

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

---

На правах рукописи

Короткова Дарья Дмитриевна

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

Специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
Андрей Георгиевич ЗАРАЙСКИЙ

Москва – 2020 г.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>1. ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>3</b>
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>7</b>
2.1. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ У ПОЗВОНОЧНЫХ .....	7
2.2. МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И ЭВОЛЮЦИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА ПОЗВОНОЧНЫХ.....	12
2.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАННИХ ЭТАПОВ РЕГЕНЕРАЦИИ КРУПНЫХ ПРИДАТКОВ ТЕЛА У ПОЗВОНОЧНЫХ .....	17
2.4. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, АКТИВИРУЕМЫЕ ФАКТОРАМИ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ И ВНЕКЛЕТОЧНЫМИ ПУРИНОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ, - ВАЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РАННЕГО РАЗВИТИЯ МОЗГА И РЕГЕНЕРАЦИИ.....	23
2.5. ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas9 ГЕННОГО НОКАУТА НА МОДЕЛИ ЭМБРИОНОВ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ <i>XENOPUS LAEVIS</i> .....	32
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>35</b>
3.1. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА C-ANSWER.....	35
3.2. ЭКСПРЕССИЯ C-ANSWER В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ И В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ КОНЕЧНОСТЕЙ И ХВОСТА ГОЛОВАСТИКОВ.....	40
3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФУНКЦИЙ C-ANSWER В РАЗВИТИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА.....	48
3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ C-ANSWER В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ .....	60
3.5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С C-ANSWER В ХОДЕ ЭМБРИОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ .....	64
3.6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ C-ANSWER НА АКТИВНОСТЬ FGF СИГНАЛЬНОГО ПУТИ .....	67
3.7. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ C-ANSWER НА АКТИВНОСТЬ ПУРИНЭРГИЧЕСКОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ .....	69
<b>4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>71</b>
<b>5. ВЫВОДЫ .....</b>	<b>77</b>
<b>6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>79</b>
6.1. МАТЕРИАЛЫ .....	79
6.2. МЕТОДЫ .....	82
<b>7. БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>96</b>
<b>8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>97</b>
<b>9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>99</b>

# 1. ВВЕДЕНИЕ

Прогрессивное развитие конечного мозга и сниженная способность к регенерации крупных придатков тела являются важными отличиями теплокровных животных (птицы, млекопитающие) от холоднокровных (рыбы, амфибии, рептилии). Основной причиной данных различий принято считать перестройку функциональных связей внутри приблизительно одного и того же набора генов (Rodríguez-Trelles, Tarrío, Ayala, 2003; Wray, 2007). В лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН была выдвинута гипотеза о том, что описанные отличия теплокровных от холоднокровных могут быть также обусловлены исчезновением или появлением отдельных генов в ходе эволюции позвоночных. Некоторые из таких генов были идентифицированы в совместной работе с лабораторией математических моделей в биологии (ИППИ РАН) в ходе широкомасштабного биоинформатического скрининга геномов представителей всех классов позвоночных, направленного на поиск генов, исчезнувших в эволюции на этапе перехода к теплокровным.

В настоящей работе планировалось изучить физиологические и молекулярные функции одного из найденных таким образом генов, названного *c-answer* (от Cold-blooded Animals Specific Wound Epithelium Receptor binding protein – специфичный для холоднокровных рецептор-связывающий белок раневого эпителия). Предполагалось, что полученные в ходе данной работы данные позволят проверить гипотезу о том, что исчезновение *c-answer* у предков теплокровных позвоночных могло привести к снижению их регенерационных способностей и в то же время создать условия для дальнейшего прогрессивного развития мозга.

Как было показано в результате проведенного ранее биоинформатического анализа, этот ген присутствует в геномах всех исследованных холоднокровных позвоночных, однако отсутствует у теплокровных. Согласно данным, полученным в ходе нашей работы на

модельном объекте – шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*, *c-answer* экспрессируется в ходе регенерации хвоста и почки задней конечности у головастиков, а также в период раннего развития мозга. Участие *c-Answer* в регенерации и развитии мозга шпорцевой лягушки обусловлено его взаимодействием с рецепторами факторов роста фибробластов и рецептором пуриnergического сигнального пути - P2ry1.

Актуальность настоящей работы определяется необходимостью изучения функций не известного ранее гена *c-answer* в процессе эмбрионального развития и в ходе регенерации крупных придатков тела у холоднокровных.

Учитывая факт исчезновения *c-answer* у теплокровных и, одновременно, участия *c-answer* как в регенерации, так и в раннем развитии мозга у холоднокровных, изучение механизмов функционирования *c-answer* может быть важно для решения одной из наиболее масштабных проблем эволюционной биологии - выяснения механизмов эволюции способности к регенерации и прогрессивного развития головного мозга у теплокровных позвоночных. Помимо этого, потеря *c-answer* в эволюции у теплокровных позвоночных повышает актуальность данного исследования для биомедицины, поскольку изучение функционирования *c-answer* может быть полезно для установления причин потери способности к регенерации конечностей у теплокровных позвоночных, в том числе человека.

Необходимо отметить, что изучение роли генов, исчезнувших в ходе эволюции позвоночных, привлекает внимание и других исследователей, в частности, было показано, что гены *and1-4*, принимающие участие в развитии плавников рыб, присутствуют в геномах рыб, однако отсутствуют в геномах четвероногих животных, а потеря данных генов в ходе эволюции создала предпосылки для формирования конечностей вместо плавников (Zhang et al., 2010).

Основной целью настоящей работы являлось изучение роли *c-Answer* в регенерации крупных придатков тела и в развитии мозга, а также механизмов и

роли взаимодействия *c-Answer* с рецепторами P2ry1 и FGFR4, на модельном объекте – шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

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

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

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

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

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

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

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

8) На основании полученных данных построить модель, объясняющую, каким образом исчезновение у теплокровных гена *c-answer* могло привести к

снижению их регенерационных способностей и в то же время создать условия для прогрессивного развития мозга.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

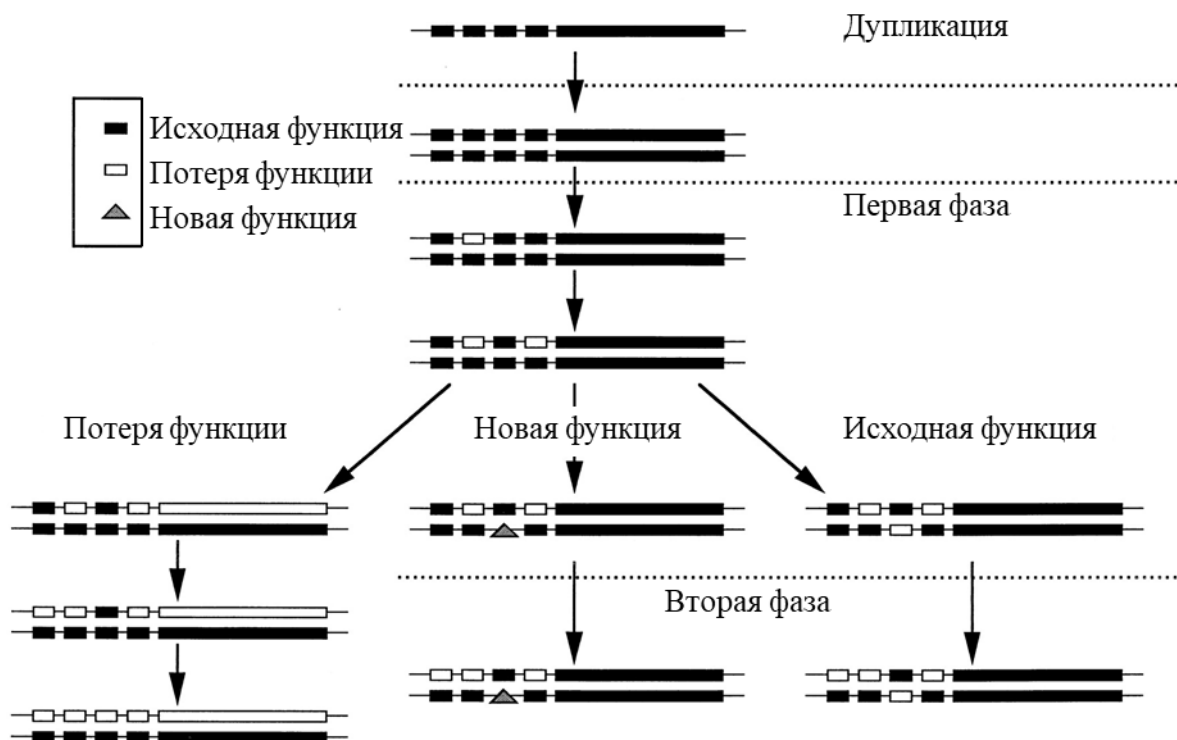
### 2.1. Генетические механизмы эволюционных изменений у позвоночных

Генетические преобразования, лежащие в основе крупных эволюционных изменений, которые обусловили возникновение современных классов позвоночных, остаются слабо изученными. К таким изменениям (ароморфозам) относятся - возникновение конечностей (разделение челюстноротых на надкласс рыбы и надкласс четвероногие), появление зародышевых оболочек (разделение на анамнии и амниоты), возникновение способности к поддержанию постоянной температуры тела, прогрессивное развитие дорсальной части конечного мозга при одновременном снижении способности к регенерации конечностей (разделение на холоднокровных и теплокровных).

В 1970 году японский биолог С. Оно выдвинул гипотезу 2R, согласно которой одной из движущих сил эволюции позвоночных стали полногеномные дубликации, приведшие к кратному усложнению генома у позвоночных и позволившие исключить из селективного отбора дополнительные копии (дубликаты) имеющихся генов, и тем самым создавшие возможность для приобретения такими копиями новых функций. Кроме того, значительное увеличение числа генов заложило основу для возникновения новых регуляторных связей, управляющих генной активностью в эмбриональном развитии (Ohno, 1970).

В ходе последующих исследований по сравнению геномов различных групп позвоночных и беспозвоночных было подтверждено, что геномные дубликации имели место в эволюции позвоночных, причём полногеномная дубликация произошла дважды до разделения хордовых на подтип бесчерепные и подтип позвоночные (Dehal, Boore, 2005). Одним из наиболее наглядных фактов, подтверждающих реальность гипотезы 2R, стало выявление одного кластера Нох-генов у представителя подтипа бесчерепные - ланцетника, и четырех у представителя подтипа позвоночные – мыши (Castro, Holland,

2003). Кроме того, было показано, что у отдельных представителей групп позвоночных (костистых рыб, бесхвостых амфибий) в дальнейшем произошли дополнительные дупликация генома (Hughes, Hughes, 1993).



**Рисунок 1. Возможные эволюционные преобразования регуляторных элементов пары дублицированных генов (Force et al., 1999 с изм.).**

Одновременно с С. Оно американский биолог В. Фитч исследовал процесс эволюции дублицированных генов позвоночных с точки зрения гомологии. В результате он разделил гомологичные гены на паралоги (возникли в ходе дупликаций предкового гена) и ортологи (произошли от общего гена-предка в ходе вертикальной эволюции) (Fitch, 1970). Появившиеся в ходе дупликации предковых генов гены-паралоги в дальнейшем подвергались различным типам мутаций в зависимости от их функциональной значимости для организма.

Одна из дублицированных копий предкового гена могла накапливать мутации в кодирующей части, приводящие к аминокислотным заменам, вызывающим изменение свойств исходного белка и, соответственно, приводящим к появлению у белка новых функций. При этом другая копия



сохраняла исходные свойства, так, что кодируемый ею белок продолжал выполнять изначальные функции. Мутации в кодирующей области исходной копии могли происходить только в незначущих положениях кодонов, либо таким образом, чтобы возникающие замены аминокислот не приводили бы к существенным изменениям свойств белка (**Рис. 1**). Считается, что по такому механизму накопления мутаций в одной из дублированных копий предкового гена могли возникать семейства гомологичных генов, характерные для позвоночных. Примерами могут служить такие семейства гомеобоксных генов, как *Nox* (сегментация и развитие туловищного отдела), *Otx* (*otx1*, *otx2*), *Vent* (*vent1* и *vent2*), *Engrailed* (*en1* и *en2*), которые возникли у позвоночных в результате дубликации и последующей мутации одной из паралогических копий предкового гена беспозвоночных (Holland, 2015).

Другой механизм генетических преобразований паралогов заключается в том, что одна из дублированных паралогических копий предкового гена, исключенная из селективного отбора, могла подвергаться мутациям в области регуляторных элементов, ответственных за экспрессию.

В результате такая копия могла начать экспрессироваться в местах не характерных для предкового гена или наоборот, её экспрессия могла исчезать в некоторых местах предкового паттерна. Именно такие мутации в регуляторных областях генов считаются в настоящее время основной причиной существенных морфологических различий, наблюдаемых между представителями различных классов позвоночных животных. Например, установлено, что у представителей класса миног, которые не имеют грудных плавников, отсутствует энхансерная область гена *shh*, необходимая для экспрессии данного гена в грудных плавниках у рыб. Показано, что мутация, вызвавшая появление цис-регуляторного элемента гена *shh*, действительно стала одной из причин возникновения плавников у рыб. При этом у змей, которые, как известно, не имеют конечностей, в результате дополнительной мутации произошло удаление данного цис-регуляторного элемента из регуляторной области *shh* (Kvon et al., 2016). Существенно, что при такого рода

геномных преобразованиях, затрагивающих регуляторные области генов, не происходит изменения самого набора генов, а лишь перестраиваются регуляторные связи между ними.

Предполагается, что важную роль в появлении мутаций в регуляторных областях генов могли играть мобильные элементы и ретровирусы. Встраиваясь в различные участки генома, они способны вызывать транслокации, как отдельных регуляторных элементов, так и перестройки больших фрагментов генома. В частности, редким примером мутации, произошедшей, по-видимому, в результате хромосомной транслокации, можно считать мутацию, обусловившую появление нового «гибридного» гена из паралогов двух предковых генов. В ходе недавних исследований были получены данные о том, что возникновение гомеобоксного гена *anf*, отсутствующего у всех беспозвоночных животных и совмещающего в себе функциональные свойства генов сразу двух классов - Prd и Antp, могло произойти благодаря хромосомной транслокации между дублированными копиями генов этих классов у предков современных позвоночных. Появление *anf* у предков позвоночных, вероятно, создало условия для возникновения конечного мозга - структуры, характерной исключительно для позвоночных животных (Вауганов et al., 2016).

Наряду с геномными дубликациями, большое значение для эволюции имел обратный процесс - элиминация отдельных генов. Так, в случае функциональной избыточности некоторые паралоги в большой степени были подвержены точечным миссенс и нонсенс мутациям, которые приводили к потере геном функции и, как правило, к последующей полной или частичной делеции нуклеотидной последовательности данной копии гена. Показано, что такие генетические преобразования являются наиболее распространенными типами мутаций, сохраняющимися в эволюции (Olson, 1999). Именно вследствие таких делеций многие гены современных позвоночных имеют в геноме не четыре паралогических гомолога, что логично было бы ожидать в случае двух циклов полногеномных дубликаций, а меньше.

В силу плейотропного эффекта, присущего многим генам, делеционные мутации могли привести к перестройке сигнальных путей и, как следствие, появлению у организма новых признаков и функций (Redivivus, Partiality, 2005), в том числе к указанным выше ароморфозам в ряду позвоночных. Интересно, что в ходе эволюции могли исчезнуть не только дубликаты предковой формы гена, но и сам ген-предок, что, однако, происходило значительно реже.

В подтверждение можно привести данные (Zhang et al., 2010), которые показали, что делеция генов *and1*, *and2*, *and3*, *and4*, отвечающих за развитие актинотрихии и лепидотрихии, у рыбы - предковой формы четвероногих, могло создать условия для развития конечностей вместо плавников. При этом отмечается, что потеря данных генов происходила поэтапно, так, в геномах большинства рыб обнаружено четыре гена *and*, в геноме представителя хрящевых рыб - акулы, обнаружен один ген данного семейства, в то время как в геномах четвероногих животных данные гены отсутствуют.

Другим примером генов, исчезновение которых привело к преобразованию признаков и функций организма, могут служить гены семейств *Agr* (секретируемые дисульфидизомеразы) и *Ras-dva* (малые ГТФазы), регулирующие процессы регенерации и развития мозга. Было показано, что их поэтапное исчезновение могло послужить одной из причин снижения способности к регенерации конечностей и одновременно создать условия для прогрессивного развития конечного мозга у теплокровных (Tereshina et al., 2014).

Таким образом, можно заключить, что эволюционные преобразования генных сетей, приводящие к постепенному изменению характерных признаков позвоночных и, соответственно, выделению новых групп позвоночных, как правило, обусловлены мутациями в генах, обладающих несколькими функциями. При этом гены, одной из функций которых является регуляция важных этапов эмбрионального развития, зачастую относящихся к формированию нервной системы, - консервативны и обладают высокой устойчивостью к мутациям. Появление существенных мутаций в таких генах

происходит редко и отражается не только на эмбриональном развитии, но и на связанных с ним процессах формирования конечностей и регенерации.

В связи с этим большой интерес представляет изучение генетических и молекулярных аспектов процессов развития нервной системы и регенерации для установления общих для этих процессов сигнальных путей, эволюционные преобразования которых могли оказать влияние на реорганизацию процессов развития нервной системы и регенерации в эволюции позвоночных.

## **2.2. Механизмы развития и эволюции переднего мозга позвоночных**

Одним из наиболее важных отличительных признаков позвоночных является сложноорганизованная трубчатая нервная система с головным мозгом, который подразделяется на несколько больших отделов: задний мозг, средний мозг, промежуточный и конечный мозг. Конечный мозг является уникальным отделом головного мозга позвоночных, не имеющим гомологов у всех остальных животных. Благодаря конечному мозгу позвоночные могут осуществлять высшую нервную деятельность - совокупность сложных реакций адаптации, поведения, памяти и мышления, связанных с нейрофизиологическими процессами в уникальной структуре конечного мозга - коре больших полушарий. Конечный мозг развивается из самого первого из трех пузырей эмбрионального мозга, называемого передним мозгом. Из переднего мозга также происходит роstralная часть промежуточного мозга.

В последнее время углубилось понимание механизмов, регулирующих раннее развитие переднего мозга позвоночных (Danesin, Houart, 2012; Lupo et al., 2002). В эмбриогенезе этот отдел мозга возникает из головной нейроэктодермы в результате нейральной индукции - спецификации эмбриональной эктодермы к дифференцировке в нейроэктодерму.

Большим достижением биологии развития была демонстрация того, что в основе нейральной индукции лежит процесс ингибирования активности факторов суперсемейства - TGF $\beta$  - BMPs (bone morphogenetic proteins) в

результате связывания с их антагонистами - специфическими белками (Chordin, Noggin, Follistatin, Cerberus), секретлируемыми клетками организатора Шпемана - области зародыша в районе дорсальной губы бластопора (Kuroda, Wessely, Robertis De, 2004). В результате ингибирования активности BMPs эмбриональная эктодерма получает возможность спонтанно дифференцироваться в нейральную ткань - модель нейральной дифференцировки по умолчанию. При этом было показано, что наиболее ранней стадией является спецификация к развитию в структуры переднего мозга. Впоследствии в ходе гастрюляции и нейруляции, задние регионы нервной пластинки индуцируются другими специфическими факторами (Wnt1, Wnt3, Wnt8, Fgfs, Retinoids), секретлируемыми клетками каудальных регионов организатора Шпемана, к развитию в постериорные отделы головного мозга и в спинной мозг. Впервые эти данные были получены на эмбрионах шпорцевой лягушки, а затем подтверждены и на некоторых других модельных организмах (Lupo et al., 2002).

В одной из работ, посвященных механизмам развития мозга в эволюции, авторы предположили, что основой механизма, запускающего спецификацию нейроэктодермы по типу переднемозговых структур, является активность гомеодоменного белка *Anf*, впервые возникшего у предков современных позвоночных. На ранних стадиях эмбриогенеза базальных групп позвоночных *Anf* специфично экспрессируется в зачатке конечного мозга. При этом белок *Anf*, являясь ультимативным транскрипционным ингибитором, подавляет экспрессию гомеобоксных генов, регулирующих развитие постериорных отделов мозга (*otx2* и *рахб*). В результате его активности в области презумптивного конечного мозга активируется генетическая программа дифференцировки конечного мозга. Таким образом, активность гена *anf* можно считать первым звеном механизма запуска дифференцировки конечного мозга как в эволюции, так и в эмбриогенезе (Bayramov et al., 2016).

Со стадии нейрулы у позвоночных начинается регионализация нервной пластинки, формирование сигнальных центров мозга, отделов мозга, закладка

глазного поля. Недавние исследования показали, что первым в развивающемся мозге под воздействием Wnt устанавливается сигнальный центр МНВ (mid-hindbrain boundary), определяющий границу между средним и задним мозгом и экспрессирующий необходимые для этого транскрипционные факторы Otx2, Eng2, Gbx (Wilson, Houart, 2004).

Другим сигнальным центром, активирующимся под действием Wnt немного позднее, является ANR/ANB (anterior neural ridge/anterior neural border). ANR располагается в наиболее антериорной части нервной пластинки. В этой зоне наблюдается экспрессия Frizzled-related proteins (FRP; антагонисты Wnt), Fgf3 и Fgf8, определяющих формирование конечного мозга. Последним между установившимися МНВ (midbrain–hindbrain boundary) и ANR формируется сигнальный центр ZLI (zona limitans intrathalamica), экспрессирующий Shh (Cavodeassi, Houart, 2012).

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. Вместе с тем было показано, что переход от холоднокровных позвоночных к теплокровным характеризуется значительным увеличением размеров дорсальной области конечного мозга. При этом, если у теплокровных позвоночных после окончания нейруляции зачаток конечного мозга увеличивается за счёт пролиферации его клеток, то у холоднокровных позвоночных клетки конечного мозга делятся менее интенсивно и существенного увеличения размеров конечного мозга не происходит (Wilson, Houart, 2004; Danesin, Houart, 2012).

Для объяснения причин увеличения размеров данной области мозга у теплокровных позвоночных было выдвинуто предположение о возникновении у них гетерохронии в закладке двух основных сигнальных центров, управляющих ранним развитием мозга, по сравнению с низшими позвоночными. Так, у холоднокровных позвоночных первым закладывается сигнальный центр МНВ, а у теплокровных позвоночных – ANB, что может

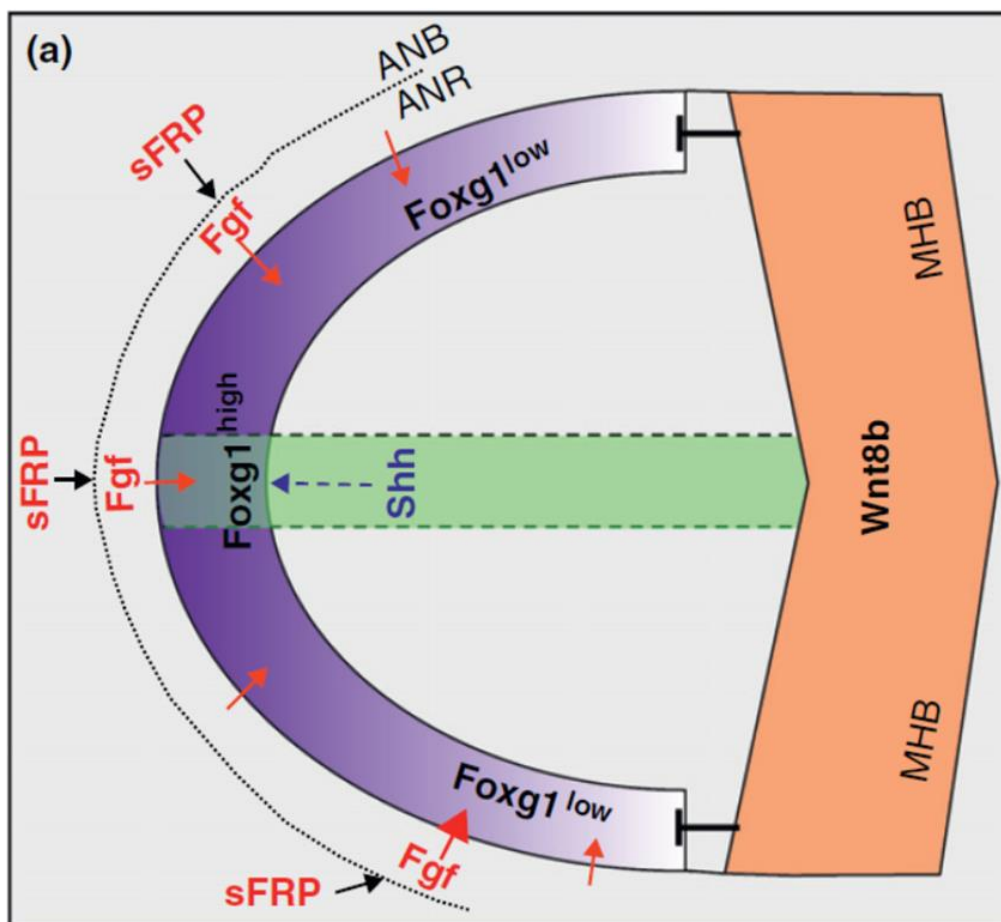
быть обусловлено преобразованиями в генетических механизмах развития мозга, в частности изменениями в регуляторных элементах генов, управляющих закладкой сигнальных центров МНВ и АНВ, которые привели к гетерохронии в закладке МНВ и АНВ центров. В результате возникающий первым у холоднокровных позвоночных МНВ центр специфицирует большую часть передней области нервной пластинки к развитию в более задние отделы мозга, в то время как возникающий первым у теплокровных позвоночных АНВ – в передние, что может объяснять различия в размерах дорсальной части конечного мозга у различных групп позвоночных.

Показано, что основным интегратором сигнальных путей, необходимых для развития конечного мозга, является транскрипционный фактор FoxG1 (FoxG1). FoxG1 активируется FRP, Fgf8 (АНР), Shh (ЗЛІ) и ингибируется Wnt, Frz (МНВ). Активность FoxG1 направлена на ингибирование дорсализующих BMP и Wnt, что способствует развитию вентральной части конечного мозга (Danesin, Houart, 2012) (**Рис. 2**).

В ходе недавних исследований было установлено, что одним из генов, стимулирующих экспрессию FoxG1 и, тем самым, способствующих развитию вентральной части конечного мозга, является *agl* (Tereshina et al., 2014). Интересно, что данный ген присутствует только в геномах низших позвоночных (анамний) и исчезает в ходе эволюции у высших позвоночных (амниот), у которых для развития дорсальной части конечного мозга требуется ингибирование экспрессии FoxG1.

Происходящее на той же стадии развития формирование глаз, как было установлено в последнее время, контролируется пуриnergическим рецептором P2ry1, агонистом которого является АДФ. Как правило, P2ry1 ассоциирован с ферментом NTPDase2, гидролизующим внеклеточные нуклеотиды АТФ и АДФ. Показано, что АТФ выделяется постериорной частью нервной пластинки, а после гидролиза, в виде АДФ, активирует рецептор P2ry1, который, в свою очередь, способен усиливать экспрессию некоторых транскрипционных факторов, регулирующих развитие глаз (Rax, Raxb) (Massé et al., 2007). При

этом установлено, что у млекопитающих P2ry1 и NTPDase2 в развитии глаз не участвуют (Gampe et al., 2015).



**Рисунок 2.** Схематическое изображение сигнальных каскадов, индуцирующих теленцефалическую дифференцировку на нервной пластинке у рыбы *Danio rerio*; anteriорная часть нервной пластинки слева (Danesin, Houart, 2012).

Таким образом, развитие мозга представляет собой сложный многоэтапный процесс обмена сигналами (TGF-betas, Wnts, GFs) между сигнальными центрами (ANR, MHB, ZLI), который координирует транскрипционный фактор FoxG1. Механизмы развития мозга позвоночных консервативны, однако последние данные свидетельствуют об изменении функции пуринаргического сигнального пути в развитии глаз в ходе эволюции позвоночных, а также об исчезновении некоторых генов-регуляторов развития конечного мозга в процессе эволюции. Возможно, изменение функции



пуриnergического сигнального пути и исчезновение данных генов могли стать причиной различий в степени развития переднего мозга у различных групп позвоночных. В связи с этим целенаправленный поиск генов, регулирующих развитие мозга у холоднокровных позвоночных, но при этом исчезнувших у теплокровных позвоночных, мог бы быть эффективным подходом для выяснения механизмов развития и эволюции головного мозга.

### **2.3. Молекулярно-генетические механизмы ранних этапов регенерации крупных придатков тела у позвоночных**

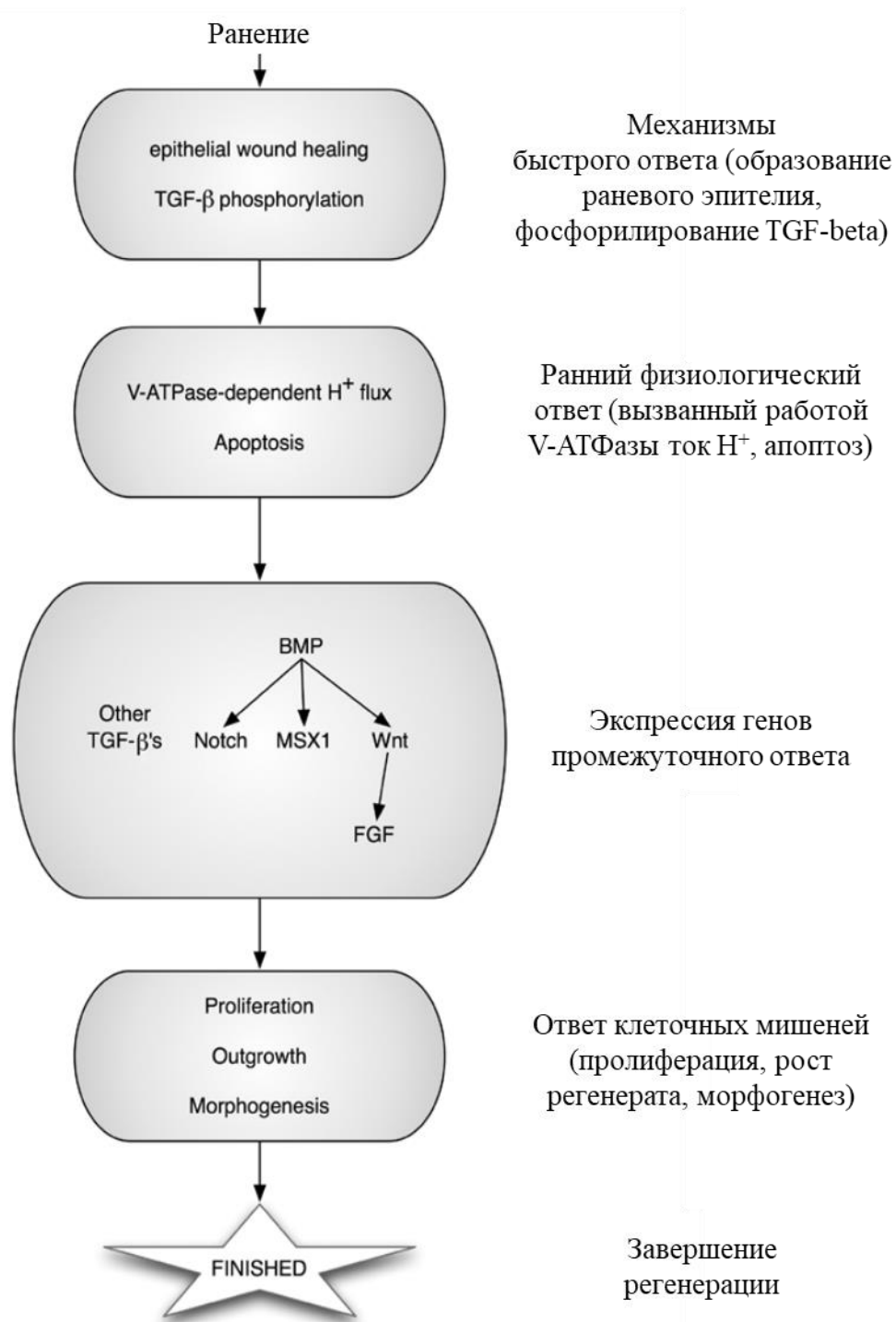
Генетические изменения, затрагивающие такие фундаментальные, высоко консервативные процессы, как развитие нервной системы, в силу плейотропного эффекта отражаются и на других сопряженных процессах. Одним из процессов, наиболее тесно связанных с развитием нервной системы, является регенерация, в особенности репаративная регенерация крупных придатков тела. Связь данных процессов обусловлена тем, что в ходе регенерации происходит повторное развитие всех типов тканей, среди которых определяющей инициацию регенерации является нервная ткань, соответственно, при регенерации требуется активация многих сигнальных путей, например, Shh, TGF-beta, Wnt, участвующих в нормальном развитии нервной системы (Yakushiji et al., 2008).

Одной из наиболее удобных моделей для рассмотрения процесса регенерации крупных придатков тела является шпорцевая лягушка, которая обладает способностью восстанавливать придатки тела только на стадии головастика (за исключением «рефрактерного» периода, ст. 45-47) (Tseng, Levin, 2008).

Установлено, что процесс регенерации включает 4 основных этапа: (1) заживление раны; (2) формирование бластемы; (3) пролиферация клеток бластемы; (4) дифференцировка клеток (Nacu et al., 2016). Успешный итог регенерации обуславливается рядом процессов, происходящих в течение

первых 24 часов после ампутации, и последующей активацией важных сигнальных каскадов, приводящей к пролиферации, росту и морфогенезу.

Событиями, происходящими на самых ранних стадиях после ампутации, являются резкое падение рН в клетках дистальной части регенерата (наблюдается в течение 1-3 минут после ампутации) (Matlashov et al., 2015); выработка клетками раны активных форм кислорода (регистрируется в течение 1 часа после ампутации); активация TGF-beta каскада, способствующего заживлению раны (образованию раневого эпителия) посредством стимуляции миграции эпидермальных клеток в область раны (происходит на 2<sup>ой</sup> час после ампутации); активная работа вакуолярной АТФазы, направленная на реполяризацию бластемы; и апоптоз (детектируется до 6-го часа после ампутации). Регенерационная бластема формируется в течение первых 24 часов после ампутации и содержит преимущественно недифференцированные мезенхимные клетки и клетки-предшественники нервной трубки и хорды. Дальнейшие процессы связаны с активацией сигнальных каскадов, наиболее важными среди которых являются BMP TGF-beta, Notch, Msx1, Fgf MEK/ERK киназный путь, Wnt/beta-catenin, Hh, IGF, MMP каскады, которые, в свою очередь, регулируют клеточные циклы и движения клеток и в конечном счете приводят к формированию регенерата (**Рис. 3**). Факторы, влияющие на активацию данных каскадов, могут быть разделены на внеклеточные, например, наличие сигнала от раненного нерва, и внутриклеточные – эпигенетические, такие как метилирование ДНК и изменение конформации хроматина.



**Рисунок 3. Схематическое изображение событий, происходящих при регенерации хвоста у *X.laevis* (Tseng, Levin, 2008 с изм.).**

После формирования раневой бластемы (24 часа после ампутации у головастика шпорцевой лягушки) происходит индукция и поддержание роста и разметки регенерата. На данном этапе регенерации отмечается высокое сходство процесса регенерации с процессом развития, в частности развития нервной системы (мозга), поскольку происходит активация общих для данных

процессов сигнальных каскадов. Основным из них является BMP сигнальный каскад, активирующийся лигандами из суперсемейства TGF-beta - факторами роста, необходимыми для нормального эмбрионального развития. Несмотря на то что основной функцией белков TGF-beta является ингибирование клеточных делений, при определенных условиях они способствуют пролиферации клеток некоторых типов тканей (Ruscetti, Akel, Bartelmez, 2005).

Каскадами, активируемыми BMP, являются FGF и Wnt/beta-catenin сигнальные пути (Lin, Slack, 2008). При этом для нормальной регенерации необходимо взаимодействие данных сигнальных путей. Так, показано, что бета-катенин способен к эпигенетической регуляции экспрессии генов-мишеней Wnt, в частности *vent* и *cdx* путем метилирования гистонов, что важно для формирования и разметки осей, как в ходе регенерации, так и в процессе развития придатков тела. В свою очередь Wnt может активировать FGF, взаимодействие которого с BMP необходимо для установления антерио-постериорной оси в ходе регенерации (Hikasa, Sokol, 2013).

Другой мишенью BMP является Notch-каскад. Экспрессия генов, участвующих в этом каскаде, детектируется в бластеме головастика шпорцевой лягушки через 24 часа после ампутации (Beck, Christen, Slack, 2003). Установлено, что роль этих генов проявляется в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток (Bolós, Grego-Bessa, la Pompa de, 2007). Показано, что ингибирование Notch-каскада посредством MG132 как в обычном головастике, так и в конститутивно экспрессирующем рецептор BMP - Alk3, приводит к серьезным аномалиям регенерации (Beck, Christen, Slack, 2003).

Активация сигнального пути Shh также необходима как для нормального развития, так и для регенерации. Так, ген *shh* активируется в развивающейся конечности в зоне поляризующей активности (постериорной области дистальной части конечности), и регулирует клеточное деление, тканевую дифференцировку, формирование скелетных структур, морфогенез (Yakushiji et al., 2008). Экспрессия *shh* в ходе регенерации необходима для установление антерио-постериорной разметки регенерата (Nacu et al., 2016).

Показано, что активация пуриnergических рецепторов P2ry1, сопряжённых с G-белками, приводит к повышению уровня инозитолфосфата и последующему повышению цитоплазматического уровня кальция и сопутствующим ему выходом ионов водорода из клетки (Erb, Weisman, 2012). Ампутация приводит к снижению уровня экспрессии данных рецепторов, который затем восстанавливается в процессе регенерации. Поскольку рецептор P2ry1 активируется внеклеточными нуклеотидами, в частности АТФ, которые у позвоночных выпускаются в везикулах в окончаниях мотонейронов вместе с ацетилхолином, активация P2ry1 коррелирует с активацией рецепторов ацетилхолина, участвующих во многих процессах передачи сигналов в нервной системе.

Установлена также роль тирозинкиназных рецепторов FGFR4 и их лигандов Fgf8, Fgf10, необходимых для нормального развития нервной системы, в процессе регенерации у хвостатых амфибий. Интересно, что у аксолотля Fgf10 активируется на третий день после ампутации и принимает участие в формировании регенерата, тогда как Fgf8 активируется позднее, на седьмой день после ампутации, и определяет разметку формирующейся конечности (Kochegarov et al., 2015).

Как было выявлено в ходе последних исследований, важную роль в процессе регенерации, как и в развитии конечного мозга, играют белки семейства Agr - секретлируемые дисульфид изомеразы, содержащие тиоредоксиновый домен. В отличие от других дисульфидизомераз, Agr также секретрируются во внеклеточное пространство и регулируют клеточную пролиферацию и дифференцировку (Aberger et al., 1998). Установлено, что один из генов семейства Agr - *agr2* принимает участие в регенерации у тритона (Blassberg et al., 2011). Показано, что за исключением гена *agl* гены семейства Agr (*agr2*, *agr3*) имеются у всех групп позвоночных, тогда как *agl* есть только у низших позвоночных (анамний) и был утерян в ходе эволюции, что могло привести к снижению способности к регенерации крупных придатков тела и

важным изменениям в развитии конечного мозга (Ivanova et al., 2013; Ivanova et al., 2015).

Интересно, что *agl*, наряду с малыми Ras-подобными ГТФазами, исчезнувшими у млекопитающих в ходе эволюции, является мишенью важного регулятора развития конечного мозга - гена *anf/hesx1*. Одновременно показано, что в процессе развития эмбрионов шпорцевой лягушки гены *agl*, *ras-dva1* и *ras-dva2* связаны единой сигнальной петлей, активируемой фактором Fgf8, который, как было описано ранее, участвует в формировании проксимодистальной оси придатков тела в ходе регенерации, что может подтверждать необходимость активации генов *agl*, *ras-dva1* и *ras-dva2* для нормальной регенерации (Tereshina, Zraisky, Novoselov, 2006).

Как для процесса развития мозга, так и для процесса регенерации важное значение имеет эпигенетическая регуляция. Одним из механизмов эпигенетической регуляции в процессе регенерации является метилирование промоторных и энхансерных областей ряда генов, в частности *shh*, ответственного за антерио-постериорную разметку регенерата (Tseng, Levin, 2008). Другим механизмом эпигенетической регуляции регенерации является деацетилирование гистонов, способствующее необходимой на её ранних этапах повторной активации генов, экспрессирующихся в ходе развития (Stewart et al., 2013). Наряду с этим существует другой важный механизм эпигенетического контроля регенерации, заключающийся в регуляции токов ионов, способных оказывать влияние на клеточный цикл и движение клеток, с помощью ионных помп (Woodhouse et al., 1999).

При рассмотрении процесса репаративной регенерации у позвоночных с точки зрения эволюции можно заметить постепенное снижение регенеративных потенциалов с повышением ранга организма в эволюционном ряду. Так, большинство холоднокровных позвоночных (рыбы, амфибии, рептилии) обладает способностью к регенерации конечностей на протяжении всей жизни, у части холоднокровных, например у лягушек, возможность регенерации конечностей ограничена эмбриональным периодом, теплокровные позвоночные

(птицы, млекопитающие) не способны восстанавливать утраченные конечности ни в эмбриональном, ни в постнатальном периоде (Alibardi, 2010).

Таким образом, можно заметить, что обусловленная преобразованиями в молекулярно-генетических механизмах регенерации потеря способности к репаративной регенерации крупных придатков тела на этапе деления позвоночных на холоднокровных и теплокровных коррелирует с исчезновением некоторых генов, активирующихся на ранних этапах регенерации и регулирующих развитие дорсальной части конечного мозга у холоднокровных.

#### **2.4. Сигнальные пути, активируемые факторами роста фибробластов и внеклеточными пуриновыми нуклеотидами, - важные регуляторы раннего развития мозга и регенерации**

Рецепторы факторов роста фибробластов (Fgf), относящиеся к группе тирозинкиназных рецепторов, являются одними из наиболее значимых регуляторов раннего развития мозга и регенерации (Blak et al., 2007; Müller, Meyer, Werner, 2012; Trokovic et al., 2005).

Известно четыре трансмембранных тирозинкиназных Fgf рецептора: FGFR1-4. В структуру FGFR входят внеклеточный домен, один трансмембранный домен и внутриклеточный тирозинкиназный домен. Во внеклеточном домене имеется отщепляемый лидерный пептид для транспорта рецептора к мембране и три иммуноглобулин-подобных домена. Первый иммуноглобулин-подобный домен отделен от двух других, необходимых для взаимодействия с лигандом, участком кислых аминокислот (acid amino acids box). Трансмембранный домен представляет собой альфа спираль, состоящую из неполярных аминокислот. Во внутриклеточном домене находится два каталитических – тирозинкиназных домена (Hongo, Kengaku, Okamoto, 1999).

Для активации FGFR1-4 необходимо взаимодействие FGFR с лигандами - низкомолекулярными секретруемыми белками, факторами роста фибробластов Fgf (Ornitz et al., 1995).

При связывании с лигандами происходит димеризация FGFR и кросс-фосфорилирование тирозина внутриклеточного домена каждого из мономеров (Umbhauer et al., 2000). При этом FGFR1 и FGFR4 при активации способны образовывать как гомо- так и гетеродимеры, а ингибирование функции одного из рецепторов в гетеродимере приводит к снижению функции другого. Интересно также, что из всех FGFR киназная активность наиболее выражена у рецептора FGFR1 (Yamagishi, Okamoto, 2010).

В результате фосфорилирования происходят конформационные изменения в трансмембранном и внутриклеточном доменах FGFR, и последующая активация специфических внутриклеточных сигнальных путей (PLC $\gamma$ , RAS-МАРК, PI3K-АКТ, STAT).

Лиганды Fgf делятся на (1) канонические (Fgf1-10, Fgf16-18, Fgf20, Fgf22) – секретируемые белковые молекулы, которые способны связываться с гепарансульфат протеогликанами внеклеточного матрикса для закрепления у поверхности мембраны, необходимого для последующего взаимодействия с рецептором, и активировать FGFR (Bouleau et al., 2007; Rodriguez-Enfedaque et al., 2009); (2) гормоноподобные (Fgf15, Fgf19, Fgf21, Fgf23) – способные взаимодействовать с рецептором только в присутствии ко-рецептора, например, ко-рецептора Klotho, и диффундирующие на большие расстояния ввиду отсутствия сайтов связывания с гепарансульфатпротеогликанами (Gutiérrez et al., 2008; Potthoff, Kliwer, Mangelsdorf, 2012); (3) внутриклеточные (Fgf11-14), которые не связываются с рецепторами и не активируют их, а выполняют в клетке функции по регуляции ионных (натриевых) каналов (Smallwood et al., 1996).

Показано, что канонические Fgf-лиганды действуют аутокринно или паракринно, гормоноподобные – эндокринно. Основными механизмами действия FGFR, приводящими к активации сигнальных путей, участвующих в осуществлении функций FGFR, являются (1) фосфорилирование PLC - необходимо для осуществления морфогенеза, осуществляется FGFR4 (Umbhauer et al., 2000; Berkeley, Richard, 2012); (2) фосфорилирование MAP



киназы Erk при посредстве малых ГТФаз Ras и Raf – требуется для индукции мезодермы и постериорной части нервной пластинки, осуществляется, главным образом, FGFR1, но в некоторых случаях может также осуществляться FGFR4 (Yamagishi, Okamoto, 2010); (3) фосфорилирование PI3K – приводит к сходным результатам, что и (2), в основном осуществляется FGFR2 (Dufour et al., 2008); (4) фосфорилирование транскрипционных факторов STAT – необходимо для регуляции экспрессии генов, осуществляется FGFR1, FGFR3 (Li et al., 1999).

Кроме того, в ходе недавних исследований был обнаружен представитель FGFR - FGFR1, не обладающий киназной активностью. Установлено, что он является модулятором активности других FGFR, поскольку в его структуре имеется SH-домен, необходимый для связывания фосфорилированного тирозина (Trueb, 2011). Описаны также другие белки, способные взаимодействовать с FGFR и модулировать их активность. Например, белок Sprouty является ингибитором всех тирозинкиназных рецепторов, в том числе FGFR. Два других модулятора FGFR- Dusp6 и Sef – трансмембранные белки, ингибирующие трансдукцию сигнала FGFR, опосредованную малой ГТФазой Ras. При этом описано, что в ингибировании Ras принимает участие внеклеточный домен Sef, тогда как внутриклеточный участвует в ингибировании фосфорилирования FGFR (Camps et al., 1998; Fürthauer et al., 2002; Torii et al., 2004; Tsang et al., 2002).

Белок SCL, как продемонстрировано, индуцирует обусловленную убиквитинилированием деградацию FGFR (Dufour et al., 2008). Ранее упомянутый ко-рецептор – трансмембранный белок Klotho, не обладающий тирозинкиназным доменом, также модулирует активность FGFR, а именно FGFR4 при активации гормоно-подобным лигандом Fgf23 и FGFR1 при активации гормоно-подобными лигандами Fgf19 и Fgf23.

Модулятором, способным оказывать стимулирующее влияние на активность FGFR, является трансмембранный белок XFLRT3 (Böttcher et al., 2004). Стимулирующее влияние XFLRT3 объясняется тем, что

трансмембранный, лейцин-богатый домен XFLRT3 способен усиливать активность MAP-киназного пути, необходимого для индукции мезодермы и постериорной части нервной системы с участием Xbra (Umbhauer et al., 2000).

Таким образом, рецепторы семейства FGFR осуществляют свои функции в развитии нервной системы и регенерации, наиболее важными из которых являются дифференцировка, пролиферация и миграция клеток, путем активации вышеупомянутых сигнальных каскадов и прямого взаимодействия с модуляторами их сигнала (Lea et al., 2009).

Интересно, что в зависимости от активирующегося рецептора, а, следовательно и сигнального пути, в одном и том же зародышевом листке могут формироваться разные типы тканей. Так, активация FGFR1 в эктодерме приводит к индукции мезодермы через активацию Ras-пути, а активация FGFR4 в эктодерме приводит к индукции эпидермиса. В то же время активация FGFR1 в нейроэктодерме поддерживает экспрессию генов семейств Wnt, Engrailed и приводит к расширению зоны среднего мозга посредством MAPK-пути, а активация FGFR4 в нейроэктодерме поддерживает экспрессию генов семейств Hox, Klox и приводит к индукции заднего мозга и спинного мозга (Hongo, Kengaku, Okamoto, 1999).

Результаты последних исследований свидетельствуют о важной роли Fgf и FGFR в развитии нервной системы, в том числе головного мозга. Показано, что на начальных этапах эмбриогенеза они необходимы для экспрессии белков из организатора шпемана (Eng, Ng), которые подавляют сигнал BMP, что приводит к индукции нервной системы (Hongo, Kengaku, Okamoto, 1999). В дальнейшем они регулируют экспрессию маркеров антериорной части нервной системы - Pax, FoxG1, En-2, XeNK-2, и паннейральных маркеров NCAM, Nrр-1, Sox2. На последующих этапах активируемый этими генами Fgf8 (лиганд FGFR4) в зависимости от уровня экспрессии Cerberus способен индуцировать разные отделы переднего мозга. Так, если Fgf8 экспрессируется в одной области с Cerberus, развивается дорсальная часть конечного мозга (маркер –

Emx1), если зона экспрессии Fgf8 свободна от Cerberus, то развивается вентральная часть конечного мозга (маркер – Xnxx2.1) (Lupo et al., 2002).

Помимо формирования нервной системы Fgf и FGFR участвуют в развитии и спецификации мезодермы. Интересно, что для индукции мезодермы необходима более высокая концентрация лигандов Fgf, чем для формирования нервной системы (Hongo, Kengaku, Okamoto, 1999). Было показано, что FGFR участвуют в миогенезе у птиц, регулируя пролиферацию и дифференцировку мышечных клеток. При этом основную роль в пролиферации играет FGFR1, а в дифференцировке - FGFR4 (Marics et al., 2002). Эти данные коррелируют с результатами исследования по регенерации конечностей у аксолотля, которые демонстрируют, что активация FGFR1 в ходе регенерации происходит раньше, чем активация FGFR4 (Kochegarov et al., 2015).

Также установлено, что последовательная активация различных семейств Fgf и FGFR4 в развитии и в ходе регенерации конечности приводит к формированию нервной и мышечной тканей и установлению разметки вдоль антерио-постериорной оси. Так, Fgf10 активирует FGFR2b и Wnt3, которые впоследствии активируют транскрипционные факторы SP6 и SP8, вызывающие экспрессию Fgf4, Fgf8, Fgf9, Fgf17 в AER зоне - апикальной эктодерме формирующейся конечности. В свою очередь Fgf4, Fgf8, Fgf9, Fgf17 активируют экспрессию FGFR1c и FGFR2c (Sun, Mariani, Martin, 2002; Tsang et al., 2002).

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что представители семейства FGF активируются как в ходе эмбриогенеза для осуществления клеточной пролиферации и дифференцировки, разметки тканей, так и у взрослых организмов в процессах репаративной регенерации и поддержания гомеостаза в тканях и органах. В связи с этим, нарушения экспрессии или структуры FGF приводят к физиологическим аномалиям. Например, повышенная экспрессия FGFR4 может вызвать рак яичников, гепатоцеллюлярную карциному, мышечную дистрофию, бронхолегочную дисплазию (Saito et al., 2000; Zaid et al., 2013). Миссенс мутации FGFR4 являются причинами рабдомиосаркомы,

аденоидной кистозной карциномы, рака молочной железы, а один из аллельных вариантов FGFR4 ассоциирован с повышением секреции инсулина и повышенным риском развития диабета (Ezzat et al., 2013; Taylor VI et al., 2009; Thussbas et al., 2006).

Другими рецепторами, которые играют важную роль в эмбриогенезе и регенерации, являются пуриnergические рецепторы. Пуриnergические рецепторы, которые активируются внеклеточным аденозином, делятся на два семейства - P2Y и P2X.

P2Y – белки с семью трансмембранными альфа-спиралями, относящиеся к типу рецепторов, связанных с G-белками (GPCR), и активируемые АТФ, АДФ и АМФ. Рецепторы P2X являются лиганд-управляемыми ионными каналами, которые при активации АТФ пропускают внеклеточные катионы (Khakh, 2001).

Показано, что P2Y и P2X экспрессируются в различных типах тканей (рецепторы P2Y - в нервной системе и в невозбудимых тканях, P2X - преимущественно в возбудимых тканях) и не способны взаимодействовать друг с другом напрямую (Abbracchio, Burnstock, 1994).

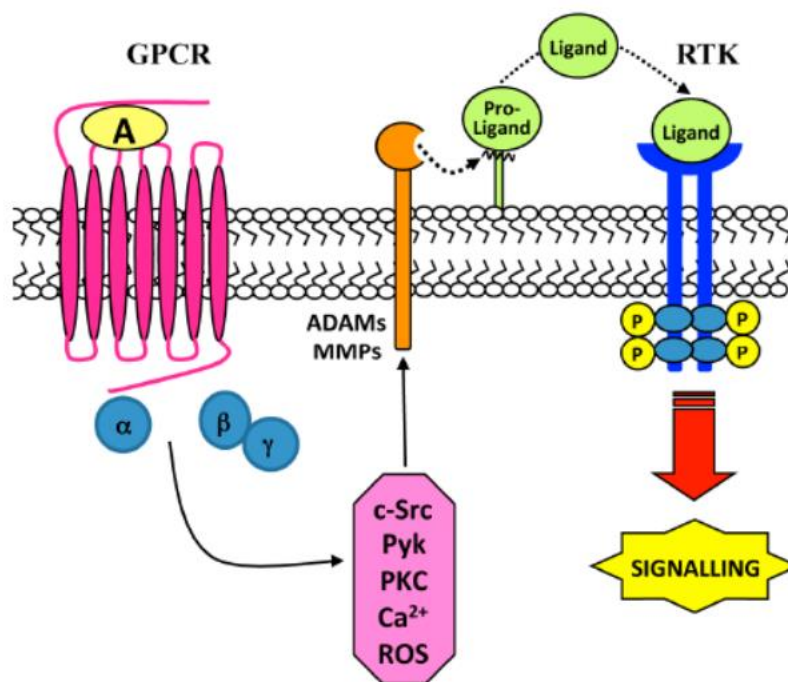
Описано, что в состав P2Y входят внеклеточный N-конец с сайтами гликозилирования, семь трансмембранных альфа-спиралей, три внеклеточные петли, принимающие участие во взаимодействии с лигандом, три внутриклеточные петли, необходимые для взаимодействия с G-белком, внутриклеточный C-конец, содержащий сайты связывания фосфотирозина или сайты фосфорилирования для киназ (Erb, Weisman, 2012).

Как упоминалось, рецепторы P2Y активируются внеклеточными адениновыми нуклеотидами (АТФ, АДФ и АМФ), которые выпускаются из нервных окончаний в везикулах в ответ на механический стресс, гипоксию, вирусные инфекции, сигналы апоптоза (Séror et al., 2011). Концентрация нуклеотидов регулируется эктоэнзимами - ферментами, ассоциированными с P2Y рецепторами и гидролизующими нуклеотиды (Robson, Sévigny, Zimmermann, 2006). Интересно, что в зависимости от активирующего нуклеотида рецепторы P2y1 способны по-разному влиять на агрегацию

тромбоцитов. Так, активация P2ry1 АТФ приводит к ухудшению агрегации тромбоцитов, а АДФ – к улучшению. Вазодилаторную функцию P2ry1 осуществляет только при взаимодействии с АТФ (Hoffmann et al., 1999).

Для дальнейшей передачи сигнала активированные внеклеточными нуклеотидами рецепторы P2Y, как свойственно другим GPCR, формируют гомо- и гетеродимеры с рецепторами адениновых нуклеотидов (Albizu et al., 2010; Milligan et al., 2003). Запускаемые ими сигнальные каскады могут быть (1) кальций-зависимыми, так, передача сигнала рецептора P2ry1 на G-белок приводит к активации PLC $\beta$ , мобилизации внеклеточного Ca<sup>2+</sup> и активации мономерных G-белков RhoA и Rac (Erb, Weisman, 2012; Soulet et al., 2005); (2) кальций-независимыми, опосредованными фосфорилированием ERK1/ERK2 (May et al., 2006).

Показано, что функция многих ионных каналов, молекул клеточной адгезии, тирозинкиназных рецепторов модулируется P2Y (Erb, Weisman, 2012). Возможно, это связано с тем, что P2Y формируют на клеточной мембране сложные белковые комплексы (состоящие преимущественно из P2Y и тирозинкиназных рецепторов), важная роль которых заключается в передаче сигнала от GPCR к RTK путем трансактивации тирозинкиназных рецепторов пуриnergическими (**Рис. 4**).



**Рисунок 4. Лиганд-опосредованная трансактивация рецептора семейства RTK рецептором семейства GPCR (Cattaneo et al., 2014).**

Установлено, что трансактивация тирозинкиназных рецепторов пуриnergическими рецепторами может осуществляться по нескольким механизмам.

(1) Одним из механизмов трансактивации является опосредованная G-белком, связанным с P2Y, активация внеклеточных металлопротеаз MMP и ADAM, которые принимают участие в отщеплении внеклеточной части от связанных с внеклеточным матриксом лигандов тирозинкиназных рецепторов, и тем самым позволяют лигандам активировать тирозинкиназные рецепторы (Kalwa et al., 2014). Так, отщепление протеазой MMP7 внеклеточной части у связывающего гепарин EGF-подобного фактора (НВ-EGF) в клетках стенок сосудов приводит к активации EGFR, вызывающей сужение сосудов (Нao et al., 2004). В то же время активация ADAM10 и ADAM17 необходима для высвобождения EGF и активации им EGFR в ходе регенерации эпителиальной ткани при ранении (Yin et al., 2007).

(2) Кроме того, через P2Y возможна активация внутриклеточных нерцепторных тирозинкиназ (Src, RAFTK, Pyk2), которые, в свою очередь,

запускают фосфорилирование и активацию тирозинкиназных рецепторов (Erb et al., 2006). Примером может служить трансактивация рецептора VEGFR-2 опосредованная рецептором P2Y<sub>2</sub>, которая, как показано, является причиной ангиогенеза при онкологических заболеваниях (Rumjahn et al., 2009), а также трансактивация рецепторов PDGFR и EGFR при регенерации эпителия.

(3) Другой механизм трансактивации основан на запуске ассоциированным с P2Y G-белком производства активных форм кислорода, которые способны окислять фосфатазы и, следовательно, дефосфорилировать тирозинкиназные рецепторы (RTK). В результате равновесие сдвигается в сторону фосфорилированной формы RTK и, таким образом, происходит активация RTK-каскада. Примером такого тирозинкиназного рецептора является Flt3, повышенная активность которого может приводить к развитию заболеваний сердечно-сосудистой системы (Kalwa et al., 2014).

В целом, функции рецепторов P2Y состоят в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, фагоцитоза, секреции, клеточной адгезии и миграции (Lazarowski, Boucher, Harden, 2003). Сравнительно недавно была установлена ключевая роль P2ry1 рецептора в развитии глаз у низших позвоночных (Massé et al., 2007). В связи со способностью пуриnergических рецепторов трансактивировать тирозинкиназные рецепторы, нарушения функций рецепторов P2Y ведут к серьезным аномалиям нервной, сердечно-сосудистой и иммунной систем. Так, показано, что делеция P2ry1 приводит к снижению воспаления сосудов, увеличению массы тела, повышению уровня глюкозы в крови, нарушению развития глиальных клеток (Bringmann et al., 2013; Laplante et al., 2012).

В заключение необходимо отметить, что в нормальном функционировании описанных рецепторов (P2Y и FGFRs), принимающих участие во многих жизненно важных процессах, включая развитие мозга и регенерацию, значимую роль может играть взаимодействие данных рецепторов, возможно, опосредованное другими трансмембранными белками. В связи с тем что это явление изучено недостаточно, требуется проведение дальнейших

исследований, направленных на поиск и исследование функций подобных белков.

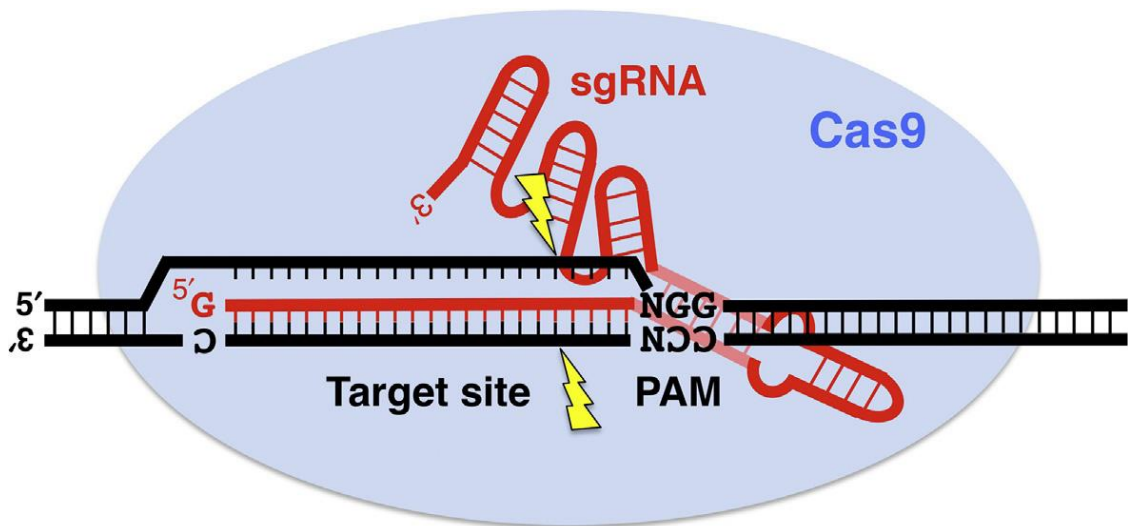
## **2.5. Особенности применения технологии CRISPR/Cas9 генного нокаута на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis***

Известно, что в бактериях *Streptococcus pyogenes* эндонуклеаза Cas9 расщепляет ДНК-мишень путем образования комплекса с двумя небольшими РНК: crРНК, которая имеет комплементарную последовательность к целевой ДНК-мишени, и tracrРНК. Для эффективного расщепления ДНК-мишени, за целевым сайтом на этой ДНК должна находиться последовательность, называемая protospacer - дополнительная последовательность, т.н. PAM мотив. PAM мотив имеет последовательность NGG (где N может быть любым нуклеотидом). Роль PAM-мотива для Cas9 может также играть последовательность NAG, хотя ее эффективность оказывается ниже, чем у последовательности NGG (Anders et al., 2014; Terns, Terns, 2014). После Cas9-опосредованного расщепления ДНК, двунитевые разрывы часто несовершененно восстанавливаются, что может приводить к сбою рамки считывания и, как следствие, полному нокауту целевого гена (**Рис. 5**).

Для удобства, crРНК, включающая комплементарную последовательность к целевой ДНК-мишени, может быть объединена с tracrРНК, в результате чего образуется одна кассета – т.н. гидовая РНК (sgРНК) (Hwang et al., 2013; Mali et al., 2013; Yang et al., 2013).

Во многих случаях эксперименты по редактированию генома у млекопитающих проводятся на эмбриональных стволовых клетках, растущих в культуре. При этом клетки ко-трансформируются плазмидами, экспрессирующими sgРНК и белок Cas9. Затем, после соответствующей селекции, клетки с мутантным целевым геном вводятся в бластоцисту с последующим получением химерных животных, продуцирующих половые клетки, несущие соответствующую мутацию.





**Рисунок 5. Схема мутации целевой последовательности с помощью системы CRISPR/Cas9 (Nakayama et al., 2014).**

В случае холоднокровных животных такая технология не представляется возможной ввиду отсутствия у них аналогов ES клеток. Однако, у них возможен другой, даже более эффективный подход, основанный на микроинъекциях в оплодотворенную яйцеклетку или в отдельные клетки раннего дробящегося эмбриона готовой синтетической sgРНК в смеси либо с мРНК Cas9, либо непосредственно с очищенным рекомбинантным белком Cas9 (Blitz et al., 2013; Guo et al., 2014; Nakayama et al., 2013; Nakayama et al., 2014). При этом синтетическая sgРНК может быть получена на основе ДНК фрагментов, несущих промотор T7 или SP6 полимеразы и полученных в результате ПЦР на основе предварительно синтезированных олигонуклеотидов (Nakayama et al., 2013). Все это значительно упрощает процедуру получения нокаутных эмбрионов, так как позволяет полностью исключить трудоемкую стадию создания плазмидных конструкций.

Однако, несмотря на указанные преимущества, данный подход CRISPR/Cas9 нокаута до сих пор использовался в основном на лягушках вида *Xenopus tropicalis*, обладающих диплоидным геномом, но еще сравнительно редко применялся на таком, более удобном для экспериментальной биологии развития объекте, как шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*). Отчасти это обусловлено тем, что *Xenopus laevis*, несмотря на очевидные преимущества -

крупные эмбрионы, легкость содержания, выращивания и проведения различных микроопераций, обладает псевдотетраплоидным геномом, сиквенс которого до недавнего времени не был известен в достаточной мере. В результате во многих случаях не представлялось возможным нокаутировать одновременно сразу два псевдоаллеля того или иного гена, что является необходимым условием таких экспериментов. Однако, опубликование в недавнее время полного геномного сиквенса *Xenopus laevis* сделало возможным проведение первых работ по CRISPR/Cas9 нокауту на этом объекте (Banach, Edholm, Robert, 2017; DeLay et al., 2018; McQueen, Pownall, 2017; Wang et al., 2015).

Полученные эмбрионы обычно являются мозаичными. При этом клетки, несущие мутантные аллели целевого гена и клетки с немутантными аллелями, присутствуют в различных пропорциях. Важно, чтобы нокаутные эмбрионы могли быть отобраны по фенотипу, а затем генотипированы уже в первом поколении. В дальнейшем, на основе таких эмбрионов, в зависимости от их жизнеспособности, могут быть созданы линии лягушек, имеющие нокаутные мутации по целевым генам во всех своих клетках. В случае же летальных мутаций, на основе генотипирования сначала могут быть отобраны гетерозиготные особи, на основе потомства которых в дальнейшем могут быть созданы гомозиготные мутанты.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Первичная структура белка *c-Answer*

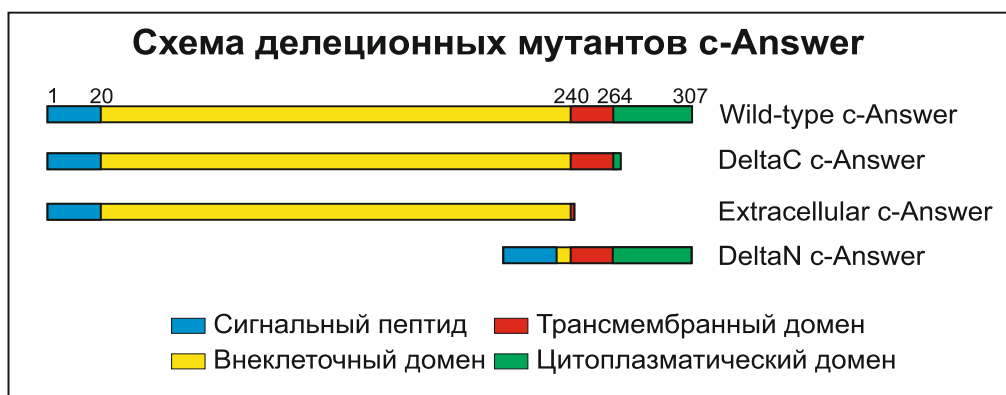
На основании анализа баз данных GenBank была реконструирована последовательность нуклеотидов, соответствующая полноразмерной кДНК *c-answer* у *X.laevis*, и установлено, что ген *c-answer* состоит из 7 экзонов и кодирует белок из 307 аминокислот, массой приблизительно 35 кДа.

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

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

В примембранной части внутриклеточного домена *c-Answer* содержит маркер локализации в мембранных рафтах. У *X.laevis* он представлен мотивом RHRRR и полностью идентичен известному мотиву, содержащемуся в CD4 ко-рецепторе T-клеточного рецептора и необходимому для локализации CD4 на плазматической мембране (Porik, Alce, 2004). Необходимо отметить, что у других видов холоднокровных, прим. *X.tropicalis*, *c-Answer* содержит мотив

RHRKK, который не является идентичным известному домену CD4, однако, учитывая, что замена положительно заряженного аргинина (R) на лизин (K)-эквивалента, предположительно, выполняет ту же функцию.



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

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

В ходе поиска гомологов c-Answer среди аннотированных белков, проведенного с помощью пакета программ BLAST, обнаружено, что ближайшим гомологом c-Answer является один из четырех рецепторов факторов роста фибробластов - FGFR4 (26% идентичных аминокислот) (**Рис. 1.2**).

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

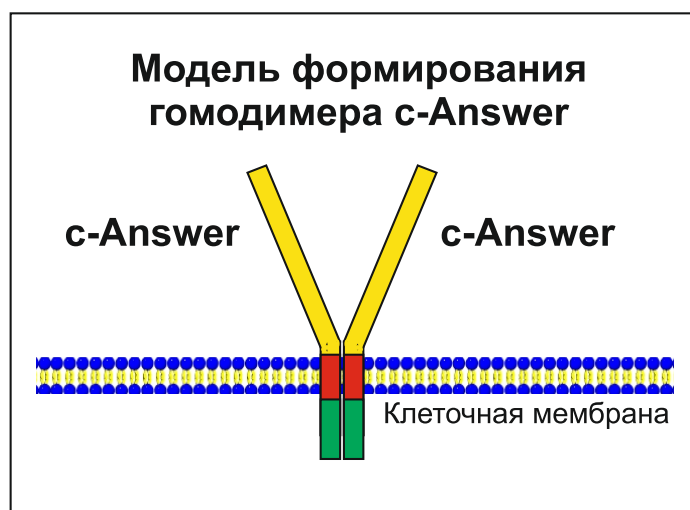


**Рисунок 1.2. Выравнивание белковой последовательности c-Answer с его ближайшим гомологом FGFR4 (26% идентичности).**

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

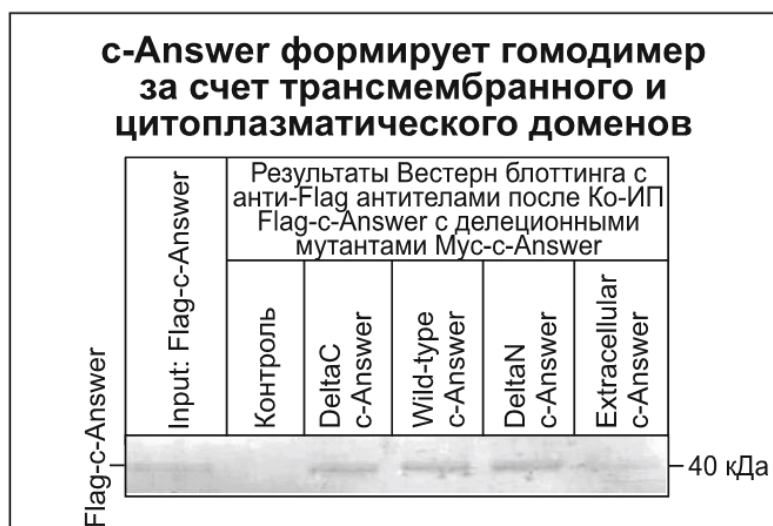
При этом у c-Answer, в отличие от FGFR4, отсутствует характерный для Fgf рецепторов и необходимый для фосфорилирования тирозинкиназный домен во внутриклеточной части. Потенциальная мишень для фосфорилирования у c-Answer представлена одним остатком тирозина (Y288) во внутриклеточном домене. Кроме того,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

Поскольку в состав c-Answer входит нечетное число остатков цистеина, мы предположили, что, подобно рецепторам FGFRs, c-Answer способен к формированию гомодимера (Рис. 1.3).



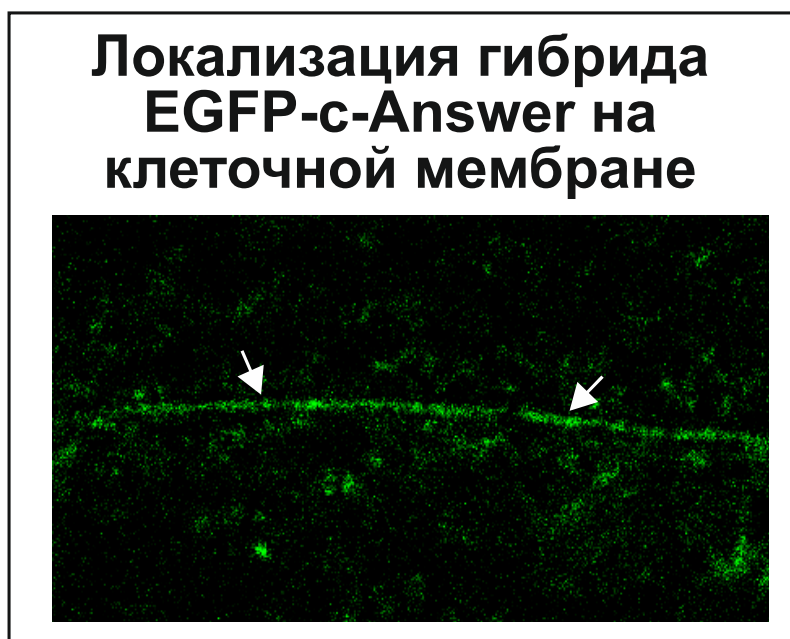
**Рисунок 1.3. Модель формирования гомодимера c-Answer на клеточной мембране.**

С помощью ко-иммунопреципитации с последующим Вестерн-блоттингом полноразмерного c-Answer, меченного MYC, и его делеционных мутантов (deltaN-c-Answer, deltaC-c-Answer, extracellular-c-Answer), меченных FLAG, мы выяснили, данный белок способен образовывать гомодимер, который формируется в основном благодаря взаимодействию внутриклеточного и трансмембранного доменов c-Answer (Рис. 1.4).



**Рисунок 1.4. Результаты Вестерн-блоттинга для установления вовлеченных в формирование гомодимера доменов c-Answer.**

Мембранная локализация с-Answer подтверждена с помощью конфокальной микроскопии клеток нейроэктодермы эмбрионов шпорцевой лягушки, экспрессирующих гибридный белок с-Answer и EGFP. Кроме локализации на цитоплазматической мембране, присутствие с-Answer было выявлено во внутриклеточных структурах, вероятно, соответствующих комплексу Гольджи и лизосомам (Рис. 1.5).



**Рисунок 1.5. Локализация с-Answer (EGFP-с-Answer) на субклеточном уровне (результаты конфокальной микроскопии).**

### 3.2. Экспрессия *c-Answer* в эмбриогенезе и в процессе регенерации конечностей и хвоста головастика

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

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

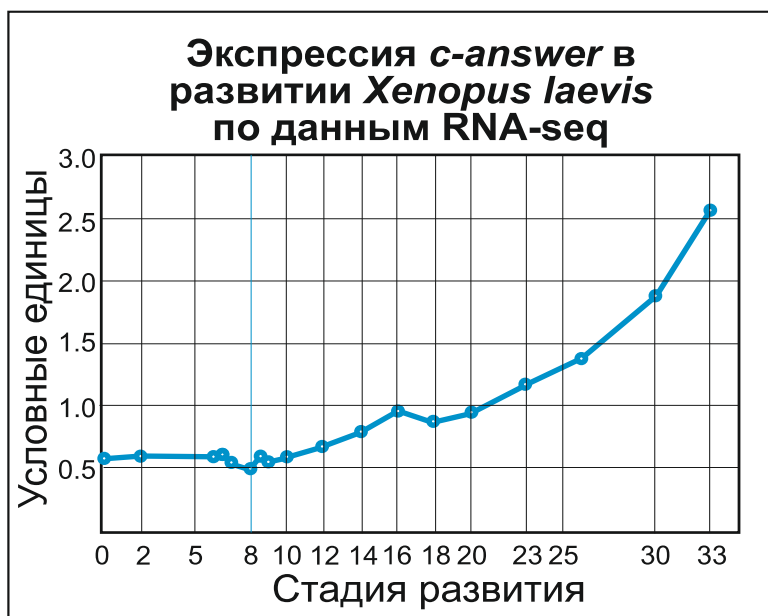


Рисунок 2.1. Экспрессия *c-answer* в ходе эмбриогенеза *Xenopus laevis* (данные транскриптомного секвенирования (Yanai et al., 2011)).



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

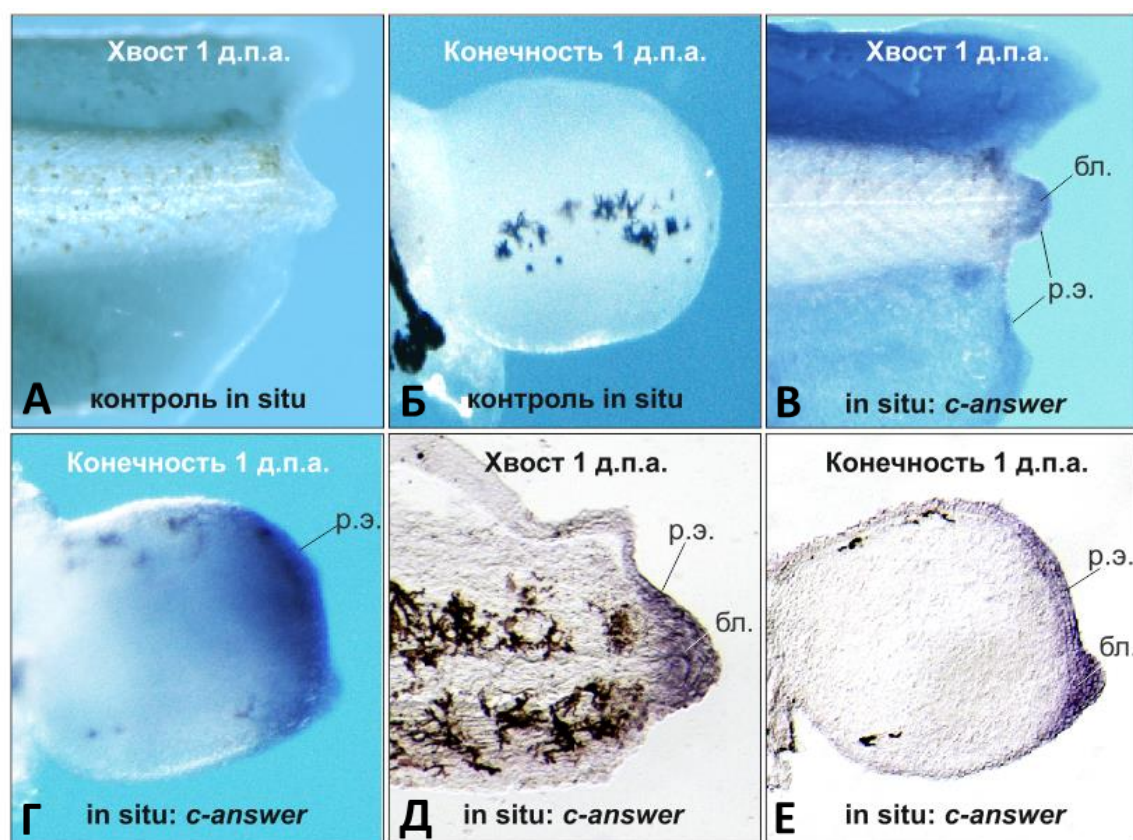


**Рисунок 2.2.** Экспрессия *c-answer* у эмбриона на стадии ранней нейрулы (результаты гибридизации *in situ* с зондом к мРНК *c-answer*; тотальный препарат (слева) и сагиттальный срез (справа)); п.н.в. – передний нервный валик, н.п. – нервная пластинка, т.мзд. – тангенциальная мезодерма.

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

Результаты гибридизации *in situ* показали, что экспрессия *c-answer* достигает максимального уровня в раневом эпителии и бластеме регенератов

конечностей и хвоста головастиков на первый и второй дни после ампутации. При этом в день ампутации (контроль) и на пятый день после ампутации в бластеме и раневом эпителии содержится существенно меньше транскриптов *c-answer* (Рис. 2.3).



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

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

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

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

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

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

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

Данные количественной ОТ-ПЦР подтверждают результаты гибридизации *in situ*, свидетельствуя об активации данного гена на первый день после ампутации и постепенном снижении количества его мРНК до базового уровня к пятому дню после ампутации (Рис. 2.4).

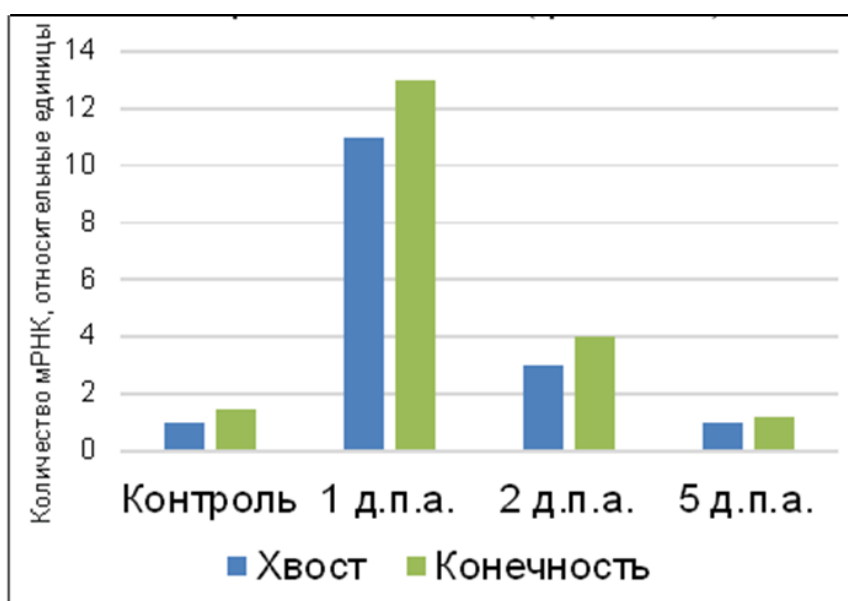
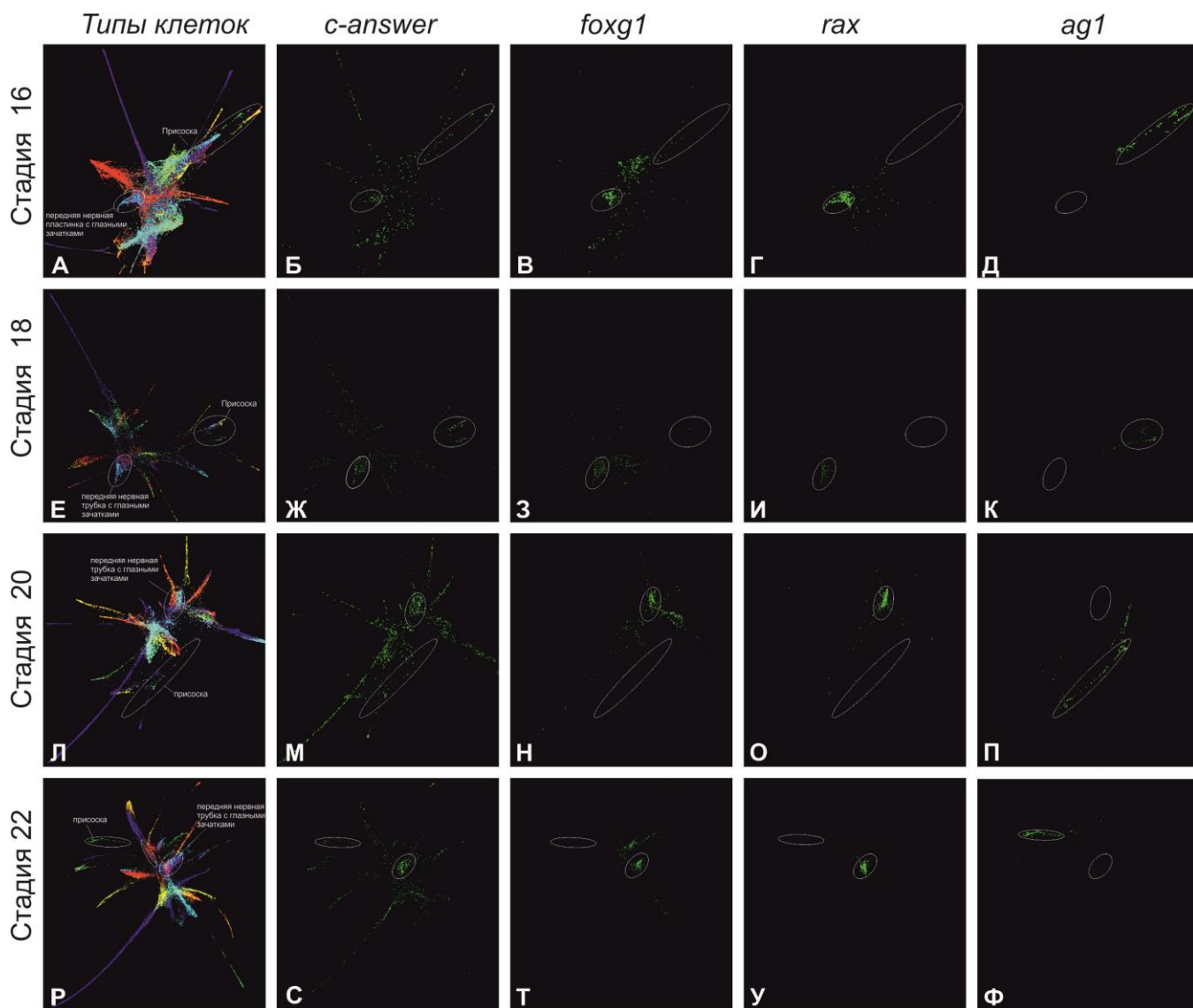


Рисунок 2.4. Экспрессия *c-answer* на ранних этапах (0 (контроль), 1, 2, 5 дни после ампутации) регенерации хвоста и конечностей головастиков шпорцевой лягушки (результаты ОТ-ПЦР).

Согласно базе данных транскриптомного секвенирования на уровне одной клетки для зародышей *Xenopus laevis* ([https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/currentDatasetsList\\_xenopus\\_v2.html](https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/currentDatasetsList_xenopus_v2.html); (Briggs et al., 2018)), *c-answer* экспрессируется на низком уровне относительно равномерно по всему зародышу и присутствует во всех зародышевых листках (эктодерма, мезодерма, энтодерма). В некоторых тканях, в частности в зачатках переднего мозга, глаз и присоски наблюдаются кластеры клеток с повышенным уровнем экспрессии *c-answer*. При этом те же самые кластеры клеток

экспрессируют гены-маркеры соответствующих анатомических структур: *foxd1* (передний нервный валик, теленцефалон, глаза и жаберные дуги), *rax* (передний нервный валик, зачатки глаз) и *ag1* (присоска и железа вылупления) (Рис. 2.5).



**Рисунок 2.5.** Распределение клеток, экспрессирующих *c-answer*, маркеры переднемозговых структур *foxd1* и *rax* и маркер присоски *ag1* по данным транскриптомного секвенирования на уровне одной клетки на стадиях 16, 18, 20 и 22 (Briggs et al., 2018).

А. Стадия 16, все клетки эмбриона распределены согласно сходству по профилям экспрессии, кластеризованы и окрашены в соответствии с популяцией, к которой они относятся. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

Подробная

легенда:

[https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer\\_1\\_6\\_dev.html?cgibin/client\\_datasets/xenopus\\_embryo\\_timecourse\\_v2/S16](https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_dev.html?cgibin/client_datasets/xenopus_embryo_timecourse_v2/S16).

**Б.** Стадия 16, клетки, экспрессирующие *c-answer*, окрашены зеленым. Интенсивность окрашивания прямо пропорционально зависит от числа молекул *c-answer* мРНК, содержащихся в данной клетке. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**В.** Стадия 16, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *foxg1*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Г.** Стадия 16, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Д.** Стадия 16, клетки, экспрессирующие ген-маркер присоски *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Е.** Стадия 18, все клетки эмбриона распределены согласно сходству по профилям экспрессии, кластеризованы и окрашены в соответствие с популяцией, к которой они относятся. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

Подробная

легенда:

[https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer\\_1\\_6\\_dev.html?cgibin/client\\_datasets/xenopus\\_embryo\\_timecourse\\_v2/S18](https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_dev.html?cgibin/client_datasets/xenopus_embryo_timecourse_v2/S18).

**Ж.** Стадия 18, клетки, экспрессирующие *c-answer*, окрашены зеленым. Интенсивность окрашивания прямо пропорционально зависит от числа молекул *c-answer* мРНК, содержащихся в данной клетке. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**З.** Стадия 18, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *foxg1*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**И.** Стадия 18, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**К.** Стадия 18, клетки, экспрессирующие ген-маркер присоски *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Л.** Стадия 20, все клетки эмбриона распределены согласно сходству по профилям экспрессии, кластеризованы и окрашены в соответствие с популяцией, к которой они относятся. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз. Подробная легенда: [https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer\\_1\\_6\\_dev.html?cgibin/client\\_datasets/xenopus\\_embryo\\_timecourse\\_v2/S20](https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_dev.html?cgibin/client_datasets/xenopus_embryo_timecourse_v2/S20).

**М.** Стадия 20, клетки, экспрессирующие *c-answer*, окрашены зеленым. Интенсивность окрашивания прямо пропорционально зависит от числа молекул *c-answer* мРНК, содержащихся в данной клетке. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Н.** Стадия 20, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *foxg1*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**О.** Стадия 20, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**П.** Стадия 20, клетки, экспрессирующие ген-маркер присоски *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Р.** Стадия 22, все клетки эмбриона распределены согласно сходству по профилям экспрессии, кластеризованы и окрашены в соответствие с популяцией, к которой они относятся. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз. Подробная легенда: [https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer\\_1\\_6\\_dev.html?cgibin/client\\_datasets/xenopus\\_embryo\\_timecourse\\_v2/S22](https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_dev.html?cgibin/client_datasets/xenopus_embryo_timecourse_v2/S22).

**С.** Стадия 22, клетки, экспрессирующие *c-answer*, окрашены зеленым. Интенсивность окрашивания прямо пропорционально зависит от числа молекул *c-answer* мРНК, содержащихся в данной клетке. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Т.** Стадия 22, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *foxg1*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**У.** Стадия 22, клетки, экспрессирующие ген-маркер переднего мозга и глазных зачатков *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

**Ф.** Стадия 22, клетки, экспрессирующие ген-маркер присоски *rax*, окрашены зеленым. Белым обведены клетки, соответствующие нервной пластинке и зачатку глаз.

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

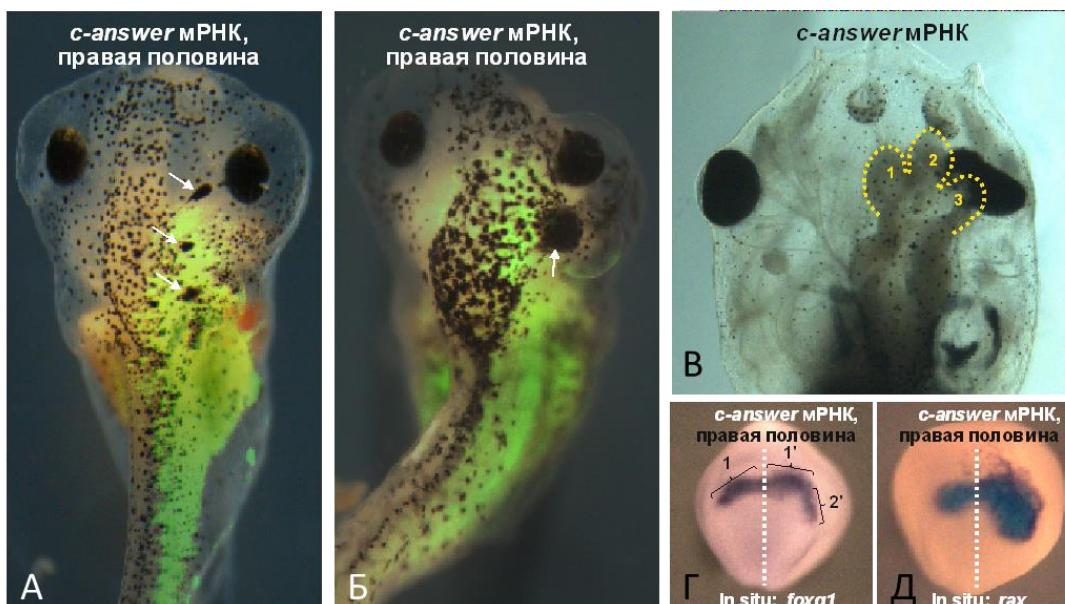
Для установления функции *c-answer* в формировании и развитии нервной системы был проведен ряд *in vivo* экспериментов по активации/ блокированию функции данного гена.

#### **Эффекты оверэкспрессии мРНК *c-answer* и мРНК делеционных мутантов *c-answer***

Активацию трансляции *c-Answer* осуществляли с помощью инъекций в эмбрионы синтезированных *in vitro*, кэпированных *c-answer* мРНК, *deltaC-c-answer* мРНК, *deltaN-c-answer* мРНК, *extracellular-c-answer* мРНК.

Показано, что оверэкспрессия *c-Answer* в зародышах приводит к аномалиям развития головных структур, в частности к увеличению конечного мозга, редко к развитию дополнительных долей конечного мозга. У головастика с искусственно активированной трансляцией *c-Answer* отмечено разрастание пигментного эпителия сетчатки, формирование эктопических глаз (Рис. 3.1 А-В).





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

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

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

**В.** Результаты инъектирования *c-answer* мРНК в оба бластомера на стадии 2х бластомеров.

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

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

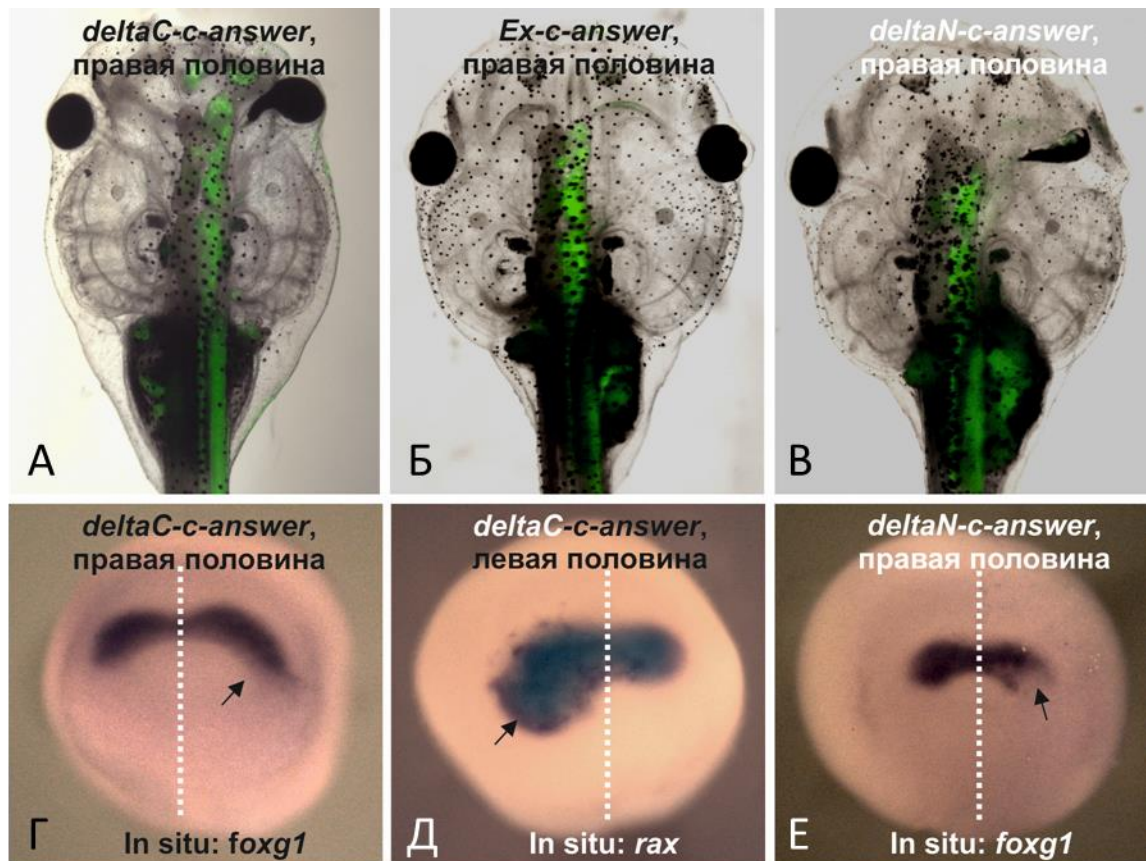
При оверэкспрессии *deltaC-c-answer* мРНК наблюдали эффекты сходные с эффектами оверэкспрессии *c-answer* мРНК – увеличение теленцефалона, (n=75, 75%), эктопическая дифференцировка глазного эпителия (n=83, 65%), увеличение глаза со стороны инъекции (**Рис. 3.2 А**).

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

Соответственно, оверэкспрессия мутанта *deltaC-c-Answer* вызывала расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга и глаз на инъецированной половине зародыша: *foxg1* (n= 60, 78%), *raxb* (n= 55, 75%) и *rax* (n= 58, 80%) (**Рис. 3.2 Г, Д**).

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

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



**Рисунок 3.2. Результаты оверэкспрессии делеционных мутантов *c-Answer* в эмбриональном развитии: увеличение переднего мозга и расширение зон экспрессии генов-маркеров переднего мозга и глаз, *foxg1* и *rax*, соответственно, при оверэкспрессии мРНК *deltaC-c-answer*; уменьшение мозга, глаза и сужение зоны экспрессии гена-маркера переднего мозга *foxg1* при оверэкспрессии мРНК *deltaN-c-answer*.**

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

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

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

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

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

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

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

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

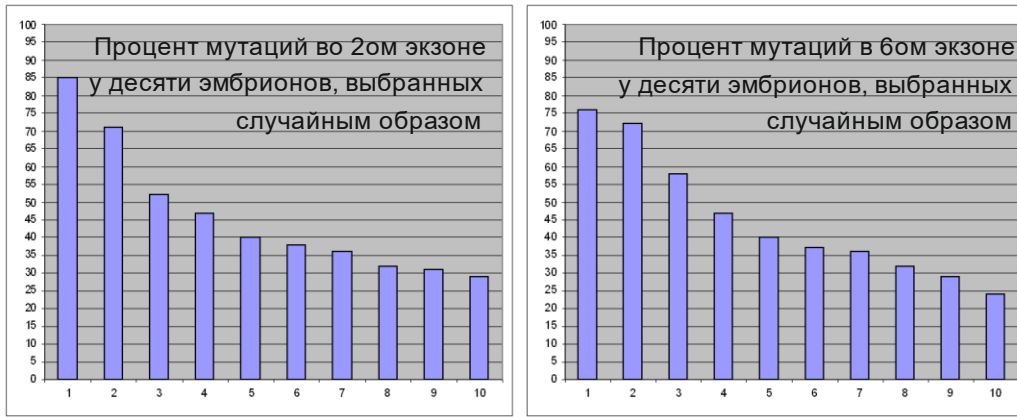
Подавление экспрессии гена *c-answer* было проведено с помощью системы CRISPR/Cas9. Нами было создано две конструкции для нокаута – для 2-го и 6-го экзонов (**Рис. 3.3**).

ccacgcgctccgcaaa **atg** aaggcgggtgttgctgctgttccttgtgtctgtgctgtgttc  
 M K A V L C L F L V S V L C F  
 ttccaagcacatgggg **agactcccg** tcggttcaaattatcgggtcca **gagtaccagttctg**  
 F Q A H G E T P D V Q I I G P E Y P V L  
 gaaggagacgatgtcacattggagtggttcctcaagcagtgactctgatatgagacatttt  
 E G D D V T L E C S S S S D S D M R H F  
 gctttccaanaatacagca **agtggatgaatcggttggttgagctggatacagtccggttat**  
 A F Q K Y S K W M N R W F E L D T V R Y  
 ttccgatgctggtattacaacctgaatgtatctcgtgaagggggcgactgcttatgcag  
 F R C W Y Y N L N V S R E G G R L L M Q  
 ctcaatgacgtctctgagtggcagaagggcccttaccgatgtgtctcctccgacgacaac  
 L N D V S E W Q K G P Y R C V S S S D D N  
 tttaccgatgtggtagtttctgaaaactttaccctttactgtgtatt **acctgcgggacatc**  
 F T D V V V S E N F T F T V Y Y L R D I  
 tatcttcagcgtgccaaactcctggagccctagcgtggcagattatctgctggtggaggaa  
 Y L Q R A N S W S P S V A D Y L L V E E  
 ggatctgatgtggagattaaatgttctgcctccgctgaccaggaaccctttatgaatgg  
 G S D V E I K C S A S A D Q E P F Y E W  
 agtaaggag **ttcagtgattggagctgggaatatgacaccctcacactcaccaacgtggac**  
 S K E F S D W S W E Y D T L T L T N V D  
 cggtcagatgctggaatgtacacttgacggcttaccactcggatagccaagtatagtc  
 R S D A G M Y T C T A Y H S D M P S I V  
 aagaagaaaaccttccagttgctgctggtgccaanaagctcttcaatctcatttg **ctggc**  
 K K K T F Q L R V V P K S S S I S F A G  
 ctgagctcggagatactcctgctctactttgtcgtcctactgtatcacttctgctcctc  
 L S L G D **I L L Y F V A P T V S L L L L**  
 gtcatcacgctcatcgtctt gatcatccgtcaccgcagac **ggcaaatgaagaaccacaa**  
 V I T L I V F I I R H R R R Q M K K P Q  
 atcagcct **gatagagactgagaaaaggacccccatctataaaggcagcagtcagtcctgtg**  
 I S L I E T E K R T P I Y K G S S Q S V  
 tgtagcaccacttctgacacacagccctggtcatg **taa**

**Рисунок 3.3. Целевые сайты во 2<sup>ом</sup> и 6<sup>ом</sup> экзонах *c-answer* для нокаута *c-answer* с помощью системы CRISPR/Cas9 (целевая последовательность выделена рамкой, PAM-сайт подчеркнут).**

Нокаут по второму экзону позволял полностью инактивировать работу гена *c-answer*, а нокаут по шестому экзону (содержащему трансмембранный домен) позволял получить мутантный белок с-Answer, содержащий только внеклеточную часть. В обоих случаях мутации приводили к аномалиям развития эмбрионов и уменьшению общих размеров головастиков с небольшой частотой (21% и 23% соответственно). При этом у эмбрионов, ницецированных только гидовой РНК или белком Cas9 или некодирующей РНК в смеси с белком Cas9 подобных эффектов не наблюдалось, что говорит о специфичности полученных результатов.

Частота мутаций для 10 выбранных случайным образом эмбрионов, валидированная методом транскриптомного секвенирования, составила: для мутации во 2-м экзоне: 85, 71, 52, 47, 40, 38, 36, 32, 31, 29 (среднее 46); для мутации в 6-м экзоне 76, 72, 58, 47, 40, 37, 36, 32, 29, 24 (среднее 45) (**Рис. 3.4**).



Примеры делеций во 2ом экзоне		Δ п.о.
TTTCAGAGACTC CCGACGTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		
TTTCAGAGACTC CCGACG-----GGTCCAGAGTACCCAGT		-11
TTTCAGAGACTC CCGA-----CAGT		-26
TTTCAGAGACTC CCGA-----CGGTCC AGAGTACCCAGT		-12
TTTCAGAGACTC -----TTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		-6
TTTCAGAGACTC CCGA-GTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		-1
TTT-----CAGAGTACCCAGT		-30
TTTCAGAGAC -----TTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		-8
TTTCAGAGAC -----TCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		-9
TTTCAGAGACTC C-----CAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		-7
TTT-----ACGTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		-12

(PAM-сайт выделен красным, целевая последовательность - зеленым, инсерции синим)

Примеры инсерций во 2ом экзоне		Δ п.о.
TTTCAGAGACTC CCGACGTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		
TTTCAGAGACTC CCGACGTTCA GAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+1
TTTCAGAGACTC CCGACGACTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+2
TTTCAGAGACTC CCGACCCGAGACCG GTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+9
TTTCAGAGACTC CCGACGTTCAAAT C TATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+1
TTTCAGAGACTC CCGACGATCATA TTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+7
TTTCAGAGACTC CCGACCTGTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+2
TTTCAGAGACTC CCTTCACAAAAGAAGAATT GACGTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+17
TTTCAGAGACTC CCGTTTCCACGTTCAAATTATCGGTCC AGAGTACCCAGT		+5

Примеры делеций в 6ом экзоне		Δ п.о.
TCTCGGAGATAT CCTGCTCTACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		
TCTCGGAGATAT CCT-----CTTC		-28
TCTCGGAGATAT CCTGC-----ACTTC		-25
TCTCGGAGATAT CCTGCTCT-----TATCACTTC		-18
TCTCGGAGATA -----CCTACTGTATCACTTC		-20
TCTCGGA -----ACTGTATCACTTC		-27
TCTCGGAGATAT CCTGC-----GCTCCTACTGTATCACTTC		-11
TCTCGGAGATAT CCTG-----TGTCGCTCCTACTGTATCACTTC		-8
TCTCGGAGATAT CCTGC-----CGCTCCTACTGTATCACTTC		-10
TCTCGGAGATAT CCTG-----TTTGTGCTCCTACTGTATCACTTC		-6
TCTCGGAGATAT C-----TGTCGCTCCTACTGTATCACTTC		-11

(PAM-сайт выделен красным, целевая последовательность - зеленым, инсерции синим)

Примеры инсерций в 6ом экзоне		Δ п.о.
TCTCGGAGATAT CCTGCTCTACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		
TCTCGGAGATAT CCTGCAGGAGGTAAGAAGTT TCTACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		+14
TCTCGGAGATAT CCTGCTAGAGGTAAG C TACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		+9
TCTCGGAGATAT CCTGCTCAGAGGA TACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		+6
TCTCGGAGATAT CCTGCTAACACTACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		+4
TCTCGGAGATAT CCTGAGCTCTACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		+2
TCTCGGAGATAT CCTGCATCTACTTTGTCGCTCCTA CTGTATCACTTC		+1

**Рисунок 3.4. Частота мутаций в последовательности *c-answer* для 2го и 6го экзонов в результате нокаута *c-answer* с помощью системы CRISPR/Cas9. Примеры инсерций и делеций, полученных в результате нокаута *c-answer* с помощью системы CRISPR/Cas9.**

Сравнительно низкий процент видимых эффектов от мутаций можно объяснить тем, что общее число клеток с мутантной копией гена у зародышей редко составляет более 70%.

Таким образом, в результате ингибирования функции *c-answer* обоими способами наблюдали уменьшение переднеголовных структур (конечного мозга и глаз) у головастиков (Рис. 3.5).



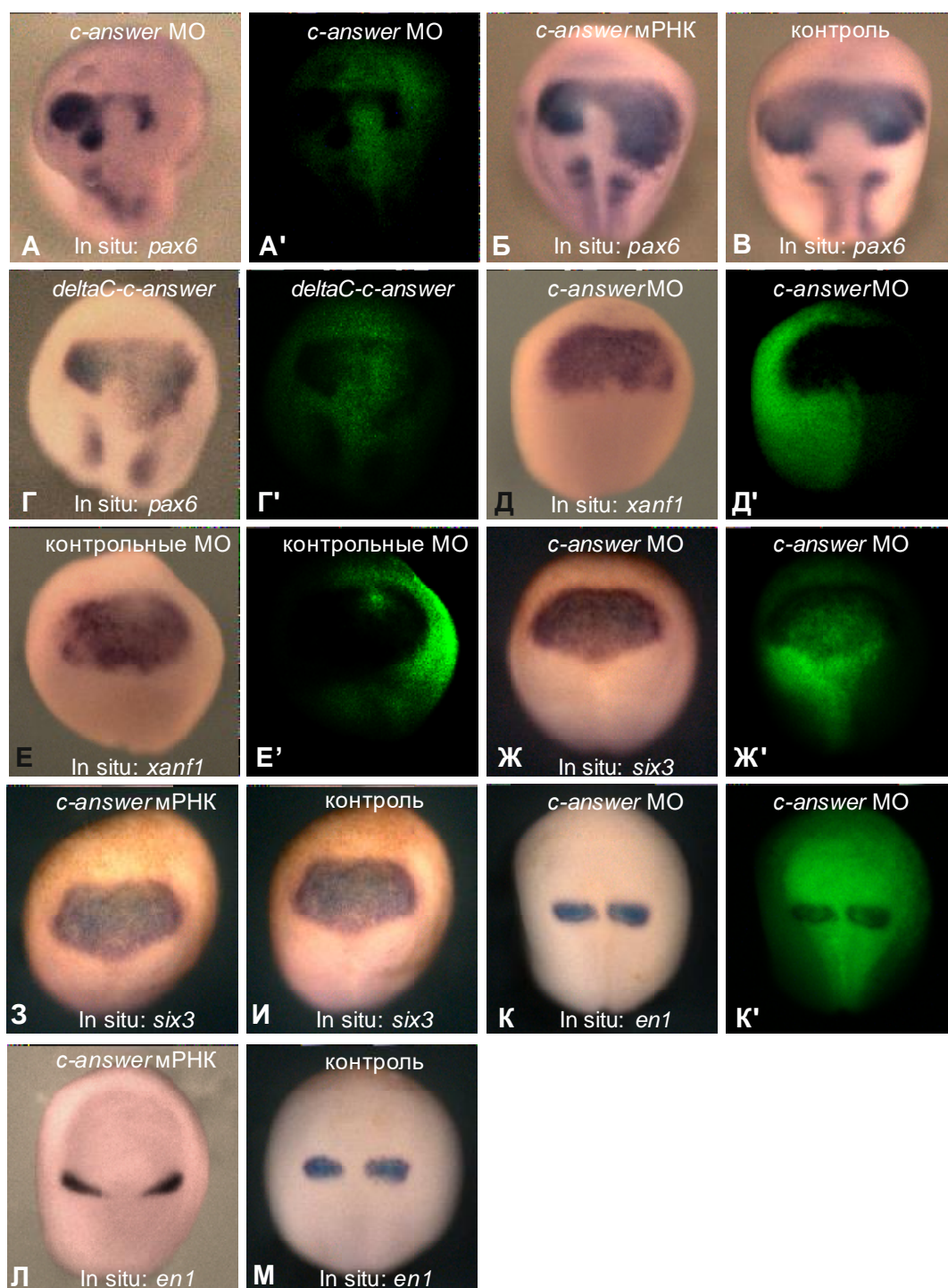
**Рисунок 3.5. Эффекты нокдауна и нокаута *c-answer* с помощью МО *c-answer* и системы CRISPR/Cas9, соответственно, на развитие мозга и глаз у головастиков.**

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

Для определения возможных молекулярных механизмов развития наблюдаемых аномалий у эмбрионов с активированной/ подавленной экспрессией *c-answer* методом гибридизации *in situ* изучали изменение экспрессии следующих генов-маркеров развития мозга: *raxb*, *rax*, *otx*, *engrailed*, *fgf8*, *six3*, *xanf1*. Показано, что *c-Answer* влияет на экспрессию гомеобоксных генов-регуляторов развития глаз *raxb*, *rax*; и гена-индуктора конечного мозга, фактора роста фибробластов *fgf8*. При этом активация функции *c-answer*, либо



инъекция *deltaC-c-answer* мРНК/ *extracellular-c-answer* мРНК вызывает усиление экспрессии некоторых генов (Рис. 3.1 Г, Д; Рис. 3.2 Г, Д; Рис. 3.6 Б, Г, Г'), а ингибирование *c-answer* с помощью МО *c-answer*, либо инъекция *deltaN-c-answer* мРНК приводит к ее подавлению (Рис. 3.2 Е; Рис. 3.6 А, А'). Тем не менее для некоторых генов изменения зоны экспрессии при подавлении или активации функции *c-answer* не происходит (Рис. 3.6 Д, Д', Ж, Ж', К, К', Л).



**Рисунок 3.6. Результаты гибридизации *in situ* с зондами к указанным генам на эмбрионах, инъецированных *c-answer* МО или *c-answer* мРНК или мРНК делеционных мутантов *c-answer*.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.4. Исследование физиологической функции *c-Answer* в процессе регенерации

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

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

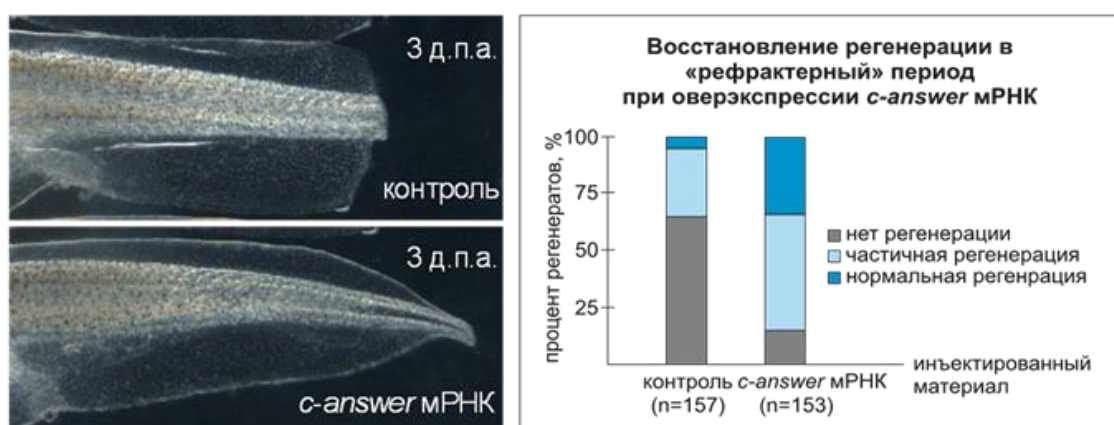
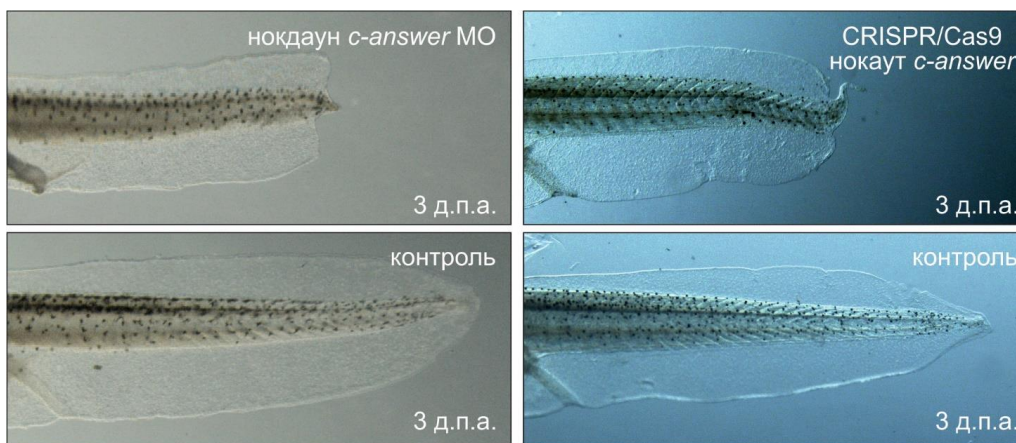


Рисунок 4.1. Восстановление регенерации хвоста в «рефрактерный» период в результате оверэкспрессии *c-answer* мРНК.

Для изучения влияния делеционных мутантов *c-Answer* на регенерацию, хвосты головастикам ампутировали на стадиях 40-44, когда головастики в норме способны регенерировать хвосты в течение шести дней после ампутации.

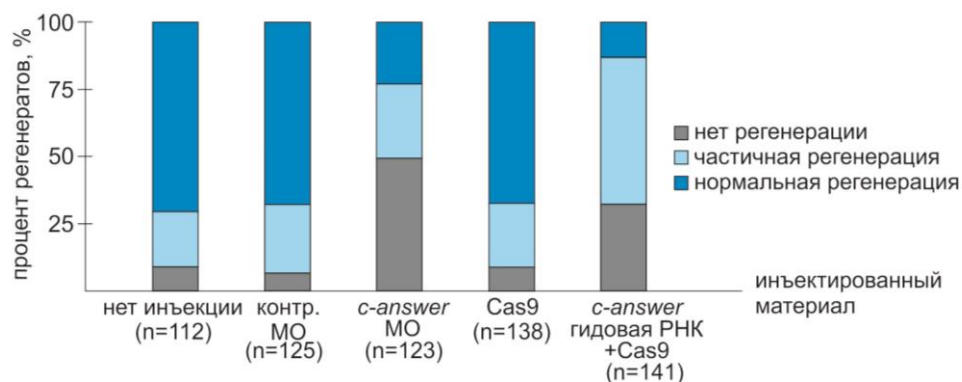
Состояние регенератов оценивали на третий день после ампутации. У головастиков, инъецированных *deltaC-c-answer* мРНК, наблюдалось ингибирование регенерации (28% полное ингибирование регенерации, 54% частичная регенерация (регенерирует один из плавников или только хорда, морфология регенерата существенно нарушена), 18% нормальная регенерация; 36/70/24). При этом у головастиков, оверэкспрессирующих *extracellular-c-Answer*, который отличается от *deltaC-c-Answer* отсутствием трансмембранного домена, регенерация проходила нормально, ингибирования регенерации отмечено не было. Головастики, инъецированные *deltaN-c-answer* мРНК, продемонстрировали ингибирование регенерации (24% полное ингибирование регенерации, 49% частичная регенерация (плавник/ хорда), 27% нормальная регенерация; 29/59/32).

В ходе эксперимента по влиянию блокирования функции *c-answer* на регенерацию у головастиков, инъецированных *c-answer* МО/ гидовой мРНК *c-answer*+белком Cas9, ампутировали хвосты на стадиях 40-44, когда головастики в норме способны регенерировать хвосты в течение шести дней после ампутации. Состояние регенератов оценивали на третий день после ампутации. В результате у головастиков с подавленной с помощью *c-answer* МО функцией *c-Answer* отмечали снижение способности к регенерации или полное ингибирование регенерации. При этом у головастиков, инъецированных *mis-c-answer* МО (антисмысловыми морфолиновыми олигонуклеотидами к *c-answer* мРНК с внесенными нуклеотидными заменами) и служивших контролем, наблюдалась нормальная регенерация (Рис. 4.2).



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

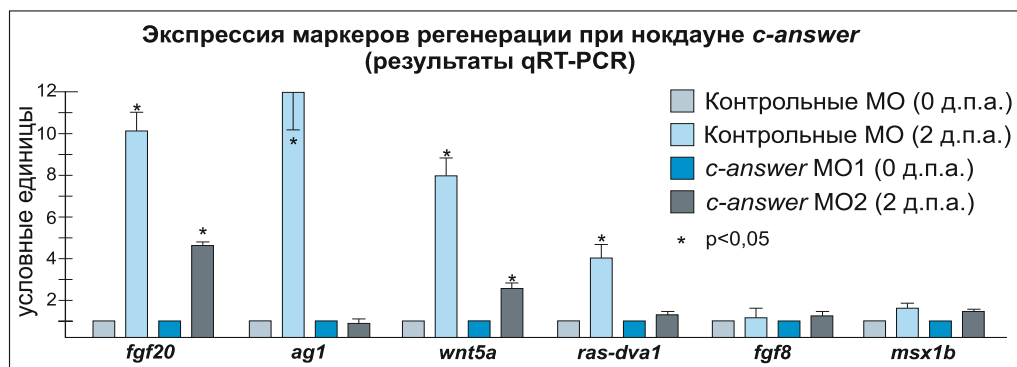
Влияние мутаций *c-Answer*, внесенных с помощью системы CRISPR/Cas9, на способность к регенерации оценивали у головастиков с уменьшенным общим размером тела, так как уменьшение размеров тела головастиков косвенно свидетельствовало о высоком проценте клеток с мутантным *c-Answer*, в результате ингибирование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



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

Для выявления генов-маркеров, участников известных сигнальных путей, активирующихся в ходе регенерации, на экспрессию которых влияет *c-answer*, нами была проведена количественная ОТ-ПЦР с праймерами к кДНК этих

маркеров. Результаты ОТ-ПЦР на образцах бластем хвостов, взятых на 0 и 2 день после ампутации у головастиков с подавленной с помощью *c-answer* МО функцией *c-answer* (опыт) и у головастиков, инъецированных контрольными МО к *c-answer* с нуклеотидными заменами (контроль), показали, что подавление функции *c-answer* отражается на экспрессии генов *fgf20*, *ag1*, *wnt5a*, *ras-dva1* – блокирование *c-answer* подавляет экспрессию этих генов, регулирующих регенерацию (Рис. 4.4).



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

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

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

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

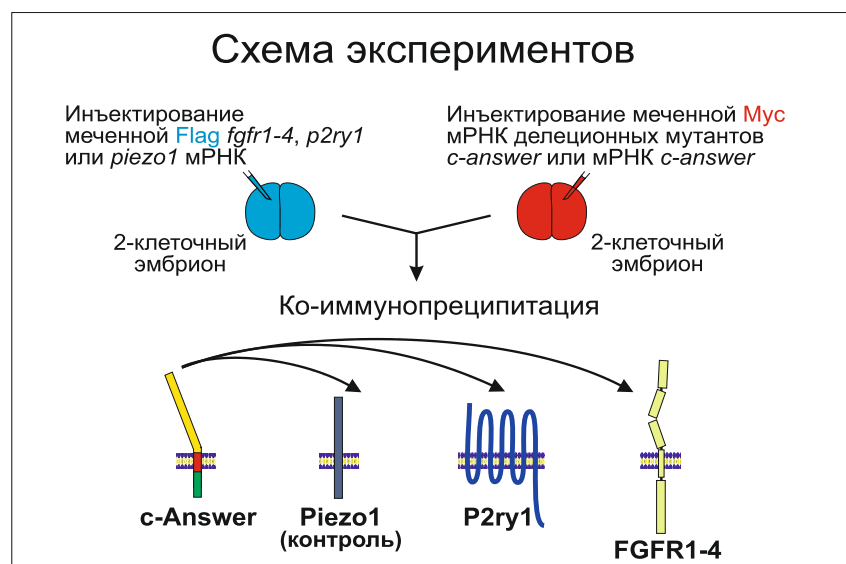
Один из этих сигнальных путей активируется при связывании Fgf8 с тирозинкиназным рецептором факторов роста фибробластов FGFR4, другой – при связывании внеклеточных пуриновых нуклеотидов, в частности аденозиндифосфата (АДФ), с рецептором P2ry1, сопряженным с G-белком.

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

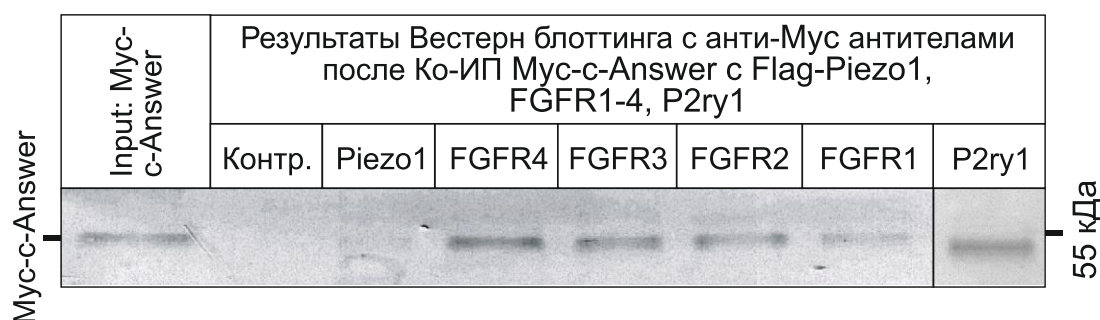
Для этого были созданы конструкции для экспрессии в эмбрионах двух известных изоформ Fgf8 - Fgf8a и Fgf8b, их рецептора FGFR4 и остальных рецепторов семейства Fgf (FGFR1-3), а также рецептора АДФ - P2ry1, меченных FLAG-олигопептидом, и *c-Answer*, меченного MYC-олигопептидом. В качестве отрицательного контроля использовали конструкцию для экспрессии фрагмента трансмембранного механо-чувствительного канала Piezo1, также меченного FLAG (**Рис. 5.1**).

В результате было выявлено взаимодействие *c-Answer* с рецепторами FGFR1-4 и P2ry1 (**Рис. 5.2**).





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

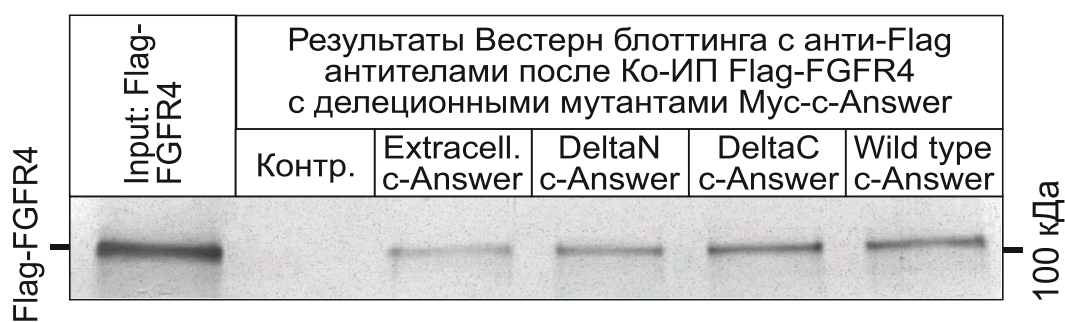


**Рисунок 5.2. Результаты Вестерн-блоттинга, проведенного для проверки взаимодействия c-Answer с FGFR1-4 и P2ry1 рецепторами сигнальных путей, регулирующих развитие конечного мозга, глаз и регенерацию.**

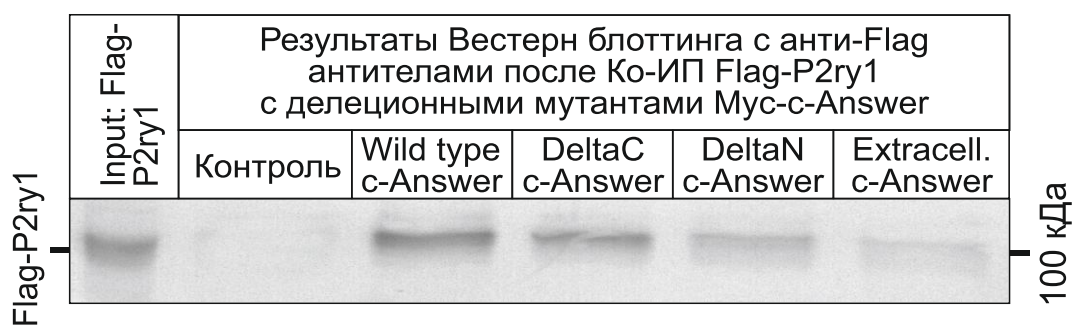
Для локализации доменов c-Answer вовлеченных в белок-белковые взаимодействия с FGFR1-4 и P2ry1 была создана серия плазмидных конструкций для производства синтетических мРНК, кодирующих различные делеционные мутанты c-Answer (*deltaC-c-answer* мРНК/ *extracellular-c-answer* мРНК/ *deltaN-c-answer* мРНК), меченные MYC-эпитопом. Полученные мРНК этих мутантов были инъектированы в ранние эмбрионы совместно с мРНК,

кодирующими FGFR1-4 и P2ry1, меченные FLAG-эпитопом. Затем по отработанной ранее методике методом иммунопреципитации с последующим Вестерн-блоттингом было изучено взаимодействие делеционных мутантов с-Answer с FGFR1-4 и P2ry1.

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



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



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

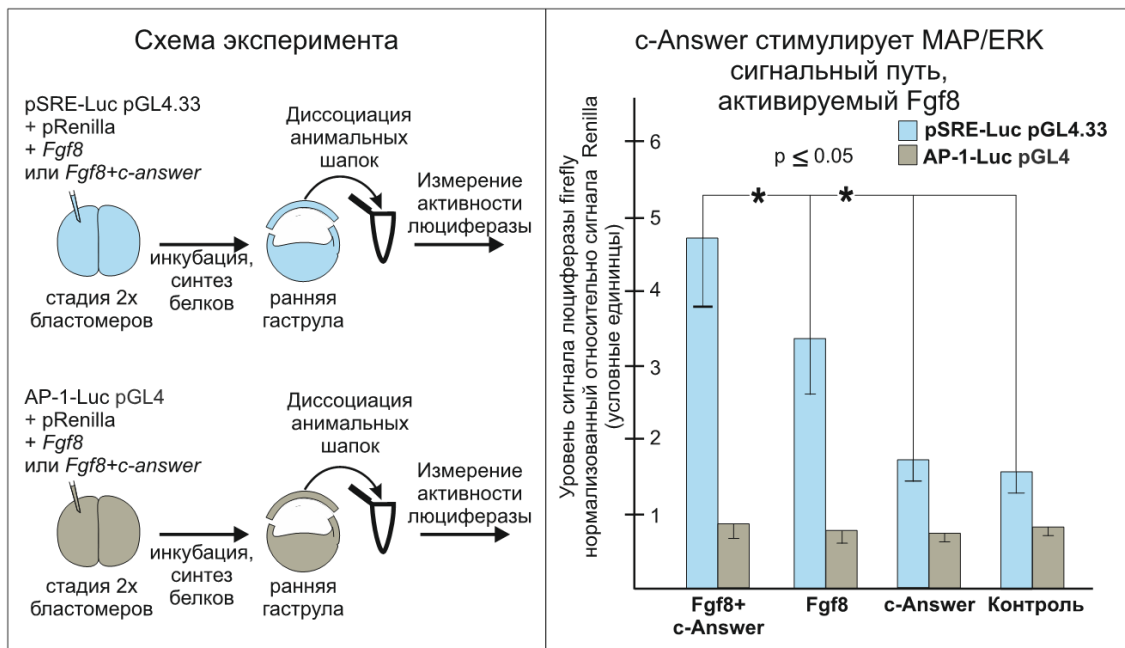
### 3.6. Изучение влияния *c-Answer* на активность FGF сигнального пути

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

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

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

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



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

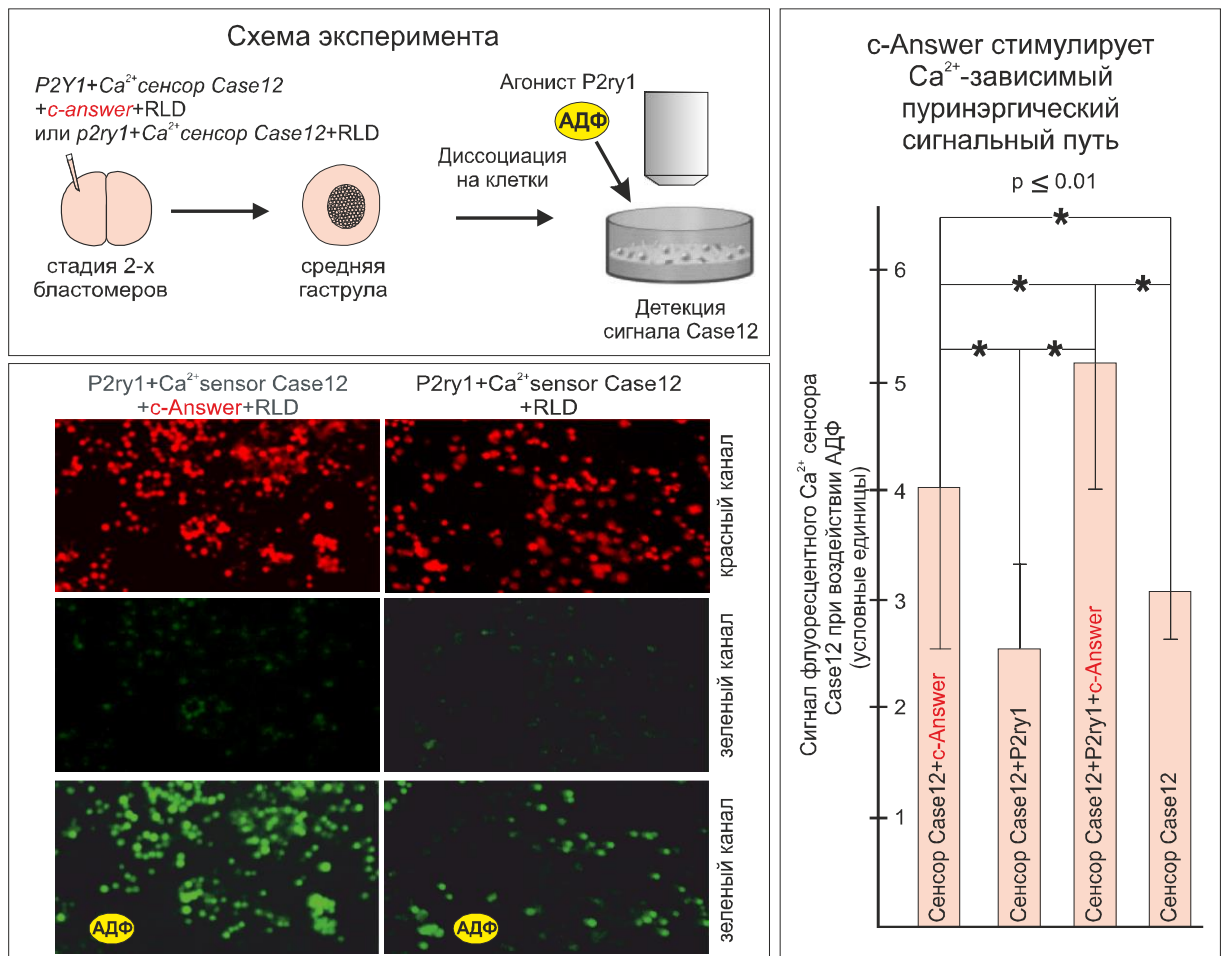
### 3.7. Изучение влияния *c-Answer* на активность пуриnergического сигнального пути

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

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

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

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



**Рисунок 7.1.** Схема и результаты проведения эксперимента по установлению роли *c-Answer* в  $Ca^{2+}$ -зависимом пуриnergическом сигнальном пути.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные в ходе проведенных экспериментов, свидетельствуют о том, что белок c-Answer контролирует раннее развитие головного мозга и регенерацию у шпорцевой лягушки путем взаимодействия с рецепторами FGFR4 и P2ry1 и модуляции их активности.

Известно, что ряд трансмембранных белков (Sef, XFLRT3, Klotho) (Böttcher et al., 2004) являются ко-рецепторами/ модуляторами активности рецепторов семейства FGFR, которые, аналогично c-Answer, имеют сравнительно небольшой внутриклеточный домен и не обладают тирозинкиназной активностью. Данные белки также взаимодействуют с рецепторами FGFR (или их лигандами Fgf) с помощью внеклеточного и/ или трансмембранного домена. Однако, в отличие от c-Answer, некоторые из них ингибируют функцию FGFR и имеют более низкую структурную гомологию с этим рецептором. Кроме того, в литературе отсутствуют данные об их взаимодействии с пуриnergическими рецепторами и, в частности с рецептором P2ry1. Таким образом, можно предположить, что роль c-Answer как модулятора активности рецепторов различных типов RTK (FGFRs) и GPCR (P2ry1) относительно уникальна.

Как мы показали, во взаимодействии с рецепторами FGFR4 и P2ry1 участвуют как внеклеточный, так и трансмембранный и внутриклеточные домены c-Answer. Причем, трансмембранный домен играет наиболее важную роль во взаимодействии с рецепторами. Также отличается и функциональная роль этих трех доменов c-Answer. В результате экспериментов по изучению влияния делеционных мутантов c-Answer на процессы развития мозга и регенерацию было показано, что мутант, содержащий внутриклеточный и трансмембранные домены, deltaN-c-Answer, подавляет как развитие мозга, так и регенерацию и, таким образом, действует как доминантно-негативная форма c-Answer.

Напротив, мутант *deltaC-c-Answer*, содержащий внеклеточный и трансмембранные домены, стимулирует развитие мозга, но также подавляет регенерацию, и, как мы предполагаем, является доминантно-позитивной формой *c-Answer*. При этом ингибирующий эффект этой формы на регенерацию может объясняться тем, что в данной форме белка отсутствуют оба дестабилизирующих сайта убиквитинирования, и, таким образом, устойчивость и продолжительность жизни данной формы увеличиваются, по сравнению с полноразмерным белком *c-Answer*. В результате при гиперэкспрессии мутанта *deltaC-c-Answer* может нарушаться нормальный ход регенерации, поскольку повышенная экспрессия эндогенного *c-Answer* необходима только на первый день регенерации, а присутствие его экспрессии выше базального уровня на 2-й и последующие дни регенерации могут препятствовать нормальному прохождению процесса регенерации.

Можно было бы ожидать, что мутант, содержащий только внеклеточный домен *c-Answer* - *extracellular-c-Answer* - будет оказывать эффекты сходные с мутантом *deltaC-c-Answer*, однако, оказалось, что *extracellular-c-Answer* не оказывает существенного влияния ни на развитие мозга, ни на процесс регенерации. Мы предположили, что *c-Answer* не может эффективно функционировать без трансмембранного домена, необходимого ему для закрепления на мембране, а также для нормального взаимодействия с его белковыми партнерами (FGFRs и P2<sub>gy1</sub>) и формирования гомодимера.

Интересно, что по результатам ОТ-ПЦР, проведенной на образцах бластем хвостов головастиков с подавленной функцией *c-answer*, наиболее сильный ингибирующий эффект наблюдался для генов *agl* и *ras-dval*, впервые открытых в нашей лаборатории. Ранее в нашей лаборатории было показано, что гены *agl* и *ras-dval* участвуют в развитии мозга и регенерации придатков тела у холоднокровных позвоночных (рыбы, амфибии, рептилии) (Ivanova et al., 2013; Ivanova et al., 2015; Ivanova et al., 2018; Tereshina et al., 2014; Tereshina et al., 2019). Мы предполагаем, что повышенный эффект от подавления *c-Answer*



на активность данных генов может свидетельствовать о тесной взаимосвязи утраченных в эволюции генов, регулирующих регенерацию и развитие мозга, а потеря одного из таких генов могла затем привести к элиминированию остальных подобных генов.

Очевидно, что исчезновение *c-answer* в ходе эволюции позвоночных могло быть важным событием, вызвавшим изменения в функционировании этих сигнальных путей и связанные с ними функциональные и морфологические преобразования у теплокровных позвоночных.

Одно из таких преобразований могло заключаться в изменении в ходе эволюции экспрессии одного из ключевых регуляторов развития конечного мозга, транскрипционного фактора FoxG1, которая, как показано другими авторами (Cavodeassi, Houart, 2012; Shimamura, Rubenstein, 1997) и нами, положительно регулируется сигнальным путем, который активируется рецептором FGFR4 и *c-Answer*. Согласно данным литературы, высокий уровень экспрессии FoxG1 регулирует у позвоночных развитие эволюционно древних, вентральных отделов конечного мозга (Danesin, Houart, 2012). Именно эти отделы составляют у эмбрионов рыб и амфибий большую часть конечного мозга. В тоже время, у эмбрионов эволюционно более продвинутых птиц и млекопитающих гораздо сильнее развита дорсальная часть конечного мозга, в которой FoxG1 экспрессируется со сравнительно более низкой интенсивностью. В частности, именно из этой, дорсальной, части конечного мозга у птиц и млекопитающих развивается такая важная структура, как новая кора головного мозга. В экспериментах на мышинных эмбрионах было показано, что искусственная интенсификация экспрессии FoxG1 в этой части конечного мозга вызывает недоразвитие новой коры (Danesin, Houart, 2012). Наоборот, подавление FoxG1 в эмбриогенезе у рыбы *Danio rerio* и у мыши приводит к тому, что клетки наиболее вентральных регионов конечного мозга, т.е. именно те, в которых в норме наблюдается высокий уровень экспрессии FoxG1, оказываются не способны определить свою спецификацию (Danesin et al., 2009;

Martynoga et al., 2005). В тоже время, у таких эмбрионов аномально разрастаются дорсальные области конечного мозга.

Как мы показали, *c-Answer* посредством положительного влияния на сигнальный путь, связанный с *FGFR4*, стимулирует экспрессию *FoxG1*. При этом подавление функции *c-Answer* приводит к снижению уровня экспрессии *FoxG1*, которое в данном случае затрагивает в основном дорсальные зоны области его нормальной экспрессии в зачатке конечного мозга эмбриона шпорцевой лягушки. Принимая во внимание эти и вышеописанные данные литературы, можно предположить, что потеря *c-Answer* предками теплокровных позвоночных могла привести у них к снижению уровня экспрессии *FoxG1* в дорсальной части конечного мозга. В результате клетки в этой части мозга могли получить определенную свободу в дальнейшем выборе направления своей дифференцировки, которая ранее диктовалась высоким уровнем экспрессии *FoxG1*. В итоге в дорсальной части конечного мозга у предков теплокровных позвоночных могли создаться условия для развития, в ходе последующей эволюции, новых структур, характерных для современных птиц и млекопитающих.

Важную роль в развитии конечного мозга и глаз у шпорцевой лягушки играет также пуринаргический рецептор *P2ry1* (Harata et al., 2016; Massé et al., 2007). Эти данные были подтверждены исследованиями на другом холоднокровном позвоночном – рыбе *Danio rerio*, в ходе которых было установлено участие *P2ry1* в процессе регенерации сетчатки и показано, что активация *P2ry1* необходима для запуска экспрессии генов плюрипотентности и пролиферативной активности Мюллеровских клеток, являющихся источниками регенерации сетчатки у *D. rerio* (Medrano et al., 2017). Учитывая полученные нами данные о стимулирующем действии *c-Answer* на активность *P2ry1*, логично предположить, что потеря *c-Answer* в эволюции предками современных теплокровных животных могла привести к существенным перестройкам механизмов развития отделов ЦНС, связанных с

функционированием рецептора P2ry1. Косвенным подтверждением этому может служить тот факт, что, нокаут *p2ry1* вызывает серьезные аномалии развития глаз у шпорцевой лягушки, но не вызывает нарушения развития глаз у мыши (Gampe et al., 2015). Возможно, что именно такой перестройкой механизмов глазной дифференцировки и, в частности потерей гена *c-answer*, объясняется в значительной степени сниженная, по сравнению с амфибиями, способность к регенерации глазных тканей у млекопитающих.

Исчезновение гена *c-answer* в эволюции могло оказать влияние и на другой важный процесс – регенерацию конечностей. Как известно, для регенерации конечностей особенно существенными являются ее ранние стадии. Именно на этих стадиях в клетках раневого эпителия происходит активация FGF сигнального каскада, необходимого для процесса регенерации (Gorsic, Majdic, Komel, 2008; Lin, Slack, 2008; Nacu et al., 2016). Поскольку *c-Answer* является положительным модулятором этого сигнального каскада, можно думать, что активация его экспрессии именно в этот период является одним из важных условий успешной регенерации. Также для начальных стадий регенерации может быть важным выявленное нами положительное модулирующее действие *c-Answer* на функционирование пуриnergического рецептора P2ry1. В литературе имеются данные о важной роли этого рецептора в ходе регенерации (Choi et al., 2001).

Как мы показали, *c-answer* активируется в клетках раневого эпителия уже через день после ампутации почки задней конечности и хвоста у головастика шпорцевой лягушки, а искусственное подавление его экспрессии нарушает процесс регенерации хвоста. Учитывая это, можно предположить, что исчезновение *c-answer* в эволюции могло быть одной из причин сниженной способности к регенерации конечностей у современных птиц и млекопитающих, по сравнению с рыбами и амфибиями. Очевидно, что молекулярные и физиологические функции *c-Answer* во всех этих процессах должны быть подробно исследованы в дальнейшем.

Необходимо отметить, что закрепление в эволюции мутаций, вызывающих потерю функции гена, регулирующего такие важные процессы как развитие мозга и регенерацию, по-видимому, являются очень редкими событиями в эволюции, поскольку данные мутации, как правило, летальны. В то же время, закрепление подобных мутаций может привести к крупным морфологическим преобразованиям, примерами которых являются снижение регенерационных потенциалов и прогрессивное развитие конечного мозга у теплокровных позвоночных. Таким образом, ген *c-answer* может пополнить ряд ранее идентифицированных в нашей лаборатории генов (*agl*, *ras-dva1*, *ras-dva2*, *tfp4*), потеря которых в эволюции могла стать основой для описанных преобразований в молекулярно-генетических механизмах регенерации и развития мозга (Ivanova et al., 2013; Ivanova et al., 2015; Ivanova et al., 2018; Tereshina et al., 2014; Tereshina et al., 2019).

## 5. ВЫВОДЫ

1. Специфичный для холонокровных позвоночных ген *c-answer* кодирует неизвестный ранее трансмембранный белок, способный формировать гомодимер.

2. В ходе эмбриогенеза *c-answer* экспрессируется в зачатке переднего мозга; *c-answer* синэкспрессируется с известными маркерами развития мозга (*foxg1*, *rax*, *agl*); экспрессия *c-answer* также активируется на ранних этапах регенерации крупных придатков тела.

3. Ингибирование функции *c-answer* вызывает уменьшение конечного мозга, подавление регенерации и экспрессии известных генов-маркеров регенерации, а оверэкспрессия *c-answer*, напротив, приводит к увеличению конечного мозга и стимулирует регенерацию у головастика в «рефрактерный» период.

4. Искусственное уменьшение или повышение уровня экспрессии *c-answer*, соответственно, подавляет или усиливает экспрессию известных маркеров дифференцировки конечного мозга - *foxg1*, *raxb* и маркера глаз - *rax*.

5. Белок *c-Answer* взаимодействует с FGFR4 и P2ry1 - рецепторами двух важных сигнальных путей, регулирующих развитие конечного мозга, глаз и регенерацию; взаимодействие осуществляется преимущественно за счет трансмембранного домена и околосмембранных участков.

6. *c-Answer* оказывает стимулирующее действие на MAP/ERK сигнальный путь, активируемый Fgf, и Ca<sup>2+</sup>-зависимый пуриnergический сигнальный путь, модулируя работу рецепторов FGFRs и P2ry1, соответственно.

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

## 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 6.1. Материалы

#### Реактивы

В работе использовали следующие реактивы:

ампициллин; канамицин; этанол  $C_2H_6O$ ; йод  $I_2$ ; натрий хлористый  $NaCl$  (Helicon); калий хлористый  $KCl$  (Helicon); магний хлористый гексагидрат  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (ДиаЭм); кальций хлористый  $CaCl_2$  (Fluka); натрий едкий  $NaOH$  (Авогадро); малеиновая кислота  $C_4H_4O_4$  (MERCK); магния гептогидрат  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Helicon); натрий фосфорнокислый двузамещенный  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  (Helicon); триэтаноламин хлорид (Acros Organics); цитрат натрия дигидрат (MERCK); ацетангидрид;  $NaOH$  (Авогадро); параформальдегид (Sigma); препарат TorulaRNA (Sigma); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma); смесь дигоксигенин-меченных рибонуклеотидов (Enzo); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) (Силекс); ВМР (Boehringer Mannheim Purple) – субстрат для щелочной фосфатазы (Roche); блокирующий реагент (Roche); левамизол (Sigma); краска для нанесения на гель (Силекс); бромистый этидий (Helicon); агароза (Helicon); маркер длин фрагментов ДНК 100-1500 н.п. (СибЭнзим); L-цистеин (ДиаЭм); анестезирующее вещество MS222; бета-меркаптоэтанол (Sigma); набор Wizard PCR Preps (Promega); набор Wizard Plus Minipreps (Promega); набор T7/SP6- mMESSAGE mMACHINE (Ambion); набор Total RNA Purification Kit (Norgen); хлороформ (Химмед); буфер для M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Promega); хориогонический гонадотропин (Sigma); lamb serum (Invitrogen); CHAPS; EDTA (Helicon); sodium salt (Helicon); EGTA (Helicon); MOPS (Helicon); Tris Base (Helicon); Trizol Reagent (Ambition); Tween-20 (Helicon); oligo-dT primers (Евроген); 5x qPCRmix-HS SYBR (Евроген); fluorescein lysine dextran (Molecular probes).

## Ферментные препараты

В работе использовали следующие ферментные препараты:

SP6 и T7 РНК-полимеразы (Ambion); Klenow fragments (Fermentas); Tersus PCR kit (Eurogen); дигоксигенин-специфичные антитела, связанные с щелочной фосфатазой anti-dig-AP-Fab fragment (Enzo); эндонуклеазы рестрикции: AgeI, EcoRI, EcoRV, BglII, NotI, BamHI, XhoI (Promega и Fermentas); T4 ДНК лигазу (Eurogen); Taq ДНК-полимеразу (Силекс); РНКазу H (Promega); протеиназу К (Sigma); M-MuLV обратную транскриптазу (Promega).

## Буферы и растворы

В работе использовали следующие буферы и растворы:

50x ТАЕ (рН 7.6): 2М Трис основание, 1.56М уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА;

10x буфер для проведения ПЦР (Силекс);

10x буферы для эндонуклеаз рестрикции (Promega и Fermentas);

лизис-буфер для бактерий: 1x PBS, 1 мг/мл лизоцим, 0.5% Nonidet P40, 1мМ PMSF;

10x PBS (рН 7.4): 17 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 52 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5М NaCl;

модифицированный раствор Рингера для культивации зародышей амфибий (0.1 MMR): 0.1М NaCl, 2.0 мМ KCl, 1мМ  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2мМ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5мМ;

фиколл 400 (Диаэм);

HEPES (Helicon), рН 7.4; раствор MEMFA для фиксации зародышей: 3.7% параформальдегид, 2мМ EGTA, 1мМ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1мМ MOPS, рН 7.4;

буфер PTW: 1x PBS, 0.1% Tween-20;

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

буфер МАВ: 100мМ малеиновая кислота, 150мМ NaCl, рН 7.5;



50x раствор Дэнхардта: 1% фиколл, 1% поливинилпирролидон, 1% БСА;

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

буфер для щелочной фосфатазы: 100мМ Трис-НСl (рН 9.5), 50мМ MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 100мМ NaCl, 0.1% Tween-20.

### **Микробиологические среды**

В работе использовали следующие микробиологические среды:

среда Лурия-Бертани (LB) для выращивания бактерий Escherichia coli: 1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% хлорид натрия, 0.01 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 1.5 % агар.

### **Лабораторное оборудование**

В работе использовали следующее оборудование:

напольную центрифугу с охлаждением (Jouan GR412); настольную центрифугу с охлаждением (Eppendorf 5415R); настольную центрифугу (Eppendorf minispin Cyclo Temp 202); автоматический ПЦР-амплификатор (Eppendorf Mastercycler); водный термостат с охлаждением (TE-8DRB-5A Techne); шейкер с термостатируемой камерой (C26 Incubator shaker Edison); термостатируемую качалку (Scello); качалку (Shaker S3, ELMi); термостат (TC-80M-2); рН-метр (Radelkis OP-211/2); электрофоретическую камеру для вертикального электрофореза VE-20 (Helicon); электрофоретическую камеру для горизонтального электрофореза SE-20 (Helicon); источник постоянного тока EPS 301 (Amersham pharmacia biotech); УФ-трансиллюминатор (Vilber-Lourmat); автоклав; термостаты «Гном» (ДНК-технология); весы аналитические (Ohaus); автоматические микропипетки (Gilson), микроинъектор Femtojet (Eppendorf); флуоресцентный стереомикроскоп (Leica MZ FLIII) с цифровой камерой (Leica DC 300F); бинокулярный микроскоп Polyvar (Reichert-Jung);

конфокальный флуоресцентный микроскоп LSM510META (Zeiss), вортекс (Sybron Thermolyne maxi mix); систему очистки воды (Milli-Q Water Purification system); ножницы капсулотомические по Ваннас (Cilita).

### **Лабораторные животные**

Работа проводилась на зародышах и головастиках гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Daudin, 1802). Для получения зародышей использовали самцов и самок гладких шпорцевых лягушек.

## **6.2. Методы**

### **Аmplификация кодирующей последовательности гена и его направленное клонирование в бактериальный вектор**

Аmplификацию ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в следующей реакционной смеси: 1x реакционный буфер; смесь дезоксирибонуклеотидов (0.2 мМ); ДНК-матрица (10-20 нг на 30 мкл реакционной смеси); термостабильная ДНК-полимераза (2.5 ед. на 30 мкл реакционной смеси); ПЦР праймер прямой (0.2-0.5 мкМ); ПЦР праймер обратный (0.2-0.5 мкМ); вода Milli-Q. Количество циклов выбирали в соответствии с количеством исходной матрицы и требуемого количества амплифицированной ДНК, температуру на стадии отжига праймеров подбирали из расчета длины и GC-состава праймеров, а длительность стадии элонгации – с учетом длины амплифицируемого фрагмента ДНК.

Для направленного клонирования вектор и амплифицированный фрагмент обрабатывали двумя рестриктазами. Рестрикцию ДНК проводили в следующей реакционной смеси: 10x буфер для эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз); ДНК (вектор и амплифицированный фрагмент); ферменты рестрикции; вода Milli-Q. Рестрикцию ДНК проводили в течение 1-16ч. при +37°C. Затем реакционный раствор инкубировали с ДНКазой (0.5-3 ед. на 20

мкл) 20-30 мин. при +37°C. После проводили очистку с помощью системы Purification Kit (Norgen).

В зависимости от размера фрагмента ДНК электрофоретическое разделение ДНК проводили в 1-2.5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1.2 мкг/мл), в буфере 1xTAE при напряжённости электрического поля 250V. Образцы ДНК наносили на гель вместе с краской для нанесения. Для оценки размера фрагмента использовали ДНК-маркеры. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью УФ-транслюминатора. Концентрацию ДНК определяли по интенсивности свечения бромистого этидия в содержащей ДНК полосе или по оптической плотности на фотометре.

После электрофоретического разделения ДНК в агарозном геле полосу с линеаризованным фрагментом ДНК вырезали из геля под УФА-излучением (365 нм). Вырезанный фрагмент геля растворяли в 6М растворе йода J<sub>2</sub> при +65°C в течение 10 мин. Затем остужали при комнатной температуре и проводили выделение ДНК на колонке.

Подготовленные плазмидный вектор и амплифицированный фрагмент ДНК лигировали с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 в реакционной смеси: 10x буфер для лигазы; плазмидный вектор и амплифицированный фрагмент ДНК в соотношении 1:3 – 1:5; лигаза T4; вода Milli-Q.

Для трансформации бактерий использовали лигазную смесь. К аликвоте (200 мкл) химически компетентных клеток добавляли 5-10 мкл смеси и инкубировали в течение часа при +4°C. Затем прогревали 90 секунд при +42°C с последующим охлаждением на льду. После добавляли 1 мл среды LB без селективного антибиотика и инкубировали в течение часа при 37°C при интенсивной аэрации на термостатируемой качалке (200 об/мин.), затем высевали на твердую среду LB, содержащую селективный антибиотик, и инкубировали в термостате при +37°C в течение 14-16 часов.

Для отбора целевых рекомбинантных клонов после трансформации проводили скрининг бактериальных колоний методом ПЦР с использованием

прямого и обратного праймеров, один из которых отжигался на участок плазмидного вектора, а другой - на участок клонированного фрагмента ДНК. Отобранные клоны пересеивали в 100-150 мл жидкой среды LB, содержащей селективный антибиотик, и в течение 16-18 часов при +37°C и интенсивной аэрации наращивали биомассу, которую затем использовали для выделения плазмидной ДНК.

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Plus Minipreps (Promega) по протоколу производителя. Клетки осаждали центрифугированием (3 тыс. об./мин.) в течение 15 мин., удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора (cell resuspension solution). Затем добавляли 200 мкл лизирующего раствора (cell lysis solution), перемешивали, переворачивая пробирку, до просветления раствора. Далее добавляли равный объем нейтрализующего раствора (neutralization solution), встряхивали до образования творожистого осадка, центрифугировали (13.4 тыс. об./мин.) в течение 5 мин. Супернатант смешивали с 1 мл ДНК-связывающей смолы и наносили на колонку. Смолу промывали два раза избыточным объемом раствора column wash solution, затем элюировали ДНК при промывке колонки 100 мкл воды Milli-Q.

Синтетические кэпированные мРНК получали с помощью наборов SP6- или T7-mMessage mMachine (Ambion) по методике производителя. В качестве матрицы использовали плазмидные конструкции на основе вектора pCS2+, линейаризованные по сайтам NotI. Синтезированную мРНК очищали на колонке с помощью набора Total RNA Purification Kit (Norgen).

### **Получение и культивирование зародышей шпорцевой лягушки**

Зародышей шпорцевой лягушки получали с помощью гормональной стимуляции и искусственного оплодотворения. Для этого самкам в спинной лимфатический мешок инъецировали хорионический гонадотропин человека (Sigma) (500 ед. на самку). Через 12-15 часов у самок собирали икру и оплодотворяли в чашках Петри, приводя икру в контакт с вырезанным у самца

перфорированным семенником. Затем инкубировали в 0.1x MMR в течение часа при комнатной температуре. Третичные оболочки растворяли в 2%-ном водном растворе L-цистеина (pH 7.8-8.0), после чего промывали 0.1x MMR 5 раз по 5-10 мин. и инкубировали до нужной для инъекции стадии бластомеров. Стадии развития зародышей определяли по таблицам нормального развития Ньюкупа и Фабера (Nieuwkoop and Faber, 1994).

До стадии 40 зародышей инкубировали в 0.1x MMR, затем перемещали в аквариум с отстоянной водой. Для проведения ампутации хвоста/ задних конечностей головастиков (стадии 41-44, 51-56) помещали в чашку Петри с растворенным в 0.1x MMR анестезирующим веществом. Затем капсулотомическими ножницами ампутировали дистальную треть хвоста или заднюю конечность на границе стилопода и зейгопода. После операций головастиков помещали в аквариум с чистой водой.

### **Активация трансляции эндогенных мРНК**

Для активации трансляции эндогенных мРНК эмбрионы шпорцевой лягушки инъецировали синтезированной *in vitro* мРНК. мРНК были синтезированы с помощью mMessage Machine SP6 Kit (Ambion) после линейаризации плазмиды на основе pCS2 с помощью рестриктазы NotI. Эмбрионов инъецировали в анимальные бластомеры/ в один из бластомеров в зависимости от дизайна эксперимента на стадии 2-4 бластомеров 3-4 нл 100нг/мкл водным раствором синтетической мРНК в смеси с 5% раствором флуоресцеин-лизин-декстрана (FLD), необходимого, чтобы отследить распределение инъецированного материала. Эффекты активации трансляции эндогенных мРНК наблюдали на стадиях 10-48.

### **Блокирование трансляции эндогенных мРНК**

Блокирование трансляции эндогенных мРНК (knockdown) проводили путем инъецирования в эмбрионы шпорцевой лягушки антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (18-25 метилморфолиновых колец,

содержащих по одному из четырех азотистых оснований (А, Т, G, С) и соединённых между собой фосфordiамидатной связью). Морфолиновые антисмысловые олигонуклеотиды к *c-answer* (*c-answer* MO) и контрольные (mismatched, с внесенными нуклеотидными заменами в последовательность *c-answer*) были выбраны согласно рекомендациям производителя (Gene Tools), с использованием баз данных NR и EST для *Xenopus laevis* и программы BLAST.

MO к *c-answer* и контрольные инъецировали в объеме 3–4 нл водного раствора концентрации 0.25 мМ в эмбриона на стадии 2-4 бластомеров. Все MO инъецировали в смеси с 10% раствором флуоресцеин-лизин-декстрана (FLD), необходимого, чтобы отследить распределение инъецированного материала. Эффекты блокирования трансляции эндогенных мРНК наблюдали на стадиях от ранней гастрюлы до головастика (стадии 10-48). Для проведения экспериментов, связанных с регенерацией хвоста, инъецированные эмбрионы инкубировали до стадии 40-42, затем под контролем флуоресценции (стереомикроскоп Leica M205) хвосты ампутировали с помощью капсулотомических ножниц. На 7-8 день после ампутации головастика с нормально и аномально отросшими хвостами подсчитывали. Всего в независимых экспериментах было проанализировано 248 головастика. Статистическая значимость при проведении t-теста составила  $p \leq 0.01$ .

### **Инактивация гена *c-answer* с помощью системы CRISPR/Cas9**

Целевые последовательности во 2-ом и 6-ом экзонах *c-answer* были выбраны с помощью он-лайн программы <http://chopchop.cbu.uib.no/>. Целевые последовательности были подобраны таким образом, чтобы избежать потенциальный нивелирующий эффект трети мутаций, восстанавливающих рамку считывания. Для этого целевые последовательности выбирали во 2-м экзоне ближе к его 5'-концу – с той целью, чтобы возникающие делеции нарушали взаимодействие с акцепторным сайтом на 3'-конце прилежащего интрона. В случае 6-ого экзона целевые последовательности выбирали внутри мотива, кодирующего трансмембранный домен. В результате, любые

возникающие делеции и инсерции, в том числе и восстанавливающие рамку считывания, должны были нарушать встраивание *c-Answer* в мембрану.

Конструкция гидовой РНК и ее сборка с помощью ПЦР была выполнена в соответствии с описанным в литературе протоколом (Nakayama et al., 2014). Транскрипция гидовой РНК *in vitro* была проведена с помощью набора GeneArt™ Platinum™ Cas9 Nuclease Ready-to-transfect wild-type Cas9 protein for performing CRISPR/Cas9-mediated genome editing Catalog Numbers B25640, B25641 (Invitrogen) в соответствии с прилагающимся протоколом. Белок Cas9 из данного набора смешивали с гидовой мРНК *c-answer* в финальной концентрации 0.8 нг и 400 пг, соответственно, в водном растворе флуоресцеин-лизин-декстрана (FLD) (Invitrogen, 40 кДа, 5 мкг/мкл), инкубировали 5 минут при комнатной температуре и инъецировали в эмбрионы через 20 минут после оплодотворения.

Для генотипирования нокаутных эмбрионов их инкубировали до стадии 12-14, затем из 10 случайно выбранных эмбрионов выделяли тотальную ДНК (Sive, Grainger, Harland, 2010) и участок кДНК, предположительно, содержащий мутации, амплифицировали с помощью ПЦР с прямым и обратным внешними праймерами, фланкирующими мутированный участок *c-Answer*. 50 нг полученного продукта ПЦР использовали для другого раунда ПЦР (общий объем 25 мкл, 40 циклов) с прямым внутренним праймером (1 мкл 100 пмоль/мкл), обратным адаптерным праймером (внутренним обратным праймером, содержащим адаптерную часть, общую для всех праймеров баркодов) (1 мкл 10 пмоль/мкл) и праймером баркода, уникальным для каждого эмбриона (1 мкл 100 пмоль/мкл). Полученные ПЦР продукты с уникальными баркодами были смешаны и генотипированы с помощью NGS (Illumina MiSeq).

## **Гибридизация *in situ* на зародышах и головастиках шпорцевой лягушки**

В работе использовали методику (Harland, 1991). Инкубации в средах проводились на качалке (80 об./мин.) при комнатной температуре, если не указано иное значение.

Для получения РНК-зонда, комплементарного исследуемой РНК, на матрице ДНК были синтезированы дигоксигенин-меченные антисмысловые РНК в ходе *in vitro* транскрипции с использованием 10х смеси рибонуклеотидов (3.5мМ dig-UTP, 6,5мМ UTP, 10мМ АТР, 10мМ GTP, 10мМ СТР) (Boehringer Mannheim, Enzo). Транскрипция осуществлялась с помощью наборов SP6- или T7-mMessage mMachine (Ambion) по протоколу производителя.

Желточную оболочку зародышей снимали пинцетом, затем зародышей/головастиков помещали в фиксирующий раствор MEMFA и инкубировали 90 мин. Фиксирующий раствор заменяли на 1х PBS, инкубировали 5 мин. Затем инкубировали 5 раз по 5 мин. в 96% этаноле, хранили при -20°C.

Предгибридизация. 96% этанол заменяли на РТW с помощью последовательных инкубаций по 5 мин. в 75%, 50% и 25% растворах этанола в РТW. Затем 3 раза по 5 мин. инкубировали в РТW. Добавляли раствор протеиназы К в РТW (1мкг/мл) и инкубировали 10 мин. Затем инкубировали с 0.1М раствором триэтаноламин-гидрохлорида (ТЭА) 2 раза по 5 мин. Далее к 0.1М раствору ТЭА добавляли 0.25% ацетангирида и инкубировали 5 мин. 2 раза. Инкубировали с РТW 5 мин. 2 раза. Заменяли РТW на охлажденный до +4°C фиксирующий раствор MEMFA и инкубировали 20 мин. Затем удаляли MEMFA и инкубировали с РТW 5 мин. 2 раза. Оставляли 1 мл РТW, добавляли 250 мкл РН-буфера и инкубировали в течение 5 мин. Заменяли раствор на РН-буфер (500 мкл на флакон), переставляли образцы на +60°C и инкубировали 1 час. Меняли РН-буфер и оставляли на 14-18 часов при +60°C на качалке. Зародышей/головастиков в РН-буфере хранили при -20°C.

Гибридизация с дигоксигенин-меченым антисмысловым зондом, комплементарным исследуемой РНК. Зародышей/головастиков в РН-буфере



прогревали до +60°C, удаляли РН-буфер и добавляли предварительно прогретый до +60°C раствор дигоксигенин-меченного зонда в РН-буфере (0.5-1мкг дигоксигенин-меченой антисмысловой РНК на 1мл РН-буфера), инкубировали 14-18 часов при +60°C.

Отмывка от РНК-зонда. Раствор зонда удаляли и инкубировали с РН-буфером 2 раза по 30 мин. при +60°C, затем последовательно инкубировали с предварительно прогретым до +60°C раствором 2xSSC 2 раза по 60 мин. при +60°C, раствором 0.2xSSC 2 раза по 60 мин. при комнатной температуре и буфером МАВ 2 раза по 10 мин.

Инкубация со специфичными к дигоксигениновым остаткам антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой. Удаляли МАВ, добавляли 2% блокирующий реагент в буфере МАВ, инкубировали 15-60 мин. Удаляли раствор, добавляли буфер МАВ с 2% блокирующего реагента и 20% сыворотки (heat treated lamb serum), инкубировали 1-2 ч. Удаляли раствор, добавляли буфер МАВ, содержащий 2% блокирующего реагента, 20% сыворотки и дигоксигенин-специфичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (разведение 1/1000), инкубировали 14-18 часов при +4°C.

Отмывка от антител. Инкубировали с буфером МАВ 6 раз по 60 мин. Затем инкубировали с буфером МАВ 14-18 часов при +4°C.

Проявление. Для проявления производили добавление субстрата для щелочной фосфатазы, которая осуществляет с ним хромогенную реакцию: Инкубировали с буфером для щелочной фосфатазы с добавлением 2мМ левамизола, ингибирующего эндогенную фосфатазную активность (2 раза). Удаляли буфер и добавляли предварительно прогретый до комнатной температуры субстрат для щелочной фосфатазы (ВМР, Boehringer Mannheim Purple AP substrate) с добавлением 1мМ левамизола, инкубировали в темноте появления окраски (3-18 ч.). Инкубировали с буфером для щелочной фосфатазы в течение 10 мин. 2 раза, заменяли буфер на фиксирующий раствор MEMFA. Окрашенные зародыши хранили при +4°C.

Обесцвечивание. Для обесцвечивания удаляли MEMFA и инкубировали с PBS 3 раза по 5 мин., затем один раз с 25% и три раза с 50% раствором этанола в PBS по 5 мин. Затем инкубировали с 10% раствором перекиси водорода в 50% этаноле, разрушающем пигмент в эктодермальных клетках, под УФ-лампой до обесцвечивания объекта (2-24 ч.). Затем инкубировали 3 раза по 5 мин. с 50% раствором этанола в PBS и заменяли раствор на MEMFA.

Гибридизация проводилась с зондами к *rax*, *foxd1*, *raxb*, *otx*, *xanf1*, *fgf8* (Ermakova et al., 2007), *c-answer*, *six3*, *engrailed1*.

### **Экспрессия белков в зародышах шпорцевой лягушки**

Для экспрессии исследуемых белков были созданы конструкции, позволяющие синтезировать их *in vivo* в клетках развивающихся зародышей с инъекцией мРНК, синтезированной *in vitro*. Конструкции для экспрессии целевых белков, содержащих по три MYC- или FLAG-олигопептида на N-конце, создавали для дальнейшего выделения белков на аффинном иммуносорбенте и анализа их возможных взаимодействий методом коиммунопреципитации. Все конструкции MYC- или FLAG-меченых белков для анализа были созданы в соответствии с методикой, подробно описанной в указанной статье (Bayramov et al., 2011).

### **Экстракция тотальной РНК. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР)**

Метод ОТ-ПЦР использовали для амплификации и измерения количества исследуемых молекул ДНК в образцах.

Экстракция тотальной РНК из зародышей шпорцевой лягушки, хвостов и лап головастиков шпорцевой лягушки. Для подготовки образцов к ОТ-ПЦР проводили экстракцию РНК. Лизирование осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя лизис-буфера TrizolReagent (Ambion). Лизированные образцы инкубировали 14-16 часов при -70°C. Затем образцы размораживали на льду, добавляли 0,02 мл хлороформа, перемешивали в

течение 15 сек, инкубировали при комнатной температуре 2-3 мин., центрифугировали при 12 тыс. об./мин. 15 мин. при +4°C. Собирали водную фазу, добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия, добавляли гликоген для осаждения РНК (1 мкл гликогена на 20 мкл раствора), добавляли 2,5 объема этанола, инкубировали 14-16 часов при -70°C. Затем центрифугировали (10000g) в течение 15 мин. при +4°C, удаляли супернатант, промывали осадок 70% холодных этанолом и просушивали осадок в термостате с открытой крышкой в течение 10 мин. Высохший осадок растворяли в 20 мкл воды Milli-Q.

Обратная транскрипция. Экстрагированную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза кодирующей ДНК, который осуществляли методом обратной транскрипции (ОТ) в соответствии с рекомендациями производителя фермента ревертазы (обратной транскриптазы) (Promega). Экстрагированную РНК инкубировали с oligo-dT primers (50пМ) 10 мин. при +70°C, затем помещали в лед. Обратную транскрипцию проводили в течение часа при +37°C в следующей реакционной смеси: РНК-матрица (10-20 нг на 30 мкл реакционной смеси); смесь дезоксирибонуклеотидов (0.5 мМ), ревертаза (15-20 ед на мкл реакционной смеси); РНазин (20 ед на мкл реакционной смеси); 5x буфер для ревертазы; вода Milli-Q. Реакцию останавливали прогреванием при +70°C в течение 10 мин. Полученные кДНК образцы хранили при -70°C. В качестве контроля использовали реакционную смесь без добавления ревертазы.

ПЦР в реальном времени. Процедуру ПЦР проводили в соответствии с протоколом производителя (Евроген) в следующей реакционной смеси: 5x реакционная смесь qPCRmix-NS SYBR, ОТ-ПЦР праймер прямой (0.2-0.5 мкМ); ОТ-ПЦР праймер обратный (0.2-0.5 мкМ); ДНК-матрица (50-100 нг на 25 мкл реакционной смеси). Для интерпретации результатов, полученных для независимых образцов, проводили нормировку образцов относительно внутреннего контроля (кДНК одного из генов домашнего хозяйства - орнитиндекарбоксилазы). Эффективность каждого цикла ПЦР считали равной 2.

## Ко-иммунопреципитация и иммуноблоттинг

Электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ПААГ). Для проведения электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли использовали гель с концентрацией ПАА 14% и толщиной 1 мм, в качестве образцов-стандартов – маркеры PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). Силу тока в расчете на один гель устанавливали в 10 мА, после прохождения образцов в разделяющий гель – 20 мА.

Иммуноблоттинг (Вестерн-блоттинг). Электроперенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану проводили с использованием источника постоянного тока: EPS 301 (Amersham pharmacia biotech) согласно протоколу производителя, в течение 1 ч. при силе тока 1 мА на 1 см<sup>2</sup> мембраны. Затем инкубировали мембрану в течение 1 ч. при комнатной температуре на орбитальной качалке в блокирующем растворе 1x PBS, 0.1% Tween-20, 3% блокирующего реагента. Мембрану отмывали 3 раза по 5 мин. в растворе: 1x PBS; 0.1% Tween-20. После инкубировали мембрану в течение 14-16 часов с моноклональными антителами (МАТ), конъюгированными с щелочной фосфатазой и специфичными к MYC- или FLAG- олигопептидам, разведенными 1/1000 в растворе 1x PBS, 0.1% Tween-20, 0.5% блокирующего реагента. После этого мембрану отмывали 5 раз по 7-10 мин. раствором 1xPBS, 0,1% Tween, затем инкубировали 5 мин. в проявляющем растворе, промывали водой и высушивали.

Изучение белок-белковых взаимодействий в системе *in vivo* с помощью метода ко-иммунопреципитации. Аффинный носитель отмывали от спирта буфером для проведения ко-иммунопреципитации. К смоле добавляли 600 мкл лизата зародышей, экспрессировавших целевые белки и инкубировали в течение 14-16 часов при перемешивании. После инкубации смесь центрифугировали 2 мин. при 4000 g при +4°C, супернатант удаляли. Смолу промывали буфером для проведения ко-иммунопреципитации при +4°C 3 раза,

с помощью центрифугирования в течение 2 мин. при 4000 g. Белки неспецифически элюировали 4x буфером для образцов для SDS-электрофореза или специфически с помощью MYC-пептида и анализировали с помощью SDS-электрофореза и Вестерн-блоттинга с использованием специфических МАТ.

### **Конфокальная и флуоресцентная микроскопия**

Распределение меченных EGFP клеток в эмбрионах, инъецированных *EGFP-c-answer* мРНК наблюдали с помощью конфокального микроскопа. Все фотографии были сделаны с помощью конфокального микроскопа “Leica DM IRE 2” и объектива HCX PL APO 63x с Ar/Kr лазером (488 нм) для возбуждения EGFP-меченных белков. Съемка проводилась на зародышах на стадии 10-11, которые были инъецированы *EGFP-c-answer* мРНК на стадии 4x бластомеров (70пг/бластомер). Детекция флуоресценции *in vivo* проводилась с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Leica M205 и Leica camera (DC 400F).

### **Детекция сигнала репортерного белка Case12**

Для детекции влияния *c-Answer* на высвобождение  $Ca^{2+}$  при активации рецептора *P2ry1*, нами была разработана методика, позволяющая на клеточном уровне визуализировать изменения концентрации кальция, наблюдаемые при активации рецептора *P2ry1*, в зародышах *in vivo*. Для этого эмбрионы шпорцевой лягушки на стадии двух бластомеров инъецировали либо смесью мРНК *p2ry1* с мРНК  $Ca^{2+}$ -флуоресцентного сенсора Case12 (Евроген) (контроль), либо смесью тех же мРНК с добавлением мРНК *c-answer* (опыт). С целью нормировки сигнала сенсора в эмбрионы вместе с мРНК инъецировали красный флуоресцентный трейсер - родамин-лизин-декстран (RLD). По достижению эмбрионами стадии 10.5 (ранней гаструлы), вырезали область анимальной эктодермы и диссоциировали материал от нескольких зародышей (10-15) на клетки в бескальциевом растворе (CMF) (116 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 4.6 mM Трис, 0.4 mM ЭДТА). По завершении диссоциации, бескальциевый раствор заменяли на среду, в которую добавляли АДФ, финальной

концентрации 300 мкМ, и затем производили покадровую съемку сигнала Case12 в зеленом и красном каналах. После нормировки относительно изображений в красном канале, проводили сравнение уровня Case12-сигнала в опыте и в контроле. В трех независимых экспериментах было проанализировано 40 эмбрионов, статистическая значимость в t-тесте  $p \leq 0.01$ .

### **Измерение активности MAP/ERK сигнального пути**

Измерение уровня активации MAP/ERK сигнального пути, активируемого Fgf, с помощью люциферазы проводили, как описано ранее (Baugatov et al., 2011). Эмбрионов на стадии 2-4 бластомеров инъецировали синтетическими мРНК *c-answer* и *fgf8*, либо только мРНК *fgf8* (3-4 нл 100нг/мкл водного раствора мРНК на эмбрион) в смеси с референтной плазмидой pRenilla и одной из люциферазных репортерных плазмид - AP-1-Luc pGL4.44[luc2P/AP1 SRE/Hygro] (Promega), чувствительной к стресс-активируемому MAPK/JNK сигнальному пути, или SRE-Luc pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro] (Promega), чувствительной к активации MAP/ERK сигнального пути (50 пк/эмбриона каждой плазмиды). На стадии 10 эксплантаты анимальных шапочек вырезали из эмбрионов и культивировали эксплантаты до стадии 11, анализ активности люциферазы с помощью люминометра проводили согласно протоколу Promega в трех повторностях (10 эксплантатов/ повторность).

### **Гистологические криосрезы**

Эмбрионы или образцы бластемы хвоста/ конечности головастика *X.laevis* фиксировали в 4%-ом ПФА, затем переводили в раствор 1.5% бактагара на 5% сахарозе и ориентировали в процессе застывания образца. После, участок, содержащий образец, вырезали в форме пирамидки. Пирамидку с образцом оставляли в 30%-ом растворе сахарозы на 12-15 часов, а затем прикрепляли с помощью полимера Neg-50 (Richard-Allan Scientific) к подставке и покрывали Neg-50. Затем подставку с образцом замораживали в жидком азоте и получали срезы толщиной 20мкм на замораживающем микротоме Microm HM 525

(Thermo Scientific). Полученные срезы размещали на стеклах для криосрезов (Fisher Scientific, cat.# 12-550-15).

## 7. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность:

- сотрудникам лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН за помощь, оказанную при выполнении данной работы и любезно предоставленные материалы;

- научному руководителю, зав. лаб. молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН, Андрею Георгиевичу Зарайскому за научное руководство, содействие и помощь, как при выполнении экспериментальной части работы, так и в процессе работы над текстом и оформлением диссертации;

- сотрудникам лаборатории математических методов и моделей в биоинформатике ИППИ РАН за сотрудничество при разработке широкомасштабного биоинформатического подхода для идентификации генов, утраченных в эволюции;

- К. Massé за любезно предоставленные плазмидные конструкции.



## 8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

ГТФ – гуанозинтрифосфат

д.п.а. – дней после ампутации

МО - морфолиновый олионуклеотид

ОТ-ПЦР - обратная транскрипция, сопряженная с ПЦР

ПААГ - полиакриамидный гель

п.о. – пара оснований

sgРНК – single guide (одноцепочечная гидовая) РНК

ANR/ANB - anterior neural ridge/anterior neural border (передняя граница нервной пластинки)

c-answer - cold-blooded animals specific wound epithelium receptor binding protein (специфичный для холоднокровных рецептор-связывающий белок раневого эпителия)

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)

EGFP - enhanced green fluorescent protein (усиленный зеленый флуоресцентный белок)

FGF – fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов)

FLD - fluorescein lysinated dextran (флуоресцеин-лизин-декстран)

GPCR - g-protein-coupled receptor (рецептор, сопряжённый с G-белком)

MAP/ERK - mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase (сигнальный путь ERK)

MAPK/JNK - mitogen-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase  
(сигнальный путь JNK)

MHB - midbrain–hindbrain boundary (граница между средним и задним мозгом)

MMR - Marc's modified Ringer's (модифицированный раствор Рингера)

RLD - rhodamine lysinated dextran (родамин-лизин-декстран)

ZLI - zona limitans intrathalamica (граница между таламусом и субталамусом)

## 9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbracchio M.P., Burnstock G., Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? // *Pharmacol. Ther.* 1994.
2. Aberger F., Weidinger G., Grunz H., Richter K., 1998. Anterior specification of embryonic ectoderm: The role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2 // *Mech. Dev.*
3. Albizu L., Cottet M., Kralikova M., Stoev S., Seyer R., Brabet I., Roux T., Bazin H., Bourrier E., Lamarque L., Breton C., Rives M.-L., Newman A., Javitch J., Trinquet E., Manning M., Pin J.-P., Mouillac B., Durroux T., 2010. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. // *Nat. Chem. Biol.*
4. Alibardi L., 2010. Regeneration in Reptiles and Its Position Among Vertebrates // *Morphol. Cell. Asp. Tail Limb Regen. Lizards.*
5. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M., 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. // *Nature*. V. 513. P. 569–73.
6. Banach M., Edholm E.-S., Robert J., 2017. Exploring the functions of nonclassical MHC class Ib genes in *Xenopus laevis* by the CRISPR/Cas9 system. // *Dev. Biol.* V. 426. P. 261–269.
7. Bayramov A. V., Eroshkin F.M., Martynova N.Y., Ermakova G. V., Solovieva E.A., Zraisky A.G., 2011. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling // *Development*. V. 138. P. 5345–5356.
8. Bayramov A. V, Ermakova G. V, Eroshkin F.M., Kucheryavyy A. V, Martynova N.Y., Zraisky A.G., 2016. The presence of *Anf/Hesx1* homeobox gene in lampreys suggests that it could play an important role in emergence of telencephalon. // *Sci. Rep.* V. 6. P. 39849.
9. Beck C.W., Christen B., Slack J.M.W., Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate // *Dev. Cell.* 2003.
10. Berkeley U.C., Richard M., 2012. Electronic Thesis and Dissertations Developmental genetics of *Xenopus* By Jessica Burnham Lyons A dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Molecular and Cell Biology in the Graduate Divisi.
11. Blak A.A., Naserke T., Saarimäki-Vire J., Peltopuro P., Giraldo-Velasquez M., Vogt Weisenhorn D.M., Prakash N., Sendtner M., Partanen J., Wurst W., 2007. *Fgfr2* and *Fgfr3* are not required for patterning and maintenance of the midbrain and anterior hindbrain // *Dev. Biol.*
12. Blassberg R. a, Garza-Garcia A., Janmohamed A., Gates P.B., Brockes J.P., 2011. Functional convergence of signalling by GPI-anchored and anchorless forms of a salamander

protein implicated in limb regeneration. // *J. Cell Sci.* V. 124. P. 47–56.

13. Blitz I.L., Biesinger J., Xie X., Cho K.W.Y., 2013. Biallelic genome modification in F(0) *Xenopus tropicalis* embryos using the CRISPR/Cas system. // *Genesis.* V. 51. P. 827–34.

14. Bolós V., Grego-Bessa J., la Pompa J.L. de., 2007. Notch signaling in development and cancer // *Endocr Rev.*

15. Böttcher R.T., Pollet N., Delius H., Niehrs C., 2004. The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. // *Nat. Cell Biol.* V. 6. P. 38–44.

16. Bouleau S., Parvu-Ferecatu I., Rodriguez-Enfedaque A., Rincheval V., Grimal H., Mignotte B., Vayssiere J.L., Renaud F., 2007. Fibroblast Growth Factor 1 inhibits p53-dependent apoptosis in PC12 cells // *Apoptosis.*

17. Briggs J.A., Weinreb C., Wagner D.E., Megason S., Peshkin L., Kirschner M.W., Klein A.M., 2018. The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. // *Science.* V. 360. P. eaar5780.

18. Bringmann A., Grosche A., Pannicke T., Reichenbach A., 2013. GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells. // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* V. 4. P. 48.

19. Camps M., Nichols a, Gillieron C., Antonsson B., Muda M., Chabert C., Boschert U., Arkinstall S., 1998. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. // *Science.*

20. Castro L.F.C., Holland P.W.H., 2003. Chromosomal mapping of ANTP class homeobox genes in amphioxus: Piecing together ancestral genomes // *Evol. Dev.*

21. Cattaneo F., Guerra G., Parisi M., Marinis M. De, Tafuri D., Cinelli M., Ammendola R., 2014. Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors // *Int. J. Mol. Sci.* V. 15. P. 19700–19728.

22. Cavodeassi F., Houart C., 2012. Brain regionalization: Of signaling centers and boundaries // *Dev. Neurobiol.* V. 72. P. 218–233.

23. Choi R.C.Y., Man M.L.S., Ling K.K.Y., Ip N.Y., Simon J., Barnard E.A., Tsim K.W.K., 2001. Expression of the P2Y1 Nucleotide Receptor in Chick Muscle: Its Functional Role in the Regulation of Acetylcholinesterase and Acetylcholine Receptor // *J. Neurosci.* V. 21. P. 9224–9234.

24. Danesin C., Peres J.N., Johansson M., Snowden V., Cording A., Papalopulu N., Houart C., 2009. Integration of Telencephalic Wnt and Hedgehog Signaling Center Activities by Foxg1 // *Dev. Cell.* V. 16. P. 576–587.

25. Danesin C., Houart C., 2012. A Fox stops the Wnt: Implications for forebrain development and diseases // *Curr. Opin. Genet. Dev.* V. 22. P. 323–330.

26. Dehal P., Boore J.L., 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. // PLoS Biol. V. 3. P. e314.
27. DeLay B.D., Corkins M.E., Hanania H.L., Salanga M., Deng J.M., Sudou N., Taira M., Horb M.E., Miller R.K., 2018. Tissue-Specific Gene Inactivation in *Xenopus laevis*: Knockout of *lhx1* in the Kidney with CRISPR/Cas9 // Genetics. V. 208. P. 673–686.
28. Dufour C., Guenou H., Kaabeche K., Bouvard D., Sanjay A., Marie P.J., 2008. FGFR2-Cbl interaction in lipid rafts triggers attenuation of PI3K/Akt signaling and osteoblast survival // Bone.
29. Erb L., Liao Z., Seye C.I., Weisman G.A., P2 receptors: Intracellular signaling // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2006.
30. Erb L., Weisman G.A., 2012. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways // Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal. V. 1. P. 789–803.
31. Ermakova G. V., Solovieva E.A., Martynova N.Y., Zaraisky A.G., 2007. The homeodomain factor Xanf represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions // Dev. Biol. V. 307. P. 483–497.
32. Ezzat S., Zheng L., Florez J.C., Stefan N., Mayr T., Hliang M.M., Jablonski K., Harden M., Stančáková A., Laakso M., Haring H.U., Ullrich A., Asa S.L., 2013. The cancer-associated FGFR4-G388R polymorphism enhances pancreatic insulin secretion and modifies the risk of diabetes // Cell Metab.
33. Fitch W.M., 1970. Distinguishing Homologous from Analogous Proteins // Syst. Biol.
34. Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y., Postlethwait J., 1999. Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations // Genetics. V. 151.
35. Fürthauer M., Lin W., Ang S.-L., Thisse B., Thisse C., 2002. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. // Nat. Cell Biol.
36. Gampe K., Haverkamp S., Robson S.C., Gachet C., Hüser L., Acker-Palmer A., Zimmermann H., 2015. NTPDase2 and the P2Y<sub>1</sub> receptor are not required for mammalian eye formation // Purinergic Signal. V. 11. P. 155–160.
37. Gorsic M., Majdic G., Komel R., 2008. Identification of differentially expressed genes in 4-day axolotl limb blastema by suppression subtractive hybridization. // J. Physiol. Biochem. V. 64. P. 37–50.
38. Guo X., Zhang T., Hu Z., Zhang Y., Shi Z., Wang Q., Cui Y., Wang F., Zhao H., Chen Y., 2014. Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis* // Development. V. 141. P. 707–714.
39. Gutiérrez O.M., Mannstadt M., Isakova T., Rauh-Hain J.A., Tamez H., Shah A., Smith K., Lee H., Thadhani R., Jüppner H., Wolf M., 2008. Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality

among Patients Undergoing Hemodialysis // Fibroblast Growth Factor 23 Mortal. among Patients Undergoing Hemodial.

40. Hao L., Du M., Lopez-Campistrous A., Fernandez-Patron C., 2004. Agonist-Induced Activation of Matrix Metalloproteinase-7 Promotes Vasoconstriction Through the Epidermal Growth Factor-Receptor Pathway // *Circ. Res.*

41. Harata A., Nishida H., Nishihara A., Hashimoto C., Harata A., Nishida H., Nishihara A., Hashimoto C., 2016. Purinergic P2Y Receptors Are Involved in &lt;i>Xenopus</i> Head Formation // *CellBio. V. 05. P. 49–65.*

42. Hikasa H., Sokol S.Y., 2013. Wnt signaling in vertebrate axis specification. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 5.*

43. Hitchcock A.L., Auld K., Gygi S.P., Silver P.A., 2003. A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. V. 100. P. 12735–40.*

44. Hoffmann C., Moro S., Nicholas R. a, Harden T.K., Jacobson K. a, Hill C., Carolina N., 1999. The Role of Amino Acids in Extracellular Loops of the Human P2Y 1 Receptor in Surface Expression and Activation Processes \* // *V. 274. P. 14639–14647.*

45. Holland L.Z., 2015. The origin and evolution of chordate nervous systems // *Philos. Trans. R. Soc. B-Biological Sci. V. 370. P. 20150048.*

46. Hongo I., Kengaku M., Okamoto H., 1999. FGF Signaling and the Anterior Neural Induction in *Xenopus* // *Dev. Biol. V. 216. P. 561–581.*

47. Hughes M.K., Hughes A.L., 1993. Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis* // *Mol. Biol. Evol.*

48. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Tsai S.Q., Sander J.D., Peterson R.T., Yeh J.-R.J., Joung J.K., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. // *Nat. Biotechnol. V. 31. P. 227–9.*

49. Ivanova A.S., Tereshina M.B., Ermakova G. V., Belousov V. V., Zraisky A.G., 2013. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles // *Sci. Rep. V. 3. P. 1279.*

50. Ivanova A.S., Shandarin I.N., Ermakova G. V., Minin A.A., Tereshina M.B., Zraisky A.G., 2015. The secreted factor Ag1 missing in higher vertebrates regulates fins regeneration in *Danio rerio* // *Sci. Rep. V. 5. P. 8123.*

51. Ivanova A.S., Korotkova D.D., Ermakova G. V., Martynova N.Y., Zraisky A.G., Tereshina M.B., 2018. Ras-dva small GTPases lost during evolution of amniotes regulate regeneration in anamniotes // *Sci. Rep. V. 8. P. 13035.*

52. Kalwa H., Sartoretto J.L., Martinelli R., Romero N., Steinhorn B.S., Tao M., Ozaki

C.K., Carman C. V, Michel T., 2014. Central role for hydrogen peroxide in P2Y1 ADP receptor-mediated cellular responses in vascular endothelium // *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 111. P. 3383–3388.

53. Khakh B.S., 2001. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. // *Nat. Rev. Neurosci.*

54. Kochegarov A., Moses-Arms A., Hanna M.C., Lemanski L.F., 2015. JSM Regenerative Medicine Identification of Genes Involved in Limb Regeneration in the Axolotl *Ambystoma mexicanum* // *JSM Regen Med.* V. 3.

55. Kuroda H., Wessely O., Robertis E.M. De., 2004. Neural induction in *Xenopus*: Requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin,  $\beta$ -Catenin, and Cerberus // *PLoS Biol.* V. 2.

56. Kvon E.Z., Kamneva O.K., Melo U.S., Barozzi I., Osterwalder M., Mannion B.J., Tissi $\beta$ res V., Pickle C.S., Plajzer-Frick I., Lee E.A., Kato M., Garvin T.H., Akiyama J.A., Afzal V., Lopez-Rios J., Rubin E.M., Dickel D.E., Pennacchio L.A., Visel A., 2016. Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution // *Cell.* V. 167. P. 633- 642.e11.

57. Laplante M., Horvat S., Festuccia W.T., Birsoy K., Prevorsek Z., Efeyan A., Sabatini D.M., 2012. DEPTOR cell-autonomously promotes adipogenesis, and its expression is associated with obesity. // *Cell Metab.* V. 16. P. 202–12.

58. Lazarowski E.R., Boucher R.C., Harden T.K., 2003. Mechanisms of Release of Nucleotides and Integration of Their Action as P2X- and P2Y-Receptor Activating Molecules // *Mol. Pharmacol.* V. 64. P. 785–795.

59. Lea R., Papalopulu N., Amaya E., Dorey K., 2009. Temporal and spatial expression of FGF ligands and receptors during *Xenopus* development // *Dev. Dyn.* V. 238. P. 1467–1479.

60. Li C., Chen L., Iwata T., Kitagawa M., Fu X.Y., Deng C.X., 1999. A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors // *Hum. Mol. Genet.*

61. Lin G., Slack J.M.W., 2008. Requirement for Wnt and FGF signaling in *Xenopus* tadpole tail regeneration // *Dev. Biol.*

62. Lupo G., Harris W. a, Barsacchi G., Vignali R., 2002. Induction and patterning of the telencephalon in *Xenopus laevis*. // *Development.* V. 129. P. 5421–5436.

63. Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M., 2013. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. // *Nat. Biotechnol.* V. 31. P. 833–8.

64. Marics I., Padilla F., Guillemot J., Scaal M., Marcelle C., 2002. FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. // *Development.* V. 129. P. 4559–4569.

65. Martynoga B., Morrison H., Price D.J., Mason J.O., 2005. Foxg1 is required for

specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. // *Dev. Biol.* V. 283. P. 113–27.

66. Massé K., Bhamra S., Eason R., Dale N., Jones E. a., 2007. Purine-mediated signalling triggers eye development. // *Nature.* V. 449. P. 1058–1062.

67. Matlashov M.E., Bogdanova Y.A., Ermakova G. V., Mishina N.M., Ermakova Y.G., Nikitin E.S., Balaban P.M., Okabe S., Lukyanov S., Enikolopov G., Zaraisky A.G., Belousov V. V., 2015. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* V. 1850. P. 2318–2328.

68. May C., Weigl L., Karel A., Hohenegger M., 2006. Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y1 receptor in a Ca<sup>2+</sup> independent manner in differentiated human skeletal muscle cells // *Biochem. Pharmacol.* V. 71. P. 1497–1509.

69. McQueen C., Pownall M.E., 2017. An analysis of MyoD-dependent transcription using CRISPR/Cas9 gene targeting in *Xenopus tropicalis* embryos // *Mech. Dev.* V. 146. P. 1–9.

70. Medrano M.P., Bejarano C.A., Battista A.G., Venera G.D., Bernabeu R.O., Faillace M.P., 2017. Injury-induced purinergic signalling molecules upregulate pluripotency gene expression and mitotic activity of progenitor cells in the zebrafish retina // *Purinergic Signal.* V. 13. P. 443–465.

71. Milligan G., Ramsay D., Pascal G., Carrillo J.J., GPCR dimerisation // *Life Sciences.*

72. Müller A.K., Meyer M., Werner S., The roles of receptor tyrosine kinases and their ligands in the wound repair process // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2012.

73. Nacu E., Gromberg E., Oliveira C.R., Drechsel D., Tanaka E.M., 2016. FGF8 and SHH substitute for anterior–posterior tissue interactions to induce limb regeneration // *Nature.* V. 1. P. 1–16.

74. Nakayama T., Fish M.B., Fisher M., Oomen-Hajagos J., Thomsen G.H., Grainger R.M., 2013. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Xenopus tropicalis* // *genesis.* V. 51. P. 835–843.

75. Nakayama T., Blitz I.L., Fish M.B., Odeleye A.O., Manohar S., Cho K.W.Y., Grainger R.M., 2014. Cas9-based genome editing in *Xenopus tropicalis*. // *Methods Enzymol.* V. 546. P. 355–75.

76. Ohno S., 1970. Evolution by Gene Duplication // (1970).

77. Olson M. V., 1999. When less is more: gene loss as an engine of evolutionary change. // *Am. J. Hum. Genet.* V. 64. P. 18–23.

78. Ornitz D.M., Herr A.B., Nilsson M., Westman J., Svahn C.M., Waksman G., 1995. FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. // *Science.*

79. Peng J., Schwartz D., Elias J.E., Thoreen C.C., Cheng D., Marsischky G., Roelofs J.,



Finley D., Gygi S.P., 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination // *Nat. Biotechnol.* V. 21. P. 921–926.

80. Potthoff M.J., Kliewer S.A., Mangelsdorf D.J., 2012. Endocrine fibroblast growth factors 15 / 19 and 21 : from feast to famine // *Genes Dev.*

81. Redivivus T., Partiality R., 2005. The quarterly review of biology // *History.* V. 81. P. 287–316.

82. Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance // *Purinergic Signal.*

83. Rodriguez-Enfedaque A., Bouleau S., Laurent M., Courtois Y., Mignotte B., Vayssière J.L., Renaud F., 2009. FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*

84. Rodríguez-Trelles F., Tarrío R., Ayala F.J., 2003. Evolution of cis-regulatory regions versus codifying regions. // *Int. J. Dev. Biol.* V. 47. P. 665–73.

85. Rumjahn S.M., Yokdang N., Baldwin K.A., Thai J., Buxton I.L., 2009. Purinergic regulation of vascular endothelial growth factor signaling in angiogenesis // *Br J Cancer.* V. 100. P. 1465–1470.

86. Ruscetti F.W., Akel S., Bartelmez S.H., 2005. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. // *Oncogene.* V. 24. P. 5751–63.

87. Saito A., Higuchi I., Nakagawa M., Saito M., Uchida Y., Inose M., Kasai T., Niiyama T., Fukunaga H., Arimura K., Osame M., 2000. An overexpression of fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor 4 in a severe clinical phenotype of facioscapulohumeral muscular dystrophy // *Muscle and Nerve.*

88. Séror C., Melki M.-T., Subra F., Raza S.Q., Bras M., Saïdi H., Nardacci R., Voisin L., Paoletti A., Law F., Martins I., Amendola A., Abdul-Sater A.A., Ciccocanti F., Delelis O., Niedergang F., Thierry S., Said-Sadier N., Lamaze C., Métivier D., Estaquier J., Fimia G.M., Falasca L., Casetti R., Modjtahedi N., Kanellopoulos J., Mouscadet J.-F., Ojcius D.M., Piacentini M., Gougeon M.-L., Kroemer G., Perfettini J.-L., 2011. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. // *J. Exp. Med.*

89. Shimamura K., Rubenstein J.L., 1997. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. // *Development.* V. 124. P. 2709–18.

90. Sive H.L., Grainger R., Harland R.M., 2010. Early development of *Xenopus laevis* : a laboratory manual : Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 338.

91. Smallwood P.M., Munoz-Sanjuan I., Tong P., Macke J.P., Hendry S.H., Gilbert D.J.,  
105

Copeland N.G., Jenkins N. a, Nathans J., 1996. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

92. Soulet C., Hechler B., Gratacap M.P., Plantavid M., Offermanns S., Gachet C., Payrastre B., 2005. A differential role of the platelet ADP receptors P2Y1 and P2Y12 in Rac activation // J. Thromb. Haemost.

93. Stewart H.J.S., Horne G.A., Bastow S., Chevassut T.J.T., 2013. BRD4 associates with p53 in DNMT3A-mutated leukemia cells and is implicated in apoptosis by the bromodomain inhibitor JQ1 // Cancer Med. V. 2. P. 826–835.

94. Sun X., Mariani F. V, Martin G.R., 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. // Nature.

95. Taylor VI J.G., Cheuk A.T., Tsang P.S., Chung J.Y., Song Y.K., Desai K., Yu Y., Chen Q.R., Shah K., Youngblood V., Fang J., Su Y.K., Yeung C., Helman L.J., Mendoza A., Ngo V., Staudt L.M., Wei J.S., Khanna C., Catchpoole D., Qualman S.J., Hewitt S.M., Merlino G., Chanock S.J., Khan J., 2009. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models // J. Clin. Invest.

96. Tereshina M.B., Ermakova G. V., Ivanova A.S., Zaraisky A.G., 2014. 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. V. 3. P. 1–9.

97. Tereshina M.B., Ivanova A.S., Eroshkin F.M., Korotkova D.D., Nesterenko A.M., Bayramov A. V, Solovieva E.A., Parshina E.A., Orlov E.E., Martynova N.Y., Zaraisky A.G., 2019. Agr2-interacting Prodl-like protein Tfp4 from *Xenopus laevis* is necessary for early forebrain and eye development as well as for the tadpole appendage regeneration. // Genesis. P. e23293.

98. Tereshina M.B., Zaraisky A.G., Novoselov V. V., 2006. Ras-dva, a member of novel family of small GTPases, is required for the anterior ectoderm patterning in the *Xenopus laevis* embryo. // Development. V. 133. P. 485–94.

99. Terns R.M., Terns M.P., 2014. CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed. // Trends Genet. V. 30. P. 111–8.

100. Thussbas C., Nahrig J., Streit S., Bange J., Kriner M., Kates R., Ulm K., Kiechle M., Hoefler H., Ullrich A., Harbeck N., 2006. FGFR4 Arg388 allele is associated with resistance to adjuvant therapy in primary breast cancer // J Clin Oncol.

101. Torii S., Kusakabe M., Yamamoto T., Maekawa M., Nishida E., 2004. Sef Is a Spatial Regulator for Ras / MAP Kinase Signaling // Dev. Cell.

102. Trokovic R., Jukkola T., Saarimäki J., Peltopuro P., Naserke T., Vogt Weisenhorn D.M., Trokovic N., Wurst W., Partanen J., 2005. Fgfr1-dependent boundary cells between

developing mid- and hindbrain // *Dev. Biol.*

103. Trueeb B., Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011.

104. Tsang M., Friesel R., Kudoh T., Dawid I.B., 2002. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. // *Nat. Cell Biol.* V. 4. P. 165–169.

105. Tseng a-S., Levin M., 2008. Tail regeneration in *Xenopus laevis* as a model for understanding tissue repair. // *J. Dent. Res.* V. 87. P. 806–816.

106. Umbhauer M., Penzo-Méndez A., Clavilier L., Boucaut J., Riou J., 2000. Signaling specificities of fibroblast growth factor receptors in early *Xenopus* embryo. // *J. Cell Sci.* V. 113 ( Pt 1. P. 2865–2875.

107. Wang F., Shi Z., Cui Y., Guo X., Shi Y.-B., Chen Y., 2015. Targeted gene disruption in *Xenopus laevis* using CRISPR/Cas9. // *Cell Biosci.* V. 5. P. 15.

108. Wilson S.W., Houart C., 2004. Early steps in the development of the forebrain // *Dev. Cell.* V. 6. P. 167–181.

109. Woodhouse G., King L., Wieczorek L., Osman P., Cornell B., 1999. The ion channel switch biosensor // *J. Mol. Recognit.* V. 12. P. 328–334.

110. Wray G.A., 2007. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations // *Nat. Rev. Genet.* V. 8. P. 206–216.

111. Yakushiji N., Suzuki M., Satoh A., Ide H., Tamura K., 2008. Effects of activation of hedgehog signaling on patterning, growth, and differentiation in *Xenopus* froglet limb regeneration // *Dev. Dyn.* V. 238. P. 1887–1896.

112. Yamagishi M., Okamaoto H., 2010. Competition for ligands between FGFR1 and FGFR4 regulates *Xenopus* neural development // *Int. J. Dev. Biol.* V. 54. P. 93–104.

113. Yanai I., Peshkin L., Jorgensen P., Kirschner M.W., 2011. Mapping Gene Expression in Two *Xenopus* Species: Evolutionary Constraints and Developmental Flexibility // *Dev. Cell.* V. 20. P. 483–496.

114. Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L., Jaenisch R., 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. // *Cell.* V. 154. P. 1370–9.

115. Yin J., Xu K., Zhang J., Kumar A., Yu F.-S.X., 2007. Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. // *J. Cell Sci.* V. 120. P. 815–25.

116. Zaid TM, Yeung TL, Thompson MS, Leung CS, Harding T, Co NN, Schmandt RS, Kwan SY, Rodriguez-Aguay C, Lopez-Berestein G, Sood AK, Wong KK, Birrer MJ M.S., 2013. Identification of FGFR4 as a Potential Therapeutic Target for Advanced-Stage, High-Grade Serous Ovarian Cancer // *Clin Cancer Res.*

117. Zhang J., Wagh P., Guay D., Sanchez-Pulido L., Padhi B.K., Korzh V., Andrade-Navarro M. a, Akimenko M.-A., 2010. Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. // Nature. V. 466. P. 234–237.