

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

---

На правах рукописи

Александр Владиславович Бородулин

**Секретируемый белок *Noggin4* – новый регулятор активности  
Wnt/b-catenin-сигнального каскада в раннем эмбриональном развитии**

Специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор А.Г. Зарайский

Москва-2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>1. ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Сигнальные пути Wnt.....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Лиганды Wnt-сигнализации и их липидирование.....	11
2.1.2. Wnt-фенотипы, функциональная избыточность и специфичность .....	12
2.1.3. G-белки в Wnt-сигналинге.....	13
2.1.4. Сигнализация через систему рецепторного комплекса Frizzled-LRP .....	16
2.1.5. Рецепторы Wnt, неродственные Frizzled.....	20
<b>2.2. Регуляция активности Wnt-сигнальных путей .....</b>	<b>24</b>
2.2.1. Секретируемые ингибиторы Wnt.....	24
2.2.1.1. Семейство белков Dickkopf (Dkk) .....	24
2.2.1.2. Семейство белков sFRP .....	29
2.2.1.3. WIF-1 .....	33
2.2.1.4. Wise и SOST .....	33
2.2.1.5. Cerberus.....	35
2.2.1.6. IGFBP-4 .....	35
2.2.2. Трансмембранные ингибиторы Wnt.....	36
2.2.2.1. Семейство белков Shisa .....	36
2.2.2.2. Waif1/5T4 .....	37
2.2.2.4. Tiki1 .....	38
2.2.3. Активаторы Wnt-сигнальных каскадов.....	38
2.2.3.1. Семейство белков R-Spondin.....	38
2.2.3.2. Фактор Noggin.....	40
<b>2.3. Механизмы распределения белков Wnt в тканях .....</b>	<b>42</b>
2.3.1. Свободная диффузия, белки-переносчики и везикулярный транспорт .....	43
2.3.2. Цитонемный транспорт белков Wnt.....	45
2.3.3. Wnt-цитонемы в эмбриональном развитии .....	46
<b>2.4. Семейство факторов Noggin.....</b>	<b>48</b>
2.4.1. Структура белка Noggin .....	48
2.4.2. Белок Noggin человека.....	49
2.4.3. Структурные основы ингибиторной функции Noggin .....	50
2.4.4. Экспрессия, активация и функциональный цикл Noggin.....	51

2.4.5. Экспрессия Noggin в эктодермальных производных .....	51
2.4.6. Экспрессия Noggin в мезодермальных производных .....	52
2.4.7. Биологическая функция .....	52
2.4.8. Разнообразие факторов Noggin и их номенклатура .....	53
2.4.9. Белок Noggin4 .....	54
<b>Приложение 1 .....</b>	<b>56</b>
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>69</b>
<b>3.1. Результаты.....</b>	<b>69</b>
3.1.1. Описание распределения экспрессии Noggin4 в раннем развитии <i>G. gallus</i> .....	69
3.1.2. Исследование влияния Noggin4 на развитие осевых и головных структур .....	71
3.1.3. Оценка влияния Noggin4 на активность специфических люциферазных репортеров .....	72
3.1.4. Изучение способности Noggin4 связывать лиганды разных сигнальных путей.....	74
3.1.5. Изучение влияния Noggin4 на экспрессию генов-мишеней Wnt/ $\beta$ -catenin пути .....	75
3.1.6. Проверка специфичности и физиологической эффективности MO .....	75
3.1.7. Свидетельства нелокальности физиологического действия Noggin4 .....	76
3.1.8. Оценка способности Noggin4 к диффузии в межклеточном пространстве <i>in vivo</i> .....	77
<b>3.2. Обсуждение .....</b>	<b>80</b>
3.2.1. Noggin4 консервативно экспрессируется в гомологичных эмбриональных структурах у амфибий и птиц .....	80
3.2.2. Noggin4 не влияет на активность BMP и Nodal/Activin .....	80
3.2.3. Noggin4 связывает белок Wnt8 и подавляет активность каскада Wnt/ $\beta$ -catenin .....	81
3.2.4. Noggin4 действует нелокально, быстро распространяясь в межклеточном пространстве <i>in vivo</i> .....	82
3.2.5. Noggin4 регулирует передне-задний градиент сигнальной активности Wnt8 .....	84
<b>Приложение 2 .....</b>	<b>86</b>
<b>4. ВЫВОДЫ .....</b>	<b>103</b>
<b>5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>104</b>
<b>5.1. Материалы .....</b>	<b>104</b>
5.1.1. Реактивы .....	104
5.1.2. Ферментные препараты .....	104
5.1.3. Лабораторное оборудование .....	105

5.1.4. Лабораторные животные .....	105
5.1.5. Буферы и растворы.....	105
5.1.6. Микробиологические среды.....	107
5.1.7. Предоставленные штаммы .....	107
5.1.8. Предоставленные плазмиды.....	107
<b>5.2. Методы .....</b>	<b>108</b>
5.2.1. Амплификация ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	108
5.2.2. Электрофорез в агарозном геле .....	108
5.2.3. Элюция ДНК из агарозного геля .....	108
5.2.4. Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции.....	108
5.2.5. Достройка 3'-конца двуцепочечных молекул ДНК.....	109
5.2.6. Отщепление выступающего 3'-конца двуцепочечных молекул ДНК.....	109
5.2.7. Лигирование молекул ДНК.....	109
5.2.8. Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> .....	109
5.2.9. Выделение плазмидной ДНК из бактерий <i>Escherichia coli</i> .....	109
5.2.10. Изготовление ДНК конструкций .....	110
5.2.11. Транскрипция <i>in vitro</i> .....	114
5.2.12. Получение зародышей <i>X. laevis</i> и <i>G. gallus</i> .....	114
5.2.13. Синтез белков в зародышах <i>Xenopus laevis</i> .....	115
5.2.14. Электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях в ПААГ .....	115
5.2.15. Выделение секретируемых белков из межклеточного пространства эмбриональной ткани .....	115
5.2.16. Измерение внутриклеточной концентрации активного P-Smad1.....	116
5.2.17. Оценка уровней экспрессии <i>Noggin4</i> и <i>EGFP-Noggin4</i> .....	117
5.2.18. Количественная ко-иммунопреципитация .....	118
5.2.19. Иммуноблот (Western Blotting).....	118
5.2.20. Блокирование трансляции эндогенных мРНК при помощи морфолино.....	119
5.2.21. Фиксация зародышей <i>Xenopus laevis</i> .....	120
5.2.22. Фиксация зародышей <i>Gallus gallus</i> .....	121
5.2.23. Гибридизация <i>in situ</i> тотальных препаратов зародышей <i>X. laevis</i> и <i>G. gallus</i> .....	121
5.2.24. Синтез dig-меченной анти-мРНК для гибридизации <i>in situ</i> .....	122
5.2.25. Экстракция тотальной РНК из зародышей шпорцевой лягушки .....	123
5.2.26. Экстракция тотальной РНК из куриных зародышей .....	123

5.2.27. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция.....	124
5.2.28. Определение параметров подвижности белков по FRAP .....	125
5.2.29. Измерение люциферазной активности специфических репортеров. ....	126
5.2.30. Калибровка конфокального микроскопа .....	126
5.2.31. Конфокальная микроскопия и эксперименты FRAP .....	126
<b>6. БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>128</b>
<b>7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>129</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>130</b>

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Передне-задняя и дорсовентральная оси представляют собой основание плана строения двусторонне-симметричных многоклеточных. У позвоночных обе оси образуются благодаря функции уникальных сигнальных белков-морфогенов. В зависимости от своей концентрации, морфогены на разных расстояниях от своего источника определяют те или иные судьбы клеток и образуют градиенты активностей – области высокой, средней и низкой активности, определяющих тот или иной путь развития данной клетки (Wolpert 1969). Во время разметки осей эти градиенты устанавливаются во всем зародыше, и интенсивность каждого сигнала в данном конкретном месте вдоль передне-задней и дорсо-вентральной осей зародыша определяет, в конечном счете, разметку будущего организма. Соответственно, пространственные отношения градиентов морфогенов важны для точной и корректной активности каждого сигнала в каждой точке зародыша. Кроме того, точное распределение активностей морфогенов вдоль каждой оси не может быть установлено мгновенно и, таким образом, оси тела не могут быть размечены одновременно. Правильное соотношение уровней активности морфогенов должно активно поддерживаться в течение всего процесса первичной разметки зародыша, а клетки должны обладать точной информацией о том, когда отвечать на сигналы морфогенов, чтобы выбрать верный вектор клеточного поведения и дифференцировки. Таким образом, временная регуляция сигналов разнообразных морфогенов и компетенции их клеток-мишеней также важна для правильного установления системы осей тела. Более того, передне-заднее и дорсо-вентральное паттернирование всех тканей продолжается, начиная со стадии бластулы, на протяжении стадий гаструляции, нейроляции и сомитогенеза; каждая из этих стадий характеризуется разными динамическими физическими условиями. Таким образом, пространственная и временная регуляции активности морфогенов должны координироваться между собой с тем, чтобы обеспечить устойчивое эмбриональное развитие. Важно, что хотя разметка обеих осей обеспечивается разными механизмами, это происходит одновременно. Эти механизмы ортогонального паттернирования должны гармонично функционировать во всем пространстве зародыша на протяжении всего процесса раннего развития.

Несмотря на то, что передне-задняя полярность яиц амфибий и рыб задается распределением материнских факторов, настоящая передне-задняя разметка клеточных судеб у всех позвоночных контролируется на стадиях поздней бластулы и гаструлы. К концу гаструляции в зародышах шпорцевой лягушки четко определяются области с передними и задними характеристиками.

Передне-задняя разметка опосредована сигнальными каскадами Wnt, FGF, Nodal и ретиноевой кислоты (retinoic acid, RA). В частности, Wnt, FGF, Nodal и RA определяет заднюю, постериорную спецификацию клеток, тогда как передняя – anteriорная – спецификация клеток реализуется через последовательное подавление этих сигналов. На стадиях бластулы и гастрюлы Wnt, FGF и Nodal размечают широкие области передне-задней оси тела (голову, туловище и хвост).

В ряду морфогенов, участвующих в разметке зародыша, белок Wnt занимает важное место: в ходе передне-задней разметки Wnt активирует “канонический” Wnt/ $\beta$ -catenin сигнальный каскад и через него – экспрессию «хвостовых» генов. В зародышах шпорцевой лягушки и данио на стадиях ранней и средней бластулы материнская активность Wnt-сигнализации локализуется в дорсальной части зародыша, обеспечивая формирование дорсального организатора, ответственного за установление дорсовентральной асимметрии. В дальнейшем, в конце дробления и на стадии гастрюлы, зиготическая Wnt-сигнализация в организаторе подавляется, ее центр перемещается на вентролатеральную границу зародыша.

Wnt-сигнализация также играет ключевую роль в передне-задней разметке нейральной ткани, обеспечивая спецификацию наиболее задних ее отделов. Исследования передне-задней разметки ЦНС ясно показывают, что Wnt действует как морфоген, концентрационно определяя каудальную специфичность клеток. Этот белок способен напрямую сообщать клеткам заднюю позиционную информацию и определять таким образом соотношение и распределение каудальных клеточных судеб в разных отделах развивающейся ЦНС.

Важно, что передние структуры, в особенности передний мозг, требуют для своего развития подавления активности Wnt-пути, что указывает на равную важность антагонистов этого сигнального пути в процессе передне-заднего паттернирования. Благодаря своим уникальным свойствам, белок Noggin4 занимает среди ингибиторов этого сигнального каскада особое место.

В настоящей работе нами впервые показана способность этого белка напрямую связывать основной лиганд Wnt/ $\beta$ -catenin-пути – Wnt8 – и подавлять его сигнальную активность. Кроме того, при помощи разработанного нами уникального метода прижизненной визуализации белков *in vivo* была впервые продемонстрирована способность Noggin4 перемещаться на значительные расстояния в эмбриональных тканях и измерена скорость его перемещения. Эти данные, возможно, помогут пролить свет на проблему скейлинга, или размерной инвариантности эмбрионального паттерна – способности развивающейся системы воспроизводить паттерн даже при существенных помехах, например при удалении значительной части системы. В настоящее время механизмы этого явления остаются во многом неизвестными. Несмотря на важность и актуальность проблемы

скейлинга, этот феномен редко принимается во внимание при разработке моделей позиционной информации на основе градиентов морфогенов (Wolpert 2016).

Работа проведена в основном на модели зародыша шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, представляющем собой один из классических объектов экспериментальной биологии развития. Ввиду удобства культивирования, экспериментальных манипуляций и микроскопии, данный объект представляет собой систему весьма перспективную, с точки зрения изучения механизмов передне-задней разметки зародыша и распределения морфогенов в эмбриональных тканях. Кроме того, для шпорцевой лягушки разработан ряд широко используемых молекулярно-генетических методик, а высокий эволюционный консерватизм событий и процессов раннего эмбрионального развития делает полученные данные актуальными для исследований нормальных и патологических процессов индивидуального развития у других позвоночных животных, включая человека.



## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Сигнальные пути Wnt

Семейство белков Wnt (Logan and Nusse 2004) насчитывает 19 высококонсервативных секретируемых гликопротеинов, действующих как лиганды соответствующих внутриклеточных каскадов передачи сигнала и регулирующих, в том числе, разнообразные процессы как в индивидуальном развитии (Rijsewijk, Schuermann et al. 1987, McMahon and Moon 1989), так и в физиологии взрослого организма (Stoick-Cooper, Moon et al. 2007, Stoick-Cooper, Weidinger et al. 2007). В 1996 году в качестве рецепторов для некоторых или всех белков семейства Wnt было предложено десять членов белков семейства Frizzled (Bhanot, Brink et al. 1996, Yang-Snyder, Miller et al. 1996). Белки Frizzled представляют собой семикратно трансмембранные поверхностные клеточные рецепторы, филогенетически принадлежащие большому семейству GPCRs (G protein-coupled receptors) (Bjarnadottir, Gloriam et al. 2006). Было показано, что рецепторы Frizzled образуют гомо- и гетеромерные комплексы с другими белками данного семейства (Kaykas, Yang-Snyder et al. 2004); это свойство является типичным для GPCRs (Angers, Salahpour et al. 2002).

Далее для некоторых Wnt-лигандов была показана способность активировать тирозинкиназные рецепторы ROR2 (Hikasa, Shibata et al. 2002) и RYK (Yoshikawa, McKinnon et al. 2003, Inoue, Oz et al. 2004, Lu, Yamamoto et al. 2004), что является прямым свидетельством способности белков Wnt активировать несколько разных внутриклеточных сигнальных путей. Каскад Wnt/ $\beta$ -catenin является наиболее хорошо изученным из всех Wnt-сигнальных путей. Функционируя в пределах физиологического гомеостаза, этот сигнальный путь регулирует клеточную дифференцировку, пролиферацию и самообновление стволовых клеток и клеток-предшественников в течение всего жизненного цикла Metazoa. Критичность ограничения активности этого сигнального пути рамками гомеостаза подтверждается внушительным массивом доказательств того, что повышение или понижение сигнальной активности в Wnt/ $\beta$ -catenin-каскаде сопровождается целым спектром расстройств (Moon, Kohn et al. 2004, Clevers 2006).

За последние 20 лет усилиями исследователей были изучены молекулярные механизмы, обеспечивающие требуемый гомеостатический баланс активности Wnt-сигнализации. В частности, стало понятно, что в отсутствие лигандов Wnt образуется деградирующий комплекс, включающий GSK3 (glycogen synthase kinase 3), CK1 $\alpha$ , Axin и APC (adenomatous polyposis coli). Этот белковый

комплекс обеспечивает фосфорилирование  $\beta$ -catenin с дальнейшим его убиквитинилированием по механизму SKP1-cullin 1-F-box ( $SCF^{\beta-TrCP}$ ) E3 лигазы и деградации в 26S протеасоме (Kimelman and Xu 2006). Взаимодействие лигандов Wnt с рецепторами Frizzled и Wnt-корцепторами LRP5 и LRP6 (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6) обеспечивает активацию цитоплазматических фосфобелков Dishevelled, подавляющих деградационный комплекс и останавливающих, таким образом, разрушение  $\beta$ -catenin. Это позволяет  $\beta$ -catenin накапливаться в ядре и взаимодействовать с белками семейства LEF (lymphoid enhancer-binding factor) и TCF (T cell factor), выступая в качестве транскрипционного ко-фактора, модулирующего экспрессию генов-мишеней (Рис. 1). Рецепторы Frizzled сами по себе, без участия LRP5/6, также способны к взаимодействию с лигандами Wnt и активации как  $\beta$ -catenin-зависимой, так и неканонических ветвей каскада. У позвоночных  $\beta$ -catenin-независимые сигнальные пути контролируют такие разнообразные процессы и явления, как планарная клеточная полярность волосковых сенсорных клеток улитки внутреннего уха (Dabdoub 2003), конвергентное вытяжение (Heisenberg, Tada et al. 2000), разграничение тканей (Winklbaue, Medina et al. 2001) и дорсо-вентральное паттернирование плана строения (Westfall, Brimeyer et al. 2003) при гаструляции (Рис. 2). В отличие от  $\beta$ -catenin-зависимого пути, точные молекулярные детерминанты, лежащие в основе активации различных  $\beta$ -catenin-независимых ветвей каскада, остаются в существенной степени неясными. Вследствие этого сведения об этих ветвях Wnt-каскада и процессах, контролируемых ими, часто бывают противоречивы. Это обстоятельство указывает на важность дальнейшего исследования с тем, чтобы выяснить механизмы работы этих сигнальных путей. Тем не менее, в экспертном сообществе установился консенсус относительно того, что у позвоночных неканонические ветви Wnt-каскада, в целом, играют роль антагониста  $\beta$ -catenin-зависимой сигнализации (Torres 1996). Этот антагонизм физиологически актуален в таких процессах, как тканевая регенерация (Stoick-Cooper, Weidinger et al. 2007) и развитие конечности (Topol, Jiang et al. 2003), а так же для полноценного выживания предшественников тимоцитов (Liang, Coles et al. 2007). Открытыми остаются вопросы о специфичности разных Wnt-лигандов в отношении активации разных Frizzled в физиологических условиях, а так же вопрос об участии разных Frizzled в работе тех или иных ветвей Wnt-сигнального каскада.

По мере накопления биомедицинской информации о связи разных сигнальных путей Wnt-каскада с разными патологическими процессами прилагается все больше исследовательских усилий к изучению того, как модуляция активности этих путей может помочь в разработке новых терапевтических стратегий.

### 2.1.1. Лиганды Wnt-сигнализации и их липидирование

Первичная структура белков семейства Wnt включает сигнальную последовательность, после которой следует высококонсервативный цистеиновый кластер. Несмотря на то, что Wnt являются секретлируемыми белками, низкая растворимость активных Wnt-молекул ранее создавала трудности при выделении и очистке и биохимическом описании этого семейства ростовых факторов. Труднорастворимая природа белков Wnt впоследствии получила объяснение, когда стало известно об их посттрансляционном пальмитоилировании, объясняющем их более высокую гидрофобность, чем это было предсказано на основе их первичной аминокислотной последовательности (Willert, Brown et al. 2003). Было обнаружено, что цистеиновый остаток, подверженный пальмитоилированию, является консервативным. Это косвенно свидетельствует о том, что все функциональные формы белков Wnt несут данную модификацию. Анализ мутантов показал, что этот остаток необходим для функционирования Wnt-белков и их обработка ферментом ацил-протеин-тиоэстеразой ведет к образованию низкогидрофобной неактивной формы, что стало дополнительным свидетельством в пользу важности пальмитоилирования для Wnt-сигнализации (Willert, Brown et al. 2003).

Наиболее вероятно, что ферменты, пальмитилирующие белки Wnt, кодируются у *Drosophila* геном *porcupine* (*por*) (Kadowaki, Wilder et al. 1996), а у *Caenorhabditis elegans* его гомологом *mom-1* (Rocheleau, Downs et al. 1997). Фенотипическое сходство между мутантами по *wnt* и *por/mom-1* свидетельствует о том, что ферменты *Porcupine* и *MOM-1* вовлечены в сигнализацию Wnt (Kadowaki, Wilder et al. 1996). Эти гены востребованы в Wnt-продуцирующих, но не в принимающих Wnt-сигнал клетках. Hofmann отмечает сходство по первичной структуре между *Porcupine* и связанными с мембраной ацетилтрансферазами – ферментами, присутствующими в мембранах эндоплазматического ретикулума и ацилирующими широкий спектр субстратов (Hofmann 2000). Таким образом, *por*, возможно, кодирует фермент, катализирующий перенос пальмитата на Wnt. В согласии с этой гипотезой, *Wingless*, как и *Wnt3a*, также характеризуется гидрофобностью (Zhai, Chaturvedi et al. 2004). *Wingless* способен ассоциироваться с мембранами, однако как при биохимическом подавлении O-ацетилтрансферазной активности, так и при генетическом удалении гена *por* *Wingless* утрачивает свою гидрофобность и мембранную локализацию. Эти данные поддерживают модель, в которой *Porcupine* является ключевым регулятором липидирования белков Wnt и их мембранной адресации. Интересно, что белки семейства *Hedgehog* также несут N-концевой пальмитат, необходимый для сигнализации. Присоединение этого пальмитата предположительно катализируется *Skinny-hedgehog*, обладающим, подобно *Porcupine*, ацилтрансферазной активностью (Chamoun 2001).

Хотя пальмитоилирование является критической характеристикой Wnt-сигнализации, его точная функция неизвестна. При оверэкспрессии *Wingless* у *Drosophila* необходимость в функции *rog* можно обойти (Noordermeer, Klingensmith et al. 1995) и, аналогично, мутантные генные конструкции, лишенные сайта пальмитоилирования, способны продуцировать слабый Wnt-сигнал при оверэкспрессии в клетках (Willert, Brown et al. 2003). Эти наблюдения могут объясняться тем, что нарушения адресации белков Wnt на мембраны при отсутствии липидного агента могут быть частично компенсированы высоким уровнем их экспрессии.

### 2.1.2. Wnt-фенотипы, функциональная избыточность и специфичность

Общепринятый подход к пониманию функции данного гена в ткани или эмбриональном развитии – изучение нокаутных фенотипов. В некоторых случаях экспрессионные паттерны и мутантные фенотипы тесно коррелируют между собой и однозначно демонстрируют вовлеченность данного конкретного фактора Wnt в специфическое событие эмбриогенеза. Так, Wnt3a экспрессируется в первичной полоске раннего зародыша мыши, а мутанты по этому гену обнаруживают дефекты гаструляции (Liu, Wakamiya et al. 1999). Вместе с тем отмечен ряд случаев, когда мутантные фенотипы полноценно проявляются лишь при одновременном нокауте нескольких генов Wnt. Классический пример этого – двойной нокаут по Wnt1/Wnt3a, влияющий на развитие более широкой области ЦНС, чем нокауты Wnt1 и Wnt3a по отдельности (Ikeya, Lee et al. 1997). Сходный эффект наблюдается для внутриклеточных медиаторов Wnt-сигнализации: мутанты по Lef1 и TCF1 демонстрируют дефекты, сходные с мутантами по Wnt3a, однако только при одновременном отсутствии Lef1 и TCF1. Эти примеры иллюстрируют, насколько сильно генетическая и функциональная избыточность компонентов Wnt-сигнализации способна влиять на нашу способность отслеживать и интерпретировать фенотипы Wnt-мутантов.

Анализ Fz-мутантов в целом оказался неспособным выявить специфические Wnt/Fz-пары, взаимодействующие в процессе развития. Исключение составляет *Frizzled4*, направляющий рост аксонов в нервной трубке через посредство Wnt4 (Lyuksyutova 2003). Недостаток прямого соответствия между индивидуальными Wnt и Fz в анализе мутантных фенотипов указывает на то, что одиночный Fz, возможно, активируется множественными Wnt или что данный Wnt может присоединять множественные Fz. У *Drosophila* фактор Wg взаимодействует как с Fz, так и с Dfz2, причем дефекты разметки кутикулы наблюдаются только у мутантов по обоим рецепторам (Bhanot, Brink et al. 1996, Kennerdell and Carthew 1998, Chen, Fernandez et al. 1999, Rulifson, Wu et al. 2000). Это относительно простой пример, в котором сигнализация опосредована преимущественно лигандом Wnt лишь одного типа и генетической избыточностью всего двух

рецепторов Fz. У позвоночных, где экспрессионные паттерны Wnt и Fz выявлены более детально и где Fz даже способны взаимодействовать с другими лигандами, такими как Norrin (Guo, Hawkins et al. 2004), перекрывающиеся взаимодействия и взаимоотношения между белками Wnt, другими Fz-связывающими факторами и самими рецепторами Fz могут оказаться гораздо более сложными.

### 2.1.3. G-белки в Wnt-сигналинге

Семикратно-трансмембранная топология рецепторов Frizzled воспроизводит общую структуру белков класса GPCR, в связи с чем возникает вопрос о роли гетеротримерных G-белков – важных переносчиков сигналов, идущих через GPCR – в работе Wnt-сигнализации. Кроме семи гидрофобных сегментов, Frizzled-рецепторы демонстрируют и другие сходства с общей структурой белков GPCR, такие как предсказанные сайты гликозилирования и фосфорилирования РКА-киназой (cyclic AMP-dependent protein kinase), протеин-киназой С (PKC) и казеин-киназой 2 (CK2). С другой стороны, Frizzled лишены других важных свойств класса GPCR, таких как консервативные Asp-Arg-Tyr участки, необходимые для спаривания с G-белками и расположенные во второй внутриклеточной петле некоторых GPCRs. Кроме того, Frizzled-рецепторы лишены хорошо известного участка Asn-Pro-X-X-Tyr (где X означает любой аминокислотный остаток) на конце седьмого трансмембранного сегмента многих GPCRs. Хотя неканоническая ( $\beta$ -catenin-независимая) Frizzled-опосредованная сигнализация и раньше связывалась с гетеротримерными G-белками (Slusarski, Corces et al. 1997), недостаток генетических свидетельств у *Drosophila melanogaster* в поддержку этого взгляда на ранних этапах исследования заставил многих предполагать, что G-белки не вовлечены в передачу сигнала по  $\beta$ -catenin-зависимому пути. Однако теперь получен большой массив доказательств в пользу участия этих белков как в каноническом, так и в неканонических ветвях Wnt-каскада.

*Роль в  $\beta$ -catenin-зависимой сигнализации.* Malbon с коллегами в свое время представили первые данные, связывающие G-белок-опосредованную передачу сигнала с каскадом Wnt/ $\beta$ -catenin (Liu, Liu et al. 1999). В клетках F9 тератокарциномы активация  $\beta$ -catenin-опосредованной транскрипции ведет к индукции первичных энтодермальных потенций. Из того факта, что влияния Wnt на судьбу клеток блокируются ингибиторами  $G\alpha_i$ - и  $G\alpha_o$ -субъединиц G-белков, такими как коклюшный токсин и антисмысловые олигонуклеотиды, был сделан вывод об облигатном участии гетеротримерных G-белков в Wnt/ $\beta$ -catenin-зависимой сигнализации (Liu, Liu et al. 1999). Позднее появились биохимические доказательства того, что рецепторы Frizzled до активации каскада уже спарены с  $G\alpha_o$  (Liu, Rubin et al. 2005). Не более чем через 5 минут после активации Frizzled GSK3 $\beta$  быстро диссоциирует из комплекса с Axin, причем этот процесс коррелирует со снижением

взаимодействия между  $G\alpha_o$  и Frizzled. Действительно, нокдаун субъединиц  $G\alpha_i$  и  $G\alpha_o$  гетеротримерного G-белка при помощи малых интерферирующих РНК (миРНК) показывает, что и модуляция взаимодействия между GSK3 $\beta$  и Axin, и последующая стабилизация  $\beta$ -catenin действительно опосредуется G-белками.

Широко поддерживаемая точка зрения, что рецепторы Frizzled передают сигнал независимо от G-белков опирается на дефицит генетических доказательств на *D. melanogaster* – модельном организме, для которого определено и описано большинство главных молекулярных участников каскада. Функциональная избыточность шести  $G\alpha$ -субъединиц у *D. melanogaster* и плейотропные роли этих белков в активности нескольких дрозофилиных GPCRs препятствуют прямой демонстрации генетического взаимодействия между G-белками и Frizzled. В попытке решить эту проблему, Katanaev с коллегами (Katanaev, Ponzielli et al. 2005) представили генетические доказательства того, что гетеротримерные G-белки опосредуют передачу сигнала, инициированного лигандом Wg как в канонической  $\beta$ -catenin-ветви Wnt-каскада, так и в неканонической Wnt/PCP-ветви. В частности, на модели глаза мухи было показано, что гиперэкспрессия Frizzled ведет к aberrантной интеграции сигналов планарной клеточной полярности, руководящих развитием омматидиев. Экспрессия коклюшного токсина нивелирует эффект гиперэкспрессии Frizzled. Авторы трактовали это как доказательство того, что  $G\alpha_o$  – единственный известный G-белок *D. melanogaster*, чувствительный к этому токсину – активируется на уровне ниже рецепторов Frizzled.

В соответствии с тезисом, что  $G\alpha_o$  необходим для передачи сигнала Wg, было показано, что гипоморфные клоны<sup>1</sup>  $G\alpha_o$  в крыльях дрозофилы снижают экспрессию генов-мишеней Wg. Это также подтверждается экспериментами gain-of-function, в которых гиперэкспрессия  $G\alpha_o$  в крыльях мухи сопровождалась повышением уровней экспрессии генов-мишеней Wg. Кроме того, было показано, что мутантные варианты  $G\alpha_o$ , благоприятствующие активированному GTP-связанному состоянию, индуцируют экспрессию генов-мишеней Wg и, напротив, мутанты, способствующие неактивному GTP-связанному состоянию, не способны к такой индукции. Это свидетельствует о том, что Wg инициирует обмен нуклеотидов в  $G\alpha_o$  и что это является ключевым событием в активации сигналинга. Вместе с тем показано, что утрата экспрессии генов-мишеней Wg у клонов Frizzled может быть восстановлена мутантами  $\alpha_o$ •GTP, но не  $G\alpha_o$  дикого типа. Суммируя эти

---

<sup>1</sup> Гипоморфные клоны – группа клеток, содержащих мутантный вариант одного и того же гена, в которых мутация лишь частично влияет на биологическую активность, контролируемую продуктом данного гена.

данные, можно заключить, что рецепторы Frizzled, как и остальные GPCRs, выполняют роль факторов обмена гуанин-нуклеотидов (guanine nucleotide-exchange factors, GEFs) и катализируют обмен GDP на GTP в G-белках, критичный для активации сигналинга в каскаде Wnt.

Эксперименты по эпистазу на *D. melanogaster* позволили выяснить, что gain-of-function-активация генов-мишеней каскада Wg белком  $G\alpha_o$  подавляется в клетках, несущих мутацию в Armadillo (ARM; дрозофилиный гомолог  $\beta$ -catenin) или Dishevelled, а так же в клетках, оверэкспрессирующих Shaggy (SGG; дрозофилиный гомолог GSK3). Согласно этим данным,  $G\alpha_o$  реализует свою функцию выше уровня Dishevelled – белка, активация которого, согласно представлениям на момент публикации, происходит непосредственно после активации Frizzled, то есть на уровень ниже.

*Роль в  $\beta$ -catenin-независимой сигнализации.* Если G-белки действительно являются непосредственными интермедиатами Frizzled-активности, другие  $\beta$ -catenin-независимые процессы, контролируемые Frizzled (такие, как явления планарной клеточной полярности), также должны требовать активации  $G\alpha_o$ . Действительно, планарная полярность в крыле дрозофилы нарушается в клонах с gain-of-function и loss-of-function по  $G\alpha_o$  (Katanaev, Ponzielli et al. 2005). Такие мутанты демонстрируют сходство по фенотипу с мутантами loss-of-function и gain-of-function по рецепторам Frizzled.

При исследованиях  $\beta$ -catenin-независимой Wnt-сигнализации на модели *Danio rerio* были получены первые доказательства связи Frizzled-рецепторов с сигнализацией, опосредованной G-белками (Slusarski, Corces et al. 1997, Slusarski, Yang-Snyder et al. 1997). Эти эксперименты показывали, что нарушение функции G-белков блокирует изменения в потоках  $Ca^{2+}$ , индуцируемые действием Wnt5a или Frizzled2 в зародышах *D. rerio* (Slusarski, Corces et al. 1997). Последующее изучение показало, что активация САМКII ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II), PKC и NFAT (nuclear factor of activated T cells) в различных системах зависит от G-белков (Saneyoshi, Kume et al. 2002, Weeraratna, Jiang et al. 2002, Kremenevskaja, von Wasielewski et al. 2005, Dejmek, Safholm et al. 2006, Ma and Wang 2006, Dissanayake, Wade et al. 2007, Schleiffarth, Person et al. 2007, Pereira, Schaer et al. 2008).

В зародышах позвоночных активация  $\beta$ -catenin-независимой сигнализации лигандами Wnt влияет на клеточные движения при конвергентном удлинении – процессе, обеспечивающем вытяжение вдоль передне-задней оси тела. У *D. rerio* мутантные аллели двух Wnt-генов – ppt (pipetail, также известный как wnt5b) (Kilian, Mansukoski et al. 2003) и slb (silberblick, или wnt11) (Heisenberg, Tada et al. 2000) – вызывают дефекты конвергентного вытяжения из-за неправильных движений мезодермальных клеток в гастрულიрующем зародыше. У зародышей шпорцевой

лягушки *X. laevis* микроинъекция РНК, кодирующей доминант-негативный вариант Wnt11, в область дорсальной краевой зоны – ключевой для формирования осей тела эмбриональной области – так же вызывает дефекты конвергентного вытяжения (Tada and Smith 2000). Эксплантаты дорсальной краевой зоны – т.н. келлеровские эксплантаты – при культивации *in vitro* не теряют способности к конвергентному вытяжению, что выражается в удлинении эксплантата. Интересно, что и Frizzled7, и  $\beta\gamma$ -субъединицы гетеротримерных G-белков для этого процесса необходимы (Penzo-Mendèz, Umbhauer et al. 2003).

В свете имеющихся свидетельств того, что эти  $\beta\gamma$ -субъединицы присутствуют в тех же белковых комплексах, что и белки Dishevelled в клетках позвоночных (Angers, Thorpe et al. 2006), можно предположить, что они высвобождаются непосредственно в результате активации G-белка рецепторами Frizzled и регулируют активность Dishevelled. По мнению некоторых исследователей (Angers and Moon 2009), при появлении экспериментальных доказательств такой связи Frizzled-зависимая сигнализация может приобрести сходство с сигнализацией через рецепторы феромонов у дрожжей, при которой большая часть клеточных функций является следствием активации эффекторов  $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков, но не их  $\alpha$ -субъединицей.

#### 2.1.4. Сигнализация через систему рецепторного комплекса Frizzled-LRP

Наименее понятный аспект Wnt-сигналинга – каким образом активация рецепторных комплексов Frizzled-LRP5/6 ведет к подавлению комплекса деградации  $\beta$ -catenin. Хотя большинство исследователей согласны, что это требует активации фосфобелков Dishevelled, остается неясным, каким образом активируются сами Dishevelled и как они препятствуют работе комплекса деградации. Тем не менее, мы знаем, что последовательность событий, инициируемых белками Wnt, включает изменения во взаимодействии между рецепторами Frizzled и ко-рецепторами LRP5/6, включение Dishevelled и Axin в сигналосомы, содержащие рецепторы Frizzled и ко-рецепторы LRP5/6 и активацию цитоплазматической цепи передачи сигнала.

*Латеральная передача сигнала между Frizzled и LRP.* Несмотря на то, что рецепторы Frizzled, по-видимому, способны связывать лиганды Wnt сами по себе, генетические эксперименты на *D. melanogaster* и мыши указывают на то, что полноценная Wnt-сигнальная активность требует участия Arrow у *D. melanogaster* (Wehrli, Dougan et al. 2000) и LRP5/6 у позвоночных (Tamai, Semenov et al. 2000). Биохимически было показано, что кроме рецепторов Frizzled Wnt-лиганды связываются с N-концевым доменом ко-рецепторов LRP и способны стабилизировать тройственный комплекс Frizzled-LRP-Wnt (Tamai, Semenov et al. 2000). Биохимические и генетические эксперименты по эпистазу расположили активность LRP и Narrow ниже уровня Wnt,



но выше цитоплазматических компонентов Dishevelled и  $\beta$ -catenin, что согласуется с моделью, предусматривающей функционирование LRP5 и Narrow на уровне плазматической мембраны. В совокупности эти данные указывают на то, что рецепторы Frizzled образуют с ко-рецепторами LRP сигнальный комплекс, опосредованно стабилизирующий пул  $\beta$ -catenin.

*Взаимодействие Axin с ко-рецепторами класса LRP.* Свидетельства того, что Axin связывается с С-концевым доменом ко-рецептора LRP и что Wnt-белки, возможно, содействуют этому связыванию, позволяют сформулировать модель того, как Wnt-сигнализация может запускаться в цитоплазме (Mao, Wang et al. 2001). При помощи метода FRAT (fluorescent resonance energy transfer) было установлено, что пул молекул Axin важен для сигнализации, но сам по себе недостаточен для ее максимальной эффективности. Это указывает на то, что так же важны другие белки или процессы. Нельзя исключить, что стабильность самого Axin, как в случае с  $\beta$ -catenin, регулируется Wnt-сигнализацией (Willert, Shibamoto et al. 1999, Lee, Salic et al. 2003), однако такой взгляд, как отмечают Angers and Moon, (Angers and Moon 2009) поддерживается далеко не всеми.

Взаимодействие Axin с ко-рецепторами LRP опосредуется Pro-Pro-Ser-Pro повторами, расположенными в цитоплазматическом домене LRP5/6 (см. (Tamaï, Zeng et al. 2004)). Наличие этого домена достаточно для активации Wnt-сигнального каскада – это показано при анализе мутаций в этих повторах и при переносе изолированного Pro-Pro-Ser-Pro мотива с ко-рецептора LRP5 на рецептор липопротеинов низкой плотности, в норме не способный опосредовать Wnt-сигнализацию. Наличие Pro-Pro-Ser-Pro мотива наделяет Wnt-сигнальной активностью химерный рецептор, что было показано в экспериментах по удвоению осевого комплекса у *X. laevis* и при помощи TCF/LEF-люциферазных репортеров в культурах клеток (Tamaï, Zeng et al. 2004). Мутационный анализ всех пяти Pro-Pro-Ser-Pro доменов в полном размере LRP6 обнаруживает, что по меньшей мере четыре из них необходимы для полной стабилизации  $\beta$ -catenin (Wolf, Palmby et al. 2008). Кластеры остатков Ser и Thr, содержащихся в ядрах Pro-Pro-Ser-Pro доменов, фосфорилируются независимо от Wnt-активности и образуют сайт стыковки с Axin (Tamaï, Zeng et al. 2004). Таким образом, в нормальном клеточном контексте включение Axin в состав комплекса с ко-рецепторами LRP5/6 требует высокой аффинности связывания, которая, возможно, требует фосфорилирования Pro-Pro-Ser-Pro домена LRP, опосредованного Wnt-активностью. Эти данные могут указывать на существование некой киназы и, возможно, фосфатазы, регулирующих Wnt-зависимое фосфорилирование С-концевых хвостов ко-рецепторов LRP5/6. На роль таких киназ претендуют CK1 $\gamma$  (Davidson, Wu et al. 2005) и GSK3 $\beta$  (Zeng, Tamaï et al. 2005), активность которых вовлечена в процесс фосфорилирования ко-рецепторов LRP5/6. Фосфорилирование LRP5/6 киназой GSK3 $\beta$  зависит от активности Wnt-сигнализации. Киназа CK1 $\gamma$ , закоренная в мембране,

также функционирует на уровне ко-рецепторов LRP5/6 как у *D. melanogaster*, так и в клетках позвоночных (Davidson, Wu et al. 2005). Сайты фосфорилирования киназой СК1 $\gamma$  как выше, так и ниже урона Pro-Pro-Ser-Pro доменов важны для максимальной сигнальной активности ко-рецепторов LRP5/6. Между двумя этими упомянутыми работами, тем не менее, существует одно важное различие и нерешенный вопрос, касающийся динамики фосфорилирования сериновых остатков этих доменов. Zeng с коллегами утверждают, что фосфорилирование этих доменов киназой GSK3 $\beta$  зависит от активности Wnt-сигналикации, тогда как Davidson с сотрудниками показывают, что этот сайт фосфорилирован конститутивно и что статус фосфорилирования не меняется при стимуляции Wnt-сигналинга. Тем не менее, эти результаты поддерживают рабочую модель, предусматривающую возникновение высокоаффинного сайта включения Axin при фосфорилировании С-концевых доменов LRP5/6 киназами GSK3 $\beta$  и СК1 $\gamma$  (Рис. 3).

Считается, что Axin представлен в клетке на очень низком уровне (Angers and Moon 2009), поэтому логично предположить, что его утилизация ко-рецепторами LRP5/6 должна конкурировать с его функцией в составе комплекса деградации  $\beta$ -catenin и, соответственно, опосредованно активировать ядерные функции  $\beta$ -catenin. Эти исследования также обнаружили положительную функцию GSK3 $\beta$  в передаче сигнала Wnt – роль, которая до этого маскировалась сильной негативной регуляцией, выполняемой GSK3 $\beta$  в составе комплекса деградации  $\beta$ -catenin.

*Белки Dishevelled в Wnt-опосредованном фосфорилировании LRP.* Dishevelled – важная молекулярная точка ветвления, в которой происходит сопряжение Frizzled-опосредованной Wnt-сигналикации по  $\beta$ -catenin-зависимому и независимому путям. Соответственно, эксперименты по эпистазу расположили Dishevelled среди первых цитоплазматических участников каскада, воспринимающих Wnt-активность (Siegfried, Wilder et al. 1994). В  $\beta$ -catenin-зависимой ветви каскада Dishevelled, по-видимому, инактивирует комплекс деградации  $\beta$ -catenin через ассоциацию с Axin (Kishida, Yamamoto et al. 1999, Smalley, Sara et al. 1999). Белки Dishevelled могут также принимать участие в Wnt-опосредованном фосфорилировании ко-рецепторов LRP5/6 (Zeng, Huang et al. 2007). Нокдаун по Dishevelled при помощи миРНК у *D. melanogaster* (Bilic, Huang et al. 2007) блокирует Wnt-зависимое фосфорилирование LRP6. Сходные результаты были получены как на мышинных клетках с нокдауном по всем трем генам Dishevelled при помощи миРНК (op. cit.), так и в клетках мышей, нокаутированных по Dsh1 и Dsh2 и с нокдауном по Dsh3 (Zeng, Huang et al. 2008). Согласно одной из гипотез, в ответ на действие лигандов Wnt Dishevelled взаимодействует с внутриклеточными доменами рецепторов Frizzled через посредство гетеротримерных G-белков. Образующийся при этом комплекс получает возможность взаимодействовать с комплексом Axin-

GSK3 $\beta$ . Этот шаг может быть важным для достижения максимального уровня фосфорилирования ко-рецепторов LRP5/6 киназой GSK3 $\beta$  (Рис. 3).

Совокупность полученных на сегодня результатов указывает на то, что Dishevelled, Axin и GSK3 $\beta$  необходимы для Wnt-опосредованного фосфорилирования LRP6. Поскольку при активации каскада Axin ассоциируется с фосфорилированным хвостом LRP6, эта модель совместима с петлей положительной обратной связи, необходимой для амплификации сигнала и, возможно, устойчивой активации каскада в условиях постоянного наличия внеклеточных лигандов Wnt (Рис. 3).

*Wnt-индуцированное образование сигналом LRP6.* Факт участия белков Dishevelled в Wnt-зависимом фосфорилировании LRP5/6, о котором было сказано выше, говорит о том, что в  $\beta$ -catenin-зависимой ветви каскада Dishevelled функционирует выше, а не ниже уровня LRP5/6, как ранее предполагалось на основе gain-of-function фенотипов. В этой связи возникает вопрос о том, как Dishevelled и другие белки-эффекторы этого каскада обеспечивают фосфорилирование LRP5/6, индуцируя включение Axin. Интересные в этом отношении результаты были получены в экспериментах по real-time визуализации клеток, экспрессирующих химерные белки LRP6 и Axin с зелеными флюоресцентными метками с разными параметрами возбуждения (Bilic, Huang et al. 2007). В состоянии покоя Axin локализован в прерывистых структурах в плазме клеток, тогда как LRP6 равномерно распределен во всей клеточной мембране. В пределах 15 минут после начала стимуляции Wnt-белками LRP6 кластеризуется в ассоциированные с мембраной агрегаты, колокализованные с Axin. На модели эксплантатов крыши бластоцеля зародышей *X. laevis* авторы также показали, что такие Wnt-индуцированные сигналосомы содержат фосфорилированные белки LRP6, Dishevelled и прочие проксимальные участники Wnt-каскада, такие как рецепторы Frizzled и GSK3 $\beta$ . Интересно, что для белков Dishevelled ранее была показана способность образовывать динамические агрегаты (Schwarz-Romond 2005) и включаться в плазматическую мембрану после воздействия Wnt, возможно через прямое взаимодействие с рецепторами Frizzled (Wong, Bourdelas et al. 2003).

На основе всех этих данных была сформулирована рабочая модель, согласно которой Wnt запускает образование агрегатов Frizzled-LRP5 или Dishevelled-LRP6, после чего включающиеся в эти комплексы киназы GSK3 $\beta$  и CK1 $\gamma$  катализируют фосфорилирование доменов Pro-Pro-Ser-Pro, расположенных на LRP5/6, в результате чего возникает платформа для включения Axin (Angers and Moon 2009). Авторы признают, что в данной модели образования сигналом многие вопросы остаются неясными. Например, до сих пор неизвестно, как эти сигналосомы транслируют количественные различия в уровнях концентрации внеклеточного пула Wnt-лигандов в пропорциональные уровни внутриклеточного  $\beta$ -catenin. Неясно, контролируются ли эти события

уровнем фосфорилирования LRP5/6, количеством включающегося в сигнасомы Axin, либо через посредство регуляции киназных активностей GSK3 $\beta$  и CK1 $\gamma$  в составе сигнасом. Кроме того, остается открытым вопрос, деактивируется ли Wnt-сигнализация специфическими фосфатазами, дефосфорилирующими LRP5/6 и каков механизм высвобождения Axin из комплекса деградации и его взаимодействия с LRP5/6. Наконец, неясно, насколько динамична сборка и разборка сигнасом и как регулируются эти процессы. Ответы на эти вопросы должны помочь выяснить механизмы сигнализации через рецепторы Frizzled и ко-рецепторы LRP5/6.

### 2.1.5. Рецепторы Wnt, неродственные Frizzled

До недавнего времени большинство известных эффектов Wnt-сигнализации относились к активации рецепторов Frizzled. Идентификация Wnt-связывающих цистеин-богатых доменов ROR2 (см. в (Xu and Nusse 1998)) и Wnt-ингибирующих факторов RYK65 позволила предположить, что сигналы Wnt могут переноситься этими рецепторами, которые не имеют отношения к Frizzled. К настоящему времени в ряде работ установлено, что эти факторы действительно являются настоящими рецепторами Wnt-лигандов и что они как отрицательно, так и положительно регулируют разнообразные аспекты функционирования сигнальных путей Wnt, влияя таким образом на многие биологические процессы (Рис. 4).

*ROR2 как участник передачи Wnt-сигнала.* Hikasa с сотрудниками (Hikasa, Shibata et al. 2002) удалось идентифицировать ROR2 во время поиска генов, дифференциально регулируемых гомеодоменным белком дорсального организатора LIM1 (LIM homeobox protein 1, или LHX1) в плюрипотентных клетках эксплантатов крыши бластоцеля зародышей *X. laevis*. Эксперименты по оверэкспрессии показали, что ROR2 подавляет клеточные движения конвергентного удлинения дорсальной мезодермы и нейроэктодермы – процессов, регулируемых неканоническими ветвями Wnt-сигнального каскада. Различные Wnt-белки взаимодействуют с цистеин-богатым внеклеточным доменом ROR2.

Функциональная взаимосвязь между CAM-1 (гомолог ROR-белков у *Caenorhabditis elegans*) и фактором семейства Wnt EGL-20 (см. в (Forrester 2004)) позволяет констатировать эволюционный консерватизм данной сигнальной системы. CAM-1, лишенный своего цитоплазматического домена, способен полностью устранять нарушения клеточной миграции, наблюдаемые с мутантах по *cam-1*. Это говорит о том, что тирозин-киназная активность гомолога ROR-белка в данном контексте может быть необязательной.

Дополнительные доказательства, связывающие ROR2 с Wnt-сигналингом, получены в работе на мышах, в которых экспрессионные паттерны и loss-of-function фенотипы ROR2 напоминают таковые у мутантов по Wnt5a (Oishi, Takeuchi et al. 1999). В пользу такой функциональной взаимосвязи говорят результаты экспериментов *in vitro*, в которых показано, что Wnt5a взаимодействует с ROR2 и что эти два белка синергично активируют JNK (jun N-terminal kinase) в клеточных культурах (Schambony and Wedlich 2007). У *X. laevis* Wnt5a и ROR2 активируют сигнальный путь JNK и регулируют экспрессию параксиального протокадгерина *rapc* – гена, координирующего полярность клеток в процессе морфогенетических перемещений (Unterseher, Hefele et al. 2004). Нокдаун по Wnt5a, ROR2 или JNK фенотикирует дефекты клеточного поведения, ассоциированные со снижением функции APC. Напротив, Wnt5a повышает активность JNK и стимулирует экспрессию *rapc* по JNK- и ATF2 (activating transcription factor 2)-зависимому механизму. Таким образом, тирозин-киназная активность ROR2 важна для активации экспрессии *rapc* под действием лиганда Wnt5a.

Перечисленные выше исследования демонстрируют роль ROR2 в  $\beta$ -catenin-независимой сигнализации. Для объяснения того, как неканонический Wnt-сигналинг может обуславливать это действие были предложены разные механизмы (Ishitani, Ninomiya-Tsuji et al. 1999, Ishitani, Kishida et al. 2003, Topol, Jiang et al. 2003), однако на сегодня консенсус среди исследователей не достигнут. Сопасающаяся с ролью ROR2 в антагонизме  $\beta$ -catenin-зависимой сигнализации способность Wnt5a блокировать Wnt3a-зависимую активацию  $\beta$ -catenin существенно повышена в культуре клеток человека HEK93, устойчиво экспрессирующих ROR2 (см. в (Mikels and Nusse 2006). Напротив, Wnt5a почти не оказывает эффекта на Wnt3a-активацию  $\beta$ -catenin-зависимого люциферазного репортера в мышинной клеточной линии L, в которой уровни транскрипции ROR2 в 700 раз ниже, чем в клетках HEK293. При оверэкспрессии ROR2 в тех же L-клетках Wnt5a сильно подавляет Wnt3a-опосредованную активацию того же репортера. В этом контексте важно отметить, что ROR2-TM (конструкция, содержащая лишь внеклеточный и трансмембранный домены ROR2) снижает способность ROR2 дикого типа усиливать Wnt5a-зависимую сигнализацию, что указывает на возможное участие в цитоплазматической сигнализации связывания Wnt5a и ROR2 (Mikels and Nusse 2006).

В указанном исследовании (op. cit.) Wnt5a-сигнализация в  $\beta$ -catenin-независимой ветви каскада отводилась в  $\beta$ -catenin-зависимую ветвь при помощи оверэкспрессии Frizzled4 и LRP5, причем этот эффект нивелируется при оверэкспрессии ROR2. Как отмечают исследователи (Angers and Moon 2009), в рамках такой парадигмы представляется возможным, что специфичность сигнальных событий в каждой данной клетке может контролироваться не столько специфической

комбинацией Wnt-рецепторов, сколько репертуаром и уровнем экспрессии Wnt-лигандов и их рецепторов. Это интересная концепция, заслуживающая дальнейшей проверки, особенно для эндогенной экспрессии рецепторов и Wnt-белков. Клеточная контекст-зависимая модуляция Wnt-сигналинга (Itasaki 2003, Cselenyi and Lee 2008), возможно, также играет важную роль в определении того, какая ветвь Wnt-каскада –  $\beta$ -catenin-зависимая или независимая – активируется в каждом случае. Таким образом, следует проявлять осторожность в выводах, когда речь идет о том, что определенный Wnt-лиганд или Frizzled-рецептор отвечает за активацию определенной ветви каскада (Verkaar, Vanrosmalen et al. 2009).

*RYK как переносчик Wnt-сигналов.* Белок RYK представляет собой атипичный тирозинкиназный рецептор с дивергировавшим киназным доменом, для которого предсказано отсутствие киназной активности (Hovens, Stacker et al. 1992). Derailed (DRL) – гомолог RYK у *D. melanogaster* – так называемый направляющий рецептор, экспрессирующийся в конусах роста и аксонах нейронов комиссур и направляющий их рост через срединную линию центральной нервной системы. Для роста этих нейронов существует два маршрута роста – передняя и задняя комиссуры. DRL требуется для выбора маршрута передней комиссуры: у мутантных по DRL мух рост нейронов неустойчив и переключается на заднюю комиссуру. Поскольку DRL специфически экспрессируется в нейронах, выбирающих передний маршрут, было предсказано, что он действует как рецептор репеллентных, “отпугивающих” сигналов, исходящих из задней комиссуры (Bonkowsky, Yoshikawa et al. 1999). Важно отметить, что мисэкспрессия DRL в нейронах, предсказуемо растущих в заднем направлении, перенаправляет их рост по переднему пути. Используя такую мисэкспрессию, Yoshikawa с коллегами (Yoshikawa, McKinnon et al. 2003) провели скрининг аксонов, переключающихся обратно на заднюю комиссуру в мутантах, оверэкспрессирующих DRL. Интересно, что Wnt5a оказался одним из тех генов, которые при мутации доминантно подавляют образование фенотипов мисэкспрессии DRL и переключение выбора комиссуры.

При помощи мутаций loss-of-function было установлено, что Wnt5a вовлечен в выбор направления роста аксонов. DRL физически ассоциирует с Wnt5a, но функционирует независимо от Frizzled и Dishevelled. Это обстоятельство указывает на то, что DRL имеет собственный путь передачи сигнала. Интересно, что оверэкспрессия DRL, лишённого C-концевого домена, не способна перенаправлять рост аксона по переднему пути. Иными словами, даже при предположительно полностью нефункциональном киназном домене DRL способен активировать цитоплазматический сигнальный путь, возможно, благодаря взаимодействию с тирозинкиназой семейства Src (Wouda, Bansraj et al. 2008).

LIN-18 – гомолог RYK у *C. elegans* – связывается с гомологом Wnt MOM-2 и действует совместно с Frizzled и гомологами Wnt LIN-17 и LIN-44, соответственно, в ходе определения клеточных судеб в развитии вульвы (Рис. 4) (Inoue, Oz et al. 2004). По-видимому, в данном контексте этот гомолог RYK не функционирует в качестве ко-рецептора для Wnt. Действительно, двойные мутанты по *lin-17* и *lin-18* демонстрируют более сильные фенотипы, в сравнении с фенотипами мутантов по каждому из этих генов. Это обстоятельство указывает на то, что они работают независимо и в разных сигнальных путях.

В культуре клеток млекопитающих HEK293T RYK физически взаимодействует с Wnt1 и Wnt3a (Lu, Yamamoto et al. 2004). В экспериментах gain-of-function и loss-of-function по RYK на этих клетках выяснилось, что RYK необходим для Wnt-опосредованной активации  $\beta$ -catenin/TCF-люциферазного репортера. По-видимому, механизм сигнализации через RYK в данном случае отличается от такового у *D. melanogaster* и *C. elegans*.

По мере выяснения механизмов RYK-сигнализации, они все больше удивляют исследователей. Эксперименты по иммунолокализации выявили связь между ядерной локализацией RYK и нейрональной дифференцировкой (Рис. 4) (Lyu, Yamamoto et al. 2008). Дальнейшие эксперименты обнаружили, что RYK расщепляется в своей трансмембранной части при помощи  $\gamma$ -секретазы и/или presenilin, высвобождая при этом С-концевой протеолитический фрагмент, который далее транслоцируется в ядро. Интересно, что Wnt3a способствует ядерной транслокации внутриклеточного домена белка RYK, но не влияет на его расщепление. И механизмы, посредством которых Wnt3a может индуцировать ядерную транслокацию внутриклеточного домена RYK, и то, каким образом отщепляемый фрагмент обеспечивает регуляцию нейрональной дифференцировки остаются неясными. Эта роль Wnt3a/RYK-сигнализации в дифференцировке кортикальных нейронов контрастирует с хорошо охарактеризованной ролью Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализации в контроле обновления предшественников нейронов (Chenn 2002, Zechner, Fujita et al. 2003). Координированная интеграция и регуляция этих двух Wnt-путей может быть, таким образом, важной частью процесса нейрогенеза.

## 2.2. Регуляция активности Wnt-сигнальных путей

Регуляция активности Wnt-сигнализации осуществляется на разных уровнях широким спектром эффекторов – как агонистов, так и антагонистов, действующих как внутриклеточно (модуляция компонентов системы передачи сигнала в цитоплазме), так и внеклеточно (модуляция взаимодействия лиганд-рецептор). Эти модуляторы выполняют весьма важные функции контроля точной настройки Wnt-сигнализации и подавления или активации процессов индивидуального развития, регулируемых Wnt, таких как передне-задняя осевая разметка, сомитогенез, ангиогенез, васкуляризация, образование конечности, костей, зубов и глаза. Кроме того, регуляторы Wnt-сигнализации вовлечены в развитие ряда патологических процессов, таких как канцерогенез и заболевания костей. На данный момент известно шесть семейств секретируемых – белки Dickkopf (Dkks), secreted Frizzled-related proteins (sFRPs), Wnt inhibitory factor 1 (WIF-1), Wise/SOST, Cerberus, insulin-like growth-factor binding protein 4 (IGFBP-4) – и четыре семейства трансмембранных Wnt-антагонистов: Shisa, Wnt-activated inhibitory factor 1 (Wai1/5T4), adenomatosis polyposis coli down-regulated 1 (APCDD1) и Tiki1. Среди них наиболее полно охарактеризован белок Dkk.

Кроме собственно лигандов Wnt известно два семейства факторов роста, способных активировать Wnt-сигнализацию: Noggin и R-spondins (Rspo). Эти семейства белков неродственны друг другу; некоторые из них действуют специфично на канонический Wnt-путь, тогда как другие оказывают влияние как на каноническую, так и на неканоническую ветви сигнального каскада Wnt.

### 2.2.1. Секретируемые ингибиторы Wnt

#### 2.2.1.1. Семейство белков Dickkopf (Dkk)

*Физические свойства и структура.* Белки Dkk представляют собой небольшое семейство эволюционно консервативных секретируемых гликопротеинов. Первый фактор этого семейства, Dkk1, был описан как эмбриональный индуктор головных структур и антагонист Wnt у *Xenopus* (Glinka, Wu et al. 1998). С тех пор белки этого семейства были обнаружены у других позвоночных, включая человека, а так же у ряда беспозвоночных, таких как *Dictyostelium*, кишечнополостные, оболочники и асцидии, однако не у *Drosophila* и *Caenorhabditis elegans*.

У позвоночных семейство Dkk включает четыре фактора – Dkk1-4. Длина этих белков варьирует от 255 до 350 а.о.; для всех них характерно наличие двух консервативных цистеин-



богатых доменов (cysteine-rich domains, CRDs) (Рис. 5). N-концевая структура всех CRD уникальна для факторов Dkk, тогда как структура С-конца обнаруживает гомологию со структурой, называемой колипазной складкой (colipase fold), обнаруженной в широком спектре функционально несвязанных белков, включая такие как colipases, toxins, protease inhibitors и prokineticins (Niehrs 2006). Кроме двух CRD-доменов в структуре одного Dkk3 обнаружен sgy-домен.

Dkk3, по-видимому, представляет собой дивергирующий член семейства Dkk. Dkk1, -2 и -4 родственны друг другу в большей степени, чем белку Dkk3 (Glinka, Wu et al. 1998), при этом сиквенс самого Dkk3 заметно гомологичен soggy (sgy) – существенно дивергировавшему фактору семейства Dkk, называемому так же Dickkopf-like protein 1 (Krupnik, Sharp et al. 1999). Книдарии Hydra и Nematostella обладают лишь двумя генами Dkk, один из которых родственен Dkk1, -2 и -4 (Guder 2006), а второй – белку Dkk3 позвоночных (Fedders, Augustin et al. 2004).

О белке Soggy известно немного, кроме его возможной роли в сперматогенезе и гомологии с Dkk3 (Kaneko 2000, Kohn, Kaneko et al. 2005).

*Механизм действия.* Среди всех сигнальных каскадов, активируемых лигандами Wnt, белки семейства Dkk специфично подавляют активность Wnt/ $\beta$ -catenin-пути. Dkk1 и Dkk2 высокоаффинно связываются с LRP5/6 с  $K_d$  в пределах от 0.3 до 0.7 нМ (Bafico, Liu et al. 2001, Mao, Wu et al. 2001, Semenov, Tamai et al. 2001). Как и для Dkk1 и Dkk2, для белка Dkk4 было показано функциональное взаимодействие с LRP6. Dkk3, напротив, не связывается с LRP6 и не влияет на Wnt-сигнализацию (Mao, Wu et al. 2001, Mao and Niehrs 2003), однако регулирует активность каскада TGF- $\beta$  (Pinho and Niehrs 2007). В структуре LRP6 связывание с Dkk1 опосредует домен YWTD-EGF (Mao, Wu et al. 2001). Для связывания с LRP6 и подавления активности Wnt-сигнализации в структуре Dkk1 критична колипазная складка С-концевого домена, но не N-конец (Brott and Sokol 2002, Li, Mao et al. 2002, Mao and Niehrs 2003), а мутация консервативного Cys-220 в структуре колипазной складки делает взаимодействие невозможным (Semenov, Tamai et al. 2001). Генетические доказательства взаимодействия Dkk1-LRP6 получены в экспериментах по спасению фенотипа с серьезными дефектами развития, наблюдаемыми у мышей с двойным нокаутом по LRP6/Dkk1 (MacDonald 2004).

Кроме LRP5/6 белки Dkk высокоаффинно связываются с рецепторами другого класса – Kremen1 и Kremen2 (Krm1/2), эволюционно консервативными трансмембранными белками. Содержащиеся в структуре этих рецепторов домены Kringle, WSC и CUB критичны для взаимодействия с Dkk1 (Mao, Wu et al. 2002). Белки Kremen связываются как с Dkk1, так и с Dkk2 – но не с Dkk3 – с  $K_d$  в наномолярных пределах (Mao, Wu et al. 2002).

Как и при взаимодействии DKK1-LRP6, наличие колипазной складки Dkk1 необходимо и достаточно для его взаимодействия с Kremen (Mao and Niehrs 2003). Krm1/2 сильно потенцирует способность Dkk1 подавлять сигнализацию Wnt. В loss-of-function экспериментах было продемонстрировано взаимодействие этих белков *in vivo*. Нокдаун по Krm1/2 при помощи морфолино у зародышей *Xenopus* индуцирует дефекты развития головы, которые могут быть нивелированы оверэкспрессией мРНК Dkk1. Кроме этого, при одновременном подавлении экспрессии Dkk1 и Krm1/2 наблюдается существенное усиление дефектов головных структур (Davidson 2002). Более того, у мышей эти белки генетически взаимодействуют в процессе развития конечности; у тройных мутантов Krm1<sup>-/-</sup>/Krm2<sup>-/-</sup>/Dkk<sup>+/-</sup> наблюдается повышенное образование эктопических пальцев (Ellwanger, Saito et al. 2008).

Основной режим действия Dkk1 заключается в предотвращении взаимодействия Wnt-LRP6 и нарушении Wnt-индуцированного образования комплекса Fz8-LRP6 (Рис. 6) (Semenov, Tamai et al. 2001). Кроме того, в присутствии Kremen Dkk1 может образовывать тройственный комплекс с Krm2 и LRP6, инициировать быстрый эндоцитоз и таким образом удалять LRP6 из клеточной мембраны (Рис. 6Б) (Mao, Wu et al. 2002). Недавние биохимические исследования (Semenov, Zhang et al. 2008, Wang, Zhang et al. 2008) и описание двойных мышинных мутантов Krm1<sup>-/-</sup>/Krm2<sup>-/-</sup> обнаружили, что Kremen не являются универсально обязательными для функционирования Dkk1, однако в определенных тканях их взаимодействие физиологически актуально, а способность Dkk1 препятствовать взаимодействию Wnt-LRP6 может быть достаточной для эффективного подавления Wnt-сигнализации в разных клеточных типах.

*Двойная роль Dkk2.* В отличие от чистого ингибитора канонической Wnt-сигнализации Dkk1, Dkk2 способен в зависимости от клеточного контекста работать в качестве и ингибитора, и активатора этого сигнального пути. При оверэкспрессии у *Xenopus*, Dkk2 действует синергично с ко-экспрессирующимися Fz8 (Wu, Glinka et al. 2000) или LRP6 (Brott and Sokol 2002), индуцируя Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализацию. В клеточных культурах HEK293T и NIH3T3 Dkk2 подавляет активность канонического Wnt-каскада при ко-трансфекции с Wnt и Fz и активирует его при ко-трансфекции с LRP5/6 (Wu, Glinka et al. 2000, Li, Mao et al. 2001, Mao and Niehrs 2003), причем колипазная складка Dkk2, по-видимому, достаточна для этой синергии (Li, Mao et al. 2001). Однако в присутствии Krm2 Dkk2 работает как ингибитор (Mao and Niehrs 2003), что указывает на возможное влияние рецепторного контекста.

Структурно-функциональный анализ обнаруживает, что изолированная колипазная складка Dkk1 достаточна для синергии с LRP6 при активации Wnt-каскада, тогда как N-концевой домен Dkk важен для проявления ингибиторного эффекта. N-концевой домен Dkk2 в этом отношении

нейтрален (Brott and Sokol 2002). Таким образом, в то время как калипазная складка Dkk1/2 опосредует связывание этих белков с LRP5/6, N-концевой домен модулирует результаты этого взаимодействия (op. cit.).

*Роль Dkk в эмбриональном развитии и патологических процессах.* Учитывая важнейшую роль, которую играют белки Wnt в процесса эмбрионального развития, неудивительно, что одна из основных функций белков Dkk, для экспрессии которых характерна выраженная регионализация – контроль над клеточной дифференцировкой у позвоночных (Grotewold, Theil et al. 1999, Monaghan, Kioschis et al. 1999, Hashimoto, Itoh et al. 2000, Shinya, Eschbach et al. 2000, Chapman, Brown et al. 2004, Diep, Hoen et al. 2004, Idkowiak, Weisheit et al. 2004, Fjeld, Kettunen et al. 2005, Nie 2005, Nie, Luukko et al. 2006).

*Dkk1 и разметка передне-задней оси.* Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализация играет важную роль в первичной эмбриональной разметке передне-задней оси. Совместно с BMP- и Nodal/Activin-каскадами Wnt/ $\beta$ -catenin-путь в целом подавляет развитие передних структур и в особенности переднего мозга. Это действие предотвращается у *Xenopus* шпемановским организатором, у рыб зародышевым щитком, а у мыши передней мезоэнтодермой – структурами, секретирующими коктейль антагонистов ростовых факторов (De Robertis and Kuroda 2004, Niehrs 2004, Niehrs 2010).

Dkk1 первоначально был идентифицирован как ген, отвечающий за активность шпемановского организатора в зародышах шпорцевой лягушки. Он специфично экспрессируется в передней мезоэнтодерме и индуцирует полные эктопические головы при ко-экспрессии с ингибиторами BMP, тогда как инъекция антител к Dkk1 продуцирует фенотипы с уменьшенной головой или вовсе без головы (Glinka, Wu et al. 1998).

У зародышей *Danio rerio* Dkk1 также экспрессируется в производных организатора во время гастрюляции (Hashimoto, Itoh et al. 2000, Shinya, Eschbach et al. 2000) и при оверэкспрессии обеспечивает передне-нейральное развитие (Hashimoto, Itoh et al. 2000). Эти данные говорят в поддержку модели, согласно которой Wnt/ $\beta$ -catenin-активность подавляет эмбриональное развитие передних структур, в норме предотвращаемое действием Dkk1.

У мышинных зародышей Dkk1 экспрессируется с начала гастрюляции до стадии нейрулы в передней висцеральной энтодерме, передней мезоэнтодерме и энтодерме передней кишки, соответственно – тканях, ассоциированных с передней спецификацией. У зародышей мутантных по Dkk1 мышей отсутствуют структуры впереди от границы между задним и средним мозгом, и уже на стадии E7.5 передний маркер *Hesx1* не экспрессируется (Mukhopadhyay, Shtrom et al. 2001). В то время как гетерозиготные по Dkk1 мыши нормально развиты и фертильны, у двойных гетерозигот по Dkk1 и *Noggin* обнаруживаются дефекты развития головы, сходные с таковыми у мутантов,

гомозиготных по *Dkk1* (del Barco Barrantes 2003). Это говорит в пользу модели, согласно которой одновременное подавление BMP- и канонической Wnt-сигнализации необходимо для развития головных структур (Glinka, Wu et al. 1997).

*Dkk1* также играет важную роль на прегаструляционных стадиях E5.5-E6, когда первичная проксимо-дистальная ось мышиноного зародыша конвертируется в передне-заднюю полярность при помощи процесса, требующего координированной миграции клеток (Kimura-Yoshida, Nakano et al. 2005). Двойные мутанты *LRP5<sup>-/-</sup>/LRP6<sup>-/-</sup>* не способны индуцировать и/или поддерживать предшественников первичной полоски в проксимальном эпибласте мышиноного зародыша до начала гаструляции (Kelly 2004).

*Роль Dkk в формировании конечности, костей и глаза.* Во время раннего развития конечности активация Wnt/ $\beta$ -catenin-пути лигандом Wnt3a требуется для формирования апикального эктодермального гребня (АЭГ), важного сигнального центра, контролирующего рост конечности (Barrow 2003, Soshnikova 2003). При оверэкспрессии *Dkk1* в курином зародыше наблюдается развитие укороченной конечности, сопровождаемое апоптозом (Mukhopadhyay, Shtrom et al. 2001, Grotewold 2002). Напротив, повышенная активность Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализации при gain-of-function мутации  $\beta$ -catenin ведет к увеличению АЭГ. Расширение зоны АЭГ наблюдается как в null-мутантах по *Dkk1*, так и у гипоморфных мутантов *Dkk1<sup>d/d</sup>*, что указывает на возможное взаимодействие с Wnt3a (Mukhopadhyay, Shtrom et al. 2001, Adamska, MacDonald et al. 2004). В дополнение к расширению зоны АЭГ, вышеуказанные мутанты демонстрируют полисиндактилию передних конечностей (Mukhopadhyay, Shtrom et al. 2001, MacDonald 2004), причем нормальное количество пальцев восстанавливается у мышей *Dkk1<sup>d/d</sup>/LRP6<sup>+/-</sup>* (MacDonald 2004). Полидактилия у мутантов по *Dkk1* может быть устранена при одновременном выключении Wnt7a (Adamska, MacDonald et al. 2004). Таким образом, *Dkk1* способен контролировать разные шаги Wnt3- или Wnt7a-сигнализации в процессе развития конечности и разметки пальцев у мышей.

Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализация играет центральную роль в регуляции плотности костей млекопитающих (Krishnan 2006). Loss-of-function мутации по *LRP5* ассоциированы с синдромом рецессивного семейного остеопороза-псевдоглиомы (Gong, Slee et al. 2001), тогда как gain-of-function мутации по *LRP5* связаны с развитием патологий повышенного остеогенеза (Boyden, Mao et al. 2002). Интересно, что для одной конкретной gain-of-function мутации, а именно G171V, предполагается, что ослабление ингибиторной функции *Dkk1* в отношении *LRP5* ведет к усилению сигнализации через *LRP5* (Boyden, Mao et al. 2002, Ai, Holmen et al. 2005). Как и у человека, у мышей-гетерозигот по *Dkk1<sup>+/-</sup>* обнаруживается повышение минеральной плотности костей

(Morvan, Boulukos et al. 2006, MacDonald, Joiner et al. 2007). Напротив, трасгенные мыши, оверэкспрессирующие *Dkk1* в костях, страдают остеопенией (Li, Sarosi et al. 2006). Это может указывать на подавление белком *Dkk1* активности сигналинга через систему Wnt-LRP5 как способ регуляции уровня остеогенеза.

Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализация играет важную роль в процессе развития глаза, и факторы *Dkk1-3* экспрессируются в этом органе на высоком уровне (более детально см. (Niehrs 2006)). Тяжесть дефектов развития головных структур у null-мутантов по *Dkk1* однозначно свидетельствует в пользу высокой важности этого фактора в регуляции развития глаза. В отличие от *Dkk1*, мышинокауты по *Dkk2* остаются жизнеспособными, но слепыми из-за кератинизации корнеального эпителия и кожных производных как следствие конститутивной активации Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального каскада в процессе развития роговицы (Mukhopadhyay, Gorivodsky et al. 2006).

#### 2.2.1.2. Семейство белков sFRP

*Физические свойства и структура.* Белки sFRP объединяются в большое семейство секретлируемых ингибиторов Wnt и напоминают по структуре лиганд-связывающий CRD-домен Wnt-рецепторов семейства Frizzled. Первый фактор этого семейства, Frzb, был впервые выделен как хордогенный фактор из экстрактов бычьих хрящей (Hoang, Moos et al. 1996). Вскоре после этого Frzb был изолирован при дифференциальном скрининге кДНК шпемановского организатора зародышей *Xenopus* (Bouwmeester, Kim et al. 1996) и охарактеризован как антагонист Wnt (Leyns, Bouwmeester et al. 1997, Wang, Krinks et al. 1997). После этого были описаны дополнительные факторы этого семейства (Finch, He et al. 1997, Melkonyan, Chang et al. 1997, Rattner, Hsieh et al. 1997).

У человека семейство sFRP включает пять факторов, sFRP1-5, один из которых – sFRP3 – является ортологом Frzb. Другие ортологи были найдены в геномах всех изученных на данный момент позвоночных, а также беспозвоночных, за исключением дрозофилы (Bovolenta, Esteve et al. 2008). На основе гомологичных последовательностей и данных филогенетического анализа sFRP1, -2 и -5 объединяются в подгруппу, дивергировавшую от подгруппы, в которую входят sFRP3 и -4 (Jones and Jomary 2002, Kawano 2003, Bovolenta, Esteve et al. 2008). Эта кластеризация также отражает различия в организации генома. Подобно человеческому *Dkk1*, -2 и -4, факторы sFRP1, -2 и -5 расположены в пределах хромосом одной группы паралолии 4/5/8/10, тогда как sFRP3 и -4 находятся за пределами этой группы. Третья подгруппа факторов sFRP была обнаружена у шпорцевой лягушки, курицы и данио, но не у млекопитающих. Факторы этой подгруппы – Sizzled, Sizzled2 и Crescent – гомологичны по последовательности факторам sFRP1, -2 и -5 (Pfeffer, De

Robertis et al. 1997, Salic, Kroll et al. 1997, Bradley, Sun et al. 2000, Pera and De Robertis 2000, Houart, Caneparo et al. 2002).

Человеческие белки sFRP включают 295-346 а.о. и обладают CRD-доменом в составе N-концевой области. Эти CRD-домены факторов семейства sFRP на 30-70% гомологичны CRD-домена рецепторов Frizzled и содержат 10 консервативных остатков цистеина (Rehn, Pihlajaniemi et al. 1998), образующих паттерн дисульфидных связей (Chong, Uren et al. 2001). В С-концевой части факторов sFRP располагается домен NTR (Netrin-related motif), обнаруженный в большом количестве неродственных белков, включая аксон-направляющий белок netrin 1, тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMPs), type-1 procollagen C-proteinase enhancer proteins (PCOLCEs) и белки системы комплемента (Рис. 5) (Bányai and Patthy 1999). NTR-домен характеризуется наличием сегментов положительно заряженных остатков (Uren, Reichsman et al. 2000), по-видимому определяющих гепарин-связывающие свойства, и шестью остатками цистеина, образующих дисульфидные мосты (Chong, Uren et al. 2001).

*Механизм действия.* Первоначальный биохимический и функциональный анализ, проведенный на зародышах шпорцевой лягушки и в клеточных культурах показал, что Frzb/sFRP3 связывает Wnt1 и XWnt8 и подавляет активность сигнального каскада Wnt/ $\beta$ -catenin (Leysn, Bouwmeester et al. 1997, Lin, Wang et al. 1997, Wang, Krinks et al. 1997). Эти данные говорят в пользу модели, согласно которой белки sFRP подавляют Wnt-сигнализацию, вытесняя лиганд Wnt из активного рецепторного комплекса (Рис. 6B). CRD-домен Frzb скорее всего необходим и достаточен для обеих активностей – и для связывания, и для подавления Wnt (Lin, Wang et al. 1997). На этом фоне у мутантов по sFRP1, лишенных CRD-домена, сохраняется способность связывать Wingless – дрозофилиный гомолог Wnt (Uren, Reichsman et al. 2000). В другой работе по изучению структуры и функций sFRP1 при помощи Wnt-репортерных конструкций получены данные, указывающие на то, что для оптимального подавления Wnt-сигнализации критичны оба домена – CRD и NTR (Bhat, Stauffer et al. 2007). Более того, в недавнем комбинированном биохимическом и функциональном исследовании sFRP1, проведенном на культурах клеток и эмбрионах рыбы медака, было показано, что NTR-домен сохраняет функцию полноразмерной молекулы в отношении связывания Wnt8 и подавления Wnt-сигнализации (Lopez-Rios, Esteve et al. 2008). Такие противоречивые результаты могут означать, что в структуре факторов sFRP содержатся множественные сайты связывания и/или пары sFRP-Wnt образуются с разной аффинностью. Действительно, в то время как для sFRP1-4 была показана способность связывать Wnt3a с аффинностью в пределах наномолярных значений, лиганд Wnt5a способен связывать лишь sFRP1 и -2, но не sFRP3 и -4. Кроме того, Wnt3a сигнализацию в L-клетках способны блокировать

только sFRP1 и -2 (Wawrzak, Metioui et al. 2007). В ряде других работ была описана возможная биохимическая и/или функциональная специфичность взаимодействий sFRP-Wnt в разных эмбриологических моделях, включая нервную трубку (Galli, Barnes et al. 2006), сомиты (Lee, Buttitta et al. 2000), сосудистый эндотелий (Dennis, Aikawa et al. 1999) и эмбриональное сердце (Schneider 2001), а также в процессе разметки передне-задней оси зародышей шпорцевой лягушки (Bradley, Sun et al. 2000, Pera and De Robertis 2000).

При определении кристаллической структуры CRD-доменов рецептора Fz8 и sFRP3 мыши обнаружился потенциал этих доменов к димеризации (Dann, Hsieh et al. 2001). В пользу такой возможности говорит способность белков sFRP и Fz образовывать гомо- и гетеромерные комплексы через посредство CRD-доменов (Bafico, Gazit et al. 1999, Rodriguez, Esteve et al. 2005). На основе этих данных предложена альтернативная модель подавляющего действия белков sFRP на Wnt-сигнализацию через формирование нефункциональных комплексов с рецепторами Fz (Рис. 6Г).

В отличие от белков Dkk, специфично ингибирующих каноническую Wnt-сигнализацию, факторы sFRP способны подавлять активность в неканоническом Wnt/CPC-пути (Li, Rankin et al. 2008, Satoh, Matsuyama et al. 2008, Matsuyama, Aizawa et al. 2009, Sugiyama, Stump et al. 2010). Это неудивительно, учитывая тот факт, что факторы sFRP эффективно связывают оба типа лигандов Wnt. Wnt/PCP-сигнализация, сама по себе, находится в антагонизме с активностью Wnt/ $\beta$ -catenin-каскада (Yan, Wallingford et al. 2001, Schwarz-Romond 2002, Simons, Gloy et al. 2005, Li, Esterberg et al. 2011), поэтому ее подавление факторами sFRP может объяснять одновременную активацию Wnt/ $\beta$ -catenin-каскада (Swain, Katoh et al. 2005). Интересно отметить, что у шпорцевой лягушки Frzb и Crescent способны активировать канонический Wnt-путь путем усиления диффузии Wnt8 и Wnt11 (Mii and Taira 2009).

Кроме Wnt-сигнализации факторы sFRP способны регулировать другие сигнальные системы. sFRP1, например, связывается с RANKL – белком из семейства TNF, – блокируя при этом образование остеокластов (Häusler, Horwood et al. 2004). sFRP1, кроме того, может взаимодействовать с металлопротеиназой ADAM10 и подавлять ее активность, выполняя при роль негативного регулятора сигнализации Notch в процессе нейрогенеза сетчатки (Esteve, Sandonis et al. 2011). Фактор Sizzled связывает и ингибирует активность BMP1/Tolloid – металлопротеиназы, обеспечивающей расщепление антагониста BMP chordin, таким образом подавляя BMP-сигнализацию (Lee, Ambrosio et al. 2006).

*Роль sFRPs в эмбриональном развитии и патологических процессах.* Паттерн экспрессии нескольких факторов sFRP проанализированы в разных эмбриональных системах, включая рыбу

медака, шпорцевую лягушку, курицу и мышь. sFRP демонстрируют динамические, частично перекрывающиеся, но вполне различимые паттерны экспрессии. Для изучения роли этих факторов в эмбриогенезе были созданы линии мышей с нокаутами по *Sfrp1*, *Sfrp2* и *Sfrp5* (Leaf, Tennessen et al. 2006, Satoh 2006), а так же линии двойных и тройных мутантов с разными комбинациями мутаций в гомо- и гетерозиготах по двум или всем трем генам (Satoh, Matsuyama et al. 2008). Кроме двойных мутантов *Sfrp1*<sup>-/-</sup>/*Sfrp2*<sup>-/-</sup> и тройных мутантов *Sfrp1*<sup>-/-</sup>/*Sfrp2*<sup>-/-</sup>/*Sfrp5*<sup>-/-</sup>, остальные линии мышей сохраняют жизнеспособность и фертильность и не имеют очевидных отклонений в общей морфологии, что говорит об избыточной роли факторов sFRP а эмбриональном развитии. Напротив, одновременная инактивация *Sfrp1* и *Sfrp2* дает абортное развитие из-за серьезного укорочения передне-задней оси и неполной сегментации сомитов, причем эти нарушения проявляются еще сильнее при дополнительной инактивации *Sfrp5*. Генетический анализ комбинированных тройных *Sfrp*-нокаутных мышей и мышей фенотипа Loop tail, несущих мутацию в *Stbm/Vangl2*, вскрыл участие факторов sFRP в конвергентном вытяжении через регуляцию сигнального каскада Wnt/PCP (Satoh, Matsuyama et al. 2008). Кроме того, *Dkk1*-дефицитные зародыши, несущие *Sfrp1*-гомозиготные или *Sfrp2*-гетерозиготные мутации, формируют неправильные сомиты с размытыми межсомитными границами, указывая на то, что sFRP-опосредованное подавление Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализации критично для сомитогенеза (Satoh, Matsuyama et al. 2008).

Кроме регуляции элонгации передне-задней оси и сомитогенеза в ходе развития мышиноного зародыша, *Sfrp1* и -2 принимают участие и в эмбриональных органогенезах; так, оба гена требуются для нормального полового развития самцов мыши (Warr, Siggers et al. 2009).

Наряду с участием в качестве ингибиторов в регуляции Wnt-сигнального каскада, есть свидетельства того, что белки sFRP могут работать как гены опухолевой супрессии, поскольку исчезновение или снижение экспрессии sFRP наблюдается в целом спектре инвазивных карцином. Эпигенетическое выключение (гиперметилирование) sFRP1 и -2 наблюдается практически во всех опухолевых типах, а статус метилирования промотора sFRP1 даже предлагается в качестве биомаркера для диагностики рака и оценки опухолевой прогрессии (Bovolenta, Esteve et al. 2008, Esteve and Bovolenta 2010). Факторы sFRP также вовлечены в другие патологические процессы, такие как остеолитическая гетеротопическая оссификация (Gordon, Southam et al. 2007) и дегенерация фоторецепторов (Nackam 2005).



### 2.2.1.3. WIF-1

WIF-1 (Wnt-inhibitory factor 1) был первоначально определен как маркер экспрессируемой последовательности из сетчатки человека (Hsieh, Rattner et al. 1999). Он обнаружен у рыб, амфибий и млекопитающих. Wif-1 экспрессируется в широком спектре тканей, наиболее активно в мозге, легком, сетчатке и хрящах (Hsieh, Rattner et al. 1999, Hunter, Zhang et al. 2004, Hu, Gu et al. 2008, Surmann-Schmitt, Widmann et al. 2009) и представляет собой белок длиной 379 а.о. с уникальным высококонсервативным WIF-доменом, пятью EGF-подобными повторами и гидрофильным хвостом (Рис. 5). Стоит отметить, что WIF-домен обнаруживается также во внеклеточном домене тирозин-киназного рецептора RYK. При оверэкспрессии WIF-1 у зародышей шпорцевой лягушки происходит индукция вторичной оси и нарушается сомитогенез. Учитывая способность WIF-1 блокировать активность XWnt8, этот факт указывает на роль в регуляции активности Wnt-каскада (Hsieh, Rattner et al. 1999).

Действительно, WIF-1 связывается с лигандами XWnt8 и Wingless и подавляет взаимодействие между XWnt8 и Fz2 у *Drosophila* (op. cit.). Эти данные дают основание предположить, что подобно факторам sFRP, WIF-1 препятствует связыванию лигандов Wnt с рецепторами, влияя таким образом на активность как канонической, так и неканонических ветвей Wnt-сигнального пути (Рис. 6B). Недавно было показано, что WIF-1 связывается с лигандами Wnt обоих типов, включая Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt9a и Wnt11 и регулирует Wnt-активность в процессе развития хрящей (Surmann-Schmitt, Widmann et al. 2009).

Механизм регуляции Wnt-сигналинга белком WIF-1 остается не вполне понятным, однако наблюдаемое выключение WIF-1 в разных опухолях указывает не то, что, подобно белкам семейств Dkk и sFRP, этот секретируемый фактор выполняет важную роль при канцерогенезе и других биологических процессах, требующих участия Wnt-сигнального каскада (Chien, Conrad et al. 2009, Kansara, Tsang et al. 2009, Elston and Clifton-Bligh 2010).

### 2.2.1.4. Wise и SOST

Wise, известный также как SOSTDC1 (sclerostin domain-containing 1), Ectodin и USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1), выделен при функциональном анализе активностей, влияющих на передне-задний характер тканей нейтральных зародышей шпорцевой лягушки (Itasaki 2003). Анализ последовательности и структуры выявил, что Wise образует цистиновый узел (Ellies, Viviano et al. 2006, Lintern, Guidato et al. 2009) и вместе с SOST принадлежит CAN – подсемейству антигонистов BMP, в структуре которых содержатся цистиновые узлы (Avsian-Kretchmer and Hsueh 2004). У шпорцевой лягушки Wise, по-видимому, выполняет роль контекст-

зависимого регулятора Wnt-сигнализации; он может как подавлять, так и активировать ее в разных условиях (Itasaki 2003).

В культурах клеток Wise блокирует активность Wnt1 и Wnt3a в экспериментах с люциферазными репортерами (Yanagita, Oka et al. 2004, Blish, Wang et al. 2008). Он взаимодействует с LRP6 через одну из трех петель, образуемых цистиновым узлом (Lintern, Guidato et al. 2009) и способен конкурировать с Wnt8 за связывание с LRP6 (Рис. 6Д) (Itasaki 2003). Wise способен подавлять Wnt-сигнализацию не только паракринно, но и находясь внутри эндоплазматического ретикулама, уменьшая пул LRP6 на клеточной поверхности (Guidato and Itasaki 2007). Кроме того, Wise связывает рецептор LRP4 (Ohazama, Johnson et al. 2008), способный модулировать Wnt-сигнализацию, опосредованную LRP5/6 (Ohazama, Johnson et al. 2008, Li, Pawlik et al. 2010).

Wise экспрессируется в различных тканях, включая заднюю покровную эктодерму, жаберные дуги, дермальных сосочках волосяных фолликулов и вибрисс, зубной бугорок, эндометрий крысы, эмбриональные яички и почки (Lintern, Guidato et al. 2009). Null-мутанты по Wise сохраняют жизнеспособность и фертильность и по виду здоровы, за исключением некоторых аномалий развития зубов, которые, судя по всему, также указывают на участие Wise в регуляции активности канонической Wnt-сигнализации (Ahn, Sanderson et al. 2010).

Белки Wise и SOST объединяет гомология первичной структуры (38%) и наличие цистинового узла (Рис. 5). SOST экспрессируется на высоком уровне в остеобластах и остеоцитах, а loss-of-function мутации и поавление функции SOST проявляются в двух редких формах аутосомно-рецессивного краниотубулярного гиперостоза, склеростеозе (Balemans 2001, Brunkow, Gardner et al. 2001) и болезни ван Бухема (Balemans 2002, Staehling-Hampton, Proll et al. 2002), характеризующейся избыточным ростом костной ткани.

SOST подавляет Wnt-активность через связывание с первыми двумя YWTD-EGF-повторами в структуре LRP5/6 (Li 2005, Semenov, Tamai et al. 2005).

Подбно Dkk1, SOST обладает способностью нарушать Wnt-индуцированное образование комплекса Fz8-LRP6 (Рис. 6Д), на основе чего делаются выводы о механизме его действия (Semenov, Tamai et al. 2005). Иными словами, утрата функции SOST, вероятно, сопровождается гиперактивацией Wnt-сигнализации, что стимулирует избыточный рост ростей при связанных с этим заболеваниях. Интересно, что склеростеоз демонстрирует ряд черт, характерных для фенотипов с gain-of-function по гену LRP5, например, при точечной мутации G171V (Boyden, Mao et al. 2002, Little, Folz et al. 2002). Эта мутация, как и аналогичная мутация в LRP6 (G158V) блокирует связывание SOST и LRP6 (Ellies, Viviano et al. 2006, Semenov and He 2006).

Доказательства генетического взаимодействия между SOST и LRP6 получены также в rescue-экспериментах. У двойных доминантных мышей SOST<sup>-/-</sup>/LRP6<sup>-/-</sup> дефекты развития передних и задних конечностей, наблюдаемые у мутантов LRP6<sup>-/-</sup>, нивелируются (Collette, Genetos et al. 2010).

#### 2.2.1.5. Cerberus

Cerberus был выделен из зародышей шпорцевой лягушки как активно экспрессирующийся ген, специфичный для организатора, способный индуцировать головы при эктопической оверэкспрессии в зародышах *Xenopus* (Bouwmeester, Kim et al. 1996). Родственные ему гены обнаружены у других позвоночных, включая данию, курицу и мышь (Belo, Silva et al. 2009). Все они обладают цистиновым узлом в С-концевом домене (Рис. 5) и подвергаются протеолитическому расщеплению после секреции (Piccolo, Agius et al. 1999). У шпорцевой лягушки Cerberus связывается с белками Nodal, BMP и Wnt через независимые сайты и подавляет сигнальные каскады всех трех лигандов, что ведет к одновременному блокированию развития головы и туловища (op. cit.). Напротив, морфолино-опосредованный нокдаун Cerberus в зародышах *Xenopus* нарушает индукцию головных структур (Silva 2003, Kuroda, Wessely et al. 2004).

В отличие от своего гомолога у амфибий, мышинный Cerl-1 не связывает лиганды Wnt, не влияет на сигнализацию в соответствующих каскадах (Belo, Bachiller et al. 2000) и не требуется для индукции головы (Simpson, Johnson et al. 1999, Belo, Bachiller et al. 2000, Shawlot, Min Deng et al. 2000). Белки, родственные Cerberus, скорее выполняют функцию ключевых регуляторов сигнального каскада Nodal и играют важную роль в латерализации (формирования лево-правой асимметрии) зародышей позвоночных (Rodriguez Esteban, Capdevila et al. 1999, Yokouchi, Vogan et al. 1999, Zhu, Marvin et al. 1999, Hashimoto 2004, Marques 2004, Tavares, Andrade et al. 2007, Vonica and Brivanlou 2007).

#### 2.2.1.6. IGFBP-4

IGFBP-4 принадлежит семейству белков IGFBP (insulin-like growth factor binding proteins), модулирующих активности ростовых факторов группы IGF (Firth and Baxter 2002). IGFBP-4 был обнаружен при поиске факторов, способных к индукции дифференцировки кардиомиоцитов в клетках P19CL6 (Zhu, Shiojima et al. 2008). Он обеспечивает кардиогенез по IGF-независимому механизму, а именно через подавление канонической Wnt-сигнализации (op. cit.). Связывается он непосредственно с LRP6 и Fz8 через С-терминальный тироглобулиновый домен и блокирует присоединение Wnt3а к рецептору (Рис. 6Е). Морфолино-нокдаун IGFBP-4 у шпорцевой лягушки вызывает дефекты сердца, сходные с таковыми при оверэкспрессии XWnt8. Эти дефекты

устраняются при коэкспрессии с доминант-негативной формой LRP6. Это говорит о том, что кардиогенное влияние IGFBP-4 опосредовано подавлением Wnt/ $\beta$ -catenin-сигналикации.

На сегодня определено шесть факторов семейства IGFBP – IGFBP1-6, – три из которых (IGFBP-1, -2 и -6, но не IGFBP-3 и -5) способны, как и IGFBP-4, напрямую связываться, хотя и с более низкой эффективностью, LRP6 и Fz8 и подавлять активность сигнального пути Wnt/ $\beta$ -catenin (Zhu, Shiojima et al. 2008).

### 2.2.2. Трансмембранные ингибиторы Wnt

#### 2.2.2.1. Семейство белков Shisa

Семейства Shisa у позвоночных включает пять подсемейств (Furushima, Yamamoto et al. 2007). Недавно к ним было добавлено еще четыре подсемейства (Pei and Grishin 2012). Белки Shisa объединяет общий сигнальный пептид, CRD-домен в N-концевом домене, трансмембранный сегмент и C-терминальный регион, обогащенный остатками пролина (Рис. 5) (op. cit.). Базовый член семейства – белков Shisa 1 шпорцевой лягушки – был описан как ген, специфично экспрессирующийся в презумптивной головной эктодерме и шпемановском организаторе (Yamamoto, Nagano et al. 2005). У зародышей шпорцевой лягушки при оверэкспрессии Shisa 1 наблюдается увеличение передне-нейральных структур, а при одновременном подавлении сигнализации BMP происходит индукция вторичной головы. Нокдаун по этому белку при помощи инъекции морфолино в зародышах *Xenopus* подавляет экспрессию передне-нейральных маркеров и развитие головных структур – сильное свидетельство участия в развитии головы. Shisa1 не подавляет BMP- и Nodal-сигналикацию, однако действует при индукции головы как ингибитор Wnt и FGF. Он функционирует в пределах клетки, захватывая Fz- и FGF-рецепторы и препятствуя их созреванию (Yamamoto, Nagano et al. 2005).

У амфибий найдено три паралогичных XShisa1 гена XShisa2-4 (Nagano, Takehara et al. 2006, Silva, Filipe et al. 2006). XShisa2 экспрессируется в сомитной мезодерме и, подобно Shisa1, ингибирует каскады Wnt и FGF, регулируя тем самым сегментное паттернирование в процессе сомитогенеза (Nagano, Takehara et al. 2006). Гомологи Shisa были так же обнаружены у рыбы данио, крысы, мыши, курицы и человека (Katoh and Katoh 2005, Furushima, Yamamoto et al. 2007, Hedge and Mason 2008, Zhu, Tsuchida et al. 2008).

У мыши обнаружено четыре фактора этого семейства – mShisa и mShisa3-5 (Furushima, Yamamoto et al. 2007). Экспрессия mShisa по профилю напоминает XShisa1 и -2. Он экспрессируется в передней висцеральной энтодерме, передней мезоэнтодерме, передней нейроэктодерме и сомитной мезодерме (op. cit.). Как и Xshisa 1 и -2, оверэкспрессия mShisa

подавляет сигнализацию Wnt в клетках амфибий и млекопитающих. Однако mShisa2/2-мутантные мыши не обладают никаким характерным фенотипом ни в отношении головных структур, ни в отношении сомитогенеза, как и двойные нокауты по mShisa и mShisa3, -4 или -5 (op. cit.). Эти данные говорят о возможной компенсации утраты функции Shisa другими Wnt-антагонистами, такими как Dkk, sFRP и Cerberus.

#### 2.2.2.2. Waif1/5T4

Ген Waif1a был обнаружен при профилировании генной экспрессии и функционально охарактеризован у зародышей данио как прямая генная мишень каскада Wnt/ $\beta$ -catenin (Kagermeier-Schenk, Wehner et al. 2011). Продукт этого гена представляет собой белок с одним трансмембранным доменом, несколькими внеклеточными повторами, обогащенными остатками лейцина и коротким С-концом без консервативных участков (Рис. 5). У данио и шпорцевой лягушки Waif1a экспрессируется в раннем эмбриогенезе в областях активной Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализации, в особенности в дорсолатеральном приграничном эпибласте во время гастрюляции; его экспрессия напрямую регулируется Wnt8. Waif1a подавляет Wnt/ $\beta$ -catenin у данио и *Xenopus*. У мыши и человека Waif1/5T4 подавляет Wnt-сигналинг в культурах клеток. Waif1 у данио действует по принципу обратной связи как прямой супрессор Wnt8-опосредованной нейроэктодермальной и мезодермальной дифференцировки в процессе гастрюляции. На молекулярном уровне Waif1a связывается с LRP6 и подавляет как Wnt3a-, так и Dkk1-опосредованную интернализацию LRP6, не влияя при этом на Wnt3a-опосредованное фосфорилирование LRP6 по неизвестному механизму. В то же время Waif1a активирует неканоническую PCP-ветвь Wnt-каскада в зародышах данио и в эксплантатах зародышей шпорцевой лягушки через посредство Dkk1, действующего как активатор каскада. Повышенная экспрессия Waif1a/5T4 в карциномах человека коррелирует в плохим прогнозом по выживаемости и свидетельствует, таким образом, о роли этого фактора в биологии рака (Starzynska, Marsh et al. 1994, Naganuma, Kono et al. 2002).

#### 2.2.2.3. Фактор APCDD1

Ген APCDD1 (Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1) первоначально был обнаружен при поиске генов, подавляемых после индукции APC с клетках рака кишечника SW480 (Takahashi, Fujita et al. 2002). APCDD1 – гликопротеин, ассоциированный с мембраной, эволюционно консервативный у позвоночных. У зародышей мыши APCDD1 экспрессируется в нервной и сосудистой системах, внутреннем ухе и мезенхиме разных внутренних органов (Jukkola, Sinjushina et al. 2004). Выраженная экспрессия APCDD1 наблюдается в волосяных фолликулах мыши и человека (Jukkola, Sinjushina et al. 2004, Shimomura, Agalliu et al. 2010). Точечная мутация L9R в этом гене вызывает наследственное заболевание hypotrichosis simplex – редкую аутосомно-

доминантную форму алопеции (Shimomura, Agalliu et al. 2010). Эта мутация располагается в сигнальной последовательности и нарушает транспорт белка в клеточную мембрану. Факт того, что APCDD1 является прямой мишенью канонической ветви Wnt-каскада (Takahashi, Fujita et al. 2002), а так же сходство его экспрессии с Wise (O'Shaughnessy, Yeo et al. 2004) позволили Shimomura с коллегами предположить, что APCDD1 может выполнять роль ингибитора Wnt. Они обнаружили, что растворимый белок APCDD1 связывает Wnt3a и внеклеточный домен LRP5 *in vitro* и подавляет сигнализацию Wnt/ $\beta$ -catenin в культурах клеток, возможно через воспрепятствование связыванию Wnt с рецептором Fz. *In vivo* APCDD1 подавляет Wnt-сигнализацию во время дифференцировки нейронов из предшественников в нервной системе куриного зародыша и в процессе осевой разметки зародыша шпорцевой лягушки. Учитывая его широкую экспрессию в различных клеточных типах, можно предположить, что APCDD1 регулирует несколько других процессов, контролируемых активностью этого каскада.

#### 2.2.2.4. Tiki1

Tiki1 был обнаружен при функциональном скрининге кДНК как ген с экспрессией, специфичной для организатора, необходимый для развития передне-нейральных структур *Xenopus* (Zhang, Abreu et al. 2012). Tiki1 кодирует эволюционно консервативную трансмембранную металлопротеиназу, которая подавляет Wnt-сигнализацию, отщепляя от лиганда Wnt девять N-концевых остатков, что ведет к образованию окисленных Wnt-олигомеров, неспособных к лиганд-рецепторному взаимодействию (op. cit.).

### 2.2.3. Активаторы Wnt-сигнальных каскадов

#### 2.2.3.1. Семейство белков R-Spondin

Белки R-Spondin (Rspo1-4) объединяются в небольшое семейство четырех секретируемых ростовых факторов, способных, как и лиганды Wnt, к активации Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального пути. Первым был обнаружен человеческий R-spondin 3 (Chen, Wang et al. 2002). Затем был обнаружен мышинный R-spondin1 – ген, специфично экспрессирующийся в крыше нервной трубки и дорсальной части переднего мозга (Kamata, Katsube et al. 2004). R-spondin2 шпорцевой лягушки был найден при функциональном скрининге по своей способности активировать Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализацию (Kazanskaya, Glinka et al. 2004). Белки семейства Rspo эволюционно консервативны и присутствуют в геномах беспозвоночных, включая полухордовых, хордовых и иглокожих, но не у *Drosophila* и *C. elegans* (Kim, Zhao et al. 2006, Yoon and Lee 2012). У млекопитающих белки Rspo1-4 обладают 60% гомологии по первичной структуре, общим сигнальным пептидом, двумя

N-концевыми furin-like доменами CRD, после которых расположены домен thrombospondin type-1 и положительно заряженный С-концевой домен (Рис. 5) (Kazanskaya, Glinka et al. 2004). Обработка клеток растворимым гепарином или ингибитором сульфатирования хлоратом натрия повышает уровень белков этого семейства в кондиционной среде. Это указывает на возможное связывание этих белков с гепаран-сульфат протеогликанами, такими как синдеканы и глипиканы (Nam, Turcotte et al. 2006). Rspo3 действительно связывается с синдеканом 4 (Sdc4) (Ohkawara, Glinka et al. 2011).

*Механизм действия.* Характерная черта всех четырех факторов Rspo – их способность активировать канонических Wnt-путь. В этом отношении белки Rspo действуют синергично с факторами Wnt (Kazanskaya, Glinka et al. 2004, Kim 2005, Nam, Turcotte et al. 2006, Wei, Yokota et al. 2007, Kim, Wagle et al. 2008) и для активации сигналинга требуют присутствия лигандов Wnt (Binnerts, Kim et al. 2007). Тем не менее, точный механизм активации сигнального пути Wnt/ $\beta$ -catenin через белки Rspo до конца неясен.

Содержащий лейцин-богатый домен белок G-protein-coupled receptor 5 (LGR5) и его гомолог LGR4 выступают в качестве рецепторов для Rspo. Экспрессия LGR5 маркирует пролиферирующие стволовые клетки в нескольких Wnt-зависимых компартментах, таких как тонкий и толстый кишечник, желудок и волосяной фоллику, тогда как LGR4 экспрессируется существенно шире (Barker and Clevers 2010). LGR4 и -5 требуются для сигнализации через Rspo и действуют синергично с Wnt3a и Rspo при сигнализации в каскаде Wnt/ $\beta$ -catenin. Белки Rspo1-4 высокоаффинно связываются с LGR4 и -5 с  $K_d$  наномолярного порядка (Carmon, Gong et al. 2011, de Lau, Barker et al. 2011, Glinka, Dolde et al. 2011).

Как связывание Rspo с LGR4/5, так и их функция опосредованы furin-доменами (Kazanskaya, Glinka et al. 2004, Glinka, Dolde et al. 2011). Более того, сигнализация через систему Rspo3-LGR4 требует клатрин-опосредованного эндоцитоза, критичного для активации  $\beta$ -catenin (Glinka, Dolde et al. 2011).

Cong с сотрудниками удалось сформулировать возможный механизм, посредством которого Rspo и LGR4/5 потенцируют Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализацию. При поиске новых негативных Wnt-регуляторов они идентифицировали трансмембранный фактор E3 ubiquitin ligase zinc and ring finger 3 (ZNRF3) и его гомолог ring finger 43 RNF43 (Hao, Xie et al. 2012). ZNRF3 подавляет Wnt-сигнализацию через оборот рецепторов Fz и LRP6. Rspo связывается с внеклеточной частью ZNRF3, стимулируя при этом его взаимодействие с LGR4, что приводит к удалению ZNRF3 из мембраны. Эти результаты позволяют сформулировать модель, в которой Rspo активирует Wnt-сигнализацию через подавление ZNRF3 по LGR4-зависимому механизму, что приводит к

аккумуляции рецепторов Wnt на клеточной поверхности (Рис. 7А). ZNRF3-опосредованная супрессия Wnt/ $\beta$ -catenin-сигналинга критична для развития хрусталика у мыши (Hao, Xie et al. 2012).

Loss-of-function анализ у шпорцевой лягушки и мыши, а также генетические исследования на человеке подчеркивают роль белков Rspo в эмбриональном развитии и при заболеваниях. У шпорцевой лягушки и мыши члены семейства Rspo дифференциально экспрессируются в широком спектре эмбриональных тканей, таких как дорсальная нервная трубка, сомиты, хвостовая почка, зоны переднего эпидермального гребня конечности и мозга (Kazanskaya, Glinka et al. 2004, Nam, Turcotte et al. 2007). Они коэкспрессируются с несколькими Wnt-генами и их экспрессия регулируется лигандами Wnt (Kazanskaya, Glinka et al. 2004).

#### 2.2.3.2. Фактор Norrin

Ген Norrie disease pseudoglioma (NDP, или Norrin) кодирует малый секретлируемый фактор, в структуре которого содержится цистиновый узел (Рис. 5). По своей третичной структуре Norrin напоминает TGF- $\beta$  (Meitinger, Meindl et al. 1993). Мутации Norrin вызывают развитие болезни Норри (Chen, Hendriks et al. 1992, Meindl, Berger et al. 1992) расстройство, характеризующееся сосудистыми патологиями глаза и слепотой, часто сопровождаемой прогрессивной утратой слуха и задержкой психического развития (Berger 1998).

Практически идентичные сосудистые дефекты сетчатки и внутреннем ухе наблюдаются у Fz42/2-мышей (Xu, Wang et al. 2004) и у Ndp-нокаутных мышей (Richter, Gottanka et al. 1998, Rehm, Zhang et al. 2002), что позволило Nathans с сотрудниками проанализировать Norrin и Fz4 на предмет образования пары лиганд-рецептор. Действительно, выяснилось, что Norrin высокоаффинный лиганд Fz4, который связывается с CRD-доменом рецептора с наномолярной аффинностью и содействует Fz4 при активации TCF/LEF-опосредованной транскрипции по LRP5/6-зависимому механизму (Xu, Wang et al. 2004). Несмотря на то, что Norrin не обладает структурным родством лигандам Wnt, однако функционирует сходным образом. Функция Norrin требует трех пар цистеинов, образующих консервативное трио дисульфидных связей, характерных для всех белков, содержащих цистиновые узлы (Smallwood, Williams et al. 2006).

В доказательство функционального взаимодействия между Norrin, Fz4 и LRP5 *in vivo* обнаружено, что у человека мутации в каждом из этих генов вызывают семейную эксудативную витреоретинопатию (Chen, Battinelli et al. 1993, Robitaille, MacDonald et al. 2002, Toomes, Bottomley et al. 2004, Toomes, Bottomley et al. 2004) – наследственное заболевание, характеризующееся периферической аваскулярностью сетчатки (Warden, Andreoli et al. 2007). В соответствии с



клиническими данными, таргетированная инактивация *Norrin*, *Fz4* или *LRP5* у мышей вызывает похожие изменения васкуляризации сетчатки (Xu, Wang et al. 2004, Luhmann, Lin et al. 2005, Xia, Liu et al. 2008).

У млекопитающих насчитывается 10 рецепторов Fz, лишь один из которых – *Fz4* – является рецептором *Norrin* (Smallwood, Williams et al. 2006). Поскольку *Fz4* способен передавать Wnt-сигналы, возникает вопрос о том, как *Fz4/LRP5* могут отвечать на разные типы лигандов при активации  $\beta$ -catenin-зависимой транскрипции. Обнаружение *TSPAN12* – белка из семейства tetraspanin – в качестве компонента комплекса *Norrin/Fz4/LRP5* помогает найти ответ на этот вопрос. При регуляции васкуляризации сетчатки в развитии млекопитающих *TSPAN12* специфично стимулирует *Fz4/LRP5*-сигнализацию, индуцированную *Norrin*, но не лигандами Wnt (Рис. 7B) (Junge, Yang et al. 2009). Экспрессия *Norrin* в сетчатке, нервной трубке и мозге мышиноного зародыша, как и его экспрессия в дефинитивной центральной нервной системе и децидуальной оболочке матки (Luhmann, Meunier et al. 2005, Ye, Smallwood et al. 2011) указывает на то, что его роль не ограничивается лишь развитием глаза.

### 2.3. Механизмы распределения белков Wnt в тканях

Wnt-сигнализация регулирует широкий спектр процессов в индивидуальном развитии и при заболеваниях. Важной особенностью Wnt-сигнализации является образование Wnt-лигандами концентрационных градиентов в компетентной ткани, что определяет клеточную судьбу у позвоночных и беспозвоночных. Для выполнения этой паракринной функции адресация Wnt-морфогенов от секретирующей клетки к клетке-реципиенту должна тщательно регулироваться. Для объяснения внеклеточного транспорта этих липидированных сигнальных белков в гидрофильной среде внеклеточного пространства было предложено множество разных моделей, однако оживленная дискуссия о механизмах точного градиентного распределения лигандов в компетентной ткани продолжается до сих пор. Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что в эмбриональном развитии позвоночных и беспозвоночных Wnt-белки распределяются вдоль сигнальных филоподий, цитонем. Цитонемно-опосредованный транспорт оказывает сложное влияние на наши представления о том, как Wnt-сигнализация распространяется в тканях и делает возможным формирование точного распределения лигандов в реципиентных тканях.

Один из первых шагов индивидуального развития – установление эмбрионального плана строения. Lewis Wolpert сформулировал модель генерации позиционной информации через распределение веществ, известных как морфогены (Wolpert 1969). Он предположил, что морфогены образуют в пределах ткани градиенты концентрации и что специфические пороговые значения концентрации морфогенов определяют клеточную идентичность. С 1969 года идея градиентов морфогенов получила существенное экспериментальное подтверждение (Gurdon and Bourillot 2001). Bicoid стал первым экспериментально обнаруженным белком, образующим вольпертов морфогенетический градиент вдоль передне-задней оси зародыша *Drosophila* и определяющий, таким образом, его организацию вдоль этой оси (Driever and Nüsslein-Volhard 1988). В последующие годы были открыты сходные морфогенетические активности, включая такие сигнальные каскады, как hedgehog/sonic hedgehog (Hh/Shh), ретиноевая кислота, transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) и fibroblast growth factor (FGF) (см. обзор (Bökel and Brand 2013) (Bökel and Brand 2013)).

Паракринная сигнальная активность – основополагающее свойство для морфогенетической функции белков Wnt в процессе разметки тканей. С другой стороны, механизм внеклеточного транспорта и адресации данного морфогена от секретирующей к компетентной клетке до сих пор обсуждается. Недавно полученные данные указывают на то, что белки Wnt распределяются вдоль

цитонем – длинных сигнальных филоподий, позволяющих запускать юкстакринную (контактную) сигнализацию на существенных расстояниях. Было показано, что в зародышах данио лиганды Wnt8a транспортируются посредством актин-содержащих цитонем к реципиентным клеткам, где они активируют сигнализацию, требуемую для спецификации клеток нервной пластинки (Stanganello, Hagemann et al. 2015). Одновременно с этим на цитонемах были обнаружены рецепторы Frizzled, обеспечивающие ретроградный транспорт белков Wnt в цитонемах в процессе формирования мышц крыла *Drosophila* (Huang and Kornberg 2015). У курицы Fz7 был обнаружен на клеточных протрузиях, содержащих актин и микротрубочки, в процессе развития дермомиотома (Sagar, Prols et al. 2015).

Огромный массив данных указывает на морфогенетическую функцию белка Wnt8 при развитии тканей, реализуемую через определение клеточной судьбы в зависимости от концентрации – более высокие концентрации Wnt8 определяют «задние» клеточные судьбы, более низкие – «передние». Для выполнения своей морфогенетической функции лиганды Wnt секретируются локальным сигнальным центром и далее распределяются на расстояния в несколько клеточных диаметров. В некоторых эмбриональных контекстах распределение активностей Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализации может объясняться либо клеточной памятью в отношении статуса Wnt/ $\beta$ -catenin-активности, либо смешением Wnt-продуцирующих и Wnt-принимающих популяций клеток (Aulehla, Wehrle et al. 2003, Serralbo and Marcelle 2014). Однако паракринная сигнализация представляется наилучшим объяснением образования таких градиентов, например в нервной пластинке зародышей данио. В данном случае Wnt-продуцирующие клетки происходят из мезодермы и не смешиваются с эктодермальными клетками нервной пластинки в процессе гаструляции (Woo 1997, Keller, Schmidt et al. 2008). Обобщая, можно сказать, что функция Wnt/ $\beta$ -catenin-сигналинга в пределах нервной пластинки коррелирует с образованием морфогенетического поля, а различия в концентрациях Wnt8 отвечают за регионализацию ЦНС вдоль передне-задней оси (Bang, Papalopulu et al. 1999, Dorsky 2003, Green, Whitener et al. 2014). Регуляция распространения играет основополагающую роль в формировании морфогенетического градиента Wnt8. Однако до сих пор остается неясно, как Wnt-лиганды распределяются и формируют этот градиент на расстояниях десятков микрон.

### 2.3.1. Свободная диффузия, белки-переносчики и везикулярный транспорт

Наиболее широко в настоящее время изучается режим транспорта морфогенов посредством свободной диффузии, при котором морфогены выделяются в межклеточное пространство и пассивно диффундируют в нем (Muller, Rogers et al. 2013). Белки семейства Wnt могут

переноситься между смежными клетками посредством латеральной диффузии при участии молекул клеточной поверхности, таких как гепарансульфат-протеогликаны (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) (Рис. 8А). На основе анализа HSPG-мутантов Dally и Dally-like исследователи предположили, что глипиканы необходимы для поддержания нормальных уровней внеклеточных Wnt на поверхности клеток у *Drosophila* (Takei 2004, Han 2005). Однако распространение Wnt-белков на большие расстояния по механизму диффузии маловероятно ввиду посттрансляционного липидирования, в ходе которого Wnt-молекулы приобретают дополнительную гидрофобность, а их растворимость, соответственно, существенно снижается (Willert, Brown et al. 2003, Janda, Waghray et al. 2012). Wnt-белки могут транспортироваться в составе мультибелковых комплексов, маскирующих их гидрофобные липидные модификации и повышающих растворимость. Такие комплексы могут формироваться самими Wnt-белками через образование мицелл, либо челночными липид-связывающими белками. Существование таких Wnt-связывающих белков, способствующих диффузии факторов Wnt, было недавно предложено для *Drosophila* и *Xenopus* (Рис. 8Б). Было показано, что Wnt связываются с секретлируемой wingless-взаимодействующей молекулой Swim, способствующей их распространению (Mulligan, Fuerer et al. 2011). Более того, уровень Wnt-сигнализации может быть повышен при участии внеклеточных белков, принадлежащих семейству растворимых sFRP (Mii and Taira 2011, Gorny, Kaufmann et al. 2013).

Помимо челночных белков-переносчиков, в качестве механизма распространения гидрофобных молекул Wnt в тканях предполагается везикулярный механизм (Рис. 8В) (см. обзор (Gross and Boutros 2013)). У *Drosophila* экзовезикулы, ассоциированные с Wnt-белками, перемещаются с той же скоростью, что была измерена ранее для Wnt (Greco, Hannus et al. 2001). Действительно, нокдаун по липофоруину при помощи РНК-интерференции ведет к понижению активности дальнедействующей Wnt-сигнализации (Panáková, Sprong et al. 2005, Willnow, Hammes et al. 2007). Похожие результаты получены на мыши, где факторы Wnt3a, ассоциированные в среде с частицами липопротеинов высокой плотности, сохраняют свою активность (Neumann, Coudreuse et al. 2009).

Некоторые недавно полученные данные указывают на важную роль в мобилизации Wnt-белков экзовезикул другого типа – экзосом (Gross and Boutros 2013). Выделение экзосом требует транспорта соответствующих карго-белков по механизму эндоцитоза. Перед секрецией Wnt-белки подвергаются эндоцитозу и транспортируются к мультивезикулярным тельцам (multivesicular bodies, MVBs), где происходит их упаковка в везикулы для последующей секреции. Для этого процесса необходим комплекс ESCRT-0; известно, что его блокирование ведет к неправильной

секреции Wnt-белков (Coombs, Yu et al. 2010). В нервно-мышечном синапсе *Drosophila* белки Wnt выделяются в MVB-производных экзосомах в синаптическую щель и усиливают чувствительность постсинаптической мембраны, обеспечивая кластеризацию глутаматных рецепторов (Korkut, Ataman et al. 2009, Kerr, Fuentes-Medel et al. 2014). В имагинальном диске крыла Wnt-белки находятся на поверхности лиганд-связывающих везикул, способных инициировать Wnt-сигнальную активность в клетках-мишенях (Gross, Chaudhary et al. 2012). Недавно полученные данные указывают на роль экзозом в межклеточной коммуникации в опухолевых тканях (Luga and Wrana 2013, Menck, Klemm et al. 2013, Koch, Lustig et al. 2014).

Таким образом, хотя мобилизация Wnt-белков может происходить по везикулярному механизму как в физиологических, так и в патологических условиях, остается неясным, вносит ли вклад этот механизм в формирование градиента сигнальной активности Wnt. Исследования на *Drosophila* показывают, что даже в случае, когда Wnt-белки секретируются в составе экзосом, их морфогенетический градиент образуется независимо от экзосомального транспорта, поскольку нокаут по GTPase Rab11, подавляющий продукцию экзосом, не влияет на образование Wnt-градиента (Beckett, Monier et al. 2012). Более того, гипотеза о том, что Wnt-белки должны секретоваться через мембрану «клетки происхождения» для осуществления своей морфогенетической активности была поставлена под сомнение в недавнем исследовании по связыванию эндогенных лигандов Wnt с мембраной (Alexandre, Vaena-Lopez et al. 2013). Хотя трансгенные мухи, полученные в данном исследовании, были стерильны и не могли летать, Wnt-лиганды, связанные с мембраной, сохраняли способность восстанавливать разметку крыла у мутантов wingless. Это указывает на то, что паракринный Wnt-сигналинг является скорее факультативным для процесса разметки крыла у таких трансгенов. Данное исследование инициировало обсуждение клеточных механизмов, обеспечивающих контролируемую секрецию и распространение белков Wnt из секретирующих клеток с последующим формированием поля морфогенетического градиента в прилежащих тканях.

### 2.3.2. Цитонемный транспорт белков Wnt

Еще один предлагаемый механизм транспорта морфогенов – через посредство специализированных сигнальных филоподий (Рис. 8Г). Филоподии представляют собой тонкие актиновые протрузии, вытягивающиеся из клетки и вовлеченные в клеточную адгезию и миграцию (Jacquemet, Namidi et al. 2015). В 1961 году Wolpert and Gustafson визуализировали филоподии в живом зародыше морского ежа на стадии бластулы и обнаружили их поведение, указывающее на функцию филоподий как сенсоров позиционной информации (Wolpert and Gustafson 1961). В 1999

году при помощи прижизненной визуализации Ramírez-Weber and Kornberg обнаружили класс длинных хрупких клеточных протрузий у *Drosophila* и предположили, что они участвуют в мобилизации сигнальных молекул (Ramírez-Weber and Kornberg 1999). Эти клеточные вытяжения с сигнальными функциями были названы цитонемами и впоследствии были описаны у разных модельных видов (Kornberg and Roy 2014). Показано, что предшественники воздушного мешка трахеальной системы *Drosophila* вытягивают цитонемы по направлению к FGF-продуцирующим клеткам (Sato and Kornberg 2002). Более того, известно, что в имагинальном диске крыла *Drosophila* апикальные цитонемы ориентированы по направлению к источнику BMP-белка Dpp (Hsiung, Ramirez-Weber et al. 2005). Notch/Delta-сигнализация определяет дальнедействующее латеральное ингибирование про-нейральных клеточных судеб при помощи сигнальных филоподий в нотуме *Drosophila* (de Joussineau, Soulé et al. 2003, Cohen, Georgiou et al. 2010). Кроме этого появляются сообщения о цитонемах, экспрессирующих рецепторы EGF в других клеточных контекстах, например в глазном диске (Roy, Hsiung et al. 2011). Кроме этого предполагается, что цитонемы необходимы для образования градиента hedgehog в эпителиальных клетках *Drosophila* (Rojas-Ríos, Guerrero et al. 2012, Bischoff, Gradilla et al. 2013). В почке конечности куриного зародыша также был обнаружен цитонемный транспорт (Sanders, Llagostera et al. 2013).

Ключевая особенность цитонем – их специфичность в отношении сигнальных молекул. Различные сигнальные белки переносятся разными цитонемами, хотя эти сигнальные филоподии могут выглядеть одинаково (Roy, Hsiung et al. 2011). В научном сообществе вплоть до настоящего времени обсуждается вопрос о том, используется ли клеткой подобная модальность цитонем для транспорта липидированных лигандов или рецепторов Wnt-сигнального каскада.

### 2.3.3. Wnt-цитонемы в эмбриональном развитии

Объем свидетельств в пользу мобилизации Wnt-лигандов на клеточных протрузиях в последнее время растет. Так, факторы Wnt2b транспортируются на клеточных вытяжениях к Wnt-компетентным клеткам в культуре фибробластов *Xenopus* (Holzer, Liffers et al. 2012). У данио липидированные белки Wnt8a локализуются на мембране, включая клеточные протрузии (Luz, Spann-Muller et al. 2014). Было также показано, что Wnt8 аккумулируются на плазматической мембране продуцирующих клеток (Stanganello, Hagemann et al. 2015). Эти Wnt8-кластеры включают переносчик Cdc42-dependent actin assembly protein 1 (Toca-1, известный так же как fnbp11), определяющий позиционирование новой филоподии через локальную активацию комплекса нуклеации филоподий (filopodia nucleation complex) (Ho, Rohatgi et al. 2004). Впоследствии эти растущие филоподии переносят на своих концах белок Wnt8 к клеткам-

мишеням. Эти протрузии могут быть охарактеризованы как актин-содержащие флоподии, необходимые и достаточные для распределения белков Wnt в пределах нервной пластинки (Рис. 9А). Кроме того, в формирующихся Wnt-содержащих филоподиях были обнаружены активированные молекулы Cdc42/N-Wasp, что указывает на динамическую полимеризацию актина в процессе вытяжения филоподии (Stanganello, Hagemann et al. 2015). Далее Wnt8 транспортируется в составе кластеров на концах цитонем. Когда вытянутая Wnt8-положительная цитонема достигает компетентной клетки-мишени, на ее мембране в зоне контакта происходит индукция Wnt-рецепторного комплекса при посредстве LRP6-содержащих сигнасом и запускается Wnt-сигнальная активность (op. cit.). LRP6-сигналосома представляет собой динамическую структуру, обеспечивающую сигнализацию Wnt (Niehrs 2012) (см. раздел 2.1.4. Сигнализация через систему рецепторного комплекса Frizzled-LRP"). После установления контакта филоподии сокращаются, а Wnt-положительный кластер остается присоединенным к мембране компетентной клетки (Stanganello, Hagemann et al. 2015). Эти остаточные структуры Wnt-положительных филоподий и ранее наблюдались в виде экзовезикул – мембранных пузырьков, выделяемых дендритными клетками (Luz, Spannll-Muller et al. 2014), – однако остается неясным, участвуют ли они в дальнейшей мобилизации Wnt. Визуализация *in vivo* показывает, что после установления контакта Wnt-содержащие LRP6-сигналосомы в основном поглощаются компетентной клеткой по механизму эндоцитоза, что является необходимым условием для активации сигналинга (Hagemann, Kurz et al. 2014, Stanganello, Hagemann et al. 2015).

Функция Wnt-компетентной клетки в Wnt-сигнализации также активно изучается. Данные по *Drosophila* предоставляют первое свидетельство того, что компоненты Wnt-сигнального каскада могут также быть распределены на цитонемах, возникающих у воспринимающей клетки (Рис. 9Б). Например, было показано, что предшественники миобластов мышц крыла формируют цитонемы, содержащие Wnt-рецепторы Fz. Эти цитонемы вступают в контакт с Wnt-продуцирующими клетками имагинального диска крыла. Образующиеся при этом Wnt-Fz-комплексы ретроградно перемещаются вдоль динамических цитонем миобластов (Huang and Kornberg 2015).

Учитывая все эти данные, предполагается существование консервативного механизма на основе цитонем, вносящего вклад в распределение как лигандов Wnt, так и их специфических рецепторов в индивидуальном развитии позвоночных и беспозвоночных (Stanganello and Scholpp 2016).

## 2.4. Семейство факторов Noggin

Белок Noggin, кодируемый геном *nog*, представляет собой секретируемый гомодимерный гликопротеин с молекулярной массой 64 кДа. Noggin был открыт благодаря своей способности индуцировать образование вторичной оси при эктопической экспрессии у зародышей шпорцевой лягушки (Smith and Harland 1992). Было обнаружено, что у зародышей *Xenopus*, вентрализованных ультрафиолетом, Noggin восстанавливал развитие дорсальных структур, а инъекция его кДНК приводила к избыточному росту головных структур, благодаря чему белок получил свое название, которое в переводе с английского означает “башка” (Smith and Harland 1992).

Ранее считалось, что Noggin представлен одним белком, регулирующим активность сигнальных молекул класса BMP, однако сейчас известно, что Noggin представляет собой семейство, состоящее из трех гомологов, регулирующих, помимо BMP, активности разнообразных сигнальных каскадов, такие как Nodal/Xnr, ActivinB и Wnt/ $\beta$ -catenin.

### 2.4.1. Структура белка Noggin

Первичная структура Noggin включает кислый N-концевой и обогащенный остатками цистеина С-концевой домены. Структура Noggin и его комплекса с BMP7 разрешена методом рентгеноструктурного анализа с точностью 2.4Å (Groppe, Greenwald et al. 2002). Область, обогащенная остатками цистеина, образует в составе функциональной молекулы структуру, известную под названием «цистиновый узел», характерную для широкого спектра сигнальных молекул и их антагонистов. Структурная основа цистиновых узлов может быть включать восьмичленное (CAN), девятичленное (twisted gastrulation) и десятичленное кольцо. К факторам с десятичленным цистиновым узлом относятся, помимо Noggin, другой известный BMP-антагонист, частично дублирующий его функцию – Chordin (Avsian-Kretchmer and Hsueh 2004).

Топология белка Noggin воспроизводит структуру молекул BMP в двух осях симметрии. BMP-димер организован в виде бабочки с крыльями, вытягивающимися из центрального ядра, которое опосредует димеризацию. Noggin, как и BMP, димеризуется через центральное ядро, из которого расходятся две пары  $\beta$ -складчатых «пальцев». Перед «пальцами» расположен N-концевой фрагмент длиной около 20 а.о. – так называемый slip-домен. При взаимодействии Noggin и BMP slip-домен обхватывает молекулу BMP, экранируя ее поверхность и препятствуя ее связыванию с BMP-рецепторами обоих типов (Рис. 10) (Groppe, Greenwald et al. 2002). По-видимому, такой



механизм связывания консервативен, поскольку такой же *clip*-домен описан и для Crossveinless2 – другого фактора из числа антагонистов BMP (Zhang, Qiu et al. 2008).

В настоящее время известно четыре BMP-рецептора I типа: Alk1 (activin receptor-like kinase 1), Alk2, Alk3 и Alk6 и три BMP-рецептора II типа: BMPR-II, ActR-II (activin type II receptor) и ActR-III. Для этих рецепторов показана способность специфически связывать определенные лиганды BMP (Miyazono, Kamiya et al. 2009). Взаимодействуя с некоторыми BMP, Noggin препятствует их связыванию с рецепторами и активации как Smad-зависимых, так и Smad-независимых BMP-сигнальных каскадов (Groppe, Greenwald et al. 2002).

*In vitro* эксперименты показывают, что Noggin связывается с варьирующей аффинностью с BMP2, 4, 5, 6, 7, 13 и 14 (Zimmerman, De Jesús-Escobar et al. 1996, Seemann, Brehm et al. 2009, Song, Krause et al. 2010). Соответственно, Noggin оказывает ингибирующее действие лишь на сигнализацию BMP2, 4, 5, 7, 13 и -4 и не влияет на сигнальную активность BMP3, 6, 9, 10 и 15 (Gamer, Nove et al. 2005, Seemann, Brehm et al. 2009, Song, Krause et al. 2010).

До сих пор остается не до конца ясным, воспроизводится ли структурный механизм, описанный для взаимодействия Noggin-BMP7, при связывании и подавлении белком Noggin других BMP-лигандов. Интересно, что связывание Noggin с BMP6 не совпадает со снижением активности этого лиганда при дифференцировке остеобластов с условиях *in vitro* (Song, Krause et al. 2010).

#### 2.4.2. Белок Noggin человека

В геноме человека присутствует единственный вариант гена *noggin*. После посттрансляционного удаления сигнальной последовательности (остатки 1-27), в составе зрелого белка hNoggin насчитывается 205 а.о. (остатки 28-232). Этот белок секретируется в виде гликозилированного, ковалентно связанного гомодимера. Первичная структура hNoggin содержит цистеин-богатую (9 остатков цистеина) С-концевую часть, для которой не выявлено очевидных структурных гомологий.

Центральный высокоосновный гепарин-связывающий сегмент белка удерживает Noggin на клеточной поверхности, регулируя таким образом его диффузию (Paine-Saunders, Viviano et al. 2002). hNoggin высокоаффинно связывает молекулы hBMP4 и с более низкой аффинностью – hBMP7 (Zimmerman, De Jesús-Escobar et al. 1996). Кроме того, он с соразмерной аффинностью связывается с гомологами этих сигнальных молекул у *Drosophila* и *Xenopus*, что указывает на высокий уровень его функционального консерватизма (Groppe, Rumpel et al. 1998).

### 2.4.3. Структурные основы ингибиторной функции *Noggin*

Поверхности молекул BMP содержат два выступающих гидрофобных участка (Groppe, Rumpel et al. 1998) – один на выпуклой поверхности, связывающей рецепторы II типа (см. (Kirsch, Nickel et al. 2000) и Рис. 10B, область II), второй на вогнутой поверхности, взаимодействующей с рецепторами I типа (см. (Kirsch, Sebald et al. 2000) и Рис. 10B (область I), Рис. 11). Суперпозиция структуры комплекса *Noggin*-BMP7 и модели BMP-сигнального комплекса (Kirsch, Nickel et al. 2000, Kirsch, Sebald et al. 2000) показывает, что при взаимодействии с *Noggin* обе пары связывающих эпитопов BMP эффективно маскируются (Рис. 10A). Это хорошо согласуется с известной способностью *Noggin* подавлять связывание BMP с рецепторами обоих типов (Zimmerman, De Jesús-Escobar et al. 1996). Сайт связывания с рецепторами I типа перекрывается сегментом *clip*-домена (Gln 28-Asp 39) в первую очередь благодаря гидрофобным взаимодействиям (Рис. 10B (область I), Рис. 11). Гидрофобное кольцо, принадлежащее Pro 35 в составе *Noggin*, погружается в гидрофобный карман молекулы BMP7, образованный остатками Trp 52, Trp 55, Val 87, Tyr 128 и Met 131, имитируя сходное погружение Phe 85 в составе спирали  $\alpha 1$  BMP-рецептора BMPRIa в гидрофобное углубление BMP2 (Kirsch, Sebald et al. 2000). Считается, что этот остаток является ключевым детерминантом всех рецепторов I типа. Поскольку остатки, выстилающие это углубление, высококонсервативны для факторов BMP и в меньшей степени для факторов TGF- $\beta$ , взаимодействия в этой области могут также объяснять высокую аффинность и специфичность связывания *Noggin* с белками BMP. Дополнительная специфичность связывания может возникать благодаря предспиральной петле в структуре BMP, варьирующей по длине среди родственных подсемейств TGF- $\beta$ .

Сайт связывания рецепторов II типа тщательно маскируется С-концевой половиной *clip*-домена (Asn 40-Glu 48), дистальной частью пальца f1 и пальцем f2 (Рис. 10B (область II), Рис. 11). Как и в области I, взаимодействия, обозначенные в области II, также носят преимущественно гидрофобную природу. Дополнительная дисульфидная связь, расположенная вблизи окончания пальца f2 (Cys 207-Cys 215), уникальная для *Noggin*, усиливает конформационную ригидность этого длинного пальца.

Таким образом, две структурные особенности, посредством которых *Noggin* связывает BMP7, напоминают таковые для BMP-рецепторов: во-первых, гидрофобная боковая цепь гибкого основного сегмента погружается в гидрофобный карман BMP; во-вторых, между двумя изогнутыми гидрофобными поверхностями возникают комплементарные взаимодействия. Дополнительное сходство проявляется в том, что *Noggin*, как гомодимер, взаимодействует с обеими парами рецептор-связывающих эпитопов BMP7, имитируя режим связывания при сборке

гетеротетрамерных рецепторов. Несмотря на то, что погружаемая область поверхности при взаимодействии Noggin-BMP7 меньше, чем общий размер поверхности, погружающейся при взаимодействии с рецепторами I и II типов, общая аффинность Noggin усиливается эффектом близости, благодаря его димерно природе.

#### 2.4.4. Экспрессия, активация и функциональный цикл *Noggin*

Noggin – фактор с плеiotропным действием, экспрессирующийся как в раннем развитии, так и на более поздних стадиях жизненного цикла. В начале гаструляции *Noggin* продуцируется клетками организатора и проявляет антагонизм в отношении BMP2, 4 и 7, способствуя установлению градиента активности соответствующих сигнальных каскадов, регулирующих дорсовентральную разметку плана строения с последующим образованием зародышевых листков (Рис. 13) (Smith and Harland 1992, Zimmerman, De Jesús-Escobar et al. 1996).

#### 2.4.5. Экспрессия *Noggin* в эктодермальных производных

Присутствие *Noggin* является критичным в эмбриональных производных эктодермы, таких как нервная трубка, зуб, волосяной фолликул и глаз (McMahon, Takada et al. 1998). Несмотря на то, что индукция нервной трубки происходит в отсутствие *Noggin*, было показано, что он критичен для нейрогенеза (McMahon, Takada et al. 1998, Lim, Tramontin et al. 2000). *Noggin* экспрессируется в хорде, его продукция увеличивается при действии на эктодермальные производные норадреналина (McMahon, Takada et al. 1998, Messenger, Rowe et al. 1999). В этом отношении оверэкспрессия *Noggin* нейтрализует действие BMP4 на нейрональные предшественники, вызывая избыточную пролиферацию нейральной ткани (Рис. 13) (Bonaguidi, Peng et al. 2008).

Кроме того, *Noggin* экспрессируется в дермальных сосочках и соединительной ткани волосяного фолликула, где он нейтрализует BMP4-зависимую индукцию фолликула в культуре эмбриональной кожи (Рис. 13) (Botchkarev, Botchkareva et al. 1999). Интересно, что эктопическая аппликация *Noggin* и последующее подавление BMP4 ведет к изменению фенотипа зубов и развитию моляров вместо резцов (Tucker 1998). Важная роль *Noggin* была так же задокументирована в развитии глаза. Оверэкспрессия *Noggin* в эпидермисе ведет к снижению активности апоптоза и ретардации клеточной дифференцировки в эпителии века (Sharov 2003). Кроме того, *Noggin* обнаруживается в тканях хрусталика, сетчатки и периокулярной мезенхиме и нивелирует дефекты развития глаза, индуцированные удалением клеток эпибласта (Gerhart, Pfautz et al. 2009).

#### 2.4.6. Экспрессия *Noggin* в мезодермальных производных

В тканях мезодермального происхождения *Noggin* экспрессируется на умеренном уровне (Рис. 13). Его экспрессия необходима для паттернирования сомитов и скелетных тканей (McMahon, Takada et al. 1998). В срединных сомитах экспрессия *Noggin* стимулируется *Wnt1*, что приводит к подавлению активности BMP4 и ускоряет миогенез (Hirsinger, Duprez et al. 1997). Кроме этого, *Noggin* регулирует эмбриональный хондрогенез, остеогенез и формирование суставов (Рис. 13) (Gong, Krakow et al. 1999, Tylzanowski, Mebis et al. 2006). Экспрессия *Noggin* в остеобластах повышается в присутствии BMP2, 4, 5, 6 и 7 (Gazzerro, Gangji et al. 1998, Song, Krause et al. 2010). Известно, что Indian hedgehog индуцирует экспрессию *Noggin* в хондроцитах (Pathi, Rutenberg et al. 1999). Трансгенные мыши, оверэкспрессирующие *Noggin* в зрелых остеокальцин-позитивных остеобластах, страдают от выраженного снижения плотности костной ткани и снижением объема оссификации вследствие нарушений рекрутирования и функционирования остеобластов (Wu, Li et al. 2003). Дальнейшие эксперименты на мышах показали, что *Noggin* экспрессируется постнатально в несмешивающейся черепной мезенхиме. Предполагается, что преждевременное смешение мезенхимы вдоль срединной линии черепа, вызванное конститутивной активацией FGF-рецепторов, является результатом несоответствующего подавления экспрессии *Noggin* (Warren, Brunet et al. 2003).

#### 2.4.7. Биологическая функция

Понимание функциональной роли белка *Noggin* углубляется с накоплением информации о лигандах BMP и их тканей-мишеней. У null-мутантных по *noggin* мышей повышенная активность BMP вызывает серию аномалий развития, включающих абортное формирование нервной трубки, задержку образования волосяных фолликулов, нарушение морфогенеза аксиального скелета и повреждение суставов (McMahon, Takada et al. 1998, Tylzanowski, Mebis et al. 2006). Ввиду того, что null-мутации по *noggin* дают эмбриональные летали, роль *Noggin* в гомеостазе дефинитивных тканей остается в основном неопределенной.

Важность *Noggin* в физиологии человека подчеркивается открытием гетерозиготных missense-мутаций гена *nog*, сопровождающихся нарушением морфогенеза суставов, что указывает на функциональную гаплонедостаточность (Gong, Krakow et al. 1999, Marcelino, Sciortino et al. 2001). Вместе с тем, повышенная активность *Noggin* сопровождается скелетной дисплазией – проксимальным симфалангизмом (SYM1) и синдромом множественного синостоза 1 (SYNS1) (Marcelino, Sciortino et al. 2001).

Кроме этого, недавно было показано, что *Noggin* в комбинации с *basic fibroblast growth factor* (*bFGF*) достаточен для поддержания пролонгированного роста эмбриональных стволовых клеток *in vitro* (Wang, Zhang et al. 2005). Отметим также, что в процессе нейрогенеза *Noggin* действует как антагонист BMP-сигналикации, таким образом принимая участие в регуляции ниши стволовых клеток (Lim, Tramontin et al. 2000).

По-видимому, *Noggin* играет некоторую роль в физиологии клеток остеолитического рака предстательной железы. При этом было обнаружено, что экспрессия *Noggin* ограничивается клеточными линиями, индуцирующими образование остеолитических метастазов в костях. Реэкспрессия *Noggin* в клетках рака предстательной железы снижает остеосклерозирующий потенциал, нормализует общее структурное костное окружение и балансирует ремоделирование костей (Schwaninger, Rentsch et al. 2007).

#### 2.4.8. Разнообразие факторов *Noggin* и их номенклатура

Хотя *noggin*-подобные гены идентифицированы у большинства многоклеточных животных, их гомологи были описаны главным образом у позвоночных. Предполагается, что паралогичные гены в разных таксонах позвоночных возникли в результате независимых геномных дупликаций. До сих пор когда мы говорили о *Noggin*, речь в основном шла о первом открытом представителе этого семейства белков – *Noggin1*. Ранее предполагалось, что все позвоночные и асцидии обладают лишь одним геном *noggin*. Исключение составляли костистые рыбы, в геноме которых было обнаружено три гомолога: *noggin1*, *noggin2* и *noggin3* (Furthauer, Thisse et al. 1999). Для всех трех форм *noggin* показана способность подавлять вентрализирующие эффекты BMP, однако паттерны их экспрессии оказались различными, что, по мнению авторов, отражает разные аспекты экспрессии их единого эволюционного предшественника в разных организмах.

Представления о том, что у большей части позвоночных экспрессируется лишь одна форма *noggin*, как выяснилось, не соответствует действительности. В 2004 из *Xenopus tropicalis* был обнаружен и охарактеризован ген *noggin2*, являющийся близким гомологом одноименного гена костистых рыб (Fletcher, Watson et al. 2004). Паттерны экспрессии этих генов также оказались различными. Экспрессия *noggin1* у *X. tropicalis* очень напоминает экспрессию одноименного гена у *X. laevis*. Он продолжительно экспрессируется в области организатора на стадии поздней бластулы и в течение всей гаструляции и нейруляции в хорде. Более поздняя его экспрессия наблюдается в передней части нервного гребня, переднем головном мозге и жаберных дугах после закрытия нервной трубки. На личиночной стадии его экспрессия продолжается в дорсальной части нервной трубки и слуховых пузырьках. Паттерн экспрессии *noggin2* у *X. tropicalis* оказался весьма сходным

с открытым несколько позже *noggin2 X. laevis*, а так же с *D. rerio*, однако в отличие от последнего, ген *X. tropicalis* экспрессируется так же на стадии 28 в сердце. При дальнейшем изучении было обнаружено, что у *X. laevis* оба паралога – *noggin1* и *noggin2* – проявляют ингибиторную активность не только в отношении сигнального каскада BMP, но так же других важных сигнальных путей, определяющих раннюю разметку плана строения и развитие головных структур – ActivinB, Nodal/Xnrs и Wnt8, хотя и с меньшей эффективностью (Bayramov, Eroshkin et al. 2011).

При исследовании регенерации у планарий было охарактеризовано высокое разнообразие генов *noggin* (Molina, Salo et al. 2009). Было обнаружено десять гомологов, которые можно разделить на две группы: собственно *noggin* (два гена) и восемь *noggin*-подобных генов, продукты экспрессии которых имеют вставку из 50-60 а.о. в средней части *noggin*-домена.

У асцидии была обнаружена лишь одна форма *noggin*. На основании этих данных было построено филогенетическое дерево известных *noggin*-гомологов (Рис. 12). Предположительно, три крупные ветви этого дерева возникли из предковой формы *noggin* низших хордовых, в настоящее время представленной в геноме асцидий, путем его дупликации. Тот факт, что все три подгруппы представлены у эволюционно дальних позвоночных, говорит о древности этих событий.

#### 2.4.9. Белок *Noggin4*

В 2005 при изучении гена *xanf-1* – гомеобоксного регулятора развития передней нейроэктодермы у *X. laevis* (Ermakova, Solovieva et al. 2007) – было открыто по два гомолога *noggin* в трех видах, принадлежащих разным классам позвоночных: *Fugu rubripes* (костистые рыбы), *Xenopus laevis* (амфибии) и *Gallus gallus* (птицы) (Eroshkin, Ermakova et al. 2006). Один из открытых генов оказался на 67% гомологичным гену *noggin2 D. rerio*, поэтому получил название *noggin2*. Второй ген с гораздо более низкой степенью гомологии (30%) по отношению к *noggin1* и *noggin2*, был назван *noggin4*, как следующий после ранее обнаруженного у *D. rerio* гена *noggin3*, который, в свою очередь, при более внимательном изучении оказался близким (62%) паралогом *noggin1* того же вида. По-видимому, *noggin3* специфичен для клады *D. rerio* и образовался в результате сравнительно недавней дупликации.

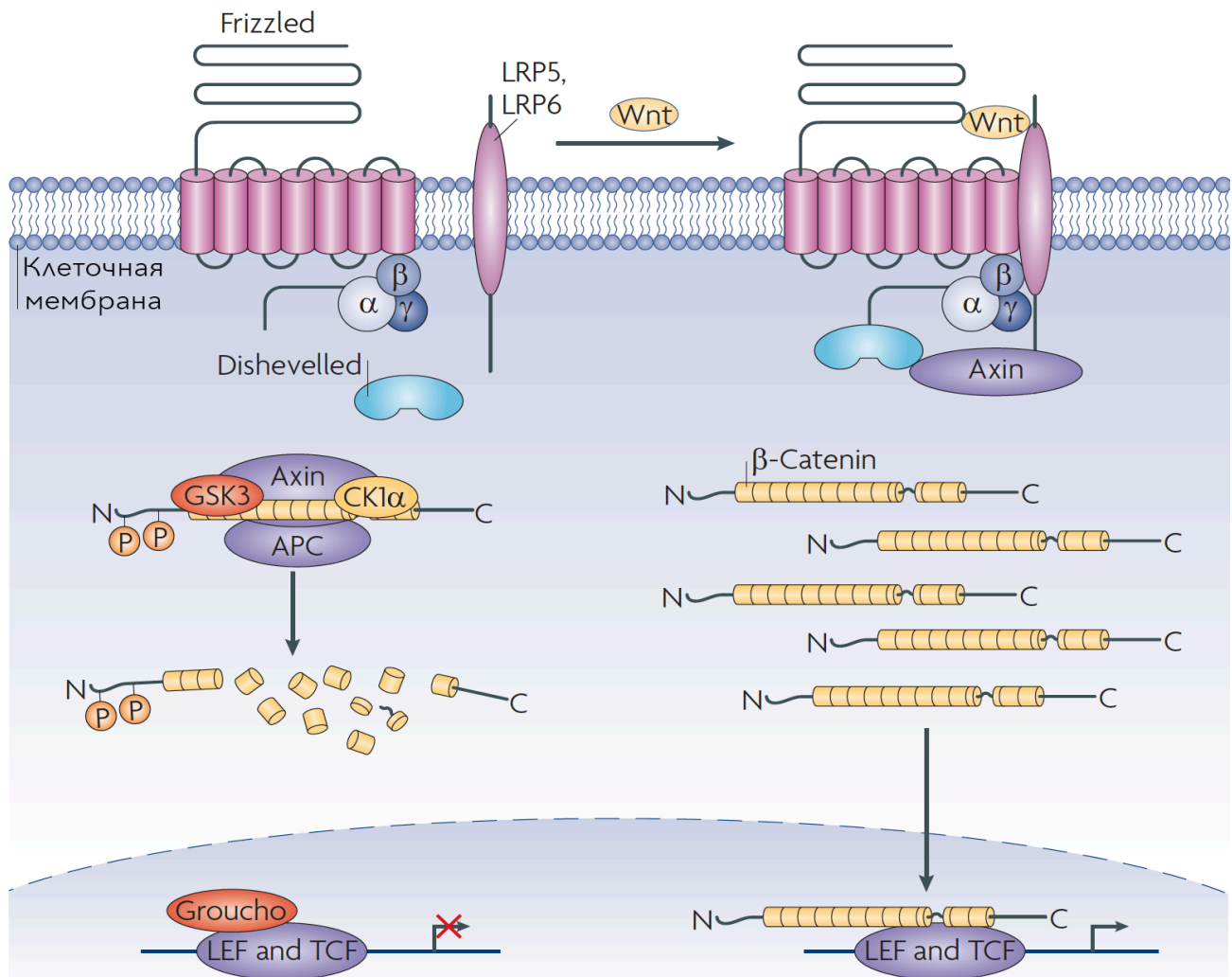
По результатам проведенного онлайн-скрининга доступных баз данных ортологи *Xnoggin 2* и *Xnoggin4* были обнаружены в геномах рыбы фугу, курицы и лягушки *X. tropicalis*. В геноме рыбы дано прямых гомологов *noggin4* нет, однако была обнаружена еще одна форма *noggin*, равноудаленная по первичной структуре от всех известных *noggin*-генов *D. rerio* – *noggin5*. Кроме того, при скрининге баз данных млекопитающих в геноме человека обнаружился псевдоген,

локализованный в хромосоме 22 и содержащий три сдвига кодирующей рамки и три стоп-кодона. Этот псевдоген был отнесен к подгруппе *noggin4* на том основании, что его реконструированная транслируемая последовательность гораздо более гомологична членам этой подгруппы (35-43%), чем к другим белкам *Noggin* (20-28%).

При изучении *Noggin4* в зародышах *X. laevis* выяснилось, что по характеру экспрессии он весьма существенно отличается от своих гомологов. Характерной чертой *Noggin4* является поверхностная диффузность областей его экспрессии на всех исследованных стадиях развития. В тотальных препаратах зародышей шпорцевой лягушки картины гибридизации *in situ* для *Noggin4* характеризуются отсутствием сколь-нибудь четких границ областей экспрессии на поверхности зародыша (Eroshkin, Ermakova et al. 2006). Одновременно с этим область экспрессии *Noggin4* практически на всех изученных стадиях ограничивается вглубь зародыша материалом сперва презумптивной, а затем и дефинитивной нейроэктодермы, а при нейруляции – их производными, с максимумами в районе переднемозговых структур. В начале гастрюляции, когда экспрессия *Noggin4* начинает определяться методом гибридизации *in situ*, она локализуется исключительно в презумптивной передней нейроэктодерме – в двух верхних слоях клеток дорсальной поверхности гастрюлы. Стоит отметить, что экспрессия *Noggin1* на этой стадии локализуется почти исключительно в материале презумптивной осевой мезодермы (шпемановский организатор) с гораздо более четкими границами распределения, ввиду чего авторы делают вывод о видимой комплементарности экспрессионных паттернов белков *Noggin1* и *Noggin4*. На более поздних стадиях области экспрессии *Noggin4* располагаются в структурах передне-дорсальной части зародыша: в головной покровной эктодерме, дорсальной части нервной трубки, включая головной мозг, слуховых пузырьках, присоске и производных нервного гребня, включая жаберные дуги. В глазных зачатках *Noggin4* экспрессируется в материале презумптивной сетчатки, но не в презумптивном пигментном эпителии. Таким образом, заключают авторы, в раннем развитии *Noggin4* экспрессируется комплементарно *Noggin1* почти исключительно в эктодермальных производных. Единственное исключение из этого правила составляют узкие полоски клеток, расположенных вдоль срединных линий сомитов на стадиях 24-26.

Позже нами была проведена работа по изучению экспрессии *Noggin4* в курином зародыше (см. раздел «3.2.1. *Noggin4* консервативно экспрессируется в гомологичных эмбриональных структурах у амфибий и птиц»), результаты которой были опубликованы в журнале *International Journal of Developmental Biology* (Borodulin, Eroshkin et al. 2012).

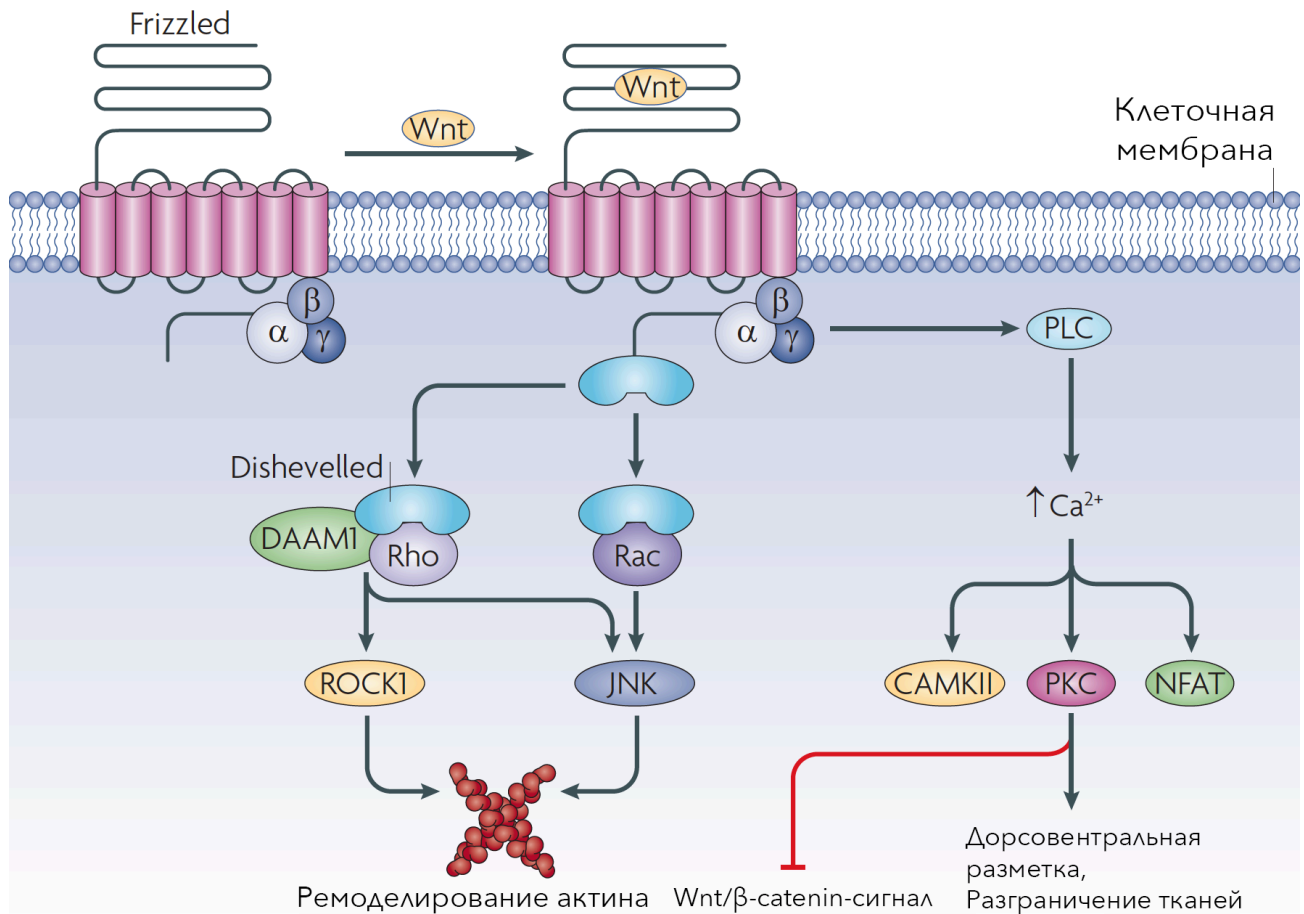
## Приложение 1



**Рис. 1.  $\beta$ -catenin-зависимая Wnt-сигнализация**

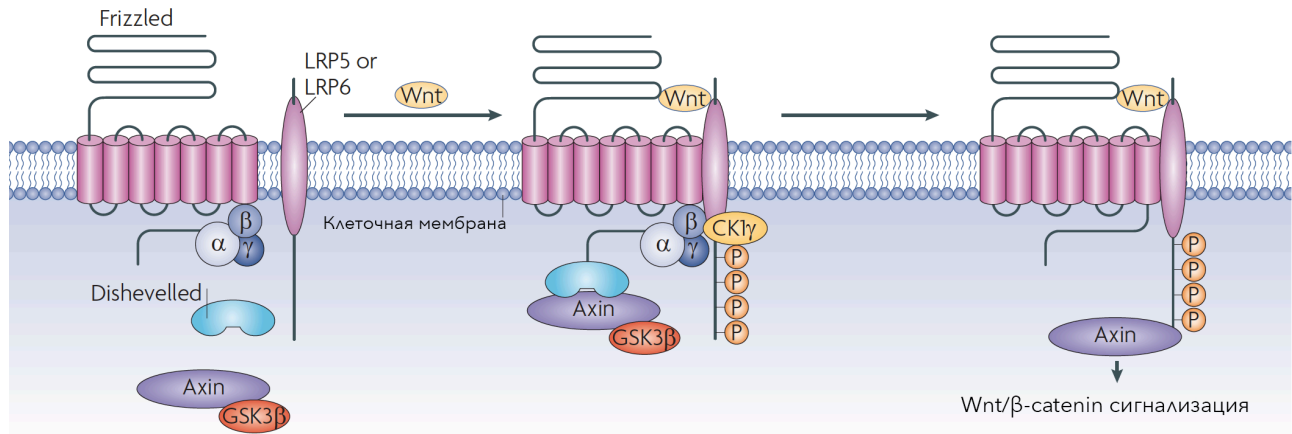
APC и Axin – скэффолд-белки, образующие комплекс деградации  $\beta$ -catenin. Фосфорилирование  $\beta$ -catenin составляющими GSK3 и CK1 $\alpha$  формирует сигнал распознавания  $\beta$ -catenin лигазой SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> E3 (не показана) и запускает его разрушение по пути убиквитин-протеасомному механизму. Таким образом, в состоянии покоя цитоплазматический пул  $\beta$ -catenin невелик, а экспрессия генов-мишеней каскада подавлена при помощи белков семейства транскрипционных репрессоров Groucho, связывающихся с LEF/TCF-белками. При взаимодействии лигандов Wnt с LRP5 или рецепторными комплексами Frizzled-LRP6 происходит активации гетеротримерных G-белков и Dishevelled, что ведет к включению Axin в состав комплексов с ко-рецепторами LRP5/6. При этом комплекс деградации подавляется,  $\beta$ -catenin аккумулируется в плазме и транслоцируется в ядро, где вытесняет Groucho из комплексов с LEF/TCF, действуя как транскрипционный ко-активатор контекст-зависимой транскрипции.  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  – субъединицы гетеротримерного G-белка. (Angers and Moon 2009)





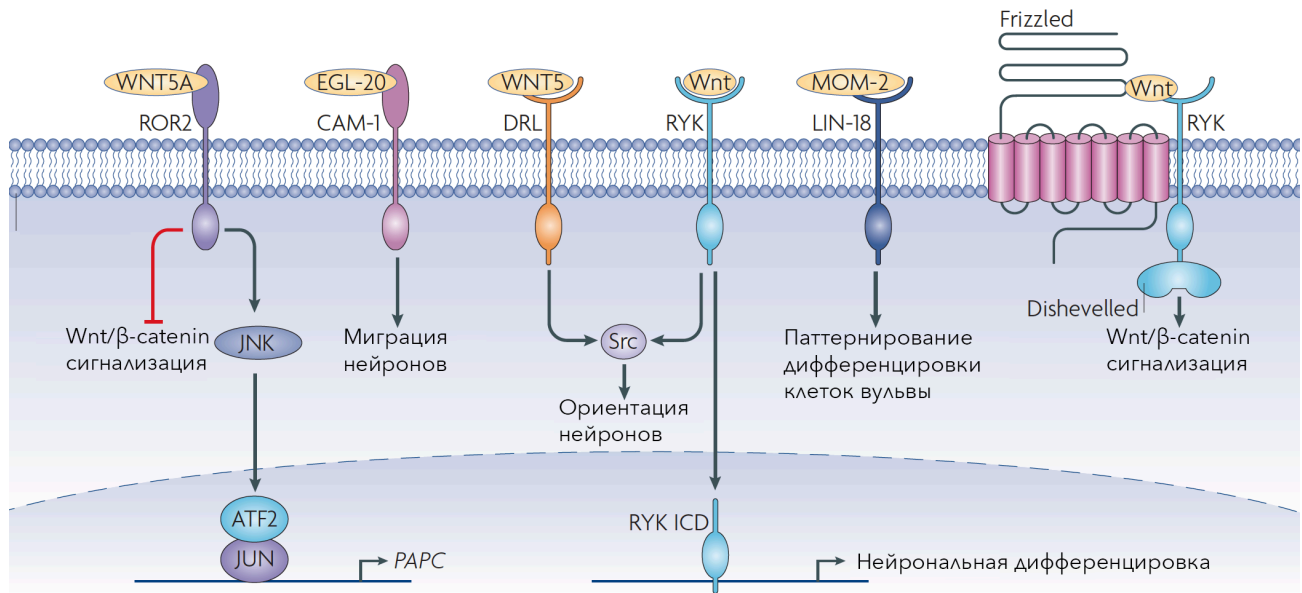
**Рис. 2.  $\beta$ -catenin-независимая Wnt-сигнализация**

“Неканонические” ветви Wnt-сигнального каскада не требуют транскрипционной активности  $\beta$ -catenin.  $\beta$ -Catenin-независимая Wnt сигнализация может активироваться специфическими комбинациями лигандов Wnt и рецепторов Frizzled, либо может зависеть от контекста специфических рецепторов. Активированные Frizzled-рецепторы инициируют сигнализацию через посредство G-белков (показаны в виде  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ -субъединиц) и/или белков Dishevelled. Одна из неканонических ветвей включает активацию малых G-белков Rho и Rac, регулирующих состояние актинового цитоскелета. DAAM1 образует комплекс с Dishevelled и действует через регуляцию ROCK1 и комплекс Dishevelled-Rac, влияя на JNK-опосредованное ремоделирование актина. Другая ветвь действует через PLC-опосредованное повышение внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , что ведет к активации CAMKII, PKC и NFAT. Эта сигнальная ветвь регулирует дорсовентральную разметку и разграничение тканей в зародышах, а так же является антагонистом Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнализации. (Angers and Moon 2009)



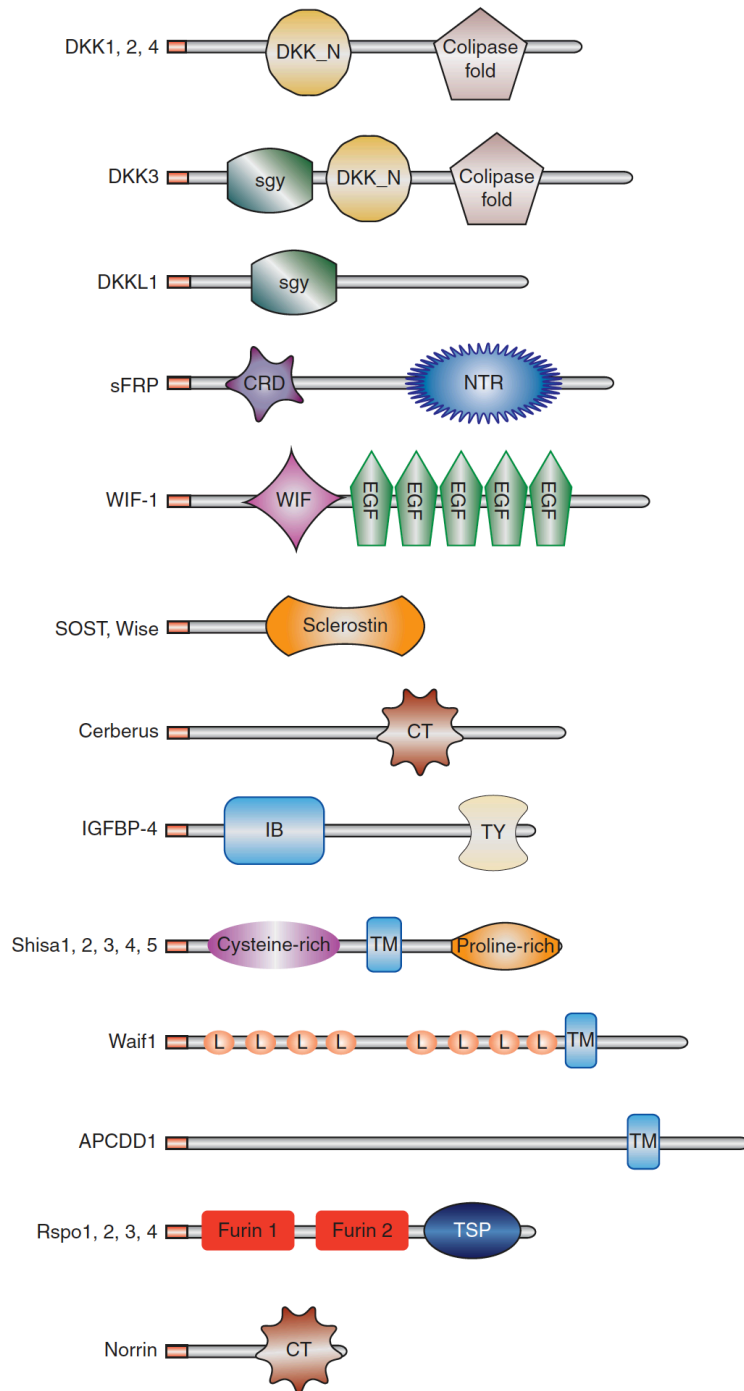
**Рис. 3. Латеральная сигнализация между Frizzled и LRP**

Активируясь при связывании с лигандами Wnt, рецепторы Frizzled взаимодействуют с цитоплазматическими белками Dishevelled, увеличивая их концентрацию в примембранной области. Dishevelled, в свою очередь, взаимодействуют с комплексом Axin-GSk3 $\beta$ , который фосфорилирует Pro-Pro-Ser-Pro-домены цитоплазматических хвостов LRP5/6. Это праймирует цитоплазматические части LRP5/6 для дальнейшего фосфорилирования киназой CK1 $\gamma$  и их взаимодействия с Axin. Поскольку пул Axin невелик, его дополнительное сокращение подавляет образование комплекса деградации  $\beta$ -catenin, что ведет к стабилизации  $\beta$ -catenin и активации каскада. Несмотря на то, что гетеротримерные G-белки показаны на рисунке ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ), их необходимость и вклад в фосфорилирование С-терминального домена LRP5/6 неясны. (Angers and Moon 2009)



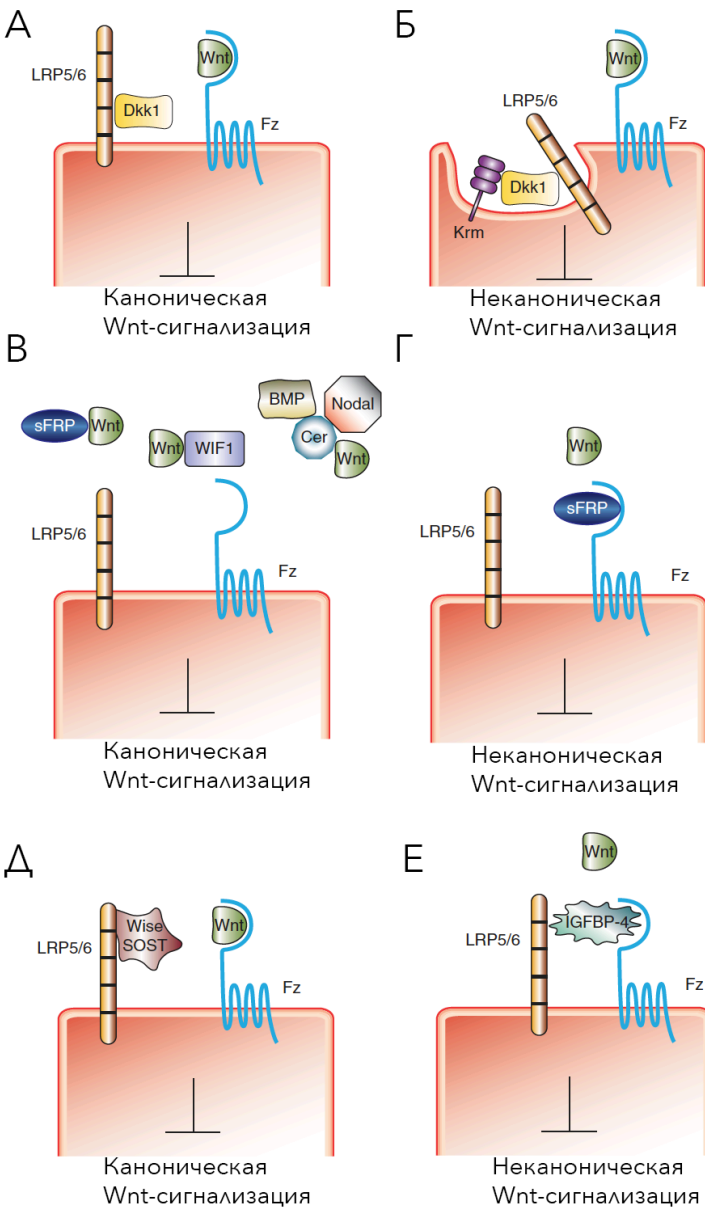
**Рис. 4. Рецепторы Wnt-лигандов, неродственные Frizzled**

Тирозин-киназные рецепторы ROR2 (позвоночные) и их гомологи CAM-1 (*Caenorhabditis elegans*) взаимодействуют через свои цистеин-обогащенные домены с лигандами Wnt5a и EGL-20, соответственно. У позвоночных ROR2-сигнализация ведет к подавлению Wnt/ $\beta$ -catenin-зависимой активности, активации неканонических сигнальных путей JNK/ATF2 и транскрипции гена параксиального протокадгерина (PAPC). EGL-20-зависимая активация CAM-1 у *C. elegans* опосредует миграцию нейронов. Derailed (DRL) у *Drosophila melanogaster*, тирозин-киназный рецептор Ryk у позвоночных и LIN-18 у *C. elegans* несут Wnt-ингибирующие домены, позволяющие им связывать белки Wnt. Через Src-зависимый сигнальный путь Ryk- и DRL-сигнализация контролирует направление роста аксонов. У позвоночных Wnt также могут опосредовать ядерную локализацию внутриклеточного домена (ICD) Ryk, расщепляемого протеазой и контролировать нейрональную дифференцировку. У *C. elegans* гомолог Wnt MOM-2 активирует LIN-18 в процессе дифференцировки клеток вульвы. Кроме этого, образуя комплексы с рецепторами Frizzled и белками Dishevelled, Ryk может участвовать в  $\beta$ -catenin-зависимой сигнализации. (Angers and Moon 2009)



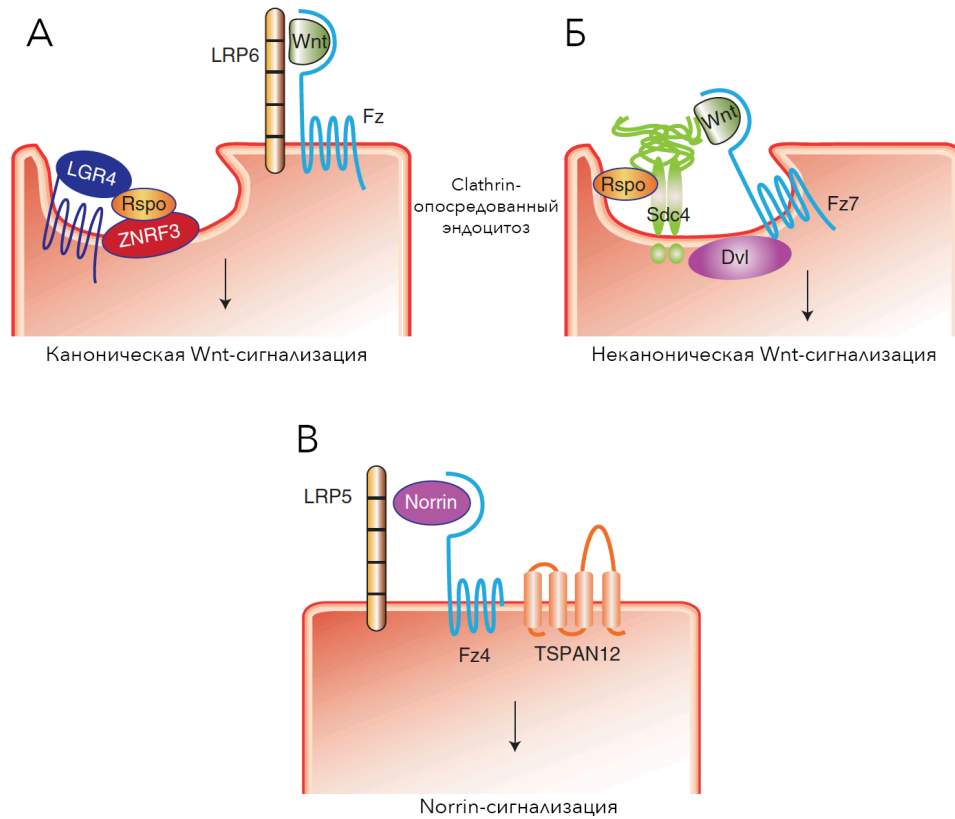
**Рис. 5. Доменная структура антагонистов и агонистов Wnt-сигнализации**

Сигнальный пептид в каждом белке помечен красным. NTR, Netrin-related домен; WIF, Wnt-inhibitory factor 1 домен; EGF, epidermal growth factor-like домен; CT, cystine knot-like домен; IB, insulin growth factor binding protein домент; TY, thyroglobulin type-1 домен; TM, transmembrane домен; L, лейцин-обогащенные повторы; TSP, thrombospondin type-1 домен. (Cruciat and Niehrs 2013)



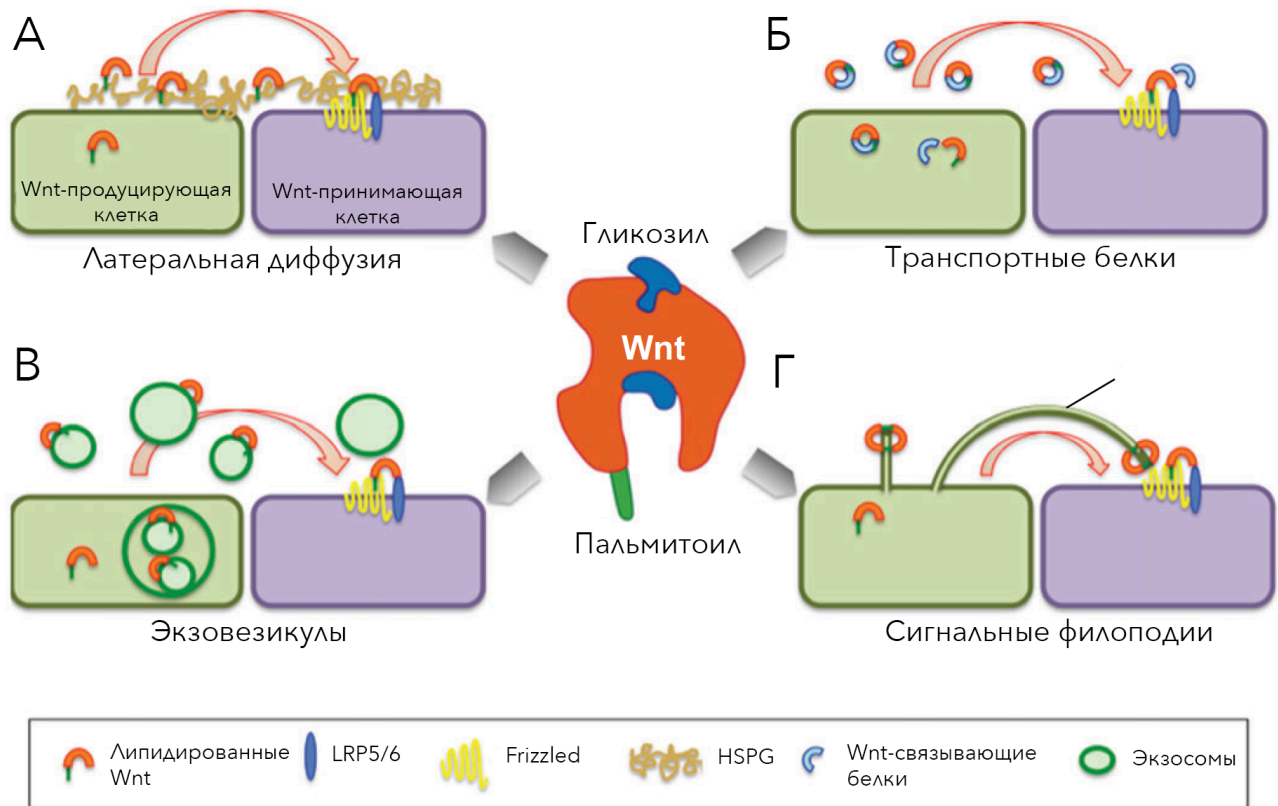
**Рис. 6. Модели подавления Wnt-сигнальной активности**

(**А, Б**) Взаимодействие Dkk1 с LRP6 блокирует Wnt-индуцированное образование комплекса Frizzled-LRP6 (**А**) и/или индуцирует эндоцитоз LRP6 в присутствии его ко-рецептора Кремен (**Б**). (**В**) sFRPs, WIF-1 и Cerberus связывают Wnt, подавляя сигнализацию как канонической, так и в неканонических ветвях каскада. (**Г**) sFRPs также могут подавлять каноническую и неканоническую Wnt-сигнализацию, связываясь с Frizzled. (**Д**) Присоединение Wise/SOST к LRP6 блокирует Wnt-индуцированное образование комплекса Fz-LRP6. (**Е**) IGFBP-4 связывается с LRP6 и Frizzled, препятствуя передаче Wnt-сигнала. (Cruciat and Niehrs 2013)



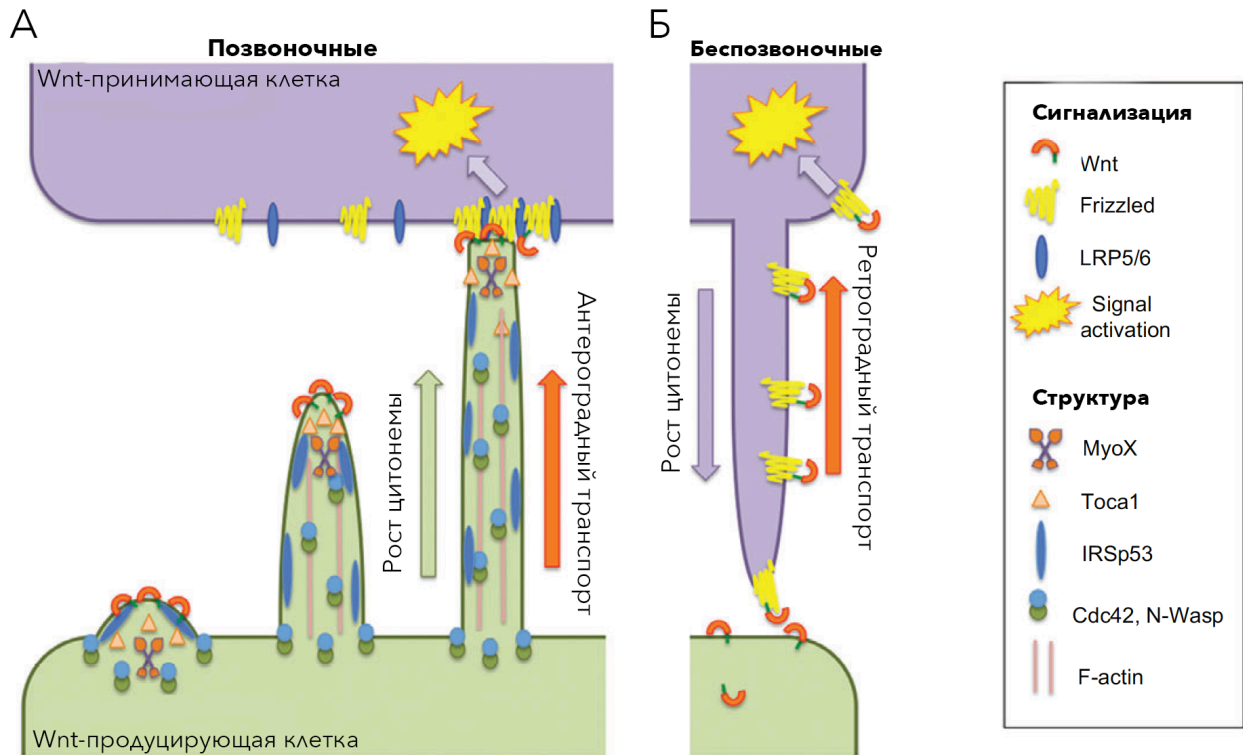
**Рис. 7. Модели возбуждения Wnt-сигнальной активности**

**(А)** Rspo связывает ZNRF3 и LGR4, индуцируя clathrin-опосредованный эндоцитоз рецепторов. Интернализированные ZNRF3 неспособны убиквитинилировать Wnt-рецепторы и стимулировать их деградацию. Вследствие этого Frizzled и LRP6 аккумулируются в клеточной мембране и участвуют в передаче Wnt-сигналов. **(Б)** Связывание Rspo3 с Sdc4 запускает clathrin-опосредованный эндоцитоз Wnt-рецепторного комплекса и таким образом способствует неканонической Wnt-сигнализации. **(В)** TSPAN12 является частью Norrin/Fz4/LRP5-сигнального комплекса и способствует Norrin/ $\beta$ -catenin-сигнализации. (Cruciat and Niehrs 2013)



**Рис. 8. Схематическое представление известных видов транспорта Wnt-лигандов**

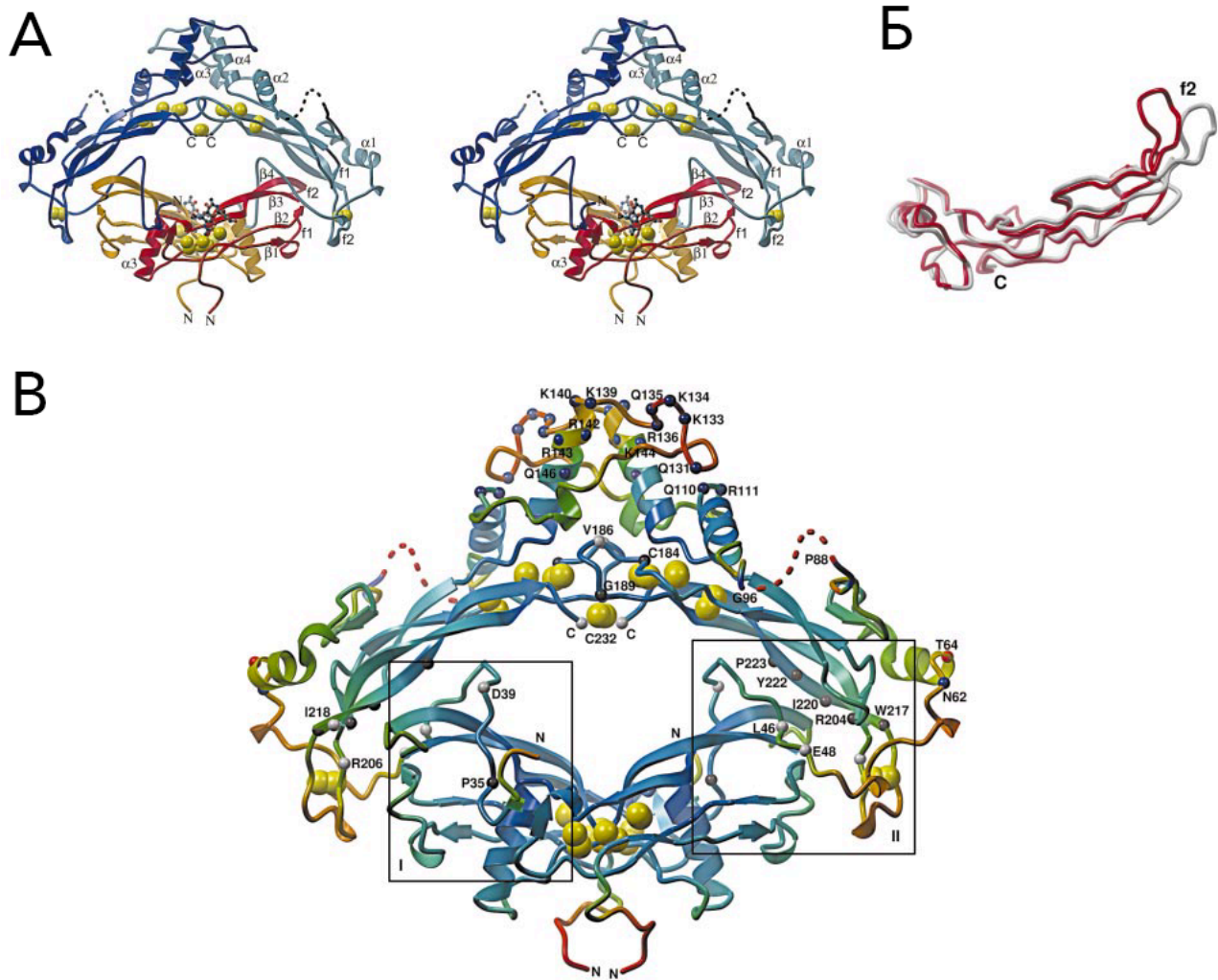
(А) Латеральная диффузия. Гепарансульфат-протеогликаны (HSPGs) содействуют латеральной диффузии гликозилированных Wnt-лигандов. (Б) Транспортные белки. Пальмитоилированные Wnt связываются и сольбилизируются специфическими внеклеточными липид-связывающими белками и транспортируются в составе комплекса к компетентной клетке. (В) Экзовезикулы, такие как липофорины и экзосомы, переносят на своих поверхностях липидированные лиганды Wnt и доставляют их к компетентной клетке. (Г) Цитонемы. Лиганды транспортируются при помощи цитонем, вытягивающихся от индуцирующей клетки к компетентной. (Stanganello and Scholpp 2016)



**Рис. 9. Принципиальная схема строения и функционирования цитонем**

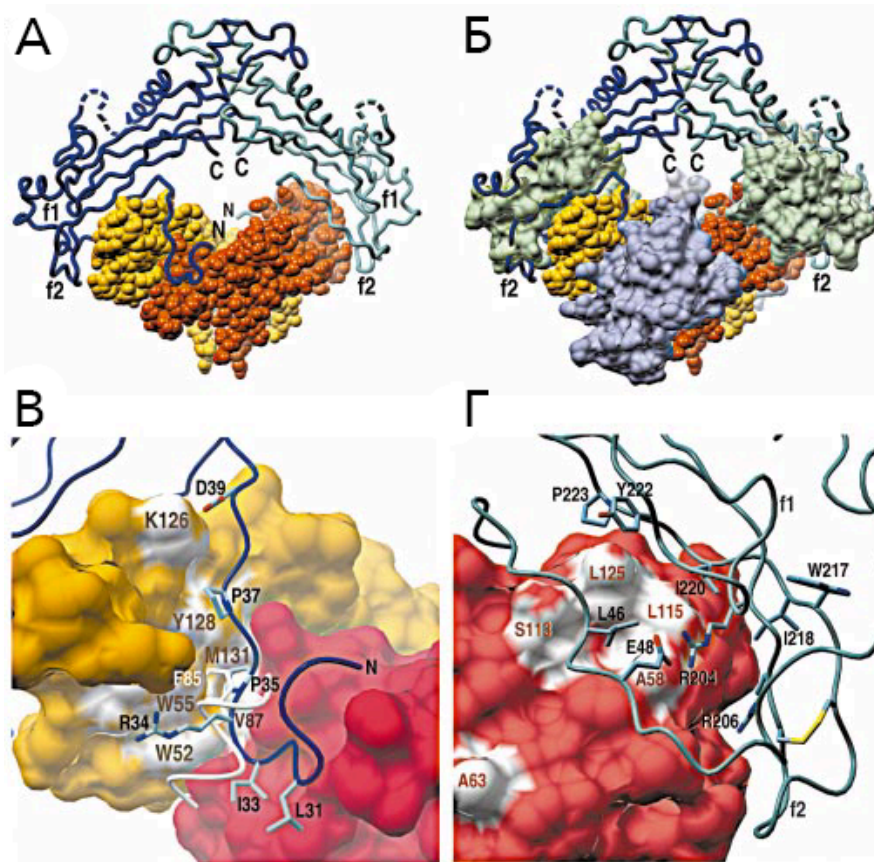
(А) Позвоночные. У данио Wnt8 включается совместно с белком нуклеации Тоса-1 в мембранные кластеры. Затем Cdc42 и N-Wasp совместно с IRSp53 индуцируют образование актин-содержащих филоподий. Wnt-цитонемы доставляют Wnt8 к реципиентной ткани, обеспечивая таким образом юстакринную активацию каскада. В реципиентной клетке Wnt8 подвергается эндоцитозу, активируя сигнализацию в Wnt-пути. (Б) Беспозвоночные. У *Drosophila* Frizzled-положительные цитонемы вытягиваются от Wnt-реципиентной клетки и вступают в контакт с Wnt-продуцирующей клеткой. После образования Wnt-рецепторного комплекса на цитонеме лиганд транспортируется к Wnt-реципиентной клетке в ретроградном направлении. (Stanganello and Scholpp 2016)





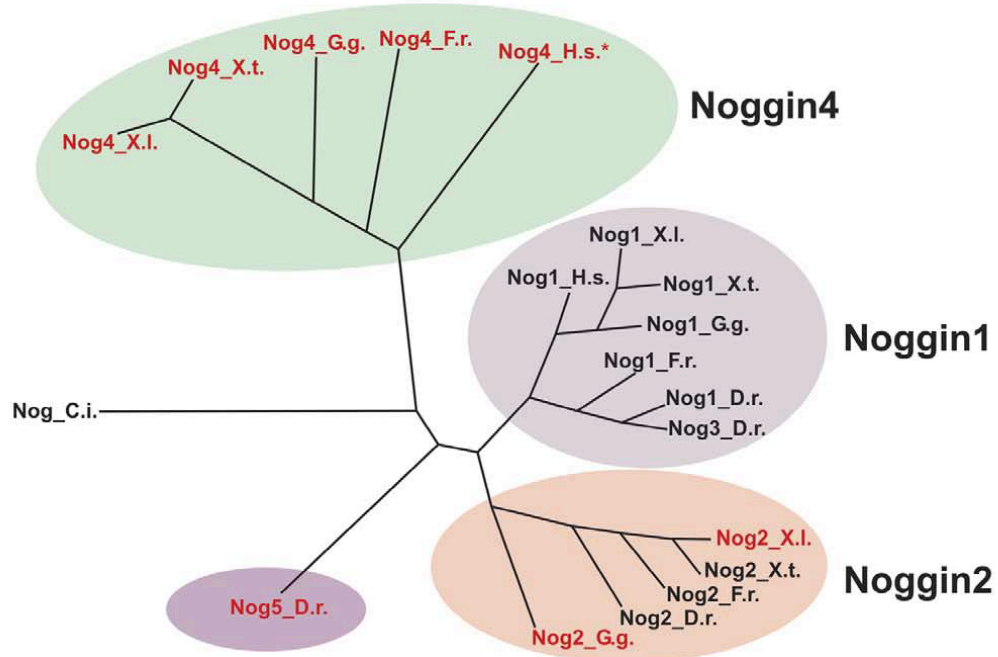
**Рис. 10. Структура комплекса Noggin-BMP7**

(A) Стереорезультат изображения комплекса BMP7. Субъединицы Noggin показаны синим и голубым цветами, субъединицы гомодимера BMP7 – красным и золотым; атомы серы в составе цистиновых связей – желтые сферы; N-ацетилглюкозамины BMP7 показаны как шарики, соединенные прямыми линиями (модель balls-and-sticks). Пальцы (f1 и f2) гомодимеров Noggin и BMP7 помечены вблизи их концов. (B) Суперпозиция свободного (серый) и связанного с Noggin (красный) мономеров BMP7, как они выглядят при взгляде сверху на комплекс (A). (C) Комплекс Noggin-BMP7, градиентно помеченный цветами радуги, соответствующими значениям B-фактора (синий соответствует наименьшему значению, красный – наибольшему), который отражает относительную упорядоченность/хаотичность. Субъединицы, несущие патологические мутации Noggin, показаны черным; замены в разных конструкциях – светло-серым (Asp 39, Leu 46, Glu 48, Val 186, Arg 206, Ile 218, Cys 232) или черным (Pro 35). Остатки гепарин-связывающего сайта Noggin (от Gln 131 до Lys 144 и предположительно Gln 110, Arg 111) показаны синим. Asn 62 и Thr 64 содержат N-связанный сигнал гликозилирования. Помечена лишь одна группа остатков, хотя выделены обе цепи. Области, выделенные прямоугольниками I и II, показаны на Рис. 11 (B, Г). (Groppe, Greenwald et al. 2002)



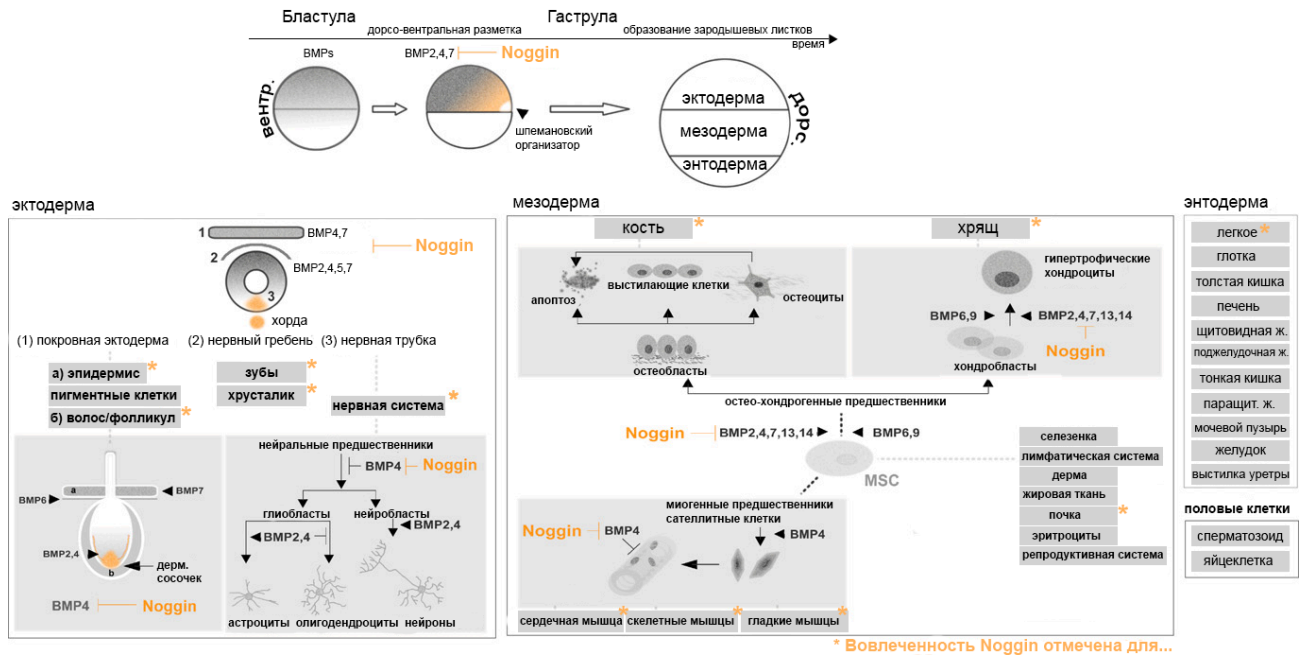
**Рис. 11. Структурная основа ингибиторного действия Noggin**

(А, Б) Комплекс Noggin-BMP7 (слева) наложен на модель комплекса BMP7-ActRII-BMPRIa complex (справа). Мономеры BMP7 окрашены как на Рис. 10; пары внеклеточных доменов ActRII и BMPRIa показаны зеленым и синим, соответственно. Пальцы (f1 и f2) и С-концевая половина clip-домена белка Noggin препятствует связыванию с ActRII. N-концевая половина clip-домена препятствует связыванию с BMPRIa. (В) Поверхность BMP7 с Noggin (синяя петля) в BMPRIa-связывающем эпитопе (см. Рис. 10В, область I). Спираль  $\alpha 3$  (белая петля) и Phe 85 рецептора BMPRIa в составе комплекса BMPRIa-BMP2. (Г) Взаимодействия в ActRII-связывающем эпитопе (см. Рис. 10В, область II). Ala 58, Ala 63, Ser 113, Leu 115 и Leu 125 ActRII-связывающего эпитопа показаны белым. Noggin показан голубым. (Groppe, Greenwald et al. 2002)



**Рис. 12. Филогенетические отношения семейства *noggin***

Филогенетическое древо генов семейства *noggin*, обнаруженных у курицы (G.g.), рыбы данио (D.r.), рыбы *Fugu rubripes* (F.r.), человека (H.s.), бесхвостых амфибий *Xenopus laevis* (X.I.) и *Xenopus tropicalis* (X.t.). H.s.\* – аминокислотная последовательность, восстановленная из человеческого псевдогена *noggin4*. Все вновь обнаруженные гены *noggin* помечены красным. (Ershkin, Ermakova et al. 2006)



**Рис. 13. Краткое описание функций Noggin при гаструляции и гистогенезе**

Показаны ингибиторные влияния Noggin на соответствующие сигнальные факторы BMP в процессе дорсо-вентральной разметки гаструлы и образования тканей из зародышевых листков. Звездочкой отмечены ткани, для которых показано участие Noggin в поддержании эмбрионального и дeфинитивного гомеостаза.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Результаты

#### 3.1.1. Описание распределения экспрессии *Noggin4* в раннем развитии *G. gallus*

Несмотря на то, что ортологи *noggin4* обнаруживаются в геномах всех позвоночных, кроме млекопитающих, характер экспрессии белка *Noggin4* в раннем эмбриональном развитии был охарактеризован только у зародышей шпорцевой лягушки (Eroshkin, Ermakova et al. 2006). Поскольку *Noggin4* потенциально вовлечен в регуляцию раннего эмбриогенеза, описание паттернов экспрессии его ортологов в индивидуальном развитии других видов позвоночных и сравнительная оценка эволюционной консервативности этих паттернов представляет актуальный научный интерес. Кроме того, мы считаем важным сравнить характер экспрессии разных гомологов семейства *Noggin* и сопоставить различия паттернов экспрессии с выполняемыми этими белками функциями.

При помощи метода гибридизации *in situ* в тотальных препаратах мы изучили пространственное и временное распределение транскрипции *Noggin4* в раннем развитии куриного зародыша *Gallus gallus* (Borodulin, Eroshkin et al. 2012) и провели сравнительный анализ полученных результатов с аналогичными данными, полученными ранее на зародышах шпорцевой лягушки. В качестве контроля гибридизации мы использовали переднемозговой маркер *Ganf* (Рис. 253, И).

На ранних стадиях развития, вплоть до образования первых сомитов, *Noggin4* экспрессируется крайне диффузно. В зародышах на стадии 4 (Рис. 25А) мРНК *GNoggin4* транскрибируется вдоль всей первичной полоски; углубление по срединной линии первичной полоски при этом остается свободным от экспрессии *Noggin4*. Уровень экспрессии на этой стадии имеет локальный минимум в областях первичной полоски, непосредственно прилежащих к гензеновскому узелку с постепенным нарастанием в каудальном направлении. В области гензеновского узелка и ньюкуповского центра экспрессия максимальна. В большинстве полученных препаратов на этой стадии можно заметить намечающуюся асимметрию экспрессии в области гензеновского узелка.

С началом гастрюляции (Рис. 25Б, В) асимметрия экспрессии в гензеновском узелке проявляется наиболее явно (Рис. 25В'): яркая область хорошо заметна в правой части гензеновского узелка, она заметно смещена в ростральном направлении. Второе, менее яркое и не

всегда заметное пятно экспрессии в области гензеновского узелка локализуется асимметрично слева и несколько смещено в каудальном направлении. В хордальном выросте *Noggin4* экспрессируется заметно слабее, его окрашивание снижается до фонового в ростральном направлении. Хордальный вырост и гензеновский узелок окружен зоной диффузной экспрессии с тремя локальными максимумами – по обе стороны от узелка и впереди от хордального выроста. В центре узелка экспрессия минимальна, окрашивание этой области неотлично от фонового. Ростральнее гензеновского узелка экспрессия на поперечном срезе наблюдается почти исключительно в эктодерме (Рис. 25Б'). Непосредственно каудальнее узелка уровень экспрессии несколько снижается. На некоторых препаратах окрашивание в этой области трудно отличить от фонового, однако в большинстве препаратов, несмотря на несколько сниженный уровень экспрессии, окраска валиков в этой части первичной полоски хорошо различима. Далее в каудальном направлении наблюдается постепенное нарастание уровня экспрессии в валиках первичной полоски с максимумом в самых задних ее отделах, сравнимым с глобальным максимумом в узелке. В области задней краевой зоны в большинстве препаратов располагается яркая зона экспрессии, завершающая общий паттерн.

Стадия 7 (Рис. 25Г) характеризуется выраженной экспрессией *Noggin4* в материале головной складки располагающихся непосредственно за ней нервных валиках, где выраженность окраски максимальна в самых ростральных частях зародыша и быстро падает до фоновой в каудальном направлении. В хорде на этой стадии экспрессия *Noggin4* отсутствует или слабо различима. Одновременно, в каждом вновь образующемся сомите наблюдается повышение экспрессии *Noggin4*. В области узелка в ходе гастрюляции, продолжающейся в каудальной части зародыша, асимметрия экспрессии *Noggin4* на этой стадии исчезает. В первичной полоске, каудальнее гензеновского узелка, паттерн экспрессии не отличается от такового на предыдущей стадии. На поперечном срезе хорошо заметно, что *Noggin4* экспрессируется на уровне нервных валиков почти исключительно в нейроэктодерме (Рис. 25Г'). На стадии 8 (Рис. 25Д) экспрессия в нервных валиках продолжается и распространяется в каудальном направлении, по-прежнему не достигая уровня первых сомитов. В оформленных сомитах наблюдается явное повышение уровня экспрессии, по сравнению с несегментированной параксиальной мезодермой. В каудальном направлении от последнего сомита наблюдается диффузное распределение окрашивания в несегментированной мезодерме (область продолжающейся гастрюляции), переходящее в самых каудальных отделах в обычный для более ранних стадий рисунок экспрессии в первичной полоске. Стадия 10 (Рис. 25Е) отличается от предыдущих прогрессивным распространением экспрессии *Noggin4* в нервных валиках. В сомитах, как и в головных структурах, по-прежнему наблюдается повышенная

относительно туловищных нервных валиков экспрессия. Тенденция к распространению экспрессии вдоль нервных валиков завершается на стадии 10. На стадии 12 (Рис. 25Ж) экспрессия снижается до минимума над закрытой частью нервной трубки, но продолжается в головных структурах, преимущественно в нейроэктодерме и ее производных (Рис. 25Ж').

### *3.1.2. Исследование влияния *Noggin4* на развитие осевых и головных структур*

Молекулярная функция *Noggin1* состоит в связывании лигандов BMP4 и подавлении активности соответствующего сигнального каскада. Это подтверждается рядом экспериментов, в том числе по ко-иммунопреципитации *Noggin1* с BMP4 и измерению активности соответствующих люциферазных репортеров. Его физиологическая функция состоит в обеспечении нейтрализации эктодермы, что подтверждается индукцией вторичной оси тела при эктопической экспрессии *Noggin1* на брюшной стороне зародыша.

Принимая во внимание полученные ранее данные об относительно низкой степени сходства первичной структуры *Noggin4* и его гомологов (Рис. 18А) (Eroshkin, Ermakova et al. 2006), мы предположили, что по своим молекулярным и физиологическим свойствам *Noggin4* отличается от *Noggin1* и *Noggin2*, а именно, что он не способен индуцировать образование вторичных осевых комплексов.

Для проверки этой гипотезы мы провели сравнительный эксперимент по влиянию эктопической экспрессии *Noggin1* и *Noggin4* на фенотип зародышей. Для этого 4-клеточные зародыши инъецировали в экваториальную зону вентральных бластомеров смесью мРНК *Noggin1* (15 нг/бластомер) с несекретируемым зеленым флюоресцентным красителем FLD, либо смесью FLD с мРНК *Noggin4* (150 нг/бластомер). Несмотря на то, что концентрация инъецируемой мРНК *Noggin4* была на порядок выше концентрации мРНК *Noggin1*, эктопическая оверэкспрессия *Noggin4* на брюшной стороне зародыша оказалась неспособной индуцировать развитие вторичной оси тела, как это происходит в случае с *Noggin1* (Рис. 14).

Несмотря на неспособность влиять на контролируемые BMP-сигналингом морфогенетические процессы, *Noggin4* все же оказывает заметное влияние на развитие переднеголовных структур. Так, в зародышах с искусственно повышенным уровнем экспрессии *Noggin4* на стадии хвостовой почки проявляются фенотипические эффекты увеличения глаз и присоски. Напротив, в зародышах, где экспрессия *Noggin4* была подавлена специфическими антисмысловыми морфолино-олигонуклеотидами (МО1), на той же стадии наблюдается обратный эффект – уменьшение линейных размеров глаза и присоски (Рис. 18В).

На стадии головастика эффекты усиления экспрессии *Noggin4* при введении экзогенной мРНК проявляются в значительном увеличении размеров глаз и приобретении ими колбовидной формы (Рис. 20Б, Д). Подавление экспрессии при помощи MO2 дает противоположные результаты, наблюдаются недоразвитие головных структур – уменьшение линейных размеров головы и туловища и формирование уменьшенного циклопического глаза.

Эффекты влияния экспрессии *Noggin4* на развитие головы наблюдаются так же в экспериментах по гибридизации *in situ* в тотальных препаратах зародышей шпорцевой лягушки. Так, при РНК-гибридизации с dig-зондами к маркерам презумптивного переднего мозга – *FoxG1*, *Rx*, *Otx2* и *Rax6* – при искусственном усилении экспрессии *Noggin4* на стадии средней нейрулы наблюдается передне-латеральное расширение зон экспрессии этих маркеров (Рис. 18Г'-Ж'), по сравнению с контрольными зародышами (Рис. 18Г-Ж). Вместе с тем, при введении MO области экспрессии этих генов в пределах нервной пластинки демонстрируют существенное сокращение линейных размеров (Рис. 18Г"-Ж"; Рис. 20Ж-М).

Известно, что для эктопической индукции минимального полного вторичного осевого комплекса, включающего туловищный и головной отделы, необходимо и достаточно одновременно подавить активность двух сигнальных каскадов – *Wnt/β-catenin* и *BMP* (Glinka, Wu et al. 1997). Подавление активности только *BMP*-каскада индуцирует развитие вторичной оси без головных структур. Учитывая эти данные, а так же свидетельства того, что *Noggin4* негативно регулирует активность *Wnt/β-catenin*-пути, мы предположили, что эктопическая экспрессия *Noggin4* при одновременном подавлении активности *BMP*-каскада способна индуцировать полные осевые комплексы. Для проверки этого предположения мы использовали мРНК доминант-негативного *BMP*-рецептора (*tBR*), ко-инъецируемого с мРНК *Noggin4* в вентральные бластомеры. Результаты этого эксперимента показывают, что в условиях, когда активность в *BMP*-каскаде подавлена при помощи *tBR*, *Noggin4* действительно способен индуцировать полные вторичные оси, включая передний мозг и циклопические глаза, приблизительно у 60% экспериментальных зародышей (Рис. 17В, В'). Вместе с этим, введение мРНК *tBR* приводит к формированию туловищных отделов без головных структур.

### 3.1.3. Оценка влияния *Noggin4* на активность специфических люциферазных репортеров

Неспособность *Noggin4* обеспечивать развитие вторичных осевых структур при эктопической экспрессии указывает на то, что данный белок не оказывает влияния на активность *BMP*-сигнального пути, подавление которого является необходимым условием нейральной индукции. С другой стороны, выявленная нами способность *Noggin4* к антериоризации фенотипа указывает на



то, что он может функционировать подобно ингибиторам Wnt/ $\beta$ -catenin и/или Activin/Nodal. Из данных других авторов известно, что подавление активности этих сигнальных путей необходимо для развития головных структур (Glinka, Wu et al. 1998, Piccolo, Agius et al. 1999). Для проверки гипотезы о том, что Noggin4 не влияет на активность BMP-сигнального пути и для изучения влияния Noggin4 на активность путей Wnt/ $\beta$ -catenin и Nodal/Activin мы использовали плазмиды, несущие ген люциферазы под контролем Smad2-связывающих цис-регуляторных элементов (pBRE-Luc – BMP-каскад; pARE-Luc – Nodal/Activin-каскад; pTOPFlash – Wnt/ $\beta$ -catenin-каскад).

Экспериментальные данные наглядно демонстрируют, что в отличие от своих гомологов, Noggin4 не оказывает существенного влияния на люциферазную активность BRE-репортера, индуцированную в эктодермальных эксплантатах мРНК BMP4, даже в тех случаях, когда его концентрация на один или два порядка превосходит концентрацию Noggin1 и Noggin2 (Рис. 15А).

Так же мы не обнаружили заметного влияния мРНК Noggin4 на люциферазный репортер ARE, активируемый при помощи мРНК лигандов Nodal/Activin-сигнального каскада – ActivinB и Xnr2: в обоих случаях введение мРНК Noggin4 в трех повышающихся концентрациях не приводило к подавлению люциферазного сигнала (Рис. 15Б, В).

Наконец, мы оценили влияние Noggin4 на люциферазную активность плазмиды pTOPFlash в эктодермальных эксплантатах зародышей, в которых Wnt-сигнализация была стимулирована мРНК Wnt8. Зародыши в экспериментальных группах инъецировались смесью люциферазной плазмиды и мРНК Wnt8 с добавлением мРНК Noggin4 в трех возрастающих концентрациях. Мы показали, что введение мРНК Noggin4 в зародыши при синхронной активации репортера TOPFlash снижает его активность, причем степень выраженности этого эффекта находится в прямой зависимости от концентрации вводимой мРНК Noggin4 (Рис. 15Г).

Учитывая, что Noggin4 является секретлируемым белком, мы предположили, что он реализует свою молекулярную функцию во внеклеточном пространстве, на уровне не ниже рецепторов Wnt8. Для проверки этой гипотезы мы стимулировали сигнализацию в каноническом Wnt-каскаде при помощи оверэкспрессии одного из внутриклеточных эффекторов данного пути –  $\beta$ -catenin – и проверили в этих условиях способность Noggin4 подавлять активность репортера TOPFlash. Для этого 2-клеточные зародыши были инъецированы смесью мРНК  $\beta$ -catenin в смеси с плазмидой pTOPFlash. В экспериментальных группах зародыши инъецировали такой же смесью с добавлением мРНК Noggin4 в двух концентрациях. Выяснилось, что в данных условиях введение мРНК Noggin4 не оказывает заметного влияния на активность TOPFlash-репортера, активированного экзогенной мРНК  $\beta$ -catenin (Рис. 15Г).

### 3.1.4. Изучение способности *Noggin4* связывать лиганды разных сигнальных путей

Для изучения способности *Noggin4* связывать лиганды разных сигнальных путей нами были получены плазмидные конструкции, кодирующие производные различных белков, меченные специфическими антигенными эпитопами flag и мус на N- или C-конце зрелого полипептида, а именно BMP4 (BMP-каскад); ActivinB, Xnr2, Xnr4 (Nodal/Activin каскад) и Wnt8 (канонический Wnt каскад).

При помощи метода ко-иммунопреципитации нам удалось оценить способность белка мус-*Noggin4* напрямую связывать белок flag-BMP4 и сравнить его с другими гомологами семейства *Noggin*. Результаты этого эксперимента указывают на то, что в условиях, в которых мус-*Noggin1* образует комплекс с flag-BMP4, мус-*Noggin4* не связывает данный белок (Рис. 16А; см. так же Fig. 2G в (Baurov, Eroshkin et al. 2011)). Эти данные согласуются с результатами эксперимента по измерению концентрации фосфорилированного Smad1, являющегося одним из ключевых переносчиков сигнала в составе внутриклеточной части BMP-каскада. Активация этого белка, связана с его фосфорилированием внутриклеточным киназным доменом TGF $\beta$ -рецептора I типа. Фосфорилированный P-Smad1 приобретает способность взаимодействовать с другими внутриклеточными участниками каскада и таким образом обеспечивать передачу сигнала в ядро. Количественное измерение внутриклеточной концентрации активного P-Smad1 в зародышах с повышенной экспрессией белков семейства *Noggin* позволяет оценить степень их влияния на активность BMP-сигнального пути (см. раздел «5.2.16. Измерение внутриклеточной концентрации активного P-Smad1»). При помощи метода ко-иммунопреципитации мы провели такую оценку и выяснили, что в отличие от обоих своих гомологов, *Noggin4* при оверэкспрессии не влияет на концентрацию P-Smad1 (Рис. 16Б). Кроме того, ко-иммунопреципитация flag-меченных лигандов Nodal/Activin-каскада – ActivinB, Xnr2 и Xnr4 – с мус-*Noggin4* показывает, что *Noggin4* не образует комплексов ни с одним из изученных белков (Рис. 17А).

Одновременно мы обнаружили, что мус-*Noggin4* способен к образованию комплекса с лигандом Wnt-сигнального пути, flag-Wnt8 (Рис. 17А). При этом он конкурирует за связывание с Frizzled8 – специфическим мембранным рецептором лиганда Wnt8, экспрессирующимся в передней нейроэктодерме (Itoh, Jacob et al. 1998). При повышении количества вводимой мРНК Frizzled8 количество flag-Wnt8, доступного для связывания с мус-*Noggin4*, прогрессивно снижается (Рис. 17Б).

При проведении экспериментов по связыванию *Noggin4* и Wnt8 мы выяснили, что способность flag-Wnt8-связывающий потенциал мус-*Noggin4* зависит от способа выделения: при выделении белков из тотального лизата зародышей, несмотря на хорошую их экспрессию, нам не

удалось увидеть образования комплекса между мус-Noggin4 и flag-Wnt8. В то же время при выделении белков, секретированных в межклеточное пространство зародыша с использованием бескальциевой среды CMFM (см. раздел «5.2.15. Выделение секретируемых белков из межклеточного пространства эмбриональной ткани»), было впервые показано образование устойчивого комплекса секретируемых во внеклеточное пространство факторов мус-Noggin4 и flag-Wnt8 (Martynova 2016)

### 3.1.5. Изучение влияния *Noggin4* на экспрессию генов-мишеней *Wnt/β-catenin* пути

Если *Noggin4* действительно способен напрямую подавлять активность сигнального пути *Wnt/β-catenin*, то следует ожидать, что при искусственном изменении его количества в зародыше уровни экспрессии прямых генов-мишеней данного сигнального каскада будут синхронно и предсказуемо меняться. Нам удалось оценить это при помощи qRT-PCR прямых генетических мишеней *β-catenin*-зависимого *Wnt*-пути, включая такие гены как *Axin2*, *HoxA1*, *HoxB1*, *HoxD1*, *Siamois* и *Xnr3* (Тао, Yokota et al. 2005). Действительно, мы обнаружили, что в зародышах, в которых экспрессия *Noggin4* была подавлена при помощи *Noggin4 MO1*, уровень экспрессии этих генов значительно повышается и, напротив, снижается при оверэкспрессии *Noggin4* (Рис. 15Д).

### 3.1.6. Проверка специфичности и физиологической эффективности *MO*

В целях верификации результатов экспериментов с использованием специфических морфолино-олигонуклеотидов к *Noggin4* мы провели оценку эффективности *MO1* и *MO2* в отношении обеих псевдоаллелей мРНК *Noggin4 X. laevis*. Сайты взаимодействия *MO1* соответствует позициям от -20 до +5 в зрелой мРНК *Noggin4*, где за первые три нуклеотида принят старт-кодон AUG. Сайты взаимодействия *MO2* соответствуют позициям от +1 до +25 (Рис. 21А).

Специфичность действия *MO* в отношении мРНК *Noggin4* проверяли при помощи вестерн-блоттинга. Для этого мРНК Мус-Noggin4 инъецировали в каждый бластомер зародышей на стадии 2 клеток (100 пг/бластомер) саму по себе и в смеси с одним из *MO* – контрольным *misNoggin4 MO*, опытными *MO1* и *MO2* (8 нл 0.2 мМ водного раствора) или стандартным некомплементарным контрольным *MO*, предоставленным GeneTools (8 нл 0.2 мМ водного раствора). Зародыши инкубировали до стадии средней гаструлы, после чего их гомогенизировали и анализировали на предмет наличия белка Мус-Noggin4 при помощи вестерн-блоттинга с anti-Мус антителами (Рис. 21Б). В зародышах, инъецированных смесью мРНК Мус-Noggin4 с *MO1/MO2*, нам не удалось обнаружить Мус-меченный белок *Noggin4*, что говорит об эффективном подавлении трансляции обоими *MO*. Напротив, в отрицательном (только мРНК Мус-Noggin4) и положительном (смесь

мРНК *Myc-Noggin4* с некоплементарным *misNoggin4* MO) контролях иммуноблот предсказуемо показывает наличие в пробах белка *Myc-Noggin4*.

Для дополнительной проверки эффективности MO1 мы провели эксперимент по “спасению фенотипа”, в котором в каждый бластомер 2-клеточных зародышей инъецировали либо MO1, либо смесью MO1 с мРНК *Noggin4*, лишенной сайта взаимодействия с данным MO. Зародыши инкубировали до стадии головастика, обездвигивали, измеряли и вычисляли средний дорсо-антериорный индекс (Medial Dorso-Anterior Index, DAI) (Kao and Elinson 1988). Найденный таким образом DAI для группы зародышей, инъецированных чистым MO1, составил 2.8, тогда как для группы зародышей, инъецированных вышеупомянутой смесью, этот показатель составил 4.1. Эти данные указывают на то, что при введении функциональной мРНК *Noggin4*, неспособной к взаимодействию с MO1, но сохраняющей полную информацию о функциональном белке *Noggin4*, происходит «спасение фенотипа» при помощи этой мРНК, действие которой заменяет действие разрушаемой при помощи MO1 мРНК дикого типа. Фенотипические эффекты уменьшения переднеголовных структур так же наблюдаются при введении обоих вариантов MO *Noggin4* – MO1 (Рис. 18В) и MO2 (Рис. 20В, Е), но не в случае контрольного *misNoggin4* MO1 (Рис. 20А, Г).

### 3.1.7. Свидетельства нелокальности физиологического действия *Noggin4*

Мы обнаружили, что белок *Noggin4* проявляет свое физиологическое действие не только локально, но и в районах, лежащих за пределами области его повышенной/пониженной экспрессии. Признаки такого поведения *Noggin4* обнаруживаются при сравнении контрольных зародышей, унилатерально инъецированных мРНК EGFP (Рис. 19А-А”, В-В”), с зародышами, асимметрично инъецированными мРНК *Noggin4* в один из передне-дорсальных бластомеров на стадии 8 клеток. На картинах гибридизации *in situ* с *dig*-зондами к переднеголовным маркерам *FoxG1*, *Rx*, *Otx2* и *Rax6* на стадии средней нейрулы хорошо видно, что увеличение линейных размеров области экспрессии вышеперечисленных генов проявляется не только в части зародыша, состоящей из нагруженных экзогенной мРНК *Noggin4* потомков инъецированного бластомера (Рис. 19Б, Г, Д, Е; на флюоресцентных фотографиях (Б'-Е') эти зоны отмечены несекретируемым зеленым флюоресцентным красителем FLD), но и в областях, где экзогенная мРНК *Noggin4* отсутствует (отмечены стрелками).

Учитывая эти данные, мы предположили, что при асимметричной оверэкспрессии *Noggin4* можно ожидать нелокальную морфологическую антериоризацию фенотипа, подобно той, что наблюдается при унилатеральной оверэкспрессии мРНК *Noggin4* (Рис. 18В). Для проверки этой гипотезы мы инъецировали мРНК *Noggin4* с несекретируемым зеленым флюоресцентным

красителем FLD на стадии 8 клеток асимметрично в правые дорсальный и вентральный бластомеры, после чего инкубировали зародыши до стадии хвостовой почки и оценивали полученные таким образом фенотипы (Рис. 19Ж-Ж’). По сравнению с контрольной группой, в экспериментальных зародышах действительно наблюдается увеличение линейных размеров присоски не только в области экспрессии экзогенной мРНК (на флюоресцентной фотографии (Ж’) соответствует окрашенной области), но и в области, где экзогенная мРНК отсутствует (на фотографиях помечена стрелками).

### 3.1.8. Оценка способности *Noggin4* к диффузии в межклеточном пространстве *in vivo*

*Noggin4* является секретируемым белком. Чтобы функционировать в качестве естественного ингибитора Wnt-сигнализации, он должен распространяться в межклеточном пространстве живого зародыша, взаимодействуя с Wnt8. Таким образом, для подтверждения физиологической роли *Noggin4* необходимо оценить его способность к перемещению в межклеточном пространстве и сравнить его с другими членами семейства *Noggin*, а так же с белком Wnt8. Для этих целей мы изготовили плазмидные конструкции, кодирующие секретируемые рекомбинантные белки *Noggin1/2/4* и Wnt8 с флюоресцентными метками EGFP или TagRFP (см. “Материалы и методы”; Рис. 22А).

Прежде всего мы провели экспериментальную оценку полученных рекомбинантных белков на предмет сохранения ими молекулярной и физиологической активности. Для этого мы снова воспользовались соответствующими люциферазными репортерными плазмидными конструкциями – BRE для EGFP-*Noggin1/2* и TOPFlash для EGFP-*Noggin4*. В соответствии с ранее полученными данными для немеченных *Noggin1/2/4*, их рекомбинантные аналоги сохраняли способность подавлять люциферазную активность соответствующих репортеров (Рис. 23А, Б; ср. Рис. 15А, Г). Кроме того, мРНК EGFP-*Noggin4* сохраняла способность немеченного *Noggin4* индуцировать вторичные полные осевые комплексы, включая головные структуры, при эктопической ко-экспрессии с ингибитором BMP-каскада tBR (Рис. 23В, Г; ср. Рис. 17В, В’).

Для корректного расчета диффузионных коэффициентов используемых в экспериментах этой серии рекомбинантных конструкций потребовалось оценить относительные уровни экспрессии EGFP-*Noggin4* и *Noggin4* дикого типа в тканях и количества этих белков в межклеточном пространстве эктодермы живого зародыша. Для этого при помощи qRT-PCR мы измерили количество мРНК EGFP-*Noggin4* и *Noggin4* в эксплантатах дорсальной эктодермы (см. раздел «5.2.17. Оценка уровней экспрессии *Noggin4* и EGFP-*Noggin4*»). Данные, полученные таким образом, использовали для расчета относительных уровней экспрессии (Рис. 28). По нашим

оценкам, концентрации эндогенной мРНК Noggin4 в зародышах дикого типа в среднем в 20 раз ниже, чем концентрация синтетической мРНК EGFP-Noggin4 в эмбрионах, использованных в FRAP-экспериментах. При допущении, что эффективность трансляции эндогенной мРНК Noggin4 не может быть ниже таковой для более длинной мРНК EGFP-Noggin4, мы заключили, что концентрация эндогенного белка Noggin4 не может быть ниже 1/20 от концентрации белка EGFP-Noggin4. Принимая концентрацию белка EGFP-Noggin4 равной 1 мМ (см выше), мы считаем концентрацию эндогенного белка Noggin4 в межклеточном пространстве равной  $5 \cdot 10^8$  М.

Для оценки диффузионных свойств рекомбинантных белков в межклеточном пространстве мы провели серию экспериментов по пересадке эксплантатов анимальной эктодермы зародышей, экспрессирующих EGFP-Noggin1/2/4, в область крыши бластоцеля зародышей дикого типа (Рис. 24А). Пересадки производились на стадии поздней бластулы; после приживления (ок. 60 мин) в полученных зародышах при помощи лазерного конфокального микроскопа измерялось расстояние, которое рекомбинантные флюоресцентные белки из трансплантатов преодолевали в межклеточном пространстве зародыша-реципиента (Рис. 24Б-Г). Полученные таким образом значения диффузионного пути для EGFP-Noggin4 существенно превосходят значения для EGFP-Noggin1/2 (Рис. 24Д). Эти результаты указывают на то, что белок EGFP-Noggin4 распространяется в межклеточном пространстве интактного зародыша с существенно более высокой скоростью, чем EGFP-Noggin1 и EGFP-Noggin2.

Значение  $D$ , вычисленное для Noggin4 на основании кривых характерного времени FRAP, составило  $3.8 \pm 1.3$  мкм<sup>2</sup>/с. Это значение согласуется с теоретической оценкой  $D$  для Noggin4 (8.0 мкм<sup>2</sup>/с), вычисленное при помощи гидродинамического моделирования. На основании этих данных были измерены коэффициенты диффузии ряда белков.

Столь хорошее соответствие по порядку величины диффузионного потенциала Noggin4, определенного в живом зародыше, теоретически рассчитанному значению в условиях свободной диффузии согласуется с фактом отсутствия в структуре этого белка потенциальных сайтов связывания гепарина (Рис. 18А). В противном случае диффузия *in vivo* должна быть существенно медленнее из-за взаимодействия с гепарансульфат-протеогликанами матрикса.

На основании формулы (1) (см. раздел “5.2.28. Определение параметров подвижности белков по FRAP”) мы вычислили эффективные коэффициенты диффузии для изучаемых белков:

	Данные FRAP	Гидродинамическое моделирование
<b>EGFP-Noggin1</b>	0.05±0.03	8.0
<b>EGFP-Noggin2</b>	0.05±0.03	8.0
<b>EGFP-Noggin4</b>	3.75±1.3	8.0
<b>EGFP-Wnt8</b>	0.08±0.03	–
<b>EGFP-hep</b>	0.68±0.26	17.9
<b>EGFP-hep + Wnt8</b>	0.42±0.12	–
<b>EGFP-Noggin4 + Wnt8</b>	0.12±0.06	–
<b>Noggin1</b>	–	11.4

## 3.2. Обсуждение

### 3.2.1. *Noggin4* консервативно экспрессируется в гомологичных эмбриональных структурах у амфибий и птиц

Изученные нами при помощи гибридизации *in situ* паттерны экспрессии *Noggin4* в раннем развитии амфибий (Eroshkin, Ermakova et al. 2006) и птиц (Vorodulin, Eroshkin et al. 2012) характеризуются консервативностью. В отличие от лягушки, у куриного зародыша выраженная экспрессия *Noggin4* наблюдается в презумптивной аксиальной мезодерме (гензеновский узелок зародышей птиц – структура гомологичная шпемановскому организатору амфибий). Однако по мере прогрессии хорды экспрессия *Noggin4* в ней снижается до фонового уровня и смещается в направлении переднего конца зародыша, образуя, как и у *X. laevis*, очень плавный градиент с максимумами в головных структурах и постепенным убыванием интенсивности в каудальном направлении. При этом экспрессия у обоих изученных видов характеризуется выраженной диффузностью и гомологичной локализацией на сопоставимых стадиях – преимущественно в материале презумптивной, а затем дефинитивной покровной и нейроэктодермы и параксиальной мезодермы (сомитов). Подобная эволюционная консервативность экспрессионных паттернов *Noggin4* у разных типов позвоночных может указывать на важность функций, выполняемых этим белком в раннем индивидуальном развитии таких эволюционно дистантных видов, как шпорцевая лягушка и курица.

### 3.2.2. *Noggin4* не влияет на активность BMP и Nodal/Activin

Ранее было показано, что оба гомолога *Noggin4* – *Noggin1* и *Noggin2* – способны подавлять активность сигнальных каскадов BMP и Nodal/Activin (Bayramov, Eroshkin et al. 2011). Опираясь на данные о сравнительно низкой степени гомологии последовательностей *Noggin4* и других членов семейства *Noggin*, мы предположили, что *Noggin4* столь же существенно отличается от них по своим функциональным и молекулярным характеристикам. Действительно, эктопическая экспрессия *Noggin4* не способна воспроизвести наиболее известный из описанных эффектов белков семейства *Noggin* – индуцировать развитие вторичного осевого комплекса. Кроме того, мы не выявили признаков какого-либо подавляющего влияния белка *Noggin4* на активность важнейших сигнальных путей, обеспечивающих передне-заднюю (Nodal/Activin) и дорсо-вентральную (BMP) разметку раннего зародыша. Так, согласно полученным данным, *Noggin4* не связывает лиганды этих путей и не влияет на люциферазную активность специфических



репортерных плазмид. Кроме того, *Noggin4* не оказывает влияния на концентрацию внутриклеточного эффектора BMP-пути – фосфорилированного P-Smad1.

Одновременно с этими данными мы получили убедительные свидетельства специфической регуляции белком *Noggin4* развития головных структур. Так, мы обнаружили, что экспрессионные паттерны таких маркеров переднеголовных структур, как *FoxG1*, *Rx*, *Otx2* и *Rax6* существенно изменяются под влиянием повышения и понижения уровня экспрессии *Noggin4*, указывая на позитивную регуляцию работы этих генов со стороны *Noggin4*. С этими данными хорошо согласуются установленные нами факты общей антериоризации фенотипа – увеличение линейных размеров головы и присоски, увеличение и изменение формы глаз – под влиянием *Noggin4* и обратных эффектов при подавлении его экспрессии.

Эти данные указывают на то, что белок *Noggin4* оказывает стимулирующее влияние на развитие головных структур, однако реализует свою физиологическую функцию в раннем эмбриональном развитии через посредство молекулярных механизмов, не связанных с регуляцией активности сигнальных путей BMP и *Nodal/Activin*.

### 3.2.3. *Noggin4* связывает белок *Wnt8* и подавляет активность каскада *Wnt/β-catenin*

Из данных других авторов известно, что для индукции минимального полного осевого комплекса необходимо и достаточно одновременно подавить два сигнальных каскада: BMP и *Wnt/β-catenin* (Glinka, Wu et al. 1997). В экспериментах по эктопической ко-экспрессии *Noggin4* с доминант-негативным рецептором BMP4 обнаружилась способность *Noggin4* индуцировать минимальные вторичные осевые комплексы, включая голову с циклопическим глазом, на фоне подавления сигнализации в каскаде BMP. Это позволило нам предположить, что *Noggin4* может работать как антагонист *Wnt/β-catenin*.

Эксперименты по оверэкспрессии *β-catenin* – внутриклеточного эффектора *Wnt*-пути – указывают на то, что *Noggin4* действует на уровне не ниже поверхностного рецептора *Frizzled8*. При дальнейшем изучении возможного влияния *Noggin4* на активность *Wnt/β-catenin* нами были получены прямые свидетельства в пользу способности *Noggin4* образовывать комплекс с главным лигандом этого каскада, *Wnt8*, конкурируя с *Frizzled8* за связывание с ним. Одновременно с этим мы выяснили, что *Noggin4* обладает ингибиторной активностью в отношении репортерных плазмид, селективно активируемых сигнализацией в каноническом каскаде *Wnt*. Наконец, при помощи qRT-PCR мы показали, что искусственное повышение и понижение экспрессии *Noggin4* вызывает синхронные изменения уровней экспрессии ряда генов-мишеней сигнального каскада *Wnt/β-catenin* – *Axin2*, *HoxA1*, *HoxB1*, *HoxD1*, *Siamois* и *Xnr3*.

В совокупности, полученные данные предоставляют исчерпывающие свидетельства в пользу способности секретлируемого белка Noggin4 напрямую взаимодействовать с лигандом Wnt8, связывать его в межклеточном пространстве и конкурентно блокировать его взаимодействие со специфическими рецепторами Frizzled8. Это, в свою очередь, приводит к подавлению активности каскада Wnt/ $\beta$ -catenin, снижению уровня экспрессии его непосредственных генетических мишеней и проявлению наблюдаемых фенотипических эффектов.

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают гипотезу о том, что Noggin4 является секретлируемым антагонистом канонического Wnt/ $\beta$ -catenin сигнального каскада. В этом отношении Noggin4 напоминает известный антагонист Wnt8 – Frzb/sFRP3, – но существенно отличается от Dkk, взаимодействующего не с лигандом Wnt8, а с ко-рецептором Frizzled, Lrp5/6 (Semenov, Tamai et al. 2001). Noggin4 также обнаруживает сходство с Frsb/sFRP3 по своей способности индуцировать эктопические вторичные головные с циклопическим глазом на фоне одновременного подавления активности BMP-каскада. Такое свойство Frsb/sFRP3 объясняется его способностью селективно ингибировать Wnt8, но не Wnt3a (Wang, Krinks et al. 1997, Kazanskaya, Glinka et al. 2000, Galli, Barnes et al. 2006, Wawrzak, Metioui et al. 2007). Dkk, в отличие от Noggin4 и Frsb/sFRP3, проявляет ингибиторную активность в отношении как Wnt8, так и Wnt3a и способен индуцировать головы с билатеральными глазами в сходных экспериментах (Glinka, Wu et al. 1998, Kazanskaya, Glinka et al. 2000). В этой связи представляет интерес и требует исследования вопрос о способности Noggin4 подавлять активность Wnt3a.

Ввиду того, что оба белка представляют собой секретлируемые морфогены с обогащенной остатками цистеина первичной структурой, их правильный посттрансляционный процессинг и адекватные конформационные модификации являются необходимым условием для сохранения их функциональных свойств. Этим может объясняться обнаруженный нами факт зависимости Wnt8-связывающей активности Noggin4 от способа выделения этих белков при ко-иммунопреципитации: в процессе секреции из клеток данные белки должны подвергаться дополнительному конформационному и модификационному изменению, отсутствующему при их прямом выделении из лизата эмбрионов.

#### *3.2.4. Noggin4 действует нелокально, быстро распространяясь в межклеточном пространстве in vivo*

Мы обнаружили любопытное свойство белка Noggin4 действовать в областях зародыша, существенно отдаленных от областей, непосредственно содержащих соответствующие мРНК. Нелокальные эффекты Noggin4 проявляются как на уровне морфологических структур

(билатеральное увеличение присоски при унилатеральной оверэкспрессии *Noggin4*), так и на уровне экспрессии генов-маркеров переднеголовных структур. Эти эффекты могут объясняться обнаруженной нами способностью белка *Noggin4* относительно свободно перемещаться в межклеточном пространстве зародыша – по нашим оценкам, скорость распространения флюоресцентно меченного рекомбинантного аналога *Noggin4*, *EGFP-Noggin4*, в межклеточном пространстве более чем на порядок превышает таковую для *EGFP-Noggin1/2* и *TagRFP-Wnt8* (см. таблицу в разделе “3.1.8. Оценка способности *Noggin4* к диффузии в межклеточном пространстве *in vivo*”). Мы предполагаем, что столь существенные отличия диффузионной способности *Noggin4* может объясняться отсутствием в структуре белка сайтов связывания с молекулами гепарансульфат-протеогликанов межклеточного матрикса. Хотя количественные данные способности к диффузии для других известных антагонистов *Wnt* недоступны, представляется вероятным, что описанные нами свойства *Noggin4* делают его уникальным среди таких факторов, поскольку все они – включая *DAN*, *Dkk*, *Cerberus* и *Frzb/sFRP* – содержат в своей структуре гепарин-связывающие сайты и, таким образом, их диффузия в межклеточном пространстве должна быть замедлена (Finch, He et al. 1997, Fedi, Bafico et al. 1999, Nolan, Kattamuri et al. 2013, Xavier, Melikova et al. 2014).

При выполнении данной работы нами был разработан новый подход к изучению диффузии секретлируемых белков в межклеточном пространстве в условиях *in vivo*. Способность флюоресцентно меченных морфгенов к диффузии в эмбриональных тканях обычно изучается при помощи анализа FRAP-кинетик в квадратной области, содержащей множество клеток (Wartlick, Kicheva et al. 2009, Inomata, Shibata et al. 2013). Однако для корректного расчета коэффициента диффузии необходимо определить размерность диффузионного пространства (Sobolev, Rosenkranz et al. 1984). Тот факт, что межклеточное пространство имеет обычно нецелочисленную размерность, создает существенные трудности при использовании такого метода и делает соответствующие расчеты нетривиальной задачей (Kicheva, Bollenbach et al. 2014). Более того, процесс снятия FRAP-кинетик во время подобных экспериментов обычно требует существенного времени, вплоть до десятков минут. Происходящие при этом побочные процессы, такие как деградация и/или секреция белка и гибель зародышей, способны влиять на параметры восстановления флюоресценции и диффузии и искажать получаемые результаты, что требует учета в соответствующих вычислениях диффузионного потенциала (Axelrod, Koppel et al. 1976). Разработанный нами подход лишен вышеупомянутых неудобств, поскольку позволяет напрямую оценить реальную скорость распространения через измерение времени полувосстановления

флюоресценции после фотобличинга в “одиночном” межклетнике, что существенно сокращает время измерения и упрощает дальнейшие вычисления.

### 3.2.5. *Noggin4* регулирует передне-задний градиент сигнальной активности *Wnt8*

Передне-задний градиент распределения концентрации *Wnt8* необходим для разметки передней нейроэктодермы у позвоночных (Kiecker and Niehrs 2001, Niehrs 2010). В нервной пластинке зародышей *Xenopus* *Wnt8* экспрессируется от ее заднего края вплоть до границы между презумптивным задним и средним мозгом, соответствующей заднему краю зоны экспрессии *Otx2* в передней нервной пластинке (Ermakova, Solovieva et al. 2007, Park and Saint-Jeannet 2008). Перемещаясь от этой границы, *Wnt8* образует градиент с минимумом вблизи передней границы нервной пластинки. Для точной регуляции этого градиента в зародыше *Xenopus laevis* эндогенный *Noggin4* должен конкурировать с рецепторами *Frizzled* за связывание с *Wnt8*.

Мы провели количественную оценку эффектов конкуренции эндогенного *Noggin4* за связывание *Wnt8* с одним из основных его рецепторов в передней эктодерме, *Frizzled8* (Itoh, Jacob et al. 1998). Для этого мы, во-первых, оценили концентрацию эндогенного белка *Noggin4* в межклеточном пространстве зародыша – 50 нМ (см. Рис. 28 и раздел «5.2.17. Оценка уровней экспрессии *Noggin4* и EGFP-*Noggin4*»). Во-вторых, мы предположили для простоты, что: (1) в пределах передней нейроэктодермы *Noggin4* распределен равномерно; (2) *Frizzled8* также распределен в передней нейроэктодерме в тотальной концентрации 50 нМ; (3) концентрация *Wnt8* образует передне-задний убывающий градиент с максимальным значением в 50 нМ в районе границы между презумптивным задним и средним мозгом, понижаясь в направлении переднего края нервной пластинки, согласно логистической сигмоидной функции (Рис. 30). Мы постулировали сигмоидный характер градиента концентрации *Wnt8* как наиболее соответствующий форме экспериментально измеренного градиента *Wnt/β-Catenin*-сигнализации в презумптивной нервной пластинке (Kiecker and Niehrs 2001). Наконец, мы считали, что аффинность *Noggin4* к *Wnt8* не превышает 100 нМ, тогда как аффинность *Wnt8* к *Frizzled8* равна 10 нМ (Hsieh, Rattner et al. 1999).

Данные предположения позволили рассчитать концентрационный градиент комплекса *Wnt8-Frizzled* при изменениях количества *Noggin4* вдоль средней линии области экспрессии *otx2* в передней нейральной пластинке. Результаты проведенного моделирования качественно воспроизводят результаты наших экспериментов по стимулированию и подавлению экспрессии *Noggin4* при помощи инъекции его мРНК или специфических МО. Эти фактические изменения

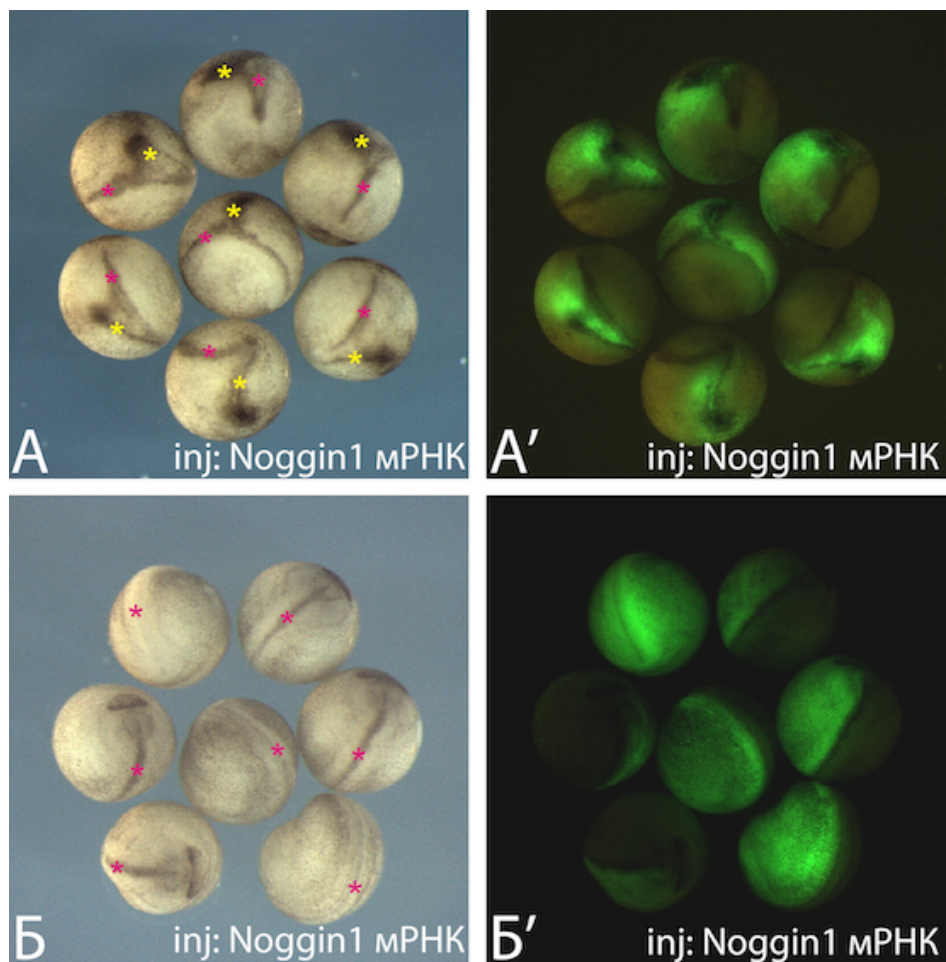
концентрации Noggin4 пространственно смещали условный порог градиента активности Wnt8 на величину порядка 100 мкм (Рис. 30).

Таким образом и проведенные нами эксперименты, и количественные оценки подтверждают, что Noggin4 исполняет роль дальнедействующего ингибитора Wnt8-сигнализации, регулируя передне-задний градиент сигнальной активности каскада Wnt/ $\beta$ -catenin.

Согласно данным трех независимых методов – количественной ко-иммунопреципитации, поверхностного плазмонного резонанса и FRAP-экспериментов *in vivo* по разработанной нами методике (Eroshkin, Nesterenko et al. 2016), – Noggin4 взаимодействует с Wnt8 с умеренной аффинностью и константой связывания  $K_D$  в пределах от 10 до 100 нМ. Такое значение  $K_D$ , очевидно, выше, чем определенное в работах других авторов значение для комплекса Wnt8 с рецептором Frizzled или Frzb/sFRP3 – 10 нМ (Hsieh, Rattner et al. 1999, Wawrzak, Metioui et al. 2007). С другой стороны, проведенное нами математическое моделирование показало, что даже значение  $K_D$  в 100 нМ позволяет белку Noggin4 эффективно регулировать градиент сигнальной активности Wnt8, руководящий передне-задней разметкой нервной пластинки.

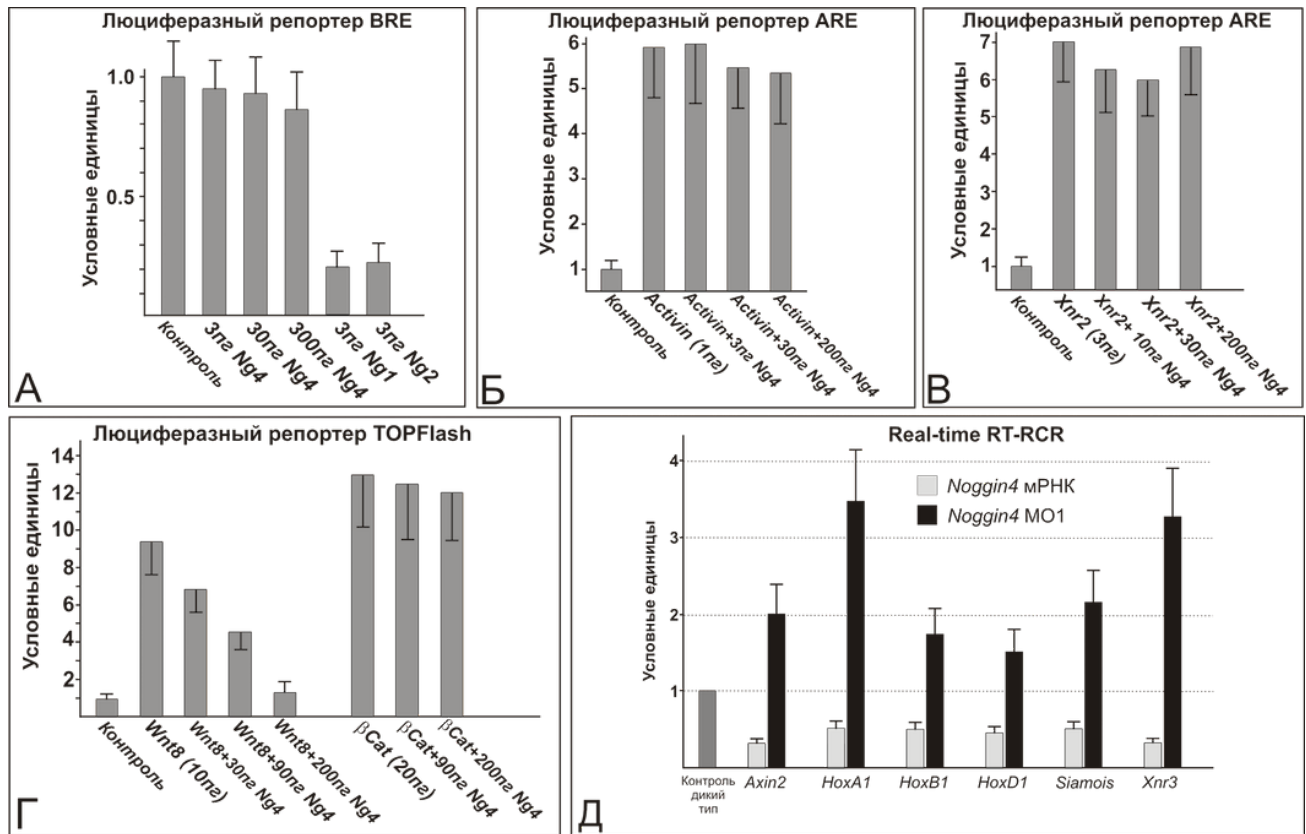
Важно, что при моделировании влияния Noggin4 на сигнальный градиент Wnt8 существование самого градиента было постулировано как начальное условие. Таким образом, предсказания на основе моделирования не зависят от специфических механизмов формирования этого градиента. Например, он может возникать по недавно предложенному механизму цитонемного транспорта Wnt8 (Luz, Spannll-Muller et al. 2014, Stanganello, Hagemann et al. 2015) (см. так же раздел «2.3.2. Цитонемный транспорт белков Wnt»). Согласно этому механизму, Wnt8 локализуется на концах тонких клеточных филоподий – «цитонем», – индуцируя Wnt-сигнализацию при взаимодействии с кластерами LRP6-содержащих сигналом на контактной поверхности компетентной клетки. Учитывая наши результаты, касающиеся связывания Noggin4 с Wnt8 и его влияния на сигнальную активность канонической ветви пути Wnt, было бы интересно выяснить потенциальную роль Noggin4 в блокировании образования или работы сигналом.

## Приложение 2



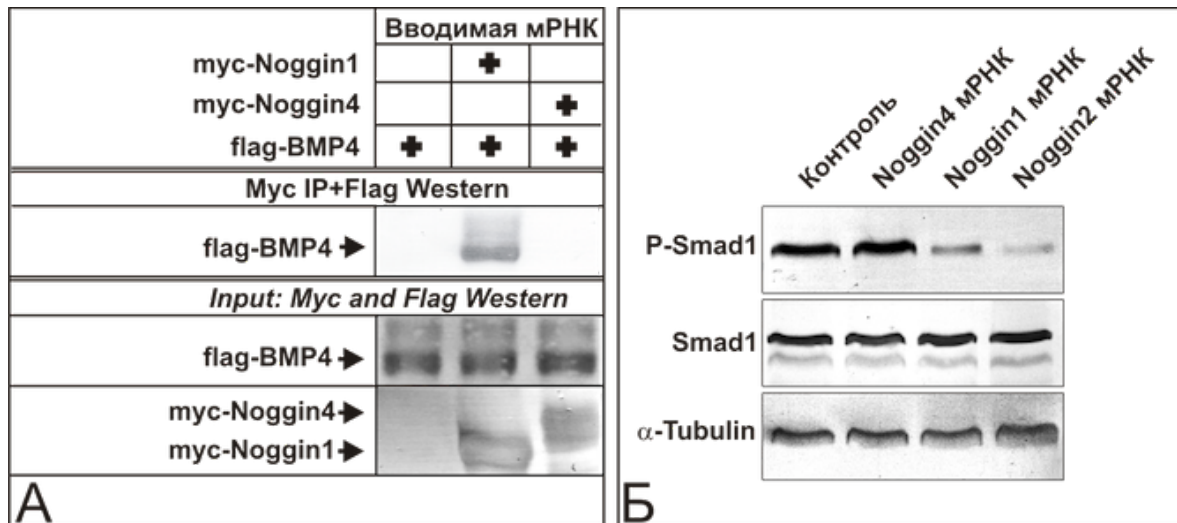
**Рис. 14. Способность *Noggin1* и *Noggin2* индуцировать вторичные осевые комплексы при эктопической экспрессии**

(**А, А'**) Инъекция смеси 15 нг/бластомер мРНК *Noggin1* с FLD в экваториальную зону вентральных бластомеров на стадии 4-х бластомеров индуцирует образование вторичного осевого комплекса (98%, n=120; красные звездочки – основные оси; желтые звездочки – вторичные оси). (**Б, Б'**) Инъекция смеси 150 нг/бластомер мРНК *Noggin4* с FLD в экваториальную зону вентральных бластомеров на стадии 4-х бластомеров не способна индуцировать образование вторичных осей (0%, n=120; красные звездочки – основные оси).



**Рис. 15.** Влияние *Noggin1*, *Noggin2* и *Noggin4* на активность специфических люциферазных репортеров

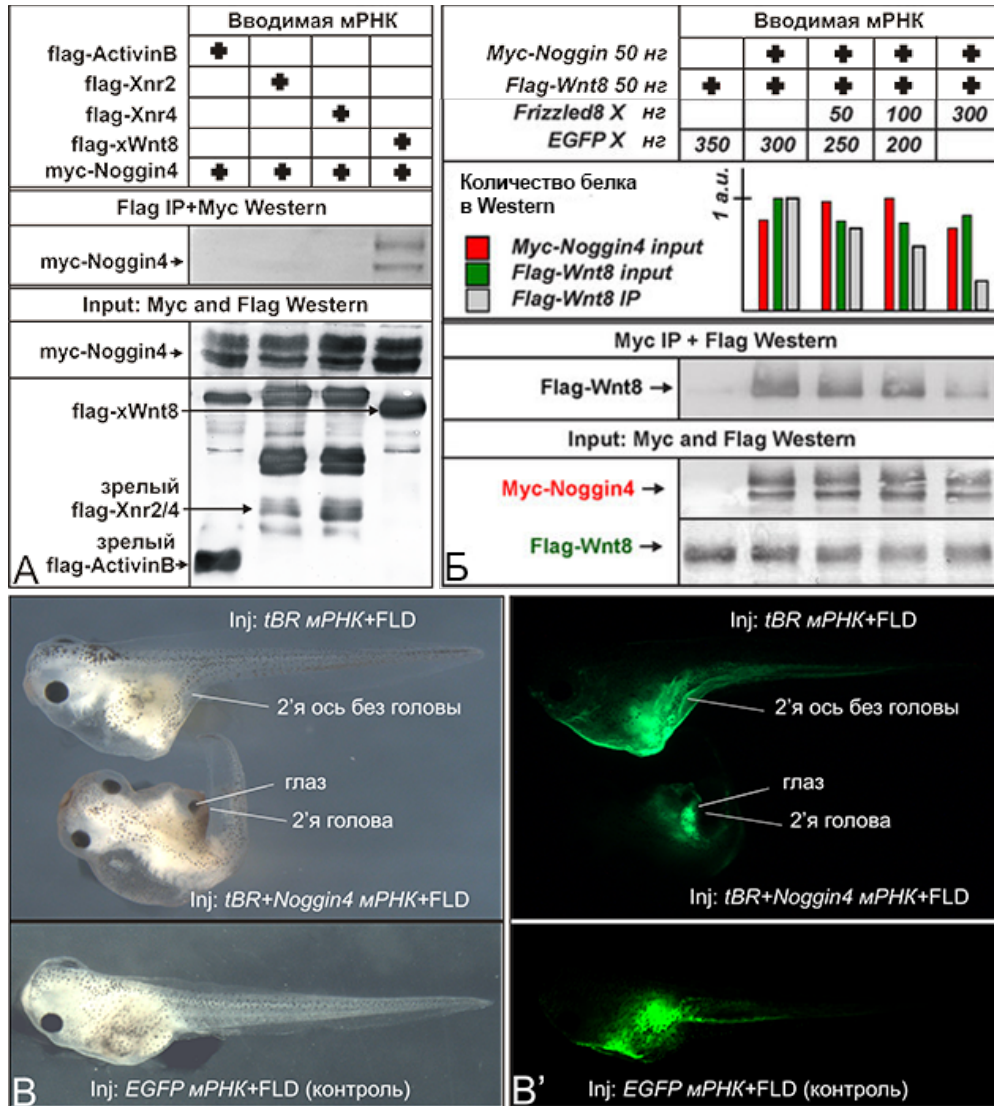
(А) Влияние *Noggin1*, *Noggin2* и *Noggin4* на экспрессию BMP-специфического люциферазного репортера BRE. 2-клеточные зародыши инъецировали плазмидой BRE самой по себе (контроль), либо в смеси с мРНК *Noggin1*/*Noggin2* в неизменной концентрации либо мРНК *Noggin4* в возрастающих концентрациях. (Б, В) Влияние *Noggin4* на экспрессию Smad2-специфического репортера ARE, активируемого лигандами *ActivinB* или *Xnr2*. (Г) Влияние *Noggin4* на экспрессию Wnt/ $\beta$ -catenin-специфического репортера TOPFlash, активируемого *Wnt8* и  $\beta$ -catenin. (Д) количественный qRT-PCR анализ экспрессии прямых генетических мишеней канонического Wnt-сигнального пути – *Axin2*, *HoxA1*, *HoxB1*, *HoxD1*, *Siamois* и *Xnr3* – в зародышах на стадии поздней гаструлы (стадия 12), инъецированных на стадии 4 клеток мРНК *Noggin4* либо *Noggin4* MO1. Уровни экспрессии каждого из тестируемых генов в зародышах дикого типа приняты за единицу.



**Рис. 16.** Сравнение способности Noggin1, Noggin2 и Noggin4 связывать BMP4 и влиять на внутриклеточную концентрацию фосфорилированного Smad1

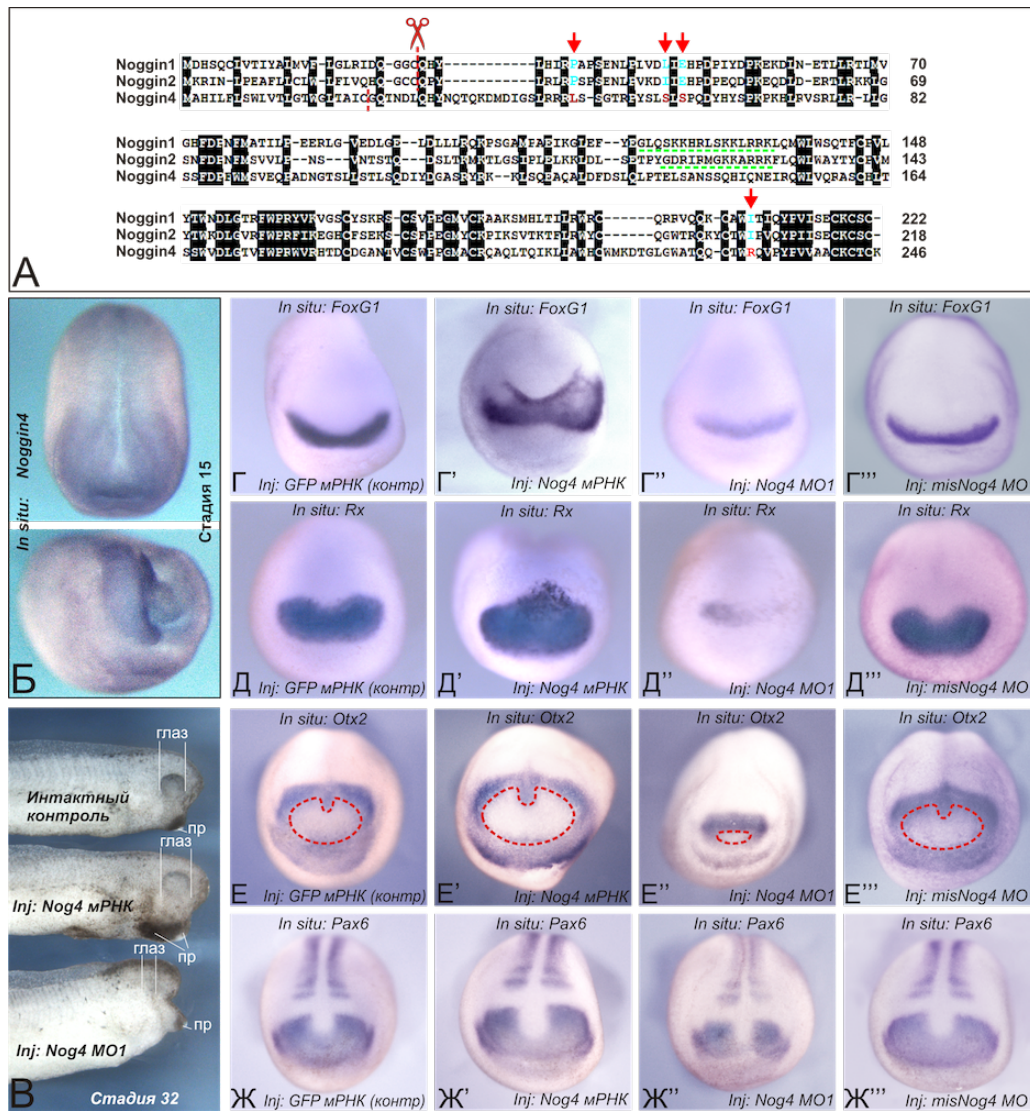
**(А)** Сравнение способности Noggin1 и Noggin4 связывать BMP4 при помощи ко-иммунопреципитации. **(Б)** В отличие от Noggin1 и Noggin2, оверэкспрессия Noggin4 не вызывает снижения концентрации эндогенного эффектора фосфорилированного Smad1. Зародыши на стадии 2 бластомеров инъецировали мРНК Noggin1/2 или Noggin4 (100 пг/зародыш), после чего инкубировали их до стадии поздней бластулы. Полученные зародыши использовали для определения содержания P-Smad1 при помощи иммуноблота с антителами к P-Smad1 (Cell Signaling Technology, Inc.). Общий уровень Smad1 определяли при помощи antiSmad-антител (ab66737, Abcam). В качестве контроля нанесения использовали  $\alpha$ -tubulin, количество которого определяли при помощи антител к tubulin (DM1A, Sigma). Во всех случаях Fab-фрагменты Anti-Rabbit антител, конъюгированные со щелочной фосфатазой (A3937, Sigma), использовали для определения первичных антител.





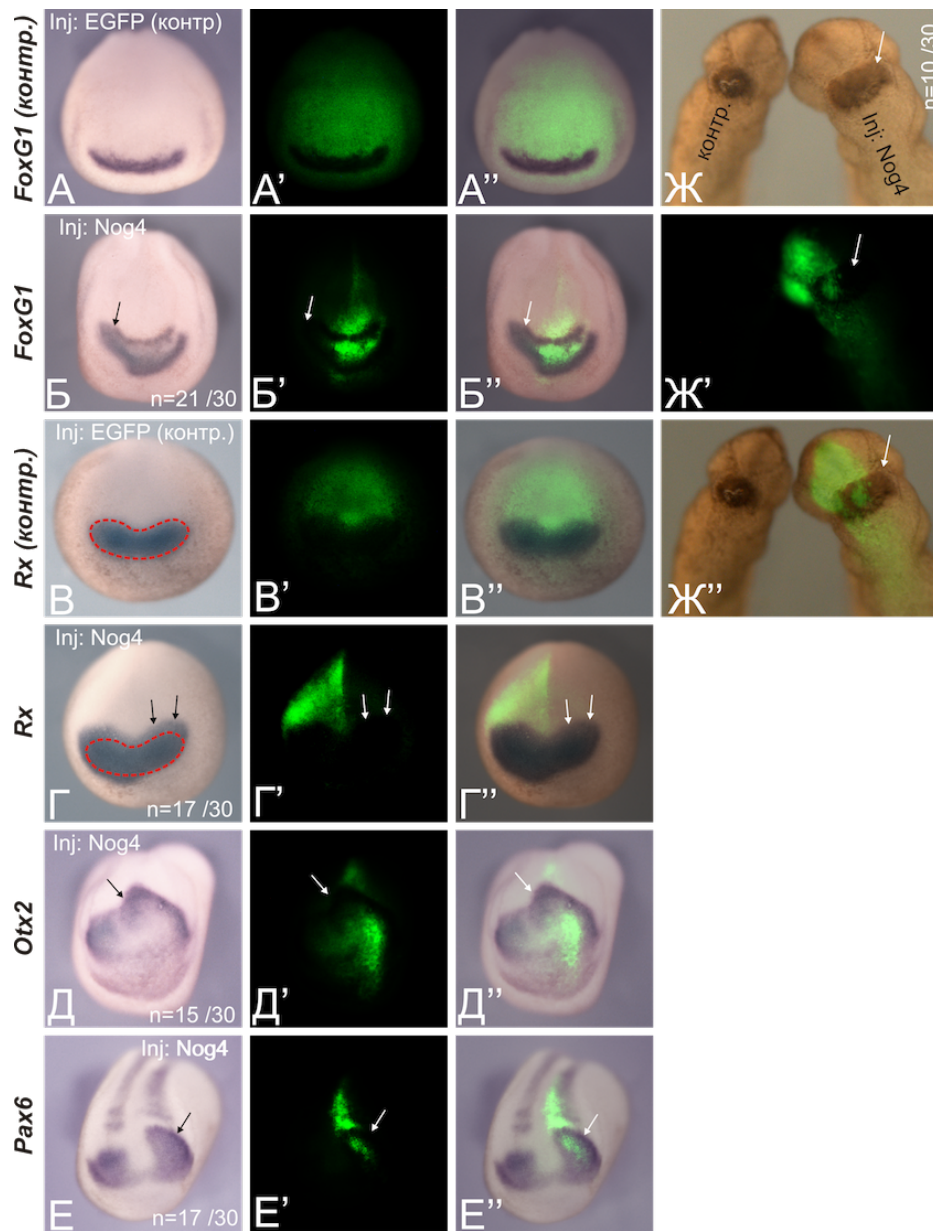
**Рис. 17.** Способность *Noggin4* связывать лиганды разных сигнальных путей

(А) Анализ взаимодействия *Noggin4* с *ActivinB*, *Xnr2*, *Xnr4* и *XWnt8* при помощи ко-иммунопреципитации. (Б) *Frizzled8* конкурирует с *Noggin4* за связывание *Wnt8* в экспериментах по ко-иммунопреципитации. 2-клеточные зародыши инъецировали мРНК *Noggin4* и *Wnt8*, либо этими мРНК в смеси с возрастающими количествами мРНК *Frizzled8*. Ко-иммунопреципитацию проводили с использованием нативных экстрактов средних гаструл, как описано (Martynova, Eroshkin et al. 2008). (В) Индукция вторичной головы с циклопическим глазом при ко-инъекции мРНК *Noggin4* и *tBR* (60%, n = 70). При инъекции чистой мРНК *tBR* индуцируется только вторичный осевой комплекс без головы (80%, n = 70). При инъекции контрольной мРНК *EGFP* индукции вторичных осей не происходит (100%, n = 60). (В') Область, содержащая ко-инъецированный FLD.



**Рис. 18. Свойства Noggin4**

(А) Выравнивание аминокислотных последовательностей Noggin1, Noggin2 и Noggin4. Позиции, ответственные за связывание с BMP4, отмечены красными стрелками. Места отщепления сигнального пептида и сайты, необходимые для связывания с гепаран-сульфат протеогликанами межклеточного матрикса помечены красным и зеленым пунктиром, соответственно. (Б) Гибридизация *in situ* в тотальных препаратах зародыша шпорцевой лягушки на стадии средней нейрулы с антисмысловым dig-зондом к Noggin4. Сверху вид с дорсальной стороны, снизу право-фронтальный вид. (В) Влияние введения мРНК Noggin4 (80%, n = 120) и MO1 Noggin4 (85%, n = 130) на развитие переднеголовных структур. Пр – присоска. Гибридизация *in situ* dig-зондами к мРНК *FoxG1*, *Rx*, *Otx2* и *Pax6* в тотальных препаратах зародышей на стадии средней нейрулы, инъектированных: (Г-Ж) контрольной мРНК *GFP* (0%, n = 40; 0%, n = 50; 0%, n = 40; 0%, n = 30 нарушений развития, соответственно); (Г'-Ж') *Noggin4* mRNA (85%, n = 30; 61%, n = 35; 81%, n = 40; 65%, n = 40 нарушений развития, соответственно); (Г''-Ж'') *Noggin4* MO1 (90%, n = 50; 86%, n = 40; 60%, n = 40; 60%, n = 40 нарушений развития, соответственно); (Г'''-Ж''') контрольными *misNoggin4* MO1 (0%, n = 30; 0%, n = 30; 0%, n = 40; 0%, n = 30 нарушений развития, соответственно). Красным пунктиром (Е'-Е''') обозначены области презумптивного роstralного переднего мозга. Вид спереди, дорсальная сторона сверху.



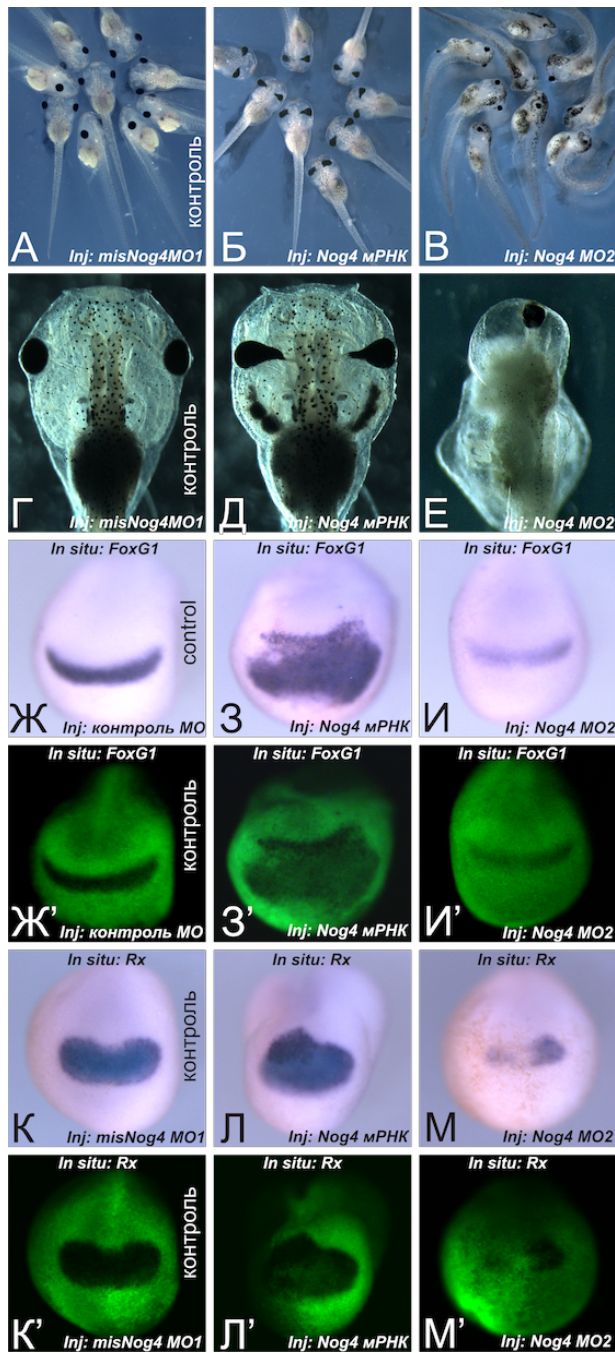
**Рис. 19. Нелокальность действия Noggin4**

(А-А'', В-В'') Контрольный зародыш, ињецированный унилатерально в дорсальные бластомеры мРНК EGFP с FLD на стадии 8 клеток и гибридованный на стадии средней нейрулы с dig-зондом к FoxG1 (А-А'') и Rx (В-В'').

(Б-Б'', Г-Г'') Зародыши, ињецированные мРНК Noggin4 с FLD на стадии 8 клеток в один из дорсальных бластомеров и гибридованные dig-зондами к FoxG1 (Б-Б''), Rx (Г-Г''), Otx2 (Д-Д'') и Pax6 (Е-Е''). Стрелками обозначены области, в которых оверэкспрессия соответствующих генов-маркеров не совпадает с локализацией FLD, что подтверждает нелокальность действия Noggin4.

(А'-Е') флюоресцентные фотографии зародышей (А-Д). Наложение фотографий (А-Д) и (А'-Е').

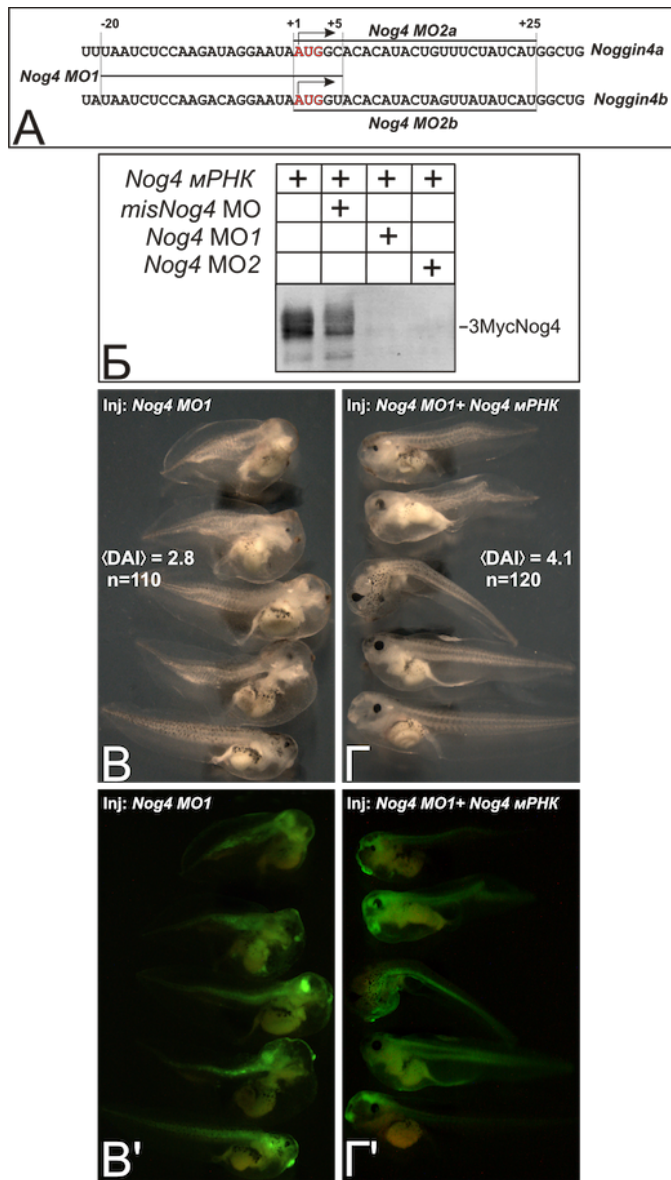
(Ж-Ж'') Расширенная присоска интактной стороны зародыша на стадии хвостовой почки (справа), ињецированного в правые дорсальный и вентральный бластомеры на стадии 8 клеток подтверждает нелокальность активности Noggin4.



**Рис. 20. Влияние инъекций мРНК *Noggin4* и *MO2* на фенотип головных структур головастика и экспрессию переднеголовных маркеров *FoxG1* и *Rx***

(А-В) 5-дневные головастики, инъектированные мРНК *Noggin4* и *MO2*. (Г-Е) Головы 5-дневных головастика, инъектированных мРНК *Noggin4* и *MO2*, вид с дорсальной стороны, роstralный конец сверху.

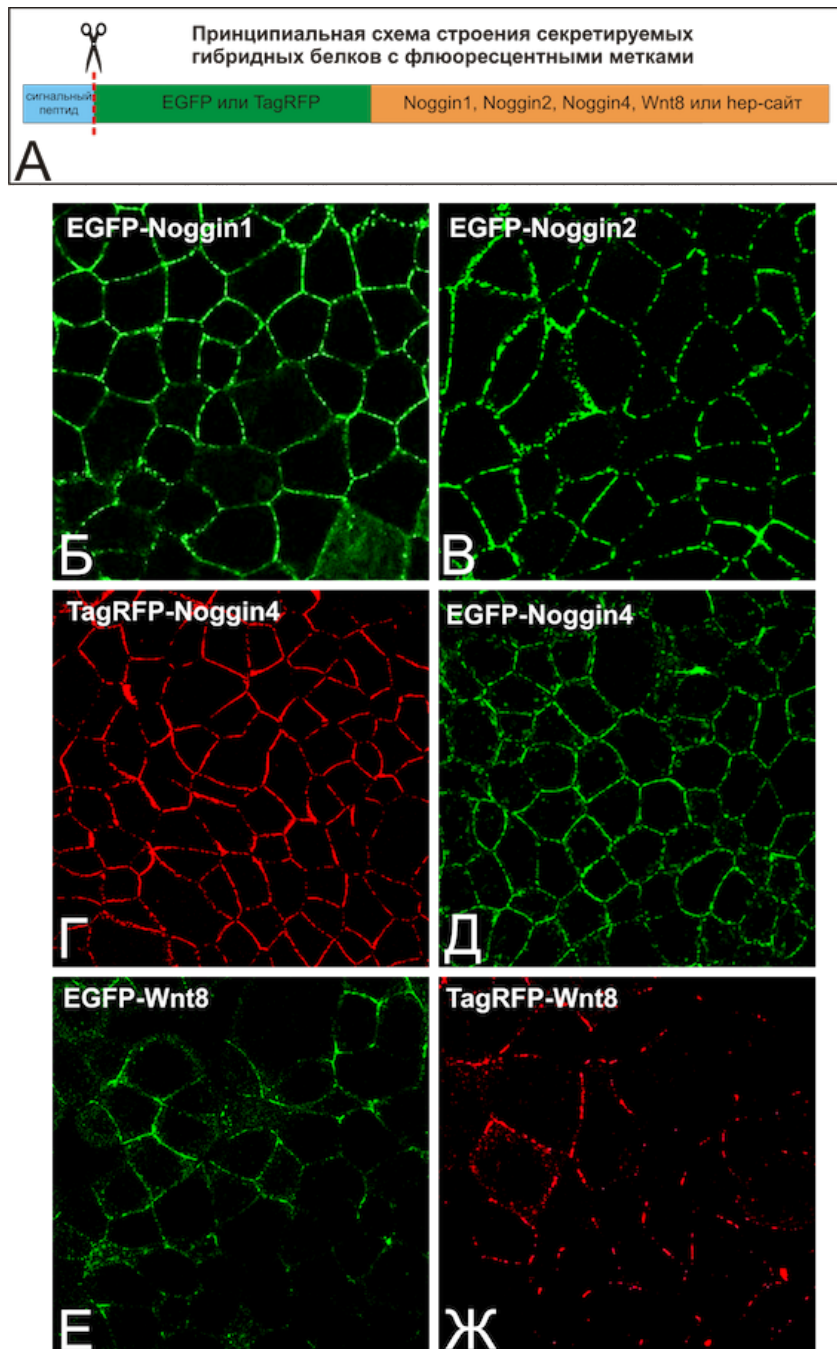
(Ж-М') Гибридизация *in situ* в тотальных препаратах зародышей на стадии средней нейрулы с зондами к *FoxG1* и *Rx*, инъектированных контрольными МО ((100%, n=30; Ж и Ж'), мРНК *Noggin4* (85%, n=30; З и З') и (61%, n=35; Л и Л'), *Noggin4 MO2* (100%, n=40; И и И', М и М') и *misNoggin4 MO1* (80%, n=40; К и К').



**Рис. 21. Проверка специфичности и эффективности МО**

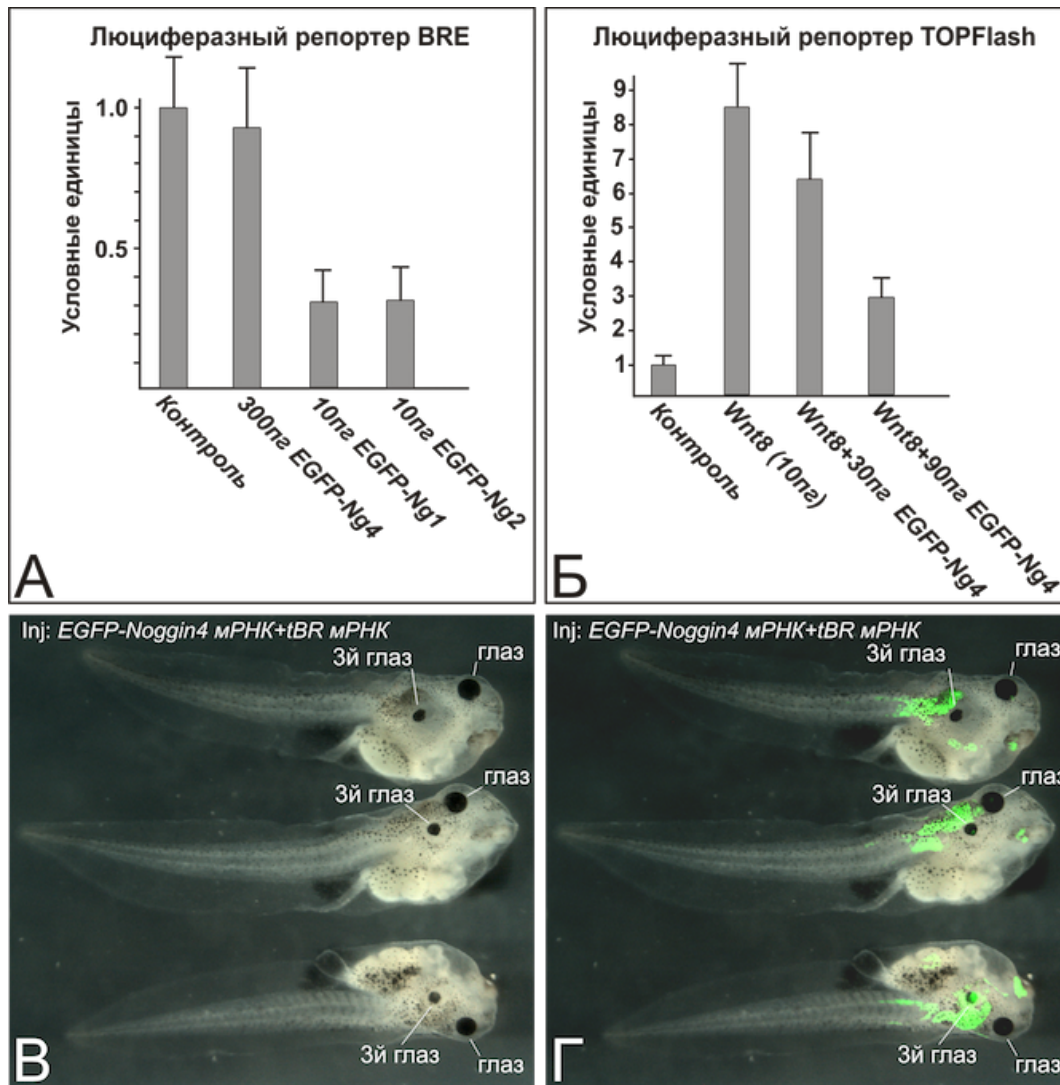
(А) Схема локализации сайтов взаимодействия с МО на обоих псевдоаллелях мРНК *Noggin4 X. laevis*. (Б) мРНК 5'-UTR-Мус-Noggin4 инъецировали в каждый бластомер 2-клеточного зародыша (100 пг/бластомер) саму по себе и в смеси с контрольным *misNoggin4* МО, опытными МО1 и МО2 (8 нл 0.2 мМ водного раствора) или в смеси со стандартным контрольным МО, предоставленным GeneTools (8 нл 0.2 мМ водного раствора). Инъецированные зародыши на стадии средней гастролы анализировали на предмет наличия белка Мус-Noggin4 при помощи вестерн-блота с anti-Мус антителами (см. Материалы и методы).

(В-Г') Специфичность эффектов МО подтверждали в экспериментах по спасению фенотипа, в которых *Noggin4* МО1 инъецировали сами по себе (В, В') или в смеси с мРНК *Noggin4*, лишенной сайта взаимодействия с МО1 (Г, Г'). Средний дорсо-антериорный индекс (Medial Dorso-Anterior Index, DAI) вычисляли для обоих типов головастиков, развившихся из инъецированных зародышей.



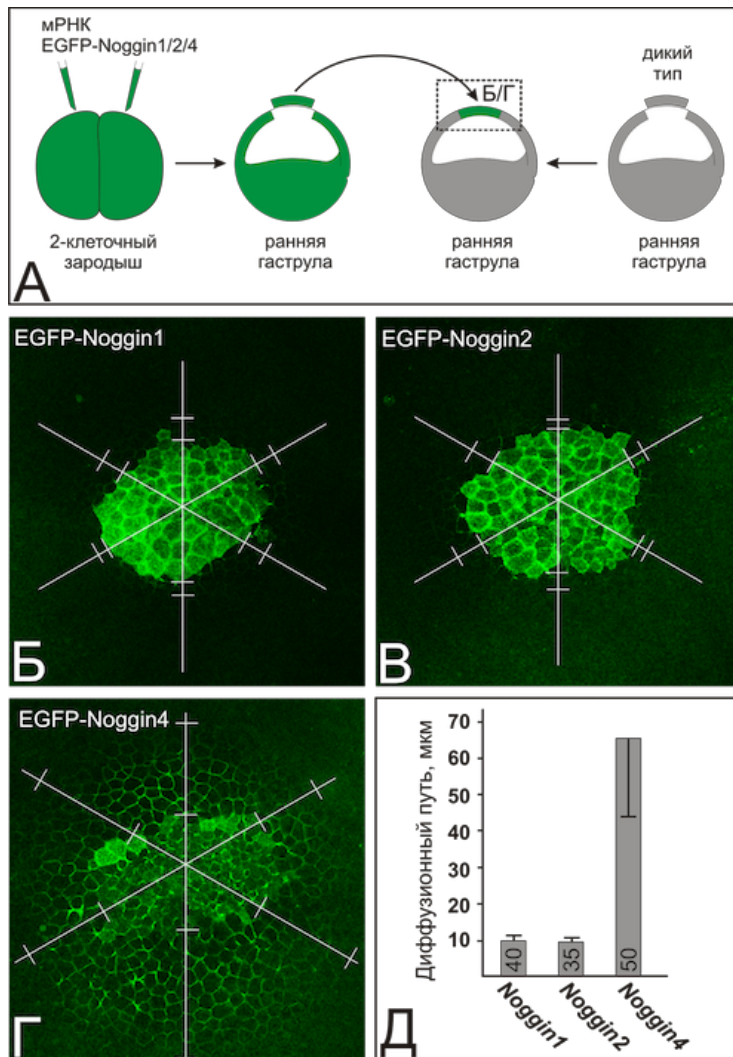
**Рис. 22.** Noggin1, Noggin2, Noggin4 и Wnt8, меченные EGFP или TagRFP, секретируются в межклеточное пространство анимальной эктодермы зародышей *Xenopus laevis*

(А) Принципиальная схема строения флюоресцентно-меченных секретируемых рекомбинантных белков. Красным пунктиром показано место отщепления сигнального пептида. (Б-Ж) Прижизненная визуализация полученных фьюжн-белков в межклеточном пространстве анимальной эктодермы зародышей *X. laevis*. 4-клеточные зародыши инъецировали в анимальные бластомеры мРНК, кодирующими различные рекомбинантные белки, после чего на стадии ранней-средней гастрюлы их наблюдали с анимального полюса при помощи конфокального лазерного микроскопа.



**Рис. 23. Рекомбинантные конструкции Noggin1, Noggin2 и Noggin4, меченные EGFP, сохраняют молекулярные и физиологические активности своих немеченных аналогов**

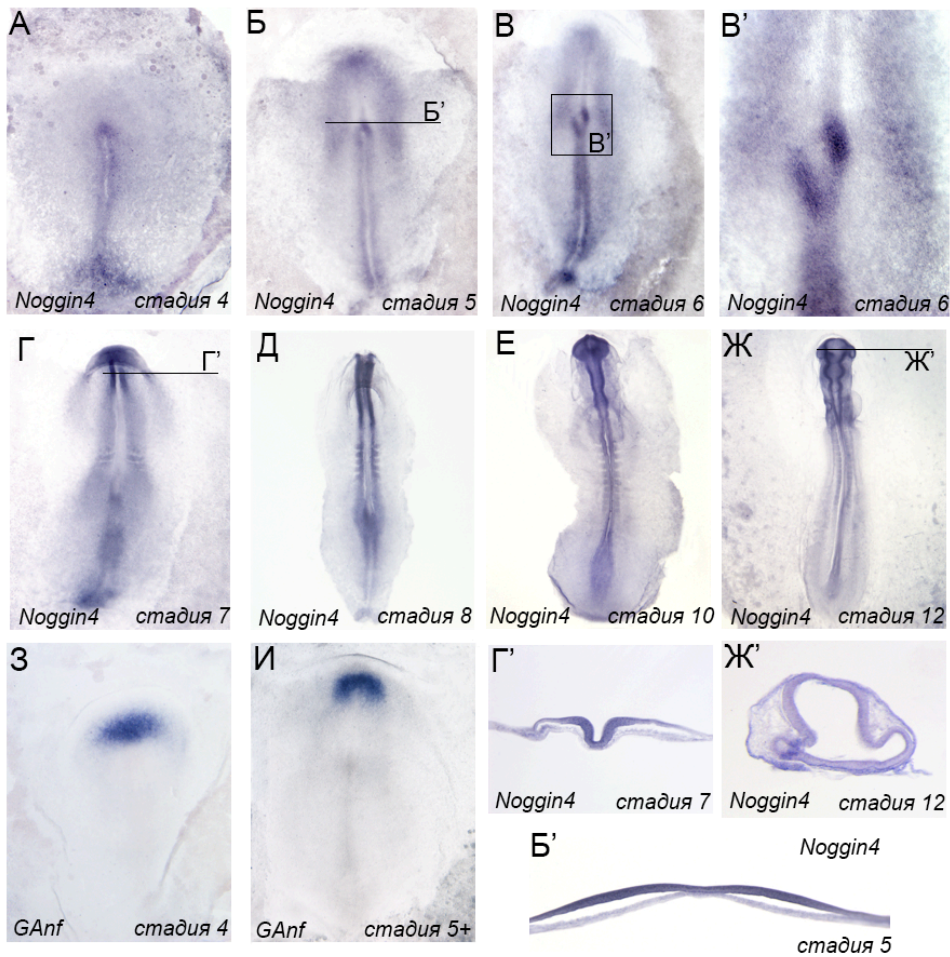
**(А)** EGFP-Noggin1 и EGFP-Noggin2 подавляют экспрессию BMP-специфического люциферазного репортера BRE в зародышах *Xenopus laevis*. Зародыши инъецировали плазмидой репортера BRE самой по себе (контроль), либо в смеси с мРНК EGFP-Noggin1 или EGFP-Noggin2. **(Б)** EGFP-Noggin4 подавляет экспрессию Wnt/ $\beta$ -catenin-специфического люциферазного репортера TOPFlash в зародышах *Xenopus laevis*. Зародыши инъецировали плазмидой репортера TOPFlash самой по себе (контроль), либо в смеси с мРНК XWnt8 и увеличенной концентрацией мРНК EGFP-Noggin4. **(В, Г)** мРНК EGFP-Noggin4, ко-инъецируемая с мРНК ингибитора BMP, доминант-негативным BMP-рецептором tBR, индуцирует развитие вторичного осевого комплекса, включая циклопические глаза в головастиках *Xenopus laevis* (50%, n=70). Две разные группы головастиков, полученных в независимых экспериментах, фотографировали на стадиях 39 и 46, соответственно. На **(В)** два верхних головастика показаны с правой стороны, нижний головастик показан с брюшной стороны.



**Рис. 24. Диффузия Noggin1, Noggin2 и Noggin4 из эктодермальных эксплантатов**

(А) Принципиальная схема эксперимента. 2-клеточные зародыши *Xenopus laevis* инъецировали мРНК рекомбинантных белков Noggin1/2/4. Далее зародыши инкубировали до стадии поздней бластулы и использовали для получения эксплантатов крыши бластоцеля. Полученные эксплантаты пересаживали на интактные зародыши и после приживания наблюдали движение флуоресцентных белков под конфокальным микроскопом. Область зародыша, изображенная на (Б-Г), обозначена пунктирным прямоугольником. (Б-Г) Примеры трансплантатов спустя 60 минут после пересадки. В отличие от клеток реципиента, цитоплазма клеток донора содержит флуоресцентные белки EGFP-Noggin1/2/4. Для сравнения диффузионных свойств исследуемых белков в каждом эксплантате измеряли диффузионный путь в шести направлениях (белые линии, расходящиеся из центра эксплантата под углом 60°) от границы эксплантата до точек, где уровень флуоресценции EGFP в межклеточном пространстве становится неотличимым от фона (пары белых отметок на радиальных линиях). (Д) Средний диффузионный путь и стандартное отклонение, вычисленные для каждой группы эксплантатов (количество эксплантатов указано на каждом из столбцов).





**Рис. 25.** Экспрессия *Noggin4* в раннем развитии *Gallus gallus*<sup>2</sup>

(А-Ж) Паттерны экспрессии *Noggin4* в тотальных препаратах куриных зародышей на разных стадиях развития. (А) Стадия 4; первичная полоска, гензеневский узелок. (Б) Стадия 5; гензеневский узелок с асимметричным распределением экспрессии *Noggin4*. (В) Стадия 6, общий вид; выраженная асимметрия экспрессии *Noggin4* в гензеневском узелке. (В') Тот же препарат, увеличенная область гензеневского узелка с асимметричным распределением экспрессии. (Г) Стадия 7 (одна пара сомитов); выраженная экспрессия в нервных валиках в области головных структур. (Д) Стадия 8. (Е) Стадия 10; распространение области экспрессии в нервных валиках в каудальном направлении. (Ж) Стадия 12. (З, И) Контрольная гибридизация с антисмысловым dig-зондом к мРНК *GAuf* на стадиях 4 (З) и 5+ (И). (Б', Г', Ж') Поперечные срезы препаратов куриных зародышей (Б), (Г) и (Ж), соответственно. (Б') Стадия 5; поперечный срез спереди от гензеневского узелка. (Г') Стадия 7; поперечный срез на уровне нервных валиков, выраженная экспрессия в материале нейроэктодермы. (Ж') Стадия 12; поперечный срез на уровне глазного пузыря, экспрессия *Noggin4* во всей нейроэктодерме, в том числе, в материале презумптивной сетчатки.

Гибридизация *in situ* с dig-зондом к мРНК *Noggin4*

<sup>2</sup> Гибридизация *in situ* с антисмысловым dig-зондом к мРНК *Noggin4*

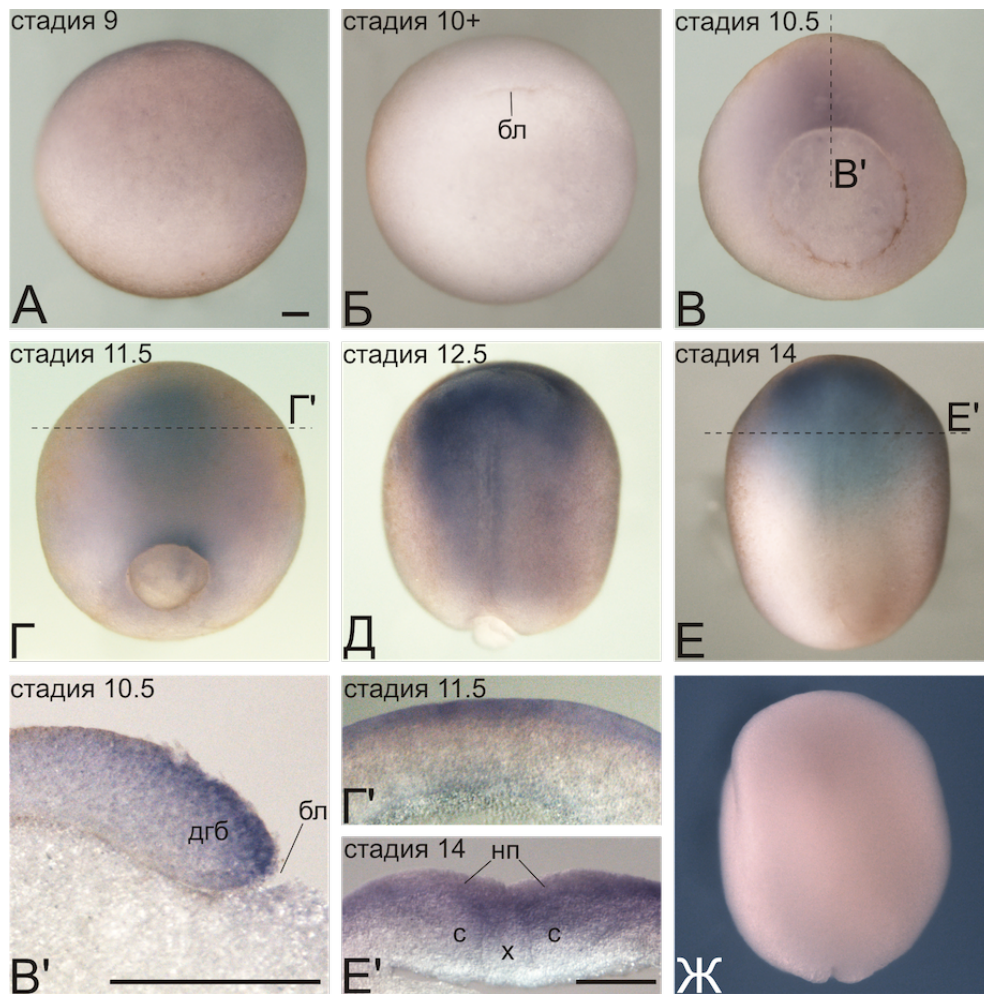
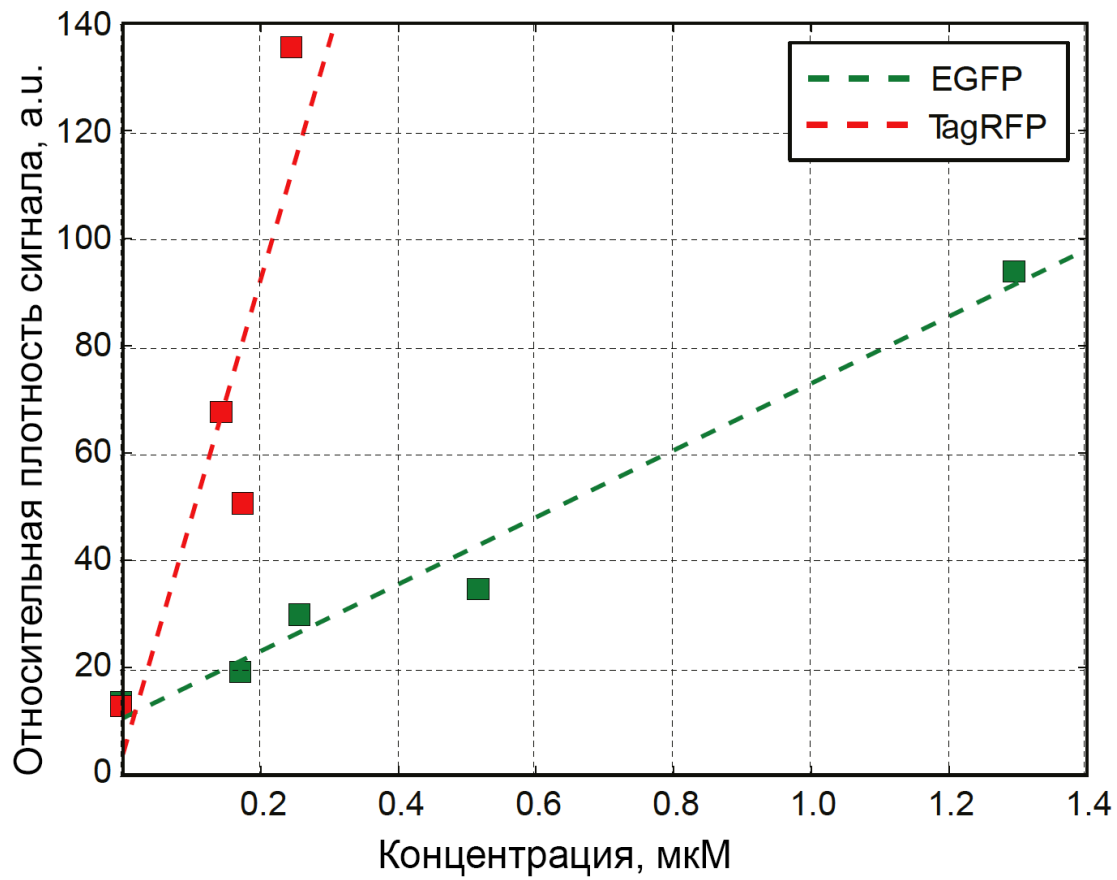


Рис. 26. Экспрессия *Noggin4* в раннем развитии *Xenopus laevis*<sup>3</sup>

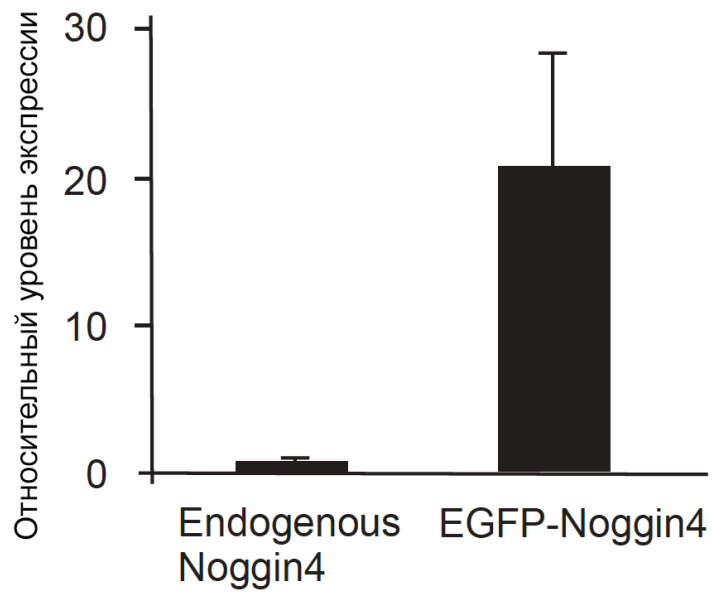
Общий вид зародышей на стадии поздней бластулы (А), в начале гастрюляции (Б), на стадии средней (В) и поздней (Г) гастрюлы; вид с вегетативного полюса, дорсальная сторона сверху. Общий вид зародышей на стадии ранней (Д) и средней (Е) нейрулы; вид с дорсальной стороны, головной полюс сверху. (В') Сагиттальный срез зародыша на стадии средней гастрюлы; область дорсальной губы бластопора, передний конец слева. Поперечные срезы зародышей на стадии ранней (Г') и поздней (Е') гастрюлы; область презумптивного переднего мозга, дорсальная сторона сверху. (Ж) Контрольная гибридизация со смысловым зондом к мРНК *Noggin4*. бл – бластопор, дгб – дорсальная губа бластопора, нп – нервная пластинка, с – сомиты, х – хорда. Размер масштабной линейки на всех рисунках – 100 мкм.

<sup>3</sup> Гибридизация *in situ* с антисмысловым dig-зондом к мРНК *Noggin4*

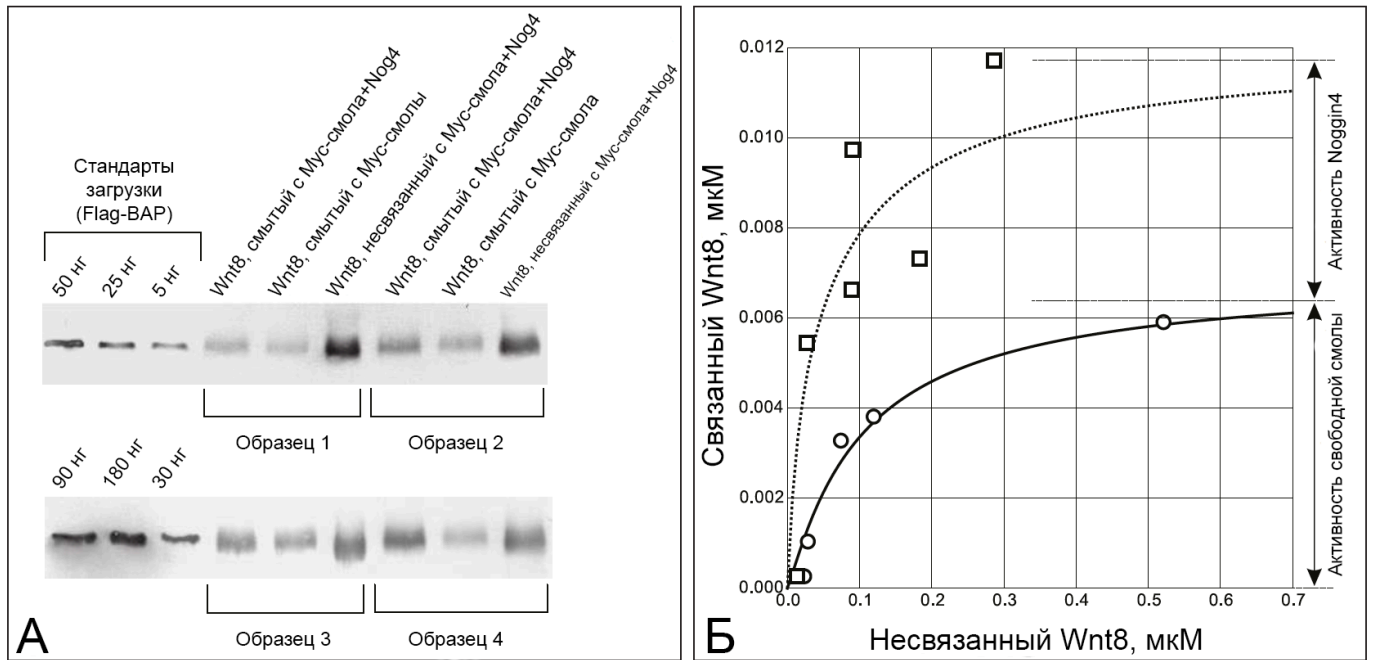


**Рис. 27. Калибровка конфокального микроскопа**

Калибровочные кривые для EGFP (зеленая) и TagRFP (красного) белков при наиболее часто используемых настройках микроскопа.

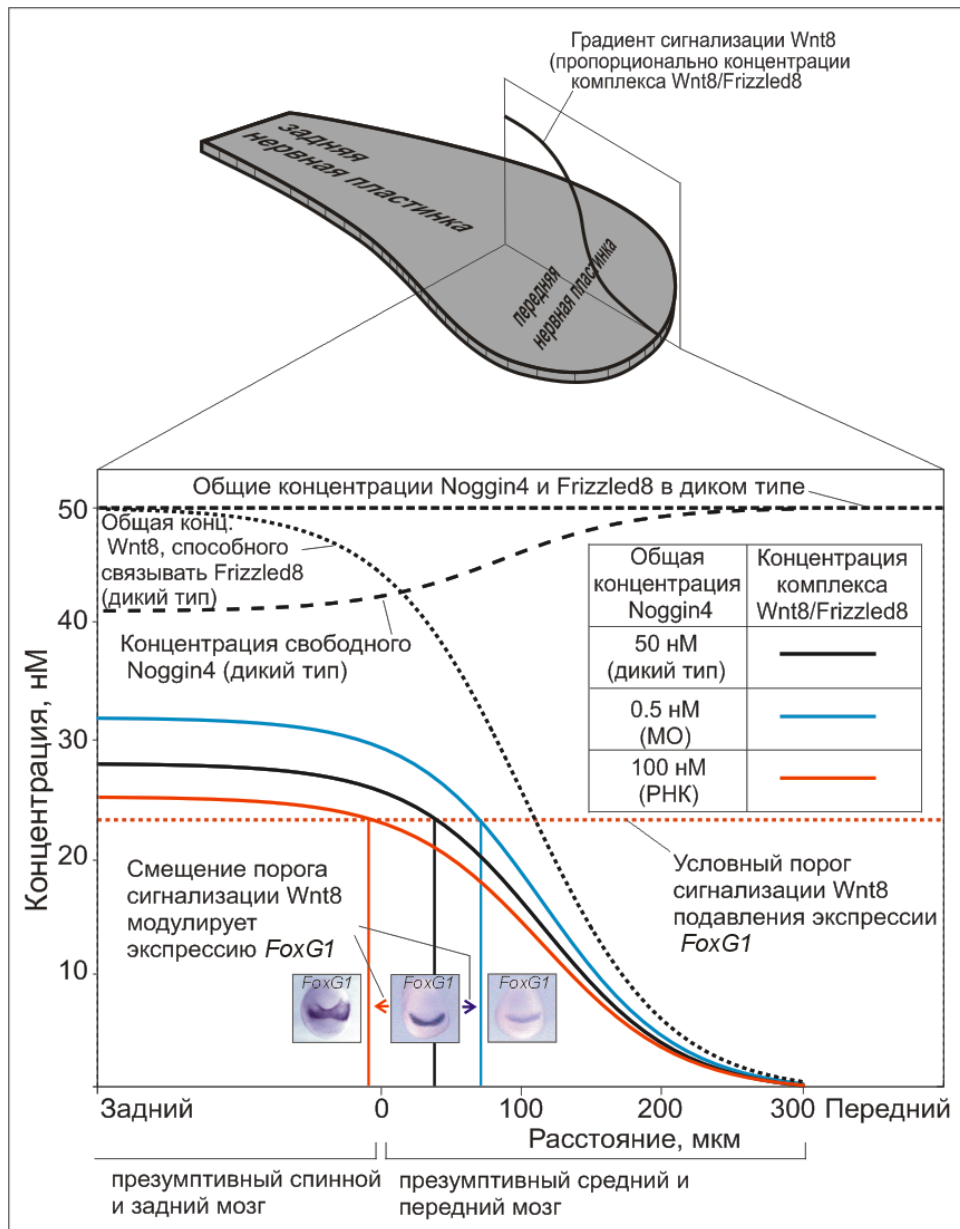


**Рис. 28.** Относительные концентрации эндогенной мРНК *Noggin4* и мРНК *EGFP-Noggin4* в эктодермальных эксплантатах эмбрионов на стадии средней гастролы



**Рис. 29. *In vitro* анализ связывания Wnt8 и Noggin4 при помощи количественной ко-иммунопреципитации и поверхностного плазмонного резонанса**

(А) Репрезентативные примеры вестерн-блотов с anti-Flag антителами номинальных количеств Flag-BAP (стандарт загрузки), Flag-Wnt8, смытого Мус-пептидом после инкубации с Мус-Смола+Мус-Noggin4, Flag-Wnt8, смытого Мус-пептидом после инкубации с Мус-смола+контрольные образцы и несвязанного Flag-Wnt8 после инкубации с Мус-Смола+Мус-Noggin4. Стандарты загрузки и экспериментальные образцы наносились на один гель. (Б) Изотермы поглощения, нарисованные по экспериментальным точкам, полученным по изображениям вестерн-блотов (см. Table S2 в (Eroshkin, Nesterenko et al. 2016)).



**Рис. 30. Моделирование влияния Noggin4 на передне-задний градиент сигнальной активности Wnt8**

При нейруляции Wnt8, распространяясь из задних областей в пределах передней нервной пластинки и взаимодействуя в ней с Frizzled8, образует градиент сигнальной активности, показанный в верхней части схемы сплошной черной линией внутри прямоугольника вдоль срединной линии нервной пластинки. Цветные кривые в увеличенной версии этого прямоугольника (ниже) выражают теоретически рассчитанное пространственное распределение концентрации комплекса Wnt8/Frizzled8 при трех концентрациях Noggin4: дикий тип, сниженная (инъекция Noggin4 МО) и повышенная (инъекция мРНК Noggin4). Три фотовставки показывают предполагаемые эффекты соответствующего пространственного смещения условного порога концентрации комплекса Wnt8/Frizzled8 экспрессии переднемозгового маркера FoxG1. Для более детального анализа см. основной текст и п. 4.2 и Fig.1 в Supplementary (Eroshkin, Nesterenko et al. 2016).

## 4. ВЫВОДЫ

1. Изучено и описано пространственное-временное распределение экспрессии Noggin4 в раннем развитии куриного зародыша *Gallus gallus*. Проведен сравнительный анализ паттернов экспрессии Noggin4 в раннем развитии куриного зародыша и эмбриона шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.
2. Показано, что белок Noggin4, в отличие от своих гомологов, не способен оказывать влияние на активность сигнальных путей BMP и Nodal/Activin как *in vitro*, так и *in vivo*.
3. Продемонстрирована способность белка Noggin4 связывать лиганд канонической ветви сигнального пути Wnt/ $\beta$ -catenin, Wnt8, и подавлять его сигнальную активность в условиях *in vitro* и *in vivo*.
4. Обнаружено уникальное для известных секретлируемых внеклеточных ингибиторов Wnt-сигнализации свойство Noggin4: вычисленная скорость его распространения в межклеточном пространстве более чем на порядок превосходит скорость его гомологов.
5. На основании результатов экспериментов и математического моделирования предложена модель регуляции белком Noggin4 градиента сигнальной активности Wnt8 в процессе ранней разметки нервной пластинки у эмбрионов *Xenopus laevis*.
6. Разработан новый, оптимизированный для условий *in vivo* подход к изучению распространения секретлируемых белков в межклеточном пространстве зародыша, позволяющий напрямую оценить реальную скорость их перемещения на основе применения генетических конструкций с флюоресцентными метками и измерения кинетик времени полувосстановления флюоресценции после фотобличинга (FRAP) в индивидуальном межклеточном сегменте.

## 5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 5.1. Материалы

#### 5.1.1. Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: этанол, изопропанол, хлороформ (Химмед), фенол, глицерин (Juro, Швейцария), ампициллин, NaCl (USB, США), KCl (Helicon, Россия), MgCl<sub>2</sub> (USB, США), MgSO<sub>4</sub> (Helicon, Россия), CaCl<sub>2</sub> (Fluka, Швейцария), NaOOCCH<sub>3</sub> (Sigma, США), NaOH (Германия), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O (Ferak Berlin, Германия), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O (Ferak Berlin, Германия), L-цистеин гидрохлорид (США), триэтаноламин хлорид (Aldrich, Германия), Tris Base (Helicon, Россия), EGTA (USB, США), EDTA (USB, США), MOPS (Juro, Швейцария), HEPES (Juro, Швейцария), CHAPS, цитрат натрия (MERCCK, Германия), малеиновая кислота (MERCCK, Германия), фиколл (Amersham Pharmacia, Швеция), параформальдегид (Sigma, США), формамид (BRL, США), поливинилпирролидон (PVP) (Sigma, США), Tween 20 (Sigma, США), хорионический гонадотропин (Sigma, США), препарат TorulaRNA (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США), агароза (USB, США), бромфеноловый синий, бромистый этидий (Plusone), FLD (Fluorescein lysine dextran) (Molecular probes, США), гормон дексаметазон (Sigma, США), циклогексимид (Fluca AG), маркер длины ДНК 1000 н.п. (Fermentas), морфолино олигонуклеотиды (Vector Labs, США), смесь дигоксигенин-меченных рибонуклеотидов [3,5mM digoxigenin-UTP+6,5mM UTP+10mM ATP+10mM GTP+10mM CTP] (Boehringer Mannheim, Enzo, Германия), ВМР (Boehringer Mannheim Purple) – субстрат для щелочной фосфатазы (Roche, Германия), блокирующий реагент, БР, blocking reagent (Roche, Германия), левамизол (Sigma, США), Minimal SD base (CLONTECH), YPD medium (CLONTECH), DNA herring tests carrier (CLONTECH), агар, аминокислоты (Sigma), b-меркаптоэтанол, диметилсульфоксид (DMSO), полиэтиленгликоль (PEG), ацетат лития (CLONTECH), 3-АТ (3-азотриазол) (Sigma), галактоза, раффиноза (Sigma), CMFM (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free medium: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 7.5 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1% BSA).

Набор Wizard PCR Preps (Promega), набор Wizard Plus Minipreps (Promega), набор T7/SP6-mMessage mMachine (Ambion), набор RNeasy mini kit (Qiagen).

#### 5.1.2. Ферментные препараты

В работе использовали SP6 полимеразу для транскрипции *in vitro* (Ambion.), T7 и T3 РНК-полимеразы (Promega, США) для синтеза дигоксигенин-меченных РНК-зондов, дигоксигенин-



специфичные антитела, связанные с щелочной фосфатазой anti-dig-AP-Fab fragment (Enzo, Германия), эндонуклеазы рестрикции: AgeI, XhoI, BamHI, HindIII, BglII (Promega), ДНК-лигазу фага T4 (Promega), термостабильную Taq-ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus*, термостабильную модифицированную ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* KTN (Ignatov, 1998), Pfu-полимеразу из *Picrococcus furiosus*, RNКазуH (Promega), протеиназу K (Sigma), РНАзин (Promega).

### 5.1.3. Лабораторное оборудование

В работе использовали напольную центрифугу с охлаждением (Jouan GR412); настольную центрифугу с охлаждением (Eppendorf 5415R); настольную центрифугу (Eppendorf minispin Cyclo Temp 202); автоматический ПЦР-амплификатор (Eppendorf Mastercycler); водный термостат с охлаждением (TE-8D RB-5A Techne); шейкер с термостатируемой камерой (C26 Incubator shaker Edison); термостатируемую качалку (Scello); качалку (Shaker S3, ELMi); фотометр (Biophotometer, Eppendorf); планшетный спектрофотометр iMark (Bio-Rad); люминометр TD-20/20; термостат (TC-80M-2); источник постоянного тока (Hoefer PS250/2.5 AMP); pH-метр (Radelkis OP-211/2); УФ-трансиллюминатор (Vilber-Lourmat); ультразвуковой аппарат (Bransan Sonifier, VWR Scientific); автоклав; термостаты «Гном» и «Гермит» (ДНК-технология); установку для белкового переноса (EPS-301, Amercham Pharmacia Biotech); весы аналитические (Ohaus); автоматические микропипетки (Gilson), микроинъектор Femtojet (Eppendorf); флуоресцентный стереомикроскоп (Leica MZ FLIII) с цифровой камерой (Leica DC 300F); вибротом HM 650V (Microm); бинокулярный микроскоп Polyvar (Reichert-Jung); вортекс (Sybron Thermolyne maxi mix); систему очистки воды (Milli-Q Water Purification system).

### 5.1.4. Лабораторные животные

Для получения зародышей в работе использовали самцов и самок шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* и *X. tropicalis*.

Коричневые племенные куриные яйца закупали на ФГУП ППЗ "Птичное". При необходимости перед использованием яйца хранились в термостате при температуре 10°C не более пяти суток.

### 5.1.5. Буферы и растворы

В работе использовали следующие буферы и растворы:

50x TAE (pH 7.6): 2 М Трис основание, 1,56 М уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА.

1x TE-буфер: 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5-8.0), 0.1 мМ EDTA.

Раствор бромистого этидия в воде для окрашивания ДНК в агарозных гелях - 2 мкг/мл.

10x Буфер для ДНК-лигазы фага T4 (Силекс).

10x Буфер для проведения ПЦР (Силекс).

10x Буферы для эндонуклеаз рестрикции (Promega и Fermentas).

X-gal стоковый раствор (Yeast Protocol Handbook, CLONTECH): X-gal 20 мг/мл в N`N-диметилформамиде.

Z-буфер (Yeast Protocol Handbook, CLONTECH): 16.1 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.5 г/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.75 г/л KCl, 0.246 г/л  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0.

Лизис-буфер для бактерий: 1xPBS, 1 мг/мл лизоцим, 0.5% Nonidet P40, 1мМ PMSF.

Лизис-буфер для зародышей: 25 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 137 мМ NaCl, 0.5% Nonidet P40, 5% глицерин, 1мМ  $\text{ZnCl}_2$ .

Фосфатный буфер Dulbecco: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.5мМКН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, 8.1мМ Na<sub>2</sub>НР<sub>4</sub>.

Буфер OR-2: 82.5 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 мМ HEPES, pH=7.8

2x Буфер для нанесения белков на гель: 100 мМ Трис-HCl (pH 6.5), 4% ДСН, 0.5 мг/мл бромфеноловый синий, 20% глицерин, 8 мМ ЭДТА.

5x Трис-глициновый буфер для проведения электрофореза по Laemmli (pH 8.3): 125 мМ Трис основание, 1.25 мМ глицин, 0.5% ДСН.

5x Верхний буфер для заливки ПААГ геля: 625 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 0.5% ДСН.

5x Нижний буфер для заливки ПААГ геля: 1.875 М Трис-HCl (pH 8.9), 0.5% ДСН.

1x Буфер для белкового переноса: 48 мМ Трис основание, 39 мМ глицин, 0.0375% ДСН, 20% этанол.

Раствор для окрашивания с помощью Куммасы: 1г/л Куммасы ярко голубой R250, 20 % этанол, 25% уксусная кислота, 1г/л  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Раствор для проявления геля, окрашенного Куммасы: 25% этанол, 7% уксусная кислота.

10x PBS (pH 7.4): 17 мМ КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, 52 мМ Na<sub>2</sub>НР<sub>4</sub>·7Н<sub>2</sub>О, 1.5М NaCl.

Раствор NaI: 6.6М NaI, 16мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Хранить в темноте при 4<sup>0</sup>С.

Модифицированный раствор Рингера для культивации зародышей амфибий (0.1 MMR): 0.1М NaCl, 2.0 мМ KCl, 1мМ MgCl<sub>2</sub>·6Н<sub>2</sub>О, 2мМ CaCl<sub>2</sub>·2Н<sub>2</sub>О, 5мМ HEPES, pH 7.4.

Раствор MEMFA для фиксации зародышей: 3.7% параформальдегид, 2мМ EGTA, 1мМ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1мМ MOPS, pH 7.4.

Буфер PTW: 1xPBS, 0.1% Tween-20.

20x SSC: 0.15М NaCl, 0.015М цитрат натрия дигидрат.

Буфер MAB: 100мМ малеиновая кислота, 150мМ NaCl, pH 7.5.

Предгибризационный буфер (**prehybridization buffer**, РН-буфер) для РНК-РНК гибридизации *in situ*: 50% формамид, 5xSSC, 1 мг/мл Torula RNA, 1храствор Дэнхардта, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 10мМ EDTA.

50x Раствор Дэнхардта: 1% фиколл, 1% поливинилпирролидон, 1% БСА.

Буфер для щелочной фосфатазы: 100мМ Трис-НСl (рН 9.5), 50мМ MgCl<sub>2</sub>•6Н<sub>2</sub>О, 100мМ NaCl, 0.1% Tween-20.

1хБуфер для проведения коиммунопреципитации (рН 7.2-7.4): 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 8.1 мМ Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>•7Н<sub>2</sub>О, 1.5 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 1% Triton-X 100.

Гуанидиновый лизис-буфер: 4М гуанидин тиоцианат, 42 мМ цитрат натрия дигидрат (рН-7), 0,83% N-лаурил саркозин натрия, 100мМ β-меркаптоэтанол.

#### 5.1.6. Микробиологические среды

В работе использовали следующие микробиологические среды:

Среда Лурия-Бертани (LB) для выращивания бактерий *Escherichia coli*: 1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% хлорид натрия, 0.01 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 1.5 % агар (только для заливки чашек). Стерилизовали автоклавированием.

Среда для дрожжей: 6.7г/л YNB (Yeast nitrogen base) или 26.7г/л Minimal SD base или 37г/л Minimal SD base Gal/Raf, 2% агар (только для заливки чашек). Стерилизовали автоклавированием. Перед использованием добавляли глюкозу до конечной концентрации 2% (кроме среды Minimal SD base Gal/Raf) и селективную 10х смесь аминокислот. Для селективных галактозосодержащих сред добавляли 2% галактозы и 1% раффинозы вместо 2% глюкозы.

#### 5.1.7. Предоставленные штаммы

В работе использовали следующие штаммы:

Бактерии *Escherichia coli*-штамм DH5α (F-, thi-1, gyrA96, supE44, hsdR17, recA1, endA1, relA1), штамм CodonPlus BL21(DE3) (F-, gal, hsdS BNL) линия RIPL.

#### 5.1.8. Предоставленные плазмиды

ActivinB, FlagActivinB, FlagBMP4, FlagXnr4, MycNoggin1, MycNoggin2, Noggin1, Noggin2, Noggin4, tBR, Xnr2, Xnr4, XWnt8, XWnt8-Flag (Группа молекулярных основ эмбриогенеза).

pCSb Catenin была любезно предоставлена Robert Grainger.

## 5.2. Методы

### 5.2.1. Амплификация ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Состав реакционной смеси: 1хбуфер для проведения ПЦР, смесь dNTP (конечная концентрация 0.25 мМ), праймеры (0.5 пмоль/мкл), матричная ДНК (для плазмиды 0.01-1нг на 25 мкл реакционной смеси), термостабильная ДНК-полимераза (0.5ед. на 25 мкл реакционной смеси), вода mQ. Реакцию проводили в амплификаторе с нагреваемой крышкой. Количество циклов выбирали в соответствии с исходным количеством матрицы и требуемым количеством конечного продукта реакции, температуру на стадии отжига праймеров подбирали из расчета длины и GC-состава праймеров, а длительность стадии элонгации – с учетом длины амплифицируемого фрагмента ДНК.

### 5.2.2. Электрофорез в агарозном геле

Электрофоретическое разделение ДНК проводили в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0.5 мкг/мл), в буфере 1хТАЕ при напряжённости электрического поля 80V. Образцы ДНК наносили на гель вместе с краской для нанесения. Визуализацию ДНК осуществляли на УФ-трансиллюминаторе. Концентрацию ДНК определяли по интенсивности свечения бромистого этидия в полоске, содержащей ДНК, или по оптической плотности с помощью фотометра.

### 5.2.3. Элюция ДНК из агарозного геля

После проведения электрофоретического разделения ДНК вырезали из геля полосу, содержащую нужный фрагмент ДНК, помещали ее в пробирку и добавляли такой объем раствора NaI, чтобы гель был полностью погружен в жидкость. Инкубировали при 65<sup>0</sup>С до полного расплавления агарозы, затем выделяли ДНК с использованием набора Wizard Plus Minipreps (Promega) по протоколу производителя.

### 5.2.4. Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции

Состав реакционной смеси: 1х буфер для эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз), фермент, ДНК, вода mQ. Расщепление продуктов ПЦР проводили в течение 14-16 ч., а плазмидной ДНК – 1-2 ч. при 37<sup>0</sup>С. Фермент инактивировали прогреванием при 65-80<sup>0</sup>С в течение 15мин. В случае термостабильных ферментов проводили экстракцию ДНК равным объемом смеси фенола с хлороформом (1:1) рН-8.0, затем ДНК осаждали добавлением 2,5-3 объема 96% этанола с

последующим ЦФ 10мин при КТ на 12 тыс. об/мин. Осадок промывали 70% этанолом и растворяли в воде mQ.

#### 5.2.5. Достройка 3'-конца двуцепочечных молекул ДНК

Состав реакционной смеси: 1хбуфер для фрагмента Клёнова (большой фрагмент ДНК-полимеразы I), фермент (1-5ед.), смесь dNTP (0.05мМ), ДНК (0.1-4 мкг), вода mQ. Реакцию проводили в объёме 20-25 мкл в течение 10 мин при 37<sup>0</sup>С. Фермент инактивировали прогреванием при 70<sup>0</sup>С в течение 10 мин.

#### 5.2.6. Отщепление выступающего 3'-конца двуцепочечных молекул ДНК

Состав реакционной смеси: 1х буфер для ДНК-полимеразы бактериофага Т4, фермент (1ед.); смесь dNTP (0.1мМ); ДНК (0.1-1 мкг); вода mQ. Реакцию проводили в объёме 20 мкл в течение 5 мин при КТ. Фермент инактивировали прогреванием при 70<sup>0</sup>С в течение 10 мин.

#### 5.2.7. Лигирование молекул ДНК

Состав реакционной смеси: 1хбуфер для ДНК-лигазы бактериофага Т4, фермент (1ед. для лигирования липких концов ДНК, 2 ед.- для тупых концов), ДНК-вектор (около 1мкг), ДНК-вставка (в молярном соотношении вектор/вставка 1:5–1:10), вода mQ. Лигирование проводили в объёме 20-50 мкл в течение ночи при 14-16<sup>0</sup>С. Перед проведением трансформации фермент инактивировали прогреванием при 65<sup>0</sup>С в течение 10-15 мин.

#### 5.2.8. Трансформация клеток *Escherichia coli*

К аликвоте (200 мкл) химически компетентных клеток добавляли раствор плазмидной ДНК и 8 мкл 0.5 М β-меркаптоэтанола и инкубировали 1 ч. на льду. Затем прогревали 60 сек. при 42<sup>0</sup>С с последующим охлаждением на льду. Добавляли 600 мкл среды LB без селективного антибиотика и инкубировали 1 ч. при 37<sup>0</sup>С при интенсивной аэрации, затем высевали на твердую среду LB, содержащую селективный антибиотик, и наращивали биомассу в течение 14-16 ч. при 37<sup>0</sup>С.

#### 5.2.9. Выделение плазмидной ДНК из бактерий *Escherichia coli*

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Plus Minipreps (Promega) по протоколу производителя. Клетки *E. coli*, трансформированные плазмидной ДНК, наращивали в 10-15 мл среды LB с селективным антибиотиком в течение 16-18 ч. при 37<sup>0</sup>С и интенсивной аэрации (200 об/мин). Клетки осаждали центрифугированием (ЦФ) на 3000 об/мин в течение 15 мин., удаляли надосадочную жидкость и осадок ресуспендировали в 400 мкл раствора I (cell resuspension solution). Затем добавляли равный объем лизирующего раствора II (cell lysis

solution), перемешивали переворачиванием до просветления раствора. Далее добавляли равный объем нейтрализующего раствора III (neutralization solution), резко встряхивали до образования творожистого осадка с последующим ЦФ 5 мин. на 12 тыс. об/мин. Супернатант смешивали с равным объемом смолы и наносили на колонку. Смолу промывали два раза избыточным объемом раствора IV (column wash solution), затем ДНК элюировали 50-100 мкл воды mQ.

#### 5.2.10. Изготовление ДНК конструкций

##### **pCSFrizzled8**

кДНК, кодирующую полную рамку считывания, получали при помощи РТ-ПЦР из тотальной РНК зародышей *Xenopus laevis* на стадии гаструлы со следующими праймерами (кодирующие последовательности Frizzled8 подчеркнуты):

Frizzled8-EcoRI-forward

ATTGAATTCCACCATGGAGAGTCTGTCGCTGTCCG

Frizzled8-XhoI-reverse

AATCTCGAGCATCTAGACCTGAGATAAGGGCA

Полученную кДНК клонировали в экспрессионный вектор pCS2+ по сайтам рестрикции EcoRI и XhoI. Активность мРНК, синтезированной на основе полученной конструкции, проверяли на предмет ее способности индуцировать вторичную ось.

##### **5'-UTR-MycNoggin4**

1). Создание 5'-фрагмента кДНК MycNoggin4, содержащего на 5'-UTR целевой сайт для Noggin4 MO. ПЦР pNoggin4 (Eroshkin, Ermakova et al. 2006) с праймером:

5'-AATGGATCCTAATCTCCAAGACAGGAATA ("Noggin4 5'-UTR")

и смесью двух обратных праймеров в соотношении 1:10 пМ, соответственно (Myc-tag-кодирующие последовательности подчеркнуты):

5'-CAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCATTTGTTTGGCCACAGATAGC

("Myc-Noggin4 reverse") и

5'-GAGGTCTTCTCCGATATCAGCTTCTGTTCCAGATCCTCTTCAGAGATG ("Myc reverse").

2). Получение 3'-фрагмента кДНК MycNoggin4. ПЦР pNoggin4 с обратным праймером

5'-TATCTCGAGTCTCATTTACAGGTACACTTGCA (“Noggin4-stop”) и смесью двух прямых праймеров в соотношении 1:10 пМ, соответственно (Myc-tag-кодирующие последовательности подчеркнуты):

5'-GAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGATCTCCAGCACTATAATCAG

(“Myc-Noggin4 forward”) и

5'-GAACAGAAGCTGATATCGGAGGAAGACCTCGAGCAGAAACTCATCTCTG

(“Myc forward”).

3). Получение полноразмерной кДНК, кодирующей Noggin4, с целевым сайтом для Noggin4 МО на 5'-UTR и трех копий Myc-tag эпитопов, следующих за сайтом отщепления сигнального пептида. Перекрывающиеся фрагменты кДНК, полученные в предыдущих шагах, выделяли, смешивали, денатурировали, отжигали и использовали в ПЦР с праймерами “Noggin4 5'-UTR” and “Noggin4-stop” (см. выше).

4). Клонирование продукта ПЦР в экспрессионный вектор pCS2 по сайтам рестрикции BamHI и XhoI.

Полученная конструкция: pCS2-5'-UTR-MycNoggin4.

**EGFP-Noggin4** (синтезируемая мРНК: SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4)

1). Клонирование кДНК, кодирующей сигнальный пептид Noggin2 с 3Myc-tag в экспрессионный вектор pCS2. Эти фрагменты кДНК получали при помощи ПЦР MycNoggin2 (Eroshkin, Ermakova et al. 2006) с праймерами (здесь и далее сайты рестрикции подчеркнуты):

прямой праймер Noggin2-BamHI

5'-AATTGGATCCGCCACCATGAAGAGGATAAATCTGC и

обратный праймер Noggin2-myc BglII:

5'-AATTAGATCTTCTAAGCCTGAGCAGATCCT

и клонировали по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI (тупой) вектора pCS2.

Полученная конструкция: pCS2-SignalNog2-3Myc

2). Клонирование EGFP кДНК в вектор pCS2-SignalNog2-3Myc.

кДНК EGFP получали при помощи ПЦР pEGFP-C1 (Clontech) со следующими праймерами:

прямой EGFP-BglII:

5'-TTCTAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA

и обратный EGFP-HindIII:

5'-GAAAAGCTTTGCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

и клонировали по сайтам рестрикции BglIII и HindIII вектора pCS2-SignalNog2-3Myc.

Полученная конструкция: pCS2-SygnalNog2-3Myc-EGFP.

3). Клонирование кДНК, кодирующей сайт TEV-протеиназы в pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP.

кДНК TEV-сайта получали при помощи отжига соответствующих олигонуклеотидов:

прямой TEV-HindIII-ApaI: 5'-AGCTTTCGAAAATTTATATTTTCAGGGCCCC

и обратный TEV-HindIII-ApaI: 5'-AGCTGGGGCCCTGAAAATATAAATTTTCGAA

и клонировали по сайту рестрикции HindIII вектора pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP. Клоны с правильной ориентацией TEV-вставки отбирались при помощи ПЦР.

Полученная конструкция: pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV.

4). Клонирование кДНК 6His в вектор pCS2-SygnalNog2-3Myc-EGFP-TEV.

кДНК, кодирующую 6His, получали отжигом следующих олигонуклеотидов:

прямой HindIII-6His: 5'-AGCTAGATCTCACCATCACCAACATCATGG

и обратный HindIII-6His: 5'-AGCTCCATGATGGTGGTGATGGTGAGATCT

и клонировали по уникальному сайту рестрикции HindIII вектора pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV. Клоны с правильной ориентацией вставки 6His отбирались при помощи ПЦР.

Полученная конструкция: pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His.

5). Клонирование зрелой кДНК Noggin4 в pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His.

кДНК, кодирующая зрелую РНК Noggin4, была получена при помощи ПЦР вектора pBluescript-Noggin4 (Eroshkin, Ermakova et al. 2006) со следующими праймерами:

прямой Noggin4-ApaI: 5'-TTTCAGGGCCCCGGCCAAACAAATGATCTCC

и Stop-Noggin4-XhoI: 5'-TТАCTCGAGTCAGCAGGAACACTTGAC

и клонировали по сайтам рестрикции ApaI и XhoI pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His.

Полученная конструкция: pCS2-SygnalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4.

**EGFP-Noggin1** (синтезируемая мРНК: SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog1)

кДНК Noggin4 в pCS2-SygnalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4 заменяли на кДНК Noggin1, полученную при помощи ПЦР плазмиды pBluescript-Noggin1 (Bayramov, Eroshkin et al. 2011) со следующими праймерами (здесь и ниже стоп-кодоны выделены серым цветом):

прямой Noggin1-ApaI: 5'-TTTCAGGGCCCCCATTTATCTGCACATCAGAC



и Stop-Noggin1-XhoI: 5'-ATTCTCGAGTCTCAGCATGAGCATTTGCA.

**EGFP-Noggin2** (синтезируемая мРНК: SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog2)

кДНК Noggin4 в рCS2-SygnalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4 заменяли на кДНК Noggin2, полученную при помощи ПЦР плазмиды рBluescript-Noggin2 (Bayramov, Eroshkin et al. 2011) со следующими праймерами:

прямой Noggin2-ApaI: 5'-TTTCAGGGCCCCCAGCCTTATCTCAGGCTTA

и Stop-Noggin2-XhoI: 5'-ATTCTCGAGTTAGCATGAACAACCTTACAACCTCTG.

**EGFP-XWnt8** (синтезируемая мРНК: SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-XWnt8)

кДНК Noggin4 в рCS2-SygnalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4 заменяли на кДНК XWnt8, полученную при помощи ПЦР со следующими праймерами:

прямой XWnt8-ApaI: 5'-TTTCAGGGCCCCCTGGTCAGTCAATAACTTTC

и Stop-XWnt8-XhoI: 5'-ТААТCTCGAGTCATCTCCGGTGGCCTCTGT.

**EGFP-hep** (синтезируемая мРНК: SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-hep)

Олигонуклеотиды, кодирующие гепарин-связывающий сайт Noggin1, отжигали и заменяли на полученную вставку кДНК Noggin4 в рCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4:

прямой Heparin-ApaI-XhoI:

5'-AGAGCAAAAAGCACAGACTGAGCAAGAAACTCAGGAGAAAGTGAC

и обратный Heparin-ApaI-XhoI:

5'-TCGAGTCACTTTCTCCTGAGTTTCTTGCTCAGTCTGTGCTTTTTGCTCTGGCC.

**TagRFP-Noggin1, -2 и -4** (синтезируемые мРНК: SignalNog2-3Myc-TagRFP-TEV-6His-Nog1/2/4)

кДНК EGFP в плазмиде рCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog1/2/4 заменяли на кДНК TagRFP, полученную при помощи ПЦР со следующими праймерами:

прямой TagRFP-BglII: 5'-TTCTAGATCTATGGTGTCTAAGGGCGAAGA

и обратный TagRFP-BglII: 5'-TTCTAGATCTCCAATTAAGTTTGTGCCCA.

**TagRFP-XWnt8** (синтезируемая мРНК: SignalNog2-3Myc-TagRFP-TEV-6His-XWnt8)

кДНК Noggin1 в плазмиде рCS2-SignalNog2-3Myc-TagRFP-TEV-6His-Nog1 заменяли на кДНК XWnt8, полученную при помощи ПЦР со следующими праймерами:

прямой XWnt8-ApaI: 5'- TTTCAGGGCCCCTGGTCAGTCAATAACTTTC  
и Stop-XWnt8-XhoI: 5'- ТААТCTCGAGTСАТСТСССGGTGGCCTCTGT.

**TagRFP-hep** (синтезируемая мРНК: SignalNog2-3Myc-TagRFP-TEV-6His-hep) кДНК EGFP в плазмиде pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-hep заменяли на кДНК TagRFP по фланкирующим сайтам рестрикции BglII.

#### **pCMV-3Myc-6His-Nog4** (для селекции неомицином)

Кассеты SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4 вырезали из плазмиды pCS2-SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4 (см. выше) по сайтам рестрикции BamHI и XhoI и клонировали по BglII и XhoI эуспрессионного вектора pEGFP-N1 (Clontech). Затем кДНК EGFP удаляли из кассеты SignalNog2-3Myc-EGFP-TEV-6His-Nog4 рестрикцией по сайту BglII и лигировали полученную линейаризованную плазмиду на себя. На конечном этапе вторую кДНК EGFP удаляли из плазмиды рестрикцией по сайтам BamHI и NotI, затем обрабатывали полученную линейаризованную плазмиду фрагментом Кленова и лигировали ее на себя.

#### 5.2.11. Транскрипция *in vitro*

Синтетические экпированные мРНК получали при помощи наборов mMessage mMachine (Ambion) по методике производителя с использованием SP6, T3 или T7 РНК-полимеразы. В качестве матрицы использовали плазмидные конструкции на основе вектора pCS2+, линейаризованные по сайтам NotI и конструкции на основе вектора pSP64, линейаризованные по сайту EcoRI. После синтеза мРНК очищали при помощи набора RNeasy Mini kit (Qiagen) и растворяли в воде mQ.

#### 5.2.12. Получение зародышей *X. laevis* и *G. gallus*

Зародыши шпорцевой лягушки получали методом искусственного оплодотворения по методике Sive (Sive 1994). Для этого самкам инъектировали хорионический гонадотропин (500 единиц на самку) в спинной лимфатический мешок. Через 12-15 ч. самка откладывала икру, которую переносили в чашки Петри и там оплодотворяли, приводя в контакт с вырезанным у самца семенником. Инкубировали в 0.1xMMR 1ч. при КТ, после оплодотворения удаляли у зародышей наружные оболочки водным раствором 2% L-цистеина (pH 7.8-8.0), промывали 0.1xMMR 5 раз по 5-10 мин. и инкубировали до стадии 2-4 бластомеров. Стадии развития зародышей определяли по таблицам нормального развития Ньюкупа и Фабера (Nieuwkoop and Faber, 1967).

Племенные коричневые яйца, приобретенные заранее на птицефабрике ФГУП ППЗ "Птичное", инкубировали в термостате при 38°C. По достижении требуемой стадии развития яйца осторожно разбивали в чашку Петри, желток очищали от белка и снимали зародыш с поверхности желтка при помощи бумажного кольца и удаляли с него остатки желтка, осторожно промывая в РТW при КТ.

#### *5.2.13. Синтез белков в зародышах Xenopus laevis*

Ооциты или зародыши на требуемой стадии развития отбирали в 60-луночные планшеты Таразакс с 4% раствором Ficoll в 0.1-кратном буфере MMR, соответственно. Микроинъекцию раствора синтетической мРНК (100-150нг/мкл) проводили на приборе Femtojet (Eppendorf) (размер капли 4-5 делений при 25-кратном увеличении), после чего переносили в чистый 0.1-кратный буфер MMR, где инкубировали 18-20 часов в термостате при температуре 14°C. Стадии развития определяли по таблицам нормального развития (NIEUWKOOP 1967). Далее зародыши гомогенизировались на льду пипетированием в фосфатном буфере Dulbecco (10 мкл/зародыш) с добавлением 1% Triton X-100 и ингибиторами протеаз и центрифугировали на скорости 13400 об/мин в течение 30 мин при температуре 4°C для удаления желтка. Полученный супернатант отбирали в чистую пробирку.

#### *5.2.14. Электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях в ПААГ*

Электрофоретическое разделение белков проводили по методике в модификации Леммли (Laemmli 1970). Для приготовления гелей использовали водный стоковый раствор с соотношением акриламида: N,N,N',N'-метилден-бис-акриламида 29:1. Концентрирующий (верхний) 5% гель готовили на буфере 0.1% ДСН, 0.125М Трис–НСl (рН 6.8), а разделяющий (нижний) гель - на буфере 0.1% ДСН, 0.375М Трис–НСl (рН 8.9). Процентное содержание акриламида в нижнем геле подбирали в зависимости от размера разделяемых белков (7.5-12%). Электрофоретическое разделение проводили в 1х трис-глициновом буфере для проведения электрофореза. Пробы наносили в буфере нанесения после предварительного прогревания в течение 5 мин. при 95°C. Электрофорез в концентрирующем геле проводили при силе тока 8-10 мА на 1 пластину геля, а в разделяющем геле – при 15-20 мА.

#### *5.2.15. Выделение секретируемых белков из межклеточного пространства эмбриональной ткани*

С зародышей, предварительно инъецированных синтетическими мРНК, кодирующими соответствующие Flag- и Мус-меченные белки, снимали оболочки на стадии ранней гаструлы, после чего зародыши помещали в среду CMFM в объеме 10 мкл/зародыш, где они диссоциировали

на отдельный клетки. Зародыши в CMFM инкубировали при комнатной температуре на вращающейся платформе 2 часа для накопления в среде секретируемых белков. Затем в среду добавляли коктейль из 2 mM ЭДТА и ингибитора протеаз Sigma™, после чего продолжили инкубацию еще 1 час, пока эксплантаты полностью не диссоциировали на отдельные клетки. Полученные клеточные массы осторожно осаждали на центрифуге (1000 об/мин, 3 мин), в супернатант добавляли 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 2 mM восстановленного глутатиона и 2 mM окисленного глутатиона (кондиционная среда CMFM с IP добавками) и использовали для ко-иммунопреципитации. В случае Myc-Noggin1, Myc-Noggin2 и Myc-Noggin4 1.5 мл кондиционной среды смешивали с 150 мкл EZview Red ANTI-MYC Affinity Gel (Sigma™ E6654) и инкубировали в течение 2 часов при температуре 4°C на вращающейся платформе, после чего трижды промывали средой CMFM с IP-добавками. Кондиционную среду, содержащую Flag-Activin, Flag-BMP4, Flag-Xnr3, Flag-Xnr4 или Flag-Wnt8, предварительно концентрировали в 5 раз на центрифужных фильтрах Amicon Ultra (Ultracel-10k). После этого аликвоты концентрированной среды CMFM с IP-добавками, содержащей достаточные количества Flag-меченных белков, смешивали с 50 мкл аликвот EZview Red ANTI-MYC Affinity Gel, уравновешенных 0.5% BSA (контроль), либо с 50 мкл аликвот EZview Red ANTI-MYC Affinity Gel, содержащих связанные Noggin1, Noggin2 или Noggin4 (см. выше) и инкубировали ночь при 4°C на вращающейся платформе. После 5-кратного промывания средой CMFM с IP-добавками комплексы белков смывались с ANTI-MYC Affinity Gel при помощи инкубации в CMFM с IP добавками с 0.15 мг/мл с-MYC пептида (Sigma™ M2435) и анализировались при помощи вестерн-блота по описанной ранее методике (Bayramov, Eroshkin et al. 2011).

#### *5.2.16. Измерение внутриклеточной концентрации активного P-Smad1*

Определение в зародышах P-Smad1, Smad1 и  $\alpha$ -tubulin проводили при помощи вестерн-блоттинга с соответствующими антителами к этим белкам согласно протоколу производителя. Зародыши инъецировали мРНК Noggin1/2 или Noggin4 в количестве 100 пг на эмбрион, инкубировали и выделяли белок по описанной методике (см. раздел “5.2.13. Синтез белков в зародышах *Xenopus laevis*”).

P-Smad1 определяли вестерн-блотом при помощи anti-P-Smad1 антител (Cell Signaling Technology, Inc.). Общий уровень Smad1 определяли при помощи anti-Smad антител (ab66737, Abcam).  $\alpha$ -tubulin, служащий в качестве контроля загрузки, определяли при помощи anti-tubulin антител (DM1A, Sigma). Во всех случаях для определения первичных антител использовали Fab-фрагменты Anti-Rabbit антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (A3937, Sigma).

Количество белка на вестерн-блоте измеряли при помощи программного обеспечения ImageJ™ как интегральную плотность после разделения каналов и удаления фона.

#### 5.2.17. Оценка уровней экспрессии *Noggin4* и *EGFP-Noggin4*

Для оценки уровня экспрессии эндогенного белка *Noggin4* в межклеточном пространстве живого зародыша при помощи qRT-PCR мы оценили во сколько раз концентрация мРНК *EGFP-Noggin4* в зародышах из проводимых нами FRAP-экспериментов была выше эндогенной мРНК *Noggin4*. Пять групп эксплантатов крыши бластоцеля – «анимальных шапочек», по 10 эксплантатов в каждой группе – вырезали из гаструл дикого типа, принадлежащих разным кладкам, а так же из экспериментальных гаструл из тех же кладок, предварительно инъецированных мРНК *EGFP-Noggin4* таким же образом, как и гастролы для FRAP-экспериментов. Эксплантаты крыши бластоцеля брались с учетом того факта, что в отличие от зародышей дикого типа, их экспериментальные собратья могли содержать мРНК не только в эктодермальном слое, из которого брался эксплантат, но и в остальных частях. Относительные концентрации *EGFP-Noggin4* и эндогенной мРНК *Noggin4* в этих группах эксплантатов сравнивали по данным qRT-PCR со следующими парами праймеров к *EGFP* и *Noggin4*:

*EGFP Forward* 5'-GGCGACGTAAACGGCCACA и  
*EGFP Reverse* 5'-CTGCACGCCGTAGGTCAGG;

*Nog4 Forward* 5'-TGGTTGGTGCAGAGGGCCAG и  
*Nog4 Reverse* 5'-CATGCCAGGTGGCCAGGAGC.

Пары праймеров подбирались так, чтобы они давали максимально близкую к идентичной эффективность полимеразной реакции на основе обеих матриц *EGFP* и *Noggin4*. В результате проведенного анализа мы установили, что концентрации эндогенной мРНК *Noggin4* была в среднем в 20 раз ниже, чем концентрация синтетической мРНК *EGFP-Noggin4* в эмбрионах, использованных в FRAP-экспериментах (Рис. 28). При допущении, что эффективность трансляции эндогенной мРНК *Noggin4* не может быть ниже таковой для более длинной мРНК *EGFP-Noggin4*, мы заключили, что концентрация эндогенного белка *Noggin4* не может быть ниже 1/20 от концентрации белка *EGFP-Noggin4*. Принимая концентрацию белка *EGFP-Noggin4* равной 1 мМ (см выше), мы оценили концентрацию эндогенного белка *Noggin4* в межклеточном пространстве равной  $5 \cdot 10^8$  М.

### 5.2.18. Количественная ко-иммунопреципитация

Для измерения  $K_D$  комплекса Wnt8-Noggin4 при помощи количественной ко-иммунопреципитации (кКо-ИП) Flag-Wnt8 (всего 5 мкг) Мус-Noggin4 (всего 7 мкг) выделяли согласно протоколу, описанному в разделе “5.2.15. Выделение секретируемых белков из межклеточного пространства эмбриональной ткани”, из двух кладок по 700 зародышей, инъецированных соответствующими синтетическими мРНК. Для проведения кКо-ИП к чистой anti-Мус смоле (контрольные образцы) или к anti-Мус смоле, заранее смешанной с Мус-Noggin4 (опытные образцы), добавляли Flag-Wnt8 в нескольких постепенно понижающихся концентрациях. Далее при помощи количественного вестерн-блота измерялись концентрации связанного и несвязанного Flag-Wnt8. Затем концентрации связанного и свободного Flag-Wnt8 измерялись при помощи количественного иммуноблота путем нанесения экспериментального и контрольного образцов на тот же гель в серии разведений стандартного образца – N-концевого Flag-ВАР рекомбинантного белка, 50 кДа (Sigma P-7582) (Рис. 29) Сканированные изображения иммуноблота обрабатывались при помощи ImageJ50 для количественных измерений. Количества Wnt8 в промывочной среде и элюате, вычисленные на основе полученных изображений, нормализовались по разведению и по объему преципитационной реакции для вычисления концентраций связанной и свободной фракции Wnt8.

Модель для анализа результатов вестерн-блоттинга основана на допущении, что происходят следующие реакции:

1. Мус-Wnt8 (W) связывает anti-Мус смолу (R), согласно уравнению  $W + R \rightleftharpoons WR$ ;
2. Flag-Wnt8 связывает Noggin4 (N), согласно уравнению  $W + N \rightleftharpoons WN$ .

Соответственно, эти реакции характеризуются четырьмя численными параметрами:

1. активность смолы  $r = [R] + [WR]$ ;
2. активность Noggin4  $h = [N] + [WN]$ ;
3.  $K_d$  комплекса WN,  $K_1 = [W][N] = [WN]$ ;
4.  $K_d$  комплекса WR,  $K_2 = [W][R] = [WR]$ .

### 5.2.19. Иммуноблот (*Western Blotting*)

Проводили электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях с использованием предокрашенного маркера. Отделяли разделяющий гель и проводили перенос белков из него на мембрану Hybond P (Amersham) на приборе для полусухого электропереноса (EPS-301, Amersham Pharmacia Biotech) по инструкции производителя. Для этого вырезали мембрану по размеру разделяющего геля, 3 листа бумаги Whatman 3М размером с гель и 3 листа

бумаги Whatman 3М на 1 см шире и длиннее. Мембрану предварительно вымачивали 20-30 сек. в изопропанолe, промывали 7-10 мин. водой и уравнивали в течение 10 мин. в 1хбуфере для переноса. В этом же буфере для переноса вымачивали листы бумаги Whatman 3М. Помещали на нижний электрод установки для переноса стопку бумаги Whatman 3М (листы большего размера), мембрану, гель, листы бумаги меньшего размера, накрывали верхним электродом и проводили перенос в течение 1 ч. при силе тока 1мА на 1см<sup>2</sup> мембраны. Мембрану инкубировали в течение 1 ч. при КТ на орбитальной качалке в блокирующем растворе 1хPBS, 0.1% Tween-20, 3% блокирующего реагента (blotting grade blocker non-fat dry milk, Bio-Rad). Затем мембрану отмывали 3 раза по 5 мин. в растворе 1хPBS, 0.1% Tween-20 и инкубировали ночь при 4<sup>0</sup>С с моноклональными антителами мыши, конъюгированными с алкаиновою фосфатазой и специфичными к с-Мус или FLAG эпитопам, разведенными 1/1000 в растворе 1хPBS, 0.1% Tween-20, 0.5% блокирующего реагента. После этого мембрану отмывали 5 раз по 7-10 мин. раствором 1хPBS, 0,1% Tween, затем инкубировали 5 мин. в проявляющем растворе (western blue stabilized substrate for alkaline phosphatase, Promega), промывали водой и высушивали.

#### *5.2.20. Блокирование трансляции эндогенных мРНК при помощи морфолино*

Морфолино олигонуклеотиды (МО) – это химически синтезированные модифицированные анти-смысловые олигонуклеотиды. Они состоят из морфолино мономеров (обычно 18-25), соединенных фосфордиамидатной связью, каждый из которых содержит по одному из четырех азотистых оснований (А, Т, G, С), присоединенных к шестичленному кольцу морфолина (**Error! Reference source not found.**). Такие МО обладают устойчивостью к внутриклеточным нуклеазам, высокой эффективностью ингибирования трансляции эндогенных мРНК по RNaseH независимому механизму, очень высокой специфичностью, нечувствительностью к вторичной структуре РНК-мишени, быстрым распределением между цитоплазмой и ядром, хорошей растворимостью в воде. Антисмысловой морфолино олигонуклеотид, связываясь с целевой мРНК-мишенью, препятствует её трансляции, в результате в клетке не синтезируется белок-мишень.

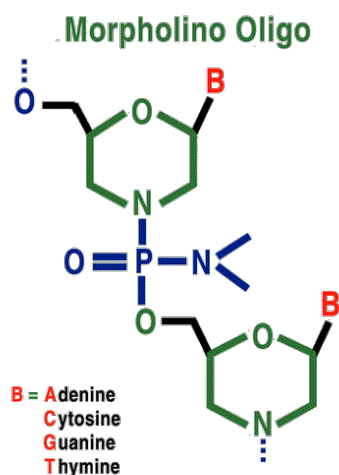


Схема МО. В – одно из четырех азотистых оснований (аденин, гуанин, цитозин, тимин).

На основе анализа баз данных NR и EST для *Xenopus laevis* при помощи программы BLAST, и, с учетом рекомендаций производителя Gene Tools, LLC были изготовлены следующие антисмысловые морфолино олигонуклеотиды:

- стандартный МО к позициям –20+5 мРНК Noggin4 для обоих псевдоаллелей Noggin4 у *Xenopus laevis* – 5'-ACCATTATTCCTGTCTTGGAGATTA;
- эквимоллярную смесь двух МО к позициям +1+25 мРНК Noggin4 для обоих псевдоаллелей Noggin4 у *Xenopus laevis* – 5'-GATTATAGAAGTGAGTATCTTCCAT и 5'-ATGATATAACTAGTATGTGTACCAT;
- некомплементарный вариант Noggin4 МО1 – 5'-TCCAGTATACCCATCTAGGATATTC в качестве отрицательного контроля.

Для микроинъекций использовали 0,2 мМ водные растворы морфолино олигонуклеотидов, смешанных с 5% флуоресцентной меткой FLD. В 1-2 бластомера инъекцировали 5-7 нл растворов на стадиях 2-16 бластомеров.

#### 5.2.21. Фиксация зародышей *Xenopus laevis*

В работе использовали методику Sive (Sive et al., 1994). Пинцетом снимали с зародышей шпорцевой лягушки вителлиновые оболочки, затем помещали их в холодный (4°C) фиксирующий раствор MEMFA и инкубировали 90 мин. при КТ на шейкере (45 об/мин). Сливали фиксирующий раствор и добавляли 1xPBS, промывали 5 мин. при КТ на качалке. Осторожно сливали 1xPBS и добавляли 50% этанол, промывали 5 мин. при КТ на качалке. Меняли раствор на 96% этанол,



инкубировали 15 мин. при КТ на шейкере. Повторно дважды промывали 96% этанолом по 15 мин. Зародыши в 96% этаноле хранили в морозильной камере ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

#### 5.2.22. Фиксация зародышей *Gallus gallus*

Коричневые племенные куриные яйца инкубировали при  $38^{\circ}\text{C}$  до необходимой стадии. Время инкубации, необходимое для достижения требуемой стадии, определялось по таблицам нормального развития (Астауров 1975). По окончании инкубации зародыши снимали с желтка с помощью бумажного кольца, помещали их в холодный ( $4^{\circ}\text{C}$ ) фиксирующий раствор MEMFA и инкубировали 90 мин. при КТ на шейкере (45 об/мин). Сливали фиксирующий раствор и добавляли 1xPBS, промывали 5 мин. при КТ на качалке. Осторожно сливали 1xPBS и добавляли 50% этанол, промывали 5 мин. при КТ на качалке. Меняли раствор на 96% этанол, инкубировали 15 мин. при КТ на шейкере. Повторно дважды промывали 96% этанолом по 15 мин. Зародыши в 96% этаноле хранили в морозильной камере ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

#### 5.2.23. Гибридизация *in situ* тотальных препаратов зародышей *X. laevis* и *G. gallus*

В работе использовали методику Harland (Harland 1991):

I. Предгибридизация: Фиксированные зародыши переводили из 96% (Harland 1991) этанола в РТW с помощью последовательных промывок по 5 мин. при КТ на шейкере (45 об/мин) 96%, 75% и 50% водными растворами этанола, затем 25% раствором этанола в РТW. Промывали РТW 3 раза по 5 мин. при КТ на качалке. Добавляли раствор протеиназы К в РТW (1мкг/мл) и инкубировали 5 мин. при КТ. Промывали 0.1М раствором триэтаноламин гидрохлорида (ТЭА) 2 раза по 5 мин. при КТ. К 0.1М раствору ТЭА после 2-ой промывки добавляли 0.25% ацетангидрида и инкубировали 5 мин. при КТ на качалке. Туда же добавляли ещё 0.25% ацетангидрида и инкубировали 5 мин. при КТ на качалке. Промывали РТW 2 раза по 5 мин. при КТ на качалке. Заменяли РТW на фиксирующий раствор MEMFA и инкубировали 20 мин. при КТ на качалке. Промывали РТW 2 раза по 5 мин. при КТ на качалке. Удаляли РТW, оставляя 1 мл, и добавляли 250 мкл РН-буфера, инкубировали 15 мин. при КТ на качалке. Заменяли раствор на РН-буфер (300 мкл на флакон), инкубировали 60 мин. при  $60^{\circ}\text{C}$  на качалке. Меняли РН-буфер и оставляли на ночь (14-18 часов) при  $60^{\circ}\text{C}$  на качалке. Зародыши в РН-буфере хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения гибридизации с зондом.

II. Гибридизация с дигоксигенин-меченым антисмысловым зондом, комплементарным исследуемой РНК: Зародыши в РН-буфере прогревали до  $60^{\circ}\text{C}$ , сливали РН-буфер и добавляли предварительно прогретый до  $60^{\circ}\text{C}$  раствор диг-меченного зонда в РН-буфере (0.5-1мкг

дигоксигенин-меченой антисмысловой РНК на 1мл РН-буфера), инкубировали ночь при 60°C на качалке.

III. Отмывка от РНК-зонда: Отбирали раствор зонда и промывали РН-буфером 2 раза по 30 мин. при 60°C на качалке, затем последовательно промывали предварительно прогретым до 60°C раствором 2xSSC 2 раза по 60 мин. при 60°C на качалке, раствором 0,2xSSC 2 раза по 60 мин. при КТ на качалке и буфером МАВ 2 раза по 10 мин. при КТ на качалке.

IV. Инкубация со специфичными к дигоксигениновым остаткам антителами, сшитыми с щелочной фосфатазой: Сливали МАВ и добавляли 2% блокирующий реагент в буфере МАВ, инкубировали 15-60 мин. при КТ на качалке. Удаляли раствор и добавляли буфер МАВ с 2% блокирующего реагента и 20% сыворотки (heat treated lamb serum), инкубировали 1-2 ч. при КТ на качалке. Удаляли раствор и добавляли буфер МАВ, содержащий 2% блокирующего реагента, 20% сыворотки и диг-специфичные антитела, сшитые с щелочной фосфатазой (разведение 1/1000), инкубировали ночь на качалке при 4°C.

V. Отмывка от антител: Промывали буфером МАВ 6 раз по 60 мин. при КТ на качалке. Последнюю промывку оставляли на ночь на качалке при 4°C.

VI. Проявление (добавление субстрата для щелочной фосфатазы, которая осуществляет с ним хромогенную реакцию, при этом эндогенную фосфатазу ингибируют с помощью левамизола): Промывали буфером для щелочной фосфатазы с добавлением левамизола (2мМ) 2 раза при КТ на качалке. Сливали буфер и добавляли предварительно прогретый до КТ субстрат для щелочной фосфатазы (BMP, Boehringer Mannheim Purple AP substrate) с добавлением левамизола (1мМ), инкубировали в темноте при КТ на качалке до появления окраски (3-18 ч.). Промывали буфером для щелочной фосфатазы 2 раза при КТ на качалке и добавляли фиксирующий раствор MEMFA. Окрашенные зародыши хранили при 4°C.

#### 5.2.24. Синтез dig-меченой анти-мРНК для гибридизации *in situ*

Дигоксигенин (digoxigenin, dig)-меченные антисмысловые РНК (dig-асРНК) были получены в результате транскрипции *in vitro* с использованием 10x смеси рибонуклеотидов (3,5мМ dig-UTP, 6,5мМ UTP, 10мМ ATP, 10мМ GTP, 10мМ CTP) (Boehringer Mannheim, Enzo) и SP6 или T7 РНК-полимераз (Promega) в соответствии с рекомендациями производителей. В качестве матрицы использовали продукт ПЦР реакции или линейаризованную плазмидную ДНК, имеющие промотер для SP6 или T7 полимераз.

Состав реакционной смеси: плазмидная ДНК (1 мкг) или ПЦР-продукт (200нг); dig-смесь рибонуклеотидов (1x); DTT (10 mM); РНАзин (25 ед.); буфер, оптимальный для работы полимераз

(1x); T7 или SP6 полимеразы (10 ед.) (суммарный объем реакции составлял 20 мкл). Тщательно перемешивали и инкубировали 2 ч. при 37°C. Добавляли фермент ДНКазу (10 ед.) и инкубировали 15 мин. при 37°C. Далее dig-асРНК очищали набором RNeasy mini kit (Qiagen), определяли концентрацию на спектрофотометре и хранили при -20°C. Для приготовления гибридационной пробы 1 мкг dig-асРНК растворяли в 1 мл РН-буфера.

#### *5.2.25. Экстракция тотальной РНК из зародышей шпорцевой лягушки*

Экстракцию тотальной РНК проводили с использованием методик (Chomczynski and Sacchi 1987, Belyavsky, Vinogradova et al. 1989).

Зародышей шпорцевой лягушки культивировали в 0,1x MMR до нужной стадии. Полученные зародыши лизировали пипетированием в гуанидиновом лизис-буфере (10 мкл на зародыш), затем добавляли 1/10 объема 2M ацетата натрия (рН-4,4) и перемешивали. Проводили экстракцию РНК смесью фенол (рН-4,5)/хлороформ (1/1). ЦФ 5 мин. при 10 тыс. об/мин при 4 °С. Отбирали водную фазу, добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и ЦФ при тех же условиях. РНК осаждали из отобранной водной фазы добавлением 3 объемов этанола 96%. ЦФ 10 мин. при 14 тыс. об/мин, осадок промывали 70% этанолом и растворяли в воде с добавлением ингибитора РНКаз. Концентрацию выделенной РНК измеряли на спектрофотометре.

#### *5.2.26. Экстракция тотальной РНК из куриных зародышей*

Экстракцию тотальной РНК проводили с использованием методики (Zaraisky, Lukyanov et al. 1992) с модификациями.

Куриные яйца инкубировали в течение 72 часов в термостате при температуре 38°C с соблюдением режима влажности. После инкубации яйца осторожно разбивали (5 зародышей на точку), поверхность желтка очищали от белка полосками из фильтровальной бумаги, зародышевые диски отделялись на бумажных кольцах и отмывались от желтка в РТW ( $t \approx 37^\circ\text{C}$ ). Затем зародыши вырезались из бумажных дисков, перемещались в пробирку, содержащую 600 мкл ледяного лизирующего буфера, гомогенизировались пипетированием. В лизат при комнатной температуре добавляли 3 мкл DNase-free RNase. Инкубировали в течение 60 минут при 37°C. Охлаждали препарат до комнатной температуры. Добавляли 200 мкл раствора ацетата калия и перемешивали содержимое пробирки в течение 20 секунд. Осаждали преципитированный комплекс белок/SDS центрифугированием на максимальной скорости в течение 3 минут при 4°C в микроцентрифуге. Комплекс был виден как осадок на дне пробирки. Переносили супернатант в чистую пробирку, содержащую 600 мкл изопропанола. Хорошо перемешивали раствор, а затем отделяли преципитат ДНК при помощи центрифугирования в микроцентрифуге на максимальной скорости в течение 1

мин. при КТ. Семплером осторожно удаляли супернатант и добавляли 600 мкл 70% этанола для осаждения ДНК. Встряхивали пробирку несколько раз и центрифугировали в микроцентрифуге на максимальной скорости в течение 1 минуты при комнатной температуре. Семплером осторожно отделяли супернатант и высушивали осадок ДНК на воздухе в течение 15 мин. Растворяли осадок ДНК в 100  $\mu$ l TE (pH 7.6). Хранили в морозильной камере при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.2.27. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция.

Для синтеза комплементарной ДНК на матрице выделенной РНК использовали реакцию обратной транскрипции в соответствии с рекомендациями производителя ревертазы (Promega).

Для синтеза первой цепи кДНК в пробирке смешивали тотальную РНК (0,5-1 мкг) и олиго(dT)<sub>18</sub>-праймер (20-50 пмоль), доводили объем добавлением воды до 12 мкл и инкубировали при  $70^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали на льду и добавляли буфер для М-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) ревертазы (1x), смесь дезоксинуклеотидов (0,5мМ), РНАзин (25ед) и фермент М-MuLV обратную транскриптазу (ревертазу) (10-15 ед.) (суммарный объем реакции составлял 20 мкл), перемешивали и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение часа. Останавливали реакцию прогреванием 15 мин. при  $70^{\circ}\text{C}$ . Синтезированные образцы кДНК хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для контроля экспрессии различных генов на разных стадиях развития шпорцевой лягушки синтезированные образцы первой цепи кДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР (26 циклов). Последовательности праймеров приведены в разд. 6.2.24 В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена фактора элонгации EF-1 $\alpha$ , который оценивали в реакции ПЦР (17 циклов). Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для контроля экспрессии различных генов на разных стадиях развития шпорцевой лягушки синтезированные образцы первой цепи кДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР в реальном времени (40 циклов) на приборе АНК-32 (Синтол) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Последовательности праймеров приведены ниже:

NP 001087841.1 *Xenopus laevis* Axin2

прямой: CCGCCGCTGTCGCATAA;

обратный: CAGGTGGACGCAAAGAAGT.

Длина ампликона: 124 bp

NM 001085719.1 *Xenopus laevis* homeobox A1 (Hoxa1a)

прямой: CCATTTCCCCATCAGCCAGT;

обратный: ATGTCCCCAGCCTTCTAACC.

Длина ампликона: 142 bp

FJ422584.1 *Xenopus laevis* homeobox protein Hoxb-1 (Hoxb1)

прямой: TCCAACACTGGACCCCAACTC;

обратный: CTTGGTGCTCCTGCCCCATAA.

Длина ампликона: 97 bp

NM 001090566.1 *Xenopus laevis* homeobox D1 (Hoxd1)

прямой: TTTATGCCAGTCGGGGGTGT;

обратный: ATCGTAATCGGGGCTGCTGT.

Длина ампликона: 150 bp

Для нормировки уровня экспрессии генов качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена фактора элонгации EF-1 $\alpha$  или орнитин-декарбоксилазы (ODC) (Xanthos, Kofron et al. 2002, Ivanova, Tereshina et al. 2013), уровни экспрессии которых в данных экспериментальных условиях не менялись. Уровень экспрессии генов рассчитывался по методу  $\Delta\Delta C_t$  по формуле  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

#### 5.2.28. Определение параметров подвижности белков по FRAP

Для оценки диффузии свободного EGFP-Noggin4 использовалась формула:

$$I_N(t) = 1 - \left( \frac{4\pi Dt}{w^2} \right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (1)$$

где  $D$  – коэффициент “истинной” фиковской диффузии,  $I_N$  – нормализованная интенсивность флюоресцентного сигнала,  $w$  – линейный размер зоны фотобличинга.

Формула (1) использовалась для оценки свободной диффузии Noggin4, однако для обладающих сайтами связывания гепарина Noggin1, Noggin2 и Wnt8 требование свободной диффузии не выполняется. Мы показали, что FRAP-кинетики в этом случае должны описываться суммой двух экспонент с двумя характерными временами: времени восстановления на основе диффузии ( $\tau_1$ ) и времени восстановления на основе адсорбции ( $\tau_2$ ).

Поэтому для оценки подвижности этих белков в межклеточном матриксе живого зародыша мы использовали формулу для эффективного коэффициентна диффузии:

$$D_E \approx \frac{w^2 \tau_{2/3}}{2}, \quad (2)$$

где  $w$  – линейный размер зоны фотобличинга,  $\tau_{2/3}$  – время восстановления флюоресценции до 2/3 от равновесного значения определялось после фитирования данных двуэкспонентой зависимостью. Для более детальной информации – см. (Eroshkin, Nesterenko et al. 2016).

### 5.2.29. Измерение люциферазной активности специфических репортеров.

Для изучения активности сигнальных каскадов нами были использованы следующие векторы: GL3-ARE-Luc (Pierreux, Nicolas et al. 2000), TOPflash (Millipore); TCFm-Luc (Hikasa, Ezan et al. 2010) и референсный pCMV- $\beta$ -GAL (50 пг каждого вектора на зародыш). Данные векторы в конечной концентрации 10 нг/мкл смешивали с синтетическими мРНК *ActivinB*, *BMP4*, *Cerberus*, *Follistatin*, *Noggin1*, *Noggin2*, *RFP*, *Smad1*, *Smad2*, *Wnt8*, *Xnr2*,  *$\beta$ -Catenin* в разных сочетаниях, а также с вектором pCMV- $\beta$ -GAL, несущим ген  $\beta$ -галактозидазы под контролем неспецифического промотора CMV (в конечной концентрации 10 нг/мкл) и с родамин-лизин декстраном в качестве трейсера (в конечной концентрации 5 мкг/мкл). Данную смесь микроинъектировали в эмбрионы на стадии 2-4 бластомеров. Объем инъекцируемого материала составлял 4–8 нл на эмбрион. На стадии ранней гаструлы (стадия 10) из эмбрионов вырезали эктодермальные эксплантаты или эксплантаты дорсальной краевой зоны. Эксплантаты культивировали в течение 8 ч, после чего их лизировали в cell culture lysis buffer (Promega) из расчета 5 мкл буфера на эксплантат. Люциферазную активность в лизатах эксплантатов измеряли с использованием Luciferase Assay System (Promega) на люминометре TD-20/20 (Turner Designs) согласно рекомендациям производителей. Уровень сигнала нормализовали по  $\beta$ -галактозидазной активности, измеренной с использованием субстрата О-нитрофенил-D-галактопиранозид в спектрофотометра для иммунологических планшетов iMark (BioRad) согласно рекомендациям производителя.

### 5.2.30. Калибровка конфокального микроскопа

Для оценки абсолютных концентраций флюоресцентных белков в межклеточном пространстве мы провели калибровку конфокального микроскопа, на котором проводились эксперименты. Для этой цели чистые стоковые растворы рекомбинантных белков EGFP и TagRFP (подарок компании Evrogen) растворялись в 0.1-кратном буфере MMR и вносились в четырех разных концентрациях в такие же чашки со стеклянным дном (MatTek, диаметр 35 мм), что использовались для экспериментов FRAP. Важно, что калибровочные кривые получены нами при разных настройках микроскопа (разные значения pinhole, line average number и т.д.). Значение плотности сигнала, полученное для чистого 0.1-кратного буфера MMR, принимали за точку отсчета. Относительную плотность сигнала измеряли в каждой точке. Репрезентативные примеры кривых, которые далее использовали для анализа концентраций *in vivo*, показаны на Рис. 27.

### 5.2.31. Конфокальная микроскопия и эксперименты FRAP

Все FRAP-эксперименты проводились на конфокальном микроскопе «Leica DM IRE 2» с использованием объектива HCX PL APO 63x objective и Ar/Kr-лазера (488 нм) для возбуждения

EGFP-меченных белков, He/Ne-лазера (543 нм) для возбуждения TagRFP-меченных белков и дихроического зеркала DD488/543. Конфокальные изображения были получены на эмбрионах *X. laevis* на стадии ранней-средней гаструлы (ст. 10-11), предварительно инъецированных на стадии 4-8 клеток синтетическими мРНК (70 пг/бластомер). Для каждого типа или комбинации исследованных белков было произведено от 20 до 30 раундов записи FRAP-данных. Каждый такой раунд проводили для индивидуальных линейных межклеточных пространств между двумя смежными эктодермальными клетками анимального полушария зародышей на стадии ранней гаструлы. Таким образом, в каждом зародыше было проанализировано от 2 до 3 разных межклеточных сегментов.

Как показали предварительные FRAP-эксперименты, выжигаемая область часто перемещалась от своей начальной позиции из-за коллективных движений клеток эктодермального пласта. Для учета этого эффекта и получения адекватных данных использовали специальный скрипт на языке Python: <http://erg.biophys.msu.ru/wordpress/archives/644>.

## 6. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность:

- коллективу Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН – в особенности Федору Ерошкину, Андрею Байрамову, Наталье Мартыновой, Галине Ермаковой, Евгению Орлову за консультативную и деятельную помощь при проведении экспериментов и обсуждении результатов;
- заведующему Лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН Андрею Георгиевичу Зарайскому за высокий профессионализм, чуткое руководство и помощь в проведении экспериментов и работе над текстом диссертации;
- м.н.с. НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Алексею Нестеренко за неоценимый вклад с подготовку текста диссертации и тесную работу при выполнении экспериментов;
- заведующему Лабораторией биофотоники ИБХ РАН д.б.н. Константину Лукьянову за плодотворное сотрудничество и любезно предоставленный доступ к микроскопическому оборудованию;
- м.н.с. Кафедры биохимии Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова Григорию Гладышеву за консультативную помощь и обсуждение;
- M. Asashima, E. De Robertis, R. Grainger, R. Harland, A. Hemmati-Brivanlou, M. Jones, S. Sokol и G. Thomsen за любезно предоставленные плазмидные конструкции.



## 7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток  
 БСА – бычий сывороточный альбумин  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
 ед. – единица активности  
 КТ – комнатная температура  
 кДа – килодальтон  
 кДНК – комплементарная ДНК  
 М.д. – морфогенетические движения  
 мин. – минута  
 мкг – микрограмм  
 мкл – микролитр  
 мл – миллилитр  
 мм – миллиметр  
 мМ – миллимоль  
 МО – морфолино олигонуклеотид  
 мРНК – матричная РНК  
 нг – нанограмм  
 НТО – нетранслируемая область  
 об/мин – обороты в минуту  
 ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, сопряженная с ПЦР  
 п.о. – пара оснований  
 ПААГ – полиакриламидный гель  
 пг/эмбр. – пикограмм на эмбрион  
 пр. – прочее  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 РНК –рибонуклеиновая кислота  
 сек. – секунда  
 ст. – стадия развития  
 тыс. – тысяча  
 ЦНС – центральная нервная система  
 ЦФ – центрифугирование  
 ч. – час  
 ЭФ – электрофорез  
 Anf – Anterior neural fold  
*E. coli* – кишечная палочка *Escherichia coli*  
 DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
 FLD – Fluorescein lysinated dextran  
 GFP – Green Fluorescent Protein, зеленый флуоресцентный белок  
 RFP – Red Fluorescent Protein, красный флуоресцентный белок  
 qRT-PCR – quantitative real-time polymerase chain reaction, количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астауров, Б. Л. (1975). Объекты биологии развития. М., Наука.
2. Adamska, M., B. T. MacDonald, Z. H. Sarmast, E. R. Oliver and M. H. Meisler (2004). "En1 and Wnt7a interact with Dkk1 during limb development in the mouse." Developmental Biology **272**(1): 134-144.
3. Ahn, Y., B. W. Sanderson, O. D. Klein and R. Krumlauf (2010). "Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning." Development **137**(19): 3221-3231.
4. Ai, M., S. L. Holmen, W. Van Hul, B. O. Williams and M. L. Warman (2005). "Reduced Affinity to and Inhibition by DKK1 Form a Common Mechanism by Which High Bone Mass-Associated Missense Mutations in LRP5 Affect Canonical Wnt Signaling." Molecular and Cellular Biology **25**(12): 4946-4955.
5. Alexandre, C., A. Baena-Lopez and J.-P. Vincent (2013). "Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless." Nature **505**(7482): 180-185.
6. Angers, S. and R. T. Moon (2009). "Proximal events in Wnt signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(7): 468-477.
7. Angers, S., A. Salahpour and M. Bouvier (2002). "Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 409-435.
8. Angers, S., C. J. Thorpe, T. L. Biechele, S. J. Goldenberg, N. Zheng, M. J. MacCoss and R. T. Moon (2006). "The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation." Nat Cell Biol **8**(4): 348-357.
9. Aulehla, A., C. Wehrle, B. Brand-Saberi, R. Kemler, A. Gossler, B. Kanzler and B. G. Herrmann (2003). "Wnt3a Plays a Major Role in the Segmentation Clock Controlling Somitogenesis." Developmental Cell **4**(3): 395-406.
10. Avsian-Kretchmer, O. and A. J. W. Hsueh (2004). "Comparative Genomic Analysis of the Eight-Membered Ring Cystine Knot-Containing Bone Morphogenetic Protein Antagonists." Molecular Endocrinology **18**(1): 1-12.
11. Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson and W. W. Webb (1976). "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics." Biophys J **16**(9): 1055-1069.
12. Bafico, A., A. Gazit, T. Pramila, P. W. Finch, A. Yaniv and S. A. Aaronson (1999). "Interaction of Frizzled Related Protein (FRP) with Wnt Ligands and the Frizzled Receptor Suggests Alternative Mechanisms for FRP Inhibition of Wnt Signaling." Journal of Biological Chemistry **274**(23): 16180-16187.
13. Bafico, A., G. Liu, A. Yaniv, A. Gazit and S. A. Aaronson (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." Nat Cell Biol **3**(7): 683-686.
14. Balemans, W. (2001). "Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST)." Human Molecular Genetics **10**(5): 537-543.
15. Balemans, W. (2002). "Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease." Journal of Medical Genetics **39**(2): 91-97.
16. Bang, A. G., N. Papalopulu, M. D. Goulding and C. Kintner (1999). "Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm." Dev Biol **212**(2): 366-380.
17. Bányai, L. and L. Patthy (1999). "The NTR module: Domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases." Protein Sci. **8**(8): 1636-1642.

18. Barker, N. and H. Clevers (2010). "Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptors as Markers of Adult Stem Cells." *Gastroenterology* **138**(5): 1681-1696.
19. Barrow, J. R., Thomas, K. R., Boussadia-Zahui, O, Moore, R, Kemler, R, Capecchi, M. R., McMahon, A. P. (2003). "Ectodermal Wnt3/beta -catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge." *Genes & Development* **17**(3): 394-409.
20. Bayramov, A. V., F. M. Eroshkin, N. Y. Martynova, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva and A. G. Zaraisky (2011). "Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling." *Development* **138**(24): 5345-5356.
21. Beckett, K., S. Monier, L. Palmer, C. Alexandre, H. Green, E. Bonneil, G. Raposo, P. Thibault, R. L. Borgne and J.-P. Vincent (2012). "Drosophila S2 Cells Secrete Wingless on Exosome-Like Vesicles but the Wingless Gradient Forms Independently of Exosomes." *Traffic* **14**(1): 82-96.
22. Belo, J. A., D. Bachiller, E. Agius, C. Kemp, A. C. Borges, S. Marques, S. Piccolo and E. M. De Robertis (2000). "Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development." *genesis* **26**(4): 265.
23. Belo, J. A., A. C. Silva, A. C. Borges, M. Filipe, M. Bento, L. Goncalves, M. Vitorino, A.-m. Salgueiro, V. Texeira, A. T. Tavares and S. Marques (2009). "Generating asymmetries in the early vertebrate embryo: the role of the Cerberus-like family." *Int. J. Dev. Biol.* **53**(8-9-10): 1399-1407.
24. Belyavsky, A., T. Vinogradova and K. Rajewsky (1989). "PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells." *Nucleic Acids Res* **17**(8): 2919-2932.
25. Berger, W. (1998). "Molecular Dissection of Norrie Disease." *Acta Anatomica* **162**(2-3): 95-100.
26. Bhanot, P., M. Brink, C. H. Samos, J.-C. Hsieh, Y. Wang, J. P. Macke, D. Andrew, J. Nathans and R. Nusse (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." *Nature* **382**(6588): 225-230.
27. Bhanot, P., M. Brink, C. H. Samos, J. C. Hsieh, Y. Wang, J. P. Macke, D. Andrew, J. Nathans and R. Nusse (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." *Nature* **382**(6588): 225-230.
28. Bhat, R. A., B. Stauffer, B. S. Komm and P. V. N. Bodine (2007). "Structure-Function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function." *Journal of Cellular Biochemistry* **102**(6): 1519-1528.
29. Bilic, J., Y. L. Huang, G. Davidson, T. Zimmermann, C. M. Cruciat, M. Bienz and C. Niehrs (2007). "Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation." *Science* **316**(5831): 1619-1622.
30. Binnerts, M. E., K. A. Kim, J. M. Bright, S. M. Patel, K. Tran, M. Zhou, J. M. Leung, Y. Liu, W. E. Lomas, M. Dixon, S. A. Hazell, M. Wagle, W. S. Nie, N. Tomasevic, J. Williams, X. Zhan, M. D. Levy, W. D. Funk and A. Abo (2007). "R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(37): 14700-14705.
31. Bischoff, M., A.-C. Gradilla, I. Seijo, G. Andrés, C. Rodríguez-Navas, L. González-Méndez and I. Guerrero (2013). "Cytosomes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in Drosophila epithelia." *Nature Cell Biology* **15**(11): 1269-1281.
32. Bjarnadottir, T. K., D. E. Gloriam, S. H. Hellstrand, H. Kristiansson, R. Fredriksson and H. B. Schioth (2006). "Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse." *Genomics* **88**(3): 263-273.
33. Blish, K. R., W. Wang, M. C. Willingham, W. Du, C. E. Birse, S. R. Krishnan, J. C. Brown, G. A. Hawkins, A. J. Garvin, R. B. D'Agostino, Jr., F. M. Torti and S. V. Torti (2008). "A human bone

- morphogenetic protein antagonist is down-regulated in renal cancer." *Mol Biol Cell* **19**(2): 457-464.
34. Bökel, C. and M. Brand (2013). "Generation and interpretation of FGF morphogen gradients in vertebrates." *Current Opinion in Genetics & Development* **23**(4): 415-422.
  35. Bonkowski, J. L., S. Yoshikawa, D. D. O'Keefe, A. L. Scully and J. B. Thomas (1999). "Axon routing across the midline controlled by the Drosophila Derailed receptor." *Nature* **402**(6761): 540-544.
  36. Borodulin, A. V., F. M. Eroshkin, A. V. Bayramov and A. G. Zaraisky (2012). "Noggin4 expression during chick embryonic development." *Int J Dev Biol* **56**(5): 403-406.
  37. Bouwmeester, T., S.-H. Kim, Y. Sasai, B. Lu and E. M. D. Robertis (1996). "Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer." *Nature* **382**(6592): 595-601.
  38. Bovolenta, P., P. Esteve, J. M. Ruiz, E. Cisneros and J. Lopez-Rios (2008). "Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease." *Journal of Cell Science* **121**(6): 737-746.
  39. Boyden, L. M., J. Mao, J. Belsky, L. Mitzner, A. Farhi, M. A. Mitnick, D. Wu, K. Insogna and R. P. Lifton (2002). "High Bone Density Due to a Mutation in LDL-Receptor-Related Protein 5." *New England Journal of Medicine* **346**(20): 1513-1521.
  40. Bradley, L., B. Sun, L. Collins-Racie, E. LaVallie, J. McCoy and H. Sive (2000). "Different Activities of the Frizzled-Related Proteins frzb2 and sizzled2 during Xenopus Anteroposterior Patterning." *Developmental Biology* **227**(1): 118-132.
  41. Brott, B. K. and S. Y. Sokol (2002). "Regulation of Wnt/LRP Signaling by Distinct Domains of Dickkopf Proteins." *Molecular and Cellular Biology* **22**(17): 6100-6110.
  42. Brunkow, M. E., J. C. Gardner, J. Van Ness, B. W. Paepers, B. R. Kovacevich, S. Proll, J. E. Skonier, L. Zhao, P. J. Sabo, Y.-H. Fu, R. S. Alisch, L. Gillett, T. Colbert, P. Tacconi, D. Galas, H. Hamersma, P. Beighton and J. T. Mulligan (2001). "Bone Dysplasia Sclerosteosis Results from Loss of the SOST Gene Product, a Novel Cystine Knot-Containing Protein." *The American Journal of Human Genetics* **68**(3): 577-589.
  43. Carmon, K. S., X. Gong, Q. Lin, A. Thomas and Q. Liu (2011). "R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ -catenin signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(28): 11452-11457.
  44. Chamoun, Z. (2001). "Skinny Hedgehog, an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal." *Science* **293**(5537): 2080-2084.
  45. Chapman, S. C., R. Brown, L. Lees, G. C. Schoenwolf and A. Lumsden (2004). "Expression analysis of chick Wnt and frizzled genes and selected inhibitors in early chick patterning." *Dev. Dyn.* **229**(3): 668-676.
  46. Chen, G., J. Fernandez, S. Mische and A. J. Courey (1999). "A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in Drosophila development." *Genes & Development* **13**(17): 2218-2230.
  47. Chen, J. Z., S. Wang, R. Tang, Q. S. Yang, E. Zhao, Y. Chao, K. Ying, Y. Xie and Y. M. Mao (2002). "Cloning and identification of a cDNA that encodes a novel human protein with thrombospondin type I repeat domain, hPWTSR." *Mol Biol Rep* **29**(3): 287-292.
  48. Chen, Z. Y., E. M. Battinelli, A. Fielder, S. Bunday, K. Sims, X. O. Breakefield and I. W. Craig (1993). "A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy." *Nature Genetics* **5**(2): 180-183.
  49. Chen, Z. Y., R. W. Hendriks, M. A. Jobling, J. F. Powell, X. O. Breakefield, K. B. Sims and I. W. Craig (1992). "Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease." *Nature Genetics* **1**(3): 204-208.

50. Chenn, A. (2002). "Regulation of Cerebral Cortical Size by Control of Cell Cycle Exit in Neural Precursors." *Science* **297**(5580): 365-369.
51. Chien, A. J., W. H. Conrad and R. T. Moon (2009). "A Wnt Survival Guide: From Flies to Human Disease." *Journal of Investigative Dermatology* **129**(7): 1614-1627.
52. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
53. Chong, J. M., A. Uren, J. S. Rubin and D. W. Speicher (2001). "Disulfide Bond Assignments of Secreted Frizzled-related Protein-1 Provide Insights about Frizzled Homology and Netrin Modules." *Journal of Biological Chemistry* **277**(7): 5134-5144.
54. Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* **127**(3): 469-480.
55. Cohen, M., M. Georgiou, N. L. Stevenson, M. Miodownik and B. Baum (2010). "Dynamic Filopodia Transmit Intermittent Delta-Notch Signaling to Drive Pattern Refinement during Lateral Inhibition." *Developmental Cell* **19**(1): 78-89.
56. Collette, N. M., D. C. Genetos, D. Muruges, R. M. Harland and G. G. Loots (2010). "Genetic evidence that SOST inhibits WNT signaling in the limb." *Developmental Biology* **342**(2): 169-179.
57. Coombs, G. S., J. Yu, C. A. Canning, C. A. Veltri, T. M. Covey, J. K. Cheong, V. Utomo, N. Banerjee, Z. H. Zhang, R. C. Jadulco, G. P. Concepcion, T. S. Bugni, M. K. Harper, I. Mihalek, C. M. Jones, C. M. Ireland and D. M. Virshup (2010). "WLS-dependent secretion of WNT3A requires Ser209 acylation and vacuolar acidification." *Journal of Cell Science* **123**(19): 3357-3367.
58. Cruciat, C. M. and C. Niehrs (2013). "Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(3): a015081.
59. Cselenyi, C. S. and E. Lee (2008). "Context-Dependent Activation or Inhibition of Wnt- - Catenin Signaling by Kremen." *Science Signaling* **1**(8): pe10-pe10.
60. Dabdoub, A. (2003). "Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea." *Development* **130**(11): 2375-2384.
61. Dann, C. E., J. C. Hsieh, A. Rattner, D. Sharma, J. Nathans and D. J. Leahy (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." *Nature* **412**(6842): 86-90.
62. Davidson, G. (2002). "Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning." *Development* **129**(24): 5587-5596.
63. Davidson, G., W. Wu, J. Shen, J. Bilic, U. Fenger, P. Stannek, A. Glinka and C. Niehrs (2005). "Casein kinase 1  $\gamma$  couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction." *Nature* **438**(7069): 867-872.
64. de Joussineau, C., J. Soulé, M. Martin, C. Anguille, P. Montcourrier and D. Alexandre (2003). "Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in *Drosophila*." *Nature* **426**(6966): 555-559.
65. de Lau, W., N. Barker, T. Y. Low, B.-K. Koo, V. S. W. Li, H. Teunissen, P. Kujala, A. Haegebarth, P. J. Peters, M. van de Wetering, D. E. Stange, J. van Es, D. Guardavaccaro, R. B. M. Schasfoort, Y. Mohri, K. Nishimori, S. Mohammed, A. J. R. Heck and H. Clevers (2011). "Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling." *Nature* **476**(7360): 293-297.
66. De Robertis, E. M. and H. Kuroda (2004). "Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 285-308.
67. Dejmek, J., A. Safholm, C. Kamp Nielsen, T. Andersson and K. Leandersson (2006). "Wnt-5a/Ca<sup>2+</sup>-Induced NFAT Activity Is Counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-Casein Kinase 1 Signaling in Human Mammary Epithelial Cells." *Molecular and Cellular Biology* **26**(16): 6024-6036.

68. del Barco Barrantes, I. (2003). "Dkk1 and noggin cooperate in mammalian head induction." Genes & Development **17**(18): 2239-2244.
69. Dennis, S., M. Aikawa, W. Szeto, P. A. d'Amore and J. Papkoff (1999). "A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling." J Cell Sci **112 ( Pt 21)**: 3815-3820.
70. Diep, D. B., N. Hoen, M. Backman, O. Machon and S. Krauss (2004). "Characterisation of the Wnt antagonists and their response to conditionally activated Wnt signalling in the developing mouse forebrain." Developmental Brain Research **153**(2): 261-270.
71. Dissanayake, S. K., M. Wade, C. E. Johnson, M. P. O'Connell, P. D. Leotlela, A. D. French, K. V. Shah, K. J. Hewitt, D. T. Rosenthal, F. E. Indig, Y. Jiang, B. J. Nickoloff, D. D. Taub, J. M. Trent, R. T. Moon, M. Bittner and A. T. Weeraratna (2007). "The Wnt5A/Protein Kinase C Pathway Mediates Motility in Melanoma Cells via the Inhibition of Metastasis Suppressors and Initiation of an Epithelial to Mesenchymal Transition." Journal of Biological Chemistry **282**(23): 17259-17271.
72. Dorsky, R. I. (2003). "Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain." Development **130**(9): 1937-1947.
73. Driever, W. and C. Nüsslein-Volhard (1988). "The bicoid protein determines position in the Drosophila embryo in a concentration-dependent manner." Cell **54**(1): 95-104.
74. Ellies, D. L., B. Viviano, J. McCarthy, J.-P. Rey, N. Itasaki, S. Saunders and R. Krumlauf (2006). "Bone Density Ligand, Sclerostin, Directly Interacts With LRP5 but Not LRP5G171V to Modulate Wnt Activity." J Bone Miner Res **21**(11): 1738-1749.
75. Ellwanger, K., H. Saito, P. Clement-Lacroix, N. Maltry, J. Niedermeyer, W. K. Lee, R. Baron, G. Rawadi, H. Westphal and C. Niehrs (2008). "Targeted Disruption of the Wnt Regulator Kremen Induces Limb Defects and High Bone Density." Molecular and Cellular Biology **28**(15): 4875-4882.
76. Elston, M. S. and R. J. Clifton-Bligh (2010). "Identification of Wnt family inhibitors: A pituitary tumor directed whole genome approach." Molecular and Cellular Endocrinology **326**(1-2): 48-54.
77. Ermakova, G. V., E. A. Solovieva, N. Y. Martynova and A. G. Zaraisky (2007). "The homeodomain factor Xanf represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions." Dev Biol **307**(2): 483-497.
78. Eroshkin, F. M., G. V. Ermakova, A. V. Bayramov and A. G. Zaraisky (2006). "Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of noggin2 and noggin4 in *Xenopus laevis*." Gene Expr Patterns **6**(2): 180-186.
79. Eroshkin, F. M., A. M. Nesterenko, A. V. Borodulin, N. Y. Martynova, G. V. Ermakova, F. K. Gyoeva, E. E. Orlov, A. A. Belogurov, K. A. Lukyanov, A. V. Bayramov and A. G. Zaraisky (2016). "Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*." Sci Rep **6**: 23049.
80. Esteve, P. and P. Bovolenta (2010). "The Advantages and Disadvantages of Sfrp1 and Sfrp2 Expression in Pathological Events." Tohoku J. Exp. Med. **221**(1): 11-17.
81. Esteve, P., A. Sandonìs, M. Cardozo, J. Malapeira, C. Ibañez, I. Crespo, S. Marcos, S. Gonzalez-Garcia, M. L. Toribio, J. Arribas, A. Shimono, I. Guerrero and P. Bovolenta (2011). "SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis." Nature Neuroscience **14**(5): 562-569.
82. Fedders, H., R. Augustin and T. C. G. Bosch (2004). "A Dickkopf - 3 -related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan *Hydra*." Development Genes and Evolution **214**(2): 72-80.
83. Fedi, P., A. Bafico, A. Nieto Soria, W. H. Burgess, T. Miki, D. P. Bottaro, M. H. Kraus and S. A. Aaronson (1999). "Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1

- homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling." *J Biol Chem* **274**(27): 19465-19472.
84. Finch, P. W., X. He, M. J. Kelley, A. Uren, R. P. Schaudies, N. C. Popescu, S. Rudikoff, S. A. Aaronson, H. E. Varmus and J. S. Rubin (1997). "Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6770-6775.
  85. Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). "Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins." *Endocrine Reviews* **23**(6): 824-854.
  86. Fjeld, K., P. i. Kettunen, T. Furmanek, I. H. Kvinnsland and K. Luukko (2005). "Dynamic expression of Wnt signaling-related Dickkopf1, -2, and -3 mRNAs in the developing mouse tooth." *Dev. Dyn.* **233**(1): 161-166.
  87. Forrester, W. C. (2004). "The Caenorhabditis elegans Ror RTK CAM-1 Inhibits EGL-20/Wnt Signaling in Cell Migration." *Genetics* **168**(4): 1951-1962.
  88. Furushima, K., A. Yamamoto, T. Nagano, M. Shibata, H. Miyachi, T. Abe, N. Ohshima, H. Kiyonari and S. Aizawa (2007). "Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings." *Developmental Biology* **306**(2): 480-492.
  89. Galli, L. M., T. Barnes, T. Cheng, L. Acosta, A. Anglade, K. Willert, R. Nusse and L. W. Burrus (2006). "Differential inhibition of Wnt-3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3." *Dev Dyn* **235**(3): 681-690.
  90. Glinka, A., C. Dolde, N. Kirsch, Y.-L. Huang, O. Kazanskaya, D. Ingelfinger, M. Boutros, C.-M. Cruciat and C. Niehrs (2011). "LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling." *EMBO Rep* **12**(10): 1055-1061.
  91. Glinka, A., W. Wu, H. Delius, A. P. Monaghan, C. Blumenstock and C. Niehrs (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." *Nature* **391**(6665): 357-362.
  92. Glinka, A., W. Wu, D. Onichtchouk, C. Blumenstock and C. Niehrs (1997). "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." *Nature* **389**(6650): 517-519.
  93. Gong, Y., R. B. Slee, N. Fukai, G. Rawadi, S. Roman-Roman, A. M. Reginato, H. Wang, T. Cundy, F. H. Glorieux, D. Lev, M. Zacharin, K. Oexle, J. Marcelino, W. Suwairi, S. Heeger, G. Sabatakos, S. Apte, W. N. Adkins, J. Allgrove, M. Arslan-Kirchner, J. A. Batch, P. Beighton, G. C. M. Black, R. G. Boles, L. M. Boon, C. Borrone, H. G. Brunner, G. F. Carle, B. Dallapiccola, A. De Paepe, B. Floege, M. L. Halfhide, B. Hall, R. C. Hennekam, T. Hirose, A. Jans, H. Jüppner, C. A. Kim, K. Keppler-Noreuil, A. Kohlschuetter, D. LaCombe, M. Lambert, E. Lemyre, T. Letteboer, L. Peltonen, R. S. Ramesar, M. Romanengo, H. Somer, E. Steichen-Gersdorf, B. Steinmann, B. Sullivan, A. Superti-Furga, W. Swoboda, M.-J. van den Boogaard, W. Van Hul, M. Vikkula, M. Votruba, B. Zabel, T. Garcia, R. Baron, B. R. Olsen and M. L. Warman (2001). "LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development." *Cell* **107**(4): 513-523.
  94. Gordon, A., L. Southam, J. Loughlin, A. G. Wilson, I. Stockley, A. J. Hamer, R. Eastell and J. M. Wilkinson (2007). "Variation in the secreted frizzled-related protein-3 gene and risk of Osteolysis and heterotopic ossification after total hip arthroplasty." *Journal of Orthopaedic Research* **25**(12): 1665-1670.
  95. Gorny, A.-K., L. T. Kaufmann, R. K. Swain and H. Steinbeisser (2013). "A secreted splice variant of the Xenopus frizzled-4 receptor is a biphasic modulator of Wnt signalling." *Cell Communication and Signaling* **11**(1): 89.
  96. Greco, V., M. Hannus and S. Eaton (2001). "Argosomes." *Cell* **106**(5): 633-645.
  97. Green, D., A. E. Whitener, S. Mohanty and A. C. Lekven (2014). "Vertebrate nervous system posteriorization: Grading the function of Wnt signaling." *Dev. Dyn.* **244**(3): 507-512.

98. Groppe, J., J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A. N. Economides, W. Kwiatkowski, M. Affolter, W. W. Vale, J. C. I. Belmonte and S. Choe (2002). "Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin." *Nature* **420**(6916): 636-642.
99. Gross, J. C. and M. Boutros (2013). "Secretion and extracellular space travel of Wnt proteins." *Current Opinion in Genetics & Development* **23**(4): 385-390.
100. Gross, J. C., V. Chaudhary, K. Bartscherer and M. Boutros (2012). "Active Wnt proteins are secreted on exosomes." *Nature Cell Biology* **14**(10): 1036-1045.
101. Grotewold, L. (2002). "The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death." *The EMBO Journal* **21**(5): 966-975.
102. Grotewold, L., T. Theil and U. R  ther (1999). "Expression pattern of Dkk-1 during mouse limb development." *Mechanisms of Development* **89**(1-2): 151-153.
103. Guder, C. (2006). "An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra." *Development* **133**(5): 901-911.
104. Guidato, S. and N. Itasaki (2007). "Wnt retained in the endoplasmic reticulum inhibits Wnt signaling by reducing cell surface LRP6." *Developmental Biology* **310**(2): 250-263.
105. Guo, N., C. Hawkins and J. Nathans (2004). "From The Cover: Frizzled6 controls hair patterning in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**(25): 9277-9281.
106. Gurdon, J. B. and P. Y. Bourillot (2001). "Morphogen gradient interpretation." *Nature* **413**(6858): 797-803.
107. Hackam, A. (2005). "The Wnt Signaling Pathway in Retinal Degenerations." *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* **57**(6): 381-388.
108. Hagemann, A. I. H., J. Kurz, S. Kauffeld, Q. Chen, P. M. Reeves, S. Weber, S. Schindler, G. Davidson, T. Kirchhausen and S. Scholpp (2014). "In vivo analysis of formation and endocytosis of the Wnt/ -Catenin signaling complex in zebrafish embryos." *Journal of Cell Science* **127**(18): 3970-3982.
109. Han, C. (2005). "Drosophila glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc." *Development* **132**(4): 667-679.
110. Hao, H.-X., Y. Xie, Y. Zhang, O. Charlat, E. Oster, M. Avello, H. Lei, C. Mickanin, D. Liu, H. Ruffner, X. Mao, Q. Ma, R. Zamponi, T. Bouwmeester, P. M. Finan, M. W. Kirschner, J. A. Porter, F. C. Serluca and F. Cong (2012). "ZNRFB3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner." *Nature* **485**(7397): 195-200.
111. Harland, R. M. (1991). "In situ hybridization: an improved whole-mount method for Xenopus embryos." *Methods Cell Biol* **36**: 685-695.
112. Hashimoto, H. (2004). "The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish." *Development* **131**(8): 1741-1753.
113. Hashimoto, H., M. Itoh, Y. Yamanaka, S. Yamashita, T. Shimizu, L. Solnica-Krezel, M. Hibi and T. Hirano (2000). "Zebrafish Dkk1 Functions in Forebrain Specification and Axial Mesendoderm Formation." *Developmental Biology* **217**(1): 138-152.
114. H  usler, K. D., N. J. Horwood, Y. Chuman, J. L. Fisher, J. Ellis, T. J. Martin, J. S. Rubin and M. T. Gillespie (2004). "Secreted Frizzled-Related Protein-1 Inhibits RANKL-Dependent Osteoclast Formation." *J Bone Miner Res* **19**(11): 1873-1881.
115. Hedge, T. A. and I. Mason (2008). "Expression of Shisa2, a modulator of both Wnt and Fgf signaling, in the chick embryo." *Int. J. Dev. Biol.* **52**(1): 81-85.
116. Heisenberg, C.-P., M. Tada, G.-J. Rauch, L. Saúde, M. L. Concha, R. Geisler, D. L. Stemple, J. C. Smith and S. W. Wilson (2000). "Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation." *Nature* **405**(6782): 76-81.
117. Hikasa, H., J. Ezan, K. Itoh, X. Li, M. W. Klymkowsky and S. Y. Sokol (2010). "Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification." *Dev Cell* **19**(4): 521-532.



118. Hikasa, H., M. Shibata, I. Hiratani and M. Taira (2002). "The Xenopus receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling." *Development* **129**(22): 5227-5239.
119. Ho, H.-Y. H., R. Rohatgi, A. M. Lebensohn, M. Le, J. Li, S. P. Gygi and M. W. Kirschner (2004). "Toca-1 Mediates Cdc42-Dependent Actin Nucleation by Activating the N-WASP-WIP Complex." *Cell* **118**(2): 203-216.
120. Hoang, B., M. Moos, Jr., S. Vukicevic and F. P. Luyten (1996). "Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis." *J Biol Chem* **271**(42): 26131-26137.
121. Hofmann, K. (2000). "A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling." *Trends in Biochemical Sciences* **25**(3): 111-112.
122. Holzer, T., K. Liffers, K. Rahm, B. Trageser, S. Özbek and D. Gradl (2012). "Live imaging of active fluorophore labelled Wnt proteins." *FEBS Letters* **586**(11): 1638-1644.
123. Houart, C., L. Caneparo, C.-P. Heisenberg, K. A. Barth, M. Take-Uchi and S. W. Wilson (2002). "Establishment of the Telencephalon during Gastrulation by Local Antagonism of Wnt Signaling." *Neuron* **35**(2): 255-265.
124. Hovens, C. M., S. A. Stacker, A. C. Andres, A. G. Harpur, A. Ziemiecki and A. F. Wilks (1992). "RYK, a receptor tyrosine kinase-related molecule with unusual kinase domain motifs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**(24): 11818-11822.
125. Hsieh, J. C., A. Rattner, P. M. Smallwood and J. Nathans (1999). "Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3546-3551.
126. Hsiung, F., F.-A. Ramirez-Weber, D. David Iwaki and T. B. Kornberg (2005). "Dependence of Drosophila wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic." *Nature* **437**(7058): 560-563.
127. Hu, Y.-A., X. Gu, J. Liu, Y. Yang, Y. Yan and C. Zhao (2008). "Expression pattern of Wnt inhibitor factor 1(Wif1) during the development in mouse CNS." *Gene Expression Patterns* **8**(7-8): 515-522.
128. Huang, H. and T. B. Kornberg (2015). "Myoblast cytonemes mediate Wg signaling from the wing imaginal disc and Delta-Notch signaling to the air sac primordium." *eLife* **4**.
129. Hunter, D. D., M. Zhang, J. W. Ferguson, M. Koch and W. J. Brunken (2004). "The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate, retinal development." *Molecular and Cellular Neuroscience* **27**(4): 477-488.
130. Idkowiak, J., G. Weisheit, J. Plitzner and C. Viebahn (2004). "Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo." *Development Genes and Evolution* **214**(12): 591-605.
131. Ikeya, M., S. M. Lee, J. E. Johnson, A. P. McMahon and S. Takada (1997). "Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors." *Nature* **389**(6654): 966-970.
132. Inomata, H., T. Shibata, T. Haraguchi and Y. Sasai (2013). "Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals." *Cell* **153**(6): 1296-1311.
133. Inoue, T., H. S. Oz, D. Wiland, S. Gharib, R. Deshpande, R. J. Hill, W. S. Katz and P. W. Sternberg (2004). "C. elegans LIN-18 Is a Ryk Ortholog and Functions in Parallel to LIN-17/Frizzled in Wnt Signaling." *Cell* **118**(6): 795-806.
134. Ishitani, T., S. Kishida, J. Hyodo-Miura, N. Ueno, J. Yasuda, M. Waterman, H. Shibuya, R. T. Moon, J. Ninomiya-Tsuji and K. Matsumoto (2003). "The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a/Ca<sup>2+</sup> Pathway To Antagonize Wnt/ - Catenin Signaling." *Molecular and Cellular Biology* **23**(1): 131-139.
135. Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, S. Nagai, M. Nishita, M. Meneghini, N. Barker, M. Waterman, B. Bowerman, H. Clevers, H. Shibuya and K. Matsumoto (1999). "The TAK1-NLK-MAPK-related

- pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF." *Nature* **399**(6738): 798-802.
136. Itasaki, N. (2003). "Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling." *Development* **130**(18): 4295-4305.
  137. Itoh, K., J. Jacob and Y. S. S (1998). "A role for Xenopus Frizzled 8 in dorsal development." *Mech Dev* **74**(1-2): 145-157.
  138. Ivanova, A. S., M. B. Tereshina, G. V. Ermakova, V. V. Belousov and A. G. Zaraisky (2013). "Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles." *Sci Rep* **3**: 1279.
  139. Jacquemet, G., H. Hamidi and J. Ivaska (2015). "Corrigendum to "Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion" [Curr. Opin. Cell Biol. 36 (2015) 23–31]." *Current Opinion in Cell Biology* **37**: 119.
  140. Janda, C. Y., D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas and K. C. Garcia (2012). "Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled." *Science* **337**(6090): 59-64.
  141. Jones, S. E. and C. Jomary (2002). "Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns." *Bioessays* **24**(9): 811-820.
  142. Jukkola, T., N. Sinjushina and J. Partanen (2004). "Drapc1 expression during mouse embryonic development." *Gene Expression Patterns* **4**(6): 755-762.
  143. Junge, H. J., S. Yang, J. B. Burton, K. Paes, X. Shu, D. M. French, M. Costa, D. S. Rice and W. Ye (2009). "TSPAN12 Regulates Retinal Vascular Development by Promoting Norrin- but Not Wnt-Induced FZD4/ $\beta$ -Catenin Signaling." *Cell* **139**(2): 299-311.
  144. Kadowaki, T., E. Wilder, J. Klingensmith, K. Zachary and N. Perrimon (1996). "The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing." *Genes & Development* **10**(24): 3116-3128.
  145. Kagermeier-Schenk, B., D. Wehner, G. Özhan-Kizil, H. Yamamoto, J. Li, K. Kirchner, C. Hoffmann, P. Stern, A. Kikuchi, A. Schambony and G. Weidinger (2011). "Wnt1/5T4 Inhibits Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Activates Noncanonical Wnt Pathways by Modifying LRP6 Subcellular Localization." *Developmental Cell* **21**(6): 1129-1143.
  146. Kamata, T., K.-i. Katsube, M. Michikawa, M. Yamada, S. Takada and H. Mizusawa (2004). "R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1676**(1): 51-62.
  147. Kaneko, K. J. (2000). "Soggy, a spermatocyte-specific gene, lies 3.8 kb upstream of and antipodal to TEAD-2, a transcription factor expressed at the beginning of mouse development." *Nucleic Acids Research* **28**(20): 3982-3990.
  148. Kansara, M., M. Tsang, L. Kodjabachian, N. A. Sims, M. K. Trivett, M. Ehrich, A. Dobrovic, J. Slavin, P. F. M. Choong, P. J. Simmons, I. B. Dawid and D. M. Thomas (2009). "Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice." *Journal of Clinical Investigation* **119**(4): 837-851.
  149. Kao, K. R. and R. P. Elinson (1988). "The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced Xenopus laevis embryos." *Dev Biol* **127**(1): 64-77.
  150. Katanaev, V. L., R. Ponzelli, M. Sémériva and A. Tomlinson (2005). "Trimeric G Protein-Dependent Frizzled Signaling in Drosophila." *Cell* **120**(1): 111-122.
  151. Katoh, Y. and M. Katoh (2005). "Comparative genomics on Shisa orthologs." *International Journal of Molecular Medicine*.
  152. Kawano, Y. (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." *Journal of Cell Science* **116**(13): 2627-2634.

153. Kaykas, A., J. Yang-Snyder, M. Heroux, K. V. Shah, M. Bouvier and R. T. Moon (2004). "Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization." *Nat Cell Biol* **6**(1): 52-58.
154. Kazanskaya, O., A. Glinka, I. del Barco Barrantes, P. Stannek, C. Niehrs and W. Wu (2004). "R-Spondin2 Is a Secreted Activator of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Is Required for Xenopus Myogenesis." *Developmental Cell* **7**(4): 525-534.
155. Kazanskaya, O., A. Glinka and C. Niehrs (2000). "The role of Xenopus dickkopf1 in prechordal plate specification and neural patterning." *Development* **127**(22): 4981-4992.
156. Keller, P. J., A. D. Schmidt, J. Wittbrodt and E. H. K. Stelzer (2008). "Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy." *Science* **322**(5904): 1065-1069.
157. Kelly, O. G. (2004). "The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice." *Development* **131**(12): 2803-2815.
158. Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway." *Cell* **95**(7): 1017-1026.
159. Kerr, K. S., Y. Fuentes-Medel, C. Brewer, R. Barria, J. Ashley, K. C. Abruzzi, A. Sheehan, O. E. Tasdemir-Yilmaz, M. R. Freeman and V. Budnik (2014). "Glial Wingless/Wnt Regulates Glutamate Receptor Clustering and Synaptic Physiology at the Drosophila Neuromuscular Junction." *Journal of Neuroscience* **34**(8): 2910-2920.
160. Kicheva, A., T. Bollenbach, A. Ribeiro, H. P. Valle, R. Lovell-Badge, V. Episkopou and J. Briscoe (2014). "Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord." *Science* **345**(6204): 1254927.
161. Kiecker, C. and C. Niehrs (2001). "A morphogen gradient of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus." *Development* **128**(21): 4189-4201.
162. Kilian, B., H. Mansukoski, F. C. Barbosa, F. Ulrich, M. Tada and C.-P. Heisenberg (2003). "The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation." *Mechanisms of Development* **120**(4): 467-476.
163. Kim, K.-A., J. Zhao, S. Andarmani, M. Kakitani, T. Oshima, M. E. Binnerts, A. Abo, K. Tomizuka and W. D. Funk (2006). "R-Spondin Proteins: A Novel Link to  $\beta$ -catenin Activation." *Cell Cycle* **5**(1): 23-26.
164. Kim, K. A. (2005). "Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium." *Science* **309**(5738): 1256-1259.
165. Kim, K. A., M. Wagle, K. Tran, X. Zhan, M. A. Dixon, S. Liu, D. Gros, W. Korver, S. Yonkovich, N. Tomasevic, M. Binnerts and A. Abo (2008). "R-Spondin Family Members Regulate the Wnt Pathway by a Common Mechanism." *Molecular Biology of the Cell* **19**(6): 2588-2596.
166. Kimelman, D. and W. Xu (2006). " $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." *Oncogene* **25**(57): 7482-7491.
167. Kimura-Yoshida, C., H. Nakano, D. Okamura, K. Nakao, S. Yonemura, J. A. Belo, S. Aizawa, Y. Matsui and I. Matsuo (2005). "Canonical Wnt Signaling and Its Antagonist Regulate Anterior-Posterior Axis Polarization by Guiding Cell Migration in Mouse Visceral Endoderm." *Developmental Cell* **9**(5): 639-650.
168. Kirsch, T., J. Nickel and W. Sebald (2000). "BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II." *EMBO J* **19**(13): 3314-3324.
169. Kirsch, T., W. Sebald and M. K. Dreyer (2000). "Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex." *Nat Struct Biol* **7**(6): 492-496.
170. Kishida, S., H. Yamamoto, S.-i. Hino, S. Ikeda, M. Kishida and A. Kikuchi (1999). "DIX Domains of Dvl and Axin Are Necessary for Protein Interactions and Their Ability To Regulate  $\beta$ -Catenin Stability." *Molecular and Cellular Biology* **19**(6): 4414-4422.

171. Koch, C. J., R. A. Lustig, X.-Y. Yang, W. T. Jenkins, R. L. Wolf, M. Martinez-Lage, A. Desai, D. Williams and S. M. Evans (2014). "Microvesicles as a Biomarker for Tumor Progression versus Treatment Effect in Radiation/Temozolomide-Treated Glioblastoma Patients." *Translational Oncology* **7**(6): 752-758.
172. Kohn, M. J., K. J. Kaneko and M. L. DePamphilis (2005). "DkkL1 (Soggy), a Dickkopf family member, localizes to the acrosome during mammalian spermatogenesis." *Mol. Reprod. Dev.* **71**(4): 516-522.
173. Korkut, C., B. Ataman, P. Ramachandran, J. Ashley, R. Barria, N. Gherbesi and V. Budnik (2009). "Trans-Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless." *Cell* **139**(2): 393-404.
174. Kornberg, T. B. and S. Roy (2014). "Cytonemes as specialized signaling filopodia." *Development* **141**(4): 729-736.
175. Kremenevskaja, N., R. von Wasielewski, A. S. Rao, C. Schöfl, T. Andersson and G. Brabant (2005). "Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma." *Oncogene* **24**(13): 2144-2154.
176. Krishnan, V. (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." *Journal of Clinical Investigation* **116**(5): 1202-1209.
177. Krupnik, V. E., J. D. Sharp, C. Jiang, K. Robison, T. W. Chickering, L. Amaravadi, D. E. Brown, D. Guyot, G. Mays, K. Leiby, B. Chang, T. Duong, A. D. J. Goodearl, D. P. Gearing, S. Y. Sokol and S. A. McCarthy (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." *Gene* **238**(2): 301-313.
178. Kuroda, H., O. Wessely and E. M. D. Robertis (2004). "Neural Induction in *Xenopus*: Requirement for Ectodermal and Endomesodermal Signals via Chordin, Noggin,  $\beta$ -Catenin, and Cerberus." *PLoS Biology* **2**(5): e92.
179. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
180. Leaf, I., J. Tennessen, M. Mukhopadhyay, H. Westphal and W. Shawlot (2006). "Sfrp5 is not essential for axis formation in the mouse." *genesis* **44**(12): 573-578.
181. Lee, C. S., L. A. Buttitta, N. R. May, A. Kispert and C. M. Fan (2000). "SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm." *Development* **127**(1): 109-118.
182. Lee, E., A. Salic, R. Kruger, R. Heinrich and M. W. Kirschner (2003). "The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway." *PLoS Biol* **1**(1): E10.
183. Lee, H. X., A. L. Ambrosio, B. Reversade and E. M. De Robertis (2006). "Embryonic Dorsal-Ventral Signaling: Secreted Frizzled-Related Proteins as Inhibitors of Tolloid Proteinases." *Cell* **124**(1): 147-159.
184. Leyns, L., T. Bouwmeester, S.-H. Kim, S. Piccolo and E. M. De Robertis (1997). "Frzb-1 Is a Secreted Antagonist of Wnt Signaling Expressed in the Spemann Organizer." *Cell* **88**(6): 747-756.
185. Leyns, L., T. Bouwmeester, S. H. Kim, S. Piccolo and E. M. De Robertis (1997). "Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer." *Cell* **88**(6): 747-756.
186. Li, J., I. Sarosi, R. C. Cattle, J. Pretorius, F. Asuncion, M. Grisanti, S. Morony, S. Adamu, Z. Geng, W. Qiu, P. Kostenuik, D. L. Lacey, W. S. Simonet, B. Bolon, X. Qian, V. Shalhoub, M. S. Ominsky, H. Zhu Ke, X. Li and W. G. Richards (2006). "Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia." *Bone* **39**(4): 754-766.

187. Li, L., J. Mao, L. Sun, W. Liu and D. Wu (2001). "Second Cysteine-rich Domain of Dickkopf-2 Activates Canonical Wnt Signaling Pathway via LRP-6 Independently of Dishevelled." Journal of Biological Chemistry **277**(8): 5977-5981.
188. Li, L., J. Mao, L. Sun, W. Liu and D. Wu (2002). "Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled." J Biol Chem **277**(8): 5977-5981.
189. Li, S., R. Esterberg, V. Lachance, D. Ren, K. Radde-Gallwitz, F. Chi, J. L. Parent, A. Fritz and P. Chen (2011). "Rack1 is required for Vangl2 membrane localization and planar cell polarity signaling while attenuating canonical Wnt activity." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(6): 2264-2269.
190. Li, X. (2005). "Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling." Journal of Biological Chemistry **280**(20): 19883-19887.
191. Li, Y., B. Pawlik, N. Elcioglu, M. Aglan, H. Kayserili, G. Yigit, F. Percin, F. Goodman, G. Nürnberg, A. Cenani, J. Urquhart, B.-D. Chung, S. Ismail, K. Amr, A. D. Aslanger, C. Becker, C. Netzer, P. Scambler, W. Eyaid, H. Hamamy, J. Clayton-Smith, R. Hennekam, P. Nürnberg, J. Herz, S. A. Temtamy and B. Wollnik (2010). "LRP4 Mutations Alter Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Cause Limb and Kidney Malformations in Cenani-Lenz Syndrome." The American Journal of Human Genetics **86**(5): 696-706.
192. Li, Y., S. A. Rankin, D. Sinner, A. P. Kenny, P. A. Krieg and A. M. Zorn (2008). "Sfrp5 coordinates foregut specification and morphogenesis by antagonizing both canonical and noncanonical Wnt11 signaling." Genes & Development **22**(21): 3050-3063.
193. Liang, H., A. H. Coles, Z. Zhu, J. Zayas, R. Jurecic, J. Kang and S. N. Jones (2007). "Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development." The Journal of Experimental Medicine **204**(13): 3077-3084.
194. Lin, K., S. Wang, M. A. Julius, J. Kitajewski, M. Moos and F. P. Luyten (1997). "The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(21): 11196-11200.
195. Lintern, K. B., S. Guidato, A. Rowe, J. W. Saldanha and N. Itasaki (2009). "Characterization of Wise Protein and Its Molecular Mechanism to Interact with both Wnt and BMP Signals." Journal of Biological Chemistry **284**(34): 23159-23168.
196. Little, R. D., C. Folz, S. P. Manning, P. M. Swain, S.-C. Zhao, B. Eustace, M. M. Lappe, L. Spitzer, S. Zweier, K. Braunschweiger, Y. Benchekroun, X. Hu, R. Adair, L. Chee, M. G. FitzGerald, C. Tulig, A. Caruso, N. Tzellas, A. Bawa, B. Franklin, S. McGuire, X. Nogues, G. Gong, K. M. Allen, A. Anisowicz, A. J. Morales, P. T. Lomedico, S. M. Recker, P. Van Eerdewegh, R. R. Recker, J. P. Carulli, R. G. Del Mastro, J. Dupuis, M. Osborne and M. L. Johnson (2002). "A Mutation in the LDL Receptor-Related Protein 5 Gene Results in the Autosomal Dominant High-Bone-Mass Trait." The American Journal of Human Genetics **70**(1): 11-19.
197. Liu, P., M. Wakamiya, M. J. Shea, U. Albrecht, R. R. Behringer and A. Bradley (1999). "Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation." Nat Genet **22**(4): 361-365.
198. Liu, T., X. Liu, H. y. Wang, R. T. Moon and C. C. Malbon (1999). "Activation of Rat Frizzled-1 Promotes Wnt Signaling and Differentiation of Mouse F9 Teratocarcinoma Cells via Pathways That Require G q and G o Function." Journal of Biological Chemistry **274**(47): 33539-33544.
199. Liu, X., J. S. Rubin and A. R. Kimmel (2005). "Rapid, Wnt-Induced Changes in GSK3? Associations that Regulate  $\gamma$ -Catenin Stabilization Are Mediated by G? Proteins." Current Biology **15**(22): 1989-1997.
200. Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.

201. Lopez-Rios, J., P. Esteve, J. M. Ruiz and P. Bovolenta (2008). "The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate." *Neural Dev* **3**(1): 19.
202. Lu, W., V. Yamamoto, B. Ortega and D. Baltimore (2004). "Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth." *Cell* **119**(1): 97-108.
203. Luga, V. and J. L. Wrana (2013). "Tumor-Stroma Interaction: Revealing Fibroblast-Secreted Exosomes as Potent Regulators of Wnt-Planar Cell Polarity Signaling in Cancer Metastasis." *Cancer Research* **73**(23): 6843-6847.
204. Luhmann, U. F. O., J. Lin, N. Acar, S. Lammel, S. Feil, C. Grimm, M. W. Seeliger, H.-P. Hammes and W. Berger (2005). "Role of the Norrie Disease Pseudoglioma Gene in Sprouting Angiogenesis during Development of the Retinal Vasculature." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46**(9): 3372.
205. Luhmann, U. F. O., D. Meunier, W. Shi, A. Lüttges, C. Pfarrer, R. Fundele and W. Berger (2005). "Fetal loss in homozygous mutant Norrie disease mice: A new role of Norrin in reproduction." *genesis* **42**(4): 253-262.
206. Luz, M., S. Spannll-Muller, G. Ozhan, B. Kagermeier-Schenk, M. Rhinn, G. Weidinger and M. Brand (2014). "Dynamic association with donor cell filopodia and lipid-modification are essential features of Wnt8a during patterning of the zebrafish neuroectoderm." *PLoS One* **9**(1): e84922.
207. Lyu, J., V. Yamamoto and W. Lu (2008). "Cleavage of the Wnt Receptor Ryk Regulates Neuronal Differentiation during Cortical Neurogenesis." *Developmental Cell* **15**(5): 773-780.
208. Lyuksyutova, A. I. (2003). "Anterior-Posterior Guidance of Commissural Axons by Wnt-Frizzled Signaling." *Science* **302**(5652): 1984-1988.
209. Ma, L. and H.-y. Wang (2006). "Suppression of Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Is Essential to the Wnt/cGMP/Ca<sup>2+</sup> Pathway." *Journal of Biological Chemistry* **281**(41): 30990-31001.
210. MacDonald, B. T. (2004). "Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6." *Development* **131**(11): 2543-2552.
211. MacDonald, B. T., D. M. Joiner, S. M. Oyserman, P. Sharma, S. A. Goldstein, X. He and P. V. Hauschka (2007). "Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice." *Bone* **41**(3): 331-339.
212. Mao, B. and C. Niehrs (2003). "Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling." *Gene* **302**(1-2): 179-183.
213. Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li, B. M. Mechler, H. Delius, D. Hoppe, P. Stannek, C. Walter, A. Glinka and C. Niehrs (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." *Nature* **417**(6889): 664-667.
214. Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li, B. M. Mechler, H. Delius, D. Hoppe, P. Stannek, C. Walter, A. Glinka and C. Niehrs (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling." *Nature* **417**(6889): 664-667.
215. Mao, B., W. Wu, Y. Li, D. Hoppe, P. Stannek, A. Glinka and C. Niehrs (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." *Nature* **411**(6835): 321-325.
216. Mao, J., J. Wang, B. Liu, W. Pan, G. H. Farr, 3rd, C. Flynn, H. Yuan, S. Takada, D. Kimelman, L. Li and D. Wu (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." *Mol Cell* **7**(4): 801-809.
217. Marques, S. (2004). "The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis." *Genes & Development* **18**(19): 2342-2347.
218. Martynova, N. Y., F. M. Eroshkin, L. V. Ermolina, G. V. Ermakova, A. L. Korotaeva, K. M. Smurova, F. K. Gyoeva and A. G. Zaraisky (2008). "The LIM-domain protein Zyxin binds the

- homeodomain factor Xanf1/Hesx1 and modulates its activity in the anterior neural plate of *Xenopus laevis* embryo." *Dev Dyn* **237**(3): 736-749.
219. Martynova, N. Y., Nesterenko, A. M., Orlov, E. E., Eroshkin, F. M., Borodulin, A. V., Bayramov, A. V., Zarausky, A. G. (2016). "The Interaction of Secreted Proteins Noggin4 and Wnt8 from *Xenopus laevis* Embryos." *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **42**(3): 340-342.
  220. Matsuyama, M., S. Aizawa and A. Shimono (2009). "Sfrp Controls Apicobasal Polarity and Oriented Cell Division in Developing Gut Epithelium." *PLoS Genetics* **5**(3): e1000427.
  221. McMahon, A. P. and R. T. Moon (1989). "Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis." *Cell* **58**(6): 1075-1084.
  222. Meindl, A., W. Berger, T. Meitinger, D. van de Pol, H. Achatz, C. Dörner, M. Haasemann, H. Hellebrand, A. Gal, F. Cremers and H.-H. Ropers (1992). "Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins." *Nature Genetics* **2**(2): 139-143.
  223. Meitinger, T., A. Meindl, P. Bork, B. Rost, C. Sander, M. Haasemann and J. Murken (1993). "Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure." *Nature Genetics* **5**(4): 376-380.
  224. Melkonyan, H. S., W. C. Chang, J. P. Shapiro, M. Mahadevappa, P. A. Fitzpatrick, M. C. Kiefer, L. D. Tomei and S. R. Umansky (1997). "SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(25): 13636-13641.
  225. Menck, K., F. Klemm, J. C. Gross, T. Pukrop, D. Wenzel and C. Binder (2013). "Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles." *Oncotarget* **4**(11): 2057-2066.
  226. Mii, Y. and M. Taira (2009). "Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range." *Development* **136**(24): 4083-4088.
  227. Mii, Y. and M. Taira (2011). "Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: Regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins." *Development, Growth & Differentiation* **53**(8): 911-923.
  228. Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits  $\beta$ -Catenin-TCF Signaling Depending on Receptor Context." *PLoS Biology* **4**(4): e115.
  229. Monaghan, A. P., P. Kioschis, W. Wu, A. Zuniga, D. Bock, A. Poustka, H. Delius and C. Niehrs (1999). "Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages." *Mechanisms of Development* **87**(1-2): 45-56.
  230. Moon, R. T., A. D. Kohn, G. V. De Ferrari and A. Kaykas (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." *Nat Rev Genet* **5**(9): 691-701.
  231. Morvan, F., K. Boulukos, P. Clément-Lacroix, S. R. Roman, I. Suc-Royer, B. Vayssière, P. Ammann, P. Martin, S. Pinho, P. Pognonec, P. Mollat, C. Niehrs, R. Baron and G. Rawadi (2006). "Deletion of a Single Allele of the Dkk1 Gene Leads to an Increase in Bone Formation and Bone Mass." *J Bone Miner Res* **21**(6): 934-945.
  232. Mukhopadhyay, M., M. Gorivodsky, S. Shtrom, A. Grinberg, C. Niehrs, M. I. Morasso and H. Westphal (2006). "Dkk2 plays an essential role in the corneal fate of the ocular surface epithelium." *Development* **133**(12): 2447-2447.
  233. Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, C. Rodriguez-Esteban, L. Chen, T. Tsukui, L. Gomer, D. W. Dorward, A. Glinka, A. Grinberg, S.-P. Huang, C. Niehrs, J. C. I. Belmonte and H. Westphal (2001). "Dickkopf1 Is Required for Embryonic Head Induction and Limb Morphogenesis in the Mouse." *Developmental Cell* **1**(3): 423-434.
  234. Muller, P., K. W. Rogers, S. R. Yu, M. Brand and A. F. Schier (2013). "Morphogen transport." *Development* **140**(8): 1621-1638.

235. Mulligan, K. A., C. Fuerer, W. Ching, M. Fish, K. Willert and R. Nusse (2011). "Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by maintaining Wingless solubility." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(2): 370-377.
236. Nagano, T., S. Takehara, M. Takahashi, S. Aizawa and A. Yamamoto (2006). "Shisa2 promotes the maturation of somitic precursors and transition to the segmental fate in *Xenopus* embryos." *Development* **133**(23): 4643-4654.
237. Naganuma, H., K. Kono, Y. Mori, S. Takayoshi, P. L. Stern, K. Tasaka and Y. Matsumoto (2002). "Oncofetal antigen 5T4 expression as a prognostic factor in patients with gastric cancer." *Anticancer Res* **22**(2B): 1033-1038.
238. Nam, J.-S., T. J. Turcotte and J. K. Yoon (2007). "Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development." *Gene Expression Patterns* **7**(3): 306-312.
239. Nam, J. S., T. J. Turcotte, P. F. Smith, S. Choi and J. K. Yoon (2006). "Mouse Cristin/R-spondin Family Proteins Are Novel Ligands for the Frizzled 8 and LRP6 Receptors and Activate beta-Catenin-dependent Gene Expression." *Journal of Biological Chemistry* **281**(19): 13247-13257.
240. Neumann, S., D. Y. M. Coudreuse, D. R. van der Westhuyzen, E. R. M. Eckhardt, H. C. Korswagen, G. Schmitz and H. Sprong (2009). "Mammalian Wnt3a is Released on Lipoprotein Particles." *Traffic* **10**(3): 334-343.
241. Nie, X. (2005). "Dkk1, -2, and -3 expression in mouse craniofacial development." *Journal of Molecular Histology* **36**(5): 367-372.
242. Nie, X., K. Luukko, K. Fjeld, I. H. Kvinnsland and P. Kettunen (2006). "Developmental expression of Dkk1-3 and Mmp9 and apoptosis in cranial base of mice." *Journal of Molecular Histology* **36**(6-7): 419-426.
243. Niehrs, C. (2004). "Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer." *Nat Rev Genet* **5**(6): 425-434.
244. Niehrs, C. (2006). "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators." *Oncogene* **25**(57): 7469-7481.
245. Niehrs, C. (2010). "On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes." *Development* **137**(6): 845-857.
246. Niehrs, C. (2012). "The complex world of WNT receptor signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**(12): 767-779.
247. NIEUWKOOP, P. D., FABER, J. (1967). "Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis." 282.
248. Nolan, K., C. Kattamuri, D. M. Luedeke, X. Deng, A. Jagpal, F. Zhang, R. J. Linhardt, A. P. Kenny, A. M. Zorn and T. B. Thompson (2013). "Structure of protein related to Dan and Cerberus: insights into the mechanism of bone morphogenetic protein antagonism." *Structure* **21**(8): 1417-1429.
249. Noordermeer, J., J. Klingensmith and R. Nusse (1995). "Differential requirements for segment polarity genes in wingless signaling." *Mechanisms of Development* **51**(2-3): 145-155.
250. O'Shaughnessy, R. F. L., W. Yeo, J. Gautier, C. A. B. Jahoda and A. M. Christiano (2004). "The WNT Signalling Modulator, Wise, is Expressed in an Interaction-Dependent Manner During Hair-Follicle Cycling." *Journal of Investigative Dermatology* **123**(4): 613-621.
251. Ohazama, A., E. B. Johnson, M. S. Ota, H. J. Choi, T. Porntaveetus, S. Oommen, N. Itoh, K. Eto, A. Gritli-Linde, J. Herz and P. T. Sharpe (2008). "Lrp4 Modulates Extracellular Integration of Cell Signaling Pathways in Development." *PLoS ONE* **3**(12): e4092.
252. Ohkawara, B., A. Glinka and C. Niehrs (2011). "Rspo3 Binds Syndecan 4 and Induces Wnt/PCP Signaling via Clathrin-Mediated Endocytosis to Promote Morphogenesis." *Developmental Cell* **20**(3): 303-314.



253. Oishi, I., S. Takeuchi, R. Hashimoto, A. Nagabukuro, T. Ueda, Z.-J. Liu, T. Hatta, S. Akira, Y. Matsuda, H. Yamamura, H. Otani and Y. Minami (1999). "Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system." *Genes to Cells* **4**(1): 41-56.
254. Panáková, D., H. Sprong, E. Marois, C. Thiele and S. Eaton (2005). "Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling." *Nature* **435**(7038): 58-65.
255. Park, B. Y. and J. P. Saint-Jeannet (2008). "Hindbrain-derived Wnt and Fgf signals cooperate to specify the otic placode in *Xenopus*." *Dev Biol* **324**(1): 108-121.
256. Pei, J. and N. V. Grishin (2012). "Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors." *Cellular Signalling* **24**(3): 758-769.
257. Penzo-Mendèz, A., M. Umbhauer, A. Djiane, J.-C. Boucaut and J.-F. Riou (2003). "Activation of G $\beta$  $\gamma$  signaling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during *Xenopus* gastrulation." *Developmental Biology* **257**(2): 302-314.
258. Pera, E. M. and E. M. De Robertis (2000). "A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1." *Mechanisms of Development* **96**(2): 183-195.
259. Pereira, C., D. J. Schaer, E. B. Bachli, M. O. Kurrer and G. Schoedon (2008). "Wnt5A/CaMKII Signaling Contributes to the Inflammatory Response of Macrophages and Is a Target for the Antiinflammatory Action of Activated Protein C and Interleukin-10." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28**(3): 504-510.
260. Pfeffer, P. L., E. M. De Robertis and J. C. Izpisua-Belmonte (1997). "Crescent, a novel chick gene encoding a Frizzled-like cysteine-rich domain, is expressed in anterior regions during early embryogenesis." *Int J Dev Biol* **41**(3): 449-458.
261. Piccolo, S., E. Agius, L. Leyns, S. Bhattacharyya, H. Grunz, T. Bouwmeester and E. M. De Robertis (1999). "The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals." *Nature* **397**(6721): 707-710.
262. Pierreux, C. E., F. J. Nicolas and C. S. Hill (2000). "Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus." *Mol Cell Biol* **20**(23): 9041-9054.
263. Pinho, S. and C. Niehrs (2007). "Dkk3 is required for TGF- $\beta$  signaling during *Xenopus* mesoderm induction." *Differentiation* **75**(10): 957-967.
264. Ramírez-Weber, F.-A. and T. B. Kornberg (1999). "Cytosomes." *Cell* **97**(5): 599-607.
265. Rattner, A., J. C. Hsieh, P. M. Smallwood, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and J. Nathans (1997). "A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(7): 2859-2863.
266. Rehm, H. L., D. S. Zhang, M. C. Brown, B. Burgess, C. Halpin, W. Berger, C. C. Morton, D. P. Corey and Z. Y. Chen (2002). "Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease." *J Neurosci* **22**(11): 4286-4292.
267. Rehn, M., T. Pihlajaniemi, K. Hofmann and P. Bucher (1998). "The frizzled motif: in how many different protein families does it occur?" *Trends in Biochemical Sciences* **23**(11): 415-417.
268. Richter, M., J. Gottanka, C. A. May, U. Welge-Lussen, W. Berger and E. Lutjen-Drecoll (1998). "Retinal vasculature changes in Norrie disease mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(12): 2450-2457.
269. Rijsewijk, F., M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel and R. Nusse (1987). "The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* **50**(4): 649-657.
270. Robitaille, J., M. L. E. MacDonald, A. Kaykas, L. C. Sheldahl, J. Zeisler, M.-P. Dubé, L.-H. Zhang, R. R. Singaraja, D. L. Guernsey, B. Zheng, L. F. Siebert, A. Hoskin-Mott, M. T. Trese, S. N.

- Pimstone, B. S. Shastry, R. T. Moon, M. R. Hayden, Y. P. Goldberg and M. E. Samuels (2002). "Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy." *Nature Genetics* **32**(2): 326-330.
271. Rocheleau, C. E., W. D. Downs, R. Lin, C. Wittmann, Y. Bei, Y.-H. Cha, M. Ali, J. R. Priess and C. C. Mello (1997). "Wnt Signaling and an APC-Related Gene Specify Endoderm in Early *C. elegans* Embryos." *Cell* **90**(4): 707-716.
272. Rodriguez Esteban, C., J. Capdevila, A. N. Economides, J. Pascual, A. Ortiz and J. C. Izpisua Belmonte (1999). "The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry." *Nature* **401**(6750): 243-251.
273. Rodriguez, J., P. Esteve, C. Weinl, J. M. Ruiz, Y. Fermin, F. Trousse, A. Dwivedy, C. Holt and P. Bovolenta (2005). "SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor." *Nature Neuroscience* **8**(10): 1301-1309.
274. Rojas-Ríos, P., I. Guerrero and A. González-Reyes (2012). "Cytoneme-Mediated Delivery of Hedgehog Regulates the Expression of Bone Morphogenetic Proteins to Maintain Germline Stem Cells in *Drosophila*." *PLoS Biology* **10**(4): e1001298.
275. Roy, S., F. Hsiung and T. B. Kornberg (2011). "Specificity of *Drosophila* Cytonemes for Distinct Signaling Pathways." *Science* **332**(6027): 354-358.
276. Rulifson, E. J., C.-H. Wu and R. Nusse (2000). "Pathway Specificity by the Bifunctional Receptor Frizzled Is Determined by Affinity for Wingless." *Molecular Cell* **6**(1): 117-126.
277. Sagar, F. Prols, C. Wiegrefe and M. Scaal (2015). "Communication between distant epithelial cells by filopodia-like protrusions during embryonic development." *Development* **142**(4): 665-671.
278. Salic, A. N., K. L. Kroll, L. M. Evans and M. W. Kirschner (1997). "Sizzled: a secreted Xwnt8 antagonist expressed in the ventral marginal zone of *Xenopus* embryos." *Development* **124**(23): 4739-4748.
279. Sanders, T. A., E. Llagostera and M. Barna (2013). "Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning." *Nature* **497**(7451): 628-632.
280. Saneyoshi, T., S. Kume, Y. Amasaki and K. Mikoshiba (2002). "The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos." *Nature* **417**(6886): 295-299.
281. Sato, M. and T. B. Kornberg (2002). "FGF Is an Essential Mitogen and Chemoattractant for the Air Sacs of the *Drosophila* Tracheal System." *Developmental Cell* **3**(2): 195-207.
282. Satoh, W. (2006). "Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis." *Development* **133**(6): 989-999.
283. Satoh, W., M. Matsuyama, H. Takemura, S. Aizawa and A. Shimono (2008). "Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/ $\beta$ -catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse." *genesis* **46**(2): 92-103.
284. Schambony, A. and D. Wedlich (2007). "Wnt-5A/Ror2 Regulate Expression of XPAPC through an Alternative Noncanonical Signaling Pathway." *Developmental Cell* **12**(5): 779-792.
285. Schleiffarth, J. R., A. D. Person, B. J. Martinsen, D. J. Sukovich, A. Neumann, C. V. H. Baker, J. L. Lohr, D. N. Cornfield, S. C. Ekker and A. Petryk (2007). "Wnt5a Is Required for Cardiac Outflow Tract Septation in Mice." *Pediatr Res* **61**(4): 386-391.
286. Schneider, V. A. (2001). "Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*." *Genes & Development* **15**(3): 304-315.
287. Schwarz-Romond, T. (2002). "The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling." *Genes & Development* **16**(16): 2073-2084.

288. Schwarz-Romond, T. (2005). "The Wnt signalling effector Dishevelled forms dynamic protein assemblies rather than stable associations with cytoplasmic vesicles." Journal of Cell Science **118**(22): 5269-5277.
289. Semenov, M., K. Tamai and X. He (2005). "SOST Is a Ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt Signaling Inhibitor." Journal of Biological Chemistry **280**(29): 26770-26775.
290. Semenov, M. V. and X. He (2006). "LRP5 Mutations Linked to High Bone Mass Diseases Cause Reduced LRP5 Binding and Inhibition by SOST." Journal of Biological Chemistry **281**(50): 38276-38284.
291. Semenov, M. V., K. Tamai, B. K. Brott, M. Kuhl, S. Sokol and X. He (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." Curr Biol **11**(12): 951-961.
292. Semenov, M. V., X. Zhang and X. He (2008). "DKK1 Antagonizes Wnt Signaling without Promotion of LRP6 Internalization and Degradation." Journal of Biological Chemistry **283**(31): 21427-21432.
293. Serralbo, O. and C. Marcelle (2014). "Migrating cells mediate long-range WNT signaling." Development **141**(10): 2057-2063.
294. Shawlot, W., J. Min Deng, M. Wakamiya and R. R. Behringer (2000). "The cerberus-related gene, *Cerr1*, is not essential for mouse head formation." genesis **26**(4): 253.
295. Shimomura, Y., D. Agalliu, A. Vonica, V. Luria, M. Wajid, A. Baumer, S. Belli, L. Petukhova, A. Schinzel, A. H. Brivanlou, B. A. Barres and A. M. Christiano (2010). "APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex." Nature **464**(7291): 1043-1047.
296. Shinya, M., C. Eschbach, M. Clark, H. Lehrach and M. Furutani-Seiki (2000). "Zebrafish *Dkk1*, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate." Mechanisms of Development **98**(1-2): 3-17.
297. Siegfried, E., E. L. Wilder and N. Perrimon (1994). "Components of wingless signalling in *Drosophila*." Nature **367**(6458): 76-80.
298. Silva, A.-C., M. Filipe, M. Vitorino, H. Steinbeisser and J.-A. Belo (2006). "Developmental expression of *Shisa-2* in *Xenopus laevis*." Int. J. Dev. Biol. **50**(Next).
299. Silva, A. C. (2003). "Endogenous Cerberus activity is required for anterior head specification in *Xenopus*." Development **130**(20): 4943-4953.
300. Simons, M., J. Gloy, A. Ganner, A. Bullerkotte, M. Bashkurov, C. Kronig, B. Schermer, T. Benzing, O. A. Cabello, A. Jenny, M. Mlodzik, B. Polok, W. Driever, T. Obara and G. Walz (2005). "Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways." Nat Genet **37**(5): 537-543.
301. Simpson, E. H., D. K. Johnson, P. Hunsicker, R. Suffolk, S. A. Jordan and I. J. Jackson (1999). "The Mouse *Cer1* (Cerberus related or homologue) Gene Is Not Required for Anterior Pattern Formation." Developmental Biology **213**(1): 202-206.
302. Sive, H. L., Grainger, R. M., Harland, R. M (1994). Early development of *Xenopus laevis*, Cold spring harbor.
303. Slusarski, D. C., V. G. Corces and R. T. Moon (1997). "Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling." Nature **390**(6658): 410-413.
304. Slusarski, D. C., J. Yang-Snyder, W. B. Busa and R. T. Moon (1997). "Modulation of Embryonic Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling by Wnt-5A." Developmental Biology **182**(1): 114-120.
305. Smalley, M. J., E. Sara, H. Paterson, S. Naylor, D. Cook, H. Jayatilake, L. G. Fryer, L. Hutchinson, M. J. Fry and T. C. Dale (1999). "Interaction of Axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription." EMBO J **18**(10): 2823-2835.
306. Smallwood, P. M., J. Williams, Q. Xu, D. J. Leahy and J. Nathans (2006). "Mutational Analysis of Norrin-Frizzled4 Recognition." Journal of Biological Chemistry **282**(6): 4057-4068.

307. Sobolev, A. S., A. A. Rosenkranz and A. R. Kazarov (1984). "Interaction of proteins of the adenylate cyclase complex: area-limited mobility or movement along the whole membrane? Analysis with the application of the percolation theory." *Biosci Rep* **4**(10): 897-902.
308. Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., Mishina, Y., Behringer, R. R., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B. 3rd, Birchmeier, W. (2003). "Genetic interaction between Wnt/ -catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb." *Genes & Development* **17**(16): 1963-1968.
309. Staehling-Hampton, K., S. Proll, B. W. Paeper, L. Zhao, P. Charmley, A. Brown, J. C. Gardner, D. Galas, R. C. Schatzman, P. Beighton, S. Papapoulos, H. Hamersma and M. E. Brunkow (2002). "A 52-kb deletion in the SOST-MEOX1 intergenic region on 17q12-q21 is associated with van Buchem disease in the Dutch population." *American Journal of Medical Genetics* **110**(2): 144-152.
310. Stanganello, E., A. I. Hagemann, B. Mattes, C. Sinner, D. Meyen, S. Weber, A. Schug, E. Raz and S. Scholpp (2015). "Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning." *Nat Commun* **6**: 5846.
311. Stanganello, E. and S. Scholpp (2016). "Role of cytonemes in Wnt transport." *J Cell Sci* **129**(4): 665-672.
312. Starzynska, T., P. J. Marsh, P. F. Schofield, S. A. Roberts, K. A. Myers and P. L. Stern (1994). "Prognostic significance of 5T4 oncofetal antigen expression in colorectal carcinoma." *Br J Cancer* **69**(5): 899-902.
313. Stoick-Cooper, C. L., R. T. Moon and G. Weidinger (2007). "Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine." *Genes Dev* **21**(11): 1292-1315.
314. Stoick-Cooper, C. L., G. Weidinger, K. J. Riehle, C. Hubbert, M. B. Major, N. Fausto and R. T. Moon (2007). "Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration." *Development* **134**(3): 479-489.
315. Sugiyama, Y., R. J. W. Stump, A. Nguyen, L. Wen, Y. Chen, Y. Wang, J. N. Murdoch, F. J. Lovicu and J. W. McAvoy (2010). "Secreted frizzled-related protein disrupts PCP in eye lens fiber cells that have polarised primary cilia." *Developmental Biology* **338**(2): 193-201.
316. Surmann-Schmitt, C., N. Widmann, U. Dietz, B. Saeger, N. Eitzinger, Y. Nakamura, M. Rattel, R. Latham, C. Hartmann, H. von der Mark, G. Schett, K. von der Mark and M. Stock (2009). "Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis." *Journal of Cell Science* **122**(20): 3627-3637.
317. Swain, R. K., M. Katoh, A. Medina and H. Steinbeisser (2005). "Xenopus frizzled-4S, a splicing variant of Xfz4 is a context-dependent activator and inhibitor of Wnt/beta-catenin signaling." *Cell Commun Signal* **3**: 12.
318. Tada, M. and J. C. Smith (2000). "Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway." *Development* **127**(10): 2227-2238.
319. Takahashi, M., M. Fujita, Y. Furukawa, R. Hamamoto, T. Shimokawa, N. Miwa, M. Ogawa and Y. Nakamura (2002). "Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-Catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis." *Cancer Res* **62**(20): 5651-5656.
320. Takei, Y. (2004). "Three Drosophila EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans." *Development* **131**(1): 73-82.
321. Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet and X. He (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." *Nature* **407**(6803): 530-535.

322. Tamai, K., X. Zeng, C. Liu, X. Zhang, Y. Harada, Z. Chang and X. He (2004). "A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation." *Molecular Cell* **13**(1): 149-156.
323. Tao, Q., C. Yokota, H. Puck, M. Kofron, B. Birsoy, D. Yan, M. Asashima, C. C. Wylie, X. Lin and J. Heasman (2005). "Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos." *Cell* **120**(6): 857-871.
324. Tavares, A. T., S. Andrade, A. C. Silva and J. A. Belo (2007). "Cerberus is a feedback inhibitor of Nodal asymmetric signaling in the chick embryo." *Development* **134**(11): 2051-2060.
325. Toomes, C., H. M. Bottomley, R. M. Jackson, K. V. Towns, S. Scott, D. A. Mackey, J. E. Craig, L. Jiang, Z. Yang, R. Trembath, G. Woodruff, C. Y. Gregory-Evans, K. Gregory-Evans, M. J. Parker, G. C. M. Black, L. M. Downey, K. Zhang and C. F. Inglehearn (2004). "Mutations in LRP5 or FZD4 Underlie the Common Familial Exudative Vitreoretinopathy Locus on Chromosome 11q." *The American Journal of Human Genetics* **74**(4): 721-730.
326. Toomes, C., H. M. Bottomley, S. Scott, D. A. Mackey, J. E. Craig, B. Appukuttan, J. T. Stout, C. J. Flaxel, K. Zhang, G. C. M. Black, A. Fryer, L. M. Downey and C. F. Inglehearn (2004). "Spectrum and Frequency of FZD4 Mutations in Familial Exudative Vitreoretinopathy." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **45**(7): 2083.
327. Topol, L., X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P. J. Carolan and Y. Yang (2003). "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent  $\beta$ -catenin degradation." *J Cell Biol* **162**(5): 899-908.
328. Torres, M. A. (1996). "Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development." *The Journal of Cell Biology* **133**(5): 1123-1137.
329. Unterseher, F., J. A. Hefele, K. Giehl, E. M. De Robertis, D. Wedlich and A. Schambony (2004). "Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK." *EMBO J* **23**(16): 3259-3269.
330. Uren, A., F. Reichsman, V. Anest, W. G. Taylor, K. Muraiso, D. P. Bottaro, S. Cumberledge and J. S. Rubin (2000). "Secreted Frizzled-related Protein-1 Binds Directly to Wingless and Is a Biphasic Modulator of Wnt Signaling." *Journal of Biological Chemistry* **275**(6): 4374-4382.
331. Verkaar, F., J. Vanrosmalen, J. Smits, W. Blankesteyn and G. Zaman (2009). "Stably overexpressed human Frizzled-2 signals through the  $\beta$ -catenin pathway and does not activate Ca<sup>2+</sup>-mobilization in Human Embryonic Kidney 293 cells." *Cellular Signalling* **21**(1): 22-33.
332. Vonica, A. and A. H. Brivanlou (2007). "The left-right axis is regulated by the interplay of *Coco*, *Xnr1* and *derrière* in *Xenopus* embryos." *Developmental Biology* **303**(1): 281-294.
333. Wang, K., Y. Zhang, X. Li, L. Chen, H. Wang, J. Wu, J. Zheng and D. Wu (2008). "Characterization of the Kremen-binding Site on Dkk1 and Elucidation of the Role of Kremen in Dkk-mediated Wnt Antagonism." *Journal of Biological Chemistry* **283**(34): 23371-23375.
334. Wang, S., M. Krinks, K. Lin, F. P. Luyten and M. Moos (1997). "Frzb, a Secreted Protein Expressed in the Spemann Organizer, Binds and Inhibits Wnt-8." *Cell* **88**(6): 757-766.
335. Wang, S., M. Krinks and M. Moos, Jr. (1997). "Frzb-1, an antagonist of Wnt-1 and Wnt-8, does not block signaling by Wnts -3A, -5A, or -11." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(2): 502-504.
336. Warden, S. M., C. M. Andreoli and S. Mukai (2007). "The Wnt Signaling Pathway in Familial Exudative Vitreoretinopathy and Norrie Disease." *Seminars in Ophthalmology* **22**(4): 211-217.
337. Warr, N., P. Siggers, D. Bogani, R. Brixey, L. Pastorelli, L. Yates, C. H. Dean, S. Wells, W. Satoh, A. Shimono and A. Greenfield (2009). "Sfrp1 and Sfrp2 are required for normal male sexual development in mice." *Developmental Biology* **326**(2): 273-284.

338. Wartlick, O., A. Kicheva and M. Gonzalez-Gaitan (2009). "Morphogen gradient formation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(3): a001255.
339. Wawrzak, D., M. Metioui, E. Willems, M. Hendrickx, E. de Genst and L. Leyns (2007). "Wnt3a binds to several sFRPs in the nanomolar range." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(4): 1119-1123.
340. Weeraratna, A. T., Y. Jiang, G. Hostetter, K. Rosenblatt, P. Duray, M. Bittner and J. M. Trent (2002). "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma." *Cancer Cell* **1**(3): 279-288.
341. Wehrli, M., S. T. Dougan, K. Caldwell, L. O'Keefe, S. Schwartz, D. Vaizel-Ohayon, E. Schejter, A. Tomlinson and S. DiNardo (2000). "Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." *Nature* **407**(6803): 527-530.
342. Wei, Q., C. Yokota, M. V. Semenov, B. Doble, J. Woodgett and X. He (2007). "R-spondin1 Is a High Affinity Ligand for LRP6 and Induces LRP6 Phosphorylation and beta-Catenin Signaling." *Journal of Biological Chemistry* **282**(21): 15903-15911.
343. Westfall, T. A., R. Brimeyer, J. Twedt, J. Gladon, A. Olberding, M. Furutani-Seiki and D. C. Slusarski (2003). "Wnt-5/ pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/ $\beta$ -catenin activity." *J Cell Biol* **162**(5): 889-898.
344. Willert, K., J. D. Brown, E. Danenberg, A. W. Duncan, I. L. Weissman, T. Reya, J. R. Yates and R. Nusse (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." *Nature* **423**(6938): 448-452.
345. Willert, K., S. Shibamoto and R. Nusse (1999). "Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex." *Genes Dev* **13**(14): 1768-1773.
346. Willnow, T. E., A. Hammes and S. Eaton (2007). "Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance." *Development* **134**(18): 3239-3249.
347. Winklbauer, R., A. Medina, R. K. Swain and H. Steinbeisser (2001). "Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation." *Nature* **413**(6858): 856-860.
348. Wolf, J., T. R. Palmby, J. Gavard, B. O. Williams and J. S. Gutkind (2008). "Multiple PPPS/TP motifs act in a combinatorial fashion to transduce Wnt signaling through LRP6." *FEBS Lett* **582**(2): 255-261.
349. Wolpert, L. (1969). "Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation." *J Theor Biol* **25**(1): 1-47.
350. Wolpert, L. (2016). "Positional Information and Pattern Formation." *Curr Top Dev Biol* **117**: 597-608.
351. Wolpert, L. and T. Gustafson (1961). "Studies on the cellular basis of morphogenesis of the sea urchin embryo." *Experimental Cell Research* **25**(2): 374-382.
352. Wong, H.-C., A. Bourdellas, A. Krauss, H.-J. Lee, Y. Shao, D. Wu, M. Mlodzik, D.-L. Shi and J. Zheng (2003). "Direct Binding of the PDZ Domain of Dishevelled to a Conserved Internal Sequence in the C-Terminal Region of Frizzled." *Molecular Cell* **12**(5): 1251-1260.
353. Woo, K. (1997). "Specification of the Zebrafish Nervous System by Nonaxial Signals." *Science* **277**(5323): 254-257.
354. Wouda, R. R., M. R. K. S. Bansraj, A. W. M. de Jong, J. N. Noordermeer and L. G. Fradkin (2008). "Src family kinases are required for WNT5 signaling through the Derailed/RYK receptor in the *Drosophila* embryonic central nervous system." *Development* **135**(13): 2277-2287.
355. Wu, W., A. Glinka, H. Delius and C. Niehrs (2000). "Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling." *Current Biology* **10**(24): 1611-1614.
356. Xanthos, J. B., M. Kofron, Q. Tao, K. Schaible, C. Wylie and J. Heasman (2002). "The roles of three signaling pathways in the formation and function of the Spemann Organizer." *Development* **129**(17): 4027-4043.

357. Xavier, C. P., M. Melikova, Y. Chuman, A. Uren, B. Baljinnyam and J. S. Rubin (2014). "Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/beta-catenin signaling." *Cell Signal* **26**(1): 94-101.
358. Xia, C. H., H. Liu, D. Cheung, M. Wang, C. Cheng, X. Du, B. Chang, B. Beutler and X. Gong (2008). "A model for familial exudative vitreoretinopathy caused by LPR5 mutations." *Human Molecular Genetics* **17**(11): 1605-1612.
359. Xu, Q., Y. Wang, A. Dabdoub, P. M. Smallwood, J. Williams, C. Woods, M. W. Kelley, L. Jiang, W. Tasman, K. Zhang and J. Nathans (2004). "Vascular Development in the Retina and Inner Ear." *Cell* **116**(6): 883-895.
360. Xu, Y. K. and R. Nusse (1998). "The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases." *Current Biology* **8**(12): R405-R406.
361. Yamamoto, A., T. Nagano, S. Takehara, M. Hibi and S. Aizawa (2005). "Shisa Promotes Head Formation through the Inhibition of Receptor Protein Maturation for the Caudalizing Factors, Wnt and FGF." *Cell* **120**(2): 223-235.
362. Yan, D., J. B. Wallingford, T. Q. Sun, A. M. Nelson, C. Sakanaka, C. Reinhard, R. M. Harland, W. J. Fantl and L. T. Williams (2001). "Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(7): 3802-3807.
363. Yanagita, M., M. Oka, T. Watabe, H. Iguchi, A. Niida, S. Takahashi, T. Akiyama, K. Miyazono, M. Yanagisawa and T. Sakurai (2004). "USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **316**(2): 490-500.
364. Yang-Snyder, J., J. R. Miller, J. D. Brown, C. J. Lai and R. T. Moon (1996). "A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway." *Curr Biol* **6**(10): 1302-1306.
365. Ye, X., P. Smallwood and J. Nathans (2011). "Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain." *Gene Expression Patterns* **11**(1-2): 151-155.
366. Yokouchi, Y., K. J. Vogan, R. V. Pearse and C. J. Tabin (1999). "Antagonistic Signaling by Caronte, a Novel Cerberus-Related Gene, Establishes Left-Right Asymmetric Gene Expression." *Cell* **98**(5): 573-583.
367. Yoon, J. K. and J.-S. Lee (2012). "Cellular signaling and biological functions of R-spondins." *Cellular Signalling* **24**(2): 369-377.
368. Yoshikawa, S., R. D. McKinnon, M. Kokel and J. B. Thomas (2003). "Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor." *Nature* **422**(6932): 583-588.
369. Yoshikawa, S., R. D. McKinnon, M. Kokel and J. B. Thomas (2003). "Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor." *Nature* **422**(6932): 583-588.
370. Zarsky, A. G., S. A. Lukyanov, O. L. Vasiliev, Y. V. Smirnov, A. V. Belyavsky and O. V. Kazanskaya (1992). "A novel homeobox gene expressed in the anterior neural plate of the Xenopus embryo." *Dev Biol* **152**(2): 373-382.
371. Zechner, D., Y. Fujita, J. Hülsken, T. Müller, I. Walther, M. M. Taketo, E. Bryan Crenshaw, W. Birchmeier and C. Birchmeier (2003). "β-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system." *Developmental Biology* **258**(2): 406-418.
372. Zeng, X., H. Huang, K. Tamai, X. Zhang, Y. Harada, C. Yokota, K. Almeida, J. Wang, B. Doble, J. Woodgett, A. Wynshaw-Boris, J. C. Hsieh and X. He (2007). "Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions." *Development* **135**(2): 367-375.
373. Zeng, X., H. Huang, K. Tamai, X. Zhang, Y. Harada, C. Yokota, K. Almeida, J. Wang, B. Doble, J. Woodgett, A. Wynshaw-Boris, J. C. Hsieh and X. He (2008). "Initiation of Wnt signaling:

- control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions." *Development* **135**(2): 367-375.
374. Zeng, X., K. Tamai, B. Doble, S. Li, H. Huang, R. Habas, H. Okamura, J. Woodgett and X. He (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." *Nature* **438**(7069): 873-877.
375. Zhai, L., D. Chaturvedi and S. Cumberledge (2004). "Drosophila Wnt-1 Undergoes a Hydrophobic Modification and Is Targeted to Lipid Rafts, a Process That Requires Porcupine." *Journal of Biological Chemistry* **279**(32): 33220-33227.
376. Zhang, X., Jose G. Abreu, C. Yokota, Bryan T. MacDonald, S. Singh, Karla Loureiro A. Coburn, S.-M. Cheong, Mingzi M. Zhang, Q.-Z. Ye, Howard C. Hang, H. Steen and X. He (2012). "Tiki1 Is Required for Head Formation via Wnt Cleavage-Oxidation and Inactivation." *Cell* **149**(7): 1565-1577.
377. Zhu, L., M. J. Marvin, A. Gardiner, A. B. Lassar, M. Mercola, C. D. Stern and M. Levin (1999). "Cerberus regulates left-right asymmetry of the embryonic head and heart." *Current Biology* **9**(17): 931-938.
378. Zhu, W., I. Shiojima, Y. Ito, Z. Li, H. Ikeda, M. Yoshida, A. T. Naito, J.-i. Nishi, H. Ueno, A. Umezawa, T. Minamino, T. Nagai, A. Kikuchi, M. Asashima and I. Komuro (2008). "IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis." *Nature* **454**(7202): 345-349.
379. Zhu, Y., A. Tsuchida, A. Yamamoto, K. Furukawa, O. Tajima, N. Tokuda, S. Aizawa, T. Urano, K. Kadomatsu and K. Furukawa (2008). "Expression and roles of a xenopus head-forming gene homologue in human cancer cell lines." *Nagoya J Med Sci* **70**(3-4): 73-82.