

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

На правах рукописи

Орлов Евгений Евгеньевич

**Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга
системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в
раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis***

Специальность – 1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

*диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Москва – 2023 г.

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

Научный руководитель:

Зарайский Андрей Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Краус Юлия Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Кафедры биологической эволюции биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Адамейко Игорь Игоревич, доктор биологических наук, профессор, руководитель Лаборатории нейроиммунологии Центра изучения мозга Венского медицинского университета.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Защита диссертации состоится 14 февраля 2024 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

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

Автореферат разослан «___» _____ 202__ г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физико-математических наук**



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Актуальность темы исследования, проведенного в ходе работы над диссертацией, определяется, прежде всего, тем, что она направлена на решение одного из наиболее фундаментальных вопросов биологии развития и синтетической биологии: на выявление и изучение принципов самоорганизации и регуляции морфогенетических полей – крупномасштабных динамических структур, определяющих целостность эмбрионального развития. Явление скейлинга, т.е. сохранение пропорций пространственной разметки эмбриона при изменении его размеров - наиболее характерная особенность эмбриональных морфогенетических полей. Вплоть до настоящего времени попытки понять механизмы скейлинга сводились к созданию и анализу поведения теоретических моделей, в той или иной мере воспроизводящих это явление *in silico*. Лишь сравнительно недавно при создании таких моделей авторы стали использовать экспериментальные данные о конкретных генах и их продуктах - секретируемых белках - идентифицированных в ходе изучения различных молекулярных механизмов в эмбриогенезе. Однако до сих пор в литературе не были описаны подходы для целенаправленного выявления генов и белков, непосредственно ответственных за эмбриональный скейлинг. Разработанный нами метод поиска генов-скейлеров с размер-чувствительной экспрессией представляет собой первый пример подобного подхода.

Помимо этого, актуальность диссертационной работы обусловлена с тем, что другим важным ее результатом стало выявление новых свойств секретруемой протеиназы Mmp3. А именно, была открыта способность Mmp3 специфично протеолизировать некоторые ключевые белки, участвующие в формировании морфогенетического градиента BMP вдоль дорсо-вентральной оси эмбриона. Задача выявления новых молекулярных функций у белков, участвующих в формировании морфогенетических градиентов, а так же выяснение их роли в формировании целостной структуры эмбриона – одна из самых актуальных задач биологии в целом и биологии развития в частности.

Научная новизна и практическая значимость работы

В настоящей работе впервые был разработан метод прицельного поиска генов-скейлеров как генов, дифференциально экспрессирующихся в эмбрионах нормального и половинного размера. На модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* была разработана оригинальная технология массового получения эмбрионов половинного размера с последующим глубоким транскриптомным секвенированием образцов РНК, выделенных из таких эмбрионов, а так же из эмбрионов нормального размера. В результате биоинформатического анализа полученных таким образом данных впервые была идентифицирована группа из генов, экспрессия которых в несколько раз отличалась в эмбрионах нормального и половинного размера.

В качестве наиболее подходящего кандидата на роль гена-скейлера среди найденной группы генов был выбран ген, кодирующий матриксную металлопротеиназу 3 (Mmp3), демонстрирующий наиболее резкое снижение экспрессии в эмбрионах половинного размера. Впервые было показано, что искусственное подавление функции *mmp3* действительно приводит к уменьшению размеров сомитной мезодермы и нервной пластинки, как это и наблюдается в уменьшенных эмбрионах, а усиление функции – к обратным эффектам. Для металлопротеиназы Mmp3 впервые были обнаружены новые субстраты: белки-ингибиторы BMP-лигандов - Noggin1 и 2, и протеаза Tolloid-like1, расщепляющая еще один белок-ингибитор BMP-каскада Chordin. Таким образом, впервые было показано, что Mmp3 действительно является новым модулятором системы морфогенов BMP/Chordin/Noggin. В результате была подтверждена изначальная гипотеза о том, что в саморегулирующейся системе, реагирующей на размер эмбриона, должны

существовать модулятор, концентрация которых сильно изменяется в зависимости от размера эмбриона. Следовательно, разработанный подход может быть применен и к другим модельным объектам с целью нахождения новых модуляторов морфогенетических градиентов. Подобный поиск имеет важное прикладное значение: морфогены участвуют во множестве процессов развития и метаболизма, и нарушение их нормальной функции является причиной целого ряда патологических процессов, таких как наследственные заболевания, нарушения развития плода, образования опухолей и пр. Например в данной работе были обнаружены новые субстраты для фермента Mmp3 – активного участника воспалительных процессов при черепно-мозговой травме и повреждении спинного мозга. Полученные в работе данные могут быть использованы для углубления нашего понимания этих патологических процессов. Кроме того, полученный комплекс новых данных о механизме регуляции градиентов морфогенных белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриональном развитии может быть использован в программах по обучению студентов и других специалистов соответствующего профиля.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы являлась экспериментальная проверка гипотезы о существовании специальных генов-скейлеров с экспрессией, зависящей от размера эмбриона, продукты которых осуществляют скейлинг морфогенетических градиентов, ответственных за пространственный паттернинг эмбриональных зачатков.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод массового разделения бластомеров эмбрионов шпорцевой лягушки и последующего их выращивания.
2. Выделить образцы РНК из эмбрионов нормального и половинного размера на стадии средней-поздней гастрюлы для последующего секвенирования транскриптомных кДНК библиотек и определения дифференциально экспрессирующихся генов-потенциальных скейлеров.
3. Подтвердить в независимых экспериментах с помощью количественной ПЦР дифференциальную экспрессию найденных генов и наметить среди них для последующего детального изучения наиболее перспективный кандидат на роль гена-скейлера. Клонировать его кДНК и определить паттерн экспрессии в эмбрионе с помощью метода гибридизации мРНК *in situ*.
4. С помощью инъекций мРНК и соответствующих антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов в эмбрионы вызвать активацию и подавление активности гена-скейлера, соответственно, с последующим исследованием изменений размеров эмбриональных зачатков с целью определения функции гена в эмбрионе.
5. Показать, что выбранный ген действительно участвует в переразметке определенных эмбриональных зачатков при уменьшении зародыша.
6. С помощью методов белковой химии (вестерн-блоттинг, ко-иммунопреципитация) выяснить, на какой(ие) из известных белков-морфогенов, оперирующих на стадии гастрюляции, может действовать белок данного гена.
7. Изучить молекулярный механизм модуляции белком этого гена градиента(ов) этого/этих белков-морфогенов на стадии гастрюлы.

Публикации и апробация работы

По теме работы опубликовано 10 статей. Результаты были представлены на 7 конференциях.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста и содержит следующие разделы: список сокращений, введение, актуальность темы исследования, научная новизна и практическая значимость работы, цель и задачи исследования, обзор литературы, результаты, обсуждение, выводы, материалы и методы, список литературы. Работа иллюстрирована 39 рисунками и 7 таблицами. Список литературы содержит 295 цитированных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Поиск новых скейлеров с помощью сравнения транскриптомов интактных и уменьшенных зародышей шпорцевой лягушки.

Для надежного и воспроизводимого получения правильно сложенных уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки был освоен и модифицирован метод по разделению и инкубированию левого и правого бластомера дробящейся зиготы (Рис. 1, А-В). Правильность эмбриональной разметки при этом определялась с помощью *in situ* гибридизации к основным маркерам эмбриональных структур: на стадии нейрулы у уменьшенных эмбрионов наблюдалось пропорциональное уменьшение нейроэктодермы (Рис. 1, Г; маркер *sox2*) и сомитной мезодермы (Рис. 1, Д; маркер *cardiac actin*). Однако, у таких эмбрионов наблюдалась диспропорционально большой зачаток хорды (Рис. 1, Е; окрашивание на маркер *chordin*). Интересно, что в ранних работах также наблюдалось диспропорциональное увеличение осевой мезодермы. Однако, подобные анализированным эмбрионы (около 70% пар) тем не менее развивались в нормально сложенных головастиков (Рис. 1, Ж). Таким образом, выбранный нами метод позволяет достигать качественного скейлинга в уменьшенных зародышах, что требуется выбранными нами условиями поиска новых скейлеров. Для этого выбирались пары эмбрионов с максимально сходными с контролем пропорциями и лизировались на стадии поздней гаструлы для транскриптомного сравнения. Для статистической достоверности данных было проведено три таких опыта. В результате был получен ряд генов (всего 11 генов без учета аллелей для L и S-геномов) с достоверно различной экспрессией ($\text{adjusted } p\text{-value} < 0.1$) в интактных и полученных из разделенных бластомеров эмбрионах (Таблица 1; Рис. 1, З). Важно, что, хотя и с несколько меньшей статистической достоверностью ($\text{adjusted } p\text{-value} = 0.231$), был обнаружен ген *sizzled* – известный экспандер градиента Chordin, чья экспрессия была снижена в уменьшенных эмбрионах; что подтверждает предсказательную силу разработанной методики (Таблица 1, выд. зеленым). Среди полученных генов также был отмечен ген *матриксной металлопротеазы-3*, чья экспрессия наиболее сильно уменьшалась в уменьшенных эмбрионах (Рис. 1, Ж, И). Кодированный фермент является секреторируемой протеазой ряда сигнальных факторов, ассоциированных с внеклеточным матриксом, и, следовательно, может являться скейлером. Для подтверждения того, что экспрессия *mmp3* действительно зависит от размера эмбриона, был использован другой, более распространенный метод получения уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки с помощью бисекции бластулы. Полученные из рассеченных бластул эмбрионы анализировались вместе с контролем на уровень экспрессии экспандера *sizzled* и предполагаемого скейлера *mmp3*, а также некоторых других генов дорзо-вентральной разметки с помощью КОТ-ПЦР (Рис. 2, А). Оказалось, что при сагиттальном рассечении бластул, при котором в обеих половинах происходит эмбриональная регуляция (хотя и значительно менее полная, чем в случае инкубирования разделенных бластомеров), происходит значительное снижение экспрессии *mmp3* и *sizzled*. Кроме того, экспрессия *mmp3* значительно снижалась в обеих

рассеченных половинах и при перпендикулярном рассечении, при котором происходит регуляция только в дорсальной части. Тогда как экспрессия *sizzled* снижалась только в дорсальной части, но сильно увеличивалась в вентральной, что можно объяснить разной активностью ВМР-каскада в дорсальных и вентральных половинках, влияющей на экспрессию *sizzled*. Также снижение экспрессии *mmp3* наблюдалось при постепенном увеличении удаляемой части у эмбриона путем удаления отдельных бластомеров на более поздних стадиях развития: в данном случае наблюдалось постепенное снижение экспрессии *mmp3* с уменьшением размера оперированного эмбриона (Рис. 2, Б), причем экспрессия *mmp3* в эмбрионах, уменьшенных более, чем в два раза, была ниже, чем в эмбрионах половинного размера, то есть, экспрессия *mmp3* обратно пропорциональна степени уменьшения размера эмбриона. Полученные данные надежно свидетельствуют о том, что экспрессия *mmp3* действительно зависит преимущественно лишь от размера эмбриона, и снижение экспрессии *mmp3* в уменьшенных эмбрионах не является, во-первых, результатом уже произошедшей регуляции (поскольку снижение происходит и в вентральных эксплантатах бластулы, которые не способны к регуляции), во-вторых, не является артефактом проведенной операции по разделению бластомеров, о чем говорят как данные по удалению отдельных бластомеров на более поздних стадиях, так и сходное наблюдаемое снижение экспрессии *mmp3* в уменьшенных эмбрионах, полученных совершенно другим способом из разрезанных бластул. Таким образом, *Mmp3* может быть истинным скейлером.

Таблица 1: список дифференциально экспрессирующихся генов в интактных и уменьшенных эмбрионах, выявленный с помощью NGS-секвенирования

Название гена	Описание	Кол-во ридов у контроля	Кол-во ридов у половинок	опыт/ контроль	Log2 (опыт/контроль)	P-value	Q-value
<i>myb.S</i>	transcriptional activator myb	220.78	48.88	0.22	-2.18	1.88E-05	0.0194
<i>tp83.S</i>	tumor protein 83 isoform x2	1701.11	358.83	0.21	-2.25	7.81E-09	0.0001
<i>Xelaev18027442m</i>	segment polarity protein dishevelled homolog dvl-3 isoform x2	901.72	311.18	0.35	-1.53	5.27E-07	0.0021
<i>myb.L</i>	transcriptional activator myb isoform x8	192.84	51.80	0.27	-1.90	1.07E-05	0.0145
<i>atp8vfc2.L</i>	vtype proton atpase subunit c 2	147.87	40.33	0.27	-1.87	3.74E-05	0.0347
<i>rasal1.L</i>	rasgap-activating-like protein 1	441.07	139.72	0.32	-1.66	1.69E-05	0.0194
<i>Xelaev18008287m</i>	multicilin	702.71	132.17	0.19	-2.41	8.90E-14	0.0000
<i>Xelaev18010956m</i>	multicilin	493.57	102.72	0.21	-2.26	1.07E-05	0.0145
<i>ccno.S</i>	cyclin-o	399.23	130.55	0.33	-1.81	2.01E-06	0.0039
<i>Xelaev18009086m</i>	mast stem cell growth factor receptor kit	690.02	251.84	0.36	-1.46	1.35E-06	0.0029
<i>actg1.S</i>	cytoplasmic type 5 isoform x1	5840.72	16320.38	2.89	1.53	1.47E-08	0.0001
<i>znf34.L</i>	krueppel-like factor 5 isoform x1	533.11	178.57	0.33	-1.59	7.65E-07	0.0025
<i>Xetro180028501m.1</i>	val protein	5241.27	2077.54	0.40	-1.34	9.22E-06	0.0145
<i>Xelaev18014488m</i>	protein mab-21-like 3	727.32	296.88	0.41	-1.29	1.89E-05	0.0194
<i>mmp3.L</i>	collagenase 3-like	180.53	15.01	0.08	-3.59	9.25E-07	0.0028
<i>slc16a6-like.L</i>	monocarboxylate transporter 7	133.45	602.16	4.51	2.17	2.40E-10	0.0000
<i>LOC100494515-like.L</i>	globin y	3189.98	1017.47	0.32	-1.84	1.08E-06	0.0028
<i>actg1.L</i>	cytoplasmic 2	2338.81	5389.94	2.31	1.21	1.11E-05	0.0145
<i>Xelaev18043710m</i>	--NA--	2285.38	5023.72	2.20	1.14	2.38E-05	0.0230
<i>Xelaev18038326m</i>	hepoidin 1 precursor	48.40	3.07	0.06	-3.98	1.27E-05	0.0155
<i>pou2f3.L</i>	pou class transcription factor 3	259.52	70.04	0.27	-1.89	2.83E-06	0.0047
<i>szl.L</i>	<i>Xelaev18017889m.g</i>	1328.51	502.38	0.38	-1.40	0.000343837	0.2316

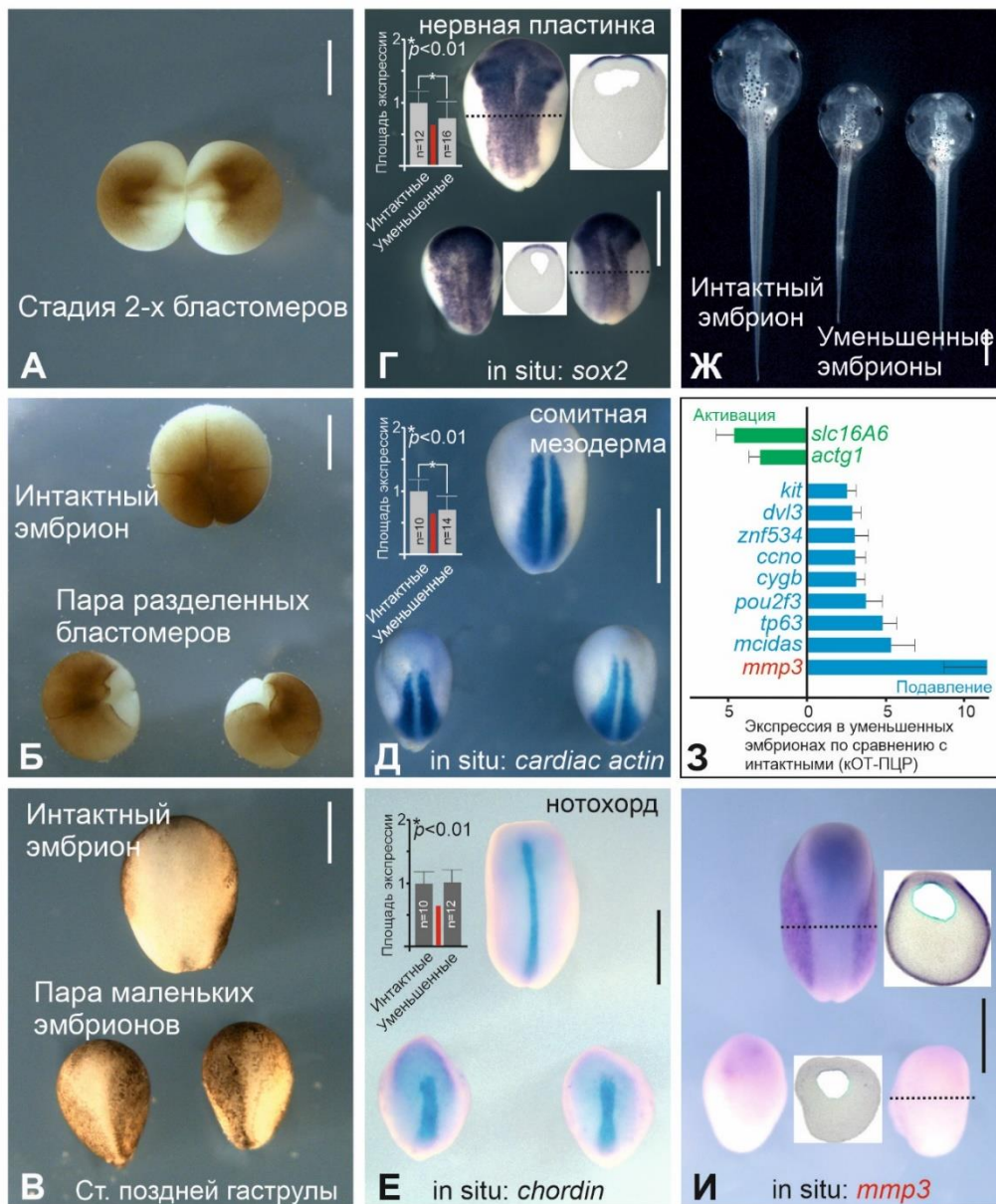


Рис. 1. Получение уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки и поиск потенциальных скейлеров.

(А-В) Получение уменьшенных эмбрионов путем деления левого и правого бластомера на стадии 2-х клеток с последующим инкубированием пар до стадии поздней гастролы/ранней нейрулы. (Г-Е) Анализ экспрессии некоторых маркеров осевых структур у интактных и уменьшенных эмбрионов на стадии средней нейрулы. Красная линия обозначает позицию, как должны уменьшиться анализируемые структуры у уменьшенных эмбрионов в случае «идеального» скейлинга. (Ж) Эмбрионы из (В), развившиеся до стадии головастика. (З) Подтверждение с помощью КОТ-ПЦР дифференциально экспрессирующихся генов в интактных и уменьшенных эмбрионах, обнаруженных с помощью секвенирования мРНК. (И) *In situ*-гибридизация с зондом к *mmp3* интактных и уменьшенных эмбрионов на стадии средней нейрулы. Пунктирная линия в (Г) и (И) указывает на примерное расположение срезов.

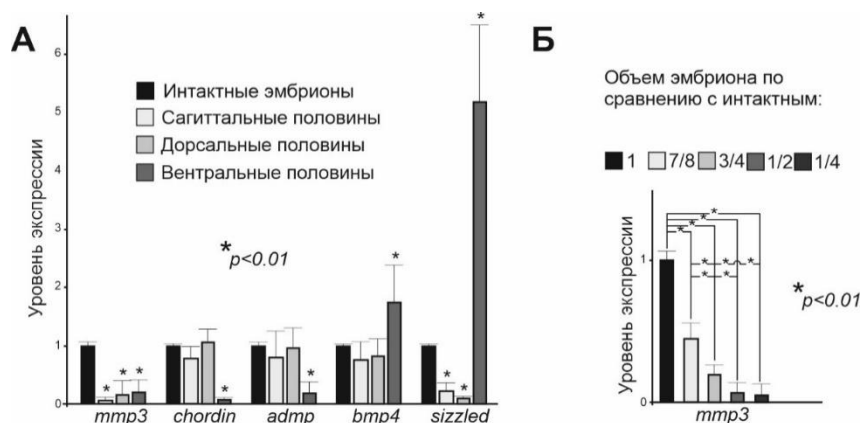


Рис. 2. кОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов эмбрионов шпорцевой лягушки на стадии поздней гастрюлы (стадия 12.5).

(А) Экспрессия *mmp3* снижается и при сагиттальном, и при фронтальном разрезании бластул. Экспрессия *sizzled* снижалась только в сагиттальных и дорсальных половинах, но росла в вентральных. Для проверки корректности опыта также анализировалась экспрессия дорзо-вентральных маркеров *chordin*, *admp* и *bmp4*. Полученные уровни экспрессии этих генов для разных типов половин совпадают с литературными данными. (Б) При постепенном уменьшении размера эмбриона происходит постепенное снижение экспрессии *mmp3*. Материал от зародышей отбирался в латеральной области, чтобы не нарушать дальнейшую дорзо-вентральную разметку.

2. Исследование экспрессии гена матричной металлопротеиназы-3 в раннем развитии шпорцевой лягушки.

Для исследования функции гена *mmp3* в раннем развитии шпорцевой лягушки был исследован паттерн экспрессии гена с помощью гибридизации *in situ* с антисмысловым зондом к *mmp3*. Было показано, что в начале гастрюляции *mmp3* экспрессируется в эктодерме и мезодерме с максимумом экспрессии в дорсальной области (Рис. 3, А, Б, В). Затем, в конце гастрюляции, экспрессия *mmp3* в дорсальной эктодерме падает, но сохраняется в дорсальной мезодерме (Рис. 3, Г-Д'). Во время нейруляции паттерн экспрессии *mmp3* довольно сильно меняется: экспрессия *mmp3* в мезодермальных тканях перестает детектироваться, и сосредотачивается в клетках внутреннего слоя эпидермиса (сенсорный слой) (Рис 3, Е-Ж'). Важно отметить, что клетки внутреннего слоя эпидермиса выстилают т.н. щель Браше – область межклеточного пространства между эктодермой и мезодермой, в которую могут секретироваться различные морфогены, такие как Chordin. Следует заметить, что и во время гастрюляции *mmp3* также экспрессируется рядом с щелью Браше.

3. Нокаунт *mmp3* приводит к уменьшению сомитной мезодермы и нервной пластинки, но одновременно к увеличению нотохорда.

Для того, чтобы определить, действительно ли *Mmp3* вовлечен в разметку ранних эмбрионов шпорцевой лягушки, был использован метод специфичного подавления трансляции белка с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов. В результате инъекции морфолино к *mmp3* (*mmp3-МО*, 5 пмоль/эмбрион) происходило уменьшение нервной пластинки и сомитной мезодермы (маркеры *sox2* и *cardiac actin*, соответственно) (Рис. 4, А-Б''),

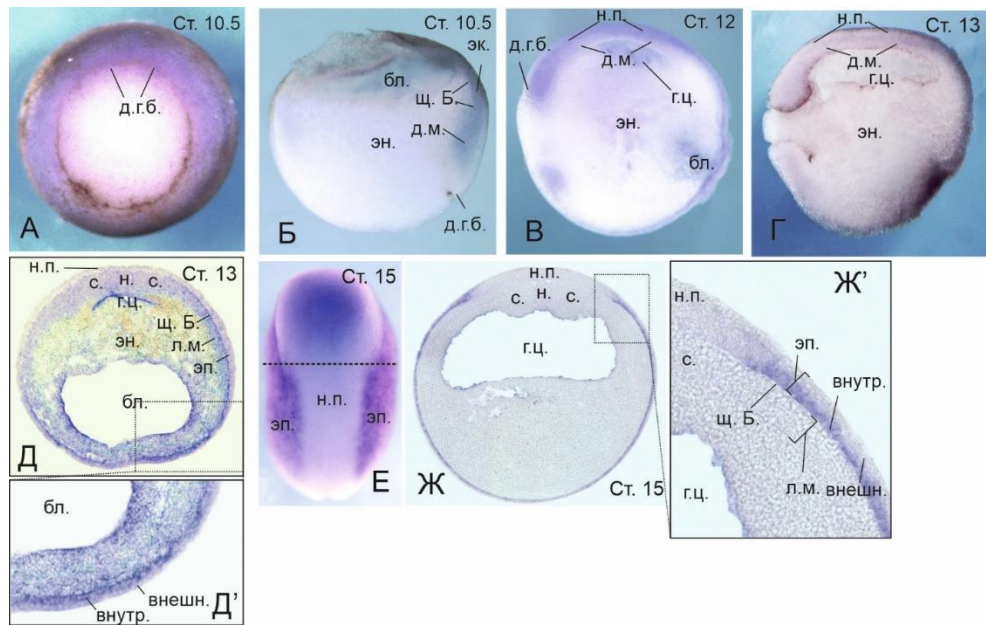


Рис. 3. Анализ экспрессии гена матричной металлопротеиназы-3 в раннем развитии шпорцевой лягушки с помощью гибридизации с антисмысловым зондом к *mmp3*.

(А) Экспрессия *mmp3* на ранней гастрале (стадия 10.5), вид со стороны желточной пробки. (Б) Сагиттальный срез эмбриона, аналогичного в (А). (В) Сагиттальный срез средней/поздней гастралы (стадия 12). (Г) Сагиттальный срез поздней гастралы/ранней нейрулы (стадия 13). (Д) Трансверсальный срез эмбриона, аналогичного в (Г). (Д') Экспрессия *mmp3* в эпидермисе. (Е) Экспрессия *mmp3* на средней нейруле (стадия 15). Вид с дорсальной стороны. (Ж) Трансверсальный срез эмбриона, аналогичного в (Е). Пунктиром в (Е) обозначена примерное расположение плоскости среза в (Ж, Ж'). (Ж') Экспрессия *mmp3* в эпидермисе. Обозначения: бл. – бластоцель; внешн. – внешний слой эпидермиса; внутр. – внутренний слой эпидермиса; г.ц. – гастроцель; д.г.б. – дорсальная губа бластопора; д.м. – дорсальная мезодерма; л.м. – латеральная мезодерма; н. – нотохорд; н.п. – нервная пластинка; с. – сомит; щ. Б. – щель Браше; эн. – энтодерма; эп. – эпидермис.

что согласуется с наблюдаемой переразметкой (скейлингом) этих структур в уменьшенных эмбрионах (Рис. 4, В-Г"). Интересно, что с уменьшением сомитной мезодермы и нейроэктодермы при подавлении трансляции *mmp3* происходило увеличение зачатка хорды, что также согласуется с данными о непропорциональном увеличении размера хорды при переразметке уменьшенных зародышей (антискейлинге) (Рис. 4, Д-Е"). Важность активности *Mmp3* для переразметки эмбриональных зачатков при регуляции эмбриона была также дополнительно подтверждена в опытах по оверэкспрессии *mmp3* в целых и уменьшенных эмбрионах (Рис. 5). Так, инъекция 20 пг/эмбрион мРНК *mmp3* приводит к расширению нервной пластинки и сомитов у целых эмбрионов и у уменьшенных эмбрионов (Рис. 5, А-А'', Б-Б'', Г-Г'', Д-Д''), сильно нарушая нормальную эмбриональную переразметку у последних. Аналогично, инъекция мРНК *mmp3* вызывает сужение хорды у целых и уменьшенных эмбрионов по сравнению с неинъекцированными (Рис. 5, В-В'', Е-Е'). Параллельно с мРНК *mmp3* также производилась инъекция *mmp3-МО* в те эмбрионы, которые затем подвергались разрезанию: поскольку в уменьшенных эмбрионах эндогенный уровень мРНК *mmp3* должен быть очень низок, то дополнительный нокдаун *mmp3* с помощью морфолино не имел выраженного эффекта, что подтверждает функциональную значимость изменения экспрессии *mmp3* для эмбриональной переразметки в уменьшенных зародышах (Рис. 5, А'', Б'', В'').

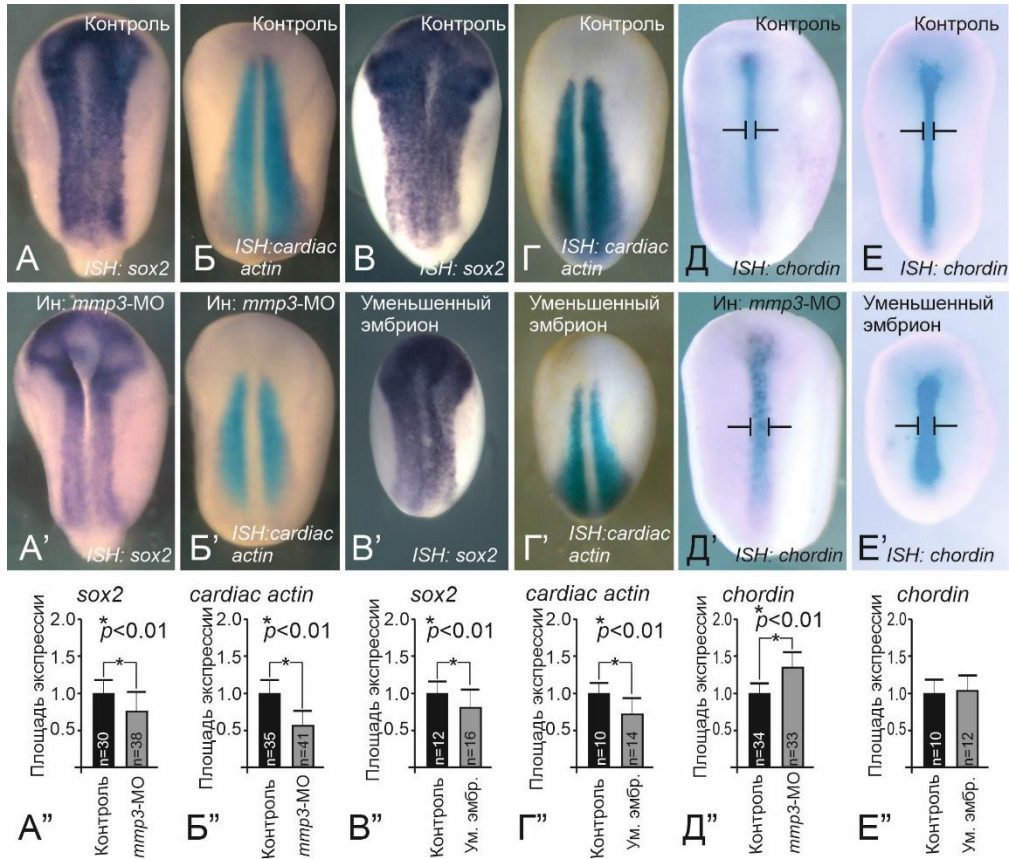


Рис. 4. Эффект подавления *ttp3* на экспрессию осевых маркеров.

(A, A') Сравнение экспрессии маркера нейроэктодермы *sox2* в контрольных (A) и инъектированных 5 пмоль/эмбрион *ttp3*-МО (A') эмбрионах. (Б, Б') Сравнение экспрессии маркера сомитной мезодермы *cardiac actin* в контрольных (Б) и инъектированных *ttp3*-МО (Б') эмбрионах. (В, В') Сравнение экспрессии маркера нейроэктодермы *sox2* в контрольных (В) и уменьшенных (В') эмбрионах. (Г, Г') Сравнение экспрессии маркера сомитной мезодермы *cardiac actin* в контрольных (Г) и уменьшенных (Г') эмбрионах. (Д, Д') Сравнение экспрессии маркера хорды *chordin* в контрольных (Д) и инъектированных *ttp3*-МО (Д') эмбрионах. (Е, Е') Сравнение экспрессии маркера хорды *chordin* в контрольных (Е) и уменьшенных (Е') эмбрионах. (А''-Е'') Расчет площади экспрессии соответствующих маркеров. Ум. эмбр. – уменьшенный эмбрион.

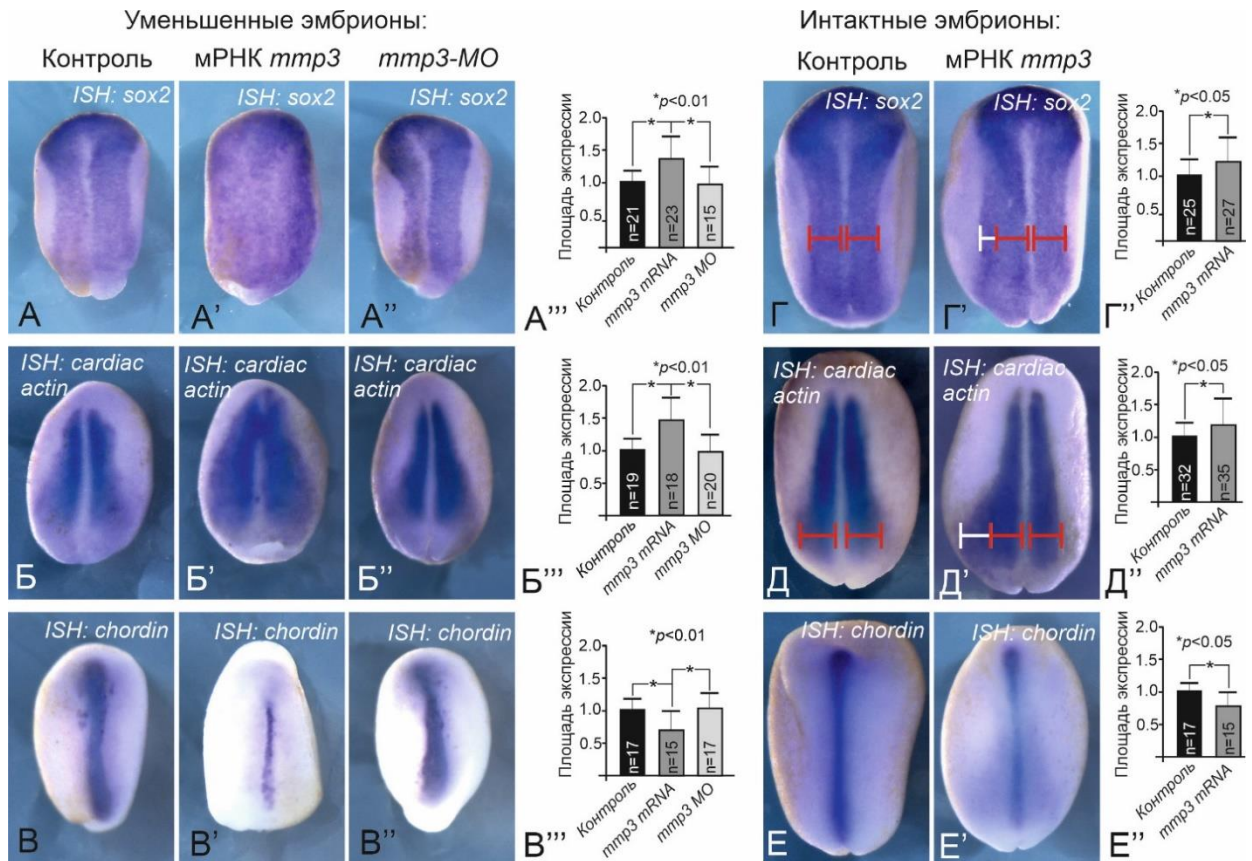


Рис. 5. Влияние повышения и понижения экспрессии *ttp3* на разметку осевых зачатков у целых и уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки.

(А-А'') Усиление активности *ttp3* в уменьшенных эмбрионах расширяет нейральный зачаток (А'), инъекция *ttp3*-МО не влияет на размер нейрального зачатка (А''). (Б-Б'') Усиление активности *ttp3* в уменьшенных эмбрионах расширяет сомитную мезодерму (Б'), инъекция *ttp3*-МО не влияет на размер сомитной мезодермы (Б''). (В-В'') Усиление активности *ttp3* в уменьшенных эмбрионах сужает хорду (В'), инъекция *ttp3*-МО не влияет на размер хорды (В''). (Г, Г') Инъекция мРНК *ttp3* в левый бластомер приводит к расширению нервной пластинки на стороне инъекции. (Д, Д') Инъекция мРНК *ttp3* в левый бластомер приводит к расширению сомитной мезодермы на стороне инъекции. (Е, Е') Инъекция мРНК *ttp3* в оба бластомера приводит к уменьшению хорды. (А''', Б''', В''', Г'', Д'', Е'') Расчеты площадей зачатков в соответствующих наблюдениях.

Примечательно, что в ходе дальнейшего развития инъекцированные *ttp3*-МО уменьшались в размере по сравнению с неинъекцированными. Видимо, эмбрион «пытается» подстроить свой объем под уменьшившиеся размеры осевых зачатков, причем уменьшение объема эмбриона сопровождалось выбрасыванием лишних энтодермальных клеток из бластопора/ануса эмбриона. Некоторые уменьшенные эмбрионы (от 10 до 55% в эксперименте) в ходе дальнейшего наблюдения развивались в полностью нормальные, правильно сложенные, но уменьшенные эмбрионы. Уменьшение количества инъекцированного *ttp3*-МО в два раза (до 2.5 пмоль/эмбрион), а также нокаут *ttp3* с помощью CRISPR-Cas9 (35%, n=250), значительно увеличивало долю правильно сложенных уменьшенных головастиков в эксперименте, что может свидетельствовать о том, что подавление лишь одного гена *ttp3* может приводить к полному скейлингу эмбриона. При этом для пропорциональной переразметки целого эмбриона необходимо небольшое снижение активности *ttp3*, что приводит к небольшому изменению размера

эмбриональных зачатков, под которое эмбрион может «подогнать» свой размер. Однако сильное снижение активности *ttnr3* приводит к слишком значительным перестройкам в эмбрионе, что в результате приводит к аномальному фенотипу. При этом в уменьшенных эмбрионах как раз может требоваться более значительное снижение активности *ttnr3*, поскольку их изначальный объем в два раза меньше, и для них будет требоваться сильная переразметка.

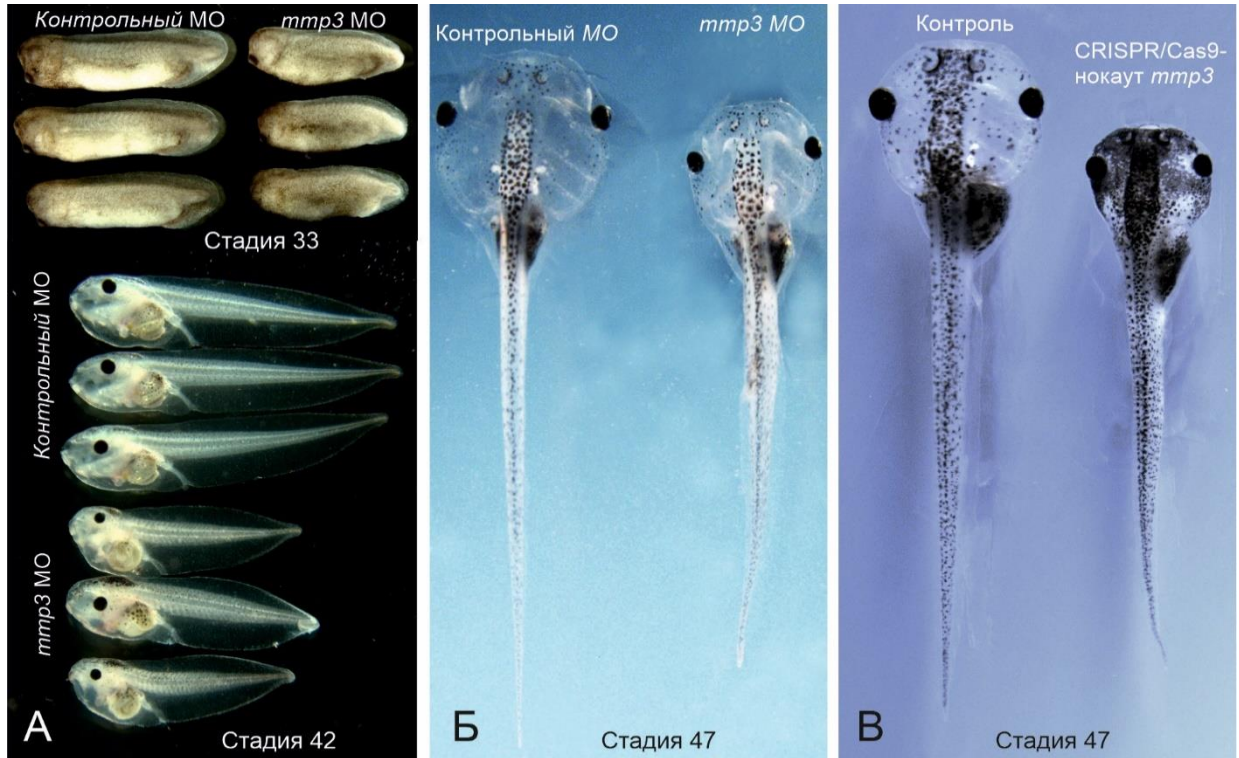


Рис. 8. Подавление активности *ttnr3* приводит к развитию уменьшенных зародышей.

(А) Инъекция *ttnr3*-МО приводит к уменьшению зародышей. Вид стадий 33 и 42. (Б) Инъекция сниженной концентрации *ttnr3*-МО приводит к формированию уменьшенных нормальных зародышей. (В) Нокаут *ttnr3* с помощью CRISPR-Cas9 также приводит к формированию уменьшенных зародышей.

4. Mmp3 расщепляет секретируемые белки Noggin1 и 2 и препятствует деградации Chordin путем разрушения металлопротеиназы Tolloid-like1.

Поскольку Mmp3 участвует в процессинге различных элементов внеклеточного матрикса, было предположено, что Mmp3 также способна деградировать некоторые секретируемые белки-морфогены, ответственные за дорзо-вентральную разметку. Исходя из этого, был протестирован ряд секретируемых морфогенов, ответственных за дорзо-вентральную разметку, на способность подвергаться протеолитической деградации с помощью Mmp3. Сначала были проверены белки-антагонисты BMP-каскада, секретируемые в шпемановском организаторе: Cerberus, Chordin, Follistatin и Noggin1. Кроме того, был протестирован морфоген Noggin2. Учитывая, что мРНК *noggin2* транслируется примерно в 200 раз активнее, чем мРНК *noggin1*, присутствие даже слабой экспрессии *noggin2* на стадии гаструлы может влиять на разметку дорзо-вентральной оси. Когда меченные Мус-эпитопом конструкции мРНК *chordin*, *cerberus*, *follistatin*, *noggin1* и *noggin2* ко-инъекцировались в эмбрионы шпорцевой лягушки вместе с мРНК *ttnr3*, не

было замечено деградации Cerberus и Follistatin (Рис. 9, А, Б). Однако наблюдалось сильное ослабление полос детекции конструкций Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2 при их ко-экспрессии с Mmp3 (Рис. 9, В, Г). При этом деградации Мус-Noggin1/2 не наблюдалось при ко-инъекции конструкций мРНК *mus-noggin1/2* с неактивной формой *mmp3*, имеющую точечную мутацию Glu219Ala в каталитическом центре (Рис. 9, Д). При ко-инъекции мРНК *mus-chordin* вместе с *mmp3* наблюдался обратный эффект усиления полосы детекции Мус-Chordin. Этот эффект сопровождался ослаблением полос низкомолекулярных фрагментов деградации Chordin протеиназой Tolloid-like1 (Tll1) (Рис. 9, Е).

Для того, чтобы проверить, действительно ли изменение эндогенного уровня мРНК *mmp3* приводит к изменению концентрации Chordin и Noggin1/2 в эмбрионе *in vivo*, была сравнена концентрация соответствующих эндогенных белков в межклеточном пространстве контрольных эмбрионов и эмбрионов с подавленной трансляцией *mmp3*. Для этого применялся метод вестерн-блоттинга концентрированной межклеточной среды эмбрионов с поликлональными антителами к Chordin и Noggin1/2. В результате показано снижение концентрации Chordin и повышение концентрации Noggin1/2 в межклеточной жидкости эмбрионов с подавленной трансляцией Mmp3 (Рис. 9, Ж, З). Также снижение концентрации Chordin в межклеточной среде было выявлено у уменьшенных эмбрионов, в которых происходит естественное снижение экспрессии *mmp3* (Рис. 9, И). Таким образом, было подтверждено, что Mmp3 деградирует Noggin1/2 и стабилизирует Chordin в эмбрионах шпорцевой лягушки *in vivo*.

Учитывая, что Mmp3 стабилизирует Chordin путем ингибирования функции Tolloid-like1, была проверена способность Mmp3 расщеплять Tolloid-like1. Действительно, ко-экспрессия *mus-tolloid-like1* и *mmp3* приводит к ослаблению полосы детекции зрелой (активной) формы Tolloid-like1 на вестерн-блоте. В то же время незрелая (неактивная) форма Tolloid-like1, содержащая ингибиторный пропептид, оставалась интактной (Рис. 10, А). Также не было замечено деградации зрелой формы Tolloid-like1 при ко-инъекции соответствующей мРНК и мРНК мутантной формы *mmp3(Glu219Ala)* (Рис. 10, Б). Следовательно, ослабление полосы детекции зрелой формы Tolloid-like1 происходит за счет её деградации, а не ингибирования её процессинга при совместной секреции обеих конструкций. Причина, по которой Mmp3 способна расщеплять только зрелую форму Tolloid-like1, возможно заключается в том, что активная форма Mmp3 образуется только в межклеточном пространстве эмбриона после секреции. Также в межклеточном пространстве присутствует преимущественно зрелая форма Tolloid-like1, которая также претерпевает процессинг после секреции. Данное предположение было проверено экспериментально: при разделении внутриклеточной и внеклеточной фракции эмбрионов шпорцевой лягушки, экспрессирующих мРНК *mus-tolloid-like1*, во внутриклеточной фракции наблюдали преимущественно незрелую форму белка, тогда как во внеклеточной фракции – зрелую. При этом ко-экспрессия *mus-tolloid-like1* и *mmp3* приводит к практически полному исчезновению зрелой формы Tolloid-like1 во внеклеточной фракции (Рис. 10, В). Таким образом можно заключить, что Mmp3 действительно расщепляет Tolloid-like1 преимущественно во внеклеточной среде.

Для подтверждения высокой специфичности протеолитической функции Mmp3 в развивающемся эмбрионе шпорцевой лягушки также была исследована возможность

расщепления других участников dorзо-вентральной разметки: ADMP, BMP4 и Sizzled. Однако, было показано, что Mmp3 не влияет на стабильность этих белков (Рис. 10, Г-Е).

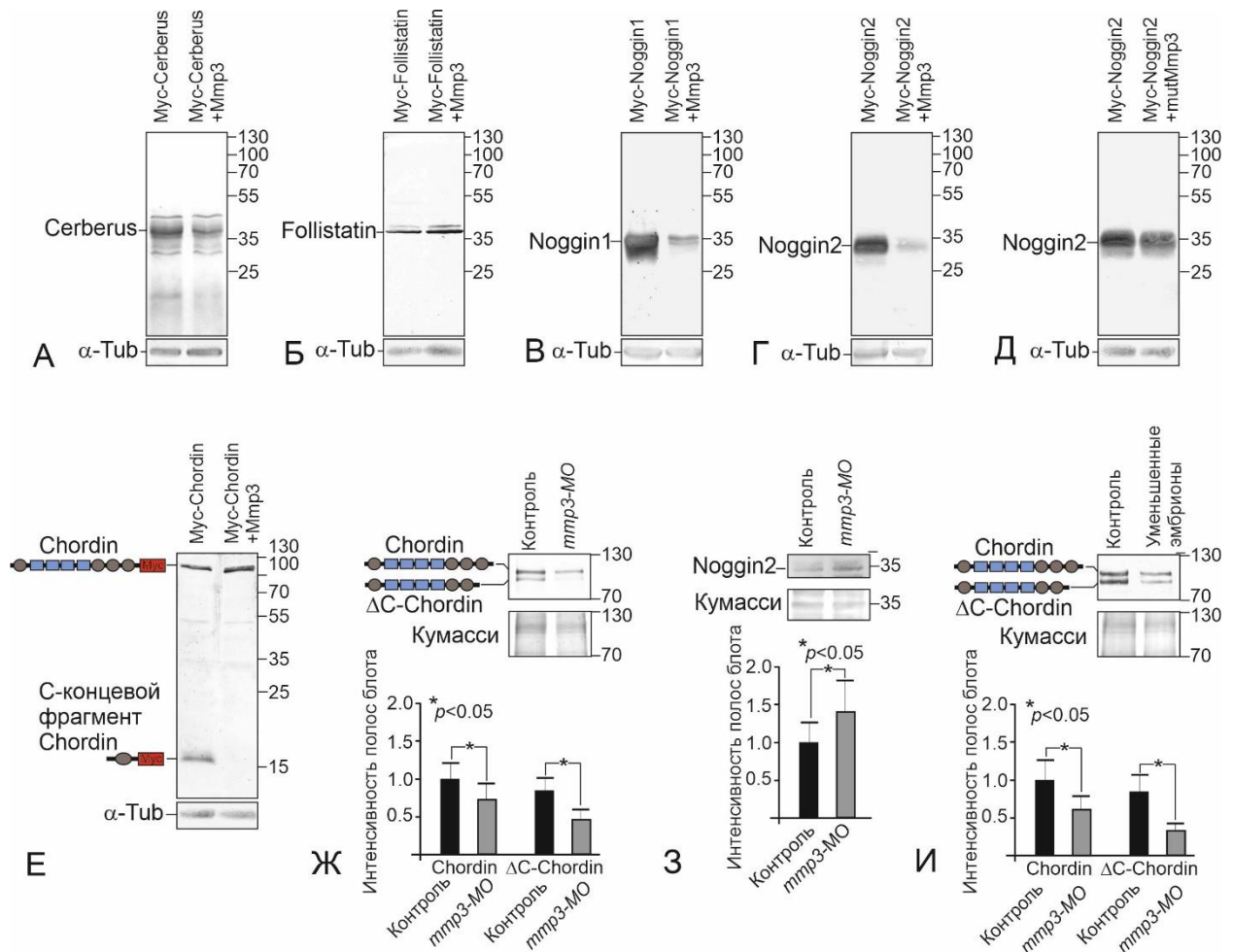


Рис. 9. Исследование воздействия Mmp3 на секретируемые факторы шпемановского организатора.

(А) Mmp3 не расщепляет Cerberus. (Б) Mmp3 также не расщепляет Follistatin. (В, Г) Mmp3 способна расщеплять Noggin1 (В) и Noggin2 (Г). Неактивная мутантная форма *mutMmp3*(Glu219Ala) не способна расщеплять Noggin2. (Е) Mmp3 предотвращает расщепление Chordin протеазой Tolloid-like. (Ж) Подавление трансляции *tmpr3* с помощью МО приводит к снижению концентрации двух активных форм Chordin в межклеточном пространстве: интактного Chordin и частично процессированного протеазой Tolloid-like1 Δ C-Chordin, который также обладает сильной анти-BMP-активностью. (З) Подавление трансляции *tmpr3* с помощью МО также приводит к повышению концентрации Noggin1/2 в межклеточном пространстве эмбрионов. (И) В межклеточном пространстве уменьшенных эмбрионов происходит снижение концентрации Chordin и Δ C-Chordin. В (А, Б, В, Г, Д) на форец наносились тотальные лизаты эмбрионов. Контроль загрузки – блот с антителами к α -Tubulin. В (Ж, З, И) на форец наносилась сконцентрированная межклеточная фракция ~20-30 эмбрионов. Контроль загрузки – окрашивание геля Кумасси.

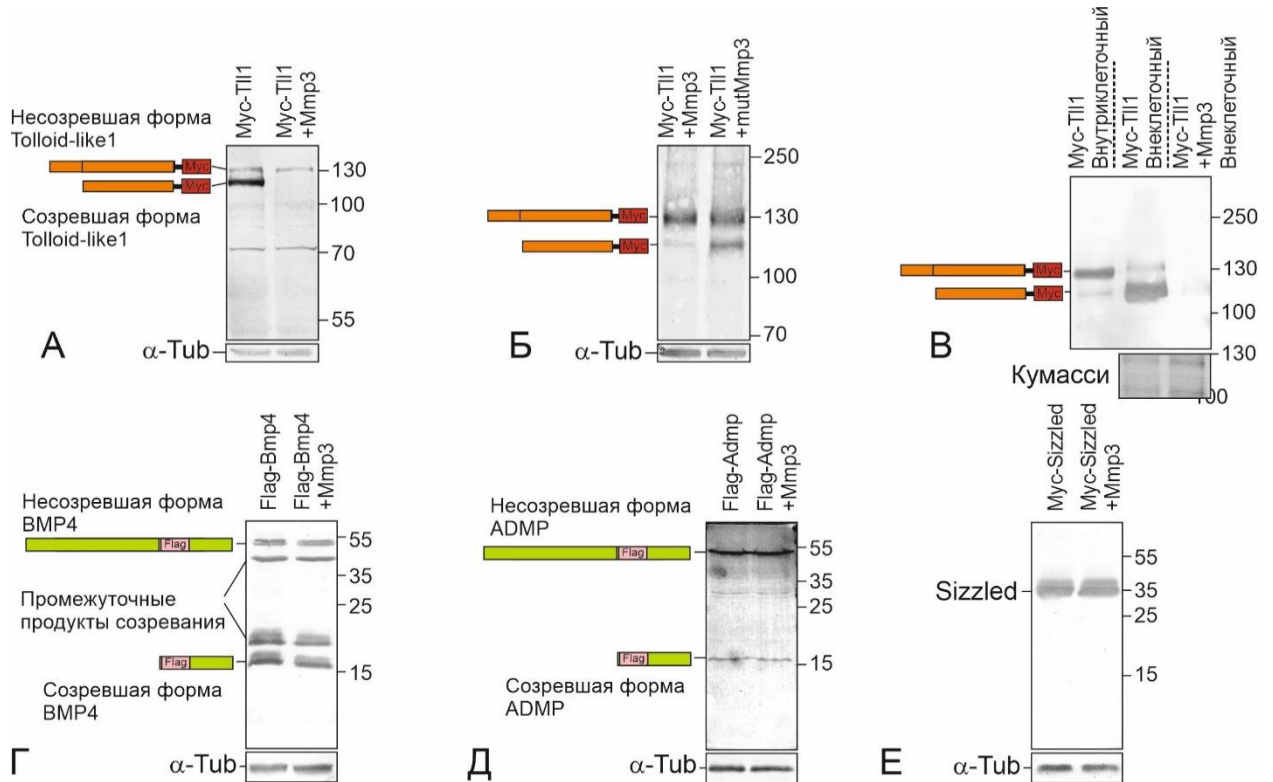


Рис. 10. Исследование воздействия Mmp3 на Tolloid-like1 и на некоторых участниках дорзо-вентральной разметки.

(А) Mmp3 расщепляет исключительно созревшую форму Tolloid-like1 (Tll1). (Б) Неактивная форма Mmp3 не влияет на стабильность созревшей формой Tll1. (В) Mmp3 расщепляет Tll1 только во внеклеточной среде. Также продемонстрировано, что Mmp3 не расщепляет: BMP4 (Г); ADMP (Д); Sizzled (Е).

5. В соответствии с ролью Mmp3 как экспандера для Chordin, подавление функции Mmp3 вызывает расширение вентрального маркера *sizzled*.

Если Mmp3 усиливает ингибиторное воздействие Chordin на BMP-каскад, то подавление функции Mmp3 должно усиливать экспрессию вентральных генов-маркеров, активируемых BMP-каскадом. Для подтверждения данного предположения был исследован эффект нодауна *mmp3* с помощью морфолино на экспрессию вентрального маркера *sizzled*. Действительно, при подавлении Mmp3 происходит расширение домена экспрессии *sizzled* в дорсальную сторону (Рис. 11, Б, Б'). Более того, согласно с обнаруженным ингибиторным эффектом Mmp3 на зрелую форму Tolloid-like1, ко-инъекция морфолино к *mmp3* и *tolloid-like1* предотвращала это расширение (Рис. 11, В, В'). Наконец, ко-инъекция морфолино к *mmp3*, *tolloid-like1* и *chordin* вновь приводила к расширению домена экспрессии *sizzled* (Рис. 32, Г, Г'), что полностью подтверждает предположенное функциональное (в данном случае эпистатическое) взаимодействие генов данных белков *in vivo*.

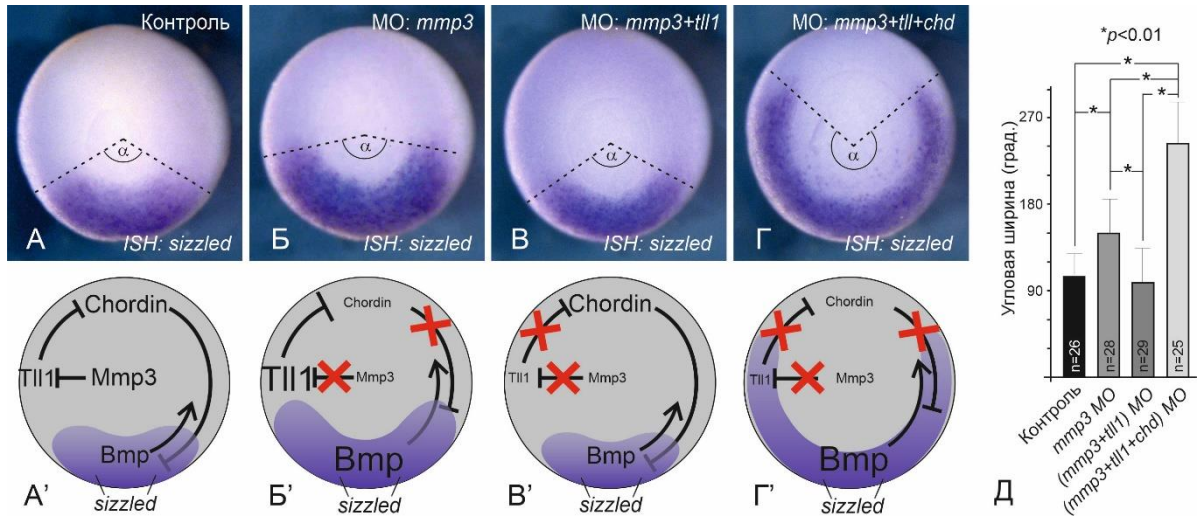


Рис. 11. Влияние *mmp3* на экспрессию вентрального гена-маркера *sizzled*.

(А) Контрольный эмбрион. (Б) Подавление одного гена *mmp3* (инъекция 3.33 пмоль/эмбрион *mmp3-MO*) вызывает дополнительную активацию *tolloid-like1*, что вызывает деградацию *Chordin* и, следовательно, расширение вентрального маркера *sizzled*. (В) Дополнительное подавление *tolloid-like1* (ко-инъекция 3.33 пмоль/эмбрион *mmp3-MO* + 3.33 пмоль/эмбрион *tolloid-like1-MO*) отменяет эффект от подавления *mmp3*. (Г) Дополнительное подавление *chordin* (ко-инъекция 3.33 пмоль/эмбрион *mmp3-MO* + 3.33 пмоль/эмбрион *tolloid-like1-MO* + 1.6 пмоль/эмбрион *chordin-MO1* + 1.6 пмоль/эмбрион *chordin-MO2*) снова вызывает расширение вентрального маркера *sizzled*. (А'-Г') Схемы взаимодействия *mmp3*, *tolloid-like1*, *chordin* и *sizzled* при указанных генетических манипуляциях. (Д) Расчет угловой ширины домена экспрессии *sizzled* для (А-Г).

6. Подавление *Chordin* вызывает сужение (скейлинг) сомитов и нервной пластинки, а активация *Noggin1/2* вызывает расширение (антискейлинг) нотохорда.

Для того, чтобы детально выяснить роль *Chordin* и *Noggin1/2* в *Mmp3*-опосредованном скейлинге зародышей, был проанализирован эффект подавления их функции на размер нейроэктодермы, сомитов и нотохорда. При подавлении *chordin* с помощью морфолино наблюдалось сужение нервной пластинки и сомитов, сходное с таким в уменьшенных зародышах или в зародышах с подавленным *mmp3* (Рис. 12, А, Б). Сходный эффект наблюдался при гиперэкспрессии ингибитора *Chordin* *tolloid-like1* (Рис. 12, В). Однако, при подавлении *chordin* не происходило изменения размера нотохорда (Рис. 12, Г). Также не наблюдалось изменения размера нотохорда, сомитов и нервной пластинки при подавлении *Noggin1/2* (Рис. 12, А, Б, Г). Однако при одновременном подавлении *chordin* и одного или обоих *noggin1/2* происходило уменьшение нотохорда (Рис. 13, А), при этом в случае одновременного подавления *chordin* и одного из *noggin1/2* не происходило дополнительного уменьшения нотохорда по сравнению с подавлением *chordin* и какого-либо из *noggin1/2* (Рис. 13, А). Полученный результат хорошо согласуется с предыдущими данными, согласно которым инициация значительной части зачатка нотохорда происходит еще до гаструляции по BMP-независимому механизму. Однако, когда нотохорд имеет диспропорционально увеличенный размер в случае уменьшенных эмбрионов или инъекцированных *mmp3-MO*, инъекция *noggin2-MO* (но не *noggin1-MO* или *chordin-MO1+2*) приводит к уменьшению таких увеличенных нотохордов (Рис. 13, Б; Рис. 14, А). Сильное уменьшение нотохорда также наблюдалось в

уменьшенных зародышах при подавлении *chordin* и *noggin1/2* (Рис. 14, Б). Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод, что в нормальном эмбрионе Chordin и Noggin1/2 достаточно сильно ингибируют BMP-каскад, так что ингибирование лишь *chordin* или *noggin1/2* не способно преодолеть порог BMP-каскада, способного изменить размер зачатка нотохорда (Рис. 15, А). Только подавление *chordin* вместе с *noggin1* или *noggin2* может преодолеть этот порог. В то же время в уменьшенных эмбрионах или эмбрионах, инъецированных *mmp3-MO*, у которых уровень Chordin снижен, необходимое ингибирование BMP-каскада для формирования нотохорда будет обеспечиваться преимущественно Noggin1/2, уровень которых, наоборот, повышен. В результате при подавлении *noggin2* в этих эмбрионах (но не *noggin1*, поскольку количество белка Noggin1 в эмбрионе должно быть ниже, чем Noggin2 из-за слабой трансляции первого) (Рис. 15, Б). Подытожив, можно заключить, что при Mmp3-зависимом скейлинге Chordin ответственен за скейлинг сомитов, нервной пластинки и нотохорда, а Noggin1/2 ответственен только за антискейлинг нотохорда.

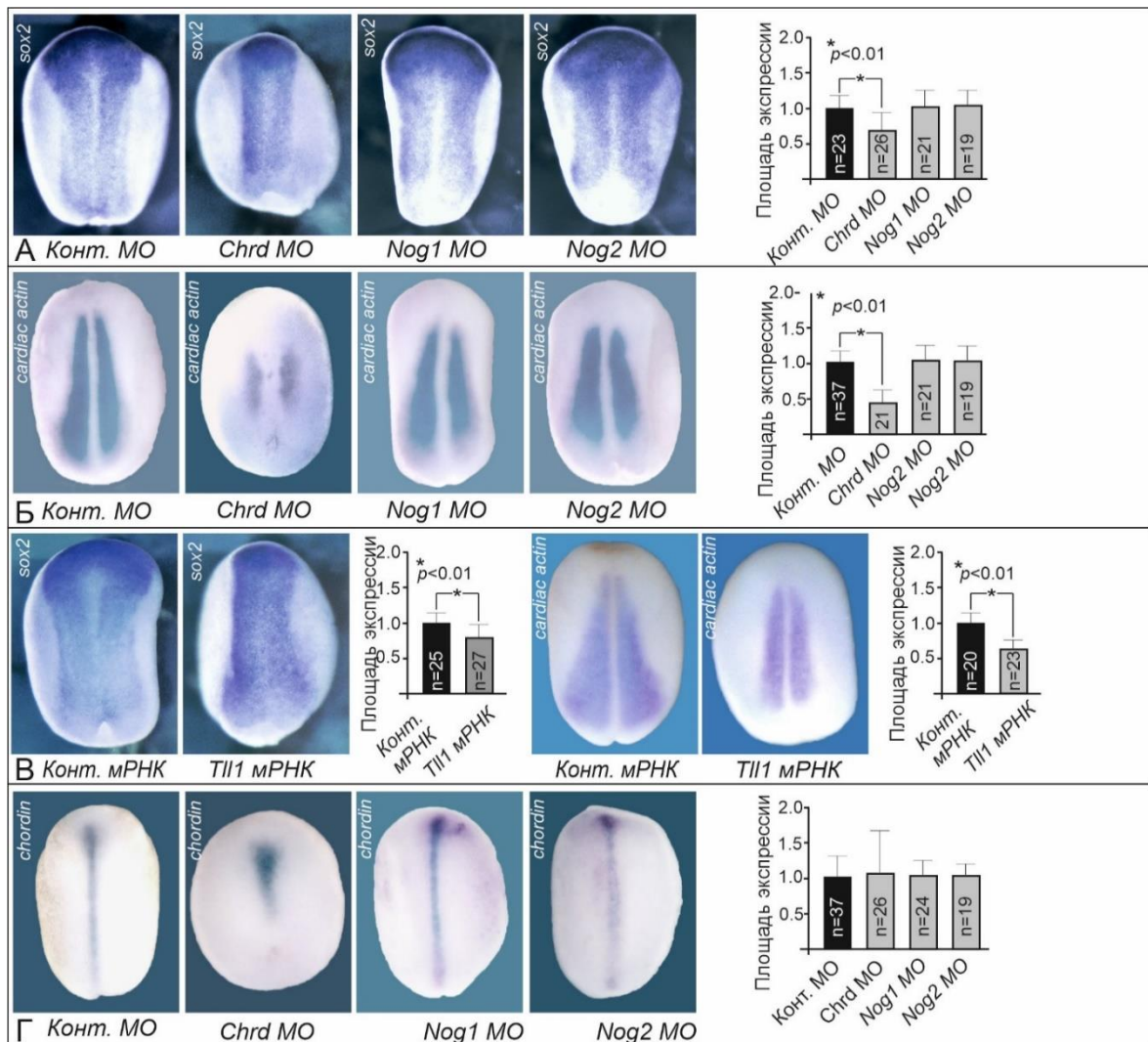


Рис. 12. Влияние подавления *chordin* и *noggin1/2* на размер зачатков нотохорда, сомитов и нервной пластинки.

(А) Подавление *chordin*, но не *noggin1* или *noggin2*, вызывает уменьшение нервной пластинки. (Б) Подавление *chordin*, но не *noggin1* или *noggin2*, вызывает уменьшение сомитов. (В) Оверэкспрессия *tollid-like1 (tll1)* также приводит к уменьшению нервной пластинки и сомитов. (Г) Подавление *chordin* или *noggin1/2* не влияет на размер нотохорда.

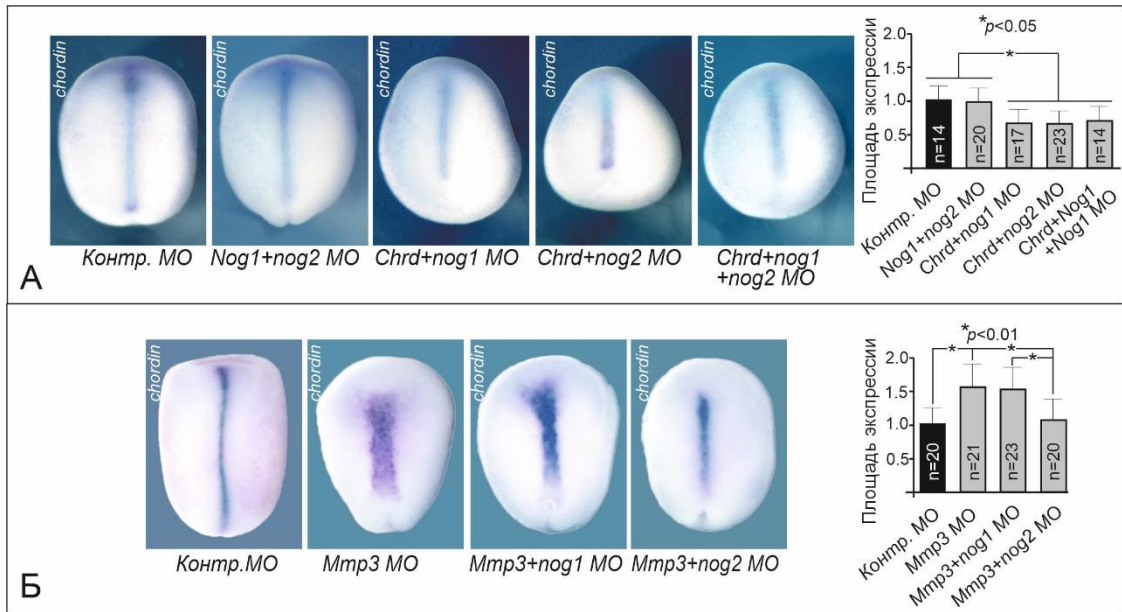


Рис. 13. Влияние совместного нокдауна (*chordin+noggin1/2*) и (*mmp3+noggin1/2*) на размер зачатка хорды в эмбрионах нормального размера.

(А) Только совместное подавление *chordin* и *noggin1/2* приводит к изменению размера зачатка нотохорда. (Б) В эмбрионах с увеличенным размером нотохорда за счет нокдауна *mmp3* дополнительный нокдаун *noggin2*, но не *noggin1*, вызывает уменьшение зачатка.

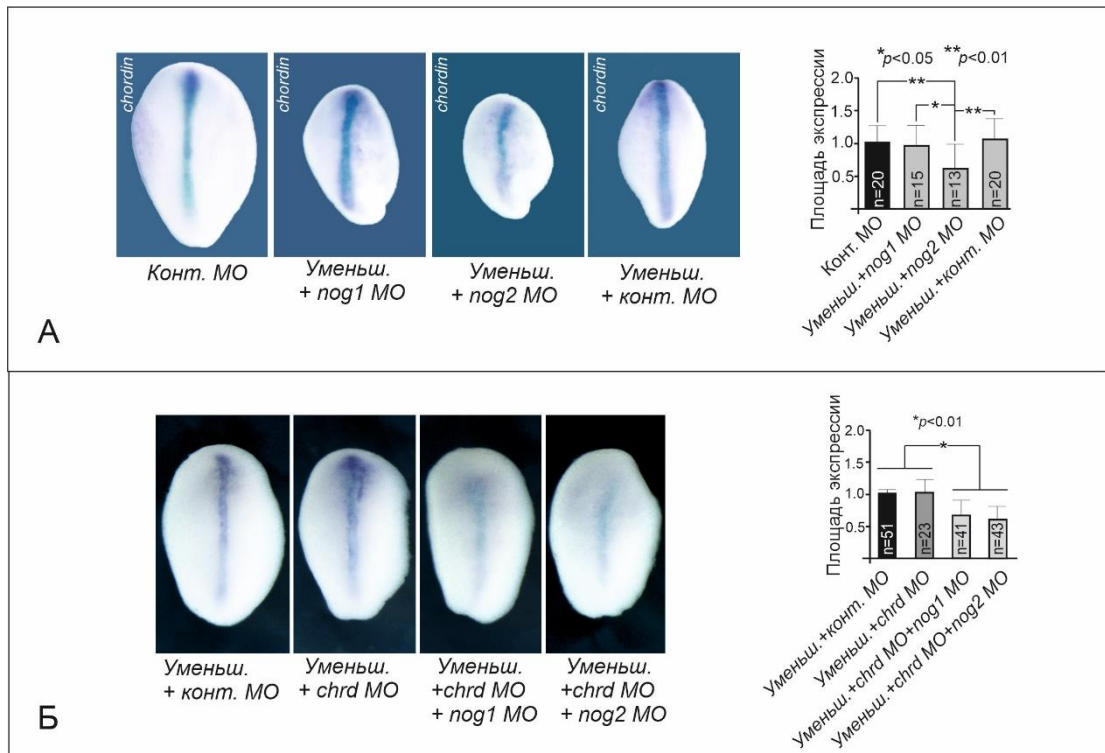


Рис. 14. Влияние одиночного нокдауна *chordin*, *noggin1* или *noggin2* и двойного нокдауна (*chordin+noggin1/2*) на размер нотохорда в уменьшенных эмбрионах.

(А) В уменьшенных эмбрионах нокдаун *noggin2*, но не *noggin1*, вызывает уменьшение размера нотохорда. (Б) В уменьшенных эмбрионах только двойной нокдаун *chordin* и *noggin1* или *chordin* и *noggin2* вызывает уменьшение нотохорда, но не одиночный нокдаун *chordin*.

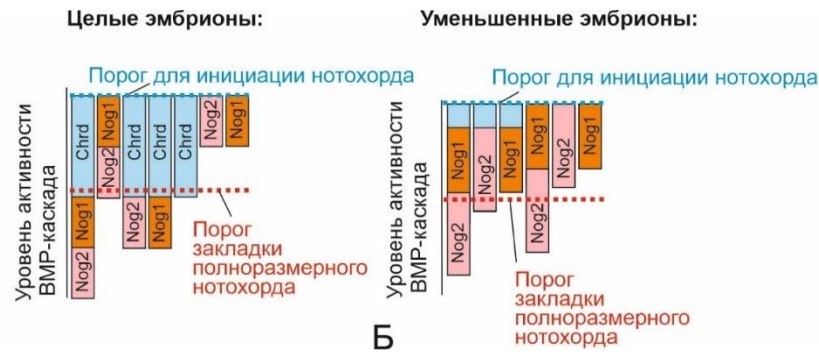


Рис. 15. Предполагаемая схема формирования зачатка ното хорда белками Chordin и Noggin1/2.

(А) Схема для эмбрионов нормального размера. Chordin и Noggin1/2 совместно регулируют размер зачатка. (Б) Схема для уменьшенных эмбрионов. Chordin и Noggin1/2 также совместно регулируют размер зачатка. Однако за счет снижения уровня Chordin его роль в разметке ното хорда снижена. Наоборот, за счет повышения уровня Noggin1/2 в уменьшенных эмбрионах их роль в разметке возрастает.

7. Моделирование Mmp3-опосредованного скейлинга.

Для того, чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемые эффекты скейлинга сомитов и нервной пластинки и антискейлинг хорды являются результатом влияния Mmp3 на Chordin и Noggin1/2, была создана математическая модель с целью выяснить воспроизводимость экспериментальных данных с помощью этой модели. Основываясь на литературных данных, при моделировании был выбран следующий сценарий дорзо-вентральной разметки. Зачатки ното хорда и сомитов определяются во время начала и середины периода гаструляции. Границы между этими зачатками определяются пространственно-временным градиентом активности BMP-каскада, который формируется в краевой зоне эмбриона. Этот градиент активности формируется благодаря диффузии секретлируемых в шпемановском организаторе антагонистов BMP-каскада, к которым принадлежит Chordin и Noggin1/2. Так называемый ранний, или бластульный, шпемановский организатор формируется на будущей дорсальной стороне бластулы под действием бета-катенина и Nodal-каскада (Рис. 37, А, слева). Для того, чтобы различать территорию организатора, заложенного на стадии бластулы от территории, заложенной позднее, во время гаструляции, назовём территорию бластульного организатора «*initial notochord seed*» (INS). Соответственно, начальный организатор индуцируется «факторами индукции начального организатора» («*Early Notochord Activating Factors*», ENAF) (Рис. 16, А, справа). С началом гаструляции ингибиторы BMP Chordin и Noggin1/2 начинают диффундировать из INS, что приводит к расширению области организатора (Рис. 16, А, см. стрелки). Однако, поскольку клетки краевой зоны теряют компетенцию к дифференцировке в клетки ното хорда примерно в середине гаструляции, это расширение прекращается, и клетки краевой зоны могут дифференцироваться только в сомиты или более вентральные части мезодермы. Для описания дифференцировки клеток краевой зоны был введен параметр δ , описывающий статус дифференцировки. При $\delta < 0$ клетка дифференцируется в клетку ното хорда, при $\delta > 0$ клетка дифференцируется в более латеральный тип мезодермы. При этом клетка переходит в стационарное состояние при δ приблизительно равным +1 или -1 (Рис. 37, Б). С биологической точки зрения параметр δ описывает меру позиционной информации, направляющей дифференцировку мезодермальной клетки в сторону ното хорда или в иную сторону. Переключение знака числа δ в клетках, уже иницированных в дифференцировку ното хорда, может

происходить при сильном изменении концентрации Chordin и Noggin1/2 в дорсальной области, что приведет к изменению профиля градиента активности BMP-каскада. Все взаимодействия на Рис. 16, А описываются системой из четырех реакционно-диффузионных уравнений (Рис. 16, В). Для простоты анализа рассматривалось равномерное распределение Mmp3 вдоль краевой зоны; в уменьшенных эмбрионах концентрация Mmp3 уменьшалась в 10 раз. Процессы, происходящие при уменьшении концентрации Mmp3 в уменьшенных эмбрионах, схематически представлены на Рис. 16, Г. Согласно модели, территория INS (синий на Рис. 16, Г) по-разному эволюционирует в ходе развития при разном уровне Mmp3. В нормальных эмбрионах Noggin1/2, за счет наличия сайта связывания с гепаран-сульфат протеогликанами ВКМ, имеет затрудненную диффузию и скапливается в области INS, расщепляется Mmp3 и из-за этого слабо ингибирует BMP-каскад в области INS (определяемый по окрашиванию на фосфорилированный pSmad1/5/8; синий и голубой цвет на Рис. 16, Г), что ограничивает дальнейший рост INS. В то же время Chordin за счет своей высокой способности к диффузии не способен накапливаться в области INS и поэтому также незначительно влияет на распространение области INS. В уменьшенных эмбрионах, однако, концентрация Mmp3 гораздо ниже, поэтому в области INS начинает накапливаться «лишний» Noggin1/2, что приводит к дополнительному ингибированию BMP-каскада в области INS, что в результате приводит к увеличению нотохорда. В результате, несмотря на то, что в уменьшенном эмбрионе INS изначально меньше, чем в нормальном, поскольку при разделении эмбриона пополам происходит также разделение INS на две половины, в ходе гастрюляции INS уменьшенных эмбрионов диспропорционально увеличивается (Рис. 17, Ж, Ж', З, З'). Согласно приведенной модели, следовательно, подавление трансляции *noggin2* с помощью морфолино в уменьшенных эмбрионах будет приводить к уменьшению финального размера зачатка хорды. Для того, чтобы проверить предположения модели, был использован метод окрашивания фосфорилированного pSmad1/5/8 в эмбрионах после различных экспериментальных манипуляций для анализа смещения градиента активности BMP-каскада вдоль дорзо-вентральной оси. При этом для удобства представления данных производилось измерение угловой ширины краевой зоны, свободной от окрашивания pSmad1/5/8. Если угловые размеры зоны, свободной от pSmad1/5/8, совпадают у различных типов эмбрионов, значит, пропорции их разметки сохраняются. В результате было установлено, что, действительно, уже в начале гастрюляции у эмбрионов с низкой концентрацией Mmp3 в краевой зоне (т.е. у инъекцированных *mmp3*-МО и уменьшенных зародышей) происходит расширение зоны, свободной от фосфорилированного pSmad1/5/8 (Рис. 17, А, А', В, В'). При этом подавление *noggin2* в уменьшенных эмбрионах устраняло этот эффект (Рис. 17, Д, Д'), что дополнительно подтверждает полученные данные о Noggin1/2-зависимом увеличении зачатка хорды в уменьшенных зародышах. Однако уже на стадии средней гастрюлы (стадия 11) подавление *mmp3* в целых зародышах приводило к сужению свободной от pSmad1/5/8 зоны (Рис. 17, Б, Б'), что также соответствует «идеальному» скейлингу сомитов в уменьшенных эмбрионах (Рис. 17, Г, Г'). Действительно, в ходе дальнейшей гастрюляции происходит закладка зачатков сомитов, которая, по допущению модели и согласно полученным данным, происходит за счет активности Chordin, но не Noggin1/2 (Рис. 17, Е, Е'; подавление *noggin2* в уменьшенных эмбрионах на средней гастрюле уже не влияет на границы градиента BMP-каскада). Таким образом, подавление *mmp3* приводит к деградации Chordin на средней гастрюле и смещению градиента BMP-каскада дорсальнее. Для дополнительной проверки произведенных вручную измерений в Рис. 17, которые могут вследствие субъективных особенностей исследователя дать ошибку, был использован метод автоматического анализа изображений на основе машинного обучения. Как можно видеть на Рис. 18, автоматический метод анализа дал сходные результаты, и, кроме того, позволил рассчитать профили градиента pSmad1/5/8 для каждого образца для более корректной оценки изменений при каждом воздействии (Рис. 18, А, Б, В). Кроме

того, этим методом показано, что подавление *noggin2* в целых зародышах не изменяет градиент *pSmad1/5/8*, что согласуется с отсутствием у таких зародышей изменений размера хорды и сомитной мезодермы, что дополнительно подтверждает валидность данного метода расчета градиента *pSmad1/5/8* (Рис. 18, Г). Таким образом, данные по окраске *pSmad1/5/8* подтверждают выдвинутую модель антискейлинга нотохорда (Рис. 16, Г). Что же касается сомитов и нейроэктодермы, то их латеральные края определяются преимущественно градиентом *Chordin*, который примерно на порядок быстрее диффундирует, чем *Noggin1/2* (Рис. 16, Г). В уменьшенных эмбрионах из-за снижения уровня *Mmp3* возрастает уровень протеазы *Tolloid-like1*, которая разрушает *Chordin*. Поэтому в уменьшенных эмбрионах градиент *Chordin* становится более пологим, что приводит к смещению пороговых концентраций, необходимых для дифференцировки нервной пластинки и сомитов, ближе к средней линии, т.е. их сужению (скейлингу).

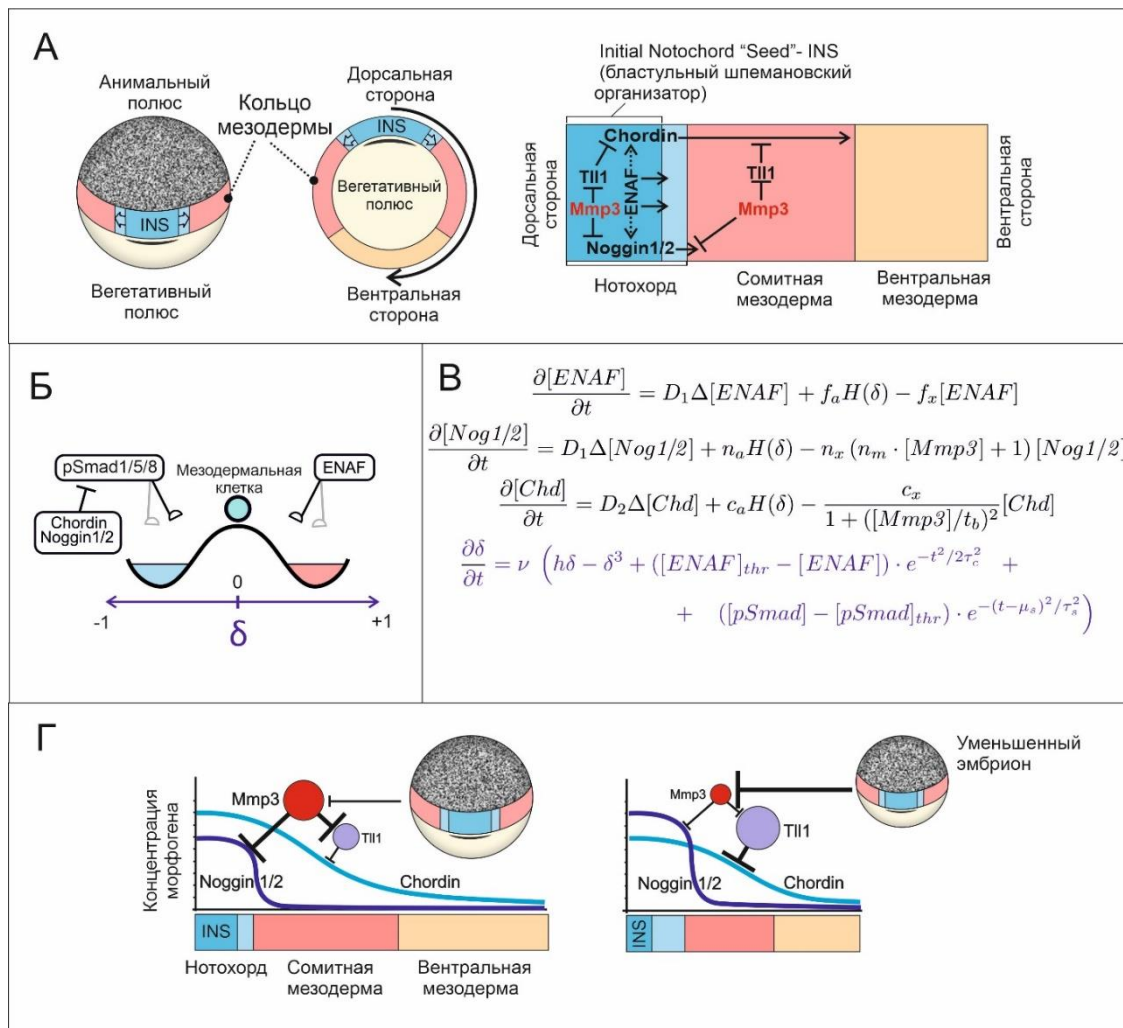


Рис. 16. Модель Mmp3-опосредованного скейлинга эмбриона.

(А) Геометрическая составляющая модели. (Б) Схематическое изображение модели дифференцировки нотохорда из состояния неустойчивого равновесия в сторону нотохорда или сомитов, выражаемое через значение параметра δ . (В) Система уравнений, задействованная в моделировании (см. подробнее Orlov et al., 2022). (Г) Общая схема Mmp3-опосредованного скейлинга уменьшенных зародышей.

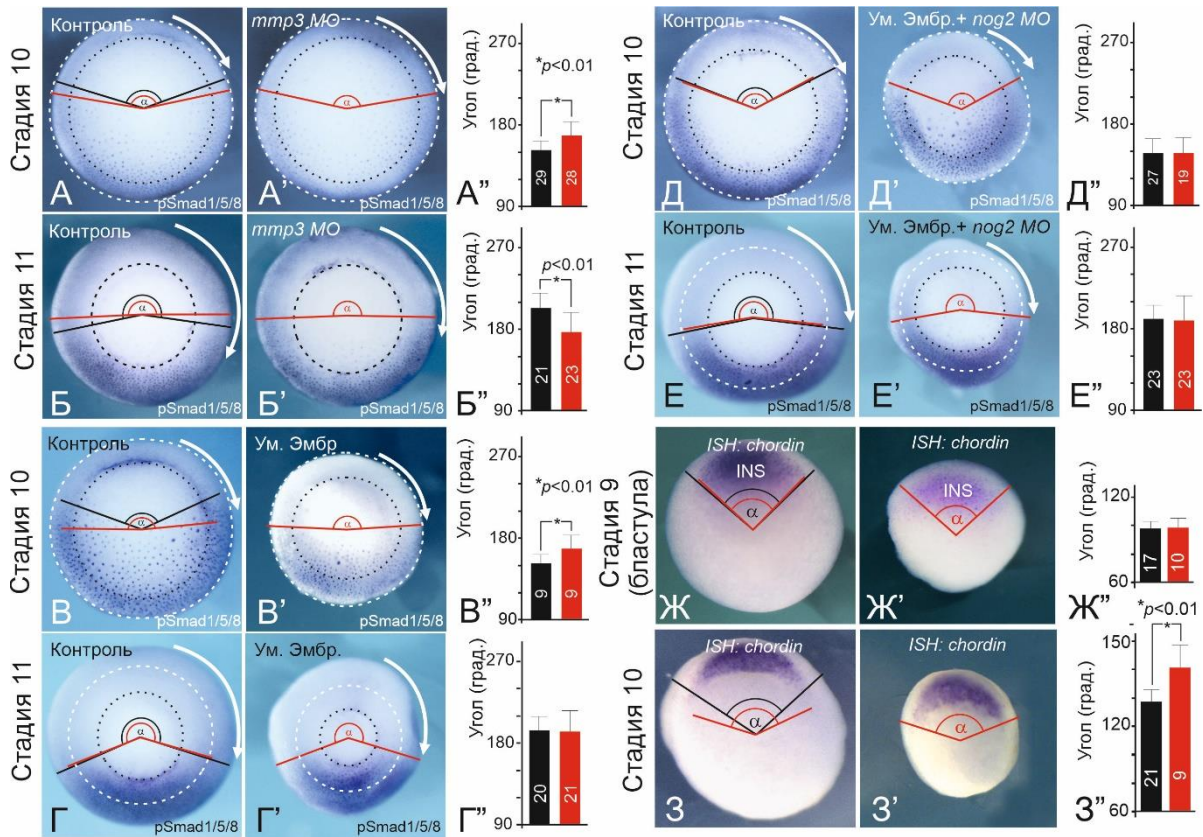


Рис. 17. Анализ изменений градиента активности BMP-каскада (pSMAD1/5/8) при подавлении *ttp3*, *noggin2*, и при уменьшении эмбриона.

(А, А') Подавление *ttp3* на ранней гастрале (стадия 10) смещает градиент BMP-каскада вентральнее (А'), что соответствует расширению зачатка хорды. (Б, Б') Однако, уже на стадии средней гастралы (стадия 11) при подавлении *ttp3* градиент BMP-каскада смещается дорсальнее (Б'), что соответствует процессу уменьшения сомитов. (В, В') В уменьшенных эмбрионах на стадии ранней гастралы (стадия 10) также происходит относительное смещение градиента BMP-каскада в вентральную сторону, что также, как и в случае (А, А'), свидетельствует о непропорциональном расширении зачатка хорды. (Г, Г') На стадии средней гастралы (стадия 11) границы градиента BMP-каскада у контрольных (Г) и уменьшенных (Г') эмбрионов совпадают, что свидетельствует о пропорциональном скейлинге сомитов. (Д, Д') При подавлении *noggin2* в уменьшенных эмбрионах (Д') происходит нивелирование разницы в профиле градиента BMP-каскада по сравнению с (В, В'), что свидетельствует о *Noggin2*-зависимом расширении нотохорда в уменьшенных эмбрионах. (Е, Е') На стадии средней гастралы, однако, подавление *noggin2* никак не влияет на ширину градиента BMP-каскада. Действительно, согласно модели, на этой стадии происходит разметка территории сомитов, осуществляемое *Chordin*, но не *Noggin2*. (Ж, Ж', 3, 3') Подтверждение данных в (В, В') с помощью гибридизации *in situ* с зондом к *chordin*. На стадии бластулы (стадия 9) размер зачатка хорды определяется функционированием *INS*. При этом в уменьшенных зародышах (Ж') размер зачатка пропорционален интактным (Ж). Однако, уже на стадии ранней гастралы (стадия 10) в уменьшенных зародышах происходит непропорциональное увеличение зачатка хорды (3') по сравнению с интактными (Ж). Это соответствует данным, полученным в (В, В'). (А'', Б'', В'', Г'', Д'', Е'', Ж'', 3'') Результаты ручного измерения границ градиентов для соответствующих экспериментов.

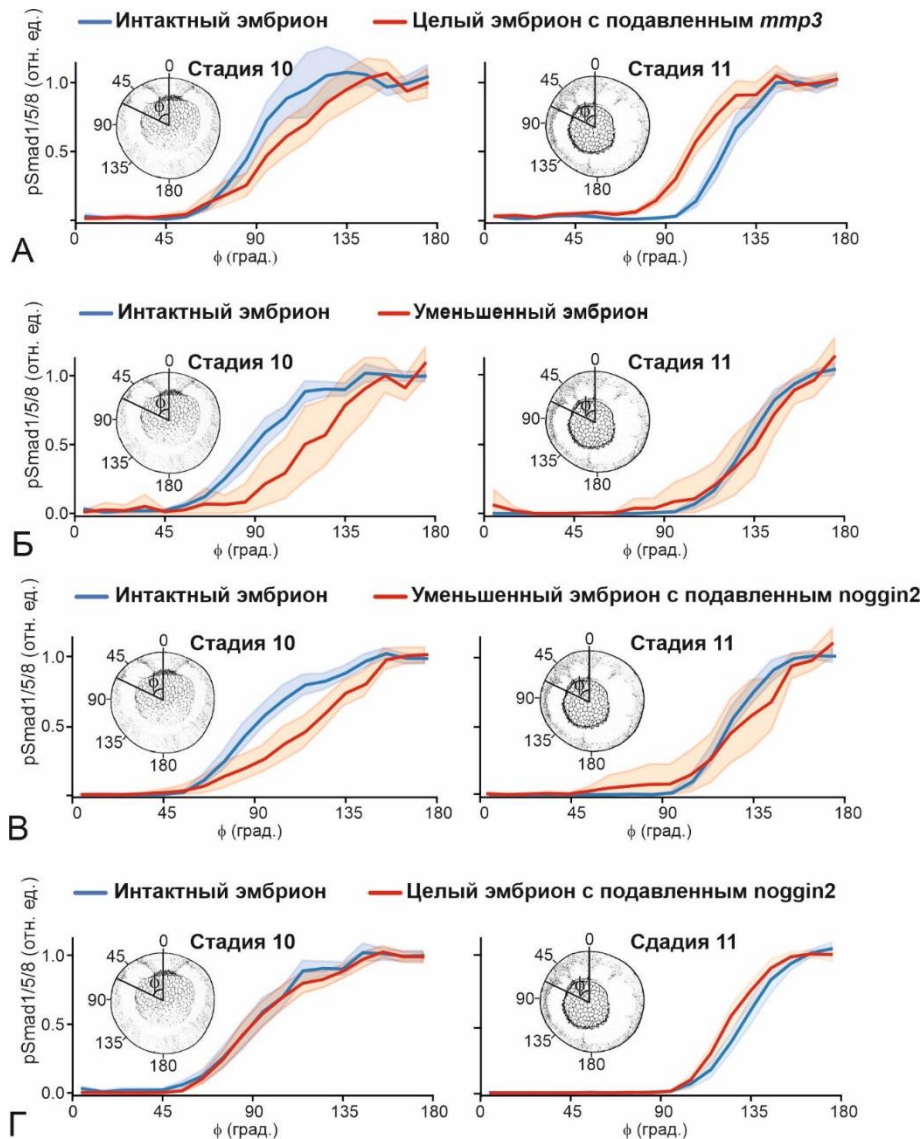


Рис. 18. Автоматический расчет градиента BMP-каскада.

(А) Расчет данных из Рис. 38, А, А' (слева) и Рис. 38, Б, Б' (справа). (Б) Расчет данных из Рис. 38, В, В' (слева) и Рис. 38, Г, Г' (справа). (В) Расчет данных из Рис. 38, Д, Д' (слева) и Рис. 38, Е, Е' (справа). (Г) Расчет градиента BMP-каскада на ранней (стадия 10, слева) и средней (стадия 11, справа) гастреле при подавлении *noggin2* в целых эмбрионах.

ВЫВОДЫ

1. На модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* впервые был разработан метод прицельного поиска генов-скейлеров как генов, дифференциально экспрессирующихся в эмбрионах нормального и половинного размера. Была разработана оригинальная технология массового получения эмбрионов половинного размера с последующим глубоким транскриптомным секвенированием образцов РНК, выделенных из таких эмбрионов, а также из эмбрионов нормального размера. В результате биоинформатического анализа полученных данных была идентифицирована группа генов, экспрессия которых в несколько раз отличалась в эмбрионах нормального и половинного размера.
2. Один из найденных генов – ген матричной металлопротеиназы 3 (*Mmp3*), чья экспрессия сильно снижалась в уменьшенных эмбрионах. Снижение активности

Mmp3 ответственно за сужение (скейлинг) зачатков сомитов и нейроэктодермы, и непропорциональное расширение (антискейлинг) хорды в уменьшенных эмбрионах. То есть, ген, кодирующий Mmp3 действительно является геном-скейлером.

3. Также среди генов, дифференциально экспрессирующихся в интактных и уменьшенных эмбрионах, был обнаружен *sizzled*, известный ранее размер-зависимый модулятор BMP-каскада, что доказывает валидность выбранного метода поиска скейлеров.
4. Mmp3 расщепляет секретируемые антагонисты BMP-каскада белки Noggin1/2, но стабилизирует секретируемый антагонист BMP-каскада Chordin путем расщепления металлопротеиназы Tolloid-like1.
5. Снижение экспрессии *mmp3* в уменьшенных эмбрионах приводит к накоплению Noggin1/2, что вызывает антискейлинг хорды, и расщеплению Chordin, приводящему к скейлингу сомитов и нервной пластинки.
6. Полученные в ходе работы результаты впервые подтверждают гипотезу о генах-скейлерах, регулирующих морфогенетические градиенты в зависимости от размера эмбриона.

Список работ, опубликованных по теме исследования

Статьи:

1. **Orlov, E. E.**, Nesterenko, A. M., Korotkova, D. D., Parshina, E. A., Martynova, N. Y., Zarausky, A. G. Targeted search for scaling genes reveals matrix metalloproteinase 3 as a scaler of the dorsal-ventral pattern in *Xenopus laevis* embryos. // *Developmental cell*. 2022. Т. 57. № 1. С. 95–111.e12.
2. Parshina, E. A., **Orlov, E. E.**, Zarausky, A. G., Martynova, N. Y. The Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits Retinoic Acid Signaling by Destabilizing the Maternal mRNA of the RXR γ Nuclear Receptor. // *International journal of molecular sciences*. 2022. Т. 23. № 10. С. 5627.
3. Parshina, E. A., Eroshkin, F. M., **Orlov, E. E.**, Gyoeva, F. K., Shokhina, A. G., Staroverov, D. B., Belousov, V. V., Zhigalova, N. A., Prokhortchouk, E. B., Zarausky, A. G., Martynova, N. Y. // Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status. *Cell reports*. 2020. Т. 33. № 7. С. 108396.
4. 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., Zarausky, A. G. Agr2-interacting Prod1-like protein Tfp4 from *Xenopus laevis* is necessary for early forebrain and eye development as well as for the tadpole appendage regeneration. // *Genesis*. 2019. Т. 57. № 5. С. e23293.
5. Иванова, А. С., Мартынова, Н. Ю., Комаров, П. А., **Орлов, Е. Е.**, Ермакова, Г. В., Зарайский, А. Г., Терёшина, М. Б. Получение Agr2-специфичных антител и определение паттерна распределения белка Agr2 в раннем развитии эмбрионов и регенерации головастиков *Xenopus laevis*. // *Онтогенез*. 2018. Т. 49. № 6. С. 385-390.
6. **Орлов, Е. Е.**, Нестеренко, А. М., Мартынова, Н. Ю., Зарайский, А. Г. Визуализация градиента сайтов связывания морфогенов в эмбрионе шпорцевой лягушки с помощью флуоресцентно меченного гепарин-связывающего мотива морфогена BMP4. // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43. № 3. С. 333-336.
7. Байрамов, А. В., Ерошкин, Ф. М., Мартынова, Н. Ю., **Орлов, Е. Е.**, Бородулин, А. В., Зарайский, А. Г. Секретируемый белок Noggin – активатор Wnt/PCP-сигнального каскада. // *Биоорганическая химия*. 2017. Т. 43, № 2. С. 214-217.
8. Мартынова, Н. Ю., Нестеренко, А. М., **Орлов, Е. Е.**, Ерошкин, Ф. М., Бородулин, А. В., Байрамов, А. В., Зарайский, А. Г. Взаимодействие секретируемых белков

- Noggin4 и Wnt8 из эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. // Биоорганическая химия. 2016. Т. 42. № 3. С. 375.
9. Eroshkin, F. M., Nesterenko, A. M., Borodulin, A. V., Martynova, N. Y., Ermakova, G. V., Gyoeva, F. K., **Orlov, E. E.**, Belogurov, A. A., Lukyanov, K. A., Bayramov, A. V., Zарaisky, A. G. Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. // Scientific reports. 2016. Т. 6. С. 23049.
 10. Nesterenko, A. M., **Orlov, E. E.**, Ermakova, G. V., Ivanov, I. A., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Martynova, N. Y., Zарaisky, A. G. Affinity of the heparin binding motif of Noggin1 to heparan sulfate and its visualization in the embryonic tissues. // Biochemical and biophysical research communications. 2015. Т. 468. № 1-2. С. 331–336.

Тезисы конференций:

1. Нестеренко, А. М., **Орлов, Е. Е.**, Бородулин, А. В., Иванов, И. И., Белогуров, А. А., Гольшев, С. А., Паршина, Е. А., Зарайский, А. Г. Связывание с гепариновым матриксом как основной фактор, влияющий на подвижность белков в межклеточном пространстве. // VI съезд биофизиков России. Сочи, 16-21.09.2019.
2. Нестеренко, А. М., **Орлов, Е. Е.**, Паршина, Е. А., Зарайский, А. Г. Компактная модель пространственной дифференцировки с учетом время-зависимой компетенции. Случай латеральной разметки мезодермы амфибий. // VI съезд биофизиков России. Сочи, 16-21.09.2019.
3. **Orlov, E.E.**, Nesterenko, A.M., Korotkova, D.D., Parshina, E.A., Zарaisky, A.G. NGS approach to study embryonic scaling: an evidence for a new scaling mechanism. // Second European Amphibian Club, Lutherstadt-Wittenberg (Germany), 26-29 June 2019.
4. **Orlov, E.E.**, Nesterenko, A.M., Korotkova, D.D., Parshina, E.A., Martynova, N.Yu., Zарaisky, A.G. Transcriptome analysis of whole and reduced in size amphibian embryos reveals new members of the embryonic scaling mechanism. // FEBS Congress, Prague, 07-12 July 2018.
5. **Орлов Е.Е.**, Нестеренко А.М., Зарайский А.Г. «Поиск генов эмбрионального скейлинга с помощью анализа транскриптома уменьшенных зародышей лягушки». // XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 12-15.02.2018.
6. **Орлов Е.Е.**, Зарайский А.Г. Изменение скорости диффузии секретируемых белков семейства Noggin как способ регуляции размеров зачатка центральной нервной системы. // XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 08-11.02.2016.
7. **Орлов, Е. Е.**, Нестеренко, А. М., Ермакова, Г. В., Иванова, И. А., Семенюк, П. И., Орлов, В. Н., Мартынова, Н. Ю., Зарайский, А. Г. Изучение пространственного распределения гепаран-сульфат протеогликанов в раннем эмбриональном развитии у шпорцевой лягушки. // XXVIII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, 08-11.02.2016.