

УДК 611.013

Выявление экспрессии Т-кадгерина в эмбриогенезе у мыши

К. А. Рубина^{1*}, В. А. Смутова¹, М. Л. Семенова², А. А. Поляков³, S. Gerety⁴, D. Wilkinson³,
Е. И. Суркова¹, Е. В. Семина¹, В. Ю. Сысоева¹, В. А. Ткачук¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и молекулярной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Division of Developmental Neurobiology, MRC National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA

⁴Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge. CB10 1SA

*E-mail: rkseiniya@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2014

После доработки 20.02.2015

РЕФЕРАТ В представленной работе изучена экспрессия Т-кадгерина на ранних этапах развития эмбриона мыши. С использованием методов гибридизации *in situ* и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией установлено, что экспрессия Т-кадгерина в развивающемся головном мозге выявляется, начиная со стадии E8.75, а в сердце – со стадии E11.5, что указывает на возможную роль Т-кадгерина в процессах формирования сосудов в эмбриогенезе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ангиогенез, *in situ*-гибридизация, Т-кадгерин, эмбриогенез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ T-cad – Т-кадгерин, ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Т-кадгерин впервые обнаружили более 20 лет назад в мозге куриного эмбриона [1]. В ранних работах Раншт [1] было показано, что экспрессия Т-кадгерина в развивающихся сомитах коррелирует с миграцией клеток нервного гребня из нервной трубки. Клетки нервного гребня представляют собой транзиторную мультипотентную популяцию клеток, из которых впоследствии формируются различные ткани, включая черепно-лицевые кости и хрящи, гладкомышечные клетки, меланоциты, периферические нейроны, глию и другие. В более поздних работах этой лаборатории было обнаружено, что мигрирующие клетки нервного гребня и растущие к своим мишеням аксоны мотонейронов выбирают траекторию движения через ростральную часть сомитов, избегая по пути каудальную часть сомитов, где клетки экспрессируют Т-кадгерин. Эксперименты *in vitro* с использованием растворимого Т-кадгерина или Т-кадгерина в качестве субстрата показали, что Т-кадгерин подавляет формирование нейритов и рост аксонов мотонейронов. Это позволило предположить, что Т-кадгерин функционирует как молекула-навигатор для растущих аксонов и мигрирующих клеток нервного греб-

ня [2, 3]. Подобно другим навигационным молекулам, эфринам и их рецепторам [4], Т-кадгерин в развивающейся нервной системе действует как «молекула отталкивания» и негативно регулирует рост аксонов и миграцию клеток.

Следует отметить, что уровень экспрессии Т-кадгерина во взрослом мозге выше, чем в эмбриональном [5]. В нашей лаборатории обнаружено, что во взрослом организме Т-кадгерин экспрессируется не только в нервной системе, но и в сердечно-сосудистой [6, 7]. Иммуногистохимическое окрашивание срезов аорты выявило присутствие Т-кадгерина во всех слоях сосудистой стенки (интима, медиа и адвентиции), в эндотелии, гладкомышечных клетках и перицитах. В адвентиции высокий уровень Т-кадгерина отмечен в стенках *vasa vasorum* [6]. Мы наблюдали также повышение экспрессии Т-кадгерина в сосудах при различных патологиях: при формировании атеросклеротических поражений и постангиопластическом рестенозе – состояниях, связанных с патологическим ангиогенезом у человека [6, 7]. Кроме того, обнаружено, что повышенная экспрессия Т-кадгерина в стенке артерий после баллонной ангиопластики у крыс коррелирует с поздни-

ми стадиями формирования неоинтимы и совпадает с фазой активной миграции и пролиферации сосудистых клеток. Экспрессия Т-кадгерина в *vasa vasorum* адвентиции поврежденных кровеносных сосудов позволяет предполагать его участие в регуляции ангиогенеза или репарации повреждений сосудистой стенки [7].

Известно, что в эмбриогенезе формирование нервной и сердечно-сосудистой систем происходит параллельно, в результате чего сосуды и нервы часто располагаются в непосредственной близости друг от друга. Нервные и сосудистые клетки секретируют нейротрофические и ангиогенные факторы соответственно, что способствует их выживанию и определяет направление роста и миграции [8]. Механизмы регуляции направленного роста аксонов и миграции нервных клеток достаточно хорошо изучены [4, 9, 10], данных о факторах и механизмах, регулирующих направленный рост сосудов, существенно меньше. К навигационным молекулам, участвующим в регуляции формирования нервной и сосудистой систем, традиционно относят такие белки, как семафорины и их рецепторы (плексины и нейропилины), нейтрины и их рецепторы (DCC/неогенин и Unc5), слитлиганды и их рецепторы (Robo) и некоторые другие белки [10]. Данные об экспрессии Т-кадгерина в сердечно-сосудистой системе в эмбриогенезе до сих пор не опубликованы. Не известно, экспрессируется ли Т-кадгерин в формирующемся сердце и сосудах в эмбриогенезе или его роль ограничивается регуляцией траектории роста аксонов и миграции клеток нервного гребня.

В этой связи, используя методы *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией, мы анализировали экспрессию Т-кадгерина на разных стадиях развития мыши. Экспрессия мРНК Т-кадгерина в развивающемся головном мозге обнаруживается, начиная со стадии E8.75. В сердце экспрессия Т-кадгерина выявлена на стадии E11.5, что совпадает с процессами активного формирования и роста сосудов за счет васкуло- и ангиогенеза в сердечно-сосудистой системе и головном мозге.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение датированной беременности мыши

В работе использовали эмбрионы мышей, полученные от гибридов F1 CBA/C57Bl6. Мышей содержали в стандартных условиях при 14-часовом световом дне. В вечернее время суток к самкам подсаживали самцов, на следующее утро выявляли спарившихся мышей по наличию вагинальных пробок. День обна-

ружения вагинальной пробки считали 1/2 первого дня беременности.

Получение эмбрионов мыши на постимплантационных стадиях развития

Постимплантационные эмбрионы извлекали по стандартному протоколу, описанному Манк [11]. Самку умерщвляли путем дисклокации шейных позвонков, вскрывали брюшную полость, извлекали матку с децидуомами и помещали в чашку Петри с охлажденным фосфатно-солевым буфером (ФСБ, Sigma-Aldrich). Далее рога матки надрезали по антимезометриальному краю, обнажая децидуальные капсулы с зародышами, и отделяли их от мезометриальной стенки. Децидуомы переносили в чистую чашку Петри, содержащую холодный ФСБ. Децидуальную капсулу надрезали, захватив ее мезометриальный конец, и аккуратно выталкивали эмбрион в раствор. После этого препаровальными иглами эмбрион освобождали из амниотической оболочки и переносили пипеткой в чистую чашку Петри с ФСБ для отмывки. Эмбрионы фиксировали в 4% растворе формальдегида (PR5 Panreac) на ФСБ при температуре +4°C в течение ночи.

Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши антителами против Т-кадгерина

После фиксации эмбрионы промывали 5 раз по 20 мин в ФСБ, содержащем 0.2% детергента Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Для блокирования неспецифического окрашивания образцы помещали в нормальную неиммунную сыворотку козы (Sigma-Aldrich) в разведении 1 : 10 и инкубировали их при температуре +4°C на качалке в течение ночи. Затем эмбрионы инкубировали в растворе моноклональных антител кролика против Т-кадгерина мыши (BioDesign) в разведении 1 : 25. В качестве контроля использовали неиммунные иммуноглобулины IgG кролика (Abd Serotec) в концентрации, эквивалентной концентрации специфических антител. Инкубацию проводили в течение дня при комнатной температуре и при постоянном покачивании. Антитела отмывали в 0.2% растворе Triton X-100 на ФСБ (3 раза по 20 мин при комнатной температуре), а затем (в четвертой смене раствора) на качалке в течение ночи при температуре +4°C. После отмывки эмбрионы помещали в раствор вторых антител козы, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor® 594, в которых выдерживали весь день на качалке при комнатной температуре. Ядра клеток докрасивали флуоресцентным красителем DAPI (Sigma-Aldrich) в разведении 1 : 1000 в течение 30 мин, а затем промывали 3 раза по 20 мин в 0.2% Triton X-100 на ФСБ и оставляли на ночь в том же раство-

ре при температуре +4°C на качалке. На следующий день эмбрионы заключали в среду Aqua-Poly/Mount (Polysciences). Готовые образцы анализировали при помощи конфокального мультифотонного микроскопа Leica SP5 и программного обеспечения Leica Application Suite Advanced Fluorescence 2.2.0 (Leica Microsystems).

Очистка плазмид для *in situ*-гибридизации

Очистку и выделение плазмид производили с помощью коммерческого набора EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя.

Линеаризация плазмид для *in situ*-гибридизации

In situ-гибридизацию с РНК-содержащими пробами к Т-кадгерину (*sense* и *antisense*) и *Krox20* проводили на эмбрионах мыши по методике, разработанной ранее [12].

Для выявления экспрессии мРНК Т-кадгерина в эмбрионах мыши методом гибридации *in situ* использовали плазмиду рFLCI (ImaGenes, Германия) со встроенной EST-последовательностью (*expressed sequence tag*) кДНК Т-кадгерина. Для положительного контроля использовали плазмиду Bluescript KS со встроенной EST-последовательностью кДНК *Krox20*. EST представляют собой короткие кДНК, используемые для выявления экспрессии генов и доступные в базе данных GenBank.

Для линеаризации плазмидную ДНК обрабатывали рестриктазами: Not1 (Fermentas) – для *Krox20* и BamH1 (Fermentas) – для Т-кадгерина. Состав реакционной смеси для линеаризации: 10-кратный буфер, деионизованная вода («Синтол»), плаزمид (4 мкг), рестриктаза (Not1 или BamH1). Смесь инкубировали в течение 12 ч при температуре +37°C. После инкубации ДНК очищали с использованием коммерческого набора GFX PCR DNA and Gel Purification Kit (GE Healthcare) в соответствии с протоколом производителя. Линеаризованные и нелинеаризованные плазмиды анализировали с помощью электрофореза в 1.2% агарозном геле.

Синтез РНК-содержащей пробы для *in situ*-гибридизации

Реакционная смесь для синтеза меченной дигоксигенином РНК-содержащей пробы включала: 5-кратный транскрипционный буфер, деионизованную свободную от РНКаз воду, линеаризованную плазмиду, смесь нуклеотидов, меченных DIG (10 мМ АТФ, 10 мМ СТР, 10 мМ GTP, 6.5 мМ UTP, 3.5 мМ DIG-11-UTP, pH 7.5, Roche), ингибитор РНКаз (Merck Biosciences), РНК-полимеразу. Смесь инкубировали в течение 2 ч при температуре +37°C.

Для синтеза РНК-содержащей пробы с линеаризованной плазмиды, содержащей последовательность *Krox20*, использовали РНК-полимеразу Т3 (Fermentas). Для синтеза РНК-пробы прямой последовательности Т-кадгерина (отрицательный контроль) с линеаризованной плазмиды использовали РНК-полимеразу Т7 (Promega), а для синтеза обратной РНК-пробы для выявления мРНК Т-кадгерина использовали РНК-полимеразу Т3 (Fermentas). Полученные РНК-пробы очищали на коммерческой колонке RNAspin Mini (GE Healthcare) в соответствии с протоколом изготовителя.

Гибридизация эмбрионов мыши *in situ*

Гибридизацию эмбрионов мыши проводили с РНК-пробой (*antisense*), которую синтезировали на матрице гена Т-кадгерина. РНК-проба *antisense* (обратная последовательность) позволяет выявлять экспрессию на уровне транскрипции. *Sense*-проба (прямая последовательность) не связывается с мРНК в клетке, поскольку она некомплементарна мРНК и используется в качестве отрицательного контроля. Положительным контролем служила РНК-проба, синтезированная на матрице гена *Krox20*, уровень экспрессии которого высок в клетках центральной нервной системы эмбрионов мыши на этих стадиях развития.

Гибридизацию проводили на эмбрионах мыши стадий E8.75, E9.5 и E10.5.

Эмбрионы фиксировали в течение ночи в 4% растворе формальдегида (PRS Panreac) на ФСБ, содержащем также 1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) при температуре +4°C, затем отмывали (2 раза по 5 мин) холодным ФСБ и последовательно фиксировали в растворах метанола возрастающей концентрации (25, 50, 75 и дважды 100%). После этого эмбрионы замораживали и хранили для последующих исследований при температуре –20°C. Непосредственно перед проведением гибридации зародышей подвергали регидратации в растворах метанола с понижающейся концентрацией (75, 50 и 25%), отмывали 3 раза в ФСБ, обрабатывали протеиназой К при комнатной температуре (Qiagen, в концентрации 10 мкг/мл на ФСБ). Затем эмбрионы отмывали в ФСБ, фиксировали в 4% формальдегиде (PRS Panreac) на ФСБ в течение 20 мин и отмывали 2 раза по 5 мин в ФСБ. Далее эмбрионы постепенно переводили в гибридационный буфер, содержащий 50% формамид (Sigma-Aldrich), 5-кратный буфер SSC (исходный раствор: 20-кратный буфер SSC содержит 3 М NaCl, 0.3 М цитрат натрия, pH 7.0), 0.1% Triton X-100 («ДиаЭм»), 50 мкг/мл гепарина (Sigma-Aldrich), 1 мг/мл РНК из дрожжей типа IV (Sigma-Aldrich), 5 мМ EDTA (Applichem),

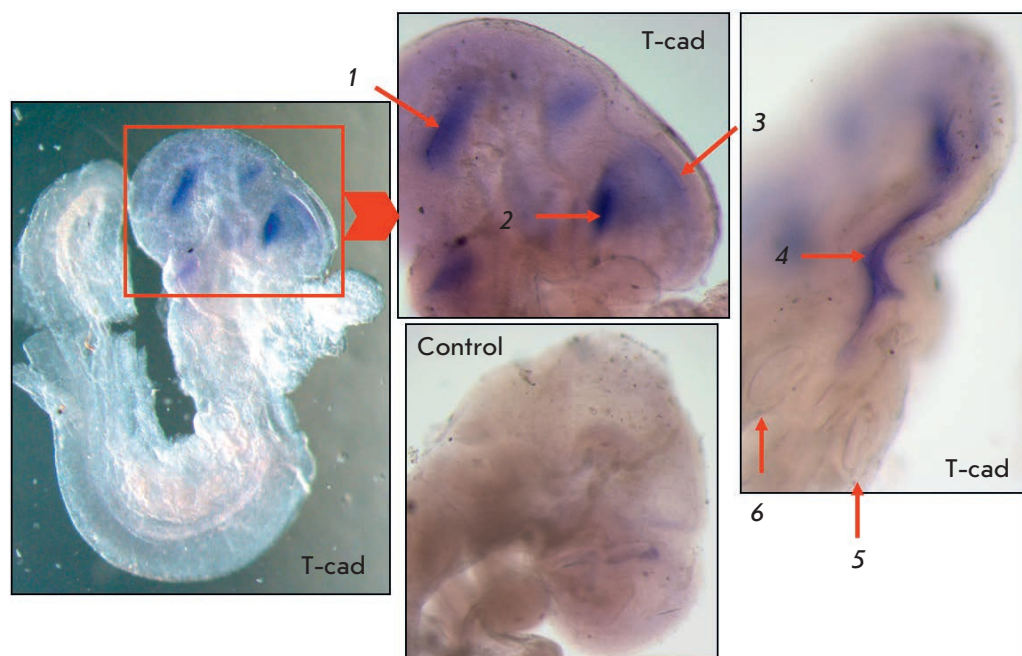


Рис. 1. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E8.75. Экспрессия мРНК Т-кадгерина (T-cad): 1 – в области среднего мозгового пузыря; 2 – в основании формирующегося глазного пузыря; 3 – во внутренней выстилке конечного мозга; 4 – в продолговатом мозге; 5, 6 – в слуховых пузырях. Отсутствие специфического окрашивания в отрицательном контроле (control). Увеличение в 3.2, 5 и 6 раз

2% блокирующий раствор (Roche) и 0.1% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate) (Sigma-Aldrich). Эмбрионы инкубировали при комнатной температуре в смеси (1 : 1) гибридационного буфера и ФСБ, затем – в гибридационном буфере. Эмбрионы оставляли в гибридационном буфере на ночь при температуре +65°C. Утром эмбрионы помещали в свежий гибридационный буфер, добавляли РНК-пробу (0.5 мкг пробы на 1 мл буфера) и инкубировали в течение 24 ч при температуре +65°C. После этого эмбрионы отмывали в гибридационном буфере (3 раза по 30 мин при температуре +65°C), а затем в смеси гибридационного буфера и буфера МАВТ (1 : 1) в течение 30 мин при температуре +65°C. Состав буфера МАВТ: 100 мМ малеиновая кислота (Sigma-Aldrich), pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich). Далее эмбрионы промывали в буфере МАВТ 3 раза по 10 мин при комнатной температуре, помещали в блокирующий раствор (2% блокирующий раствор (Roche), содержащий 20% сыворотки овцы (Abd Serotec) и МАВТ) на 2 ч при комнатной температуре, после чего инкубировали в течение 12 ч при +4°C с раствором антител против дигоксигенина, конъюгированных с щелочной фосфатазой в разведении 1 : 200 (Roche), приготовленном на 10% сыворотке овцы. После инкубации с антителами эмбрионы промывали при комнатной температуре в МАВТ, а затем в буфере NTMT до появления окрашивания. Состав буфера NTMT на 1 мл: 100 мМ трис-HCl (Sigma-Aldrich), pH 9.5,

50 мМ MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 100 мМ NaCl, 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich), 4.5 мкл NBT (4-nitro-blue tetrasodium chloride, Vector Laboratories) и 3.5 мкл BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, Vector Laboratories). Реакцию окрашивания останавливали многократным промыванием в ФСБ, после чего эмбрионы фиксировали в 4% формальдегиде (PRS Panreac) на ФСБ в течение 2 ч при комнатной температуре. Съёмку эмбрионов производили с использованием стереомикроскопа (Olympus SZX 16, камера AxioCam HRC, Carl Zeiss) и программы Axio Vision 3.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя методы *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией, мы оценили экспрессию Т-кадгерина на стадиях E8.75–E11.5 раннего эмбрионального развития мыши.

Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном головном мозге мыши

Экспрессия мРНК Т-кадгерина обнаружена в формирующемся головном мозге, начиная со стадии E8.75, в частности, в промежуточном и переднем мозге – во внутренней выстилке полости конечного мозга (telencephalon) (рис. 1). мРНК Т-кадгерина выявлялась также в области глазных пузырей – в месте перехода промежуточного мозга в развивающиеся зрительные бугры. В отрицательном контроле (проба sense) наблюдали неспецифическое фоновое

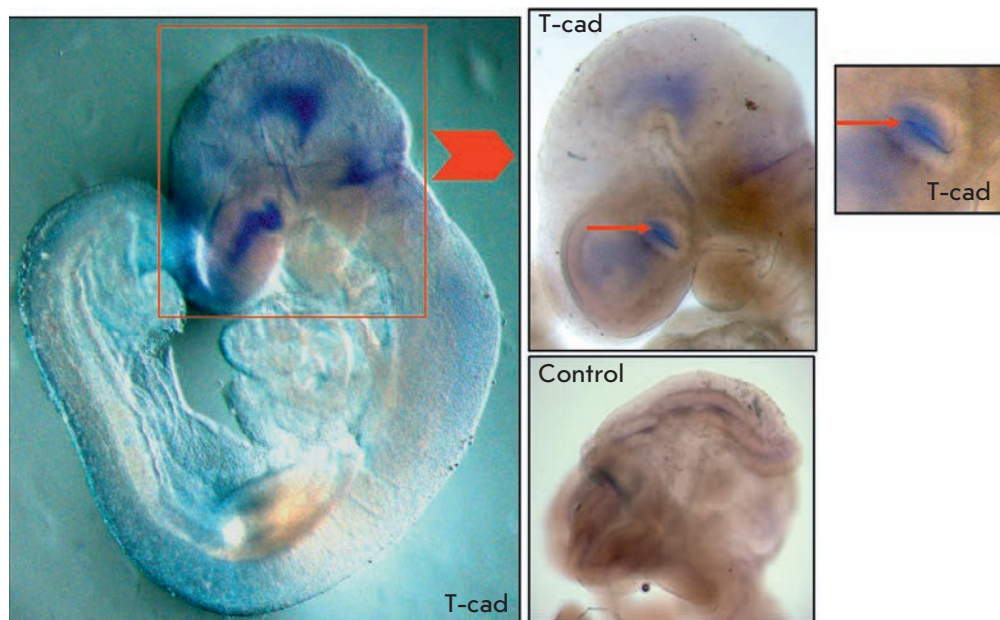


Рис. 2. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E9.5. Окрашивание участков головного мозга соответствует локализации мРНК Т-кадгерина (T-cad). Экспрессия наблюдается в основании формирующихся глазных пузырей; в области теменного и затылочного изгибов. Маленькие стрелки указывают на основание формирующегося глазного пузыря. Control – отрицательный контроль. Увеличение в 3,2, 5 и 6 раз

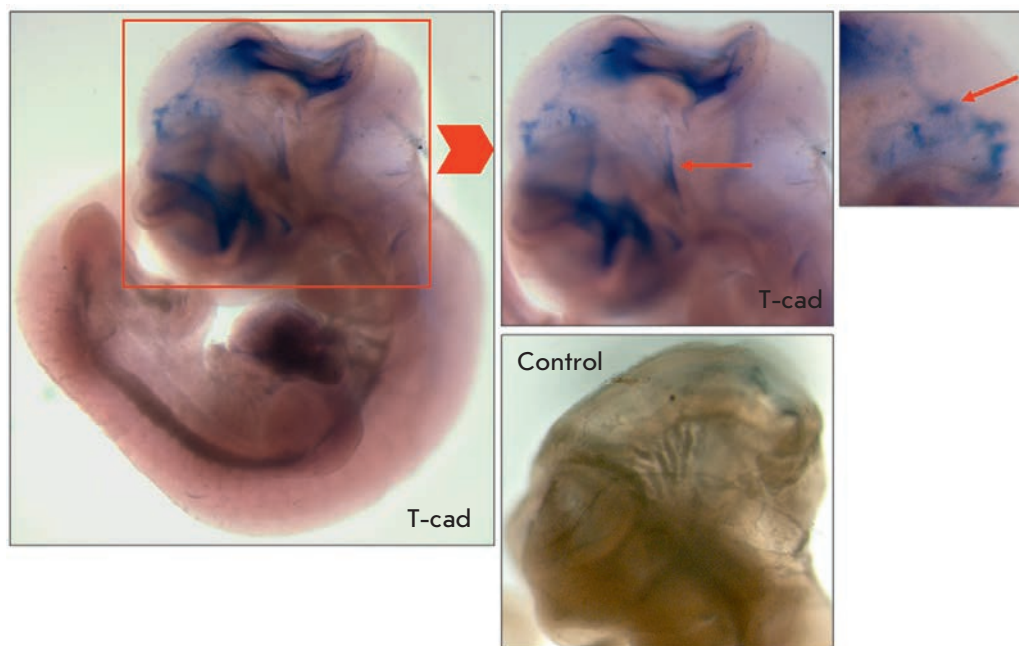


Рис. 3. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E10.5. Интенсивная экспрессия Т-кадгерина (T-cad) в формирующейся крыше мозга, в латеральных областях диэнцефалона. Стрелкой указано специфическое окрашивание сосудистого сплетения в области конечного мозга. Отсутствие специфического окрашивания в отрицательном контроле (control). Увеличение в 3,2, 5 и 6 раз

диффузное окрашивание в переднем мозге, отличное от специфического окрашивания с использованием положительного контроля и antisense-пробы на Т-кадгерин.

На стадии E9.5 экспрессия мРНК Т-кадгерина выявлена в переднем мозге, в утолщающейся обонятельной плакоде, в основании глазных пузырей, в области теменного изгиба, в месте перехода продолговатого мозга в спинной – в области затылочного изгиба (рис. 2).

На стадии E10.5 экспрессия мРНК Т-кадгерина наблюдалась в среднем мозге, в формирующейся эпендимной крыше промежуточного мозга (диэнцефалон, diencephalon) и его латеральных областях (рис. 3 и 4). Специфическое окрашивание обнаружено также в области сосудистого сплетения конечного мозга (рис. 3).

В отрицательном контроле специфического окрашивания не обнаружили. В положительном контроле наблюдали характерный для гена *Krox20* паттерн специфического окрашивания (рис. 3 и 4).

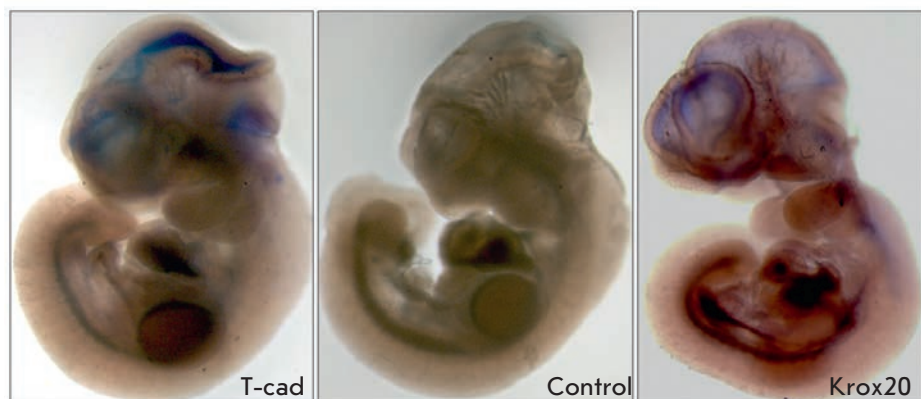


Рис. 4. *In situ*-гибридизация эмбрионов мыши на стадии E10.5. T-cad – специфическое окрашивание T-кадгерина в крыше мозга в области затылочного изгиба, во внутренней выстилке конечного мозга; control – отсутствие специфического окрашивания в отрицательном контроле; Krox20 – окрашивание структур центральной нервной системы в положительном контроле. Увеличение в 3.2 раза

Белок T-кадгерин детектировали методом иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против T-кадгерина на целых эмбрионах мыши в сочетании с конфокальной микроскопией. T-кадгерин выявляли, начиная со стадии E9.5, при этом специфическое окрашивание наблюдалось в выстилках развивающегося головного мозга (рис. 5), в том числе в основании формирующихся глазных пузырей.

Уровень экспрессии T-кадгерина во внутренней выстилке головного мозга был высоким, начиная со стадии E11.5: интенсивное специфическое окрашивание наблюдалось в области промежуточного мозга, формирующегося глазного бокала, а также в области среднего и заднего мозга (рис. 6).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия T-кадгерина на уровне мРНК начинается со стадии E8.75 и выявляется в разных отделах эмбрионального головного мозга. Белок T-кадгерин в эмбрионах детектируется, начиная со стадии E9.5. Максимальная интенсивность экспрессии T-кадгерина выявляется во внутренней выстилке головного мозга.

Экспрессия T-кадгерина в эмбриональном сердце

В сердце эмбрионов мыши T-кадгерин экспрессируется, начиная со стадии E11.5 (рис. 7). На стадиях E8.75, E9.5, E10.5 ни экспрессии мРНК T-кадгерина, ни самого T-кадгерина в формирующемся сердце не обнаружено (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют о том, что в формирующемся головном мозге мРНК T-кадгерина экспрессируется, начиная со стадии E8.75 – во внутренней выстилке полости конечного мозга и в промежуточном мозге. До этой стадии экспрессию T-кадгерина выявить не удалось. Известно, что в области изгибов головного мозга на ранних этапах развития происходит ак-

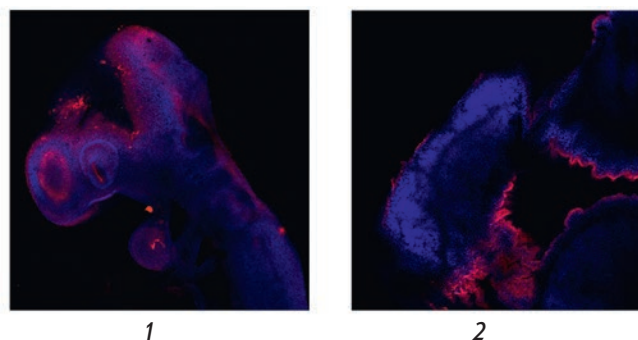


Рис. 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши на стадии E9.5 (1) и E12.5 (2). Специфическое окрашивание (красная флуоресценция) соответствует экспрессии T-кадгерина в выстилках мозга на обеих стадиях; экспрессия T-кадгерина в формирующемся глазном пузыре у эмбриона E9.5. Синяя флуоресценция соответствует ядрам, докрашенным DAPI. Увеличение в 5 раз

тивное формирование и рост кровеносных сосудов [13]. Возможно, экспрессия T-кадгерина на стадии E9.5 в этих областях формирующегося мозга связана с интенсивными процессами ангиогенеза и потенциальным участием этого белка в процессах регуляции направленного роста кровеносных сосудов так же, как это происходит при росте аксонов мотонейронов к своим мишеням в нервной системе.

Позднее, на стадии E9.5, мРНК T-кадгерина была идентифицирована в переднем мозге, в обонятельной плакаде, в основании глазных пузырей, в области теменного и затылочного изгибов. Известно, что в области изгибов головного мозга на этой стадии развития происходит активное формирование и рост кровеносных сосудов, что позволяет предполагать возможное участие T-кадгерина в васкуляризации этих структур [13]. Характерно, что экспрессия T-кадгерина на уровне мРНК в области глазных пузырей выявлялась еще на стадии E8.75. Мы предполагаем, что экс-

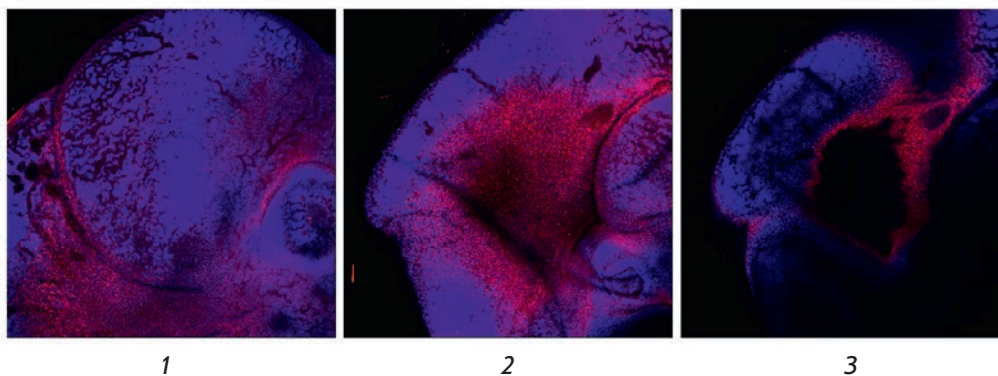


Рис. 6. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши на стадии E11.5. Специфическое окрашивание (красная флуоресценция) соответствует экспрессии белка Т-кадгерина. Синяя флуоресценция соответствует ядрам, докрашенным DAPI. 1 – специфическое окрашивание в области промежуточного мозга, а также в области формирующегося глазного бокала; 2 – специфическое окрашивание в области среднего и заднего мозга; 3 – тот же участок, что и на 2 – на другом уровне оптической плоскости. Увеличение в 5 раз

прессия Т-кадгерина в основании формирующихся глазных пузырей связана с эпителизацией структур будущих глазных бокалов, или Т-кадгерин участвует в формировании сосудистой оболочки глаза. Однако для точного определения роли Т-кадгерина в формировании этих структур необходимы дополнительные исследования.

Далее на стадии E10.5 интенсивное окрашивание, соответствующее мРНК Т-кадгерина, было выявлено в среднем мозге, в формирующейся эпендимной крыше промежуточного мозга и его латеральных областях. Специфическое окрашивание обнаружено также в области сосудистого сплетения конечного мозга. Окрашенные области морфологически соответствовали областям формирования сосудистых сплетений в стенках формирующейся системы желудочков мозга.

Полученные методом гибридизации *in situ* результаты определения экспрессии Т-кадгерина на уровне белка подтверждали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов мыши. Конфокальная микроскопия в сочетании с анализом изображения позволила обнаружить белок Т-кадгерин в выстилках развивающегося головного мозга, начиная со стадии E9.5. Экспрессия Т-кадгерина выявлена, в том числе, и в основании формирующихся глазных пузырей, что соответствует данным, полученным методом *in situ*-гибридизации. Экспрессия Т-кадгерина в формирующемся глазном бокале указывает на возможное участие этого белка в развитии сосудистой оболочки глаза.

Окрашивание эмбрионов антителами выявило интенсивную экспрессию Т-кадгерина во внутренней выстилке головного мозга, начиная со стадии E11.5.

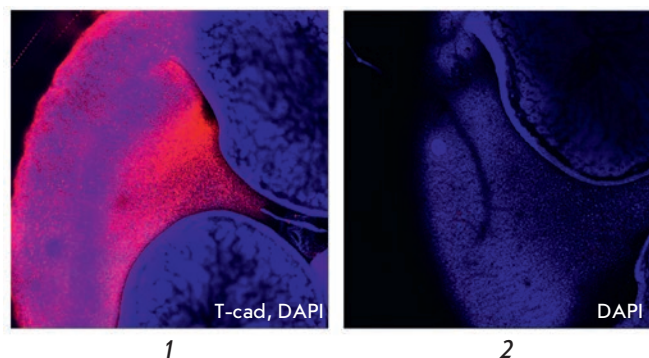


Рис. 7. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов мыши на стадии E11.5. Специфическое окрашивание (красная флуоресценция) соответствует экспрессии белка Т-кадгерина (T-cad). Синяя флуоресценция соответствует ядрам, докрашенным DAPI. 1 – специфическое окрашивание, отражающее экспрессию Т-кадгерина в области сердца; 2 – контрольное окрашивание антителами к иммуноглобулину G. Увеличение в 5 раз

А именно, интенсивное специфическое окрашивание наблюдалось в области промежуточного мозга, формирующегося глазного бокала, а также в области среднего и заднего мозга. Мы предположили, что Т-кадгерин участвует в формировании системы желудочков головного мозга, а именно сосудистых сплетений в стенках желудочков, поскольку известно, что на этом этапе эмбрионального развития здесь происходит активное формирование сосудов мозга [13].

Таким образом, использование методов *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окраши-



Рис. 8. Отсутствие мРНК Т-кадгерина в формирующемся сердце эмбрионов мыши на стадиях E8.75–E10.5 (1, 2, 3). Стрелки и выделенная область указывают на зону формирующегося сердца. Увеличение в 5 (1, 2) и 6 раз (3)

вания в сочетании с конфокальной микроскопией впервые позволило выявить Т-кадгерин в эмбрионах мыши и определить стадию, с которой начинается экспрессия Т-кадгерина на уровне мРНК и белка, а также морфологические области экспрессии этого белка. Экспрессия Т-кадгерина на уровне мРНК обнаруживается, начиная со стадии E8.75, в разных отделах формирующегося головного мозга. Экспрессия белка Т-кадгерина выявляется, начиная со стадии E9.5. Наибольшая экспрессия Т-кадгерина при этом наблюдалась во внутренней выстилке головного мозга, что предполагает возможное участие Т-кадгерина в формировании сосудистых сплетений в стенках желудочков в развивающемся головном мозге.

Методы *in situ*-гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов мыши позволили выявить экспрессию Т-кадгерина в сердце на уровне белка, начиная со стадии E11.5. На стадиях E8.75, E9.5, E10.5 ни экспрессии мРНК Т-кадгерина, ни белка Т-кадгерина в формирующемся сердце не обнаружено.

Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном сердце, впервые выявленная на стадии E11.5, отражает, по всей видимости, активные процессы формирования и роста сердца и его отделов, а также ангиогенеза [14].

Предположительно, между стадиями E10.5–E11.5 эмбрионального развития мыши происходит активация синтеза мРНК Т-кадгерина, после чего происходит быстрое и интенсивное накопление белка Т-кадгерина. Вполне вероятно, что Т-кадгерин также принимает участие в установлении синаптических контактов в формирующейся проводящей системе сердца.

Ранее в лаборатории Раншт были получены мыши с дефицитом Т-кадгерина [15]. Такие мыши были жизнеспособны и фертильны, что характерно для це-

лого ряда животных с нокаутом и указывает на возможные компенсаторные механизмы, реализующиеся в эмбриогенезе. Однако в условиях эксперимента на различных животных моделях, воспроизводящих заболевания сердечно-сосудистой системы у человека, обнаружено, что Т-кадгерин играет важную роль в процессах восстановления кровоснабжения при повреждении. На модели ишемии-реперфузии показано, что Т-кадгерин выполняет кардиопротективную функцию, поскольку размер инфаркта у контрольных мышей был значительно меньше, чем у животных с дефицитом Т-кадгерина [16, 17]. На модели ишемии задней конечности с использованием этих же мышей обнаружено, что Т-кадгерин необходим для полноценной реваскуляризации ишемизированных мышц [18]. Полученные в настоящей работе данные о роли Т-кадгерина как навигационной молекулы, регулирующей рост сосудов в эмбриогенезе, согласуются с результатами, полученными на экспериментальных животных моделях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные об экспрессии Т-кадгерина в развивающемся головном мозге и сердце мыши свидетельствуют о том, что начало экспрессии Т-кадгерина совпадает с активизацией процессов формирования и роста сосудов за счет васкуло- и ангиогенеза в сердечно-сосудистой системе и головном мозге в эмбриогенезе [19]. Эти результаты позволяют выдвинуть предположение о роли Т-кадгерина как молекулы-регулятора процессов формирования и направленного роста сосудов в эмбриогенезе. Механизм, по которому Т-кадгерин осуществляет регуляцию роста нейронов в нервной системе в эмбриогенезе, как показано ранее, заключается в гомофильном узнавании и последующем «отталкивании» Т-кадгерина на клетках [2, 3]. Нами установлен сходный механизм регуляции

роста сосудов *in vivo* в модельных экспериментах на мышцах и регуляции миграции эндотелиальных клеток *in vitro* [20]. Возможно, сходный механизм имеет место и при регуляции роста кровеносных сосудов с участием T-кадгерина в эмбриогенезе. ●

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00086) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T. // *Neuron*. 1991. V. 7. № 3. P. 391–402.
2. Fredette B.J., Ranscht B. // *J. Neurosci*. 1994. V. 14. P. 7331–7346.
3. Fredette B.J., Miller J., Ranscht B. // *Development*. 1996. V. 122. P. 3163–3171.
4. Eichmann A., Makinen T., Alitalo K. // *Genes Devel*. 2005. V. 19. № 9. P. 1013–1021.
5. Takeuchi T., Misaki A., Liang S.B., Tachibana A., Hayashi N., Sonobe H., Ohtsuki Y. // *J. Neurochem*. 2000. V. 74. P. 1489–1497.
6. Ivanov D., Philippova M., Antropova J., Gubaeva F., Iljinskaya O., Tararak E., Bochkov V., Erne P., Resink T., Tkachuk V. // *Histochem. Cell. Biol*. 2001. V. 115. P. 231–242.
7. Kudrjashova E., Bashtrikov P., Bochkov V., Parfyonova Ye., Tkachuk V., Antropova J., Iljinskaya O., Tararak E., Erne P., Ivanov D., et al. // *Histochem. Cell Biol*. 2002. V. 118. № 4. P. 281–290.
8. Carmeliet P. // *Nat. Rev. Genet*. 2003. V. 4. № 9. P. 710–720.
9. Poliakov A., Cotrina M., Wilkinson D. // *Developmental Cell*. 2004. V. 7. № 4. P. 465–480.
10. Weinstein B.M. // *Cell*. 2005. V. 120. P. 299–302.
11. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. М.: Мир, 1990. 406 с.
12. Wilkinson D. *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford: Oxford Univ. Press, 1998. P. 212.
13. Vasudevan A., Bhide P. // *Cell Adhesion Migration*. 2008. V. 2. № 3. P. 167–169.
14. Burggren W., Keller B. *Development of cardiovascular systems*. Cambridge, UK. Cambridge Univ. Press, 1997. P. 360.
15. Hebbard L.W., Garlatti M., Young L.J.T., Cardiff R.D., Oshima R.G., Ranscht B. // *Cancer Res*. 2008. V. 68. № 5. P. 1407–1416.
16. Denzel M., Scimia M., Zumstein P., Walsh K., Ruiz-Lozano P., Ranscht B. // *J. Clin. Invest*. 2010. V. 120. № 12. P. 4342–4352.
17. Parker-Duffen J., Walsh K. // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2014. V. 28. № 1. P. 81–91.
18. Parker-Duffen J., Nakamura K., Silver M., Zuriaga M.A., MacLauchlan S., Arahamian T.R., Walsh K. // *Biol. Chem*. 2013. V. 288. № 34. P. 24886–24897.
19. Gilbert S.F. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. P. 817.
20. Rubina K., Kalinina N., Potekhina A., Efimenko A., Semina E., Poliakov A., Wilkinson D.G., Parfyonova Y., Tkachuk V. // *Angiogenesis*. 2007. V. 10. № 3. P. 183–195.