

Короткова Дарья Дмитриевна

**Роль нового белка холоднокровных c-Answer в регуляции пуриnergического и FGF
сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга**

Специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020 г.

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Андрей Георгиевич ЗАРАЙСКИЙ
руководитель лаборатории молекулярных основ
эмбриогенеза Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
биоорганической химии им. академиков
М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской
академии наук

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Элеонора Норайровна ГРИГОРЯН
руководитель лаборатории проблем регенерации
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской академии наук

кандидат биологических наук
Андрей Александрович ПАНТЕЛЕЕВ
руководитель лабораторий тканевой инженерии
и регенеративной биомедицины
НИЦ “Курчатовский Институт”,
Центр НБИКС Технологий

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «23» сентября 2020г. в 10 часов на заседании диссертационного Совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10 и на сайте ИБХ РАН (<http://www.ibch.ru>).

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

Характеристика работы

Актуальность проблемы

Причины возникновения важных отличий теплокровных животных (птицы, млекопитающие) от холоднокровных (рыбы, амфибии, рептилии), в частности прогрессивного развития конечного мозга и сниженной способности к регенерации крупных придатков тела остаются мало изученными. Считается, что возможная причина данных различий - перестройка функциональных связей внутри приблизительно одного и того же набора генов (Rodriguez-Trelles et al., 2003; Wray, 2007). На основании проведенных ранее исследований в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН была выдвинута гипотеза о том, что описанные отличия теплокровных от холоднокровных могут быть также обусловлены исчезновением или появлением отдельных генов в ходе эволюции позвоночных. Так, в нашей лаборатории было показано, что гены *ag1* и *ras-dva1* участвуют в развитии мозга и регенерации придатков тела у холоднокровных позвоночных (рыбы, амфибии, рептилии) и исчезают в ходе эволюции позвоночных (Ivanova et al., 2013; Ivanova et al., 2015; Ivanova et al., 2018; Tereshina et al., 2014; Tereshina et al., 2019). Необходимо отметить, что исчезновение генов в ходе эволюции может быть вызвано закреплением в эволюции мутаций, вызывающих потерю функции гена. Закрепление подобных мутаций для гена, регулирующего такие важные процессы как развитие мозга и регенерацию, по-видимому, является очень редким событием в эволюции, поскольку данные мутации, как правило, летальны. В то же время, исчезновение гена может привести к изменениям в функционировании важных сигнальных путей и связанным с ними функциональным морфологическим преобразованиям, примерами которых являются снижение регенерационных потенциалов и прогрессивное развитие конечного мозга у теплокровных позвоночных.

Для идентификации других генов, исчезнувших в ходе эволюции позвоночных на этапе перехода к теплокровным, в совместной работе с лабораторией математических моделей в биологии (ИППИ РАН) был разработан широкомасштабный биоинформатический подход для сравнительного анализа геномов представителей всех классов позвоночных. Один из найденных с помощью данного подхода генов, названный нами *c-answer* (от Cold-blooded Animals Specific Wound Epithelium Receptor binding protein – специфичный для холоднокровных рецептор-связывающий белок раневого эпителия) был выбран нами для более подробного изучения. Мы показали, что *c-answer* является трансмембранным модулятором активности рецепторов FGFRs и P2ry1. Известно, что ряд трансмембранных белков (Sef, XFLRT3, Klotho) (Böttcher et al., 2004) являются ко-рецепторами/ модуляторами активности рецепторов семейства FGFR, которые, аналогично *c-Answer*, имеют сравнительно небольшой внутриклеточный домен и не обладают тирозинкиназной активностью. Данные белки также взаимодействуют с рецепторами FGFR (или их лигандами Fgf) с помощью внеклеточного и/ или трансмембранного домена. Однако, в отличие от *c-Answer* некоторые из них ингибируют функцию FGFR и имеют более низкую структурную гомологию с этим рецептором. Кроме того, в литературе отсутствуют данные об их взаимодействии с пуринаргическими рецепторами и, в частности с рецептором P2ry1. Таким образом, можно предположить, что роль *c-Answer* как модулятора активности рецепторов различных типов RTK (FGFRs) и GPCR (P2ry1) относительно уникальна.

Учитывая факт исчезновения *c-answer* у теплокровных и одновременно участия *c-answer* как в регенерации, так и в раннем развитии мозга у холоднокровных, изучение механизмов функционирования *c-answer* может быть важно для решения одной из наиболее масштабных проблем эволюционной биологии - выяснения механизмов эволюции способности к регенерации и прогрессивного развития головного мозга у позвоночных. Таким образом, ген *c-answer* может пополнить ряд ранее идентифицированных в нашей лаборатории генов (*ag1*, *ras-dva1*, *ras-dva2*, *tfp4*), потеря которых в эволюции могла стать

основой для описанных преобразований в молекулярно-генетических механизмах регенерации и развития мозга (Ivanova et al., 2013; Ivanova et al., 2015; Ivanova et al., 2018; Tereshina et al., 2014; Tereshina et al., 2019).

Цель работы

Основной целью настоящей работы являлось изучение роли *c-Answer* в регенерации крупных придатков тела и в развитии мозга, а также механизмов и роли взаимодействия *c-Answer* с рецепторами *P2ry1* и *FGFR4*, на модельном объекте – шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1) Изучить особенности первичной аминокислотной структуры белка *c-Answer* с применением биоинформатических методов, а также выяснить его субклеточную локализацию с помощью конфокальной микроскопии зародышей шпорцевой лягушки, инъецированных мРНК *EGFP-c-answer*.

2) Исследовать экспрессию *c-answer* с помощью методов гибридизации мРНК *in situ* и ПЦР в реальном времени в период раннего развития головного мозга и в ходе регенерации хвоста и почки задней конечности у головастиков шпорцевой лягушки.

3) Путем оверэкспрессии синтетической мРНК *c-answer* и мРНК делеционных мутантов *c-answer*, а также ингибирования функции *c-answer* с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов/ системы CRISPR/Cas9 изучить физиологическую функцию *c-answer* в раннем развитии мозга и в ходе регенерации придатков тела у головастиков.

4) На основании анализа аномалий экспрессии генетических маркеров развития мозга и регенерации в зародышах с искусственно измененной экспрессией *c-answer* выявить регуляторные сигнальные пути, связанные с активностью *c-answer*.

5) С помощью методов ко-иммунопреципитации и Вестерн-блоттинга изучить возможные взаимодействия *c-Answer* с рядом лигандов и рецепторов сигнальных путей, предположительно связанных с активностью *c-Answer*.

6) Локализовать домены *c-Answer*, вовлеченные в белок-белковые взаимодействия с рецепторами *FGFRs* и *P2ry1*.

7) Изучить способность *c-Answer* влиять на активность *FGFR4* и *P2ry1* рецепторов.

8) На основании полученных данных построить модель, объясняющую, каким образом исчезновение у теплокровных гена *c-answer* могло привести к снижению их регенерационных способностей и в то же время создать условия для прогрессивного развития мозга.

Научная новизна

В настоящей работе проводилось изучение физиологических и молекулярных функций одного из утраченных в ходе эволюции позвоночных генов - *c-answer*. Как было показано в результате проведенного ранее биоинформатического анализа, этот ген присутствует в геномах всех исследованных холоднокровных позвоночных, однако отсутствует у теплокровных. Актуальность настоящей работы определяется необходимостью изучения функций *c-answer* в процессе эмбрионального развития и в ходе регенерации крупных придатков тела у холоднокровных позвоночных. Согласно данным, полученным на модельном объекте – шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*, *c-answer* экспрессируется в ходе регенерации хвоста и почки задней конечности головастиков, а также в период раннего развития мозга. Участие *c-Answer* в регенерации и развитии мозга шпорцевой лягушки обусловлено его взаимодействием с рецепторами факторов роста фибробластов, *FGFRs*, и рецептором пуриnergического сигнального пути - *P2ry1*. Таким образом, научная новизна

работы заключается в том, что был описан впервые открытый, отсутствующий у теплокровных животных, модулятор пуринэргического и FGF сигнальных путей, *c-Answer*, и сформулирована гипотеза об его роли в эволюции позвоночных.

Практическая значимость

Изучение функционирования *c-answer*, утраченного в ходе эволюции у теплокровных позвоночных может быть полезно для установления причин потери способности к регенерации конечностей у теплокровных позвоночных, в том числе человека, что может иметь практическую значимость для регенеративной медицины. Помимо этого, полученные в ходе работы данные по взаимодействию *c-Answer* с рецепторами P2ry1 и FGFRs могут быть использованы для биомедицинских исследований, направленных на создание лекарств против болезней, связанных с нарушениями в функционировании рецепторов P2ry1 и FGFRs.

Апробация работы и публикации

Основные результаты, полученные в данной работе, были представлены на российских и международных конференциях: XVII Конференция-школа с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития» (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Октябрь 2016, Москва, Россия; первое место на конкурсе молодых ученых); XIX Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (Курчатовский институт, Февраль 2018, Гатчина, Санкт-Петербург, Россия; первое место на конкурсе молодых ученых); XVII Международная конференция биологии *Xenopus* (Университет Вашингтона, Август 2018, Сиэтл, США). По теме диссертации опубликовано 4 статьи в международных реферируемых журналах, а также 2 статьи в российских журналах, входящих в перечень журналов и изданий, утвержденных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», а также списка литературы, который содержит 117 источников. Работа изложена на 108 страницах печатного текста, содержит 31 рисунок.

Основное содержание работы

Обзор литературы

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя пять разделов. Первый раздел посвящен описанию генетических механизмов эволюционных изменений у позвоночных. Во втором и третьем разделах представлен обзор молекулярно-генетических механизмов развития переднего мозга у позвоночных и их эволюции, а также механизмов ранних этапов регенерации крупных придатков тела у различных классов позвоночных. Четвертый раздел посвящен описанию сигнальных путей, активируемых факторами роста фибробластов и внеклеточными пуриновыми нуклеотидами, которые являются важными регуляторами раннего развития мозга и регенерации. В пятом разделе описаны особенности применения технологии CRISPR/Cas9 генного нокаута на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

Экспериментальная часть

1. Первичная структура белка c-Answer

На основании анализа баз данных GenBank была реконструирована последовательность нуклеотидов, соответствующая полноразмерной кДНК *c-answer* у *X.laevis*, и установлено, что ген *c-answer* состоит из 7 экзонов и кодирует белок из 307 аминокислот, массой приблизительно 35 кДа.

Согласно проведенному анализу, полноразмерный *c-answer* экспрессируется только одним псевдоаллелем (L копия *c-answer* в геноме *X.laevis*). кДНК последовательности другого псевдоаллеля (S) не были обнаружены нами в GenBank. Более того, в геномной базе данных GenBank были выявлены лишь последовательности 2-ого, 4-ого и 5-ого экзонов *c-answer* для S псевдоаллеля. Таким образом, можно предположить, что копия *c-answer* во втором псевдоаллеле (S) либо была частично утеряна в эволюции, либо по крайней мере не экспрессируется.

Исследование первичной структуры c-Answer показало, что он содержит внеклеточный N-концевой, трансмембранный и внутриклеточный C-концевой домены и является трансмембранным белком, поскольку имеет две структурные особенности, характерные для трансмембранных белков: отщепляемый сигнальный пептид на N-конце и альфа-спиральный трансмембранный домен (Рис. 1.1).

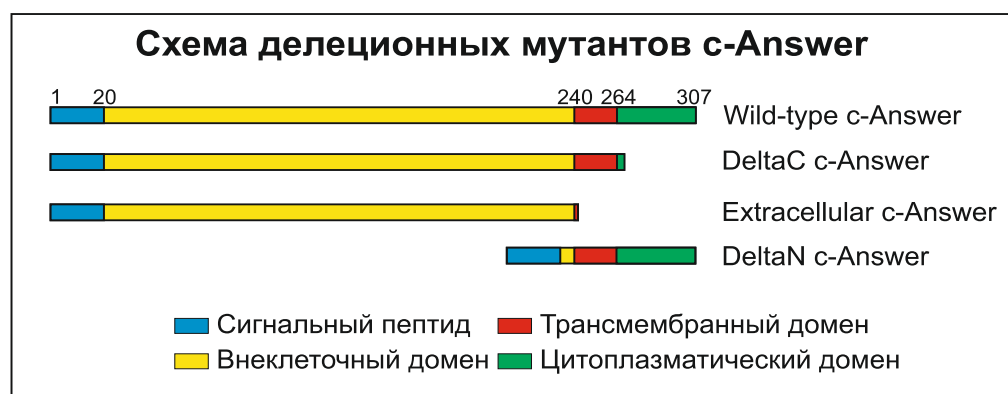


Рисунок 1.1. Первичная структура трансмембранного белка c-Answer и схемы делеционных мутантов c-Answer, используемых в экспериментах.

В примембранной части внутриклеточного домена c-Answer содержит маркер локализации в мембранных рафтах. У *X.laevis* он представлен мотивом RHRRR и полностью идентичен известному мотиву, содержащемуся в CD4 ко-рецепторе Т-клеточного рецептора и необходимому для локализации CD4 на плазматической мембране (Popik, Alce, 2004). Необходимо отметить, что у других видов холоднокровных, прим. *X.tropicalis*, c-Answer содержит мотив RHRKK, который не является идентичным известному домену CD4, однако, учитывая, что замена положительно заряженного аргинина (R) на лизин (K)- эквивалента, предположительно, выполняет ту же функцию.

В аминокислотном составе c-Answer у *X.laevis* имеются 2 остатка лизина в позициях 283 и 289, которые, согласно он-лайн программе идентификации сайтов убиквитинилирования (<http://www.ubpred.org/>; (Hitchcock et al., 2003; Peng et al., 2003)), с высокой вероятностью являются основой двух таких сайтов. При этом для всех видов холоднокровных характерно наличие сайтов убиквитинилирования в цитоплазматическом домене c-Answer.

В ходе поиска гомологов c-Answer среди аннотированных белков, проведенного с помощью пакета программ BLAST, обнаружено, что ближайшим гомологом c-Answer

является один из четырех рецепторов факторов роста фибробластов - FGFR4 (26% идентичных аминокислот) (Рис. 1.2).



Рисунок 1.2. Выравнивание белковой последовательности c-Answer с его ближайшим гомологом FGFR4 (26% идентичности).

Результаты сравнения полноразмерных последовательностей других тирозинкиназных рецепторов (VGFR, EGFR, NGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3) с c-Answer свидетельствуют о меньшей структурной гомологии (даже при большем проценте идентичности) c-Answer с этими белками, чем с FGFR4.

Высокая гомология c-Answer и FGFR4 отмечена в области иммуноглобулиновых доменов их внеклеточных частей, в аргинин- и лизинбогатых областях юкстамембранных доменов и в трансмембранных доменах.

При этом у c-Answer, в отличие от FGFR4, отсутствует характерный для Fgf рецепторов и необходимый для фосфорилирования тирозинкиназный домен во внутриклеточной части. Потенциальная мишень для фосфорилирования у c-Answer представлена одним остатком тирозина (Y288) во внутриклеточном домене. Кроме того, c-Answer содержит во внеклеточной части два иммуноглобулиновых домена, тогда как FGFR4 - три. Имеющиеся у c-Answer иммуноглобулиновые домены гомологичны иммуноглобулиновым доменам II и III FGFR4, выполняющим основные функции при осуществлении взаимодействия между рецептором FGFR4 и лигандом Fgf8 (Рис. 1.2).

Поскольку в состав c-Answer входит нечетное число остатков цистеина, мы предположили, что, подобно рецепторам FGFRs, c-Answer способен к формированию гомодимера (Рис. 1.3 А). С помощью ко-иммунопреципитации с последующим Вестерн-блоттингом полноразмерного c-Answer, меченного MYC, и его делеционных мутантов (deltaN-c-Answer, deltaC-c-Answer, extracellular-c-Answer), меченных FLAG, мы выяснили, данный белок способен образовывать гомодимер, который формируется в основном благодаря взаимодействию внутриклеточного и трансмембранного доменов c-Answer.

Мембранная локализация c-Answer подтверждена с помощью конфокальной микроскопии эмбрионов шпорцевой лягушки, экспрессирующих гибридный белок c-Answer и EGFP. Кроме локализации на цитоплазматической мембране, присутствие c-Answer было выявлено во внутриклеточных структурах, вероятно, соответствующих комплексу Гольджи и лизосомам (Рис. 1.3 Б).

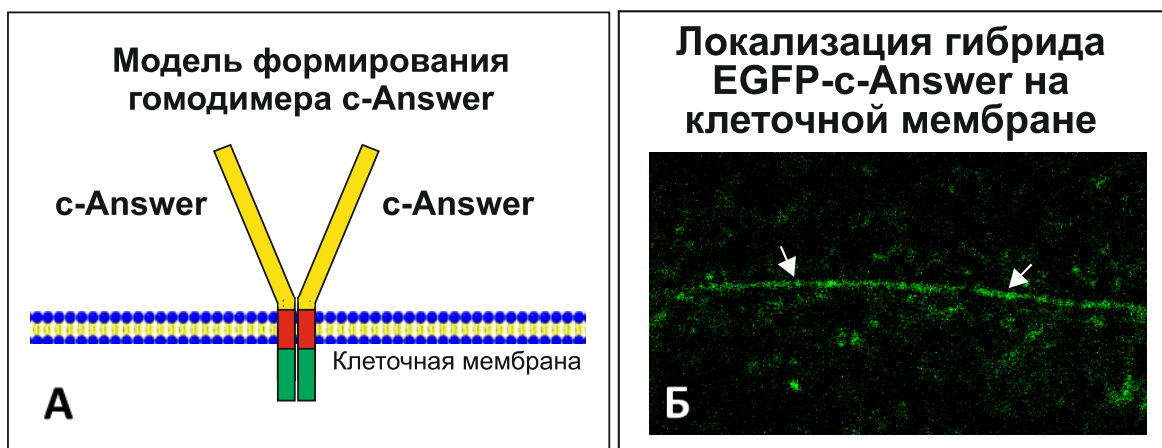


Рисунок 1.3. А. Модель формирования гомодимера c-Answer. Б. Мембранная локализация c-Answer.

2. Экспрессия c-Answer в эмбриогенезе и в процессе регенерации конечностей и хвоста головастики

Для изучения роли c-answer в эмбриогенезе исследовали экспрессию данного гена методом гибридизации *in situ* с зондом к мРНК c-answer на целых эмбрионах на стадиях 12-14 (поздней гаструлы и ранней нейрулы) и на сагиттальных срезах эмбрионов на стадии 14.

Выбор данных стадий для проведения гибридизации объясняется тем, что на стадии ранней нейрулы нервная пластинка находится в открытом состоянии, что позволяет идентифицировать экспрессию исследуемого гена в случае его возможного участия в формировании нервной системы. Кроме того, анализ базы транскриптомных данных по последовательным стадиям развития шпорцевой лягушки (http://kirschner.med.harvard.edu/mz_site/blast/index4.html; (Yanai et al., 2011)) показал, что активация экспрессии c-Answer происходит на стадии поздней гаструлы, а к стадии нейрулы уровень экспрессии c-Answer становится достаточным для осуществления картирования паттерна его экспрессии методом гибридизации *in situ* (Рис. 2.1).

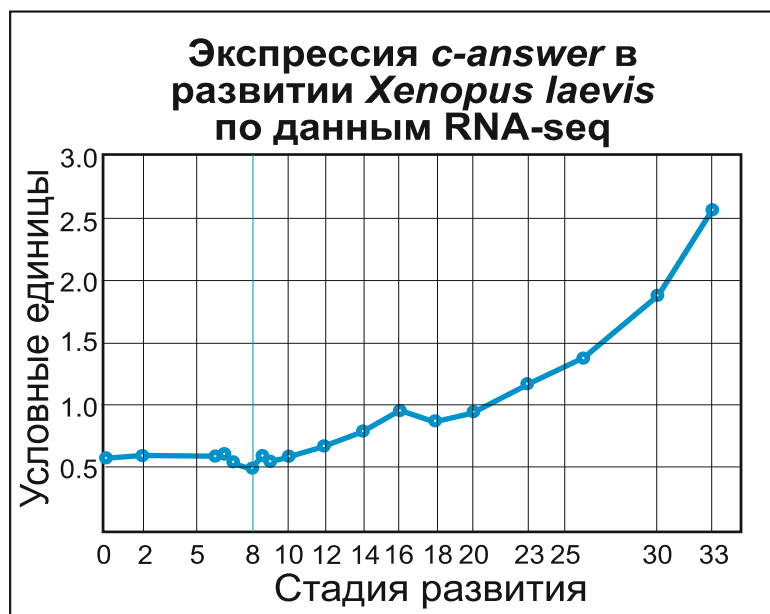


Рисунок 2.1. Экспрессия c-answer в ходе эмбриогенеза *Xenopus laevis* (данные транскриптомного секвенирования (Yanai et al., 2011)).

В результате гибридизации на целых зародышах установлено, что транскрипты *c-answer* содержатся в дорсальной эктодерме: в зачатке переднего мозга, нервной пластинке и преплакодной эктодерме. Данные, полученные в ходе гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *c-answer* на сагиттальных срезах эмбрионов на стадии ранней нейрулы, подтверждают преимущественно эктодермальную локализацию транскриптов *c-answer* с их преобладанием во внутренней части антериальной нейроэктодермы (зачатке переднего мозга) и аксиальной мезодерме (Рис. 2.2).



Рисунок 2.2. Экспрессия *c-answer* у эмбриона на стадии ранней нейрулы (результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *c-answer*; тотальный препарат (слева) и сагиттальный срез (справа)); п.н.в. – передний нервный валик, н.п. – нервная пластинка, т.мзд. – тангенциальная мезодерма.

Для изучения роли *c-answer* в процессе регенерации исследовали экспрессию данного гена в регенерирующих конечностях и хвостах головастиков методами гибридизации *in situ* и количественной ОТ-ПЦР на первый, второй и пятый дни после ампутации.

Результаты гибридизации *in situ* показали, что экспрессия *c-answer* достигает максимального уровня в раневом эпителии и бластеме регенератов конечностей и хвоста головастиков на первый и второй дни после ампутации. При этом в день ампутации (контроль) и на пятый день после ампутации в бластеме и раневом эпителии содержится существенно меньше транскриптов *c-answer* (Рис. 2.3).

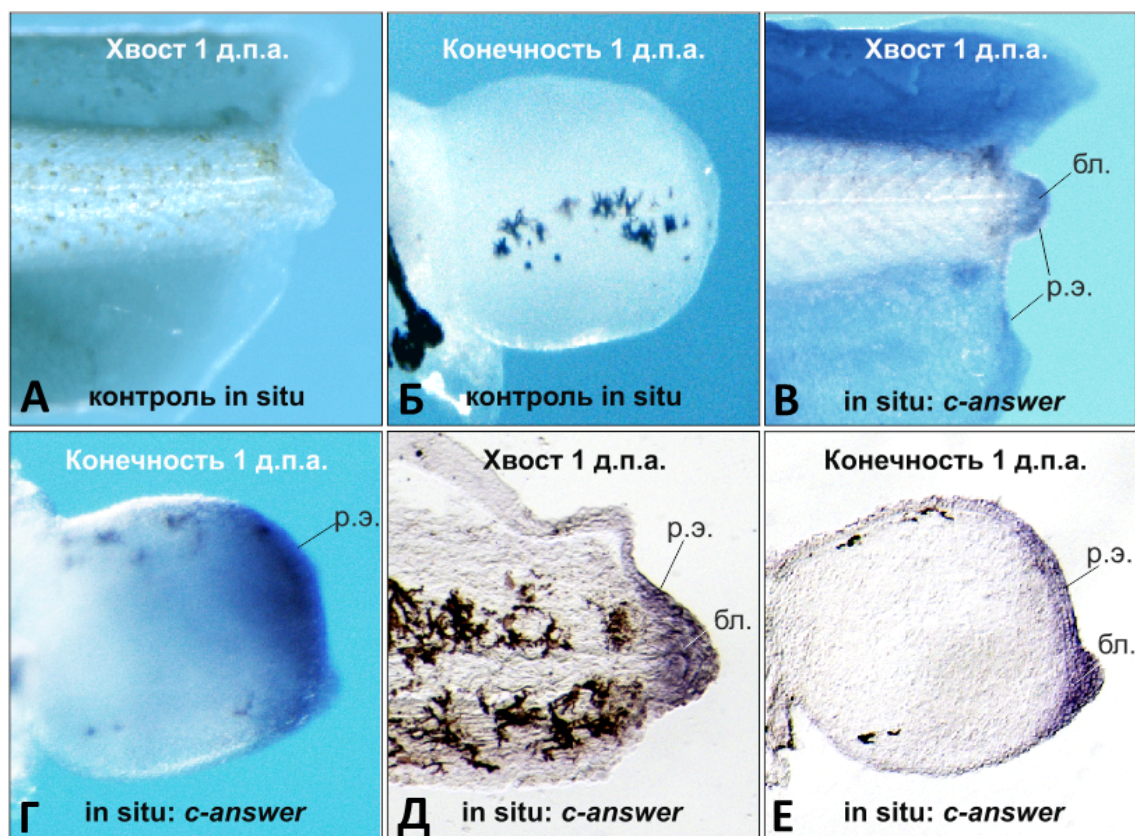


Рисунок 2.3. Экспрессия *c-answer* на ранних этапах регенерации хвоста и конечностей головастика шпорцевой лягушки (результаты гибридизации *in situ*); р.э. – раневой эпителий, бл. – бластема.

А. Результаты гибридизации *in situ* с контрольным зондом к мРНК *c-answer* на хвосте, 1 д.п.а.

Б. Результаты гибридизации *in situ* с контрольным зондом к мРНК *c-answer* на почке задней конечности, 1 д.п.а.

В. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *c-answer* на хвосте, 1 д.п.а.

Г. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *c-answer* на почке задней конечности, 1 д.п.а.

Д. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *c-answer* на сагиттальном срезе хвоста, 1 д.п.а.

Е. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *c-answer* на сагиттальном срезе почки задней конечности, 1 д.п.а.

Данные количественной ОТ-ПЦР подтверждают результаты гибридизации *in situ*, свидетельствуя об активации данного гена на первый день после ампутации и постепенном снижении количества его мРНК до базового уровня к пятому дню после ампутации.

Согласно базе данных транскриптомного секвенирования на уровне одной клетки для зародышей *Xenopus laevis* (https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/currentDatasetsList_xenopus_v2.html; (Briggs et al., 2018)), *c-answer* экспрессируется на низком уровне относительно равномерно по всему зародышу и присутствует во всех зародышевых листках (эктодерма, мезодерма, энтодерма). В некоторых тканях, в частности в зачатках переднего мозга, глаз и присоски наблюдаются кластеры клеток с повышенным уровнем экспрессии *c-answer*. При этом те же самые кластеры клеток экспрессируют гены-маркеры соответствующих анатомических структур: *foxg1* (передний нервный валик, теленцефалон, глаза и жаберные дуги), *rax* (передний нервный валик, зачатки глаз) и *agl* (присоска и железа вылупления).

3. Исследование физиологической и молекулярной функций *c-Answer* в развитии переднего мозга

Для установления функции *c-answer* в формировании и развитии нервной системы был проведен ряд *in vivo* экспериментов по активации/ блокированию функции данного гена.

3.1. Эффекты сверхэкспрессии мРНК *c-answer* и мРНК делеционных мутантов *c-answer*

Активацию трансляции *c-Answer* осуществляли с помощью инъекций в эмбрионы синтезированных *in vitro*, кэпированных *c-answer* мРНК, *deltaC-c-answer* мРНК, *deltaN-c-answer* мРНК, *extracellular-c-answer* мРНК. Показано, что сверхэкспрессия *c-Answer* в зародышах приводит к аномалиям развития головных структур, в частности к увеличению конечного мозга, редко к развитию дополнительных долей конечного мозга. У головастиков с искусственно активированной трансляцией *c-Answer* отмечено разрастание пигментного эпителия сетчатки, формирование эктопических глаз (Рис. 3.1 А-В).

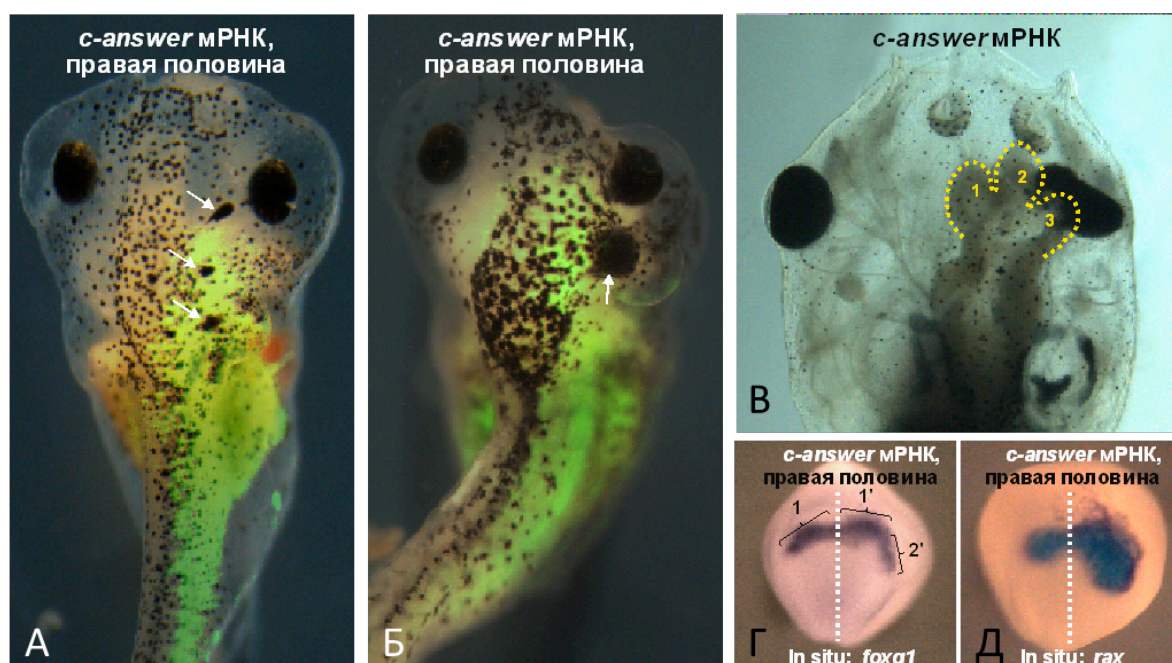


Рисунок 3.1. Образование эктопических глаз, разрастание переднего мозга и расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга и глаз, *foxg1* и *rax*, соответственно, в результате сверхэкспрессии мРНК *c-answer*.

А. Результаты инъектирования *c-answer* мРНК в один из blastомеров на стадии 2х blastомеров.

Б. Результаты инъектирования *c-answer* мРНК в один из blastомеров на стадии 2х blastомеров.

В. Результаты инъектирования *c-answer* мРНК в оба blastомера на стадии 2х blastомеров.

Г. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *foxg1* на эмбрионе, инъектированном *c-answer* мРНК в один из blastомеров на стадии 2х blastомеров.

Д. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *rax* на эмбрионе, инъектированном *c-answer* мРНК в один из blastомеров на стадии 2х blastомеров.

При сверхэкспрессии *deltaC-c-answer* мРНК наблюдали эффекты сходные с эффектами сверхэкспрессии *c-answer* мРНК – увеличение теленцефалона, (n=75, 75%), эктопическая

дифференцировка глазного эпителия (n=83, 65%), увеличение глаза со стороны инъекции (Рис. 3.2 А).

Однако в отличие от *c-answer* мРНК, гиперэкспрессия *deltaC-c-answer* мРНК не приводила к распространению пигментного эпителия сетчатки на большие расстояния, эктопическая дифференцировка пигментного эпителия происходила рядом с нормальным глазом, вокруг зрительного нерва. Кроме того, у эмбрионов, инъекцированных *deltaC-c-answer* мРНК, ни разу не было зафиксировано появление полноценного эктопического глаза.

Соответственно, гиперэкспрессия мутанта *deltaC-c-Answer* вызывала расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга и глаз на инъекцированной половине зародыша: *foxf1* (n= 60, 78%), *rax6* (n= 55, 75%) и *rax* (n= 58, 80%) (Рис. 3.2 Г, Д).

При гиперэкспрессии мутанта *extracellular-c-Answer* не наблюдалось развития эктопических глаз и разрастания переднего мозга, однако у 30% инъекцированных головастиков (n=83) наблюдалось небольшое увеличение глаз и теленцефалона (Рис. 3.2 Б).

Гиперэкспрессия мутанта *deltaN-c-Answer* вызывала уменьшение размера теленцефалона и глаз (n=80, 75%) (Рис. 3.2 В).

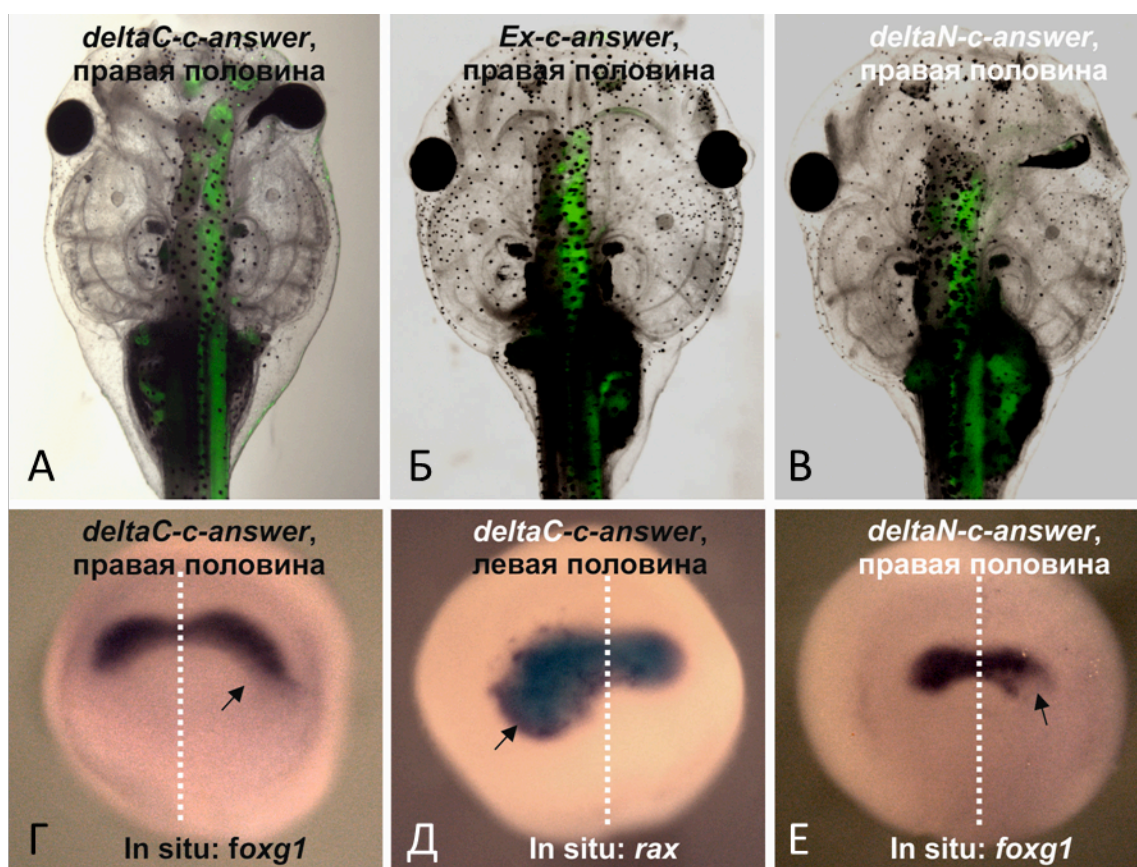


Рисунок 3.2. Результаты гиперэкспрессии делеционных мутантов *c-Answer* в эмбриональном развитии: увеличение переднего мозга и расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга и глаз, *foxf1* и *rax*, соответственно, при гиперэкспрессии мРНК *deltaC-c-answer*; уменьшение мозга, глаза и сужение зоны экспрессии гена-маркера переднего мозга *foxf1* при гиперэкспрессии мРНК *deltaN-c-answer*.

А. Результаты инъекцирования *deltaC-c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

Б. Результаты инъекцирования *extracellular-c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

В. Результаты инъекцирования *deltaN-c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

Г. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *foxg1* на эмбрионе, инъецированном *deltaC-c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

Д. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *rax* на эмбрионе, инъецированном *deltaC-c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

Е. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *foxg1* на эмбрионе, инъецированном *deltaN-c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

3.2. Эффекты блокирования функции *c-answer* с помощью МО и системы CRISPR/Cas9

Блокирование трансляции мРНК *c-answer* проводили методом инъекций в эмбрионы антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов к *c-answer* мРНК (*c-answer* МО). При этом, как и в случае оверэкспрессии внутриклеточной части *c-Answer* (*deltaN-c-answer* мРНК), наблюдали уменьшение конечного мозга и глаз у головастиков.

Подавление экспрессии гена *c-answer* было проведено с помощью системы CRISPR/Cas9. Нами было создано две конструкции для нокаута – для 2-го и 6-го экзонов. Нокаут по второму экзону позволял полностью инактивировать работу гена *c-answer*, а нокаут по шестому экзону (содержащему трансмембранный домен) позволял получить мутантный белок *c-Answer*, содержащий только внеклеточную часть. В обоих случаях мутации приводили к аномалиям развития эмбрионов и уменьшению общих размеров головастиков с небольшой частотой (21% и 23%, соответственно). При этом у эмбрионов, ниъецированных только гидовой РНК или белком Cas9 или некодирующей РНК в смеси с белком Cas9 подобных эффектов не наблюдалось, что говорит о специфичности полученных результатов. Частота мутаций для 10 выбранных случайным образом эмбрионов, валидированная методом транскриптомного секвенирования, составила: для мутации во 2-м экзоне: 85, 71, 52, 47, 40, 38, 36, 32, 31, 29 (среднее 46); для мутации в 6-м экзоне 76, 72, 58, 47, 40, 37, 36, 32, 29, 24 (среднее 45). Сравнительно низкий процент видимых эффектов от мутаций можно объяснить тем, что общее число клеток с мутантной копией гена у зародышей редко составляет более 70%.

Таким образом, в результате ингибирования функции *c-answer* обоими способами наблюдали уменьшение переднеголовных структур (конечного мозга и глаз) у головастиков (Рис. 3.3).



Рисунок 3.3. Эффект нокадауна и нокаута *c-answer* с помощью МО *c-answer* и системы CRISPR/Cas9, соответственно, на развитие мозга и глаз у головастиков.

3.3. Влияние активации/ блокирования функции *c-answer* на экспрессию генов-маркеров развития головного мозга

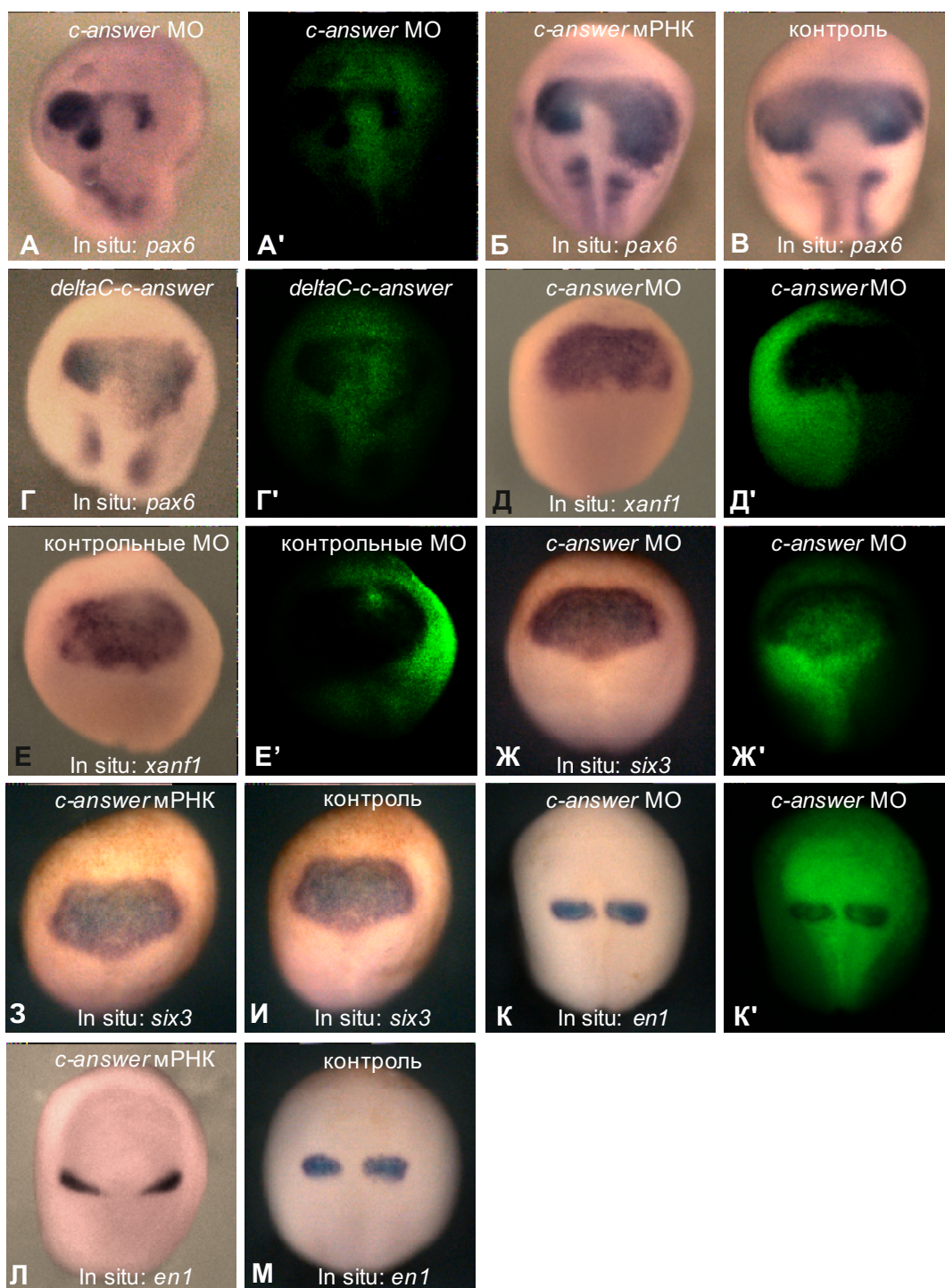


Рисунок 3.4. Результаты гибридизации *in situ* с зондами к указанным генам на эмбрионах, инъецированных *c-answer* МО или *c-answer* мРНК или мРНК делеционных мутантов *c-answer*.

А. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *pax6* на эмбрионе, инъецированном *c-answer* МО в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

А'. Флуоресцентная фотография **А**, демонстрирующая распределение флуоресцентного трейсера FLD, соответствующего распределению инъецированного материала.

Б. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *pax6* на эмбрионе, инъецированном *c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

В. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *pax6* на контрольном, неинъецированном эмбрионе.

Г. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *pax6* на эмбрионе, инъецированном *deltaC-c-answer* мРНК в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

Г'. Флуоресцентная фотография **Г**, демонстрирующая распределение флуоресцентного трейсера FLD, соответствующего распределению инъецированного материала.

Д. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *xanf1* на эмбрионе, инъецированном *c-answer* МО в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

Д'. Флуоресцентная фотография **Д**, демонстрирующая распределение флуоресцентного трейсера FLD, соответствующего распределению инъецированного материала.

Е. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *xanf1* на эмбрионе, инъецированном контрольными МО *c-answer* в один из бластомеров на стадии 2х бластомеров.

Е'. Флуоресцентная фотография **Е**, демонстрирующая распределение флуоресцентного трейсера FLD, соответствующего распределению инъецированного материала.

Ж. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *six3* на эмбрионе, инъецированном *c-answer* МО в оба бластомера на стадии 2х бластомеров.

Ж'. Флуоресцентная фотография **Ж**, демонстрирующая распределение флуоресцентного трейсера FLD, соответствующего распределению инъецированного материала.

З. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *six3* на эмбрионе, инъецированном *c-answer* мРНК в оба бластомера на стадии 2х бластомеров.

И. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *six3* на контрольном, неинъецированном эмбрионе.

К. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *en1* на эмбрионе, инъецированном *c-answer* МО в оба бластомера на стадии 2х бластомеров.

К'. Флуоресцентная фотография **К**, демонстрирующая распределение флуоресцентного трейсера FLD, соответствующего распределению инъецированного материала.

Л. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *en1* на эмбрионе, инъецированном *c-answer* мРНК в оба бластомера на стадии 2х бластомеров.

М. Результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *en1* на контрольном, неинъецированном эмбрионе.

Для определения возможных молекулярных механизмов развития наблюдаемых аномалий у эмбрионов с активированной/ подавленной экспрессией *c-answer* методом гибридизации *in situ* изучали изменение экспрессии следующих генов-маркеров развития мозга: *pax6*, *rax*, *otx*, *engrailed*, *fgf8*, *six3*, *xanf1*. Показано, что *c-Answer* влияет на экспрессию гомеобоксных генов-регуляторов развития глаз *pax6*, *rax*; и гена-индуктора конечного мозга, фактора роста фибробластов *fgf8*. При этом активация функции *c-answer*, либо инъецирование *deltaC-c-answer* мРНК/ *extracellular-c-answer* мРНК вызывает усиление экспрессии некоторых генов (**Рис. 3.1 Г, Д; Рис. 3.2 Г, Д; Рис. 3.4 Б, Г, Г'**), а ингибирование *c-answer* с помощью МО *c-answer*, либо инъецирование *deltaN-c-answer* мРНК приводит к ее подавлению (**Рис. 3.2 Е; Рис. 3.4 А, А'**). Тем не менее для некоторых генов изменения зоны экспрессии при подавлении или активации функции *c-answer* не происходит (**Рис.3.4 Д, Д', Ж, Ж', К, К', Л**).

4. Исследование физиологической функции *c-Answer* в процессе регенерации

Участие *c-answer* в процессе регенерации продемонстрировано в ходе серии *in vivo* экспериментов по искусственной активации/ блокированию функции *c-answer* с помощью инъекций синтетической *c-answer* мРНК/ *deltaC-c-answer* мРНК/ *extracellular-c-answer* мРНК/ *deltaN-c-answer* мРНК/ антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов к *c-answer* мРНК (*c-answer* МО)/ гидовой мРНК *c-answer*+белка Cas9.

Для проведения эксперимента по изучению влияния активации функции *c-answer* на регенерацию у головастика, инъецированных *c-answer* мРНК, ампутировали хвосты на стадиях 45-47 («рефрактерный период»), когда головастики в норме не способны регенерировать хвосты. Состояние регенератов оценивали на третий день после ампутации. В результате у головастика с активированной функцией *c-answer* отмечали восстановление способности к регенерации. При этом у неинъецированных головастика, служивших контролем, регенерация оставалась, как и в нормальном развитии, блокирована (Рис. 4.1).



Рисунок 4.1. Восстановление регенерации хвоста в «рефрактерный» период в результате оверэкспрессии *c-answer* мРНК.

Для изучения влияния делеционных мутантов *c-Answer* на регенерацию, хвосты головастика ампутировали на стадиях 40-44, когда головастики в норме способны регенерировать хвосты в течение шести дней после ампутации. Состояние регенератов оценивали на третий день после ампутации. У головастика, инъецированных *deltaC-c-answer* мРНК, наблюдалось ингибирование регенерации (28% полное ингибирование регенерации, 54% частичная регенерация (регенерирует один из плавников или только хорда, морфология регенерата существенно нарушена), 18% нормальная регенерация; 36/70/24). При этом у головастика, оверэкспрессирующего *extracellular-c-Answer*, который отличается от *deltaC-c-Answer* отсутствием трансмембранного домена, регенерация проходила нормально, ингибирования регенерации отмечено не было. Головастики, инъецированные *deltaN-c-answer* мРНК, продемонстрировали ингибирование регенерации (24% полное ингибирование регенерации, 49% частичная регенерация (плавник/ хорда), 27% нормальная регенерация; 29/59/32).

В ходе эксперимента по влиянию блокирования функции *c-answer* на регенерацию у головастика, инъецированных *c-answer* МО/ гидовой мРНК *c-answer*+белком Cas9, ампутировали хвосты на стадиях 40-44, когда головастики в норме способны регенерировать хвосты в течение шести дней после ампутации. Состояние регенератов оценивали на третий день после ампутации. В результате у головастика с подавленной с помощью *c-answer* МО функцией *c-Answer* отмечали снижение способности к регенерации или полное ингибирование регенерации. При этом у головастика, инъецированных *mis-c-answer* МО (антисмысловыми морфолиновыми олигонуклеотидами к *c-answer* мРНК с внесенными

нуклеотидными заменами) и служивших контролем, наблюдалась нормальная регенерация (Рис. 4.2).

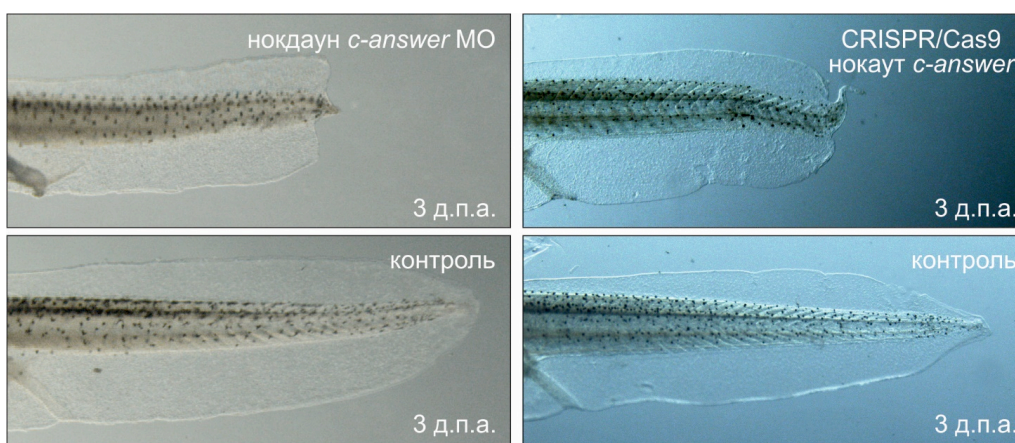


Рисунок 4.2. Ингибирование регенерации хвоста в результате нокдауна и нокаута *c-answer* с помощью *c-answer* MO и системы CRISPR/Cas9, соответственно.

Влияние мутаций *c-Answer*, внесенных с помощью системы CRISPR/Cas9, на способность к регенерации оценивали у головастиков с уменьшенным общим размером тела, так как уменьшение размеров тела головастиков косвенно свидетельствовало о высоком проценте клеток с мутантным *c-Answer*, в результате ингибирования регенерации наблюдалось у 90% таких головастиков (Рис. 4.3).

Рисунок 4.3. Эффект нокдауна и нокаута *c-answer* с помощью *c-answer* MO и системы CRISPR/Cas9, соответственно, на регенерацию хвоста у головастиков.

Для выявления генов-маркеров, участников известных сигнальных путей, активирующихся в ходе регенерации, на экспрессию которых влияет *c-answer*, нами была проведена количественная ОТ-ПЦР с праймерами к кДНК этих маркеров. Результаты ОТ-ПЦР на образцах бластем хвостов, взятых на 0 и 2 день после ампутации у головастиков с подавленной с помощью *c-answer* MO функцией *c-answer* (опыт) и у головастиков, инъецированных контрольными MO к *c-answer* с нуклеотидными заменами (контроль), показали, что подавление функции *c-answer* отражается на экспрессии генов *fgf20*, *agl*, *wnt5a*, *ras-dval* – блокирование *c-answer* подавляет экспрессию этих генов, регулирующих регенерацию (Рис. 4.4).

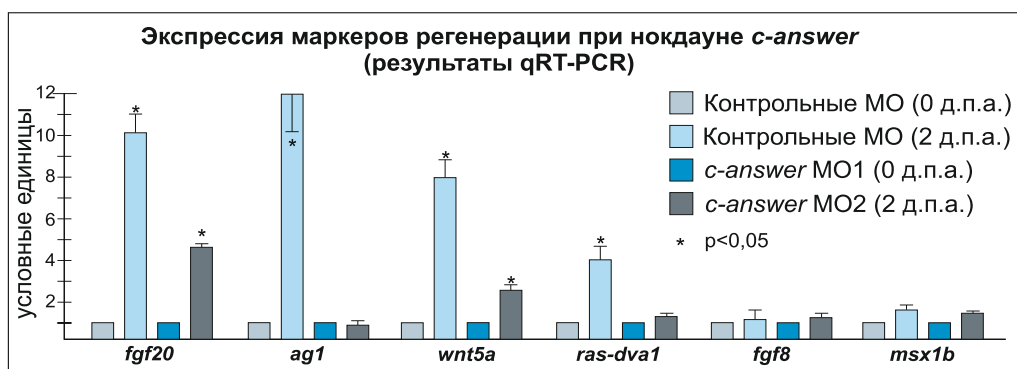


Рисунок 4.4. Экспрессия генов-маркеров регенерации на ранних этапах регенерации хвоста (0, 2 д.п.а.) у головастиков с подавленной с помощью *c-answer* МО функцией *c-answer* (результаты ОТ-ПРЦ).

Таким образом, данные ОТ-ПЦР на молекулярном уровне подтверждают наблюдаемые нами фенотипические эффекты.

5. Идентификация белков, взаимодействующих с *c-Answer* в ходе эмбриогенеза и регенерации

На основании полученных в ходе работы данных по экспрессии *c-answer*, влиянию активации/ блокирования *c-answer* на экспрессию генов-маркеров развития головного мозга и регенерации, анатомических и молекулярно-генетических аномалиях развития, вызываемых искусственной активацией/ блокированием *c-answer*, было выдвинуто предположение об участии *c-answer*, по крайней мере, в двух сигнальных путях, регулирующих ранние этапы развития мозга и глаз, а также активирующихся в ходе регенерации придатков тела.

Один из этих сигнальных путей активируется при связывании Fgf8 с тирозинкиназным рецептором факторов роста фибробластов FGFR4, другой – при связывании внеклеточных пуриновых нуклеотидов, в частности аденозиндифосфата (АДФ), с рецептором P2гу1, сопряженным с G-белком.

Возможные взаимодействия *c-Answer* с белками, участвующими в этих каскадах, проверены методом ко-иммунопреципитации с последующим Вестерн-блоттингом.

Для этого были созданы конструкции для экспрессии в эмбрионах двух известных изоформ Fgf8 - Fgf8a и Fgf8b, их рецептора FGFR4 и остальных рецепторов семейства Fgf (FGFR1-3), а также рецептора АДФ - P2гу1, меченных FLAG-олигопептидом, и *c-Answer*, меченного MYC-олигопептидом. В качестве отрицательного контроля использовали конструкцию для экспрессии фрагмента трансмембранного механо-чувствительного канала Piezo1, также меченного FLAG (**Рис. 5.1**).

В результате было выявлено взаимодействие *c-Answer* с рецепторами FGFR1-4 и P2гу1 (**Рис. 5.2**).

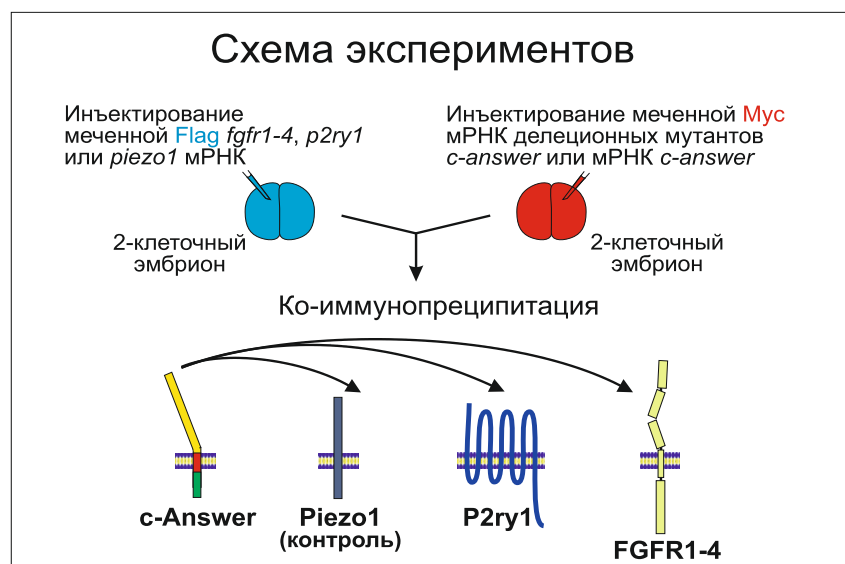


Рисунок 5.1. Схема проведения экспериментов по установлению белок-белковых взаимодействий c-Answer с его молекулярными партнерами.

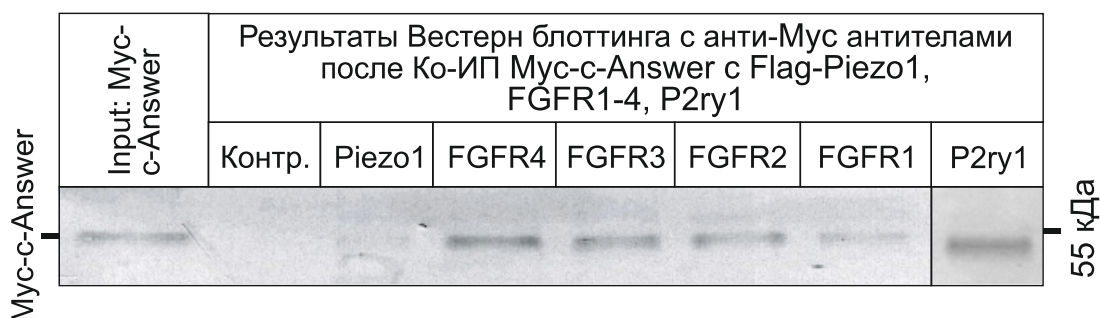


Рисунок 5.2. Результаты Вестерн-блоттинга, проведенного для проверки взаимодействия c-Answer с FGFR1-4 и P2ry1 рецепторами сигнальных путей, регулирующих развитие конечного мозга, глаз и регенерацию.

Для локализации доменов c-Answer вовлеченных в белок-белковые взаимодействия с FGFR1-4 и P2ry1 была создана серия плазмидных конструкций для производства синтетических мРНК, кодирующих различные делеционные мутанты c-Answer (*deltaC-c-answer* мРНК/ *extracellular-c-answer* мРНК/ *deltaN-c-answer* мРНК), меченные MYC-эпитопом. Полученные мРНК этих мутантов были инъецированы в ранние эмбрионы совместно с мРНК, кодирующими FGFR1-4 и P2ry1, меченные FLAG-эпитопом. Затем по отработанной ранее методике методом иммунопреципитации с последующим Вестерн-блоттингом было изучено взаимодействие делеционных мутантов c-Answer с FGFR1-4 и P2ry1.

В результате было показано, что в белок-белковом взаимодействии в той или иной степени участвуют все домены c-Answer, при этом в случае с *deltaN-c-Answer* и *deltaC-c-Answer*, обладающих трансмембранным доменом, наблюдается более сильное взаимодействие, чем в случае с *extracellular-c-Answer*. Таким образом, во взаимодействии c-Answer с FGFR1-4 (**Рис. 5.3**) и P2ry1 (**Рис. 5.4**) ключевую роль играют трансмембранный домен и околосмембранные участки c-Answer.

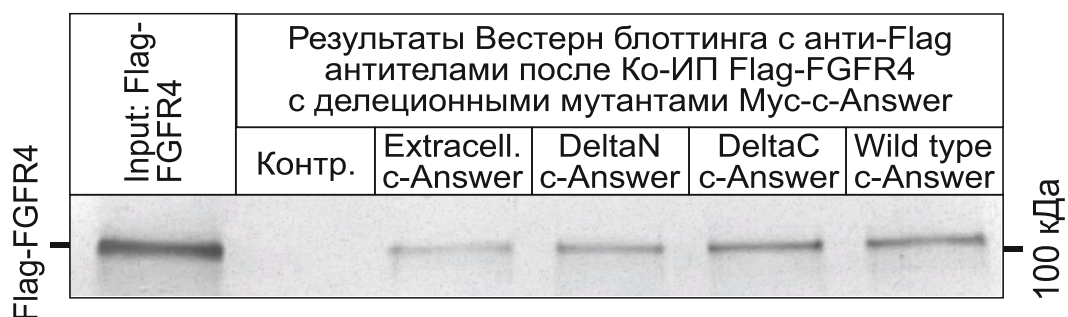


Рисунок 5.3. Результаты Вестерн-блоттинга, проведенного для установления доменов с-Answer, вовлеченных во взаимодействие с рецептором FGFR4.

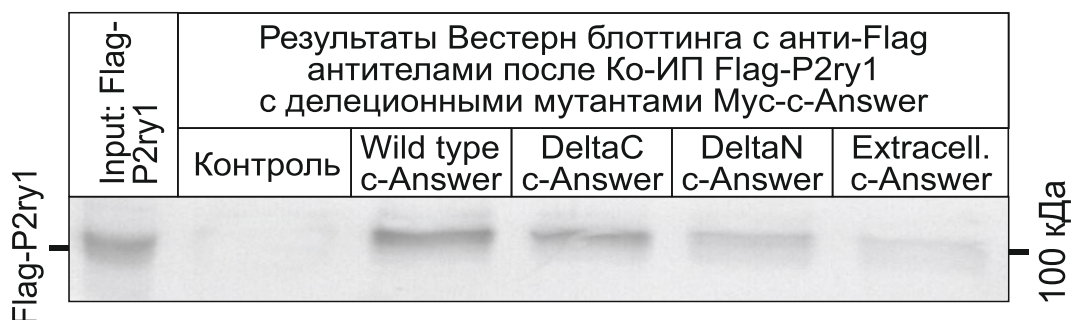


Рисунок 5.4. Результаты Вестерн-блоттинга, проведенного для установления доменов с-Answer, вовлеченных во взаимодействие с рецептором P2ry1.

6. Изучение влияния с-Answer на активность FGF сигнального пути

Как известно, молекулярный каскад, запускаемый Fgf рецепторами, может приводить к активации, по крайней мере, трех внутриклеточных сигнальных путей. Первый из этих путей ведет через ГТФазу Ras к фосфорилированию митоген-активируемой киназы Erk. Второй, приводит к активации фосфолипазы-С гамма (PLC-gamma). Третий путь активирует фосфатидилинозитол-3 киназу (PI3K).

В данной работе мы исследовали влияние с-Answer на сигнальный путь, активирующий Erk киназу.

Для измерения уровня активации MAP/ERK сигнального пути, активируемого связыванием лиганда Fgf8 с рецепторами FGFRs, мы использовали люциферазные репортерные конструкции по описанной ранее методике (Bayramov et al., 2011). Эмбрионов инъецировали синтетическими мРНК *c-answer* и *fgf8*, либо только мРНК *fgf8* в смеси с референтной плазмидой pRenilla и одной из люциферазных репортерных плазмид - AP-1-Luc pGL4.44[luc2P/AP1 SRE/Hygro] (Promega), чувствительной к стресс-активируемому MAPK/JNK сигнальному пути (контроль), или SRE-Luc pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro] (Promega), чувствительной к активации MAP/ERK сигнального пути (опыт). На стадии 10 эксплантаты анимальных шапочек вырезали из эмбрионов, культивировали эксплантаты до стадии 11 и проводили анализ активности люциферазы с помощью люцинометра.

В результате мы показали, что через взаимодействие с рецепторами FGFRs с-Answer оказывает стимулирующее влияние на MAP/ERK сигнальный путь (**Рис. 6.1**).

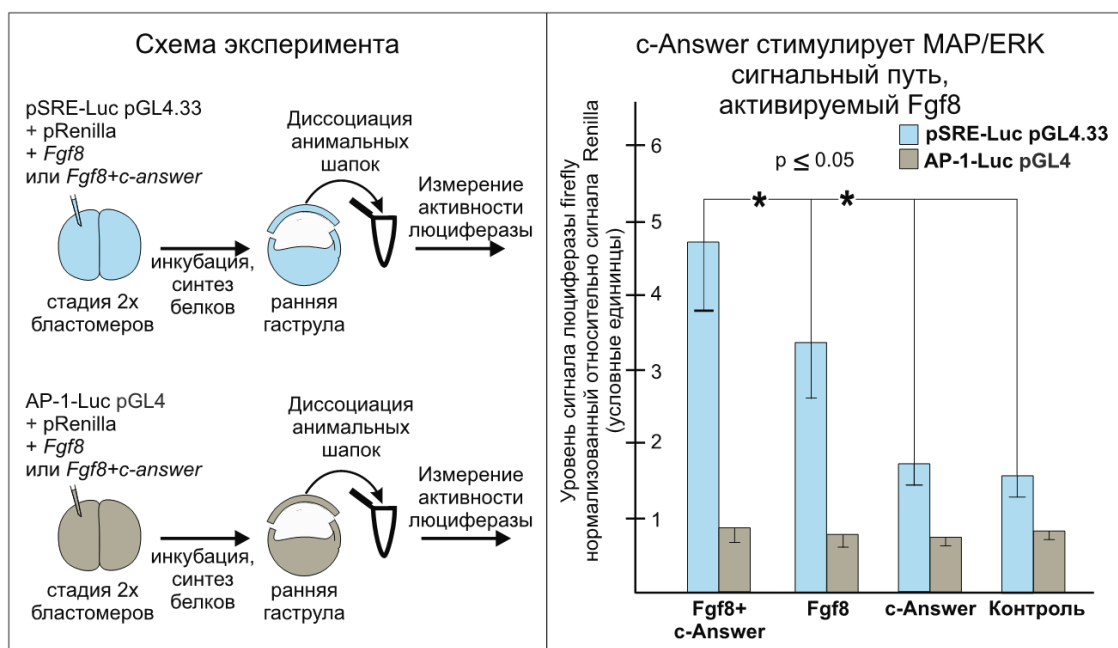


Рисунок 6.1. Схема и результаты проведения эксперимента по установлению роли *c-Answer* в MAP/ERK сигнальном пути, активируемом *Fgf8*.

7. Изучение влияния *c-Answer* на активность пуриnergического сигнального пути

Рецептор внеклеточного АТФ/ АДФ - P2ry1 - принадлежит к классу т.н. рецепторов, ассоциированных с G-белками (GPCR). Связывание P2ry1 с АДФ приводит к активации протеин киназы C (PLC), образованию фосфатидил-инозитол-фосфата с последующим высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а также к входу Ca^{2+} в клетку через клеточную мембрану. В результате запускаются сигнальные пути, активируемые повышенной концентрацией цитоплазматического Ca^{2+} . Кроме того, есть данные, что активация P2ry1 может приводить к Ca^{2+} -независимой активации митоген активируемой киназы Erk.

В настоящей работе мы исследовали влияние *c-Answer* на Ca^{2+} -зависимый пуриnergический сигнальный путь. Для выяснения характера действия *c-Answer* на данный сигнальный путь, нами была разработана методика по детекции уровня ионов кальция с помощью Ca^{2+} -сенсора Case12 в культуре клеток зародышей, ко-экспрессирующих *c-Answer* и рецептор P2ry1.

Для детекции влияния *c-Answer* на высвобождение Ca^{2+} при активации P2ry1, эмбрионы на стадии 2х бластомеров были инъецированы либо смесью мРНК *p2ry1* с мРНК Ca^{2+} -флуоресцентного сенсора Case12 (Evrogen) (контроль), либо смесью тех же мРНК с добавлением мРНК *c-answer* (опыт). С целью нормировки сигнала сенсора в эмбрионы вместе с мРНК был инъецирован красный флуоресцентный трейсер - родамин-лизин-декстран (RLD). По достижению эмбрионами стадии ранней гастрюлы, в среду добавляли АДФ и производили покадровую съемку сигнала Case12 в зеленом и красном каналах. После нормировки относительно изображений в красном канале, сравнивали уровни Case12-сигнала в опыте и в контроле. Аналогичный эксперимент был проведен на культуре клеток, полученной путем диссоциации инъецированных зародышей в бескальциевом растворе.

В результате мы установили, что *c-Answer* оказывает стимулирующее влияние на Ca^{2+} -зависимый пуриnergический сигнальный путь, модулируя работу пуринового рецептора P2ry1 (Рис. 7.1).

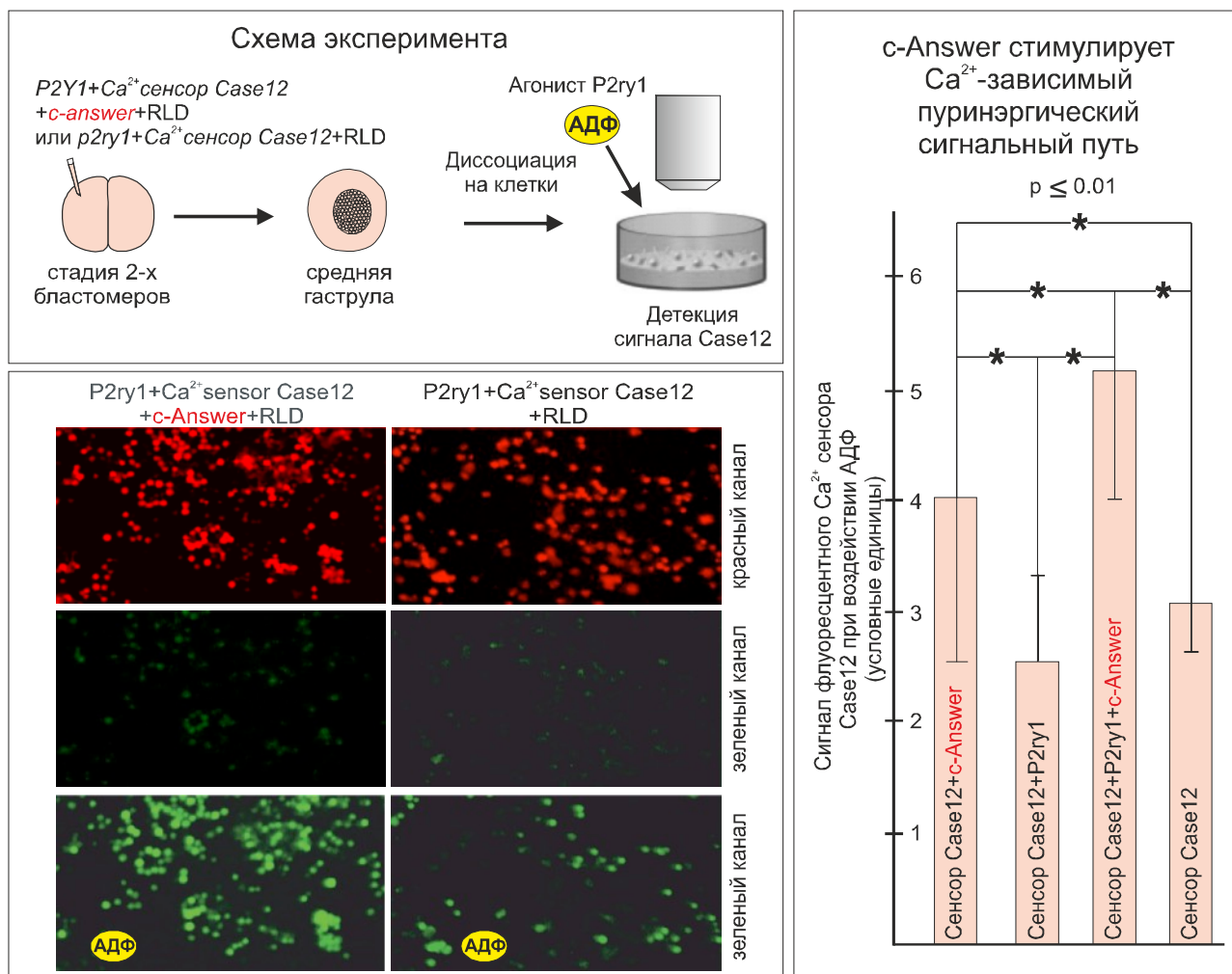


Рисунок 7.1. Схема и результаты проведения эксперимента по установлению роли *c-Answer* в Ca²⁺-зависимом пуриnergическом сигнальном пути.

Выводы

1. Специфичный для холоднокровных позвоночных ген *c-answer* кодирует неизвестный ранее трансмембранный белок, способный формировать гомодимер.
2. В ходе эмбриогенеза *c-answer* экспрессируется в зачатке переднего мозга; *c-answer* синэкспрессируется с известными маркерами развития мозга (*foxg1*, *rax*, *agl1*); экспрессия *c-answer* также активируется на ранних этапах регенерации крупных придатков тела.
3. Ингибирование функции *c-answer* вызывает уменьшение конечного мозга, подавление регенерации и экспрессии известных генов-маркеров регенерации, а оверэкспрессия *c-answer*, напротив, приводит к увеличению конечного мозга и стимулирует регенерацию у головастика в «рефрактерный» период.
4. Искусственное уменьшение или повышение уровня экспрессии *c-answer*, соответственно, подавляет или усиливает экспрессию известных маркеров дифференцировки конечного мозга - *foxg1*, *raxb* и маркера глаз - *rax*.
5. Белок *c-Answer* взаимодействует с FGFR4 и P2Y1 - рецепторами двух важных сигнальных путей, регулирующих развитие конечного мозга, глаз и регенерацию; взаимодействие осуществляется преимущественно за счет трансмембранного домена и околомембранных участков.

6. *c-Answer* оказывает стимулирующее действие на MAP/ERK сигнальный путь, активируемый Fgf, и Ca²⁺-зависимый пуриnergический сигнальный путь, модулируя работу рецепторов FGFRs и P2ry1, соответственно.

7. Полученные данные согласуются с гипотезой о том, что исчезновение *c-answer* в ходе эволюции могло обусловить прогрессивное развитие мозга и потерю способности к регенерации конечностей у теплокровных.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах

1. Korotkova D.D., Lyubetsky V.A., Ivanova A.S., Rubanov L.I., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Martynova N.Y., Nesterenko A.M., Tereshina M.B., Peshkin L., Zاراisky A.G. Bioinformatics screening of genes specific for well-regenerating vertebrates reveals a novel regulator of brain development and regeneration: *c-answer*. **Cell reports**. 22 OCT 2019. 29(4):1027-1040.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.09.038

2. Tereshina M.B., Ivanova A. S., Eroshkin F.M., Korotkova D.D., Nesterenko A.M., Bayramov A.V., Solovieva E.A., Parshina E.A., Orlov E.E., Martynova N.Y., Zاراisky A.G. Agr2-interacting Prod1-like protein Tfp4 from *Xenopus laevis* is necessary for early forebrain and eye development as well as for the tadpole appendage regeneration. **Genesis**. 26 MAR 2019. 57(5):e23293. DOI: 10.1002/dvg.23293

3. Ivanova A.S., Korotkova D.D., Ermakova G.V., Martynova N.Y., Zاراisky A.G., Tereshina M.B. Ras-dva small GTPases lost during evolution of amniotes regulate regeneration in anamniotes. **Scientific Reports**. 29 AUG 2018. 8(1):13035. DOI: 10.1038/s41598-018-30811-0

4. Иванова А.С., Короткова Д.Д., Мартынова Н.Ю., Аверьянова О.В., Зарайский А.Г., Терешина М.Б. Способы специфичного подавления работы генов in vivo при помощи морфолиновых и vivo-морфолиновых олигонуклеотидов. **Биоорганическая химия**. ИЮНЬ 2018. 44(3):358–361. DOI: 10.7868/S0132342318030120

5. Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Иванова А.С., Короткова Д.Д., Зарайский А.Г. Взаимодействие секретируемого фактора Agr2 с его потенциальными рецепторами из семейства трехпетельных белков. **Биоорганическая химия**. МАЙ 2017. 43(3):330–332. DOI: 10.7868/S0132342317030058

6. Nesterenko A.M., Kuznetsov M.V., Korotkova D.D., Zاراisky A.G. Morphogene adsorption as a Turing instability regulator: Theoretical analysis and possible applications in multicellular embryonic systems. **PLoS One**. 7 FEB 2017. 12(2):e0171212. DOI: 10.1371/journal.pone.0171212

Тезисы докладов на конференциях

1. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Мартынова Н.Ю., Любецкий В.А., Селиверстов А.В., Нестеренко А.М., Терешина М.Б., Зарайский А.Г. Роль нового трансмембранного модулятора пуриnergического рецептора P2Y1 и рецепторов факторов роста фибробластов – *c-Answer* в регенерации и развитии мозга у холоднокровных. *Сборник тезисов I Студенческого биохимического форума (МГУ имени М.В. Ломоносова, Декабрь 2018, Москва, Россия; первое место в подсекции биохимия)*.

2. Korotkova D.D., Ivanova A.S., Rubanov L.I., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Lyubetsky V.A., Martynova N.Y., Tereshina M.B., Nesterenko A.M., Lyubetsky V.A., Zاراisky A.G. *c-Answer*, the gene lost in evolution in warmblooded animals, controls regeneration and brain development via Fgf and purinergic signaling in *Xenopus laevis*. *Сборник тезисов XVII Международной конференции биологии Xenopus (Университет Вашингтона, Август 2018, Сиэтл, США)*.

3. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Мартынова Н.Ю., Любецкий В.А., Селиверстов А.В., Нестеренко А.М., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г. Роль нового трансмембранного регулятора регенерации и развития мозга - c- Answer в функционировании пуринэргического рецептора P2Y1 и рецептора факторов роста фибробластов FGFR4. *Сборник тезисов XIX Зимней молодежной школы по биофизике и молекулярной биологии (Курчатовский институт, Февраль 2018, Гатчина, Санкт-Петербург, Россия; первое место на конкурсе молодых ученых).*

4. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Мартынова Н.Ю., Любецкий В.А., Селиверстов А.В., Нестеренко А.М., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г. Роль нового трансмембранного регулятора регенерации и развития мозга - c- Answer в функционировании пуринэргического рецептора P2Y1 и рецептора факторов роста фибробластов FGFR4. *Сборник тезисов XXX Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления Физико-химической биологии и биотехнологии» (Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Февраль 2018, Москва, Россия).*

5. Lyubetsky V. A., Kоротkova D.D., Ivanova A. S., Rubanov L.I., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Nesterenko A.M., Tereshina M.B., Zaraisky A.G. Novel transmembrane protein c-Answer revealed by bioinformatic screening of genes present only in well regenerating animals. *FEBS Journal*. SEP 2017, 284.155. DOI: 10.1111/febs.14174

6. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Любetsky В.А., Селиверстов А.В., Мартынова Н.Ю., Нестеренко А.М., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г. Novel FGF-signaling modulator c-Answer revealed by bioinformatics screening for genes present only in well-regenerative animals. *Mechanisms of Development*. JUL 2017, 145, S49. DOI: 10.1016/j.mod.2017.04.089

7. Короткова Д.Д. Новый рецептор-связывающий белок, c-Answer, регулирующий регенерацию и развитие мозга у холоднокровных. *Сборник тезисов XXIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»;* (МГУ имени М.В. Ломоносова, Апрель 2017, Москва, Россия; первое место в подсекции молекулярная биология).

8. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Любецкий В.А., Селиверстов А.В., Нестеренко А.М., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г. Роль нового трансмембранного белка холоднокровных c-Answer в регенерации и развитии мозга у шпорцевой лягушки. *Сборник тезисов XXIX Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления Физико-химической биологии и биотехнологии» (Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Февраль 2017, Москва, Россия).*

9. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Любецкий В.А., Селиверстов А.В., Нестеренко А.М., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г. Ген Answer, потерянный высшими позвоночными в ходе эволюции, регулирует регенерацию и раннее развитие мозга у шпорцевой лягушки. *Сборник тезисов XVII Конференции-школы с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития» (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Октябрь 2016, Москва, Россия; первое место на конкурсе молодых ученых).*

10. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Любetsky В.А., Селиверстов А.В., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г. Answer, the gene lost during evolution in higher vertebrates regulates regeneration and early forebrain development in *Xenopus laevis*. *Сборник тезисов XVI Международной конференции биологии Xenopus (Август 2016, Крит).*

11. Короткова Д.Д., Иванова А.С., Терёшина М.Б., Зарайский А.Г. Ген Answer, утраченный в ходе эволюции у высших позвоночных, регулирует регенерацию и раннее развитие мозга у шпорцевой лягушки. *Сборник тезисов XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления Физико-химической биологии и биотехнологии» (Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Февраль 2016, Москва, Россия).*