



ГЕН *ag1* НЕОБХОДИМ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАВНИКОВ У РЫБЫ *Danio rerio*

© 2015 г. И. Н. Шандарин*, А. С. Иванова*, А. А. Минин**,
М. Б. Терешина*, А. Г. Зарайский#.*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Поступила в редакцию 13.01.2015 г. Принята к печати 06.02.2015 г.

На модели регенерации хвостового плавника рыбы *Danio rerio* впервые установлено, что секретируемый белок – Ag1 – необходим для регенерации. Показано, что ампутация хвостового плавника индуцирует быструю активацию экспрессии гена этого белка в клетках раневого эпителия. Вместе с тем, ингибирование трансляции мРНК *ag1* вызывает замедление регенерации. Результаты этой работы важны потому, что ген *ag1* имеется только у низших, хорошо регенерирующих позвоночных, включая рыб и амфибий, но отсутствует у высших позвоночных, не способных к эффективной регенерации конечностей. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение потенциальной возможности регенерации у высших позвоночных, в том числе у человека, может объясняться исчезновением у них некоторых генов, важных для регенерации, в частности, гена *ag1*.

Ключевые слова: *Danio rerio*, регенерация, *ag1*.

DOI: 10.7868/S0132342315040120

ВВЕДЕНИЕ

Семейство генов *agr* включает три подсемейства *ag1*, *agr2* и *agr3*, гены которых кодируют секретируемые белки, содержащие тиоредоксиновый домен и регулирующие клеточный рост и дифференцировку [1]. Ранее мы показали, что гены подсемейства *ag1* имеются только у низших позвоночных животных (рыб и амфибий), обладающих высокой потенциальной возможностью регенерации, но были утрачены в ходе эволюции у высших позвоночных (рептилий, птиц и млекопитающих), не способных к регенерации конечностей [2] (см. также филогению семейства генов *agr* на рис. 1а). В этой же работе мы продемонстрировали активацию экспрессии гена *ag1* при регенерации хвоста и задней конечности у головастика шпорцевой лягушки. Данное обстоятельство указывает на важность гена *ag1* для регенерации, а также свидетельствует в пользу гипотезы о том, что его утрата в ходе эволюции могла быть одной из причин снижения регенерационных способностей у высших позвоночных. В настоящей работе мы проверили эти предположения, изучив экспрессию и физиологическую функцию гена *ag1* при регенерации хвостового плавника у представителя другой большой группы низших позвоночных – рыбы *Danio rerio*.

Автор для связи (тел.: +7 (916) 848-30-16; эл. почта: azaraisky@yahoo.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии гена *ag1* (*ag1-a*) рыбы *Danio rerio* проводили с помощью метода гибридизации *in situ* с меченной дигоксегенином антисмысловой РНК-пробой (dig-проба) к мРНК гена *ag1 D. rerio* на целых хвостовых плавниках взрослых рыб, которые фиксировали по стандартному протоколу на 1-ый день после ампутации (1 дпа). В результате мы обнаружили существенное усиление сигнала гибридизации в регенератах по сравнению с интактной частью плавника рис. 1б. Как было установлено с помощью гистологических срезов плавников, подвергнутых гибридизации, транскрипты *ag1* были преимущественно локализованы в клетках раневого эпителия регенерирующего плавника. Интересно, что такая локализация транскриптов *ag1 D. rerio* хорошо согласуется с полученными нами ранее данными об аналогичной локализации транскриптов ортолога этого гена, *xag1/2*, в регенерирующих хвостах и почках задних конечностей головастика шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [2]. В свою очередь, это обстоятельство указывает на возможное сходство функций, выполняемых белком Ag1 при регенерации придатков тела у рыб и амфибий.

В качестве альтернативного метода анализа экспрессии *ag1 D. rerio* в процессе регенерации мы использовали метод ПЦР в реальном времени. Образцы плавников с сформировавшейся бластемой (по 5 фрагментов плавников от разных рыб в 3 повтор-

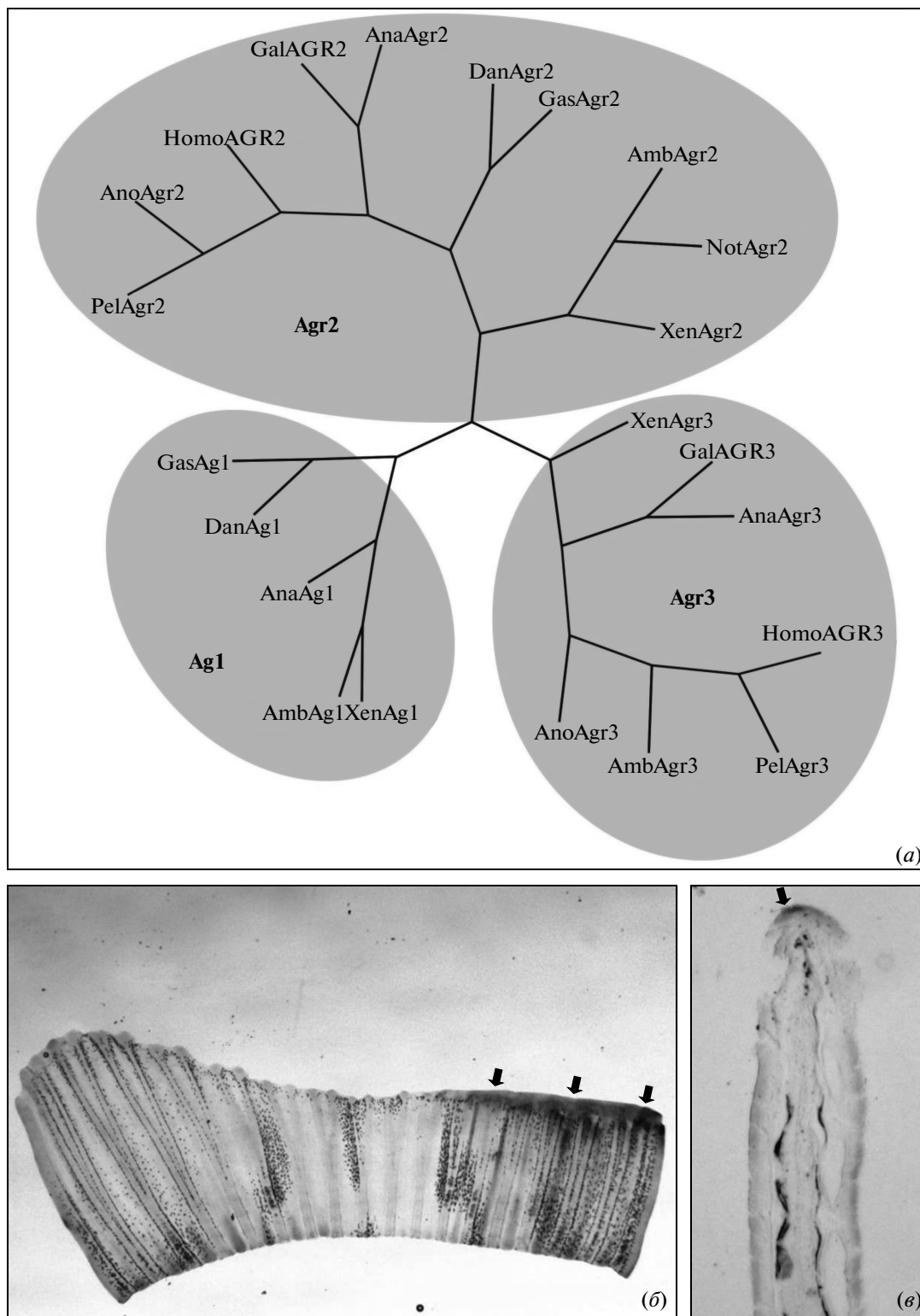


Рис. 1. Филогения генов семейства *Agr* и локализация экспрессии гена *ag1* в хвостовом плавнике *Danio rerio*. (а) Филогенетическое древо белков Ag1, Agr2 и Agr3. Расшифровка сокращений: Homo – *Homo sapiens*; Gal – *Gallus gallus*; Pel – *Pelodiscus sinensis*; Ano – *Anolis carolinensis*; Xen – *Xenopus laevis*; Amb – *Ambystoma mexicanum*; Ana – *Anas platyrhynchos*; Not – *Notophthalmus viridescens*; Dan – *Danio rerio*; Gas – *Gasterosteus aculeatus*. (б) *In situ*-гибридизация хвостового плавника *Danio rerio* на 1-й день после ампутации (1 дпа); правая половина взята в качестве интактного контроля; стрелками показана локализация мРНК *ag1*. (в) Продольный срез плавника на 1 дпа; стрелки обозначают локализацию мРНК *ag1*.

ностях) были собраны на тех же сроках, что и в опытах по гибридизации *in situ* (рис. 2а). В качестве контроля использовали аналогичные образцы, взятые сразу после ампутации. Суммарную РНК выделяли из собранных образцов с помощью коммерческих наборов компании “Macherey-Nagel” (США). Синтез первой цепи кДНК и ПЦР в реальном времени полученных образцов РНК проводили с помощью коммерческого набора компании “Евроген” (Россия). Для нормализации данных использовали геометрическое среднее от данных, полученных в результате ПЦР в реальном времени тех же образцов с праймерами к мРНК двух генов “домашнего хозяйства” *D. rerio*: *odc* (ген орнитиндекарбоксилазы [3] и *ef1a* (ген фактора элонгации трансляции 1 альфа). Также, в качестве положительного внутреннего контроля, мы проводили ПЦР в реальном времени с праймерами для двух генов *igf2b* и *fgf20a* *D. rerio*, активация экспрессии которых была показана ранее другими авторами [4, 5].

Как показано на рис. 2б, экспрессия *ag1 D. rerio* существенно возрастает на 2-й день после ампутации и к пятому дню достигает своего максимального значения, что согласуется с нашим предположением об участии этого гена в регенерации. Полученные данные в целом напоминают картину экспрессии *xag1/2* у шпорцевой лягушки [2]. Характер экспрессии маркерных генов *igf2b* и *fgf20a D. rerio* в наших экспериментах хорошо согласует-

ся с литературными данными [4, 5], что позволяет говорить о достоверности наших результатов.

Чтобы продемонстрировать непосредственное участие *ag1 D. rerio* в регенерации хвостового плавника мы подавили трансляцию мРНК *ag1* с помощью микроинъекций в одну половину плавника антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов, комплементарных области мРНК *ag1 D. rerio*, включающей стартовый кодон, и способных проникать через клеточные мембраны (*VivoMO ag1*). В результате мы обнаружили, что микроинъекции *VivoMO ag1* вызывают асимметрию хвостового плавника (рис. 2в, 2г) и значительно замедляют регенерацию (рис. 2д).

Таким образом, наши данные подтверждают участие гена *ag1* в регенерации хвостового плавника *D. rerio*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ампутацию плавников проводили с помощью микрохирургических ножниц. Dig-пробу синтезировали *in vitro* с помощью SP6-полимеразы и стандартного набора реактивов (Boehringer, Германия), на основе кДНК *ag1 D. rerio*, предварительно клонированной в плазмиду T-Gem (Promega, США). кДНК *ag1 D. rerio* была получена в результате проведения ПЦР с обратной транскрипцией суммарной РНК из эмбрионов *Danio rerio* (на стадии 48 ч после оплодотворения) с помощью следующих праймеров (все праймеры 5'–3'):

Ag1 forward: ATGAATTCTTATGAAATTCTGAAGACA;

Ag1 reverse: GAGTCGACGATCAGAGTTCAGTCTGC.

Полученный фрагмент кДНК клонировали в плазмиду T-Gem (Promega).

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали следующие праймеры:

Dag1 forward CACTGGCCGCTCTGTATACTT;

Dag1 reverse CTCTTGAGAGAGTTTGGACTGT.

ODC forward CTCCACCTTCAATGGCTTCCAG;

ODC reverse AGTGGGATGGCACGTTTCCAG;

EF-1alpha forward AAGAACGTGTCAGTCAAGGACAT;

EF-1alpha reverse CGTAACCCTGAGAGATCTGACCA;

Fgf20a forward AAGGGCGAACTGTACGGAT;

Fgf20a reverse TTGAGGGCTACATAATAAT;

Igf2b forward GCAGGTCATTCCAGTGATGC;

Igf2b reverse TCTGAGCAGCCTTTCTTTGC.

Vivo-морфолиновые олигонуклеотиды компании “GeneTools” (USA) имели следующую структуру:

Dag1 VivoMO ACAGAGCGGCCAGTGCTGCATGATT;

control VivoMO TCTGTGGATGTCTTGCTCTTCCAGG.

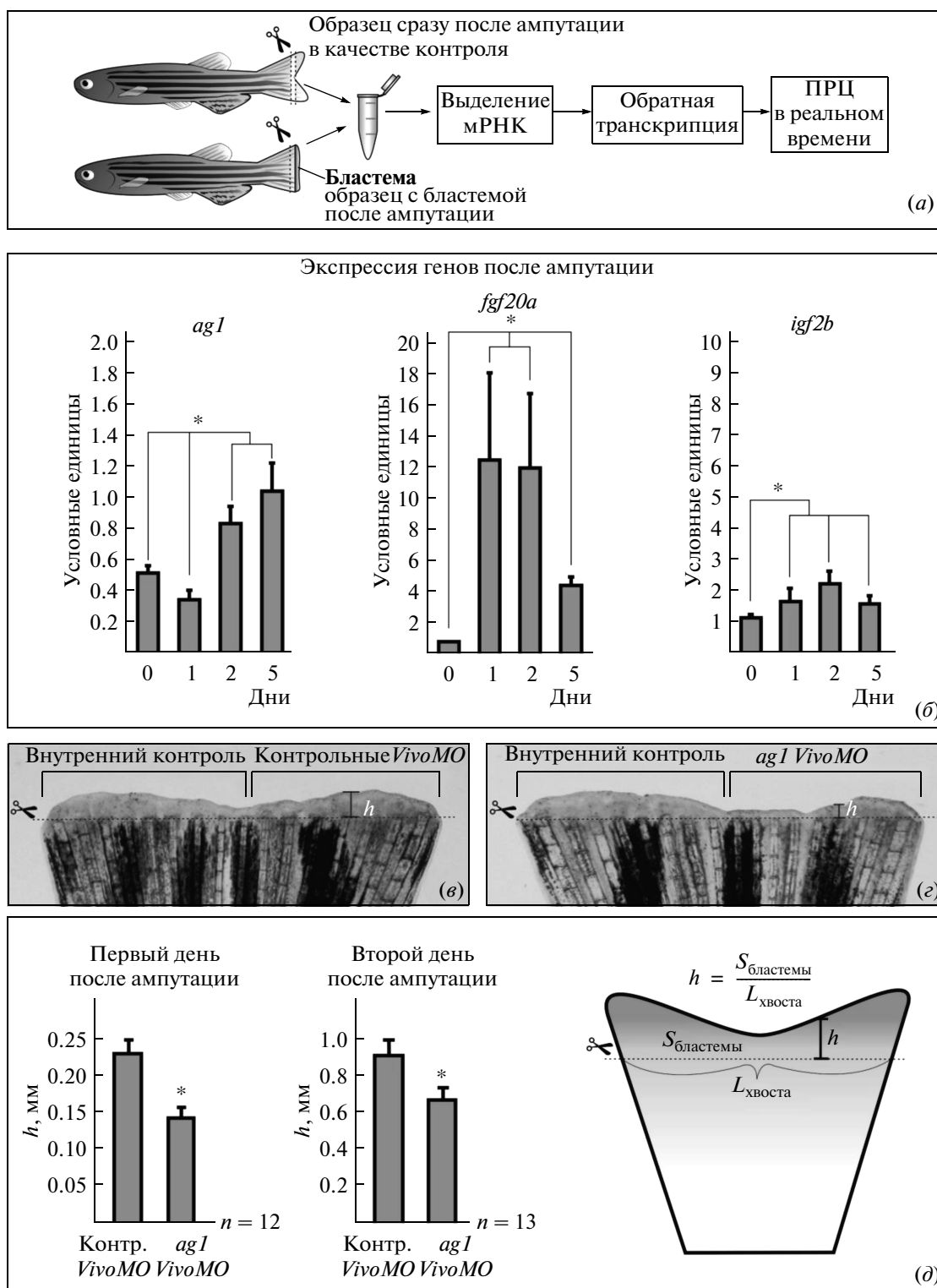


Рис. 2. Изучение экспрессии гена *ag1* и влияния подавления трансляции мРНК *ag1* на регенерацию. (а) Схема постановки эксперимента ПЦР в реальном времени (подробнее см. в тексте). (б) Характер экспрессии *ag1*, *fgf20a*, *igf2b* *D. rerio* в контрольных образцах сразу после ампутации и на 1, 2, 5 дпа (* $p < 0.01$). (в, г) Регенерирующие хвостовые плавники на 2 дпа; инъекции контрольных *VivoMO* или *ag1 VivoMO* производились в правую половину плавника. (д) Графики, отражающие высоту наросты бластемы (*h*, мм) на 1 и 2 дпа (* $p < 0.01$); справа схема подсчетов (*S* – площадь бластемы, *L* – ширина плавника).

Подсчеты длины выросшей бластемы проводили в программе ImageJ по схеме, представленной на рис. 2*д*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была выполнена за счет средств комплексной научной программы Российского Фонда Фундаментальных Исследований 14-50-00131.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fritzsche F.R., Dahl E., Pahl S., Burkhardt M., Luo J., Mayordomo E., Gansukh T., Dankof A., Knuechel R., Denkert C., Winzer K.-J., Dietel M., Kristiansen G.* // Clin. Cancer Res. 2006. V. 12. P. 1728–1734.
2. *Ivanova A.S., Tereshina M.B., Ermakova G.V., Belousov V.V., Zاراisky A.G.* // Sci. Rep. 2013. V. 3. P. 1279.
3. *Xanthos J.B., Kofron M., Tao Q., Schaible K., Wylie C., Heasman J.* // Development. 2002. V. 129. P. 4027–4043.
4. *Whitehead G.G., Makino S., Lein C.-L., Kea-ting M.T.* // Science. 2005. V. 310. P. 1957–1960.
5. *Chablais F., Jazwinska A.* // Development. 2010. V. 137. P. 871–879.

ag1* Is Required for the Fin Regeneration in *Danio rerio

A. S. Ivanova*, I. N. Shandarin*, A. A. Minin, M. B. Tereshina*, A. G. Zاراisky#,***

#Phone: +7 (916) 848-30-16; e-mail: azاراisky@yahoo.com

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow

**Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow

In the current research, we have demonstrated that Ag1 protein is necessary for the fin regeneration in the fish *Danio rerio*. Robust activation of gene *ag1* expression in cells of the wound epithelium is observed after caudal fin amputation. Besides, inhibition of translation of *ag1* mRNA leads to retardation of the caudal tail fin regeneration. Results of our research are important because only lower vertebrates (fish and amphibians) with good regenerative capacity have *ag1*, whereas this gene is missing in higher vertebrates, which are not capable to effectively regenerate limbs. Our data confirm that reduction of the regenerative abilities in higher vertebrates, including human, could be explained by extinction of some genes essential for the regeneration, in particular, of *ag1*.

Keywords: Danio rerio, regeneration, ag1