

## ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА PITX2 В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ\*

*Аннотация.* Целью настоящего исследования явилась пространственная и временная характеристика экспрессии транскрипционного фактора PITX2 и его изоформ в сетчатке глаза человека в ходе пренатального развития (9,5-24 недель) и в сетчатке постнатальных крыс (2 месяца). Для исследования экспрессии гена PITX2 был использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрицах кДНК, синтезированных на РНК, выделенной из препарированной сетчатки. Для локализации экспрессии исследуемых белков использовался метод иммуногистохимии. Впервые получены данные, свидетельствующие об участии PITX2 в формировании сетчатки глаза человека и крысы.

*Ключевые слова:* развитие глаза человека, экспрессия генов, транскрипционные факторы, PITX2, изоформы.

I. Andrejchenko, N. Firsova

EXPRESSION STUDYING TRANSCRIPTION FACTOR PITX2  
IN AN EYE RETINA MAMMALS

*Abstract.* The purpose of the present research was the spatial and time characteristic of an expression transcription factor PITX2 and its isoforms in a retina of an eye of the person in a course developments (9,5-24 week) and in a retina rats (2 months). For research of an expression of gene PITX2 the method ПЦР on matrixes кДНК, synthesised on мРНК, allocated of the prepared retina has been used. For localisation of an expression of investigated fibers the method immunogistohimii was used. For the first time the data testifying to participation PITX2 in formation of a retina of an eye of the person and a rat is obtained.

*Key words:* retina, transcription factor PITX2, expression gene, isoforms.

Глаз является уникальной модельной системой для изучения функций отдельных генов в ходе развития, исследования механизмов пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза клеток. Глаз позвоночных, в том числе человека, состоит из морфологически и функционально различающихся тканей, в формировании которых принимают участие различные эмбриональные источники: поверхностная эктодерма, нейро-эктодерма и мезенхима – производная нервного гребня. Формирование и специализация структур глаза обеспечиваются взаимным влиянием тканей, в которых экспрессируются регуляторные белки: транскрипционные, РНК-связывающие факторы и сигнальные белки. Для формирования глаза позвоночных необходима скоординированная работа основного каскада регуляторных генов: Pax6, Eya1, Six3, Dach1, Prox1, Pitx2 и др.

Наше внимание сосредоточено на многофункциональном транскрипционного факторе PITX2, т.к. известно, что ген PITX2 начинает экспрессироваться на самых ранних этапах развития глаза позвоночных. Нарушение структуры и/или экспрессии PITX2 приводит к целому ряду серьезных аномалий глаза, при которых наблюдаются дефекты развития роговицы и структур радужно-роговичного угла.

Целью работы явилось изучение пространственных и временных особенностей экспрессии транскрипционного фактора PITX2 и его изоформ, PITX2A и PITX2B, в ходе развития сетчатки человека и в сетчатке постнатальных крыс.

\* © Андрейченко И.Н., Фирсова Н.В.

### Материалы и методы

Объектом исследования является сетчатка плодов человека (9,5, 14 и 24 недели пренатального развития), а также сетчатка постнатальных крыс (2 месяца). Абортивный материал плодов человека получен из лицензированных учреждений Минздрава РФ, действующих в рамках законодательства РФ об охране здоровья граждан. Возраст плодов соответствует срокам, установленным врачом-акушером. Энуклеацию глаз проводили не позже, чем через 24 часа после операции. Постнатальные крысы предоставлены виварием Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью обратной транскриптазы SuperScript (GIBCO BRL, США), гексануклеотидов (Силекс, Москва) на матрице кДНК, синтезированных на РНК из различных тканей глаза. кДНК были отнормированы по рибосомальному белку человека с мол массой 19 кД, RPL19, и по глицеральдегид3фосфат дегидрогеназе крысы, GAPDH. ПЦР проводили на амплификаторе (Eppendorf, США) с помощью Taq-полимеразы (Силекс, Москва). При конструировании специфических праймеров для ПЦР использовали компьютерную программу DNASTar. Высокая гомология нуклеотидных последовательностей PITX2 человека и крысы позволила нам использовать одни и те же праймеры.

Условия амплификации: 94°C – 1 мин., 56°C – 1 мин., 72°C – 1 мин., 30-40 циклов. Уровень экспрессии гена оценивали по интенсивности свечения полос, полученных при электрофоретическом разделении ПЦР-продуктов в 1%-ном агарозном геле.

Ген	Структура праймеров	Размер ПЦР-фрагмента н.п.
<i>PITX2</i> <i>Human/rat</i>	Пр. 5'tgtggaccaaccttacgga3' (экзон 5) Обр. 5'gtattgaggctgttgagac3' (экзон 6)	374/381
<i>PITX2A</i> <i>Human/rat</i>	Пр. 5'-tctcccggtagccgata -3' (экзон 1'2) Об. 5'-gccacgctctcattctt-3' (экзон 5)	111
<i>PITX2B</i> <i>Human/rat</i>	Пр. 5'-tctcccggtagccgata -3' (экзон 1'2) Об. 5'-tccgtgaactcgacctt -3' (экзон 3)	140
<i>GAPDH</i> <i>rat</i>	Пр. 5' tgcagtgccagcctcgtctcatag3' (экзон 2) Об. 5' ccttttgcccacccttcag3' (экзон 6)	378
<i>RPL19</i> <i>Human</i>	Пр. 5'agggtacagccaatgcccg3' (экзон 4) Обр. 5'ccttgataaagctcttgatgatc3' (экзон 6)	326

**Иммуногистохимическое исследование** проводили по стандартной методике на криосрезах глаз. Использовали антитела: PITX2 (Sigma, США, 1:200), Antirabbit Aleksa 488 (MolecularProbs, США, 1:1000), Antirabbit Aleksa 586 (MolecularProbs, США, 1:1000), Hoechst 42333 (Leica, Германия, 1:1000). Специфичность окрашивания подтверждали в контрольных экспериментах без использования первичных антител. Для анализа иммунохимической реакции использовали флюоресцентный микроскоп Leica DM RXA2 (Германия), оснащенный набором светофильтров и фотокамерой Olympus DP70 (Германия).

### Результаты исследования и обсуждение

#### Анализ экспрессии гена PITX2 в сетчатке развивающегося глаза человека и постнатальной крысы

Анализ экспрессии гена PITX2 в сетчатке глаза человека на последовательных стадиях развития (9,5, 14 и 24 недели) человека, а также глаза постнатальной крысы (2 ме-

сяца) проводился на кДНК библиотеках, синтезированных на мРНК из препарированных сетчаток. Полученные библиотеки были отнормированы по RPL19 человека и GAPDH крысы, соответственно (рис.1).

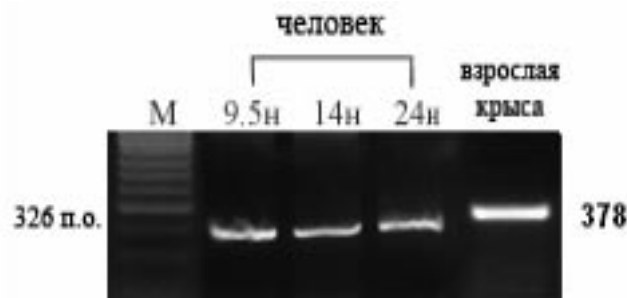


Рис.1 Нормирование кДНК-библиотек, синтезированных на мРНК из сетчаток человека и крысы, по RPL19 человека и GAPDH крысы.

На 9,5 неделе пренатального развития плода человека идет активный морфогенез глаза, в котором уже присутствуют зачатки всех основных структур. Сетчатка представлена двумя слоями нейробластов: внутренним и наружным. Во внутреннем нейробластическом слое идет дифференцировка мюллеровских и ганглиозных клеток. В пределах наружного нейробластического слоя формируются биполяры и горизонтальные клетки. Результаты ПЦР-анализа, свидетельствуют о наличии транскриптов PITX2 в сетчатке человека на этой стадии развития (рис.3).

Морфологическая характеристика глаза 14-недельного плода человека свидетельствует о еще более выраженных изменениях в гистологии тканей, по сравнению с 9,5 неделями эмбриогенеза.

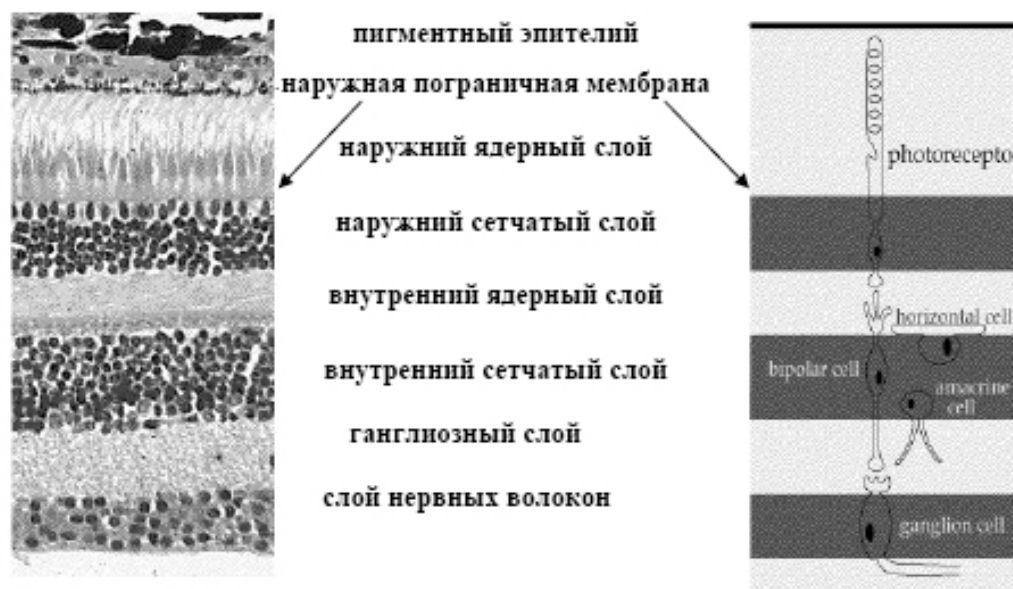


Рис 2. Структура слоев сетчатки [5,12].

В сетчатке начинают формироваться наружный и внутренний сетчатые слои. Продолжается дифференцировка ганглиозных и фоторецепторных клеток. Однако уровень экспрессии этого гена несколько снижается (рис.3), по сравнению с 9,5 неделями эмбриогенеза.

К 24 неделе пренатального развития сетчатка глаза практически сформирована. Присутствуют все ядерные и сетчатые слои (рис.2). Несмотря на то, что уровень экспрессии PITX2 снижается (рис.3), полученные результаты указывают на участие PITX2 не только в регуляции формирования сетчатки на ранних стадиях развития (9,5 недель), но и на конечных этапах дифференцировки клеток сетчатки (24 недели).

У крыс и мышей процесс дифференцировки клеток сетчатки продолжается и постнатально. Нами впервые идентифицирована экспрессия гена PITX2 в сетчатке постнатальной крысы (рис.3). Особенности морфогенеза сетчатки крысы позволяют предположить участие этого транскрипционного фактора в дифференцировке мюллеровских, фоторецепторных клеток и биполяров, поскольку дифференцировка ганглиозных и амакриновых клеток завершается во время пренатального развития.

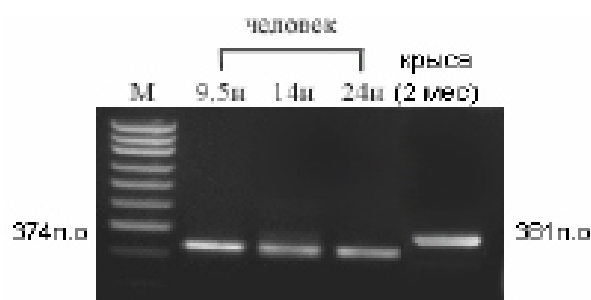


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа уровня экспрессии гена PITX2 в сетчатке глаза человека и крысы.

Сравнение морфогенеза глаз человека и других позвоночных, в частности крыс, позволяет выявить ряд несовпадений в темпах развития сетчатки, гистогенез которой у человека завершается в эмбриогенезе, а у крыс продолжается в постнатальный период развития. Исходя из полученных данных становится очевидно его участие в гистогенезе сетчатки как человека, так и крысы во время активного формирования этой структуры.

#### **Локализация белка PITX2 в клетках сетчатки человека на различных стадиях развития**

Для подтверждения и уточнения данных ПЦР-анализа об экспрессии PITX2 был использован метод иммуногистохимии, который позволил локализовать белковый продукт исследуемого гена в сетчатке человека на 9,5, 14 и 24 неделях пренатального развития глаза человека.

В сетчатке 9.5 недельного плода человека PITX2-позитивные клетки локализуются во внутреннем и наружном нейробластических слоях (рис.4). Совмещение изображения среза, окрашенного антителами против PITX2 (Б) и ядерным красителем Hoechst (А), демонстрирует локализацию PITX2 практически в ядрах всех клеток формирующейся сетчатки. Это также подтверждает принадлежность исследуемого гена к классу транскрипционных факторов.

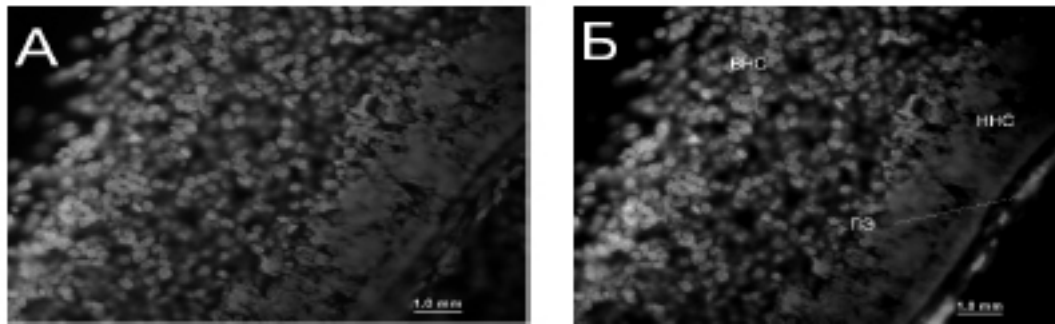


Рис.4 Локализация PITX2 в сетчатке 9,5-недельного плода человека. А – Hoeschst; Б – PITX2. ВНС – внутренний нейробластический слой, ННС – наружный нейробластический слой, ПЭ – пигментный эпителий.

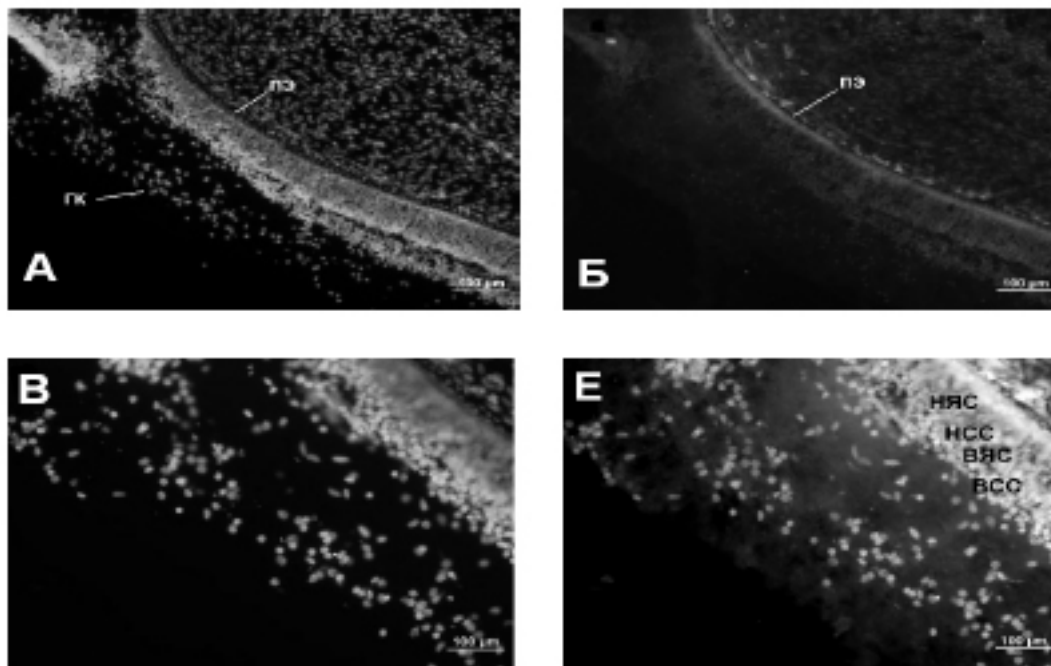


Рис.5 Локализация PITX2 в сетчатке 14-недельного плода человека. А – центральная область сетчатки (Hoeschst); Б – центральная область сетчатки (PITX2); В – периферическая область сетчатки (Hoeschst); Е – периферическая область сетчатки (PITX2). ГК – ганглиозные клетки, ВСС – внутренний сетчатый слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, НСС – наружный сетчатый слой, НЯС – наружный ядерный слой, ПЭ – пигментный эпителий.

В сетчатке 14-недельного плода человека иммунохимическая реакция на антитела против PITX2 детектируется практически во всех клетках (рис.5): в ганглиозном слое, во внутреннем ядерном, включающем амакриновые, горизонтальные клетки и биполяры, и в наружном ядерном слое, включающем фоторецепторные клетки. Важно отметить наличие белка PITX2 как в области выхода зрительного нерва (рис.5Б), так и в периферической области сетчатки (рис.5Е), поскольку дифференцировка клеток сетчатки идет в направлении от центра к периферии.

Таким образом, впервые показано наличие белка PITX2, как в недифференцированных клетках сетчатки на 9,5 неделе эмбриогенеза, так и в дифференцирующихся клетках 14-недельного плода, что свидетельствует о новых, еще не известных функциях этого фактора транскрипции в гистогенезе сетчатки. Наличие белка PITX2 в сетчатке на 14 неделе согласуется с результатами ПЦР-анализа.

К 24 неделе развития завершается дифференцировка всех клеточных типов сетчатки и, по сравнению с 14 неделей, наблюдается изменение локализации белка PITX2 (рис.6). На 24 неделе интенсивная иммунопозитивная реакция на окрашивание антителами против PITX2 выявлена только в ядрах ганглиозных клеток (гк) (рис.5). В других слоях сетчатки, дифференцировка которых близка к завершению, иммунохимический сигнал не детектируется.

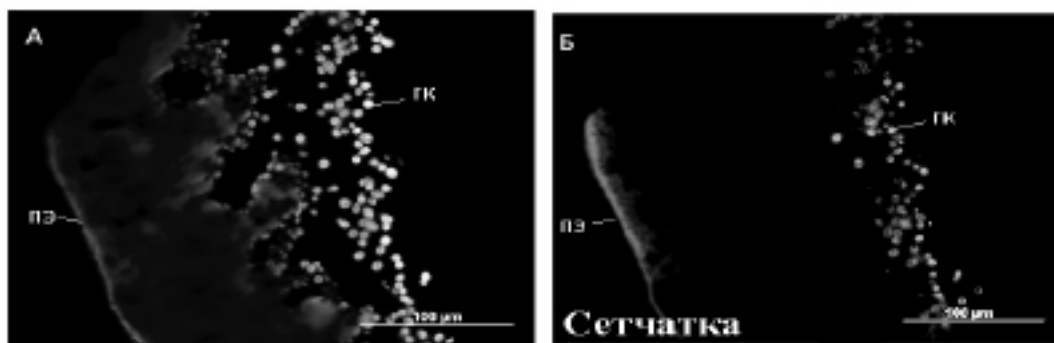


Рис.6 Локализация PITX2 в сетчатке 24-недельного плода человека. А – периферическая область сетчатки (Hoechst); Б – периферическая область сетчатки (PITX2). ГК – ганглиозные клетки, ПЭ – пигментный эпителий.

Таким образом, экспрессия PITX2 в сетчатке человека в ходе развития имеет ряд особенностей: на начальных этапах гистогенеза экспрессия PITX2 наблюдается практически во всех клетках сетчатки, а на более поздних – ограничена слоем ганглиозных клеток. Следовательно, транскрипционный фактор PITX2 является регулятором развития не только переднего сегмента глаза, как считалось ранее, но и сетчатки, что является принципиально новым фактом.

#### Анализ уровня экспрессии изоформ PITX2A и PITX2B в сетчатке позвоночных

Для PITX2 идентифицировано 4 изоформы (A, B, C и D), которые образуются путем альтернативного сплайсинга и/или с использованием альтернативного промотора [6, 12]. В глазу эмбрионов и новорожденных мышей выявлена экспрессия изоформ PITX2A и PITX2B [7, 12]. ПЦР-анализ со специфическими праймерами для изоформ A и B (рис.7) позволил впервые идентифицировать экспрессию изоформ A и B PITX2 в сетчатке человека на последовательных стадиях развития и в сетчатке постнатальной крысы.

Полученные данные могут свидетельствовать о сходном механизме регуляции развития сетчатки у эволюционно отдаленных групп позвоночных: человека и крысы. Вероятно нормальное развитие эмбриона, и глаза в частности, определяется точной настройкой экспрессии разных изоформ гена PITX2.

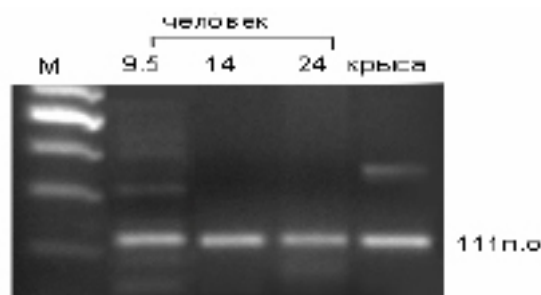


Рис.7 Результаты ПЦР-анализа уровня экспрессии изоформы PITX2A/B (111/140) в сетчатке глаза человека и крысы.

---

---

### Заключение

Сравнительные исследования развития глаза человека и позвоночных животных являются необходимыми из-за ряда особенностей морфогенеза глаза человека. Проведение некоторых экспериментальных исследований (например, направленный мутагенез, нокаут генов и т.д.) возможно только с использованием моделей животных. Таким образом, интеграция знаний, полученных при исследовании различных моделей, позволяет получить наиболее целостную картину развития глаза.

Полученные нами данные свидетельствуют, что ген *Pitx2* играет важную роль в развитии сетчатки глаза. В процессе дифференцировки клеток сетчатки принимают участие изоформы *Pitx2A* и *Pitx2B*, согласованная экспрессия которых необходима для нормального формирования этой структуры. Предполагается, что изоформы *Pitx2A* и *Pitx2B* участвуют в дифференцировке мюллеровских клеток, фоторецепторов и биполяров, т.к. у крысы их дифференцировка продолжается в постнатальный период.

До настоящего времени считалось, что ген *Pitx2* является регулятором развития переднего сегмента глаза [9, 12]. В наших исследованиях выявлена экспрессия гена в сетчатке, которая относится к заднему отделу глаза, что говорит о важной роли этого гена в развитии основных структур глаза. Нами показана зависимость уровня экспрессии этого гена от степени дифференцировки клеток сетчатки. Уровень экспрессии последовательно уменьшается в процессе дифференцировки, и к 24 нед. белок локализуется только в ганглиозных клетках. Результаты, полученные на разных объектах (человек, крыса), свидетельствуют о сходстве механизмов развития сетчатки у эволюционно отдаленных групп позвоночных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 08-04-00462.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Генетика: Учебник для вузов / под ред. Иванова В.И. М: ИКЦ «Академкнига», 2007. 638 с.
2. Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Панова И.Г., Сухих Г.Т., Зиновьева Р.Д., Миташов В.И. Исследование экспрессии регуляторных генов *Rax6*, *Prox1*, *Pitx2* в дифференцирующихся клетках глаза плода человека // Изв. РАН. Сер. Биол. 2006. № 4. С. 421-429.
3. Панова. И.Г., Подгорный. О.В., Вердиев. Б., Смирнова. Ю.А. Пролиферативные и дифференцировочные потенции клеток сетчатки плода человека *IN VIVO* и *IN VITRO* // Изв. РАМН. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. № 2. С. 103-109.
4. Фирсова Н.В., Зиновьева Р.Д. Молекулярно-генетические аспекты развития глаза человека // Известия РАН. Сер. Биол. 2008. № 4 С. 396 -408.
5. Balashov, N.A. and Bernstein, P.S. Purification and identification of the components of the human macular carotenoid metabolism pathways. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998. 39. S. 38.
6. Cox C.J., Espinoza H.M., McWilliams B., Chappell K., Morton L., Hjalt T.A., Semina E.V. Differential regulation of gene expression by *PITX2* isoforms // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 28. P. 25001-25010.
7. Gage P.J., Camper S.A. Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. № 3. P. 457-464.
8. Hjalt T.A., Semina E.V., Amendt B.A., Murray J.C. The *Pitx2* protein in mouse development // *Dev. Dyn.* 2000. V. 218. P. 195-200.
9. Semina E.V., Reiter R., Leysens N.J., Alward W.L., Small K.W., Datson N.A., Siegel-Bartelt J., Bierke-Nelson D., Bitoun P., Zabel B.U., Carey J.C., Murray J.C. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, *RIEG*, involved in Rieger syndrome // *Nat. Genet.* 1996. V. 14. P. 392-399.