ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 3, с. 232–238

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.224.46

ПОЛУЧЕНИЕ НУЛЕВОЙ МУТАЦИИ ГЕНА *TOOTHRIN* МЕТОДОМ НАПРАВЛЕННОЙ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2023 г. Е. Е. Куваева[a], Д. А. Куликова[a], О. Б. Симонова[a, *], И. Б. Мерцалов[a]

[a] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия*

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

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.
После доработки 10.05.2023 г.
Принята к публикации 13.05.2023 г.

Ген *toothrin* (*tth*) дрозофилы является родственным консервативному семейству генов *d4*, кодирующих специфические факторы транскрипции у многоклеточных животных. В предыдущих работах мы исследовали эффект оверэкспрессии гена *tth* и охарактеризовали специфический паттерн его экспрессии в нервной системе, но мутации в гене *tth* до сих пор не были обнаружены. Нулевые мутанты необходимы для анализа функций генов и скрининга их генов-партнеров. В работе мы описываем получение первых дрозофил, нокаутных по гену *tth*, с помощью метода гомологичной рекомбинации и впервые характеризуем фенотип летальных эмбрионов, вызванный потерей функции этого гена.

Ключевые слова: нокаут гена, семейство генов *d4*, *toothrin*, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0475145023030059, **EDN:** ZRSGJG

ВВЕДЕНИЕ

Ген *toothrin* (*tth*) был открыт у *D. melanogaster* как “дальний родственник” генов эволюционно консервативного семейства *d4* (*DPF – Double PHD fingers*) (Simonova et al., 2005). Гены этого семейства у млекопитающих экспрессируются в различных тканях и на разных стадиях развития. Два из них, *neuro-d4* (*Dpf1*) и *Cer-d4* (*Dpf3*), нейроспецифические, третий, *ubi-d4/Requiem* (*Dpf2*), экспрессируется во всех тканях и на одинаковом уровне, как у эмбрионов, так и у взрослых организмов (Kulikova et al., 2013). Белки семейства D4 обладают общим планом строения, включающим набор уникальных доменов: N-концевой домен 2/3, домен Krüppel-типа и С-концевой домен “цинковых пальцев” PHD-типа, или D4-домен. В геноме дрозофилы был найден единственный ген семейства *d4* (*Drosophila-d4*, *dd4*), кодирующий белок, содержащий все перечисленные выше структурные домены кроме домена Krüppel-типа (Nabirochkina et al., 2002). Позже был обнаружен родственный этому семейству ген *tth*, кодирующий последовательность аминокислот, включающую только характерный N-концевой домен 2/3. По литературным данным, домен 2/3 в клетках млекопитающих может взаимодействовать с белками сигнального пути NF-kB, которые регулируют экспрессию генов иммунной системы, участвуют в регуляции пролиферации клеток и апоптоза (Ishizaka et al., 2012). Однако функция гена *tth* остается не до конца исследованной.

Один из методов изучения функции гена – анализ последствий ее потери (loss-of-function). Чтобы “выключить”, или “нокаутировать”, исследуемый ген достаточно получить его делецию. Выводы касательно функций генов делают, сравнивая фенотипы нормальных и нокаутированных по исследуемому гену организмов. Нокаут генов можно выполнить различными методами. Одним из них является метод направленной гомологичной рекомбинации ДНК, когда копия исследуемого гена заменяется последовательностью маркерного гена, который затем легко удалить с помощью сайт-специфической рекомбинации (Gong, Golik, 2003). При сайт-специфической рекомбинации обмен участками ДНК происходит по конкретным коротким сайтам гомологии. В настоящее время разработана универсальная система сайт-специфической рекомбинации с использованием Cre-рекомбиназы бактериофага P1 – система Cre-Lox. Эту систему используют для получения делеций, инверсий, вставок, транслокаций и других модификаций в хромосомной или эписомной ДНК (Will et al., 2002). Метод подразумевает встраивание в геном модельного организма последовательности гена, кодирующего фермент Cre-рекомбиназу бактериофага P1 и ее таргетных последовательностей *loxP* (*locus of crossing-over of*

P1). Cre-рекомбиназа узнает сайты *loxP* и осуществляет по ним сайт-специфическую рекомбинацию. Система Cre-Lox бактериофага P1 очень похожа в действии и в использовании на систему FLP-FRT дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Turan et al., 2011). Система FLP-FRT представляет собой технологию сайт-направленной рекомбинации между короткими сайтами-мишенями *FRT* для распознавания их дрожжевой рекомбиназой (флипазой) FLP. С помощью этой технологии можно получать мозаичные организмы и изучать последствия потери функции гена в конкретном органе или группе клеток. Это важно в тех случаях, когда мутация исследуемого гена приводит к летальному эффекту. Для этого используют тканеспецифический промотор, который активирует рекомбиназу в конкретном органе или ткани. В силу хорошей изученности, дрозофила является удобным организмом для проведения направленной гомологичной рекомбинации с целью "выключения" функции генов (Nefedova, 2020).

В работе мы описываем получение первых нокаутных по гену *toothrin* дрозофил, что даст возможность исследовать "нулевых" мутантов с потерей функции этого гена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии дрозофил, использованные в работе

Мух всех линий поддерживали при 23–25°C на стандартной кормовой среде, содержащей манную крупу, сахар, изюм, дрожжи и пищевой агар в конечной концентрации 0.4%.

В экспериментах использовали линии дрозофил, полученные из музейных коллекций, или созданные самостоятельно. Для микроинъекций использовали эмбрионы линии y^1w^{1118} (Bloomington *Drosophila* Stock Center). Мух этой линии использовали также для проведения аналитических скрещиваний и выявления трансформантов, несущих маркерный ген, отвечающий за пигментацию глаз (*mini-white*). Мух линии y^1w^{1118}; *FLP*, *I-SceI/TM3*, *Sb, Ser* (# 6935 Bloomington *Drosophila* Stock Center) использовали для мобилизации инактивирующей конструкции. Эта линия содержит конструкции *P{70FLP}23* и *P{70I-SceI}4A*, которые под контролем промотора гена теплового шока *hsp70* индуцибельно экспрессируют флипазу FLP и эндонуклеазу I-SceI соответственно. Дрозофил линии *Df(1)260-1*, y^1*/FM, B* использовали для балансирования Х-хромосомы и выведения ее в гомозиготное состояние. Мух лабораторной линии *Cy/L*; *D/Sb* (обозначена *18V*) с множественными инверсиями во второй (*SM6, CyO*) и третьей (*TM3, Sb*) хромосомах использовали для хромосомного картирования. Трансгенную линию *CyO;* $p[w^+Cre]$*/Sco,* содержащую конструкцию $p[w^+Cre]$, где *Cre* – ген, кодирующий сайт-специфическую Cre-рекомбиназу бактериофага *Enterobacteria phage P1*, использовали для вырезания маркерного гена *mini-white* из инактивирующей генной конструкции. Линия была любезно предоставлена д.б.н. акад. П.Г. Георгиевым (Институт биологии гена Российской академии наук). Для размножения трансформантов использовали линию со сцепленными Х-хромосомами *C(1)DX*, y^1 f^1 (Bloomington *Drosophila* Stock Center). Мух линии дикого типа *Oregon-R* (Bloomington *Drosophila* Stock Center) использовали для выведения нокаутных мутантов на чистый генетический фон и в контрольных экспериментах.

Синтез инактивирующей конструкции и получение трансформированных дрозофил

В работе использовали плазмиду *pW25* размером 8968 п.н. (получена от Кента Голика, университет Юта; Gong, Golik, 2003), содержащую сайты рестрикции для клонирования *Not*I, *Sph*I, *Acc*65I, *Asc*I, *Bsi*WI, сайты *loxP* для рекомбинации Cre-Lox, сайты *FRT* для рекомбинации FLP-FRT и маркерный ген w^{hs}, определяющий пигментацию глаз. В плазмиду *pW25* клонировали фрагменты ДНК, расположенные по флангам кодирующей области *tth* и названные левым (LA) и правым (RA) плечом конструкции. Фрагменты амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК дрозофил линии дикого типа *Oregon-R*. Амплифицированный фрагмент LA, длиной 5565 п.н., и фрагмент RA, длиной 4776 п.н., по отдельности клонировали в плазмиду *pGEM-T easy* (Promega) и полностью секвенировали. Далее клонированные фрагменты вырезали из полученных плазмид с помощью эндонуклеаз рестрикции (*Kpn*I и *Not*I для фрагмента LA и *Asc*I с *Bsi*WI для фрагмента RA) и переклонировали по соответствующим сайтам рестрикции в плазмиду *pW25*. В результате была получена инактивирующая генная конструкция *pW25tth-exc*, которую использовали в дальнейшей работе (рис. 1).

Очистку плазмидной ДНК для инъекции осуществляли по протоколу набора Амершам 27-9602-01 (GFX PCR DNA и Gel Band Purification Kit). Инъекционную иглу заполняли смесью (5–10 мкл) плазмидного вектора *pW25tth-exc* и плазмиды-хелпера *pBR322*, экспрессирующего под промотором *hsp70* транспозазу мобильного Р-элемента, в соотношении 4 : 1. Концентрация плазмидной ДНК составляла 1 мкг в 1 мкл деионизированной воды. Полученной смесью проводили микроинъекцию эмбрионов y^1w^{1118} на стадии прецеллюлярной бластодермы. Трансформантов отбирали по цвету глаз (маркер *mini-white*). Правильно прошедшую гомологичную рекомбинацию подтвер-

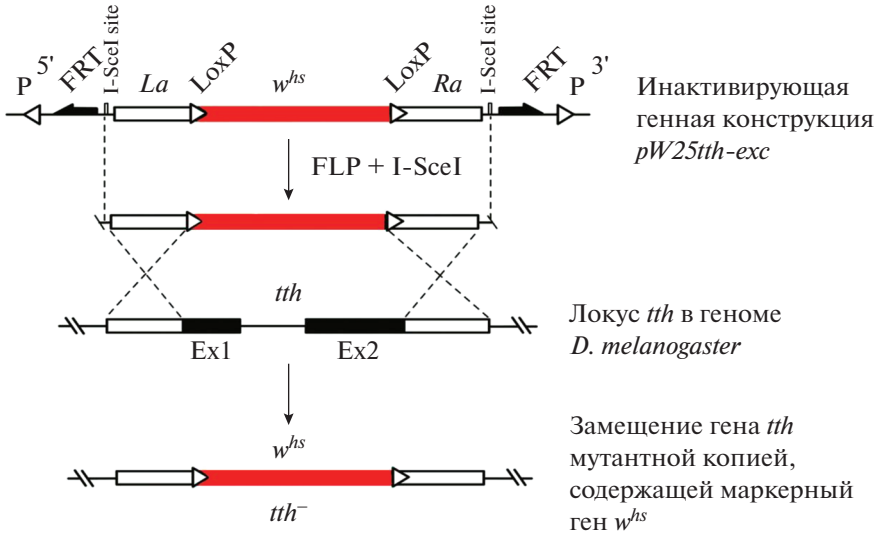

Рис. 1. Схема этапов генетической модификации локуса *tth* (объяснение в тексте).

ждали с помощью ПЦР-анализа геномной ДНК, используя специфические (прямой *nd3:* 5'-tcg cag ctc ttc ctg gac aa-3' и обратный *RevTth:* 5'-cag ata ctt ccg ata gtt gcg-3') праймеры для гена *tth* (рис. 2а, 2б).

Генетические эксперименты

Индукция сайт-направленной рекомбинации. Трансформант y^1w^{1118}; $p\{W25tth\text{-}exc\}$, w^{hs} с инсерцией инактивирующей конструкции в хромосому II был размножен, его потомков использовали для индукции сайт-направленной рекомбинации и получения делеции гена *tth*. Поскольку конструкция *pW25tth-exc,* маркированная w^{hs}, встроилась во II хромосому, необходимо было ввести доминантный маркер второй хромосомы *Curly* в геном мух линии y^1w1^{118}; *FLP*, *I-SceI/TM3*, *Sb*, *Ser*. Для этого скрещивали самок этой линии с самцами линии *18V*. В F1 отбирали мух y^1w^{1118}/y^+w; *Cy*(*L*)/+; *FLP*, *I-SceI*/*D* с доминантным маркером во II и III хромосоме. Мух полученной линии, несущих гены рестриктазы I-SceI и рекомбиназы FLP, скрещивали с мухами y^1w^{1118}; $p\{W25tth\text{-}exc\}$, w^{hs}; +/+. Для дестабилизации конструкции *pW25tth-exc* личинок F2 третьего возраста y^1w^{1118}; $p\{W25tth\text{-}exc\}$, $w^{hs}/Cy(L)$; *FLP*, *I-SceI* (*D*)/+ инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 ч для активизации экспрессии ферментов FLP и I-SceI. Отбирали потомков с доминантным маркером *Curly* (или *Lobe*) во II хромосоме и без маркеров в III хромосоме и массово (по 10 особей) скрещивали с самцами y^1w^{1118}. В F3 отбирали самцов $p\{W25tth\text{-}exc\}$, w^{hs}(?)/*Y*; *Cy*/+; *FLP*, *I-SceI*/+ (красные глаза w^{hs} и мутация *Curly*), такое сочетание маркеров возможно при транслокации конструкции *pW25tth-exc* со второй на любую другую хромосому. Хромосомное картирование конструкции проводили в генетических экспериментах и подтверждали с помощью ПЦР-анализа.

Удаление маркерного гена *mini-white* из делетированного локуса *tth* с помощью сайт-специфической рекомбинации. Для удаления маркерного гена *mini-white* ($\{w^{hs}\}$), окруженного сайтами *loxP*, из района гена *toothrin* (*tth*) мы использовали линию мух, несущих Cre-рекомбиназу. Для этого скрещивали нокаутных самок w^- $tth^-\{w^{hs}\}$ с самцами, несущими Cre-рекомбиназу, y^1w^1/Y; *CyO p*[w^+*Cre*]/*Sco.* Так как Cre-рекомбиназа активируется при повышенной температуре, потомство F1 (личинки третьего возраста) инкубировали в термостате при 37°C в течение часа. После вылета имаго отбирали самцов с абрикосовым цветом глаз w^- $tth^-\{?\}$; *CyO p*[w^+*Cre*]/+, которых (для получения отводок) размножали в индивидуальных скрещиваниях с самками *C*(*1*)*RM*/Y, имеющими сцепленные Х-хромосомы. Поскольку самцы в F1 имели “мозаичные” гаметы, вследствие случайности Cre-рекомбинации, в F2 мы получали 2 класса самцов (белоглазых и с пигментированными глазами), отбирали белоглазых (без *mini-white*) самцов, которых далее размножали в индивидуальных скрещиваниях с самками *C*(*1*)*RM*/Y.

Проверку успешного сайт-специфического вырезания маркерного гена *mini-white* в отводках, нокаутных по гену *tth* дрозофил, осуществляли с помощью ПЦР-анализа (рис. 2в, 2г) с использованием пары праймеров: *nd1* (прямой праймер для гена *tth:* 5'-tcg aga gga gag gtg gaa ga-3' 20 нукл.) и *KotthR1* (обратный праймер для гена *tth*: 5'-cag gca aag gca tcc gaa tc-3' 20 нукл.).

Выведение мутантов с нулевым аллелем *tth* на чистый генетический фон. Для выведения мутантов с нулевым аллелем *tth* на чистый генетический фон, самок дикого типа $y^+w^+tth^+$ (*Oregon-R*) скрещивали с белоглазыми нокаутными самцами $y^-w^-tth^-$/Y. Гетерозиготных самок $y^+w^+tth^+/y^-w^-tth^-$, полученных в потомстве F1, возвратно скрещивали с родительскими самцами $y^-w^-tth^-$/Y. В F2 получали красноглазых самцов родительского класса $y^+w^+tth^+$/Y и кроссоверов $y^+w^+tth^-$/Y (искомый рекомбинант). Наличие нулевого аллеля гена *tth* верифицировали посредством ПЦР-анализа, используя прямой *nd1* и обратный *KoTthR1* праймер. Мухи из отводок, показавших положительный ответ, были выведены в гомозиготное состояние.

Получение изогенной гомозиготной линии *tth*$^-$. Для выведения мутантов tth^- в гомозиготное состояние скрещивали одного самца tth^-/Y с самками линии *Df(1)260-1,* $y^1/FM4$, несущими балансерную инверсию *FM4* в первой хромосоме. Гетерозиготных самок F1 *FM4*, B/w^+tth^- возвратно скрещивали с родительским самцом tth^-/Y и в потомстве F2 отбирали гемизиготных самцов tth^-/Y и гомозиготных самок tth^-.

Сбор погибших эмбрионов и приготовление препаратов их кутикулы

Особей (5 пар самцов и самок) помещали в стакан со средой на 6–8 ч для откладки яиц. Поскольку эмбриональная стадия развития длится 24 ч при 25°C, стакан с отложенными яйцами держали в термостате до полного вылупления личинок больше суток. Не вылупившихся спустя 48 ч особей считали погибшими. Для исследования фенотипа погибших эмбрионов хорион удаляли вручную, кутикулу просветляли в капле раствора Хойера с добавлением 30% молочной кислоты в течение 1 ч при 60°C (Ashburner et al., 2005).

Микроскопия

Фотографии кутикулы сделаны с помощью цифровой камеры-окуляра DCM300 для микроскопа Olympus Ah-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание нокаутной по гену tth линии мух

Первым этапом работы стало получение направленной мутации гена *tth*. Для этого мы провели Р-элемент-зависимую трансформацию эмбрионов дрозофил генетической конструкцией *pW25tth-exc*, созданной на основе вектора *pW25* (см. Материалы и методы). Эта конструкция содержит нарушенную структуру гена *tth* (вместо кодирующей области был встроен маркер *mini-white* (w^{hs})), сайты *FRT* для узнавания FLP-рекомбиназой, сайт узнавания дрожжевой рестриктазой I-*Sce*I, а также сайты *loxP* (рис. 1). Было инъецировано 200 эмбрионов и получено 156 выживших взрослых мух. После аналитического индивидуального скрещивания их с мухами линии y^1w^{1118}, в F1, судя по наличию пигментации глаз, было обнаружено 5 трансформантов. Хромосомное картирование маркерного гена показало, что в 4х случаях он встроился в хромосому III, а в одном случае в хромосому II. Трансформанта $\boldsymbol{y^1w^{1118}}$; $\boldsymbol{p\{W25\ tth\text{-}exc\}}$, $\boldsymbol{w^{hs}}$ с конструкцией во второй хромосоме мы использовали в дальнейшей работе. Мы провели мобилизацию инактивирующей конструкции, которая под воздействием тепловой обработки (37°C, 1 ч; см. Материалы и методы) должна была вырезаться из места исходного встраивания на хромосоме II и заменить последовательность гена *tth*, расположенную на Х-хромосоме, по механизму гомологичной рекомбинации по плечам RA и LA (рис. 1). В результате вместо нативного гена *tth* в районе его локализации должен был находиться маркерный ген *mini-white* (w^{hs}) из инактивирующей конструкции (рис. 1). Анализ транслокации конструкции на Х-хромосому мы проводили в массовых аналитических скрещиваниях. Было проанализировано 2100 особей. В результате были отобраны 4 особи, в геноме которых произошло изменение хромосомной локализации маркера *mini-white* – с аутосомы на Х-хромосому. Эти особи были индивидуально размножены и подвержены ПЦР-анализу со специфическими праймерами для подтверждения правильно прошедшей гомологичной рекомбинации. Оказалось, что только в одном случае (отводка Т16) инактивирующая конструкция правильно встроилась в район локализации гена *tth*, заменив его копию геном *mini-white* (рис. 2а, 2б).

Таким образом, мы провели успешный нокаут гена *tth* с помощью направленной гомологичной рекомбинации. В итоге впервые были получены дрозофилы с нулевым аллелем гена *tth* – $y^-w^-tth^-\{w^+\}$. Однако эти дрозофилы несли мутации в генах *white* (*w*) и *yellow* (*y*), расположенные, так же, как и *tth*, в Х-хромосоме. Для корректного изучения мутантного фенотипа необходимо было вывести новую мутацию на чистый генетический фон. Кроме того, нужно было избавиться от маркерного гена *mini-white* $\{w^+\}$ из района локализации *tth*.

Выведение мух линии $y^-w^-tth^-\{w^+\}$ на чистый генетический фон происходило в 2 этапа: с помощью сайт-специфической рекомбинации и с помощью гомологичной рекомбинации (см. Материалы и методы). На первом этапе мы с помощью системы рекомбинации Cre-Lox – удалили мар-

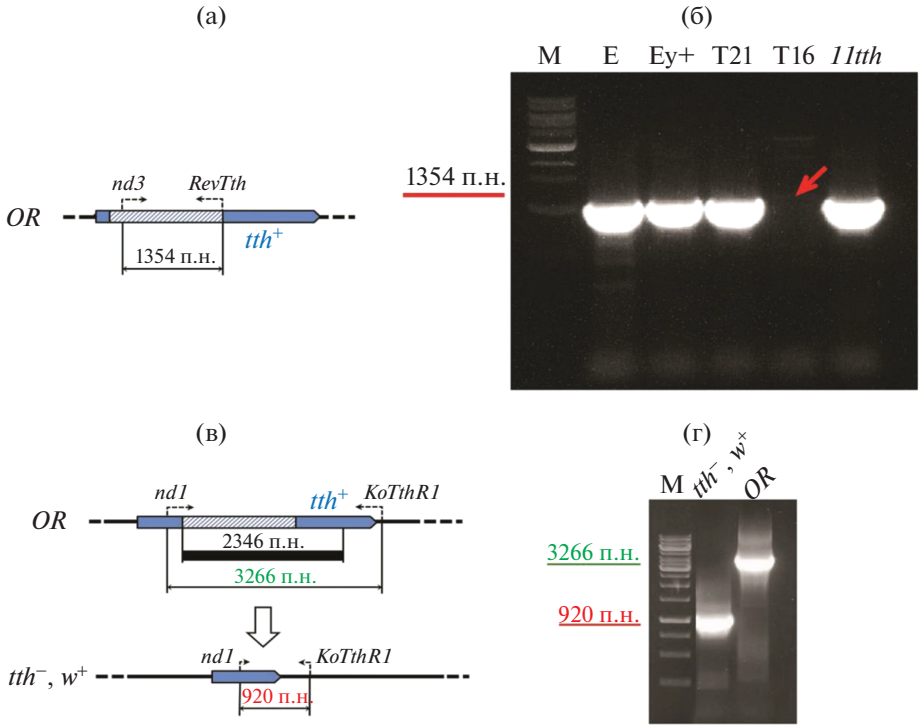

Рис. 2. Генотипирование дрозофил и анализ нокаута *tth*. (а) Схема последовательности гена *tth* у дрозофил дикого типа. Диагональными линиями обозначена открытая рамка считывания. (б) Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа с использованием пары праймеров: *nd3/RevTth* для ПЦР-анализа. *E*, *Ey+*, *T21*, *T16* – дрозофилы из анализируемых отводок. *11tth* – дрозофилы контрольной линии, содержащей инактивированную конструкцию по гену *tth* на II хромосоме. М – маркер длины фрагментов ДНК. Отводка *T16* – это нулевой мутант $tth^{-}\{w^{+}\}$, стрелкой показано отсутствие ПЦР-фрагмента, соответствующего гену *tth*. (в) Схема последовательности гена *tth* у мух дикого типа OR-R и у мух линии $w^{+}tth^{-}$ с указанием пар праймеров, использованных для ПЦР. Черным прямоугольником обозначен делетируемый фрагмент. (г) Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа на делецию гена *tth* в полученной отводке $w^{+}tth^{-}$ с использованием пары праймеров: *nd1/KoTthR1* (920 т.п.о. в случае делеции и 3266 т.п.о. в диком типе).

керный ген *mini-white* из нулевого аллеля *tth*. На втором этапе мы провели рекомбинацию, заменив с помощью кроссинговера мутации w^{-} и y^{-} на гены дикого типа (см. Материалы и методы). Потенциальных рекомбинантов $y^{+}w^{+}tth^{-}$/Y отбирали по пигментации глаз. По нашим оценкам, частота рекомбинации между генами *w* и *tth* должна была составить 43.5%. То есть каждый второй красноглазый самец должен был быть потенциальным рекомбинантом. Было проанализировано четыре отводки, в двух из которых наличие нулевого аллеля гена *tth* подтвердили генотипированием с помощью ПЦР с праймерами из смежного с геном *tth* района (рис. 2в, 2г). Таким образом, мы получили линию нокаутных мух с делецией гена *tth* на чистом генетическом фоне.

Анализ фенотипа кутикулы погибших эмбрионов с нулевым аллелем гена tth

Для того чтобы определить, влияет ли делеция гена *tth* на выживаемость, мы проверили наличие летальных эмбрионов в потомстве мутантных дрозофил. Было проанализировано 533 эмбриона, из которых 509 перешли на личиночную стадию развития. В контрольной линии дикого типа *Oregon-R* все эмбрионы ($N = 356$) перешли на личиночную стадию развития. Таким образом, частота эмбриональной летальности в линии tth^{-} составила 2.6% (509/533 × 100%), в контрольной линии – 0%. Анализ фенотипа кутикулы погибших эмбрионов показал ряд аномалий морфологического характера и нарушение формирования дорсо-вентральной оси полярности: их вентральные структуры (зубчатые полоски) формировались в латеральном положении (рис. 3). У всех погибших эмбрионов было выявлено нарушение развития челюстного аппарата, что свидетельствует о недоразвитии головного отдела (рис. 3б). Полученные результаты свидетельствуют о влиянии гена *tth* на эмбриональное развитие. Возможно, этот ген вовлечен в каскад важных процессов развития. Низкая пенетрантность эмбриональной летальности (2.6%) говорит о том, что существуют гены, способные

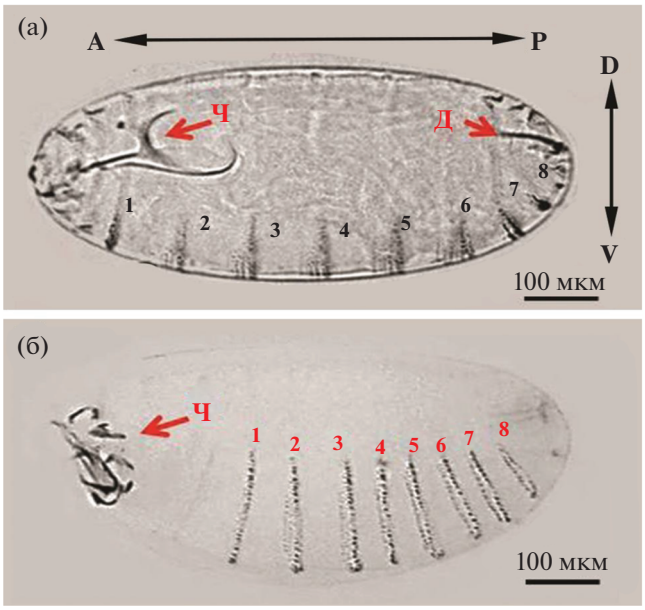

Рис. 3. Дефекты развития мутантного эмбриона *tth*$^{-}$. (а) Дикий тип: эмбрион в вителлиновой оболочке (вид с латеральной стороны) (1–8 – абдоминальные сегменты: зубчатые полоски отражают количество и размер сегментов, Ч – челюстной аппарат, Д – дыхальца; A, P – передняя и задняя оси полярности соответственно, V, D – вентральная и дорзальная оси полярности соответственно). (б) Мутантный эмбрион *tth*$^{-}$ в вителлиновой оболочке, цифрами указаны зубчатые полоски, расположенные не в вентральной, как положено, а в латеральной области эмбриона. Нарушение развития головного отдела указано стрелкой. Масштабная полоска – 100 мкм.

частично заместить отсутствие белка ТТН у мутантов. Например, таким геном может быть родственный ген семейства *d4 – dd4*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе нашей работы методом направленного внесения делеций была получена первая и единственная “нулевая” мутация гена *tth*. Этот ген кодирует белок без характерного D4-домена, но с доменом 2/3. Нулевая мутация не вызвала видимых фенотипических проявлений у взрослых особей, но в некоторой степени повлияла на выживаемость эмбрионов. Нарушение формирования головного отдела у погибших эмбрионов нулевых мутантов *tth* говорит о возможных дефектах в развитии их нервной системы, в частности, головного мозга. Известно, что некоторые гены семейства *d4* млекопитающих (*Cer-d4* и *neuro-d4*), а также ген дрозофилы *dd4* экспрессируются в нервной системе (Buchman et.al., 1992; Nabirochkina et al., 2002). Кроме того, предварительный анализ экспрессии белка ТТН выявил его локализацию в оптических структурах мозга личинок и имаго дрозофилы (Kuvaeva et al., 2022). Эти данные говорят об эволюционном консерватизме родственных генов семейства *d4* позвоночных и беспозвоночных животных, функция которых, по-видимому, связана с развитием нервной системы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Центру коллекций линий дрозофил Bloomington *Drosophila* Stock Center (Блумингтон, США) за предоставление ряда линий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН 2023 года № 0088-2021-0007.

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 экспериментальную работу, участвовала в обсуждении результатов и написании статьи. Д.А. Куликова участвовала в экспериментах и обсуждала результаты. О.Б. Симонова участвовала в обсуждении результатов, инициировала 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.

Ashburner M., Golic K.G., Hawley R.S. Drosophila: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. 1409 p.

Buchman V.L., Ninkina N.N., Bogdanov et al. Differential splicing creates a diversity of transcripts from a neurospecific developmentally regulated gene encoding a protein with new zinc-finger motifs // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20(21). P. 5579–5585.

Gong W.J., Golic K.G. Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila* // PNAS. 2003. V. 100(5). P. 2556–2561.

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-κB RelA/p50 het-

erodimer // 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.

Kuvaeva E.E., Kulikova D.A., Simonova O.B., Mertsalov I.B. Studying the specific localization of Toothrin protein from related D4 family in *Drosophila melanogaster* // Rus. J. Dev. Biol. 2022. V. 53. № 2. P. 145–149.

Nabirochkina E.N., 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.

Nefedova L.N. Drosophila melanogaster as a model of developmental genetics: modern approaches and prospects // Russ. J. Dev. Biol. 2020. V. 51. P. 201–211.

Turan S., Galla M., Ernst E. et al. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges // J. Mol. Biol. 2011. V. 407(2). P. 193–221.

Will E., Klump H., Heffner N. et al. Unmodified Cre recombinase crosses the membrane // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30(12):e59.

Generation of a Null Mutation of the *toothrin* Gene by Targeted Homologous Recombination in *Drosophila melanogaster*

E. E. Kuvaeva[1], D. A. Kulikova[1], O. B. Simonova[1, *], and I. B. Mertsalov[1]

[1]Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

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

Drosophila toothrin gene is related to the conserved *d4* family of genes that encode specific transcription factors. In early works, we investigated the effect of *tth* gene overexpression and characterized the specific pattern of its expression in the nervous system, but mutations in the *tth* gene have not yet been found. Null mutants are essential for analyzing gene function and screening of partner genes. Here we report the generation of the first *tth* gene knockout in *Drosophila* using a homologous recombination technique.

Keywords: d4 gene family, *toothrin*, gene knockout, *Drosophila melanogaster*