплодотворяются и начинают развитие на двое-трое суток раньше других. Время, необходимое для прохождения яйцеводов, передвижения вдоль рогов матки и формирования бластоцист, а также для подготовки к имплантации, составляет у лисиц примерно 14–15 дней. Практически ничего не известно об изменчивости ранних эмбрионов у лисиц непосредственно перед имплантацией.

Известно однако, что *KIT* функционирует в ходе периимплантационного периода. С помощью siРНК, способной выключать *KIT*, было установлено, что такое воздействие значительно замедляет раннее эмбриональное развитие от двухклеточной стадии до поздних бластоцист (Lim et al., 2010). Наиболее вероятно, что KITLG/KIT оказывает влияние на размножение определенных клеток развивающейся бластоцисты. Возможно, главной мишенью в этом случае являются гигантские клетки трофобласта, которые в процессе имплантации располагаются непосредственно в зоне контакта эмбриона с эндометрием матки и участвуют в формировании плаценты. Поверхность трофобласта резко увеличивается при добавлении KITLG в среду для культивирования эмбрионов (рис. 7), также KITLG в

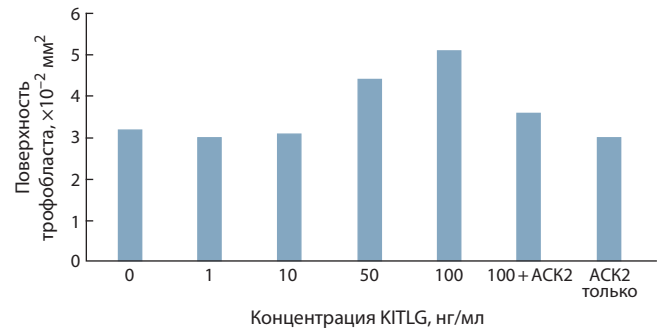


Рис. 7. Возможное влияние KITLG и его рецептора KIT на успех имплантации бластоцист у мыши.

Площадь поверхности трофобласта зависит от концентрации KITLG (0–100 нг/мл) в среде для культивирования эмбрионов и существенна для процесса имплантации ACK2 (анти-с-KIT антитела 10 мкг/мл) (Mitsunari et al., 1999).

целом интенсифицирует развитие бластоцист (Taniguchi et al., 2004) и снижает действие негативных факторов (Glabowski, 2005). KITLG, так же как и KIT РНК, обнаружены в мастоцитах эндометрия. Экспериментальные факты поддерживают гипотезу о том, что KITLG, производимый клетками эндометрия и имплантирующегося эмбриона, может, активируя KIT, оказывать паракринное и/или аутокринное воздействие на имплантацию благодаря стимулированию роста трофобласта (Arcesi et al., 1992; Kauma et al., 1996; Mitsunari et al., 1999).

Существенное влияние *KITLG* на плодовитость, а следовательно, и успешность протекания имплантации было недавно продемонстрировано у молочных коз породы Гуань-Жонг. Оказалось, что некий гаплотип, сформированный из трех тесно сцепленных SNP в 3'-UTR районе *KITLG*, повышает плодовитость самок носителей с 1.7 до 2.0, т.е. примерно на 15 % (An et al., 2016). Авторы полагают, что эти SNPs расположены в зоне, являющейся мишенью для двух микроРНК (*chi-miR-204-5p* и *chi-miR-211*). МикроРНК, как известно, модулируют посттранскрипционную активность и оказывают влияние на разнообразные биологические процессы.

Важность мастоцитов в ходе имплантации была убедительно продемонстрирована их пересадкой от мышей дикого генотипа к *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* гомозиготам, которые дефицитны по мастоцитам и плодовитость которых существенно снижена. После пересадки мастоцитов от донора с диким генотипом в полость матки мутантных гомозигот плодовитость последних приблизилась к нормальной (Woidacki et al., 2013). *Kit^{W-sh}* мутация представляет собой инверсию в 5'-регуляторной области гена *Kit* (Nagle et al., 1995). Представляется вероятным, что эта инверсия резко снижает активность KITLG/KIT комплекса, особенно у гомозиготных самок, сокращая их плодовитость на 50 % от нормальной. У гомозигот по *Kit^{W-sh}* мутации количество KIT молекул ниже необходимого вследствие нарушенной регуляции мутантного гена, и поэтому процесс имплантации протекает менее успешно. Тем не менее трансплантированные в эндометрий гомозиготных *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* самок немутантные мастоциты нормализовали протекание имплантации и восстанавливали стандартную плодовитость,

что крайне маловероятно без производства достаточного количества KIT (Woidacki et al., 2013). Эти эксперименты наглядно показали одну из возможностей коррекции дефицита синтеза KIT.

Как говорилось выше, платиновая мутация у лисиц приводит к появлению укороченной формы KIT, и поэтому димеры у гомозиготных эмбрионов тоже укорочены. Это обстоятельство не мешает гомозиготам W^P/W^P успешно преодолевать имплантационный барьер (Belyaev et al., 1975). Тем не менее все такие гомозиготные эмбрионы (W^P/W^P и W/W) погибают после имплантации, но до 30-го дня эмбрионального развития, когда KITLG/KIT сигнальная трансдукция оказывается необходимой для обеспечения неких жизненно важных морфогенетических процессов.

Участвуя в передаче сигналов внутри клетки, KIT взаимодействует со многими молекулярными процессами в зависимости от типа клеток и регуляторных обстоятельств. Такой широкий диапазон взаимодействий возможен благодаря наличию многочисленных функциональных сайтов в киназном домене (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa:3815). Среди них два фактора – FGF (fibroblast growth factor) и LIF (leukemia inhibitory factor), оказывающих влияние на активность KITLG/KIT, заслуживают специального упоминания. Необходимо отметить, что резкий пик активности LIF приходится именно на имплантацию (Elvin et al., 1999). Активация сигнальной трансдукции через GDF9 и BMP15 в конечном счете позитивно влияет на пре- и постимплантационное развитие эмбрионов, как было установлено при добавлении этих ростовых факторов в среду для культивирования эмбрионов, где произошло дозревание ооцитов (Gilchrist et al., 2008).

Эмбриональные и материнские сигналы играют важную роль в преобразовании эндометрия при подготовке и в процессе имплантации. Среди сигналов, исходящих от эмбриона, особое значение имеют hCG (гонадотропин хориона) и IL1 β (интерлейкин 1 β), где hCG модулирует рецептивность клеток стромы и эпителия эндометрия к IL1 β во время имплантации и ангиогенеза (Bourdieu et al., 2012). IL1 β является одним из ранних и существенных сигналов, исходящих от бластоцисты и содействующих ее собственной имплантации и последующему развитию (Bourdieu et al., 2013). В контексте этой статьи приобретают значение следующие факты. Известно, что KIT имеет критическое значение в дифференцировке, размножении, и выделении цитокининов мастоцитами. Кроме того обнаружено, что KIT служит регулятором рецептора интерлейкина (IL-1RI) в мастоцитах (Drube et al., 2012), так же как KITLG/KIT влияет на рост мастоцитов стимулированных IL1 α (Kameyoshi et al., 2000). Не исключено, что дополнительное изучение упомянутых генов и связанных с ними клеточных процессов может оказаться полезным для понимания рассматриваемых в этой статье функциональных отклонений, вызываемых мутациями у лисиц.

Если связь платиновой окраски у лисиц с заменой нуклеотида в гене *KIT* не вызывает сомнений, то относительно грузинской белой окраски известно лишь то, что каузальная мутация расположена в районе гена *KIT*. Вполне возможно, что она действительно вызвана мутацией *KIT*. В пользу этого свидетельствует не только характерный для

некоторых *KIT* мутаций фенотип, но и особенности постнатальной смертности гомозигот (Беляев и др., 1973б). Однако окончательный вывод может быть сделан только после определения молекулярной природы этой мутации. Недавний пример с White Spotting у мышей показал, что периимплантационная летальность гомозигот, которую изначально связывали с мутацией гена *Kit*, в действительности оказалась результатом изменения в расположенном рядом гене *Exoc1* (Mizuno et al., 2015). По этой причине имеет смысл рассмотреть ближайшее окружение *KIT*, если каузальная мутация в этом гене, включая его регуляторные области, не будет обнаружена.

Влияние фотопериодических модификаций на эмбриональную жизнеспособность гомо- и гетерозигот по грузинской белой мутации

Мутации гена *KIT* у разных видов демонстрируют широкое разнообразие фенотипов у гомо- и гетерозигот, включая эмбриональную смертность до имплантации, после имплантации и в постнатальный период, так же как различную степень жизнеспособности. Грузинская белая мутация вызывает дополнительный интерес в связи с тем, что обладает двумя фазами летальности: в доимплантационный и постнатальный период. Первая из них может быть преодолена с помощью удлинения светового дня, поэтому ее следует определить как условную летальность или сниженную жизнеспособность (Беляев и др., 1973б). В отличие от грузинской белой мутации, изменение фотопериодических условий не оказало никакого влияния на жизнеспособность гомозигот по беломордой и платиновой мутации.

За многие годы с момента обнаружения грузинской белой мутации и до начала работ Беляева с сотрудниками в 1969 г. в известных нам скрещиваниях гетерозигот соотношение потомков с мутантным и диким фенотипом не отличалось от 2 : 1. Мутантные гомозиготы W^G/W^G ранее не были описаны, и предположение о их эмбриональной смертности представлялось наиболее вероятным. Неожиданное появление редких белых щенков в скрещиваниях гетерозигот при значительном расширении экспериментов, а также гибель всех таких щенков в первые недели и месяцы после рождения поставили дополнительные вопросы. Только одна предположительно гомозиготная W^G/W^G белая самка достигла репродуктивного возраста (рис. 8). Все ее 11 потомков от анализирующего скрещивания оказались гетерозиготами.

Последовавшее эмбриологическое исследование установило, что в обычных условиях многие гомозиготы W^G/W^G не преодолевали имплантационный барьер, и лишь некоторое количество оказалось способным пройти эмбриональное развитие полностью (Беляев и др., 1973б). Исходя из ранее обнаруженного позитивного влияния светового фактора на доимплантационную смертность у млекопитающих (Беляев и др., 1963), было изучено влияние удлиненного светового дня на эмбриональную жизнеспособность гетеро- и гомозигот по грузинской белой мутации. Эта работа показала, что удлинение светового дня для беременных гетерозиготных самок достоверно повышает количество гомозигот W^G/W^G , успешно проходящих имплантацию и последующие этапы

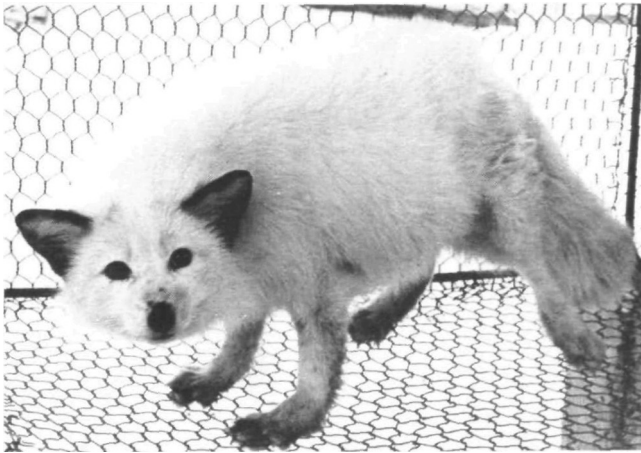


Рис. 8. Самка, гомозиготная по грузинской белой мутации, W^G/W^G (Belyaev et al., 1975).

эмбрионального развития. Параллельно с возрастанием частоты W^G/W^G уменьшается доля W^G/w (рис. 9, а), что было интерпретировано как конкуренция эмбрионов с разными генотипами (Belyaev et al., 1975). Выяснилось также, что повышение плодовитости самок, сильно коррелирующей с количеством желтых тел (corpora lutea), тоже ведет к росту числа рожденных мутантных гомозигот и уменьшению количества гетерозигот (см. рис. 9, б). Таким образом, удлинение светового дня и повышенная плодовитость самок приводят к одинаковому результату. В качестве вероятного объяснения этого интригующего феномена рассматривалось изменение гормонального баланса и повышение уровня прогестерона. Известно, что готовность эндометрия к имплантации может быть искусственно модулирована введением эстрадиола и прогестерона, без прочих воздействий. Степень синхронизации между эмбрионом и эндометрием определяет вероятность успешной имплантации и может быть стимулирована своевременной подачей прогестерона (Paulson, 2011).

Спустя долгое время после работ Д.К. Беляева с сотрудниками появились исследования, приоткрывающие новые аспекты влияния гормонов на имплантацию. Например, экспрессия гена *NDRG4* (N-myc down-regulated gene 4, tumor suppressor), влияющего на ангиогенез, динамично регулируется эстрогенами и прогестероном, существенно возрастая в ходе имплантации. В местах имплантации экспрессия *NDRG4* значительно выше, чем на промежуточных участках. Эстрогены индуцируют экспрессию *NDRG4*, что может вести к задержке имплантации (Yang et al., 2016). В этом можно усмотреть механизм формирования некоего баланса интересов между эмбрионом и матерью, который препятствует чрезмерной инвазии бластоцисты и подавляет слишком интенсивную иммунную защиту эндометрия.

Циркадные ритмы и фотопериодические изменения

Эволюция большинства видов проходила в условиях регулярной смены дневной и ночной фаз. Следствием таких воздействий стало формирование сложной циркадной

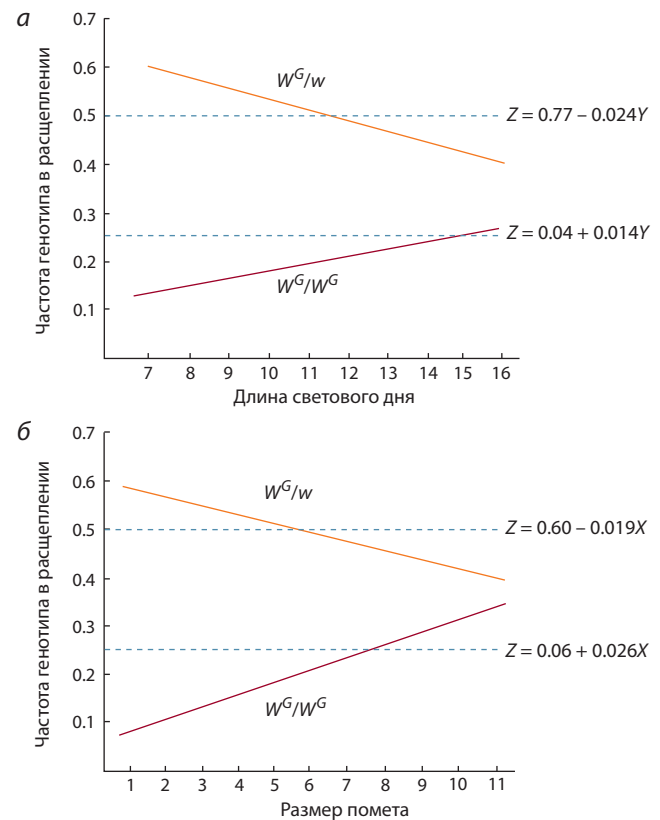


Рис. 9. Изменения частот гомозигот (W^G/W^G) и гетерозигот (W^G/w) по грузинской белой мутации в скрещиваниях $W^G/w \times W^G/w$ в зависимости от длины светового дня (а) и размера (численности) помета (б).

Штриховые линии показывают менделевские ожидания (Belyaev et al., 1975).

системы, состоящей у млекопитающих из центрального регулятора, находящегося в супрахиазматическом ядре (СХЯ) гипоталамуса, и локальных осцилляторов/часов, расположенных во многих клетках тела и обладающих значительной автономностью. СХЯ постоянно адаптируется к сезонно меняющемуся фотопериоду (соотношению светлого и темного времени суток) и синхронизирует периферические часы, используя многочисленные стимулы.

Подстройка ритма репродуктивной активности у самок млекопитающих к меняющимся условиям зависит от многих факторов, два из которых имеют особое значение: существование эстрогенной системы с отрицательной обратной связью, сопряженной с созреванием ооцитов и последующими стадиями репродуктивного процесса; функционирование центральных циркадных часов, указывающих на время суток (фотопериод), которые оказывают влияние на периферические циркадные часы, локализованные в разных компонентах репродуктивной системы. Среди таких компонент следует отметить так называемые кисспептинные нейроны, способные интегрировать стимуляторные эстрадиоловые сигналы и суточные вазопрессинергические сигналы (Simonneaux, Vahougne, 2015). Полученные за последнее десятилетие результаты указывают на разнообразие и важность функций гена *KISS1* (metastasis-suppressor KiSS-1), который вместе со своим рецептором *KISS1R* активно участвует во многих

процессах гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Несколько кисспептинов, кодируемых геном *KISS1*, – результат альтернативного сплайсинга, альтернативной транскрипции и эпигенетических модификаций. Представление о том, как формируется многообразие кисспептинов и как они обеспечивают тонкую подстройку многих процессов, связанных с развитием и функционированием репродуктивной системы, возникает в настоящее время (Semaan, Kauffman, 2013; Castellano et al., 2014). Вероятная роль *KISS1/KISS1R* в эмбриональном развитии и имплантации в зависимости от фотопериодических условий рассмотрена далее.

Взаимодействие циркадных часов с сезонно меняющимися фотопериодическими условиями необходимо для непрерывно идущей физиологической адаптации (de Paula et al., 2008). Влияние средовых сигналов, таких как свет, на генную экспрессию опосредуется через базовые клеточные циркадные осцилляторы, которые с некоторыми модификациями широко используются у эукариот. Эти осцилляторы посылают фазовую информацию для контроля над экспрессией так называемых *clock*-зависимых генов и ритмических процессов. Осцилляции формируются благодаря наличию позитивных и негативных элементов, создающих сложную систему с обратной связью (рис. 10). Значительное количество генов млекопитающих вовлечено в циркадные осцилляции, и поэтому резкие изменения фотопериодических условий оказывают влияние на динамику многих процессов. Например, при исследовании профиля экспрессии у 12252 генов в клетках эндометрия беременных крыс было обнаружено 7235 генов со значительными фазовыми осцилляциями, в том числе выявлено 11 генов, непосредственно связанных с имплантацией, и 24 гена, влияющих на формирование плаценты, осцилляция активности которых контролируется локальным циркадным ритмом (Tasaki et al., 2013).

Клеточные циркадные часы основываются на двух автономных транскрипционно-трансляционных системах с обратной связью, которые задают ритмические колебания экспрессии многих генов, близкие к 24 ч. Одна из них – с отрицательной обратной связью – включает так называемые «период»-гены (*PER1*, *PER2*, *PER3*) и криптохром-гены (*CRY1*, *CRY2*). Гетеродимеры, формируемые из *PER* и *CRY* белков, влияют на *CLOCK/BMAL1* гетеродимеры, подавляя собственную транскрипцию. *PER* и *CRY* белки фосфорилируются с помощью киназы эписон (CK1ε, CSNK-I-Epsilon), что ведет к их деградации и старту нового цикла. Другая система с положительной связью запускается *CLOCK/BMAL1* гетеродимером, который инициирует транскрипцию генов-мишеней, содержащих E-box *cis*-регуляторные энхансерные последовательности (de Paula et al., 2008; Valenzuela et al., 2015).

Циркадные часы среди прочего регулируют MAPK (митоген-активированная протеинкиназа) – сигнальный путь, являющийся одним из фундаментальных у эукариот. Эта регуляция заключается в координированном контроле над группой генов, так что пик их активности наступает в подходящее время суток и тем самым обеспечивает рост и выживание (de Paula et al., 2008). Сигнальный путь PI3K (фосфатидилинозитид-3-киназа) представляет собой другой важный сигнальный путь, который участвует в

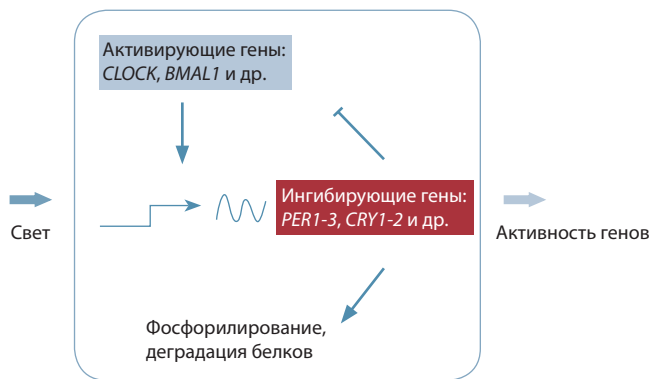


Рис. 10. Схема регуляции циркадного ритма у млекопитающих.

В отсутствие внешних сигналов циркадный осциллятор генерирует колебания генной активности с периодом, близким к 24 ч. Позитивные элементы (*CLOCK*, *BMAL1* и др.) этого регуляторного контура активируют транскрипцию негативных элементов (*PER1-3*, *CRY1-2* и др.). Рост концентрации негативных элементов ведет к подавлению позитивных. Фосфорилирование и деградация негативных элементов приводят к очередному возобновлению цикла. Свет и другие факторы оказывают влияние на циркадный ритм, таким образом воздействуя на многие гены и физиологические процессы (de Paula et al., 2008).

модуляции циркадных ритмов, взаимодействуя с *BMAL1* and *CLOCK* (Jeong et al., 2014). Существенно, что MAPK и PI3K/Akt непосредственно связаны с сигналами, поступающими через *KITLG/KIT* внутрь клеток, и оказывают влияние на антиапоптозные гены и гены, влияющие на пролиферацию (KEGG Pathway Database, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html?sess=2764b8338258d6286de91bbebe6faf46>). Оба этих сигнальных пути активно участвуют в протекании имплантации и формировании плаценты (Jeong et al., 2014; Furmento et al., 2016).

Известно, что добавление растворимой формы *KITLG* в среду для культивирования эмбрионов улучшает формирование бластоцист. Выключение *KIT* гена, напротив, приводит к значительному снижению скорости формирования бластоцист и, следовательно, задержке эмбрионального развития. Эти факты указывают на важность *KITLG/KIT* сигнального пути, задействующего с помощью MAPK и PI3K/Akt специфические клеточные цели, что влияет на дробление бластомеров, пролиферацию трофобласта и внутренней клеточной массы (Lim et al., 2010).

Совокупность экспериментальных данных свидетельствует о синхронизации экспрессии специфичных для яичников генов к гипоталамо-гипофизарным сигналам, а также об их регулируемости гонадотропинами. Установлена связь между возникновением циркадного ритма в яичнике и активностью рецептора лютеинизирующего гормона, как и возможная функциональная зависимость с продукцией андрогена и прогестерона (Gräs et al., 2012). Прогестерон, а не эстрадиол, синхронизирует циркадные осцилляции в клетках стромы эндометрия, используя транскрипционные и трансляционные механизмы обратной связи с локальной циркадной системой (Higata et al., 2009). Готовность эндометрия к имплантации также зависит от баланса эстрогенов и прогестерона. При формировании этого баланса активно используются механизмы обратной связи, и он едва ли достижим без



Рис. 11. Аутокринный и паракринный эффекты мелатонина, синтезируемого в клетках трофобласта.

MT1 и MT2 – рецепторы мелатонина, способные передать сигнал внутрь клеток трофобласта; VEGF – ген фактора роста эндотелия сосудов; NAT – ген N-ацетилтрансферазы; HIOMT – ген гидроксиндол-О-метилтрансферазы (Valenzuela et al., 2015).

ряда ингибиторов и их рецепторов, таких, например, как ErbB (Kim et al., 2010). Вполне ожидаемо функционирование всей этой сложной регуляторной системы оказывается чувствительным к резким фотопериодическим изменениям. Сравнение контрольной группы беременных овец (12 ч свет : 12 ч темнота) с экспериментальной (24 ч постоянный свет) показало, что у экспериментальных животных уровни фолликулостимулирующего гормона и эстрадиола возрастают, а уровень прогестерона снижается как в материнской системе циркуляции, так и у эмбриона. Возрастание уровня лютеинизирующего гормона обнаружено только в эмбриональной циркуляции (Gao et al., 2016). Весьма вероятно, что более мягкие изменения фотопериода, использованные в работе (Беляев и др., 1973б), тоже могли привести к сдвигам в уровне многих гормонов и белков, участвующих в обсуждаемых здесь процессах. Допускать существование простых линейных зависимостей в реакции на фотопериодические изменения, по-видимому, не приходится.

Другим важнейшим фактором, синхронизирующим ~24-часовые циркадные ритмы с фотопериодическими изменениями у млекопитающих, является эпифизарный гормон мелатонин, с помощью которого информация из супрахиазматического ядра передается многочисленным тканям и органам. Помимо эпифиза, мелатонин синтезируется в разных клетках и тканях, включая плаценту и бластоцисты (Valenzuela et al., 2015). Связываясь с рецепторами на поверхности клеток трофобласта, эпифизарный мелатонин передает сигнал внутрь бластоцисты и действует на ее циркадную систему, контролируя экспрессию clock-генов: *CLOCK*, *BMAL1*, *PER1-3*, *CRY1-2*, а также на производство локального мелатонина, оказывающего как аутокринный (на бластоцисту), так и паракринный эффект на клетки матки и формирующейся плаценты, что влияет на имплантацию и последующие процессы (рис. 11). Более детальное исследование показало, что мелатонин

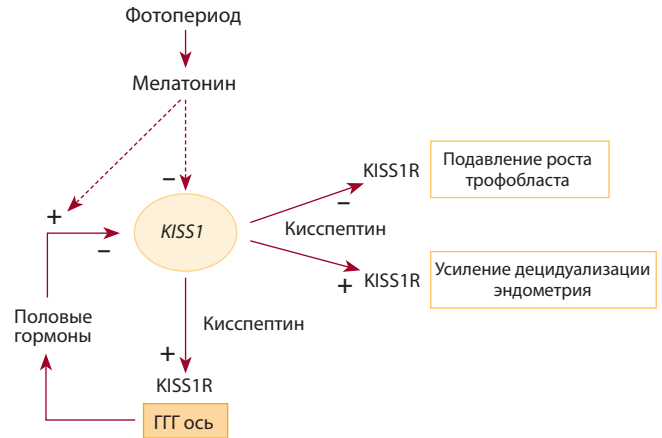


Рис. 12. Модель регуляции гена *KISS1* и возможные эффекты на процесс имплантации.

Кисспептин преимущественно стимулирует гипоталамо-гипофизарно-гонадную (ГГГ) систему, в светлое время действуя через свой рецептор KISS1R. В аркуатном ядре гипоталамуса экспрессия гена *KISS1* отрицательно регулируется половыми гормонами и мелатонином (прямо – на KISS1 нейроны, опосредованно – через половые гормоны). Наличие необходимого запаса энергии, принадлежность к определенной возрастной и половой группе предполагаются, но на схеме не указаны. Одна из специфических характеристик этой регуляторной системы – ее способность затормаживать рост трофобласта у зрелых бластоцист и ускорять подготовку эндометрия у беременных самок непосредственно перед имплантацией (Bilban et al., 2004; Revel et al., 2006; Saadeldin et al., 2012; Zhang et al., 2014).

индуцирует экспрессию *Per1* и *Per2*, необходимых для перенастройки СХЯ часов в зависимости от циркадного времени (СТ). Этот эффект достоверно обнаруживается при СТ 10 (субъективный закат/сумерки), но отсутствует при СТ 6 (субъективный полдень) (Kandalepas et al., 2016). Сложность системы фотопериодической регуляции у млекопитающих поразительна.

Экзогенный мелатонин увеличивает скорость деления клеток, сокращает время развития и выход полноценных бластоцист (Berlinguer et al., 2009). Влияние локального мелатонина на зародыш, начиная с двухклеточной стадии и кончая бластоцистой, готовой к имплантации, зависит от его концентрации. Низкие концентрации (10^{-9} М) ускоряют развитие и способствуют снижению смертности эмбрионов на протяжении доимплантационного периода. Более высокие концентрации мелатонина (10^{-3} М) не оказывают положительного влияния (Tian et al., 2010). Будучи мощным антиоксидантом, мелатонин способствует имплантации, утолщению эндометрия и повышению плотности желёз в стенке матки. Помимо этого мелатонин значительно снижает уровень эстрадиола, не влияя на уровень прогестерона, и активирует экспрессию генов, имеющих критическое значение в процессе имплантации, включая *HBEGF* (heparin binding EGF like growth factor) и его рецептор *ErbB1*. Среди многих других генов, подверженных действию мелатонина, следует указать на *PRA* (progesterone receptor A), *p53* (protein 53) и *LIF* (leukaemia inhibitory factor). Общий вывод состоит в том, что мелатонин и его MT2 рецептор влияют на раннее эмбриональное развитие (He et al., 2015). В свете накопленных экспериментальных данных положительная корреляция между количеством развивающихся эмбрионов

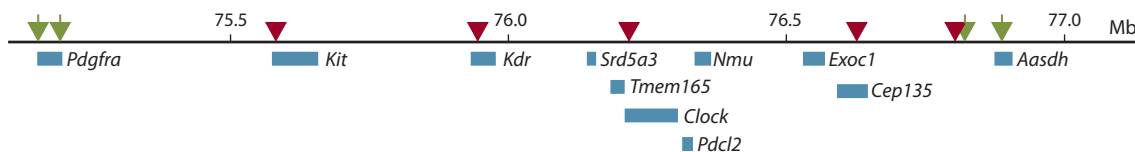


Рис. 13. Синтенная группа генов, существующая по меньшей мере начиная с предка костистых рыб.

Pdgfra, *Kit*, *Kdr* – расположенные рядом гены, детерминирующие ростовые факторы (тирозин-киназные рецепторы); *Srd5a3* – ген стероид 5-альфа-редуктазы; *Tmem165* – ген трансмембранного белка 165; *Clock* – центральный ген циркадной системы; *Pdc12* – ген фосфодуцин-подобного белка, связанный с G белком; *Nmu* – ген, кодирующий нейромедин U, пептид с широким спектром влияния; *Exoc1* – ген, определяющий белок экзоцитного комплекса. Расстояние между генами *Kit* и *Clock* у домового мыши и других позвоночных составляет около 1 Мб. Использована генетическая номенклатура для *Mus musculus* (Mizuno et al., 2015).

и уровнем циркулирующего мелатонина говорит о связи между массой плаценты и уровнем мелатонина (Tamura et al., 2008). Предположение о критически важной роли циркадной системы и мелатонина в физиологии плаценты активно обсуждается, но требует дополнительных данных. Весьма вероятно, что мелатонин индуцирует такие антиоксиданты, как каталаза и супероксиддисмутаза, предотвращая негативные последствия оксидативного стресса (Valenzuela et al., 2015).

Влияние фотопериодических условий посредством мелатонина на кисспептины и функционирование всей репродуктивной системы получило достаточное количество доказательств (Revel et al., 2006). Эти пептиды имеют широкий спектр действия на созревание ооцитов; экспрессию материнских генов, включая уже упомянутый *BMP15*; темп формирования бластоцист и их готовность к имплантации; а также децидуализацию эндометрия матки. Выяснилось, что кисспептин, способствуя апоптозу, замедляет разрастание трофобласта у бластоцист, готовых к имплантации (Bilban et al., 2004; Saadeldin et al., 2012). Параллельно *KISS1/KISS1R* комплекс активно участвует в децидуализации эндометрия матки в процессе подготовки к имплантации (Zhang et al., 2014). Было обнаружено, что цитокинин LIF, столь необходимый в день имплантации, слабо экспрессируется у мышей с выключенным *KISS1(-/-)*, делая имплантацию практически невозможной. Добавление экзогенного LIF позволяет «спасти» имплантацию у таких животных и демонстрирует критическую роль не только LIF, но и *KISS1* (Calder et al., 2014). Таким образом, одна из разнообразных функций *KISS1*, возможно, заключается в тонкой подстройке морфофункциональных состояний бластоцисты и эндометрия, повышая вероятность успешной имплантации (рис. 12).

Сегодня сложно однозначно интерпретировать факт расположения *KIT* и близких к нему по происхождению и функции генов (*PDGFRA* и *KDR*) в одной синтенной группе с *CLOCK*, центральным геном циркадной системы (рис. 13) (Mizuno et al., 2015). Тесное сцепление этих генов прослеживается как минимум начиная с костистых рыб, т.е. на протяжении более 400 млн лет. С учетом опосредованных (например, через MAPK сигнальный путь) функциональных связей между *KIT* и *CLOCK*, так же как и с некоторыми другими генами, входящими в этот синтенный блок, допущение о неслучайности их совместной локализации и консервации этой группы генов может оказаться не лишним оснований. Однако доказательства такого предположения пока отсутствуют.

Почему дополнительное освещение влияет на жизнеспособность эмбрионов в скрещиваниях гетерозигот по грузинской белой мутации?

Факты, изложенные в данной статье, предоставляют возможность для поиска потенциальных ответов на поставленный вопрос. Однако только эксперименты могут подтвердить либо опровергнуть обсуждаемые здесь предположения. Прежде всего следует констатировать, что молекулярная природа грузинской белой мутации нуждается в дальнейшем исследовании. Ни одна из обнаруженных на сегодня замен в кДНК гена *KIT* у грузинских белых лисиц, по-видимому, не может привести к существенным изменениям структуры белка (Kukekova, 2016, уст. сообщ.). Следовательно, возможны два объяснения.

1. Искомая мутация затрагивает не структуру *KIT* белка, а регуляцию гена. В этом случае надежда на обнаружение такой мутации, возможно, связана с регуляторной областью гена *KIT*. Трудность такого рода поиска не нуждается в пояснении.
2. Грузинская белая мутация прямо не связана с геном *KIT*, а вызвана некими изменениями в близко расположенных генах, поскольку эта мутация картирована в районе гена *KIT* (Kukekova et al., 2016). Пример с геном *EXOC1*, рассмотренный ранее, потенциально демонстрирует такую возможность (Mizuno et al., 2015).

Первая версия представляется более вероятной, поскольку в ее пользу косвенно свидетельствуют несколько фактов. Они обнаруживаются при сравнении грузинской белой мутации с английской пятнистой мутацией у кроликов породы Checkered Giant (Fontanesi et al., 2014), а также при сравнении других видов млекопитающих со сходными мутациями. Во-первых, это очевидное подобие фенотипов (см. рис. 1, в и рис. 4). Во-вторых, это убедительное доказательство мутационного изменения, связанного с геном *KIT*, у Checkered Giant, приводящего к резкому снижению экспрессии *KIT* (см. рис. 5). В-третьих, это совпадение сроков постнатальной смертности гомозиготных кроликов (*En/En*) и гомозиготных лисиц (*W^G/W^G*), вызываемое резко сниженной перистальтикой в период перехода от питания молоком к твердой пище и ведущее к синдрому мегаколона. Поэтому исследование экспрессии гена *KIT* в ICC кишечника у *W^G/W^G* может оказаться полезным в случае значительных трудностей в обнаружении регуляторной мутации.

Таким образом, доступные в настоящее время факты не противоречат предположению, высказанному в ис-

ходной статье об аллельности платиновой и грузинской белой мутаций (Беляев и др., 1973а). Понимая, что только экспериментальный ответ может быть воспринят как окончательный, в дальнейших рассуждениях мы тем не менее будем исходить из предположения о наличии регуляторной мутации в гене *KIT* у лисиц грузинской белой окраски. В настоящее время можно только догадываться, как действует предполагаемая регуляторная мутация. Сравнительный анализ является лучшим из того, что доступно вне экспериментального подхода. Исходя из сниженной экспрессии *KIT* у кроликов, гомозиготных по английской пятнистой мутации, можно допустить нечто подобное у W^G/W^G эмбрионов. В таком случае не исключено, что почти 100% постнатальная смертность гомозигот W^G/W^G обусловлена низким уровнем экспрессии *KIT* в ИСС кишечника у щенков в первые недели жизни.

Существуют два наиболее интригующих вопроса, вытекающих из обсуждаемых здесь работ Беляева с сотрудниками.

1. Какова причина того, что вероятность успешной имплантации W^G/W^G бластоцист низка?
2. Каким образом искусственное удлинение светового дня значительно повышает успешность имплантации бластоцист W^G/W^G ?

Прежде всего необходимо снова вернуться к обсуждению динамики и временных рамок событий, предшествующих имплантации у лисиц. Как уже отмечено, у лисиц (*Vulpes vulpes*) во время овуляции ооциты пребывают в профазе первого мейотического деления (Pearson, Enders, 1943). Созревание ооцита, включая прохождение МІ, у лисиц завершается в пределах 24–48 ч после овуляции. На это указывает высокий уровень успешных оплодотворений, если скрещивания осуществляются именно в этом временном интервале (Farstad, 1998). Другая особенность собак и, вероятно, лисиц, состоит в неодновременной овуляции созревающих яйцеклеток. В результате процесс овуляции занимает от 24 до 96 ч (Linde Forsberg, Reynaud, 2012). Это означает, что некоторые ооциты оплодотворяются и начинают развитие раньше других. Время, необходимое для прохождения яйцеводов, составляет 4–6 дней, и эмбрионы попадают в полость матки на стадии 4–16 бластомеров. За последующие 9–10 дней до начала имплантации проходят начальные стадии эмбрионального развития, включая формирование бластоцист и их распределение вдоль рогов матки (Valtonen, Jalkanen, 1993). Известно, что активация эмбрионального генома у многих крупных млекопитающих начинается не ранее стадии 4 бластомеров. Таким образом, возможность селективного воздействия дополнительного освещения ограничена интервалом от стадии 4–8 бластомеров до начала имплантации. Тот факт, что W^G/w самки получали дополнительное освещение более длительное время, начиная с дня первого покрытия и до рождения потомства (Беляев и др., 1973б), не влияет на продолжительность временного интервала, в течение которого дополнительное освещение могло оказать воздействие.

Предположим, что в контрольных условиях на доимплантационной стадии развитие гомозигот W^G/W^G происходит медленнее других генотипов и причина такого отставания состоит в недостаточной продукции КІТ. Как

говорилось выше, выключение *KIT* значительно замедляет развитие эмбрионов на доимплантационном этапе (Lim et al., 2010). Активность KITLG/*KIT* трансдукции в гигантских клетках трофобласта, по-видимому, весьма важна для успешной имплантации. Увеличение поверхности трофобласта при добавлении KITLG (см. рис. 7), вероятно, повышает успех имплантации. Помимо клеток трофобласта, KITLG/*KIT* комплекс особенно активен в мастоцитах эндометрия (Arcesi et al., 1992; Kauma et al., 1996; Mitsunari et al., 1999) и некоторых других типах клеток. Если W^G/W^G бластоцисты действительно развиваются медленнее других вследствие недостатка КІТ, то можно ответить на первый из поставленных выше вопросов следующим образом: такие бластоцисты часто опаздывают к началу имплантации. Если этот сценарий близок к тому, что реально происходит в скрещиваниях $W^G/w \times W^G/w$, то появляется понимание возможных причин резкой нехватки потомков с генотипом W^G/W^G .

Теперь рассмотрим второй вопрос: каким образом изменение фотопериодических условий может селективно повлиять на вероятность имплантации бластоцист с разными генотипами? Поскольку активным участником имплантации являются не только бластоцисты, но и эндометрий матки, можно предположить разные сценарии: селективное ускорение развития бластоцист, изменение подготовки эндометрия к имплантации и ее возможная задержка, модификация активности генов, непосредственно связанных с началом имплантации, или комбинация этих процессов. Готовность эндометрия к имплантации зависит от баланса эстрогенов и прогестерона (Paulson, 2011), который может быть изменен фотопериодическими модификациями. Например, резкое увеличение светового дня повышает уровень эстрадиола и снижает уровень циркулирующего прогестерона (Gao et al., 2016), так же как экспериментальное изменение фотопериодических условий у самок лисиц влияет на уровень эстрадиола и прогестерона (Осадчук, Трут, 1988). Значительный рост уровня прогестерона, особенно в течение первых двух-трех недель беременности, типичен для лисиц в обычных фотопериодических условиях (Hartley et al., 1994). Недостаточный уровень прогестерона может замедлить подготовку эндометрия к имплантации, тем самым увеличивая вероятность имплантации W^G/W^G бластоцист. Возможные нарушения в работе циркадных часов, особенно в первые 10–15 дней с момента перевода самок на искусственно удлиненный световой день, тоже могут иметь последствия. Известно, что циркадные часы играют важную роль в разных аспектах размножения самок, включая имплантацию. Например, делеция гена *BMAL1* в стероидогенных клетках ведет к нарушению работы циркадной системы, так же как к изменениям продукции прогестерона и в итоге к невозможности имплантации (Liu et al., 2014).

Как отмечено ранее в этой статье, мелатонин оказывает разноплановое влияние на эмбриональное развитие. Поскольку дополнительное освещение беременных самок влияет на продукцию эпифизарного и, возможно, локального мелатонина, такие параметры, как темп развития бластоцист и готовность эндометрия к имплантации, вероятно, претерпевают изменения. Существенно, что эффект мелатонина зависит от его концентрации: низкие кон-

центрации способствуют снижению доимплантационной смертности эмбрионов и ускоряют их развитие (Tian et al., 2010). Помимо этого мелатонин снижает уровень эстрадиола, не влияя на уровень прогестерона (He et al., 2015).

Изменение фотопериодических условий с неизбежностью воздействует на динамику продукции и циркуляции мелатонина, что, вероятно, влияет на подготовку эндометрия к имплантации. Мелатонин частично подавляет гипоталамо-гипофизарно-гонадную (ГГГ) ось у самок, что среди прочего выражается в снижении уровня эстрадиола в плазме и подавлении эстрогенного рецептора (Chuffa et al., 2011). Сравнение динамики концентраций мелатонина в плазме у самок, пребывающих в естественном фотопериоде и в условиях искусственно удлиненного дня, показало более интенсивное возрастание и более высокие концентрации мелатонина в эксперименте (Gómez-Brunet et al., 2008). Иными словами, сокращение темного времени суток при искусственном удлинении дня компенсируется за счет быстрого возрастания концентрации мелатонина до более высоких значений. И хотя точное знание молекулярных, клеточных и физиологических процессов, запускаемых искусственным изменением фотопериода, и их влияния на эмбрионы с разными генотипами пока недоступно, факт такого влияния был обнаружен в обсуждаемой работе (Belyaev et al., 1975). Было установлено, что вероятность имплантации W^G/W^G бластоцист возрастает по мере удлинения светового дня. В связи с этим возникает вопрос: почему рост доли гомозигот W^G/W^G , преодолевших имплантационный барьер, сопровождается снижением доли гетерозигот W^G/w (см. рис. 9, а). Можно просто ответить на этот вопрос: совокупность всех частот равна 1, и возрастание одной компоненты должно повлечь за собой снижение других. Однако отсутствие изменений в частоте бластоцист с диким генотипом w/w делает такое объяснение недостаточным.

Рассуждая на эту тему, можно предположить, что фактор, способствующий имплантации гомозигот, не оказывает точно такого же влияния на гетерозиготы. Этого может быть достаточно для возникновения конкурентного преимущества у гомозигот; тогда как w/w бластоцисты, не имеющие дефектов, характерных для двух других генотипических классов, оказываются индифферентными к фотопериодическому влиянию. Регуляторная система с обратной связью, контролирующая производство КИТ, КИТЛГ и других белков и обнаруженная в развивающихся ооцитах (см. рис. 6), или нечто подобное ей, возможно, оперирует и в бластоцистах. В этой системе при значительном дефиците КИТ, которое, вероятно, имеет место у W^G/W^G , активирующее влияние BMP15 на экспрессию *KITLG* может существенно усилиться. В таком случае *KITLG* начнет производиться в большем количестве, что интенсифицирует его аутокринное и паракринное влияние, способствуя росту трофобласта, ускорению созревания W^G/W^G бластоцист и усилению локальной реакции эндометрия (Hutt et al., 2006). Экспериментальные факты поддерживают гипотезу о том, что *KITLG*, производимый клетками эндометрия и имплантирующегося эмбриона, оказывает паракринное и/или аутокринное воздействие на имплантацию, стимулируя разрастание трофобласта (Arcesi et al., 1992; Kauma et al., 1996; Mitsunari et

al., 1999). У гетерозиготных бластоцист W^G/w имеется нормальный аллель гена *KIT*, и ход событий, который может иметь место у гомозигот W^G/W^G , представляется для них менее вероятным. Однако суммарная продукция КИТ, судя по фенотипу гетерозигот, у них снижена, и это обстоятельство может влиять на темп развития W^G/w бластоцист и их взаимодействие с эндометрием. Уровень *KITLG* при 16-часовом дне достоверно выше, чем при 8-часовом (Photoperiodism: 1415854_at: Kitl), что соответствует условиям обсуждаемого эксперимента с лисицами. Если это создает преимущества для гомозигот, то можно предположить, что усиления подготовки эндометрия и преимущественного ускорения развития W^G/W^G бластоцист при удлинении световой фазы суток оказывается достаточно для успешной имплантации и конкуренции с гетерозиготами W^G/w .

В такую логику укладываются данные о влиянии *KISS1/KISS1R* системы. Кисспептин может оказывать тормозящий эффект на дальнейший рост трофобласта у почти готовых к имплантации бластоцист и усиление подготовки эндометрия матки к имплантации. Более того, кисснейроны, и следовательно кисспептин, функционируют в зависимости от фотопериодических условий (см. рис. 12). Вполне возможно, что резкое удлинение светового периода для самок из скрещиваний $W^G/w \times W^G/w$ ведет, с одной стороны, к замедлению финальной стадии развития бластоцист и накоплению бластоцист разных генотипов перед самым началом имплантации, а с другой – к децидуализации и повышению готовности эндометрия. Не следует также упускать из виду возможность дополнительного усиления производства *KITLG* мутантными гомозиготами в условиях искусственно удлиненного дня, что стимулирует развитие бластоцист. Вклад *NDRG4*, который опосредованно подвержен фотопериодической модификации, в подготовку и протекание имплантации тоже может иметь отношение к рассматриваемому явлению. Имплантация сопровождается изменением гормонального профиля и стимуляцией эстроген-зависимой экспрессии гена *NDRG4*, преимущественно наблюдающейся непосредственно в зоне контакта бластоцисты и эндометрия. Интенсивная экспрессия *NDRG4* активирует децидуализацию, тогда как подавление экспрессии *NDRG4* в клетках стромы эндометрия ведет к прекращению децидуализации. Активация *NDRG4* может сопровождаться замедлением имплантации (Yang et al., 2016). С учетом всех упомянутых фактов замедленное развитие W^G/W^G эмбрионов оказывается скомпенсировано, и трудности, с которыми сталкиваются такие эмбрионы при имплантации в стандартных фотопериодических условиях, преодолеваются при удлинении светового периода.

В этой статье была предпринята попытка обсудить вопросы, поставленные в работах Д.К. Беляева с сотрудниками, касающиеся трех мутаций и причин их летальности в гомозиготном состоянии, а также влияния фотопериодических изменений на эмбриональную жизнеспособность мутантных гомозигот. Современные данные позволяют очертить круг генов и процессов, возможно, вносящих свой вклад в рассматриваемые явления. Однако автор ясно сознает, что верификация обсуждаемых здесь возможностей достигается только экспериментальным путем. До-

полнительные варианты объяснений, хотя они неизвестны в настоящее время, могут появиться со временем и еще раз продемонстрировать исключительную сложность биологических процессов.

Выводы

1. Предполагаемое замедленное развитие бластоцист, гомозиготных по грузинской белой мутации (W^G/W^G), по-видимому, вызванное дефектом регуляции гена *KIT*, возможно, ответственно за опоздание таких бластоцист к началу имплантации и значительную нехватку W^G/W^G потомков в стандартных фотопериодических условиях.
2. Удлинение светового дня для беременных самок из $W^G/w \times W^G/w$ скрещиваний, приводящее к резкому возрастанию доли W^G/W^G в потомстве, может быть связано со следующими факторами:
 - уровень *KITLG* при длинном световом дне существенно превышает таковой при коротком световом дне, и это обстоятельство, возможно, способствует селективному ускорению развития W^G/W^G бластоцист;
 - удлинение светового дня снижает подавляющее действие мелатонина на *KISS1* и может способствовать возрастанию уровня кисспептина, что, с одной стороны, ведет к замедлению финальной стадии роста трофобласта и накоплению бластоцист разных генотипов перед началом имплантации, а с другой стороны – к децидуализации и повышению готовности эндометрия;
 - кроме того, удлинение светового дня, возможно, интенсифицирует эстроген-зависимую экспрессию гена *NDRG4* и вызывает задержку начала имплантации, что существенно для успешного развития W^G/W^G бластоцист.
3. Почти 100 % ранняя постнатальная смертность гомозигот по грузинской белой мутации, вполне вероятно, вызвана низкой концентрацией *KIT* в интерстициальных клетках кишечника (interstitial Cajal cells – ICC) и, как следствие, значительно ослабленной перистальтикой, что делает переход от питания молоком к твердой пище невозможным.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Беляев Д.К., Клочков Д.В., Железова А.И. Влияние световых условий на воспроизводительную функцию и плодовитость норок (*Mustela vison* Schr). Бюл. Моск. о-ва испытателей природы. 1963;68(2):107-125.

Беляев Д.К., Трут Л.Н., Рувинский А.О. Об аллельных отношениях грузинской белой, платиновой и беломордой мутаций у лисиц. Генетика. 1973a;IX(10):71-77.

Беляев Д.К., Трут Л.Н., Рувинский А.О. Генетически детерминированная летальность у лисиц и возможности ее преодоления. Генетика. 1973b;IX(9):71-82.

Осадчук Л.В., Трут Л.Н. Фотопериодический контроль эндокринной функции гонад у серебристо-черных лисиц и его изменение при domestikации. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1988;24(2):176-183.

An X., Song Y., Bu S., Ma H., Gao K., Hou J., Wang S., Lei Z., Cao B. Association of polymorphisms at the microRNA binding site of the caprine *KITLG* 3'-UTR with litter size. Sci. Rep. 2016;6:25691.

Arceci R.J., Pampfer S., Pollard J.W. Expression of CSF-1/c-fms and SF/c-kit mRNA during preimplantation mouse development. Dev. Biol. 1992;151(1):1-8.

Belyaev D.K., Trut L.N., Ruvinsky A.O. Genetics of the W locus in foxes and expression of its lethal effects. J. Heredity. 1975;66:331-338.

Berlinguer F., Leoni G.G., Succu S., Spezzigu A., Madeddu M., Satta V., Bebbere D., Contreras-Solis I., Gonzalez-Bulnes A., Naitana S. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. J. Pineal Res. 2009;46(4):383-391.

Bernstein A., Chabot B., Dubreuil P., Reith A., Nocka K., Majumder S., Ray P., Besmer P. The mouse W/c-kit locus. Ciba Found. Symp. 1990;148:158-166.

Bilban M., Ghaffari-Tabrizi N., Hintermann E., Bauer S., Molzer S., Zoratti C., Malli R., Sharabi A., Hiden U., Graier W., Knöfler M., Andree F., Wagner O., Quaranta V., Desoye G. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. J. Cell Sci. 2004;117(8):1319-1328.

Blechman J.M., Lev S., Barg J., Eisenstein M., Vaks B., Vogel Z., Givol D., Yarden Y. The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. Cell. 1995;80(1):103-113.

Bourdieu A., Calvo E., Rao C.V., Akoum A. Transcriptome analysis reveals new insights into the modulation of endometrial stromal cell receptive phenotype by embryo-derived signals interleukin-1 and human chorionic gonadotropin: possible involvement in early embryo implantation. PLoS ONE. 2013;8(5):e64829.

Bourdieu A., Shao R., Rao C.V., Akoum A. Human chorionic gonadotropin triggers angiogenesis via the modulation of endometrial stromal cell responsiveness to interleukin 1: a new possible mechanism underlying embryo implantation. Biol. Reprod. 2012;87(3):66.

Calder M., Chan Y.M., Raj R., Pampillo M., Elbert A., Noonan M., Gillio-Meina C., Caligioni C., Bérubé N.G., Bhattacharya M., Watson A.J., Seminara S.B., Babwah A.V. Implantation failure in female *Kiss1^{-/-}* mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. Endocrinology. 2014;155(8):3065-3078.

Castellano J.M., Wright H., Ojeda S.R., Lomniczi A. An alternative transcription start site yields estrogen unresponsive *Kiss1* mRNA transcripts in the hypothalamus of prepubertal female rats. Neuroendocrinology. 2014;99(2):94-107.

Chabot B., Stephenson D.A., Chapman V.M., Besmer P., Bernstein A. The proto-oncogene *c-kit* encoding a trans-membrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. Nature. 1988;335:88-89.

Chuffa L.G., Seiva F.R., Fávoro W.J., Teixeira G.R., Amorim J.P., Mendes L.O., Fioruci B.A., Pinheiro P.F., Fernandes A.A., Franci J.A., Delella F.K., Martinez M., Martinez F.E. Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. Reprod. Biol. Endocrinol. 2011;9:108.

Drube S., Schmitz F., Göpfert C., Weber F., Kamradt T. C-Kit controls IL-1β-induced effector functions in HMC-cells. Eur. J. Pharmacol. 2012;675(1-3):57-62.

Elvin J.A., Clark A.T., Wang P., Wolfman N.M., Matzuk M.M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. Mol. Endocrinol. 1999;13(6):1035-1048.

England G. Dog Breeding, Whelping and Puppy Care. John Wiley & Sons, 2012.

Farstad W. Reproduction in foxes: current research and future challenges. Anim. Reprod. Sci. 1998;53(1-4):35-42.

Fontanesi L., Vargiolu M., Scotti E., Latorre R., Fausone Pellegrini M.S., Mazzoni M., Asti M., Chiochetti R., Romeo G., Clavanzani P., De Giorgio R. The *KIT* gene is associated with the English spotting coat color locus and congenital megacolon in Checkered Giant rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). PLoS ONE. 2014;9(4):e93750.

Furmento V.A., Marino J., Blank V.C., Cayrol M.F., Cremaschi G.A., Aguilar R.C., Roguin L.P. Granulocyte colony-stimulating factor

- (G-CSF) upregulates $\beta 1$ integrin and increases migration of human trophoblast Swan 71 cells via PI3K and MAPK activation. *Exp. Cell Res.* 2016;342(2):125-134.
- Gao Q., Lv J., Li W., Zhang P., Tao J., Xu Z. Disrupting the circadian photo-period alters the release of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, progesterone, and estradiol in maternal and fetal sheep. *J. Reprod. Dev.* 2016;62(5):487-493.
- Gilchrist R.B., Lane M., Thompson J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update.* 2008;14(2):159-177.
- Glabowski W. The protective effect of stem cell factor (SCF) on *in vitro* development of preimplantation mouse embryos. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 2005;51:83-93.
- Gómez-Brunet A., Santiago-Moreno J., del Campo A., Malpoux B., Chemineau P., Tortonesi D.J., Gonzalez-Bulnes A., López-Sebastián A. Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long-day photoperiod. *Biol. Reprod.* 2008;78(3):552-562.
- Gräs S., Georg B., Jørgensen H.L., Fahrenkrug J. Expression of the clock genes *Per1* and *Bmal1* during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. *Cell Tissue Res.* 2012;350(3):539-548.
- Hartley F.G.L., Follett B.K., Harris S., Hirst D., McNeilly A.S. The endocrinology of gestation failure in foxes (*Vulpes vulpes*). *J. Reprod. Fertility.* 1994;100:341-346.
- He C., Wang J., Li Y., Zhu K., Xu Z., Song Y., Song Y., Liu G. Melatonin-related genes expressed in the mouse uterus during early gestation promote embryo implantation. *J. Pineal Res.* 2015;58(3):300-309.
- Hirata M., He P.J., Shibuya N., Uchikawa M., Yamauchi N., Hashimoto S., Hattori M.A. Progesterone, but not estradiol, synchronizes circadian oscillator in the uterine endometrial stromal cells. *Mol. Cell Biochem.* 2009;324(1-2):31-38.
- Huang E.J., Nock K.H., Buck J., Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol. Biol. Cell.* 1992;3(3):349-362.
- Hutt K.J., McLaughlin E.A., Holland M.K. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 2006;12(2):61-69.
- Jeong W., Kim J., Bazer F.W., Song G. Proliferation-stimulating effect of colony stimulating factor 2 on porcine trophectoderm cells is mediated by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e88731.
- Johnson J.L., Kozysa A., Kharlamova A.V., Gulevich R.G., Perelman P.L., Fong H.W., Vladimirova A.V., Oskina I.N., Trut L.N., Kukekova A.V. Platinum coat color in red fox (*Vulpes vulpes*) is caused by a mutation in an autosomal copy of *KIT*. *Anim. Genet.* 2015;46(2):190-199.
- Kameyoshi Y., Morita E., Tanaka T., Hiragun T., Yamamoto S. Interleukin-1 α enhances mast cell growth by a fibroblast-dependent mechanism. *Arch. Dermatol. Res.* 2000;292(5):240-247.
- Kandalepas P.C., Mitchell J.W., Gillette M.U. Melatonin signal transduction pathways require E-box-mediated transcription of *Per1* and *Per2* to reset the SCN clock at dusk. *PLoS ONE.* 2016;11(6):e0157824.
- Kauma S., Huff T., Krystal G., Ryan J., Takacs P., Turner T. The expression of stem cell factor and its receptor, c-kit in human endometrium and placental tissues during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81(3):1261-1266.
- Kim T.H., Lee D.K., Franco H.L., Lydon J.P., Jeong J.W. ERBB receptor feedback inhibitor 1 regulation of estrogen receptor activity is critical for uterine implantation in mice. *Biol. Reprod.* 2010;82(4):706-713.
- Kukekova A.V., Johnson J.L., Kharlamova A.V., Vladimirova A.V., Shepeleva D.V., Gulevich R.G., Trut L.N. Georgian white coat color of red fox (*Vulpes vulpes*) maps to fox chromosome 2 in the region containing *KIT* gene. *Anim. Genet.* 2016;47(4):514-515.
- Lemmon M.A., Pinchasi D., Zhou M., Lax I., Schlessinger J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J. Biol. Chem.* 1997;272(10):6311-6317.
- Leung P.C.K., Adashi E.Y. The Ovary. Second edition. Elsevier Acad. Press, 2004.
- Lim J.J., Eum J.H., Lee J.E., Kim E.S., Chung H.M., Yoon T.K., Kim K.S., Lee D.R. Stem cell factor/c-Kit signaling in *in vitro* cultures supports early mouse embryonic development by accelerating proliferation via a mechanism involving *Akt*-downstream genes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010;27(11):619-627.
- de Lima P.F., Ormond C.M., Caixeta E., Barros R.G., Price C., Burattini J. KITL regulates meiosis and expression of *NPPC* in bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction.* 2016;16:0155.
- Linde Forsberg C., Reynaud K. Ch. 14. Biology of reproduction and modern reproductive technology in the dog. *The Genetics of the Dog.* Ed. by E. Ostrander, A. Ruvinsky. 2012;295-320.
- Liu Y., Johnson B.P., Shen A.L., Wallisser J.A., Krentz K.J., Moran S.M., Sullivan R., Glover E., Parlow A.F., Drinkwater N.R., Schuler L.A., Bradfield C.A. Loss of BMAL1 in ovarian steroidogenic cells results in implantation failure in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(39):14295-14300.
- Lu H.S., Clogston C.L., Wypych J., Parker V.P., Lee T.D., Swiderek K., Baltera R.F., Jr., Patel A.C., Chang D.C., Brankow D.W., Liu X.-D., Ogden S.G., Karkare S.B., Hu S.S., Zsebo K.M., Langley K.E. Post-translational processing of membrane-associated recombinant human stem cell factor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992;298:150-158.
- Mitsunari M., Harada T., Tanikawa M., Iwabe T., Taniguchi F., Terakawa N. The potential role of stem cell factor and its receptor c-kit in the mouse blastocyst implantation. *Mol. Hum. Reprod.* 1999;5:874-879.
- Mizuno S., Takami K., Daitoku Y., Tanimoto Y., Dinh T.T., Mizuno-Iijima S., Hasegawa Y., Takahashi S., Sugiyama F., Yagami K. Peri-implantation lethality in mice carrying megabase-scale deletion on 5q3.3 is caused by Exoc1 null mutation. *Sci. Rep.* 2015;5:13632.
- Nagle D.L., Kozak C.A., Mano H., Chapman V.M., Bučan M. Physical mapping of the *Tec* and *Gabrb1* loci reveals that the *Wsh* mutation on mouse chromosome 5 is associated with an inversion. *Hum. Mol. Genet.* 1995;4(11):2073-2079.
- Otsuka F., Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99(12):8060-8065.
- Paulson R.J. Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2011;96(3):530-535.
- de Paula R.M., Lamb T.M., Bennett L., Bell-Pedersen D. A connection between MAPK pathways and circadian clocks. *Cell Cycle.* 2008;7(17):2630-2634.
- Pearson O.P., Enders R.K. Ovulation, maturation and fertilization in the fox. *Anatom. Record.* 1943;85(1):69-83.
- Photoperiodism: 1415854_at: Kitl. http://photoperiodism.brainstars.org/probeset/1415854_at inspected on 27.11.2016.
- Reith A.D., Rottapel R., Giddens E., Brady C., Forrester L., Bernstein A. *W* mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the *c-kit* receptor. *Genes Dev.* 1990;4(3):390-400.
- Revel F.G., Saboureau M., Masson-Pévet M., Pévet P., Mikkelsen J.D., Simonneau V. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr. Biol.* 2006;16(17):1730-1735.
- Rijnberk A., Kooistra H.S. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats: An Illustrated Text.* Second, revised and extended edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.
- Saadeldin I.M., Koo O.J., Kang J.T., Kwon D.K., Park S.J., Kim S.J., Moon J.H., Oh H.J., Jang G., Lee B.C. Paradoxical effects of kisspeptin: it enhances oocyte *in vitro* maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during *in vitro* culture. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012;24(5):656-668.
- Sanders K.M., Ward S.M. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J. Physiol.* 2006;576(Pt. 3):721-726.

- Semaan S.J., Kauffman A.S. Emerging concepts on the epigenetic and transcriptional regulation of the *Kiss1* gene. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2013;31(6):452-462.
- da Silva E.Z., Jamur M.C., Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem.* 2014;62(10):698-738.
- Simonneaux V., Bahougne T. A multi-oscillatory circadian system times female reproduction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2015;6:157.
- Tamura H., Takayama H., Nakamura Y., Reiter R.J., Sugino N. Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *J. Pineal. Res.* 2008;44(3):335-340.
- Taniguchi F., Harada T., Nara M., Deura I., Mitsunari M., Terakawa N. Coculture with a human granulosa cell line enhanced the development of murine preimplantation embryos via SCF/c-kit system. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2004;21:223-228.
- Tasaki H., Zhao L., Isayama K., Chen H., Yamauchi N., Shigeyoshi Y., Hashimoto S., Hattori M.A. Profiling of circadian genes expressed in the uterus endometrial stromal cells of pregnant rats as revealed by DNA microarray coupled with RNA interference. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2013;4:82.
- Tian X.Z., Wen Q., Shi J.M., Liang-Wang, Zeng S.M., Tian J.H., Zhou G.B., Zhu S.E., Liu G.S. Effects of melatonin on *in vitro* development of mouse two-cell embryos cultured in HTF medium. *Endocr. Res.* 2010;35(1):17-23.
- Tuck A.R., Mottershead D.G., Fernandes H.A., Norman R.J., Tilley W.D., Robker R.L., Hickey T.E. Mouse GDF9 decreases KITL gene expression in human granulosa cells. *Endocrine*. 2015;48(2):686-695.
- Valenzuela F.J., Vera J., Venegas C., Pino F., Lagunas C. Circadian system and melatonin hormone: risk factors for complications during pregnancy. *Obstet. Gynecol. Int.* 2015;2015:825802.
- Valtonen M., Jalkanen L. Species-specific features of oestrous development and blastogenesis in domestic canine species. *J. Reprod. Fertil Suppl.* 1993;47:133-137.
- Woidacki K., Popovic M., Metz M., Schumacher A., Linzke N., Teles A., Poirier F., Fest S., Jensen F., Rabinovich G.A., Maurer M., Zenclussen A.C. Mast cells rescue implantation defects caused by c-kit deficiency. *Cell Death Dis.* 2013;4:e462.
- Wong A.K., Ruhe A.L., Robertson K.R., Loew E.R., Williams D.C., Neff M.W. A *de novo* mutation in *KIT* causes white spotting in a subpopulation of German Shepherd dogs. *Anim. Genet.* 2013;44(3):305-310.
- Yang Q., Gu Y., Zhang X., Wang J.M., He Y.P., Shi Y., Sun Z.G., Shi H.J., Wang J. Uterine expression of NDRG4 is induced by estrogen and up-regulated during embryo implantation process in mice. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0155491.
- Yarden Y., Kuang W.J., Yang-Feng T., Coussens L., Munemitsu S., Dull T.J., Chen E., Schlessinger J., Francke U., Ullrich A. Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987;6(11):3341-3351.
- Ye Y., Kawamura K., Sasaki M., Kawamura N., Groenen P., Gelpke M.D., Rauch R., Hsueh A.J., Tanaka T. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009;7:26.
- Yuzawa S., Opatowsky Y., Zhang Z., Mandiyan V., Lax I., Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell.* 2007;130(2):323-334.
- Zhang P., Tang M., Zhong T., Lin Y., Zong T., Zhong C., Zhang B., Ren M., Kuang H. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e97647.