

на правах рукописи

УДК 591.596/599

РГБ ОД

09 ФЕВ 1997

ЗНОЙКО

Ия Юрьевна

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ЭКСПРЕССИИ ГОМЕОБОКСНЫХ ГЕНОВ
СЕМЕЙСТВА SIX В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ КОНЕЧНОСТИ АМФИБИЙ

03.00.30 биология развития

03.00.03 молекулярная биология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 1997

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики
Института биологии развития им. Н. К. Кольцова
(Директор Института - академик Н. Г. Хрущов)

Научные руководители:

Кандидат биологических наук Р. Д. Зиновьева
Доктор биологических наук В. И. Миташов

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук А. Г. Бабаева
Уч.-корр. РАН Доктор биологических наук Л. И. Корочкин

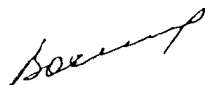
Ведущее учреждение: Биологический факультет
Московского Государственного Университета
им. М. В. Ломоносова

Защита диссертации состоится *11.02* 1998 года в 11 часов
на заседании диссертационного совета Д 002.85.01
при Институте биологии развития им. Н. К. Кольцова
РАН по адресу: г. Москва, ул Вавилова, 26

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН (Москва, ул. Вавилова, 26

Автореферат разослан *30* декабря 1997 года.

Ученый секретарь специализированного совета
кандидат биологических наук



Е. В. Волин

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. Одной из наиболее актуальных проблем современной биологии является изучение молекулярных механизмов, направляющих развитие отдельных органов и организма в целом (Stocum, 1995; Tsouls, 1996). В данной работе предпринята попытка выявить и охарактеризовать гены, участвующие в регулировании процесса регенерации конечности амфибий. Проблема регенерации волнует биологов и медиков уже давно, и на морфологическом уровне она достаточно хорошо описана. Однако, молекулярно-генетические механизмы этого процесса остаются неясными. Очевидно, что начало процесса регенерации после утраты органа или повреждения его части является следствием активации экспрессии генов, которые в нормальных условиях "молчат". Выявление и изучение этих генов помогло бы, во-первых, ответить на вопрос, почему только некоторые животные обладают способностью к регенерации, и, во-вторых, возможно, получить средство для стимуляции регенерации у животных (и человека), которые в норме не обладают способностью к регенерации. Понимание молекулярно-генетических механизмов регенерации помимо фундаментально-научного значения может также иметь и практическое значение для решения таких медицинских проблем, как заживление ран и восстановление пораженных тканей.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Целью настоящей работы было выявить и охарактеризовать гены, специфически экспрессирующиеся в ходе регенерации конечности амфибий. В качестве претендентов на роль таких генов были выбраны гомеобоксные гены семейства *Six*, так как известно, что гены этого семейства играют важную роль в развитии мышц. Моделью для исследования служили представители бесхвостых (травяная лягушка *Rana temporaria*) и хвостатых (испанский тритон *Pleurodeles waltl* и аксолотль (*Ambystoma mexicanum*) амфибий. Поскольку указанные животные обладают различной способностью к регенерации конечности, выбранная модель дает возможность оценить роль, которую играют анализируемые гомеобоксные гены в процессе регенерации, а также установить, существует ли связь между их экспрессией и регенерационной способностью изучаемых животных.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

1. В данной работе впервые идентифицированы гомеобоксные

гены семейства *Six*, экспрессирующиеся у амфибий.

2. Впервые проведены исследования уровня экспрессии генов семейства *Six* в ходе регенерации конечности хвостатых и бесхвостых амфибий.

3. Впервые показано наличие корреляции между экспрессией *Six* генов и регенерационной способностью у амфибий.

4. Нами впервые получен и охарактеризован фрагмент гена *Stx1* лягушки *Rana temporaria*, а также фрагменты генов семейства *Six*, экспрессирующиеся в ходе регенерации конечности у тритона *Pleurodeles waltl* и аксолотля *Ambystoma mexicanum*.

Практическая значимость работы определяется прежде всего непосредственной близостью проблемы, освещаемой в диссертации, к практическим задачам медицины.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные положения диссертации доложены на Европейской конференции международной ассоциации исследователей регенерации 29 сентября - 3 октября 1997 г в Кельне (Германия) и на конференции "Современные проблемы биологии развития", посвященной 30-летию Института биологии развития им. Н.К. Кольцова, 29-31 октября 1997 г в Москве.

ПУБЛИКАЦИИ. Основные результаты диссертационной работы изложены в 3-х публикациях.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, глав с изложением материала и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Изложена на 162 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками. Список литературы содержит 149 источника, в том числе 6 на русском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Идентифицированы гомеобокс-содержащие гены семейства *Six*, гомологи гена дрозофилы *sine oculis*, у травяной лягушки (*Rana temporaria*), испанского тритона (*Pleurodeles waltl*) и аксолотля (*Ambystoma mexicanum*). Обнаружена дифференциальная экспрессия *Six* генов в ходе регенерации конечности у изученных амфибий.

Выявлена корреляция экспрессии этих генов с наличием регенерационной способности у изученных животных. Определена первичная структура наиболее консервативных участков идентифицированных генов. С помощью компьютерного анализа выявлены различия в первичной структуре генов семейства *Six*, экспрессирующихся в регенератах конечностей тритона, лягушки и аксолотля, с одной стороны, и общие структурные особенности этих генов у всех изученных амфибий в сравнении с соответствующими генами млекопитающих, с другой стороны. Структурный анализ полученных клонов показал, что впервые удалось выделить и охарактеризовать фрагмент гена *Six1* лягушки *Rana temporaria* и участки генов семейства *Six*, экспрессирующихся в регенерирующих конечностях хвостатых амфибий. В процессе работы сконструирована кДНК библиотека зародышей тритона на 20-30 стадиях развития, клонированная в фэгмиде UNI-ZAP XR. Подобрана система для поиска полноразмерных копий охарактеризованных клонов в виде Marathon-кДНК амплифицированной библиотеки регенерирующих тканей конечности испанского тритона.

ВВЕДЕНИЕ.

Генетический контроль восстановительных процессов (регенерации) является предметом интенсивного изучения. Развитие этого направления исследований открывает возможности не только для понимания молекулярных механизмов такого сложного процесса как регенерация органов и тканей, но и для практического использования полученных данных для решения био-медицинских задач. Современные молекулярно-биологические методы исследования позволяют искать подходы для решения проблемы восстановления утраченной способности к регенерации путем выявления и изучения генов, специфически экспрессирующихся в ходе регенерации. Поскольку прогрессивная фаза регенерации имеет много общего с процессом развития, логично предположить, что в этих двух процессах могут участвовать сходные регуляторные гены.

Молекулярные механизмы, управляющие важнейшими биологическими функциями, - высококонсервативны, так как находятся под эволюционным давлением. Наиболее ярко это демонстрируют гомеобоксные гены, участвующие в регуляции важнейших процессов в хо-

де развития организма. Эти гены содержат в своем составе гомеобокс - высококонсервативный участок, кодирующий гомеодомен, ответственный за связывание регуляторного белка с ДНК. Практически все гомеобоксные гены являются транскрипционными факторами; на данный момент есть все основания предполагать, что именно они играют ключевую роль в определении "клеточной судьбы".

Данное исследование было предпринято для установления возможного участия гомеобоксных генов семейства *Six* в ходе регенерации конечности амфибий. В качестве модели были выбраны представители бесхвостых (лягушка) и хвостатых (тритон и аксолотль) амфибий. Поскольку указанные животные обладают различной способностью к регенерации конечности, выбранная модель дает возможность оценить роль, которую играют вышеназванные гомеобоксные гены в реализации регенерационной потенции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Биологический материал. Работа выполнялась на следующих видах животных: лягушки травяные (*Rana temporaria*), тритоны испанские (*Pleurodeles waltl*) и аксолотль (*Ambystoma mexicanum*). Все операции на животных проводились под наркозом MS 222. У взрослых тритонов и аксолотлей удаляли задние конечности на уровне 1/2 бедра и 1/2 голени. У личинок лягушки удаляли задние конечности на IIa и III стадиях развития по Полежаеву (Полежаев, 1968). Образовавшиеся регенераты конечности удаляли на стадиях ранней, средней и поздней почки, на стадии конуса. До момента использования образцы тканей хранили при -70°C.

Выделение РНК и синтез 1-ой цепи кДНК. Из полученных образцов ткани выделяли РНК гуанидинтиоцианатным методом с помощью набора TRI-REAGENT (Molecular Research Center, Inc., США). 1-ую цепь кДНК синтезировали по стандартному протоколу с помощью обратной транскриптазы M-MLV-RT (BRL, США).

Выделение геномной ДНК из семенников тритона и лягушки проводили по стандартному протоколу с помощью протеиназного метода.

Анализ экспрессии генов семейства Six проводили с использованием метода RT-PCR. С помощью компьютерного анализа (пакет программ DNASTAR) известных структур генов семейства Six млекопитающих были сконструированы вырожденные праймеры. В качестве матрицы использовали образцы 1-ой цепи кДНК, синтез которых описан выше.

Выделение и клонирование амплифицированных фрагментов. Фрагменты, полученные в результате амплификации фракционировали в 1,5% агарозном геле. Из геля кДНК элюировали с помощью набора GeneClean II (Bio 101 Inc., США). Полученные фрагменты кДНК клонировали в вектор pCR 2 с помощью набора "Original TA Cloning Kit" Version F (InvitroGen, США).

Определение первичной структуры кДНК проводили секвенированием по методу Сэнгера с использованием универсальных M13 праймеров.

Компьютерный анализ. Первичную структуру полученных кДНК фрагментов анализировали с помощью пакета программ "DNASTAR".

Конструирование кДНК библиотеки зародышей тритона на 20-30 стадиях развития проводили с помощью набора ZAP-cDNA SYNTHESIS KIT (Stratagene, США).

Создание амплифицированной кДНК библиотеки тканей регенерирующей конечности тритона проводили в системе "Marathon" (Clontech, США). мРНК выделяли с помощью набора "DYNABEADS mRNA purification kit" (DYNAL, США). Скрининг библиотеки проводили с помощью метода 3' и 5'RACE.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Анализ экспрессии гомеобоксных генов семейства Six в интактных и регенерирующих структурах амфибий.

Для поиска гомологов генов семейства Six, экспрессирующихся в развивающихся и регенерирующих тканях амфибий мы использо-

вали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). На основе известных структур генов *Six1*, *Six2* и *Six3* мыши были сконструированы вырожденные праймеры, фланкирующие консервативный участок, общий для генов семейства и содержащий два домена: так называемый, *Six*-бокс и гомеобокс, что соответствовало положениям между 139 и 492 нуклеотидами для *Six1*, 247 и 600 для *Six2*, 602 и 955 для *Six3* (Oliver et al., 1995).

В качестве матрицы использовали РНК, выделенную из регенераторов конечностей животных, обладающих различной способностью к ее регенерации, а также из развивающихся и дифференцированных конечностей. Известно, что в отличие от тритонов, которые сохраняют способность к регенерации полноценной конечности на протяжении всей жизни, конечность у травяных лягушек может регенерировать только в том случае, если она была удалена на достаточно ранней стадии развития (до IIб стадии по Полежаеву, см. Рис. 1). Лягушки на продвинутых стадиях развития, начиная с III, а также взрослые особи полностью утрачивают способность к регенерации конечности.

Таким образом, при проведении данных исследований мы пытались ответить на следующие вопросы: во-первых, экспрессируются ли гены семейства *Six* в ходе регенерации конечности у амфибий, и, во-вторых, существует ли корреляция между экспрессией *Six* генов и регенерационной способностью животных.

Результаты ПЦР эксперимента, представленные на Рис. 2, показали, что экспрессия генов семейства *Six* наблюдалась в регенератах конечности тритона и лягушки. В дифференцированных тканях взрослого тритона экспрессия генов семейства *Six* не обнаружена. Следует особо отметить, что экспрессия этого гена наблюдалась в развивающейся конечности лягушки на стадии, когда она способна к регенерации конечности, и не детектировалась на следующей стадии развития лягушки, когда она теряет способность к регенерации конечности (Рис. 2, 1-ая и 3-я дорожки, соответственно). Полосы, присутствующие в дорожках, соответствующих образцам геномной ДНК лягушки и тритона, подтверждают наличие гомологов *Six*-генов в геномах лягушки и тритона, а также свидетельствуют о том, что этот район гена не интронирован (Рис 2).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что экспрес-

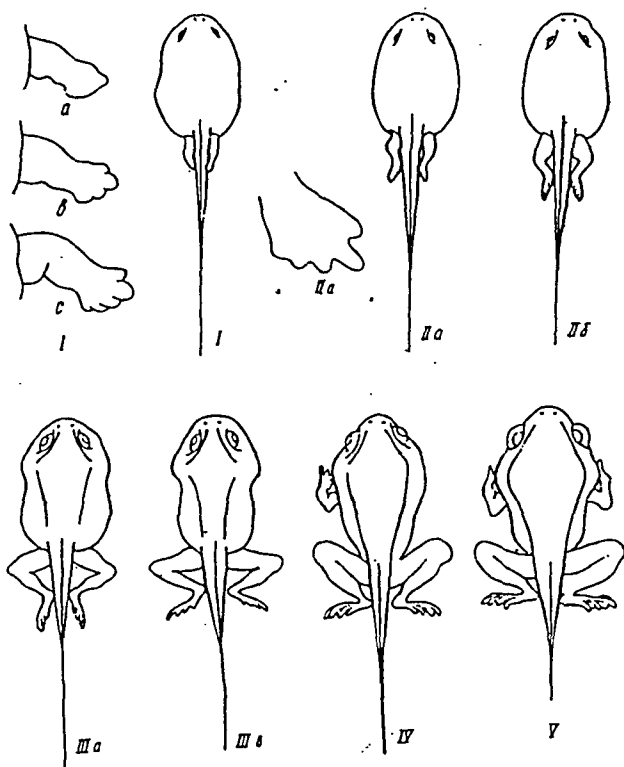


Рис. 1. Последовательные стадии метаморфоза головастиков травяной лягушки (Полежаев, 1968).

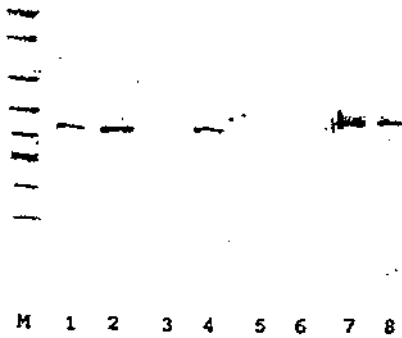


Рис. 2. Электрофоретическое фракционирование в 1,5% агарозном геле продуктов ПЦР реакции, с синтетическими олигонуклеотидными прайкерами, фланкирующими наиболее консервативный участок генов семейства *Six*, размером около 350 п.н. В качестве матрицы использовали материал, выделенной: из развивающейся конечности травяной лягушки на стадии развития, когда возможна регенерация (до IIa стадии по Полежаеву, 1 дорожка) и когда регенерация невозможна (III стадия по Полежаеву, 3 дорожка); из регенерата конечности травяной лягушки (2 дорожка) и испанского тритона (4 дорожка); из дифференцированной конечности тритона (5 дорожка); из конечности взрослого тритона без кожи (6 дорожка); образцы геномной ДНК лягушки (7 дорожка) и тритона (8 дорожка). М - маркер молекулярных весов, содержащий фрагменты размером 1000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100 и 50 п.н.

сия генов семейства *Six* наблюдается в ходе регенерации и на ранних стадиях развития, но не детектируется на поздних этапах развития лягушки и в дифференцированных тканях конечности взрослых амфибий. Таким образом, обнаруженная нами корреляция экспрессии генов семейства *Six* и регенерационной способности у лягушек позволила сделать вывод о том, что экспрессия этих генов характерна для периода интенсивных формообразовательных процессов в развивающейся и регенерирующей конечности.

Анализ первичной структуры генов семейства *Six*, экспрессирующихся в регенерирующих конечностях амфибий.

Для идентификации полученных фрагментов и анализа их первичной структуры они были клонированы в вектор pCR2 (InVitro-Gen, США) и секвенированы. На Рис. 3 представлены последовательности клонов, несущих фрагменты генов, экспрессирующихся в регенерирующей (*SixReg3*) и развивающейся (*SixRT8*) конечности лягушки, регенерате конечности тритона (*SixPw1*), а также первичная структура фрагмента, полученного нами аналогичным образом из регенерирующей конечности другого представителя хвостатых амфибий, аксолотля *Ambystoma mexicanum* (*AmFLR*).

Анализ представленных последовательностей показал, что исследованные участки генов, экспрессирующихся в развивающейся и регенерирующей конечности лягушки практически идентичны, за исключением 4-х *silence-мутаций* по 84, 124, 291 и 294 положениям, не приводящим к заменам на аминокислотном уровне. Скорее всего, эти замены объясняются внутривидовым полиморфизмом, однако нельзя исключить возможность существования альтернативных форм гена, участвующих в различных процессах - развитии и регенерации.

Хотя анализируемый участок - наиболее консервативная часть гена, между первичными последовательностями клонов из регенерата конечности лягушки и регенерата конечности тритона (см. Рис. 3) было выявлено достаточно большое количество различий - 44 замены на нуклеотидном уровне, которые привели к замене 6 аминокислот. Сравнение структур кДНК клонов из регенерата конечности другого представителя хвостатых амфибий, аксолотля, и травяной лягушки выявило 48 различий на нуклеотидном и 7 на

1	T T C C A C A G C G G C A A C T T C C G A G A G C T C T A C A A G A T C C T G G A G A G C C A C C A G T T C T C C C C C C A C A A C C A C C	SIXREG3
1	SIXRT8
1 G G C G G C G C C G . G	SIXPW1
1 C G C G C C T . G	AMFLR
71	C C A A G C T G C A G C A A C T G T G G C T C A A G G C T C A C T A C G T G G A G G C G G A G A A G C T G C G G G G A A G A C C C C T T G G	SIXREG3
71 G A A T C C G . T	SIXRT8
71 C A A T C C G . T	SIXPW1
71 G . C G C . T G G C G G . G C	AMFLR
141	G G C A G T G G G C A A G T A C C G G G T G A G G A G G A A A T T C C C C C T G C C C A G G A C C A T C T G G G A C G G A G A G G A G A C C	SIXREG3
141	SIXRT8
141 C A G G C T T	SIXPW1
141 G T C . C G G C . C C G	AMFLR
211	A G C T A C T G C T T C A A G G A G A A A T C C A G G G G G G T G C T G A G A G A G T G G T A T G C C C A C A A C C C C T A C C C T T C T C	SIXREG3
211	SIXRT8
211 C . T C C C . C C . A G . C	SIXPW1
211 G . C . C . A C C . C C . G G . C	AMFLR
281	C C C G G G A G A A C A G A G A G C T G G C C G A G G C C A C T G G A C T C A C C A C T A C T C A G G T C A G C A A C T G G T T T A A G A A	SIXREG3
281 A . G G . G C . C	SIXRT8
281 G A . C . G T G . G C . C	SIXPW1
281 G C . G C C . G	AMFLR
351	C C G G	SIXREG3
351	SIXRT8
351	SIXPW1
351	AMFLR

Рис. 3. Первичная структура кДНК клонов, выделенных из регенерирующей (SixReg3) и развивающейся конечности травяной лягушки (SixRT8), а также регенерирующей конечности испанского тритона (SixPW1) и аксолотля (AmFLR). Структура SixReg3 приведена полностью, в остальных клонах обозначены только замены нуклеотидов.

аминокислотном уровнях. Сравнение первичных последовательностей клонов хвостатых амфибий - *тритона* и *аксолотля* - между собой, обнаруживает 36 замен на нуклеотидном и 9 на аминокислотном уровне.

Несмотря на то, что, все полученные нами клоны амфибий различаются между собой, для них характерны некоторые структурные черты, выделяющие их в единую группу при сравнении с известными генами млекопитающих. На Рис. 4 приведено сравнение первичных последовательностей полученных клонов амфибий и соответствующего фрагмента наиболее близкого к ним из опубликованных генов млекопитающих - *Six1* мыши. Следует отметить, что многие замены идентичны для всех изученных амфибий (см., например, положения 7, 36, 66, 75, 138, 141 и др). Этот факт может не только иллюстрировать очевидную эволюционную дистанцию между амфибиями и млекопитающими, но и отражать возможные функциональные различия генов семейства *Six*, экспрессирующихся у названных таксонов.

На Рис. 5 представлен сравнительный анализ производных аминокислотных последовательностей полученных клонов, а также соответствующих участков известных генов семейства *Six* мыши и гена *sine oculis* дрозофилы.

Следует подчеркнуть, что кДНК клон *SixReg3* травяной лягушки по структуре практически идентичен гену *Six1* мыши - на аминокислотном уровне присутствует всего одна замена по 3-ему положению. Таким образом, ген дифференциально экспрессирующийся в процессе регенерации конечности лягушки, скорее всего, является членом *Six1* лягушки *Rana temporaria*.

Аминокислотная последовательность кДНК клонов из регенерирующих конечностей тритона и аксолотля гораздо сильнее отличается от структур известных генов семейства *Six*. Наибольшую степень гомологии из всех опубликованных последовательностей клоны тритона и аксолотля демонстрируют с геном *Six1* мыши: 82,8% и 5,6% гомологии на нуклеотидном и 94,1% и 93,2% гомологии на аминокислотном уровнях, соответственно (см. Рис. 6). Однако, различий в структуре разных генов мыши *Six1* и *Six2* даже меньше - 85% гомологии на нуклеотидном и 95,8% гомологии на аминокислотном уровнях. Несмотря на то, что гены семейства *Six* амфибий образуют единую структурную группу (Рис. 4) в сравнении с гена-

1 A C GCG CC T . G C	AMFLR
1 A GG C G GCG CC G C	SIXPW1
1 A A C C C C C	SIXREG3
1 A A C C C C C	SIXRT8
1	TTCCACC CGCGGCAACTTCCGCGGAGCTCTACAAGATACTGGAGAGCCACCAGTTCCTCGCCTCACAATCACC	MOUSSIX1
71 G C C . G G G . G TGGC CG GCT	AMFLR
71 G A . C A . G . T A T G . G . G G . T . T	SIXPW1
71 G A C . G . T G G . G . G AA T	SIXREG3
71 G G C . G . T G G . G . G AA T	SIXRT8
71	CCAAACTG CAGCAGCTGTGGCTGAAAGCCCACTACGTGGAGGCCGAGAAACTTCGCGGCCCGACCCCTGGG	MOUSSIX1
141	G GT G . C A . G . G C C C G	AMFLR
141	G G G . C A . AA . G . G C C C T T	SIXPW1
141	G A G . C A . GA . G CC CA C A A	SIXREG3
141	G A G . C A . GA . G CC CA C A A	SIXRT8
141	TGCCGTGGGCAAATATCGGGTGCGCCGAAATTCCTGTTGCCCGGGACCATGTGGGACCGCCGAGGAGACC	MOUSSIX1
211 C C . C . A C . C G . C	AMFLR
211 C A . CA . C . T CC . C A G . C	SIXPW1
211 C A . CA . G A . A T . C T . T	SIXREG3
211 C A . CA . G A . A T . C T . T	SIXRT8
211	AGCTACTGCTTTAAGGAGAAGTCTCGGGCCGTCTGCGGGAGTGGTACGCGCACAACCCCTACCCCTCAC	MOUSSIX1
281 C G T G .	AMFLR
281 C A . G T O . G .	SIXPW1
281 CC GA . A T . A T . T .	SIXREG3
281 CC A T . A T . T .	SIXRT8
281	CGAGGGAGAAACGGGAGCTGGCCGAGGCCACC GGCCCTCACCACCACCCAGGTCAGCAACTGGTTAAGAA	MOUSSIX1
351	AMFLR
351	SIXPW1
351	SIXREG3
351	SIXRT8
351	CCGG	MOUSSIX1

Рис. 4. Сравнение первичной структуры кДНК клонов амфибий и соответствующего фрагмента гена *Six1* мыши. Структура последнего (*moussix1*) приведена полностью, в остальных клонах обозначены только замены нуклеотидов. Обозначения аналогичны Рис. 3.

1	F H T G L N E R D L Y H L E N H K F T K E S H G K	MOUSSIX3
1	F H R G O Y K E Y R L L N E H H H F S A Q N H A K	DROSSO
1	F H R G N P R E L Y K I L E S H O F S P H N H A K	MOUSSIX2
1	F H R G N E R E L Y K I L E S H O F S P H N H P K	MOUSSIX1
1	F H S G N F R E L Y K I L E S H O F S P H N H P K	SIXREG3
1	F H S G G F R E L Y K I L G A H P P S P H N H P K	SIXPW1
1	F H S G N F R E L Y K I L E A H P E S P R H N H P K	AMFLR
26	L Q A M W E E A Y O E A E K L R G R P L G P V D	MOUSSIX3
26	L Q A M W K A H Y I E A E K L R G R P L G A V G	DROSSO
26	L Q O L W L K A H Y I E A E K L R G R P L G R V G	MOUSSIX2
26	L Q O L N L K A H Y V E A E K L R G R P L G A V G	MOUSSIX1
26	L Q O L W L K A H Y V E A E K L R G R P L G A V G	SIXREG3
26	L Q O L N L K A H Y V E A E K L R G R P L G A V G	SIXPW1
26	L Q O L W L K A H Y V E A E K L R V A A A G A L G	AMFLR
51	K Y R V R R K E P L P R T I W D G E E T S Y C F K	MOUSSIX3
51	K Y R V R R K E P L P R T I W D G E E T S Y C F K	DROSSO
51	K Y R V R R K E P L P R S I W D G E E T S Y C F K	MOUSSIX2
51	K Y R V R R K E P L P R T I W D G E E T S Y C F K	MOUSSIX1
51	K Y R V R R K E P L P R T I W D G E E T S Y C F K	SIXREG3
51	K Y R V R R K E P L P R T I W D G E E T S Y C F K	SIXPW1
51	K Y R V R R K E P L P R T I W D G E E T S Y C F K	AMFLR
76	E K S R S L R E W Y L Q D R P N P S K K R E L	MOUSSIX3
76	E K S R S L R D M Y S H N P Y P S P R E K R E L	DROSSO
76	E K S R S L R D M Y A H N P Y P S P R E K R E L	MOUSSIX2
76	E K S R G L R E W Y A L L N P Y P S P R E K R E L	MOUSSIX1
76	E K S R S L R D M Y A H N P Y P S P R E K R E L	SIXREG3
76	E K S S G V I P R E W Y A H N P Y P S P R E K R E L	SIXPW1
76	E K S R S L R D M Y A H N P Y P S P R E K R E L	AMFLR
101	A E A T G L T T Q V S N W F K N R	MOUSSIX3
101	A E A T G L T T Q V S N W F K N R	DROSSO
101	A E A T G L T T Q V S N W F K N R	MOUSSIX2
101	A E A T G L T T Q V S N W F K N R	MOUSSIX1
101	A E A T G L T T Q V S N W F K N R	SIXREG3
101	A E A T G L T T Q V S N W F K N R	SIXPW1
101	A E A T G L T T Q V S N W F K N R	AMFLR

рис. 5. Сравнение производных аминокислотных последовательностей наиболее консервативного участка генов семейства *Six*. *SixPw1* - ген, экспрессирующийся в регенерирующей конечности испанского тритона; *SixReg3* - ген, экспрессирующийся в регенерирующей конечности травяной лягушки; *AmFLR* - ген, экспрессирующийся в регенерирующей конечности аксолотля; *mousSix1*, *mousSix2* и *mousSix3* - гены мыши *Six1*, *Six2* и *Six3*, соответственно; *drosso* - ген дрозофилы *sine oculis*. Совпадающие участки генов заштрихованы.

ми млекопитающих, один из них, а именно, ген лягушки очень близок по структуре гену *Six1* млекопитающих - гомология на аминокислотном уровне составляет 99,2% (см. Рис. 6). Эти обстоятельства позволяют предположить, что клоны, полученные нами из регенератов конечности тритона и аксолотля несут информацию о генах семейства *Six*, еще не описанных в литературе. В таком случае, в процессе регенерации конечности животного с ограниченной способностью к таковой (лягушки *Rana temporaria*) и в процессе регенерации у животных с совершенной регенерацией (тритона и аксолотля) экспрессируются различные гены семейства *Six*.

Чтобы проверить это предположение необходимо располагать дополнительной информацией структуре соответствующих генов амфибий. С этой целью нами была подобрана система для поиска полноразмерных копий охарактеризованных клонов амфибий.

Создание базовых систем для структурных исследований генов, принимающих участие в регулировании процесса регенерации.

Несмотря на очевидность поставленной цели - получение полноразмерных копий изученных клонов - ее достижение является нетривиальной задачей, поскольку рассматриваемые гены являются регуляторными, то есть очень низко представленными. Кроме того, анализируемый материал - регенерирующие ткани - доступен в очень ограниченных количествах, которых явно недостаточно для создания кДНК библиотеки классическим способом.

В ходе исследований мы обнаружили (данные приводятся в диссертации), что *Six* гены экспрессируются и в ходе развития тритона. Это обстоятельство позволило нам использовать для создания кДНК банка доступный материал - зародыши тритона на 20-30 стадиях развития. Таким образом, нами был собран материал на соответствующих стадиях развития тритона, из которого была выделена мРНК и сконструирован кДНК банк в фагмидном векторе UNI-ZAP XR (Stratagene, USA). Однако, скрининг этого банка с помощью ПЦР-продукта, полученного на той же матрице (РНК, выделенная на 20-30 стадиях развития тритона), не выявил ни одного положительного сигнала. Для анализа полученного результата, мы приблизительно оценили содержание интересующего нас гена в ис-

а.

		Гомология (%)								
		1	2	3	4	5	6	7		
Дивергенция (%)	1	■	81.3	75.1	73.4	67.8	68.4	72.0	1	MOUSSIX3
	2	32.5	■	70.1	78.0	68.6	65.5	69.5	2	DROSSO
	3	22.3	27.1	■	85.0	81.6	81.6	84.5	3	MOUSSIX2
	4	23.7	22.3	14.4	■	84.2	82.8	85.6	4	MOUSSIX1
	5	27.1	27.4	15.5	14.7	■	88.2	84.7	5	SIXREG3
	6	28.5	29.9	16.1	18.1	12.7	■	88.7	6	SIXPW1
	7	22.4	28.3	11.6	12.5	12.5	8.5	■	7	AMFLR
		1	2	3	4	5	6	7		

б.

		Гомология (%)								
		1	2	3	4	5	6	7		
Дивергенция (%)	1	■	68.1	71.4	71.4	71.2	67.8	68.9	1	MOUSSIX3
	2	31.9	■	85.8	87.4	68.4	83.9	82.2	2	DROSSO
	3	28.8	13.4	■	95.8	94.9	89.8	89.0	3	MOUSSIX2
	4	28.6	12.6	4.2	■	99.2	94.1	93.2	4	MOUSSIX1
	5	28.8	13.6	5.1	0.8	■	94.9	94.1	5	SIXREG3
	6	32.2	16.1	10.2	5.9	5.1	■	82.4	6	SIXPW1
	7	33.1	17.8	11.0	6.8	5.9	7.6	■	7	AMFLR
		1	2	3	4	5	6	7		

Рис. 6. а. Результаты сравнения нуклеотидной последовательности наиболее консервативного участка генов семейства *Six*, выраженные в процентах. Обозначения аналогичны Рис. 5. б. Результаты сравнения производной аминокислотной последовательности наиболее консервативного участка генов семейства *Six*, выраженные в процентах. Обозначения аналогичны Рис. 5.

ходном материале мРНК (см. подробно в тексте диссертации). Оказалось, что несмотря на достаточно высокий титр полученного кДНК банка (10x6 блюшек/1 мкг кДНК), интересующий нас ген из-за низкой представленности мог не попасть в банк.

Это позволило нам сделать следующие выводы: во-первых, создание банка для поиска низкопредставленных регуляторных генов следует проводить из обогащенного по ним материала (то есть в нашем случае - из регенерирующих тканей); во-вторых, поскольку обогащенный материал ограниченно доступен, целесообразно конструировать амплифицированный кДНК банк.

В связи с этим нами была использована одна из последних разработок фирмы Clontech - набор для создания амплифицированных кДНК банков Marathon. Особенность этой системы заключается в том, что она позволяет получить из небольшого количества исходного материала набор кДНК молекул с унифицированными 3' и 5'концами. Если известен даже небольшой участок из середины гена, на основе которого можно сконструировать праймеры в обоих направлениях, то один раунд амплификации позволяет получить полноразмерную копию интересующего гена. Еще одним преимуществом этого метода является то обстоятельство, что созданный один раз, этот банк позволяет искать полноразмерные копии любых генов, которые могут экспрессироваться в анализируемой ткани. Этот метод имеет и свои недостатки. В частности, как в случае всех методов на основе ПЦР, скрининг такой библиотеки, в отличие от скрининга библиотеки, полученной классическим образом, дает большое количество артефактов. Однако, использование дополнительных контролей и параллельных экспериментов позволяет достичь желаемого результата.

Из регенерирующих конечностей тритона была выделена мРНК, которую использовали для создания амплифицированного Marathon-кДНК банка. Использование специфических к генам семейства Six и универсальных для системы Marathon праймеров были проведены 3'и 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) эксперименты, которые позволили получить ряд фрагментов. Анализ полученных фрагментов с помощью ПЦР со специфическими праймерами позволил выделить из них 4 фрагмента, содержащих участок, идентифицированный нами как фрагмент гена семейства Six, экспрессирующийся в ходе регенерации конечности тритона. Аналогичным об-

разом мы планируем получить полноразмерные копии *Six* генов лягушки и аксолотля, которые необходимы для синтеза высокоспецифичных зондов при проведении экспериментов по *in situ* гибридизации для локализации экспрессии анализируемых генов в регенерирующих конечностях амфибий.

Помимо решения поставленной задачи - получения более полной информации о структуре генов семейства *Six* амфибий - полученные библиотеки послужат базовыми системами для структурной характеристики любых других низкопредставленных (регуляторных) генов, экспрессирующихся в регенерирующих конечностях амфибий.

ВЫВОДЫ.

1. Впервые идентифицированы гены семейства *Six*, гомологи гена дрозофилы *sine oculis*, у представителей хвостатых и бесхвостых амфибий.

2. Изучена экспрессия генов семейства *Six* в ходе регенерации конечности травяной лягушки, испанского тритона и аксолотля. Выявлена корреляция экспрессии этих генов с наличием регенерационной способности у изученных животных.

3. Определена первичная структура наиболее консервативных участков идентифицированных генов. Выявлены межвидовые различия в первичной структуре генов семейства *Six*, экспрессирующихся в регенератах конечностей тритона, лягушки и аксолотля, с одной стороны, и общие структурные особенности генов изученных амфибий в сравнении с соответствующими генами млекопитающих, с другой стороны.

4. Впервые выделен и охарактеризован фрагмент гена *Six1* лягушки *Rana temporaria*.

5. Создана базовая система для дальнейшей структурной характеристики идентифицированных генов, а также для изучения других регуляторных генов, экспрессирующихся в регенерирующих тканях конечностей амфибий: в процессе работы сконструированы кДНК банк зародышей тритона на 20-30 стадиях развития, клонированный в фагмидном векторе UNI-ZAP XR, и амплифицированный Marathon кДНК банк регенерирующих конечностей испанского тритона.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ СТАТЕЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Знойко И. Ю., Знойко С. Л., Зиновьева Р. Д., Миташов В. И. Дифференциальная экспрессия генов семейства *Six* в ходе регенерации и развития конечности амфибий. // Изв. РАН. Сер. биол. 1997. N 6. С. *654-659*

2. Миташов В. И., Лукьянов С. А., Казанская О. В., Маркитантова Ю. В., Долгилевич С. М., Снеговая (Знойко) И. Ю., Знойко С. Л., Микаелян А. С. Молекулярно-биологические подходы в исследованиях экспрессии генов в процессе регенерации. // Изв. РАН. Сер. биол. 1995. N 3. С. 280.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ТЕЗИСОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Znoiko I. Yu, Znoiko S. L., Zinovieva R. D., and V. I. Mitashov. *Six* family genes participate in the regeneration processes, occurring in amphibian limb. International European A. I. I. R. Conference at Cologne, Germany, 29 Sep.-3 Oct. 1997, Abstracts, p. 50.

