

УДК: 597.828:616-092.4

XENOPUS LAEVIS КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ В БИОЛОГИИ

Павлов В.М.¹, Григоренко Н.Ю.¹, Николаев В.А.¹, Джумалиева Л.А.¹

¹ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский» университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Россия, Волгоград, e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

В данной статье рассматривается история становления гладкой шпорцевой лягушки, как модельного объекта в биологии и ее современное применение в молекулярной биологии, а также для моделирования различных болезней путем нокадауна генов. Также были описаны эмбриологические и морфологические особенности данного модельного объекта, благодаря которым данная лягушка стала все чаще применяться как экспериментальная модель в биологических и медицинских исследованиях. Значительные достижения в области редактирования генов и микроскопии наряду с недавним завершением секвенирования генома *Xenopus laevis* активизировали использование этого классического модельного объекта для моделирования различных заболеваний, одним из примеров описанный в данной статье является нокадаун гена *DYRK1A* - ген развития аутизма. Также благодаря большим размерам яйцеклеток облегчается проведение различных манипуляций по изучению развития эмбриона, либо же отдельных клеточных метаболитов и структур клеток, в данной статье приведен пример использования яйцеклеток ксенопуса при изучении работы ионных каналов на аксонах. Гладкая шпорцевая лягушка является первым модельным объектом на котором провели пересадку ядер из соматических клеток в яйцеклетку этой лягушки, тем самым открыв начало новому методу генной инженерии -клонированию.

Ключевые слова: *X.laevis*, модельный объект, морфологические особенности, экспериментальная патология, нокадаун генов, клонирование.

XENOPUS LAEVIS AS A MODEL OBJECT IN BIOLOGY

Pavlov V.M.¹, Grigorenko N.Ju.¹, Nikolaev V. A.¹, Dzhumaliev L.A.¹

¹FSBEI HE VolgSMU Of the Ministry of Healthcare of the Russia – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Volgograd State Medical University» Of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation direction of preparation “Biology”, Russia, Volgograd, e-mail: v.m.pavlov29@gmail.com

This article discusses the history of the formation of the smooth spur frog as a model object in biology and its current application in molecular biology, as well as for modeling various diseases by knockdown of genes. The embryological and morphological features of this model object were also described, thanks to which this frog was increasingly used as an experimental model in biological and medical research. Significant advances in gene editing and microscopy, along with the recent completion of genome sequencing of *Xenopus laevis*, have intensified the use of this classic model object for modeling various diseases, one of the examples described in this article is the knockdown of the *DYRK1A* gene - the gene for the development of autism. Also, due to the large size of the eggs, it is easier to carry out various manipulations to study the development of the embryo, or individual cellular metabolites and cell structures. This article provides an example of the use of xenopus eggs in studying the operation of ion channels on axons. The smooth spur frog is the first model object on which nuclei were transplanted from somatic cells into the egg of this frog, thereby opening the beginning of a new method of genetic engineering-cloning.

Keywords: *X. laevis*, model object, morphological features, experimental pathology, gene knockdown, cloning.

Введение

Гладкая шпорцевая лягушка (*XenopusLaevis*) – вид южно африканской лягушки относящаяся к роду шпорцевые лягушки, живут от 5 до 15 лет, в длину достигают размера до 12 см. Для достижения половой зрелости *X.Laevis* необходимо от одного до двух лет. Биологической особенностью данного вида является наличие тетраплоидного генома[3]. Данный организм используется в биологических исследованиях из-за простаты работы с эмбрионами, за один раз от самки можно получить тысячи яйцеклеток. Яйцеклетки у данного организма очень крупные, одни из самых крупных известных клеток, в диаметре достигает более 1 мм. Также геном данной лягушки полностью расшифрован.

Оплодотворение у амфибий внешнее – самка откладывает икру в воду, а затем самец ее оплодотворяет. В лабораториях возможно получение тысячи

яйцеклеток путем гормональной стимуляцией с последующим оплодотворением всей кладки, в этом случае возможно получение тысячи эмбрионов одновременно. Период вылупления головастика из яйца составляет всего 37 часов. За данную особенность данную лягушку часто применяют исследователи в области биологии развития[4]. Сам эмбриогенез довольно прост для наблюдения – сам эмбрион, как и оболочка икринки во время всего процесса остаются прозрачными. Поэтому все стадии развития данного организма можно наблюдать вживую и даже работу внутренних органов на поздних стадиях развития.

История становление модельного объекта

Использование *X.Laavis* в качестве биологического объекта началось в 1920 году, когда Л. Хогбен изучал эндокринную систему лягушки. В результате данных экспериментов было установлено, что репродуктивный цикл лягушки схож с человеческим. К примеру, в 1930-1940 годы мочу беременной женщины вводили под кожу самке лягушки, что вызывало метание икры у амфибии, в последующем было установлено, что метание икры вызывал хорионический гонадотропин, выделяющийся у беременных с мочой[2]. В результате данного открытия лягушка использовалась в качестве живого теста на беременность. Благодаря этому практически в каждой лаборатории были данные лягушки, которые закупались, как живые реактивы, важную роль сыграло то, что данная лягушка неприхотлива к содержанию, устойчива к голоданию, многим болезням и другим неблагоприятным воздействиям.

Благодаря большим размерам яйцеклетки ксенопуса, стало возможным изучение работы ионных каналов на аксонах. Впрыскивая в яйцеклетку нужные мРНК, можно получить ионные каналы сердца человека, мозга морской свинки. На этой гигантской клетке удобно замерять изменения мембранного потенциала в ответ на различные воздействия — скажем, добавление лекарственного препарата[6]. Например, какой-то ионный канал экспрессируется на соматических клетках какого-то существа, но они слишком малы для непосредственного наблюдения изменения тока и для манипуляций. В таком случае берут яйцеклетку *X.Laavis*, мРНК изучаемого канала, которую берут из соматических клеток исследуемого организма. мРНК инъецирует в яйцеклетку, и с нее начинается синтезироваться необходимый белок. Он

встраивается в мембрану яйцеклетки и начинает в ней работать, как работал в родной клетке. А так как яйцеклетка ксенопуса большая, на ней относительно легко изучать работу канала. Например, с помощью специальных микроэлектродов замерить проходящий через него ток.

Эмбрионами *X.laevis* легко манипулировать не только хирургическим способом, но и на генном уровне. Наиболее часто в исследованиях используется методика нокдауна отдельного гена. Выключать гены можно как и с помощью обычных антисмысловых РНК, так и с помощью химически модифицированных нуклеотидов, последнее используется гораздо чаще. Метод модифицированных нуклеотидов основан на замене молекулы рибозы молекулой морфолина, а свободные гидроксильные группы в фосфате заменены на амидные. Данные молекулы называют в соответствии с названием сахара, входящий в его состав, морфолинонуклеиновой кислотой. Они комплементарно связываются с мРНК «выключаемого» гена и механически блокируют связывание ее с рибосомой или со сплайсосомой. Соответствующий белок прекращает синтезироваться. Морфолиновые олигонуклеотиды имеют важное преимущество перед антисмысловыми РНК — из-за нестандартного строения остова они не разрушаются нуклеазами, не уничтожаются защитными системами клетки, не вызывают иммунной реакции у модельного животного. На ней можно воспроизвести нарушение развития кожи, лица и носа, почек — даже на рыбке это было бы сделать труднее. Нокдауны генов у данной лягушки используется для моделирования наследственных заболеваний, в котором участвует тот или иной ген[7].

Лягушка в качестве модельного объекта

Пример исследования с нокдауном гена является изучение гена DYRK1A (dualspecificitytyrosine-(Y)-phosphorylation-regulatedkinase 1 A) – это высоконадежный ген риска развития аутизма, который кодирует консервативную киназу. В дополнение к аутизму, люди с предполагаемыми вариантами потери функции в DYRK1A проявляют микроцефалию, умственную отсталость, задержку развития и/или врожденные аномалии почек и мочевыводящих путей. DYRK1A также находится в критической области для синдрома Дауна; поэтому понимание роли DYRK1A в развитии мозга имеет решающее значение для понимания патобиологии множественных нарушений развития. Методом нокдауна гена у *X.Laevis* удалось установить, что данный

ген экспрессируется в реснитчатых тканях, локализуется в цилиарных аксонемах и базальных телах, а также необходим цилиогенеза. Также было установлено, что данный ген локализуется в митотических веретенах и его ингибирование приводит к нарушению развития переднего мозга, аномальному клеточному циклу и гибели клеток во время мозга. Результаты данного исследования дают гипотезы о потенциальных механизмах развития патологии и показывают полезность данной лягушки как модельного объекта для исследования нейродегенеративных заболеваний[5].

В 1958 году в яйцеклетку *X.Laervis* пересадили ядро из соматической клетки головастика, тем самым клонировав лягушку. В 1971 году открыли способность яйцеклеток данной лягушки транслировать инъецированных в них РНК[1]. Также из большого количества яйцеклеток лягушки возможно приготовление бесклеточной смеси, которая умеет в пробирке транскрибировать гены, синтезировать белки по нужной мРНК, производить посттрансляционную модификацию белков и другое[8, 9].

В январе 2020 года вышла статья, в которой из эмбриональных клеток *X.Laervis* собирали примитивных организмов с заданными свойствами[10]. Авторы статей моделировали их на компьютере с использованием эволюционной модели, а затем воссоздавали получившиеся модели из настоящих клеток эпителия и сердечной мышцы эмбриона. Организмы успешно двигались и даже обладали способностью к регенерации, но это пока единственное, что они умеют.

Заключение

Таким образом *X.Laervis* является одним из популярнейших и перспективнейших модельных объектов в биологии. Его очень удобно использовать в различных исследованиях начиная с биологии развития заканчивая клонированием и моделированием различных генетических заболеваний. Также неприхотливость данной лягушки делает ее отличным модельным объектом в любой лаборатории.

Список литературы

1. Gurdon J. B. [и др.]. Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells // Nature. 1971. № 5316 (233). С. 177–182.

2. Gurdon J. B., Hopwood N. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology C.8.
3. Session A. M. [и др.]. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis* // *Nature*. 2016. № 7625 (538). С. 336–343.
4. Wallingford J. B., Liu K. J., Zheng Y. *Xenopus* // *Current Biology*. 2010. № 6 (20). С. R263–R264.
5. Willsey H. R. [и др.]. The neurodevelopmental disorder risk gene *DYRK1A* is required for ciliogenesis and control of brain size in *Xenopus* embryos // *Development* (Cambridge, England). 2020. № 21 (147).
6. The Use of *Xenopus* Oocytes for the Study of Ion Channel: Critical Reviews in Biochemistry: Vol 22, No 4 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10409238709086960> (дата обращения: 14.10.2020).
7. *Xenopus*: An Undervalued Model Organism to Study and Model Human Genetic Disease - FullText - *Cells Tissues Organs* 2018, Vol. 205, No. 5-6 - Karger Publishers.
8. A highly efficient, cell-free translation/translocation system prepared from *Xenopus* eggs | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic [Электронный ресурс]. URL: <https://academic.oup.com/nar/article/19/23/6405/2387186> (дата обращения: 14.10.2020).
9. Cell-free transcription in *Xenopus* egg extract [Электронный ресурс]. URL: <https://www.jbc.org/content/294/51/19645> (дата обращения: 14.10.2020).
10. A scalable pipeline for designing reconfigurable organisms | *PNAS* [Электронный ресурс]. URL: <https://www.pnas.org/content/117/4/1853> (дата обращения: 14.10.2020).