

УДК 591

ПОЛУЧЕНИЕ AGR2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАТТЕРНА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА AGR2 В РАННЕМ РАЗВИТИИ ЭМБРИОНОВ И РЕГЕНЕРАЦИИ ГОЛОВАСТИКОВ *XENOPUS LAEVIS*

© 2018 г. А. С. Иванова^а, *, Н. Ю. Мартынова^а, П. А. Комаров^а, Е. Е. Орлов^а,
Г. В. Ермакова^а, А. Г. Зарайский^а, М. Б. Терёшина^а, **

^аИнститут биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
Россия, 117997 ГСП, Москва, В:437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: anastasiyasrg@gmail.com

**E-mail: ma-treshka@yamdex.ru

Поступила в редакцию 04.05.2018 г.

Белки группы Agr (anterior gradient) относятся к семейству белков с неканоническим тиредоксиновым мотивом и участвуют в регуляции различных процессов: эмбриональное развитие, регенерация и онкогенез. В норме у человека ген *Agr2* преимущественно экспрессируется в секретирующих клетках муцин-продуцирующих органов. Однако, при развитии некоторых типов злокачественных опухолей, *Agr2*, по-видимому, участвует в их активном метастазировании. Молекулярный механизм его функционирования изучен плохо. Модель эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* является одной из самых удобных и доступных базовых моделей для полноценного изучения различных молекулярных механизмов действия и сигнальных каскадов белков. На этой модели ранее была изучена лишь экспрессионная активность генов *Agr*, в частности показана активная экспрессия гена *Agr2* на ранних стадиях развития эмбрионов и в ходе регенерации хвоста и задних конечностей головастика. Для начала исследований молекулярного механизма функционирования белка *Agr2* необходимо получить специфичные к *Agr2* антитела и проверить их эффективность, что и было основной целью данной работы. Полученные очищенные антитела были протестированы методом иммуногистохимии, в результате чего впервые был получен паттерн распределения белка *Agr2* в раннем развитии эмбрионов и в регенерирующих хвостах головастика *Xenopus laevis*, полностью совпадающий с картиной экспрессии этого гена.

Ключевые слова: *Anterior gradient genes*, *Agr2*, эмбрионы и головастики шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, регенерация, эмбриогенез, получение антител

DOI: 10.1134/S0475145018060034

Белки Agr (Anterior Gradient proteins) представляют собой дисульфид изомеразы белков, содержащие тиредоксиновый домен и участвующие в сворачивании белков, путем регуляции образования дисульфидных связей (Persson et al., 2005). Однако, в отличие от большинства дисульфид изомераз белки *Agr2* способны секретироваться во внеклеточное пространство и участвовать в процессах регуляции роста и дифференцировки клеток (Gray et al., 2012). Между тем, механизмы этих функций Agr белков остаются по большей части не известными. Впервые гены группы *Agr* (*Anterior Gradient*) были обнаружены у шпорцевой лягушки и описаны в соответствии с паттерном их экспрессии в антериорной эктодерме раннего эмбриона (Sive et al., 1989). Группа генов Agr включает в себя три подсемейства – *Ag1*, *Agr2* и *Agr3* (Gray et al., 2012). Гены *Agr2* и *Agr3* находятся в одном синтетичном фрагменте, ген *Ag1* в другом. Го-

мологи генов *Agr2* и *Agr3* есть у человека и других млекопитающих, экспрессия их сильно выражена в кишечнике, легких, желудке, толстой кишке, предстательной железе и других тканях, которые содержат секретирующие клетки, кроме того, они участвуют в образовании опухолей (Liu et al., 2005). У амфибий активация экспрессии *Agr2* начинается в ходе гастрюляции и достигает своего максимума к началу нейруляции. Причем на этих стадиях *Agr2* экспрессируется исключительно в органах эктодермального происхождения: транскрипты локализуются в антериорном регионе дорсальной эктодермы. С наступлением нейруляции, экспрессия подавляется в клетках нервной пластинки, и одновременно сильно возрастает в области общего зачатка присоски и железы вылупления, который примыкает спереди к переднему краю нервной пластинки – к будущему зачатку переднего мозга. На более поздних стадиях развития

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
<i>pQEbamH1-TEV-Xagr2_d</i>	5'-AATAGGATCCGAAAATTTATATTTTCAGGGCAAAGAGATACCAGCAAAAAGT-3'
<i>Xagr2-Sal1_rev_w/o_stop</i>	5'-TAATGTCGACCAGTTCTGTTTTCAGCA-3'

экспрессия локализуется в клетках присоски и железы вылупления, расположенной вдоль зоны смыкания нервных валиков, а также, начиная со стадии вылупления — в клетках выстилки глотки, желудка и кишечника (Aberger et al., 1998; Novoselov et al., 2003; Tereshina et al., 2014). На основе результатов паттернов экспрессии генов *Agr* и экспериментов с подавлением трансляции их мРНК на модели эмбрионов шпорцевой лягушки была предложена схема молекулярного механизма действия *Agr* белков при регуляции развития переднего мозга (Tereshina et al., 2014). Однако, в связи с отсутствием *Agr*-специфичных антител, исследований паттерна экспрессии *Agr* на уровне белка проведено не было.

Кроме того, экспрессия генов *Agr* активируется в ходе эпиморфной регенерации амфибий и рыб в области формирования раневого эпителия и регенерационной бластемы. Эпиморфная регенерация — это процесс, при котором утраченные структуры восстанавливаются за счет массы дедифференцированных клеток бластемы. На первом этапе происходит заживление раны и формирование раневого эпителия. Раневая бластема образуется под раневым эпителием однотипными мезенхимными клетками из дедифференцированных клеток тканей культуры, в которых происходит ре-активация эмбриональных программ развития, что обеспечивает полноценное восстановление структуры утраченного органа, а в случае небольшого ранения — заживление раны без шрама (Carlson, 2007). Сравнительно недавно было показано, что гены *Agr* участвуют в процессах регенерации конечностей тритона, хвоста и конечностей головастика *Xenopus laevis*, а также в регенерации плавников рыб *Danio rerio*, активируясь в дистальной части ампутированного органа спустя

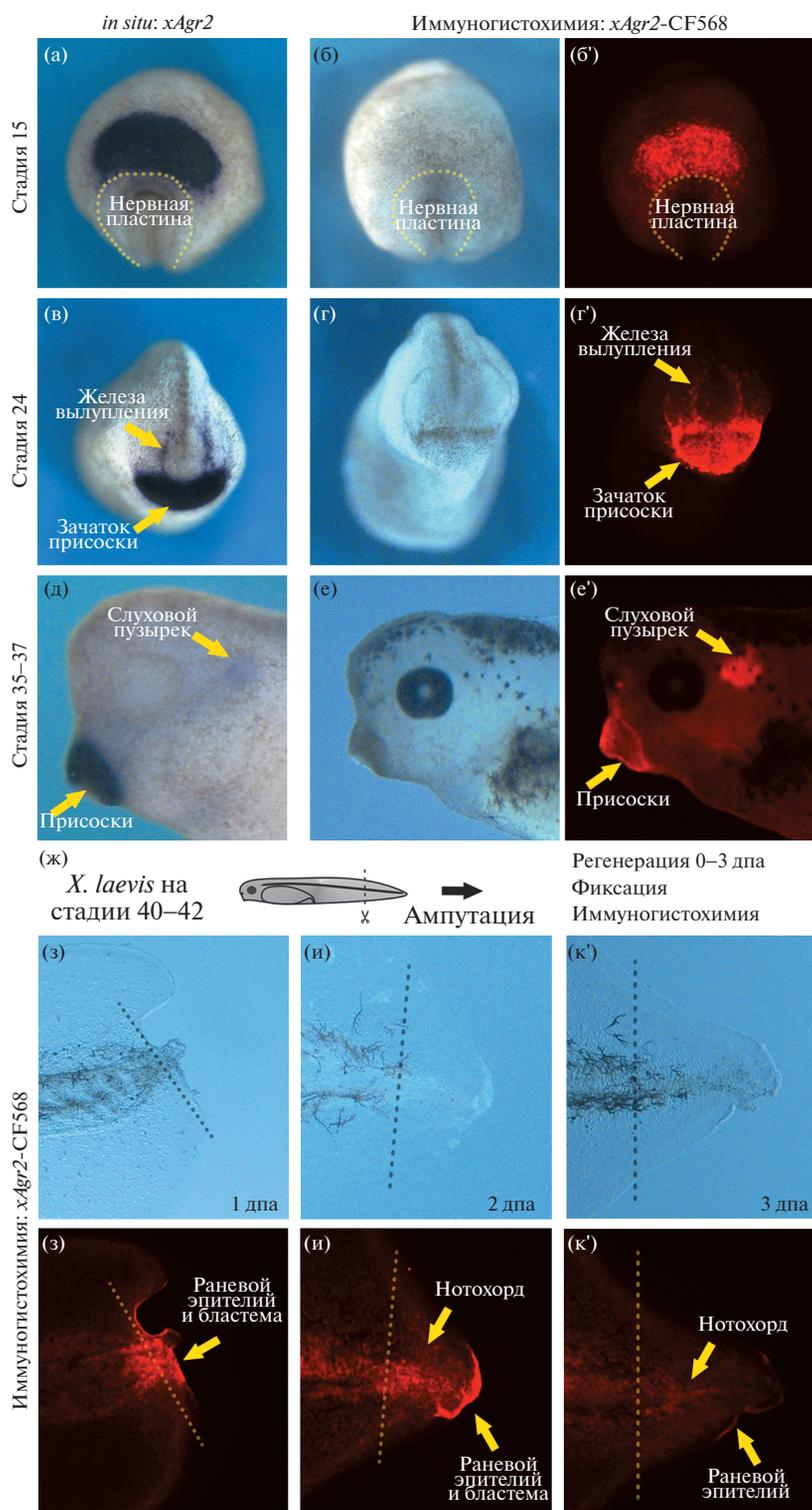
1–2 дня после ампутации (Kumar, Brockes, 2012; Ivanova et al., 2013, 2015). Данные о работе генов *Agr1* и *Agr2* в ходе регенерации придатков тела *Xenopus laevis* не были проанализированы на белковом уровне из-за отсутствия *Agr*-специфичных антител.

Цель нашей работы заключалась в получении специфичных антител к белку *Agr2* и последующем определении паттерна распределения белка *Agr2* в раннем эмбриональном развитии эмбриона *Xenopus laevis*, а также в ходе регенерации хвоста головастика, при помощи иммуногистохимического окрашивания.

Для иммунизации мы получали бактериальный белок по следующей схеме:

В качестве экспрессионной конструкции использовали *His-Xagr2* in pQE-80L. В первую очередь была получена конструкция *His-Xagr2* in pQE-80L. С имеющейся кодирующей последовательности *Xagr2* в векторе pCS2 проводили ПЦР с использованием праймеров *pQEbamH1-TEV-Xagr2_d* и *Xagr2-Sal1_rev_w/o_stop* (таблица), полученный продукт очищали на колонке Promega Wizard® Plus. Далее, очищенный ПЦР-продукт, а также вектор pQE-80L (Qiagen) в течение 4 ч при 37°C инкубировали вместе с эндонуклеазами рестрикции *BamH1* и *Sal1*. Затем проводили лигазную реакцию с использованием лигазы T4, добавляя 10-кратный избыток полученного фрагмента (вставки) относительно вектора. Фермент инактивировали нагреванием реакционной смеси при 75°C в течение 20 мин. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5α и высевали на твердую питательную среду с ампициллином, после чего проводили ПЦР-скрининг отобранных клонов. Корректность полученной конструкции проверяли методом секвенирования в фирме Evrogen. Из колоний, содержащих

Рис. 1. (а–е') Паттерны распределения белка и экспрессии мРНК *Agr2* в ходе раннего развития эмбрионов *Xenopus laevis*. (а, в, д) — фотографии эмбрионов на различных стадиях (15, 24, 35–37 стадии), окрашенных методом гибридизации *in situ*. Темно-синяя окраска, проявляющаяся в результате гибридизации *in situ*, маркирует клетки зародыша, содержащие мРНК *Agr2*. На ранних стадиях гибридационный сигнал локализуется в anteriорном крае нервной пластинки (нервная пластинка обозначена желтой пунктирной линией), на 24 стадии — в области зачатка присоски и желез вылупления (желтые стрелки), а на более поздних — в области присоски и слухового пузырька (желтые стрелки). (б, б', г, г', е, е') — фотографии эмбрионов на различных стадиях (15, 24, 35–37 стадии), окрашенных методом иммуногистохимии (*Agr2*-CF568). Флуоресцентные изображения (б', г', е') демонстрируют распределение белка *Agr2* и его ко-локализацию с мРНК транскриптами. (ж–к') паттерн распределения белка *Agr2* в ходе регенерации хвоста головастика *Xenopus laevis*. (ж) — схема эксперимента. (з, з', и, и', к, к') — фотографии хвостов головастика на 1–3 дни после ампутации на ст. 40–42. Желтая и черная пунктирные линии указывают линию ампутации. Флуоресцентные изображения демонстрируют распределение белка *Agr2* в ходе регенерации. В первый день после ампутации белок локализуется в области раневого эпителия и бластемы (желтые стрелки), на второй день — паттерн распределения *Agr2* расширяется и белок обнаруживается в том числе в области отрастающего нотохорда (желтые стрелки). Однако к третьему дню синтез белка значительно снижается — белок остаточенно присутствует в области раневого эпителия и нотохорда (желтые стрелки). Дпа — дни после ампутации.



корректную конструкцию, готовили музейные культуры. Полученная конструкция была обозначена как *His-Xagr2* in pQE-80L.

Из музейных образцов *E. coli* DH5α с конструкцией *His-Xagr2* выращивали ночную культуру, от которой отбирали 1 мл суспензии и добав-

ляли к 100 мл среды LB (Lysogeny broth) с антибиотиком, инкубировали на шейкере при 37°C. После в среду добавляли IPTG (изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид) до конечной концентрации 1 mM и инкубировали 4 ч. После инкубации смесь центрифугировали 10 мин при 1400 g, су-

пернатант сливали, а к осадку добавляли 3 мл лизис-буфера (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , 10 мМ имидазол, 1 мкМ PMSF, 1 мг/мл лизоцим, pH 8.0). Далее все операции проводили на льду. Осадок ресуспендировали и озвучивали 5–10 раз, затем инкубировали 30 мин на льду. После инкубации смесь центрифугировали 30 мин, супернатант отбирали и добавляли к 1 мл никелевого носителя (Sigma H0537), предварительно промытого лизис-буфером. Полученную смесь инкубировали на шейкере 12 ч, после чего центрифугировали 10 мин при 5000 g. К осадку добавляли 15 мл промывочного буфера (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , 20 мМ имидазол, 1 мкМ PMSF, pH 8.0), инкубировали на шейкере 30 мин, после чего центрифугировали 5 мин при 5000 g (данную процедуру повторяли 4–5 раз). Супернатант сливали, а к осадку добавляли 2 мл буфера для элюции (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , 500 мМ имидазол, 1 мкМ PMSF, pH 8.0) и инкубировали 1 ч на шейкере. Полученную взвесь центрифугировали 5 мин при 5000 g, и полученный супернатант диализовали против 1 л $1\times$ PBS (17 мМ KH_2PO_4 , 52 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 М NaCl , pH 7.4) в течение 12 ч. Концентрацию белка определяли микрометодом Бредфорда.

Очищенным таким образом белком иммунизировали кролика. Эксперименты по иммунизации кролика, забору крови, а также получению иммунной сыворотки осуществлялись на базе отдела экспериментальной биологии с виварием ИБХ РАН. Иммунизацию делали по стандартной методике (по Martynova et al., 2008). Полученную иммунную сыворотку очищали с использованием смолы с антигеном. Для получения смолы использовали выделенный белок *Xagr2*, тагированный His-эпитопом на N-конце. Выделенный белок ковалентно сшивали с бромциан-сефарозой (Cyanogen bromide-activated-Sepharose, Sigma, C9210) в соответствии с протоколом производителя. Сыворотку наносили на смолу, промывали промывочным раствором (100 мМ Boric acid с NaOH , 75 мМ NaCl pH 8.4), элюировали раствором для элюции (Glicine-HCl pH 2.7), нейтрализовали 1 М Tris (pH 9). Специфические антитела проверяли иммуноблоттингом и иммуногистохимически.

В первую очередь была исследована область локализации белка *Agr2* в процессе нейруляции. Это важно, так как именно на этих стадиях экспрессия *Agr2* имеет критическое значение для развития эмбриона, при любых нарушениях происходят значительные дефекты развития мозга (Tereshina et al., 2014). С помощью иммуногистохимического окрашивания с использованием полученных нами первичных очищенных кроличьих антител к белку *Agr2* и вторичных анти-кроличьих антител, конъюгированных с красным флуоресцентным белком CF568 (Sigma, cat.

SAB4600400, 1 : 500) были получены данные о локализации белка *Agr2* на 15, 24 и 35–37 стадиях (по Nieuwkoop, 1994) соответственно (рис. 1a–1e'). Для определения паттерна мРНК транскриптов другая часть эмбрионов на тех же стадиях была окрашена при помощи гибридизации *in situ*. Как видно из рисунка, в целом локализация мРНК и белка *Agr2* схожа. На стадии нейрулы мРНК транскрипты *Xagr2* и белок локализуются в области переднего края нервной пластинки – будущей преплакодной эктодермы. На стадии вылупления экспрессия мРНК и белка ко-локализуется в области присоски и железы вылупления. На стадиях 35–37 была зафиксирована локализация мРНК *Agr2* и белка в области присоски и слухового пузырька. Таким образом, можно заключить, что на ранних стадиях развития распределения мРНК и белка совпадают, что важно не только с точки зрения подтверждения его белковой функции, но и для дальнейших исследований в области молекулярных механизмов его действия.

Следующий этап нашей работы состоял в определении локализации белка *Agr2* в регенерации хвоста головастика *Xenopus laevis*. В ходе работы мы получали эмбрионы африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и инкубировали их до 39–40 стадии. Затем у головастика были ампутированы хвосты офтальмологическими микроножницами Ваннаса в условиях анестезии (MS222 (Sigma-Aldrich), 1 : 7000 в 0.1 MMR (Marc's Modified Ringer's)). Далее проводили серию иммуногистохимических окрашиваний по стандартному протоколу (Lee et al., 2008). Было показано, что синтез белка *Agr2* активируется в дистальной части ампутированного хвоста уже спустя 24 ч после ампутации. На второй день после ампутации синтез белка сохраняется, однако к третьему дню существенно снижается, вплоть до полного отсутствия (рис. 1з–1к'). Ранее нами было показано, что транскрипты мРНК *Agr2* обнаруживались в области раневого эпителия на первый и второй день после ампутации, к третьему дню экспрессия существенно снижалась (Ivanova et al., 2013). Сравнение распределения белка с данными паттерна экспрессии гена *Agr2* в регенерации показало их ко-локализацию в раневом эпителии, что является важнейшим доказательством функциональности гена *Agr2* в регенерации.

Таким образом, нами были получены специфические антитела к белку *Agr2*, которые позволили нам провести анализ областей распределения белка *Agr2* на различных стадиях эмбрионального развития, а также в ходе регенерации хвоста головастика *Xenopus laevis* и сравнить локализацию белка и паттерн экспрессии кодирующей его мРНК. Данное исследование является необходимой основой для дальнейшего изучения функции и молекулярных механизмов действия белка *Agr2*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты по получению специфических антител к белку Agr2, а также исследования паттерна его экспрессии в раннем развитии и регенерации головастиков *Xenopus laevis* были выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-74-10206), а так же программы Сколтеха по поддержке молодых ученых в области системной биологии “Research Fellowships in System Biology”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aberger F., Weidinger G., Grunz H., Richter K. Anterior specification of embryonic ectoderm: The role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2 // *Mech. Dev.* 1998. Mar. 72(1–2): 115–130. [http://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00021-5](http://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00021-5).
- Carlson B. Chapter 1 – An Introduction to Regeneration // In *Principles of Regenerative Biology*. 2007. 1–29. <http://doi.org/10.1016/B978-012369439-3/50003-9>.
- Gray T.A., MacLaine N.J., Michie C.O., Bouchalova P., Murray E., Howie J., Hrstka R., Maslon M.M., Nenutil R., Vojtesek B., Langdon S., Hayward L., Gourley C., Hupp T.R. Anterior Gradient-3: A novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models // *J. Immunol Methods*. 2012. Apr. 30. 378(1–2): 20–32. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2012.01.013>.
- Ivanova A.S., Shandarin I.N., Ermakova G.V., Minin A.A., Tereshina M.B., Zاراisky A.G. The secreted factor Ag1 missing in higher vertebrates regulates fins regeneration in *Danio rerio* // *Sci. Rep.* 2015. Jan. 29. 5:8123. <http://doi.org/10.1038/srep08123>.
- Ivanova A.S., Tereshina M.B., Ermakova G.V., Belousov V.V., Zاراisky A.G. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles // *Sci. Rep.* 2013. 3:1279. <http://doi.org/10.1038/srep01279>.
- Kumar A., Brookes J.P. Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration // *Trends Neurosci.* 2012. Nov. 35(11): 691–699. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2012.08.003>.
- Lee C., Kieserman E., Gray R.S., Park T.J., Wallingford J. Whole-mount fluorescence immunocytochemistry on *Xenopus* embryos // *CSH Protoc.* 2008. Feb 1. 2008: pdb.prot4957. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot4957>.
- Liu D., Rudland P.S., Sibson D.R., Platt-Higgins A., Barraclough R. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas // *Cancer Res.* 2005. May 1. 65(9):3796–3805.
- Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zاراisky A.G. The LIM-domain protein zyxin binds the homeodomain factor *Xanf1/Hesx1* and modulates its activity in the anterior neural plate of *Xenopus laevis* embryo // *Dev. Dyn.* 2008. Mar. 237(3):736–49. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21471>.
- Nieuwkoop P.B., Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. New York: Garland Pub., 1994.
- Novoselov V.V., Alexandrova E.M., Ermakova G.V., Zاراisky A.G. Expression zones of three novel genes about the developing anterior neural plate of *Xenopus* embryo // *Gene Expr. Patterns.* 2003. May. 3(2):225–230. [http://doi.org/10.1016/S1567-133X\(02\)00077-7](http://doi.org/10.1016/S1567-133X(02)00077-7).
- Persson S., Rosenquist M., Knoblach B., Khosravi-Far R., Sommarin M., Michalak M. Diversity of the protein disulfide isomerase family: Identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005. Sep. 36(3):734–740. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.04.002>.
- Sive H.L., Hattori K., Weintraub H. Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in *Xenopus laevis* // *Cell.* 1989. Jul. 14. 58(1):171–180. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90413-3](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90413-3).
- Tereshina M.B., Ermakova G.V., Ivanova A.S., Zاراisky A.G. Ras-dva1 small GTPase regulates telencephalon development in *Xenopus laevis* embryos by controlling Fgf8 and Agr signaling at the anterior border of the neural plate // *Biol. Open.* 2014. Mar. 15. 3(3):192–203. <http://doi.org/10.1242/bio.20147401>.

Obtaining of Agr2-Specific Antibodies and Determination of the Agr2 Protein Distribution Pattern during the Early Development and Regeneration of the *Xenopus laevis* Tadpoles

A. S. Ivanova^{1,*}, N. Y. Martynova¹, P. A. Komarov¹, E. E. Orlov¹, G. V. Ermakova¹, A. G. Zاراisky¹, and M. B. Tereshina^{**}

¹Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: anastasiyasrg@gmail.com

**e-mail: ma-treshka@yandex.ru

The Agr group proteins (anterior gradient) belong to the family of proteins with a noncanonical thioredoxin motif and are involved in the regulation of various processes: embryonic development, regeneration and oncogenesis. Normally, the human *Agr2* gene is predominantly expressed in the secreting cells of mucin-producing organs. However, *Agr2* is associated with an active metastasis during the development of some types of malignant tumors. The molecular mechanism of its functioning is poorly understood. The model of *Xenopus laevis* embryos is one of the most convenient basic models for the study of various molecular mechanisms and signaling cascades of proteins. Previously, only Agr genes expression patterns were studied, in par-

ticular, the *Agr2* gene expression was demonstrated in the early stages of development of the embryos of the *Xenopus laevis* and in the tail and hindlimbs regeneration of the tadpoles. To begin research of the molecular mechanism of the *Agr2* protein functioning, it is necessary to obtain *Agr2*-specific antibodies and to test their effectiveness. This was the main goal of this work. The obtained purified antibodies were tested by immunohistochemistry. As a result, we obtained the pattern of *Agr2* protein distribution during early development of embryos and tail regeneration of *Xenopus laevis* tadpoles, completely overlapping with the expression pattern of this gene.

Keywords: Anterior gradient genes, *Agr2*, embryo and tadpole of *Xenopus laevis*, regeneration, embryogenesis, antibody obtaining