

Санкт-Петербургский государственный университет

Биологический факультет

Согомонян Каринэ Сергеевна

Экспрессия генов каскада инсулинового рецептора в процессе стробилиляции *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa)

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена на кафедре
зоологии беспозвоночных

Научный руководитель: К.б.н.,
старший научный сотрудник
кафедры зоологии
беспозвоночных Старунов В.
В.

Санкт-Петербург
2018

Оглавление

Оглавление

Введение	3
Обзор литературы.....	4
Материалы и методы	11
Результаты.....	16
Обсуждение результатов	25
Выводы	27
Благодарности.....	28
Список литературы.....	29
Приложение 1	32
Приложение 2	33

Введение

Инсулиновый рецептор способен запускать множество молекулярных каскадов у различных групп животных. Он участвует в регуляции таких важных процессов как клеточная пролиферация и дифференцировка, рост, регуляция метаболизма и клеточного цикла, апоптоз. Кроме того, сигнальные пути инсулинового рецептора играют важную роль в процессах эмбриогенеза и развития.

Вид *Aurelia aurita* (Scyphozoa) является представителем одной из ключевых групп Metazoa. Для данной группы характерен метагенетический жизненный цикл, в ходе которого происходит последовательная смена полового и бесполого поколений. При этом сцифоидные медузы отличаются наличием особого типа бесполого размножения – стробилицей, - в результате которой отпочковывающиеся эфиры развиваются в медуз, размножающихся половым путем. Хотя Cnidaria представляет собой сестринский таксон Bilateria, их молекулярные каскады схожи. Тем не менее, их реализация и выполняемые функции могут различаться. Сигнальный путь инсулинового рецептора, его компоненты и функции, у кишечнополостных изучены относительно плохо. Имеется информация об инсулиноподобном рецепторе у представителя Hydrozoa (Steel et al., 1996) однако подобных исследований для группы Scyphozoa не проводилось.

Таким образом, целью данной работы стало изучение экспрессии генов каскада инсулинового рецептора в лабораторной линии сцифоидной медузы *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa).

В рамках этой цели нами были поставлены следующие задачи:

1. Выявить в транскриптомной базе *Aurelia aurita* гены каскада инсулинового рецептора
2. Провести филогенетический анализ найденных последовательностей для подтверждения их принадлежности к интересующим семействам
3. Проверить наличие экспрессии на стадиях полипа, стробилы и эфиры и выявить зоны экспрессии найденных генов с помощью РНК гибридизации *in situ*

Обзор литературы

Инсулиновый рецептор относится к большому семейству тирозинкиназных рецепторов (RTK). Сигнальные каскады, связанные с активацией тирозинкиназных рецепторов играют ключевую роль для живых организмов, так как обеспечивают регуляцию множества клеточных процессов, таких как: пролиферация, дифференциация, клеточная миграция, выживаемость клеток, контроль клеточного цикла (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Lemmon and Schlessinger, 2010; Ullrich and Schlessinger, 1990).

Лигандами, связывающимися с тирозинкиназными рецепторами, являются различные факторы роста, на основе чего выделяют следующие подсемейства (Hubbard and Miller):

- рецепторы эпидермального фактора роста,
- рецепторы фактора роста тромбоцитов,
- рецепторы фактора роста фибробластов,
- рецепторы фактора роста нервов,
- рецепторы фактора роста гепатоцитов,
- эфриновые рецепторы
- рецепторы инсулина

Не смотря на широкое разнообразие вызываемых эффектов, структура различных тирозинкиназных рецепторов сходна. В основном тирозинкиназные рецепторы являются мономерами, которые претерпевают димеризацию при связи внеклеточного домена с лигандом (Hubbard et al., 1998; Jiang and Hunter, 1999). Однако существуют и исключения, например, инсулиновый рецептор присутствует на поверхности клеточной мембраны в виде связанного посредством дисульфидного мостика димера (Van Obberghen, 1994). Цитоплазматический домен RTK соединен с экстранеклеточным трансмембранной спиралью и имеет тирозинкиназный кор, а также дополнительные регуляторные последовательности, которые подвергаются аутофосфорилированию. При связи внеклеточного домена с лигандом происходит активация тирозинкиназного активного центра, находящегося в цитоплазматическом домене, что, в свою очередь, ведет к запуску сигнальных путей, которые приводят к активации общего для данного семейства рецепторов набора сигнальных молекул (Hubbard et al., 1998; Jiang and Hunter, 1999). Интересно отметить, что один тип тирозинкиназного рецептора может участвовать в активации целого ряда молекулярных каскадов в зависимости от типа клеток, в котором данный рецептор экспрессируется (Fantl et al., 1993a). С этой особенностью связано разнообразие клеточных ответов, вызываемых активацией RTK.

Инсулиновый рецептор и рецептор инсулиноподобного фактора роста I относятся к подсемейству тирозинкиназных рецепторов. Их структурная особенность заключается в том,

что они функционируют как гетеродимеры, состоящие из $\alpha\beta$ -мономеров, соединенных дисульфидными связями. Связывание лиганда с α -субъединицей ведет к конформационным изменениям, в результате чего происходит активация тирозинкиназы, находящейся в цитоплазматической части β -субъединицы (Obberghen and AWARD, 1994). Лигандами данного подсемейства тирозинкиназных рецепторов являются инсулин и инсулиноподобные пептиды, представляющие собой структурные и функциональные гомологи и имеющие общее эволюционное происхождение (Chan et al., 1992; Murray-Rust et al., 1992; Smit et al., 1998). Предполагается, что они появились около 600 миллионов лет назад среди представителей Archamethazoa в результате дупликации общего предкового гена и последующей его дивергенции (Pertseva and Shpakov, 2002). Показано, что гены инсулинового семейства представлены среди всех группы Metazoa (Jin and Steiner, 2000). Как и инсулин позвоночных, инсулиноподобные пептиды беспозвоночных являются дипептидами. Это говорит о том, что структурно данные белки схожи. Однако функционально инсулиноподобные пептиды беспозвоночных ближе к IGF (инсулиноподобным факторам роста) и являются факторами роста, но не показано, чтобы они принимали участие в регуляции метаболизма, что является функцией инсулина у позвоночных (Jin and Steiner, 2000). Возможно, на ранних этапах эволюции позвоночных, инсулиноподобный ген предка был дублирован и дивергировал, вследствие чего образовались инсулин и IGF. Предполагается, что после дупликации инсулин приобрел роль регулятора метаболизма, а изначально он выступал в качестве фактора деления.

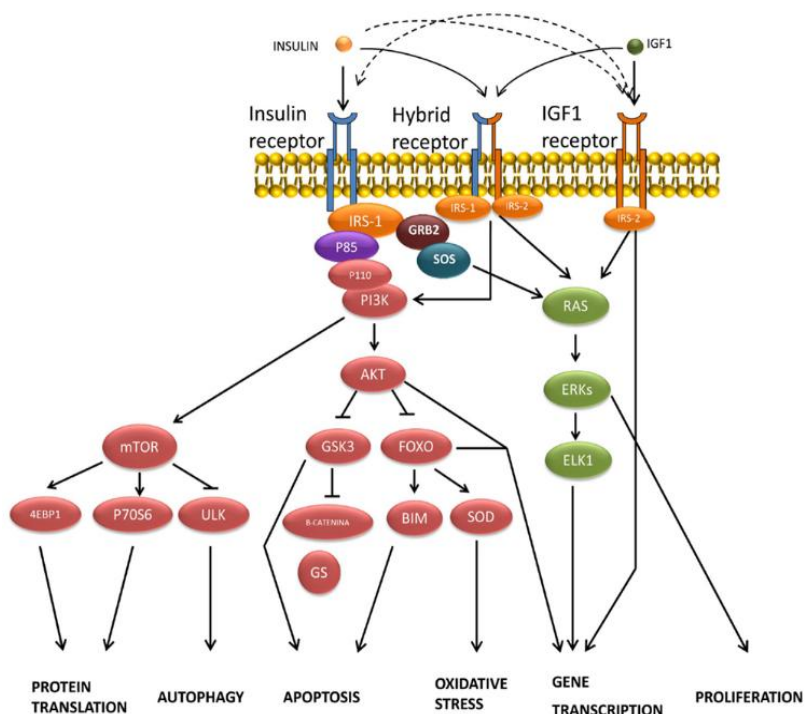


Рис1 .Схематичное изображение каскада инсулинового рецептора и рецепторов инсулиноподобных факторов роста.. IGF-I – рецептор инсулиноподобного фактора роста

E.Blázquez et al., 2014

При связывании с лигандом происходит димеризация рецептора и его аутофосфорилирование. Цитоплазматический домен тирозинкиназных рецепторов имеет

высокоселективные сайты связывания с сигнальными молекулами, обеспечивающими запуск клеточного ответа. Общая особенность сигнальных молекул состоит в том, что они содержат SH2 домен, который и обеспечивает связывание с рецептором. Еще одна особенность инсулинового рецептора заключается в том, что в отличие от остальных тирозинкиназных рецепторов, с его активным центром сначала взаимодействует молекула субстрата инсулинового рецептора (IRS). Она выступает посредником между рецептором и PI3-киназой (фосфотидилинозитол-3-киназа) или другими сигнальными молекулами, которые связываются напрямую с остатками тирозина каталитического центра других тирозинкиназных рецепторов благодаря наличию SH2 домена (Fantl et al., 1993b).

Сигнальные пути инсулинового рецептора могут приводить к образованию фосфоинозитидов и активации различных изоформ протеинкиназы C, обеспечивать глюкозный транспорт и метаболизм или запускать молекулярные каскады митогенактивируемой протеинкиназы, приводящие к запуску экспрессии генов (Cheatham and Kahn, 1995). После связывания субстрата инсулинового рецептора с фосфорилированным по тирозину цитоплазматическим доменом инсулинового рецептора, происходит активация IRS путем его фосфорилирования (Yenush et al., 1996). Он передает сигнал последующим молекулам каскада инсулинового рецептора, которые связываются с ним благодаря наличию SH2-домена. К двум таким важным белкам относятся Grb2 (Growth factor receptor-bound protein, адаптерный белок) и PI3K (фосфатидилинозитол-3-ОН-киназа (Blenis, 1993; Shepherd et al., 1998)). Каждая из этих молекул способна инициировать специфичные молекулярные каскады: MAP киназный каскад и PI3K/ПКВ сигнальный путь.

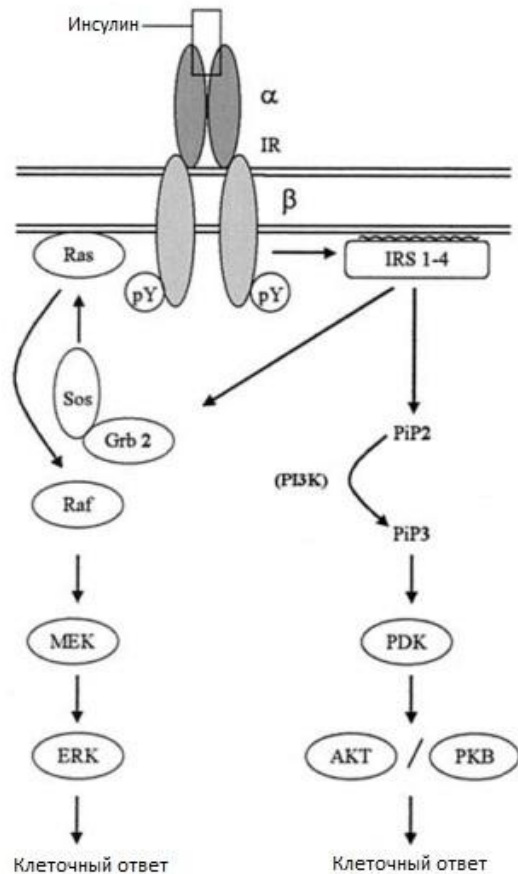


Рис 2. Схема инсулинового сигналинга у млекопитающих.

Ilse Claeys et al., 2001

Активация Grb2 приводит к формированию активного комплекса IRS-Grb2-Sos. Данный комплекс обеспечивает работу белка Ras. Последний, в свою очередь, приводит к активации киназ MEK/ERK через активацию белка Raf. PI3K связывается с фосфорилированными ключевыми сайтами IRS. Данный комплекс направляется на микродомены плазматической мембраны и под его действием образуется фосфатидилинозитол- (3,4,5) -трифосфат (PIP3). Он, в свою очередь, необходим для работы фосфоинозитид-зависимых белковых киназ (PDK1 и PDK2), опосредующих работу Akt 2 (PKB) и PKC за счет фосфорилирования (Shepherd et al., 1998). Данные киназы способны фосфорилировать последующие эффекторы, приводящие к изменению транскрипции генов.

Ортологи молекул инсулинового сигнального пути млекопитающих найдены и у беспозвоночных.

Для губки *Geodia cydonium* было показано наличие рецептора, лигандом для которого служит инсулиноподобное вещество, а также гомологов инсулинового каскада (Robitzki et al., 1989). Подобные инсулиноподобные рецепторы были также найдены и у других представителей губок: *Suberites domuncula*, *Aphrocallistes vastus* и *Sycon raphanus*. Обнаружение в различных классах губок пептидов, подобных белкам инсулинового сигналинга у высших позвоночных, указывает на способность представителей группы *Porifera* адекватно реагировать на инсулин и инсулиноподобные пептиды с помощью

комплексной внутриклеточной сигнальной реакции (Skorokhod et al., 1999). Анализ данных белков у губки *Geodia cydonium* указывает на относительную консервативность инсулинового рецептора и компонентов его каскада. Этому свидетельствуют данные о сходстве аминокислотных последовательностей инсулиноподобных рецепторов беспозвоночных с инсулиновым рецептором человека. Например, такие группы как Porifera и млекопитающие очень далеки в эволюционном плане, однако анализ аминокислотной последовательности тирозинкиназного домена инсулиноподобного рецептора губки *Geodia cydonium* показал, что он на 38,4% идентичен IR человека и на 35,7% схож с IGF-1 (Pertseva and Shpakov, 2008).

Среди нематод инсулиновый каскад хорошо изучен у *Caenorhabditis elegans*. Данный сигнальный путь участвует в регуляции метаболизма, развития и продолжительности жизни. Показано влияние рецептора DAF-2 не только на формирование Дауэровской личинки, но, что интересно, и на продолжительность жизни. Генетический анализ мутантов *daf-2*, не зависящий от регуляции феромонов, показал, что параллельные генетические пути регулируют различные аспекты метаморфоза дауэра (Gottlieb and Ruvkun, 1994; Thomas et al., 1993; Vowels and Thomas, 1992). Путь, который активирует *daf-2*, контролирует как репродуктивное развитие, так и нормальное старение: мутантные животные по гену *daf-2* останавливаются на стадии дауэровской личинки и демонстрируют заметное увеличение продолжительности жизни (Dorman et al., 1995; Kenyon et al., 1993; Larsen et al., 1995).

Инсулиноподобный рецептор DAF-2 активирует фосфатидилинозитол-3-ОН-киназу AGE-1, для которой у рецептора имеются сайты связывания, благодаря чему нет необходимости в наличии IRS. Белок AGE-1 опосредует передачу сигнала протеинкиназам АКТ-1 и АКТ-2. Посредством этого каскада блокируется действие транскрипционного фактора DAF-16, обеспечивающего формирование Дауэровской личинки, которые отличаются тем, что устойчивы к стрессу, метаболически неактивны и отличаются большой продолжительностью жизни, а также обычно образуются в ответ на недостаток пищи или при повышенной плотности популяции. Когда компоненты пути DAF-2 – инсулинового рецептора - мутируют, образование Дауэр личинок увеличивается даже в присутствии пищи. У мутантов, достигших зрелости, значительно увеличивается продолжительность жизни взрослых особей, возможно, потому что у них есть некоторые дауэр-подобные характеристики (Guarente and Kenyon, 2000). И наоборот, когда отрицательные регуляторы пути мутируют, у таких особей уменьшается способность образовывать дауэровские личинки, даже в условиях недостатка пищи или при высокой плотности популяции.

Прогнозируемый белок DAF-2 на 35% идентичен рецептору человеческого инсулина, 34% идентичен рецептору человеческого инсулиноподобного фактора роста-I (IGF-I) и на

33% идентичен рецептору, связанному с рецептором человеческого инсулина (Ebina et al., 1985; Shier and Watt, 1989; Ullrich et al., 1985)).

У *Drosophila melanogaster* имеются следующие гомологи компонентов инсулинового каскада: IR (DIR), IRS (CHICO), Grb2 (Drk), MEK (DSORT), ERK (ERK-A), PDK, Sos, PI3K (Dp110), Akt/PKB. Однако между рецепторами инсулина DIR и IR млекопитающих существуют структурные различия, которые приводят к некоторой разнице между сигнальными путями запускаемыми ими. DIR-хвост имеет сходство с областью в IRS1, которая необходима для индуцированного инсулином синтеза ДНК, а также имеет сайты фосфорилирования, необходимых для стыковки с белками, обладающих SH2-доменами, такими как PI3K. Предполагается, что DIR может опосредовать сигнал инсулина двумя различными способами: с помощью стыковочных сайтов С-концевого хвоста DIR или используя стыковочные сайты CHICO, гомолога субстрата инсулинового рецептора (Yenush et al., 1996).

Для *Drosophila* была показана экспрессия инсулинового рецептора в эмбриональном развитии, что позволяет предполагать о его участии в эмбриогенезе. Стимулируемая инсулином тирозинкиназная активность в первую очередь детектируется на мембране эмбриона на стадии 6-12 часов развития, во-вторых, она высока на стадии 12-18 часов (Petruzzelli et al., 1985). Наблюдается экспрессия двух типов транскриптов мРНК гомолога инсулинового рецептора: наличие первого обнаружено в неоплодотворенных яйцах и на стадии 2-3 часов развития эмбриона, а экспрессия второго достигает пика на 8-12 часах эмбриогенеза. На второй стадии наблюдается основное развитие нервной системы эмбриона. Таким образом, возможно участие инсулинового сигнального пути в развитии нервной системы. Уже на ранних стадиях эмбриогенеза у дрозофилы обнаруживаются клетки, отвечающие на инсулин, а стадии гаструлы инсулин необходим для выживания клеток и для дифференцировки (Seecof and Dewhurst, 1974). У личинки наблюдается экспрессия в имагинальных дисках, а также в участках развития нервной системы. В растущих, но не делящихся клетках экспрессии не было обнаружено. Имагинальные диски реорганизуются во время метаморфоза, формируя эпидермис взрослого организма. Когда активность инсулинового сигналинга понижена, уменьшается и рост имагинальных дисков, их размер, а также размер взрослой особи. Подробный анализ показал, что эти эффекты вызваны уменьшением размера и количества клеток. Наоборот, когда экспрессия инсулина повышена, рост и размер клеток увеличиваются (Coelho and Leever, 2000; Stocker and Hafen, 2000; Weinkove and Leever, 2000).

У взрослой особи обнаружена экспрессия инсулиноподобного рецептора в яичниках (Garofalo and Rosen, 1988). Синтез мРНК инсулиноподобного рецептора

наблюдается в клетках няньках, а также в зрелых ооцитах, тогда как в фолликулярных клетках он отсутствует. Эта картина указывает на то, что мРНК рецептора инсулина передается по материнской линии, что согласуется с ролью этого рецептора на ранних этапах развития.

Brogiolo et al. (Brogiolo et al.) Создали трансгенную дрозофилу, у которой инсулиновый рецептор *DInr* сверхэкспрессируется в пролиферирующих клетках развивающегося глаза. Они обнаружили, что это приводит не только к возникновению повышенного количества клеток в глазу дрозофилы, но и к увеличению их размера. Данное наблюдение важно, так как это подразумевает, что инсулиновый сигнальный путь может разветвляться на уровне рецептора, причем сигнал, стимулирующий рост, идет через путь PI3-киназы (Brogiolo et al.). Наблюдение, что MAP киназа активируется в области головы дрозофилы с гиперэкспрессией *DInr*, предполагает, что путь Ras / MAP киназы может передавать этот второй сигнал. Следует, однако, отметить, что чрезмерная экспрессия *DInr* больше влияет на увеличение роста, чем на пролиферацию клеток.

Ген, кодирующий тирозин-киназный рецептор, родственный инсулиновому рецептору позвоночных, был идентифицирован у *Hydra vulgaris* (Steele et al., 1996). Его экспрессия была показана в обоих эпителиальных слоях взрослого полипа. Экспрессия гена высока во всех образующихся почках, но по мере удлинения растущего полипа смещается в область вершины растущего полипа. Когда почка начинает формирование гипостомы и щупалец, повышается уровень экспрессии гена в основаниях щупалец и, наконец, чуть выше основания почки. Обработка полипов *Hydra* инсулином млекопитающих привела к увеличению числа эктодермальных и эндодермальных клеток, подвергающихся синтезу ДНК. Эти данные позволяют предполагать, что каскад инсулинового рецептора у представителей гидроидных играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации. Таким образом, среди представителей такого крупного таксона как Cnidaria инсулиновый молекулярный каскад изучен только у Hydrozoa, тогда как у групп Anthozoa и Scyphozoa он остается практически не изучен.

Материалы и методы

Материалом для данного исследования послужила лабораторная линия *Aurelia aurita*, «Роскофф», выделенная из морского аквариума французской бистанции Роскофф. Данная культура поддерживается на стадии сцифистомы при температуре +18°C в пластиковых контейнерах, заполненных искусственной морской водой. Кормление животных производилось раз в 2-3 дня, после чего через сутки или двое производили смену воды. В качестве корма были использованы науплиусы *Artemia salina*.

Процесс стробилиации вызывали искусственно с помощью 5µM раствора 5-метокси-2-метил индола на морской воде (Fuchs et al, 2014). Сцифистом помещали в чашку Петри с раствором индуктора и инкубировали в течение 1 суток, после чего производилась смена раствора индуктора. Спустя 2-3 дня наблюдались первые признаки стробилиационного процесса. Для дальнейших манипуляций нами были выбраны следующие стадии жизненного цикла: полип, ранняя стробила, поздняя стробила и эфира. Фиксация производилась в 4% растворе параформальдегида на морской воде (ПФА) в течение 3 часов при комнатной температуре, либо в течение 12 часов при температуре +4°C. Перед фиксацией животных помещали в чашки Петри и постепенно добавляли 7% раствор MgCl₂ для расслабления их мускулатуры. Процесс расслабления занимал, в среднем 20-30 минут. О достаточной степени расслабления судили по отсутствию сокращений в ответ на механическое раздражение. После фиксации производили смену фиксатора на метанол и хранили образцы при -80°C до востребования.

Поиск интересующих последовательностей осуществлялся с использованием баз данных. В качестве основы для поиска использовали последовательности интересующих нас генов в базе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Выбранные для работы гены использовали для поиска гомологичных последовательностей в транскриптомной базе роскоффской линии *Aurelia aurita*, размещенной на сайте Compagen (<http://www.compagen.org/aurelia>). Поиск проводили с помощью встроенного инструмента BLAST (tblastx). У найденных таким образом в базе Compagen последовательностей были определены открытые рамки считывания с использованием инструмента Translate tool, расположенного на портале ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Определенные с его помощью аминокислотные последовательности были использованы для проверки на принадлежность к интересующим семействам с помощью инструмента BLAST базы NCBI.

Подбор праймеров к выбранным последовательностям осуществляли вручную с последующей проверкой с помощью олигокалькулятора, расположенного на сайте

(<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Последовательности специфичных праймеров приведены в приложении .

Прежде чем приступить к дальнейшим этапам работы по поиску наличия экспрессии найденных генов, необходимо было получить кДНК матрицу. Для этого из имеющихся стадий жизненного цикла *Aurelia aurita* была выделена тотальная РНК с использованием набора для выделения Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research, R1054 & R1055) в соответствии с протоколом производителя.

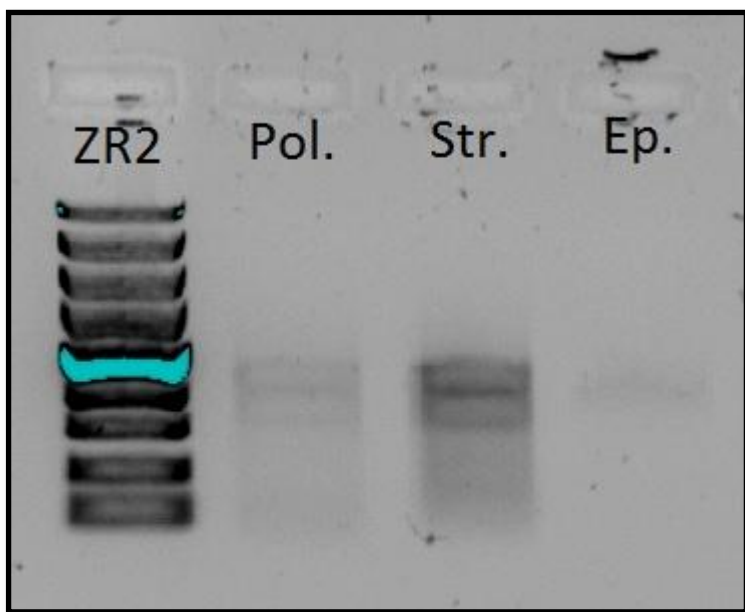


Рис 3. Выделенная РНК матрица со стадий полипа, эфиры и стробилы. Zr2 – маркер. Pol., Ep., Str. – полип, эфира, стробила соответственно

Выделенные образцы тотальной РНК были использованы для синтеза двуцепочечной кДНК с помощью набора Mint (Евроген, SK001). Синтез кДНК проводился согласно протоколу производителя.

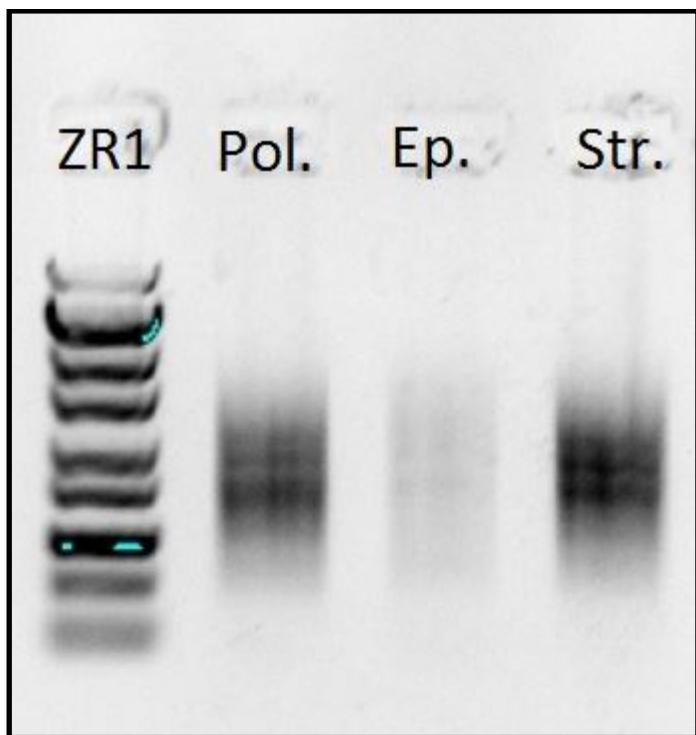


Рис 4. Двухцепочечная кДНК матрица со стадий полипа, эфиры и стробилы. Zr1 – маркер. Pol., Ep., Str. – полип, эфира, стробила соответственно.

Полученная двухцепочечная кДНК была использована в качестве матрицы для амплификации фрагментов выбранных генов с помощью специфичных праймеров. Очищенные фрагменты ДНК лигировали с использованием векторной системы Qiagen pDrive cloning kit (ID: 231122). Полученные конструкции использовали для трансформации *Escherichia coli* штамма JM109, для чего был использован набор InsT/Aclone (Fermentas, K1214). Для отбора успешно трансформированных бактериальных колоний проводили белоголубую селекцию на среде, содержащей X-Gal. Проверку колоний на встройку фрагмента проводили методом ПЦР с использованием стандартных праймеров M13, либо с использованием специфичных к искомой последовательности праймеров. Отобранные клоны были выращивали в суспензионной культуре на среде LB с ампициллином и использовали для выделения плазмидной ДНК с помощью набора Zymo Research ZRPlazmid MiniPrep Classic (<http://www.zymoresearch.com/>, Catalog Code: D4015). Вся работа с бактериальными культурами была осуществлена на базе ресурсного центра «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

Выделенная плазмидная ДНК была использована в качестве матрицы для амплификации встроенных ПЦР-фрагментов с праймерами M13. Полученные фрагменты были секвенированы в Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного Парка СПбГУ. Секвенирование осуществлялось для проверки ПЦР-фрагмента на соответствие искомой последовательности, а также определения направления встраивания. Дополнительно для определения направления встраивания проводили аналитическую ПЦР с прямыми специфичными праймерами и праймерами к сайтам распознавания РНК-

полимеразами T7 или Sp6 в качестве обратных праймеров. Проверка направления встройки была необходима для выбора полимеразы, используемой для синтеза зондов.

Синтез зондов осуществлялся в несколько этапов. Предварительно с плазмид были амплифицированы изучаемые фрагменты с использованием праймеров M13. Далее проводили препаративный гель-электрофорез в 1% агарозном геле и очищали фрагменты при помощи набора Cleanup Mini производителя Евrogen (Кат.# BC023). Полученную концентрированную ДНК использовали в качестве матрицы для синтеза РНК-зондов, меченых дигоксигенином. Синтез проводили с использованием РНК-полимераз T7 или Sp6 (Roche), в зависимости от направления встройки фрагмента. После синтеза зонды обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКаз (Roche). Качество полученных зондов проверяли с помощью неденатурирующего гель-электрофореза, после чего они были разведены водой, не содержащей нуклеаз в соотношении 1:50. Зонды хранили при температуре -20°C.

Визуализация экспрессии изучаемых генов была осуществлена методом РНК-гибридизации *in situ*. Нами был использован протокол, адаптированный для *Aurelia aurita* (см. приложение). Каждый эксперимент проводили с обязательной постановкой контрольных опытов. В качестве положительного контроля использовали зонды к FMRF-амиду. В случае отрицательного контроля проводили гибридизацию без добавления зонда.

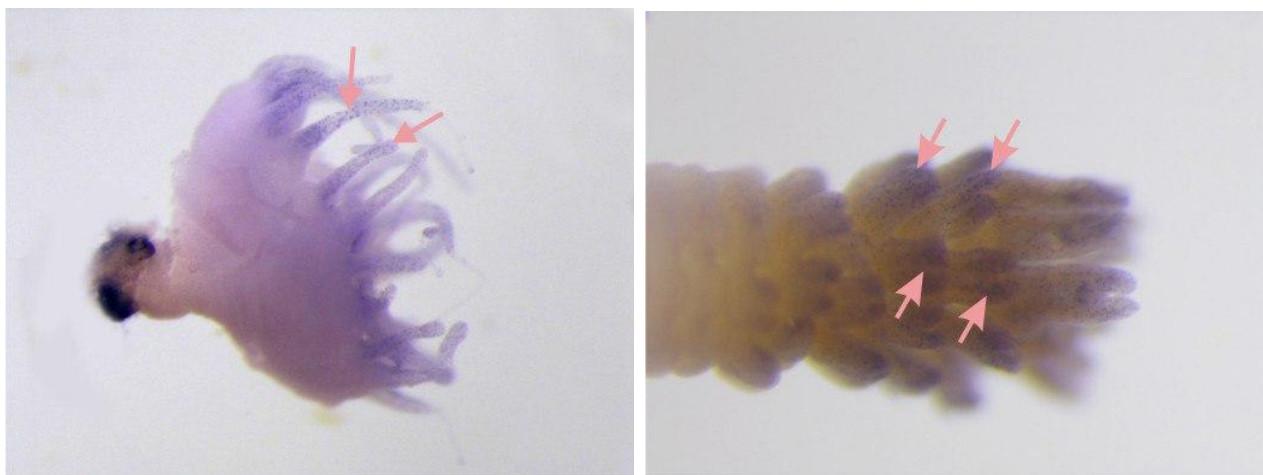


Рис 5. Гибридизация *in situ*. Положительный контроль FMRF-амид. Слева – сцифистома, справа – стробила. Стрелками указаны зоны экспрессии гена.

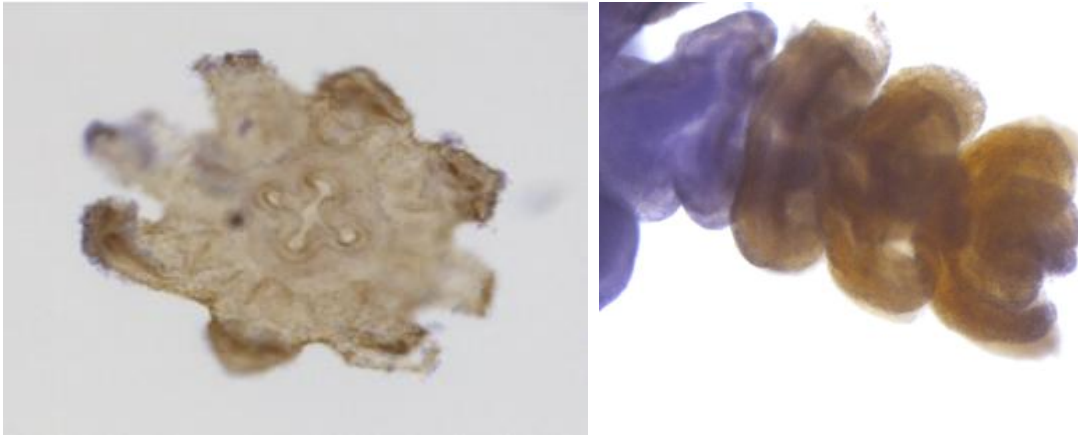


Рис 6. Гибридизация *in situ*. Отрицательный контроль. Слева – эфира, справа – стробила.

Результаты

1. Результаты поиска генов инсулинового каскада в транскриптомной базе

В результате поиска по транскриптомной базе Comragen было выявлено 5 генов, относящихся к различным белкам каскада инсулинового рецептора:

Ген инсулиноподобного рецептора НТК7

Для поиска данной последовательности был выбран ген НТК7 *Hydra vulgaris* длиной 4954 пар нуклеотидов (Steele et al., 1996). Найденная в транскриптомной базе имеет длину 414 пар нуклеотидов. В результате анализа доменной структуры был обнаружен каталитический домен протеин-тирозинкиназы. Результаты реципрокного поиска обнаруженной последовательности в базе GeneBank NCBI показывают высокое сходство данного гена с тирозин-протеинкиназами

Ген субстрата инсулинового рецептора IRS

Данная последовательность была найдена в открытой транскриптомной базе Comragen. Её длина составила 408 пар нуклеотидов. Анализ доменной структуры выявил наличие фосфотирозинсвязывающего домена, характерного для IRS-1 типа. Результаты поиска гомологичных генов в GenBank NCBI показали высокое сходство этого белка с IRS *Hydra vulgaris* а также с docking белками разных представителей Metazoa.

Ген фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3 киназы (аналог AGE1)

В ходе поиска гена фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3 киназы была выявлена последовательность длиной 600 пар нуклеотидов аналогичная гену *Caenorhabditis elegans* AGE1. Результаты анализа доменной структуры показывают наличие в данной последовательности протеинкиназного каталитического домена. Сравнение данного фрагмента с генами базы GenBank NCBI показал, что найденная последовательность на 72% аналогична фосфатидилинозитол-4-протеинкиназе таких представителей Cnidaria как *Orbicella faveolata*, *Stylophora pistillata*, *Exaiptasia pallida*.

Ген 3-фосфоинозитидзависимой протеинкиназы (PDK)

В результате поиска в транскриптомной базе 3-фосфоинозитидзависимой протеинкиназы была найдена последовательность, имеющая длину 600 пар нуклеотидов. Согласно результатам поиска аналогичных генов в GenBank NCBI данная последовательность на 60% схожа с 3-фосфоинозитидзависимой киназой других Cnidaria

(*Stylophora pistillata*, *Exaiptasia pallida*), а также разных представителей Metazoa. Найденный аналог PDK содержит гомологичный плекстрину домен, связывающий фосфоинозитиды.

Ген митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК)

В транскриптомной базе была обнаружена последовательность, соответствующая гену митогенактивируемой киназы *Aurelia aurita*, имеющемуся в транскриптомной базе Transcriptome Shough Assembly, на 99% и на 70% с прочими представителям Metazoa. Также показано наличие в найденном гене домена p38 митогениктивируемой протеинкиназы.

2. Филогенетический анализ найденных последовательностей

Обнаруженные последовательности были использованы для проведения анализа сходства найденных генов с аналогичными генами других Metazoa, в том числе и Cnidaria. На основе выравнивания с гомологичными последовательностями других видов были построены филогенетические деревья, позволяющие визуализировать кластеризацию изучаемых генов.

Ген инсулиноподобного рецептора НТК7

На данном дереве представлены результаты выравнивания последовательностей, принадлежащих к двум группам тирозинкиназных рецепторов: инсулиноподобные рецепторы и Tie-1-like рецепторы. Найденная последовательность являлась предполагаемым аналогом инсулиноподобного рецептора НТК7, однако кластеризуется тирозинкиназными рецепторами с иммуноглобулинподобным и EGF-подобным доменами.

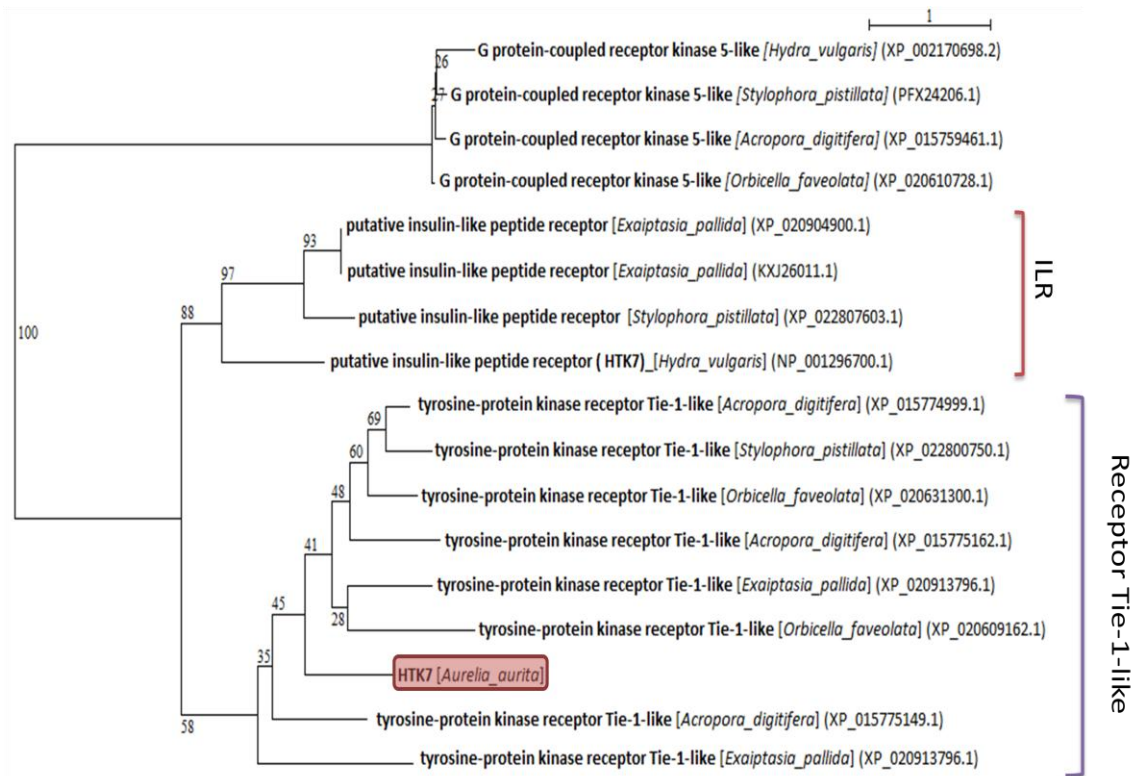


Рис 7. Филогенетическое дерево для генов семейства тирозинкиназных рецепторов.

ILR (insulin-like receptor) – инсулиноподобные рецепторы. Receptor Tie-1-like – тирозинкиназный рецептор с иммуноглобулинподобным и EGF-подобным доменами. Красной рамкой выделена последовательность НТК7 из транскриптомной база *Aurelia aurita*. Дерево построено с помощью метода maximum likelihood, bootstrap = 100

Ген субстрата инсулинового рецептора IRS

По данным выравнивания предполагаемого гена субстрата инсулинового рецептора *Aurelia aurita* с аналогичными генами представителей других Metazoa, было построено филогенетическое дерево. На нем видно, что найденный в транскриптомной базе *Aurelia aurita* фрагмент хорошо кластеризуется с генами семейства субстрата инсулинового рецептора.

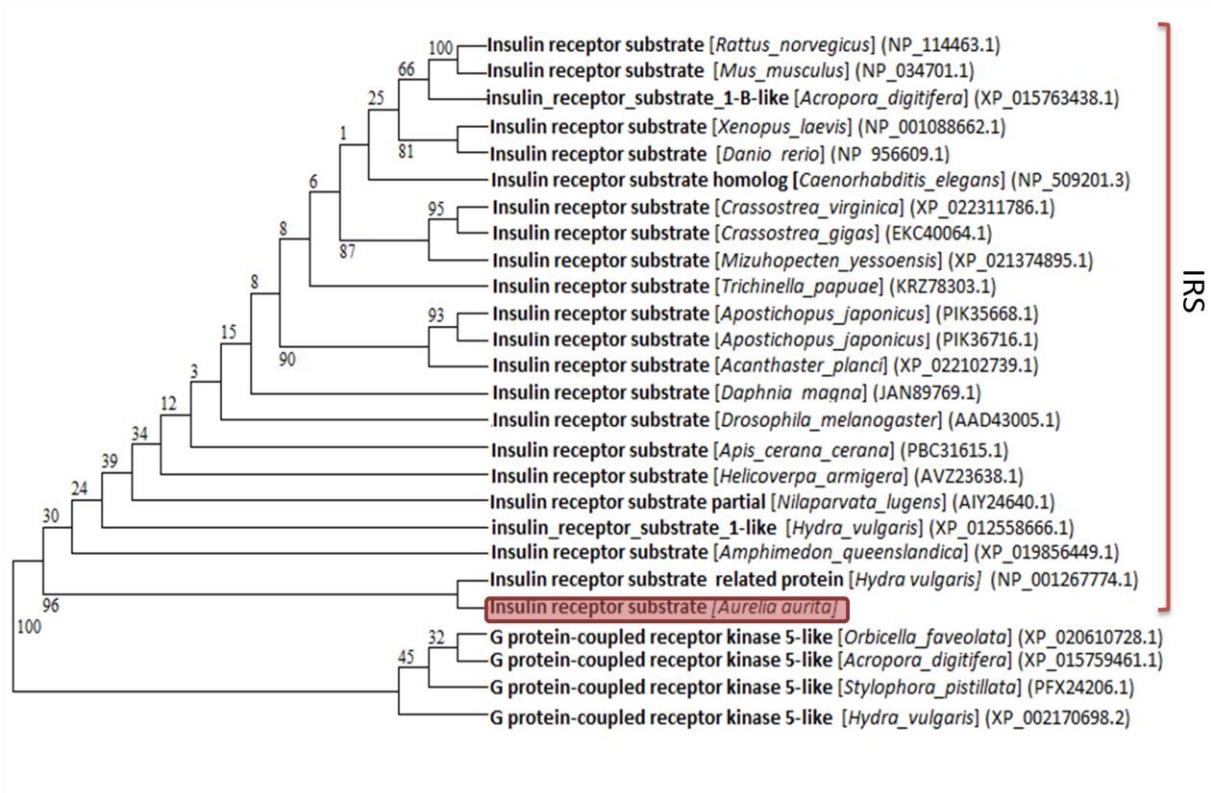


Рис 8. Филогенетическое дерево для генов семейства генов субстрата инсулинового рецептора. IRS (insulin receptor substrate) – субстрат инсулинового рецептора. Красной рамкой выделена последовательность из транскриптомной базы. Дерево построено с помощью метода maximum likelihood, bootstrap = 100

Ген фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3 киназы (аналог AGE1)

Для найденного в транскриптомной базе Comragen аналога AGE1 было построено филогенетическое дерево, на котором видно, что найденный фрагмент кластеризуется не с фосфотидилинозитол-3-киназами, а с генами группы фосфатидилинозитол-4-киназ.

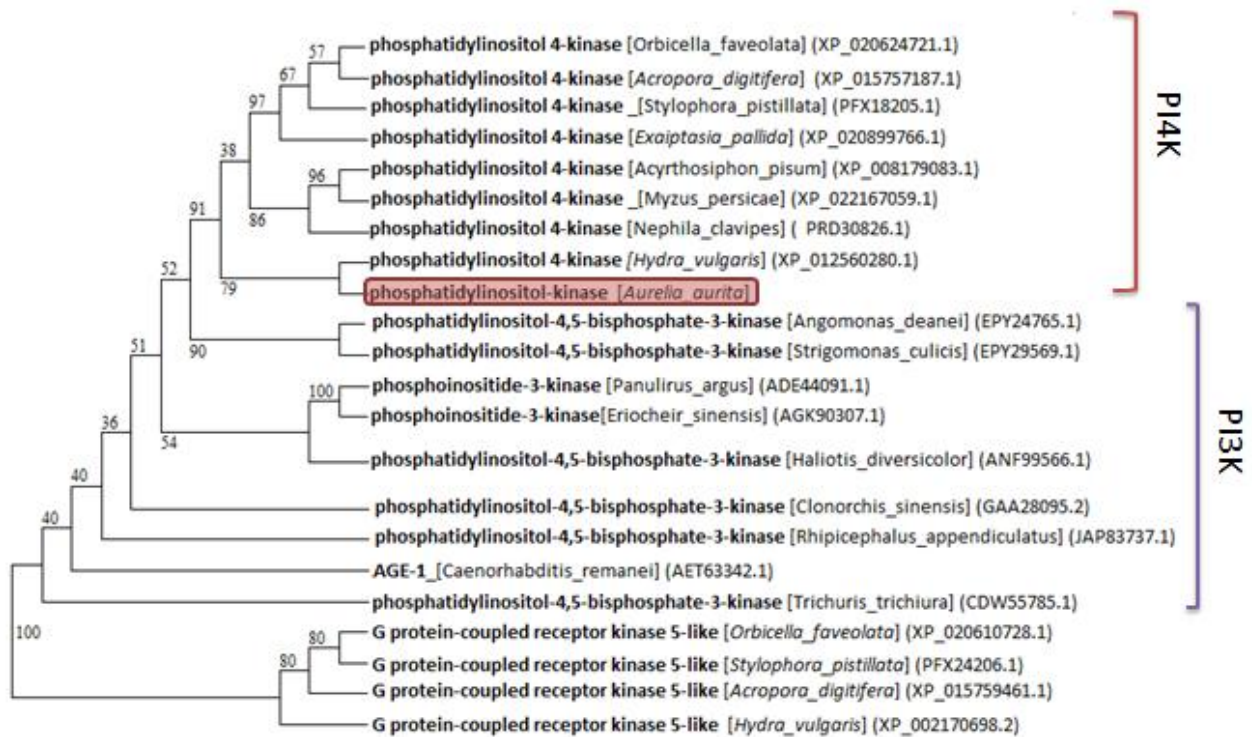


Рис 10. Филогенетическое дерево для генов семейства фосфатидилинозитол-киназ. PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа. PI4K - фосфатидилинозитол-4-киназа. Красной рамкой выделена последовательность из транскриптомной базы. Дерево построено с помощью метода maximum likelihood, bootstrap = 100

Ген 3-фосфоинозитидзависимой протеинкиназы (PDK)

Для гена, предполагаемого на роль 3-фосфатидилионзитолзависимой протеинкиназы было построено филогенетическое дерево, на котором показана принадлежность найденной последовательности к данному семейству.

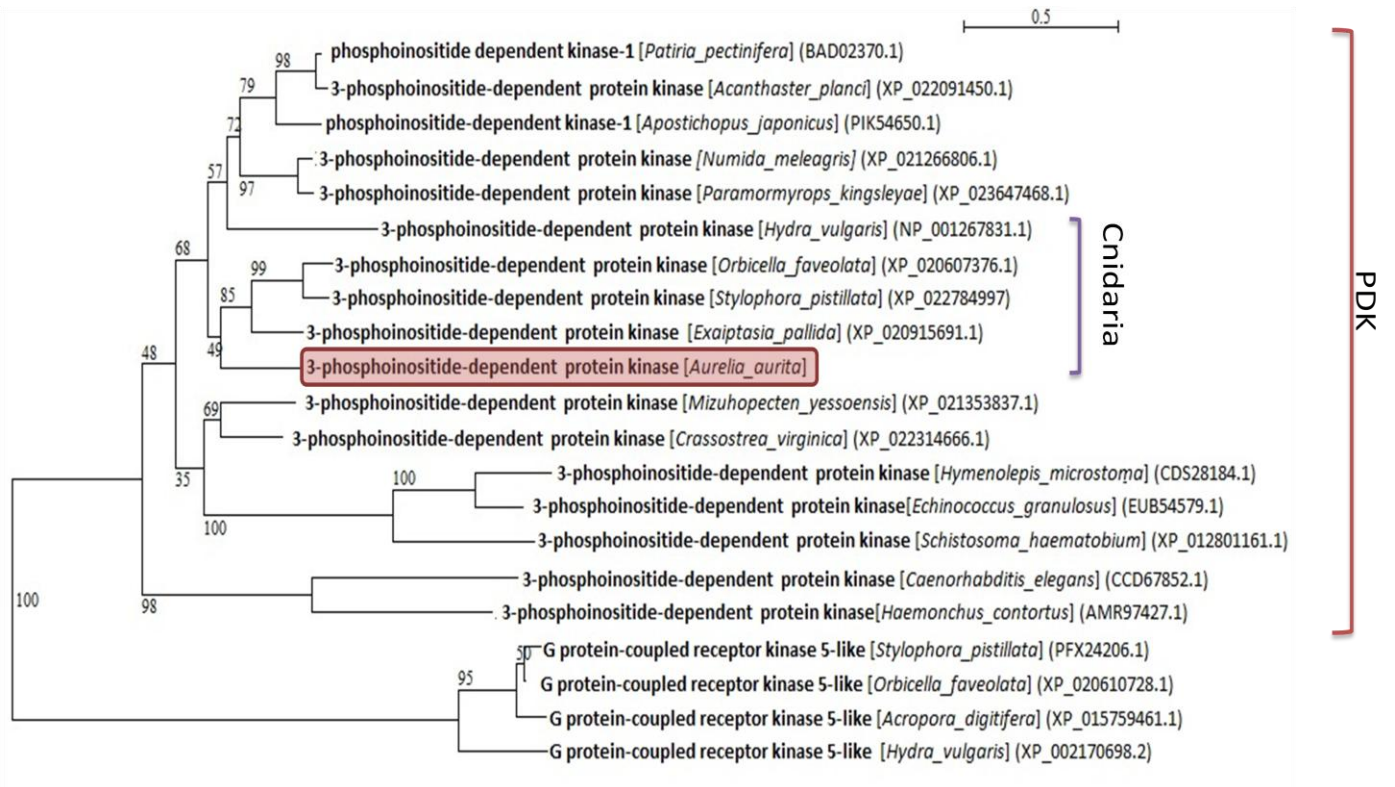


Рис 11. Филогенетическое дерево для генов семейства 3-фосфоинозитидзависимой протеинкиназы. PDK. Красной рамкой выделена последовательность из транскриптомной базы. Дерево построено с помощью метода maximum likelihood, bootstrap = 100

Ген митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК)

Найденная в транскриптомной базе *Aurelia aurita* была выравнена с последовательностями МАРК других представителей Metazoa. Результаты построения филогенетического дерева подтверждают принадлежность найденного фрагмента к данному семейству генов.

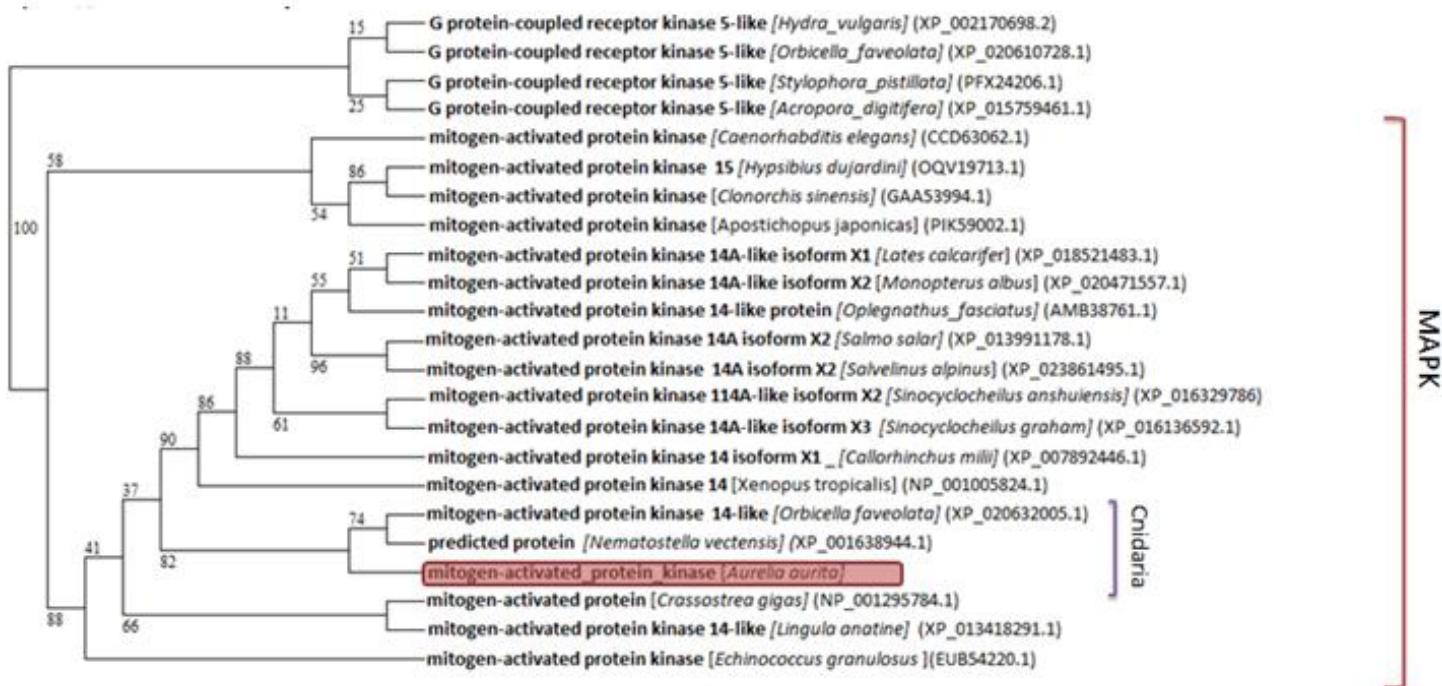


Рис 12. Филогенетическое дерево для генов семейства митогенактивируемых протеинкиназ. МАРК (mitogen-activated protein kinase) – митогенактивируемая протеинкиназа. Красной рамкой выделена последовательность из транскриптомной базы. Дерево построено с помощью метода maximum likelihood, bootstrap = 100

3. Верификация экспрессии изучаемых генов

Все обнаруженные последовательности были амплифицированы со специфичными праймерами и кДНК, полученной в результате ОТ-ПЦР каждой из выбранных стадий жизненного цикла *Aurelia aurita* в качестве матрицы. Результаты гель-электрофореза после ПЦР показали соответствие длин полученных фрагментов с расчетными значениями. Установлено, что экспрессия всех изученных последовательностей обнаруживается на всех исследованных стадиях жизненного цикла.

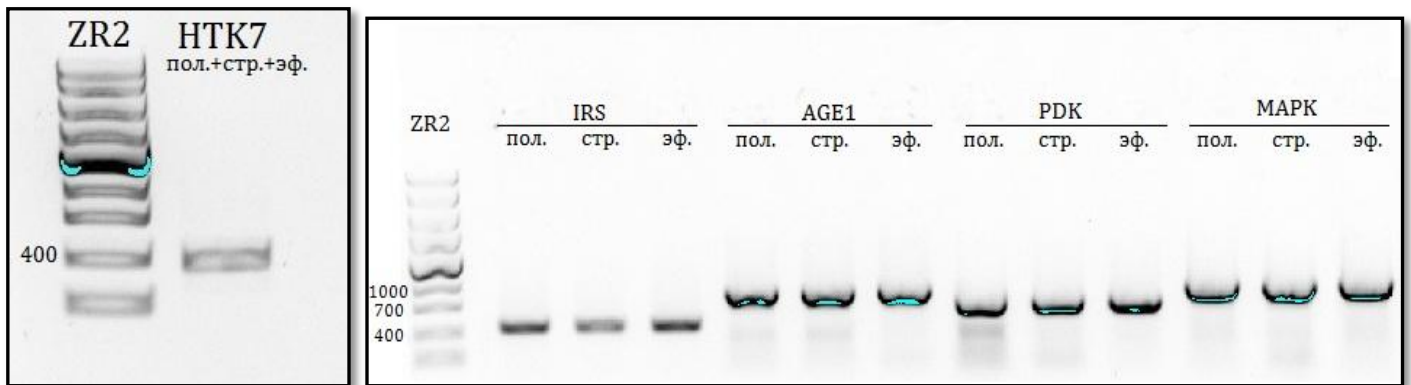


Рисунок 13. Результат гель-электрофореза продуктов амплификации генов **HTK7, IRS, AGE1, PDK** и **MAPK** с кДНК отдельных стадий жизненного цикла *Aurelia aurita*. ZR2 – маркер ZipRuler 2. Пол., стр., эф., - кДНК матрица со стадий полипа, стробилы и эфиры соответственно.

4. Молекулярное клонирование и РНК-гибридизация *in situ*

Выбранные последовательности были встроены в вектор Qiagen Pdrive и клонированы. В результате были получены плазмиды со встроенными в них фрагментами генов В результате определения направления встраивания ПЦР-фрагментов было установлено, что **HTK7** встроен в прямой последовательности, а гены **IRS, AGE1, PDK** и **MAPK** – в обратной (рисунок можно убрать, это техническая часть, которая особенно тут не нужна). Результаты синтеза зондов представлены на рисунке.

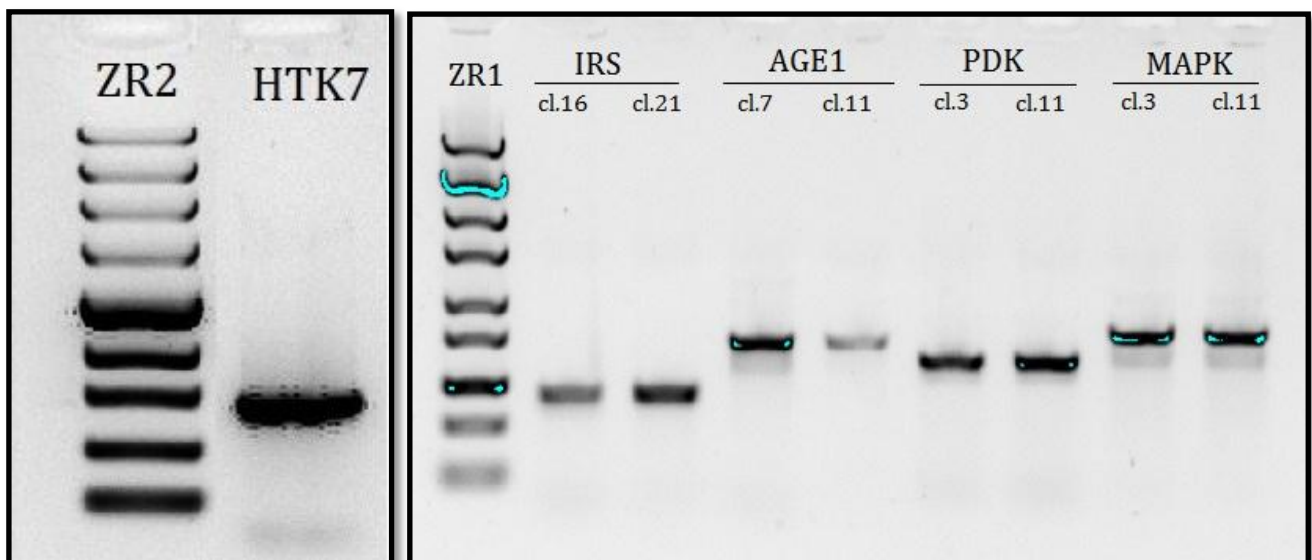


Рисунок 14. Амплификация изучаемых генов для проверки направления встраивания. Все фрагменты соответствуют ожидаемой длине. Слева – ген **HTK7**, амплифицированный с прямым праймером и праймером Sp6, справа – гены, амплифицированные с праймером T7 и прямыми праймерами.

Выбранные последовательности были встроены в вектор Qiagen Pdrive и клонированы. В результате были получены плазмиды со встроенными в них фрагментами

генов В результате определения направления встраивания ПЦР-фрагментов было установлено, что НТК7 встроен в прямой последовательности, а гены IRS, AGE1, PDK и MAPK – в обратной (рисунок можно убрать, это техническая часть, которая особенно тут не нужна). Результаты синтеза зондов представлены на рисунке.

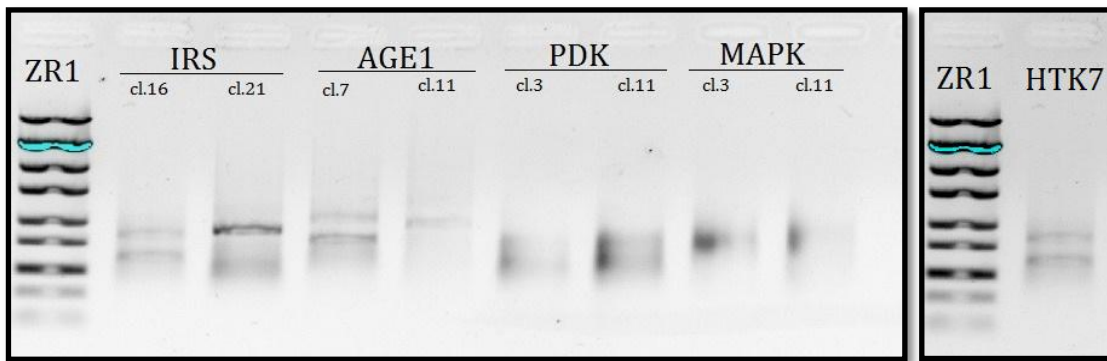


Рис 15. Зонды, синтеризованные к изучаемым генам для проведения РНК *in situ* гибридизации.

С помощью РНК гибридизации *in situ* была визуализирована экспрессия гена НТК7. Экспрессия гена НТК7 на стадии стробилы наблюдается в эпидермальных клетках. Характер экспрессии не позволяет выделить отдельные паттерны, однако он отличается от картины, видимой при неспецифическом связывании зонда. На стадии эфиры экспрессия также видна в эпителиальных клетках. Отдельных зон экспрессии не наблюдается.

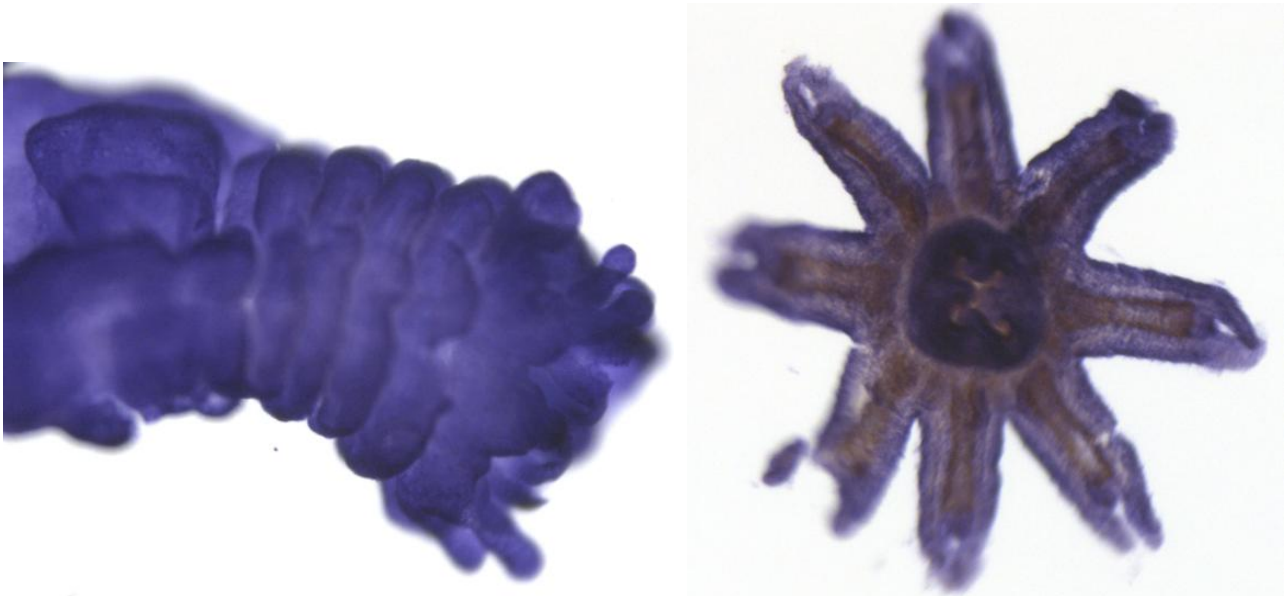


Рис 16. Гибридизация *in situ*. Экспрессия гена НТК7. Слева – стробила, справа – эфира.

Обсуждение результатов

В результате поиска по транскриптомной базе Comragen было выявлено 5 последовательностей, предположительно являющихся генами, участвующими в инсулиновом сигналинге. Сравнение найденных последовательностей с гомологичными генами Cnidaria и других многоклеточных животных показало, что три из пяти последовательностей хорошо кластеризуются с генами предполагаемых семейств. К ним относятся гены субстрата инсулинового рецептора, фосфоинозитидзависимой протеинкиназы и митогенактивируемой протеинкиназы.

Подробный анализ предполагаемых последовательностей инсулиноподобного рецептора и фосфотидитинозитол-3-киназы выявил, что данные последовательности таковыми не являются. Данные несовпадения могут быть вызваны рядом причин. Последовательности, обнаруженные в открытой базе Comragen имеют относительно небольшие длины. Вероятнее всего, найденные последовательности могут являться не целыми транскриптами, а лишь их фрагментами. Последовательность, выявленная при сравнении с геном НТК7 *Hydra vulgaris* имеет длину около 400 пар нуклеотидов, в то время как длина референсного гена составляет более 4000 пар нуклеотидов. Результаты филогенетического анализа показали, что найденный фрагмент кластеризуется не с инсулиноподобными рецепторами других кишечнополостных, а с тирозинкиназами рецепторами с иммуноглобулинподобным и EGF-подобным доменами. Можно предположить, что выявленная последовательность является частью гена, принадлежащего к семейству тирозинкиназных рецепторов, и содержит характерный для них домен. По всей видимости, длина фрагмента недостаточна для проведения полноценного анализа.

Найденный при сравнении с фосфотидилинозитол-3-киназами в транскриптомной базе фрагмент по данным филогенетического анализа относится к фосфотидилинозитол-4-киназному семейству. Это также может быть объяснено относительно короткой длиной фрагмента, наличием общих для всех тирозинкиназ доменов, а также низкими поддержками при построении дерева.

В качестве альтернативной гипотезы можно предположить, что гены инсулиноподобного рецептора и фосфотидилинозитол-3-киназы *Aurelia aurita* не представлены в транскриптомной базе в силу ее неполноты. Транскриптомные, представленные в базе были получены с использованием устаревшей платформы Roche 454 и, по всей видимости, содержат не полный набор транскриптов. Вероятно, более полное секвенирование транскриптомов различных стадий жизненного цикла *A. aurita* позволит обнаружить искомые последовательности.

Результаты амплификации со специфичными праймерами на матрицах, полученных со стадий полпа, стробилы и эфиры свидетельствуют о наличии экспрессии на всех трех стадиях. Принимая во внимание количество и важность функций, обеспечиваемых каскадом инсулинового рецептора, можно предполагать, что данные о наличии постоянной экспрессии его компонентов во время стробилиации являются достоверными.

Методом РНК *in situ* гибридизации была выявлена экспрессия гена НТК7 в эпидермальных клетках стробилы и эфиры. При этом не удается выделить отдельных доменов экспрессии гена НТК7 ни на одной из исследованных стадий. Полученные данные позволяют предположить, что данный ген имеет конститутивную экспрессию в эпидермальных клетках *Aurelia aurita*. Следует отметить, что характер экспрессии найденной последовательности отличается от гена НТК7 *Hydra vulgaris*, для которой характерна экспрессия данного рецептора в зонах пролиферации клеток (Steele et al., 1996). Вероятно, обнаруженная последовательность не гомологична гену НТК7 *H.vulgaris* и имеет иные функции. Тирозинкиназные рецепторы в основном изучены у млекопитающих, тогда как данных об экспрессии и роли Tie-1 рецептора у беспозвоночных существует относительно немного. У млекопитающих тирозинкиназные рецепторы с иммуноглобулинподобным и EGF-подобным доменами, с которыми кластеризуется обнаруженный нами фрагмент, в основном участвуют в ангиогенезе и активации молекул клеточной адгезии VCAM-1, E-селектина и ICAM-1 через MAPK-зависимый механизм (Deutsch, 1995). По всей видимости, найденная нами последовательность выполняет иные функции, а участие Tie-1 млекопитающих в ангиогенезе может быть следствием коопции, либо изменения изначальной функции гена. Так как изучаемый ген содержит консервативный для RTK домен, можно предположить, что его экспрессия видна во всех клетках, содержащих тирозинкиназные рецепторы на плазматической мембране. Учитывая их широкое разнообразие и количество выполняемых функций (Blume-Jensen and Hunter, 2001), наличие равномерного сигнала найденной последовательности не является противоречивым.

На данный момент для остальных изучаемых генов не было получено достоверных результатов РНК-гибридизации *in situ*, что может быть связано с низким уровнем их экспрессии, либо недостаточной адаптированностью использованного протокола гибридизации. Полученные результаты требуют проведения дальнейших исследований.

Исходя из полученных в ходе работы результатов, можно сделать заключение, что сцифоидные медузы имеют необходимые для инсулинового каскада гены и способны обеспечивать клеточный ответ в ответ на инсулиноподобные факторы.

Выводы

1. В транскриптоме *Aurelia aurita* обнаружены гены, участвующие в инсулиновом каскаде. К ним относятся субстрат инсулинового рецептора (IRS), фосфатидилинозитол-зависимая протеинкиназа (PDK) и митогенактивируемая протеинкиназа (МАРК).
2. Принадлежность генов НТК7 и РІЗК *A. aurita* к семействам инсулиноподобного рецептора и фосфатидилинозитол-3-киназам не была подтверждена.
3. Показано наличие экспрессии изучаемых генов в процессе стробилиляции сцифоидной медузы *Aurelia aurita*.

Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам Ресурсного центра развития молекулярных и клеточных технологий СПбГУ и сотрудникам Ресурсного центра культивирования микроорганизмов СПбГУ, Старунову В.В., Хабибулиной В.Р., Зориной Н.А., Зайнуллиной Б.Р., Кремневу Г.А за помощь в работе, Константину Халтурину за предоставление доступа в геномной информации,

Список литературы

- Blenis, J. (1993). Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5889–5892.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. 213–221.
- Chan, S.J., Oliva, A.A.J., LaMendola, J., Grens, A., Bode, H., and Steiner, D.F. (1992). Conservation of the prohormone convertase gene family in metazoa: analysis of cDNAs encoding a PC3-like protein from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6678–6682.
- Cheatham, B., and Kahn, C.R. (1995). *Insulin Action and the Insulin Signaling Network* . 16.
- Coelho, C.M., and Leever, S.J. (2000). Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms? *J. Cell Sci.* 113 (Pt 17), 2927–2934.
- Deutsch, U. (1995). Sato TN , Tozawa Y , Deutsch U , Wolburg-Buchholz K , Fujiwara Y , Gendron- Maguire M , Gridley T , Wolburg H , Risau W , Qin YDistinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 ...
- Dorman, J.B., Albinder, B., Shroyer, T., and Kenyon, C. (1995). The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141, 1399–1406.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Masiarz, F., Kan, Y.W., and Goldfine, I.D. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40, 747–758.
- Fantl, W.J., Johnson, D.E., and Williams, L.T. (1993a). Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 453–481.
- Fantl, W.J., Johnson, D.E., and Williams, L.T. (1993b). SIGNALLING BY RECEPTOR.
- Garofalo, R.S., and Rosen, O.M. (1988). Tissue localization of *Drosophila melanogaster* insulin receptor transcripts during development. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1638–1647.
- Gottlieb, S., and Ruvkun, G. (1994). daf-2, daf-16 and daf-23: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 137, 107–120.
- Guarente, L., and Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408, 255–262.
- Hubbard, S.R., and Miller, W.T. Receptor tyrosine kinases : mechanisms of activation and signaling.
- Hubbard, S.R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 11987–11990.
- Jiang, G., and Hunter, T. (1999). Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr. Biol.* 9, R568-71.
- Jin, S., and Steiner, D.F. (2000). Insulin Through the Ages : Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone. 40, 213–222.

- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* *366*, 461–464.
- Larsen, P.L., Albert, P.S., and Riddle, D.L. (1995). Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *139*, 1567–1583.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Review Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. 1117–1134.
- Murray-Rust, J., McLeod, A.N., Blundell, T.L., and Wood, S.P. (1992). Structure and evolution of insulins: implications for receptor binding. *Bioessays* *14*, 325–331.
- Obberghen, E. Van, and Award, M. (1994). Juxta " membrane i r960 i.
- Van Obberghen, E. (1994). Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia* *37 Suppl 2*, S125-34.
- Pertseva, M.N., and Shpakov, A.O. (2002). Conservatism of the Insulin Signaling System in Evolution of Invertebrate and Vertebrate Animals. *38*, 547–561.
- Pertseva, M.N., and Shpakov, A.O. (2008). [Procaryotic genesis and evolution of chemosignaling systems of eukaryotes]. *Russ. Fiziol. zhurnal Im. I.M. Sechenova* *94*, 1029–1047.
- Petruzzelli, L., Herrera, R., Garcia-Arenas, R., and Rosen, O.M. (1985). Acquisition of insulin-dependent protein tyrosine kinase activity during *Drosophila* embryogenesis. *J. Biol. Chem.* *260*, 16072–16075.
- Robitzki, A., Schröder, H.C., Ugarkovic, D., Pfeifer, K., Uhlenbruck, G., and Müller, W.E. (1989). Demonstration of an endocrine signaling circuit for insulin in the sponge *Geodia cydonium*. *EMBO J.* *8*, 2905–2909.
- Seecof, R.L., and Dewhurst, S. (1974). Insulin is a *Drosophila* hormone and acts to enhance the differentiation of embryonic *Drosophila* cells. *Cell Differ.* *3*, 63–70.
- Shepherd, P.R., Withers, D.J., and Siddle, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* *333 (Pt 3)*, 471–490.
- Shier, P., and Watt, V.M. (1989). Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J. Biol. Chem.* *264*, 14605–14608.
- Skorokhod, A., Gamulin, V., Gundacker, D., Kavsan, V., Muller, I.M., and Muller, W.E. (1999). Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. *Biol. Bull.* *197*, 198–206.
- Smit, A.B., van Kesteren, R.E., Li, K.W., Van Minnen, J., Spijker, S., Van Heerikhuizen, H., and Geraerts, W.P. (1998). Towards understanding the role of insulin in the brain: lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Prog. Neurobiol.* *54*, 35–54.
- Steele, R.E., Lieu, P., Mai, N.H., Shenk, M.A., and Sarras Jr., M.P. (1996). Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* *206*, 247–259.
- Stocker, H., and Hafen, E. (2000). Genetic control of cell size. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 529–535.
- Thomas, J.H., Birnby, D.A., and Vowels, J.J. (1993). Evidence for parallel processing of sensory information controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *134*, 1105–1117.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203–212.

Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.-C., Tsubokawa, M., et al. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313, 756.

Vowels, J.J., and Thomas, J.H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 130, 105–123.

Weinkove, D., and Leever, S.J. (2000). The genetic control of organ growth: insights from *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 75–80.

Yenush, L., Fernandez, R., Myers, M.G.J., Grammer, T.C., Sun, X.J., Blenis, J., Pierce, J.H., Schlessinger, J., and White, M.F. (1996). The *Drosophila* insulin receptor activates multiple signaling pathways but requires insulin receptor substrate proteins for DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2509–2517.

Приложение 1

Последовательности праймеров

1. НТК7

ATG GAT GGC TTA CGA ATC ATT A	прямой праймер
TAC CGT TGT GTT TTC TTC TTC G	обратный праймер

2. Insulin receptor substrate (IRS)

ATC GCA TCA CAA GAA TGA TCG	прямой праймер
TTT CTA GCA ACT TCC CTT CTG	обратный праймер

3. Аналог AGE-1 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase)

ACA TGC TGG CTT TGC AAG TG	прямой праймер
ACA TGG AAT TTG GTT CTG CAC C	обратный праймер

4. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK)

AGCTTGGGTCATTCAACGAG	прямой праймер
TTA AGT CTT CAC CAT CAG CAG C	обратный праймер

5. Mitogen-activated protein (MAPK)

ATG GTT GCC GTG AAG AAA C	прямой праймер
TCA CCA GTT GGT TCA TCA TC	обратный праймер

Приложение 2

Протокол *in situ* гибридизации, оптимизированный для *A. aurita*.

Подготовка образцов:

1. Расслабить животных в течение 5-10 минут в 2% растворе уретана на морской воде.
2. Зафиксировать в свежеприготовленном охлажденном растворе ПФА (4% на морской воде) в течение ночи при 4°C. В случае продолжительного хранения поменять ПФА на метанол и хранить при -80°C. Часть зверей оставить для приготовления антител.

1 день.

1. Промыть EtOH в течение 10 минут
2. Дегидратировать в этаноле пошагово:
 - 75% EtOH/ 25% H₂O в теч. 10 мин.
 - 50% EtOH/ 50% H₂O в теч. 10 мин.
 - 25% EtOH/ 75% H₂O в теч. 10 мин.
3. Отмыть в фосфатном буфере (РВТ) 10 минут.
4. Отмыть 3% раствором перекиси (H₂O₂) в течение 10 минут.
5. Отмыть в РВТ 3 раза по 10 минут.
6. Поместить в раствор протеиназы К (18,5 мг/мл) в РВТ на 10 мин.
7. Промыть в рабочем растворе глицина. 4 мг/мл в РВТ.
8. Поменять раствор глицина, отмывать 10 минут.
9. Отмыть в РВТ три раза по 10 минут.
10. Отмыть в растворе триэтаноламина 2 раза по 10 минут. 50
11. Поменять триэтаноламин и добавить 2,5 мкл/мл уксусного ангидрида, выдерживать 5 минут.
12. Добавить 2,5 мкл/мл уксусного ангидрида, выдерживать 5 минут.
13. Отмыть в РВТ 3 раза по 10 минут.
14. Перефиксировать в 4% растворе ПФА на РВТ в течение ночи.

2 день.

1. Отмыть в PBT 3 раза по 10 минут.
2. Отмыть в 2x SSC два раза по 10 минут.
3. Прогреть животных в 2x SSC при 70° на водяной бане в течение 20 минут
4. Отмыть в растворе 50% 2x SSC\50% Hybridization solution (HS) в течение 10 минут.
5. Отмыть в HS в течение 10 минут.
6. Пре-гибридизация в растворе HS+tRNA = 20мкл/мл при 57° в течение 2 часов при постоянном перемешивании.
7. Поменять HS+tRNA из расчета 1 мл на 1,5 мл пробирку.
8. Добавить 2 мкл зонда (разведенного 1:50) к 50 мкл HSII (5x SSC, 50% Formamid)
9. Денатурировать зонд 3-5 минут при 70 градусах.
10. Добавить весь зонд в пробирки с животными (финальная концентрация в пробирке – 1:25000)
11. Гибридизовать в течение ночи в 57° при постоянном перемешивании.

Преинкубация антител

Отобрать зафиксированных зверей на тех же стадиях

1. Отмыть в PBT 3 раза по 10 минут. 51
2. Отмыть в MAB-T 3 раза по 10 минут.
3. Размолоть зверей в 1 мл MAB-B.
4. Добавить Anti-DIG AT из расчёта 0,5 мкл на 1 мл пробы.
5. Инкубировать в течение 12 часов при 4°.
6. На следующий день - центрифугировать при 14000 g 10 минут.
7. Использовать супернатант (раствор с антителами) в нужном шаге в день три.

3 день.

1. Отмыть пробы с предварительно нагретым раствором при температуре гибридизации

- 100% HS - 10 минут

- 75% HS/25% 2x SSC - 10 минут

- 50% HS/50% 2x SSC - 10 минут

- 25% HS/75% 2x SSC - 10 минут

2. Инкубировать в 2x SSC+0,1% CHAPS 2 раза по 30 минут при температуре гибридизации.

3. Отмыть в MAB-T 2 раза по 10 минут при комнатной температуре.

4. Отмыть в MAB-B в течение часа.

5. Инкубировать в Blocking solution (80% MAB-B/20% сыворотки) 2 часа при 40 .

6. Добавить антитела из расчета финальной концентрации - 1:2000 в тот же самый раствор и инкубировать в течение ночи при 40 и постоянном перемешивании. 52

4 день.

1. Отмыть в MAB-T 9 раз по 20 минут.

2. Отмыть в NTMT 2 раза пять минут.

3. Убрать всю жидкость, добавить раствор NBT/BCIP в NTMT (1:50), инкубировать в темноте

4. Регулярно проверять степень окрашивания.

5. Как только степень окрашивания можно будет считать удовлетворительной – промыть водой, чтобы остановить реакцию. Воду сменить несколько раз.

6. Поместить образцы в 70% этанол.

Рабочие растворы:

1x раствор глицина - 4 мг/мл в PBT

Раствор гепарина - 10 мг/мл в MQ воде

HS - 50% Формамид, 5x SSC, 0,1% Tween-20, 0,1% CHAPS, 1x раствора Denhardt's , 100 мкг/мл гепарина в воде.

HSII - 50% Формамид, 25% 20x SSC, 25% H2O.

50x Денхардт - 1% поливинилпироллидон, 1x Ficoll, 1% BSA, 1 мл в 50 мл HS

МАВ - 100 мМоль малеиновой кислоты, 150 мМоль NaCl, pH 7,5.

МАВ-Т - МАВ+0,1% Tween-20

МАВ-В - МАВ-Т+1% BSA

NTMT - 100 мМоль NaCl, 100 мМоль Tris-HCl, 50 мМоль MgCl₂, 0,1% Tween-20, pH 9.5

РВТ - PBS+0,1% Tween-20

PBS – 1,5 М NaCl, 0,07М Na₂HPO₄, 0.03 М NaH₂PO₄.

Триэтаноламин - 100 мМоль в воде pH 7,8.

Протеиназа К - 1 мкл/20 мл РВТ

20x SSC - 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH = 7,0