

МОРФОМЕХАНИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В ГАСТРУЛЯЦИОННЫХ ПРОЦЕССАХ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ *XENOPUS LAEVIS*

© 2017 г. Ю. И. Василегина*, С. В. Кремнёв, Д. А. Никишин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*E-mail: yulavas26@mail.ru

Поступила в редакцию 29.08.2016 г.

Изучали влияние механического натяжения на дифференцировку осевых зачатков и экспрессию гена *Chordin* в двойных эксплантатах (сэндвичах) эмбриональных тканей *Xenopus laevis*, изготовленных из тканей ранней гаструлы в вариантах, нарушающих или не нарушающих целостность дорсомедиальной области (ДМО). В первом варианте конвергентные движения клеток подавлялись и нормально структурированные осевые органы (хорда, сомиты) почти полностью отсутствовали. Однако они возникали, если такие эксплантаты были искусственно растянуты в вентродорсальном направлении. При этом осевые органы вытягивались в направлении растяжения, то есть перпендикулярно своей нормальной ориентации. Сегментированная мезодерма всегда соприкасалась с зачатками хорды. Методом гибридизации *in situ* показано, что область экспрессии гена *Chordin* также вытянута по направлению растяжения. Методом ПЦР показано, что уровень экспрессии гена *Chordin* в растянутых образцах с нарушенной структурой ДМО не отличался достоверно от такового в эксплантатах с интактной ДМО. В то же время в нерастянутых образцах с нарушенной структурой ДМО уровень экспрессии этого гена был достоверно выше. Полученные данные показывают, что механические натяжения и связанные с ними клеточные движения являются необходимыми и достаточными условиями создания правильной гистологической структуры осевых органов и регуляции экспрессии гена *Chordin*.

Ключевые слова: гаструляция, *Xenopus*, механическое напряжение, раннее развитие, осевая мезодерма (хорда, сомиты), экспрессия гена *Chordin*

DOI: 10.7868/S0475145017010128

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что в основе гаструляционных движений и формирования передне-задней (антерио-постериорной, AP) оси зародыша лежит миграция клеток дорсальной области зародыша в направлении бластопора и их латеро-медиальная конвергенция (Keller et al., 1988, 1989). Опыты по локальным сепаровкам тканей зародыша (Kornikova et al., 2009) показали, что эти движения связаны со значительными механическими напряжениями. Целью данной работы было выяснить, в какой мере правильная гистологическая структура осевых зачатков (хорды и сомитов) и экспрессия соответствующих генов зависит от гаструляционных движений и связанных с ними механических напряжений (Hamilton, 1969; Pearson, 1979). Основной экспериментальный прием состоял в конструировании таких двойных эксплантатов (сэндвичей) презумптивных тканей осевых зачатков, в которых нормальные механозависимые клеточные движения и связанные с ними механические напряжения были бы подавлены, но могли быть восстановлены искусственным растяже-

нием. Оказалось, что это может быть достигнуто, если эмбриональная ткань при изготовлении сэндвичей разрезалась по дорсо-медиальной оси. При этом обе половинки сэндвичей располагались так, что конвергентные движения клеток, направленные к этой оси, заменялись на параллельно направленные (рис. 1, III, IV). Мы обозначили использованную процедуру как разрушение дорсо-медиального аттрактора, к которому в норме стягиваются клетки дорсальной области. Такие эксплантаты можно было искусственно растягивать в вентро-дорсальном направлении (перпендикулярно направлению их естественного антеро-постериорного (AP) растяжения, рис. 1, IV), а также сравнивать получаемые результаты со структурой сэндвичей, в которых дорсо-медиальная область была не затронута (рис. 1, I, II).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление эксплантатов

Двойные эксплантаты (сэндвичи) изготавливали из двух симметричных полосок эктодермы и под-

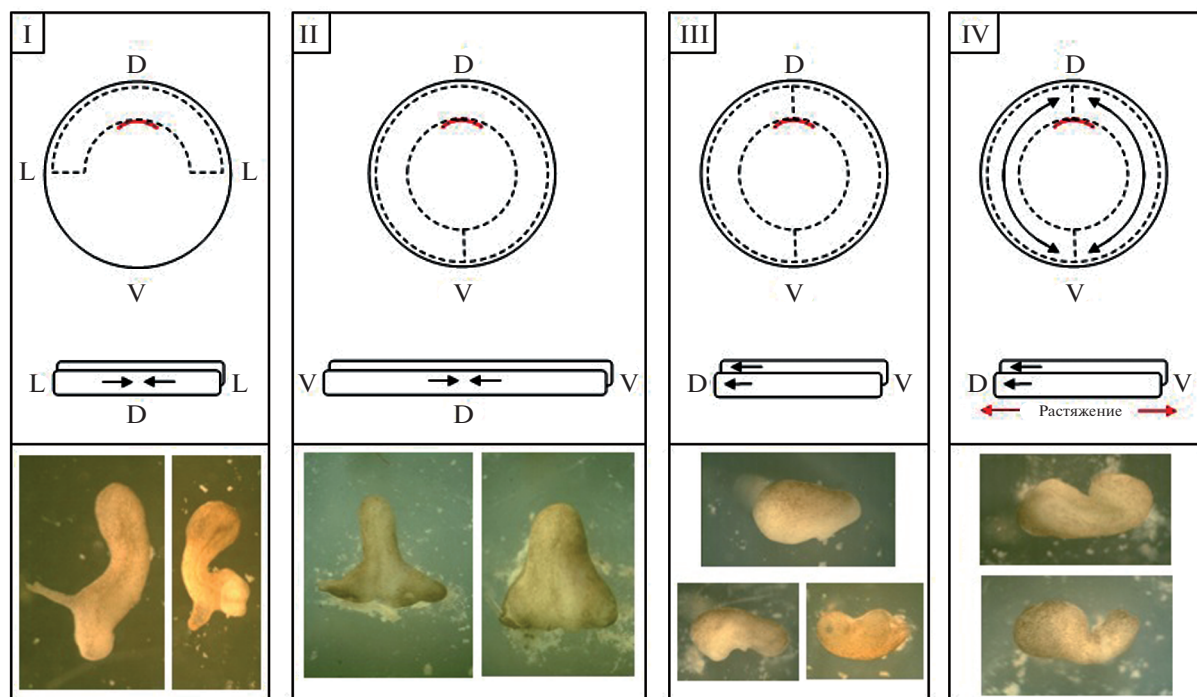


Рис. 1. Схемы экспериментов и внешняя морфология сэндвичей. Верхний ряд – схемы разрезов и локализация латеро-медиальных движений клеток в различных вариантах сэндвичей. I – нерастянутые эксплантаты, разрезы на латеральном уровне (LL); II – нерастянутые эксплантаты, разрез по вентральной линии (V); III – нерастянутые эксплантаты, разрезы по дорзальной и вентральной линиям (D и V); IV – растянутые эксплантаты, разрезы по дорзальной и вентральной линиям. Снизу: схемы сэндвичей, на которых стрелки показывают направления движений клеток в сэндвичах. В вариантах III, IV из-за взаимного расположения половинок сэндвичей конвергентные движения трансформируются в параллельно ориентированные. Нижний ряд – морфология сэндвичей через 8 ч инкубации.

стиляющей ее презумптивной мезодермы зародышей *Xenopus laevis* на стадии ранней гаструлы (стадия 10–10.5: здесь и далее стадии даны по Nieuwkoop and Faber, 1954). В первом варианте опытов перед изготовлением полосок зародыши разрезали по дорсо-медиальной и вентро-медиальной линиям (рис. 1, III). В результате дорсо-медиальная область была рассечена пополам и при сращивании полосок в сэндвичи латеро-медиальные направления в них были ориентированы не навстречу друг другу как в норме (рис. 1, I, II, горизонтальные стрелки), а в одну и ту же сторону (рис. 1, III, горизонтальные стрелки). Во втором варианте дорсомедиальная область была сохранена интактной: либо сращивали полоски, изолированные двумя латеральными разрезами (рис. 1, I), либо осуществляли один разрез по вентро-медиальной линии (рис. 1, II). В этих случаях нормальная ориентация конвергентных клеточных движений сохранялась.

Процедура растяжения сэндвичей

Растяжение сэндвичей осуществляли посредством перемещения четырех игл, введенных по-

парно в противоположные края образцов и закрепленных на агарозном субстрате. Перемещение игл производили в два этапа, через 5 и 15 мин после изготовления сэндвича. Растяжение проводили в дорсо-вентральном направлении (рис. 1, IV, изогнутые двусторонние стрелки) вплоть до достижения образцами 150% их исходной длины.

Гистологическая обработка

В период времени, соответствующий достижению нормальными зародышами стадии 23, контрольные и опытные образцы фиксировали в жидкости Буэна и обрабатывали рутинными методами для получения парафиновых срезов. Срезы окрашивали гематоксилином Эрлиха.

Гибридизация *in situ*

Для проведения гибридизации *in situ* зародыши фиксировали в растворе MEMFA, и хранили в этаноле при -20°C . Процедуру гибридизации *in situ* на целых зародышах проводили по стандартному протоколу (Harland, 1991). Выявление зонда проводили с использованием конъюгированных

со щелочной фосфатазой антител к дигоксигенину (Roche, Германия) и субстрата для щелочной фосфатазы BM Purple (Roche, Германия). Препараты обесцвечивали H_2O_2 и хранили в 96% этаноле при 4°C.

Определение относительных уровней экспрессии гена Chordin

ПЦР в реальном времени проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRMix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия). Расчет относительной экспрессии гена проводили методом $\Delta\Delta C_t$ с учетом эффективности ПЦР, определенной методом построения стандартных кривых (Bookout et al., 2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внешняя морфология сэндвичей

Как видно из рис. 1 (нижний ряд) сэндвичи, дорсо-медиальная область которых не была повреждена разрезом (варианты I, II), формировали отчетливую продольную (AP) ось. В то же время сэндвичи, при изготовлении которых эта область была разрезана, в отсутствие последующего растяжения такую ось не восстанавливали (вариант III). Между тем, так же изготовленные сэндвичи не только принимали направление навязанного им нетипичного вентро-дорсального растяжения, но и изгибались: последнее означает, что в них возникла активная сила давления, действующая в направлении растяжения (вариант IV).

Гистологический анализ осевых структур в различных вариантах сэндвичей

Гистологический анализ образцов, изготовленных на стадии ранней гастрюлы (10–11), выявил четыре группы сэндвичей (рис. 2): 1) с недифференцированной мезодермой; 2) с обособленной хордой, образованной не вакуолизированными (недифференцированными) клетками; 3) с хордой, состоящей из вакуолизированных (полностью дифференцированных) клеток; 4) с дифференцированной хордой, соприкасающейся с сомитами. Как видно из гистограммы (рис. 3), в 80% нерастянутых образцов хорда и сомиты отсутствуют, а возникающие закладки хорды сложены не до конца дифференцированными клетками. Между тем, в растянутых образцах процент отсутствия осевых закладок вдвое меньше и хорды полностью дифференцированы.

Хорда и сомиты преимущественно колокализованы (Malacinski et al., 1982; Koehl et al., 1990), то есть соприкасаются и вытянуты в одном направлении. При этом если хорда изогнута, то со-

миты располагаются со стороны ее выпуклой, то есть наиболее растянутой стороны (рис. 2г).

Таким образом, будучи приложено на стадии ранней гастрюлы, искусственное растяжение стимулирует совместное образование осевых структур (хорды и сомитов), причем осевые структуры ориентированы по направлению дорсо-вентрального растяжения, т.е. перпендикулярно их презумптивному (AP) направлению. Это говорит о том, что ориентация хорды и сомитов на этих стадиях еще не предопределена и может быть переориентирована чисто механическими воздействиями. Закладка сомитов на выпуклой (наиболее растянутой) стороне хорды подтверждает данные (Kornikova et al., 2010) о стимулирующей роли растяжения в сомитогенезе и показывает, что на ранних стадиях развития это растяжение может исходить от хорды.

В связи с обнаруженным нами подавлением формирования хорды в нерастянутых сэндвичах со стадии 10, на которой уже хорошо выражена экспрессия специфического маркера хорды гена *Chordin*, мы решили исследовать экспрессию гена в нашей модели методом гибридизации *in situ*. Нерастянутые и растянутые образцы типа III и IV (рис. 1) фиксировали через 4 и 16 ч инкубации и проводили гибридизацию. Экспрессия гена *Chordin* была выявлена как в растянутых, так и в нерастянутых эксплантатах (рис. 4). Через 4 ч инкубации метка *Chordin* во всех случаях была локализована на исходно дорзальной стороне эксплантата. В нерастянутых образцах такая же локализация сохранялась и через 16 ч, тогда как область экспрессии была по-прежнему ограничена дорзальной стороной. С другой стороны, у растянутых образцов метка была вытянута в дорзо-вентральном направлении, т.е. по направлению искусственного растяжения и перпендикулярно нормальной ориентации осевых структур. Таким образом, для экспрессии этого гена растяжение не требуется, но в отсутствие последнего нарушается нормальная локализация и форма области экспрессии.

Помимо этого, была проведена количественная оценка экспрессии данного гена в интактных зародышах и экспериментальных группах методом RT-PCR. Обнаружено, что в интактных зародышах пик экспрессии гена *Chordin* приходился на 14 и 17 стадии нормального развития (т.е. спустя 4 и 8 ч после достижения стадии 10). К 16 часам инкубации экспрессия достоверно снижалась (рис. 5).

С другой стороны, во всех экспериментальных группах (эксплантаты типа рис. 1, II с интактной ДМО, типа DV– (нерастянуты) и типа DV+ (растянуты дорсо-вентрально)) пик экспрессии гена *Chordin* приходился на 4 ч с момента изготовления эксплантатов и начала инкубации.

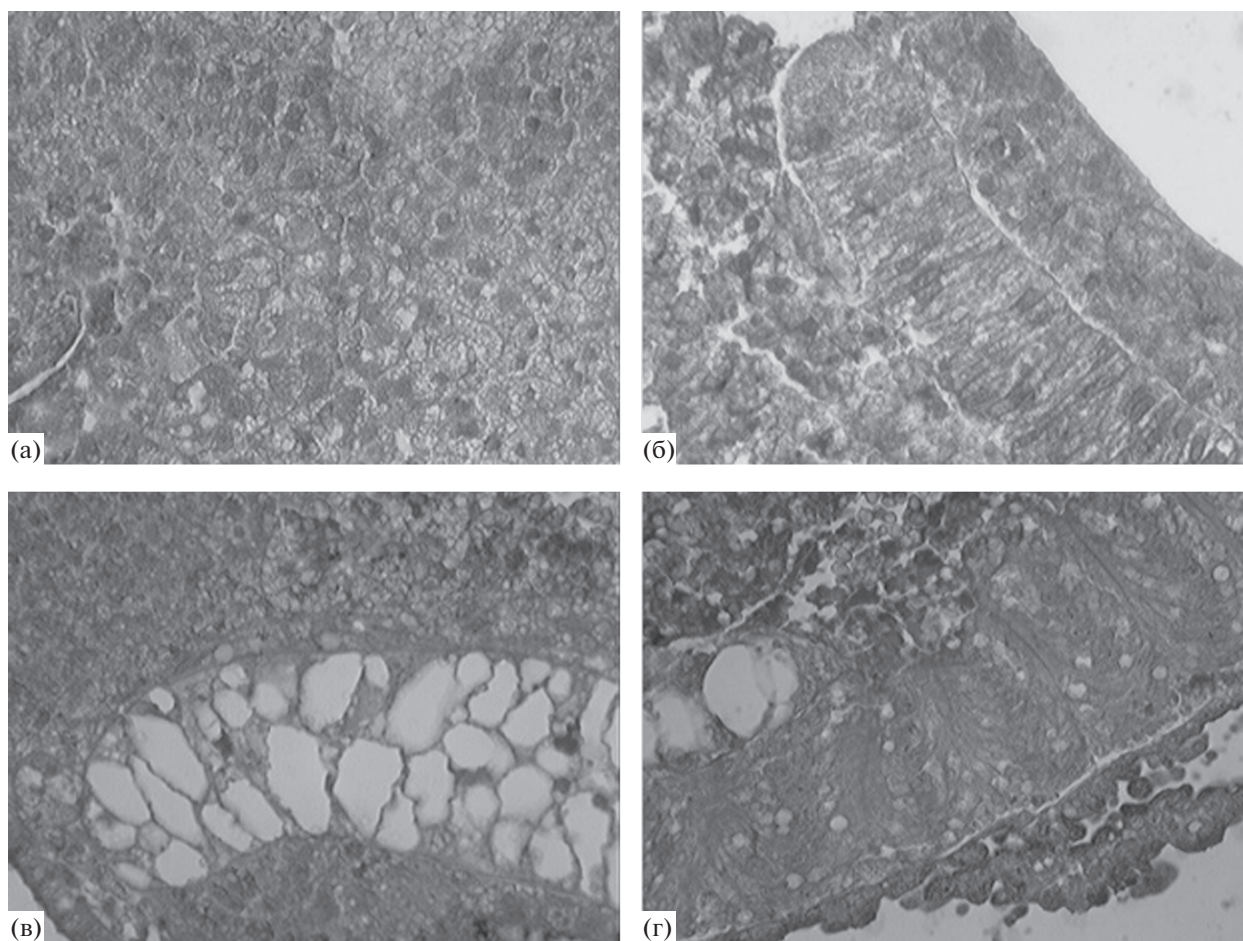


Рис. 2. Варианты гистологии сэндвичей через 16 ч инкубации. а – недифференцированная клеточная масса. б – хорда, клетки не вакуолизированы. в – хорда из вакуолизированных клеток. г – совместная закладка хорды и сомитов.

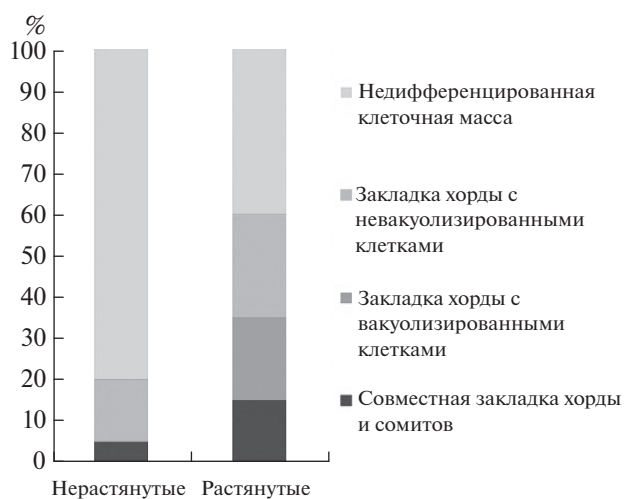


Рис. 3. Присутствие разных гистологических структур в нерастянутых и растянутых сэндвичах 16 ч инкубации, изготовленных с разрезами дорсальной области (соответствуют рис. 1, III, IV).

При этом в пределах временного промежутка между 4 и 16 ч инкубации уровень экспрессии в эксплантатах с интактной ДМО и в *растянутых* эксплантатах типа DV+ находился на одном уровне, тогда как уровень экспрессии в *нерастянутых* эксплантатах типа DV– был достоверно выше (рис. 6а, 6в).

Изложенные выше результаты показывают, что формирование осевых зачатков у зародышей амфибий является механозависимым, но эта зависимость имеет сложный характер и по-разному проявляется на разных этапах и структурных уровнях. Яснее всего механозависимость видна на этапе гистологической дифференцировки зачатка хорды: отсутствие натяжения ее подавляет (так же как и закладку мезодермальных сомитов) почти до полного исчезновения, тогда как растяжение даже в нетипичном направлении восстанавливает нормальный ход процесса. Что касается экспрессии гена *Chordin*, то здесь результат на первый взгляд парадоксален: в нерастянутых эксплантатах с подавленной диффе-

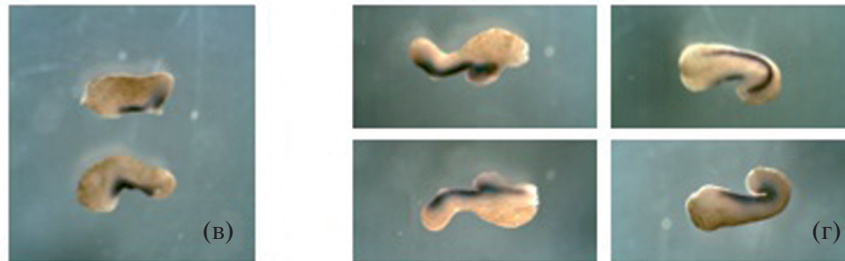
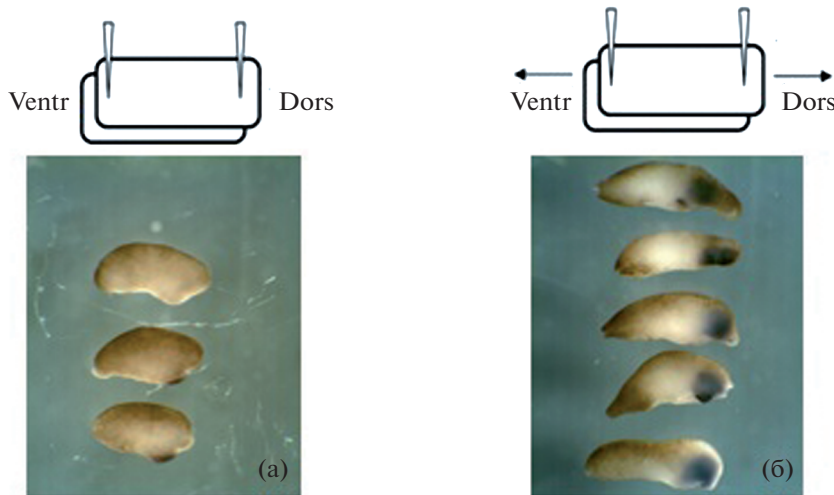


Рис. 4. Экспрессия гена *Chordin* в сэндвичах, изготовленных по типу рис. 1 III, IV. а – нерастянутые, б – растянутые, 4 ч инкубации. в – нерастянутые, г – растянутые, 16 ч инкубации.

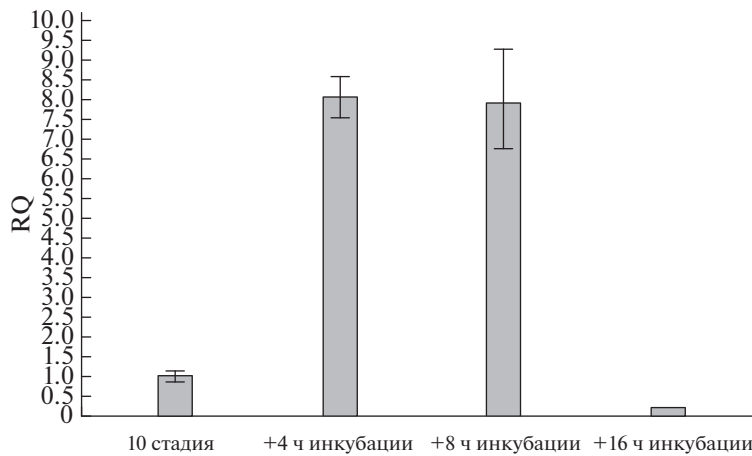


Рис. 5. Динамика экспрессии *Chordin* в интактных зародышах на стадиях 10, 13 (+4 ч после инкубации с 10-й стадией), 17 (+8 ч) и 23 (+16 ч).

ренцировкой хорды уровень экспрессии на всех исследованных сроках примерно вдвое превышает таковой в нормально или искусственно растянутых зачатках (рис. 6). По этому поводу можно высказать следующие предположения, которые не противоречат одно другому:

- 1) наблюдаемый в нерастянутых образцах уровень экспрессии является избыточным и растяжение играет роль негативного регулятора, понижающего экспрессию до оптимального уровня;
- 2) по данным Kornikova et al., (2010) в искусственно изогнутых эксплантатах супрабластопо-

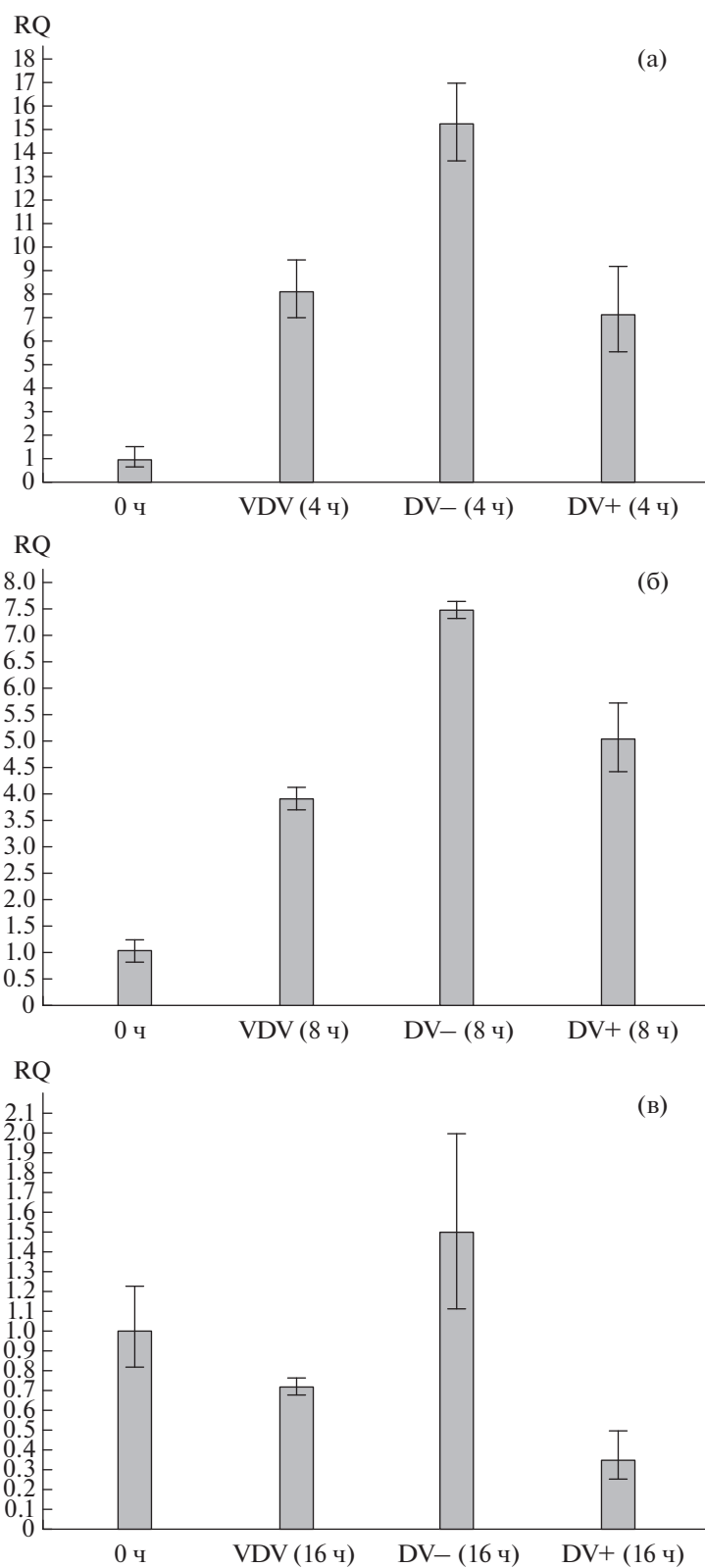


Рис. 6. Динамика экспрессии гена *Chordin* в различных группах сэндвичей. Левый столбец: контроль (немедленная фиксация всей экваториальной зоны зародыша). Три другие столбца слева направо – экспрессия в сэндвичах, из которых “VDV” соответствует рис. 1, II; “DV–” соответствует рис. 1, III и “DV+” соответствует рис. 1, IV. а – 4 ч, б – 8 ч, в – 16 ч инкубации.

ральной области нейральные дифференцировки локализируются на вогнутой (сжатой) стороне, мезодермальные ближе к выпуклой (наиболее растянутой) стороне, а хорда между ними, то есть в области наименьших деформаций.

Если такая же ситуация имеет место в нормальном развитии, то закладка хорды не требует особенно сильного или долговременного растяжения — она сама по мере своего формирования становится источником растяжения для окружающих ее тканей. В таком случае оптимум для ее формирования расположен где-то между режимом сильного и нулевого растяжения. Дальнейшие исследования должны ответить на этот и другие вопросы, связанные с механической регуляцией морфогенеза осевых зачатков.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-32085.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bookout A.L., Jeong Y., Downes M., Yu R.T., Evans R.M., Mangelsdorf D.J.* Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network // *Cell*. 2006. V. 126. P. 789–799.
- Hamilton L.* The formation of somites in *Xenopus* embryo // *Exp. Morph.* 1969. V. 22. P. 253–264.
- Harland R.M.* *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos // *Methods Cell Biol.* 1991. V. 36. P. 685–695.
- Keller R., Danilchik M.* Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis* // *Development*. 1988. V. 103. P. 193–209.
- Keller R.E., Tibbets P.* Mediolateral cell intercalation in the dorsal axial mesoderm of *Xenopus laevis* // *Dev. Biol.* 1989. V. 131. P. 539–549.
- Koehl M.A.R., Adams D.S., Keller R.E.* Mechanical development of the notochord in early tail-bud amphibian embryos // *Biomechanics of Active Movement and Deformation of Cells*. 1990. V. 42. P. 471–485.
- Kornikova E.S., Korvin-Pavlovskaya E.G., Belousov L.V.* Relocations of cell convergence sites and formation of pharyngula-like shapes in mechanically relaxed *Xenopus* embryos // *Development Genes and Evolution*. 2009. V. 219. № 1. P. 1–10.
- Kornikova E.S., Troshina T.G., Kremnyov S.V., Belousov L.V.* Neuro-mesodermal patterns in artificially deformed embryonic explants: a role for mechano-geometry in tissue differentiation // *Dev. Dyn.* 2010. V. 239. № 3. P. 885–896.
- Malacinski G.M., Youn B.W.* The structure of the anuran amphibian Notochord and a reevaluation of its presumed role in early embryogenesis // *Differentiation*. 1982. V. 21. P. 13–21.
- Pearson M., Elsdale T.* Somitogenesis in amphibian embryos. I. Experimental evidence for an interaction between two temporal factors in the specification of somite pattern // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1979. V. 51. P. 27–50.

Morphomechanical Factors in Gastrulation Process and Differentiation of Embryonic Tissue of *Xenopus laevis*

Yu. I. Vasilegina*, S. V. Kremnev, and D. A. Nikishin

Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: yulavas26@mail.ru

Received August 29, 2016

Effect of mechanical stretch on the differentiation of axial anlagen and *Chordin* gene expression was studied in sandwich explants prepared from embryonic tissues of *Xenopus laevis* at the early gastrula stage in two variants: with dissected or intact dorso-medial region. In the first case, convergent cell movements were suppressed and properly organized axial organs (notochord and somites) were almost completely absent. However, they developed if the explants of such type were artificially stretched in the ventro-dorsal direction. In this case, axial organs elongated in the line of stretching, that is in the direction vertical to their normal orientation. Segmented mesoderm was always in contact with the chord anlage. *In situ* hybridization revealed that the area of *Chordin* gene expression was also extended in the direction of stretching. PCR showed that *Chordin* gene expression in stretched explants with disrupted dorso-medial region was statistically at the same level as in the explants with intact dorso-medial region. At the same time, the corresponding gene expression in unstretched explants with disrupted dorso-medial region was statistically higher. The obtained data indicate that mechanical stretch and associated cell movements are a necessary and sufficient condition for the formation of proper histological structure of axial organs and regulation of *Chordin* gene expression.

Keywords: gastrulation, *Xenopus*, mechanical stress, early development, axial mesoderm (notochord, somites), *Chordin* gene expression