

Данные были представлены на конференции молодых ученых  
“Актуальные проблемы биологии развития”  
12–14 октября 2021 г., Москва,  
Институт биологии развития РАН

## ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКА TOOTHNRIN ИЗ РОДСТВЕННОГО СЕМЕЙСТВА D4 У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2022 г. Е. Е. Куваева<sup>а</sup>, Д. А. Куликова<sup>а</sup>, О. Б. Симонова<sup>а</sup>, \*, И. Б. Мерцалов<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

После доработки 23.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

В работе впервые исследовали картину экспрессии белка ТТН, родственного семейству белков D4, на личиночной стадии развития *Drosophila melanogaster*. Для этого были получены поликлональные антитела к нативному белку ТТН и синтезирована линия дрозофил, трансформированных генетической конструкцией, содержащей модифицированный локус *tth* для экспрессии GFP-меченого белка ТТН::GFP. Анализ картин экспрессии нативного и меченого белков показал локализацию ТТН в нервной системе, специализированных эндокринных железах и слюнных железах личинок, а также в структурах, формирующих иннервацию глаз взрослого насекомого. Было сделано предположение об участии гена *tth* в развитии нервной системы и зрительного анализатора, а также в функционировании органов, ответственных за гормональную регуляцию и пищеварение.

**Ключевые слова:** семейство генов *d4*, трансгенная конструкция, гибридный белок, нервная система, GFP, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0475145022020070

### ВВЕДЕНИЕ

Ген *toothrin* (*tth*) относится к эволюционно консервативному семейству генов *d4*. У позвоночных животных семейство представлено тремя генами, два из которых дифференциально экспрессируются в центральной и периферической нервной системе (Kulikova et al., 2013). У дрозофилы обнаружено два гена-гомолога этого семейства, но только один из них (*drosophila d4 – dd4*) кодирует белок с характерным С-концевым доменом парных цинковых пальцев РНД-типа, или D4-доменом (DPF). Было показано, что D4-домен белка DPF3/Сег-D4 человека способен связываться с метилированными и ацетиленными остатками лизинов гистонов 3 и 4 (Lange et al., 2008). Ранее мы показали специфический паттерн экспрессии мРНК гена *dd4* в нервной системе и гонадах эмбрионов дрозофилы (Nabirochkina et al., 2002). Другой ген – *tth* – является особенным геном, кодирующим белок без домена D4, но с доменом 2/3, который также есть у D4-белков. Однако паттерн экспрес-

сии ТТН исследован не был. По литературным данным, домен 2/3 белка DPF3 семейства D4 человека играет роль коактиватора транскрипции в сигнальном пути NF-κB, который участвует в воспалительном ответе, пролиферации клеток и апоптозе (Ishizaka et al., 2012). Наличие гена, кодирующего белок только с доменом 2/3, дает возможность изучать роль этого домена и самого гена в онтогенезе на модельном организме *Drosophila melanogaster*.

Цель нашей работы состояла в изучении картины экспрессии белка ТТН на личиночной стадии развития дрозофилы в имагинальных дисках и нервной системе. Для этого мы получили специфические к ТТН антитела. Дополнительно, для более точного детектирования и визуализации продуктов его экспрессии *in vivo*, мы получили линию дрозофил, трансформированную генетической конструкцией для экспрессии GFP-меченого белка ТТН.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Получение поликлональных антител к белку ТТН.

Кроликов иммунизировали рекомбинантным белком, который состоял из последовательности С-концевых аминокислотных остатков (71 а. к. о.) белка ТТН дрозофилы, полученной в бактериальной системе экспрессии *E. coli* (вектор pET-15b, Novagen). Антитела были очищены с помощью аффинной колонки, синтезированной на основе эпокси-активированной сефарозы 4В (GE healthcare), конъюгированной с рекомбинантным белком ТТН.

2. Синтез конструкции, экспрессирующей гибридный белок ТТН::GFP.

Синтез конструкции, несущей модифицированный ген *tth* мы осуществили в несколько этапов. На первом этапе была получена донорная конструкция. Для этого ген-репортер *GFP* встраивали в плазмидный вектор *pBlueskript*, содержащий клонированный в него ген устойчивости к канамицину, окруженный сайтами *LoxP* для Cre-специфической рекомбинации, и в полученную плазмиду клонировали фрагменты ДНК из области выше и ниже стоп-кодона *tth* (“плечи”). Второй этап представлен на рис. 1. Полученную донорную конструкцию встраивали в искусственную бактериальную хромосому ВАС (клон CH322-14C11 из ВАСРАС Resources Center – <https://bacrasresources.org>), содержащую локус *tth* в фрагменте геномной ДНК размером 21.195 т. п. о. При встраивании, ген-репортер *GFP* попадает в рамку считывания гена *tth* со стороны 3'-концевой области. Внесение репортерных последовательностей в ВАС-клон проводили согласно протоколу (Venken et al., 2008). С помощью электропорации модифицированный ВАС-клон трансфецировали в клетки DY380. Трансформированные клетки выращивали при 30°C, затем инкубировали при 42°C 15 мин для индукции высокой рекомбинантной активности и делали их электрокомпетентными. Затем клетки электропорировали линеаризованной донорной плазмидной конструкцией для внесения в локус последовательности репортерного гена. Встраивание контролировали по появлению устойчивости к канамицину. Далее ген устойчивости к канамицину удаляли рекомбинацией *Cre/Lox* в штамме EL350. Правильно прошедшую рекомбинацию подтверждали с помощью ПЦР соответствующей области и секвенирования ПЦР-фрагмента. В результате модифицированный *tth* кодировал гибридный рекомбинантный белок ТТН::GFP, содержащий GFP на С-конце.

3. Получение трансгенных дрозофил, экспрессирующих гибридный белок ТТН::GFP.

Полученный в описанных выше экспериментах ВАС-клон, имеющий в своем составе сайт *attB* для

сайт-специфической рекомбинации (*attB/attP*) и маркер *miniwhite* для отбора трансформантов дрозофилы, наращивали в клетках EPI300 и выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (QIAGEN Plasmid Midi Kit, Cat. no. 12143). ДНК модифицированного ВАС-клона инъецировали в полярную плазму часовых эмбрионов дрозофилы линии *attP2* ( $y^1 w^{67c23}; P\{y^{+17.7}=CaryP\}attP2$  DBSC #8622), мутантных по гену *white* и содержащих сайт *attP* для встраивания по нему *attB*-конструкций с помощью рекомбиназы *PhiC31*. Трансформантов выводили в линию гомозиготных дрозофил и использовали для исследования картины экспрессии гибридного белка ТТН::GFP в тканях и органах личинок.

4. Приготовление препаратов и иммуноокрашивание.

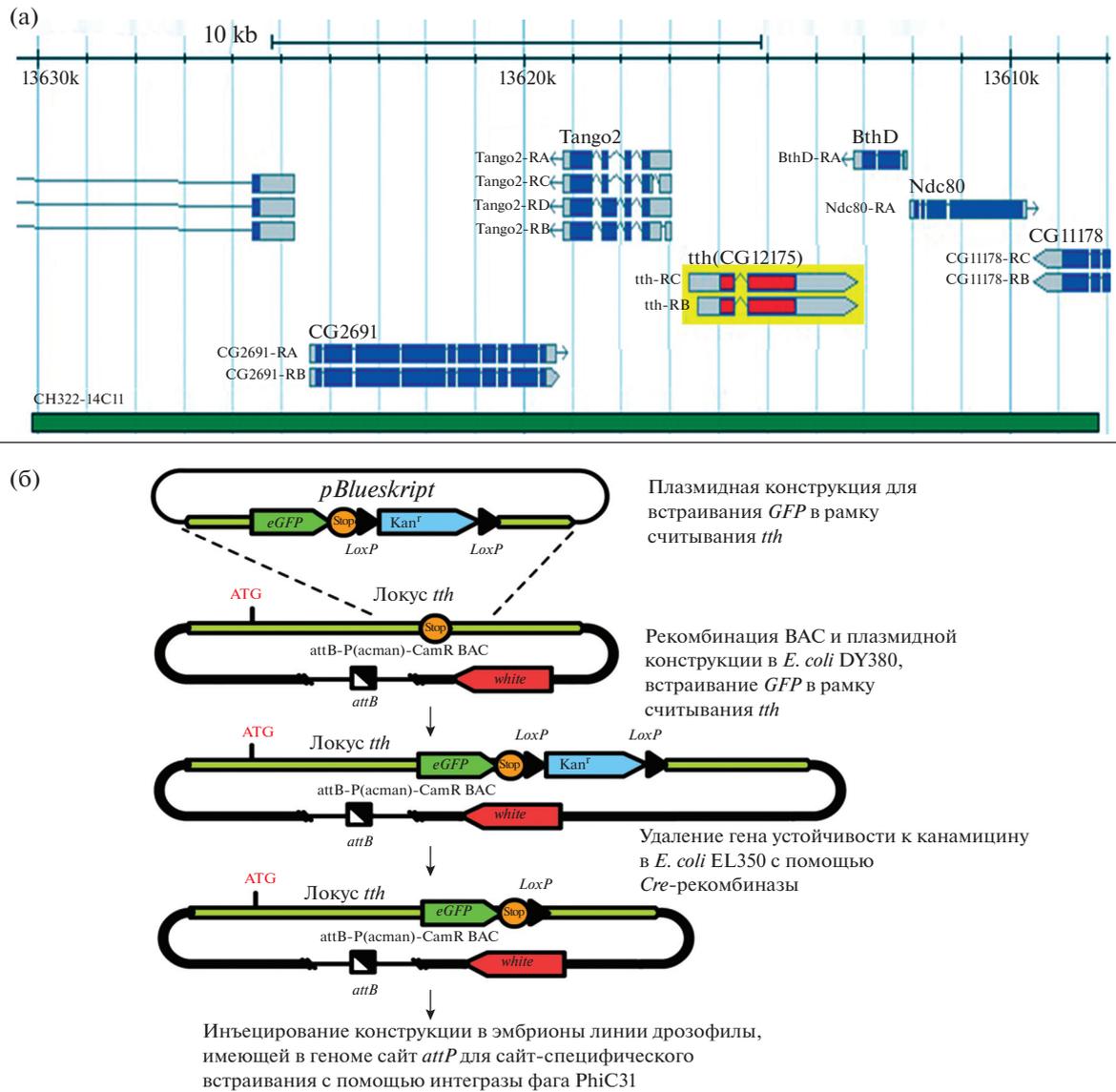
Имагинальные диски, слюнные железы и центральную нервную систему выделяли из личинок третьего возраста в PBS, фиксировали 20 мин в растворе 4% параформальдегида в PBS на льду и отмывали в PBS. Окрашивали препарированные органы личинок третьего возраста, экспрессирующих бактериальную  $\beta$ -галактозидазу гена *lacZ* в глиальных клетках и клетках слюнных желез (*repo>lacZ*). Для окрашивания X-gal использовали реакционную смесь: 3 мМ K<sub>4</sub>[FeII(CN)<sub>6</sub>], 3 мМ K<sub>3</sub>[FeIII(CN)<sub>6</sub>], 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 150 мМ NaCl, 0.25% X-gal в фосфатном буфере (pH 7.2) с добавлением 0.3% Triton-X100. Развитие окраски наблюдали в течение часа и останавливали, отмывая 3 раза в PBS. Далее проводили иммунохимическое окрашивание антителами к ТТН, конъюгированными с пероксидазой хрена, по протоколу, изложенному в руководстве (Patel, 1994). Первичные кроличьи антитела против ТТН добавляли в разведении 1 : 25. В качестве вторичных использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с HRP (пероксидаза хрена). Для окрашивания HRP добавляли раствор 0.5 мг/мл диаминобензидина (DAB) в PBS с 0.06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Как негативный контроль использовали линию дрозофил с делецией гена *tth*.

5. Микроскопия.

Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axioscope 40 в проходящем свете после иммунохимического окрашивания, и с использованием флуоресцентных светофильтров при длине волны 509 для препаратов с GFP-флуоресценцией.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

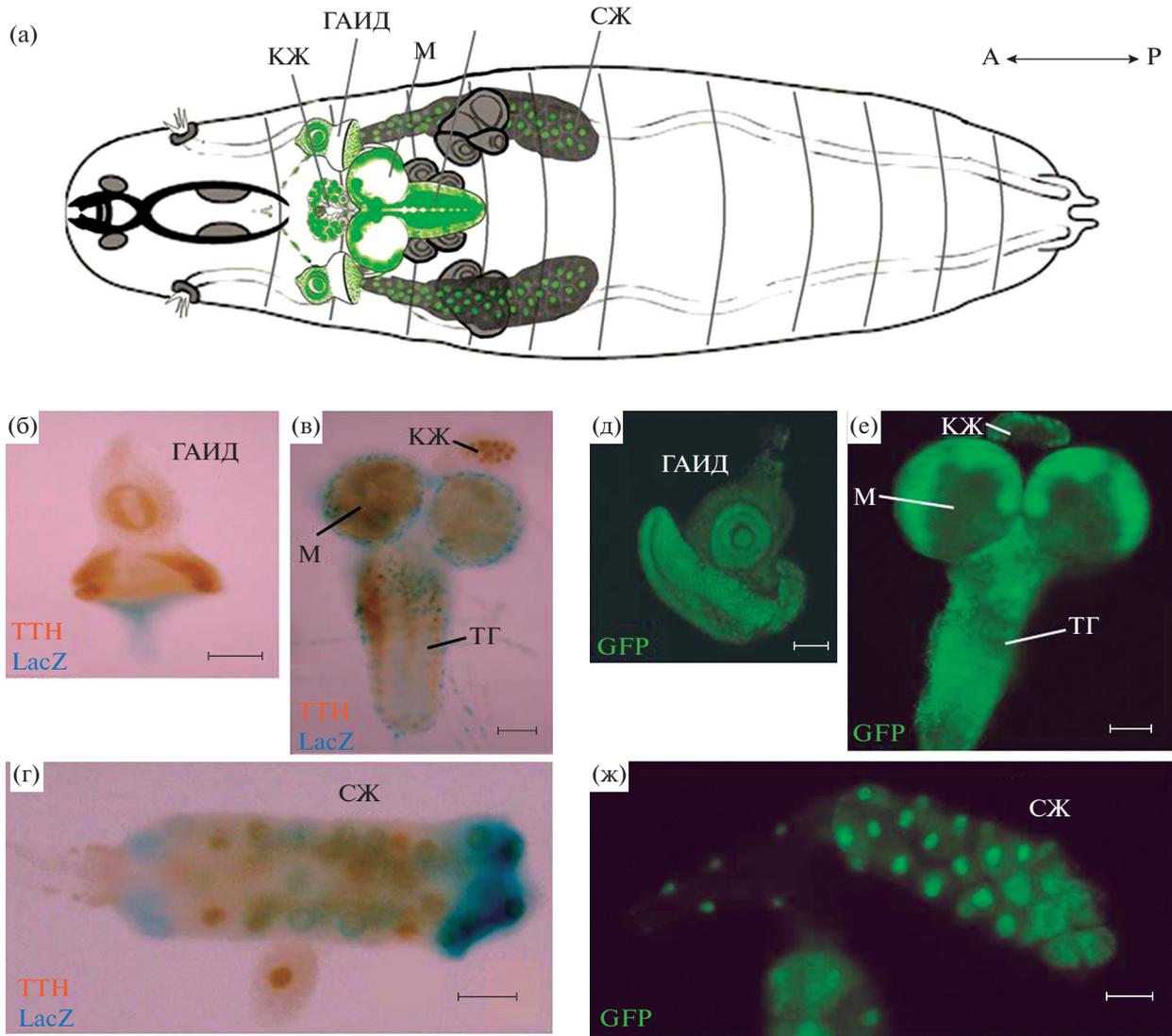
Сначала особенности экспрессии ТТН изучали с помощью иммунохимического окрашивания с использованием полученных нами специфических антител против ТТН. Оказалось, что белок локализован в ядрах клеток глазо-антенного има-



**Рис. 1.** Локализация гена *tth* и схема синтеза конструкции ТТН::GFP. (а) Район локализации гена *tth* (выделен красным) на геномной карте *D. melanogaster*, взятой из P[acman] Genome Browser (<https://bacpacresources.org>). CH322-14C11 – границы BAC (CH322-14C11) (выделены зеленым); (б) схема создания конструкции для экспрессии белка ТТН, несущего С-концевую модификацию GFP. *attB*-*P(acman)*-*CamR* BAC – бактериальная искусственная хромосома BAC (CH322-14C11), транскрибируемая область гена *tth* выделена зеленым. Обозначения: *attB* – сайт для сайт-специфической рекомбинации с *attP* сайтом, *eGFP* – зеленый флуоресцентный белок, *white* – маркерный ген, ответственный за пигментацию глаз дрозофилы, *Kan<sup>r</sup>* – ген устойчивости к канамицину, *LoxP* – сайт для *Cre*-рекомбиназы, оранжевым кругом обозначен стоп-кодон.

гинального диска, нервной системы (мозг и торакальный ганглий), и в личиночных секреторных органах: в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез. В своих экспериментах мы использовали личинок, экспрессирующих ген *lacZ* в глиальных клетках (*repo*>*LacZ*). Это позволило сравнить картины экспрессии ТТН и β-галактозидазы (продукт *LacZ*) в нервной системе. Оказалось, что паттерн экспрессии белка ТТН не совпадает с экспрессией β-галактозидазы (рис. 2б–2г). Это говорит о том, что белок ТТН экспрессируется в основном в нейронах.

Тем не менее, в тканях с низкой экспрессией белка окраска антителами не всегда эффективна. Чтобы это предусмотреть, мы провели дополнительные эксперименты по получению линии трансгенных дрозофил, экспрессирующих GFP-меченый гибридный белок ТТН::GFP (Материалы и методы). Флуоресцентные белки широко используются как репортеры для высокочувствительного молекулярного анализа *in vitro* и *in vivo*. Для этого, на основе бактериальной искусственной хромосомы (BAC), мы получили генети-



**Рис. 2.** Картина экспрессии белка ТТН и гибридного белка ТТН::GFP на личиночной стадии развития *D. melanogaster*. (а) Схема личинки дрозофилы третьего возраста, зеленым отмечена экспрессия ТТН::GFP; (б–г) Иммунохимическое окрашивание антителами против ТТН (коричневый цвет) и окраска X-gal глиальных клеток и слюнной железы личинок *repo*>*LacZ* (голубой); (д–ж) Прижизненная визуализация органов личинки, экспрессирующей белок ТТН::GFP (зеленый). Обозначения: КЖ – кольцевая железа, ГАИД – глазо-антенный имагинальный диск, М – мозг, ТГ – то-ракальный ганглий, СЖ – слюнная железа. Масштабная полоска – 50 мкм.

ческую конструкцию, в которой в одной рамке считывания последовательно располагались участки, кодирующие биоспецифический и репортерный белки (Материалы и методы). Далее мы получили трансгенных дрозофил, несущих модифицированный ген *tth*, экспрессирующий гибридный белок ТТН::GFP (Материалы и методы).

Прижизненная визуализация экспрессии белка ТТН::GFP показала, что его распределение и локализация соответствует результатам, полученным с использованием специфических антител (рис. 2). Это говорит о том, что дополнительный локус *tth* (длиной 22 т. п. о.), функционирует как эндогенный. Мы установили, что ТТН::GFP экс-

прессируется в ядрах клеток слюнных желез, кольцевой железы, хордотональных органах кутикулы, клетках органа Болвига, нейронах зрительной области ЦНС (в нейронах ламины), нейронах центрального нейропиля, а также в глазо-антенном имагинальном диске (дающем начало зрительным и обонятельным органам взрослого насекомого) и глазном стебельке (мембраны аксонов фоторецепторных нейронов).

Таким образом, мы впервые описали паттерн экспрессии белка ТТН у модельного организма *D. melanogaster* и показали, что экспрессия этого белка прежде всего связана с нервной системой и структурами, отвечающими за формирова-

ние зрительного аппарата взрослого насекомого (глазо-антенный диск, орган Болвига, оптические доли мозга), а также с эндокринными (кольцевая и слюнные железы) органами личинок.

Известно, что белки семейства D4 входят в состав хроматин-ремоделирующих SWI/SNF-подобных комплексов BAF, которые по субъединичному составу соответствуют комплексам pBAF млекопитающих (Moshkin et al., 2012). Комплексы pBAF характерны для дифференцированных постмитотических нейронов, но не для нейтральных клеток-предшественников (Lessard et al., 2007). Наши эксперименты показали, что родственный семейству D4 продукт гена *tth*, имеющий в своем составе только домен 2/3, локализуется в нейронах и нейробластах. Локализация нативного ТТН и ТТН::GFP в ядрах клеток подтверждает функциональность сайта ядерной локализации, который характерен для домена 2/3, благодаря чему белки семейства D4 могут транспортироваться в ядро, например, в период развития нервной системы у высших организмов.

Таким образом, на основе наших предварительных данных, можно предположить, что ген *tth* участвует в развитии центральной и периферической нервной системы и, в частности, зрительных органов, а также в развитии и функционировании органов секреции, контролирующими гормональную регуляцию и пищеварение *D. melanogaster*.

В целом, анализ экспрессии ТТН в имагинальных дисках, мозге и органах личинок дрозофилы показал, что этот белок локализован в ядрах нейронов мозга, а также в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез. Локализация ТТН в тканях кольцевой железы может свидетельствовать о вовлеченности этого белка в процесс гормональной регуляции развития дрозофилы, что согласуется с нашими ранними данными о влиянии экспрессии *tth* на скорость развития (Симонова и др., 2005). Высокая консервативность белковых доменов семейства D4 дрозофилы позволит экстраполировать их функцию на млекопитающих. У позвоночных животных нет генов, кодирующих белки без домена D4, однако существуют сплайс-варианты гена *cer-d4* (*DPF3*), кодирующие такие их изоформы. По нашим данным (Ninkina et al., 2001), а также по данным MGI (Mouse Gene Expression Database <http://www.informatics.jax.org>), именно этот ген экспрессируется в сетчатке глаза мыши на очень высоком уровне. Для продолжения исследования роли ТТН в развитии и функционировании нервной системы, мы планируем изучить особенности экспрессии ТТН у дрозофилы на фоне известных белковых маркеров нейронов ЦНС, включая нейроны сетчатки зрительных органов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2024-0008.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Е.Е. Куваева выполняла основную экспериментальную работу, участвовала в обсуждении результатов и написании статьи. Д.А. Куликова участвовала в биохимических экспериментах. О.Б. Симонова инициировала написание статьи, участвовала в обсуждении результатов и редактировала текст. И.Б. Мерцалов планировал и выполнял эксперименты, анализировал результаты и участвовал в написании текста статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Симонова О.Б., Куликова Д.А., Мерцалов И.Б. и др. Исследование суперэкспрессии нового гена *toothrin* у дрозофилы // Генетика. 2005. Т. 41. № 2. С. 196–202.
- Ishizaka A., Mizutani T., Kobayashi K. et al. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- $\kappa$ B RelA/p50 heterodimer // J. Biol. Chem. 2012. V. 287(15). P. 11924–11933.
- Kulikova D.A., Mertsalov I.B., Simonova O.B. *d4* family genes: Genomic organization and expression // Russ. J. Dev. Biol. 2013. V. 44. P. 1–6.
- Lange M., Kaynak B., Forster U.B. et al. Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex // Genes Dev. 2008. V. 22(17). P. 2370–2384.
- Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A. et al. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // Neuron. 2007. V. 55(2). P. 201–215.
- Moshkin Y.M., Chalkley G.E., Kan T.W. et al. Remodelers organize cellular chromatin by counteracting intrinsic histone-DNA sequence preferences in a class-specific manner // Mol. Cell. Biol. 2012. V. 32(3). P. 675–688.

- Nabirochkina E., Simonova O.B., Mertsalov I.B. et al.* Expression pattern of *dd4*, a sole member of the *d4* family of transcription factors in *Drosophila melanogaster* // *Mech. Dev.* 2002. V. 114. P. 119–123.
- Patel N.H.* Imaging neuronal subsets and other cell types in whole mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes // *Methods in Cell Biol.* 1994. V. 44. P. 445–487.
- Venken K.J., Kasprovicz J., Kuenen S. et al.* Recombineering-mediated tagging of *Drosophila* genomic constructs for *in vivo* localization and acute protein inactivation // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36(18). P. e114.

## Studying the Specific Localization of TOOTHTRIN Protein from Related D4 Family in *Drosophila melanogaster*

E. E. Kuvaeva<sup>1</sup>, D. A. Kulikova<sup>1</sup>, O. B. Simonova<sup>1</sup>\*, and I. B. Mertsalov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia*

\**e-mail: osimonova@hotmail.com*

In this work, the expression pattern of TTH protein, which is related to D4 family of proteins, was studied at the larval stage of *Drosophila melanogaster* development for the first time. To implement this, polyclonal antibodies to the native TTH protein and a *Drosophila* line of flies transformed with a genetic construct containing a modified *tth* locus for expression of the GFP-tagged TTH::GFP protein have been obtained. Analysis of expression patterns of native and labeled proteins showed the localization of TTH in the nervous system, specialized endocrine glands and salivary glands of larvae, as well as in the structures that form the innervation of the eyes of an adult insect. It was suggested that *tth* gene is involved in the development of the nervous and visual systems, as well as in the functioning of the secretion organs that control hormonal regulation and digestion.

*Keywords: d4 gene family, transgenic construct, fusion protein, nervous system, GFP, Drosophila melanogaster*