

ИВАНОВА

Анастасия Сергеевна

**РОЛЬ ГЕНОВ *AGR* И *RAS-DVA* В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОЗГА И ПРИ
РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИДАТКОВ ТЕЛА У НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2017

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», биологический факультет

Защита диссертации состоится «1» марта 2017 г. в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте ИБХ РАН <http://www.ibch.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук

В. А. Олейников

Характеристика работы

Актуальность проблемы

Изучение механизмов раннего эмбриогенеза у позвоночных одна из самых сложных и важных задач современной биологии. Механизмы репарации клеток или тканей, активация пула стволовых клеток, иммунитет, онкогенез и перерождение здоровых клеток – все это зачастую связано с активацией сигнальных каскадов эмбрионального развития. Таким образом, понимание механизмов регуляции раннего развития могут стать ключом к решению многих биомедицинских задач, в том числе при лечении ряда заболеваний, связанных со старением, нарушением иммунитета, травмами и онкологией. Один из сравнительно слабо изученных механизмов раннего эмбриогенеза – механизм развития переднего мозга, отдела эмбрионального мозга, из которого развиваются, в частности, такие важные структуры взрослого головного мозга, как большие полушария и глаза. В лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН были впервые идентифицированы несколько новых генов, отвечающих за раннее развитие переднего мозга у позвоночных. В том числе, ген не известного ранее семейства гомеодоменных транскрипционных факторов *Anf/Hesx1*, являющийся одним из ключевых регуляторов раннего развития переднего мозга (G.V.Ermakova and others, *Development*, 126 (1999), 4513–23). В ходе поиска геномных мишеней *Anf* у модельного объекта - эмбрионов шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) - были найдены несколько генов, участвующих в развитии мозга. В частности, гены *Ag1* и *Agr2*, кодирующие секретируемые белки, относящиеся к дисульфид изомеразам семейства Agr. Также, в качестве мишени *Anf* был клонирован ген, кодирующий не известную ранее Ras-подобную малую ГТФазу, получившую название *Ras-dva1*. В последствие был найден близкий гомолог *Ras-dva1* - ген *Ras-dva2*. В результате было описано новое семейство Ras-подобных ГТФаз - *Ras-dva* (M. B. Tereshina, A. G. Zaisky and V. V. Novoselov, *Development*, 133.3 (2006), 485–94). В дальнейшем, на основании ряда косвенных данных, было высказано предположение о том, что гены *Agr* и *Ras-dva1*, а также их белковые продукты, могут участвовать в одном и том же, не известном ранее, сигнальном каскаде, регулирующем развитие мозга. Одновременно, в результате филогенетического анализа семейств белков Agr и *Ras-dva* была обнаружена интересная особенность этих семейств, заключающаяся в том, что один из генов *Agr*, а именно ген *Ag1*, а также гены *Ras-dva1* и *Ras-dva2* исчезли в ходе эволюции либо у всех классов высших позвоночных (ген *Ag1*), либо, по крайней мере, у млекопитающих (гены *Ras-dva1* и *Ras-dva2*). Мы предположили, что утрата генов *Ag1* и *Ras-dva* у высших позвоночных, а соответственно, и регулируемого этими генами сигнального каскада, могли сказаться на потере ими каких-то важных физиологических функций, которые до сих пор сохраняются у низших позвоночных. Как известно, одной из таких утраченных высшими позвоночными функций является способность к восстановлению (регенерации) больших придатков тела - конечностей и хвоста. В отличие от высших, многие низшие позвоночные способны полностью восстанавливать утраченные придатки тела. Таким образом, учитывая эволюционные особенности генов *Agr* и *Ras-dva*, их взаимосвязь, в том числе с фактором Fgf8, который является неотъемлемым участником процесса регенерации у амфибий, будет логичным предположить, что аналогичные гены или даже весь сигнальный каскад активируется и в процессе регенерации придатков тела у низших позвоночных. Также было высказано предположение, что одной из причин снижения регенерационной способности у высших позвоночных могло быть нарушение сигнального каскада, регулируемого исчезнувшими в ходе эволюции генами *Ag1* и *Ras-dva*.

Цель работы

Основной целью моей диссертационной работы было, во-первых, изучение сигнального каскада, регулируемого генами *Agr* и *Ras-dva1* в ходе раннего развития переднего мозга у низших позвоночных, а во-вторых, проверка гипотезы о том, что исчезнувшие в ходе эволюции у высших позвоночных гены *Ag1*, *Ras-dva1* и *Ras-dva2* действительно принимают участие в регуляции регенерации больших придатков тела низших позвоночных - рыб и амфибий. Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- Различными методами проверить гипотезу о существовании единого сигнального каскада, включающего в себя гены *Ras-dva1* и *Agr* в ходе раннего развития эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

- Исследовать роль генов *Agr* в ходе регенерации зачатка задней конечности и хвоста головастика шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и плавников рыб *Danio rerio*.

- Исследовать роль генов *Ras-dva* в ходе регенерации зачатка задней конечности и хвоста головастика шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и плавников рыб *Danio rerio*.

Научная новизна

В настоящей работе была обнаружена взаимосвязь генов *Agr* и *Ras-dva* в раннем развитии переднего мозга эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Было впервые показано существование сигнальной петли обратной связи между генами *Agr*, *Ras-dva* и фактором роста фибробластов *Fgf8* между клетками нервной пластинки и клетками прилегающей к ней головной нервной эктодермы. Таким образом, был показан сложный механизм взаимодействия этих генов в раннем нейрогенезе. Любые нарушения экспрессии генов *Agr*, *Ras-dva* ведут к дезорганизации всего сигнального каскада, что в свою очередь приводит к серьезным нарушениям развития важного отдела переднего мозга – теленцефалона или конечного мозга. Различными методами, в том числе с помощью инъекций антисмысловых олигонуклеотидов, подавляющих трансляцию целевых генов, мы продемонстрировали важность генов *Agr* и *Ras-dva* в регуляции сигнального каскада, формирующего конечный мозг. Также, мы впервые показали участие этих генов в процессах регенерации придатков тела у низших позвоночных – рыб и амфибий. Методами количественного ПЦР, гибридизации *in situ*, а также с помощью полученных в ходе работы трансгенных линий лягушек была продемонстрирована активация экспрессии исследуемых генов в регенерирующих органах – хвосте и почке задней конечности головастика *Xenopus laevis* и плавниках рыбы *Danio rerio*. Путем подавления трансляции генов *Agr* и *Ras-dva* морфолиновыми олигонуклеотидами мы показали их необходимость для нормального процесса регенерации.

Практическая значимость

В результате нашего исследования была выявлена сигнальная петля обратной связи между генами *Agr*, *Ras-dva* и фактором роста фибробластов *Fgf8* в процессе раннего развития конечного мозга эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Таким образом, был обнаружен еще один механизм, ответственный за формирование переднего мозга у низших позвоночных. Данные результаты важны с точки зрения эволюции размеров теленцефалона, а также позволяют понять механизмы формирования теленцефалона у высших позвоночных. Полученные данные о вовлеченности генов *Agr* и *Ras-dva* в процесс регенерации придатков тела низших позвоночных позволят глубже понять механизмы регенерации низших позвоночных, а также выявить ключевые этапы регенерации, исчезнувшей у высших позвоночных.

Апробация работы и публикации

Результаты, полученные в данной работе, были представлены на конференции XXV Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 11-16 февраля, 2013, вторая премия на конкурсе молодых ученых). По теме диссертации опубликовано 3 статьи в международных реферируемых журналах, а также 1 статья в российском журнале, 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 и обсуждения”, а также выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 106 ссылок. Работа изложена на 126 страницах печатного текста, содержит 1 таблицу и 46 рисунков.

Основное содержание работы

Литературный обзор

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя два раздела. Первый раздел посвящен описанию процессов раннего нейрогенеза у эмбрионов шпорцевой лягушки, а также механизмам формирования конечного мозга. Во втором разделе представлен обзор механизмов регенерации у низших позвоночных, описаны этапы регенерации, показаны основные молекулярные каскады, вовлеченные в процессы регенерации и заживления ран у низших позвоночных.

Экспериментальная часть

1. Участие генов *Agr* и *Ras-dva1* в раннем развитии мозга эмбрионов африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

1.1 Малая ГТФаза *Ras-dva1* регулирует распространение *Fgf8* сигнала в клетках внешнего слоя передней ненейральной эктодермы.

В ходе своей работы методом гибридизации *in situ* мы показали, что, область экспрессии *Fgf8* совпадает с областью экспрессии гена *FoxG1* (Рис.1; зона 1,2 Б-Б3). Однако, в отличие от *FoxG1*, область экспрессии *Fgf8* локализуется также в клетках внутреннего слоя, расположенного над областью преплакодной эктодермы, где *Ras-dva1* экспрессируется наиболее интенсивно (Рис.1; сравните А и Б). Аналогично *FoxG1*, низкая активность *Fgf8* обнаруживается в клетках наружного слоя будущего диэнцефалона. Также мы показали схожую локализацию транскриптов генов *Ras-dva1* и *FoxG1* в ходе нейруляции на зародышах шпорцевой лягушки. На сериях вибратомных срезов видно, что они активируются в различных группах клеток, а именно: *Ras-dva1* экспрессируются в клетках ростральной части наружного слоя ненейральной эктодермы, над внутренним слоем нейральных клеток будущего зачатка конечного мозга – зоной экспрессии *FoxG1* (Рис.1; Г-Г3). Небольшая активность обоих генов зафиксирована также в наружном слое клеток постериорнее зоны экспрессии *Ras-dva1*. В будущем, эта зона даст начало промежуточному мозгу (diencephalon). Таким образом, можно говорить о том, что для развития теленцефалона необходима коэкспрессия генов *Ras-dva1* и *FoxG1* в двух различных зонах. Кроме того, была показана колокализация транскриптов генов *Agr* – *Xag2* и *Xagr2* (Рис.2; В, локализация *Xagr2* не

представлена) и *Ras-dva1* в клетках наружного слоя преплагодной эктодермы. В соответствии с функциями генов *Agr* и *Ras-dva* и их локализацией относительно других регуляторов развития переднего мозга мы предположили, что существует некий сигнальный механизм обратной связи, задействующий клетки внешнего и внутреннего слоя таким образом, что клетки внешнего слоя продуцируют некий секретируемый фактор, который передается клеткам внутреннего слоя, стимулируя их дифференцировку. Следующим нашим предположением было то, что роль такого секретируемого фактора могут играть секретируемые белки группы *Agr*.

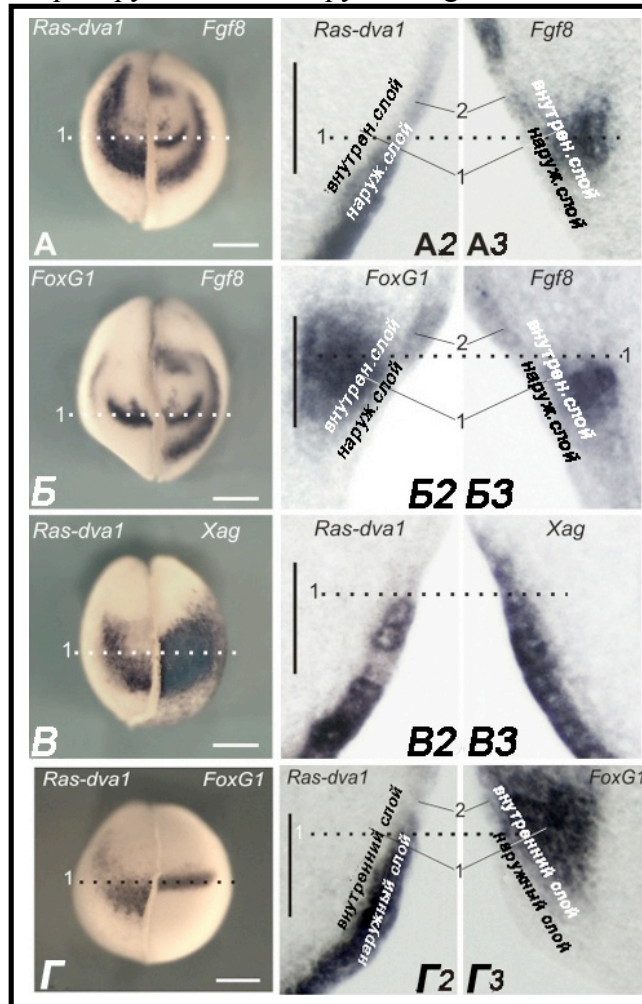
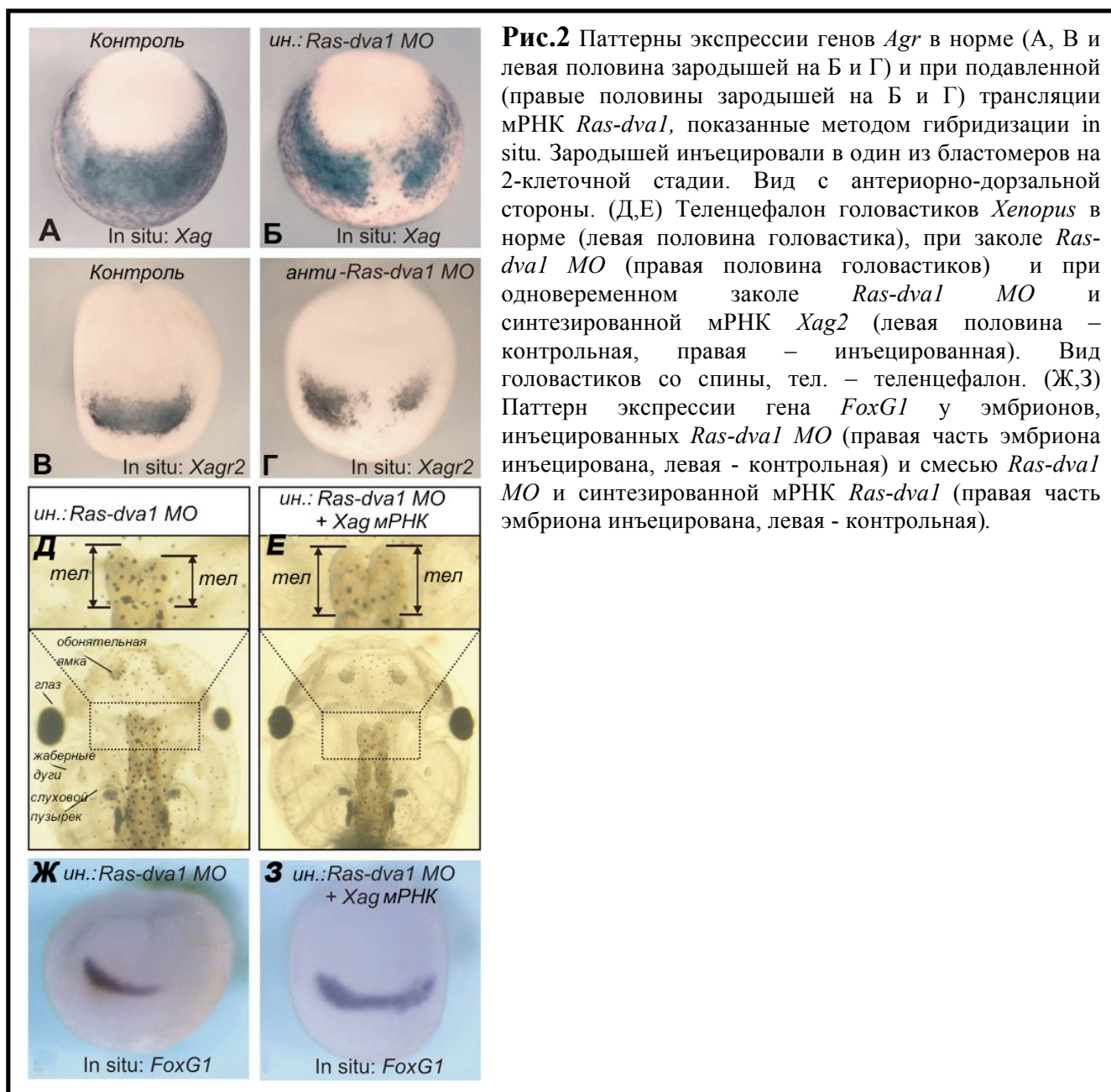


Рис.1 Паттерн экспрессии генов *Ras-dva1*, *Fgf8*, *FoxG1*, *Xag2*, представленный на левой и правой половинах одного зародыша шпорцевой лягушки *Xenopus* на стадии нейрулы (стадия 15) с помощью гибридизации *in situ*. Темно-синяя окраска, проявляющаяся в результате гибридизации *in situ*, маркирует клетки зародыша, содержащие мРНК исследуемых генов. Половинки зародышей были гибридизованы отдельно, затем сложены вместе и сфотографированы с дорзально-антериорной стороны. Пунктирная линия показывает зону экспрессии исследуемых генов. Вибратомные срезы отдельно гибридизованных половинок одного зародыша демонстрируют различную локализацию транскриптов генов. Обозначены области внутреннего и наружного слоя клеток.

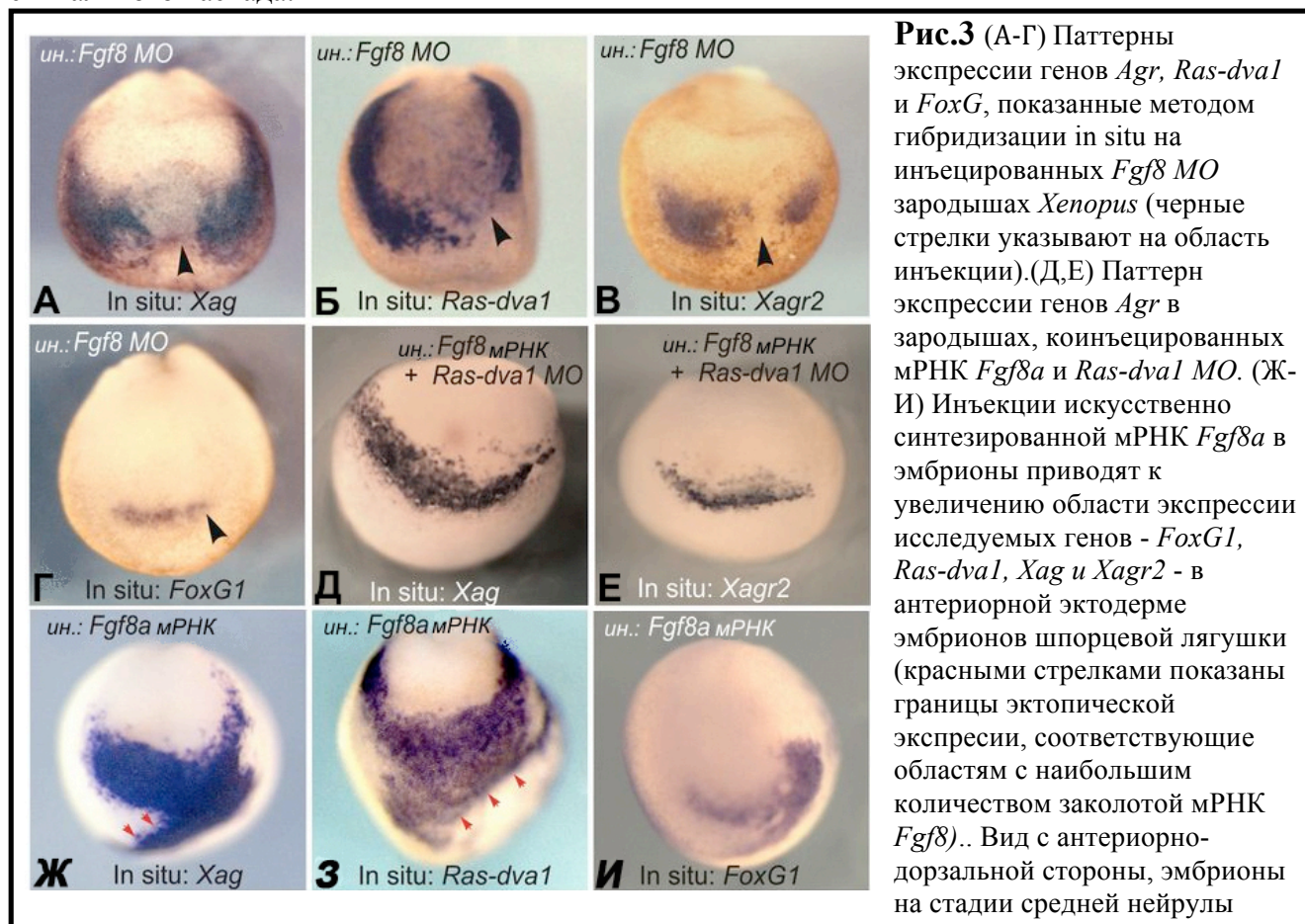
Для проверки этого утверждения мы изучили влияние подавленной экспрессии гена *Ras-dva1* на активность *Agr* генов. Для этого мы использовали антисмысловые морфолиновые олигонуклеотиды - это химически синтезированные анти-смысловые олигонуклеотиды, незаряженные ДНК-миметики, которые связываются с 5'-НТО мРНК *Ras-dva1*, тем самым препятствуют посадке рибосомы на мРНК и, следовательно, блокируют синтез белка. Мы зафиксировали значительное уменьшение экспрессии генов *Agr* и *FoxG1* в области закола у зародышей *Xenopus* на стадии средней нейрулы (ст.15), а также уменьшение телэнцефалона и глаз у головастика (ст.45) (Рис.2; Б,Г,Д,Ж). В то же время при заколе контрольных морфолино *misRas-dva1* никаких изменений в экспрессии исследуемых генов отмечено не было (Рис.2; А,В). Важно отметить, что для восстановления нормального паттерна экспрессии гена *FoxG1* и а также структуры переднего мозга дикого типа было достаточно вместе с морфолино *Ras-dva1* инъектировать искусственно синтезированную мРНК *Xagr2* или *Xag* (эквивимлярная смесь *Xag1* и *Xag2*) (Рис.2; Е,З). Эти данные указывают на то, что *Agr* являются частью сигнального каскада *Ras-dva1* - *Fgf8* - *FoxG1*, причем активируются “ниже” *Ras-dva1* в этом каскаде.



Также мы провели серию экспериментов по подавлению трансляции мРНК *Fgf8* путем введения морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов. Инъецированные эмбрионы были проанализированы методом гибридизации *in situ*. Так стало очевидно, что подавленная активность гена *Fgf8a* ведет к подавлению экспрессии генов *Agr*, *Ras-dva1* и *FoxG1* (Рис.3; А-Г). Интересно, что ко-инъекция *Fgf8a MO* и мРНК *Ras-dva1* ведет к тому, что характерный для эмбрионов дикого типа профиль экспрессии *Agr* у инъецированных эмбрионов не восстанавливается (Рис.3; Д,Е). Методом инъекции искусственно синтезированной мРНК гена *Fgf8* мы смогли оценить влияние оверэкспрессии *Fgf8* на активность генов *Agr*. Было отмечено существенное расширение области экспрессии генов *Agr* в anteriорной части ненейральной эктодермы (Рис.3; Ж, для *Xagr* не показан). Кроме того, наблюдалось увеличение экспрессии генов *Ras-dva1* и *FoxG1* (Рис.3; З, И).

Таким образом, мы подтвердили, что фактор роста фибробластов *Fgf8a* влияет на экспрессию секретируемых белков группы *Agr*, активируя процесс передачи сигнала малой ГТФазой *Ras-dva*. Соответственно, мы заключили, что сигнал от фактора *Fgf8*, продуцируемый клетками передней части нервной пластинки необходим для активации экспрессии *Agr* и *Ras-dva1* в клетках внешнего слоя прилегающего не нейральной эктодермы,

в то же время индукция *Ras-dva1* в этих клетках имеет решающее значение для всего сигнального каскада.



1.2 Белки *Agr* участвуют в процессе передачи сигнала между клетками ANB и клетками прилегающей ненейральной ectодермы

В предыдущих экспериментах мы показали, что гены *Xag2* и *Xagr2* являются участниками сигнального каскада *Fgf8*. Далее мы исследовали влияние белков *Agr* на экспрессию *FoxG1* – раннего маркера проспективного конечного мозга. Этот ген кодирует транскрипционный фактор, который участвует в процессах регионализации и роста глазного пузыря и полушарий конечного мозга. Для проверки этого предположения был смоделирован и проведен ряд экспериментов на эмбрионах с подавленной *Xenopus* трансляцией генов *Xag* и *Xagr2*. Инъекции морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов *Xag* и *Xagr2* осуществляли в 2-а blastомера (дорсальный и вентральный) на левой стороне 4/8 клеточных эмбрионов *Xenopus*. При этом, на заколотой половины зародышей наблюдали следующие аномалии развития: редуцированные теленцефалон, обонятельная ямка, слуховой пузырек, глаза и жаберные дуги (Рис.4). Аналогичные эффекты наблюдались при подавлении функции *Ras-dva1* (Рис.2).

Мы доказали, что подавление функции *Agr* ведет к недоразвитию структур конечного мозга, что, вероятно, связано с ингибированием важных генов-регуляторов. Действительно, методом гибридизации *in situ* было показано уменьшение области экспрессии генов *FoxG1* и *Fgf8* у зародышей, инъектированных *Xag2 MO*. Интересным оказалось то, что экспрессия *Ras-dva1* тоже оказалась подавленной (Рис.5; А-В). Мы предположили наличие регуляторной петли обратной связи между *Ras-dva1* и *Agr*, учитывая подавление экспрессии *Agr* путем инактивации *Ras-dva1*. Вероятно, фактор *Fgf8* тоже является участником этой сигнальной петли, поскольку его экспрессия также регулируется наличием белков *Agr* и малой ГТФазы

Ras-dva1. Подавление функции *Ras-dva1* ведет к снижению экспрессии *Fgf8* и, как следствие, происходит подавление всего каскада, в частности *FoxG1* (Рис.5; Г). В тоже время, при ингибированной активности *Fgf8* ни мРНК *Agr*, ни мРНК *Ras-dva1* не способны восстанавливать нормальный профиль экспрессии *FoxG1* (Рис.5; Д,Е). Таким образом, мы пришли к выводу, что *Agr* контролируют экспрессию *FoxG1* посредством стимуляции экспрессии *Fgf8*. Но, как и в случае с *Ras-dva1*, экспрессия *Agr* необходима для активации *FoxG1* не только как активатор *Fgf8*, но и в качестве самостоятельного индуктора. Было показано, что совместном введении *Agr* MO и мРНК *Fgf8* экспрессия *FoxG1* оставалась подавленной (Рис.5; Ж,З).

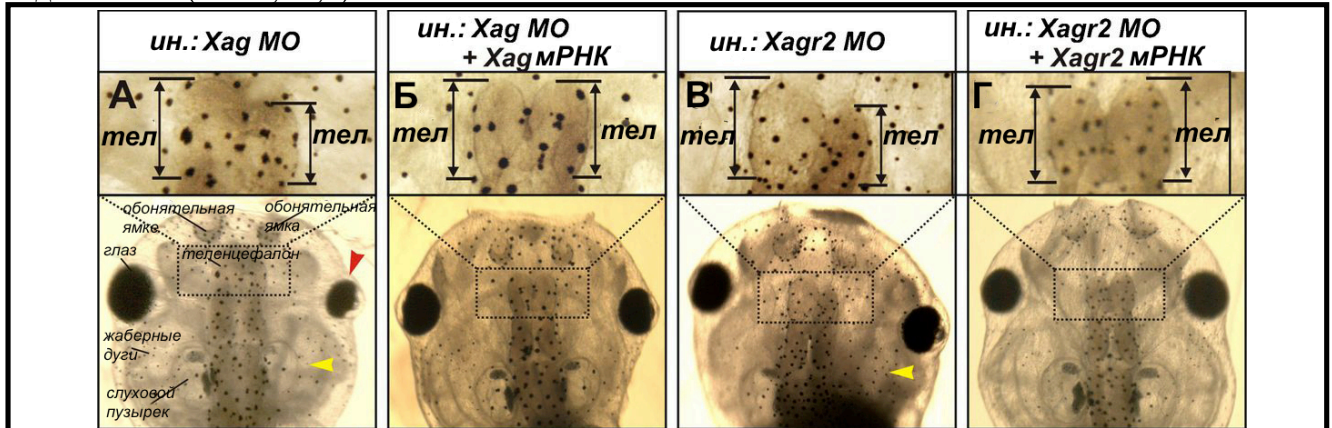


Рис.4 (А,В) Головастики с подавленной функцией генов *Hax2* и *Haxr2*. Инъецирована правая половина головастика, левая - контрольная. Вид со спины, 45 стадия. (Б,Г) Восстановление нормальной структуры теленцефалона у головастика, инъецированного смесью *Hax2* MO + мРНК *Hax2* и *Haxr2* MO + мРНК *Haxr2*. Желтые стрелки указывают на ушные везикулы, красные - на глаза.

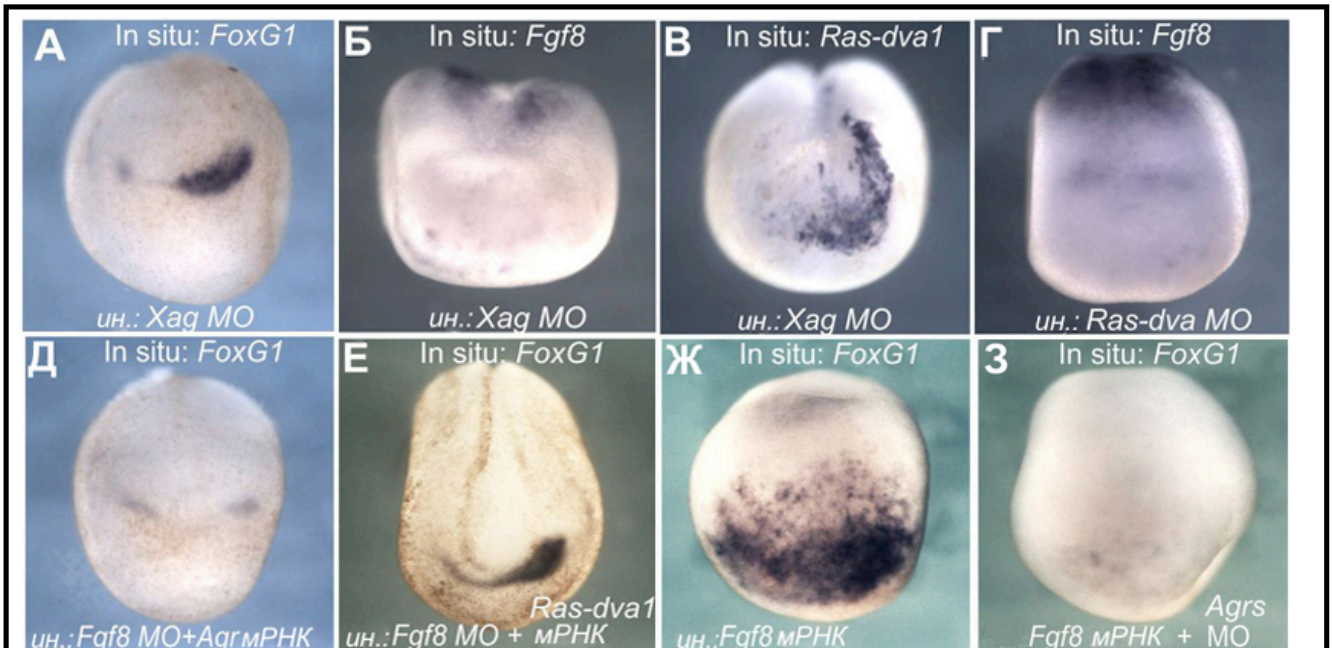


Рис.5 (А-В) Паттерны экспрессии генов *FoxG1*, *Fgf8* и *Ras-dva1*, показанные на инъецированных *Hax2* MO зародышах методом гибридизации in situ. (Г) Подавление экспрессии *Fgf8* в зародышах *Xenopus* при инъекции *Ras-dva1* MO. (Д) Ко-инъекция мРНК *Agr* (эквивимоллярной смеси мРНК *Hax1*, *Hax2*, *Haxr2A* и *Haxr2B*) или (Е) мРНК *Ras-dva1* не спасает подавленную *Fgf8* MO экспрессию *FoxG1*. (Ж) Инъекция мРНК *Fgf8* стимулирует обширную эктопическую экспрессию *FoxG1* в передней эктодерме. (З) Смесь *Agr* MO (смесь морфолино *Hax* и *Hagr*) подавляет индуцированную мРНК *Fgf8* эктопическую экспрессию *FoxG1*. Зародыши на стадии нейрулы, вид с дорзально-антериорной стороны.

1.3 Фактор *Otx2* – участник сигнального каскада *Fgf8*

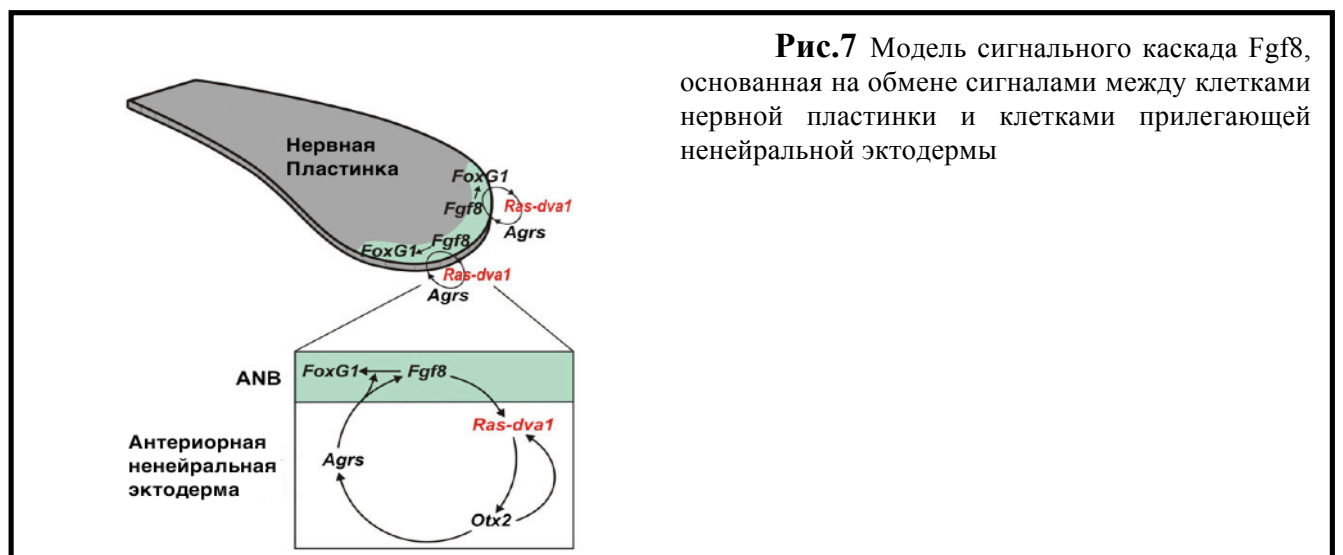
Ранее в нашей лаборатории была показана взаиморегуляция малой ГТФазы *Ras-dval* и транскрипционного фактора *Otx2* (М. В. Tereshina, А. G. Zaraisky and V. V. Novoselov, *Development*, 133.3 (2006), 485–94). Ген *Otx2* – представитель семейства гомеобокс-содержащих генов, кодирующий транскрипционный фактор. Его экспрессия важна для развития переднего и среднего отделов мозга, а так же для формирования присоски. Мы продемонстрировали, что активация *Ras-dval*-зависимого *Fgf8* сигналинга индуцирует экспрессию *Agrs* путем регуляции экспрессии *Otx2*.

Для начала мы проанализировали локализацию транскриптов *Otx2* в процессе нейруляции зародышей *Xenopus* методом гибридизации *in situ*. На вибротомных срезах продемонстрирована экспрессия гена *Otx2* в клетках внешнего слоя передней эктодермы, то есть области экспрессии генов *Agr*, *Ras-dval* и *Otx2* в презумптивном теленцефалоне совпадают (Рис.6; А-В). Далее мы изучили эффекты подавления *Fgf8* сигнала на активность *Otx2*, путем микроинъекций *Fgf8 MO* в зародыши *Xenopus*. В результате, наблюдалось уменьшение экспрессии *Otx2* в тех областях, где этот ген экспрессируется наиболее интенсивно в нормальном развитии, то есть в клетках будущей присоски и среднего мозга (Рис.6; Г, Д). Тем не менее, подавление экспрессии *Otx2* было не полным и низкий уровень экспрессии по-прежнему сохранялся во всех клетках. Интересным оказалось то, что при подавлении функции *Fgf8* происходит подавление экспрессии *Otx2* в передней части нервной пластинки и расширение экспрессии в боковой и задней ее частях. Этот результат указывает на то, что активность *Fgf8* имеет важное значение как для усиления экспрессии *Otx2* в клетках презумптивного среднего мозга и присоски, так и для ограничения экспрессии в этих областях. На более поздних стадиях ингибирование экспрессии *Otx2* путем инъекций *Fgf8 MO* в эмбрионы коррелирует с уменьшением присоски и среднего мозга, т.е. тех анатомических структур, развитие которых контролируется *Otx2*. В целом можно сказать, что эффекты подавления экспрессии *Otx2* схожи с эффектами подавления *Agr* и *Ras-dval*. Учитывая, что транскрипционный фактор *Otx2* является активатором *Agr* и *Ras-dval*, было важно проанализировать экспрессию последних на эмбрионах с подавленной активностью *Otx2*. У зародышей, инъектированных *Otx2 MO*, мы наблюдали значительное снижение активности генов *Agr* и *Ras-dval* (рис. 6; Е-И). Важно, что эти эффекты закола *Otx2 MO* сохранялись и при ко-инъекции мРНК *Fgf8*, которая в отсутствии *Otx2 MO* значительно индуцирует экспрессию *Ras-dval* и *Agrs* (Рис. 6; К-Н). Также мРНК *Otx2* восстанавливает нормальный профиль экспрессии *Xag* при подавлении *Fgf8* сигналинга. В то же время, мы обнаружили, что активность *Otx2* очень важна для поддержания экспрессии *Fgf8*: снижение экспрессии *Fgf8* наблюдалось у зародышей, инъектированных *Otx2 MO* (Рис.6; О,П). Этот результат подтверждает участие *Otx2* в сигнальной петле обратной связи между клетками ANB и клетками прилежащей передней ненейральной эктодермы.



1.4 Создана новая модель сигнальной петли обратной связи

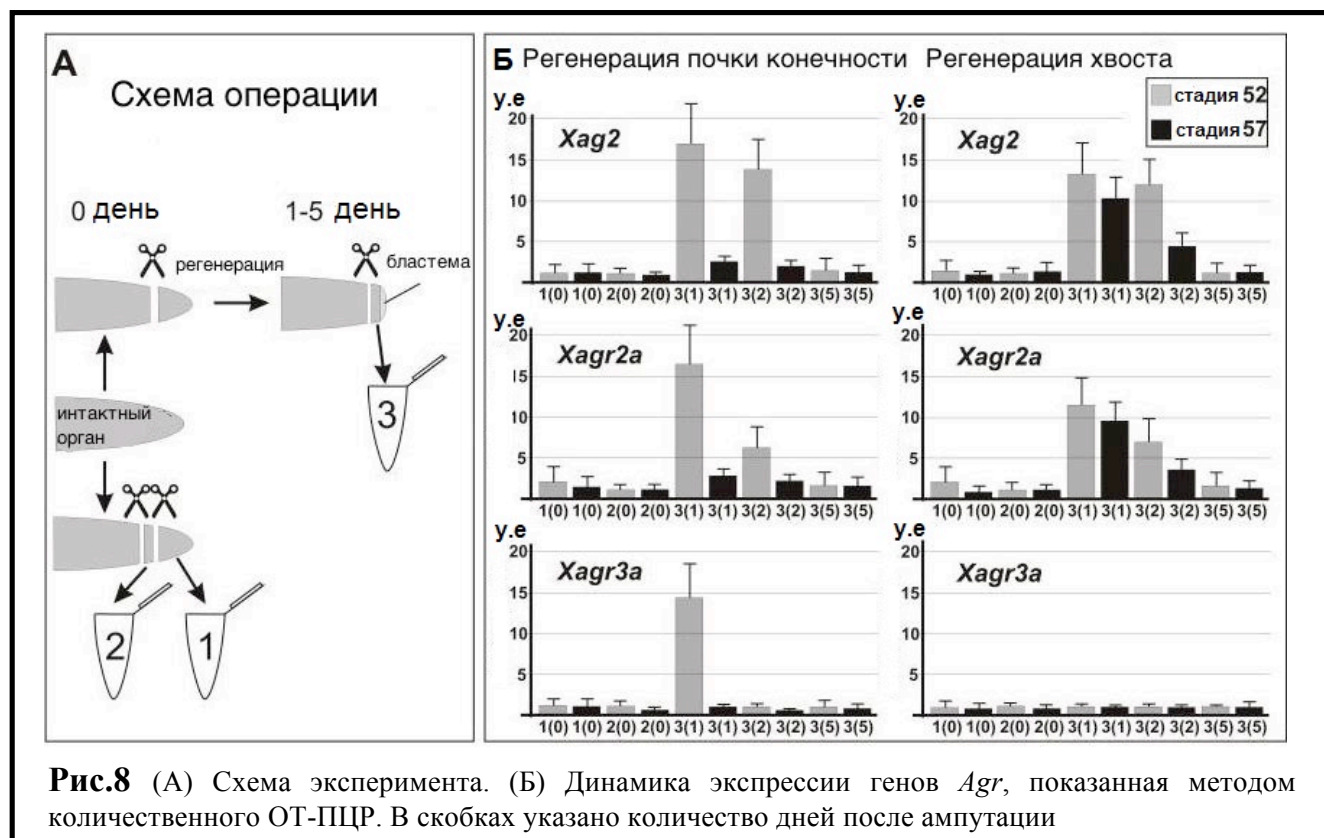
Все эти данные позволяют сконструировать модель, в которой клетки ANB продуцируют Fgf8, который через активацию *Ras-dva1* и *Otx2* индуцирует экспрессию *Agrs* в прилегающих клетках ненейральной эктодермы. В свою очередь, белки Agr, секретируемые клетками передней ненейральной эктодермы регулируют развитие конечного мозга, как путем стимуляции экспрессии Fgf8 в клетках ANB, а также активируя следующие мишени Fgf8 сигнального каскада (Рис.7).



2. Участие генов *Agr* в регенерации придатков тела низших позвоночных.

2.1 Активация генов *Agr* в регенерации хвоста и почки задней конечности головастика *Xenopus laevis*.

Исходя из данных филогенетического анализа, было важно изучить экспрессию представителей синтетических групп генов *Agr* в процессе регенерации головастика *Xenopus laevis*. Анализ содержания мРНК генов *Xag2*, *Xagr2*, *Xagr3* в регенерирующих конечностях и хвостах головастика шпорцевой лягушки мы проводили по одной и той же схеме. У всех исследуемых конечностей и хвостов ампутировали кончик и затем у половины таких ампутантов отрезали еще примерно такую же по линейному размеру часть, которая служила контролем одного и того же проксимо-дистального уровня к регенерационной бластеме другой половины ампутированных конечностей и хвостов. У этой второй половины ампутантов срединную часть отрезали уже вместе с образовавшейся бластемой, после 1-5-и дней регенерации (Рис.8). Сравнительно низкая равномерная экспрессия генов наблюдается в интактных, неампутированных, конечностях и хвостах. Экспрессия *Agr* резко возрастает в дистальной части ампутированных органов, достигая максимума уже на первый день регенерации. При этом на второй день после ампутации наблюдается небольшой спад в активности этих генов, но уровень экспрессии все равно остается выше, чем в неампутированных конечностях и хвостах. Такая динамика экспрессии была показана для генов *Xag2* и *Xagr2*. Для гена *Xagr3* было показано увеличение экспрессии в ампутированных конечностях, но не хвостах. В целом уровень экспрессии гена *Xagr3* был ниже по сравнению с другими генами, т.е. сигнал в ПЦР-амплификаторе фиксируется на более поздних циклах. То, что такое увеличение в экспрессии этого гена является специфичным для регенерации, а не является просто реакцией на рану и воспаление, доказывает эксперимент с головастиками на более поздних стадиях развития, когда регенерация уже отсутствует (стадия 57 на Рис.8).



Также мы изучили локализацию транскриптов генов *Xag2*, *Xagr2* и *Xagr3* методом гибридизации *in situ*. Было показано, что в интактных почках задних конечностей гены *Agr*

экспрессируются на низком уровне. При этом в интактных хвостах гибридационный сигнал отсутствует вовсе. Отчетливое возрастание сигнала *Xag2* и *Xagr2* наблюдается в дистальных частях ампутированных хвоста и почки задней конечности уже через сутки после операции (Рис.9, Ж-О). В то же время экспрессия *Xagr3* не детектировалась даже на 4-й день окрашивания в интактных или ампутированных почках задних конечностей и хвостов. Полученные результаты коррелируют с данными анализа количественного ОТ-ПЦР (см. выше). С помощью гистологических срезов, мы отметили повышение концентрации транскриптов *Xag2* как в клетках эпидермиса и в дистальных клетках бластемы, расположенных под эпидермисом (Рис. 9; М,О). Высокий уровень транскриптов *Xagr2* детектировался главным образом в дистальных клетках эпидермиса (Рис. 9; З,К). Также в качестве независимого контроля для проверки результатов, полученных этими традиционными методами, и визуализации активации экспрессии исследуемых генов непосредственно в живом организме мы использовали трансгенных головастика *Xenopus laevis*, экспрессирующих зеленый флюоресцентный белок под контролем промотора гена *Xag2*. Мы зафиксировали активацию трансгена *Xag2-EGFP* уже через 12 часов после ампутации в дистальной части ампутированной почки задней конечности и в хвосте (Рис.9; А,А',В,В'). Следует отметить, что в хвостах были замечены отдельные клетки, экспрессирующие *EGFP* за пределами регенерирующей бластемы. При этом в контрольных, интактных, почке конечности и в хвосте подобной активации не наблюдалось (Рис.9; Б,Б'). Экспрессия *EGFP* сохранялась и на 1-й, и на 2-й день после операции. Причем наиболее сильная экспрессия флуоресцентного белка наблюдалась на 2 день после ампутации, в бластеме. Флуоресцентный сигнал полностью пропадал в регенерирующих органах на 7-й день после ампутации. Для проверки специфичности сигнала мы ампутировали дистальные части задних конечностей и хвостов у головастика более поздних стадий развития (стадия 57), когда растущие задние конечности уже утрачивают способность к регенерации и, в то же время, такая способность сохраняется у хвоста. Как можно видеть на Рис. 9 (Г-Е'), в отличие от опытов на стадиях 51-52, ни в первый, ни во второй день после операции на стадии 57 активации трансгена в ампутированной конечности не наблюдалось. В то же время, как экспрессия *EGFP* отчетливо детектировалась в бластеме и прилегающих тканях хвоста уже на первый день после операции, что доказывает необходимость генов *Agtr* для нормальной регенерации.

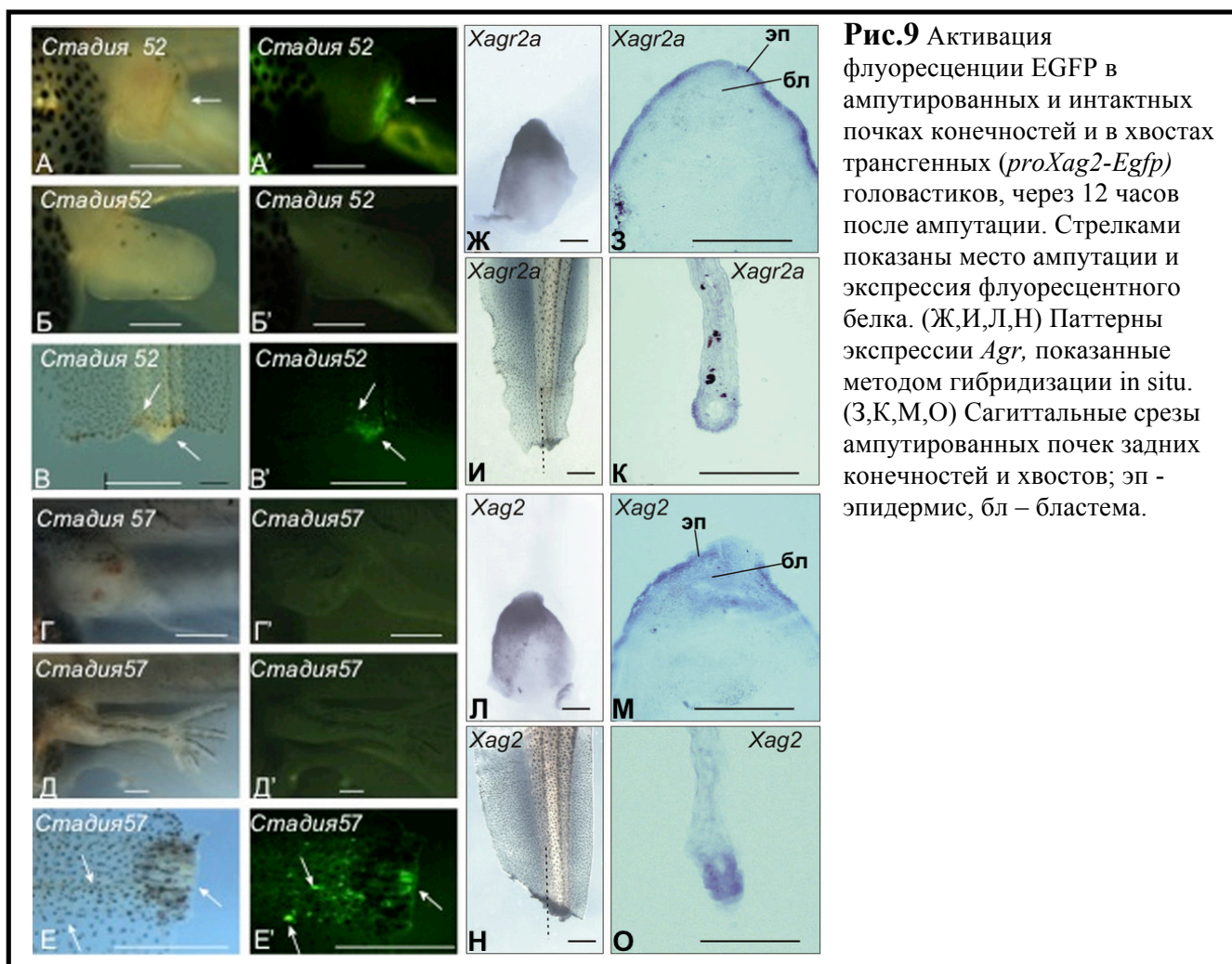
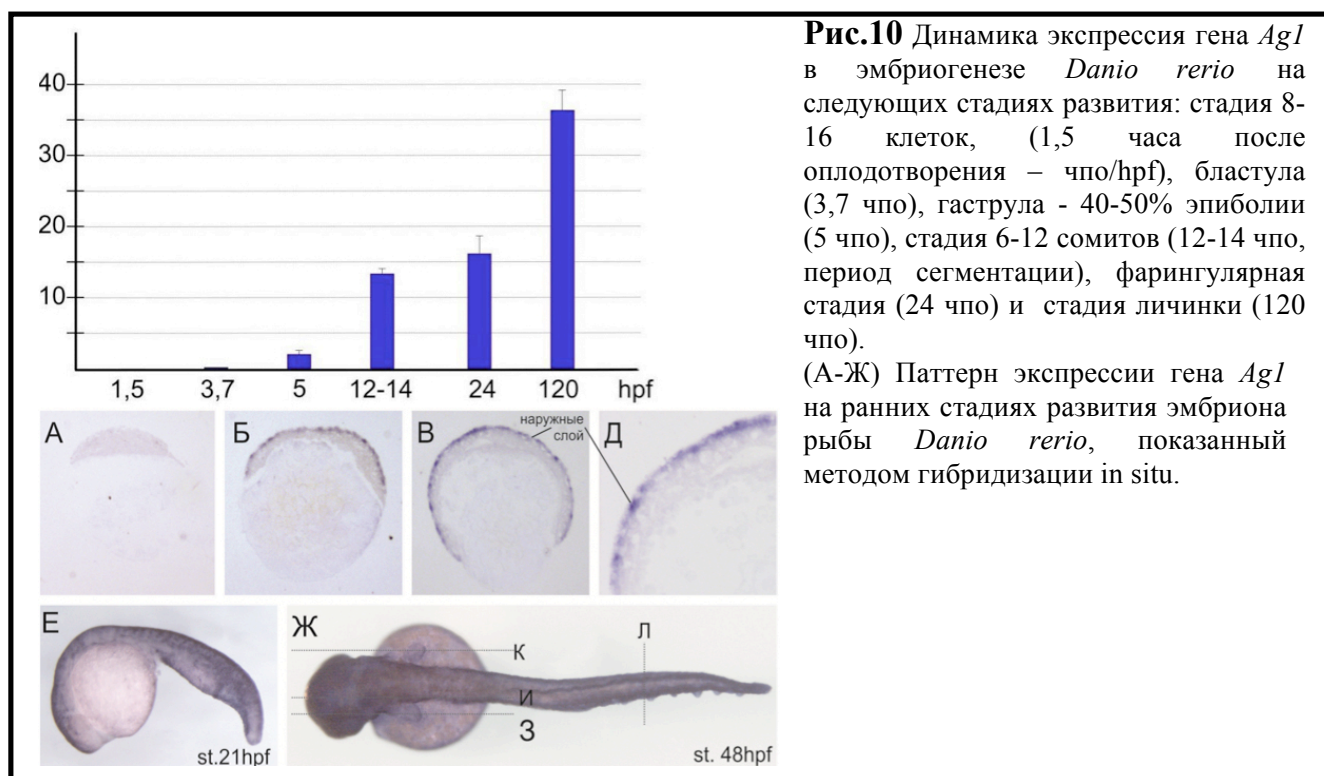


Рис.9 Активация флуоресценции EGFP в ампутированных и интактных почках конечностей и в хвостах трансгенных (*proXag2-Egfp*) головастика, через 12 часов после ампутации. Стрелками показаны место ампутации и экспрессия флуоресцентного белка. (Ж,И,Л,Н) Паттерны экспрессии *Agr*, показанные методом гибридизации *in situ*. (З,К,М,О) Сагиттальные срезы ампутированных почек задних конечностей и хвостов; эп - эпидермис, бл – бластема.

2.2 Активация генов *Agr* в регенерации плавников рыбы *Danio rerio*.

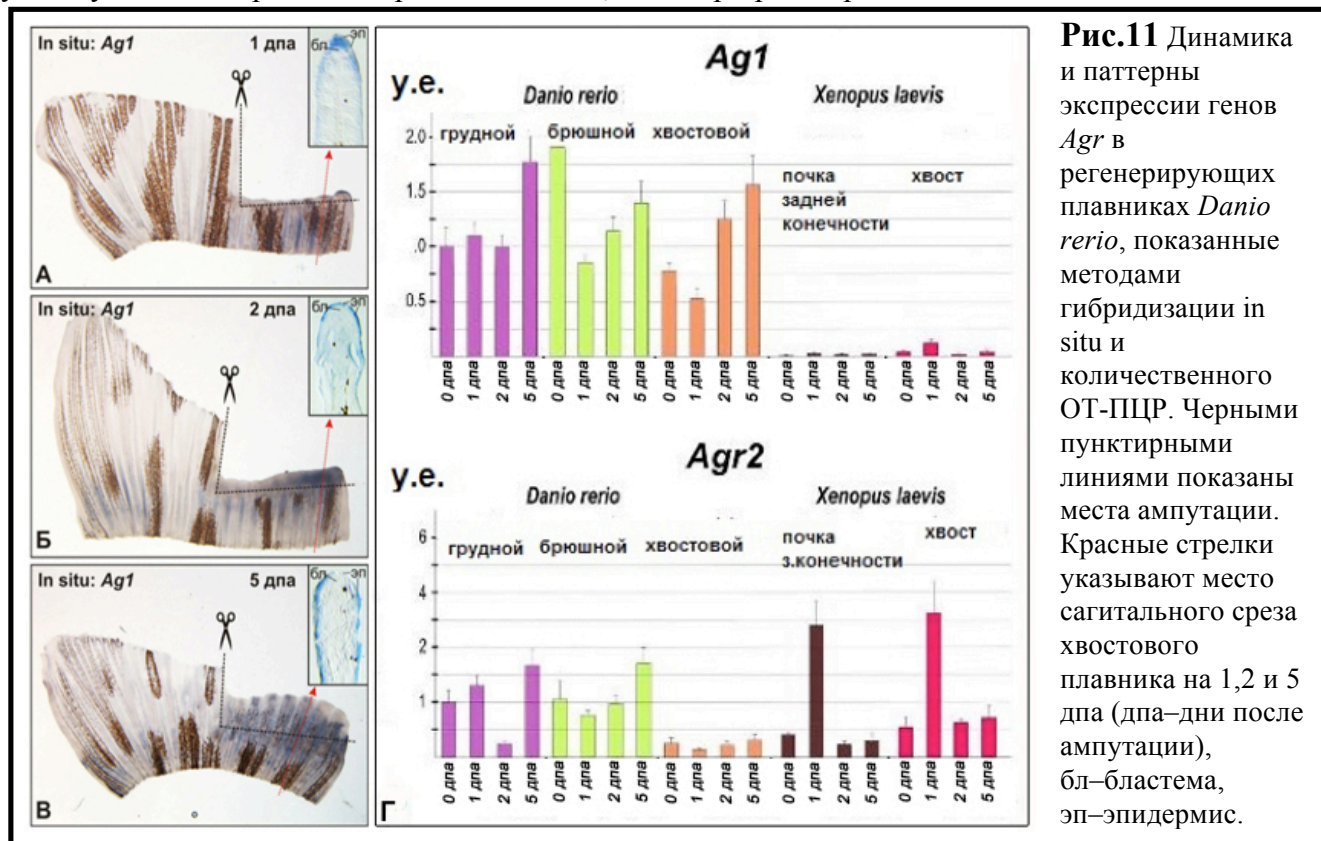
Поскольку данные об активации гена *Ag1* в эмбриональном развитии отсутствовали, мы провели ряд экспериментов, подтвердивших участие этого гена в раннем развитии. Прежде всего, мы изучили временной паттерн экспрессии *Ag1* методом количественного ОТ-ПЦР. В результате мы выяснили, что *Ag1* активируется на стадии перехода от бластулы к гастрULE, его экспрессия заметно увеличивается до достижения личиночной стадии (Рис.10). Методом гибридизации *in situ* мы определили паттерн экспрессии гена *Ag1* в тканях зародыша на последовательных стадиях развития эмбрионов *Danio rerio*. Первый гибридизационный сигнал был детектирован на стадии ранней гастрULE (30-40% эпиболии) (Рис. 10; А). С развитием зародыша экспрессия *Ag1* усиливается. На срезах мы показали поверхностную локализацию транскриптов гена *Ag1* (Рис. 10; Б,В,Д). Также на срезах эмбриона на стадии 48 чпо (часов после оплодотворения) видно, что ген *Ag1* экспрессируется в обонятельном эпителии, глазах, эпителии выстилающем глотку, а также в зачатках плавников (Рис. 10; З,И,К). На стадии 120 чпо можно наблюдать выраженную экспрессию гена в наружном эпителии, покрывающем тело. Также экспрессия была зафиксирована в области зачатков плавников, ротового эпителия, кишечника и печени, жаберном эпителии, в роговице глаза, органах пищеварительной системы - эпителиальных клетках, выстилающих рот, глотку, кишечный эпителий и проктодеум (не показано). Также, при сравнении паттерна экспрессии гена *Ag1* при развитии *Danio rerio* и экспрессии ортологичного гена у *Xenopus laevis*, можно заключить, что ген *Ag1* экспрессируется гораздо сильнее и обширнее.



Мы определили уровень экспрессии генов *Agr* при регенерации плавников *Danio rerio*, методом количественного ОТ-ПЦР. Общей чертой динамики генов *Agl* и *Agr* было некоторое снижение их экспрессии в дистальных частях плавников на первый день после ампутации. В то же время, на более поздних этапах экспрессия обоих генов начинает постепенно увеличиваться, таким образом, что через 5 дней после ампутации она превышает уровень экспрессии в интактных плавниках. Выявленная динамика экспрессии *Agr* в ампутированных плавниках *Danio*, очевидно, отличается от динамики тех же генов в регенерации придатков тела головастика *Xenopus*. Для регенерации плавников *Danio* характерны изначально высокие концентрации транскриптов *Agr* и их снижение спустя сутки после ампутации. Для *Xenopus* ситуация отличная: низкий уровень экспрессии *Agr* в интактных органах и ее увеличение в процессе регенерации. Мы предположили, что концентрации транскриптов нормировочных генов (*EF-alpha* и *ODC*) примерно одинаковы в образцах регенерирующих органов рыб и головастика и зная эффективности сравниваемых генов и сравнили уровни экспрессии *Agr* у этих двух видов. Мы выяснили, что концентрация транскриптов *Agr2* в интактных плавниках *Danio* в среднем в 3-4 раза выше, чем концентрация его ортолога *Xagr2* в придатках тела головастика *Xenopus*, а концентрация *Agl* в 15-20 раз выше концентрации *Xagr2* (Рис. 11; Г). Полученные данные можно объяснить следующим образом: если ген экспрессируется на высоком базовом уровне, то при повреждении его транскрипты немедленно расходуются на регенерацию, вследствие чего сначала уровень экспрессии гена снижается, а затем возрастает до базового уровня. И наоборот если ген, участвующий в регенерации экспрессируется на низком базовом уровне, то в случае повреждения его экспрессия быстро активируется и затем снижается до базового уровня. Результаты показали, что динамика экспрессии генов *Agr* в различных плавниках (грудной, брюшной и хвостовой) одинакова, поэтому для удобства дальнейших исследований мы использовали хвостовые плавники. Кроме того, мы сосредоточились на исследовании экспрессии и функции только одного гена - *Agl*, т.к. во-первых, данные по его активности в регенерации отсутствуют, а во-

вторых, он представляется нам особенно интересным с точки зрения эволюции, поскольку пропадает у высших позвоночных.

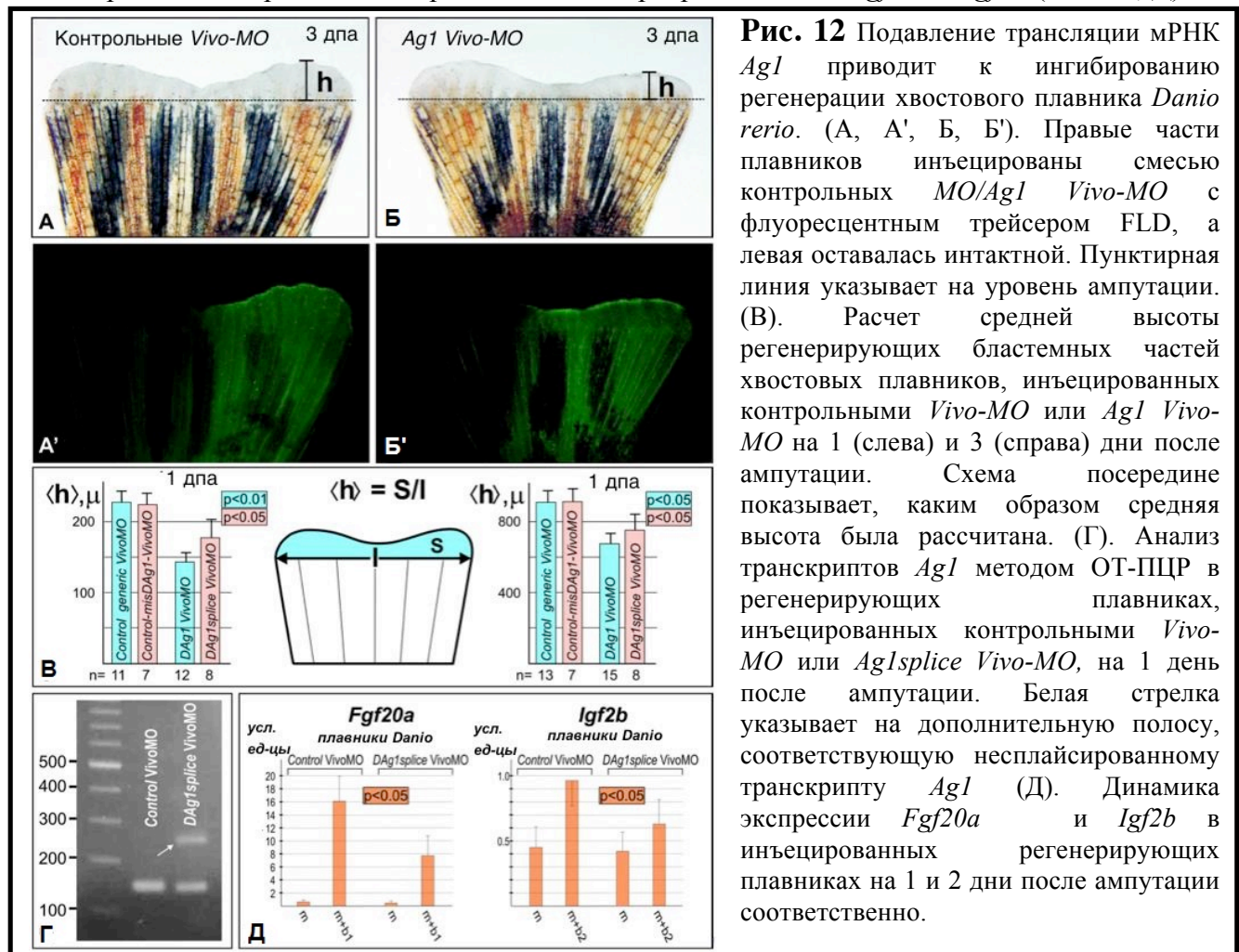
Для определения локализации клеток, экспрессирующих *Ag1* в процессе регенерации хвостового плавника на 1, 2 и 5 дни после ампутации, мы использовали метод гибридизации *in situ* (Рис.11 А-В). Для более детального анализа гибридизационного сигнала часть хвостовых плавников после гибридизации *in situ* были заключены в парафин и использованы для получения срезов. (Рис.11, А-В, вставки фотографий в верхних правых углах). Уже на первый день после ампутации ген *Ag1* начинает активно экспрессироваться в области эпидермальной шапочки, под которой начинает формироваться бластема. Далее, на 2 и 5 день, уровень экспрессии возрастает, и клетки, содержащие мРНК *Ag1*, локализуются в эпидермальном слое регенерата. Стоит отметить, что в контрольной (интактной) половине хвостового плавника так же была детектирована небольшая экспрессия *Ag1*, что может говорить о том, что ген *Ag1* участвует как в нормальном росте плавника, так и при регенерации.



Для проведения функционального анализа роли гена *Ag1* в процессах регенерации, мы ингибировали трансляцию его мРНК путем инъекции антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (*Vivo-MO*) в ампутированные хвостовые плавники. *Vivo*-морфолино – синтетические морфолиновые олигонуклеотиды, способные проникать в клетку благодаря остатку окта-гуанидин дендримера и подавлять трансляцию целевой мРНК путем связывания с областью инициации трансляции. Мы блокировали трансляцию мРНК *Ag1*, путём микроинъекций *vivo*-морфолино в область костных лучей рядом с местом ампутации. При этом наблюдали заметное снижение темпов регенерации по сравнению как с неинъектированным контролем, так и инъектированным *misAg1 Vivo-MO/control Vivo-MO*. Полученные данные говорят о том, что подавление трансляции мРНК гена *Dag1* значительно ингибирует регенерацию хвостового плавника (Рис. 12; А-В) Для проверки специфичности

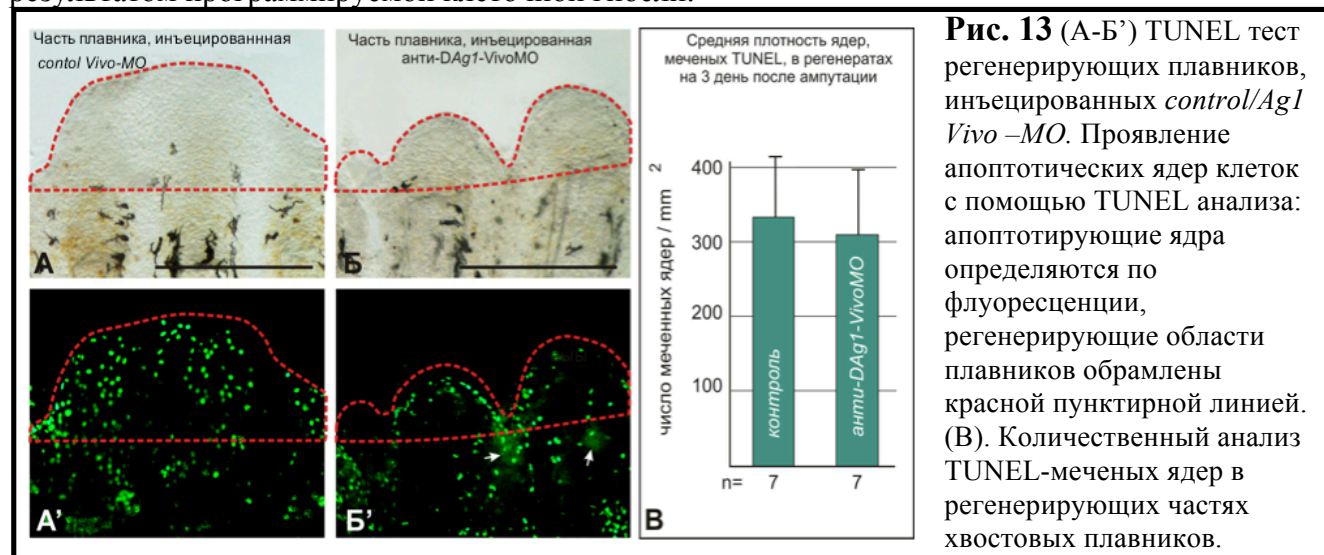
эффекта *Ag1 Vivo-MO*, мы использовали другой тип *Vivo-MO*, блокирующий сайт сплайсинга на границе 2 экзона и 2-3 интрона гена *Ag1*. Блокирование этого сайта сплайсинга ведет к сдвигу рамки считывания (не происходит сплайсинга) и, как следствие, размер мРНК *Ag1* увеличивается. При инъектировании такого типа морфолино - *Ag1splice Vivo-MO* – мы наблюдали менее выраженное снижение темпа регенерации по сравнению с *Ag1 Vivo-MO*. Методом ОТ-ПЦР была детектирована увеличенная несплайсированная мРНК *Ag1*, в то время как в контрольной группе этот транскрипт отсутствовал (Рис. 12; Г). Очевидно, что этот результат подтверждает специфичность *Ag1splice Vivo-MO* и их способность проникать в ядро. Отсутствие абсолютного подавления можно объяснить тем, что при инъекции только часть *Vivo-MO* способны проникнуть в ядра клеток, преодолев межклеточное пространство и цитоплазму.

Следующим этапом нашего исследования стал анализ динамики экспрессии генов *Fgf20a* и *Igf2b* – маркеров регенерации. Методом количественного ОТ-ПЦР мы смогли оценить уровень экспрессии этих генов для плавников, инъектированных *Ag1splice Vivo-MO*, относительно контроля. В результате, было отмечено хоть и небольшое, но статистически достоверное ингибирование экспрессии обоих маркерных генов - *Fgf20a* и *Igf2b* (Рис. 12; Д).



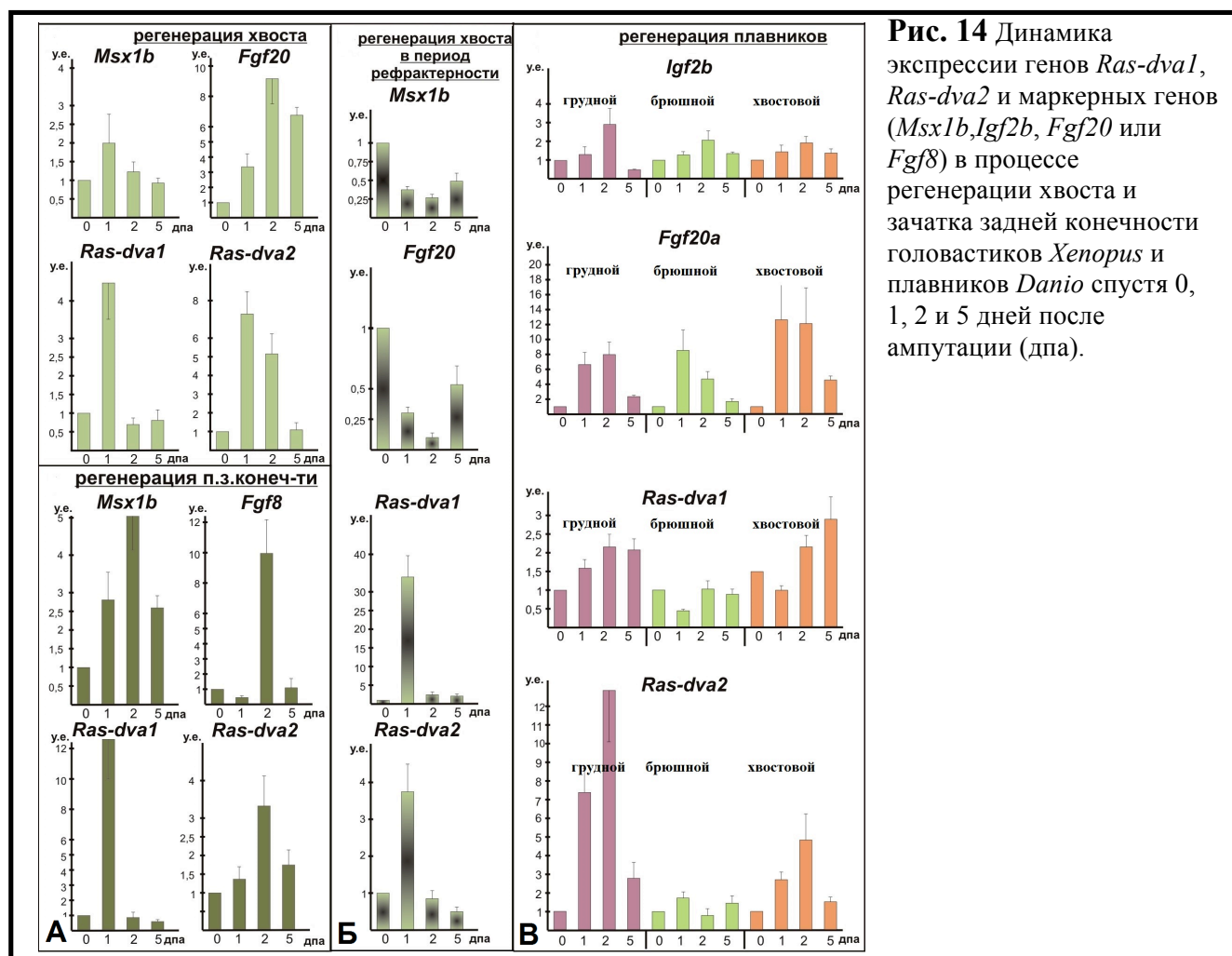
И, наконец, чтобы проверить, не является ли такое подавление регенерации результатом активации неспецифического апоптоза, мы проанализировали количество апоптотических клеток в плавниках, инъектированных control *Vivo-MO* (контроль) или *Ag1 Vivo-MO* (опыт), с помощью TUNEL теста. В результате, не было выявлено никакой статистически значимой разницы в средней концентрации апоптотических клеток в контрольных и опытных регенерирующих плавниках (Рис. 13). Таким образом, мы пришли к

выводу, что наблюдаемый нами эффект подавления регенерации плавников не является результатом программируемой клеточной гибели.



3. Участие генов *Ras-dva* в регенерации придатков тела низших позвоночных.

В первую очередь, мы исследовали временные паттерны экспрессии генов *Ras-dva* в процессе регенерации придатков тела *Xenopus* и *Danio* с помощью метода количественного ОТ-ПЦР. Динамику экспрессии маркерных генов *Fgf20a* и *Igf2b* использовали для оценки эффективности процесса регенерации в плавниках *Danio*, и динамику генов *Msx1b* и *Fgf20* – для почки конечности и хвоста головастика *Xenopus*. Мы обнаружили значительное увеличение уровня экспрессии генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* спустя сутки после ампутации в регенерирующем хвосте и почке задней конечности головастика *Xenopus* (Рис.14; А). Интересно, что уже на второй день уровень экспрессии гена *Ras-dva1*, в отличие от *Ras-dva2*, снизился до базального уровня интактного органа. К 5 дню активности генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* пришли к нормальным доампутационным значениям. Такой характер экспрессии свидетельствует об участии обоих генов на ранних этапах активации регенерационного механизма. Важно отметить, что профили экспрессии генов *Ras-dva* в регенерирующих хвостах совпадают на различных стадиях развития - 40-41 и 52-54 стадии, что указывает на то, что молекулярный механизм активации не является стадиоспецифичным и не связан с процессом эмбриогенеза. Аналогичная динамика активации экспрессии *Ras-dva1* и *Ras-dva2* была детектирована при регенерации грудных, брюшных и хвостовых плавников *Danio* (Рис. 14; В) Спустя 5 дней после ампутации уровень экспрессии гена *Ras-dva2* снижается до базального, в то время как экспрессия *Ras-dva1* сохраняется высоким уровне. Интересно, что при ампутации хвоста *Xenopus* в течение рефрактерного периода (стадии 45-47), когда по неизвестным причинам регенерация блокируется на некоторое время, мы наблюдали значительное повышение уровня экспрессии *Ras-dva1* и *Ras-dva2* на первый день после ампутации и резкое снижение на второй (Рис. 14, Б). Известно, что во время рефрактерного периода активируются механизмы заживления раны, в то время как формирование регенерационной бластемы блокируется. Наблюдаемая нами индукция генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* генов спустя сутки после ампутации, вероятно, указывает на участие этих генов в процессе заживления раны. В то же время, следующий за этим спад активности до нормальных значений говорит о том, что идет процесс подавления активности этих генов вместе с ингибированием процесса формирования бластемы. Таким образом, можно говорить о вовлеченности этих генов в процессы заживления раны и формирования бластемы.



Методом гибридизации *in situ* мы подтвердили данные количественного ОТ-ПЦР, а также получили информацию о локализации клеток с повышенной экспрессией генов *Ras-dva* в регенерирующих органах. Интересно, что в регенерирующих хвостах и конечностях головастика *Xenopus* зоны экспрессии генов *Ras-dva* не совпадают: *Ras-dva1* активируется в раневом эпителие (слабее), в клетках бластемы и ното хорда (сильнее), в то время как транскрипты *Ras-dva2* детектируются исключительно в клетках бластемы (Рис.15; А,Б,Г,Д). В качестве контроля мы использовали sense-зонд, который помогает выявить неспецифическое окрашивание. В данном случае в контроле такого окрашивания не было, что подтверждает специфическую активацию *Ras-dva* генов в регенерирующих органах. Также мы наблюдали сильную активацию генов *Ras-dva* в плавниках *Danio* спустя сутки после ампутации (Рис. 15; Ж, З), в то время как на 5 сутки гибридизационный сигнал практически не фиксировался (Рис. 15; Л, М), что вполне согласуется с данными количественного ОТ-ПЦР.

Для изучения пространственно-временного паттерна экспрессии генов *Ras-dva* мы также создали линию трансгенных лягушек *proRas-dva1-EGFP*, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок под контролем промотора гена *Ras-dva1*. Общий паттерн экспрессии трансгена *proRas-dva1-EGFP* у головастика на 46 стадии развития согласуется с литературными данными по локализации экспрессии *Ras-dva1* у головастика *Xenopus*. (Рис.16; А-А'). Паттерн флуоресценции EGFP в регенерирующих органах трансгенных головастика на 52 стадии также вполне согласуется с данными полученными ранее. Флуоресценция EGFP активировалась спустя 24 часа и достигала своего максимума на 2-е сутки после ампутации в дистальных частях хвостов и зачатках задних конечностей трансгенных головастика и исчезала к 5-6 дню (Рис. 16; Б,Б',Г,Г'). На сагитальных срезах можно увидеть, что трансген активируется в клетках эпителия и бластемы, что согласуется с

данными гибридизации *in situ* (Рис. 16; В, В', Д, Д'). Важно отметить, что у трансгенных головастика также детектировали флуоресценцию EGFP в нотохорде.

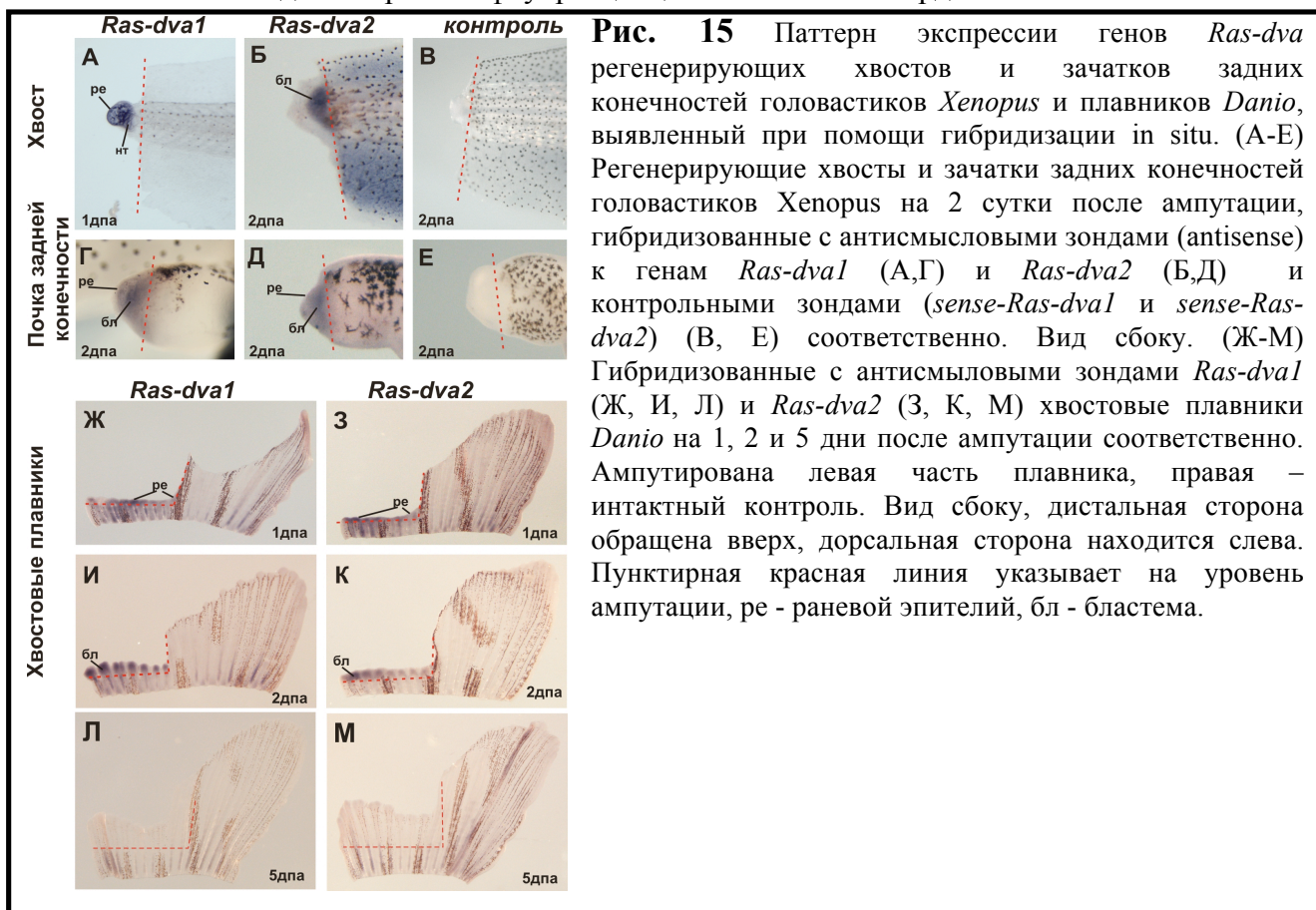


Рис. 15 Паттерн экспрессии генов *Ras-dva* регенерирующих хвостов и зачатков задних конечностей головастика *Xenopus* и плавников *Danio*, выявленный при помощи гибридизации *in situ*. (А-Е) Регенерирующие хвосты и зачатки задних конечностей головастика *Xenopus* на 2 сутки после ампутации, гибридизованные с антисмысловыми зондами (antisense) к генам *Ras-dva1* (А,Г) и *Ras-dva2* (Б,Д) и контрольными зондами (*sense-Ras-dva1* и *sense-Ras-dva2*) (В, Е) соответственно. Вид сбоку. (Ж-М) Гибридизованные с антисмысловыми зондами *Ras-dva1* (Ж, И, Л) и *Ras-dva2* (З, К, М) хвостовые плавники *Danio* на 1, 2 и 5 дни после ампутации соответственно. Ампутирована левая часть плавника, правая – интактный контроль. Вид сбоку, дистальная сторона обращена вверх, дорсальная сторона находится слева. Пунктирная красная линия указывает на уровень ампутации, ре - раневой эпителий, бл - бластема.

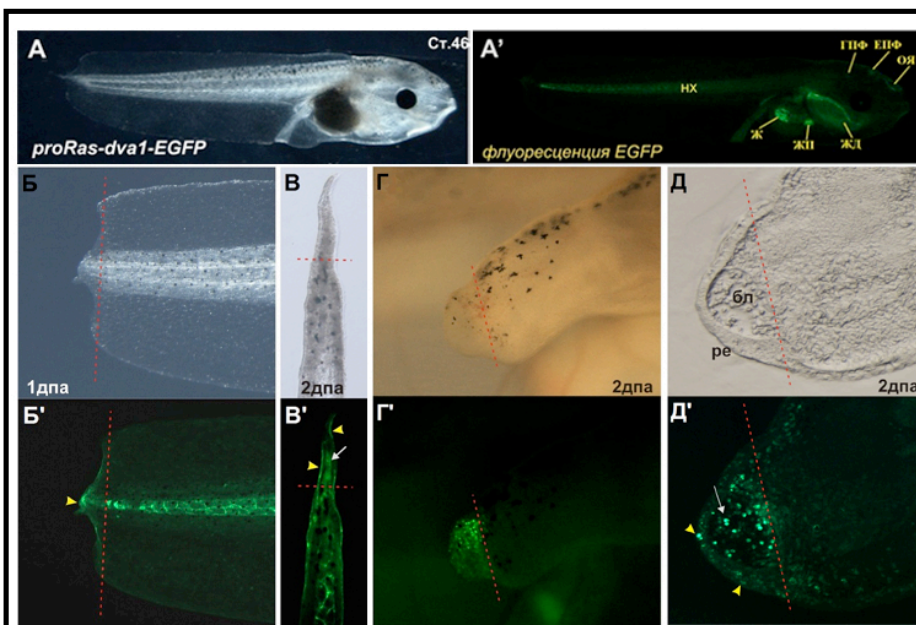
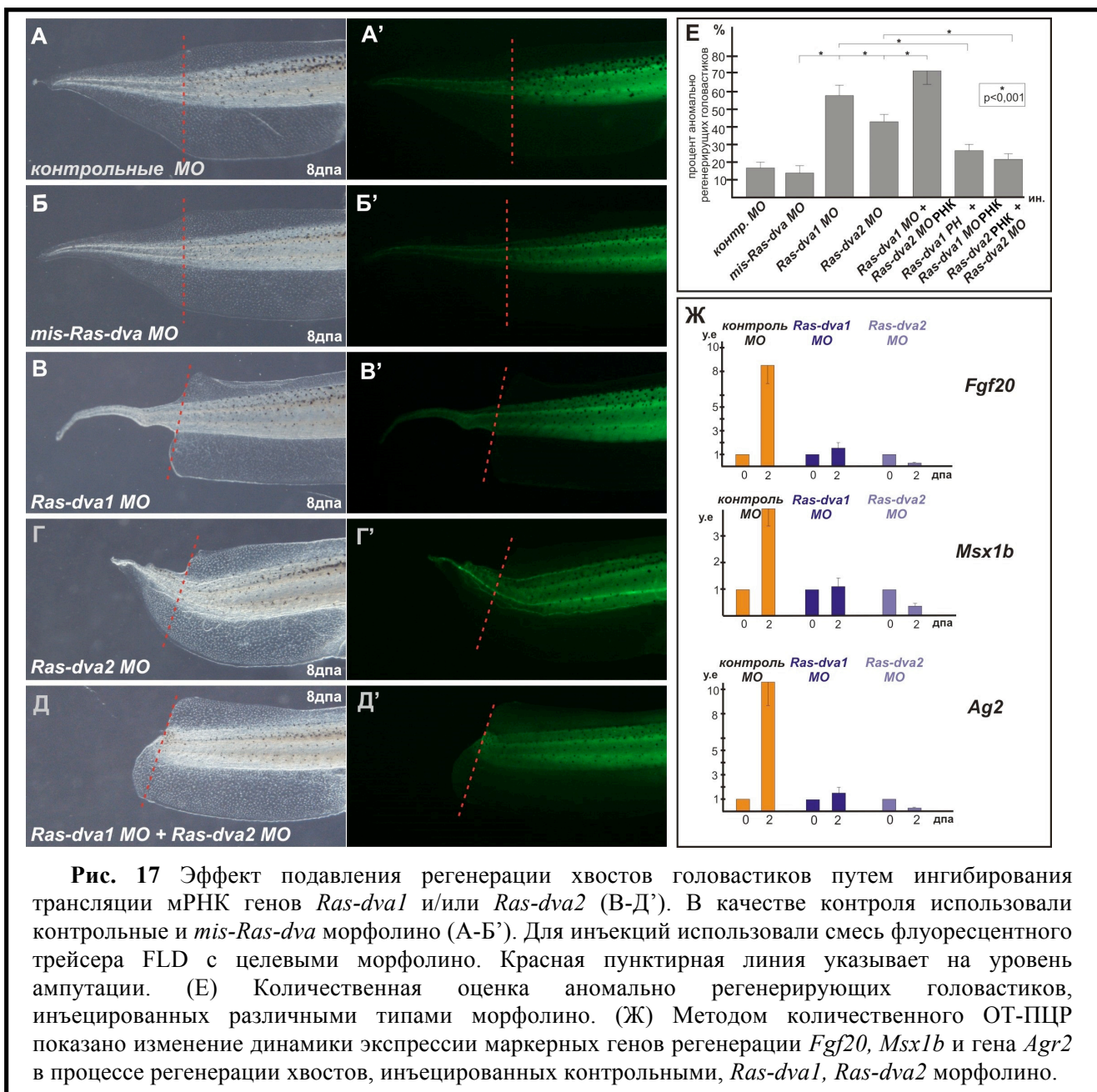


Рис.16 Активация флуоресценции EGFP в трансгенных головастиках, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок под контролем промотора гена *Ras-dva1*. (А, А') Фенотип трансгенного головастика на 46 стадии развития спустя 3 дня после ампутации хвоста, демонстрирующий сильную активацию трансгена в жаберных дугах(жд), эпифизе (епф), гипофизе(гпф), обонятельных ямках(оя), нотохорде (нх), желудке(ж)

и желчном пузыре(жп). (Б,Б',Г,Г') Активация трансгена proRas-dva1-EGFP в регенерирующих хвосте и почке задней конечности головастика 42 стадии спустя сутки после ампутации (В,В',Д, Д') Сагиттальный криосрез хвоста и почки задней конечности. Желтыми стрелками показана активация трансгена в эпителии, белой стрелкой – в бластеме. Красная пунктирная линия показывает уровень ампутации.

Для выявления необходимости наличия транскриптов генов *Ras-dva* для успешной регенерации мы провели серию экспериментов по подавлению трансляции генов *Ras-dva1/2* в регенерирующих хвостовых плавниках *Danio rerio* и хвостах головастика *Xenopus Laevis*. Для подавления трансляции эндогенных мРНК *Ras-dva1* и *Ras-dva2* мы инъектировали смесь

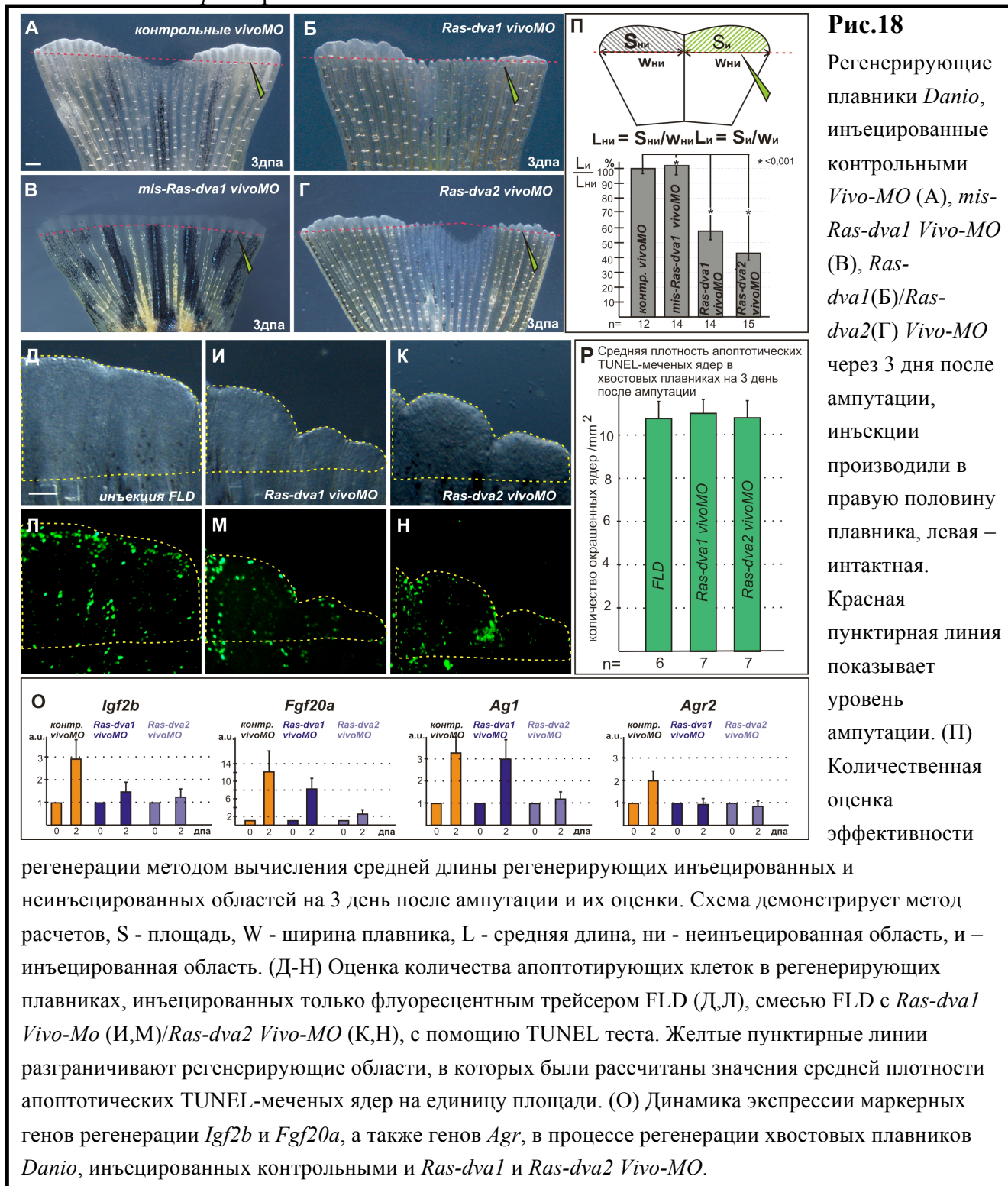
антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов с флуоресцентным трейсером FLD в эмбрионы *Xenopus laevis* на стадии 4-8 бластомеров, ампутацию проводили на 40-41 стадии. Эффективность регенерации оценивали в трех группах инъектированных головастика спустя 8 дней после ампутации: (1) инъектированные контрольными *control-MO*, (2) инъектированные *mis-Ras-dva MO* (аналог контрольных морфолино - морфолино *Ras-dva* с несколькими нуклеотидными заменами, которые приводят к несвязыванию морфолино с целевой мРНК) (3) инъектированные *Ras-dva1 MO*, (4) инъектированные *Ras-dva2 MO*, (5) инъектированные смесью *Ras-dva1 MO* и *Ras-dva2 MO*. В двух группах, инъектированных контрольными и *mis-Ras-dva* морфолино только 17 и 14% регенерирующих хвостов соответственно имели значительные морфологические отклонения нормального строения (Рис. 17 ; А-Б',Е). Значительно больший процент атипично регенерирующих хвостов был зафиксирован у головастика, инъектированных *Ras-dva1 MO* (58%) и *Ras-dva2 MO* (43%) (Рис. 17; В-Г',Е). Самый высокий процент аномально регенерирующих хвостов (72%) был зафиксирован у головастика, инъектированных смесью *Ras-dva1 MO* и *Ras-dva2 MO*. Мы наблюдали несколько типов аномалий нормального строения в процессе регенерации при подавлении функции *Ras-dva*: (1) отсутствие дорсального/вентрального или обоих плавников (Рис. 17; В), (2) значительное замедление регенерации (Рис. 17; Г), (3) отсутствие регенерации (Рис. 17; Д). Для подтверждения специфичности наблюдаемых эффектов инъекций *Ras-dva1 MO* и *Ras-dva2 MO*, мы ко-инъектировали целевые морфолино с искусственно синтезированными мРНК *Ras-dva1/Ras-dva2*, не содержащими морфолино-специфичных сайтов. Измененные инъектированные мРНК служат альтернативной матрицей для синтеза белка, таким образом, они способны нивелировать эффект подавления трансляции эндогенной мРНК. Действительно, в результате серии экспериментов в группе, ко-инъектированной целевыми морфолино и мРНК генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2*, мы зафиксировали снижение числа головастика с аномально регенерирующими хвостами в 2 раза (27% и 22% соответственно) (Рис. 17; Е). Эти данные подтверждают, что нормальная экспрессия *Ras-dva1* и *Ras-dva2* необходима для полноценной регенерации хвоста головастика *Xenopus*. Далее мы сравнили динамику и уровень экспрессии генов-маркеров регенерации, а также *Agr* генов в процессе регенерации в различных группах головастика. Методом количественного ОТ-ПЦР мы выяснили, что уровень экспрессии генов *Ag1* и *Ag2*, также как и *Fgf20* и *Fgf8* ощутимо снижается при подавлении функции генов *Ras-dva* по сравнению с контролем (Рис. 17; Ж). Полученные результаты указывают на то, что экспрессия ранних регуляторов регенерации, *Fgf20* и *Fgf8*, зависит от экспрессии *Ras-dva1* и *Ras-dva2*, что в свою очередь говорит о существенной роли этих маленьких ГТФаз в инициации регенерации.



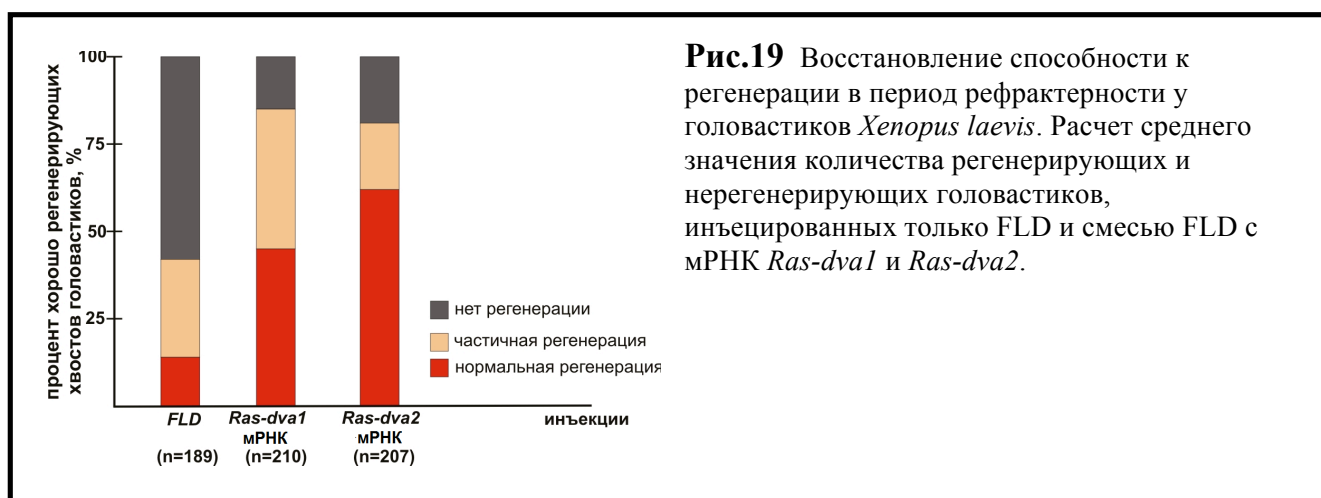
Мы изучили также эффект подавления трансляции генов *Ras-dva* в регенерирующих плавниках *Danio rerio*. Были использованы *Vivo-морфолино* с остатком окта-гуанидин дендримера, благодаря которому морфолино способны проникать в клетки. В результате было показано, что в области плавника, инъектированного *Ras-dva1 Vivo-MO* или *Ras-dva2 Vivo-MO*, регенерация существенно подавлена по сравнению с неинъектированной контрольной частью (Рис. 18; Б, Г). В тоже время на плавниках, инъектированных контрольными *control Vivo-MO* или измененными *mis-Ras-dva Vivo-MO* морфолино такого эффекта зафиксировано не было (Рис. 18; А, В). При ежедневных инъекциях морфолино, начиная со дня ампутации, ингибирование регенерации было статистически значимом уже спустя 3 дня (Рис. 18; П). Прекращение повторных инъекций приводило к постепенному нивелированию различий между контрольным и опытными половинами плавников.

Следующие эксперименты были сделаны с целью исключить неспецифическое подавление регенерации вследствие активации программируемой клеточной гибели – апоптоза. Мы провели TUNEL тест для обнаружения апоптотических клеток в регенерирующих плавниках, инъектированных *Vivo-MO*. В результате, мы не обнаружили статистически значимой разницы в средней концентрации апоптотических клеток в

регенерирующих плавниках, инъецированных контрольными и целевыми *Vivo-MO* (Рис. 18; Д-Н). Таким образом, наблюдаемый эффект замедления регенерации плавников специфичен и не является результатом апоптоза. С помощью количественного ОТ-ПЦР мы проанализировали динамику и уровень экспрессии маркерных генов регенерации (*Igf2b* и *Fgf20a*) и генов *Agr* в регенерирующих плавниках, инъецированных *Ras-dva1 Vivo-MO/Ras-dva2 Vivo-MO/control Vivo-MO*. В итоге было показано существенное подавление экспрессии всех вышеуказанных генов в плавниках, инъецированных *Ras-dva1 Vivo-MO* или *Ras-dva2 Vivo-MO* по сравнению с неинъецированным контролем, а также контролем, инъецированным *control Vivo-MO* (Рис. 18; О). Таким образом, можно говорить о том, что нормальная экспрессия генов *Ras-dva* необходима для полноценной регенерации придатков тела головастики *Xenopus* и рыб *Danio*.



Учитывая значительную роль *Ras-dva1* и *Ras-dva2* в регенерации, важной задачей было путем эктопической экспрессии этих генов попытаться восстановить способность к регенерации хвостов головастика *Xenopus* в период рефрактерности (ст. 45-47), когда регенерация по непонятным причинам отсутствует, а экспрессия генов *Ras-dva* на 2 сутки после ампутации подавляется. Мы инъецировали смесь искусственно синтезированной мРНК генов *Ras-dva1/Ras-dva2* с флуоресцентным трейсером FLD в 4-8 клеточные зародыши *Xenopus laevis*, затем у выращенных из этих эмбрионов головастиков ампутировали хвосты на 46 стадии. Эффективность регенерации хвоста исследовали на 3-4 дни после ампутации. В результате, мы наблюдали несколько типов регенерации хвоста, которые были объединены в три группы: регенерация вообще отсутствует, частичная регенерация (отсутствует один или два плавника, укороченные, изогнутые хвосты) и полноценная регенерация. В контроле процент нормально регенерирующих головастиков составил только 12%, а с полностью подавленной регенерацией – 54% (Рис. 19). В группе головастиков, инъецированных мРНК *Ras-dva1* или *Ras-dva2* мРНК, процент головастиков с отсутствующей регенерацией был меньше в 2-3.6 раза (22.5-15%) соответственно. Процент аномально регенерирующих (частично регенерирующих) головастиков был примерно одинаков. Интересно, что при инъекции мРНК *Ras-dva1* процент нормально регенерирующих головастиков был 40,5-62%, что значительно превышает процент таких головастиков в контроле (Рис. 19). Таким образом, путем введения мРНК *Ras-dva* мы смогли восстановить способность к регенерации у головастиков *Xenopus* в период рефрактерности, что является дополнительным доказательством важности и необходимости этих генов в активации регенерационного процесса.



Выводы

1. Установлено, что белки семейств Agr и Ras-dva регулируют раннее развитие мозга, участвуя в процессе обмена сигналами между клетками переднего края нервной пластинки и клетками головной эктодермы. Доказано существование сигнальной петли обратной связи между белками Agr и малой ГТФаза Ras-dva и фактором роста фибробластов Fgf8.
2. Методами ОТ-ПЦР, гибридизации *in situ* и с помощью трансгенных линий продемонстрировано усиление экспрессии генов *Agr* и *Ras-dva* при регенерации придатков тела у двух модельных представителей низших позвоночных - у рыбы *Danio rerio* и у головастика шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.
3. Методом инъекций антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов в ампутированные органы подтверждено, что гены *Agr* и *Ras-dva* необходимы для нормального процесса регенерации.
4. Метод инъекций мРНК генов *Ras-dva* показал способность этих генов восстанавливать способность к регенерации *in vivo* в период рефрактерности у головастика *Xenopus laevis*.
5. На основании полученных данных высказана гипотеза о том, что потеря генов *Agr1*, *Ras-dva1* и *Ras-dva2* могло быть одной из причин снижения регенерационной способности у высших позвоночных, включая человека.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Ivanova AS**, Tereshina MB, Ermakova GV, Belousov VV, Zاراisky AG. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles // Scientific Reports 2013; 3: 1279. doi: 10.1038/srep01279
2. Tereshina MB, Ermakova GV, **Ivanova AS**, Zاراisky AG. Ras-dva1 small GTPase regulates telencephalon development in *Xenopus laevis* embryos by controlling Fgf8 and Agr signaling at the anterior border of the neural plate // Biology Open. 2014 Mar 15;3(3):192-203. doi: 10.1242/bio.20147401
3. **Ivanova AS**, Shandarin IN, Ermakova GV, Minin AA, Tereshina MB, Zاراisky AG. The secreted factor Ag1 missing in higher vertebrates regulates fins regeneration in *Danio rerio* // Scientific Reports 2015 Jan 29;5:8123. doi: 10.1038/srep08123.
4. **Ivanova AS**, Shandarin IN, Minin AA, Tereshina MB, Zاراisky AG. Ag1 Is Required for the Fin Regeneration in *Danio rerio*. Bioorg Khim. 2015 Jul-Aug;41(4):427-31. Russian.

Тезисы

1. **Иванова А.С.**, Терёшина М.Б., Ермакова Г.В., Зарайский А.Г. Экспрессия генов AGR и малых ГТФаз семейства Ras-dva в процессе регенерации хвоста и почки задней конечности головастика шпорцевой лягушки // Тезисы XXV Международной зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 11-15 февраля, Москва 2013.
2. Бородулин А.В., Ерошкин Ф.М., **Иванова А.С.**, Нестеренко А.М., Зарайский А.Г., Мартынова Н.Ю., Байрамов А.В. Белок Noggin4 – регулятор активности внутриклеточных TGF-beta и Wnt сигнальных каскадов в развитии и регенерации зародыша шпорцевой лягушки // Тезисы XXV Международной зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии, 11-15 февраля, Москва 2013.