УДК 591

# РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ И МЕТОДОВ К ВИЗУАЛИЗАЦИИ МЕХАНИЧЕСКИХ НАПРЯЖЕНИЙ В ЭМБРИОНАХ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕХАНОСЕНСОРОВ

© 2018 г. Ф. М. Ерошкин<sup>а,</sup> \*, С. В. Кремнев<sup>b, c</sup>, Г. В. Ермакова<sup>a</sup>, А. Г. Зарайский<sup>a</sup>

<sup>а</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997 ГСП, Москва, В:437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 <sup>b</sup>МГУ им. Ломоносова, кафедра эмбриологии, Москва, Россия <sup>c</sup>Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия \*E-mail: Xenopus.FE@gmail.com Поступила в редакцию 15.12.2017 г.

В последнее время все большее количество данных свидетельствует о важности механических сил в эмбриогенезе. Изучение пространственно-временного распределения механических напряжений в ходе эмбриогенеза является одной из важных задач современной биологи развития. Появление генетически кодируемых флуоресцентных механосенсоров позволило применить их для прижизненного изучения механических напряжений в развивающихся зародышах неинвазивными методами. В настоящей работе нами была изучена возможность применения флуоресцентных механосенсоров на основе белков винкулина и С-кадгерина для визуализации механических напряжений в тканях зародышей курицы и шпорцевой лягушки. Нами отработаны методы экспрессии этих белков, а также детекции и компьютерной обработки изображений. Наилучшие результаты были получены на зародышах шпорцевой лягушки с использованием механосенсора на основе винкулина.

*Ключевые слова: Xenopus, Gallus,* эмбриогенез, механические напряжения, механосенсоры **DOI:** 10.1134/S0475145018060022

## введение

Изучение механизмов дальнодействующих сигналов, координирующих дифференцировку и морфогенетические движения клеток в эмбриогенезе – одна из центральных проблем современной биологии развития. Среди всех известных типов подобных сигналов, наименее изученными являются сигналы, основанные на возникновении и передаче механических напряжений, формирующихся в тканях эмбриона в результате морфогенетических движений, и клеточного ответа на эти напряжения. В последнее время накапливается все больше данных о том, что такие механические сигналы способны влиять как на морфогенез, так и на дифференцировку клеток (Eroshkin, Zaraisky, 2017; Eyckmans et al., 2011). В связи с этим изучение распределения механических напряжений в эмбрионах на разных стадиях развития является одной из важных задач в данной области. Для этого можно использовать различные подходы. Наиболее ранние эксперименты были основаны на инвазивных методах, основанных на микрохирургическом надрезании эмбриона; по

степени реакции ткани на разрез судили о степени механического напряжения в данной области зародыша (Beloussov et al., 1975; Beloussov, 2008). В последнее время появились и другие подходы и методы, например см. обзор (Stooke-Vaughan et al., 2017).

Среди прочих, на сегодняшний день возможны неинвазивные подходы с использованием флуоресцентных белков. Для таких задач был разработан механосенсор на основе двух флуоресцентных белков, разделенных эластичным мостиком. Когда белки находятся на небольшом расстоянии друг от друга, между ними происходит резонансный перенос энергии без переизлучения, так называемый FRET (Förster resonance energy transfer). При механическом растяжении эти два белка расходятся друг от друга за счет удлинения мостика, что приводит к падению FRET. Изменение уровня FRET можно детектировать с помощью флуоресцентного микроскопа, по соотношению свечения двух белков с последующим компьютерным анализом изображений. Важно, что данный метод является неинвазив-

#### ЕРОШКИН и др.

Релаксированное состояние



Рис. 1. Принципиальная схема работы винкулинового механосенсора VinTS.

ным и позволяет проводить исследования *in vivo* в течение продолжительного периода времени.

Идея применения FRET-пары из двух флуоресцентных белков для визуализации механических сил в живой клетке принадлежит исследователям из лаборатории Мартина Шварца (Martin A. Schwartz, Cardiovascular Research Center, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA). Они создали использованный в настоящей работе механочувствительный сенсор на основе винкулина, VinTS, и отслеживали с его помощью динамику напряжений в культуре клеток (Grashoff et al., 2010).

Суть данного подхода заключается в том, что описанная FRET-пара с эластичным линкером вставляется генно-инженерным методом в ген винкулина, между доменом, связывающим интегрины, и доменом, связывающий актиновый цитоскелет. Схема такого механосенсора приведена на рис. 1.

Кроме того, аналогичные подходы к изучению механических сил в живых системах используются в некоторых других лабораториях. Например, был разработан целый ряд флуоресцентных механосенсоров в составе как внутри-, так и внеклеточных белков (филамин, альфа-актинин, спектрин, коллаген и др.). При этом был использован тот же механочувствительный модуль, что и в VinTS, так и другие модули, например, в которых FRET меняется не за счет изменения расстояния между флуоресцентными белками, а за счет изменения угла их взаимодействия, см. обзоры (Guo et al., 2014; Yang et al., 2015).

Этой группой авторов была получена трансгенная линия *C. elegans*, экспрессирующая флуоресцентный механосенсор stFRET в составе коллагена (Collagen-19) (Rahimzadeh et al., 2011). Однако в данной работе изучались механические силы во взрослом животном, а не во время эмбриогенеза.

Целью настоящей работы было изучить применимость использования флуоресцентных механосенсоров на ранних эмбрионах лягушки (*X. laevis*) и курицы (*G. gallus*).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление ДНК-конструкций и синтез мРНК для микроинъекций

Винкулиновый механосенсор VinTS в плазмидном векторе *pcDNA3.1* (*pcDNA3.1-VinTS*) был получен от компании Addgene (http://www.addgene. org/26019/).

Для синтеза мРНК *in vitro* данный механосенсор был переклонирован в плазмидный вектор *pCS2*+. Плазмида *pcDNA3.1-VinTS* была обработана рестриктазой HindIII, затем фрагментом Кленова, затем рестриктазой XbaI. Соответствующий фрагмент был вырезан из агарозного геля и клонирован в плазмиду *pCS2*+, обработаную рестриктазой BamHI затем фрагментом Кленова, затем рестриктазой XbaI.

Контрольную конструкцию  $VinTS\Delta C$ , несущую делецию С-концевого домена винкулина, получили обработкой плазмиды pcDNA3.1-VinTS рестриктазой NotI с последующим лигированием "на себя". Далее полученный фрагмент был переклонирован в плазмиду pCS2+ таким же образом, как и полноразмерный фрагмент VinTS.

Плазмида для трансгеноза с помощью мегануклеазы. Нами была создана плазмидная конструкция *pISceI-VinTS*, в которой ген *VinTS* поставлен под контроль неспецифического сильного промотора CMV и фланкирован сайтами узнава-

XIC-cdh dir GAATTCCGGCATGAGGCTTCTG; XIC-cdh dir GAGCTCTACTCTTCATCATCATCTCCACC.

Амплифицированную последовательность клонировали в вектор *pAL2T* и проверяли на отсутствие нуклеотидных замен секвенированием. ния I-SceI. Для этого плазмида *pcDNA3.1-VinTS* была обработана рестриктазами SaII и XbaI, соответствующий фрагмент был вырезан из агарозного геля и клонирован в плазмиду *ISceI-pBSII SK*+ по тем же сайтам рестрикции.

Конструкция *CCadTS* была сделана в несоклько этапов.

Вначале мы клонировали полноразмерную последовательность С-кадгерина. Для этого из библиотеки кДНК при помощи ПЦР была амплифицирована полная кодирующая последовательность С-кадгерина. При этом использовались следующие праймеры (здесь и далее последовательность приводится в направлении от 5' к 3'):

Далее мы амплифицировали соответствующие Си N-концевые участки кадгерина. Для этого использовали следующие праймеры:

C-cdh_head_SpeI dir: ACTAGTATGGGGGGGCACCAGGCTTAG;
C-cdh_head_SacI rev: GAGCTCTGAAGGACGAGGTCTGTAATGTG;
C-cdh_tail_EcoRI: GAATTCCAAGATCTACTCTTCATCATC;
C-cdh_tail_SalI: GTCGACAACCCAGATGAAATTGGTAAC.

Каждый праймер имел внесенную последовательность соответствующего рестрикционного сайта для дальнейшей беспрепятственной сборки. Каждую амплицифицированную последовательность также клонировали в вектор *pAL2T* и проверяли на отсутствие нуклеотидных замен секвенированием. Окончательная сборка *CCadTS* из полученных фрагментов C-кадгерина и механочувствительного модуля из VinTS была произведена в векторе *pSport1*. После чего *CCadTS* был переклонирован в плазмиду *pCS2*+ так же, как и *VinTS*.

Полученные плазмиды pCS2-VinTS, pCS2-VinTS $\Delta C$  и pCS2-CcadTS были линеаризованы по уникальным сайтам рестрикции Acc65I, кэпированные мРНК были синтезированы *in vitro* с промотора SP6 с помощью коммерческого набора mMESSAGE mMACHINE (High Yield Capped RNA Transcription Kit, Ambion).

#### Микроинъекции

Микроинъекции в зародыши шпорцевой лягушки проводили на стадии двух бластомеров (в оба бластомера) в количестве 10 пг РНК на эмбрион.

# Цейтраферная съемка эмбрионов

Цейтраферная съемка микроинъецированных эмбрионов осуществлялась на флуоресцентном микроскопе Leica M205 FA со скоростью 1 пара фотографий в две минуты в каналах CFP ET (возбуждение – 436/20 нм, эмиссия – 480/40 нм) и GFP3 ET (возбуждение – 470/40 нм, эмиссия – 525/50 нм) (для mTFP1.0 пик возбуждения/эмиссии – 462/492 нм, FRET-донор, для mVenus – 515/528 нм, FRET-акцептор).

#### Трансгеноз

Трансгенные эмбрионы шпорцевой лягушки были получены двумя методами:

Трансгеноз с использованием мегануклеазы. Для получения трансгенных эмбрионов использовался ранее описанный метод (Ogino et al., 2006а, 2006b). Для данного метода плазмида pISceI-VinTS была предварительно обработана мегануклеазой ISceI.

Трансгеноз по методике REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration). Для получения трансгенных эмбрионов использовался ранее описанный метод (Kroll, Amaya, 1996). Для данного метода плазмида *pCS2-VinTS* была предварительно



**Рис. 2.** Результат компьютерной обработки серий изображений эмбриона *Xenopus*, микроинъецированного мРНК *VinTS*. Слева: эмбрион на стадии средней гаструлы. Справа: эмбрион на стадии поздней нейрулы. Головная часть слева.

линеаризована по уникальному сайту рестрикции Acc65I.

## Трансфекция эмбрионов курицы

Трансфекцию куриных эмбрионов проводили на стадии 3. Для проведения электропорации эпибласта эмбриона помещали в камеру для электропорации в гипоосмотрическом растворе и инъецировали раствор плазмидной ДНК в концентрации 2 мг/мкл между желточной мембраной и эпибластом. Параметры электропорации: три импульса по 6 В, 50 мс, 500 мс интервал. Детекцию сигнала проводили через несколько часов на стадии 6. При отработке метода детекцию проводили через сутки.

#### Компьютерная обработка изображений

Полученные серии фотографий обрабатывались на компьютере с помощью программы ІтageJ. Интенсивность FRET для каждой конкретной точки эмбриона оценивалась по отношению интенсивности свечения FRET-донора к интенсивности свечения FRET-акцептора с помощью встроенной функции "image calculator". Такое отношение двух интенсивностей свечения (яркостей) визуализировалось программой в виде псевдоцветов, при этом красный цвет соответствовал низкому уровню FRET (высокому уровню механических напряжений), синий – высокому уровню FRET (низкому уровню механических напряжений). Полученные серии изображений сохранялись как в формате изображений, так и в формате видео.

# РЕЗУЛЬТАТЫ

## 1. Экспрессия VinTS в эмбрионах Xenopus путем микроинъекции мРНК

Рутинным методом экспрессии чужеродных белков в эмбрионах шпорцевой лягушки является микроинъекция соответствующей синтетической мРНК на ранних (2–4 бластомера) стадиях. мРНК *VinTS* была инъецирована нами в зародыши *Xeno-pus* на стадии 2 бластомеров, для наиболее равно-мерного распределения инъецированного материала по зародышу. Эмбрионы инкубировались до стадии 12 (средняя гаструла), после чего проводилась цейтраферная микросъемка вплоть до стадии 20 (поздняя нейрула). Этот временной отрезок соответствует периоду активного конвергенного вытяжения эмбрионов.

После завершения микросъемки полученные серии изображений были обработаны с помощью программы ImageJ. Результатом такой обработки явилась серия цветных изображений с использованием псевдоцветов. При этом красный цвет соответствовал низкому уровню FRET (высокому уровню механических напряжений), синий – высокому уровню FRET (низкому уровню механических напряжений), со всеми промежуточными цветами спектра. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее сильные напряжения характерны для постериорной части эмбриона, тогда как в головной области напряжения значительно ниже или вовсе отсутствуют (рис. 2).

В качестве контроля нами была использована конструкция VinTS, несущая делецию С-концевой части винкулина (VinTS $\Delta$ C). Нужно отметить, что в аналогичной серии экспериментов с VinTS $\Delta$ C, различий в уровне FRET не наблюдалось (не показано).



**Рис. 3.** Локализация белка VinTS в клетках эмбриона *Xenopus*, флуоресценция в зеленом канале (mVenus). Слева: головная часть зародыша, пигментированная нейроэктодерма. Видно, что сенсор локализуется по мембранам клеток. В цитоплазме он тоже присутствует. Справа: постериорная часть эмбриона. Не видно четкой локализации сенсора вдоль латеробазальной мембраны клеток, но видна его локализация по периметру апикальной поверхности. Эпителиальный слой немного загибается на нас, что позволяет видеть локализацию по периметру апикальной мембраны.

## 2. Распределение белка VinTS в эмбриональных тканях Xenopus

К потенциальным недостаткам такого подхода является возможное влияние уровня экспрессии механосенсора на итоговый сигнал. Дело в том, что во внутриклеточные структуры встраивается (и, соответственно, взаимодействует с интегринами и актиновым цитоскелетом) лишь определенный процент синтезированного в клетке VinTS. При этом "избыток" VinTS, свободно находящийся в цитоплазме, будет приводить к повышенному сигналу FRET, поскольку находится в релаксированном (нерастянутом) состоянии. Таким образом, при неравномерной экспрессии повышение ее уровня экспрессии будет давать ложноотрицательный сигнал – показывать отсутствие натяжения даже там, где оно на самом деле есть.

Поэтому нами была изучена пространственная локализация белка VinTS в антериорной (головной) и постериорной частях эмбриона, что соответствует, по полученным нами данным, зоне слабого и сильного механическиго напряжения соответственно (рис. 3).

Полученные данные подтверждают достоверность полученных результатов. Они свидетельствуют о том, что различия в уровне FRET в разных отделах зародыша не являются следствием неравномерной экспрессии сенсорного белка и/или его неравномерного встраивания в клеточные контакты.

#### 3. Эксперименты на трансгенных животных

Хотя детальный анализ полученных изображений показывает, что в головном и в туловищном отделе сигнал FRET существенно отличается в тех точках, в которых общая интенсивность свечения одинакова, тем не менее, для получения надежных результатов необходимо обеспечить равномерную экспрессию механосенсора на низком или умеренном уровне.

Для этого нами было решено провести серию экспериментов с помощью трансгеноза. Для такого модельного объекта, как *Xenopus*, известны два метода создания трансгенов — с использованием мегануклеазы и REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration).

Сначала нами была предпринята попытка создать трансгенные эмбрионы по методике с использованием мегануклеазы (Ogino et al., 2006b). По сравнению с более широко применяемой методикой REMI (Kroll, Amaya, 1996), методика с использованием мегануклеазы является менее дорогостоящей и трудозатратной, и дает более низкий уровень экспрессии за счет встраивания в геном меньшего числа копий гена (Ishibashi et al., 2012), что в нашем случае могло оказаться преимуществом.

Однако, при использовании мегануклеазы зародыши демонстрировали крайне низкий уровень экспрессии механосенсора, мало отличимый от

ОНТОГЕНЕЗ том 49 № 6 2018



**Рис. 4.** Результат компьютерной обработки фотографий эмбриона, экспрессирующего механосенсор CcadTS. Слева: эмбрион на стадии средней гаструлы. Справа: эмбрион на стадии средней нейрулы. Цветовые значения такие же, как и на рис. 1. Синими стрелками обозначена головная часть зародыша, красными – туловищная.

контрольных (необработанных) зародышей, что заставило нас использовать методику REMI.

Полученные при помощи REMI эмбрионы на изучаемых стадиях демонстрировали умеренный уровень экспрессии VinTS, что позволило провести цейтраферную съемку с последующим анализом. Полученные при этом результаты принципиально не отличаются от результатов при микроинъекции мPHK.

#### 4. Кадгериновый механосенсор CCadTS

Флуоресцентный сенсор VinTS реагирует на механическое напряжение между интегринами и F-актином, при этом часть механических сил, возникающих в эмбрионе, могу передаваться через клеточные структуры, в которых винкулин отсутствует. Поэтому нами было решено сконструировать механосенсор на основе одного из белков адгезионных контактов.

Для этого нами была создана конструкция, несущая тот же механочувствительный модуль, что и в VinTS (FRET-пара, соединенная эластичным линкером), в составе молекулы С-кадгерина (рис. 4). Нами был выбран С-кадгерин, так как именно этот тип кадгеринов является основным компонентом адгезионных контактов в раннем развитии *Xenopus* (Lee, Gumbiner, 1995; Nandadasa et al., 2009).

Из литературы известно, что биосенсор на основе кадгерина имел наибольшую эффективность, когда сам механосенсорный модуль (два флуорофора с эластичным доменом между ними) располагался во внутриклеточном домене кадгерина между областями связывания p120 и бета-катенина (Conway et al., 2013). Таким образом, механосенсорный модуль находится перед бета-катенинсвязывающим доменом, который посредством других вспомогательных белков крепится к актиновым филаментам. Такой биосенсор получил название CCadTS.

Экспрессия CCadTS также производилась путем микроинъекции синтетической мРНК *CCadTS* в зародыши, как и в случае VinTS. Цейтраферная съемка и компьютерная обработка изображений производилась аналогично.

В отличние от VinTS, экспрессия CCadTS привела к диссоциации эмбрионов приблизительно на стадии нейрулы на отдельные клетки. Подобное "рассыпание" на клетки напоминает эффект, вызываемый инкубацией эмбрионов в среде без кальция, что приводит к потере клеточных контактов. Подобный же эффект вызывается блокированием экспрессии зиксина, одного из ключевых белков клеточных контактов (Martynova et al., 2008). Такой эффект CCadTS может объясняться тем, что встраивание довольно громоздкого механочувствительного модуля в состав С-кадгерина приводит каким-то образом к нарушению его функции. Таким образом, он может начать работать как доминантно-негативный белок, ослабляя межклеточные связи (см. обсуждение). Тем не менее, нам удалось произвести цейтраферную съемку эмбрионов на более ранних стадиях.

Полученные результаты в целом повторяют результаты, полученные с помощью сенсора VinTS, однако являются при этом менее ярко выраженными. Выявляемые CCadTS механические напряжения повышены в туловищных отделах эмбриона и понижены в головных. Таким образом, использование двух различных механосенсоров, VinTS и CCadTS, привело к сходным результатам, что свидетельствует о достоверности полученных экспериментальных данных. Тем не

#### РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ И МЕТОДОВ К ВИЗУАЛИЗАЦИИ



**Рис. 5.** Экспрессия механосенсора VinTS в куриных эмбрионах. Верхний ряд — фотограция в обычном свете, нижний — флуоресценция в зеленом канале (mVenus). Хорошо виден мозаичный характер экспрессии в отдельных клетках.

менее, остается необходимость проведения контрольных экспериментов с использованием конструкций VinTS $\Delta$ C и CCadTS $\Delta$ C, в которых FRET не изменяется под действием механических сил.

## 5. Эксперименты на ранних эмбрионах курицы

Помимо шпорцевой лягушки, мы предприняли попытку провести эксперименты на других модельных организмах. Для этого мы экспрессировали механосенсор VinTS в эмбрионах курицы с помощью стандартного метода электропорации плазмиды.

Данный метод привел к мозаичной экспрессии целевого гена в эмбриональных тканях. При этом в пределах одной клетки нами наблюдалась неравномерность в распределении напряжений: механическое напряжение на клеточной мембране детектировалось в 4—5 раз выше, чем в цитоплазме. Однако, разницы в степени напряжения между различными регионами зародыша мы не наблюдали. Таким образом, к сожалению, используя данную методику, сделать какие-то опре-

ОНТОГЕНЕЗ том 49 № 6 2018

деленные выводы о механических напряжениях в эмбрионах курицы невозможно (см. рис. 5). Мы можем предположить, что создание трансгенной линии, равномерно экспрессирующей данный механосенсор, способно прояснить данный вопрос. Однако, ввиду трудоемкости, это выходит за рамки настоящей работы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Основные подходы, используемые нами в настоящей работе — использование флуоресцентных сенсоров для механобиологического исследования эмбриональных процессов — является новаторским, и в мировой практике не использовалось. Однако, за время работы была опубликована статья (Yamashita et al., 2016).

В целом, в данной статье были использованы подходы и методы, сходные с нашими: экспрессия в эмбрионах *Xenopus* генетически кодируемого флуоресцентного механосенсора на основе FRET-пары, цейтраферная фотосъемка с последующей компьютерной обработкой изображений. Хотя есть и некоторые отличия: данными авторами был использован актинин вместо винкулина и С-кадгерина, другая FRET-пара (EGFP и mCherry, а не mTFP1.0 и mVenus, как в настоящей работе), а также большое количество инъецированной мPHK (1 нг на эмбрион, в отличие от 10 пг на эмбрион у нас).

В целом данная статья подтверждает основные методы, использованные в настоящей работе. Так, например, важным является правомерность оценки FRET по соотношению интенсивностей флуоресценции донора и акцептора. Результаты такой оценки в целом совпадают с результатами более сложных измерений, см. (Grashoff et al., 2010). Это позволяет, во-первых, не производить трудоемких экспериментальных манипуляций (таких, как выжигание FRET-донора с использованием конфокального микроскопа, что практически неосуществимо на целом зародыше), и, во-вторых, избежать сложных математических расчетов.

Результаты работы (Yamashita et al., 2016) существенно отличаются от наших. В данной статье авторы сообщают о различиях между нейральной и не-нейральной эктодермой, т.е. в медиолатеральном направлении, с высоким уровнем напряжений в нейральной эктодерме и низким уровнем в не-нейральной, тогда как в наших экспериментах выявлен антерио-постериорный градиент напряжений с максимумом в постериорной части эмбриона. Такая разница может быть обусловлена двумя факторами. Во-первых, использованный ими сенсор сконструирован на основе актинина, тогда как в нашей работе были использованы сенсоры на основе винкулина и кадгерина. Как отмечается в данной статье, использованный ими сенсор измеряет внутриклеточное напряжение, тогда как винкулиновый и кадгериновый сенсоры детектируют, соответственно, напряжение между цитоскелетом и интегринами и между соседними клетками. Во-вторых, значительную погрешность может вносить большое количество инъецируемой мРНК (примерно в 100 раз больше, чем в наших экспериментах), что может привести к небольшому проценту встраивания механосенсора в цитоскелет. Косвенно об этом свидетельствует и наблюдаемая авторами небольшая степень различия напряжений в нейральной и ненейральной эктодерме.

Кроме того, наши данные об антерио-постериорном градиенте напряжений хорошо согласуются с результатами, полученными с помощью микрохирургических методов. Так, показано наличие значительных напряжений в задних отделах эмбриона и отсутствие таковых в передних (Beloussov, 2008). Аномалии, вызванные механической релаксацией эмбрионов, включают в себя, в том числе, аномалии передне-задней разметки зародыша, вплоть до полной неразличимости переднего и заднего конца эмбриона (Beloussov et al., 1990).

Что касается механосенсора на основе кадгеринов, то в литературе известны примеры применения таких сенсоров на культурах клеток (Borghi et al., 2012; Conway et al., 2013). COOTBETственно, влияние экспрессии механосенсоров как таковых на эмбриональное развитие не было изучено. Результаты настояшей работы показывают, что экспрессия CCadTS способна негативно повлиять на межклеточные взаимодействия в эмбрионе. Можно предположить, что CCadTS может работать как доминантно-негативная форма кадгерина, тем более, что некоторые доминантнонегативные формы кадгеринов описаны в литераtype (Vizirianakis et al., 2002; Dong et al., 2007). Taким образом, при выборе или конструировании механосенсора необходимо учитывать его возможное влияние на процессы эмбриогенеза в целом и на межклеточные взаимодействия в частности.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

Разработанные методы — микроинъекции небольшого количества синтетической мРНК механосенсоров, цейтраферная съемка, а также визуализация и полуколичественная оценка FRET по соотношению флуоресценции донора и акцептора — хорошо зарекомендовали себя для ранних эмбрионов *Xenopus*.

Полученные на эмбрионах *Xenopus* результаты хорошо согласуются с результатами, полученными принципиально другими методами.

Не все флуоресцентные механосенсорами являются нейтральными. Так, встраивание сенсорного модуля в С-кадгерин негативно влияет на межклеточные взаимодействия и приводит к нарушению нормального эмбриогенеза.

Потверждена простота использования ранних эмбрионов *Xenopus* в качестве модельного объекта. В то же время, другие модели, в частности, куриные эмбрионы, требуют иных подходов.

Таким образом, нами подтверждена перспективность использования генетически кодируемых флуоресцентных механосенсоров для изучения механических напряжений в эмбрионах. В дальнейшем нами предполагается осуществить более детальные исследования в этой области.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-04-06310). Работы по клонированию плазмидных конструкций были выполнены за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Beloussov L.V.* Mechanically based generative laws of morphogenesis // Phys. Biol. 2008. V. 5. P. 015009.
- Beloussov L.V., Dorfman J.G., Cherdantzev V.G. Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // J. Embryol. Exp. Morphol. 1975. V. 34. P. 559–574.
- Beloussov L.V., Lakirev A.V., Naumidi I.I et al. Effects of relaxation of mechanical tensions upon the early morphogenesis of *Xenopus laevis* embryos // Int. J. Dev. Biol. 1990. V. 34. P. 409–419.
- Borghi N., Sorokina M., Shcherbakova O.G. et al. R. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 12568–12573.
- Conway D.E., Breckenridge M.T., Hinde E. et al. Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1 // Curr. Biol. 2013. V. 23. P. 1024–1030.
- Dong H.M., Liu G., Hou Y.F. et al. Dominant-negative E-cadherin inhibits the invasiveness of inflammatory breast cancer cells in vitro // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2007. V. 133. P. 83–92.
- *Eroshkin F.M., Zaraisky A.G.* Mechano-sensitive regulation of gene expression during the embryonic development // Genesis. 2017. V. 55.
- *Eyckmans J., Boudou T., Yu X. et al.* A hitchhiker's guide to mechanobiology // Dev. Cell. 2011. V. 21. P. 35–47.
- Grashoff C., Hoffman B.D., Brenner M.D. et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics // Nature. 2010. V. 466. P. 263–266.
- Guo J., Sachs F., Meng F. Fluorescence-based force/tension sensors: a novel tool to visualize mechanical forces in structural proteins in live cells // Antioxid. Redox Signal. 2014. V. 20. P. 986–999.
- Ishibashi S., Love N.R., Amaya E. A simple method of transgenesis using I-SceI meganuclease in Xenopus // Methods Mol. Biol. 2012. V. 917. P. 205–218.

- Kroll K.L., Amaya E. Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation // Development. 1996. V. 122. P. 3173–3183.
- *Lee C.H., Gumbiner B.M.* Disruption of gastrulation movements in *Xenopus* by a dominant-negative mutant for C-cadherin // Dev. Biol. 1995. V. 171. P. 363–373.
- *Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V. et al.* The LIM-domain protein Zyxin binds the homeodomain factor Xanf1/Hesx1 and modulates its activity in the anterior neural plate of *Xenopus laevis* embryo // Dev. Dyn. 2008. V. 237. P. 736–749.
- Nandadasa S., Tao Q., Menon N.R. et al. N- and E-cadherins in Xenopus are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements // Development. 2009. V. 136. P. 1327–1338.
- *Ogino H., McConnell W.B., Grainger R.M.* High-throughput transgenesis in *Xenopus* using I-SceI meganuclease // Nat. Protoc. 2006a. V. 1. P. 1703–1710.
- *Ogino H., McConnell W.B., Grainger R.M.* Highly efficient transgenesis in *Xenopus tropicalis* using I-SceI meganuclease // Mech. Dev. 2006b. V. 123. P. 103–113.
- Rahimzadeh J., Meng F., Sachs F. et al. Real-time observation of flow-induced cytoskeletal stress in living cells // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2011. V. 301. P. 646–652.
- Stooke-Vaughan G.A., Davidson L.A., Woolner S. Xenopus as a model for studies in mechanical stress and cell division // Genesis. 2017. V. 55.
- Vizirianakis I.S., Chen Y.Q., Kantak S.S. et al. Dominantnegative E-cadherin alters adhesion and reverses contact inhibition of growth in breast carcinoma cells // Int. J. Oncol. 2002. V. 21. P. 135–144.
- Yamashita S., Tsuboi T., Ishinabe N., Kitaguchi T., Michiue T. Wide and high resolution tension measurement using FRET in embryo // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 28535.
- Yang C., Zhang X., Guo Y., Meng F., Sachs F., Guo J. Mechanical dynamics in live cells and fluorescence-based force/tension sensors // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1853. P. 1889–1904.

# Development of Methods and Techniques to Visualize Mechanical Tension in Embryos Using Genetically Encoded Fluorescent Mechanosensors

F. M. Eroshkin<sup>1, \*</sup>, S. V. Kremnev<sup>2, 3</sup>, G. V. Ermakova<sup>1</sup>, and A. G. Zaraisky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia
<sup>2</sup>Chair of Embryology, Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119192 Russia
<sup>3</sup>Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117808 Russia
\*e-mail: Xenopus, FE@gmail.com

Lately, the growing body of quantitative data has provided evidence of the importance of mechanical forces in embryogenesis. The study of spatial and temporal distribution of mechanical tension in the course of em-

# ЕРОШКИН и др.

bryogenesis is one of the most important problems of modern developmental biology. Development of genetically encoded fluorescent mechanosensors allowed their application in an intravital study of mechanical tension in developing embryos via noninvasive techniques. The possibility of applying fluorescent mechanosensors based on vinculin and C-cadherin to visualize mechanical tension in tissues of *Gallus* and *Xenopus* embryos was studied. The methods to express and detect these proteins, as well as process the resulting images, were elaborated. The best results were obtained using *Xenopus* embryos and the vinculin-based mechanosensor.

Keywords: Xenopus, Gallus, embryogenesis, mechani?al tension, mechanosensors