

УДК: 57:597.81:575.113.1

XENOPUS КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ В ГЕНЕТИКЕ

Панова А.С.¹, Гогичаева К.К.¹, Блохина Е.И.¹, Салова В.В.¹

ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации направление подготовки «Биология», Волгоград, Россия, e-mail:

16b2panova@bk.ru

В данной статье рассказывается о представителях рода *Xenopus* и использовании их в качестве модельных объектов. В работе говорится о истории применения *Xenopus* в эмбриологических и биологических исследованиях и о роли этих лягушек в развитии биологических наук. Также затрагиваются вопросы применения этого модельного организма в генетических экспериментах. Так как более частыми лабораторными животными в данном вопросе выступают мышь и *Danio rerio*, в работе были перечислены недостатки этих моделей и приведён ряд достоинств *Xenopus*. Были затронуты два основных используемых в исследованиях вида данного рода *X. laevis* (южноафриканская когтистая лягушка) и *X. tropicalis* (западная когтистая лягушка), а также описаны особенности их генотипов. В развернутом виде были рассмотрены возможные манипуляции и их практическое значение. Также в статье представлены особенности связанные с содержанием этих животных и их жизненным циклом. В работе сделан вывод о значимости данного модельного объекта и перспективах его использования, а также сформулированы предположения о возможной будущей роли представителей рода *Xenopus* в развитии генетики.

Ключевые слова: *Xenopus*, модельный объект, генетика, геномика

XENOPUS AS A MODEL OBJECT IN GENETICS

Panova A.S.¹, Gogichaeva K.K.¹, Blokhina E.I.¹, Salova V.V.¹

¹FSBEI HE VolgGMU of the Ministry of Health of 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”, Volgograd, Russia, e-mail: 16b2panova@bk.ru

This article describes the representatives of the genus *Xenopus* and their use as model objects. The paper talks about the history of *Xenopus* in embryological and biological research and the role of these frogs in the development of biological sciences. Also touched on the application of this model organism in genetic experiments. Since the mouse and *Danio rerio* are the more frequent laboratory animals in this matter, the disadvantages of these models were listed in the work and a number of advantages of *Xenopus* were given. Two main species of this genus *X. laevis* (South African clawed frog) and *X. tropicalis* (Western clawed frog) were used, and the characteristics of their genotypes were described. In the expanded form, possible manipulations and their practical significance were considered. Also, the article presents the features associated with the content of these animals and their life cycle. The conclusion is made about the significance of this model object and the prospects for its use, as well as assumptions are formulated about the possible future role of representatives of the genus *Xenopus* in the development of genetics.

Keywords: *Xenopus*, model object, genetics, genomics

Раньше исследователи, изучающие эмбриологию амфибий, собирали образцы из дикой природы. Они зависели от параметров окружающей среды, которые было невозможно контролировать, таких как погода весной, когда амфибии откладывали икру [6; 7]. Лягушка *Xenopus* впервые стала использоваться в качестве лабораторного животного в начале 1900-х годов в Великобритании, когда впервые привлекла внимание зоологов, которые обнаружили, что представители этого рода могут размножаться в аквариумах. Наибольшую популярность этот модельный объект получил в 1940-х и 1950-х годах, когда при помощи лягушек начали проводить тестирование на беременность. Помимо эмбриологии представители рода *Xenopus* применялись в исследованиях биологии развития. Но, без сомнения, самым известным и знаменитым экспериментом, связанным с этим модельным организмом является демонстрация Джоном Гурдоном плюрипотентности соматического ядра [5]. Гурдон клонировал первого позвоночного в истории в результате переноса ядра в двуядерную оплодотворенную зиготу. В последние 3 десятилетия 20-го века *Xenopus* широко использовался в лабораториях по всему миру, поэтому и многие другие фундаментальные знания биологии и развития клеток были получены в результате работы с эмбрионами лягушек. Например, благодаря использованию лягушек рода *Xenopus* была рассмотрена молекулярная регуляция клеточного цикла [13]. Таким образом, ценность и универсальность *Xenopus* как модельного организма в области изучения механизмов развития позвоночных велика и никогда не приуменьшалась.

Однако, когда дело доходит до оценки аллелей болезней человека, большинство клиницистов и генетиков обращаются к мышам и рыбки *Danio rerio*, которые считаются наиболее подходящими модельными организмами для изучения механизмов болезней человека. Оба изначально были созданы как генетические модели, в то время как *Xenopus* - и амфибии в целом - превосходны как экспериментальные модели. Но, конечно, каждая модель в лабораторных исследованиях имеет свои преимущества и свои недостатки. Например, мышь, как млекопитающее, имеет геном, очень похожий на геном человека, и обладает огромным набором инструментов для генетических манипуляций. Тем не менее, мышь как модельный объект требует больших материальных вложений в содержание животных. К тому же размеры помета невелики [3]. Так, в среднем у самки рождается 8 детёнышей, из которых только небольшая часть несет мутантный аллель. В тоже время *Danio rerio* даёт большое количество потомков, они менее дороги в содержании и имеют множество доступных линий мутантов и репортеров. Также широко используется возможность непосредственно наблюдать эмбриональное развитие и даже выполнять

визуализацию живых клеток. Тем не менее, это не уникальная особенность *Danio rerio*. Например, развитие почек и миграция клеток нервного гребня у эмбрионов лягушки происходят с большим временным и пространственным разобщением [10; 14]. Также у *Danio rerio* есть определенные специфические для органа ограничения. Например, они не могут моделировать человеческие синдромы, которые затрагивают конечности или пальцы, легкие или диафрагму, т. е. структуры, которые участвуют во многих врожденных синдромах человека, но отсутствуют у рыб. Кроме того, хотя сердце *Danio rerio* было отличной моделью для изучения регенерации, наличие только одного предсердия и одного желудочка не может полностью моделировать пороки развития четырехкамерного сердца человека [3].

В наши дни в исследованиях используются два вида лягушек рода *Xenopus*: *X. laevis* (южноафриканская когтистая лягушка), которая использовалась в течение десятилетий, и *X. tropicalis* (западная когтистая лягушка), которая была недавно внедрена во многих лабораториях [15]. *X. tropicalis* - генетически диплоидный вид, оптимальной температурой развития которого являются 24–26 °С, тогда как представители *X. laevis* предпочитают более холодные воды до 18 °С и являются продуктом успешной гибридизации двух видов, т. е. содержат дублированный набор генов и хромосом. Конечно, амфибии генетически далеки от людей, но у них общее происхождение и при этом более близкое эволюционное положение, чем у костистых рыб. Полное секвенирование генома и тщательное аннотирование обоих видов показывают удивительно высокую степень синтении с людьми даже в дублированном геноме *X. laevis*. Около 90% генов болезней человека имеют гомологов в обоих видах *Xenopus* сохранение, что является обязательным условием для любой модели генетического прогнозирования на животных. Многие лаборатории применяют оба вида параллельно, т.е. используют *X. tropicalis* для редактирования генома и *X. laevis* для большинства других исследований [3].

Основная особенность этой модели, которая сделала ее привлекательной в прошлом и обеспечивает большие перспективы для будущих использований - это легкий доступ к яйцам и эмбрионам. Самки откладывают большие кладки из тысяч яиц, что можно спровоцировать праймированием. В настоящее время исследователи используют тот же принцип, который сделал лягушку системой для тестирования на беременность. Яйца могут быть оплодотворены естественным спариванием или искусственно при помощи добавления сперматозоидов, которые в случае *X. laevis* можно хранить в холодильнике в течение нескольких дней без потери оплодотворяющей способности. Кроме того, яйца крупные, диаметром 1,2 и 0,8 мм у *X. laevis* и *X. tropicalis* соответственно. Такие размеры позволяют проводить легкие внутриклеточные микроинъекции либо в зиготу, либо в определенные бластомеры на ранних стадиях развития. Кроме того, родословная отдельных клеток хорошо

известна [3; 11]. Т. е. инъекции могут быть точно направлены на ткани и органы на более поздних стадиях развития, вплоть до стадии головастика, непосредственно перед метаморфозом, который достигается через 5 дней развития и в котором органогенез в основном завершен. Таким образом, точные манипуляции могут быть выполнены на ранних стадиях расщепления в первые несколько часов развития, и их последствия будут непрерывно наблюдаться в течение следующих нескольких дней на протяжении всего развития органа. Так можно манипулировать большим количеством эмбрионов, которые очень быстро развиваются до желаемых стадий органогенеза, что позволяет получать результаты в короткие сроки. Поскольку самки дают пригодное для исследований потомство несколько раз в год, а содержание этих животных является относительно недорогим, использование *Xenopus* представляется выгодным выбором [3].

Уникальной особенностью, не обнаруженной у других видов модельных животных является возможность односторонних инъекций, что означает, что позволяет манипулировать только одной стороной эмбриона, используя вторую сторону как внутренний контроль. Этот признак, который является следствием первого деления расщепления, отделяющего левую и правую стороны эмбриона, весьма важен при оценке фенотипических последствий экспериментальных манипуляций [3]. Способность манипулировать очень большим количеством эмбрионов в эксперименте и возможность отбора образцов для анализа на основе нормального развития со стороны контроля добавляет высокий уровень точности, статистической значимости и воспроизводимости для каждого исследования.

Большой размер икры и эмбрионов, который отличает лягушек *Xenopus* от *Danio rerio* и мыши, по крайней мере, в течение первой трети эмбрионального развития, предлагает еще одно уникальное преимущество: достаточное количество материала для проведения протеомного анализа с управляемым числом образцов [1; 3]. С быстрым развитием протеомики эта характеристика, безусловно, станет более заметной в ближайшем будущем и, например, позволит проводить сравнительные исследования взаимодействия первоначальных и мутированных белков.

Внутриклеточные микроинъекции являются наиболее важным методом при использовании лягушки как модельного объекта. Установка для этой манипуляции довольно проста: рассекающий микроскоп, оснащенный гибким источником света и устройством для удержания и направления иглы для инъекции. В большинстве лабораторий имеется ряд установок для инъекций, позволяющих оптимально использовать кладки для яиц, которые развиваются синхронно и, следовательно, должны вводиться в течение ограниченного периода времени 30–45 минут или около того. Манипуляции во многих случаях касаются

экспрессии генов, а именно антисмысловые морфолино-олигомеры (МО), т. е. одноцепочечные нуклеотидные цепи, несущие морфолино-кольцо вместо рибозы или дезоксирибозы, связываются с мРНК и препятствуют трансляции. Если это происходит в начале AUG (блокирующие трансляцию МО или ТБМО), или со сращиванием, когда они охватывают донорный или акцепторный сайт сплайсинга (блокировка сплайсинга или SBМО) [8]. Правильное нацеливание на интересующую ткань или орган обычно контролируется совместным введением индикаторов линии, например флуоресцентного декстрана или мембранно-направленного GFP, которые позволяют отбрасывать ошибочно нацеленные образцы, просто глядя в микроскоп. Конечно, необходимо тщательно контролировать специфичность МО, поскольку ошибки не могут быть исключены априори, как и во всех манипуляциях, которые требуют взаимодействия с конкретными нуклеотидными последовательностями, будь то геномные или на уровне РНК. Контроли включают использование более одного МО, дозозависимость и спасение фенотипов путем совместного введения спасательных мРНК, которые не являются мишенями для МО [3; 4; 9].

Редактирование генома по технологии CRISPR / Cas9 представителей рода *Xenopus* легко выполняется и может служить для подтверждения правильности использования МО, а также в качестве действующего генетического инструмента [2; 12; 15].

Особь рода *Xenopus* как модельного объекта внесли существенный вклад в наше понимание основных эмбриологических и клеточных биологических принципов развития, от плюрипотентности ядра соматической клетки до выяснения организатора *Spemann* и основных сигнальных путей. Экспериментальный и молекулярный репертуар, доступный для точного и контролируемого манипулирования взаимодействиями развития и генами, относящимися к развитию, допускает, что эти виды являются полноправными членами небольшой группы эффективных моделей животных для изучения механизмов заболеваний человека. В будущем представители этого рода будут играть важную роль в биомедицинских исследованиях, и получат должное признание в генетической области.

1. Amin, N.M., T.M. Greco, L.M. Kuchenbrod, M.M. Rigney, M.-I. Chung, J.B. Wallingford, I.M. Cristea, F.L. Conlon (2014) Proteomic profiling of cardiac tissue by isolation of nuclei tagged in specific cell types (INTACT). *Development* 141: 962–973.
2. Blitz, I.L. (2018) Primordial germ cell transplantation for CRISPR/Cas9-based leapfrogging in *Xenopus*. *J Vis Exp* 132: e56035.
3. Blum M., Ott T. *Xenopus*: an undervalued model organism to study and model human genetic disease // *Cells Tissues Organs*. – 2018. – Т. 205. – №. 5-6. – С. 303-313.
4. Eisen, J.S., J.C. Smith (2008) Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 135: 1735–1743.

5. Gurdon, J.B., T.R. Elsdale, M. Fischberg (1958) Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182: 64–65.
6. Gurdon, J.B., N. Hopwood (2000) The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *Int J Dev Biol* 44: 43–50.
7. Hamburger, V. (1988) *The Heritage of Experimental Embryology – Hans Spemann and the Organizer*. New York, Oxford University Press.
8. Heasman, J. (2002) Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* 243: 209–214.
9. Kok, F.O., M. Shin, C.-W. Ni, A. Gupta, A.S. Grosse, A. van Impel, B.C. Kirchmaier, J. Peterson-Maduro, G. Kourkoulis, I. Male et al. (2015) Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev Cell* 32: 97–108.
10. Lienkamp, S., A. Ganner, C. Boehlke, T. Schmidt, S.J. Arnold, T. Schäfer, D. Romaker, J. Schuler, S. Hoff, C. Powelske et al. (2010) Inversin relays Frizzled-8 signals to promote proximal pronephros development. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 20388–20393.
11. Moody, S.A. (2000) Cell lineage analysis in *Xenopus* embryos. *Methods Mol Biol* 135: 331–347.
12. Naert, T., K. Vleminckx (2018) CRISPR/Cas9-mediated knockout of Rb1 in *Xenopus tropicalis*. *Methods Mol Biol* 1726: 177–193.
13. Philpott, A., P.R. Yew (2008) The *Xenopus* cell cycle: an overview. *Mol Biotechnol* 39: 9–19.
14. Szabó, A., M. Melchionda, G. Nastasi, M.L. Woods, S. Campo, R. Perris, R. Mayor (2016) In vivo confinement promotes collective migration of neural crest cells. *J Cell Biol* 213: 543–555.
15. Tandon, P., F. Conlon, J.D. Furlow, M.E. Horb (2017) Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: approaches and opportunities for human disease modeling. *Dev Biol* 426: 325–335.