ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 6, с. 384–388

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.852'1

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНА ПОЛОВОЙ ПЛАЗМЫ *germes* СРЕДИ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ

© 2023 г. В. В. Кондукторова[a], *, Е. Г. Фофанова[b], Д. А. Никишин[a, b]

[a] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119992 Россия*

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

**e-mail: virgo584@yandex.ru*

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.
После доработки 11.08.2023 г.
Принята к публикации 25.08.2023 г.

Ген *germes* – маркер половой плазмы и первичных половых клеток (ППК), описанный у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Известно, что оверэкспрессия его мутантной формы негативно влияет на формирование и миграцию ППК. Однако до сих пор не было известно, насколько широко этот ген представлен у животных разных филогенетических групп. В данной работе был проведен биоинформатический анализ геномных и транскриптомных последовательностей животных, имеющих половую плазму. Оказалось, что гомологи *germes* имеются только у представителей родов *Xenopus* и *Hymenochirus* семейства Pipidae (отряд Anura). Полученные результаты подтверждены путем ОТ-ПЦР-анализа экспрессии ортологов *germes* в яичниках шести представителей разных семейств Anura. Филогенетический анализ клонированных последовательностей гомологов *germes* говорит о появлении этого гена у предков Pipidae и вторичной его утрате в роде *Pseudohymenochirus*. Также показано, что аминокислотные последовательности функциональных доменов белка Germes в значительной степени консервативны.

Ключевые слова: germes, половая плазма, ППК, BLAST, бесхвостые амфибии

DOI: 10.31857/S0475145023060058, **EDN:** HXNNDU

ВВЕДЕНИЕ

Предшественники половых клеток у большинства животных закладываются на ранних этапах онтогенеза в результате одного из двух принципиально разных механизмов – индукционного и детерминативного (Extavour, Akam, 2003). У хвостатых амфибий, черепах, ящериц, змей и плацентарных млекопитающих, а также тихоходок, сверчков, пчел, клопов и пауков, первичные половые клетки (ППК), возникают из соматических клеток эмбриона в результате индукционных воздействий, поступающих от окружающих эмбриональных тканей (Hansen et al., 2021). Для бесхвостых амфибий, костистых рыб, крокодилов и птиц, а также ос, тлей, плодовых мушек, асцидий, морских стрелок и нематод механизм детерминации ППК связан с наследованием клетками определенных цитоплазматических детерминант материнского происхождения, сконцентрированных в специфической безмембранной структуре, называемой половой плазмой (germ plasm) (Hansen et al., 2021). Половая плазма формируется во время ооогенеза в определенной зоне цитоплазмы ооцита, в которой агрегируются митохондрии, эндоплазматический ретикулум, электронноплотные гранулы, а также специфический набор матричных и некодирующих РНК и белков (Houston, King, 2000).

Состав и функции молекулярных компонентов половой плазмы детально изучены на модельных организмах, использующих детерминативный механизм спецификации ППК – амфибии *Xenopus laevis*, насекомом *Drosophila melanogaster*, нематоде *Caenorhabditis elegans* и костистой рыбе *Danio rerio* (Castrillon et al., 2000; Rengaraj et al., 2010; Julaton et al., 2011). Набор генов-маркеров половой плазмы включает гены *ddx4* (*vasa*), *dazl*, *nanos*, *pum*, *smB*/*smD*. Он довольно консервативен и характерен также для ППК животных с индукционным механизмом их формирования, в том числе млекопитающих (Castrillon et al., 2000; Lesch, Rengaraj et al., 2010; Julaton et al., 2011; Page, 2012). Продукты этих генов являются РНК-связывающими факторами, которые регулируют локализацию и трансляцию других мРНК, и необходимы для формирования и спецификации ППК (Lesch, Page, 2012).

Germes является компонентом половой плазмы и впервые описан у *X. laevis* (Berekelya et al., 2003). РНК *germes* визуализируется в ооцитах в составе половой плазмы (Berekelya et al., 2003), а белок Germes детектируется в мигрирующих ППК

перед заселением в гонаду (Konduktorova et al., 2022). Последовательность белка Germes содержит два мотива лейциновых застежек-молний (*Leucine zippers*, *LZ*) и кальций-связывающий EF-hand домен (Berekelya et al., 2007). Оверэкспрессия мРНК мутантной формы Germes, лишенной LZ доменов, приводит к аномальной морфологии ППК и негативно влияет на их количество и способность к миграции (Berekelya et al., 2007). Среди белковых партнеров Germes – легкие цепи динеина *dlc8a* и *dlc8b* (Berekelya et al., 2007), посредством которых, возможно, собираются белковые комплексы или происходит взаимодействие с цитоскелетным "молекулярным мотором" динеином (King, 2000; Rapali et al., 2011). Таким образом, Germes является важным компонентом половой плазмы и обеспечивает правильное формирование и функционирование ППК у *X. laevis*. Возникает вопрос, насколько широко гомологи данного гена распространены среди животных и насколько консервативна их функциональная роль в формировании ППК? Для ответа на этот вопрос, с помощью методов биоинформатики было исследовано наличие гомологов гена *germes* у животных, обладающих половой плазмой. Также был выполнен ОТ-ПЦР-анализ экспрессии ортологов *germes* в яичниках шести представителей разных семейств Anura.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Работа проводилась на самках бесхвостых амфибий следующих видов: *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), *Hymenochirus boettgeri* (Tornier, 1896), *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758), *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758), *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761). *X. laevis* является лабораторным видом и содержится на кафедре эмбриологии МГУ, остальные лягушки были приобретены в зоомагазине и определены до вида по ключу (Terent'ev, Chernov, 1965). Тотальная РНК из правого и левого яичника каждой амфибии выделялась независимо. *R. temporaria* и *B. bufo* были взяты по две каждой особи, а *H. boettgeri* и *B. bombina* – по пять. Все протоколы экспериментов на животных были одобрены Комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Выделение РНК и синтез кДНК

Тотальную РНК яичников выделяли с помощью реагента ExstractRNA (Evrogen, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество и количество тотальной РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). кДНК синтезировали из 1–2 мкг тотальной РНК с помощью набора M-MLV (Evrogen, Россия).

Молекулярное клонирование и анализ последовательностей

С использованием полученных кДНК в качестве матрицы, проведена ПЦР с вырожденными олигонуклеотидами, специфичными для наиболее консервативного участка последовательностей *germes X. laevis* (GenBank ID: AY172320.1) и *X. tropicalis* (GenBank ID: XM_031898981.1). Последовательности вырожденных праймеров: 5'-TTGGGATAGTTATGACCTTC-3' и 5'-TCCTCCTCCTTAAGTATGGCT-3'. Полученный ампликон клонировали в вектор pGEMT (Promega, США) или pAL-TA (Evrogen, Россия) для последующего секвенирования.

Поиск нуклеотидных последовательностей транскриптов и белков проводили в базе данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Последовательности сравнивали и выравнивали с помощью программы NCBI BLAST 2 с использованием алгоритма discontiguous megablast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Stephen et al., 1997) и Clustal Omega 3 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Секвенированные последовательности полученных ампликонов сравнивали с нуклеотидными и белковыми последовательностями *X. laevis* в NCBI BLAST.

Филогенетическое дерево бесхвостых амфибий было построено вручную на основе филогении семейств, представленной на онлайн-ресурсе amphibiaweb.org (https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html). Для построения дерева использовались лишь виды, геномы которых доступны в базе NCBI и были проанализированы на наличие *germes*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки наличия гомологов гена *germes* у животных, обладающих половой плазмой, мы провели широкий поиск в базе данных NCBI с помощью алгоритма BLAST. BLAST-поиск ортологов гена *germes* в базе данных аннотированных нуклеотидных последовательностей Nucleotide, выявил только одну предсказанную последовательность. Это последовательность XM_031898982.1 мРНК *Xenopus tropicalis* (Gray, 1864), обладающая со значительной степенью гомологии (79%). В связи с тем, что последовательности, гомологичные *germes*, не были найдены ни у хвостатых амфибий, ни у представителей других групп животных, мы сосредоточили дальнейшие усилия на поиске гомологов *germes* у бесхвостых амфибий.

На следующем этапе мы искали последовательности, гомологичные гену *germes*, в геномных последовательностях представителей Anura, доступных в базе данных NCBI. У другой амфибии рода *Xenopus*, *Xenopus borealis* (Parker, 1936), была выявлена последовательность гена (CM044435), гомологичная последовательности *germes X. laevis*. Нам удалось собрать полную кодирующую после-

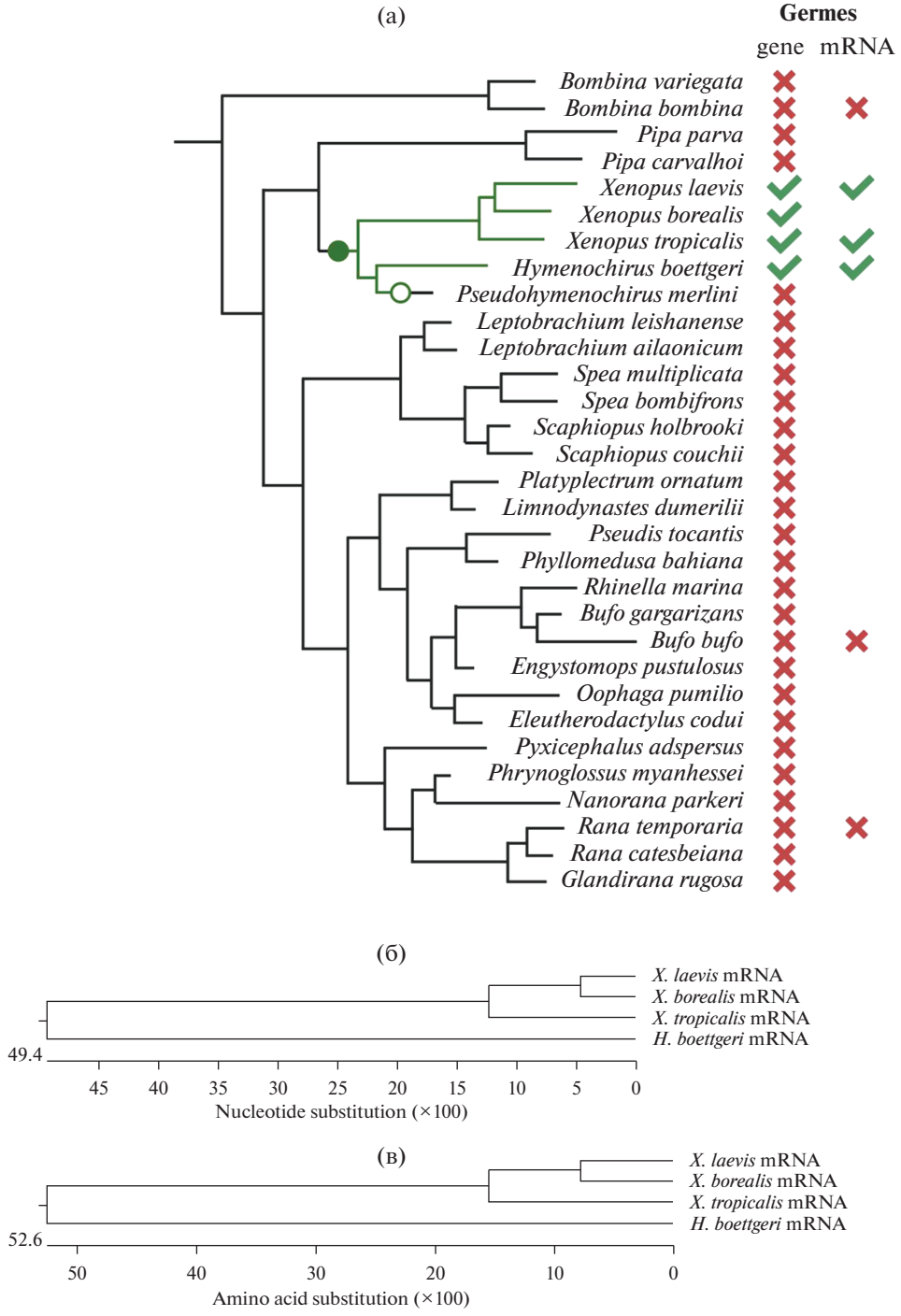

Рис. 1. (а) Распределение ортологов гена *germes* на филогенетическом дереве Anura. Виды, для которых был найден ген *germes* и его гомологи, отмечены зеленым цветом. Узлы, в которых предположительно появляется и исчезает этот ген, отмечены закрашенным и пустым кругом, соответственно. Филогенетическое дерево бесхвостых амфибий было построено на основе филогении семейств, представленной на онлайн-ресурсе amphibiaweb.org (https://amphibiaweb.org/taxonomy/AW_FamilyPhylogeny.html). (б, в) Анализ гомологии последовательностей ортологов гена *germes*. Филогенетическое дерево мРНК (б) и аминокислотных последовательностей (в).

довательность транскрипта *X. borealis* и соответствующего белка. Анализ выравнивания полученных последовательностей показал, что идентичность нуклеотидных последовательностей между *X. laevis* и *X. borealis* выше, чем между *X. laevis* и *X. tropicalis* (88 и 79% соответственно). Это объясняется тем, что *X. laevis* и *X. borealis* филогенетически ближе друг к другу (рис. 1а).

Помимо представителей рода *Xenopus*, гомолог *germes* был найден только в геноме малой когтистой лягушки *Hymenochirus boettgeri*, которая принадлежит к семейству Pipidae, как и представители рода *Xenopus*. Идентичность нуклеотидной последовательности *germes H. boettgeri* по сравнению с *X. laevis* составляет 74%. При этом гомологи *germes* не были обнаружены в геномах представителей других родов Pipidae, *Pipa* и *Pseudohymenochirus*, а также других семейств бесхвостых амфибий (рис. 1а).

Для верификации полученных результатов, был проведен ПЦР-анализ экспрессии ортологов *germes* в тканях яичников представителей нескольких семейств Anura. Используя праймеры, разработанные для короткого консервативного участка мРНК *germes X. laevis* (150 п.н.), который полностью комплементарен последовательности *germes X. tropicalis*, была выполнена ОТ-ПЦР с образцами яичников шести представителей Anura. Таким образом, были амплифицированы, клонированы и секвенированы частичные последовательности гомологов *germes* не только *X. laevis* и *X. tropicalis*, но и *H. boettgeri*. Анализ полученного фрагмента подтвердил высокую гомологию нуклеотидных последовательностей *germes X. laevis* и *H. boettgeri* (78%) (рис. 1б). ПЦР-анализ экспрессии гомологов *germes* в яичнике *Rana temporaria, Bufo bufo* и *Bombina bombina* не выявил гомологичных последовательностей, что согласуется с результатами биоинформатического анализа.

Согласно нашим результатам, *germes* встречается только в семействе Pipidae. К семейству Pipidae относятся южноамериканский род *Pipa* и три африканских рода – *Xenopus*, *Hymenochirus* и *Pseudhymenochirus* (Frost, 2023). Гомолог гена и транскрипт *germes* были обнаружены только у видов, принадлежащих к родам *Xenopus* и *Hymenochirus* (рис. 1а). Множественный анализ частичной или полной последовательности белка Germes у четырех видов амфибий (рис. 1в) показал, что самая высокая гомология наблюдается между *X. laevis* и *X. borealis*. Более низкий уровень гомологии данной последовательности наблюдается у *X. tropicalis*, а гомолог *germes H. boettgeri* имеет наименьший уровень гомологии среди четырех видов. Полученные данные об уровне гомологии последовательности *germes* полностью соответствуют представлениям о филогении этой группы. По всей вероятности, этот ген возник в пределах семейства Pipidae (рис. 1а), а позднее был утрачен в одной из линий, к которой относится род *Pseudhymenochirus*.

Таким образом, ген половой плазмы *germes* имеется только у представителей родов *Xenopus* и *Hymenochirus* в пределах одного семейства Pipidae бесхвостых амфибий. При этом, как показано в экспериментах на шпорцевой лягушке, он не только является маркером половой плазмы, но и необходим для поддержания правильного формирования и миграции ППК (Berekelya et al., 2003; Konduktorova et al., 2022). Анализ аминокислотных последовательностей, кодируемых выявленными гомологами *germes* показал, что LZ домены, ответственные за взаимодействие с другими белками, являются консервативными структурами. Это говорит в пользу того, что у представителей Anura, имеющих *germes*, он выполняет сходные функции в половой плазме и ППК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Наталье Николаевне Лучинской за помощь в обращении с различными видами амфибий и ценные рекомендации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа Д.А. Никишина и Е.Г. Фофановой поддержана Государственным заданием № 0088-2021-0009.

Исследование В.В. Кондукторовой поддержано проектом ГУ № 30-2-21.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания и эвтаназии соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.В. Кондукторова выполнила большую часть экспериментов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и подготовке публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Altschul S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. P. 3389–3402.

Berekelya L.A., Ponomarev M.B., Luchinskaya N.N. et al. *Xenopus germes* encodes novel germ plasm-associated transcript // Gene Expression Patterns. 2003. V. 3. P. 521–524.

Berekelya L.A., Mikryukov A.A., Luchinskaya N.N. et al. The protein encoded by the germ plasm RNA Germes associates with dynein light chains and functions in *Xenopus* germline development // Differentiation. 2007. V. 75. P. 546–558.

Castrillon D.H., Quade B.J., Wang T.Y. et al. The human VASA gene is specifically 1 expressed in the germ cell lineage // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. V. 97. P. 9585–9590.

Extavour C.G., Akam M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation // Development. 2003. V. 30(24). P. 5869–5884.

Frost D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 (Date of access) // Electronic Database accessible at https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php. 2023. American Museum of Natural History, New York, USA.

Hansen C.L., Pelegri F. Primordial germ cell specification in Vertebrate embryos: phylogenetic distribution and conserved molecular features of preformation and induction // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. V. 9. P. 730332.

Houston D.W., King M.L. Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate // Current Topics in Developmental Biology. 2000. V. 50. P. 155–181.

Julaton V.T.A., Reijo Pera R.A. NANOS3 function in human germ cell development // Human Molecular Genetics. 2011. V. 20. P. 2238–2250.

King S.M. The dynein microtubule motor // Biochimica et Biophysica Acta. 2000. V. 1496. P. 60–75.

Konduktorova V.V., Luchinskaya N.N., Belyavsky A.V. Expression of the germes germ plasm gene in follicular cells of *X. laevis* oocytes // Russian J. Dev. Bio. 2022. V. 53. P. 350–362.

Lesch B.J., Page D.C. Genetics of germ cell development // Nature Reviews Genetics. 2012. V. 13. P. 781–794.

Rapali P., Garcia-Mayoral M.F., Martinez-Moreno M. et al. LC8 dynein light chain (DYNLL1) binds to the C-terminal domain of ATM-interacting protein (ATMIN/ASCIZ) and regulates its subcellular localization // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011. V. 414. P. 493–498.

Rengaraj D., Zheng Y.H., Kang K.S. et al. Conserved expression pattern of chicken DAZL in primordial germ cells and germ-line cells // Theriogenology. 2010. V. 74. P. 765–776.

Stephen F.A., Madden T.L., Schäffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. P. 3389–3402.

Terent'ev P.V., Chernov S.A. Key to Amphibians and Reptiles (3rd ed.) // Israel Program for Scientific Translations. 1965.

The Distribution of the Germ Plasm Gene *germes* among Anurans

V. V. Konduktorova[1, *], E. G. Fofanova[2], and D. A. Nikishin[1, 2]

[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

[2]Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, 119334 Russia

**e-mail: virgo584@yandex.ru*

The germes gene is a marker of germ plasm and primordial germ cells (PGC) described in the African clawed frog *Xenopus laevis*. It is known that overexpression of its mutant form negatively affects the formation and migration of PGC. However, until now it was not known how widely this gene is represented in animals of different phylogenetic groups. In this work, we performed bioinformatic analysis of genomic and transcriptome sequences of animals with germ plasm. It turned out that germes homologs are present only in representatives of the genera *Xenopus* and *Hymenochirus* of the family Pipidae (order Anura). The obtained results were confirmed by RT-PCR analysis of the expression of germes orthologs in the ovaries of six representatives of different Anura families. Phylogenetic analysis of cloned sequences of germes homologs suggests the appearance of this gene in the ancestors of Pipidae and its secondary loss in the genus *Pseudohymenochirus*. It is also identified that the amino acid sequences of the functional domains of the Germes protein are rather conservative.

Keywords: germes, germ plasm, PGC, BLAST, anurans