

УДК 591.39: 591.31 :599.32

ЗЕЛЕНЫЙ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЙ БЕЛОК НЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЯ НА РАЗВИТИЕ БЛАСТОЦИСТ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J

© 2009 г. Н. Ю. Сахарова, Е. Ф. Вихлянцева, А. А. Смирнов, А. Н. Коновалов*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

*Пуцинский государственный университет

142290 Пушино, Московская обл.

E-mail: nsakharova@rambler.ru

Поступила в редакцию 16.09.08 г.

Окончательный вариант получен 08.12.08 г.

Исследовали изменения в состоянии длительно культивируемых бластоцист, полученных от самок мышей C57BL/6 после скрещивания с самцами линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J, несущими в хромосоме 15 трансген зеленого флуоресцирующего белка EGFP. Проанализированы возможные причины разных результатов культивирования: сохранение недифференцированных клеток внутренней клеточной массы в виде плотных кластеров или их дифференцировка в клетки внезародышевой энтодермы. Сравнение событий, происходящих в бластоцистах с генотипом –/– или –/EGFP, показало, что присутствие зеленого белка не влияет на клеточные процессы. Это позволяет использовать эмбриональный материал от мышей указанной линии в опытах, требующих длительного прижизненного наблюдения над эмбриональными клетками.

Ключевые слова: мышцы, бластоцисты, культивирование, зеленый флуоресцирующий белок.

Исследование поведения эмбриональных клеток-потомков клеток бластоцисты млекопитающих в условиях *in vitro* позволяет изучать клеточные взаимодействия между возникающими субпопуляциями клеток, а именно: клетками внутренней клеточной массы (ВКМ), внезародышевой энтодермы и трофобласта. Культивируемые бластоцисты являются удобной моделью для изучения влияния различных факторов на судьбы клеток-потомков ранних бластомеров. В этом контексте представляется перспективным использование эмбрионального материала, полученного от животных, несущих ген зеленого флуоресцирующего белка EGFP. Этот белок служит четким маркером, с помощью которого можно проследить судьбу конкретных клеток как при нормальном развитии, так и в условиях эксперимента (Chalfie et al., 1994; Zernicka-Goetz et al., 1997; Xin et al., 1999; Hara et al., 2003). Использование меченных EGFP эмбриональных клеток дает возможность проследить изменения, происходящие с ними в длительный период времени и достоверно отличать клетки, являющиеся потомками культивируемой бластоцисты, от клеток фидерного слоя (Shimizukawa et al., 2005). Поскольку EGFP является чужеродным для клеток млекопитающих продуктом экспрессии введенного им трансгена (Лабас и др., 2003), возникают опасения, что он может отрицательно повлиять на раннее развитие. Так, было показано, что накопление в ранних зародышах

мышей белка EGFP нарушает их эмбриогенез (Сорокин и др., 2004; Devgan, Seshagiri, 2003; Devgan et al., 2004). Поэтому прежде всего было необходимо выяснить, возникают ли различия при культивировании клеток, несущих ген *EGFP* и не имеющих его, в условиях *in vitro*.

Мы наблюдали за изменениями, происходящими с клетками разных клеточных сублиний при культивировании бластоцист мышей C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J, несущих в хромосоме 15 трансген *EGFP*. Трансгенные мыши были получены из Джексонской лаборатории, Бар Харбор, США (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) с любезного разрешения А.В. Червонского. Чтобы исключить возможное отрицательное влияние присутствующей в эмбриональных клетках дополнительной дозы EGFP вследствие сохранения в зародышах белка, синтезированного на матрицах, унаследованных от ооцита гемизиготной самки (Смирнов и др., 2008; Devgan et al., 2004), мы использовали эмбриональный материал, полученный от самок C57BL/6 после спаривания их с гемизиготными самцами (–/EGFP). Сравнение событий, которые происходят в культивируемых бластоцистах, унаследовавших или не унаследовавших ген *EGFP*, – цель нашей работы.

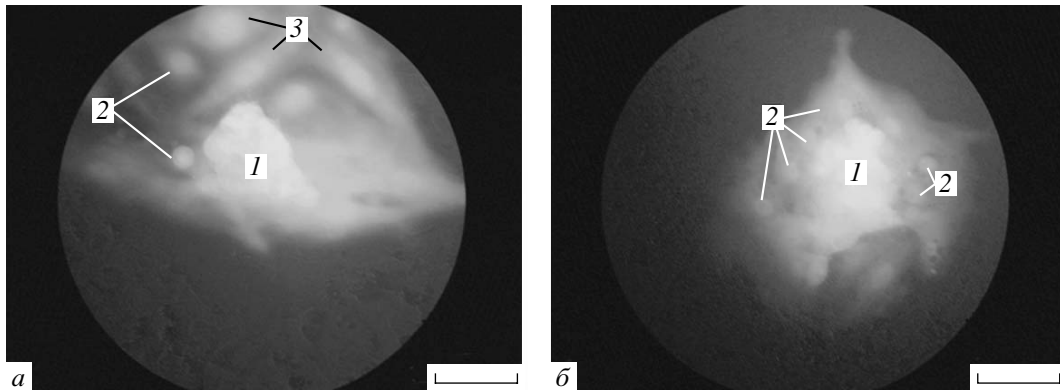


Рис. 1. Культивируемые бластоцисты $-/EGFP$ на 2-е сут после прикрепления к фидерному слою; интенсивное выселение: *a* – клеток трофобласта; *б* – клеток внезародышевой энтодермы. 1 – клетки, составляющие основное клеточное скопление, – потомки клеток ВКМ; 2 – мигрирующие клетки внезародышевой энтодермы; 3 – мигрирующие клетки трофобласта. Флуоресцентная микроскопия. Масштаб здесь и на рис. 2, 3: 100 мкм.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Зародыши, находящиеся на стадии бластоцисты – последней стадии доимплантационного периода развития, получали от самок C57BL/6($-/-$), спаренных с самцами $-/EGFP$. При таком скрещивании возникают два вида зародышей: в геноме одних включен ген *EGFP*, а у других он отсутствует. Параллельное исследование этих двух видов зародышей позволяет выявить особенности развития особей $-/EGFP$.

Бластоцисты после вылупления из *zona pellucida* переносили на фидерный слой митотически инактивированных фибробластов мыши. Для приготовления фидерного слоя клеточный монослой обрабатывали митомицином С (10 мг/мл) в течение 2 ч в CO_2 -инкубаторе. Культивирование бластоцист проводили 10 сут в среде α -МЕМ с L-глутамином (“ПанЭко”, Россия), 20%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (“Hy Clone”, США) и 1000 МЕ/мл фактора LIF (“Sigma”, США); смену среды проводили ежедневно.

Бластоцисты по одной переносили в лунки специализированного планшета, что позволило последовательно наблюдать за ростом и дифференцировкой клеток индивидуальных бластоцист. Исследование проводили с помощью микроскопа Axiovert 200 (“Zeiss”, Германия). Для сопоставления выбирали бластоцисты, которые одновременно прикреплялись к субстрату (через 3 сут после перенесения в культуральные условия); через 2 сут после их прикрепления начинали наблюдения. Для того чтобы исключить негативное влияние облучения на культивируемые клетки, наблюдения проводили в светлом поле микроскопа, лишь в последний день эксперимента использовали свет с длиной волны возбуждения 440–475 нм для детекции флуоресценции EGFP.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На следующий день после прикрепления к субстрату бластоцисты представляли собой кластеры, в центре которых находились мелкие клетки, плотно прилегающие друг к другу. Они были окружены свободно лежащими, более крупными округлыми клетками и крупными же вытянутыми фибробластоподобными клетками. Исследование с помощью флуоресцентного микроскопа (рис. 1) показало, что все клетки бластоцисты, унаследовавшей ген *EGFP*, проявляют специфическое свечение и морфологически идентифицируются как принадлежащие к трем клеточным субпопуляциям: самые мелкие клетки, составляющие сердцевину скопления, являются потомками недифференцированных клеток ВКМ; более крупные округлые принадлежат к внезародышевой энтодерме, а длинные вытянутые являются клетками трофобласта (Ouhibi et al., 1995). Наблюдение за изменениями состояния бластоцист показало, что их культивирование в течение 10 сут привело к двум разным результатам. Это позволило разделить их на две группы, в каждой из которых были бластоцисты с генотипом $-/EGFP$ и $-/-$. Ниже приведены результаты наблюдений за последовательными изменениями конкретных бластоцист разного генотипа.

Через 5 сут культивирования прикрепленные бластоцисты представляли собой крупные клеточные скопления, состоящие из смеси клеток различных субпопуляций. Все исследованные культуры имели сходный внешний вид (рис. 2, *a–г*). Основную часть таких скоплений составляла компактная масса мелких клеток, являющихся потомками ВКМ. Вокруг основного скопления располагались клетки, отличающиеся по своей морфологии от клеток-потомков ВКМ. Сопоставление с данными других авторов (Solter, Knowles, 1975; Evans, Kaufman, 1981; Tanaka et al., 2006) позволяет считать их выселяющимися клетками, активно мигрирующими по

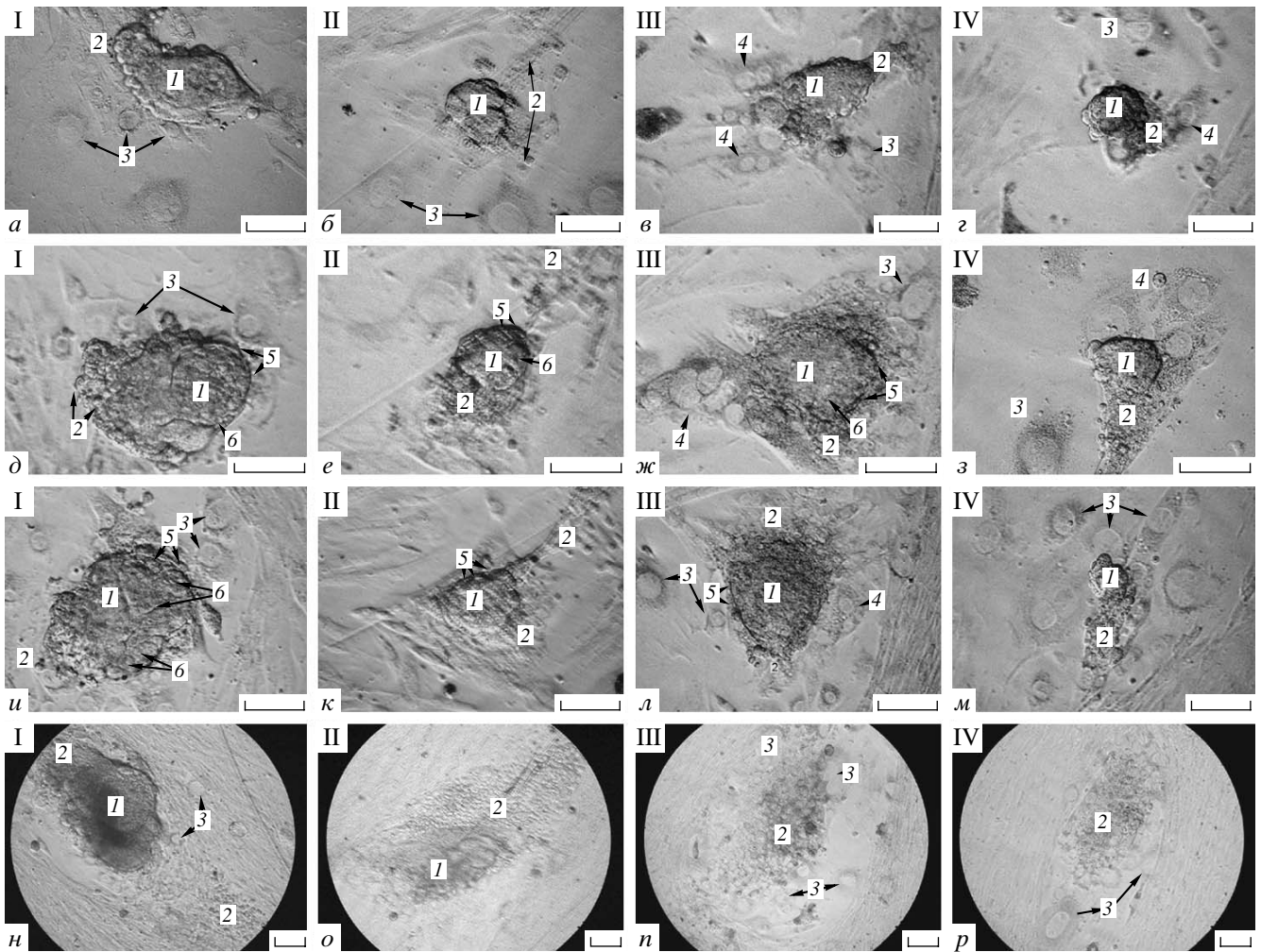


Рис. 2. Бластоцисты с генотипом $-/-$ (I, IV) и $-/EGFP$ (II, III) на 5 – 10-е сут культивирования: *a–г* – 5-е ; *д–з* – 6-е; *и–м* – 7-е; *н–р* – 10-е. 1 – скопление клеток-потомков ВКМ, 2 – клетки внезародышевой энтодермы, 3 – гигантские клетки трофобласта, 4 – многоядерные клетки трофобласта, 5 – плоские эпителиальные клетки, 6 – розеткоподобные скопления эпителиальных клеток. Световая микроскопия.

фидерному слою или по свободной поверхности лунки. Из основного скопления выходят клетки трофобласта, которые на свободной поверхности распластаются и превращаются в гигантские клетки с крупными ядрами и зернистой цитоплазмой. Другая популяция выселяющихся клеток соответствует клеткам внезародышевой энтодермы, они округлые, несколько крупнее клеток ВКМ, расположены по границе кластера клеток ВКМ и образуют отходящие от него тяжи или лежат свободно и хорошо различимы на фоне гигантских клеток трофобластического происхождения.

Через 6 сут культивирования площадь, занимаемая клетками, увеличивалась. В плотной части клеточных скоплений видны клетки с различной морфологией (рис. 2, *д–з*). Наряду с мелкими округлыми клетками различаются плоские эпителио-подобные, располагающиеся по внешней границе скопления; обособляются четкие группы полигональных и

столбчатых эпителиальных клеток. Клеточные группы сходного паттерна наблюдали ранее и при культивировании бластоцист крысы (Ouhibi et al., 1995). Вокруг плотного кластера большую площадь занимали клетки внезародышевой энтодермы, расположенные на фидерном слое или на свободной поверхности лунки, или поверх гигантских, часто многоядерных, клеток трофобласта.

Через 7 сут культивирования в строении бластоцист обнаружены различия: в одних случаях хорошо видны плотные кластеры клеток ВКМ, занимающие довольно большую площадь (рис. 2, *д, е*). Они окружены пограничным слоем плоских эпителио-подобных клеток, который отделяет их от клеток внезародышевой энтодермы и гигантских трофобластических клеток. Внутри плотных скоплений можно различить отдельные розеткоподобные группы столбчатых эпителио-подобных клеток. Кроме этого наблюдается и

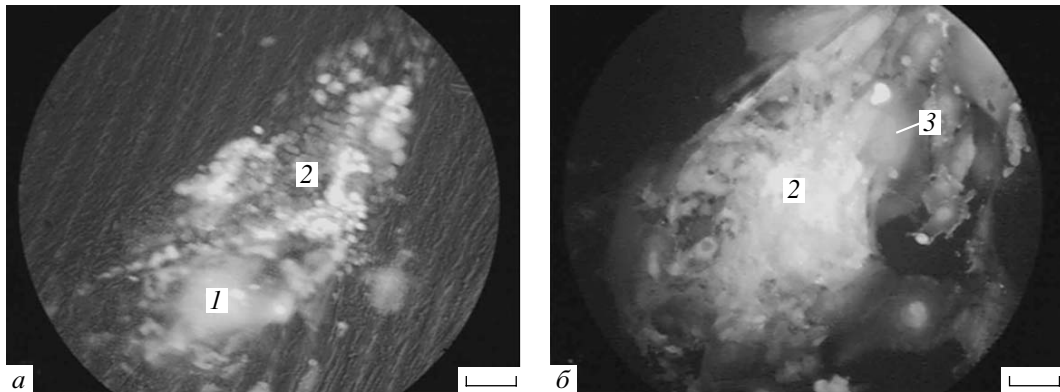


Рис. 3. Бластоцисты, несущие ген *EGFP*, на 10-е сут культивирования: *a* – то же, что на рис. 2, *o*; *б* – то же, что на рис. 2, *n*. 1 – скопление клеток-потомков ВКМ, 2 – клетки внезародышевой энтодермы, 3 – гигантские клетки трофобласта. Флуоресцентная микроскопия.

другое состояние бластоцист (рис. 2, *ж, з*): плотное клеточное скопление потомков клеток ВКМ четко не отделено от клеток внезародышевой энтодермы, занимающих большую площадь.

Через 10 сут также были обнаружены различия в состоянии бластоцист, первоначально имевших одинаковый вид: некоторые бластоцисты представляли собой плотные кластеры клеток ВКМ, в которых можно различить отдельные, довольно крупные группы клеток, разделенные четкими границами (рис. 2, *н, o*). Большая площадь занята клетками внезародышевой энтодермы. Гигантские клетки, производные трофобласта, присутствуют в незначительном количестве.

Отмечено и другое состояние культивируемых бластоцист (рис. 2, *п, р*). На месте плотного кластера недифференцированных клеток-потомков ВКМ рыхло расположены клетки, по морфологии сходные с таковыми внезародышевой энтодермы. Очертания многих клеток выражены неясно. Рыхлое скопление клеток, а также свободно лежащие клетки энтодермы находятся в окружении дегенерирующих гигантских трофобластических клеток. Можно думать, что в этом случае произошло ингибирование размножения клеток ВКМ, сопровождаемое их гибелью или дифференцировкой в клетки внезародышевой энтодермы.

Изучение материала с помощью флуоресцентного микроскопа показало, что специфическое свечение проявляли бластоцисты, которые в процессе культивирования сохраняли недифференцированные клетки ВКМ, и бластоцисты, которые их теряли. Так, сравнение изображений одной и той же бластоцисты, полученных при фотографировании в проходящем свете (рис. 2, *o*) и при облучении светом с длиной волны 440–475 нм (рис. 3, *a*), показывает, что свечение характеризует плотное скопление клеток (сохраняющиеся клетки ВКМ) и многочисленные выселившиеся клетки внезародышевой энтодермы.

Специфическое свечение обнаруживается и у бластоцисты, в процессе культивирования которой не сохранились недифференцированные клетки ВКМ (рис. 2, *п*). При этом центральное рыхлое скопление клеток выглядит как ярко светящаяся масса в центре интенсивного свечения, площадь которого совпадает с расположением гигантских трофобластических клеток (рис. 3, *б*). На общем зеленом фоне четко различаются отдельные клетки, вероятно, принадлежащие внезародышевой энтодерме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши наблюдения, культивирование бластоцист мыши в течение 10 сут привело к двум разным картинам. В одном случае сохранялось плотное скопление клеток, которые, судя по морфологическим характеристикам, являются недифференцированными потомками клеток ВКМ. Во втором – недифференцированные клетки-потомки ВКМ полностью отсутствовали и замещались клетками внезародышевой энтодермы. Проведенный анализ позволяет представить последовательность событий, приводящих к сохранению (вариант 1) или утрате (вариант 2) недифференцированных клеток-потомков ВКМ.

Вариант 1 (рис. 2, *a, б, д, e, и, к, н, o*). В ходе культивирования в бластоцистах увеличивается количество клеток и, наряду с сохранением недифференцированных клеток-потомков ВКМ, проявляется тенденция к расчленению плотного кластера на отдельные группы, состоящие из клеток, различающихся по строению. Столбчатые и плоские клетки формируют домены типа пластинок или розеток, что свидетельствует о начале эпителиальных морфогенезов (Белоусов, 2005). Плоские клетки эпителия четко определяют границы всего кластера. Граница между плотным кластером клеток ВКМ и клетками внезародышевой энтодермы сохраняется в течение всего времени

культивирования и, по-видимому, обеспечивает условия для существования недифференцированных клеток ВКМ. Клетки внезародышевой энтодермы, которые вначале расположены по краю плотного кластера клеток, интенсивно размножаются и расселяются по субстрату, но никогда не замещают клетки ВКМ. Клетки трофобласта превращаются в гигантские многоядерные клетки и на 10-е сут разрушаются.

Вариант 2 (рис. 2, в, г, ж, з, л, м, п, р). В этом случае также происходит размножение клеток и формируется плотный кластер, однако расчленение его на отдельные домены выражено слабо. В основном культивируемые бластоцисты состоят из недифференцированных клеток-потомков ВКМ. Граница между ними и интенсивно размножающимися клетками внезародышевой энтодермы отсутствует, и клетки обеих субпопуляций образуют единый пласт. Возможно, именно это создает условия, при которых клетки ВКМ перестают делиться и либо погибают, либо дифференцируются в клетки внезародышевой энтодермы.

Анализ последовательных изменений, приводящих к разному конечному результату культивирования бластоцист, позволяет считать, что более устойчивыми являются те кластеры клеток ВКМ, в которых наряду с пролиферацией идут процессы дифференцировки. Это позволяет сравнить ВКМ культивируемой бластоцисты с эмбрионидным телом, сформированным эмбриональными стволовыми клетками и представляющим собой гетерогенную популяцию из плюрипотентных недифференцированных клеток, а также из коммитированных и дифференцированных клеток, где совместно действуют факторы пролиферации и дифференцировки. Наши данные согласуются с предположением, что именно взаимодействие этих факторов, содержащихся в самих клетках, важно для создания устойчивой клеточной организации в условиях *in vitro* (Gordeeva, 2007). Вероятно, судьба клеток культивируемой ВКМ определяется теми же причинами и наличие дифференцированных клеток в составе клеточных скоплений помогает длительно сохраняться недифференцированным клеткам, которые в этом случае являются частью устойчивой системы.

На основании наших наблюдений можно предположить, что разные результаты культивирования бластоцист мышей зависят в значительной степени от взаимодействия клеток ВКМ и клеток внезародышевой энтодермы. Возможно, при втором варианте развития бластоцисты в связи с отсутствием границы между двумя рассматриваемыми субпопуляциями создаются условия для воздействия дифференцированных клеток внезародышевой энтодермы на недифференцированные клетки эпибласта. Это заставляет последних прекратить деление и, изменив свою судьбу, дифференцироваться в клетки энтодермы.

Наши данные свидетельствуют о сложных процессах пролиферации и дифференцировки, которые протекают в культивируемых бластоцистах мышей. По-видимому, длительно культивируемая бластоциста может служить хорошей моделью для изучения факторов, влияющих на состояние клеток ВКМ. В условиях культивирования, как и при нормальном развитии в составе организма, у недифференцированных клеток есть три возможных пути – пролиферация, гибель или дифференцировка. Исследование действия факторов, влияющих на выбор клетками культивируемой бластоцисты путей дальнейших преобразований, может дать новую, более подробную информацию о клеточных взаимодействиях, так как положительной стороной культивирования является замедление процессов, ведущих к дифференцировке, а это в свою очередь позволит более тщательно изучать механизмы описанных процессов.

Культивируемые бластоцисты являются хорошей моделью для изучения условий, при которых клетки ВКМ получают разную судьбу. Если считать, что после выделения популяции клеток внезародышевой энтодермы ВКМ представляет собой эпибласт, содержащий недифференцированные плюрипотентные клетки, то в условиях *in vitro* можно исследовать клеточные взаимодействия, в результате которых факторы пролиферации и дифференцировки определяют состояние тех или иных клеточных популяций.

Проведенное нами исследование показало, что EGFP, содержащийся в эмбриональных клетках и являющийся результатом экспрессии собственного гена, не оказывает отрицательного влияния на состояние клеток ни на одной из стадий их культивирования. Трансген *EGFP*, введенный в линию C57BL/6-Tg(ACVB-EGFP)1Osb/J, не влияет на выживаемость и судьбу всех трех ранних популяций эмбриональных клеток (трофобластических, энтодермальных и клеток-потомков ВКМ) при культивировании бластоцисты после ее выхода из *z. pellucida*. Данные, полученные при использовании клеток зародышей гетерозиготных мышей –/EGFP, несут объективную информацию о процессах, происходящих в культивируемых бластоцистах, и помогают более точно проанализировать поведение конкретной клетки.

Авторы приносят глубокую благодарность Б.К. Гаврилюку (ИТЭБ РАН) и О.Ф. Гордеевой (ИБР РАН) за научные консультации и обсуждение полученных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии. М.: Наука, 2005. 367 с.

Лабас Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф. Свет и цвет живых организмов. Флуоресцирующие и цветные белки // Природа. 2003. № 3. С. 33–43.

- Смирнов А.А., Шишова Н.В., Сахарова Н.Ю. и др. Локализация зеленого флуоресцирующего белка в доимплантационных зародышах мышей // Клет. технологии в биологии и медицине. 2008. № 1. С. 39–44.
- Сорокин А.В., Нониашвили Е.М., Сасина Л.К. и др. Экспрессия гена зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) на начальных стадиях развития мышечных зародышей // Цитология. 2004. Т. 46. С. 942–943.
- Chalfie M., Tu J., Euskirchen G. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // Science. 1994. V. 263. P. 802–805.
- Devgan V., Seshagiri P.B. Successful development of viable blastocysts from enhanced green fluorescent protein transgene-microinjected mouse embryos: comparison of culture media // Mol. Reprod. Devel. 2003. V. 65. P.269–277.
- Devgan V., Rao M.R.S., Seshagiri P.B. Impact of embryonic impression of enhanced green fluorescent protein on early mouse development // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004. V. 313. P. 1030–1036.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.
- Gordeeva O.F. Pluripotent cells in embryogenesis and teratoma formation // Stem Cells and Cancer / Ed. Parsons D.W. N.Y.: Nova Sci. Publ. Ink., 2007. P. 62–85.
- Hara M., Wang H., Kavamura T. et al. Transgenic mice with green fluorescent protein labelled pancreatic beta-cells // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. V. 284. P. E177–E183.
- Ouhibi N., Sullivan N.F., English J. et al. Initial culture behavior of rat blastocysts on selected feeder cell lines // Mol. Reprod. Devel. 1995. V. 40. P. 311–324.
- Shimizukawa R., Sakata A., Hirose M. et al. Establishment of a new embryonic stem cell line derived from C57BL/6 mouse expressing EGFP ubiquitously // Genesis. 2005. V. 42. P. 47–52.
- Solter D., Knowles B.B. Immunosurgery of mouse blastocyst // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 5099–5102.
- Tanaka N., Takeuchi T., Neri V.G. et al. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free system: applications and preliminary results in a murine model // J. Transpl. Med. 2006. V. 4. P.20–36.
- Xin X., Yu J.S., Tsung H.Ch. et al. The developmental fate of green fluorescent mouse embryonic germ cell in chimeric embryos // Cell Res. 1999. V. 9. P. 201–208.
- Zernica-Goetz M., Pines J., McLean H.S. et al. Following cell fate in living mouse embryo // Development. 1997. V. 124. P.1133–1137.

Green Fluorescent Protein has no Effect on Blastocyst Development in C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J Mice

N. Yu. Sakharova, E. F. Vikhlyantseva, A. A. Smirnov, and A. N. Konovalov*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Pushchino State University, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

e-mail: nsakharova@rambler.ru

Abstract—The changes in the state of long-term culture of blastocysts derived from female C57BL/6 mice after crossing with C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J males with a green fluorescent protein transgene EGFP on chromosome 15 were studied. Possible causes of different culture results were analyzed: the preservation of undifferentiated cells as dense clusters in the inner cell mass or their differentiation into extraembryonic endoderm. Comparison of the events going in blastocysts with the $-/-$ or $-/EGFP$ genotypes demonstrated that the GFP presence has no effect on cell processes. This allows us to use embryonic material from this mouse line in experiments that require long-term vital observation of embryonic cells.

Key words: mouse, blastocyst, cell culture, green fluorescent protein.