

Секция 4. Биоинформатика и IT

УДК 577.212; 577.29; 591.169

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИЗОФОРМ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА PITX В ТКАНЯХ ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ: СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СЕТЧАТКЕ ТРИТОНОВ

В.Н. Симирский, Ю.В. Маркитантова

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

Проведен биоинформационный анализ регуляторных генов семейства Pitx (Pitx1, Pitx2, Pitx3) и их изоформ у хвостатых амфибий, обладающих высокими регенерационными способностями. Эти гены контролируют формирование ряда тканей и органов в эмбриогенезе позвоночных, и, как предполагается, вовлечены в регуляцию процессов регенерации тканей (L'honore et al. 2014). С помощью праймеров, сконструированных к наиболее консервативным участкам гена Pitx1 позвоночных (*Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*), из сетчатки взрослых тритонов *P. waltl* выделены два ПЦР-фрагмента длиной 234 и 233 п.о., определена их нуклеотидная последовательность. Оба фрагмента содержат гомеодомен и участок, кодирующий домен OAR. Анализ полученных фрагментов с помощью программы Blast (Pub Med), множественного выравнивания с известными последовательностями мРНК для ряда позвоночных и построения филогенетических деревьев (метод ближайших соседей, Neighbor-Joining) подтвердил гомологию одного из фрагментов с геном Pitx1, а другого – с Pitx2. Полученные фрагменты были использованы в качестве зондов (Query Sequence) для поиска полноразмерных транскриптов Pitx1 и Pitx2 в базе данных транскриптома туловища тритонов *P. waltl*, любезно предоставленной Dr. Elewa (Elewa et al., 2017). В результате скрининга обнаружены 9 транскриптов, три из которых гомологичны Pitx1, а шесть – Pitx2. Транскрипты Pitx1 тритона наиболее сходны с соответствующими транскриптами шпорцевой лягушки и курицы, а транскрипты Pitx2 – с транскриптами этого гена у человека. Соответствующие белки содержат гомеодомен и домен OAR, характерные для генов семейства Pitx.

Blast search databases information	
Databases 1-10	
WGS_VDB://GAQK01	Hynobius chinensis
WGS_VDB://GEBK01	Ambystoma mexicanum
WGS_VDB://GESS01	Tylotriton wenxianensis
WGS_VDB://GFBM01	Ambystoma mexicanum
WGS_VDB://GFLD01	Ambystoma 'unisexual hybrid'
WGS_VDB://GFLI01	Ambystoma tigrinum
WGS_VDB://GFLJ01	Ambystoma texanum
WGS_VDB://GFLQ01	Ambystoma laterale
WGS_VDB://GFMY01	Ambystoma maculatum
WGS_VDB://GFZP01	Ambystoma mexicanum
WGS_VDB://GHDZ01	Batrachuperus yenyuanensis
WGS_VDB://GHKF01	Taricha granulosa
tsa_nt	Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) sequences

Рис. 1. Базы данных транскриптов Urodela, использованные для анализа (Transcriptome Shotgun Assembly, PubMed)

амфибий (рис. 1) позволил идентифицировать 8 изоформ Pitx1 и 9 изоформ Pitx2 у *Ambystoma mexicanum*, *Ambystoma maculatum*, *Hynobius retardatus*, *Hynobius chinensis* и *Tylotriton wenxianensis* (рис. 2). Высоко идентичные участки соответствовали области ORF, тогда как области 5' – и 3' – UTR были наиболее вариабельны. Исключение составляет участок длиной около 460 п.о. в области 3' – UTR в транскриптах Pitx2 *Ambystoma maculatum*. Этот участок присутствует также в транскриптах Pitx2 *P. waltl*, и у целого ряда эволюционно удаленных позвоночных (черепахи, крокодил, беркут, летучие мыши, утконос, беркут, дельфин). Высокая эволюционная консервативность последовательности этой области позволяет предполагать ее регуляторную роль. В частности, в 3'-UTR области мРНК, кодирующей Pitx1, могут располагаться сайты связывания с микроРНК, контролирующие трансляцию этих мРНК (Ohira et al., 2015). Нам не удалось выявить транскрипты, гомологичные Pitx3, у изученных видов хвостатых амфибий. Исключение составляют тритоны *Hynobius*, у которых выявлены лишь две изоформы Pitx3 (рис. 2). Кроме того, у этого вида тритонов обнаружен химерный транскрипт, который кодирует последовательности, гомологичные генам Pitx3 и Zmynd8. Видовые различия в экспрессии гена Pitx3 могут обуславливать различный регенерационный потенциал разных видов тритонов. Аналогичная картина наблюдается и в случае других гомеобокс-содержащих генов. В частности, показано, что у аксолотля *Ambystoma mexicanum* отсутствует ген Pax3, функцию которого у того вида выполняет, очевидно, Pax7 (Nowoshilow et al., 2018).

У тритона *Cynops pyrrhogaster* (база данных <http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori>, Nakamura et al., 2014) выявлены 27 транскриптов, кодирующих Pitx1 и Pitx2, в мозге, сердце, конечностях, хрусталике и глазном бокале. Из них в глазном бокале экспрессируется 22 транскрипта (12 изоформ Pitx1 и 10 – Pitx2), причем экспрессия 17-и транскриптов специфична для глазного бокала. Интересно, что в регенерирующей сетчатке тритона (30 сут) экспрессируются 7 изоформ Pitx1 и Pitx2, которые не обнаружены на других сроках регенерации сетчатки, что может указывать на избирательную транскрипционную активность этих генов. Изоформы Pitx2, экспрессирующиеся на этих стадиях не имели OAR домена. Ранее у тритона вида *Pleurodeles waltl* мы идентифицировали присутствие белка Pitx2 в сетчатке на протяжении всего периода ее регенерации, начиная со стадии нейробластов и до полного формирования (Авдонин и др., 2010).

Расширенный поиск гомологов Pitx в опубликованных базах данных транскриптов хвостатых амфибий позволил идентифицировать 8 изоформ Pitx1 и 9 изоформ Pitx2 у *Ambystoma mexicanum*, *Ambystoma maculatum*, *Hynobius retardatus*, *Hynobius chinensis* и *Tylotriton wenxianensis* (рис. 2). Высоко идентичные участки соответствовали области ORF, тогда как области 5' – и 3' – UTR были наиболее вариабельны. Исключение составляет участок длиной около 460 п.о. в области 3' – UTR в транскриптах Pitx2 *Ambystoma maculatum*. Этот участок присутствует также в транскриптах Pitx2 *P. waltl*, и у целого ряда эволюционно удаленных позвоночных (черепахи, крокодил, беркут, летучие мыши, утконос, беркут, дельфин). Высокая эволюционная консервативность последовательности этой области позволяет предполагать ее регуляторную роль. В частности, в 3'-UTR области мРНК, кодирующей Pitx1, могут располагаться сайты связывания с микроРНК, контролирующие трансляцию этих мРНК (Ohira et al., 2015). Нам не удалось выявить транскрипты, гомологичные Pitx3, у изученных видов хвостатых амфибий. Исключение составляют тритоны *Hynobius*, у которых выявлены лишь две изоформы Pitx3 (рис. 2). Кроме того, у этого вида тритонов обнаружен химерный транскрипт, который кодирует последовательности, гомологичные генам Pitx3 и Zmynd8. Видовые различия в экспрессии гена Pitx3 могут обуславливать различный регенерационный потенциал разных видов тритонов. Аналогичная картина наблюдается и в случае других гомеобокс-содержащих генов. В частности, показано, что у аксолотля *Ambystoma mexicanum* отсутствует ген Pax3, функцию которого у того вида выполняет, очевидно, Pax7 (Nowoshilow et al., 2018).

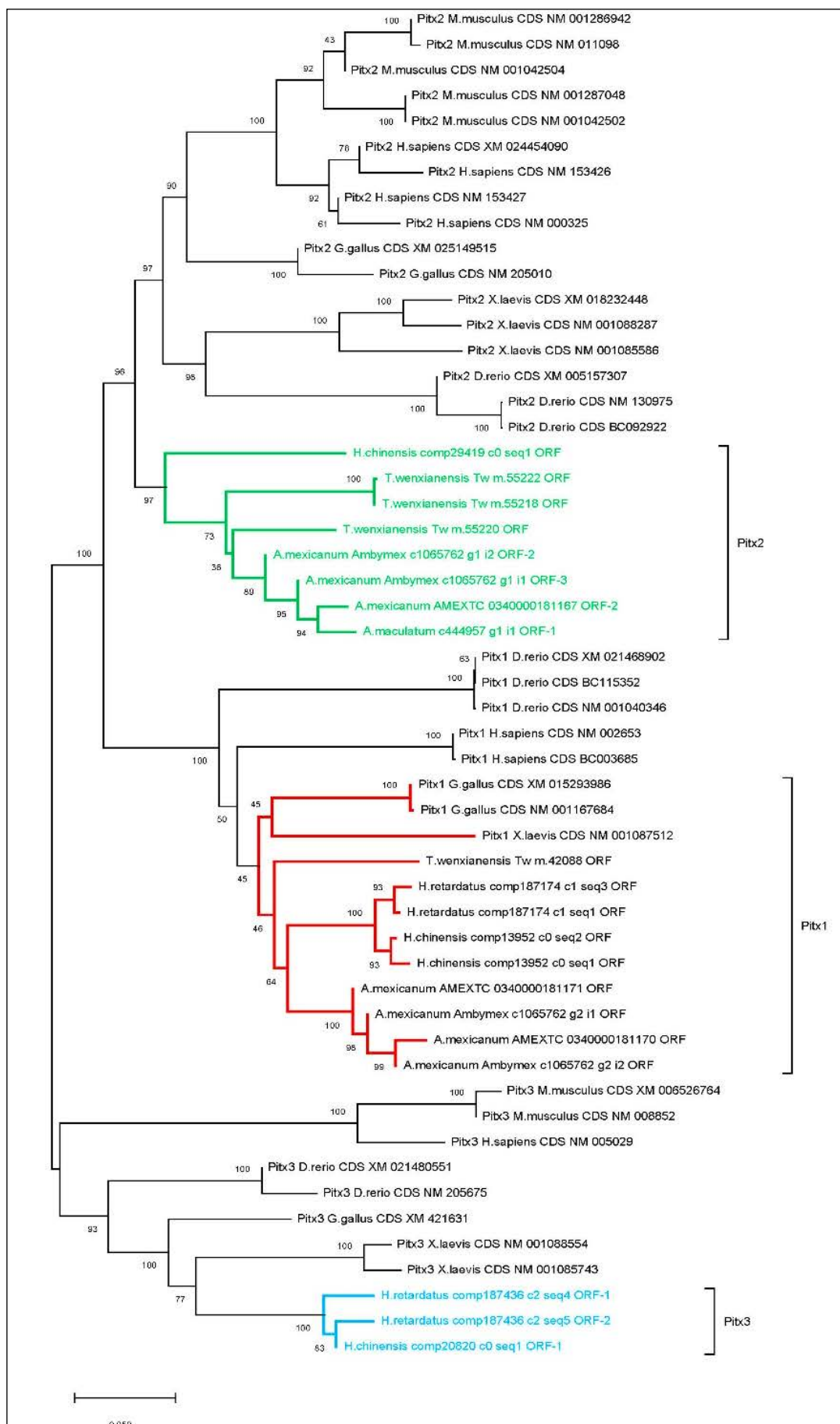


Рис. 2 Филогенетическое древо, построенная с помощью программы MegaX по методу ближайших соседей (Neighbor-Joining). Статистическую достоверность оценивали с помощью бутстрап-метода (1000 реплик). Соответствующие оценки (%) даны вблизи соответствующих ветвей и / или узлов. Для построения древа использовали ORF транскриптов, найденных с помощью программы BLAST (Pub Med). Отмечены группы транскриптов, принадлежащие гену Pitx1 (красный), Pitx2 (зеленый) и Pitx3 (синий)

Полученные данные свидетельствуют о видовых различиях в экспрессии генов семейства Pitx и дифференциальной экспрессии их изоформ в процессе регенерации сетчатки у хвостатых амфибий.

Работа выполнена в рамках темы НИР № ИНГЗ 0108–2019–0005.

ЛИТЕРАТУРА

- Avdonin P.P., Grigoryan E.N., Markitantova Yu. V. Transcriptional factor Pitx2: Localization during triton retina regeneration // *Biology Bulletin*. 2010. T. 37. № 3. С. 231–235.
- Elewa A., Wang H., Talavera-López C., Joven A., Brito G., Kumar A., Hameed L.S., Penrad-Mobayed M., Yao Z., Zamani N., Abbas Y., Abdullayev I., Sandberg R., Grabherr M., Andersson B., Simon A. Reading and editing the *Pleurodeles waltl* genome reveals novel features of tetrapod regeneration // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. No. 1. 2286. doi: 10.1038/s41467–017–01964–9.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35. P. 1547–1549.
- L'honore A., Drouin J., Buckingham M., Montarras D. Pitx2 and Pitx3 transcription factors: two key regulators of the redox state in adult skeletal muscle stem cells and muscle regeneration // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. Vol. 75. Suppl 1. S37. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.781.
- Nakamura K., Islam M.R., Takayanagi M., Yasumuro H., Inami W., Kunahong A., Casco-Robles R.M., Toyama F., Chiba C. A transcriptome for the study of early processes of retinal regeneration in the adult newt, *Cynops pyrrhogaster* // *PLoS One*. 2014. V. 9. No. 10. e109831. doi: 10.1371/journal.pone.0109831.
- Nowoshilow S., Schloissnig S., Fei J.F., Dahl A., Pang A.W.C., Pippel M., Winkler S., Hastie A.R., Young G., Roscito J.G., Falcon F., Knapp D., Powell S., Cruz A., Cao H., Habermann B., Hiller M., Tanaka E.M., Myers E.W. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators // *Nature*. 2018. Vol. 554. No. 7690. P. 50–55. doi: 10.1038/nature25458.
- Ohira T., Naohiro S., Nakayama Y., Osaki M., Okada F., Oshimura M., Kugoh H. miR-19b regulates hTERT mRNA expression through targeting PITX1 mRNA in melanoma cells // *Sci Rep*. 2015. Vol. 5. 8201. doi: 10.1038/srep08201.