

**На правах рукописи**

**Кремнёв Станислав Валерьевич**

**МЕХАНОЗАВИСИМЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ  
ПРОЦЕССЫ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ МОРФОГЕНЕЗАХ ЗАРОДЫШЕЙ  
ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ**

**03.03.05 – биология развития, эмбриология**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2012**

Работа выполнена на кафедре эмбриологии Биологического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор  
**Белоусов Лев Владимирович**  
заведующий лабораторией биофизики развития  
Биологического факультета  
Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук  
**Зарайский Андрей Георгиевич**  
заведующий лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза  
Институт биоорганической химии  
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

доктор биологических наук  
**Черданцев Владимир Георгиевич**  
профессор кафедры биологической эволюции  
Биологического факультета Московского  
государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Ведущая организация:**

Санкт-Петербургский государственный университет

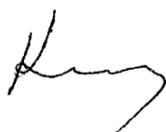
Защита состоится «20» ноября 2012г. в 15.:30 на заседании диссертационного  
совета Д 501.001.52 при Московском Государственном университете имени  
М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12,  
биологический факультет МГУ, ауд. М-1.

Факс:8(495)939-17-46; e-mail: dis\_kalsov@mail.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке  
Биологического факультета Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан « » октября 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



**Е.Н.Калистратова**

## **Общая характеристика работы**

### ***Актуальность проблемы***

В настоящее время быстро развивающейся областью биологии развития является исследование участия механических факторов в таких фундаментальных процессах как клеточные движения, морфогенез, выбор направления клеточной дифференцировки и т.д. (Farge, 2003; Belousov et al., 2006; Kornikova et al., 2010). Стало очевидным, что регуляция формообразования и экспрессии генов регулируется не только с помощью молекулярных факторов, но и посредством направленных механических или механо-геометрических воздействий (McBeath et al., 2004; Engler et al., 2006).

Многими исследованиями показано, что механические напряжения в тканях являются важным фактором регуляции клеточной динамики в раннем развитии животных. Движения клеток, различия механических характеристик тканей и изменение клеточной адгезии формируют поля механических напряжений в развивающемся зародыше, которые, в свою очередь, влияют на форму, ориентацию клеток и могут определять направление движения отдельных клеток и их групп в ближайший период развития (Belousov et al., 2006., Belousov et al., 1997). Механические напряжения регулируют важнейшие морфогенетические процессы раннего развития, такие как эпиболия, радиальная и конвергентная интеркаляция и апикальные сокращения клеток.

Каждая стадия развития характеризуется своим уникальным рисунком механических натяжений (Belousov et al., 1975). Изменение определенного рисунка натяжений драматически сказывается на формообразовании и дифференцировке осевых органов: нервной системы, хорды и сомитов (Belousov et al., 1990). При изменении механических натяжений клетки претерпевают пассивные деформации и формируют активный ответ. Активные изменения формы клеток создают новые напряжения. Механические напряжения интегрируют клеточный и тканевой уровни организации.

Консерватизм базовых механизмов раннего эмбриогенеза позволяет использовать в качестве модели для изучения молекулярных и физических факторов, участвующих в эпителиальных морфогенезах, зародышей шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, для которых разработан и оптимизирован широкий спектр современных экспериментальных методик. Результаты, полученные на *Xenopus*, могут быть полностью или частично перенесены на другие группы позвоночных животных.

## **Цели и задачи**

### *Цели*

- 1) Получить детальные морфометрические характеристики изменения формы эпителиальных клеток в ответ на релаксацию механического натяжения в эмбриональной ткани *Xenopus*.
- 2) Исследовать ответ эмбриональных эпителиальных пластов *Xenopus* на искусственную деформацию внешней силой.
- 3) Исследовать влияние растяжения эмбриональной ткани на уровень экспрессии некоторых структурных белков и их внутриклеточную локализацию.

Для достижения указанных целей были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать динамику морфологических и морфометрических характеристик эпителиальных клеток двойных эксплантатов крыши бластоцеля зародышей *Xenopus laevis* в ответ на релаксацию.
- 2) Исследовать клеточную динамику и морфологию согнутых двойных эксплантатов эмбриональной ткани зародышей *Xenopus laevis*.
- 3) Оценить динамику механических напряжений, распределенных по поверхности согнутых двойных эксплантатов эмбриональной ткани зародышей *Xenopus laevis*.
- 4) Выяснить роль эндоцитоза и динамики цитоскелета в изменении формы эпителиальных клеток согнутых двойных эксплантатов эмбриональной тканей *Xenopus laevis*.
- 5) Выявить региональные различия активных ответов эпителиальных клеток, вызванных искусственным сгибом участка крыши бластоцеля и супрабластопоральной области зародышей *Xenopus laevis*.
- 6) Выяснить, какие гены структурных белков эпителиальных клеток изменяют уровень экспрессии в ответ на растяжение.
- 7) Исследовать локализацию данного белка в эпителиальном пласте при механозависимом изменении его экспрессии в эксплантатах крыши бластоцеля зародышей в *Xenopus*.

### ***Научная новизна работы***

Впервые на зародышах шпорцевой лягушки показано, что изменение формы эпителиальных клеток (устолбление и апикальное сокращение) зависит от изменения механического напряжения в пласте. В результате релаксации крыши бластоцеля зародышей *Xenopus* эксплантацией наблюдались множественные апикальные сокращения эпителиальных клеток. На гистологических срезах было показано, что релаксация также сопровождается устолблением клеток. Впервые была подробно исследована динамика морфометрических характеристик эпителиальных клеток в релаксированных эмбриональных тканях зародышей *Xenopus*.

Впервые исследованы клеточные и молекулярные механизмы нового явления – активного усиления кривизны искусственно деформированного участка крыши бластоцеля и супрбластопоральной области зародышей шпорцевой лягушки. Показано, что в течение первых двух часов после искусственного изгиба апикальные индексы (AI, подробно см. Материалы и Методы) клеток вогнутой стороны постепенно возрастают. Эта постепенность указывает на активную реакцию клеток на механическое воздействие. После 4 ч культивирования AI клеток вогнутой стороны уменьшается, а на растянутой стороне практически не изменяется. Обработка образцов витальной липофильной краской FM 4-64FX показала, что на вогнутой стороне эксплантата идет активный эндоцитоз. Было выяснено, что для апикального сокращения и удлинения клеток, вызванного сжатием эпителиальных клеток, беспрепятственная работа миозина II является важнее, нежели правильная структурная организация актинового цитоскелета.

Также впервые с помощью молекулярно-биологических методов показано, что растяжение двойного эксплантата крыши бластоцеля в течение 70 мин приводит к увеличению экспрессии гена *XClon4*, характерного для эпителиальных тканей. Предпринята попытка выяснить молекулярный механизм увеличения мРНК *XClon4* в ответ на растяжение эмбриональной ткани. Впервые показано, что растяжение эксплантата крыши бластоцеля в течение 70 мин приводит к изменению локализации белка гена *XClon4*.

### **Научно-практическая значимость работы**

Изучение биомеханических составляющих эпителиальных морфогенезов является чрезвычайно важным именно потому, что форма эмбрионов всех животных в период развития создается организованной работой морфогенетических процессов, таких как растяжение, изгибание или сворачивание эпителиальных пластов. Знания, полученные при исследовании этих процессов, имеют не только фундаментальную ценность, так как позволяют наиболее полно понять механизмы развития всех многоклеточных животных, но также имеют и медицинское значение. Нарушения функции и развития эпителиев играют большую роль в развитии заболеваний человека – раковых опухолей, *spina bifida* (нарушение сворачивания нервных валиков), пороков сердца и т.д. Также актуальной проблемой биоинженерии является создание клеточных структур определенной геометрии. Возможность управлять таким фундаментальным процессом развития как эпителиальный морфогенез демонстрирует эффективность механического управления ходом морфогенеза.

## **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы были доложены на Международной конференции «3<sup>rd</sup> Euro Evo Devo Conference» (Париж, 2010), Международной конференции «Biological Motility: from fundamental achievements to nanotechnologies» (Пушино, 2010), Международной конференции «Каспар Фридрих Вольф и современная биология развития» (Санкт-Петербург, 2009), Международной конференции «Morphogenesis and Dynamics of Multicellular Systems» (Heidelberg, 2009), Международной конференции «12th International Xenopus Conference» (Leiwen, 2008), международной конференции «Biological Motility: achievements and perspectives» (Пушино, 2008), XV Школе «Актуальные проблемы биологии развития» (Звенигород, 2008).

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения и выводов, изложена на 104 страницах, включает 38 рисунков. Список литературы включает 119 работ.

## **Материалы и методы**

### ***Получение зародышевого материала***

Эксперименты проводили на зародышах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, полученных методом гормональной стимуляции. Яйцеклетки и зародыши инкубировали в 0,1×MMR (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.4).

### ***Изготовление полутонких срезов***

Объекты фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида, 0,1M какодилатного буфера pH 7,5 в течение 1 ч при 20<sup>o</sup> C. После стандартной проводки заливали в Эпон812. (Kremnyov et al., 2012)

### ***Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)***

Приготовление препаратов по стандартной методике. Наблюдение производилось при увеличении 300-500х. (Kremnyov et al., 2012)

### ***Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)***

Приготовление препаратов по стандартной методике. (Kremnyov et al., 2012)

### ***Конфокальная микроскопия***

Окраска Rodamin Phalloidin по стандартной методике. Исследование проводилось с помощью конфокального микроскопа Zeiss Axiovert200m LSM 510Meta.

### **Молекулярно-биологические методы**

Работа молекулярно-биологическими методами проводилась по стандартным методикам. (Bookout et al., 2005)

### **Статистический анализ**

Для статистической оценки количественных результатов использовали программу Statistica 6.0. модуль Basic Statistics.

### **Ингибиторный анализ**

Все ингибиторы были растворены в MMR в следующих концентрациях: 1  $\mu\text{M}$  латранкулин В, 10  $\mu\text{M}$  цитохалазин D, 300  $\mu\text{M}$  ML-7, 100  $\mu\text{M}$  блеббистатини, 50  $\mu\text{M}$  Y-27632, 15  $\mu\text{g/ml}$  нокодазол и 20  $\mu\text{g/ml}$  таксол (Lee and Harland, 2007). В качестве контроля был использован 1% раствор DMSO в MMR. В каждом случае было взято по 6 образцов.

### **Операции на зародышах и обработка результатов**

Микрохирургические операции проводили на стадиях 10-10,5 (ранняя гастрюла) по Ньюкупу и Фаберу (Nieuwkoop and Faber, 1956). Перед всеми операциями студенистую оболочку снимали 2.5% раствором цистеина, желточную оболочку снимали пинцетом вручную. Все операции проводили в чашках Петри, покрытых 2% агаром в растворе MMR.

Проводили следующие операции:

1. Вырезали супраблостопоральную область эмбрионов до начала формирования дорсальной губы (стадии 8-9,5) и культивировали до образования сокращенных клеток в данной области.

2. В эксперименте по исследованию активного ответа эпителиальных пластов в ответ на релаксацию методом эксплантации эмбриональной ткани, на стадии 10-10.5 вырезали фрагменты крыши бластоцеля. Два одинаковых эксплантата складывали внутренними поверхностями друг к другу и протыкали их четырьмя тонкими (70-80  $\mu\text{m}$  в диаметре) стеклянными иглами. Эксплантаты оставляли на иглах на разные сроки (0 минут, 15 минут, 30 минут, 60 минут, 120 минут, 240 минут), после чего фиксировали на иглах (рис 1, А). В экспериментах по исследованию механического натяжения на экспрессию генов, эксплантаты, закрепленные на иглах, растягивали в течение 1 часа 10 мин., переставляя иглы в противоположные стороны. В течение часа растяжение проводили три раза: через 5 минут после вставления игл, через 5 минут после первого растяжения и 30 минут после второго растяжения (рис. 1, Б). Затем образцы фиксировали в RNAlater и проводили количественный ОТ-ПЦР.

3. В эксперименте по исследованию активного ответа эпителиальных пластов в ответ на деформацию эмбриональной ткани, на стадии 10-10.5 вырезали фрагменты крыши бластоцеля. Участки крыши бластоцеля зародышей *X. laevis* стадии 10–10.5, состоящие из слоя эпизектодермы и нескольких слоев гипозектодермы, вырезали и сращивали попарно внутренними сторонами друг к другу. Затем эксплантаты сгибали по средней линии и помещали для закрепления изгиба в бороздки, вырезанные в агаре, которым были залиты чашки Петри (рис. 1, В). Образцы инкубировали несколько секунд, 15, 30, 60, 120 и 240 мин в среде 1×MMR при комнатной температуре 24–27°C. Затем эксплантаты фиксировали для проведения конфокальной микроскопии и гистологической обработки с последующей морфометрией.

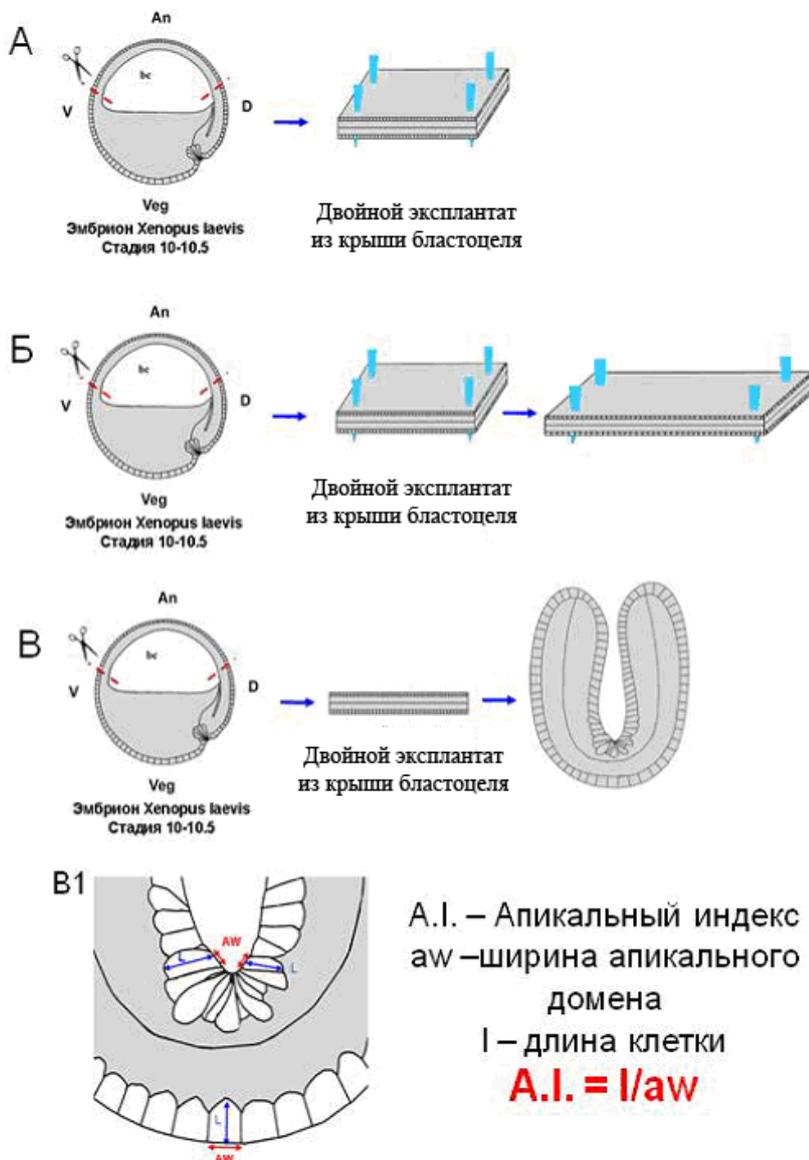


Рис.1. А. Схема операции в эксперименте по исследованию активного ответа эпителиальных пластов в ответ на релаксацию методом эксплантации эмбриональной ткани. Б. Схема операции в эксперименте по исследованию механического натяжения на экспрессию генов. В. Схема операции в эксперименте по исследованию активного ответа эпителиальных пластов в ответ на деформацию эмбриональной ткани. В1. Схема расчета апикального индекса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **I. Последствия релаксации механических натяжений в эмбриональной ткани**

#### **1.1 Формирование колбовидных клеток в релаксированной СБО.**

Описываемый опыт был повторением экспериментов Hardin and Keller, 1988, а также Lee и Harland, 2007. Мы вырезали супрабластопоральную область (СБО) эмбриона до начала гаструляции и наблюдали, как происходит формирование колбовидных клеток без физического воздействия на данную область, которое может возникать в результате других морфогенетических движений, например эпиболии. Полученные образцы окрашивали на F-актин. Результат опыта был сходен с описанным в литературе. В эксплантате по сравнению с интактным зародышем область сокращений была размыта, сокращения происходили кластерами, между которыми располагались растянутые клетки. Данный результат свидетельствует о том, что сжатие дорсальной маргинальной зоны силой, которая генерируется радиальной интеркаляцией и эпиболией в анимальной области зародыша необходимо для формирования правильного паттерна колбовидных клеток.

#### **1.2 Изменение формы эпителиальных клеток эмбриональной ткани в ответ на релаксацию.**

Так как в литературе встречается теоретические соображения (Belousov et al, 2006) и экспериментальные данные (Белоусов, 1988) в пользу того, что, образование колбовидных клеток является результатом релаксации эмбриональных тканей, мы решили исследовать данный феномен более подробно с применением новых методов исследования. Как модель были взяты двойные эксплантаты (сендвичи), изготовленные из крыш бластоцелей. При этом мы исходили из того, что при простом надсечении или вырезании ткани происходит её релаксация (Белоусов, 1987), а также имели в виду, что в данной области молекулы семейства nodal и FGF не имеют градиентов, способствующих формированию колбовидных клеток.

Сендвичи исследовали через 3, 15, 30, 60, 120 и 240 мин после начала эксплантации. Через 40 мин после эксплантации краевые раны заживлялись и наблюдались множественные апикальные сокращения клеток эпизктодермы. Апикальные сокращения могли быть диффузно распределёнными, одиночными или собранными в группы по 2-3 клетки (рис. 2, Б). Количество апикально сокращенных клеток сильно возрастает к 60 минутам и со временем не уменьшается. В тоже время клетки интактного зародыша не проявляли заметной сократительной активности, хотя единичные сокращенные клетки наблюдались. Возникает вопрос, приводят ли апикальные сокращения клеток к изменению их форм в

направлении, перпендикулярном поверхности пласта, например к образованию колбовидных клеток, которые в данной области на данной стадии развития не возникают.

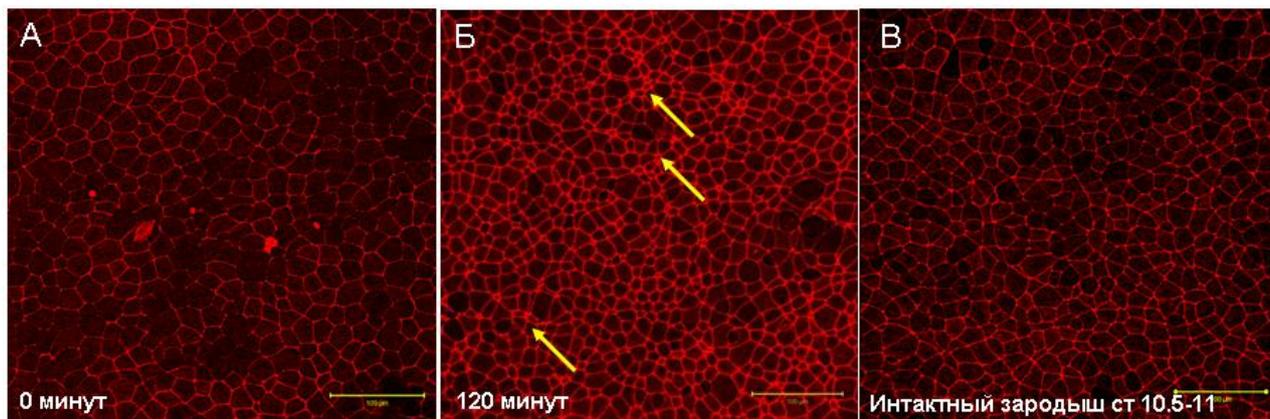


Рис 2. А, Б. Поверхности эпизктодермы эксплантатов крыши бластоцеля. А. Поверхность эпизктодермы крыши бластоцеля сразу после эксплантации. Б. Поверхность крыши бластоцеля двойного эксплантата после 120 мин культивации. Желтыми стрелками отмечены примеры апикально сокращенных клеток. В. Поверхность эпизктодермы контрольного интактного зародыша через 120 мин после начала эксперимента. Препараты окрашены на F-актин при помощи phalloidin - TRITC.

Для более подробного исследования морфологии клеток мы исследовали сколы образцов для сканирующей электронной микроскопии и поперечные срезы образцов, залитых в эпон. По микрофотографиям, полученным со сканирующего микроскопа, видно, что через 15 мин после эксплантации форма клеток эпизктодермы сходна с таковой в контроле. Но на 30 мин все клетки в пласте удлиняются и появляются колбовидные клетки: удлиненные клетки с зауженным апикальным доменом и расширенным базальным доменом. Также на одной из фотографий замечена клетка, у которой апикальный домен полностью сведен в одну точку, а базальный домен проявляет сильно выраженную двигательную активность, что проявляется в наличии множественных ламелл. Такая морфология эпителиальной клетки может свидетельствовать о процессе эпителиально-мезенхимального перехода. За последующие 30 мин морфология клеток существенно не меняется. Как правило, в это время на поверхности эксплантата проходят небольшие морфогенезы, которые выражаются в формировании углублений и выпячиваний разного размера. На 120 мин все клетки в эпителиальном пласте заметно удлиняются перпендикулярно к пласту и на сколах чаще встречаются колбовидные клетки. На 240 мин клетки в пласте немного укорачиваются.

На образцах, залитых в эпон, измеряли AI у 50 клеток, расположенных на центральных срезах каждого образца. Всего было обработано по 3 опытных и 3 контрольных образца (интактных эмбриона) для каждой временной точки. По литературным данным

клетка может считаться колбовидной, если ее AI > 5÷7. Результаты представлены в виде гистограмм для опытных и контрольных образцов (Рис. 2). Разброс AI очень небольшой: в период 1 мин - 60 мин он имеет максимум в интервале 1-2, а после 60 мин - в интервале 0-1. Заметим, что в точке 1 мин обнаружена одна клетка с индексом больше 6. Диаграммы для опытных образцов значительно отличаются от таковых контрольных образцов (Рис. 3). Уже на 15 мин наблюдается сильный разброс значений AI, хотя вплоть до 30 мин их максимальные значения остаются в пределах от 1 до 2. Далее на промежутке от 60 до 120 мин максимум AI сдвигается в интервал от 2 до 3 и сильно возрастает количество клеток с AI > 6. На 4 часа максимум опять возвращается в интервал 1 - 2 и количество клеток с AI > 6 уменьшается. Динамика изменения средних значений AI показана на Рис. 4.

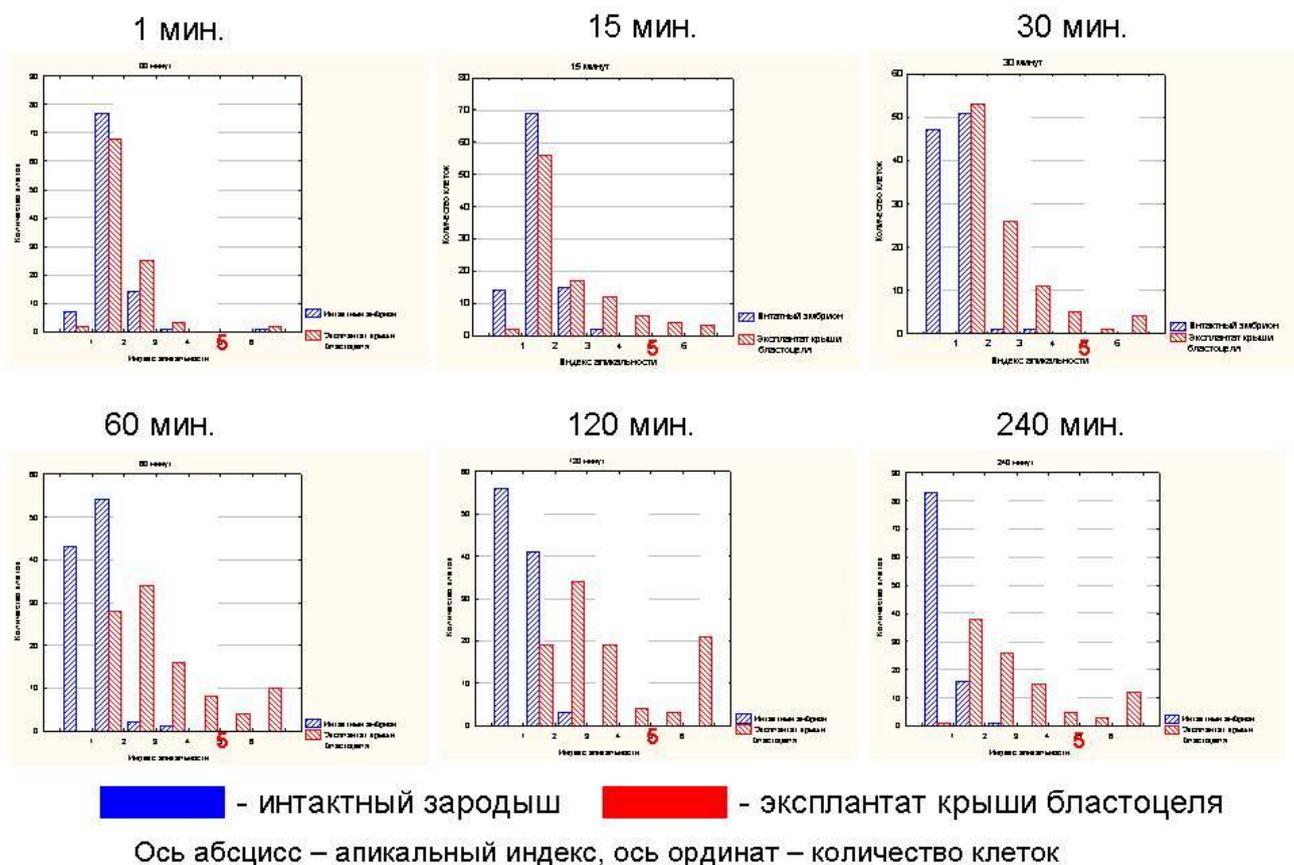


Рис 3. Сравнительные гистограммы распределения клеток по апикальному индексу в опыте и контроле для каждого времени. Синим цветом выделено распределение для интактного зародыша, красным цветом - эксплантатов крыши бластоциелы. Ось абсцисс – индекс апикальности, ось ординат - количество клеток

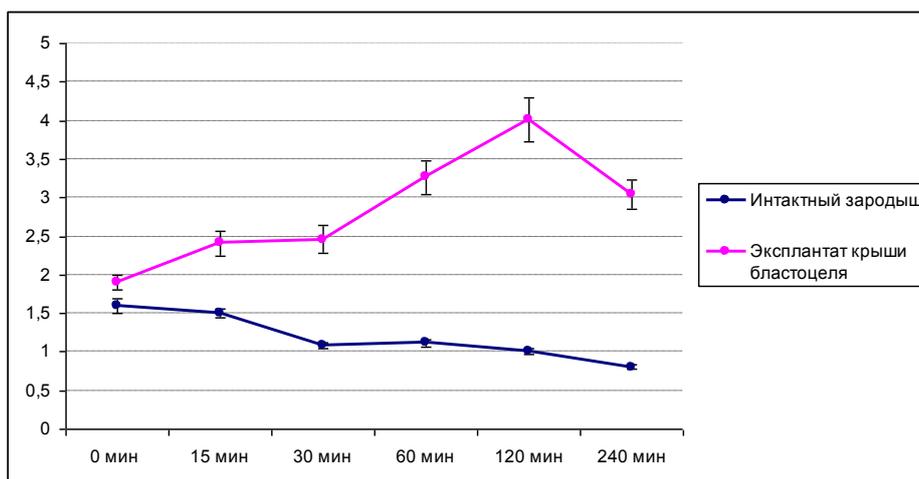


Рис. 4. Временная динамика AI в интактных зародышах и сендвичах крыши бластоцеля. За 0 мин принят момент эксплантации. Абсцисса: время в минутах, ордината: средние значения AI. Указана ошибка среднего

Хотя нашей главной задачей было исследование эпиэктодермальных клеток, мы не оставляли без внимания реакции гипоектодермальных клеток. На микрофотографии со сканирующего микроскопа видно, что гипоектодермальные клетки, являющиеся по природе мезенхимальными, в месте заживления раны между двумя фрагментами крыши бластоцеля могут принимать эпителиальный фенотип, быстро закрывая рану. Возможно, что они же через некоторое время уходят с поверхности, затягивая рану.

Также было замечено, что к 4 ч культивации внутри эксплантатов образуются полости. Они возникают одновременно в нескольких местах и постепенно сливаются. Несомненно, что самые большие полости образуются в местах, где крыши бластоцеля были прижаты неплотно, однако наблюдаются полости, которые формируются заново. Интересно, что рост полостей происходит не пассивно, например шизоцельным путем, а активным встраиванием клеток в стенку полости.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что процесс эпиболии перед и во время гаструляции является механозависимым и уплощение клеток происходит не только в результате повышения тургорного давления в бластоцеле и планарного растягивания эпиэктодермальных клеток за счет радиальной интеркаляции (Belousov et al., 2006), но и благодаря наличию тянущей силы, генерируемой в процессе инволюции. Это подтверждается тем, что максимум AI клеток эпиэктодермы резко переходит в интервал от 0 до 1 (то есть когда ширина клеток начинает превышать их высоту) как раз в тот момент, когда процесс инволюции идет наиболее активно. В отличие от интактных зародышей, в эксплантатах идет обратный процесс: вместо уплощения клеток - их удлинение вдоль апико-базальной оси. Но необходимо заметить, что в точке 240 мин максимум AI смещён левее по

сравнению с точкой 120 минут и уменьшается количество клеток с  $AI > 6$  (рис. 3). Такой эффект может быть вызван появлением полостей внутри эксплантата, которые способны создавать тургорное давление, и, следовательно, растягивать поверхность эксплантата. Тот факт, что радиальной интеркаляции в эксплантатах не наблюдается, субэпителиальные клетки теряют ориентацию и располагаются хаотично внутри эксплантата, также подтверждает данные о механозависимости этого процесса (Belousov, 2006).

## II. Активное самоусиление искусственно навязанной кривизны в эмбриональных тканях амфибий

В следующем эксперименте мы исследовали активный ответ эпителиальных пластов при деформации. Для этого мы использовали модель двойного согнутого эксплантата крыши бластоцеля *Xenopus*.

### 2.1 Клеточные движения, апикальные индексы и морфология согнутых двойных эксплантатов.

Сразу же после складывания эксплантата, края внутреннего эпителиального слоя начинают постепенно выворачиваться в сторону внешнего слоя, стараясь заживить рану между внутренним и внешним слоем двойного эксплантата. Такое движение является обычным ответом вырезанного кусочка ткани, направленное на заживление раны. Через 2-3 часа направление этих движений сменяется на противоположные, которые длятся несколько часов и ведут к сужению устья искусственной складки (Рис. 5).

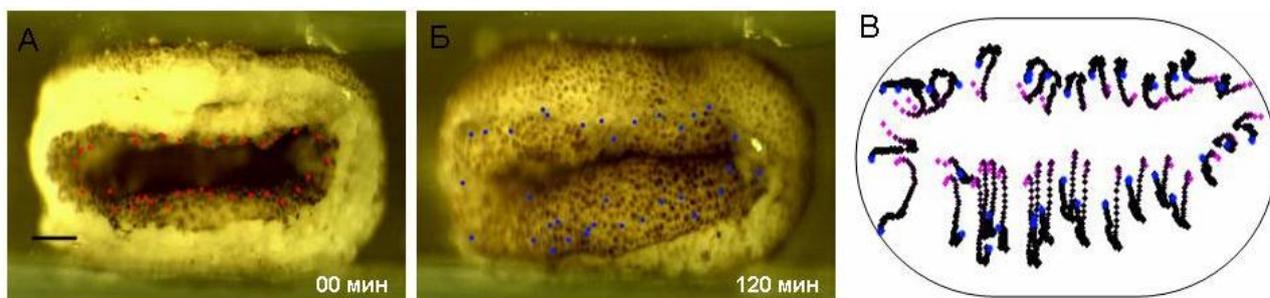


Рис 5. А,Б. Два кадра из цейтраферного фильма и (в) диаграмма клеточных траекторий в течение первых двух часов после сгибания двойного эксплантата из крыши бластоцеля. Красные точки (А): начальные положения группы клеток; синие точки (Б): конечные положения этих же клеток. Как видно из рисунка В, внутренний эпителиальный слой вначале выворачивается наружу в процессе заживления раны, но через некоторое время начинает двигаться в обратном направлении, закрывая устье согнутого эксплантата.

Уже через 2 мин после складывания эксплантата замечено увеличение  $AI$  клеток эпизододермы, расположенных на дне (на вогнутой стороне) складки. Однако в этот короткий промежуток времени апикальные поверхности клеток вогнутой стороны становятся округлыми и не проявляют никаких признаков сокращения. (Рис. 6, А) Мы

относим такие изменения к чисто пассивному ответу на сжатие. При дальнейшем культивировании АІ постепенно возрастает и сопряжен с уплощением и уменьшением апикальной поверхности клеток (Рис. 6, Г). В эпителиальном пласту вогнутой стороны сэндвича формируются протяжённые ряды столбчатых и колбовидных клеток. Это свидетельствует об активном ответе на механическое сжатие и резко отличается от поведения клеток на выпуклой стороне сложенного сэндвича и в крыше бластоцеля интактных зародышей. В клетках выпуклой стороны значения АІ существенно не меняются (Рис. 6, Б), тогда как у клеток крыши бластоцеля интактного зародыша они в течение того же периода достоверно уменьшаются (клетки уплощаются), что мы связываем с процессом эпиволии.



Рис. 6. Динамика апикальных индексов эпителиальных клеток, расположенных на вогнутой и выпуклой сторонах согнутого двойного эксплантата и эпителиальных клеток интактной крыши бластоцеля. По оси абсцисс – время после сгиба эксплантата. А и Б. Вогнутая и выпуклая стороны эксплантата сразу после сгиба. Г и Д. Вогнутая и выпуклая стороны эксплантата 2 ч после сгиба. В Интактная крыша бластоцеля до начала эксперимента. Е. Интактная крыша бластоцеля через 2 ч после начала эксперимента.

Основным результатом, полученным в этих экспериментах, является то, что эпителиальные клетки крыши бластоцеля ранней гастролы *Xenopus* активно отвечают на механическое сжатие путем сокращения апикальных доменов и удлинения клеток. Данные процессы происходят кооперативно: происходит формирование более или менее протяжённых рядов столбчатых клеток. В результате повышается напряжение вдоль всей поверхности эксплантата, создавая макроморфологический результат, а именно, самоусиление и стабилизацию искусственно навязанной кривизны, которая не характерна для данной области в данный период нормального развития. Самоусиление может быть интерпретировано в рамках модели гипервосстановления (ГВ) (Belousov et al., 2006). В

литературе уже представлено несколько активных ответов эмбриональных клеток и тканей, описываемых моделью ГВ. Например, было подробно описано клеточное поведение в ответ на растяжение эмбриональной ткани в рамках теории ГВ (Belousov et al., 2006; Troshina and Belousov, 2009). В нашем исследовании мы представляем первые свидетельства ГВ в ответ на сжатие, а именно на создание механического напряжения.

## **2.2 Тестирование динамики механических напряжений, распределённых по поверхности эксплантата, методом локальных надрезов.**

Как видно на Рис. 7, надрез, нанесённый на выгнутую сторону согнутого эксплантата, вызывает значительное расхождение краёв раны уже через 5 мин после изгиба, в то время как угол расхождения краёв на боковых стенках достигает такого же значения только через 30 мин (Рис. 7, А). Следовательно, немедленным результатом искусственного сгибания является строго локализованное растяжение выпуклой стороны и создание разницы напряжений между вогнутой и выпуклой поверхностями в зоне перегиба. Дальнейшее распространение примерно равномерного напряжения вдоль всей внешней поверхности коррелирует со срастанием противоположных эпителиальных слоёв и активным сужением устья согнутого эксплантата. Чтобы исследовать, действительно ли апикальные сокращения клеток вогнутой стороны продуцируют тянущие силы, которые поддерживают напряжение всего эпителиального слоя, мы решили проверить, имеется ли положительная корреляция между средним значением AI клеток, расположенных на сжатой стороне эксплантата в области перегиба и углом расхождения краёв надреза на внешней (выпуклой) поверхности того же образца. Для этих расчётов мы выбрали группу из шести образцов, фиксированных через 4 ч после операции. Несмотря на ограниченное число образцов, оказалось, что корреляция достоверно положительная ( $r = +0.87$ ). Следовательно, к этому времени единый согнутый эксплантат преобразуется в механически интегрированное целое, у которого напряжения генерируются сокращением апикальных доменов эпителиальных клеток вогнутой стороны у точки перегиба и распространяются оттуда вдоль всей поверхности. То, что тянущие силы, индуцированные деформацией, участвуют в формировании целостной карты напряжений эксплантата, подтверждается достоверно меньшими углами расхождения надрезов (и соответственно меньшими напряжениями) в плоских (недеформированных) эксплантатах вплоть до 2 ч культивирования. Резкое увеличение напряжений на поверхности 4-часовых плоских эксплантатов связано с образованием постепенно разрастающихся полостей. К 24 часам культивирования (что соответствует средней нейруле интактного зародыша) как у плоских, так и у согнутых эксплантатов происходит практически полная потеря напряжений. Мы связываем это с неспецифическими возрастными изменениями.

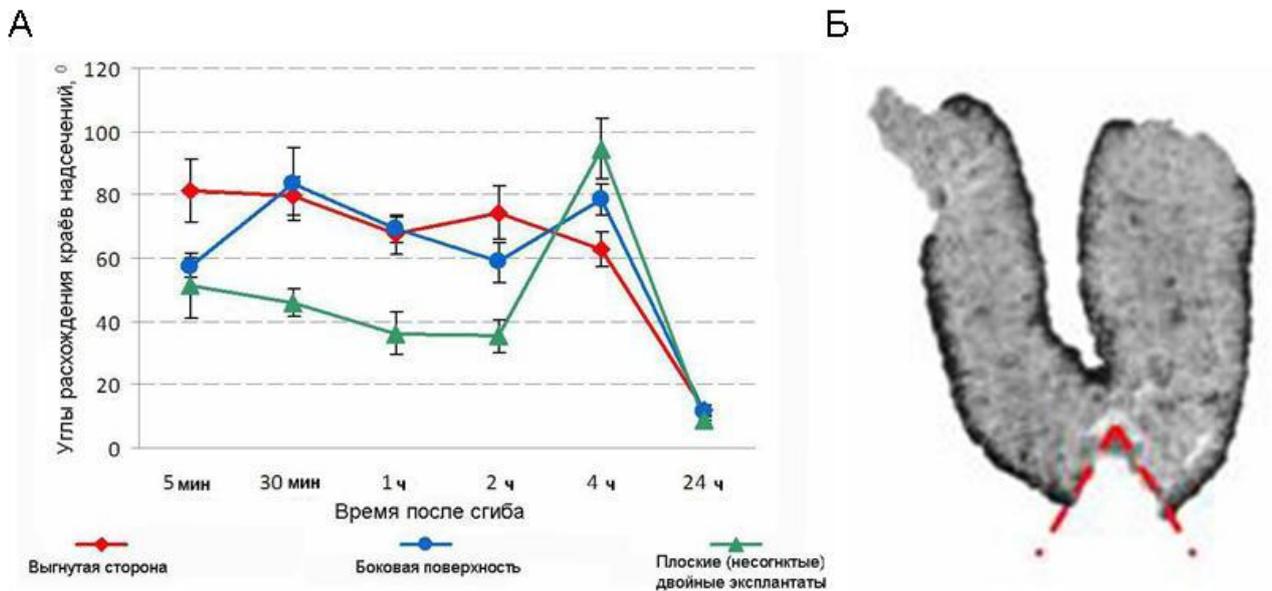


Рис. 7. А. Временная динамика углов расхождения краёв надрезов на выпуклой стороне в области перегиба (красный) и на боковой поверхности (синий) согнутого эксплантата, а также на поверхности плоского (несогнутого) эксплантата (зелёный). Показана ошибка среднего. Б. Пример тестирования механических натяжений методом надсечений. На рисунке представлен согнутый двойной эксплантат через 5 мин после изгиба. Красной пунктирной линией отмечен угол расхождения краёв после надреза.

### 2.3 Роль эндоцитоза и динамики цитоскелета в увеличении AI.

Несколькими работами было показано, что апикальное сокращение клеток сопровождается эндоцитозом апикальной мембраны (Chua et al., 2009; Lee and Harland, 2010). Для того, что бы выяснить как идет эндоцитоз в гнутых эксплантатах, мы добавляли витальную липофильную краску FM 4-64FX к 1.5 ч эксплантатам и культивировали дополнительно 30 мин. В этой временной точке (2 ч) разница AI эпителиальных клеток между вогнутой и выпнутой сторонами достигает их максимального значения. Мы обнаружили, что накопление краски в клетках вогнутой стороны превышает накопление в клетках выпнутой стороны, что говорит об активном эндоцитозе, происходящем в клетках вогнутой стороны (Рис. 8, А). Также на апикальной мембране клеток вогнутой стороны мы обнаружили активную мембранную динамику (множественные мембранные выросты), которая ни разу не наблюдалась на апикальной мембране эпителиальных клеток выпнутой стороны или клеток бластоцеля интактного зародыша. (Рис. 8, Б-Д).

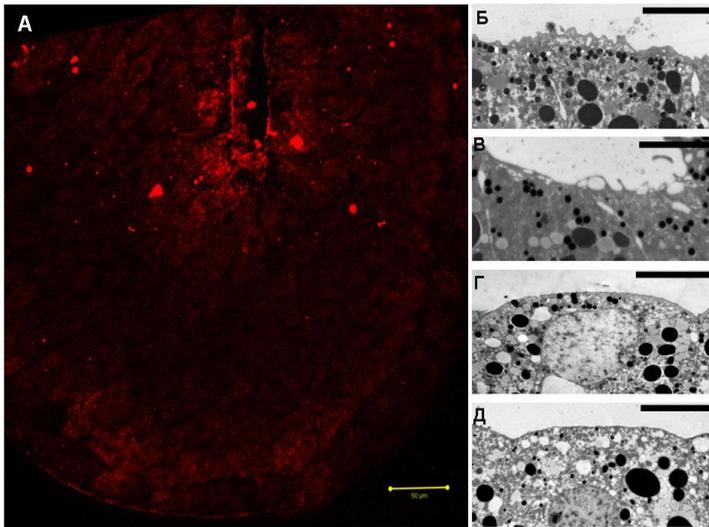


Рис. 8. Эндоцитоз и динамика апикальной мембраны эпителиальных клеток гнутых эксплантатов 2-х ч культивации. А. Более интенсивное накопление липофильной краски FM 4-64 в клетках вогнутой стороны по сравнению с клетками выгнутой стороны. Б-Д. Микрофотографии, полученные при помощи трансмиссионной электронной микроскопии, апикальных поверхностей клеток вогнутой стороны (Б и В), выгнутой стороны (Г) и интактной крыши бластоцеля (Д). На Б и В хорошо заметна активная мембранная динамика (неровная мембрана с множеством выростов).

Все цитоскелетные ингибиторы которые были использованы достоверно подавляли повышение значения АІ клеток вогнутой стороны, в то время как АІ клеток выгнутой стороны практически не изменялась. Ингибиторы в большей степени влияли на подавление апикального сокращения, чем на подавление утолбления (Рис. 9, А-В). Наиболее резко выраженный эффект вызывало добавление ML-7 или блеббистатина (нарушают работу миозина). Меньший эффект вызывало добавление цитохалазина D или ингибиторов динамики микротрубочек (нокадозол и таксол). Самый маленький эффект вызывало добавление ингибитора ROCK Y-27632.

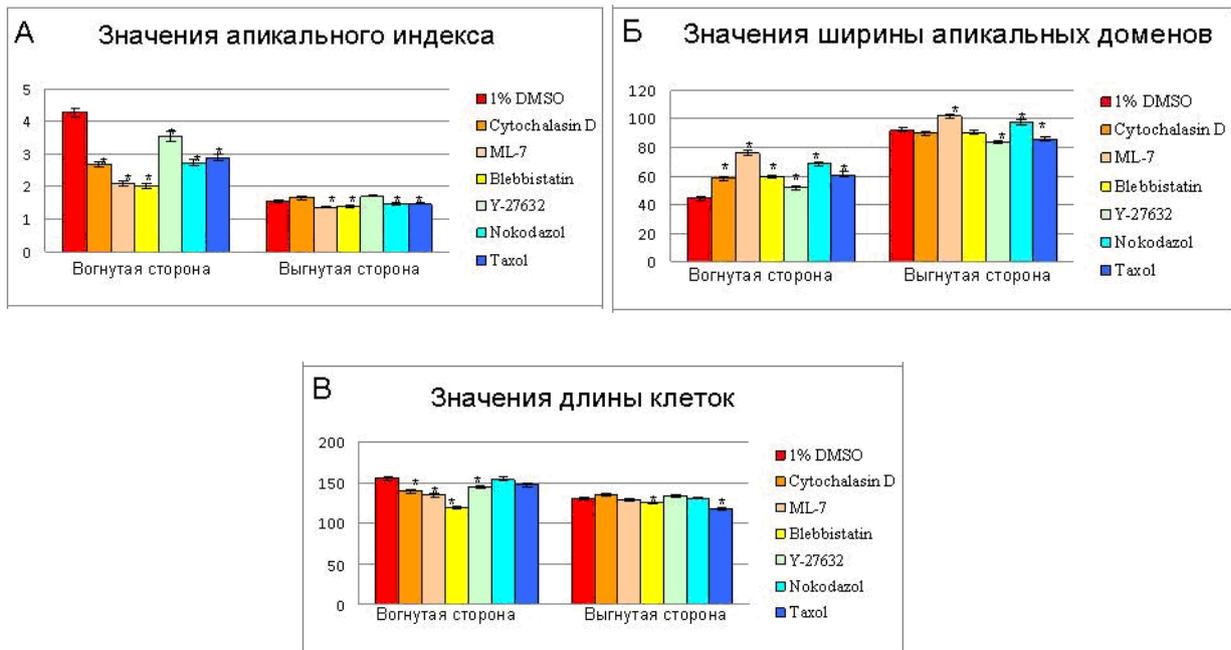


Рис. 9. Действие цитоскелетных ингибиторов (отмечены справа) на морфологические характеристики эпителиальных клеток гнутых эксплантатов 2-х ч культивации. С каждым ингибитором было взято

по 6 гнутых эксплантатов 2 ч культивирования, было обчислено по 50 клеток на образец. \* отмечено  $p < 0.05$ .

То, что самоусиление навязанной кривизны это активный процесс, подтверждается тем, что он длится на протяжении нескольких часов и блокируется различными цитоскелетными ингибиторами. Среди всех ингибиторов наиболее выраженный результат наблюдался при действии ML-7 и блеббистатина, указывая на первостепенную роль актомиозинового сокращения в ответе на сжатие. Еще одним последствием сжатия является активация эндоцитоза. Динамика цитоскелета и эндоцитоз, вероятно, тесно связаны друг с другом, так как было показано, что понижение напряжения апикальной мембраны клеток, вызванное сжатием в результате актомиозинового сокращения, может напрямую стимулировать эндоцитоз (Arodasa, 2002). Другими работами показано участие эндоцитоза в нормальном морфогенезе, а также в морфогенетическом процессе, вызванном

#### **2.4 Региональные различия активных ответов эпителиальных клеток, вызванных искусственным сгибом эмбриональной ткани Xenopus.**

Несмотря на то, что согнутые эксплантаты из всех областей крыши бластоцеля проявляли увеличение AI у клеток расположенных на вогнутой стороне, значения AI постепенно уменьшаются в переднезаднем направлении (Рис. 10, Б). Уменьшение AI происходит, в основном, за счет уменьшения высоты клетки, в то время как значения ширины апикального домена изменяются незначительно (Рис. 10, Б и Г). Сэндвичи из СБО проявляют наибольшую тенденцию выворачиваться из бороздки в агаре. После двух часов культивирования примерно половина всех сэндвичей из СБО покидают бороздку, а оставшиеся начинают удлиняться в переднее-заднем направлении и навязанная кривизна значительно сглаживается. У эксплантатов из более вентральных областей, навязанная кривизна сохраняется у 80% образцов после 4 ч культивирования и у 30% после 24 ч. По нашим наблюдениям разворачивание вентральных эксплантатов происходит за счёт возрастания тургорного давления в заново образующихся зачатках бластоцеля. То, что активные ответы на изгиб ткани проявлялись тем меньше, чем ближе изогнутые участки ткани были к заднему полюсу зародыша, оказался неожиданным. При нормальном развитии из материала СБО формируется нервная пластинка и происходит сворачивание нервных валиков. Поэтому мы предполагали, что активный ответ на изгиб будет выражен сильнее в СБО, нежели в тканях, для которых такие морфогенетические процессы на данных стадиях развития не характерны. Полученные результаты указывают на обратное и дают основания полагать, что ткани СБО, в отличие от более вентральных тканей, более строго

запрограммированы осуществлять определенные морфогенетические движения в определенном темпе, и активнее противостоять воздействиям, способным сбить четкий план развития. Это согласуется с результатами Трошиной с соавторами (2011). Они показали, что механическим растяжением ткани труднее изменить направление интеркаляции в тканях СБО, нежели направление движения клеток в тканях вентральной области.

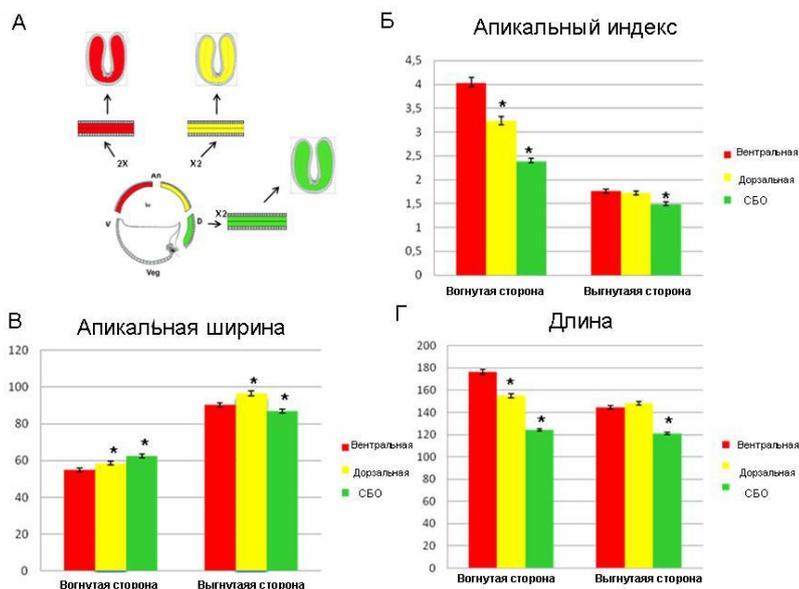


Рис. 10. Региональные различия активных ответов эпителиальных клеток, вызванных искусственным сгибом эмбриональной ткани *Xenopus*. А Схema операций. Б-Г. Диаграммы апикальных индексов, ширин апикальных доменов и длин эпителиальных клеток на вогнутой и выгнутой сторонах. Для каждой области было взято по 10 гнутых эксплантатов 2 ч культивирования, было обчислено по 50 клеток на образец. Красным цветом отмечены значения для вентральной области крыши бластоцеля, жёлтым – дорзальная сторона, зелёным – СБО. \* отмечено  $p < 0.05$ .

### III. Влияние растяжения эмбриональной ткани на уровень экспрессии генов структурных белков и внутриклеточную локализацию белков

#### 3.1 Влияние растяжения эмбриональной ткани на уровень экспрессии генов структурных белков.

Далее у нас возник вопрос: затрагивает ли изменение механического напряжения эмбриональных тканей уровень экспрессии генов структурных белков? Однако получить долговременно и равномерно релаксированный/сжатый образец эмбриональной ткани в наших условиях довольно затруднительно. Намного проще получить, более или менее равномерно растянутый продолжительное время эксплантат ткани. Для этого мы растягивали двойной эксплантат крыши бластоцеля в течение 70 мин. То, что по истечении культивирования растянутого эксплантата механическое растяжение не падает до уровня нерастянутого эксплантата, мы проверили с помощью метода надсечений. Оказалось, что угол расхождения краёв надреза на растянутом эксплантате, культивированном 70 мин, действительно существенно больше, чем на нерастянутом.

При помощи метода ПЦР в реальном времени мы оценили разницу количества мРНК нескольких генов в растянутых и нерастянутых эксплантатах. Для исследования мы взяли

гены белков клеточных контактов: С-кадгерина, Е-кадгерина,  $\beta$ -катенина,  $\alpha$ -катенина, p120, клаудина 4 (XCldn4), окклюдина, ZO-1, ZO-2, ZO-3. Эксперимент проводили в трех повторностях. Только количество мРНК гена XCldn4 во всех повторностях в растянутых эксплантатах было на 20% больше, чем в нерастянутых (Рис. 11, А). XCldn4 – трансмембранный белок, базовый элемент плотных контактов.

Также мы исключили, что увеличение экспрессии может быть связано с повреждением эксплантата при растяжении. Для этого мы клонировали ген XCldn4 и провели гибридизацию *in situ*. Мы обнаружили равномерное распределение интенсивности сигнала по всему эксплантату, как тянутому, так и нетянутому (Рис. 11, Б). Это говорит о том, что в данном случае именно растяжение ткани способствует активации экспрессии XCldn4.

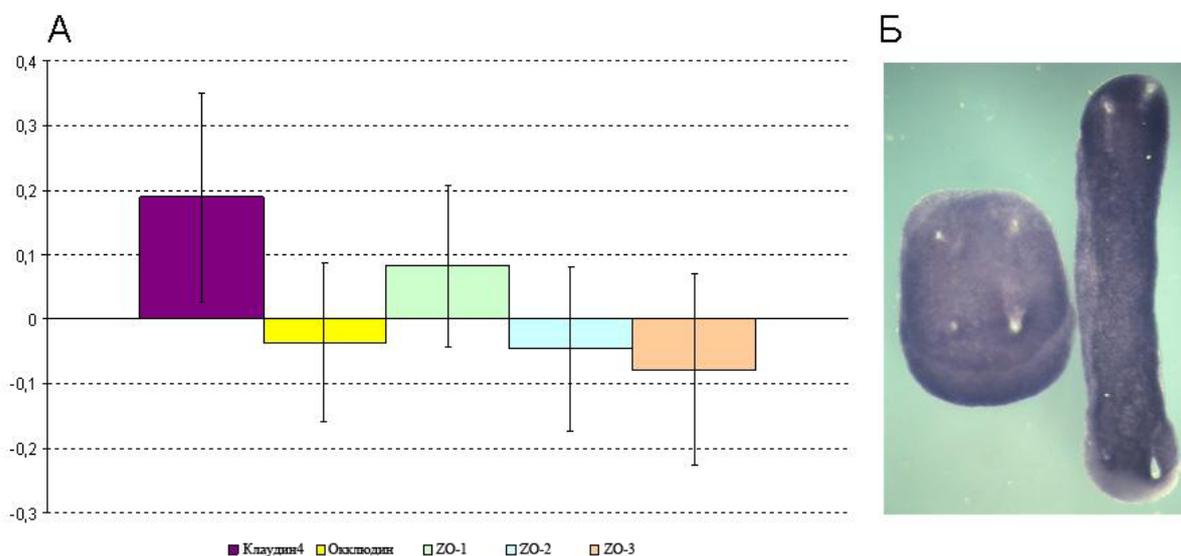


Рис. 11. А. Относительная экспрессия мРНК белков компонентов плотных контактов в растянутых эксплантатах. По оси ординат – относительное количество мРНК XCldn4. Б. *In situ* гибридизация на XCldn4 тянутого и нетянутого эксплантата.

То, что мы обнаружили изменение экспрессии только одного гена, не говорит ещё о том, что остальные гены, которые мы проверяли, не механочувствительны. Растяжение проводили в течение 70 мин, довольно короткое время, чтобы существенно изменить уровень экспрессии какого-нибудь гена. Могло просто не хватить времени, чтобы количество мРНК изменилось настолько, чтобы было возможно его детектировать. А если проводить растяжение более продолжительное время, то результат будет трудно интерпретировать. Во-первых, растянутый эксплантат постепенно сам сбрасывает натяжение и, во-вторых, в течение культивирования эмбриональная ткань меняет свои свойства согласно плану развития. В результате при длительном культивировании мы получим образец с непостоянным напряжением и изменяющимися свойствами. На протяжении

длительного эксперимента нельзя было бы отследить и учесть все изменения. То, что удалось детектировать изменение экспрессии XCl<sub>dn</sub>4, вероятно, обуславливается небольшим временем полужизни белка этого гена. Действительно, время полужизни Клаудина 4 млекопитающих всего 4 часа (Van Itallie et al., 2004). Такое динамичное обновление этого белка подразумевает постоянную активную экспрессию данного гена: именно это, скорее всего, и позволяет выявить изменение экспрессии за короткий промежуток времени.

### **3.2 Участие актомиозинового комплекса и RhoA в регуляции экспрессии XCl<sub>dn</sub>4.**

Интересным оказалось, что изменение экспрессии XCl<sub>dn</sub>4 коррелирует с динамикой F-актина. По результатам, полученным в нашей лаборатории в эксплантатах, тянутых в течение 1 ч и окрашенных на F-актин TRITC-phalloidin, интенсивность флуоресценции TRITC была существенно ниже, чем в нетянутых, что говорит как минимум о перестройке сети F-актина при растяжении ткани. Более того, было показано, что понижение напряжения сети актина с помощью цитохалазина D или блебистатина ведет к увеличению количества активной формы RhoA (K. Bhadriraju et al., 2007), а через RhoA возможна регуляция экспрессии Клаудина 2 (Guillemot L. и Citi S., 2006). Мы решили проверить, возможно ли участие этих механизмов в регуляции экспрессии XCl<sub>dn</sub>4. Для этого мы инкубировали (без растяжения) в течение одного часа анимальные шапочки в ингибиторах актомиозинового сокращения или сборки микротрубочек, после чего оценивали изменение количества мРНК XCl<sub>dn</sub>4 методом ПЦР в реальном времени. Оказалось, что количество мРНК XCl<sub>dn</sub>4 увеличивалось в присутствии всех ингибиторов актомиозинового сокращения, но практически не изменялось в присутствии ингибиторов сборки микротрубочек (Рис. 12, А и Б). Для того чтобы выяснить, вовлечена ли в этот процесс RhoA, мы закалывали в зиготу морфолино к RhoA, вырезали анимальные шапочки из наколотых морфолино эмбрионов и культивировали их также в присутствии ингибиторов актомиозинового сокращения. В данном случае увеличение количества мРНК XCl<sub>dn</sub>4 было незначительным. Из полученных результатов следует, что к стимуляции экспрессии XCl<sub>dn</sub>4 приводит регулируемое через RhoA нарушение (изменение) работы актомиозинового комплекса.

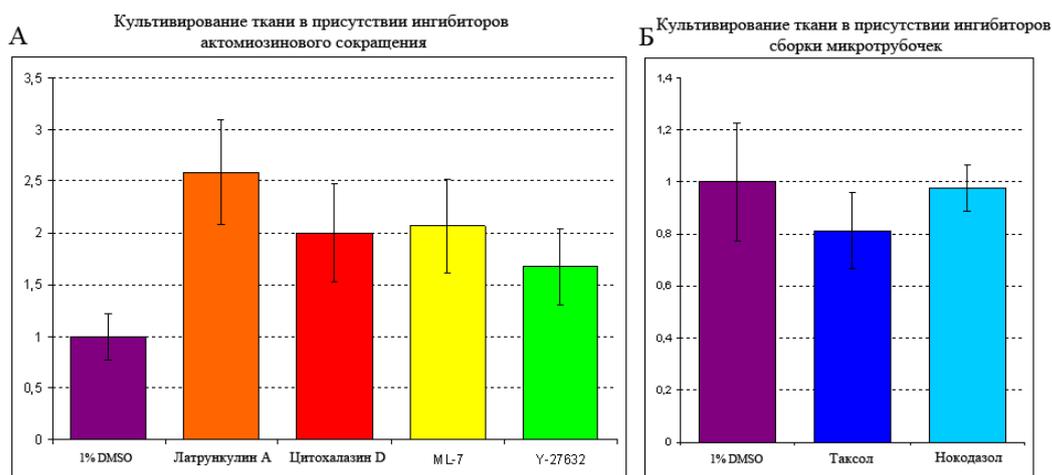
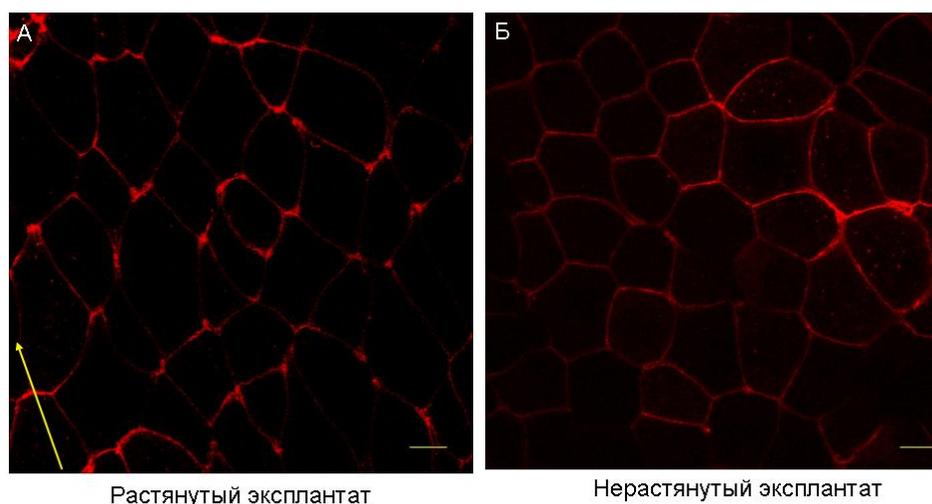


Рис. 12. Относительная экспрессия XClDn4 в эксплантированных животных шапочках, культивируемых в присутствии ингибиторов актомиозинового сокращения (А) или ингибиторов сборки микротрубочек (Б). По оси ординат – относительное количество мРНК XClDn4.

Руководствуясь полученными результатами мы предложили механизм, с помощью которого может изменяться экспрессия XClDn4 в ответ на растяжение. Возможная цепь событий такова: первым последствием растяжения является перестройка F-актина (и, соответственно, изменение напряжения актомиозиновой сети), что в свою очередь активирует RhoA, которая прямо или косвенно модулирует экспрессию XClDn4.

### 3.3 Локализация XClDn4 в зависимости от натяжения эпителиального пласта.

Далее было решено проверить, влияет ли натяжение эпителиального пласта на локализацию XClDn4. Для этого был сконструирован химерный белок XClDn4-mKate2. мРНК XClDn4-mKate2 закалывали в зиготу *Xenopus*, на стадии 10-10.5 из этих зародышей вырезали крыши бластоцеля, затем делали двойной эксплантат и растягивали на четырех иглах. Контрольные зародыши оставляли нерастянутыми. Эксплантаты находились в растянутом состоянии, как и в предыдущих опытах, в течение 70 мин. Оказалось, что в растянутых эксплантатах XClDn4 локализуется неравномерно, имея максимум локализации в узлах схождения соседних клеток, в то время как в нерастянутых зародышах он располагается равномерно по периметру клеток (Рис. 13, А и Б). Полученные результаты свидетельствуют, что растяжение эмбриональной ткани регулирует не только экспрессию XClDn4, но и локализацию его белка.



Растянутый эксплантат

Нерастянутый эксплантат

Рис.13. Локализация XCldn4-mKate2 в тянутом (А) и нетянутом (Б) эксплантате. Время культивации 70 мин. Масштабный отрезок 5 мкм.

В данном случае возникает вопрос корректности этих результатов. Влияет ли концентрация мРНК XCldn4-mKate2 на распределение этого белка в клетке? А если влияет, то, возможно, при неравномерном распределении мРНК мы просто исследовали области с разным уровнем экспрессии XCldn4-mKate2? Чтобы ответить на этот вопрос, мы исследовали распределение XCldn4-mKate2 в интактном зародыше. Несмотря на то, что в точке инъекции (место наибольшей концентрации мРНК), наблюдались внутриклеточные конгломераты XCldn4 (что в данном случае нас не интересует), распределение XCldn4 по периметру клетки не изменялось по мере удаления от места инъекции. Это говорит о том, что неравномерное распределение XCldn4 в растянутом зародыше определяется именно влиянием растяжения.

Исследования изменения локализации белка XCldn4 показали, что при растяжении клаудин 4 локализуется в местах схождения трёх и более клеток, то есть, в местах, которые в первую очередь подвержены разрыву. Вероятно, XCldn4 необходим не только для селективного пропускания ионов через клеточный пласт, но также является немаловажным компонентом поддержания механической целостности эпителиального пласта. В это предположение хорошо вписываются наши немногочисленные данные по исследованию функций XCldn4 в нормальном развитии.

## Выводы

1. Релаксация механических напряжений в супрабластопоральной области до начала гаструляции приводит к нарушениям пространственной разметки домена колбовидных клеток при закладке бластопора.

2. В релаксированных эксплантатах крыши бластоцеля ранней гаструлы *Xenopus laevis* в течение 60 минут дифференцируется фракция колбовидных клеток, резко отличающихся по апикальным индексам от нормальных эпителиальных клеток. В интактных тканях данной области этот процесс отсутствует.

3. Эмбриональные ткани *Xenopus laevis* на стадии ранней гаструлы способны активно усиливать искусственно навязанную кривизну в течение 2-3 часов.

4. Сжатие эмбриональных тканей, так же как и релаксация, активирует апикальные сокращения и утолщение клеток.

5. Активное усиление кривизны сопровождается эндоцитозом апикальной мембраны клеток вогнутой стороны складки.

6. Актомиозиновое сокращение играет главную роль в апикальном сокращении, вызванном механическим сжатием. Ингибиторы актомиозинового сокращения и динамики микротрубочек подавляют образование колбовидных клеток на сжатой стороне изогнутого двойного эксплантата.

7. Реакция активного усиления кривизны постепенно снижается в передне-заднем направлении зародыша.

8. Уровень экспрессии одного из генов структурных белков межклеточных контактов – Claudin 4 – достоверно повышается в эксплантатах вентральной эктодермы, растянутых в течение 70 мин.

9. Предложена модель регуляции экспрессии Claudin 4 через посредство актомиозинового комплекса и сигнального пути RhoA/ROCK.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

### Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Kremnyov SV, Troshina TG, Belousov LV. Active reinforcement of externally imposed folding in amphibians embryonic tissues // *Mech Dev.*, 2012, V. 129, p. 51-60.

2. Кремнёв С. В. Изменение формы эпителиальных клеток зародышей шпорцевой лягушки при деформации клеточного пласта // *Биофизика*, 2010, Т. 55, № 6, с. 1094-1098.

3. Kornikova ES, Troshina TG, Kremnyov SV, Belousov LV, Neuro-mesodermal patterns in artificially deformed embryonic explants: a role for mechano-geometry in tissue differentiation // *Dev. Dyn.*, 2010, V. 239, № 3, p. 885-96.

4. Евстифеева А.Ю., Кремнёв С.В., Белоусов Л.В. Изменения топологии и геометрии эмбриональных эпителиев шпорцевой лягушки при релаксации механических натяжений // *Онтогенез*, 2010, Т. 41, № 3, с. 1-9.

### Тезисы докладов на конференциях:

1. Kremnyov S. V. Mechanical force dependant morphogenetic events in artificially curved embryonic tissues // *Evo Devo Conference*, Paris, 2010, Conference information. p. 211.

2. Kremnyov S.V. Effects of mechanical tension decrease on cell shape of embryonic epithelia // *Biological Motility: from fundamental achievements to nanotechnologies*. Pushchino, 2010, p. 140-141

3. Кремнёв С.В. Поляризация и дээпителизация клеток эмбриональных клеток *Xenopus laevis* в связи с релаксацией механических напряжений // *Сборник тезисов «Каспар Фридрих Вольф и современная биология развития» Санкт-Петербург*, 2009, с. 45-468.

4. Kremnyov S. V., Response of epithelial cells of early *Xenopus laevis* embryos on mechanical tension decrease // *Conference: Morphogenesis and Dynamics of Multicellular Systems Heidelberg*, 2009, p.12.

5. Kremnev S. V. Intercalation and delamination in the ectoderm of *Xenopus laevis* embryos: morphometrical measurements and modeling // *12th International Xenopus Conference*, Leiuwen, 2008, p. 105.

6. Evstifeeva A.Yu., Kremnev S.V., Intercalation and delamination in mechanically tensed cell net: observations and a model, *Biological Motility: achievements and perspectives* // *Pushchino*, 2008, V. 2, p. 215-217

7. Евстифеева А.Ю., Кремнёв С.В., Перестройка механически напряжённой клеточной сети в раннем развитии *Xenopus laevis* и *Clava multicornis*: наблюдения и модель // *XV Школа «Актуальные проблемы биологии развития»*, Звенигород, 2008 с. 26-29.