

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

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Зарайский Андрей Георгиевич,
доктор биологических наук

Москва - 2016

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ.....	6
2.1. РАННЕЕ РАЗВИТИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОЗВОНОЧНЫХ.....	6
2.1.1. Нейральная индукция	6
2.1.2. Дифференцировка нервной пластинки, нервного гребня и пан-плакодной области эктодермы	8
2.1.3. Передний мозг, генетические мишени гомеодомениального транскрипционного фактора XANF1: малая ГТФаза RAS-DVA1, секретируемые белки группы AGR.....	11
2.2. РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ	18
2.2.1. Введение	18
2.2.2. Регенерация. Виды регенерации.....	18
2.2.2.1. Физиологическая регенерация	19
2.2.2.2. Репаративная регенерация	19
2.2.2.3. Автономия	19
2.2.3. Способы репаративной регенерации.....	20
2.2.3.1 Морфаллакис	20
2.2.3.2. Эпиморфоз	20
2.2.3.3. Гипертрофия.....	21
2.2.4. Эпиморфная регенерация низших позвоночных	22
2.2.5. Молекулярные механизмы регенерации	25
2.2.5.1. Вакуолярная H ⁺ АТФаза, Na(V)1.2 канал и активные формы кислорода	26
2.2.5.2. TGFbeta сигнальный путь.....	26
2.2.5.3. Матриксные металлопротеиназы	27
2.2.5.4. Wnt сигнальный путь	28
2.2.5.5. Fgf сигнальный путь.....	30
2.2.5.6. BMP сигнальный путь	32
2.2.5.7. Hedgehog сигнальный путь.....	33
2.2.5.8. Igf сигнальный путь.....	34
2.2.5.9. Другие сигнальные каскады.....	35
2.2.6. Гены семейства AGR и RAS-DVA в регенерации	36
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:	37
3.1. Лабораторные животные.....	37
3.2. Используемые реактивы.....	37
3.3. Ферменты.....	38
3.4. Используемые растворы	38
3.5. Микробиологические среды	41
3.6. Используемое оборудование.....	41
3.7. Бактериальные штаммы и микробиологические среды.....	42
3.8. Используемые праймеры для REALTIME-PCR.....	42
3.9. Эксперименты	43
3.9.1. Блокирование эндогенных мРНК целевых генов при помощи микроинъекций синтетических анти-смысловых морфолиновых олигонуклеотидов.	44
3.9.2. Клонирование генов для последующих синтезов – транскрипция in vitro и синтез dig-зондов для гибридизации in situ.	46
3.9.3. Транскрипция in vitro	47
3.9.4. Гибридизация in situ.....	47
3.9.5. Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) в реальном времени Real-time- PCR	50
3.9.6. Получение трансгенных лягушек.....	54
3.9.7. Парафиновые срезы.....	57
3.9.8. Вибратомные срезы.....	59
3.9.9. Криотомные срезы	60

3.9.10. Метод Tunnel.....	60
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
4.1. УЧАСТИЕ ГЕНОВ XAG2 И RAS-DVA1 В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОЗГА ЭМБРИОНОВ АФРИКАНСКОЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ XENOPUS LAEVIS	62
4.1.1. <i>Ras-dva1</i> регулирует развитие конечного мозга посредством не прямой активации транскрипционного фактора <i>FoxG1</i>	63
4.1.2. Малая ГТФаза <i>Ras-dva1</i> участвует в опосредованной активации экспрессии <i>Agr</i> генов во внешнем слое ненейральной антериорной эктодермы путем передачи сигнала от фактора <i>Fgf8</i>	64
4.1.3. Фенотипические эффекты подавления функции <i>Agr</i> у головастика <i>Xenopus</i> схожи с эффектами ингибирования <i>Ras-dva1</i>	71
4.1.4. <i>Fgf8</i> , <i>Ras-dva1</i> и <i>Agr</i> связаны в единой сигнальной петле обратной связи..	72
4.1.5. <i>Ras-dva1</i> -зависимый <i>Fgf8</i> сигналинг индуцирует экспрессию <i>Agrs</i> путем регуляции экспрессии <i>Otx2</i>	75
4.1.6. Заключение	78
4.2. УЧАСТИЕ ГЕНОВ <i>AGR</i> И <i>RAS-DVA</i> В РЕГЕНЕРАЦИИ ЗАДНЕЙ ПОЧКИ КОНЕЧНОСТИ И ХВОСТА ГОЛОВАСТИКОВ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ XENOPUS LAEVIS И ПЛАВНИКОВ РЫБЫ DANIO RERIO	80
4.2.1. Участие генов <i>Agr</i> в регенерации хвоста и почки конечности головастика <i>Xenopus laevis</i>	81
4.2.2. Участие генов <i>Agr</i> в регенерации плавников рыбы <i>Danio rerio</i>	89
4.2.3 Участие генов <i>Ras-dva</i> в регенерации придатков тела головастика <i>Xenopus</i> и плавников <i>Danio</i>	101
5. ВЫВОДЫ	116
6. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	117
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	126

1. Введение

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, иммунитетом, 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 нашей 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* (далее *Anf*), являющегося одним из ключевых регуляторов раннего развития переднего мозга. В ходе поиска геномных мишеней *Anf* у модельного объекта - эмбрионов шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) - в свою очередь были найдены несколько генов, участвующих в развитии мозга. В частности, - гены *Ag1* и *Agr2*, кодирующие секретлируемые белки, относящиеся к дисульфид изомеразам семейства Agt. 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*. 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 Agt 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. Возможно, что одной из причин такого снижения регенерационной способности у высших позвоночных могло быть нарушение сигнального каскада, регулируемого исчезнувшими в ходе эволюции генами *Agl* и *Ras-dva*.

Соответственно, задачами моей диссертационной работы было, во-первых, изучение сигнального каскада, регулируемого генами *Agr* и *Ras-dva* в ходе раннего развития переднего мозга, а во-вторых, проверка гипотезы о том, что исчезнувшие в ходе эволюции у высших позвоночных генов *Agl*, *Ras-dva1* и *Ras-dva2* действительно принимают участие в регуляции регенерации больших придатков тела низших позвоночных - рыб и амфибий.

2. Обзор литературных данных

2.1. Раннее развитие головного мозга позвоночных

2.1.1. Нейральная индукция

Процесс нейральной индукции один из ключевых моментов раннего развития нервной системы. Нейральная индукция – это запуск нейральной дифференцировки эктодермы путем активации определенных сигнальных механизмов. Процесс начинается на стадии гастрюляции, в момент, когда у зародыша формируется мезодермальный слой и заканчивается на стадии нейрулы. На стадии гастрюлы зародыш состоит из внутреннего энтодермального, промежуточного мезодермального и наружного эктодермального листков. Под дорсальным листком эктодермы располагается материал хордомезодермы, клетки которой секретируют молекулы-индукторы, стимулирующие развитие центральной нервной системы из эктодермальных клеток у зародышей позвоночных организмов.

Явление нейральной индукции было открыто Г.Шпеманом и Г.Мангольдом еще в 1924 году. На данный момент уже доказано, что основной механизм нейральной дифференцировки – это нейрализация по умолчанию. Суть ее состоит в следующем: вся эктодерма зародыша имеет потенции к нейральной дифференцировке, но этому препятствуют специальные белки-ингибиторы. Известно, что нейральные белки-ингибиторы - это секреторные белки BMP (bone morphogenetic proteins, представители суперсемейства TGF- β), в норме они экспрессируются во всех клетках эктодермы, в том числе в будущем зачатке центральной нервной системы. Для осуществления нейральной дифференцировки клетки хордомезодермы секретируют нейральные индукторы (Shh, Dkk, Noggin, Chordin, Follistatin, Cerberus и тд), которые специфично связываются с белками-ингибиторами, в результате чего блокируется ингибирующий нейрализацию сигнальный каскад. Источником секреторных нейральных индукторов является особая группа мезодермальных клеток (т.н. шпемановский организатор у амфибий или гензеновский узелок у птиц и млекопитающих), которая во время гастрюляции погружается внутрь и перемещаются под эктодермой в головном направлении [1].

В результате нейральной индукции в области дорсальной эктодермы, в которой уровень экспрессии нейральных индукторов существенно превышает таковой нейральных ингибиторов, формируется будущая нервная пластинка, зачаток будущей центральной нервной системы. Эктодерма, прилегающая к нервной пластинке, где с определенным соотношением пересекаются уровни ингибиторов и индукторов при наличии сигналов от Fgf, Wnt и ретиноевой кислоты, в ходе развития формирует особую область нейрогенной эктодермы

(латеральная нейрогенная эктодерма). Впоследствии эта область дифференцируется в нервный гребень и преплакодную эктодермы. Популяция клеток нервного гребня возникает из мигрирующих клеток эктодермы на границе формирования нервной трубки и в дальнейшем дает начало большому спектру различных типов клеток – сенсорные нейроны, клетки нейроглии, пигментные клетки, секреторные клетки, а также хрящевые и костные клетки черепа. Преплакодная эктодерма в свою очередь подразделяется на индивидуальные черепные сенсорные плакоды, которые дают начало зачаткам передней доли гипофиза, обонятельного эпителия, хрусталика, слухового и вестибулярного аппарата. Существует также популяция нервных сенсорных клеток, происходящая как из клеток нервного гребня, так и эктодермальных плакод. Область эктодермы на брюшной стороне эмбриона, где отношение концентрации ВМР к концентрации нейтральных индукторов оказывается выше определенного порога, дифференцируется в эпидермис и его производные. В итоге, к стадии средней нейрулы всю эктодерму зародыша шпорцевой лягушки можно разделить на пять основных областей: нервная пластинка, нервный гребень, плакодная эктодерма (или область эктодермальных плакод) и эпидермис (Рис.1), [2][3].

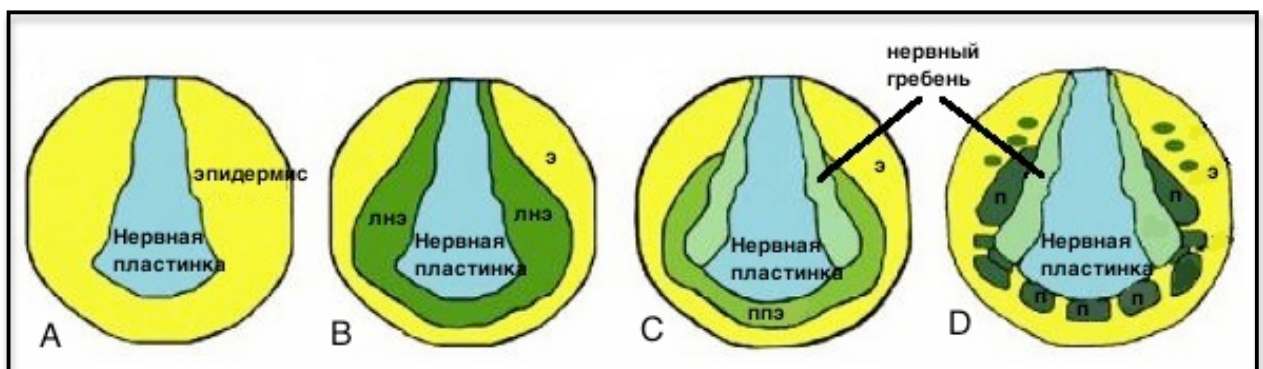


Рис 1. Области эктодермы зародыша *Xenopus laevis* на различных стадиях развития (по Brugmann и Moody, с изменениями[2]). **А** На стадии гастрюляции эктодерма делится на область нервной пластинки и эпидермис. **В,С** На стадии ранней нейрулы благодаря взаимодействию нейтральных и анти-нейтральных сигналов устанавливается область латеральной нейрогенной эктодермы (лнэ), которая впоследствии дифференцируется в область нервного гребня и преплакодную эктодерму (пнэ). **Д** На стадии нейрулы преплакодная эктодерма уже дифференцируется в отдельные плакоды (п), которые благодаря локальным сигнальным молекулам и факторам транскрипции дают начало зачаткам аденогипофиза, хрусталика, обонятельных, слуховых и наджаберных плакод.

2.1.2. Дифференцировка нервной пластинки, нервного гребня и пан-плакодной области эктодермы

Существует множество различных сигнальных молекул необходимых для осуществления нормального процесса нейруляции. Для дифференцировки каждого типа тканей необходима не только активация определенных сигнальных каскадов, но и их взаимодействие с различными диффундирующими сигнальными молекулами (Рис 2).

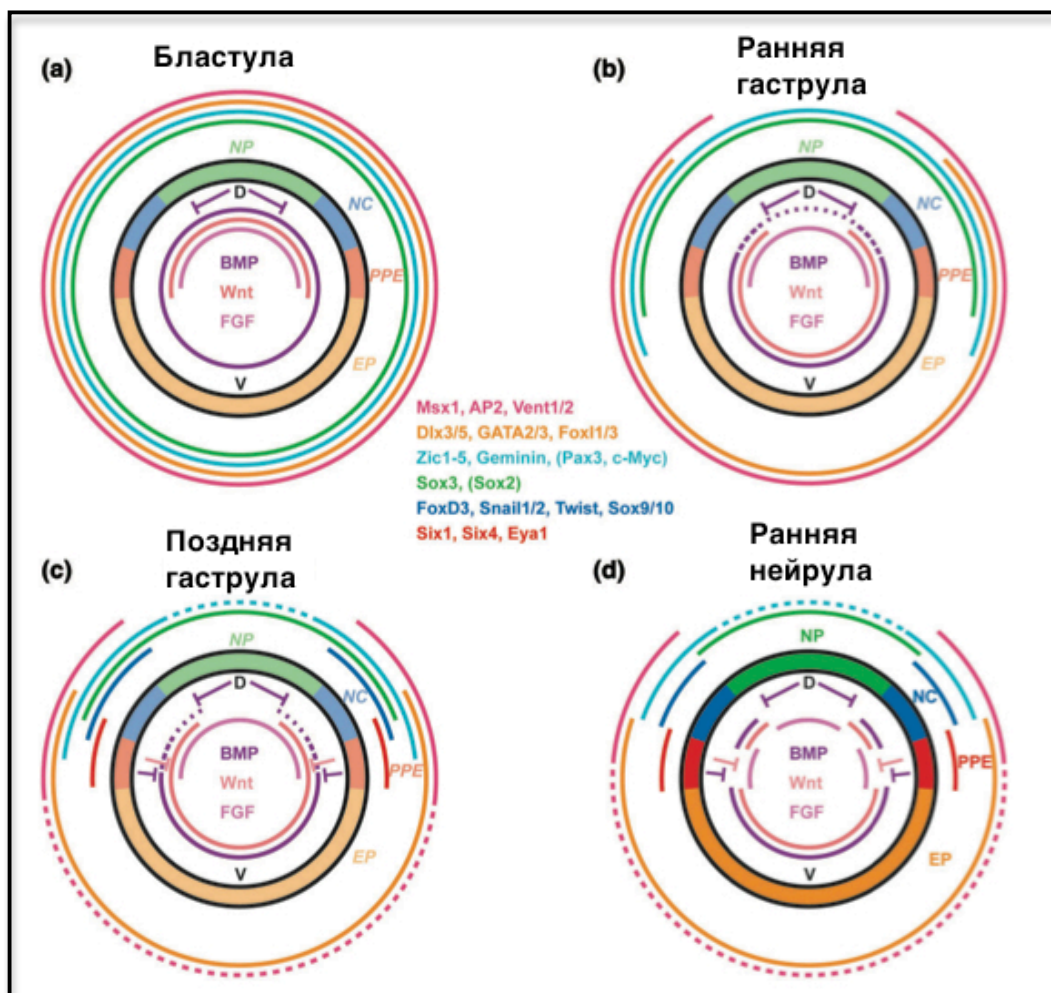


Рис 2. Области экспрессии транскрипционных факторов в процессе нейруляции [4]. На схеме показаны головные срезы зародышей *Xenopus* (**D**- dorsal, спинная сторона зародыша, **V**- ventral, брюшная сторона зародыша, **NP** (зеленый цвет) - neural plate, нервная пластинка, **NC** (синий цвет) - neural crest, нервный гребень, **PPE** (красный цвет) – preplacodal ectoderm, преплакодная эктодерма, **EP** (желтый цвет) – epidermis, эпидермис), домены экспрессии транскрипционных факторов показаны в виде цветных секторов вокруг срезов, а экспрессия регуляторов нейральной индукции BMP, Wnt, Fgf внутри срезов.

На начальных этапах процесса нейральной дифференцировки необходима активация сигнальных каскадов Bmp и его ингибиторов, таких как Noggin, Chordin, Cerberus, Gremlin, Follistatin, Dan, Drm. В ходе дальнейшей спецификации активируются сигнальные каскады от факторов роста фиброластов (*Fgf*), сигнального каскада *Wnt*, *Hedgehog*, инсулин подобного

фактора роста (*Igf*) и ретиноевой кислоты. Кроме того, для установления антериорно-постериорной оси нервной пластинки требуется не только активация *Wnt* сигнального каскада, но и включение его ингибитора, такого как dickkopf-1 (*dkk-1*) [5]. Включение всех вышеперечисленных сигнальных каскадов необходимо для запуска целого ряда нейральных транскрипционных факторов, которые активируют программы регионализации и дифференцировки клеток будущей центральной нервной системы. Это очень сложный и многоступенчатый процесс, в котором происходит разделение нервной пластинки на несколько различных зон, каждая из которых имеет свою специфичную картину экспрессии. Однако, вопрос о достаточности данных сигналов для осуществления полноценной нейральной индукции пока остается открытым [6]–[8].

Эктодермальные плакоды представляют собой парные локальные утолщения столбчатого эпителия, располагающиеся на границе нервной пластинки/нервного гребня и покровной эктодермы (презюмтивного эпидермиса). Плакоды являются временными эмбриональными органами, из которых впоследствии формируются парные органы чувств и другие структуры. Среди плакод выделяют чувствительные (хрусталиковая, слуховая, обонятельная, а также плакода боковой линии) и нейрогенные (гипофизарная, тригеминальная, эпибранхиальная), которые формируют чувствительные нейроны черепных сенсорных ганглиев. У шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* перечисленные плакоды формируются из утолщенного внутреннего слоя эпителия, но кроме этого, есть ещё производные утолщенного внешнего слоя - присоска и железа вылупления, которые в основном нужны на эмбриональных стадиях развития [1]. На данный момент известно большинство маркеров плакодной зоны на ранних стадиях развития позвоночных животных. У зародышей шпорцевой лягушки ранними генетическими маркерами пан-плакодной области (активируются уже на поздних стадиях гаструляции) являются гены *Six1*, *Six4* и *Eya1* [9]. Транскрипционные факторы *Gbx2* and *Otx2* активируются в задних (ушные и эпибранхиальные) и передних (обонятельные, хрусталиковые и тригеминальные) плакодах. Также в антериорной части преплакодной эктодермы одновременно активируется целый ряд транскрипционных факторов, таких, как *Pax6*, *Pitx*, *Six3*, *FoxE*, и *Dmrt*, различный уровень экспрессии которых определяет локализацию будущего аденогипофиза, ушных и хрусталиковых плакод. В тоже время в постериорной части активируются другие факторы - *Pax2*, *Pax8*, *Sox3*, и *Sox2*, различные сочетания которых в будущем формируют ушные, эпибранхиальные и плакоды боковой линии. Таким образом, сигнальные каскады *Shh*, *Fgf* и *BMP* на протяжении всей антерио-постериорной оси нервной пластинки и прилегающей к ней эктодермы активируют различные транскрипционные факторы, специфичные для каждого будущего зачатка органа[10][4].

Нервный гребень формируется на месте боковых валиков нервной пластинки. В процессе нейруляции, после формирования нервной трубки, клетки нервного гребня, лежащие на дорзальной поверхности нервной трубки, мигрируют в различные органы зародыша. Потомки клеток нервного гребня дифференцируются в различные типы нейральных и ненейральных клеток (нейроны и структурные клетки периферической НС, пигментные клетки, гладкомышечные клетки, головные хрящи и кости, плавники у рыб и амфибий). На первом этапе детерминации нервного гребня происходит подавление BMP сигналов до определенного уровня на латеральной границе нейральной и ненейральной эктодермы, что делает ткань презумптивного нервного гребня компетентной для восприятия последующих индукционных *Fgf* и *Wnt* сигналов. Кроме того, для дальнейшей дифференцировки клеток нервного гребня необходимо наличие генов, специфично экспрессирующихся на границе нервной пластинки (*zic1*, *msx1*, *msx2*, *dlx3*, *dlx5*, *pax3* и *pax7*) и нервного гребня (*snail1*, *slug/snail2*, *sox8*, *sox9*, *sox10*, *foxd3*, *ap-2*, *twist*, *c-myc*), а также гены-эффекторы, активизирующиеся в каждом из различных типов клеток нервного гребня. Таким образом, при индукции нервного гребня необходим взаимный обмен сигналами от трех граничащих тканей: вентральной покровной эктодермы (BMP), дорзо-латеральной нейроэктодермы (*Wnt*) и параксиальной мезодермы (*Fgf*). Взаимодействие этих трех сигналов также необходимо для нормального развития нервной пластинки и эктодермальных плакод [11][12].

В процессе дифференцировки **нервной пластинки** происходит запуск пан-нейральных транскрипционных факторов (генов первого ответа), которые в свою очередь активируют про-нейральные гены, осуществляющие дальнейшую специализацию и регионализацию клеток нервной пластинки. Уже на самых ранних стадиях нейруляции в различных областях нервной пластинки экспрессируются свои специфические наборы регуляторных генов, благодаря которым и происходит разграничение всех отделов будущего головного и спинного мозга. Так, например, было показано, что гомеобокные гены *Hox* экспрессируются в заднем мозге и регулируют его сегментацию, формирование границ между ромбомерами, и дифференцировку последних. Фактор роста *Fgf8* и гомеобокный ген *Xanfl* специфично экспрессируются на границе переднего края нервной пластинки, клетки которых в будущем сформируют конечный и часть промежуточного отделов головного мозга (Рис.3) [6][13].

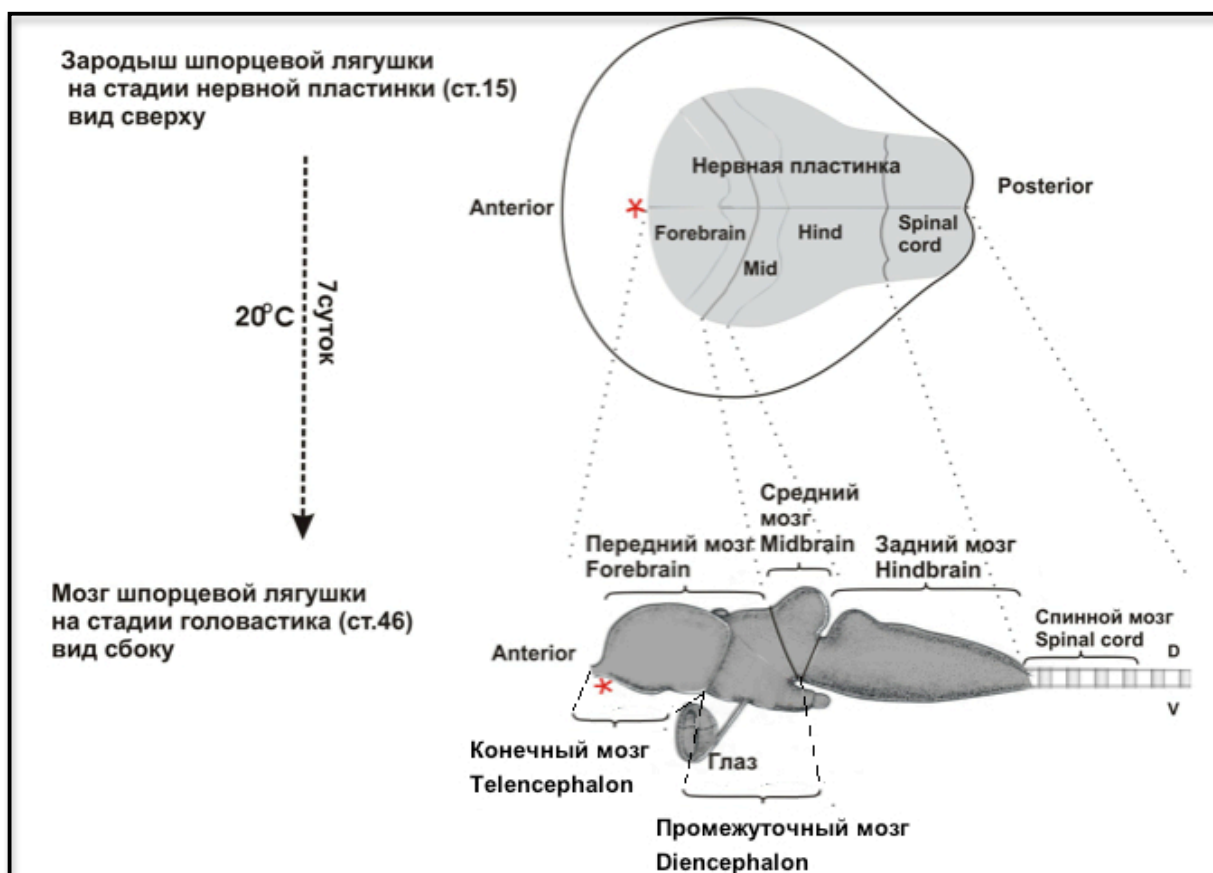


Рис.3 Регионализация и дифференцировка нервной пластинки зародыша шпорцевой лягушки[14].

2.1.3. Передний мозг, генетические мишени гомеодоменного транскрипционного фактора *Xanfl*: малая ГТФаза *Ras-dva1*, секретируемые белки группы *Agr*

Как уже было отмечено ранее, гомеобоксные гены и их продукты, гомеодоменные транскрипционные факторы, играют важную роль в регионализации и клеточной дифференцировке нервной пластинки. В частности, большой интерес представляет изучение молекулярных механизмов всех этапов регионализации и дифференцировки зачатка переднего мозга, из которого в ходе развития формируются большие полушария мозга или конечный мозг [15]. В последнее время существенный прогресс был достигнут в понимании механизмов, регулирующих раннее развитие переднего мозга [16]. В составе нейрального зачатка были выявлены группы клеток, играющие роль сигнальных центров и организующие пространственно-временные паттерны клеточных дифференцировок в развивающемся мозге. Также были установлены основные транскрипционные и секретируемые сигнальные факторы, управляющие процессами клеточной дифференцировки и морфогенеза в указанных структурах [17]. Вместе с тем, до сих пор имеется очень мало работ, посвященных вопросу о том, какие эволюционные изменения в этой системе сигнальных центров, транскрипционных и

сигнальных факторов привели к тем изменениям в развитии переднего мозга, которые наблюдаются у современных высших позвоночных, по сравнению с низшими.

В последние годы было показано, что основной план развития переднего мозга и механизмы подразделения его на области, клетки которых экспрессируют определенные регуляторные гены, сохраняется в ряду современных позвоночных, начиная от круглоротых и, кончая млекопитающими. Вместе с тем, было показано, что переход от низших позвоночных (анамний) к высшим (амниотам) характеризуется резким увеличением размеров дорсальной области конечного мозга (dorsal pallium). При этом, если у высших позвоночных после окончания нейруляции зачаток конечного мозга начинает интенсивно расти за счет пролиферации его клеток, то у низших позвоночных клетки конечного мозга делятся гораздо менее интенсивно и существенного увеличения его размеров не происходит [17][18].

Для объяснения подобного резкого увеличения размеров данной области мозга у высших позвоночных было выдвинуто предположение о возникновении у них гетерохронии, по сравнению с низшими позвоночными, в закладке двух основных сигнальных центров, управляющих ранним развитием мозга. Один из этих центров представляет собой группу клеток на переднем крае нервной пластинки (т.н. ANB центр, от Anterior Neural Boundary). Эти клетки продуцируют сигнальные факторы, определяющие дифференцировку окружающих клеток нервной пластинки в клетки конечного мозга. Второй сигнальный центр образуют клетки, расположенные вдоль будущей границы среднего и заднего мозга (т.н. MNB центр, от Midbrain/Hindbrain Boundary). Клетки этого центра секретируют факторы, определяющие развитие по типу среднего и, отчасти, промежуточного мозга. Было показано, что у рыбы *Danio* закладка MNB центра в эмбриогенезе происходит раньше ANB центра, а у мыши – наоборот. Исходя из этого, было выдвинуто предположение о том, что у мыши ANB центр, появляющийся первым, “успевает” специфицировать развитие большого участка передней области нервной пластинки по типу конечного мозга. В отличие от этого, у рыбы *Danio* возникший первым MNB центр “выигрывает” конкуренцию с ANB центром и специфицирует большую часть передней области нервной пластинки к развитию в более задние отделы мозга. Предполагается, что эта гетерохрония в закладке ANB и MNB центров у высших позвоночных может быть обусловлена гетерохронией в экспрессии генов, определяющих формирование данных центров. В свою очередь, относительное смещение времени экспрессии этих генов может быть связано с какими-то эволюционными изменениями в регуляторных элементах, управляющих их экспрессией [17].

В ходе поиска генов, специфически экспрессирующихся на ранних стадиях развития зародыша шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) в зачатке переднего мозга, был идентифицирован один из представителей гомеобоксных генов – *Xanfl* (*Xenopus* Anterior Neural

Fold), *HESX1/Hesx1*. Было показано, что именно активация экспрессии гомеодоменного фактора *Anf* являются одним из ключевых звеньев молекулярного механизма, обеспечивающего развитие переднего мозга у позвоночных. Известно, что в процессе формирования переднего мозга *Xanf1* специфично подавляет экспрессию двух гомеобоксных генов-регуляторов задних отделов мозга *Otx2* и *Pax6* в передней части нервной пластинки, что и является необходимым и достаточным условием формирования зачатка будущего переднего мозга. В то же время, экспрессия *Xanf1* в передней части нервной пластинки косвенно необходима для активации таких регуляторов развития переднего мозга, как *Bf-1*, *Bf-2*, *Fgf-8*, *Nkx-2.4*. Выявлено, что нарушения функционирования гена *Xanf1* в передней части нервной пластинки приводит к нарушению экспрессии ряда нейральных маркеров, таких как *Bf-1*, *Otx-2* и *Pax-6*, и морфологическим аномалиям развития структур переднего мозга (Рис.4) [19].

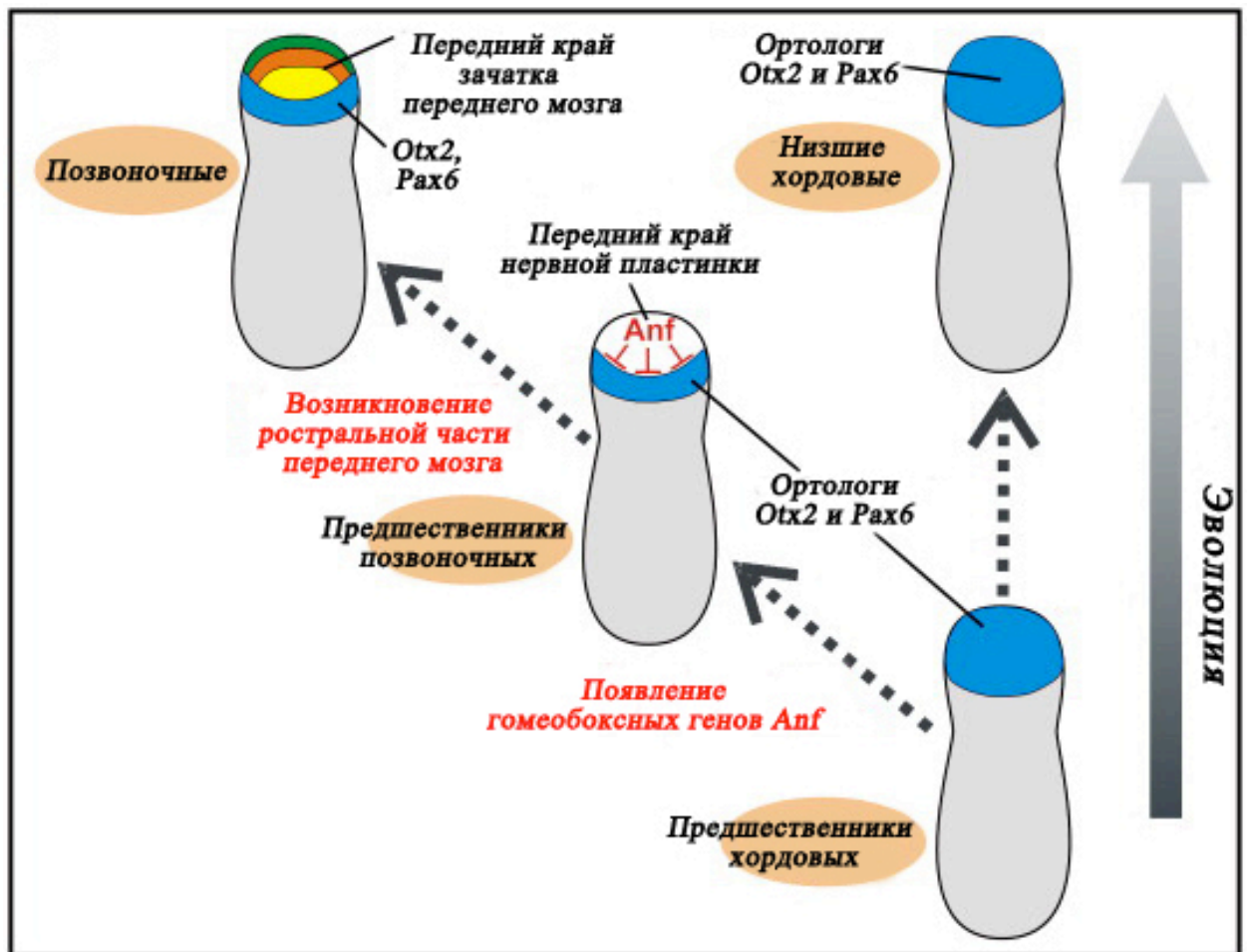


Рис. 4. Модель эволюции переднего мозга в результате появления генов ANF в эволюции у позвоночных животных. Нервная пластинка обозначена серым цветом, области экспрессии генов *Otx2* и *Pax6* и их ортологов показаны синим, структурированная область зачатка переднего мозга показана в виде зеленого, оранжевого и желтого доменов [19].

Поиск гомологов гена *Xanf1* у других организмов показал, что он присутствует только у позвоночных животных, в том числе у человека. Отсутствие генов класса *Anf* в

расшифрованных геномах беспозвоночных организмов коррелирует с отсутствием у них анатомических структур, гомологичных переднему мозгу позвоночных [20].

Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что развитие передних отделов мозга у позвоночных стало возможным в результате подавления в передней части формирующейся нервной трубки экспрессии тех генов, которые у предков позвоночных регулировали в этой области развитие структур, гомологичным задним отделам мозга позвоночных. И ген *Xanfl* шпорцевой лягушки, возможно, является одним из звеньев данного механизма ингибирования. Именно поэтому было важно идентифицировать генетические гена *Xanfl* [21]. В лаборатории «Молекулярных основ эмбриогенеза» ИБХ РАН были идентифицированы 3 новых гена:

- *Nlo* – новый белок, с областью экспрессии в нервном гребне и слуховом пузырьке (зачатке улитки внутреннего уха) *neural crest-lateral otic vesicle localization* (GenBank № AY177202)

- *Xagr2* – ген, кодирующий секретируемый белок семейства *Agr*, сильно экспрессирующийся в зародыше шпорцевой лягушки на стадии нейрулы (ст.15) и хвостовой почки (ст.25) в присоске. (GenBank № AF314056)

- *Ras-dva* – *Ras*-подобная малая ГТФаза, экспрессирующаяся в передней дорзально-вентральной области (*dva* - dorsal ventral anterior) зародышей шпорцевой лягушки на стадии нейрулы (ст.15), маркируя области передних и боковых нервных валиков (соответствующие зонам эктодермальных плакод и нервного гребня) (GenBank № AF513854).

Первый представитель генов *Anterior Gradient (Agr)* был обнаружен в 1989 году у шпорцевой лягушки и назван в соответствии с паттерном его экспрессии в anteriорной эктодерме раннего эмбриона – *Xag1* [22]. Белки *Agr* (*Anterior Gradient proteins*) представляют собой дисульфид изомеразы, содержащие тиоредоксиновый домен и участвующие в сворачивании белков, путем регуляции образования дисульфидных связей [23]. Филогенетический анализ новых геномных данных показал наличие трех подсемейств *Agr* у позвоночных - *Ag1*, *Agr2* и *Agr3* [24]. Два из них, гены *Agr2* и *Agr3* находятся в одном синтеничном фрагменте, ген *Ag1* в другом (Рис.5). Гомологи двух других генов есть у человека и других млекопитающих, экспрессия их сильно выражена в кишечнике, легких, желудке, толстой кишке, предстательной железе и других тканях, которые содержат секретирующие клетки, кроме того, они участвуют в образовании опухолей [25]. На амфибиях была показана экспрессия генов *Agr* в процессе раннего развития, причем преимущественно в органах эктодермального происхождения. Два из них – псевдоаллельные гены *Xag1* и *Xag2* экспрессируются в anteriорном регионе дорсальной эктодермы зародыша лягушки на стадии гастрюлы. В процессе нейруляции их экспрессия локализуется в клетках зачатков присоски и

железы вылупления. Эти два высокоомологичных псевдоаллеля, так же, как и многие другие подобные псевдоаллели *Xenopus laevis* очевидно возникли в эволюции данного конкретного вида лягушек сравнительно недавно, в результате удвоения хромосом у какого-то исходного вида *Xenopus*. В отличие от генов *Xag1* и *Xag2*, гены *Xagr2a* и *Xagr2b* экспрессируются на стадии нейруляции исключительно в клетках зачатка присоски, а гены *Xagr3a* и *Xagr3b* в клетках зачатка слухового пузыря и присоски [21].

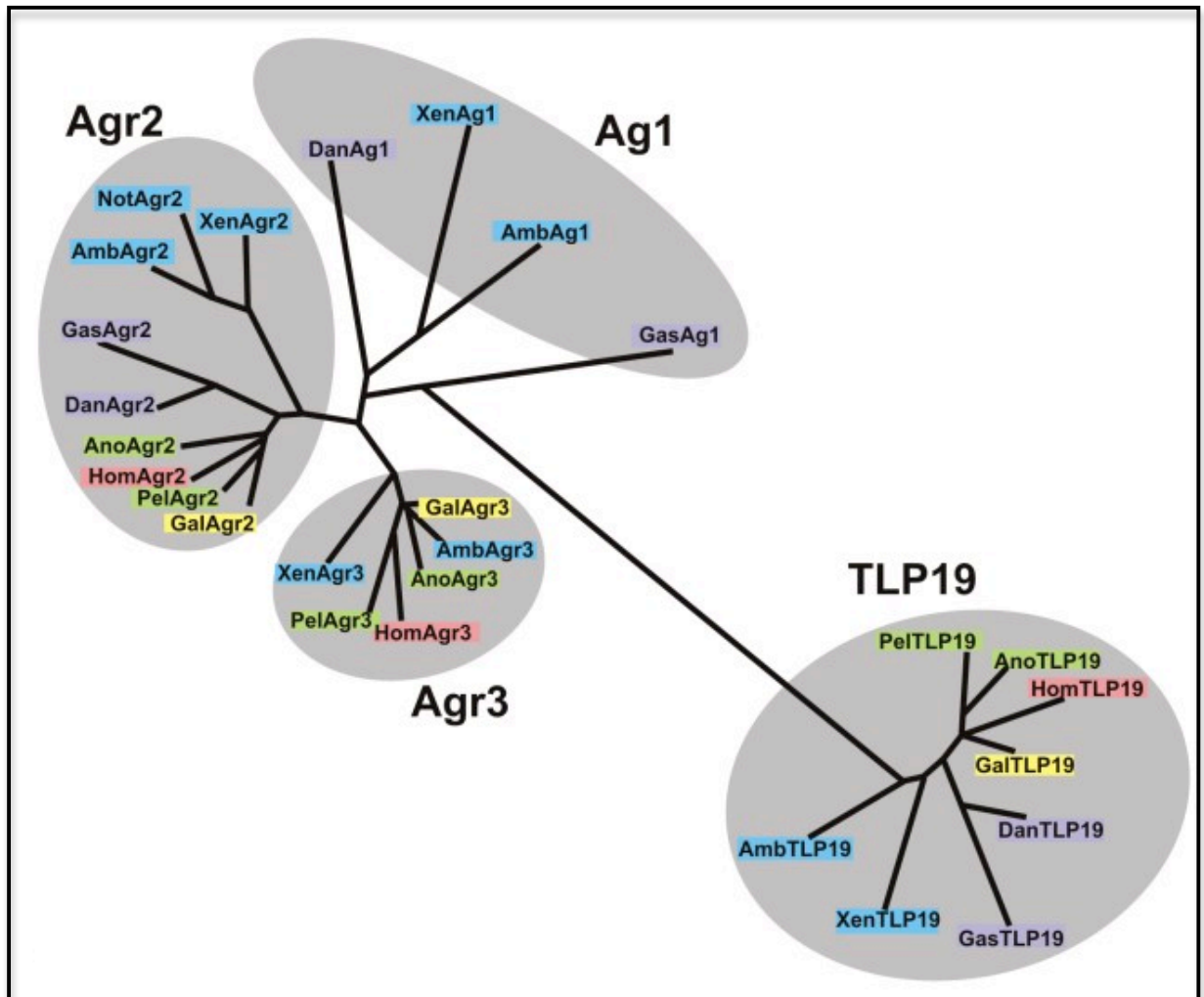


Рис.5. Филогенетическое дерево *Agr* генов [26].

Малая ГТФаза Ras-dva – Ras-подобная малая ГТФаза, специфичная для подтипа позвоночных, была впервые идентифицирована в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН (Рис.6). Кроме того, в ходе недавних исследования было показана зависимость экспрессии гена шпорцевой лягушки *Xag2* от активности малой ГТФазы Ras-dva1, также специфично экспрессирующейся на стадии нейруляции в клетках присоски [27]. Малые ГТФазы представляют собой группу регуляторных ГТФ-гидролаз, вовлеченных в процессы трансдукции сигналов в клетку и внутри клетки [28]. Была показана локализация Малой ГТФазы Ras-dva1 на плазматической и внутренних мембранах клетки [29]. У позвоночных, за

исключением рептилий, птиц и млекопитающих, существует по крайней мере два гомолога этого гена - *Ras-dva1* и *Ras-dva2*. Для *Xenopus laevis* было показано, что *Ras-dva1* экспрессируется в процессе гастрюляции и нейруляции в антериорной эктодерме и напрямую регулируется транскрипционными гомеодомными факторами Otx-2 и Xanf-1. В раннем развитии она регулирует развитие переднего мозга и краниальных плакод. В процессе нейруляции *Ras-dva1* способна контролировать сигнальный каскад, запускаемый молекулами FGF8a в клетках передней эктодермы зародышей [27]. Позднее (после стадии 33 по Ньюкопу и Фаберу) *Ras-dva1* экспрессируется в глазной сетчатке, эпифизе, гипофизе, жаберных дугах, глотке, пищеводе, желудке и желчном пузыре. В отличие от *Ras-dva1*, *Ras-dva2* не экспрессируется на стадиях гастрюляции и нейруляции, однако экспрессируется в глазной сетчатке и головном мозге головастиков, также позже обнаруживается его экспрессия в желудке и мезонефросе [30].

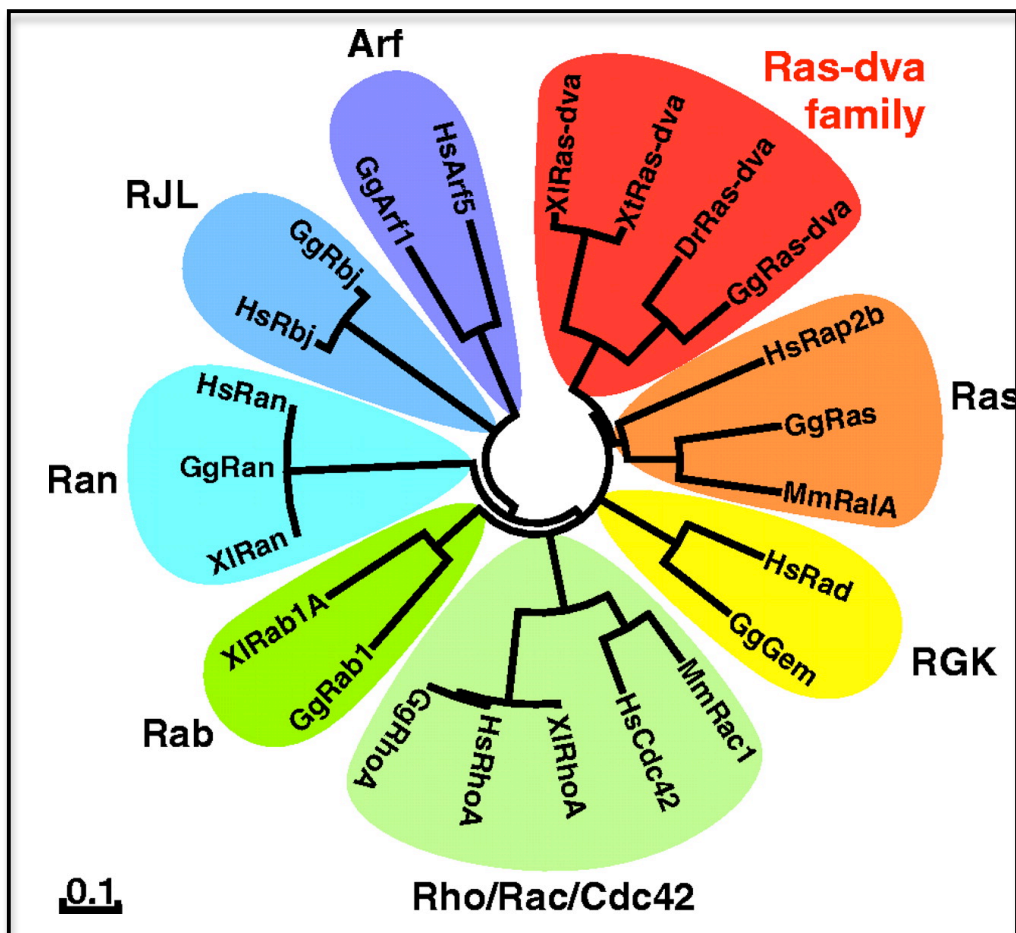


Рис. 6. Филогения суперсемейства малых ГТФаз. Красным цветом отмечено новое семейство малых ГТФаз Ras-dva [27].

Недавно, в нашей лаборатории в процессе филогенетического анализа этих генов был отмечен факт, что гены малых ГТФаз *Ras-dva* и ген *Ag1* из группы генов *Agr* пропадают в процессе эволюции у высших млекопитающих (Рис. 7).

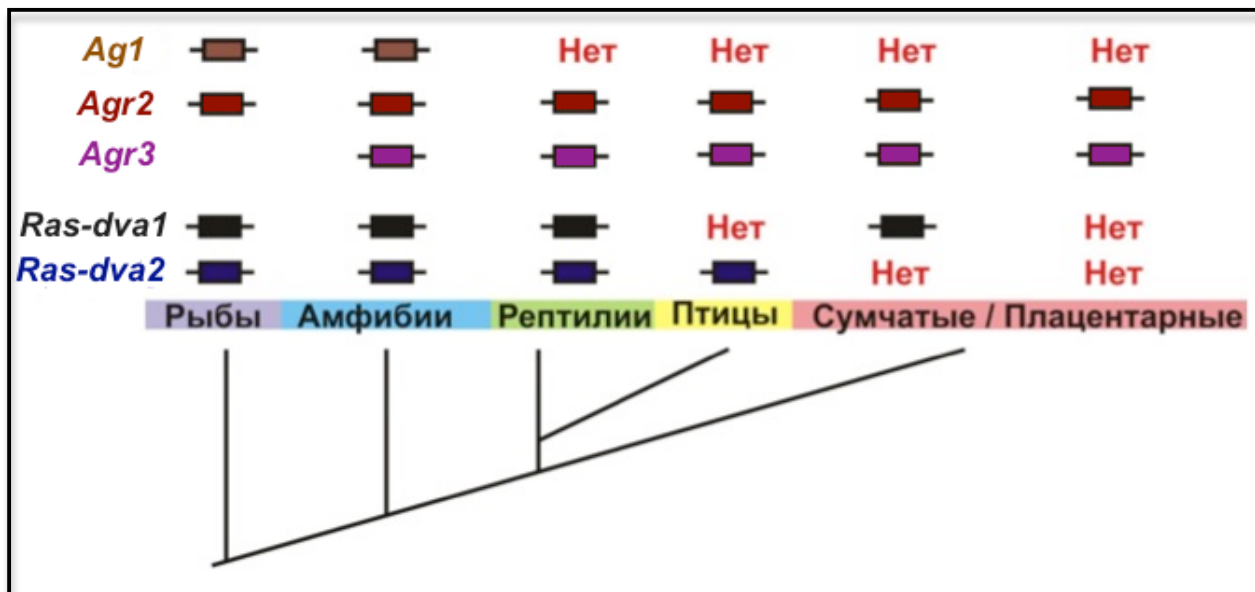


Рис. 7. Эволюция генов, кодирующих белки Agr и малые ГТФазы Ras-dva1 и Ras-dva-2.

Между тем, интересно отметить, что наблюдаемое у высших позвоночных увеличение дорсальных отделов переднего мозга коррелирует с исчезновением у их предков одного из *Agr* генов - *Ag1*, и генов малой ГТФазы *Ras-dva*.

Принимая во внимание эти данные, было бы интересно проверить гипотезу о существовании единого сигнального каскада, включающего в себя гены *Ras-dva* и *Agr*, а также гипотезу о том, что исчезновение в эволюции генов *Ras-dva* и *Ag1* вместе с появлением гена *Xanf* и могло способствовать усиленному разрастанию дорсальной коры у высших позвоночных. Данному исследованию будет посвящена первая часть моей диссертационной работы

2.2. Регенерация позвоночных

2.2.1. Введение

Регенерацией (от лат. *regeneratio* - возрождение) называют процесс восстановления самых разных структур, от части клетки до частей тела, после естественного изнашивания или случайной утраты. Процесс регенерации, различные способы восстановления и усиления регенеративной способности организма широко изучаются в биологии, особенно в биомедицине, в таких областях как: травматология, онкология, лечение дегенеративных заболеваний. Сейчас много внимания уделяется не только стволовым, но и соматическим клеткам, способным изменять свои потенции уже во взрослом организме. Много внимания уделяется и сигнальным каскадам, которые участвуют в активации механизмов регенерации. Известно, что низшие позвоночные (рыбы, амфибии) хорошо регенерируют утраченные конечности и части тела, а в процессе эволюции эта способность снижается, а у млекопитающих и вовсе отсутствует. Мы предполагаем, что некоторые гены, исчезнувшие у высших позвоночных, имеющих пониженную способность к регенерации, могут быть вовлечены в процессы восстановления придатков тела у хорошо регенерирующих низших позвоночных. Соответственно, выявление таких генов и изучение их роли в процессах регенерации может быть новым перспективным подходом к пониманию механизмов, управляющих данными процессами у низших позвоночных, а также причин их утраты у высших позвоночных. Анализ литературных данных и недавно полученные в нашей лаборатории результаты позволили предположить, что одними из таких генов могут быть гены малых ГТФаз семейства *Ras-dva*, а также гены некоторых секретируемых белков семейства *Agr* (*anterior gradient*), относящихся к суперсемейству дисульфид изомераз белков. В ходе эволюции гены *Ras-dva* и *Agr* семейств пропадают у представителей разных классов высших позвоночных. Поэтому еще одной целью нашей работы было исследование участия указанных генов в регенерации в двух различных классах низших позвоночных, на таких традиционных моделях регенерационной биологии, как головастики шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и рыбы *Danio rerio*.

2.2.2. Регенерация. Виды регенерации

Регенерация (от греч. *regeneratio* – восстановление) – восстановление организмом утраченных структур. Первые опыты по регенерации были проведены французским ученым Р. Реомюром в 1712 году (он получил регенерацию клешни у речного рака); в 1740 году швейцарский исследователь А. Трамбле описал регенерацию гидры и именно он считается основателем науки о регенерации. Регенерацию позвоночных впервые детально описал

итальянский ученый Л. Спаланзани. Большой вклад в изучение регенерации внёс Т.Х. Морган. Он занимался изучением регенерации у гидры, земляных червей и планарии.

Процесс регенерации и различные способы восстановления и усиления регенеративной способности организма широко изучаются в биологии, особенно в биомедицине, в таких областях как: травматология, онкология, лечение дегенеративных заболеваний. Сейчас много внимания уделяется не только стволовым, но и соматическим клеткам, способным изменять свои потенции уже во взрослом организме [31].

2.2.2.1. Физиологическая регенерация

Базовая способность каждого организма восполнять структуры, утраченные в процессе нормальной жизнедеятельности, получила название физиологической регенерации. Всем организмам свойственна физиологическая регенерация. Происходит восстановление самых разных структур (от части клетки до частей тела) после естественного изнашивания. Например, замена перьев и шерсти у птиц и млекопитающих, линька у змей, замена клеток эпителия желудочно-кишечного тракта (почти каждые сутки). Идет также обновление клеток крови. В теле человека каждую секунду погибает примерно 4 млн. эритроцитов и одновременно столько же образуется в красном костном мозге [32].

По регенерационной способности клетки делят на:

- *лабильные* (эпителий кожи и желудочно-кишечного тракта);
- *стабильные* (клетки печени);
- *статические* (нервные клетки).

2.2.2.2. Репаративная регенерация

Способность организма восстанавливать свои части после их утраты от случайных травм, болезней или намеренной ампутации называется репаративной регенерацией (регенерация гидры, планарии, восстановление конечности у тритона или головастика лягушек после их ампутации, восстановление хвостового плавника у рыб).

2.2.2.3. Автотомия

Этот способ регенерации иногда выделяют отдельно. Автотомия-это самоампутация (отбрасывания) части тела при неблагоприятных условиях (нападение хищника) с последующей регенерацией и восстановлением утраченного органа. Например, морские звезды способны отбрасывать свои лучи при нападении хищника, крабы –клешни, а некоторые виды африканский мышей даже кожу [33]. Известный пример отрастания хвоста у ящерицы является случаем автотомии, в результате которой не восстанавливается полноценная структура и

функция, поскольку образовавшийся на месте самоампутации «хвост» представляет собой хорду, обтянутую кожей [34].

2.2.3. Способы репаративной регенерации

Классификация на основе поведения клеток в остатке органа предложена Т.Морганом (1901) и разделяет репаративную регенерацию на осуществляющуюся путем эпиморфоза и морфаллаксиса. Необходимым условием для репаративной регенерации является наличие раневой поверхности, где и происходят регенерационные процессы.

2.2.3.1 Морфаллаксис

Морфаллаксис - это способ, при котором происходит перегруппировка клеток оставшейся части органа после эпителизации раны и его восстановление до начальной формы (примеры: гидра и планария) Митозы клеток при этом типа регенерации отсутствуют.

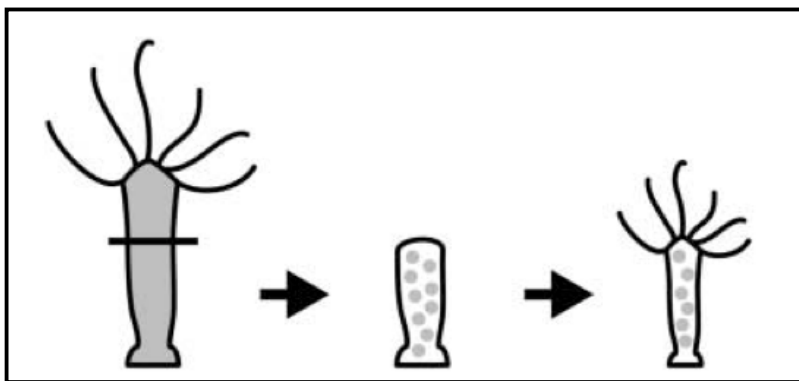


Рис.8. Регенерация гидры

2.2.3.2. Эпиморфоз

Эпиморфоз (надставка) – это способ регенерации, при котором утраченный орган восстанавливается от раневой поверхности за счет массы пролиферирующих недифференцированных мультипотентных клеток бластемы (примеры: конечности и хвост у амфибий, плавники, сетчатка, сердце у рыб) [35].

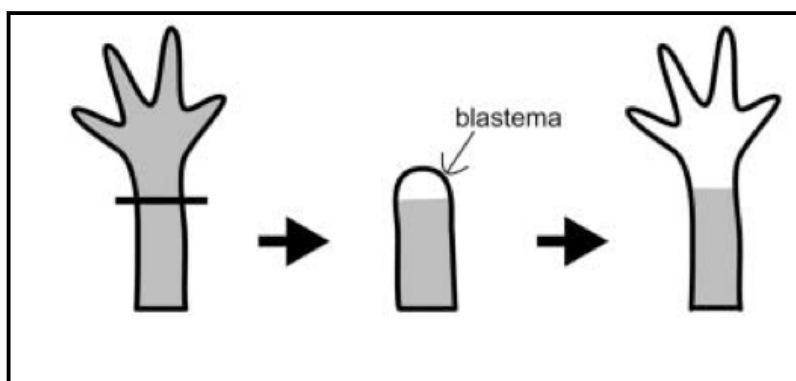


Рис.9. Регенерация конечности тритона

Важно отметить, что при этих способах регенерации происходит дедифференцировка клеток, которые затем либо сразу трансдифференцируются (при морфаллаксисе), либо сначала активно делятся и далее дифференцируются, давая начало разным типам тканей для восстановления утраченных структур (при эпиморфозе).

У позвоночных животных репаративная регенерация осуществляется только путем эпиморфоза. При этом всех позвоночных животных можно условно разделить на 2 группы: хорошо- и плохо-регенерирующих. К хорошо-регенерирующим относятся низшие позвоночные: рыбы и амфибии. К плохо-регенерирующим относятся высшие позвоночные: рептилии, птицы и млекопитающие. У высших позвоночных исходная форма органов часто не восстанавливается и на месте травмы (повреждения) образуется рубец, а не регенерационная бластема. Впрочем, существует несколько примеров регенерации среди млекопитающих – кончики зачатков пальцев эмбрионов мышей и кончики пальцев новорожденных мышей и человека. Интересный факт, некоторые молекулярные механизмы регенерации пальцев эмбрионов мышей идентичны с механизмами регенерации придатков тела низших позвоночных [36][37]. Однако, такая регенерация встречается очень редко, зависит от стадии развития организма и конкретной особи, в процессе регенерации не образуется классической регенерационной бластемы [38]. У высших позвоночных чаще всего встречается другой тип репаративной регенерации – гипертрофия.

2.2.3.3. Гипертрофия

1. *Эндоморфоз*, или регенерационная гипертрофия - это увеличение размеров органа после его повреждения. При удалении части печени или селезенки на раневой поверхности образуется рубцовая ткань, и удаленная часть не восстанавливается. Но разрастается масса оставшейся части и орган достигает прежних размеров.

2. *Компенсаторная гипертрофия* – изменения в одном из парных органов при нарушении в другом (гипертрофия одной почки при удалении другой).

Но, к сожалению, такие сложные структуры, как конечность, хвост или сетчатка высшие позвоночные восстановить не способны. Таким образом, в большинстве случаев у высших позвоночных регенерационная способность ограничена гипертрофией внутренних органов и физиологической регенерацией. Восстановительные процессы в центральной нервной системе и в миокарде выражаются только в форме внутриклеточной регенерации за счет увеличения массы органелл в сохранившихся клетках. Эффективность процессов регенерации зависит от многих факторов. У млекопитающих и человека регенерационные процессы проходят более активно в молодом возрасте, к старости они ослабевают. Тормозят процессы регенерации денервация и рентгеновские лучи. Стимулируют регенерацию нуклеиновые кислоты, гормоны, введение тканей в регенерирующий орган [39].

2.2.4. Эпиморфная регенерация низших позвоночных

Эпиморфная регенерация у низших позвоночных приводит к полному восстановлению изначальной структуры и функции утраченного органа. Данный тип регенерации активно изучается на таких модельных объектах как головастики шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и рыбы *Danio rerio*. Головастики *Xenopus laevis*, как было показано в экспериментах способны к регенерации хвоста, почки конечности, хрусталика глаза. Однако способность к полноценной регенерации со временем исчезает и зависит от стадии развития [40]. Рыбы *Danio rerio* способны восстанавливать различные повреждённые ткани и органы: плавники, чешую, сетчатку, ткани сердца, спинной мозг [41]. В настоящей работе мы использовали модели регенерации хвостового плавника *Danio rerio* и регенерации почки конечности и хвоста головастика лягушки *Xenopus laevis*. Как, уже отмечалось ранее, при эпиморфной регенерации происходит дедифференцировка ранее дифференцированных тканей, таких как хрящи, мышцы, кости [1]. С точки зрения морфологии, регенерацию можно разделить на следующие основные этапы:

- *Формирование раневого эпителия.* После ампутации с краев культи начинают мигрировать эпидермальные клетки, покрывая раневую поверхность. Затем происходит пролиферация этого однослойного эпителия, в результате чего образуется апикальная эктодермальная шапочка (АЭШ) [42].
- *Формирование регенерационной бластемы.* После формирования раневого эпителия мезодермальные клетки под шапочкой претерпевают дедифференцировку: костные, хрящевые и нервные клетки, фибробласты, утрачивают признаки, характерные для их дифференцированного состояния и обособляются друг от друга. В результате на месте хорошо структурированной

области ампутированного органа, на границе разреза, непосредственно под апикальной эктодермальной шапочкой формируется пролиферирующая масса клеток. Эта масса мультипотентных пролиферирующих клеток называется регенерационной бластемой. Регенерация всех типов тканей идет независимо друг от друга. Мышечные клетки восстанавливаются из сателлитных клеток мышц, спинной мозг - из терминальной нейральной ампулы, а хорда - из терминальных клеток хорды. Таким образом, регенерация происходит благодаря дедифференцировке зрелых клеток до состояния клеток-предшественников, которые дают начало клеткам своего типа и обладают позиционной памятью [43]–[46].

- *Рост регенерационной бластемы.* Клетки бластемы продолжают пролиферировать и расти вдоль проксимо-дистальной оси. На этом этапе большое значение имеют мезенхимно-эпителиальные взаимодействия между апикальной шапочкой и бластемными клетками мезенхимы. Важным фактом остается то, что трансдифференцировка между тканями отсутствует [40], [47].

- *Дифференцировка регенерационной бластемы.* Бластема вместе с элонгацией начинает дифференцироваться с образованием новых структур органа до полного их восстановления [35]. Если разрушить клетки бластемы, то регенерации не происходит. Более того, дедифференцируясь при образовании бластемы, клетки вновь приобретают свою эмбриональную пластичность [1].

После ампутации хвостового плавника рыбы *Danio rerio* активируется процесс регенерации. Полное восстановление всех тканей и структуры, образующих плавник, происходит в течение 2 недель. В течение 1-3 часов после ампутации эпителиальные клетки мигрируют на поверхность раны и закрывают её, образуя эпителий раны. Далее формируется бластема и апикальная эктодермальная шапочка. Спустя 24 часа после ампутации, клетки бластемы разделяются на 2 морфологически разных слоя: медленно пролиферирующая дистальная бластема и быстро пролиферирующая проксимальная бластема. Дистальная бластема снабжает дочерними клетками проксимальную бластему, где образуется популяция клеток, мигрирующих на свои позиции и дифференцирующиеся, чтобы заменить утраченные ткани. Спустя 48 часов после ампутации устанавливается программа регенерации и рост продолжается до тех пор, пока не будет восстановлено исходное строение плавника (Рис.10) [48].

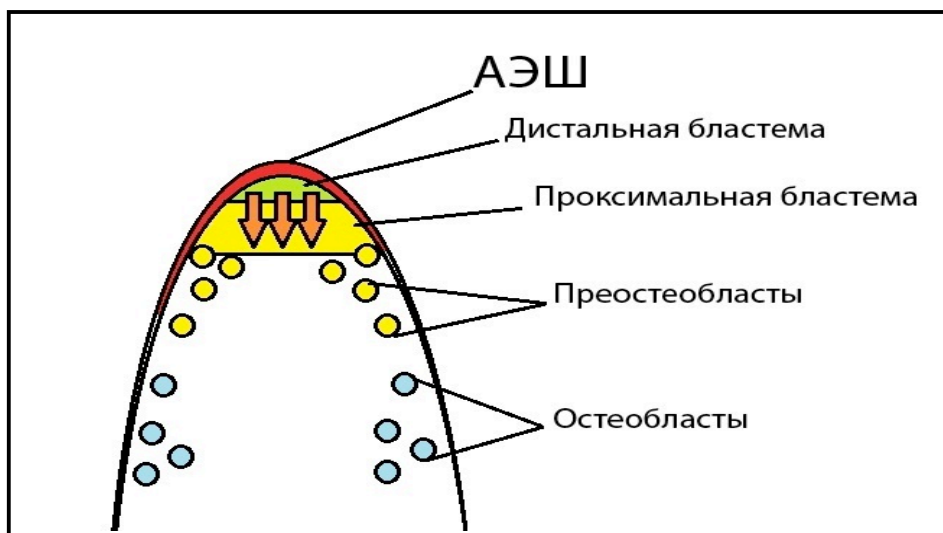


Рис. 10. Схема регенерации плавника *Danio rerio*. Продольный срез.

Хвост головастика *Xenopus laevis* представляет собой сложный придаток тела, содержащий множество осевых тканей, в том числе аналогичных тканям человека (например, спинной мозг и дорсальная аорта). Ткани хвоста включают в себя хорду, густую сеть нейронов, скелетных и гладких мышц, лимфатических сосудов, эпидермис с меланофорами. В течение недели после ампутации полностью восстанавливается исходное строение и функции всех органов и тканей (Рис.11) [49].

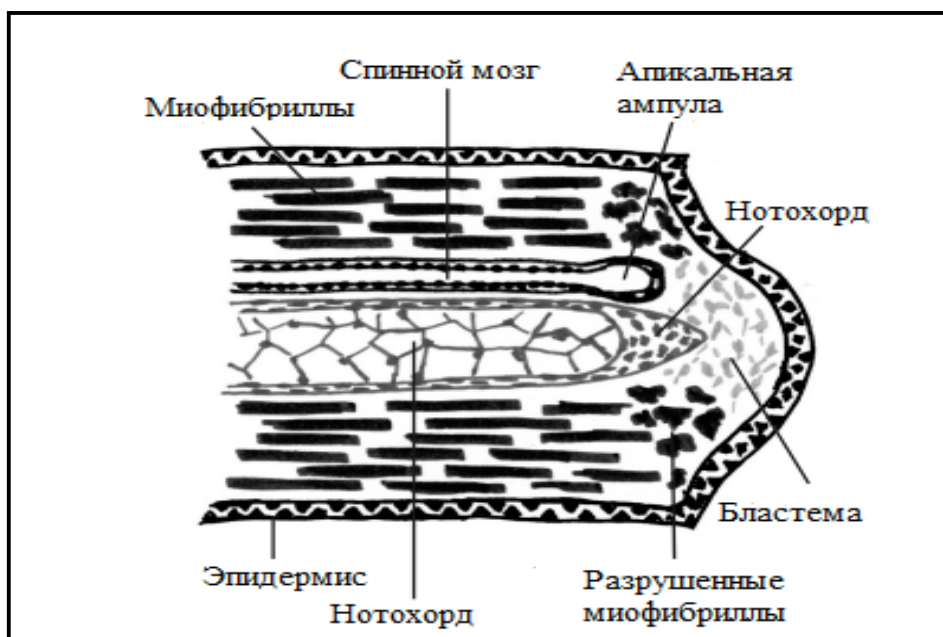


Рис. 11. Схема регенерации хвоста головастика *Xenopus laevis*. Продольный срез.

Почка конечности в отличие от хвоста имеет ограниченную по времени способность к регенерации. Регенерация происходит наиболее удачно с ранней стадии дифференцировки конечности (стадия 50 по Ньюкопу и Фаберу) до начала метаморфоза (стадия 57 по Ньюкопу и Фаберу)[40]. Кроме того, степень восстановления зависит от уровня ампутации. Потеря

способности к регенерации происходит от более проксимальных регионов к дистальным. Также наиболее быстро происходит регенерация в том случае, если ампутация проходит через область сустава, а не через костные элементы конечности [50]. Интересно, что классическая для эпиморфной регенерации дедифференцировка клеток отсутствует у мышечных клеток зачатка конечности головастика лягушки, в восстановлении мышечной ткани активно участвуют сателлитные мышечные клетки [51].

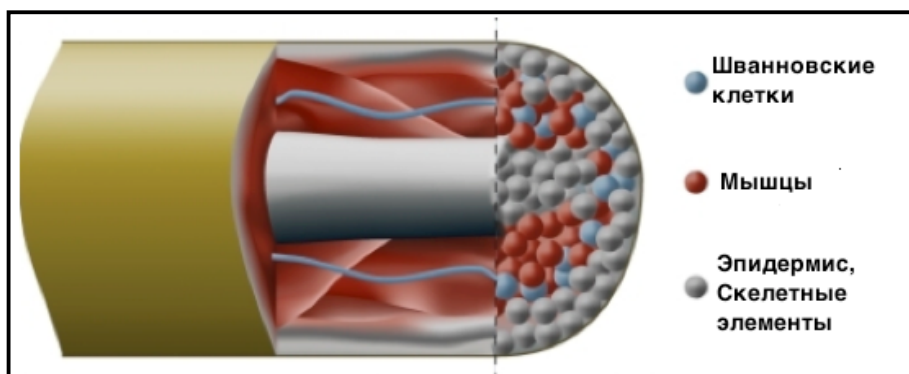


Рис. 12. Схема регенерации конечности головастика *Xenopus Laevis*, Продольный срез.

2.2.5. Молекулярные механизмы регенерации

В процессах регенерации придатков тела низших позвоночных активируются различные сигнальные пути, управляющие формированием бластемы, пролиферацией и дифференцировкой клеток. Большая часть основных сигнальных каскадов является консервативной среди позвоночных, однако существует ряд отличий в процессах активации этих каскадов.

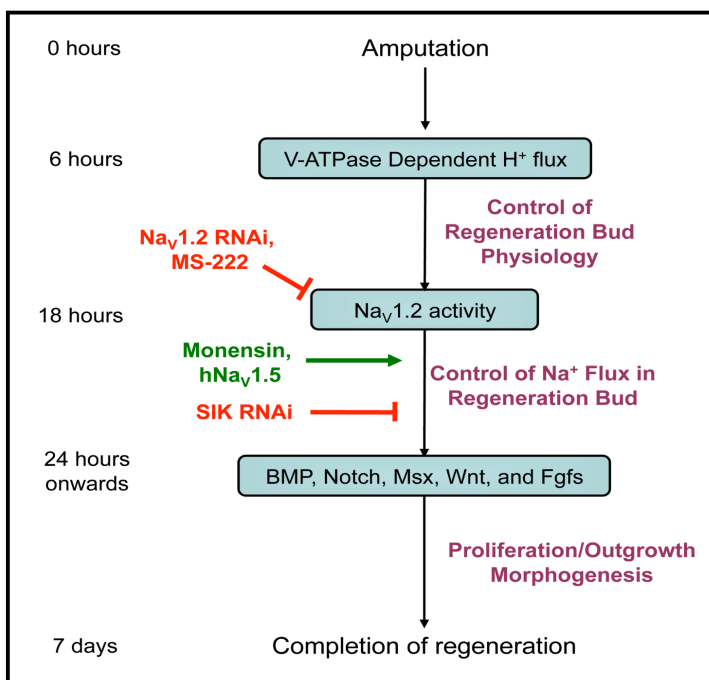


Рис. 13. Схема активации сигнальных каскадов в процессе регенерации [52].

2.2.5.1. Вакуолярная H⁺ АТФаза, Na(V)1.2 канал и активные формы кислорода

Для эпиморфной регенерации, по-видимому, первыми значимыми событиями после ампутации являются падение pH, реполяризации регенерирующего органа, увеличение концентрации натрия и активная продукция клетками активных форм кислорода, таких как пероксид водорода. Общей чертой всех процессов является их быстрая, но в тоже время кратковременная активация. Логично предположить, что такой вид активации необходим для быстрой реакции на ампутацию и быстрого включения всех остальных участников регенерационных каскадов. С использованием чувствительных флуоресцирующих сенсоров pH в частности было показано, что для активации сигнальных каскадов генов *Notch1* и *Msx1* необходимо не только изменение pH, но и определенный уровень поляризации, то есть активируется вакуолярная H⁺ АТФаза. Активная продукция регенерирующими клетками активных форм кислорода необходима для активации канонического сигнального каскада Wnt и сигнального каскада Fgf. В отсутствии любого из процессов регенерация существенно ингибируется или вовсе отсутствует [52]–[54].

2.2.5.2. TGFbeta сигнальный путь

На начальном этапе возникновения раны и раневого эпителия также происходит быстрое включение сигнального пути белка TGFbeta. Этот путь активируется уже через 15 минут после ампутации. Он стимулирует процесс заживления раны, пролиферации эпителиальных

клеток, запускает процесс регенерации. Их основная роль - поддержание сначала активной пролиферации клеток, а затем и их дальнейшая спецификация. Взаимодействие лигандов Tgf с двумя серин-треонин киназными рецепторами приводит к их фосфорилированию и трансдукции сигнала на белки Smad 2 и 3. Они перемещаются в ядро, где активируют различные транскрипционные факторы [40], [55].

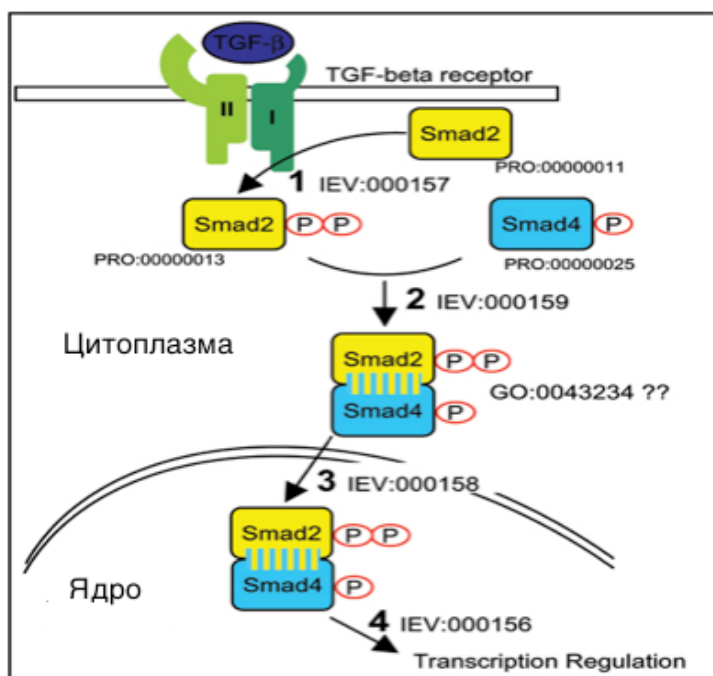


Рис 14. Схема передачи сигнала Tgf-beta [56].

2.2.5.3. Матриксные металлопротеиназы

Матриксные металлопротеиназы - семейство цинк-зависимых внеклеточных эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. Игрют роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференциации клеток. На начальных этапах регенерации также необходимо включение матриксных металлопротеиназ, они ответственны за поддержание контактов между эпителием и мезенхимными клетками, предотвращают формирование базальной мембраны [57]–[59].

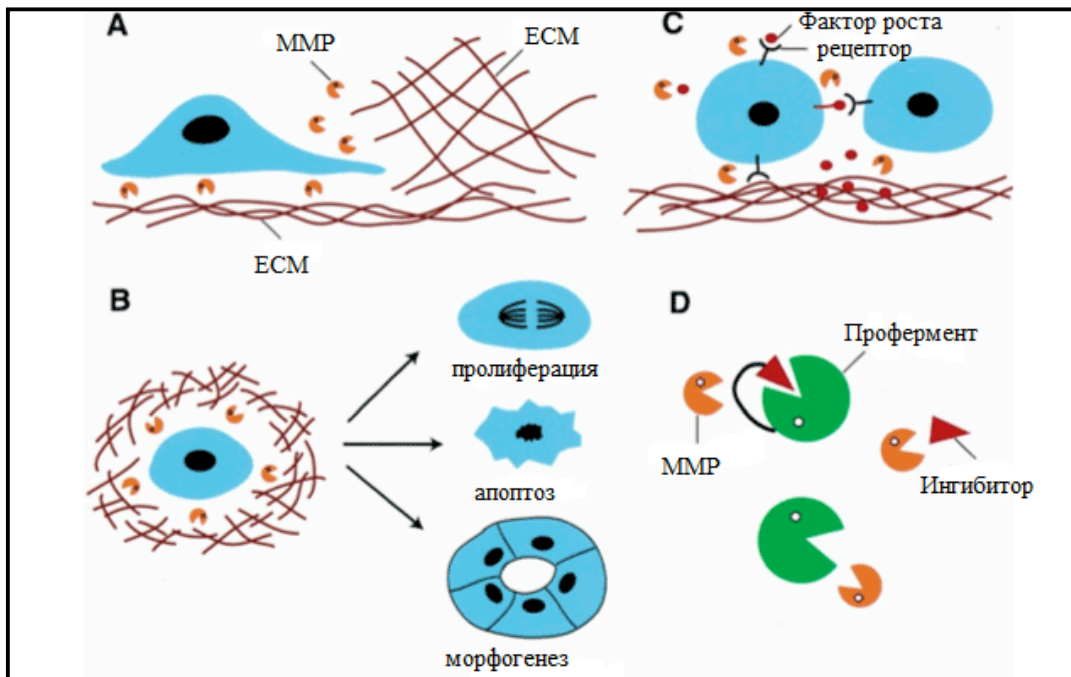


Рис.15 Механизм действия матриксных металлопротеиназ. MMP - Matrix metalloproteinases (матриксные металлопротеиназы); ECM - Extracellular matrix (внеклеточный матрикс) (A) Металлопротеиназы могут повлиять на миграцию клеток путем изменения способности клеток к адгезии и разрушения внеклеточного матрикса. (B) Металлопротеиназы способны изменять свойства внеклеточного матрикса, активируя таким образом пролиферацию клеток, апоптоз или морфогенез. (C) Металлопротеиназы модулируют активность факторов роста или их рецепторов, высвобождая их из внеклеточного матрикса. (D) Металлопротеиназы так же способны изменять активность различных ферментов.

2.2.5.4. *Wnt* сигнальный путь

Название *Wnt* - это комбинация *Wg* (англ. *wingless*) и *Int*. Ген дрозофилы *wingless* (бескрылый) первоначально был идентифицирован по рецессивной мутации, подавляющей у мушки развитие крыльев.

Wnt – это богатые цистеином гликопротеиновые лиганды, активирующие различные внутриклеточные сигнальные каскады. Они регулируют клеточные процессы, подвижность и пролиферацию клеток. *Wnt* связывается с рецепторами семейства Frizzled (FZD). Это взаимодействие активирует канонический сигнальный путь, включающий бета-катенин, или неканонический сигнальный путь, не зависящий от бета-катенина. В отсутствии *Wnt*, бета-катенин, находящийся в цитозоле клетки связан с белками APC, axin1, axin2[60]. Также бета-катенин может подвергнуться быстрому протеасомному расщеплению под действием серин-треониновых киназ CKI-alfa и GSK3-beta. Связывание *wnt* с FZD-рецептором и корецептором LRP5/6 приводит к стабилизации бета-катенина. Свободный бета-катенин перемещается в ядро клетки и активировывает экспрессию генов[61]. Дальнейшая регуляция сигнала осуществляется посредством FZD-антагониста *Wnt* ингибиторного фактора 1. Он конкурирует с *Wnt* за

связывание с FZD-рецептором. Количество корецепторов LRP5/6 на поверхности клетки регулируется с помощью белков Dickkopf (Dkk)[5]. Dkk ослабляют проведение сигнала, снижая количество LRP5/6, стимулируя их интернализацию. Белки семейства R-spondin 1 являются антагонистами Dkk (Рис.16)[62]. Канонический сигнальный путь *Wnt* важен на ранних стадиях регенерации, в период формирования регенерационной бластемы. На модели головастиков *Xenopus laevis* и рыбы *Danio rerio* было показано, что ингибирование этого пути ведет к нарушениям или отсутствию регенерации как таковой[63][64]. Вероятно, это обусловлено нарушением других процессов, регулирующих нормальный ход регенерации. Действительно, подавление экспрессии лиганда Wnt3a - активатора Wnt/beta-катенин сигнального пути – вызывало ингибирование сигнального каскада *Fgf*, который также необходим для нормальной регенерации. Таким образом, было показано, что мишенью сигнального пути *Wnt* являются белки семейства *Fgf*. Их включение вероятно необходимо для поддержания самого процесса регенерации и активной пролиферации клеток[65].

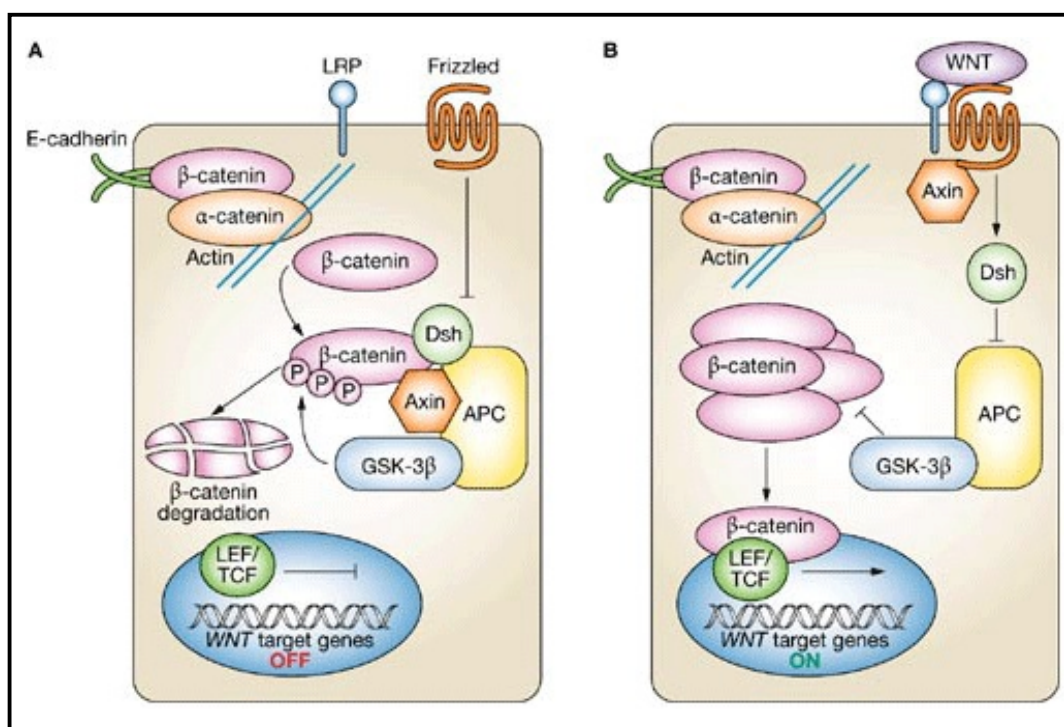


Рис.16. Схема сигнального пути *Wnt*. А – в отсутствии Wnt рецепторы *dishevelled* неактивированы и бета-катенин подвергается разрушению. В – при связывании Wnt с frizzled рецепторами, *dishevelled* рецепторы активируются и бета-катенин отсоединяется от APC комплекса и таким образом бета-катенин может ассоциироваться с транскрипционными факторами и регулировать транскрипцию генов – мишеней [66].

Участие *Wnt* пути в формировании бластемы подтверждается сериями экспериментов с использованием heat-shock индуцибельной экспрессии *Dkk1*, потенциального ингибитора канонического *Wnt* пути[41]. Стимуляция экспрессии *Dkk1* проводилась после ампутации

плавника в течение недели. Далее производилась оценка морфологии, гистологии и пролиферации плавника. В первые дни наблюдалось прекращение формирования бластемы и экспрессии *lef1* и *msxb1*. Следовательно, блокирование *Wnt* пути нарушает формирование бластемы. Так же экспрессия *Dkk1* приводила к снижению пролиферации эпителиальной и мезенхимальной тканей и предотвращению миграции клеток к ране.

Wnt/бета-катенин сигналы действуют через Fgf и BMP, контролируя формирование эпидермы, и активируют передачу сигналов ретиноевой кислоты и *Shh*, которые влияют на формирование бластемы и пролиферацию клеток[64]. Уейдингер и коллеги полагают, что *Wnt* сигналы создают организационные центры, которые управляют ростом и дифференцировкой тканей во время регенерации плавника *Danio rerio* (Рис. 17).

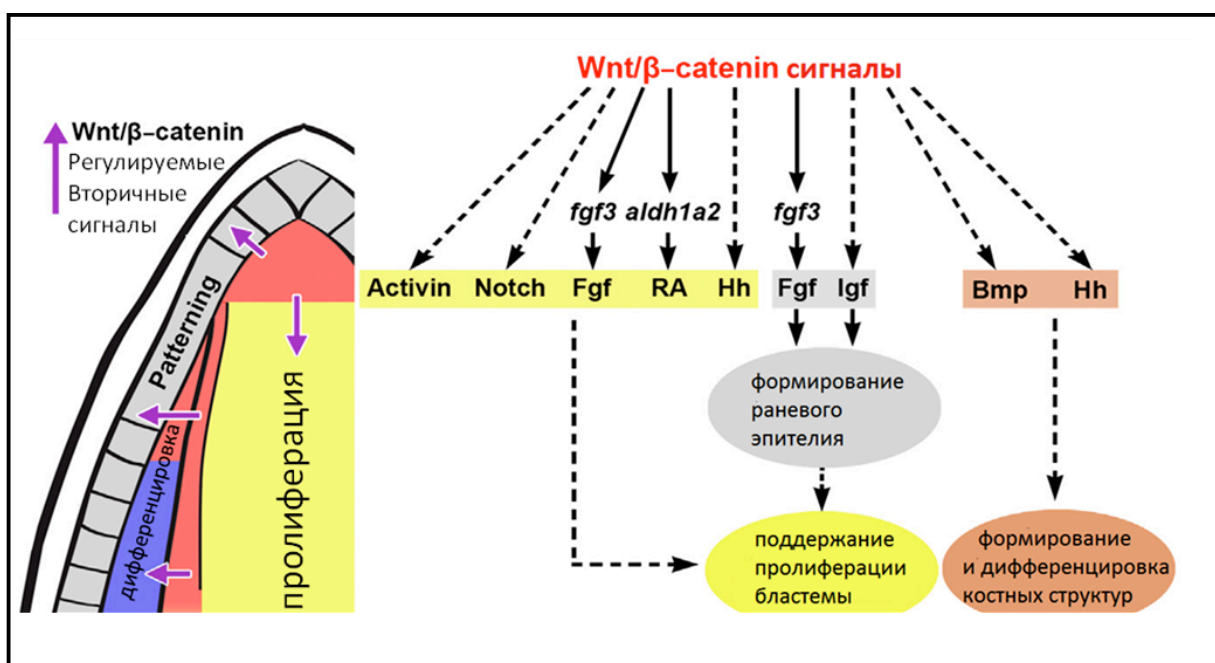


Рис.17. Схема процессов и регулирующих их сигнальных путей при регенерации плавника *Danio rerio*. Продольный срез[64].

2.2.5.5. Fgf сигнальный путь

Fgf (Fibroblast growth factor – фактор роста фибробластов) – член семейства коротких секретируемых гепарин-связывающих белков, которые индуцируют димеризацию/активацию тирозинкиназных рецепторов Fgfr (Рис.17). Fgf путь вовлечён в регенерацию ран у млекопитающих, регенерацию хвоста, конечностей и скелетной мускулатуры, а также участвует в эмбриональном развитии сердца и ангиогенезе [67]. Существует несколько доказательств важной роли Fgf в эпиморфной регенерации. Нарушение сигнализации Fgf приводит к ингибированию формирования бластемы. Активация факторов Fgf одна из самых важных и ключевых для процесса регенерации. Известно, что фактор Fgf2 участвует в

регенерации конечностей головастика и способен восстанавливать способность к регенерации в рефрактерные периоды[68]. Фактор Fgf8 играет важную роль в формировании апикального эпителия в регенерационной бластеме и взаимной индукции фактора Fgf10, еще одного важного участника регенерации [58], [63], [69], [70]. Многие из этих генов используются в качестве позитивных маркеров регенерации. В плавнике взрослой рыбы *Fgfr1* экспрессируются в мезенхимальных клетках, расположенных проксимально по отношению к эпителию раны[71]. Нарушение сигнализации *Fgfr1* приводит к ингибированию формирования бластемы и блокировке экспрессии генов *msxb* и *msxc*, которые являются предполагаемыми маркерами недифференцированных пролиферирующих клеток в регенерирующей ткани хвостового плавника. В подтверждение этому, нокдаун морфолинами к *Fgfr1* снижает экспрессию *msxb* и *msxc* в плавнике взрослой рыбы[72]. На плавниках рыбы *Danio rerio* было показано отсутствие *Fgf20a* приводит к отсутствию пролиферации мезенхимы во время формирования бластемы. Были получены мутантные животные, содержащие мутацию *Fgf20a*, что приводило к отсутствию пролиферации мезенхимы во время формирования бластемы. *Fgf20a* начинает экспрессироваться спустя 6 часов после ампутации в клетках бластемы и экспрессия достигает своего пика спустя сутки после ампутации, после чего снижается. Недавние исследования показали, что *Wnt* путь участвует в регуляции экспрессии *Fgf20a*, *Fgf20a* в свою очередь активирует транскрипционный фактор *Lef1*, тем самым обеспечивается реципрокное взаимодействие между *Fgf* и *Wnt* путями. Все эти результаты доказывают, что *Fgf* путь важен для заживления ран и инициации формирования бластемы[73], [74]. Все эти результаты доказывают, что *Fgf* путь важен для заживления ран и инициации формирования бластемы.

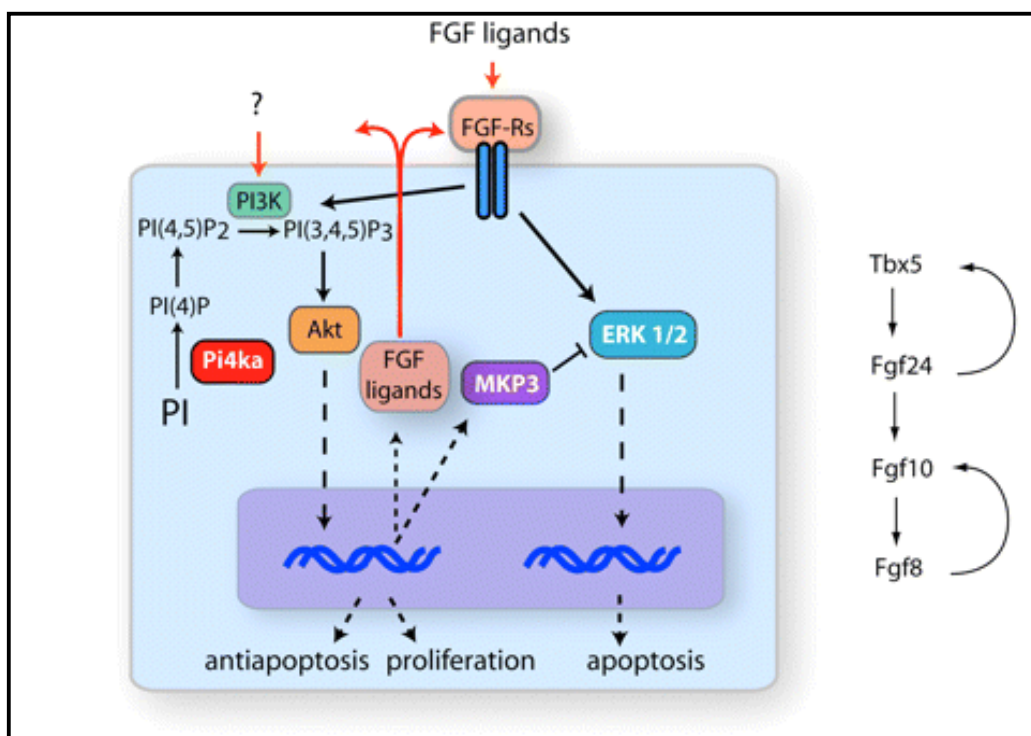


Рис.18.Схема активации сигнального каскада *Fgf* [75].

2.2.5.6. *BMP* сигнальный путь

Один из сигнальных путей TGFbeta - *BMP* сигнальный путь (Рис.18). Белки группы *BMP* являются многофункциональными факторами роста, принадлежащими к суперсемейству TGFbeta (Tumor Growth Factor beta) и играют важную роль в эмбриогенезе [76]. Для нормальной регенерации необходима активация *BMP* каскада и всех его участников. В хвостах головастика он необходим уже после стадии формирования раны, на стадии появления бластемы. Факторы *BMP2* и *BMP4* непосредственно индуцируют экспрессию транскрипционных факторов *Msx*, которые ингибируют дифференцировку клеток и участвуют в индукции апикальной эпителиальной шапочки [43], [77].

В частности, *Msx* - транскрипционный фактор, активируемый *BMP*, необходим для поддержания пролиферации и недифференцированного состояния бластемных клеток [78]. Было показано, что белки *Smad1*, *5* и *8* непосредственно имеют рецепторы к *BMP* и играть центральную роль в трансдукции сигнала *BMP*. Сигнал *BMP* важен для поддержания пролиферативной активности клеток. Подавление *BMP* его ингибитором, таким как *Noggin*, ведет к нарушениям регенерации [31]. Путем активации и ингибирования *BMP* пути было показано его прямое участие в регенерации [40], [43], [78]. Прямыми мишенями сигнала *BMP* являются транскрипционные факторы *Msx*. Их регенерационная активность связана с несколькими тканями, однако их ключевая задача - ингибирование преждевременной дифференцировки клеток, что позволяет клеткам делиться, формируя регенерационную почку

[43]. Зависимость успешной регенерации от наличия факторов *Msx* была показана во многих экспериментах [31], [40], [43], [65], [78].

В хвостах головастика активация *BMP* сигнального пути приводит к включению сигнальных каскадов других факторов, таких, как *Fgf*, *Notch* и *Wnt*, то есть этот сигнальный каскад включается одним из первых [31]. У головастика *Xenopus laevis* напрямую от сигналов *BMP* зависит регенерация мышечной ткани, а регенерация спинного мозга и хорды идет через *Notch* активируемый каскад [43]. Таким образом, еще одна из мишеней *BMP* - это сигнальный путь *Notch*. На примере регенерирующих плавников *Danio rerio* было показано, что белки *BMP* задействованы в остификации тканей при регенерации. Было показано, что эктопическая экспрессия *BMP2* в бластеме приводила к чрезмерному отложению костных образований и ненормальному структурированию плавника [79].

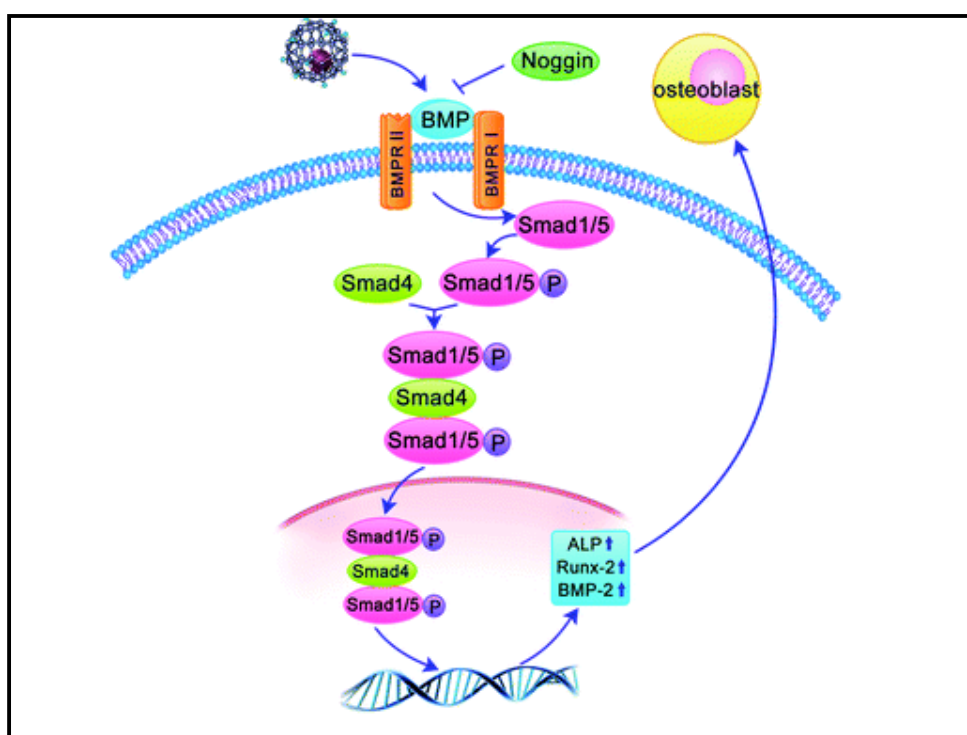


Рис.19. Схема сигнального каскада *BMP*, активация *Smad* белков [80].

2.2.5.7. *Hedgehog* сигнальный путь

Важную роль в регенерации играет сигнальный путь, активируемый белком *Shh*. Данный сигнальный путь регулирует установление антерио-постериорной оси. Активация *Shh* сигнализации оказывает положительное влияние на пролиферацию клеток, структуру и дифференцировку тканей, на скелетные элементы [81]. Белком – мишенью сигнального каскада *Shh* является транскрипционный фактор *Gli1*, активирующий пролиферацию и дифференцировку клеток. Клетки бластемы при контакте с эпидермальным слоем дифференцируются в

склеробласты, которые в конечном итоге дают начало соединительной ткани и компонентам скелета при регенерации плавника. Склеробласты синтезируют и высвобождают дермальный костный матрикс в суб-эпидермальное пространство, которое активно минерализуется, чтобы получились новые скелетные структуры [82]. Очевидно, что мишени сигнального каскада *Shh* задействованы в остификации тканей при регенерации. Было показано, что эктопическая экспрессия *Shh* в бластеме плавников *Danio* приводила к чрезмерному отложению костных образований и ненормальному структурированию плавника [79]. Кроме того, показано, что *Shh* секретируется клетками т.н. зоны поляризующей активности, расположенной на проксимальной стороне почки конечности головастика *Xenopus laevis* [83].

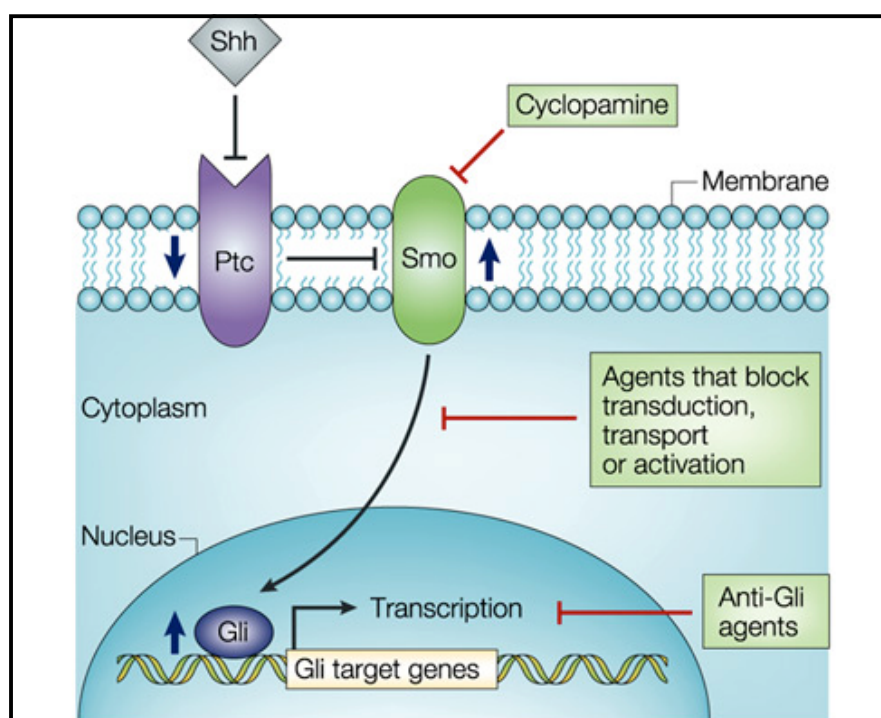


Рис.20. Схема передачи сигнала *Shh* [84].

2.2.5.8. *Igf* сигнальный путь

Инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor) *Igf*-1 способствует митозу и дифференциации различных клеток. Рецепторы *Igf*-1 состоят из двух внеклеточных альфа-субъединиц, и двух мембранных бета-субъединиц. Альфа-субъединицы содержат гормон связывающие сайты. Бета – сопряжены с тирозинкиназами. *Igf* -1 сигналы передаются по сложным сетям серин/треониновых киназ и в конечном итоге активируют клеточную пролиферацию, способствуют дифференциации тканей и препятствуют апоптозу [85]. Во время регенерации плавников *Danio* бластема индуцирует экспрессию лиганда *IGF2b*, который затем активирует *Igf* сигнальный путь в клетках, смежных с апикальным эпителием [86].

Ингибирование *Igf -1* сигнала в бластеме с помощью морфолино, или иных специфических блокаторов, препятствует регенерации плавника [86]. На клеточном уровне это выражается в отсутствии базального эпителия и усиленном апоптозе в эпидермисе раны [85].

Аналогичных данных на *Xenopus laevis* получено не было.

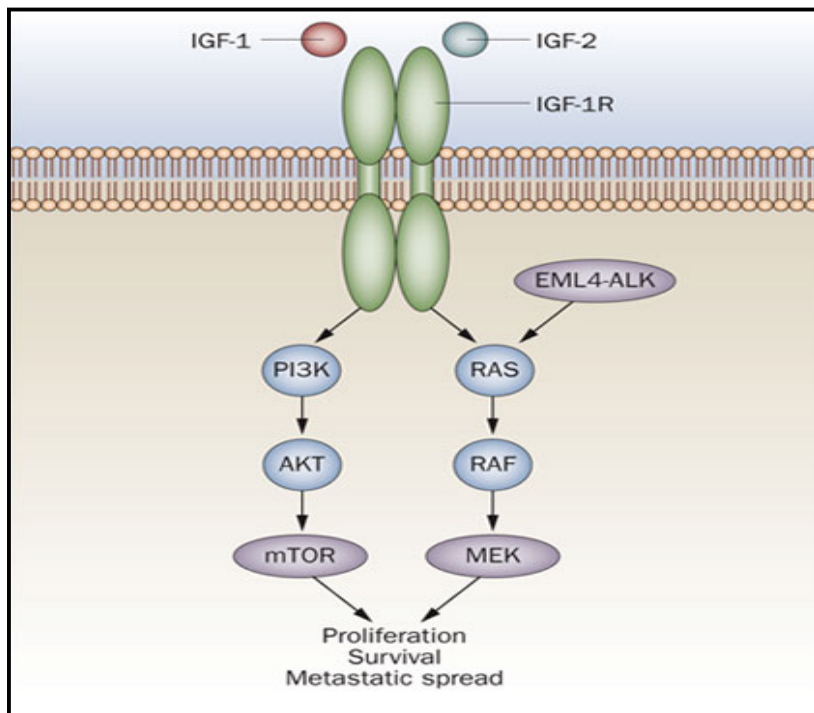


Рис.21. Схема передачи сигнала IGF-1 [87].

2.2.5.9. Другие сигнальные каскады

Как известно, что после определенных стадий регенерации активируются процессы аналогичные онтогенезу. Так, например, активируется большинство поляризующих факторов, которые отвечают за правильное формирование осей: дорсо-вентральной, anteriорно-постериорной, проксимо-дистальной. Способность клеток определять своё положение в трёхмерном пространстве необходима для нормального протекания процесса регенерации и правильного формирования органа после ампутации[74].

Ретиноевая кислота. Ранние работы по изучению регенерации хвоста *Danio rerio* продемонстрировали важную роль ретиноевой кислоты при формировании плавника в процессе эпиморфной регенерации. Гамма рецептор ретиноевой кислоты экспрессируется в клетках бластемы и его взаимодействие с ретиноевой кислотой вызывает морфологические изменения плавника при регенерации [88]. Ретиноевая кислота ингибирует регенерацию, влияя на размер и форму образующейся бластемы, а также индуцируя апоптоз в апикальной эпидермальной шапочке [89].

Активин-бета. Было показано участие активина в процессах регенерации плавников рыб. При подавлении его активности наблюдались частичное подавление регенерации и нарушения строения плавника.

Нох гены. Правильное формирование проксимо-дистальной оси во время регенерации почки конечности регулируется *hox* генами. Например, такие как гены, как *Hoxa11* и *Hoxa13* появляются в регенерационной бластеме достаточно рано, и, со временем, профиль их экспрессии начинает соответствовать профилю экспрессии развивающегося органа [90][91].

2.2.6. Гены семейства *Agr* и *Ras-dva* в регенерации

Ранее мы предположили, что утрата генов *Agr1* 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. Факты исчезновения генов *Agr1*, *Ras-dva1* и *Ras-dva2* в эволюции, а так же функциональная связь *Ras-dva1* с *Fgf8* и *Agr* белками, регулирующими не только раннее развитие, но и процессы регенерации, свидетельствуют о потенциальной роли *Ras-dva* и *Agr* в процессе регенерации у низших позвоночных. Известно также, что в процессе раннего развития головного мозга эмбрионов шпорцевой лягушки гены *Agr* и *Ras-dva* связаны единой сигнальной петлей, запускаемой фактором роста фибробластов 8 (*Fgf8*) (см. Результаты и Обсуждения ч.1). Таким образом, эти гены могут быть ключевым звеном регенерационного механизма, утраченного высшими позвоночными. Кроме того, ген *Agr2* участвует в процессах регенерации у тритона и саламандры. У тритона был найден мембранный рецептор *Prod1*, специфически взаимодействующий с *nAG* (*newt anterior gradient*). Во время регенерации сначала экспрессия *nAG* обнаруживается в шванновских клетках в оболочке дистальных нервов, позже - в секреторных клетках раневого эпителия [92]. В тоже время, по крайней мере, близкие гомологи *Prod1* отсутствуют у других низших позвоночных, в том числе, у шпорцевой лягушки и у рыбы *Danio rerio*. 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. Исследованию данной проблемы будет посвящена вторая часть моей диссертационной работы.

3. Материалы и методы:

3.1. Лабораторные животные

Для получения зародышей и головастиков в работе использовали самцов и самок шпорцевых лягушек *Xenopus leavis* Daudin. Также использовали трансгенную линию лягушек *Xenopus leavis* pro *Xag2-EGFP*.

Зародыши шпорцевой лягушки *Xenopus leavis* являются одним из наиболее удобных объектов для исследования процессов развития нервной системы на самых ранних стадиях развития. К достоинствам объекта можно отнести: легкость получения зародышей; большой размер зародышей – 1,2-1,4 мм (что облегчает наблюдения, манипуляции с ними (можно использовать микрохирургические методы, осуществлять микроинъекции); развитие до поздних стадий без существенного изменения общего объема зародыша (следовательно, нет разбавления микроинъектированного материала); имеются таблицы нормального развития; быстрый темп развития (при комнатной температуре развитие до завершения нейруляции проходит за два дня); наличие большого количества генетических маркеров.

Кроме того, в работе были использованы рыбы *Danio rerio*. Данный вид является традиционным модельным объектом для экспериментальных исследований процесса регенерации. Вид неприхотлив, легко содержать в условиях лаборатории. Плавники *Danio* имеют простую структуру и способны полностью регенерировать в течение сравнительно короткого времени.

3.2. Используемые реактивы

Хориогонический гонадотропин (Sigma, США), NaCl (Helicon, Россия), KCl (Helicon, Россия), MgCl₂ (USB, США), CaCl₂ (Fluka, Швейцария), EDTA (Helicon, Россия), HEPES (Helicon, Россия), MgSO₄ (Helicon, Россия) MS222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester; Sigma, США), агароза (Helicon, Россия), L-цистеин (Диаэм, Россия), этанол, MgSO₄·7H₂O (Helicon, Россия), MOPS (Helicon, Россия), EGTA (Helicon, Россия), параформальдегид (Sigma, США), Na₂HPO₄·7H₂O (Helicon, Россия), NaH₂PO₄·2H₂O (Ferak, Германия), Tween-20 (Helicon, Россия), протеиназа К (Sigma, США), триэтаноламин хлорид (Aldrich, Германия), ацетангидрид, формамид (BRL, США), препарат TorulaRNA (Sigma, США), сахароза (Диаэм, Россия), ингибиторы протеаз – leupeptin, chymostatin, pepstatin, PMSF (Sigma, США), CHAPS, бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США), фиколл 400 (Диаэм, Россия), поливинилпирролидон (Sigma, США), SP6 и T7 РНК-полимеразы (Promega, США) для синтеза дигоксигенин-меченных РНК-зондов, дигоксигенин-специфичные антитела, связанные с щелочной фосфатазой anti-dig-AP-Fab fragment (Enzo, Германия), РНАзин (Promega), смесь

дигоксигенин-меченных рибонуклеотидов [3,5mM digoxigenin-UTP+6,5mM UTP+10mM ATP+10mM GTP+10mM CTP] (Boehringer Mannheim, Enzo, Германия), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (Силекс, Россия), ВМР (Boehringer Mannheim Purple) – субстрат для щелочной фосфатазы (Roche, Германия), блокирующий реагент, BR, blocking reagent (Roche, Германия), левамизол (Sigma, США), набор RNeasy mini kit (Qiagen), ДНКазы, малеиновая кислота (MERCK, Германия), lamb serum (Invitrogen, США), дигоксигенин-специфичные антитела, связанные с щелочной фосфатазой anti-dig-AP-Fab fragment (Enzo, Германия), Tris Base (Helicon, Россия), NaOH (Авогадро, Россия), ингибиторы протеаз - leupeptin, chymostatin, pepstatin, PMSF (Sigma, США), краска для нанесения на гель (Силекс); бромистый этидий (Helicon), Trizol Reagent (Ambion), хлороформ (Химмед), NaOOCCH₃ (Sigma, США), гликоген (Fermentas), буфер для М-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Promega, США), М-MuLV обратную транскриптазу (Promega, США), oligo-dT primers (Евроген, Россия), М-MuLV RT kit – набор для ОТ-ПЦР (Евроген, Россия), 5x реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), маркер длины ДНК 1000н.п. (Fermentas), морфолиновые олигонуклеотиды (Gene tools, США), фиколл 400 (Диаэм, Россия), L-цистеин (Диаэм, Россия), protease inhibitor cocktail (Sigma, США), Spermine tetrahydrochloride (Sigma, США), Dithiothreitol (Sigma, США), PMSF (Sigma, США), Leupeptin (Sigma, США), Hoechst (Sigma, США), Sigmacote (Sigma, США), набор Wizard Plus Minipreps (Promega, США), рестриктаза Sfi I и буфер к ней (Fermentas), Dapi (Sigma, США), набор Wizard PCR Preps (Promega, США), этанол, бутанол, ксилол, парапласт (Monoject scientific Inc., Ирландия), канадский бальзам (Mihcrome, Англия), набор колонок с буферами и растворами для выделения РНК (Macherey Nagel), Versilube F-50, creatine phosphate (Sigma, США), adenosine triphosphate (Sigma, США).

3.3. Ферменты

В работе использовали SP6 полимеразу для транскрипции *in vitro* (Ambion.), SP6 и T7 РНК-полимеразы (Promega, США) для синтеза дигоксигенин-меченных РНК-зондов, дигоксигенин-специфичные антитела, связанные с щелочной фосфатазой anti-dig-AP-Fab fragment (Enzo, Германия), эндонуклеазы рестрикции: *XhoI*, *EcoRI*, *BamHI*, *KpnI* (Promega), ДНК-лигазу фага Т4 (Promega), термостабильную Taq-ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus*, РНКазу H (Promega), протеиназу К (Sigma), РНАзин (Promega).

3.4. Используемые растворы

0.1x MMR+HEPES (Модифицированный раствор Рингера для культивации зародышей амфибий): 0.1M NaCl, 2.0 mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 5mM HEPES pH7.8, 0.1mM EDTA;

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

2% цистеин, на 500 мл: 10 г цистеина, 25 мл 20хХВ (Довести pH до 7,8 (около 7 мл 10 N NaOH))

20хPBS: 120мМ NaCl, 7мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.7мМ KCl, pH 7.4;

PTW: PBS + 0.1% Tween20;

Предгибризационный буфер PH-буфер: 50% формамид, 5хSSC, 1 мг/мл Torula RNA, 1х Denhart's, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS, 10мМ EDTA;

Denhart's: 0.02% фиколл, 0.02% поливинилпирролидон, 0.02% BSA.

20хSSC: 0.15М NaCl, 0.015М цитрат натрия дигидрат;

МАВ: 100мМ малеиновая кислота, 150мМ NaCl, pH 7.5;

Буфер для щелочной фосфатазы: 100мМ Tris HCl pH 9.5, 50мМ MgCl_2 , 100мМ NaCl, 0.1% Tween20.

50хТАЕ (50-кратный буфер для электрофореза в агарозном геле): 2 М трис-ацетат, pH 8.2 М Tris, 1,56 М уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА.

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

Energy Mix: 150 mM creatine phosphate, 20 mM ATP, 20 mM MgCl_2

20хMMP, на 500 мл: NaCl 100 мМ, KCl 2 мМ, CaCl_2 2 мМ, MgCl_2 1 мМ

20хХВ, на 200 мл: KCl 2 М, CaCl_2 2 мМ, MgCl_2 20 мМ

CSF-ХВ: 20хХВ (100 мМ KCl, 0,1 мМ CaCl_2 , 1мМ MgCl_2), 1М MgCl_2 1 мМ, 1,5 М сахарозы 50 мМ, 1 М HEPES 10 мМ, 200 мМ EGTA 5 мМ, по 75 мкл - ингибиторы протеаз.

1,5М сахароза

1М HEPES

1М MgCl_2

1М CaCl_2

200 мМ EGTA

10 N NaOH(автоклавируемый)

Ингибиторы протеаз, 10 мг/мл в DMSO(leupeptin, chymostatin, pepstatin, PMSF)

Versilube F-50

Energy Mix: 150 mM creatine phosphate, 20 mM ATP, 20 mM MgCl_2

20хMMP, на 500 мл: NaCl 100 мМ, KCl 2 мМ, CaCl_2 2 мМ, MgCl_2 1 мМ

1хMMP

20хХВ, на 200 мл: KCl 2 М, CaCl_2 2 мМ, MgCl_2 20 мМ

1хХВ: 20хХВ (100 мМ KCl, 0,1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2), 1,5 М сахарозы 50 мМ, 1М HEPES 10 мМ. Доводили pH до 7,7

2% цистеин, на 500 мл: 10 г цистеина, 25 мл 20хХВ. Довести pH до 7,8 (около 7 мл 10 N NaOH)

CSF-ХВ: 20хХВ (100 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂), 1M MgCl₂ 1 mM, 1,5 M сахарозы 50 mM, 1 M HEPES 10 м, 200 mM EGTA 5 mM

Spermidin trihydrochloride 10 mM

Spermine tetrahydrochloride 10 mM

Dithiothreitol 100 mM

EDTA pH 8 500 mM

BSA 10%

КОН pH 7,6

Глицерин

Digitonin 10 mg/ml в DMSO

KCl 1M

Hoechst x 100, 0,1 mg/ml

2хNPB: 1,5 M Сахароза, 500 mM, 1 M HEPES pH 7,7, 30 mM, 10 mM Spermidin 1 mM, 10 mM Spermin 0,4mM, 100mM DTT 2 mM, 250mM EDTA pH 8, 2 mM, 7,7 КОН pH до 7,7

1хNPB + 3% BSA + ингибиторы протеаз: 2хNPB, 10% BSA, вода, а перед употреблением добавили: PMSFx1000, Leupeptnin x1000

1хNPB +0,3% BSA: 1хNPB, 10% BSA

Буфер для замораживания: 2хNPB, glycerol, 10%BSA

Буфер для хранения: 2хNPB, glycerol, 10%BSA, вода

SDB:

	stock	Конц.
Сахароза	1,5 M	250 mM
KCl	1 M	75 mM
Spermidin	10mM	0,5mM
Spermin	10mM	0,2mM
NaOH	0,1 N	

20хMMR

1M HEPES

1x MMR

Цистеин 2% на 1хMMR pH8

Агароза 2% на 0,4 MMR

Фиколл 6% на 0,4хMMR и 0,1хMMR

0,1х MMR

SDB

Плазмида 200- 250 нг/мкл

Экстракт из яйцеклеток (предварительно прогрели при 80°C 3 мин и откручивали на центрифуге 10 мин 13000 об/мин. Отобрали супернатант о чистую пробирку).

Equilibration Buffer: 200mM potassium cacodylate (pH 6.6 at 25°C), 25mM Tris-HCl (pH 6.6 at 25°C), 0.2mM DTT 0.25mg/ml BSA, 2.5mM cobalt chloride

proteinase K buffer: 100mM Tris-HCl (pH 8.0) 50mM EDTA.

Nucleotide Mix: 50µM fluorescein-12-dUTP 100µM dATP, 10mM Tris-HCl (pH 7.6) 1mM EDTA

3.5. Микробиологические среды

Среда Лурия-Бертани LB для выращивания бактерий *Escherichia coli*: 1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% хлорид натрия, 0.01 mM Tris-HCl (pH 8.0).

Среду автоклавировали 45 мин. При 1 атм. И хранили при комнатной температуре.

«LB- агар» - перед автоклавированием в среду LB дополнительно добавлен агар (Difco) до концентрации 1.5 %.

В работе использовали штамм *E.coli*-DH5α.

Среда D-MEM (Invitrogen), содержащая 10% фетальной телячьей сыворотки (РАА Laboratories), для выращивания культуры мышинных фибробластов NIH-3T3

Среда Opti-MEM (Invitrogen, США)

3.6. Используемое оборудование

Ножницы капсулотомические по Ваннас (Cilita, Россия), лезвие бритвы «Спутник» качалка (Shaker S3, ELMi), флуоресцентный стереомикроскоп (Leica MZ FLIII) с цифровой камерой (Leica DC 300F), вибратором Microm HM 650V (Thermo Scientific, США), настольную центрифугу (Eppendorf minispin Cyclo Temp 202), термостатируемую качалку (Scello), вортекс (Sybron Thermolyne maxi mix), систему очистки воды (Milli-Q Water Purification system), весы аналитические (Ohaus), автоматические микропипетки (Gilson), термостаты «Гном» и «Термит» (ДНК-технология), термостат (ТС-80М-2), источник постоянного тока (Hoefer PS250/2.5 AMP), спектрофотометр (Biophotometer, Eppendorf), pH-метр (Radelkis OP-211/2), микроскоп Polyvar (Reichert-Jung, Австрия), стереомикроскоп (Leica S4 E), анализатор нуклеиновых кислот АНК-32 (Syntol, Россия), настольная центрифуга с охлаждением (Eppendorf 5415R), стрипы для RT-PCR и крышки к ним (SSI, США), напольная центрифуга с охлаждением (Jouan GR412), шейкер с термостатируемой камерой (C26 Incubator shaker Edison), микроинъектор Femtojet (Eppendorf),

нагревательный столик (Россия), санный микротом (Россия), вибратор (Leikabiosystems), криостат (TermoFisher).

3.7. Бактериальные штаммы и микробиологические среды

Бактерии *Escherichia coli*-штамм DH5 α , Среда Лурия-Бертани (LB) для выращивания бактерий *Escherichia coli*: 1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% хлорид натрия, 0.01 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 1.5 % агар (только для заливки чашек), стерилизация автоклавированием.

3.8. Используемые праймеры для Realtime-PCR

- xODC (dir - 5' - GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC, rev - 5' - TTCGGGTGATTCCTTGCCAC)
- xEf-alfa (dir - 5' - TCATACAGCTCATATTGCTTGTAAGT, rev - 5' - CAAGTGGAGGATAGTCTGAGAA)
- Ras-dva1 (dir - 5'-TACCGGCGCACAGTGGAGGA, rev - 5'-GGCACCTCGGCGTCTCCTTT)
- Ras-dva2 (dir - 5'-GGCGACCTGAAGGTGTCTTG, rev - 5'-TCCTCCTCAGTGCCGGGCTT)
- Xag2 (dir - 5'-TGCTGCCAAGTCTGAGCCTGC, rev - 5'-CCTGAGCCAGTTTCTGTGCCA)
- Xagr2a (dir - 5'-TGGCCAGTATGTTCCCAAGGTTGT, rev - 5'-CATCACTTTAGCATACACCTCCGC)
- Xag1 (dir - 5'-AAACTGATCAAGAGCCTGCACCAA, rev - 5'-TGCCATTTCGATCAGCGACAAAAGC)
- Xagr2b (dir - 5'-GACCCACAGATAAGAACCTTCAGC, rev - 5'-GCTGGTTCATAGGTGTAAGTGGTGGT)
- Xagr3 (dir - 5'-ATCCGGTCACCACAGACACTATC, rev - 5'-TTGGCAATACTGACACTCTTCTA)
- Bf1 (dir - 5' - AACAAGCAGGGCTGGCAGAA, rev - 5' - CCGCTCTATCCATAAAGGTG)
- Fgf8 (dir -5' -CTGCGTCTTCTCGGAAATTGTC, rev - 5'-TTTGGCAACCTCTTCATGAAGT)
- xEf-alfa (dir -5' - AAGAACGTGTCAGTCAAGGACAT, rev - 5'-CGTAACCCTGAGAGATCTGACCA)
- xODC (dir -5' - CTCCACCTTCAATGGCTTCCAG, rev - 5'- AGTGGGATGGCACGTTTCCAG)
- DAgr1 (dir -5' - CACTGGCCGCTCTGTATACTT, rev - 5'- CTCTTGAGAGAGTTTGGACTGT)
- DAgr (dir -5' - AACCACAGAGCGTGTCAAGT, rev - 5'- ACAGTGCTAATGCTTTCATTG)
- dRas-dva1 (dir -5' -CAACAGATGAAGTTACCGA, rev - 5'-ACATTTTCATATAAATGTCC)
- dRas-dva2 (dir -5' -AAGGTGGAGATGGACTGGAAC, rev - 5'-GCCGTAGACTCAAGTCTTTAG)
- zFgf20a (dir -5' - AAGGGCGAAGTGTACGGAT, rev - 5'- TTGAGGGCTACATAATAAT)
- zIgf2b (dir -5' - GCAGGTCATTCCAGTGATGC, rev - 5'- TCTGAGCAGCCTTCTTTGC)
- Msx1b (dir -5' -TCTCCTATGGGACTTTACACA, rev - 5'-AATCACTCAAGTCTTCTTTC)
- Fgf20 (dir -5' -ATCACAGCCGATTCGGTATCC, rev - 5'-CTCAAAGTGTCCCGAAAAATGC)

3.9. Эксперименты

Для получения зародышей и головастиков в работе использовали самцов и самок шпорцевых лягушек *Xenopus laevis*. Также использовали трансгенные линии лягушек, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок GFP под контролем промотора гена *Xag2* (Линия *pro-Xag2-EGFP*), а также созданную трансгенную линию лягушек. Зародышей шпорцевой лягушки получали методом искусственного оплодотворения. Для этого самкам инъецировали хорионический гонадотропин (400-500 единиц) в спинной лимфатический мешок. Через 12-15 часов самка шпорцевой лягушки начинала метать икру. С помощью надавливающих движений вдоль хребта по направлению к тазовой части спины лягушки мы сдваивали икру в чашки Петри, где и проводили искусственное оплодотворение, приводя в контакт с вырезанным у самца семенником в 0.1x MMR. После оплодотворения у зародышей удаляли наружные оболочки 2% раствором L-цистеина, промывали зародышей 0,1xMMR 5 раз в течение 15 минут и оставляли их в 0.1x MMR.

Далее под бинокуляром отбирали зародышей на стадии 2-4 бластомеров для микроинъекций в 60-луночные плашки Теразаки с 4% раствором фиколла в 0.1x MMR. Стадии развития зародышей определяли по таблицам нормального развития Ньюкупа и Фабера. Микроинъекции производились микроинъектором Femtojet (Eppendorf). Для микроинъекций использовали смеси 5% FLD (Fluorescein Lysin Dextran MW 40.000) и либо мРНК следующих концентраций: Fgf8 - 50ng/μl; Ras-dva1/2 - 60-100ng/μl; Agr2a/b - 60-120ng/μl; Ag1/2 - 60-120ng/μl. Либо водные растворы синтетических анти-смысловых олигонуклеотидов (описаны ранее) в концентрациях по 0,25 мМ. Используемые концентрации мРНК и олигонуклеотидов и тип закола (выбор бластомеров и стадии) устанавливались экспериментально, в зависимости от цели исследования (регенерация придатков или ранний нейрогенез) и процента неспецифических летальных исходов в развитии микроинъецированных зародышей шпорцевой лягушки. При микроинъекциях указанных концентраций синтетических мРНК и олигонуклеотидов доля летальных исходов развития зародышей шпорцевой лягушки в среднем не превышала 20%. В анимальную часть 1-4 бластомеров микроинъецировали по 4-8 нл смеси на стадии 2-16 бластомеров соответственно в зависимости от типа инъецируемого раствора. Fluorescein lysinated dextran (FLD, Molecular probes) использовался в качестве метки для визуализации распределения инъецированного материала в зародыше с помощью флуоресцентного микроскопа. Фотографии трансгенных головастиков делали на флуоресцентом микроскопе в чашке петри с агарозой, в воде, содержащей небольшое количество анестезирующего вещества MS222.

Для исследования экспрессии целевых генов в раннем развитии использовали зародышей с 13 по 17 стадии развития, для исследования регенерации хвоста и зачатка почки задней конечности головастики 40 и 51-57 стадий соответственно. Зародыши развивались в 0.1х MMR достижения 40 стадии или начала кормления, затем их пересаживали в аквариум с обычной водой. Ампутации придатков проводили в чашке петри с водой, содержащей небольшое количество анестезирующего вещества MS222. Ампутиацию проводили капсулотомическими ножницами по Ваннасу, отрезали кончик хвоста и заднюю конечность на уровне предполагаемого колена. Затем головастиков помещали в аквариум с чистой водой и ставили на качалку (40 об/мин).

Для исследования процесса регенерации плавников рыбы *Danio* использовали взрослых особей *Danio rerio*. Ампутации также проводили в чашке петри с водой с содержанием анестезирующего вещества MS222 с помощью лезвия.

3.9.1. Блокирование эндогенных мРНК целевых генов при помощи микроинъекций синтетических анти-смысловых морфолиновых олигонуклеотидов.

Морфолино олигонуклеотиды (Мо) – это химически синтезированные модифицированные анти-смысловые олигонуклеотиды (www.gene-tools.com), незаряженные ДНК-миметики, структура которых способна блокировать доступ к целевым мРНК. Морфолиновые олигонуклеотиды блокируют небольшие одноцепочечные участки (около 25 н.) на поверхности молекул РНК. Они скомбинированы из 4-х различных морфолино-мономеров, каждый из которых содержит по одному из четырех азотистых оснований, присоединенных к шестичленному кольцу морфолина. Таким образом 18-25 морфолино-мономеров соединены фосфородиамидной связью в морфолино-олигонуклеотид. Такие морфолино-олигонуклеотиды обладают устойчивостью к внутриклеточным нуклеазам, высокой эффективностью ингибирования трансляции эндогенных мРНК по RNaseH независимому механизму, очень высокой специфичностью, нечувствительностью к вторичной структуре РНК-мишени, быстрым распределением между цитоплазмой и ядром, хорошей растворимостью в воде. Анти-смысловой морфолино-олигонуклеотид, связываясь с целевой мРНК-мишенью, препятствует её трансляции. В результате в клетке не синтезируется белок-мишень.

При помощи программы BLAST на основе существующих баз данных для *Xenopus laevis*, с учетом рекомендаций производителя Gene Tools, под заказ были синтезированы различные 25-тичленные морфолино-олигонуклеотиды, комплементарные 5'-НТО мРНК исследуемых генов. В качестве контрольных антисмысловых Морфолино был использованы Морфолино с 5-6 нуклеотидными заменами, благодаря которым отсутствует связывание с целевыми мРНК.

Для микроинъекций использовали 0,25 мМ водные растворы описанных морфолино олигонуклеотидов, смешанных с флуоресцентной меткой FLD. В 1-2 бластомера инъецировали 5-7нл растворов на стадиях 2-8 бластомеров (Nieuwkoop and Faber, 1967).

Для исследования процесса регенерации хвоста головастика эмбрионы дорастивали до 39-40 стадии, по флуоресценции отслеживали область попадания инъецируемой смеси морфолино, 1/4 часть хвоста ампутировали в растворе трикаина.

Последовательности используемых морфолиновых олигонуклеотидов:

Fgf8 - 5'-GGAGGTGATGTAGTTCATGTTGCTC,

Control - 5'-GCAGGGGATATAGTTGATGTTACTA;

Otx2a/b - 5'-GGTTGCTTGAGATAAGACATCATGC,

Control - 5'-GTTTTCTTGAAATAGGACATAATGT;

Ras-dva1 - 5'-GTGAGATTGCGCTTTCTTTTGTCTG,

Control – 5'-GTGACATTGCTCTTTCTTTTGTGTT;

Ras-dva2 - 5'-TCTTCTCCTTTGTGGACAGTGACAT,

Control – 5'- TCGTCTCCATTGTCGACTGTGTCAT;

Xag1/2 – 5'-TCTGTGGATGTCTTGCTCTTCCAGG,

Control – 5'-TATGTGTATGTATTGCTGTTCAAGA,

Xagr2A/B - 5'-CAGTGCTTTACTCCAGAGGCAGGAG,

Control – 5'-CAATGCTATACTGCAGATGCACGAT;

В работе по подавлению трансляции мРНК генов в процессе регенерации хвостовых плавников *Danio* мы использовали другой тип морфолино - *Vivo*-морфолино. *Vivo*-морфолино – синтетические морфолиновые олигонуклеотиды, способные проникать в клетку благодаря остатку окта-гуанидин дендримера. В случае головастика *Xenopus* это не было необходимо, так как закол осуществляли на стадиях двух-восьми клеток, а значит инъецируемая смесь морфолино проникала во все целевые клетки развивающегося зародыша при делении. Благодаря тому, что эмбрионы практически не увеличиваются в размерах, разведение

инъектируемого материала было минимальным. Для рыб *Danio* данный тип эксперимента не имел смысла в связи с существенным увеличением объема животного от ранних эмбриональных стадии до взрослой особи и значительно более долгим периодом развития.

Перед ампутацией хвостовых плавников животных анестезировали в растворе тримекаина.

Для подавления трансляции мРНК-*Dag1* в опытной группе рыб мы делали инъекцию антисмысловых *vivo*-морфолиновых олигонуклеотидов. После ампутации плавника, используя стеклянный капилляр и микроинъектор, мы инъектировали в область между костистыми лучами приблизительно 0,4 мкл 0,4 мМ раствора *vivo*-морфолино. Контрольным животным вводилось такое же количество воды.

Для последующей детекции места инъекции, мы смешивали морфолино с флуоресцентным красителем FLD в соотношении 1:20. Далее по фотографиям производился подсчет длины отросшей бластемы в контрольной и опытной группе с помощью программы ImageJ по формуле $h=S/L$, где h – длина бластемы, S – площадь бластемы и L – ширина плавника. Средние значения длины бластемы в контрольной и опытной группе мы сравнивали в программе «Statistica» по критерию Манна-Уитни.

Использованная последовательность *vivo*-морфолино:

Dag1: ACAGAGCGGCCAGTGCTGCATGATT,

DAG1splice VivoMO - 5' AATTTGCTGATACCTCTTGAGAGAG

control-generic VivoMO - 5' TCTgTggATgTCTTgCTCTTCCAgg;

control-misDAG1 VivoMO - 5'ACAGATCGGCAAGTTCTGCATTATT.

3.9.2. Клонирование генов для последующих синтезов – транскрипция *in vitro* и синтез *dig*-зондов для гибридизации *in situ*.

Фрагмент ДНК, содержащий кодирующую рамку исследуемого гена, был получен с помощью ОТ-ПЦР. В качестве матрицы использовали кДНК, синтезированной обратной транскриптазой MuMLV на основе фракции тотальной РНК, выделенной из зародышей шпорцевой лягушки на 16 стадии развития. Для ПЦР использовали следующие праймеры:

Igf2b Forw (BamH1): CAC GGA TCC TCA TGG AGG ACC AAC TAA AAC

Igf2b Rev (EcoR1): ATC GAA TTC GTC TTT TCA CTT GTG GCT AAC

Fgf20a Forw (Kpn1): TAT GGT ACC GTG ATG GGT GCA GTC G

Fgf20a Rev (Bgl2): AAT AGA TCT TTC AGC TGT GAC CTA GAA C

Для амплификации ДНК использовали MasterMix компании Evrogen: 4 мкл смеси MasterMix, 10 нг ДНК, 0,25 мкл праймера 5' (10 пмоль/мкл), 0,25 мкл праймера 3' (10 пмоль/мкл), дистиллированную воду до конечного объема реакции (20 мкл). После

тщательного перемешивания и центрифугирования 10 секунд 12000 об/мин помещали пробирку в ДНК амплификатор (с подогреваемой крышкой) со следующими параметрами цикла: 94°C - 30сек, 60°C - 30сек, 72°C - 45-120 сек. Реакцию проводили в течение 15-28 циклов. Продукт ПЦР идентифицировали в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) на УФ-трансиллюминаторе.

Полученный продукт ПЦР был очищен, порезан парами рестриктаз EcoRI и XhoI, KpnI и BglII соответственно. Далее порезанный продукт был клонирован в резанный по этим же сайтам вектор pCS2 (Promega), с использованием T4-лигазы (Evrogen). Для синтеза dig-зондов ПЦР продукт клонировали в плазмиду pGEMT (Promega) без рестрикции. Отсутствие нуклеотидных замен в полученных плазмидных конструкциях подтверждали секвенированием плазмидной ДНК на базе компании Evrogen на коммерческой основе.

3.9.3. Транскрипция in vitro

В качестве матриц для синтеза мРНК были использовали лианеризованные по соответствующим сайтам плазмиды. Синтетические кэпированные мРНК были получены при помощи набора mMessage mMachine (Ambion.) по методике производителя с использованием T7 или SP6 РНК-полимераз. После синтеза, полученные мРНК были очищены при помощи набора RNeasy mini (Qiagen). В итоге были получены мРНК в концентрациях от 500-1200 нг/μл.

3.9.4. Гибридизация in situ

В работе использовали методику Harland (Harland, 1991). Метод гибридизации in situ позволил нам изучить локализацию транскриптов исследуемых мРНК в наших образцах.

а. Синтез dig-меченой анти-смысловой РНК для приготовления гибридационной пробы:

Dig-меченные асРНК были получены в результате транскрипции in vitro с использованием смеси рибонуклеотидов и SP6 или T7 РНК-полимераз в соответствии с рекомендациями производителей. В качестве матрицы использовали продукт ПЦР реакции или лианеризованную плазмиду, имеющие промотер для синтеза антисмысловой (ас) РНК SP6 или T7 полимеразы. В реакции использовали: 1мкг плазмиды (или 200нг ПЦР продукта), 2мкл 10x dig-смеси нуклеотидов, 2мкл 10xDTT, 0,5мкл РНАзы, 4мкл 5xбуфера, оптимальный для работы полимераз, водой доводили до 18 мкл, 2мкл T7 или SP6 полимеразы (10 ед.) Тщательно перемешивали, центрифугировали 10 сек 12 000 об/мин и инкубировали 2 часа при 37°C. После добавляли 1,5-2 мкл ДНКазы и инкубировали 15 минут при 37°C. Далее dig-асРНК очищали набором RNeasy mini kit (Qiagen) и определяли концентрацию на спектрофотометре.

Синтезированные зонды хранили при -20°C . Для приготовления гибридизационной пробы смешивали 0,5-1мкг dig-асРНК с 0,5-1мл РН-буфера.

б. Фиксация эмбрионов, головастиков *Xenopus* и плавников *Danio* для проведения гибридизации in situ:

1. С зародышей *Xenopus*, находящихся в 0,1хMMR, пинцетом снимали вителлиновые оболочки, головастиков усыпляли в концентрированном растворе тримекаина, плавники рыб ампутировали в анестезирующем растворе тримекаина.
2. Образцы (плавники, головастики, зародыши, зачатки конечностей) помещали в пузырек с 3-4 мл фиксирующего раствора MEMFA. Фиксацию проводили 1,5 часа при комнатной температуре (КТ) на качалке (45об/мин).
3. Фиксирующий раствор сменяли на 0.1хPBS, выдерживали 5 минут при КТ на качалке.
4. Далее образцы проводили до 96% этанола с помощью последовательных промывок по 5 минут при комнатной температуре (КТ) на качалке 45 об/мин 25% ,50%, 75% растворами этанола на 0.1хPBS.
5. В 96% этаноле полностью отрезали хвосты и зачатки конечностей у головастиков *Xenopus*, отделяя их от туловища, далее работали только с зачатками конечностей и хвостами.
6. Образцы оставляли в холодильнике (+4 или -20°C) до проведения гибридизации.

с. Предгибридизация:

1. Фиксированные образцы, проводили до водного раствора с помощью последовательных промывок по 5 минут при комнатной температуре (КТ) на качалке 45 об/мин 96% , 75% и 50% водными растворами этанола, затем 25% раствором этанола в РТW.
2. Промывали РТW 3 раза по 5 минут при КТ на качалке.
3. Инкубировали в растворе протеиназы К в РТW (1мкг/мл) 5 мин. при КТ на качалке.
4. Промывали 0,1М раствором триэтаноламин гидрохлорида (ТЭА) и промывали 2 раза по 5 минут при КТ на качалке.
5. К ТЭА после 2-ой промывки добавляли 0,25% ацетангидрида, инкубировали 5 минут при КТ на качалке.
6. Туда же добавляли ещё 0,25% ацетангидрида, инкубировали 5 минут при КТ на качалке.
7. Промывали раствором РТW 2 раза по 5 минут при КТ на качалке.
8. Инкубировали в фиксирующем растворе MEMFA 20 минут при КТ на качалке.
9. Промывали раствором РТW 2 раза по 5 минут. Вся последующая работа шла с использованием перчаток и специальных пипеток и носиков для работы с РНК.

10. Раствор РТW удаляли почти весь, оставляли 1 мл и к нему добавляли 250мкл РН-буфера (prehybridization buffer), инкубировали 10-15 минут при КТ на качалке.
11. Инкубировали в 0,5мл чистого РН-буфера 60 минут при 60оС на качалке.
12. Заменяли раствор РН-буфера новым и оставили на ночь (14-18 часов) при 60оС на качалке.

Полученные образцы хранили при –20°С до гибридизации с пробами.

d. Гибридизация (гибридизация РНК с дигоксигенин-меченной антисмысловой пробой (dig–асРНК) к исследуемой РНК):

Образцы, находящиеся в РН-буфере, и гибридизационную пробу (раствор синтезированной dig-меченной анти-смысловой РНК в РН-буфере (0,5-1мкг dig-асРНК на 1мл РН-буфера)) нагрели до 60°С и сменили РН-буфер (0,5мл) на гибридизационную пробу (0,3-0,5мл), инкубировали на ночь при 60°С на качалке 45об/мин.

e. Отмывка от РНК-зонда:

1. Гибридизационную пробу, которую можно использовать несколько раз, отбирали и промывали образцы 0,5 мл предварительно подогретого до 60оС РН-буфера 2 раза по 30 минут при 60оС на качалке.
2. Промывали раствором 2хSSC 2 раза по 60 минут при 60оС на качалке.
3. Промывали раствором 0,2хSSC 2 раза по 30 минут при КТ на качалке.
4. Промывали раствором МАВ 2 раза по 10 минут при КТ на качалке.

f. Инкубация со специфичными к дигоксигениновым остаткам антителами, сшитыми с щелочной фосфатазой:

1. Инкубировали в МАВ с 2% блокирующего реагента (Blocking Reagent) 15-60 минут при КТ, на качалке.
2. Раствор удаляли и добавляли МАВ с 2% блокирующего реагента и 20% сыворотки (heat treated lamb serum), инкубировали 1-2 ч. при КТ на качалке.
3. Сливали раствор и добавляли МАВ, содержащий 2% блокирующего реагента, 20% сыворотки и ди-специфичные антитела, сшитые с щелочной фосфатазой (разведение 1/1000), инкубировали ночь на качалке при 4оС.

g. Отмывка от антител:

Промывали раствором МАВ 5 раз по 60 минут при КТ на качалке. Последнюю промывку оставляли на ночь на качалке при 4°С.

h. Проявление (добавление субстрата для щелочной фосфатазы, которая осуществляет с ним хромогенную реакцию, при этом эндогенную фосфатазу ингибируют с помощью левамизола):

1. Образцы промывали 2-3мл буфера для щелочной фосфатазы с добавлением левамизола (ингибитор эндогенной фосфатазы, конечн.конц. 2мМ) 2 раза по 5-10 минут при КТ на качалке.
2. Буфер сливали и добавляли субстрат для щелочной фосфатазы (0,3-0,5мл) – BMP (Boehringer Mannheim Purple AP substrate) с левамизолом (конечная концентрация 1мМ) и держали образцы в темноте при КТ на качалке до появления окраски (60 минут-30 часов).
3. Окрасившиеся образцы промывали 2-3мл буфера для щелочной фосфатазы 2 раза при КТ по 5-10 минут на качалке.
4. Буфер меняли на фиксирующий раствор MEMFA и хранили образцы в холодильнике 4оС.
5. Для долгого хранения образцы проводили до 96% этанола и хранили при –20оС.
6. Полученные образцы фотографировали цифровой камерой под микроскопом в чашке Петри с 1,5% агарозой в растворе MEMFA или PBS.

3.9.5. Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) в реальном времени *Real-time-PCR*

Этот метод, основанный на полимеразной цепной реакции, мы использовали для одновременной амплификации и измерения количества исследуемых молекул мРНК.

а. Экстракция тотальной РНК из эмбрионов, хвостов и зачатков конечностей головастика шпорцевой лягушки, плавникоа *Danio*.

Экстракцию РНК проводили сразу после ампутации каждой из частей, в соответствии с рекомендациями производителей лизис-буферов для выделения РНК (Macherey Nagel, Ambition, Evrogen). Помещали каждый из образцов (регенерирующие конечности и хвосты головастиков *Xenopus*, плавники *Danio*, эмбрионы *Xenopus* и *Danio*) в специальный лизис-буфер из набора для выделения РНК - RA1-TCEP (Macherey Nagel) (204 мкл на каждый образец), Trizol (Ambition) или ExtractRna (Evrogen) (500-1000 мкл на каждый образец), тщательно пипетировали, вортиксовали в течении 30 сек. После фиксации всех образцов инкубировали смесь на комнатной температуре в течении 15 минут, а затем оставляли на ночь в кельвинаторе на -70°С .

Далее проводили выделение РНК в соответствии с протоколами каждого из производителей. Для выделения РНК использовали перчатки и соблюдали условия стерильности для работы с РНК.

Для TrizolReagent (Ambition):

Размораживали образцы на льду, добавляли 0,02 мл хлороформа, перемешивали в течение 15 сек, инкубировали при КТ 2-3 минуты, центрифугировали при 12 тыс. оборотах 15 минут при 4°C. Аккуратно отбирали водную фазу, фиксируя ее объем. К водной фазе добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия, добавляли гликоген для осаждения РНК (1 мкл гликогена на 20 мкл раствора), пипетировали, добавляли 2,5 объема этанола и оставляли на ночь на -70°C. На следующий день центрифугировали на 10 тыс. оборотах в течение 15 минут при 4°C, удаляли супернатант, промывали 70% холодных этанолом, сливали его и оставляли образцы сушиться на 20 минут под лампой. Высохший осадок растворяли в 20 мкл воды.

Для ExtractRna (Evrogen):

Размораживали образцы при комнатной температуре, вортексировали 15 секунд, затем откручивали на холодной (4°C) центрифуге 15 минут при максимальных оборотах. Аккуратно отбирали жидкую фазу, не задевая нижнюю из нерастворенных остатков и верхнюю жировую пленку. К жидкой фазе добавляли хлороформ из расчета 200 мкл хлороформа на 1 мл лизис-буфера. Содержимое пробирки активно перемешивали переворачиванием в течение 15 секунд, инкубировали при комнатной температуре в течении 2-3 минут, затем центрифугировали образцы на максимальных оборотах при 4°C. В ходе центрифугирования содержимое пробирки разделялось на 3 фазы: нижнюю - органическую фенол-хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю – бесцветную водную фазу (содержит РНК). Аккуратно (под углом 45°) отбирали водную фазу, избегая касания других фаз, в новую пробирку. К водной фазе добавляли 96% этанол из расчета: 500 мкл этанола на 1 мл лизис-буфера. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, затем центрифугировали в течение 10 минут на максимальных оборотах при комнатной температуре. Осторожно отбирали супернатант, отслеживая осадок (РНК). Затем аккуратно добавляли 75% этанол (на 500 мкл 96% этанола 1 мл 75 % этанола) по стенке пробирки, центрифугировали на максимальных оборотах 5 минут при комнатной температуре. Внимательно отбирали супернатант, следя за осадком (он становится почти невидим). Осадок высушивали на воздухе, в пробирке с открытой крышкой. Осадок растворяли в 15-20 мкл очищенной от РНКаз воды, нагретой до 55°C.

Колонки для выделения РНК (Macherey Nagel):

Размораживали образец при комнатной температуре, вортексировали в течение 15 секунд. Добавляли 5 мкл рабочего раствора Carrier gna, вортексировали. Затем все содержимое пробирки перелили в колонки для фильтрации нерастворенных остатков, центрифугировали в течение 30 секунд на максимальных оборотах. Очищенный фильтрат смешивали с 200 мкл 70% этанола и переливали в РНК-колонки, центрифугировали в течение 30 секунд. Аккуратно добавили 100 мкл MDB на мембрану колонки, центрифугировали в течение 30 секунд, затем добавили 25 мкл рабочего раствора ДНКазы, инкубировали в течение 15 минут на комнатной температуре. Добавили буфер для инактивации ДНКазы – RA2, инкубировали в течение 2 минут, центрифугировали 30 секунд. Промыли колонку 400 и 200 мкл промывочного раствора RA3 два раза соответственно, центрифугировали на максимальных оборотах 30 секунд и 2 минуты (чтобы просушить мембрану). Очищенную РНК смывали с колонки 10-15 мкл нагретой воды (55°C), очищенной от РНКаз.

в. Обратная транскрипция.

Для синтеза комплементарной ДНК на матрице выделенной РНК использовали реакцию обратной транскрипции (ОТ), которую проводили в соответствии с рекомендациями производителя ревертазы (Promega или Evrogen). Для обратной транскрипции использовали 10 мкл каждого образца (оставшиеся 10 мкл оставляли храниться в кельвинаторе на -70°C), по 5 мкл на опыт и 5 мкл на контроль. Реакционную смесь (5 мкл РНК и 1 мкл oligo-dT primers(50пМ)) инкубировали в течение 10 минут при 75°C (происходит денатурация РНК), в это время на холоду готовили 2 варианта смеси master mix, с добавлением ревертазы (опыт) и без нее (контроль): dNTP 0,5мМ, ревертаза для опыта 15-20 ед/мкл, Рназин 20 ед/мкл, buffer 5x 4мкл, 7/8 мкл воды для опыта и контроля соответственно. Образцы после инкубации сразу помещали в лед, на льду добавляли master mix, пипетировали. Конечный объем смеси должен составлять 20 мкл. Ставили смесь инкубироваться на 1 час на 37°C, останавливали реакцию прогреванием в течение 10 мин при 72°C. Хранили образцы при -70°C

с. ПЦР в реальном времени.

Процедуру ПЦР проводили в соответствии с инструкцией производителя готовой реакционной смеси для ПЦР с красителем SYBR Green I (Евроген). На общий объем смеси 25 мкл использовали: 5х реакционная смесь qPCRmix-HS SYBR 5мкл (1х), праймеры 0,2 мкМ, ДНК-матрица 50-100нг.

Для сравнения эффективности (Е) праймеров к исследуемым генам мы провели серию ПЦР реакций с использованием шаблонов ДНК (для изготовления шаблонов, кодирующая область кДНК для каждого из генов первоначально была получена с помощью ПЦР и очищена на колонках PromegaWizard) в нескольких разведениях: 4×10^{-4} нг, 5×10^{-5} нг, $6,2 \times 10^{-6}$ нг, and 7×10^{-7} нг. Данные по эффективности были подсчитаны по формуле $E = 10^{1/\Delta C_t}$ в трех различных повторностях для каждого из праймеров (Табл.1).

праймеры	<i>XAgl</i>	<i>DAgl</i>	<i>XAgr2</i>	<i>DAgr2</i>	<i>XEf-alfa</i>	<i>DEf-alfa</i>	<i>XOdc</i>	<i>DOdc</i>
Эффективность	82%	83%	82%	80%	90%	92%	93%	90%

Таблица 1. Оценка эффективности праймеров для количественного ПЦР.

В качестве результатов реакции ПЦР в реальном времени мы определяли момент $C(t)$ (выраженный в циклах ПЦР), когда количество ДНК (в нашем случае комплиментарная ДНК, полученная в результате обратной транскрипции с мРНК) в реакционной пробирке (флуоресцентный сигнал) достигает определенной, заданной пороговой $N(t)$ величины. Сравнив полученные значения $C(t)$, мы могли говорить о начальных концентрациях кДНК в исследуемых образцах. Чем меньше $C(t)$, тем больше в нем было целевой кДНК в начальный момент времени. Чтобы иметь возможность сравнивать результаты ПЦР, полученные для независимых образцов тканей, мы проводили нормировку образцов относительно внутреннего контроля: кДНК одного из генов домашнего хозяйства (housekeeping gene) – орнитиндекарбоксилазы (*ODC*). В качестве отрицательного контроля мы использовали аликвоты тех же самых образцов РНК, которые были использованы нами для получения кДНК, но без добавления обратной транскриптазы. Данный контроль был особенно критичен в случае генов *Ras-dva*. Эти гены не имеют интронов, в связи с чем, было важно понять, является ли сигнал ОТ-ПЦР для таких генов результатом реального присутствия в образцах их мРНК, или же он генерируется в ходе ПЦР следовых количеств геномной ДНК, всегда остающейся в любых образцах тотальной РНК. Для того, чтобы определить количество мРНК в различных образцах и сравнить их, нам необходимо было учитывать присутствие в образцах тотальной РНК загрязнений в виде геномной ДНК. Для этого мы использовали следующую формулу, где X и Y - количества мРНК в образцах 1 и 2 соответственно, а a и c - значения пороговых циклов

для образцов, полученных с использованием обратной транскриптазы, b и d – без обратной транскриптазы. Эффективность каждого цикла ПЦР при этом считали равной 2.

$$\frac{Y}{X} = 2^{[(b-a)-(d-c) \times \frac{(2^{d-c} - 1)}{(2^{b-a} - 1)}]} \times 2^{a-c}$$

Данная формула отличается от обычно используемой формулы

$$\frac{y}{X} = 2^{a-c}$$

присутствием члена в квадратных скобках, который и учитывает вклад загрязнений геномной ДНК. Если в каждом образце разница между циклами с предварительной обработкой ревертазой и без нее – большая (загрязняющей геномной ДНК мало относительно кДНК), то член в квадратных скобках близок к единице и, следовательно, можно им пренебречь. Это справедливо для таких генов как *Xag*, *Xagr* и *ODC*. Т.е. для тех, для которых ПЦР с чистой геномной ДНК (образцы, не обработанные ревертазой) значительно отстает по циклам (из-за присутствия интронов в ДНК) от ПЦР образцов, где наряду с геномной ДНК появляется кДНК (образцы, обработанные ревертазой).

Однако использование данной формулы важно для определения количества мРНК безинтронных генов, таких как *Ras-dva*. Для таких генов разница между числом циклов ПЦР образцов, обработанных ревертазой, и не обработанных этим ферментом, обычно мала (вклад загрязняющей геномной ДНК велик) так, что член в квадратных скобках, учитывающий эту разницу, начинает играть существенную роль. Если же разницы между числом циклов ПЦР образцов обработанных и не обработанных ревертазой нет вовсе, то член в квадратных скобках стремится к бесконечности, что означает полное отсутствие в этом образце мРНК данного гена[93].

3.9.6. Получение трансгенных лягушек

Трансгенных лягушек получали по методу Ishibashi [94]. Все процедура включали в себя три этапа: приготовление экстракта из яйцеклеток, подготовку ядер сперматозоидов, и их перенос в яйцеклетки.

а. Получение экстракта яйцеклеток.

Для получения икры, самок *Xenopus laevis* стимулировали, инъекцией в спинной лимфатический мешок 500 единиц хориогонического гонадотропина. Полученную от таких самок на следующий день икру собирали в чашки (диаметр-14 см) с 1х ММР и распределяли в один слой на одной половине каждой чашки. Удаляли плохие икринки, сливали р-р ММР и добавляли 2% -й р-р цистеина (рН 7,8) для снятия оболочек. С момента добавления цистеина до скоростного центрифугирования проходило не более 45-60 минут. Далее промывали икру 1хХВ (4 раза по 100мл), добавляли в р-р CSF-ХВ ингибиторы протеаз (по 500мкл) и промывали этим раствором икру (2 раза по 50 мл). Раствор CSF был необходим для удержания яйцеклеток в стадии мейотической метафазы. Сливали р-р CSF-ХВ и осторожно переносили икру в пробирки для центрифугирования, удаляли как можно больше CSF. Добавляли 1мл Versilube F-50. Центрифугировали при комнатной температуре 60 сек на 1000об/мин, затем без перерыва 30 сек на 2000об/мин. Удаляли избыток CSF-ХВ и Versilube. Центрифугировали еще 10 минут на 10000 об/мин при 4°C, собирали иглой (проколов пробирку) среднюю фракцию (прозрачная темно-серая или золотистая), объем измеряли в 15мл холодной пробирке. Размораживали на льду ингибиторы протеаз, добавляли ингибиторы протеаз (1:1000) и переносили в чистую холодную пробирку. Центрифугировали 10 мин на 10000об/мин при 4°C. Собирали иглой (проколов пробирку) среднюю фракцию (более светлая, чем после первого центрифугирования), объем измеряли в 15 мл охлажденной пробирке (около 1,5мл). Добавляли холодный Energy Mix (1/20 объема) и холодный 0,1М CaCl₂ (4мкл 0,1М CaCl₂ на 1 мл экстракта). Инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Переносили экстракт в пробирки TL100, заполняя их наполовину. Центрифугировали 1,5 часа 70000об/мин 4°C, отбирали иглой второй сверху прозрачный слой, переносили его в чистую холодную пробирку. Дополнительное ультрацентрифугирование использовалось для очистки цитоплазматической фракции. Центрифугировали еще 20 мин 70000об/мин 4°C, отбирали иглой средний прозрачный слой, переносили в чистый холодный эппендорф, быстро расфасовали в холодные 0,5мл пробирки по 20 мкл и замораживали в жидком азоте. Хранили образцы при -70°C.

в. Подготовка сперматозоидов.

Самца *Xenopus laevis* анестезировали замораживанием (около 20 минут), извлекали семенник, помещали в чашку с 1х.ММР, промывали 3 раза. Осторожно пинцетом и ножницами удаляли с поверхности семенника жир. Очищенный семенник промывали 2 раза 1хNPВ, переносили в чистую сухую чашку. Добавляли 1мл 1х NPВ и очень тщательно измельчали семенник с помощью двух пинцетов и ножниц. Осторожно гомогенизировали пипеткой с отрезанным желтым концом. Профильтровали раствор через воронку из 2х слоев ткани в 15мл пробирку, чашку споласкивали холодным NPВ, снова фильтровали. Остатки продавливали

через ткань в пробирку. Полученный раствор доводили буфером до 8 мл, центрифугировали 10 мин на 3000 об/мин при 4°C 2 раза. Супернатант удаляли пастеркой. Ресуспендировали осадок в 1 мл 1xNPB, предварительно нагретым до комнатной температуры. Добавляли 50 мкл дигитонина, инкубировали 5 мин КТ. К смеси добавляли 10 мл холодного 1xNPB с 3% BSA и ингибиторами протеаз. Все аккуратно перемешивали, центрифугировали 10 мин на 3000 об/мин при 4°C. Супернатант сливали, осадок (светлый, без крови) гомогенизировали, добавляли 5 мл 1xNPB с 0,3% BSA, центрифугировали 10 мин на 3000 об/мин при 4°C. Сливали супернатант, осадок перемешивали отрезанным носом, добавляли 250 мкл 1xNPB с 47% глицерина и 0,3% BSA, перемешивали. Аликвоты разливали в холодные эппендорфы, погружали (вертикально) в жидкий азот, хранили при -70°C.

Концентрацию нуклиев определяли с помощью камеры Горяева: Смесь (1мкл суспензии нуклиев, 100 мкл воды, 1мкл Hoechst X 100) вносили в камеру Горяева. Оптимальная концентрация для хранения 75-125 нуклиев/нл.

с. Работа с плазмидой:

Использовали плазмиду pRas-dva1-pEGFP1 (встроенная конструкция - под промотором гена *Ras-dva1* зеленый флуоресцентный белок).

Трансформация клеток:

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

Выделение плазмидной ДНК:

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Plus Minipreps (Promega) по протоколу производителя. Клетки *E. coli*, трансформированные плазмидной ДНК, наращивали в 10-15 мл среды LB с селективным антибиотиком в течение 16-18 ч. при 37°C и интенсивной аэрации (200 об/мин). Клетки осаждали центрифугированием (ЦФ) на 3000 об/мин в течение 15 мин., удаляли надосадочную жидкость и осадок ресуспендировали в 400 мкл раствора I (cell resuspension solution). Затем добавляли равный объем лизирующего раствора II (cell lysis solution), перемешивали переворачиванием до просветления раствора. Далее добавляли равный объем нейтрализующего раствора III (neutralization solution), резко встряхивали до образования творожистого осадка с последующим ЦФ 5 мин. на 12 тыс. об/мин. Супернатант смешивали с равным объемом смолы и наносили на

колонку. Смолу промывали два раза избыточным объемом раствора IV (column wash solution), затем ДНК элюировали 50-100 мкл воды mQ.

Для получения линейизованной ДНК плазмиду обрабатывали рестриктазой SFI, на 100 мкл смеси использовали: ДНК 20 мкл (6000нг), 10мкл буфера для рестриктазы, 3 мкл рестриктазы, вода. Инкубировали в течение 6-7 часов при 50⁰С. Затем очищали на колонке с помощью набора Wizard PCR Preps (Promega) по протоколу производителя и высаживали спиртом (1/10 объема 5MNaOH, 2 объема этанола). Осажденную ДНК центрифугировали в течение 5 мин на максимальной скорости, затем промывали 70% этанолом объемом равным объему смеси 2 раза и центрифугировали при максимальной скорости 5 минут. Сливали супернатант и давали осадку подсохнуть под лампой в течении 20 минут, элюировали ДНК 10 мкл воды.

d. Трансформация яйцеклеток.

Экстракт из яйцеклеток (предварительно прогрели при 80⁰С 3 мин и откручивали на центрифуге 10 мин 13000 об/мин. Отобрали супернатант о чистую пробирку).

Икру от самок *Xenopus laevis* получали путем инъекции хориогонического гонадотропина. Оболочки снимали 2% раствором цистеина, промывали 1x MMR. Раскладывали икру в чашки с 0,4 MMR с 6% фиколлом, икринки лежали свободно. Замешивали в это время две смеси: плазида 200нг, SDB 2 мкл, ядра сперматозоидов 1 мкл (1 смесь); SDB 7мкл и экстракт из яйцеклеток 10 мкл (2 смесь), инкубировали обе смеси при комнатной температуре в течение 5 минут. Переносили смесь 2 в смесь 1 и осторожно перемешивали, инкубировали 15 минут при КТ. Потом к полученному раствору добавляли 160 мкл SDB и ждали 5-10 минут пока смесь распределиться по объему. Полученную смесь использовали для микроинъекций в подготовленные неоплодотворенные яйцеклетки. Микроинъекции производили микроинъектором Femtojet (Eppendorf). На стадии 4-16 бластомеров переносили правильно дробящиеся икринки в чашки, покрытые агарозой с 6% фиколлом на 0,1x MMR. Стадии развития далее определяли по таблицам нормального развития Ньюкопа и Файбера. На 12 стадии переносили зародышей в чашки с 0,1xMMR с добавлением гентамицина. Через день-два рассаживали по 10 штук на большую чашку с 0,1x MMR. Через неделю после закола пересаживали в маленькие отсадники с отстоянной водой и начинали кормить.

3.9.7. Парафиновые срезы

Для исследования локализации окрашенных на in situ участков конечностей головастика провели гистологию.

а. Проводка и заключение в парафин (парапласт).

Все работы проводили под тягой.

Фиксированные в MEMFA после проведения гибридизации *in situ* образцы переводили в 96% этанол и обезживали по следующей схеме:

1. Смесь 82% этанол : бутанол в соотношении 3 : 1, 20-30 минут на качалке 65 об\мин при КТ
2. 96% этанол : бутанол - 1 : 1, 20-30 минут на качалке 65 об\мин
3. 100% этанол : бутанол – 1 : 3, 15 минут на качалке 65 об\мин
4. 100% этанол : бутанол – 1 : 3, 15 минут на качалке 65 об\мин
5. бутанол, 15 минут на качалке 65 об\мин
6. бутанол, 15 минут на качалке 65 об\мин

Материал переносили в тигельки с расплавленным парафином и ставили их в термостат на 56-62°C, 20 минут инкубировали, пока материал оседал на дно тигелька. Для дальнейшей пропитки, препарат помещали в расплавленный парапласт в термостат, через 20 минут заменяли парапласт на новый. Инкубировали 20-30 минут в термостате 56-62°. Теплой пипеткой переносили материал из тигельков в формочки (из-под таблеток) с парафином, так же выдерживали 30 минут в термостате 56-62°C. Под бинокулярным микроскопом ориентировали конечности в формочках с парапластом раскаленной на горелке иглой и рисовали соответствующую схему ориентации материала. Оставляли застывать при КТ на ночь.

б. Срезы.

Под бинокуляром лезвием от бритвы вырезали пирамидку парапласта с материалом в её вершине в нужной ориентации и приплавляли её к деревянному кубику. Кубик с препаратом ориентировали в держателе санного микротомы, задавали толщину среза. Срезы аккуратно переносили кисточкой в коробку на фильтровальную бумагу. На стекло, предварительно покрытое «белком», капали дистиллированную воду и распределяли ее по всей поверхности предметного стекла. Это было необходимо для расправления срезов и их прикрепления к предметному стеклу. Иглой или кисточкой аккуратно переносили ленточки срезов на воду (длина ленточек должна быть чуть меньше длины покровного стекла, т.к. срезы после расправления удлиняются). Подписывали стекло карандашом. По краям стекла укладывали тонкие (2-3мм) полоски фильтровальной бумаги («рамка» для срезов и воды) и переносили стекло на нагретый столик на минуту, следили за лентами срезов. Переносили стекла с расправленными срезами в термостат и оставляли высыхать при 37°C на 12-20 ч. (расправленные срезы в итоге прилипают к стеклам, покрытым белком).

с. Окрашка срезов.

Для выявления клеточной структуры тканей (ядер клеток) на срезах мы проводили их окраску раствором красителя Дарі, в результате которой ядра клеток окрашивались, и под ультрафиолетом имели ярко синюю окраску.

Стёкла с прилипшими парафиновыми срезами проводили до дистиллированной воды по схеме:

1. Ксилол 4-5 минут
2. Ксилол 4-5 минут
3. Смесь–Ксилол : 100%этанол 1:1, 1-2 минуты
4. 100% этанол 1-2 минуты
5. 100% этанол 1-2 минуты
6. 96% этанол 1-2 минуты
7. 70% этанол 1-2 минуты
8. дистил. вода 1-2 минуты и более

Срезы на стеклах покрывали р-ром Дарі (1:100) и оставляли на 5 минут. Раствор сливали и аккуратно промывали стекла дистиллированной водой. Окрашенные срезы проводили обратно до ксилола (п 4, часть с, 8-1 последовательно). Окрашенные срезы заключали в канадский бальзам.

d. Заключение срезов в «канадский бальзам»:

Все работы проводили под тягой.

Канадский бальзам готовили заранее: в стеклянном пузырьке к 1 объему смолы «канадский бальзам» добавляли 2 объема ксилола и оставляли на 12-24 часов в термостате при 56-60°C до полного растворения. Полоски фильтровальной бумаги убирали со стекол и помещали стекло со срезами в пузырек с ксилолом, 2 раза по 4-5 минут для удаления лишнего парапласта. Далее на стекло со срезами наносили палочкой 2-3 капли «канадского бальзама» и плавно, чтобы не было пузырей, с 1 края пинцетом опускали покрывное стекло. Заключенные срезы оставляли под тягой сушиться на 3-33 часов или на ночь.

3.9.8. Вибратомные срезы

Для получения срезов мы использовали гибридизованных зародышей *Xenopus laevis*.

Промывали зародышей раствором PBS 3 раза по 10 минут. В заранее приготовленный раствор 4% агарозы, нагретой до 40 °C погружали отмытых в PBS зародышей, 20 минут инкубировали в нагретом растворе, затем меняли его на новый. Переносили образцы в чашку Петри с 4% агарозой и ориентировали их с помощью пинцетов и оставляли на 20-30 минут

застывать на 4 °C. Затем аккуратно вырезали небольшой блок, с помощью суперклея крепили его на специальной подложке. После того как клей застыл, мы фиксировали подложку в основании вибратора и заливали ее PBS в соответствии с рекомендациями производителя вибратора Leica VT1200 (LeicaBiosystems). Полученные срезы фиксировали с использованием специального фиксатора – towiol и накрывали покровным стеклом.

3.9.9. Криотомные срезы

Образцы для криорезки подготавливали в соответствии с рекомендациями производителя криостатов (Thermo Fisher). Гибридизованные образцы промывали 3 раза по 15 минут раствором PBS при комнатной температуре. В это время готовили смесь 15% сахарозы на 5% бактериальном агаре, нагревали ее до 40 °C и переливали в большую чашку Петри. Образцы переносили в чашку, ориентировали и оставляли застывать на 20-30 минут. Вырезали блок с образцом, помещали его в пробирку с 30% сахарозой на 24-48 часов при комнатной температуре, до полного погружения блока. После того как блок пропитался сахарозой и опустился, аккуратно доставали его и помещали в жидкий азот. Затем образцы помещали на столик для криорезки и покрывали раствором криопротектора. Для длительного хранения образцы оставляли в кельвинаторе на -70°C. Срезы фиксировали на специальных стеклах для криосрезов, дополнительная фиксация не требовалась.

3.9.10. Метод Tunel

Метод Tunel - метод TdT – опосредованной (терминальная деоксинуклеотидил трансфераза) метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК. Данный метод является классическим для детекции фрагментированной ДНК, что напрямую указывает на активацию апоптоза в клетке [95]. Метод основан на наличие одноцепочечных разрывов в цепи ДНК, которые детектируются терминальной деоксинуклеотидил трансферазой (TdT), трансфераза в свою очередь катализирует присоединение меченой dUTP (дезоксифосфат) к месту разрыва.

Анализ проводили в соответствии с рекомендациями производителя набора - DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega).

- 1) Плавники фиксировали в 4% параформальдегиде (фиксирующий раствор MEMFA) в течение 24 часов при 4 °C.
- 2) Затем сливали фиксирующий раствор и отмывали PBS 3 раза по 5 минут при комнатной температуре.
- 3) Сливали PBS, наливали 300-500 мкл Протеиназы К (рабочая концентрация 20µg/ml) и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Протеиназа К делает образцы проницаемыми для дальнейших компонентов реакции.

- 4) Промывали образы раствором PBS 3 раза по 5 минут при комнатной температуре.
- 5) Далее образцы инкубировали в 200 мкл Equilibration Buffer в течение 10 минут при комнатной температуре. В это время на льду подготовили rTdT-буфер: на 50 мкл реакции использовали 45 мкл Equilibration Buffer, 5 мкл Nucleotide mix, 1 мкл rTdT enzyme)
- 6) Сливали Equilibration Buffer и к каждому образцу добавляли по 150 мкл rTdT-буфера, инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Было важно избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие растворы.
- 7) Останавливали реакцию раствором 2xSSC, инкубировали в течение 15 минут на комнатной температуре.
- 8) Промывали 3 раза по 5 минут раствором PBS.
- 9) Далее фотографировали плавники под предметным стеклом с использованием флуоресцентного стереомикроскопа.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Участие генов *Xag2* и *Ras-dva1* в раннем развитии мозга эмбрионов африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*

В раннем развитии эмбрионов позвоночных огромное значение имеет организатор развития переднего мозга - ANB центр, который посредством сигнала от фактора роста фибробластов Fgf8 регулирует развитие ростральной части презумптивного переднего мозга или теленцефалона. Фактор Fgf8 необходим для активации экспрессии важного транскрипционного фактора - FoxG1. Ген *FoxG1* (Foxhead box G1) - важный транскрипционный фактор, репрессор при высоких концентрациях белка и активатор при низких. Благодаря механизму двойной активности белка FoxG1 идет процесс дифференцировки переднего края нервной пластинки (ANB центр) с зоной активного деления, что является необходимым условием формирования и разрастания зачатка конечного мозга в ограниченной зоне нервной пластинки [96]. Как уже отмечалось ранее, малая ГТФаза Ras-dva1 и секретируемые белки группы Agr, наряду с такими важными регуляторами развития конечного мозга как Xanf и FoxG1, необходимы для нормального развития мозга зародышей *Xenopus*. Секретируемые белки Agr участвуют в регуляции развития переднего мозга, при гиперэкспрессии гена *Xag2* было показано расширение зон экспрессии некоторых маркеров переднего мозга [97]. Малая ГТФ Ras-dva1 регулирует экспрессию многих факторов, отвечающих за развитие переднего мозга и краниальных плакод. В частности, она участвует в формировании конечного мозга путем опосредованного действия через фактор роста фибробластов 8 (Fgf8), включение которого активирует экспрессию гена *FoxG1*[27]. Вероятно, что мембраносвязанная ГТФаза Ras-dva1 контролирует процесс передачи сигнала от Fgf8 внутрь клеток зачатка переднего мозга. Однако, дальнейший механизм действия ГТФазы Ras-dva1 на экспрессию *FoxG1* был неизвестен. В ходе нашего исследования мы проверили наше предположение о том, что малая ГТФаза Ras-dva1 может контролировать экспрессию *FoxG1* в нейтральных клетках презумптивного переднего мозга через некий секретируемый фактор. Мы смогли продемонстрировать, что гены *Ras-dva1* и *Agr* экспрессируются в ненейральных клетках, составляющих ростральную часть переднего края нервной пластинки и прилегающей к ней ненейральной эктодермы и способны к взаиморегуляции. Кроме того, был обнаружен новый сигнальный механизм обратной связи между клетками нервной пластинки и прилегающей ненейральной эктодермы с участием белков Fgf8, Agr и малой ГТФазы Ras-dva1.

4.1.1. *Ras-dva1* регулирует развитие конечного мозга посредством не прямой активации транскрипционного фактора *FoxG1*

Как уже было показано ранее, подавление экспрессии *Ras-dva1* ингибирует экспрессию гена *FoxG1*. Методом гибридизации *in situ* мы показали схожую локализацию транскриптов генов *Ras-dva1* и *FoxG1* в ходе нейруляции на зародышах шпорцевой лягушки (Рис.22). Метод гибридизации *in situ* в целых эмбрионах или их фрагментах (*in situ* hybridization in whole mounts) – эффективный подход для выяснения пространственной локализации экспрессии генов с разрешением на уровне отдельных клеток. На сериях вибротомных срезов видно, что они активируются в различных группах клеток, а именно: *Ras-dva1* экспрессируются в клетках роstralной части наружного слоя ненейральной эктодермы, над внутренним слоем нейральных клеток будущего зачатка конечного мозга – зоной экспрессии *FoxG1*. 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.

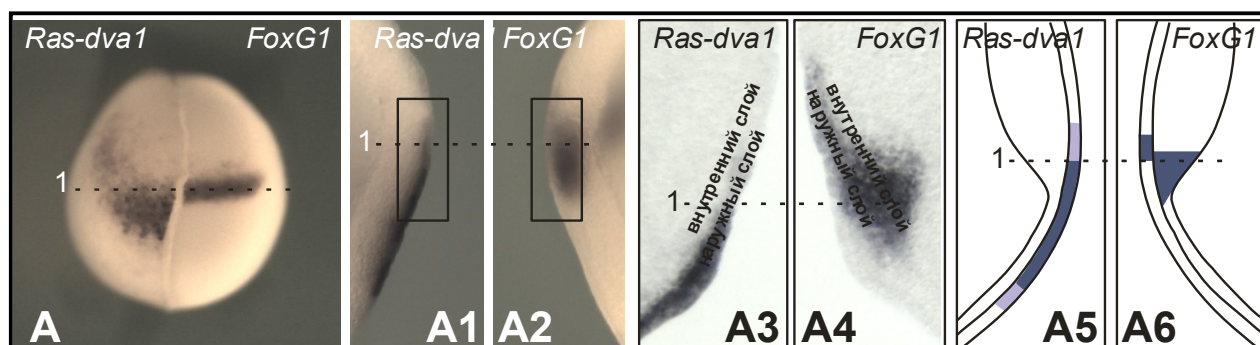


Рис.22. (А) Паттерн экспрессии генов *Ras-dva1* и *FoxG1*, представленный на левой и правой половинах одного зародыша шпорцевой лягушки *Xenopus* на стадии нейрулы (стадия 15) с помощью гибридизации *in situ*. Темно-синяя окраска, проявляющаяся в результате гибридизации *in situ*, маркирует клетки зародыша, содержащие мРНК *Ras-dva1* или *FoxG1*. Половинки зародышей были гибридизованы отдельно, затем сложены вместе и сфотографированы с дорзально-антериорной стороны. Пунктирная линия показывает зону экспрессии исследуемых генов. (A1-A4) Вибратомные срезы отдельно гибридизованных половинок одного зародыша демонстрируют различную локализацию транскриптов генов *Ras-dva1* и *FoxG1*. Обозначена область внутреннего слоя клеток - область экспрессии гена *FoxG1*, и область наружного слоя клеток, в которой *Ras-dva1* и *FoxG1* коэкспрессированы. (A3,A4) Представлены увеличенные изображения фрагментов срезов представленных в A1 и A2. (A5,A6). Схема среза зародыша и зон экспрессии исследуемых генов.

Учитывая эти данные, а также данные, полученные в нашей лаборатории ранее, можно говорить о том, что Малая ГТФаза *Ras-dva* действительно регулирует экспрессию фактора *FoxG1* не напрямую, а посредством неизвестного фактора[98].

4.1.2. Малая ГТФаза *Ras-dva1* участвует в опосредованной активации экспрессии *Agr* генов во внешнем слое ненейральной антериорной эктодермы путем передачи сигнала от фактора *Fgf8*

В ходе различных экспериментов мы доказали, что подавление экспрессии *Ras-dva1* ингибирует активацию *FoxG1*, путем подавления экспрессии фактора *Fgf8*[27]. Учитывая новые данные о локализации транскриптов обоих генов, можно говорить о вовлечении малой ГТФазы *Ras-dva1* в процесс передачи сигнала от фактора *Fgf8* в клетках наружного слоя ненейральной эктодермы, таким образом что происходит инициация обратного сигнала, стимулирующего экспрессию *FoxG1* в клетках внутреннего слоя будущего теленцефалона. Действительно, область экспрессии *Fgf8* совпадает с областью экспрессии гена *FoxG1* (Рис.23; зона 1, А2,А4,Б2,Б4). 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.23; сравните А2 и Б3). Аналогично *FoxG1*, низкая активность *Fgf8* обнаруживается клетках наружного слоя будущего диэнцефалона (Рис.23; зона 2; А2, А4, Б2, Б4).

Мы предположили, что существует некий сигнальный механизм обратной связи, задействующий клетки внешнего и внутреннего слоя, таким образом что клетки внешнего слоя продуцируют некий секретлируемый фактор, который передается клеткам внутреннего слоя, стимулируя их дифференцировку. Следующим нашим предположением было то, что роль такого секретлируемого фактора могут играть секретлируемые белки группы *Agr*. Во-первых, область экспрессии генов *Agr* совпадает с областью экспрессии *Ras-dva1*, во-вторых, один из генов *Agr* - *Xag2* участвует в дифференцировке преплакодной эктодермы в передней части нервной пластинки. Было также показано, что для нормальной экспрессии *Xag2* в раннем эмбриогенезе необходима активация *Fgf* сигналинга[97].

Как уже описывали ранее, у шпорцевой лягушки есть три подсемейства генов, каждый из которых, вследствие дупликации генома *Xenopus*, представлен парой высокоомологичных аллелей: *Xag1/Xag2*, *Xagr2a/Xagr2b* и *Xagr3a/Xagr3b* соответственно. С помощью гибридизации *in situ* мы определили локализацию транскриптов этих генов: гены *Xag* и *Xagr2* активируются в клетках внешнего слоя антериорной эктодермы (так же как и *Ras-dva1*) в области презумптивных желез вылупления и присоски (Рис.23;В-В4,Г-Г4). Ген *Xagr3*, по-видимому, не участвует в процессе ранней нейруляции, так как его экспрессия активируется на более поздних

стадиях в клетках присоски и железы вылупления [26]. Интересным оказалось то, что экспрессия генов *Agrs* ограничивается внешним слоем клеток, то есть они не участвуют в процессе развития теленцефалона напрямую, также как и *Ras-dva1*. Таким образом, секретируемые продукты этих генов могут играть роль тех самых регулируемых малой ГТФазой *Ras-dva1* сигнальных факторов.

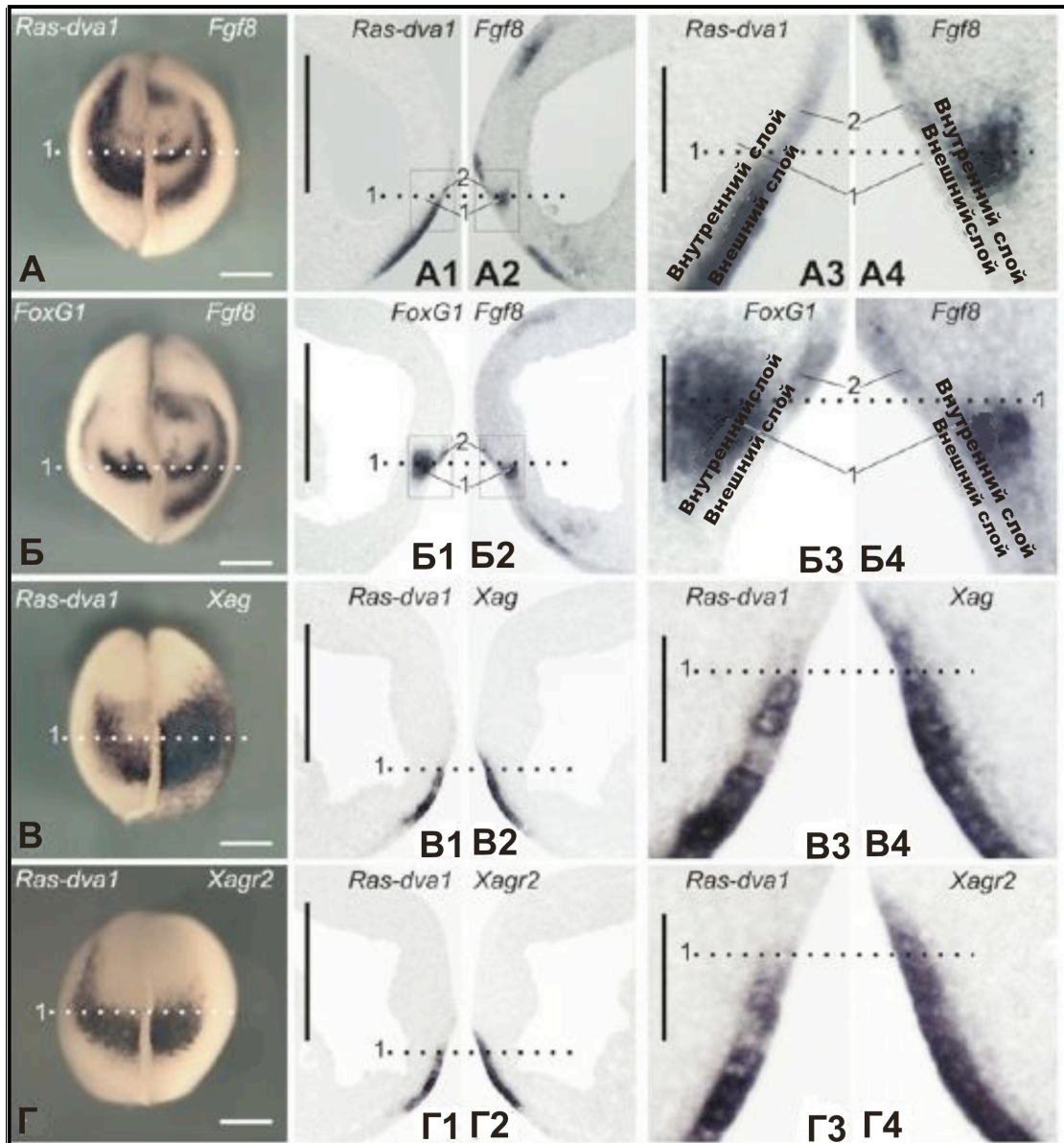


Рис.23. Анализ паттерна экспрессии генов anteriорной эктодермы на стадии средней нейрулы. (А-Г) Паттерны экспрессии генов *Ras-dva1*, *Fgf8*, *FoxG1*, *Xag*, *Xagr2*, представленные на левой и правой половинах одного зародыша шпорцевой лягушки с помощью гибридизации *in situ*. Темно-синяя окраска, проявляющаяся 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. (А1-Г1, А2-Г2) Вибратомные срезы половинок одного зародыша, отдельно гибридизованных с указанными зондами. (А3-Г3, А4-Г4) Увеличенные фрагменты изображений панелей А1-Г1 и А2-Г2.

Для того, чтобы проверить это утверждение нам было необходимо изучить влияние подавленной экспрессии гена *Ras-dva1* на активность *Agr* генов. Для этого мы использовали антисмысловые морфолиновые олигонуклеотиды - это химически синтезированные антисмысловые олигонуклеотиды, незаряженные ДНК-миметики, которые связываются с 5'-НТО мРНК *Ras-dva1*, тем самым препятствуют посадке рибосомы на мРНК и, следовательно, блокируют синтез белка. Морфолиновые олигонуклеотиды блокируют небольшие одноцепочечные участки (около 25 нуклеотидов) на поверхности молекул РНК в области инициации трансляции. Выключение экспрессии генов является мощным методом изучения функции конкретного белка. Один из бластомеров 2-х клеточного эмбриона *Xenopus* был инъецирован смесью морфолино *Ras-dva1* (*Ras-dva1 MO*) и флуоресцентного красителя FLD (Fluorescence detector) для визуализации инъецированных клеток. Методом гибридизации *in situ* мы смогли зафиксировать значительное уменьшение экспрессии генов *Xag*, *Xagr2* и *FoxG1* в области закола у зародышей *Xenopus* на стадии средней нейрулы (ст.15), а также уменьшение телэнцефалона и глаз у головастиков (ст.45) (Рис. 24. А-Ж). В то же время при заколе контрольных морфолино *misRas-dva1* никаких изменений в экспрессии исследуемых генов отмечено не было. 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* инъецировать искусственно синтезированную мРНК *Xagr2* (*Xagr2a*) или *Xag* (эквимольная смесь *Xag1* и *Xag2*) (Рис. 24 Ж, К). Эти данные указывают на то, что *Agr* являются частью сигнального каскада *Ras-dva1* - *Fgf8* - *FoxG1*, причем активируются “ниже” *Ras-dva1* в этом каскаде.

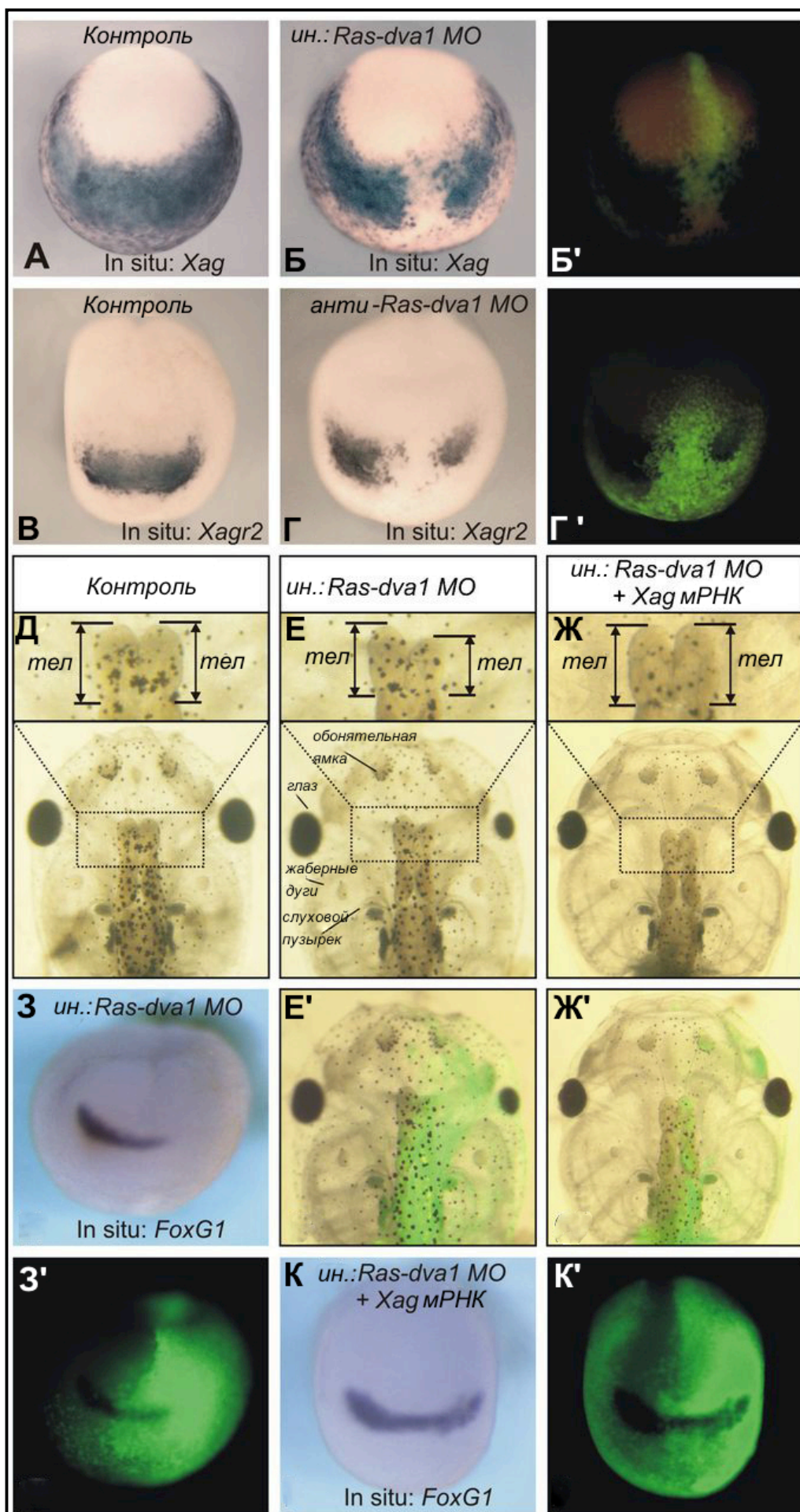


Рис.24. (А, Б, Б', В, Г, Г') Паттерны экспрессии генов *Agr* в норме и при подавленной (путем введения морфолино *Ras-dval*) трансляции мРНК *Ras-dval*, показанные методом гибридизации *in situ*. Зародышей инъецировали в один из бластомеров на 2-клеточной стадии вместе с флуоресцентным трейсером FLD. Область закола определяли по флуоресценции. Вид с anteriorno-дорзальной стороны. (Д, Е, Е') Теленцефалон головастика *Xenopus* в норме и при заколе *Ras-dval MO*. Вид головастика со спины. Флуоресценция демонстрирует распределение клеточных клонов, содержащих флуоресцентный трейсер FLD (ко-инъекция с *Ras-dval MO*). Тел - теленцефалон (Ж, Ж') Теленцефалон головастика заколотых *Ras-dval MO* и синтезированной мРНК *Xag2* одновременно. (З, З') Паттерн экспрессии *FoxG1* заколотого *Ras-dval MO* эмбриона *Xenopus*, показанный методом гибридизации *in situ*. Инъецировали *Ras-dval MO* в половину зародыша (закол в 1 из 2х бластомеров) с флуоресцентным трейсером. (К, К') Восстановление нормального паттерна экспрессии *FoxG1* путем ко-инъекции *Ras-dval MO* и синтезированной мРНК *Ras-dval*. Флуоресценция демонстрирует область закола.

Однако, открытым остается вопрос, каким образом фактор Fgf8 может влиять на экспрессию *Agr*. Методом инъекции искусственно синтезированной мРНК гена *Fgf8* мы смогли оценить влияние оверэкспрессии *Fgf8* на активность генов *Agr*. Методом гибридизации *in situ* было отмечено существенное расширение области экспрессии генов *Agr* в anteriornoй части ненейральной эктодермы (Рис.25. А,А',Б,Б'). Кроме того, наблюдалось увеличение экспрессии генов *Ras-dval* и *FoxG1* (Рис.25. В, В', Г, Г').

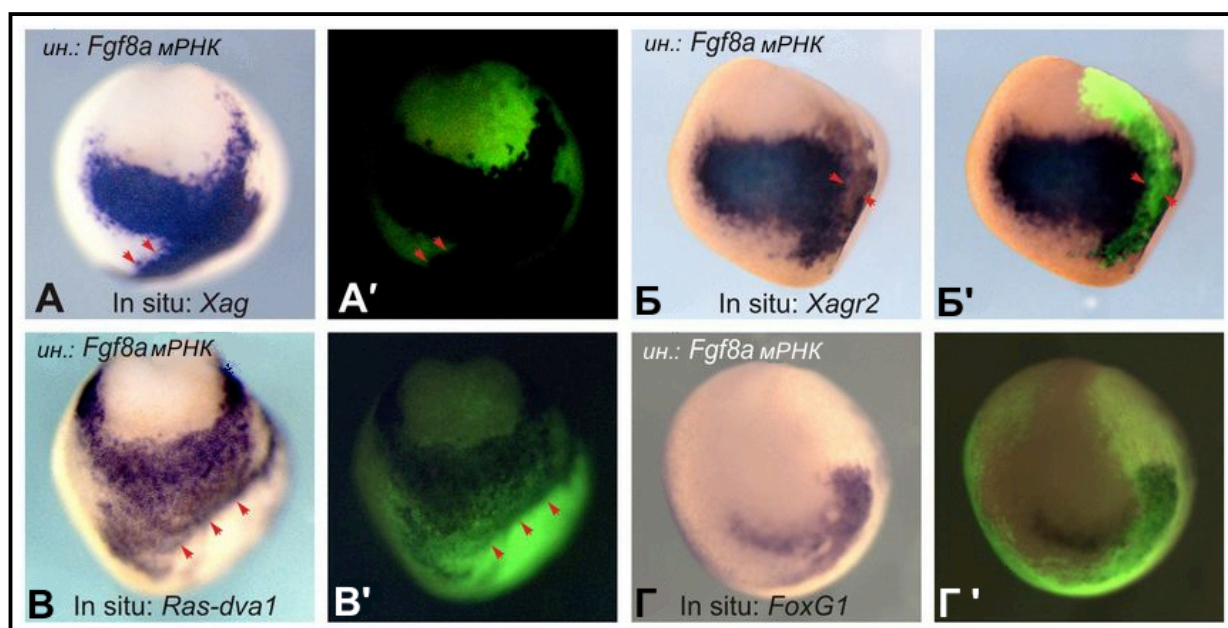


Рис.25. (А-Г') Паттерны экспрессии генов *Agr*, *Ras-dva1* и *FoxG*, показанные методом гибридизации *in situ* на инъектированных мРНК *Fgf8a* зародышах *Xenopus*. Инъекции искусственно синтезированной мРНК *Fgf8a* в эмбрионы приводят к гиперэкспрессии этого гена, что в свою очередь ведет к увеличению области экспрессии исследуемых генов - *FoxG1*, *Ras-dva1*, *Xag* и *Xagr2* - в anteriорной эктодерме эмбрионов шпорцевой лягушки. Вид с anteriорно-дорзальной стороны, эмбрионы на стадии средней нейрулы. Инъекции мРНК вместе с флуоресцентным детектором осуществляли в два бластомера (дорзальный и вентральный) на левой стороне 16 или 32-х клеточном эмбрионе. Область закола определяли по флуоресценции. Красными стрелками показаны границы ectопической экспрессии, которые соответствуют областям наибольшей флуоресценции, т.е. с наибольшим количеством заколотой мРНК *Fgf8a*.

Также мы провели серию экспериментов по подавлению трансляции мРНК *Fgf8a* путем введения морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов. Заколотые 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.26 А-Г'). Интересно, что ко-инъекция *Fgf8a* MO и мРНК *Ras-dva1* ведет к тому, что характерный для эмбрионов дикого типа профиль экспрессии у инъектированных эмбрионов не восстанавливается (Рис.26. Д-Е').

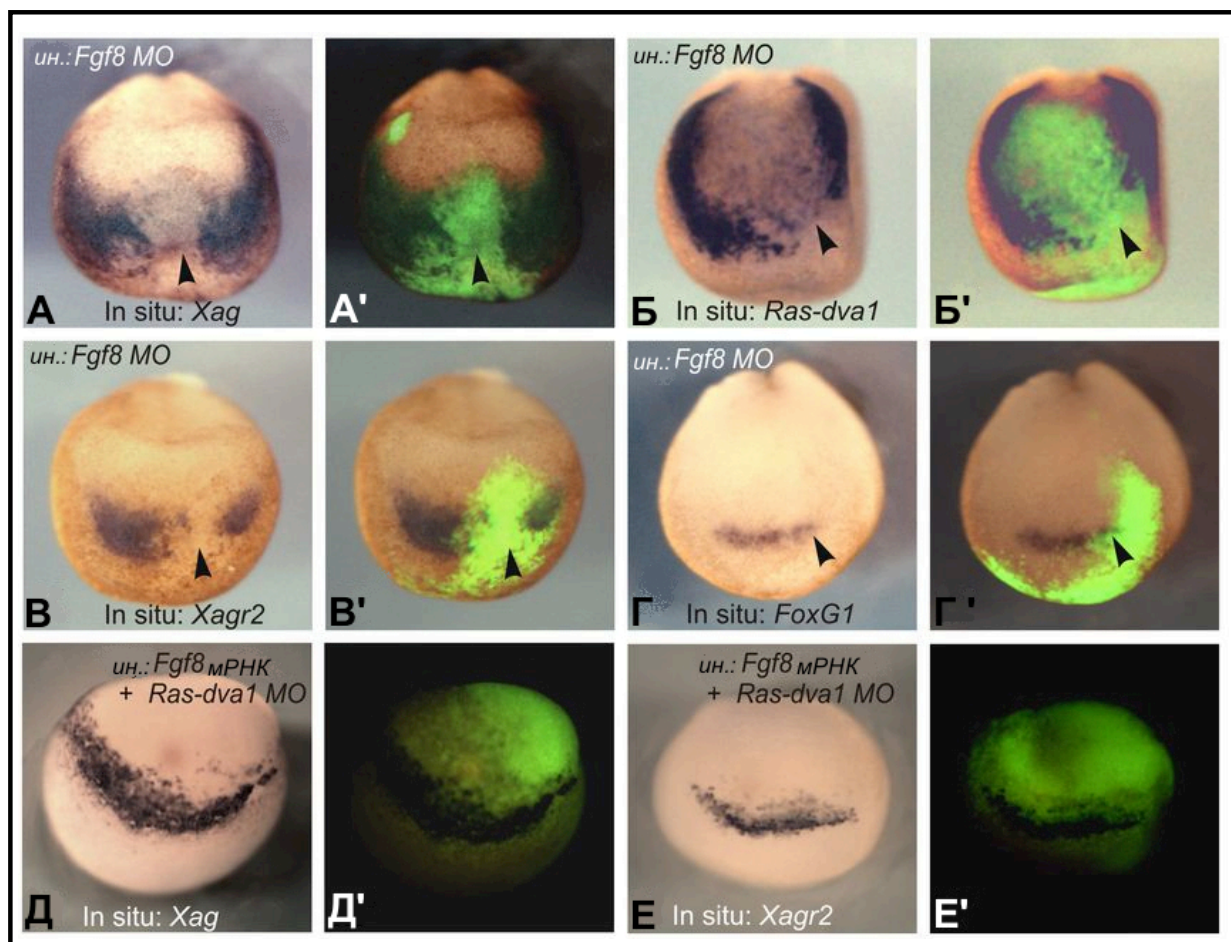


Рис.26. (А-Г') Паттерны экспрессии генов *Agr*, *FoxG1* и *Ras-dva1*, показанные методом гибридизации *in situ* на инъектированных *Fgf8a* MO зародышах *Xenopus*. Инъекции морфолиновых олигонуклеотидов к *Fgf8a* в эмбрионы приводят к подавлению экспрессии этого гена, что в свою очередь ведет к уменьшению области экспрессии исследуемых генов - *FoxG1*, *Ras-dva1*, *Xag* и *Xagr2* - в anteriорной эктодерме эмбрионов шпорцевой лягушки. Вид с anteriорно-дорзальной стороны, эмбрионы на стадии средней нейрулы. Инъекции *Fgf8a* MO вместе с флуоресцентным детектором осуществляли в два blastomeres (дорзальный и ventральный) на левой стороне 16 или 32-х клеточном эмбрионе. Область закола определяли по флуоресценции. (Д-Е') Паттерн экспрессии генов *Agr* в зародышах, коинъектированных мРНК *Fgf8a* и *Ras-dva1* MO. Черные стрелки указывают на области подавленной экспрессии исследуемых генов.

Таким образом, наша теория о том, что фактор роста фибробластов *Fgf8a* влияет на экспрессию секретируемых белков группы *Agr*, активируя процесс передачи сигнала малой ГТФазой *Ras-dva1*, полностью согласуется с полученными данными. Соответственно можно заключить, 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.

4.1.3. Фенотипические эффекты подавления функции *Agr* у головастика *Xenopus* схожи с эффектами ингибирования *Ras-dva1*

Наши предыдущие эксперименты показали, что гены *Xag2* и *Xagr2* являются участниками сигнального каскада *Fgf8*. Было логично предположить, что по аналогии с *Fgf8* и *Ras-dva1*, белки *Agr* влияют 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 [99]. 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 бластомера (дорсальный и вентральный) на левой стороне 4/8 клеточных эмбрионов *Xenopus*. При этом, на заколотой половине зародышей наблюдали следующие аномалии развития: редуцированные теленцефалон, обонятельная ямка, слуховой пузырек, глаза и жаберные дуги (Рис.27). Аналогичные эффекты наблюдались при подавлении функции *Ras-dva1*[27]. Для проверки специфичности морфолино *Xag2/Xagr2* мы использовали коинъекции морфолиновых олигонуклеотидов с мРНК *Xag2/Xagr2* с измененной 5' НТО, которая может служить альтернативной матрицей для синтеза белка. В результате, 50% инъецированных головастиков не имели тех отклонений, которые возникали в случае подавленной функции генов *Agr*.

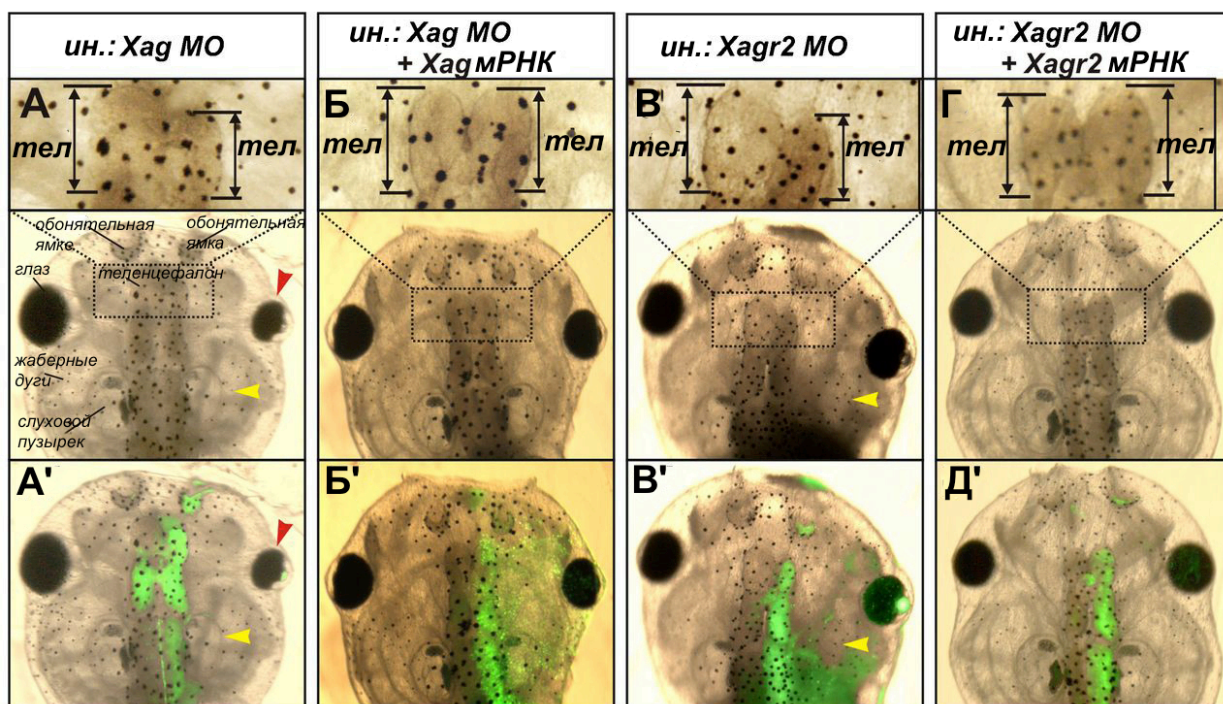


Рис.27. (А,А',В,В') Головастики с подавленной функцией генов *Xag2* и *Xagr2*. Область закола определяется по флуоресценции детектора FLD. Вид со спины, 45 стадия. (Б, Б', Г, Г') Восстановление нормальной структуры теленцефалона у головастиков, инъецированных смесью *Xag2 MO* + мРНК *Xag2* и *Xagr2 MO* + мРНК *Xagr2*. Увеличенные изображения с черными стрелками демонстрирует изменения теленцефалона, желтые стрелки указывают на ушные везикулы, красные - на глаза.

4.1.4. *Fgf8*, *Ras-dva1* и *Agr* связаны в единой сигнальной петле обратной связи

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, инъецированных *Xag2 MO*. Интересным оказалось то, что экспрессия *Ras-dva1* тоже оказалась подавленной (Рис.28; А-В'). Учитывая тот факт что, инактивация *Ras-dva1* тоже ингибирует экспрессию *Agr*, было логичным предположить наличие регуляторной петли обратной связи между *Ras-dva1* и *Agr*.

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.28; Г, Г'). В тоже время, при ингибированной

активности *Fgf8* ни мРНК *Agr*, ни мРНК *Ras-dva1* не способны восстанавливать нормальный профиль экспрессии *FoxG1* (Рис.28; 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* МО и мРНК *Fgf8* экспрессия FoxG1 оставалась подавленной (Рис. 28; Ж –З').

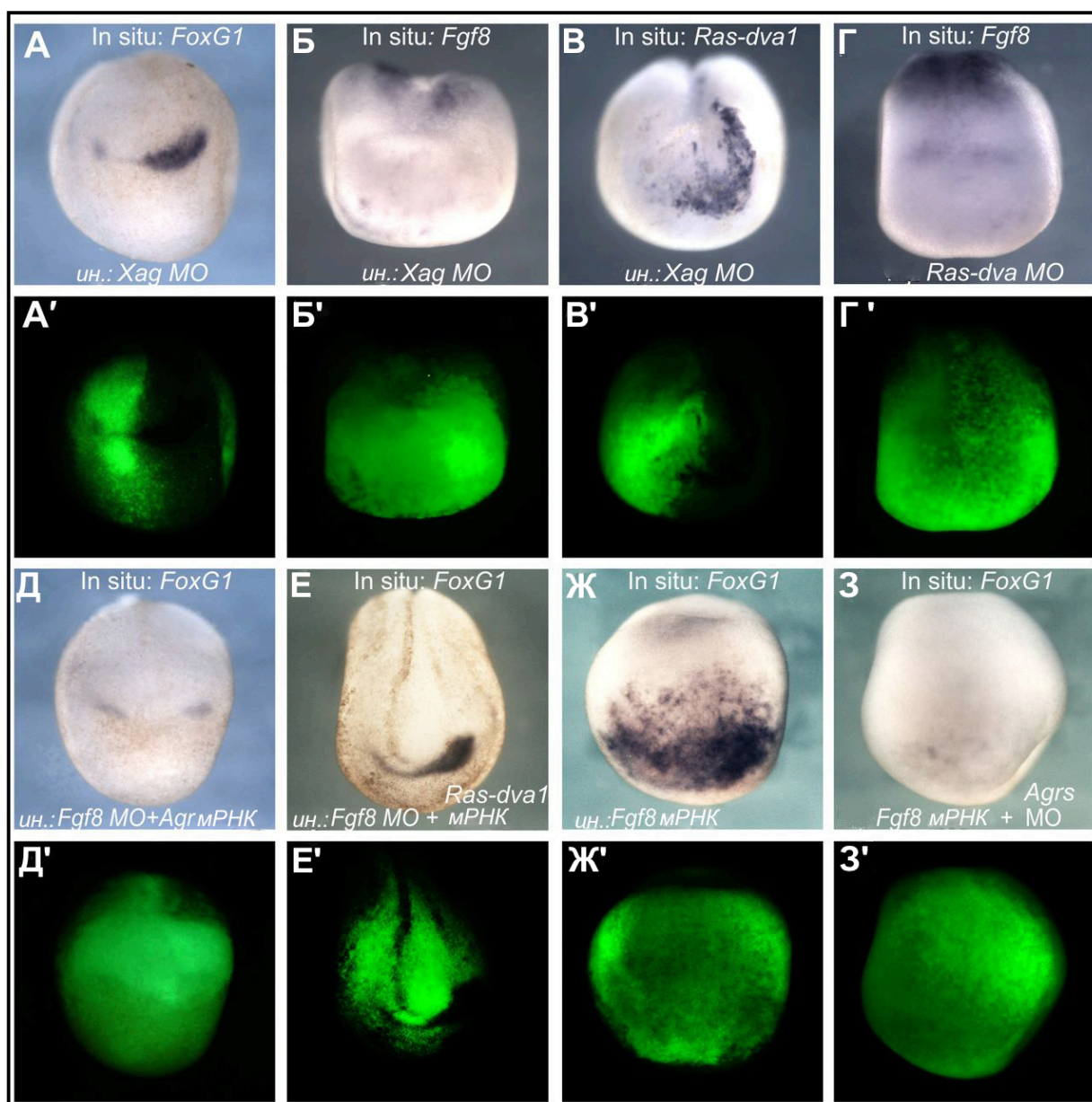


Рис.28. Взаиморегуляция экспрессии генов *Agr*, *Fgf8* и *Ras-dva1*. (А-В) Паттерны экспрессии генов *FoxG1*, *Fgf8* и *Ras-dva1*, показанные на инъектированных *Xag2* *МО* зародышах методом згибридизации *in situ*. В области закола (отслеживается по флуоресценции) отмечается сильное подавление исследуемых генов. (Г, Г') Подавление экспрессии *Fgf8* в зародышах *Xenopus* при инъекции *Ras-dva1* *МО*. (Д, Д') Ко-инъекция мРНК *Agr* (эквимоллярной смесь мРНК *Xag1*, *Xag2*, *Xagr2A* и *Xagr2B*) или (Е, Е') мРНК *Ras-dva1* не спасает подавленную *Fgf8* *МО* экспрессию *FoxG1*. (Ж-Ж') Инъекция мРНК *Fgf8* стимулирует обширную эктопическую экспрессию *FoxG1* в передней эктодерме. (З, З') Смесь *Agr* *МО* (смесь морфолино *Xag* и *Xagr*) подавляет индуцированную мРНК *Fgf8* эктопическую экспрессию *FoxG1*. Зародыши на стадии нейрулы, вид с дорзально-антериорной стороны. Во все инъекционные смеси был добавлен флуоресцентный трейсер FLD, таким образом, флуоресценция демонстрирует распределение клеточных клонов, содержащих всю инъекционную смесь.

4.1.5. Ras-dva1-зависимый Fgf8 сигналинг индуцирует экспрессию Agrs путем регуляции экспрессии Otx2

Ранее в нашей лаборатории было показано, что транскрипционный фактор Otx2 может непосредственно активировать экспрессию *Ras-dva1*, в то время как экспрессия *Ras-dva1* необходима для активации Otx2 [27]. 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[100]. Учитывая тот факт, что Otx2 также активатор экспрессии Agrs [101][100][102] можно предположить, что активация *Ras-dva1*-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-dva1* и Otx2 в презумптивном теленцефалоне совпадают (Рис.29; 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.29; 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-dva1*.

Интересно, что ингибирование экспрессии Otx2 сопровождается расширением областей низкой экспрессии, что характерно для эмбрионов, инъецированных мРНК *Fgf8*. Учитывая, что транскрипционный фактор Otx2 является активатором *Agr* и *Ras-dva1*, было важно проанализировать экспрессию последних на эмбрионах с подавленной активностью Otx2. У зародышей, инъецированных Otx2 MO, мы наблюдали значительное снижение активности генов *Agr* и *Ras-dva1* (рис. 29; Е-И'). Важно, что эти эффекты закола Otx2 MO сохранялись и

при ко-инъекции мРНК *Fgf8*, которая в отсутствии *Otx2* *МО* значительно индуцирует экспрессию *Ras-dval* и *Agrs* (сравните Рис.25; А-В с Рис. 29; 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, инъецированных *Otx2* *МО* (Рис.29; О, П). Этот результат подтверждает участие *Otx2* в сигнальной петле обратной связи между клетками ANB и клетками прилежащей передней ненейральной эктодермы.

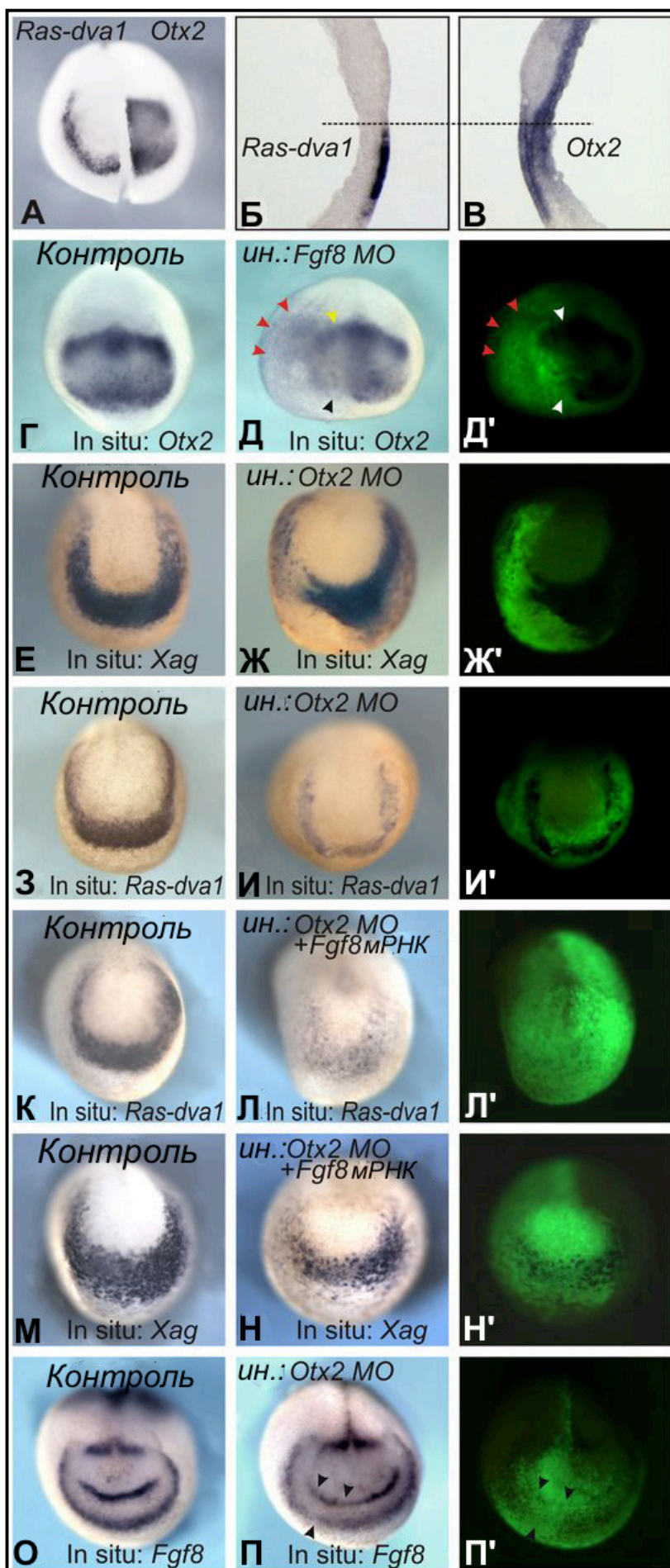


Рис.29. Паттерны экспрессии генов, показанные методом гибридизации *in situ*. Темно-синяя окраска, проявляющаяся в результате гибридизации *in situ*, маркирует клетки зародыша, содержащие мРНК исследуемых генов. (А-В) Зона экспрессии *Otx2* в наружном слое передней части нервной пластинки совпадает с зоной экспрессии *Ras-dva1*. Половинки зародышей были гибридизованы отдельно, затем сложены вместе и сфотографированы с дорзально-антериорной стороны. Вибратомные срезы половинок одного зародыша, отдельно гибридизованных с указанными зондами (по аналогии с Рис. 23.) (Г-Д') Подавление трансляции мРНК *Fgf8* с помощью *Fgf8 MO* частично ингибирует экспрессию *Otx2* в передней части нервной пластинки и расширяет боковую и заднюю области экспрессии (красные стрелки, желтые и черные стрелки указывают на снижение уровня экспрессии *Otx2* в области презумптивного среднего мозга и присоски, соответственно). Область закола отслеживается по флуоресценции. (Е-И') Подавление трансляции мРНК *Otx2* с помощью *Otx2 MO* ингибирует экспрессию *Xag* и *Ras-dva1*. (К-Н') Ко-инъекция мРНК *Fgf8a* не невилирует ингибирующего эффекта *Otx2 MO* на экспрессию *Xag* и *Ras-dva1*. (О-П') Подавление трансляции мРНК *Otx2* ингибирует экспрессию *Fgf8* (черные стрелки). Флуоресцентные изображения эмбрионов демонстрируют распределение инъекционных клеток (инъекционная смесь с FLD трейсером).

4.1.6. Заключение

- **Малая ГТФаза *Ras-dva1* регулирует распространение *Fgf8* сигнала в клетках внешнего слоя передней ненейральной эктодермы.** Как мы показали ранее, малая ГТФаза *Ras-dva1* контролирует развитие конечного мозга у эмбрионов *Xenopus Laevis* путем регуляции распространения сигнала фактора *Fgf8*, продуцируемого клетками ANB. Данные, полученные в настоящей работе, подтверждают неавтономный характер этого механизма и демонстрируют, что он основан на процессе обмена сигналов *Fgf8* и *Agrs* между нейральной и ненейральной эктодермой передней части нервной пластинки. Мы продемонстрировали, что *Ras-dva1* экспрессируется исключительно в клетках наружного слоя ненейральной эктодермы, на границе с ANB и, таким образом, в принципе, не может регулировать экспрессию генов конечного мозга (внутренний слой клеток) с помощью автономного механизма.

- **Белки *Agr* участвуют в процессе передачи сигнала между клетками ANB и клетками прилегающей ненейральной эктодермы.** Подавление трансляции мРНК *Ras-dva1* вызывает ингибирование экспрессии *FoxG1* и *Fgf8* в клетках внутреннего слоя передней части нервной пластинки, т.е. в зачатке теленцефалона и, как следствие, уменьшение последнего. Тем не менее, эти эффекты могут быть скомпенсированы путем ко-инъекции мРНК *Agrs*. Подавление трансляции мРНК *Fgf8* ведет к ингибированию экспрессии *Ras-dva1* и *Agrs* в смежных, *Fgf8*-не-экспрессирующих, клетках наружного слоя. Соответственно мы продемонстрировали, что экзогенная мРНК *Fgf8* может скомпенсировать эффект *Fgf8 MO*, но не *Ras-dva1 MO*. Кроме того, подавленная активность *Agrs* вызывает ингибирование экспрессии *FoxG1* и *Fgf8* и уменьшение телэнцефалона, то есть эффекты, аналогичные эффектам *Ras-dva1*

МО. Тем не менее, ни мРНК *Xagr*, ни мРНК *Ras-dva1* в состоянии предотвратить ингибирование экспрессии *FoxG1* вызванного *Fgf8* МО. Последние результаты демонстрируют абсолютную необходимость *Fgf8* для индукции *FoxG1*. В то же время, способность *Agrs* МО нарушать опосредованную *Fgf8* индукцию *FoxG1* указывает на то, что на *Agr* влияют не только непосредственно на активность *Fgf8*, но и сами регулируют сигнальный каскад, стимулируя экспрессию основного регулятора развития конечного мозга - *FoxG1*.

- **Фактор *Otx2* – участник сигнального каскада *Fgf8*.** И, наконец, согласно данным, полученным в нашей лаборатории ранее, и нынешним исследованиям *Ras-dva1* активируется во внешнем слое передней ненейральной эктодермы с помощью фактора транскрипции *Otx2*. Фактор *Otx2* также участвует в *Fgf8* сигналинге: действует как активатор *Agrs*, и, в свою очередь, активируется Малой ГТФазой *Ras-dva1* в клетках ненейральной эктодермы, прилегающей к ANB.

- **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.30).

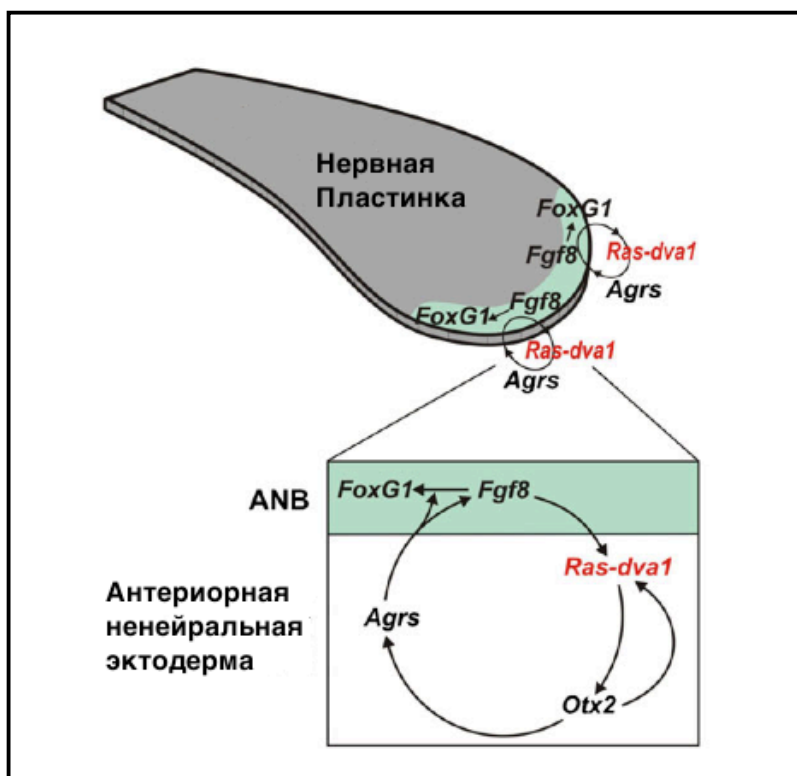


Рис.30. Модель сигнального каскада Fgf8, основанная на обмене сигналами между клетками нервной пластинки и клетками прилегающей ненейральной эктодермы.

4.2. Участие генов Agr и Ras-dva в регенерации задней почки конечности и хвоста головастика шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и плавников рыбы *Danio rerio*

Известно, что сигнальные каскады, регулирующие различные аспекты жизнедеятельности клеток, достаточно консервативны так, что одни и те же каскады могут принимать участие в различных процессах. Например, сигнальный путь *Fgf8* регулирует нейральную индукцию в раннем развитии зародышей лягушки и участвует в образовании и регенерации конечности и хвоста головастика *Xenopus laevis*. Кроме того, мы доказали существование сигнальной петли обратной связи между фактором *Fgf8*, малой ГТФазой *Ras-dva1* и секретируемыми белками *Agr* в нейрогенезе зародышей *Xenopus*. Учитывая последние данные, было бы важно выяснить, участвуют ли два последних гена также и в процессах регенерации почки конечности и хвоста головастика *Xenopus* а также плавников *Danio*. Интересно, что оба гена *Ras-dva* и ген *Ag1* постепенно исчезают в процессе эволюции, что коррелирует со снижением способности к регенерации. Возможно, исчезновение этих генов и/или нарушение всего сигнального каскада могло стать причиной утраты способности к регенерации у высших позвоночных (Рис. 31). Кроме того, изучение возможной роли генов *Agr* в процессах регенерации важно и как самостоятельная задача, так как это позволило бы ответить на вопрос о степени универсальности роли белков семейства *Agr* в процессах

регенерации. Напомним, что влияние этих белков на регенерацию было пока показано только для тритона, при этом их роль в регенерации у других позвоночных остается под вопросом.

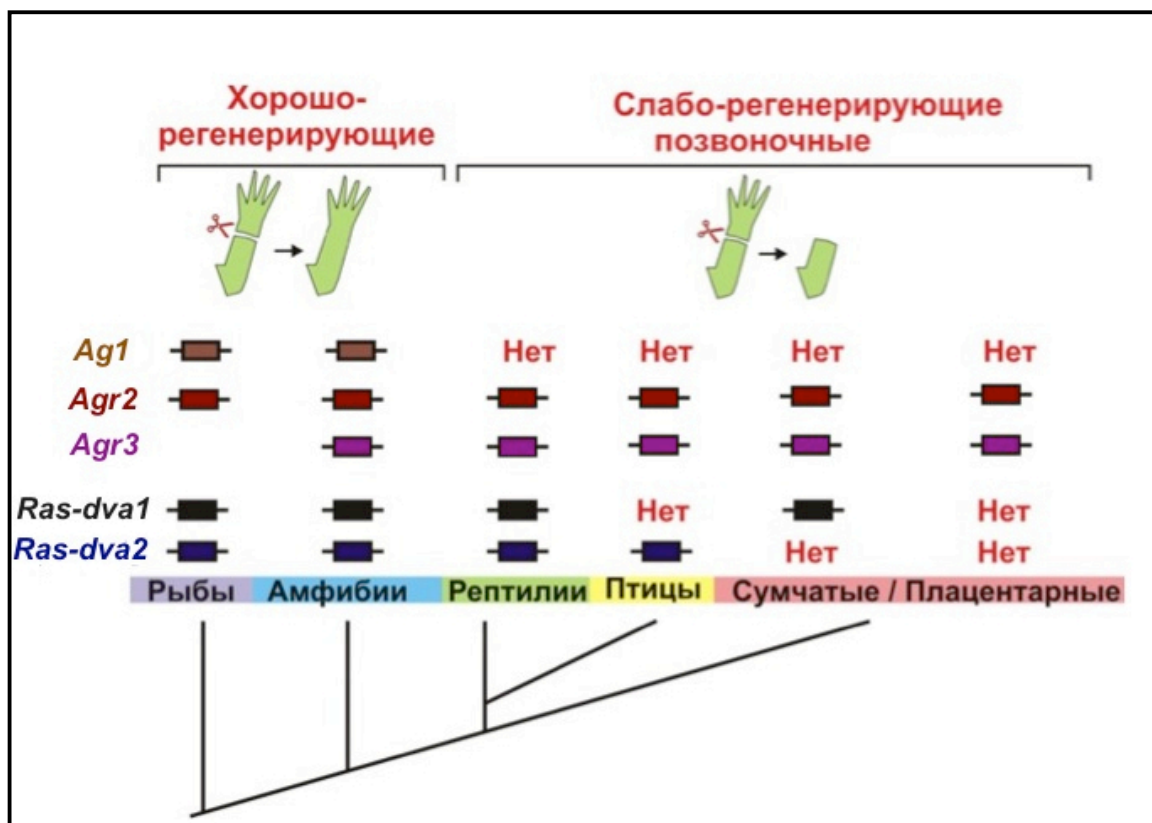


Рис.31. Схема корреляции эволюции генов *Agr* и *Ras-dva* с постепенной утратой к регенерации у высших позвоночных.

4.2.1. Участие генов *Agr* в регенерации хвоста и почки конечности головастика *Xenopus laevis*

4.2.1.1. Изучение экспрессии *Agr* генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени

ОТ-ПЦР в реальном времени - метод, основанный на полимеразной цепной реакции, используется для одновременной амплификации и измерения количества ДНК. Преимуществом данного метода является, во-первых, его высокая специфичность (позволяет анализировать мРНК именно нужного гена), а во-вторых, возможность проводить количественное сравнение концентраций мРНК изучаемого гена в разных образцах.

Исходя из данных филогенетического анализа, было бы важно изучить экспрессию представителей синтетических групп генов *Agr* в процессе регенерации головастика *Xenopus laevis*. У шпорцевой лягушки вследствие дупликации генома существует три пары высокоомологичных псевдоаллелей: *Xag1/Xag2*, *Xagr2a/Xagr2b* и *Xagr3a/Xagr3b* (более 90%

идентичности между аллелями в каждой паре). Таким образом, для оптимизации процесса проведения анализа, мы выбрали по одному из этих генов для нашего исследования, а именно: *Xag2*, *Xagr2a* и *Xagr3a*.

Анализа содержания мРНК генов *Xag2*, *Xagr2a*, *Xagr3a* 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 (эту часть в дальнейшем называли “срединной частью”), 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.32). Все отрезанные образцы растворяли в лизис-буфере, выделяли тотальную РНК и анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Чтобы иметь возможность сравнивать результаты ПЦР, полученные для независимых образцов тканей, мы проводили нормировку образцов относительно внутреннего контроля: кДНК одного из генов домашнего хозяйства (housekeeping gene) – орнитиндекарбоксилазы (*ODC*). В качестве отрицательного контроля использовали аликвоты тех же самых образцов тотальной РНК, которые были использованы нами для получения кДНК, но без добавления обратной транскриптазы.

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 *Xagr2a*. Для гена *Xagr3a* было показано увеличение экспрессии в ампутированных конечностях, но не хвостах. В целом уровень экспрессии гена *Xagr3a* был ниже по сравнению с другими генами, т.е. сигнал в ПЦР-амплификаторе фиксируется на более поздних циклах. Эффективность ПЦР при этом для всех генов *Agr* приблизительно одинакова и равна 2 (см. Материалы и методы). 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. Как мы уже отмечалось, регенерация конечностей у головастика *Xenopus laevis* ограничена по времени и после наступления метаморфоза она уже отсутствует. В то же время, регенерация хвоста сохраняется дольше, вплоть до начала его гистолиза.

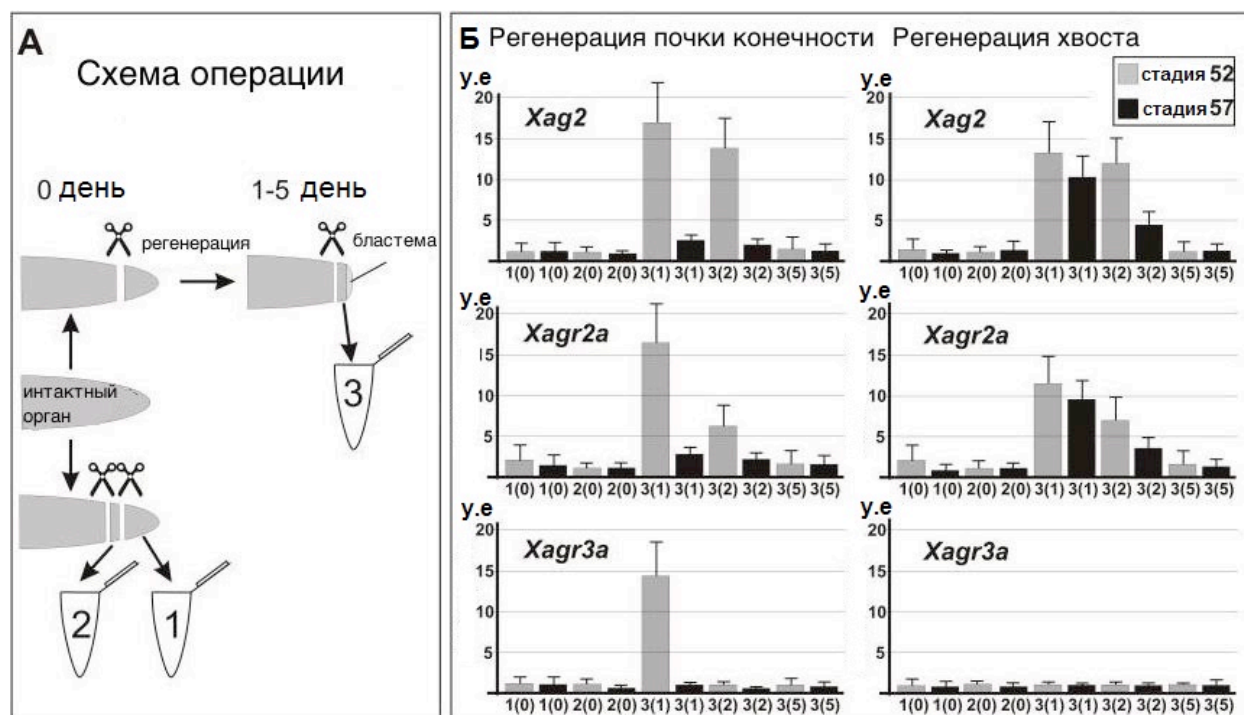


Рис.32. (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика экспрессии генов *Agr*, показанная методом количественного ОТ-ПЦР. В скобках указано количество дней после ампутации.

4.2.1.2. Изучение экспрессии генов *Agr* методом гибридизации *in situ*

Для проверки результатов анализа количественного ОТ-ПЦР другим способом, мы изучили экспрессию *Xag2*, *Xagr2a* и *Xagr3a* методом гибридизации *in situ*. Для анализа этим методом мы получали образцы тканей интактных и регенерирующих хвостов и почек задних конечностей головастика шпорцевой лягушки по той же схеме, которая использовалась для исследования этих генов методом ОТ-ПЦР с одним исключением – мы фиксировали ампутированные органы полностью, а не их части. Полученные образцы использовали для стандартной процедуры гибридизации *in situ* с dig-мечеными пробами к мРНК соответствующих генов. Как видно из Рис.33 (А, Е, Л) в интактных почках задних конечностей гены *Agr* экспрессируются на низком уровне. При этом в интактных хвостах гибридизационный сигнал отсутствует вовсе. Отчетливое возрастание сигнала *Xag2* и *Xagr2a* наблюдается в дистальных частях ампутированных хвоста и почки задней конечности уже через сутки после операции. В то же время экспрессия *Xagr3a* не детектировалась даже на 4-й день окрашивания в интактных или ампутированных почках задних конечностей и хвостов (Рис. 33; Л-П). Полученные результаты коррелируют с данными анализа ОТ-ПЦР (см. выше). Более того, на ранних эмбрионах (стадия 25, хвостовая почка) мы продемонстрировали наличие транскриптов гена *Xag3a* в присоске и слуховом пузырьке, что подтверждает эффективность *Xagr3a* зонда (Рис. 33; Р, С).

Следует отметить, что с помощью гистологических срезов, мы отметили повышение концентрации транскриптов *Xag2* как в клетках эпидермиса и в дистальных клетках бластемы,

расположенных под эпидермисом (Рис. 33; В, Д). Высокий уровень транскриптов *Xagr2* детектировался главным образом в дистальных клетках эпидермиса (Рис. 33; З, К). Для контроля неспецифического окрашивания мы использовали sense-зонды *Xag* и *Xagr*. Ни в одном из случаев гибридизационный сигнал не фиксировался (Рис. 33; Т-Ц).

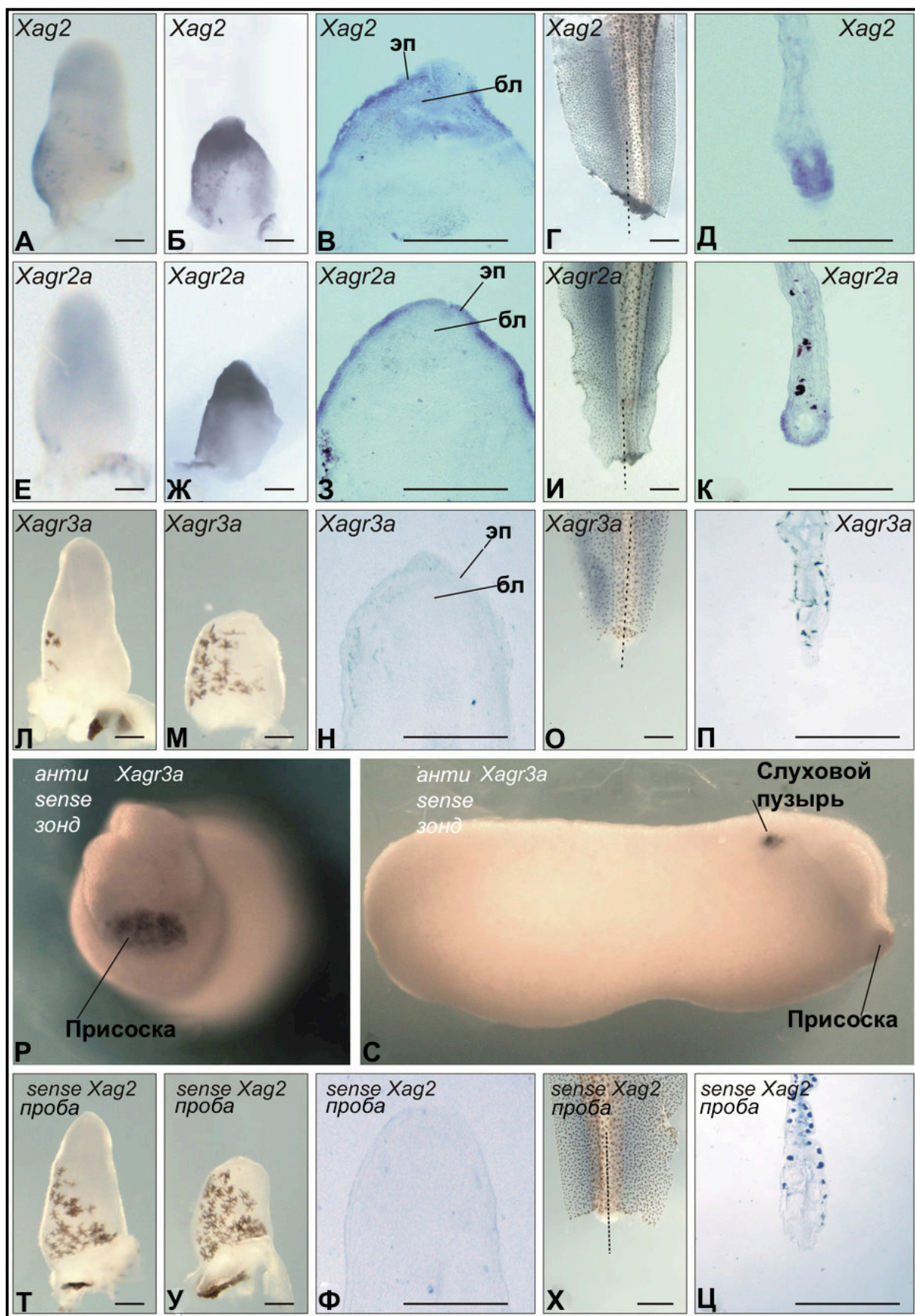


Рис.33. Паттерны экспрессии *Agr*, показанные методом гибридизации *in situ*. (А, Б, Е, Ж, Л, М) Интактные и ампутированные почки задних конечностей на 52 стадии, гибридизованные с зондами *Xag2*, *Xagr2a* и *Xagr3a* соответственно. Темно-синяя окраска, проявляющаяся в результате гибридизации *in situ*, маркирует клетки зародыша, содержащие мРНК исследуемых генов. Вид: дистальная часть сверху, справа – брюшная сторона. (В, З, И). Сагиттальные срезы ампутированных почек задних конечностей, показанных на Б, Ж и М; эп - эпидермис, бл – бластема. (Г, Д, И, К, О, П). Вид сверху и фронтальные срезы (уровень среза обозначен пунктирными линиями на Г, И, О) хвостов, ампутированных на 52 стадии и гибридизованных с зондами *Xag2* и *Xagr2a*. (Р и С). Эмбрион на 25 стадии, гибридизованный с *antisense Xag3a*. Вид с фронтальной и правой сторон соответственно, спинная сторона наверху. (Т, У, Х). Интактная и ампутированная почка задней конечности и ампутированный хвост на 52 стадии, гибридизированные с *sense*-зондом *Xag2* (контроль) (Ф, Ц). Сагиттальный срез ампутированной гибридной почки задней конечности и фронтальный срез ампутированного хвоста.

4.2.1.3. Изучение экспрессии генов *Agr* с помощью трансгенных эмбрионов *Xenopus laevis*

Использование трансгенных животных, экспрессирующих флюоресцентные белки под контролем промоторов изучаемых генов, - один из наиболее удобных способов изучения работы этих генов. Главным преимуществом данного метода является возможность следить за генной экспрессией непосредственно в живом организме. Кроме того, поскольку данный подход основан на совершенно ином принципе, чем такие традиционные методы анализа экспрессии, как ОТ-ПЦР или гибридизация *in situ*, он может служить хорошим независимым контролем для проверки результатов, полученных этими традиционными методами.

В нашей работе мы ограничили исследования работой с трансгенными эмбрионами, экспрессирующими зеленый флюоресцентный белок под контролем промоторов только одного из трех изучаемых генов – *Xag2*. Ранее в нашей лаборатории были получены линии трансгенных лягушек, экспрессирующих различные флюоресцентные белки под контролем фрагмента промоторной области гена *Xag2* шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [103]. Головастики одной из этих линий, экспрессирующих EGFP, были использованы для анализа активности промотора *Xag2* при регенерации хвостов и почек задних конечности. Во всех экспериментах мы ампутировали кончик хвоста и часть зачатка конечности (на уровне предполагаемого колена) у головастиков *Xenopus laevis* на 51-52 стадии. Экспрессию белка EGFP детектировали при помощи флуоресцентного микроскопа.

Как можно видеть на Рис.34 (А-В'), активация трансгена *Xag2-EGFP* детектировалась уже через 12 часов после операции в дистальной части ампутированной почки задней конечности и в хвосте. 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. 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.

Чтобы проверить, является ли такая экспрессия трансгена *Xag2-EGFP* специфической именно для регенерирующих почек конечностей и хвостов или же она является ответом на рану и воспаление, мы провели операции по ампутации части дистальных частей задних конечностей и хвостов на головастиках 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. 34 (Г-Е'), в отличие от опытов на стадиях 51-52, ни в первый, ни во второй день после операции на стадии 57 экспрессия трансгена в ампутированной конечности не наблюдалось. В то же время, как и в предыдущей серии опытов, экспрессия EGFP отчетливо детектировалась в бластеме и прилегающих тканях хвоста уже на первый день после операции. Другими словами, динамика экспрессии трансгена *Xag2-EGFP* хорошо соответствовала известной из литературы динамике потери регенерационной способности у почек задних конечностей и, наоборот, тенденции сохранения такой способности у хвостов.

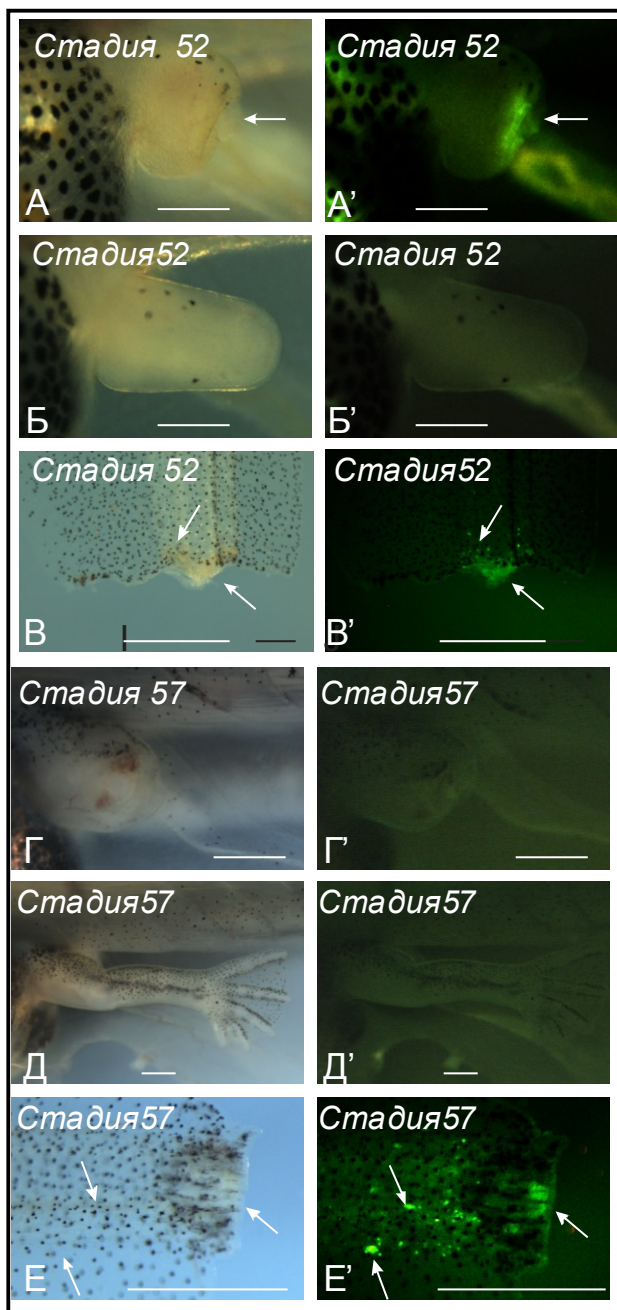


Рис.34. Активация флуоресценции EGFP в почке конечностей и хвостах трансгенных головастика, экспрессирующих EGFP под промотором гена *Xag2* через 12 часов после ампутации. Белыми стрелками показаны место ампутации и экспрессия флюоресцентного белка. (А-В') Интактная и ампутированная почки задних конечностей и хвост трансгенного головастика на 52 стадии развития (Г-Е') Интактная и ампутированная почки задних конечностей и хвост одного и того же трансгенного головастика на 57 стадии.

4.2.1.4. Заключение

Таким образом, тремя независимыми методами, мы показали что экспрессия трех представителей генов семьи *Aggr* - *Xag2*, *Xagr2a* и *Xag3a*, активируется в регенерирующих почках задних конечностей и хвостах головастика *Xenopus Laevis*. Методом ПЦР в реальном времени мы зафиксировали наличие и определили количество мРНК исследуемых генов, а методом гибридизации *in situ* и с помощью трансгенных животных подтвердили активность

этих генов и их участие в процессах регенерации. Для всех *Agr* генов характерно сильное возрастание количества мРНК спустя сутки после ампутации. Для конечностей на вторые сутки характерен небольшой спад активности гена, однако, в среднем уровень экспрессии остается достаточно высоким. С помощью гибридизации *in situ* и трансгенных животных было показано увеличение экспрессии гена *Xag2* в процессе регенерации в дистальных частях конечностей и хвостов, причем активность гена была зафиксирована уже через 12 часов после ампутации. Наиболее сильная экспрессия была на 1 и 2 день после ампутации. То, что такое увеличение 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.

Эти данные важны, и потому, что они подтверждают возможную регуляторную роль гена *Xag2* в регенерации. Влияние одного из генов *Agr*, гомолога *Xagr* – гена *nAG* - на регенерацию было показано ранее для тритона [104]. Однако вопрос об участии генов *Agr* в регенерации у других позвоночных оставался не решенным. Особенно в виду того обстоятельства, что мембранный рецептор *Agr* - белок *Prod1* - был обнаружен только у тритона и, по-видимому, отсутствует у других позвоночных. Интересно, что на тритоне было показано, что ген *nAG* также экспрессируется на низком уровне в развивающихся конечностях и уровень его экспрессии резко возрастает после ампутации. В нашем случае картина экспрессии генов *Xag* и *Xagr* очень похожа на ту, что была показана на тритоне с гомологом этих генов. В таком случае, можно говорить о том, что механизмы действия и функции этих генов могут быть похожи, и вероятно, гены *Xag* и *Xagr* также играют важную роль в регенерационных процессах. В тоже время, поскольку мембранный рецептор *Agr* - белок *Prod1* - был обнаружен только у тритона и отсутствует у других позвоночных, логично предположить, что у шпорцевой лягушки молекулярный механизм влияния белков *Xag* и *Xagr* на регенерацию может быть иным. Выяснение деталей этого механизма может оказаться принципиально важным для понимания процессов регенерации у других классов позвоночных.

Еще одним важным результатом нашей работы является отсутствие ортологов гена *Ag1* у высших позвоночных. Исчезновение *Ag1* в ходе эволюции могло быть одной из причин утраты способности к регенерации у высших позвоночных.

4.2.2. Участие генов *Agr* в регенерации плавников рыбы *Danio rerio*

4.2.2.1. Экспрессия гена *Ag1* в эмбриональном развитии зародышей *Danio rerio*

Недавний филогенетический анализ генов семейства *Agr* показал, что у *Danio rerio* представлено два подсемейства: *Ag1* (исчезает у высших позвоночных) и *Agr2*. На сегодняшний

день нет данных об активности гена *Ag1* в эмбриональном развитии или в процессе регенерации.

Прежде всего, мы изучили временной паттерн экспрессии *Ag1* методом количественного ОТ-ПЦР со специфическими праймерами на следующих стадиях развития: стадия 8-16 клеток, (1,5 ч после оплодотворения), бластула (3,7 часов после оплодотворения), гаструла - 40-50% эпиболии (5 часов после оплодотворения), стадия 6-12 сомитов (12-14 часов после оплодотворения, период сегментации), фарингулярная стадия (24 часа после оплодотворения) и стадия личинки (120 часов после оплодотворения). В результате мы выяснили, что *Ag1* активируется на стадии перехода от бластулы к гаструле, его экспрессия заметно увеличивается до достижения личиночной стадии (Рис.35).

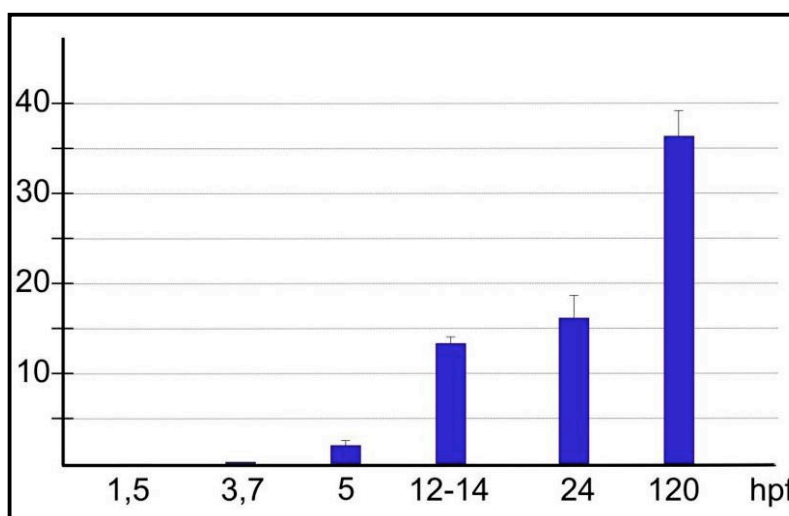


Рис.35. Динамика экспрессия гена *Ag1* в эмбриогенезе *Danio rerio*.

Чтобы определить пространственную локализацию мРНК *Ag1* в клетках целого зародыша, мы использовали ранее клонированный в нашей лаборатории ген *Ag1* и создали диоксигенин-меченный антисмысловой РНК зонд, необходимый для гибридизации *in situ*. 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 гаструлы (30-40% эпиболии) (Рис. 36; А). С развитием зародыша сигнал *in situ* усиливается (Рис. 36; Б, В, Г). Как видно на срезах развивающейся икры, ген *Ag1* экспрессируется поверхностно (Рис. 36; Б',В',Г') Чтобы определить экспрессируется ли *Ag1* во внутренних структурах, мы сделали парафиновые срезы толщиной 15 микрон. На срезах видно, что ген *Ag1* экспрессируется в обонятельном эпителии, глазах, эпителии выстилающем глотку, а также в зачатках плавников (Рис. 36; З, И, К). На стадии 48 часов после ампутации (чпо) была так же обнаружена экспрессия гена *Ag1* в эпидермальном слое (Рис. 36; Л). На стадии 120 чпо можно наблюдать выраженную экспрессию

гена в наружном эпителии, покрывающем тело (Рис. 36; М). Небольшая экспрессия видна в области ротового эпителия, кишечника и печени (Рис. 36; Н, Р). Кроме того, экспрессия была обнаружена в жаберном эпителии и в роговице глаза (Рис. 36; О, П). В органах пищеварительной системы *Ag1* экспрессируется в эпителиальных клетках, выстилающих рот, глотку, кишечный эпителий и проктодеум (Рис. 36; Р, С, Т). Таким образом, ген *Ag1* экспрессируется во многих тканях и органах, таких как: глотка, обонятельный эпителий, зачатки развивающихся плавников, плавники, кишечник, печень, проктодеум, ротовой эпителий, роговица глаза, покровный эпителий висцеральных дуг, а также эпидермис.

Интересно заметить, что ген *Ag1* начинает экспрессироваться на более ранних стадиях развития и более обширно, чем ген *Agr2* [105]. Также, при сравнении паттерна экспрессии гена *Ag1* при развитии *Danio rerio* и экспрессии ортологичного гена у *Xenopus laevis* [26], можно заключить, что ген *Ag1* экспрессируется гораздо сильнее и обширнее.

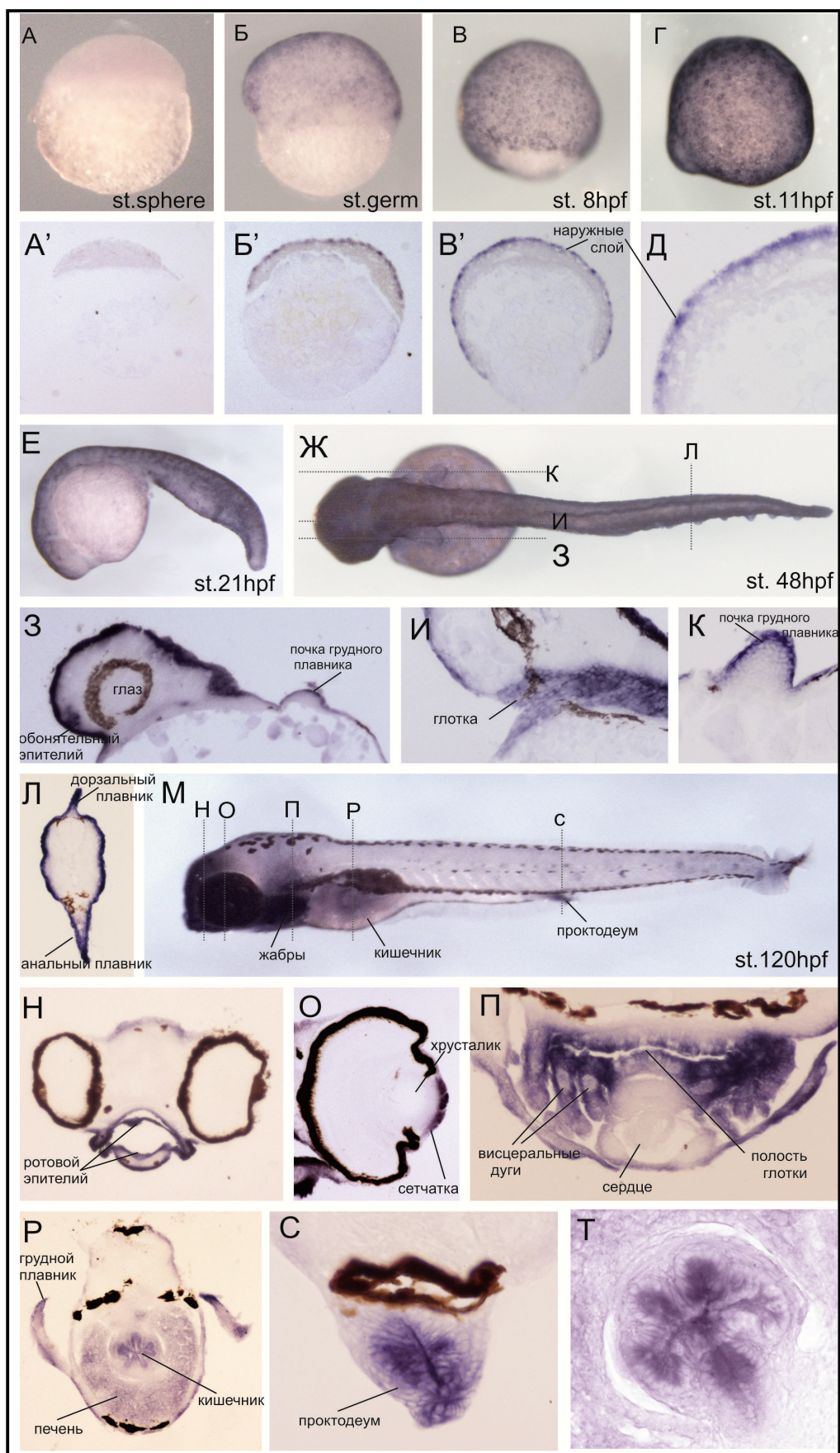


Рис.36. Паттерн экспрессии гена *Ag1* на ранних стадиях развития эмбриона рыбы *Danio rerio*, показанный методом гибридизации *in situ*. Темно-синяя окраска, проявляющаяся в результате гибридизации *in situ*, маркирует клетки зародыша, содержащие мРНК исследуемых генов. Пунктирными линиями показаны уровни срезов.

4.2.2.2. Изучение экспрессии генов семейств *Agr* методом количественного ОТ-ПЦР в регенерирующих плавниках *Danio rerio*

Мы применили ОТ-ПЦР для определения уровня экспрессии генов *Agr* при регенерации хвостового плавника *Danio rerio*. Для сравнения и нормализации уровней экспрессии генов-мишеней в различных экспериментах мы использовали расчет среднего геометрического уровня экспрессии генов домашнего хозяйства: орнитиндекарбоксилазы (ODC) и фактора элонгации альфа (EF-Alpha). В качестве положительного контроля нами были использованы гены *Fgf20a* и *IGF2b*. Ранее другими исследователями было установлено, что данные гены активируются в первые 1-2 день после ампутации плавника [86][106][86]. На графиках, изображённых на Рис. 37, наблюдается резкое усиление экспрессии генов *Fgf20a* и *IGF2b* после ампутации хвостового плавника *Danio rerio*. Полученные нами результаты подтверждают активацию данных генов при регенерации (Рис.37; В).

Общей чертой динамики генов *Ag1* 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 (Рис. 37; Б). 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.

Если предположить, что концентрации транскриптов нормировочных генов (EF-alpha и ODC) примерно одинаковы в образцах регенерирующих органов рыб и головастика и зная эффективности сравниваемых генов, то можно сравнить 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 *Ag1* в 15-20 раз выше концентрации *Xag2*. 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.

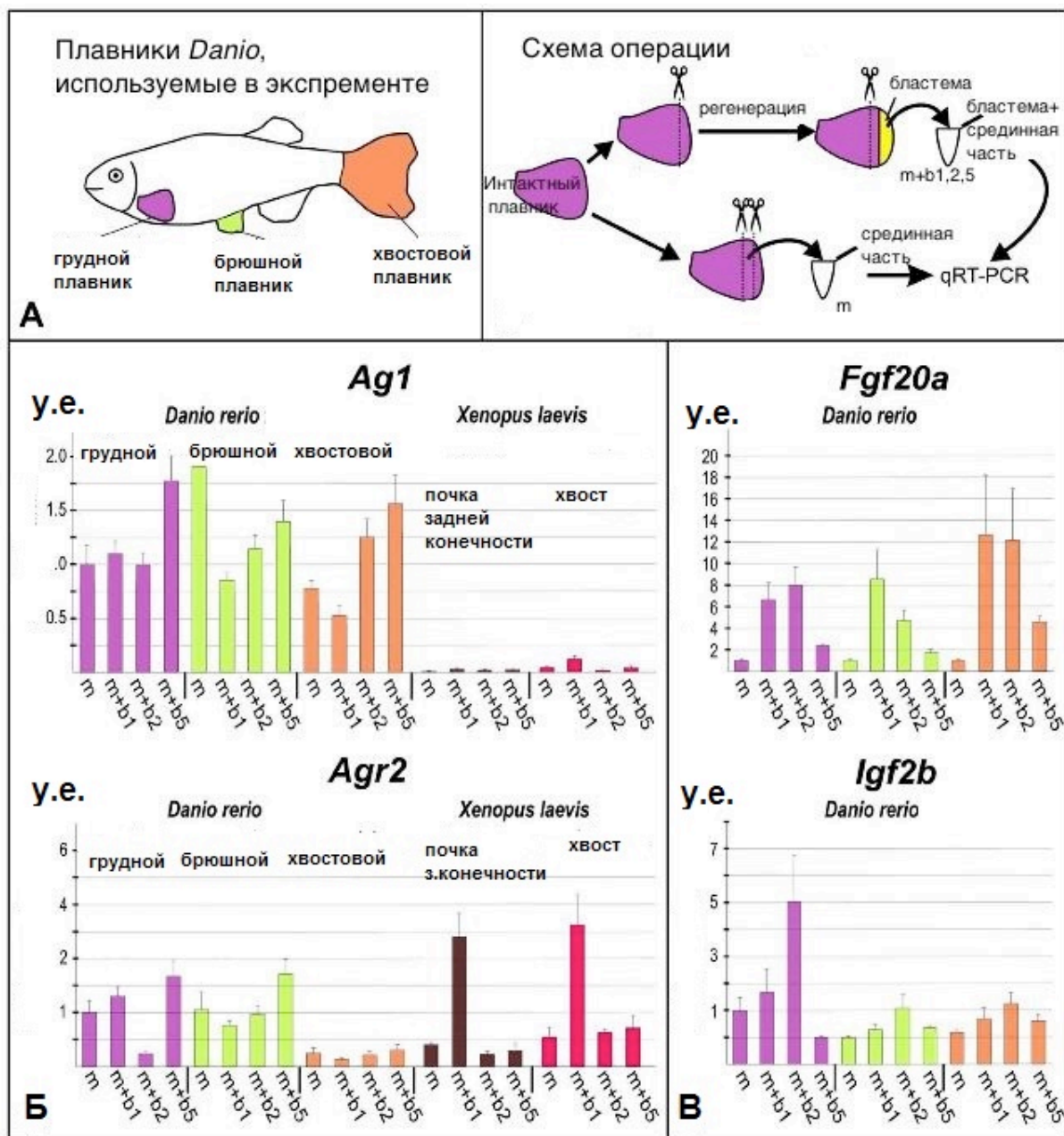


Рис. 37. Динамика экспрессии генов *Ag1*, *Fgf20a*, *Igf2b* в регенерирующих плавниках *Danio rerio*. (А). Схемы экспериментов. Образцы тканей различных плавников фиксировались на 0 (контроль), 1, 2 и 5 день после ампутации. (Б, В). Анализ экспрессии генов *Ag1*, *Fgf20a*, *Igf2b* методом количественного ОТ-ПЦР в регенерирующих плавниках рыб *Danio* и придатках тела головастиков *Xenopus* (*Ag1* гены). Планки погрешности отражают стандартную ошибку среднего.

4.2.2.3. Пространственно-временной паттерн экспрессии гена *Ag1* в клетках регенерирующего хвостового плавника *Danio rerio*

Предыдущие результаты показали, что динамика экспрессии генов *Ag1* 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 - *Ag1*, 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.38). Для более детального анализа гибридизационного сигнала часть хвостовых плавников после гибридизации *in situ* были заключены в парафин и использованы для получения срезов 15 мкм толщиной (Рис.38, вставки фотографий в верхних правых углах).

На Рис. 38 (А) видно, что 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 (Рис. 38; Б, В). Стоит отметить, что в контрольной (интактной) половине хвостового плавника экспрессия *Ag1* так же была детектирована, что может говорить о том, что ген *Ag1* участвует как в нормальном росте плавника, так и при регенерации.

Известно, что эпидермальная шапочка, формирующаяся из раневого эпителия представляет собой слой эпидермальных клеток, активно секретирующих ряд белков (сигнальных факторов, металло-протеиназ внеклеточного матрикса и др.), необходимых для запуска процесса формирования бластемы и её дальнейшей пролиферации и дифференцировки [48]. Такая локализация экспрессии гена *Ag1*, кодирующего секретируемую дисульфид-изомеразу белков, как раз в этой области уже на первый день после ампутации, указывает на возможную важную роль *Ag1* в регуляции регенерации на самых ранних этапах формирования бластемы. В целом, можно говорить о том, что паттерн экспрессии *Ag1* в регенерирующих плавниках рыбы *Danio* схож с паттерном экспрессии генов *Ag1/2* в регенерирующих придатках тела *Xenopus*.

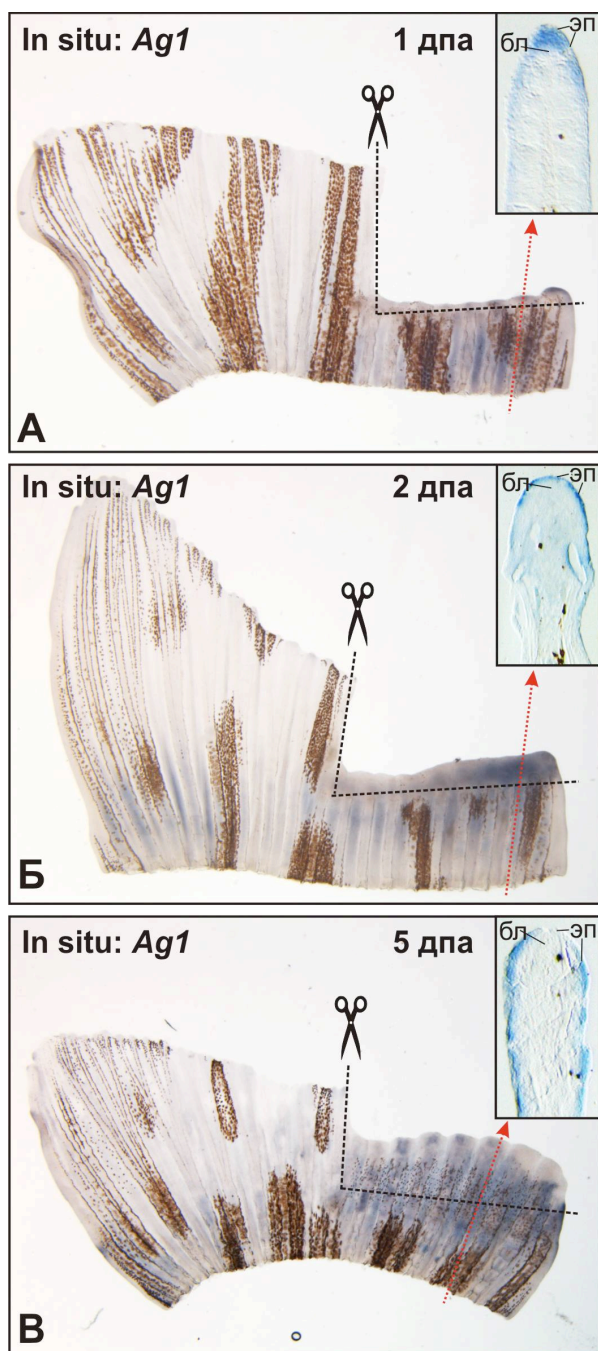


Рис. 38. Паттерн экспрессии гена *Ag1* в процессе регенерации хвостового плавника *Danio rerio*, выявленный при помощи гибридизации *in situ*. Клетки, экспрессирующие *Ag1*, окрашены тёмно-синим (гибридизационный сигнал). Черными пунктирными линиями показаны места ампутации. Красные стрелки указывают место сагитального среза хвостового плавника на 1,2 и 5 дпа (дпа – дни после ампутации), бл – бластема, эп – эпидермис.

4.2.2.4. Подавленная трансляция мРНК *Ag1* ингибирует процесс регенерации в хвостовом плавнике *Danio rerio*

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. 39; А-В)

Чтобы проверить 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. 39; 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. 39; Д).

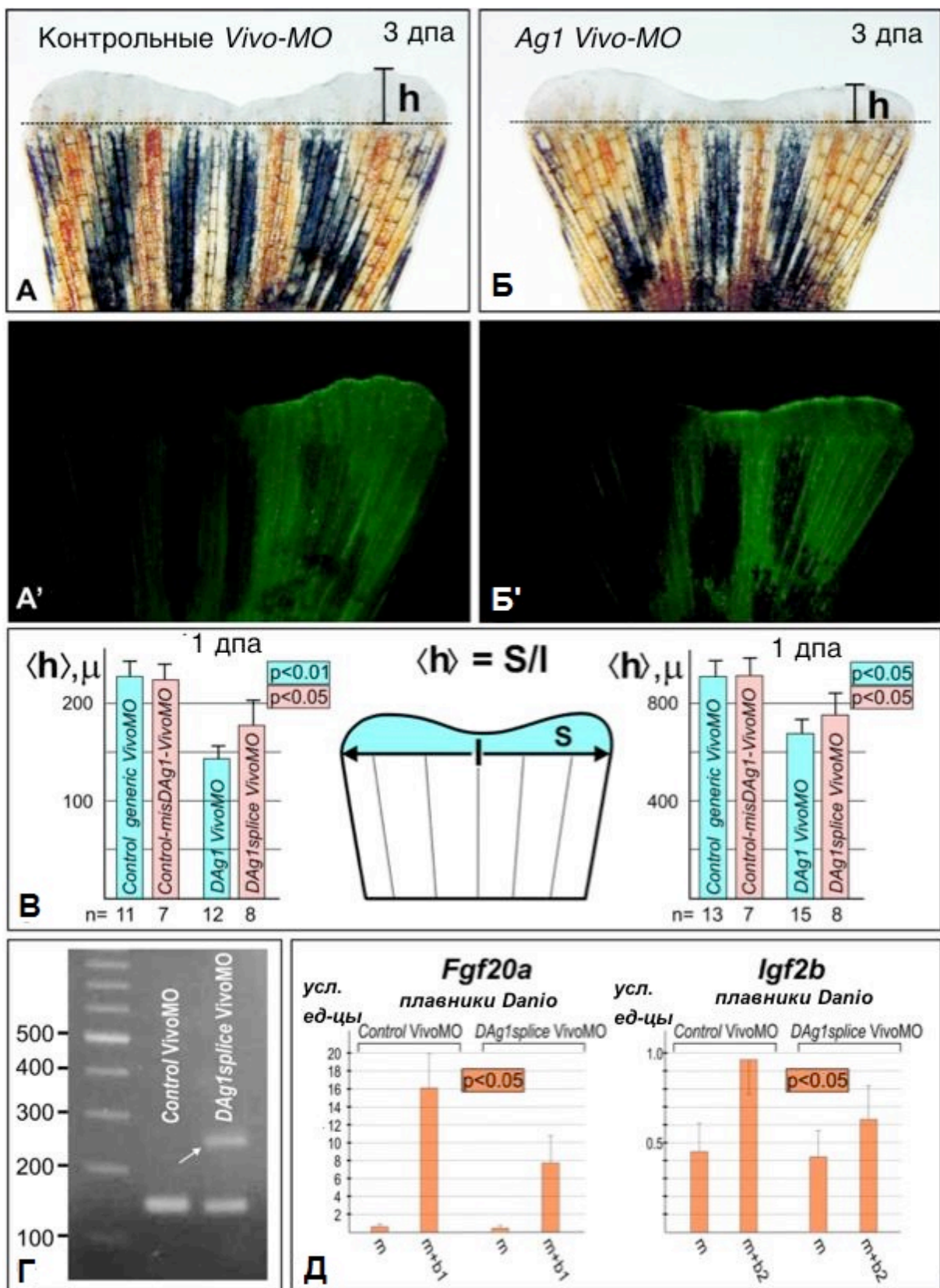


Рис.39. Подавление трансляции мРНК *Ag1* приводит к ингибированию регенерации хвостового плавника *Danio rerio*. (А, А'). На представленном хвостовом плавнике, правая часть которого инъецирована смесью контрольных *Vivo-MO* с флуоресцентным трейсером FLD, а левая оставалась интактной, показано отсутствие подавления регенерации в заколотой области. Пунктирная линия указывает на уровень ампутации. (Б, Б'). На хвостовом плавнике, правая часть которого инъецирована смесью *Ag1 Vivo-MO* с флуоресцентным трейсером FLD, а левая оставалась интактной, было показано значительное подавление регенерации в заколотой области. (В). Расчет средней высоты регенерирующих бластемных частей хвостовых плавников, инъецированных контрольными *Vivo-MO* или *Ag1 Vivo-MO* на 1 (слева) и 3 (справа) дни после ампутации. Схема посередине показывает, каким образом средняя высота была рассчитана. (Г). Анализ транскриптов *Ag1* методом ОТ-ПЦР в регенерирующих плавниках, инъецированных контрольными *Vivo-MO* или *Ag1splice Vivo-MO*, на 1 день после ампутации. Белая стрелка указывает на дополнительную полосу соответствующую несплайсированному транскрипту *Ag1* (Д). Динамика экспрессии *Fgf20a* и *Igf2b* в инъецированных регенерирующих плавниках на 1 и 2 дни после ампутации соответственно (дни, когда количество мРНК *Fgf20a* и *Igf2b* становится максимальным), показанная методом количественного ОТ-ПЦР.

И, наконец, чтобы проверить, не является ли такое подавление регенерации результатом активации неспецифического апоптоза, мы проанализировали количество апоптотических клеток в плавниках, инъецированных *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. 40). Таким образом, мы пришли к выводу, что наблюдаемый нами эффект подавления регенерации плавников не является результатом программируемой клеточной гибели.

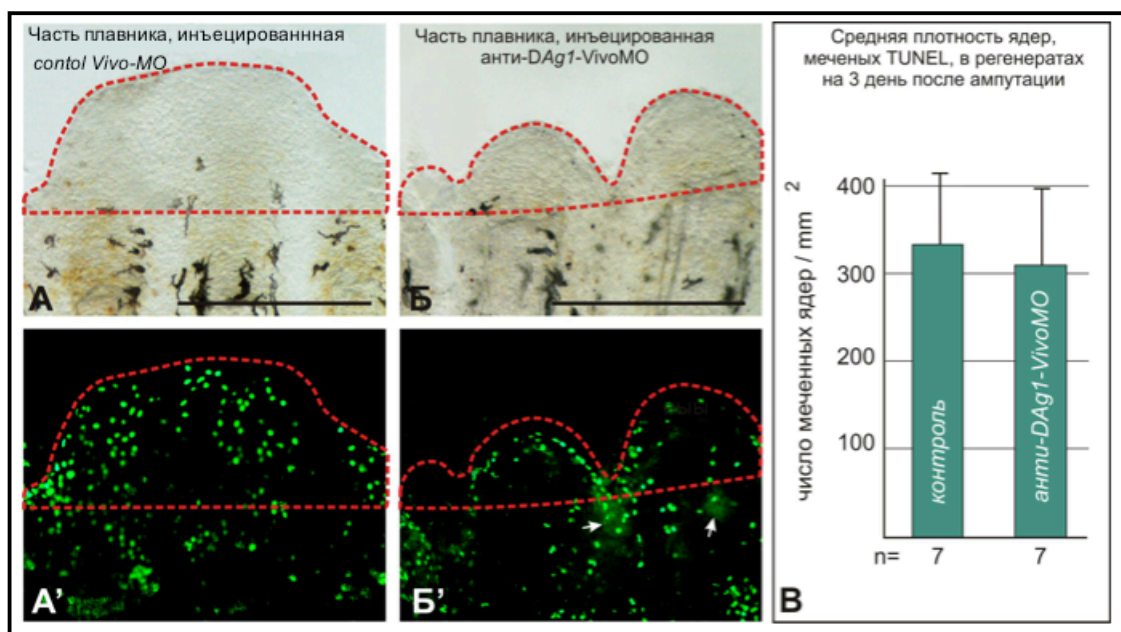


Рис.40. TUNEL тест регенерирующих плавников, инъектированных *control/Agl Vivo* – *MO*. (А-Б') Проявление апоптотических ядер клеток с помощью TUNEL анализа: апоптирующие ядра определяются по флуоресценции, регенерирующие области плавников обрамлены красной пунктирной линией. (В). Количественный анализ TUNEL-меченых ядер в регенерирующих частях хвостовых плавников.

4.2.2.5. Заключение

Мы продемонстрировали участие генов *Agr* не только в процессах раннего эмбриогенеза *Danio rerio*, но и в процессе регенерации плавников. В ходе раннего развития локализация транскриптов *Agl* в эпителии схожа с локализацией его ортолога у зародышей *Xenopus laevis*, однако, в отличие от *Xenopus*, у эмбрионов *Danio* отсутствует передне-задний градиент концентрации мРНК *Agl*.

Также мы показали участие генов *Agr* в регенерации плавников *Danio*. В отличие от *Xenopus*, гены *Agr* в интактных органах экспрессируются на высоком уровне, при ампутации уровень экспрессии падает, а затем возрастает до исходного уровня и даже выше. Таким образом, можно говорить о том, что транскрипты *Agl* быстро расходуются в ходе регенерации, а затем их концентрация постепенно восстанавливается до исходного уровня. Такая высокая концентрация, по-видимому, необходима для быстрого включения программы регенерации после повреждения или ампутации органа. Кроме того, мы показали необходимость наличия *Agl* для нормального процесса восстановления: при подавлении трансляции мРНК *Agl* происходит значительное ингибирование регенерации.

4.2.3 Участие генов *Ras-dva* в регенерации придатков тела головастика *Xenopus* и плавников *Danio*.

4.2.3.1 Изучение динамики экспрессии генов *Ras-dva* в процессе регенерации почки задней конечности и хвоста головастика *Xenopus* и плавников *Danio* методом количественного ОТ-ПЦР

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. Схема эксперимента была уже описана ранее (см. пункты 2.1.1). Мы использовали динамику экспрессии маркерных генов *Fgf20a* и *Igf2b* для оценки эффективности процесса регенерации в плавниках *Danio*, и динамику генов *Msx1b* и *Fgf20* – для почки конечности и хвоста головастика *Xenopus*. Эффективность оценивали для 1 и 2 дня после ампутации. Чтобы иметь возможность сравнивать результаты ПЦР, полученные для независимых образцов тканей, мы проводили нормировку образцов относительно внутреннего контроля: кДНК одного из генов домашнего хозяйства (housekeeping gene) – орнитиндекарбоксилазы (*ODC*). В качестве отрицательного контроля использовали аликвоты тех же самых образцов тотальной РНК, которые были использованы нами для получения кДНК, но без добавления обратной транскриптазы. Данный контроль был особенно критичен в случае генов *Ras-dva*. Эти гены не имеют интронов, в связи с чем, было важно понять, является ли сигнал ОТ-ПЦР для таких генов результатом реального присутствия в образцах их мРНК, или же он генерируется в ходе ПЦР следовых количеств геномной ДНК, всегда остающейся в любых образцах тотальной РНК.

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.41 В, Г). 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. 41, Е). 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. 41, Д). 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.

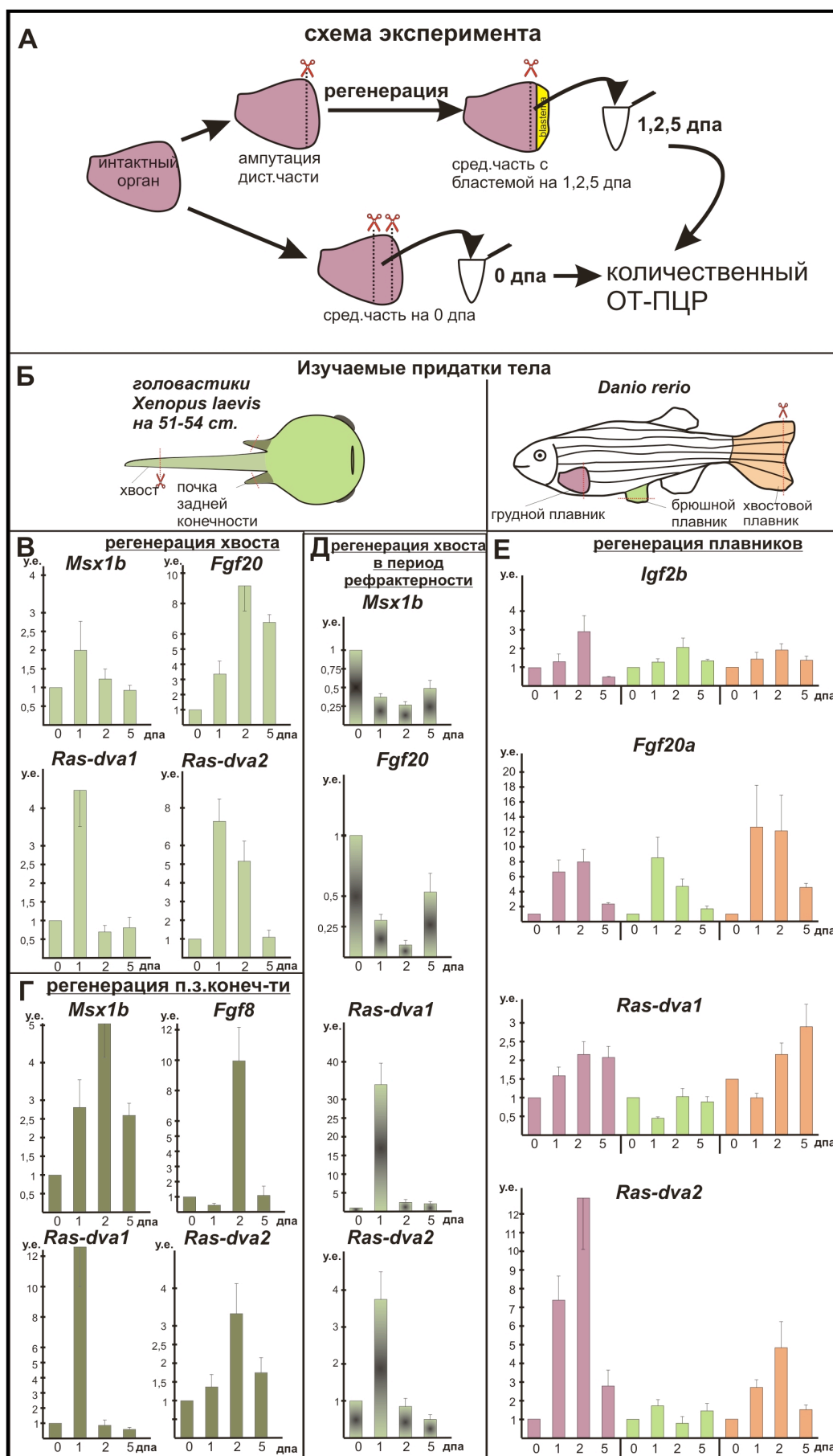


Рис.41. Анализ динамики экспрессии генов *Ras-dva1*, *Ras-dva2* и генов-маркеров методом количественного ОТ-ПЦР в процессе регенерации хвоста и зачатка задней конечности головастика *Xenopus laevis* и плавников *Danio rerio*. (А и Б) Схемы экспериментов. (В, Г) Динамика экспрессии генов *Ras-dva1*, *Ras-dva2* и маркерных генов (*Msx1b*, *Fgf20* или *Fgf8*) в процессе регенерации хвоста (В) или зачатка задней конечности (Г) головастика *Xenopus* спустя 0, 1, 2 и 5 дней после ампутации (дпа). (Д) Динамика экспрессии генов *Ras-dva1*, *Ras-dva2* и *Msx1b*, *Fgf20* в регенерирующих хвостах головастика в период рефрактерности. (Е) Динамика экспрессии генов *Ras-dva1*, *Ras-dva2* и маркерных генов *Fgf20a*, *Igf2b* в процессе регенерации плавников *Danio* спустя 0, 1, 2 и 5 дней после ампутации (цвет столбцов указывает на экспрессию соответствующих генов в плавнике на схеме Б). Значение нормированного сигнала в образце на 0 дпа (фиксировали сразу после ампутации дистальной части, схема А), было использовано в качестве условной единицы для каждого из экспериментов.

4.2.3.2. Пространственно временной паттерн экспрессии генов *Ras-dva* в процессе регенерации амфибий и рыб

Метод гибридизации *in situ* мы использовали для того, чтобы подтвердить данные количественного ОТ-ПЦР, а также получить информацию о локализации клеток с повышенной экспрессией генов *Ras-dva* в регенерирующих органах. Для данного эксперимента использовали регенерирующие плавники *Danio rerio* на 1, 2 и 5 дни после ампутации и регенерирующие хвосты и конечности головастика *Xenopus laevis* на 2 день после ампутации. Мы наблюдали сильную активацию генов *Ras-dva* в плавниках *Danio* спустя сутки после ампутации (Рис. 42; Ж, З), в то время как на 5 сутки гибридационной сигнал практически не фиксировался (Рис. 42; Л, М), что вполне согласуется с данными количественного ОТ-ПЦР. 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.42; А, Б, Г, Д). Поскольку клетки ното хорда головастика могут иметь некоторую эндогенную активность щелочной фосфатазы и давать ложноположительный гибридационной сигнал, мы проверили экспрессию *Ras-dva1* методом количественного ОТ-ПЦР в изолированной хорде и окружающих тканях. В результате, мы подтвердили, что действительно экспрессия *Ras-dva1* в хорде в 4 раза выше, чем в окружающих тканях.

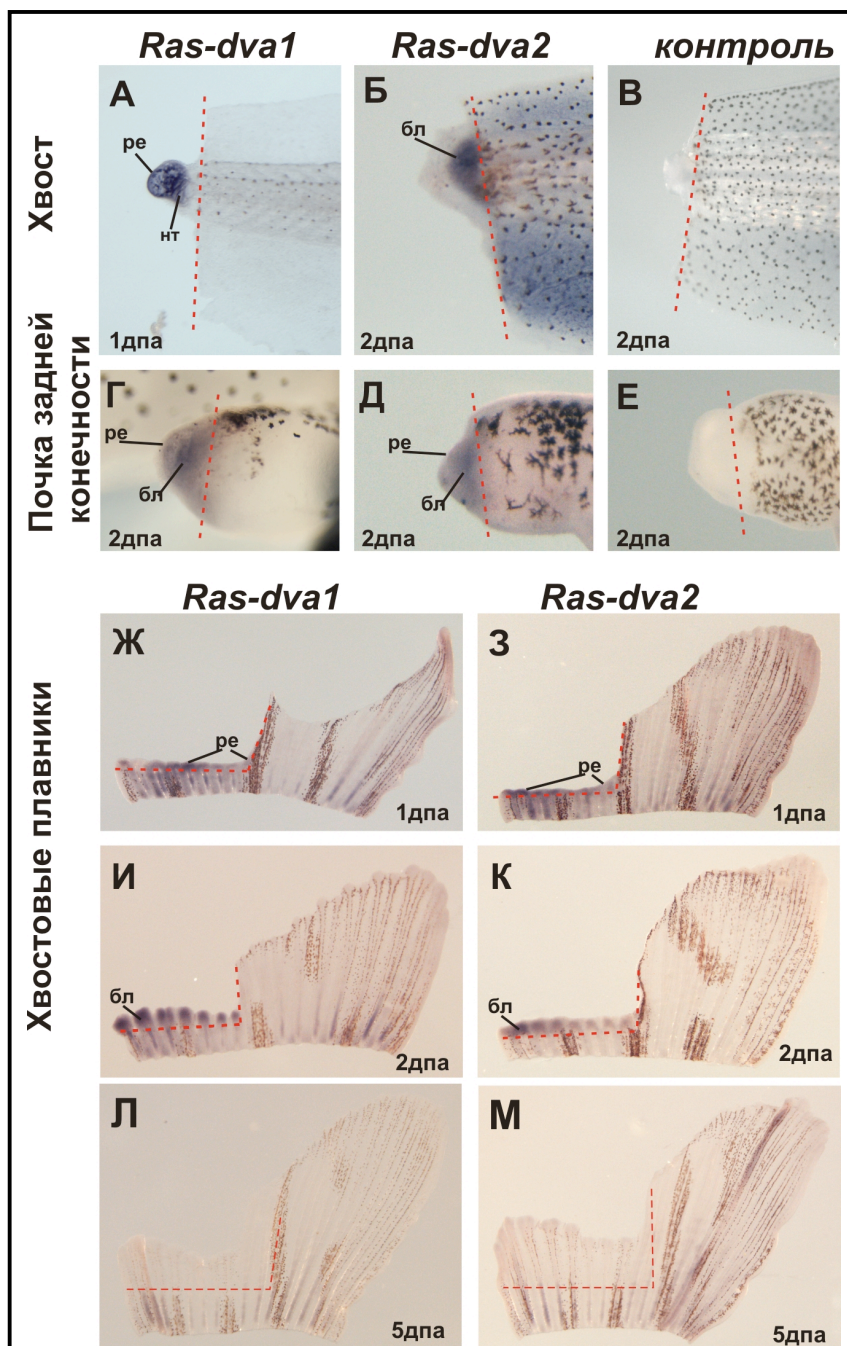


Рис. 42. Паттерн экспрессии генов *Ras-dva* регенерирующих хвостов и зачатков задних конечностей головастика *Xenopus* и плавников *Danio*, выявленный при помощи гибридизации *in situ*. (А-Е) Регенерирующие хвосты и зачатки задних конечностей головастика *Xenopus* на 2 сутки после ампутации, гибридизованные 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, дистальная сторона находится слева, дорсальной сторона обращена вверх. (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. Темно-синяя окраска, проявляющаяся в результате гибридизации *in situ*, маркирует клетки зародыша, содержащие мРНК исследуемых генов. Пунктирная красная линия указывает на уровень ампутации, ре - раневой эпителий, бл - бластема.

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*. Данный выбор был обусловлен, с одной стороны, необходимостью проанализировать экспрессию именно этого гена, так как малая ГТФаза *Ras-dva1* является непосредственным участником сигнальной петли *Fgf8*, а с другой, - значительной трудоемкостью процедуры получения трансгенных эмбрионов. Общий паттерн экспрессии трансгена *proRas-dva1-EGFP* у головастика на 46 стадии развития совпадает с паттерном, полученным ранее в нашей лаборатории на головастиках дикого типа методом *in situ* гибридизации [30] (Рис.43; 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. 43; Б-Г', Е-З'). На сагиттальных срезах можно увидеть, что трансген активируется в клетках эпителия и бластемы, что согласуется с данными гибридизации *in situ* (Рис. 42; Д, Д', З, З'). Важно отметить, что у трансгенных головастика также детектировали флуоресценцию EGFP в нотохорде.

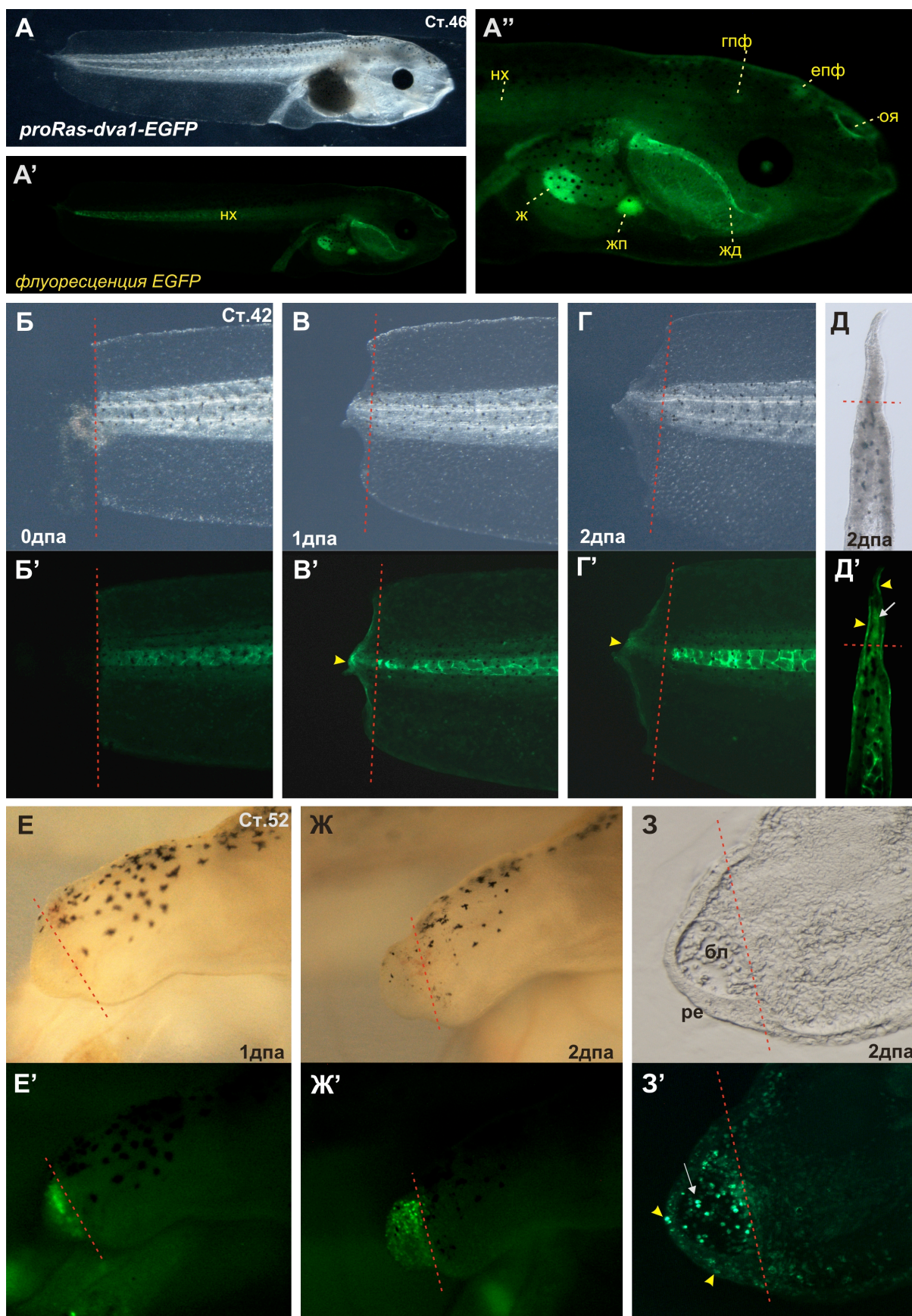


Рис. 43. Активация флуоресценции EGFP в трансгенных головастиках, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок под контролем промотора гена *Ras-dva1*. (А, А', А'') Фенотип трансгенного головастика на 46 стадии развития спустя 3 дня после ампутации хвоста, демонстрирующий сильную активацию трансгена в нотохорде, кишечнике и в головном отделе. (А'') Увеличенное изображение головного отдела, на котором отчетливо видна активация флуоресценции EGFP в жаберных дугах (жд), эпифизе (епф), гипофизе (гпф), обонятельных ямках (оя), нотохорде (нх), желудке (ж) и желчном пузыре (жп). (В-Е ') Активация трансгена *proRas-dva1-EGFP* в регенерирующих хвостах головастиков 42 стадии сразу после ампутации - 0 дпа (Б, Б'), спустя сутки после ампутации - 1 дпа (В, В'), и двое суток после ампутации - 2 дпа (Г, Г'). (Д, Д') Сагиттальный криосрез хвоста, обычной и флуоресцентное изображение. Желтыми стрелками показана активация трансгена в эпителии, белой стрелкой - в бластеме. (Е-З') Активация трансгена *proRas-dva1-EGFP* в регенерирующей почки задней конечности трансгенного головастика 52 стадии спустя сутки после ампутации (Е, Е'), 2 дня после ампутации (Ж, Ж'). (З-З') Сагиттальный криосрез почки конечности. Желтыми стрелками показана активация трансгена в эпителии, белыми - в бластеме. Красная пунктирная линия показывает уровень ампутации.

Таким образом, все полученные данные говорят о том, что гены *Ras-dva* активируются в течение первых двух суток после ампутации в регенерирующих придатках тела головастиков *Xenopus* и рыб *Danio* в клетках эпителия и бластеме, что в свою очередь указывает на причастность этих генов в регуляции ранних стадий регенерации.

4.2.3.3. Подавление трансляции генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* ведет к ингибированию процесса регенерации

Для того, чтобы определить, является ли наличие *Ras-dva1* и *Ras-dva2* необходимым условием для нормальной регенерации мы провели серию экспериментов по подавлению трансляции генов *Ras-dva1/2* в регенерирующих хвостовых плавниках *Danio rerio* и хвостах головастиков *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. Когда эмбрионы доросли до 40-41 стадии, мы ампутировали им хвосты и наблюдали за ходом регенерации. Эффективность регенерации оценивали в трех группах инъектированных головастиков 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 (статистический анализ проводили на 180-200 головастиках каждого типа в трех независимых экспериментах) (Рис. 44 ; А-Б', Е). Значительно больший процент атипично регенерирующих хвостов был зафиксирован у головастиков, инъектированных *Ras-dva1 MO* (58%) и *Ras-dva2 MO* (43%) (Рис. 44; В-Г', Е). Самый высокий процент аномально регенерирующих хвостов (72%) был зафиксирован у головастиков, 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. 44; В), (2) значительное замедление регенерации (Рис. 44; Г), (3) отсутствие регенерации (Рис. 44; 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 и восстанавливать нормальную структуру регенерирующего органа. Действительно, в результате серии экспериментов в группе, коинъектированной целевыми морфолино и мРНК генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2*, мы зафиксировали снижение числа головастиков с аномально регенерирующими хвостами в 2 раза (27% и 22% соответственно) (Рис. 44; Е). Эти данные подтверждают, что нормальная экспрессия *Ras-dva1* и *Ras-dva2* необходима для полноценной регенерации хвоста головастиков *Xenopus*.

Далее мы сравнили динамику и уровень экспрессии генов-маркеров регенерации, а также *Agr* генов в процессе регенерации в различных группах головастиков. Методом количественного ОТ-ПЦР мы выяснили, что уровень экспрессии генов *Ag1* и *Agr2*, также как и *Fgf20* и *Fgf8* ощутимо снижается при подавлении функции генов *Ras-dva*. В контроле такого подавления отмечено не было (Рис. 44; 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.

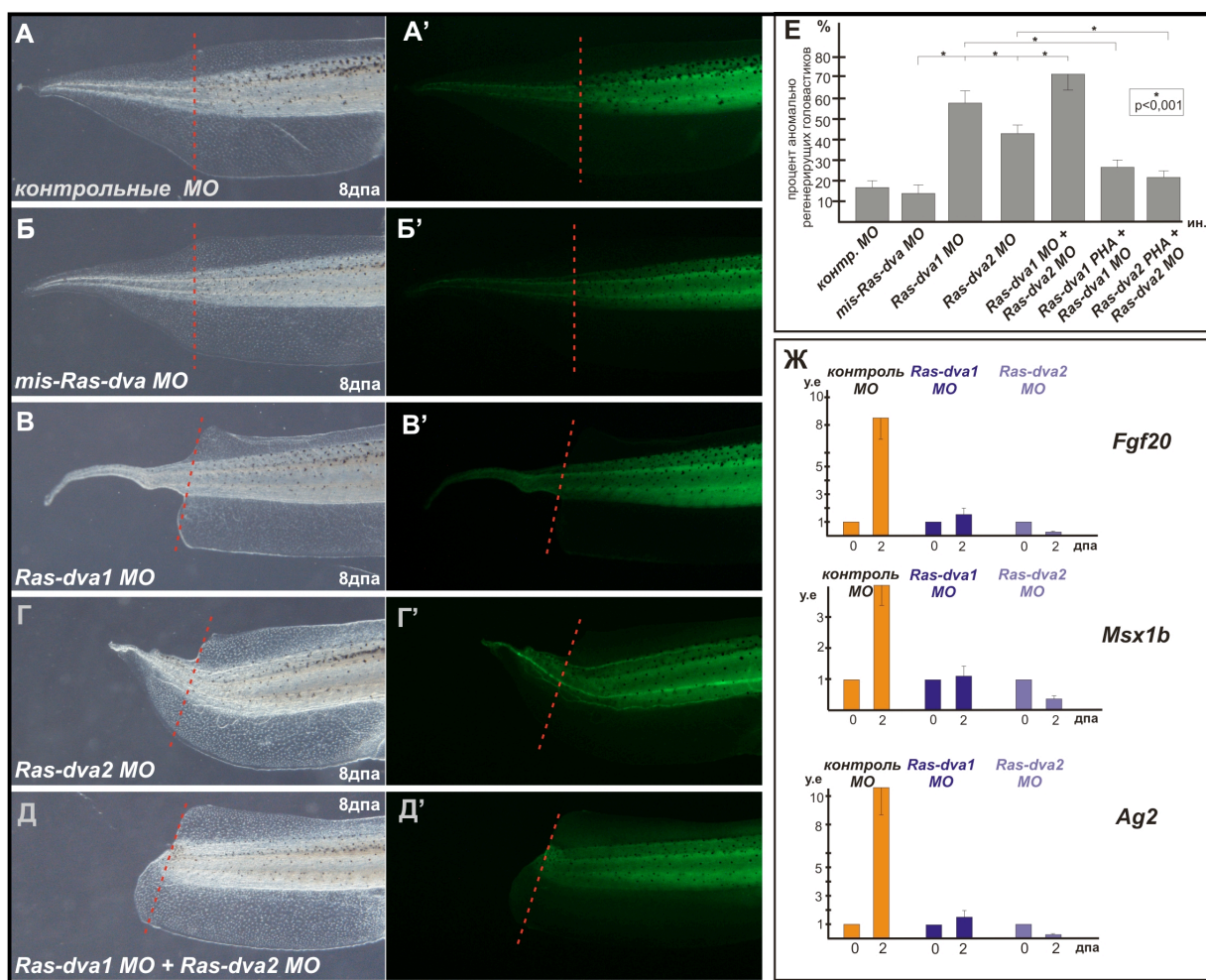


Рис. 44. Эффект подавления регенерации хвостов головастика путем ингибирования трансляции мРНК генов *Ras-dva1* (В, В') и *Ras-dva2* (Г, Г') или обоих генов (Д, Д'). В качестве контроля инъецировали контрольные (А, А') и *mis-Ras-dva* (Б, Б') морфолино. Для инъекций использовали смесь флуоресцентного трейсера FLD с целевыми морфолино, по флуоресценции FLD определяли инъецированные области (А'-Г'). Красная пунктирная линия указывает на уровень ампутации. (Е) Количественная оценка anomalously regenerating heads, инъецированных различными типами морфолино, на 8 день после ампутации. Статистическую достоверность полученных данных определяли с помощью t-теста - результаты статистически значимы, $p < 0,001$ (звездочка). (Ж) Методом количественного ОТ-ПЦР показано изменение динамики экспрессии маркерных генов регенерации *Fgf20*, *Msx1b* и гена *Ag2* в процессе регенерации хвостов, инъецированных контрольными, *Ras-dva1*, *Ras-dva2* морфолино.

Мы изучили также эффект подавления трансляции генов *Ras-dva* в регенерирующих плавниках *Danio rerio*. Были использованы особые морфолиновые олигонуклеотиды *Vivo-MO* с остатком окта-гуанидин дендримера, благодаря которому морфолино способны проникать в клетки. Инъекции проводили в дистальную область костных лучей ампутированных плавников.

В результате было показано, что в области плавника, инъецированного *Ras-dva1 Vivo-MO* или *Ras-dva2 Vivo-MO*, регенерация существенно подавлена по сравнению с неинъецированной контрольной частью (Рис. 45; Б, Г). В тоже время на плавниках, инъецированных контрольными *control Vivo-MO* или измененными *mis-Ras-dva Vivo-MO*

морфолино такого эффекта зафиксировано не было (Рис. 45; А, В). Инъекции морфолино проводили ежедневно, начиная со дня ампутации, что приводило к статистически значимому ингибированию регенерации уже на 3 день (Рис. 45; 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, инъецированных *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. 45; 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* или *Ras-dva2 Vivo-MO* и *control Vivo-MO*. В итоге было показано существенно 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. 45; О).

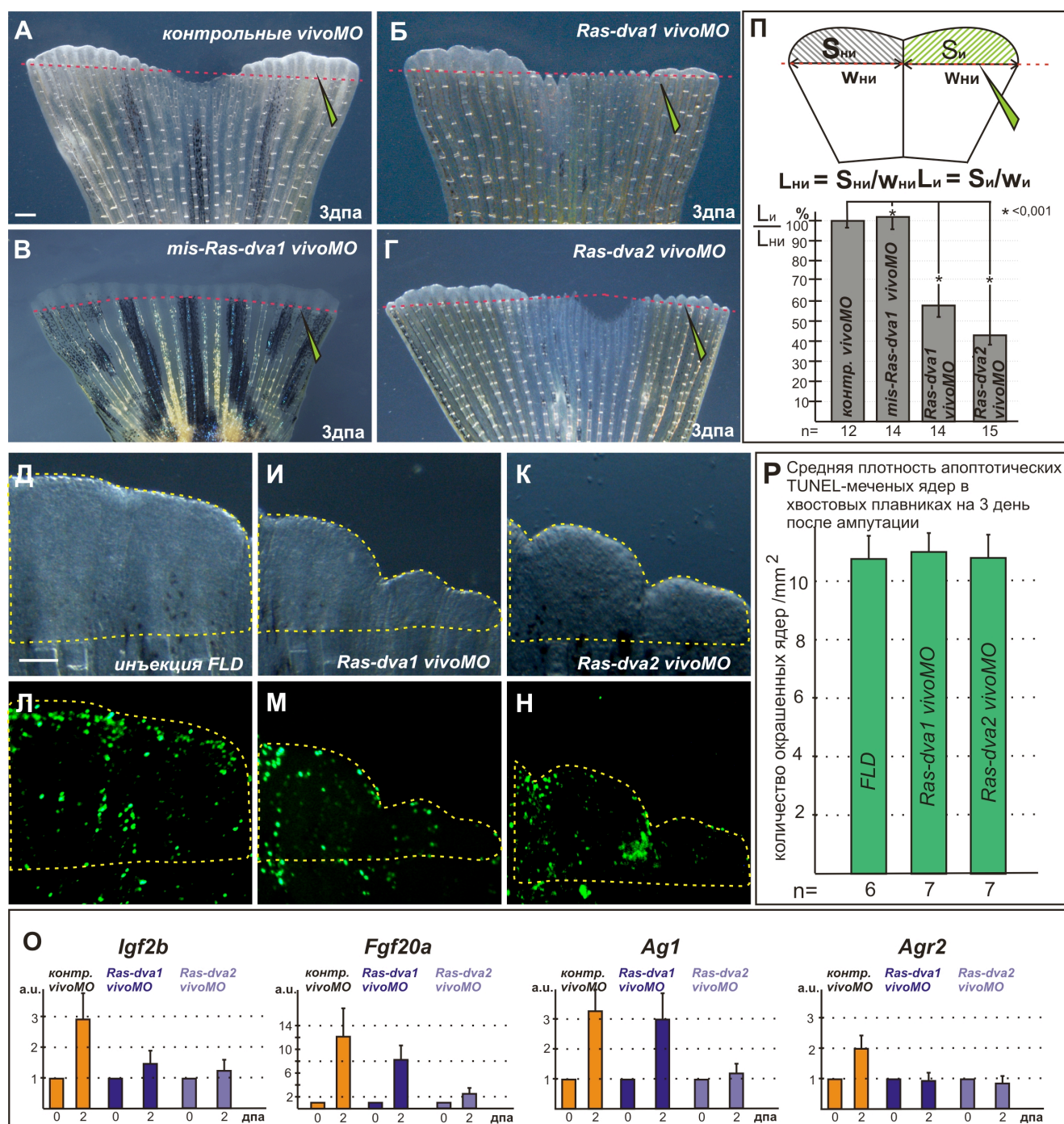


Рис. 45. Подавленная трансляция мРНК генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* ведет к ингибированию регенерации плавников рыбы *Danio rerio*. (А-Р) Регенерирующие плавники *Danio*, инъецированные контрольными *Vivo*-морфолино (А), *mis-Ras-dva1 Vivo*-морфолино (В), *Ras-dva1* (Б) и *Ras-dva2* (Г) *Vivo*-морфолино через 3 дня после ампутации, инъекции производили в правую половину плавника, левая оставалась интактной. Красная пунктирная линия показывает уровень ампутации. (П) Количественная оценка эффективности регенерации, методом вычисления средней длины регенерирующих инъецированных и неинъецированных областей на 3 день после ампутации и их сравнения. Схема демонстрирует метод расчетов, S - площадь, W - ширина плавника, L - средняя длина, ни - неинъецированная область, и - инъецированная область. Статистическую достоверность определяли с помощью t-теста - результаты статистически значимы, $p < 0,001$ (звездочка). (Д-Н) Оценка количества апоптозирующих клеток в регенерирующих плавниках, инъецированных только флуоресцентным трейсером FLD (Д,Л),

смесью FLD с *Ras-dva1 Vivo-Mo* (И,М) и *Ras-dva2 Vivo-MO* (К,Н), с помощью TUNEL теста. На изображениях Л,М,Н ярко флуоресцирующие точки - апоптотические ядра. Желтые пунктирные линии разграничивают регенерирующие области, в которых были рассчитаны значения средней плотности апоптотических TUNEL-меченых ядер на единицу площади (Р). (О) Методом количественного ОТ-ПЦР были показаны изменения динамики экспрессии маркерных генов регенерации *Igf2b* и *Fgf20a*, а также генов *Agr*, в процессе регенерации хвостовых плавников *Danio*, инъецированных контрольными и *Ras-dva1* и *Ras-dva2 Vivo-MO*.

Таким образом, можно говорить о том, что нормальная экспрессия генов *Ras-dva* необходима для полноценной регенерации придатков тела головастика *Xenopus* и рыб *Danio*.

4.2.3.4. Оверэкспрессия *Ras-dva* генов может восстанавливать способность к регенерации в рефрактерный период.

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 головастика 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, инъецированном смесью воды с флуоресцентным трейсером, процент нормально регенерирующих головастика составил только 12%, а с полностью подавленной регенерацией – 54% (Рис. 46). В группе головастика, инъецированных мРНК *Ras-dva1* или *Ras-dva2* мРНК, процент головастика с отсутствующей регенерацией был меньше в 2-3.6 раза (22.5-15%) соответственно. Процент аномально регенерирующих (частично регенерирующих) головастика был примерно одинаков. Интересно, что при инъекции мРНК *Ras-dva1* процент нормально регенерирующих головастика был 40,5-62%, что значительно превышает процент таких головастика в контроле (Рис. 46). Таким образом, путем введения мРНК *Ras-dva* мы смогли восстановить способность к регенерации у головастика *Xenopus* в период рефрактерности, что является дополнительным доказательством важности и необходимости этих генов в активации регенерационного процесса.

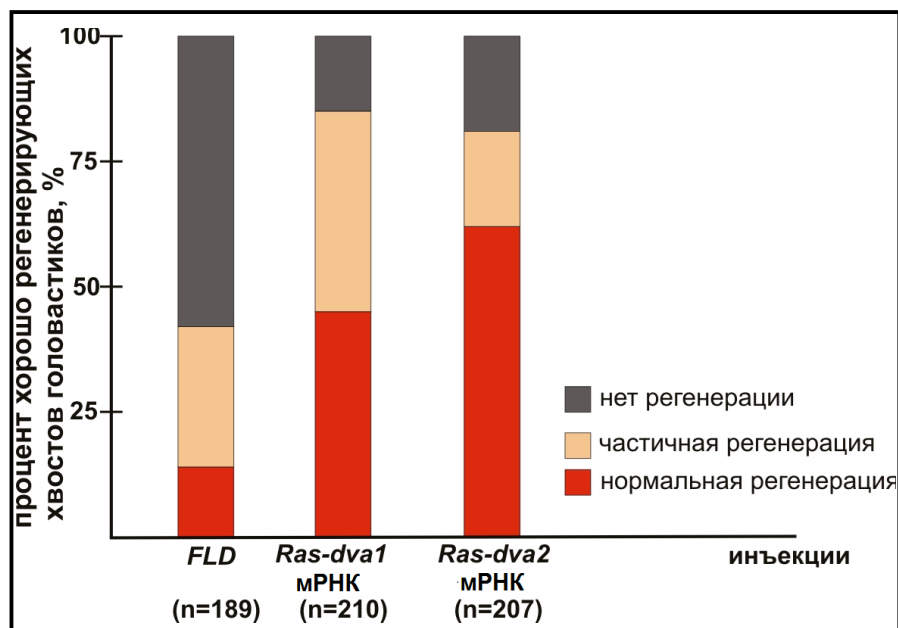


Рис. 46. Восстановление способности к регенерации в период рефрактерности у головастика *Xenopus laevis*. Расчет среднего значения количества регенерирующих и нерегенерирующих головастика, инъецированных только FLD и смесью FLD с мРНК *Ras-dva1* и *Ras-dva2*. Серый цвет – регенерация отсутствует, розовый - частичная регенерация, красный - нормальная регенерация.

4.2.3.5 Заключение

Мы различными способами продемонстрировали важную роль малых ГТФаз *Ras-dva1* и *Ras-dva2* в процессе регенерации придатков тела головастика *Xenopus laevis* и плавников рыбы *Danio rerio*.

Во-первых, мы смогли зафиксировать резкое увеличение экспрессии обоих генов после ампутации придатка (плавника рыбы, хвоста или конечности головастика) и определить локализацию их транскриптов в процессе регенерации методами количественного ОТ-ПЦР, гибридизации *in situ* и путем детекции флуоресценции EGFP в трансгенных головастиках *pro-Ras-dva1-EGFP*. Во-вторых, мы продемонстрировали значительное ингибирование регенерации при подавлении трансляции генов *Ras-dva1* и *Ras-dva2* морфолиновыми олигонуклеотидами. И, наконец, мы показали, что эктопическая экспрессия *Ras-dva1* и *Ras-dva2* восстанавливает способность к регенерации в период рефрактерности, когда в норме регенерация отсутствует. Все эти данные являются прямым доказательством участия этих генов на ранних этапах регенерации.

Мы доказали существование сигнальной петли обратной связи между генам *Agr*, *Ras-dva* и *Fgf8* в раннем развитии мозга эмбрионов *Xenopus laevis*. В процессе регенерации эти гены также находятся в тесной пространственно-временной взаимосвязи, что может указывать на универсальность данного сигнального каскада в раннем развитии и в регенерации. Соответственно потеря одного из генов приводит к дисфункции данного сигналинга. Однако,

если такое отсутствие оказывается эволюционно полезным и закрепляется в процессе естественного отбора, то и некоторые другие члены сигнального каскада могут постепенно исчезать в ходе эволюционного процесса. Вероятно, это может быть одной из причин утраты высшими позвоночными гена *Ag1* и постепенной утратой обоих генов *Ras-dva* и утратой способности к регенерации придатков тела у млекопитающих, в том числе у человека.

Поиск ответов на эти вопросы может быть эффективным подходом для понимания механизмов регенерации, эмбрионального развития и эволюции у позвоночных.

5. Выводы

По итогам данной диссертационной работы можно следующие 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. Показано, что один из генов семейства *Agr* - ген *Agl* , гены *Ras-dva1* и *Ras-dva2* исчезают в процессе эволюции позвоночных, что коррелирует с потерей способности к регенерации у высших позвоночных.
3. 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 данио и у головастика шпорцевой лягушки.
4. Методом инъекций антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов в ампутированные органы подтверждено, что гены *Agr* и *Ras-dva* необходимы для нормального процесса регенерации.
5. Метод инъекций мРНК генов *Agr* и *Ras-dva* показал способность этих генов восстанавливать способность к регенерации *in vivo* в период рефрактерности у головастика *Xenopus laevis*.
6. На основании полученных данных высказана гипотеза о том, что потеря генов *Agl* , *Ras-dva1* и *Ras-dva2* могло быть одной из причин снижения регенерационной способности у высших позвоночных, включая человека.

6. Список используемой литературы

- [1] S. F. Gilbert, *Developmental Biology*. 2010.
- [2] S. a Brugmann and S. a Moody, "Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs.," *Biol. Cell*, vol. 97, no. 5, pp. 303–319, 2005.
- [3] З. А.Г., "Нейральная индукция: новые достижения и перспективы.," *Молекулярная биология*, vol. 41, no. 2, pp. 200–215, 2007.
- [4] G. Schlosser, C. Patthey, and S. M. Shimeld, "The evolutionary history of vertebrate cranial placodes II: Evolution of ectodermal patterning," *Dev. Biol.*, vol. 389, no. 1, pp. 98–119, 2014.
- [5] a Glinka, W. Wu, H. Delius, a P. Monaghan, C. Blumenstock, and C. Niehrs, "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction," *Nature*, vol. 391, pp. 357–362, 1998.
- [6] C. Houart, M. Westerfield, and S. W. Wilson, "A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation.," *Nature*, vol. 391, no. 6669, pp. 788–792, 1998.
- [7] E. M. Pera, H. Acosta, N. Gouignard, M. Climent, and I. Arregi, "Active signals, gradient formation and regional specificity in neural induction," *Experimental Cell Research*, vol. 321, no. 1, pp. 25–31, 2014.
- [8] E. M. Pera, A. Ikeda, E. Eivers, and E. M. De Robertis, "Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 24, pp. 3023–3028, 2003.
- [9] G. Schlosser, "Making Senses. Development of Vertebrate Cranial Placodes," *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 283, no. C, pp. 129–234, 2010.
- [10] G. Schlosser, "Early embryonic specification of vertebrate cranial placodes," *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 349–363, 2014.
- [11] C. LaBonne and M. Bronner-Fraser, "Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model.," *Development*, vol. 125, no. 13, pp. 2403–2414, 1998.
- [12] C. LaBonne and M. Bronner-Fraser, "Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population," *Journal of Neurobiology*, vol. 36, no. 2, pp. 175–189, 1998.
- [13] C. Kiecker and A. Lumsden, "Compartments and their boundaries in vertebrate brain development," *Nat Rev Neurosci*, vol. 6, no. 7, pp. 553–564, 2005.
- [14] G. W. Eagleson and W. A. Harris, "Mapping of the presumptive brain regions in the

- neural plate of *Xenopus laevis*,” *J. Neurobiol.*, vol. 21, no. 3, pp. 427–440, 1990.
- [15] J. T. Wigle and D. D. Eisenstat, “Homeobox genes in vertebrate forebrain development and disease,” *Clinical Genetics*, vol. 73, no. 3, pp. 212–226, 2008.
 - [16] S. W. Wilson and C. Houart, “Early steps in the development of the forebrain,” *Developmental Cell*, vol. 6, no. 2, pp. 167–181, 2004.
 - [17] F. Cavodeassi and C. Houart, “Brain regionalization: Of signaling centers and boundaries,” *Dev. Neurobiol.*, vol. 72, no. 3, pp. 218–233, 2012.
 - [18] F. Aboitiz and F. Zamorano, “Neural progenitors, patterning and ecology in neocortical origins,” *Front. Neuroanat.*, vol. 7, no. November, p. 38, 2013.
 - [19] G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, N. Y. Martynova, and A. G. Zaraisky, “The homeodomain factor Xanf represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions,” *Dev. Biol.*, vol. 307, no. 2, pp. 483–497, 2007.
 - [20] O. V. Kazanskaya, E. A. Severtzova, K. A. Barth, G. V. Ermakova, S. A. Lukyanov, A. O. Benyumov, M. Pannese, E. Boncinelli, S. W. Wilson, and A. G. Zaraisky, “Anf: A novel class of vertebrate homeobox genes expressed at the anterior end of the main embryonic axis,” *Gene*, vol. 200, no. 1–2, pp. 25–34, 1997.
 - [21] V. V. Novoselov, E. M. Alexandrova, G. V. Ermakova, and A. G. Zaraisky, “Expression zones of three novel genes about the developing anterior neural plate of *Xenopus* embryo,” *Gene Expr. Patterns*, vol. 3, no. 2, pp. 225–230, 2003.
 - [22] H. L. Sive, K. Hattori, and H. Weintraub, “Progressive determination during formation of the anteroposterior axis in *Xenopus laevis*,” *Cell*, vol. 58, no. 1, pp. 171–180, 1989.
 - [23] S. Persson, M. Rosenquist, B. Knoblach, R. Khosravi-Far, M. Sommarin, and M. Michalak, “Diversity of the protein disulfide isomerase family: Identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family,” *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 36, no. 3, pp. 734–740, 2005.
 - [24] T. A. Gray, N. J. MacLaine, C. O. Michie, P. Bouchalova, E. Murray, J. Howie, R. Hrstka, M. M. Maslon, R. Nenutil, B. Vojtesek, S. Langdon, L. Hayward, C. Gourley, and T. R. Hupp, “Anterior Gradient-3: A novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models,” *J. Immunol. Methods*, vol. 378, no. 1–2, pp. 20–32, 2012.
 - [25] D. Liu, P. S. Rudland, D. R. Sibson, A. Platt-Higgins, and R. Barraclough, “Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 9, pp. 3796–3805, 2005.
 - [26] A. S. Ivanova, M. B. Tereshina, G. V. Ermakova, V. V. Belousov, and A. G. Zaraisky, “Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in

- frog tadpoles.,” *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1279, 2013.
- [27] M. B. Tereshina, A. G. Zارايسкий, and V. V Novoselov, “Ras-dva, a member of novel family of small GTPases, is required for the anterior ectoderm patterning in the *Xenopus laevis* embryo.,” *Development*, vol. 133, no. 3, pp. 485–94, 2006.
 - [28] L. E. Csépanyi-Kömi R1, Lévy M, “Small G proteins and their regulators in cellular signalling,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 353, no. 1–2, pp. 10–20, 2012.
 - [29] M. B. Tereshina, V. V Belousov, and A. G. Zараиский, “[Study of the mechanism of Ras-dva small GTPase intracellular localization],” *Bioorg Khim*, vol. 33, no. 5, pp. 574–576, 2007.
 - [30] M. B. Tereshina, A. V. Bayramov, and A. G. Zараиский, “Expression patterns of genes encoding small GTPases Ras-dva-1 and Ras-dva-2 in the *Xenopus laevis* tadpoles,” *Gene Expr. Patterns*, vol. 11, no. 1–2, pp. 156–161, 2011.
 - [31] a-S. Tseng and M. Levin, “Tail regeneration in *Xenopus laevis* as a model for understanding tissue repair.,” *J. Dent. Res.*, vol. 87, no. 9, pp. 806–816, 2008.
 - [32] Н. Е. Н. Голиченков В.А., Иванов Е.А., *Эмбриология*. Издательский дом “Академия,” 2004.
 - [33] A. W. Seifert, S. G. Kiama, M. G. Seifert, J. R. Goheen, T. M. Palmer, and M. Maden, “Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*).,” *Nature*, vol. 489, no. 7417, pp. 561–5, 2012.
 - [34] C. B. Daniels, B. C. Lewis, C. Tsopelas, S. L. Munns, S. Orgeig, M. E. Baldwin, S. A. Stacker, M. G. Achen, B. E. Chatterton, and R. D. Cooter, “Regenerating lizard tails: a new model for investigating lymphangiogenesis,” *FASEB J.*, vol. 17, no. 3, pp. 479–481, 2003.
 - [35] M. Suzuki, N. Yakushiji, Y. Nakada, A. Satoh, H. Ide, and K. Tamura, “Limb regeneration in *Xenopus laevis* froglet.,” *ScientificWorldJournal.*, vol. 6 Suppl 1, pp. 26–37, 2006.
 - [36] K. Muneoka, C. H. Allan, X. Yang, J. Lee, and M. Han, “Mammalian regeneration and regenerative medicine,” *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, vol. 84, no. 4. pp. 265–280, 2008.
 - [37] U. Kierdorf and H. Kierdorf, “Deer antlers - A model of mammalian appendage regeneration: An extensive review,” *Gerontology*, vol. 57, no. 1. pp. 53–65, 2010.
 - [38] Y. Choi, C. Cox, K. Lally, and Y. Li, “The strategy and method in modulating finger regeneration.,” *Regen. Med.*, vol. 9, pp. 231–42, 2014.
 - [39] K. Sousounis, J. A. Baddour, and P. A. Tsonis, “Aging and Regeneration in Vertebrates,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 108, pp. 217–246, 2014.

- [40] C. W. Beck, J. C. Izpisúa Belmonte, and B. Christen, "Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms.," *Dev. Dyn.*, vol. 238, pp. 1226–1248, 2009.
- [41] M. Gemberling, T. J. Bailey, D. R. Hyde, and K. D. Poss, "The zebrafish as a model for complex tissue regeneration," *Trends in Genetics*, vol. 29, no. 11. pp. 611–620, 2013.
- [42] M. Mochii, Y. Taniguchi, and I. Shikata, "Tail regeneration in the *Xenopus* tadpole," *Development Growth and Differentiation*, vol. 49, no. 2. pp. 155–161, 2007.
- [43] C. W. Beck, B. Christen, D. Barker, and J. M. W. Slack, "Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of *Xenopus* tadpoles," *Mech. Dev.*, vol. 123, no. 9, pp. 674–688, 2006.
- [44] J. M. W. Slack, C. W. Beck, C. Gargioli, and B. Christen, "Cellular and molecular mechanisms of regeneration in *Xenopus*," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 359, no. 1445, pp. 745–751, 2004.
- [45] B. N. Singh, M. J. Doyle, C. V. Weaver, N. Koyano-Nakagawa, and D. J. Garry, "Hedgehog and Wnt coordinate signaling in myogenic progenitors and regulate limb regeneration," *Dev. Biol.*, vol. 371, no. 1, pp. 23–34, 2012.
- [46] Y. Chen, G. Lin, and J. M. W. Slack, "Control of muscle regeneration in the *Xenopus* tadpole tail by Pax7.," *Development*, vol. 133, no. 12, pp. 2303–2313, 2006.
- [47] K. Echeverri, J. D. Clarke, and E. M. Tanaka, "In vivo imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema.," *Dev. Biol.*, vol. 236, no. 1, pp. 151–64, 2001.
- [48] A. S. Azevedo, B. Grotek, A. Jacinto, G. Weidinger, and L. Saúde, "The regenerative capacity of the zebrafish caudal fin is not affected by repeated amputations," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, pp. 1–8, 2011.
- [49] Y. Chen, N. R. Love, and E. Amaya, "Tadpole tail regeneration in *Xenopus*," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 3, pp. 617–23, 2014.
- [50] A. D. Wolfe, H. L. D. Nye, and J. A. Cameron, "Extent of ossification at the amputation plane is correlated with the decline of blastema formation and regeneration *Xenopus laevis* hindlimbs," *Dev. Dyn.*, vol. 218, no. 4, pp. 681–697, 2000.
- [51] A. M. Cavaco Rodrigues, B. Christen, M. Marti, and J. C. Izpisua Belmonte, "Skeletal muscle regeneration in *Xenopus* tadpoles and zebrafish larvae," *BMC Dev. Biol.*, vol. 12, no. 1, p. 9, 2012.
- [52] A.-S. Tseng, W. S. Beane, J. M. Lemire, A. Masi, and M. Levin, "Induction of vertebrate regeneration by a transient sodium current.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 39, pp. 13192–200, 2010.

- [53] D. S. Adams, A.-S. Tseng, and M. Levin, "Light-activation of the Archaerhodopsin H(+)-pump reverses age-dependent loss of vertebrate regeneration: sparking system-level controls in vivo.," *Biol. Open*, vol. 2, no. 3, pp. 306–13, 2013.
- [54] N. R. Love, Y. Chen, S. Ishibashi, P. Kritsiligkou, R. Lea, Y. Koh, J. L. Gallop, K. Dorey, and E. Amaya, "Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 222–228, 2013.
- [55] D. M. Ho and M. Whitman, "TGF- β signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration," *Dev. Biol.*, vol. 315, no. 1, pp. 203–216, 2008.
- [56] D. a Natale, C. N. Arighi, W. C. Barker, J. Blake, T.-C. Chang, Z. Hu, H. Liu, B. Smith, and C. H. Wu, "Framework for a protein ontology.," *BMC Bioinformatics*, vol. 8 Suppl 9, p. S1, 2007.
- [57] N. Santosh, L. J. Windsor, B. S. Mahmoudi, B. Li, W. Zhang, E. A. Chernoff, N. Rao, D. L. Stocum, and F. Song, "Matrix metalloproteinase expression during blastema formation in regeneration-competent versus regeneration-deficient amphibian limbs," *Dev. Dyn.*, vol. 240, no. 5, pp. 1127–1141, 2011.
- [58] H. Yokoyama, S. Yonei-Tamura, T. Endo, J. C. Izpisua Belmonte, K. Tamura, and H. Ide, "Mesenchyme with fgf-10 expression is responsible for regenerative capacity in *Xenopus* limb buds.," *Dev. Biol.*, vol. 219, no. 1, pp. 18–29, 2000.
- [59] S. Bai, R. Thummel, A. R. Godwin, H. Nagase, Y. Itoh, L. Li, R. Evans, J. McDermott, M. Seiki, and M. P. Sarras, "Matrix metalloproteinase expression and function during fin regeneration in zebrafish: Analysis of MT1-MMP, MMP2 and TIMP2," *Matrix Biol.*, vol. 24, no. 4, pp. 247–260, 2005.
- [60] A. Kikuchi, H. Yamamoto, and A. Sato, "Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways," *Trends in Cell Biology*, vol. 19, no. 3. pp. 119–129, 2009.
- [61] G. Liu, A. Bafico, and S. A. Aaronson, "The mechanism of endogenous receptor activation functionally distinguishes prototype canonical and noncanonical Wnts.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, pp. 3475–3482, 2005.
- [62] M. E. Binnerts, K.-A. Kim, J. M. Bright, S. M. Patel, K. Tran, M. Zhou, J. M. Leung, Y. Liu, W. E. Lomas, M. Dixon, S. A. Hazell, M. Wagle, W.-S. Nie, N. Tomasevic, J. Williams, X. Zhan, M. D. Levy, W. D. Funk, and A. Abo, "R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 37, pp. 14700–5, 2007.
- [63] H. Yokoyama, T. Maruoka, H. Ochi, A. Aruga, S. Ohgo, H. Ogino, and K. Tamura, "Different requirement for Wnt/ β -Catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, 2011.

- [64] D. Wehner, W. Cizelsky, M. Vasudevaro, G. ??zhan, C. Haase, B. Kagermeier-Schenk, A. R??der, R. I. Dorsky, E. Moro, F. Argenton, M. K??hl, and G. Weidinger, “Wnt/??-catenin signaling defines organizing centers that orchestrate growth and differentiation of the regenerating zebrafish caudal fin,” *Cell Rep.*, vol. 6, no. 3, pp. 467–481, 2014.
- [65] J. Slack, G. Lin, and Y. Chen, “The *Xenopus* tadpole: a new model for regeneration,” *Cell Mol Life Sci*, vol. 65, no. 1, pp. 54–63, 2008.
- [66] S. a C. McDonald, S. L. Preston, M. J. Lovell, N. a Wright, and J. a Z. Jankowski, “Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer.,” *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 3, no. 5, pp. 267–274, 2006.
- [67] D. Gospodarowicz, “Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth,” *Prog Clin Biol Res*, vol. 9, pp. 1–19, 1976.
- [68] S. M. Cannata, C. Bagni, S. Bernardini, B. Christen, and S. Filoni, “Nerve-independence of limb regeneration in larval *Xenopus laevis* is correlated to the level of fgf-2 mRNA expression in limb tissues.,” *Dev. Biol.*, vol. 231, no. 2, pp. 436–446, 2001.
- [69] H. Yokoyama, H. Ide, and K. Tamura, “FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *Xenopus laevis*.,” *Dev. Biol.*, vol. 233, no. 1, pp. 72–9, 2001.
- [70] H. Yokoyama, H. Ogino, C. L. Stoick-Cooper, R. M. Grainger, and R. T. Moon, “Wnt/??-catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration,” *Dev. Biol.*, vol. 306, no. 1, pp. 170–178, 2007.
- [71] K. D. Poss, J. Shen, a Nechiporuk, G. McMahon, B. Thisse, C. Thisse, and M. T. Keating, “Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration.,” *Dev. Biol.*, vol. 222, pp. 347–358, 2000.
- [72] R. Thummel, S. Bai, M. P. Sarras, P. Song, J. McDermott, J. Brewer, M. Perry, X. Zhang, D. R. Hyde, and A. R. Godwin, “Inhibition of zebrafish fin regeneration using in vivo electroporation of morpholinos against fgfr1 and msxb,” *Dev. Dyn.*, vol. 235, no. 2, pp. 336–346, 2006.
- [73] G. G. Whitehead, S. Makino, C.-L. Lien, and M. T. Keating, “Fgf20 Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration.,” *Science*, vol. 310, no. 2005, pp. 1957–1960, 2005.
- [74] C. L. Stoick-Cooper, G. Weidinger, K. J. Riehle, C. Hubbert, M. B. Major, N. Fausto, and R. T. Moon, “Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration.,” *Development*, vol. 134, no. 3, pp. 479–489, 2007.
- [75] H. Ma, T. Blake, A. Chitnis, P. Liu, and T. Balla, “Crucial role of phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha in development of zebrafish pectoral fin is linked to phosphoinositide 3-kinase and FGF signaling.,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 23, pp. 4303–4310, 2009.

- [76] J. M. Wozney, "The bone morphogenetic protein family and osteogenesis," in *Molecular Reproduction and Development*, 1992, vol. 32, no. 2, pp. 160–167.
- [77] D. M. Barker and C. W. Beck, "Overexpression of the transcription factor Msx1 is insufficient to drive complete regeneration of refractory stage *Xenopus laevis* hindlimbs," *Dev. Dyn.*, vol. 238, no. 6, pp. 1366–1378, 2009.
- [78] C. W. Beck, B. Christen, and J. M. W. Slack, "Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate," *Developmental Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 429–439, 2003.
- [79] L. Laforest, C. W. Brown, G. Poleo, J. Géraudie, M. Tada, M. Ekker, and M. A. Akimenko, "Involvement of the sonic hedgehog, patched 1 and bmp2 genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays.," *Development*, vol. 125, pp. 4175–4184, 1998.
- [80] K. Yang, W. Cao, X. Hao, X. Xue, J. Zhao, J. Liu, Y. Zhao, J. Meng, B. Sun, J. Zhang, and X.-J. Liang, "Metallofullerene nanoparticles promote osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through BMP signaling pathway.," *Nanoscale*, vol. 5, pp. 1205–12, 2013.
- [81] N. Yakushiji, M. Suzuki, A. Satoh, H. Ide, and K. Tamura, "Effects of activation of hedgehog signaling on patterning, growth, and differentiation in *Xenopus* froglet limb regeneration," *Dev. Dyn.*, vol. 238, no. 8, pp. 1887–1896, 2008.
- [82] A. Smith, F. Avaron, D. Guay, B. K. Padhi, and M. A. Akimenko, "Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function," *Dev. Biol.*, vol. 299, no. 2, pp. 438–454, 2006.
- [83] T. Endo, H. Yokoyama, K. Tamura, and H. Ide, "Shh expression in developing and regenerating limb buds of *Xenopus laevis*," *Dev. Dyn.*, vol. 209, no. 2, pp. 227–232, 1997.
- [84] A. Ruiz i Altaba, P. Sánchez, and N. Dahmane, "Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, pp. 361–372, 2002.
- [85] L. Laviola, A. Natalicchio, and F. Giorgino, "The IGF-I signaling pathway.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 13, pp. 663–669, 2007.
- [86] F. Chablais and A. Jazwinska, "IGF signaling between blastema and wound epidermis is required for fin regeneration.," *Development*, vol. 137, pp. 871–879, 2010.
- [87] F. Janku, D. J. Stewart, and R. Kurzrock, "Targeted therapy in non-small-cell lung cancer- is it becoming a reality?," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, pp. 401–414, 2010.
- [88] J. a White, M. B. Boffa, B. Jones, and M. Petkovich, "A zebrafish retinoic acid receptor expressed in the regenerating caudal fin.," *Development*, vol. 120, no. 7, pp. 1861–72, 1994.
- [89] P. Ferretti and J. Géraudie, "Retinoic acid-induced cell death in the wound epidermis of

- regenerating zebrafish fins,” *Dev. Dyn.*, vol. 202, pp. 271–283, 1995.
- [90] S. Ohgo, A. Itoh, M. Suzuki, A. Satoh, H. Yokoyama, and K. Tamura, “Analysis of *hoxa11* and *hoxa13* expression during patternless limb regeneration in *Xenopus*,” *Dev. Biol.*, vol. 338, no. 2, pp. 148–157, 2010.
 - [91] R. Thummel, M. Ju, M. P. Sarras, and A. R. Godwin, “Both *Hoxc13* orthologs are functionally important for zebrafish tail fin regeneration,” *Dev. Genes Evol.*, vol. 217, no. 6, pp. 413–420, 2007.
 - [92] A. Kumar and J. P. Brookes, “Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration,” *Trends in Neurosciences*, vol. 35, no. 11, pp. 691–699, 2012.
 - [93] A. L. Bookout, C. L. Cummins, D. J. Mangelsdorf, J. M. Pesola, and M. F. Kramer, “High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR,” *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. Chapter 15, p. Unit 15.8, 2006.
 - [94] S. Ishibashi, K. L. Kroll, and E. Amaya, “A method for generating transgenic frog embryos,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 461, pp. 447–466, 2008.
 - [95] G. M. Lozano, I. Bejarano, J. Espino, D. González, A. Ortiz, J. F. García, A. B. Rodríguez, and J. a Pariente, “Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone,” *J. Reprod. Dev.*, vol. 55, no. 6, pp. 615–621, 2009.
 - [96] G. W. Eagleson and R. D. Dempewolf, “The role of the anterior neural ridge and *Fgf-8* in early forebrain patterning and regionalization in *Xenopus laevis* □,” vol. 132, pp. 179–189, 2002.
 - [97] F. Aberger, G. Weidinger, H. Grunz, and K. Richter, “Anterior specification of embryonic ectoderm: The role of the *Xenopus* cement gland-specific gene *XAG-2*,” *Mech. Dev.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 115–130, 1998.
 - [98] M. B. Tereshina, G. V Ermakova, A. S. Ivanova, and A. G. Zaraisky, “*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,” *Biol. Open*, pp. 1–9, 2014.
 - [99] K. Shimamura, J. L. Rubenstein, K. A. U. R. Shimamura J L, K. Shimamura, and J. L. Rubenstein, “Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain,” *Development*, vol. 124, no. 14, pp. 2709–2718, 1997.
 - [100] L. S. Gammill and H. Sive, “Coincidence of *otx2* and *BMP4* signaling correlates with *Xenopus* cement gland formation,” *Mech. Dev.*, vol. 92, no. 2, pp. 217–226, 2000.
 - [101] L. S. Gammill and H. Sive, “Identification of *otx2* target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation,” *Development*, vol.

124, no. 2, pp. 471–81, 1997.

- [102] G. V Ermakova, E. M. Alexandrova, O. V Kazanskaya, O. L. Vasiliev, M. W. Smith, and A. G. Zeraisky, “The homeobox gene, Xanf-1, can control both neural differentiation and patterning in the presumptive anterior neur ectoderm of the *Xenopus laevis* embryo,” *Development*, vol. 126, pp. 4513–4523, 1999.
- [103] E. O. Serebrovskaya, T. V Gorodnicheva, G. V Ermakova, E. A. Solovieva, G. V Sharonov, E. V Zagaynova, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, A. G. Zeraisky, and K. A. Lukyanov, “Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein,” *Biochem. J.*, vol. 435, no. 1, pp. 65–71, 2011.
- [104] V. P. Yin and K. D. Poss, “New regulators of vertebrate appendage regeneration,” *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 18, no. 4, pp. 381–386, 2008.
- [105] Y. C. Chen, Y. F. Lu, I. C. Li, and S. P. L. Hwang, “Zebrafish Agr2 is required for terminal differentiation of intestinal goblet cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, 2012.
- [106] G. G. Whitehead, S. Makino, C.-L. Lien, and M. T. Keating, “fgf20 is essential for initiating zebrafish fin regeneration,” *Science*, vol. 310, pp. 1957–1960, 2005.

7. Список сокращений

АЭШ - апикальная эктодермальная шапочка

БСА - бычий сывороточный альбумин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ГДФ/ГТФ – гуанозин-ди/трифосфат

ед.- единица активности

ЗПА(ZPA) - зона поляризующей активности

КТ – комнатная температура

кДНК – комплементарная ДНК

мин. - минута

мкг -микрограмм

мкл- микролитр

мл- миллилитр

мм- миллиметр

мМ- миллимоль

мРНК – матричная РНК

МО - Морфолиновый олионуклеотид

нг- нанограмм

об/мин – обороты в минуту

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-ПЦР

РНК –рибонуклеиновая кислота

сек. – секунда

ст. – стадия развития

тыс. – тысяча

AG- anterior gradient

Anf – Anterior neural fold

BMP - bone morphogenic protein

CSF - crude citostatic factor

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

GST – glutathione S-transferase, глутатион S-трансфераза

HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этилсульфоновая кислота

FLD - Fluorescein lysinated dextran

FGF - Fibroblast growth factor

FLD - Fluorescein lysinated dextran

NPB - nuclei preparation buffer

SDB - sperm delution buffer

SHH - sonic hedgehog protein

PMSF – фенилметилсульфофторид