

*На правах рукописи*

**БОРОДУЛИН**

**Александр Владиславович**

**СЕКРЕТИРУЕМЫЙ БЕЛОК NOGGIN4 – НОВЫЙ РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ  
WNT/ $\beta$ -CATENIN-СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА  
В РАННЕМ ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2017

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (<http://www.ibch.ru>).

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,  
**Ольга Федоровна ГОРДЕЕВА**  
в.н.с. Лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

кандидат биологических наук,  
**Людмила Владимировна ОЛЕНИНА**  
с.н.с. Лаборатории биохимической генетики животных  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится 1 марта 2017 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного Совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

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

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук



**Владимир Александрович  
Олейников**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Передне-задняя и спинно-брюшная оси представляют собой основание плана строения двусторонне-симметричных многоклеточных. У позвоночных обе оси образуются благодаря функции сигнальных белков-морфогенов. В зависимости от своей концентрации, морфогены на разных расстояниях от своего источника определяют те или иные судьбы клеток и образуют градиенты активностей – области высокой, средней и низкой активности, – определяющих тот или иной путь развития данной клетки. Во время разметки осей эти градиенты устанавливаются во всем зародыше, и интенсивность каждого сигнала в данном конкретном месте вдоль передне-задней и спинно-брюшной осей зародыша определяет, в конечном счете, разметку будущего организма. Соответственно, пространственные отношения градиентов морфогенов важны для точной и корректной активности каждого сигнала в каждой точке зародыша. Кроме того, точное распределение активностей морфогенов вдоль каждой оси не может быть установлено мгновенно и, таким образом, оси тела не могут быть размечены одновременно. Правильное соотношение уровней активности морфогенов должно активно поддерживаться в течение всего процесса первичной разметки зародыша, а клетки должны обладать точной информацией о том, когда отвечать на сигналы морфогенов, чтобы выбрать верный вектор клеточного поведения и дифференцировки. Таким образом, временная регуляция сигналов разнообразных морфогенов и компетенции их клеток-мишеней также важна для правильного установления системы осей тела. Более того, паттернирование всех тканей продолжается, начиная со стадии бластулы, на протяжении стадий гаструляции, нейруляции и сомитогенеза; каждая из этих стадий характеризуется разными динамическими физическими условиями. Таким образом, пространственная и временная регуляции активности морфогенов должны координироваться между собой с тем, чтобы обеспечить устойчивое эмбриональное развитие. Важно, что хотя разметка обеих осей обеспечивается разными механизмами, это происходит одновременно. Эти механизмы ортогонального паттернирования должны гармонично функционировать во всем пространстве зародыша на протяжении всего процесса раннего развития.

Несмотря на то, что анимально-вегетативная полярность яиц амфибий и рыб задается распределением материнских факторов, настоящая передне-задняя разметка клеточных судеб у всех позвоночных контролируется на стадиях поздней бластулы и гаструлы. К концу гаструляции в зародышах шпорцевой лягушки четко определяются области с передними и задними характеристиками.

Передне-задняя разметка опосредована сигнальными каскадами Wnt, FGF, Nodal и ретиноевой кислоты (retinoic acid, RA). В частности, Wnt, FGF, Nodal и RA определяет заднюю, постериорную спецификацию клеток, тогда как передняя – антериорная – спецификация клеток реализуется через последовательное подавление этих сигналов. На стадиях бластулы и гастрюлы Wnt, FGF и Nodal размечают широкие области передне-задней оси тела (голову, туловище и хвост).

В ряду морфогенов, участвующих в разметке зародыша, белки класса Wnt занимают важное место: в ходе передне-задней разметки Wnt активируют “канонический” Wnt/ $\beta$ -catenin сигнальный каскад и через него – экспрессию «хвостовых» генов. В зародышах шпорцевой лягушки и рыбы данио на стадиях ранней и средней бластулы материнская активность Wnt-сигнализации локализуется в дорсальной части зародыша, обеспечивая формирование дорсального организатора, ответственного за установление спинно-брюшной асимметрии. В дальнейшем, в конце дробления и на стадии гастрюлы, зиготическая Wnt-сигнализация в организаторе подавляется, ее центр перемещается на вентролатеральную границу зародыша.

Wnt-сигнализация также играет ключевую роль в передне-задней разметке нейральной ткани, обеспечивая спецификацию наиболее задних ее отделов. Исследования передне-задней разметки ЦНС показывают, что Wnt действует как морфоген, концентрационно определяя каудальную специфичность клеток. Этот белок способен напрямую сообщать клеткам заднюю позиционную информацию и определять соотношение и распределение каудальных клеточных судеб в разных отделах развивающейся ЦНС.

Важно, что передние структуры, в особенности передний мозг, требуют для своего развития подавления активности Wnt-пути, что указывает на равную важность антагонистов этого сигнального пути в процессе передне-заднего паттернирования. Благодаря своим уникальным свойствам, белок Noggin4 занимает среди ингибиторов этого сигнального каскада особое место.

Работа проведена в основном на модели зародыша шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, представляющем собой один из классических объектов экспериментальной биологии развития. Ввиду удобства культивирования, экспериментальных манипуляций и микроскопии, данный объект представляет собой систему, весьма перспективную с точки зрения изучения механизмов передне-задней разметки зародыша и распределения морфогенов в эмбриональных тканях. Кроме того, для шпорцевой лягушки разработан ряд широко используемых молекулярно-генетических методик, а высокий эволюционный консерватизм событий и процессов раннего эмбрионального развития делает полученные данные актуальными для исследований нормальных и



патологических процессов индивидуального развития у других позвоночных животных, включая человека.

### **Цель и задачи работы**

Целью работы являлось изучение способности секретируемого белка Noggin4 к взаимодействию с различными сигнальными молекулами, участвующими в разметке плана строения зародыша *Xenopus laevis* в раннем развитии, возможного регуляторного влияния Noggin4 на сигнальную активность соответствующих сигнальных каскадов и особенностей распределения Noggin4 в эмбриональных тканях. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. провести сравнительный анализ паттернов экспрессии Noggin4 в раннем развитии куриного зародыша и эмбриона шпорцевой лягушки;
2. исследовать способность Noggin4 к прямому взаимодействию с лигандами ключевых сигнальных путей, регулирующих раннюю разметку развивающегося зародыша – BMP, Nodal/Activin и Wnt/ $\beta$ -catenin.
3. изучить влияние Noggin4 на активность этих сигнальных путей;
4. измерить скорость распространения Noggin4 в эмбриональных тканях в системе *in vivo*;
5. сформулировать на основании полученных данных модель регуляции белком Noggin4 процессов раннего эмбрионального развития.

### **Научная новизна работы**

В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ паттернов экспрессии белка Noggin4 в зародышах представителей эволюционно дистантных видов, относящихся к разным классам позвоночных – бесхвостых амфибий и птиц. Показано, что экспрессия у обоих изученных видов характеризуется выраженной диффузностью и гомологичной локализацией на сопоставимых стадиях. Консервативный характер экспрессии гомологов Noggin4 у разных классов позвоночных указывает на физиологическую значимость функции этого белка.

Исследована молекулярная и физиологическая функция белка Noggin4, получены новые данные относительно его молекулярных партнеров и процессов, в регуляцию которых он вовлечен. Показано, что Noggin4 не взаимодействует с сигнальными белками классов BMP и Nodal/Activin и не влияет на активность соответствующих сигнальных каскадов. Вместе с тем, обнаружена способность Noggin4 связывать белок Wnt8, препятствовать его взаимодействию со специфическими мембранными рецепторами и ингибировать, таким образом, сигнальную активность канонического Wnt/ $\beta$ -catenin пути.

На основе метода конфокальной лазерной микроскопии FRAP и при помощи генетических конструкций, в состав которых введены разные флюоресцентные метки, нами разработана новая методика прижизненной визуализации распределения сигнальных белков в тканях зародыша. При помощи этого метода мы обнаружили и впервые описали уникальное для антагонистов сигнальных молекул такого рода свойство белка Noggin4 быстро распространяться в межклеточном пространстве живого зародыша, действуя при этом в качестве дальнедействующего ингибитора сигнальной активности Wnt/ $\beta$ -catenin пути. В этих экспериментах нам удалось вычислить и сравнить скорости перемещения флюоресцентно-меченных белков – Noggin4 и его гомологов; экспериментов такого рода до сих пор не проводилось. Скорость распределения в тканях Noggin4, определенная таким образом, превышает скорости его гомологов более чем на порядок, а сам Noggin4, взаимодействуя с Wnt8, оказывает влияние на градиент распределения сигнальной активности этого белка и, в конечном итоге, на процесс паттернирования раннего эмбрионального развития.

Разработанный нами метод и новые данные, полученные при помощи этого метода, открывают новые возможности для исследования скейлинга, или размерной инвариантности эмбрионального паттерна – фундаментального явления эмбрионального развития, заключающегося в способности развивающейся системы воспроизводить паттерн даже при существенных помехах, например при удалении значительной части системы. В настоящее время механизмы этого явления остаются во многом неизвестными. Несмотря на важность и актуальность проблемы скейлинга, этот феномен редко принимается во внимание при разработке моделей позиционной информации на основе градиентов морфогенов.

### **Практическая значимость**

Сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -catenin представляет собой один из важнейших физиологических каскадов, непосредственно регулирующих клеточное поведение и индивидуальное развитие. Он вовлечен в широчайший спектр нормальных и патологических процессов – от разметки плана строения, регенерации и дифференцировки волосяного фолликула до канцерогенеза и пороков развития. Несмотря на широкий интерес и интенсивное изучение механизмов его работы в последние годы, тонкие детали регуляции сигнальной активности этого каскада остаются во многом неясными. Фундаментальные исследования механизмов регуляции Wnt/ $\beta$ -catenin снабжают прикладные биомедицинские отрасли науки новой ценной информацией, необходимой для формулировки адекватных представлений о механизмах реализации эмбриогенеза и разработки терапевтических подходов к решению широкого спектра клинических задач.

## Апробация работы

Результаты, полученные в данной работе, были представлены на XXV Международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», посвященной 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН (Москва, 11-15 февраля 2013 г.).

## Публикации

По теме работы было опубликовано 4 статьи в международных и российских рецензируемых журналах.

## Структура и объем диссертации

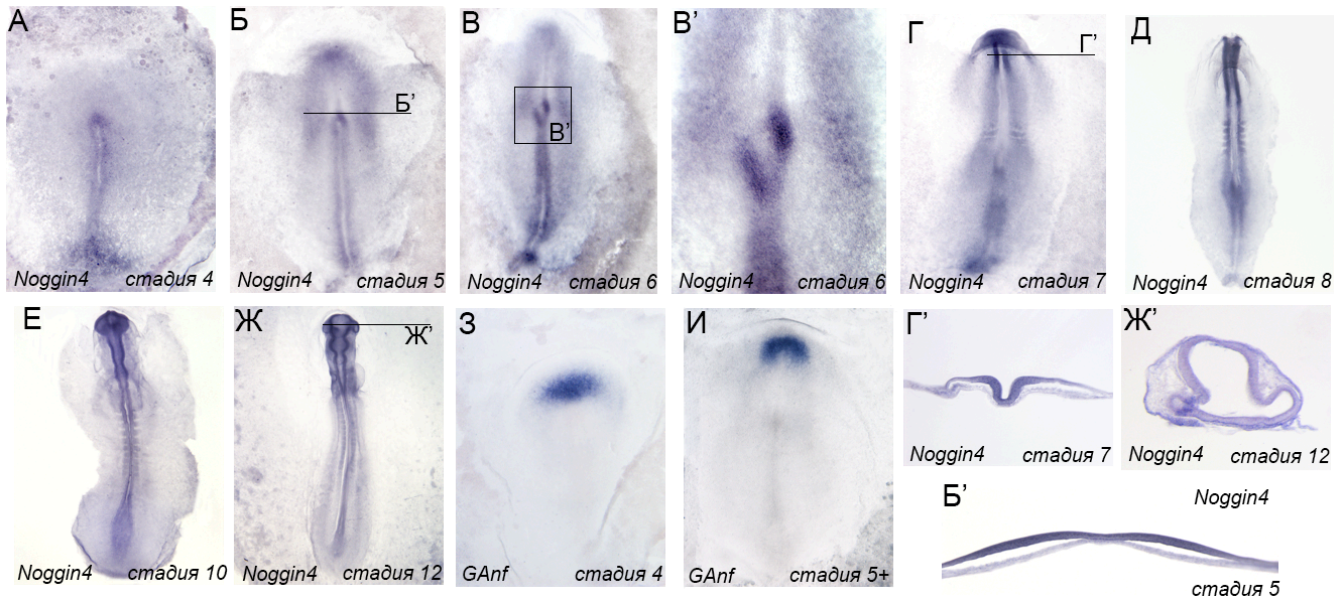
Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Материалы и методы», а также благодарностей, списка сокращений, использованных в работе и списка цитируемой литературы, в который входит 379 ссылок. Работа изложена на 152 страницах печатного текста, содержит 1 таблицу, 1 схему и 43 рисунка.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Noggin4 консервативно экспрессируется в гомологичных эмбриональных структурах у амфибий и птиц**

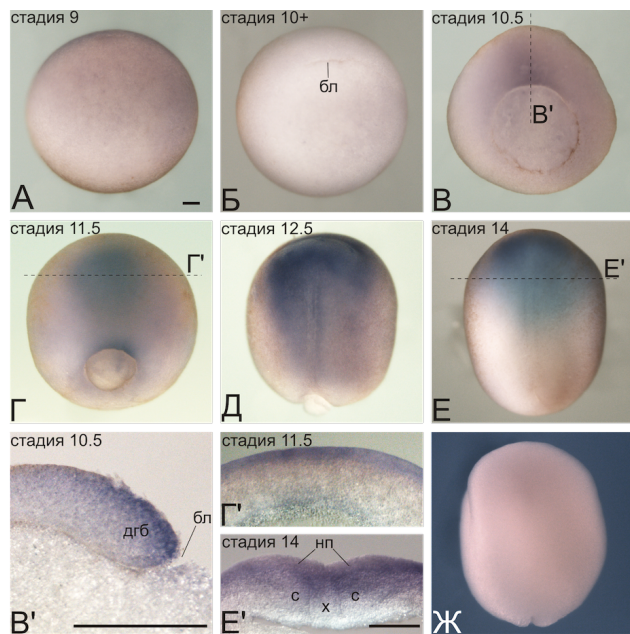
Изученные нами при помощи гибридизации *in situ* паттерны экспрессии Noggin4 в раннем развитии амфибий и птиц характеризуются консервативностью (ср. Рис. 1 и Рис. 2). В отличие от лягушки, у куриного зародыша экспрессия Noggin4 наблюдается в презумптивной аксиальной мезодерме, однако по мере прогрессии хордального выроста экспрессия Noggin4 в нем снижается до фонового уровня и смещается в направлении переднего конца зародыша, образуя, как и у *X. laevis*, очень плавный градиент с максимумами в головных структурах и постепенным убыванием интенсивности в каудальном направлении. Экспрессия у обоих изученных видов характеризуется выраженной диффузностью и гомологичной локализацией на сопоставимых стадиях – преимущественно в материале презумптивной, а затем дефинитивной покровной и нейроэктодермы и параксиальной мезодермы (сомитов).

Подобный эволюционный консерватизм экспрессионных паттернов Noggin4 у разных типов позвоночных указывает на важность функций, выполняемых этим белком у таких эволюционно дистантных видов, как шпорцевая лягушка и курица.



**Рис. 1. Экспрессия *Noggin4* в раннем развитии *Gallus gallus***

(А-Ж) Паттерны экспрессии *Noggin4* в тотальных препаратах куриных зародышей на разных стадиях развития. (А) Стадия 4; первичная полоска, гензеновский узелок. (Б) Стадия 5; гензеновский узелок с асимметричным распределением экспрессии *Noggin4*. (В) Стадия 6, общий вид; выраженная асимметрия экспрессии *Noggin4* в гензеновском узелке. (В') Тот же препарат, увеличенная область гензеновского узелка с асимметричным распределением экспрессии. (Г) Стадия 7 (одна пара сомитов); выраженная экспрессия в нервных валиках в области головных структур. (Д) Стадия 8. (Е) Стадия 10; распространение области экспрессии в нервных валиках в каудальном направлении. (Ж) Стадия 12. (З, И) Контрольная гибридизация с антисмысловым *dig*-зондом к мРНК *GAnf* на стадиях 4 (З) и 5+ (И). (Б', Г', Ж') Поперечные срезы препаратов куриных зародышей (Б), (Г) и (Ж), соответственно. (Б') Стадия 5; поперечный срез спереди от гензеновского узелка. (Г') Стадия 7; поперечный срез на уровне нервных валиков, выраженная экспрессия в материале нейроэктодермы. (Ж') Стадия 12; поперечный срез на уровне глазного пузыря, экспрессия *Noggin4* во всей нейроэктодерме, в том числе, в материале презумптивной сетчатки.



**Рис. 2. Экспрессия *Noggin4* в раннем развитии *Xenopus laevis***

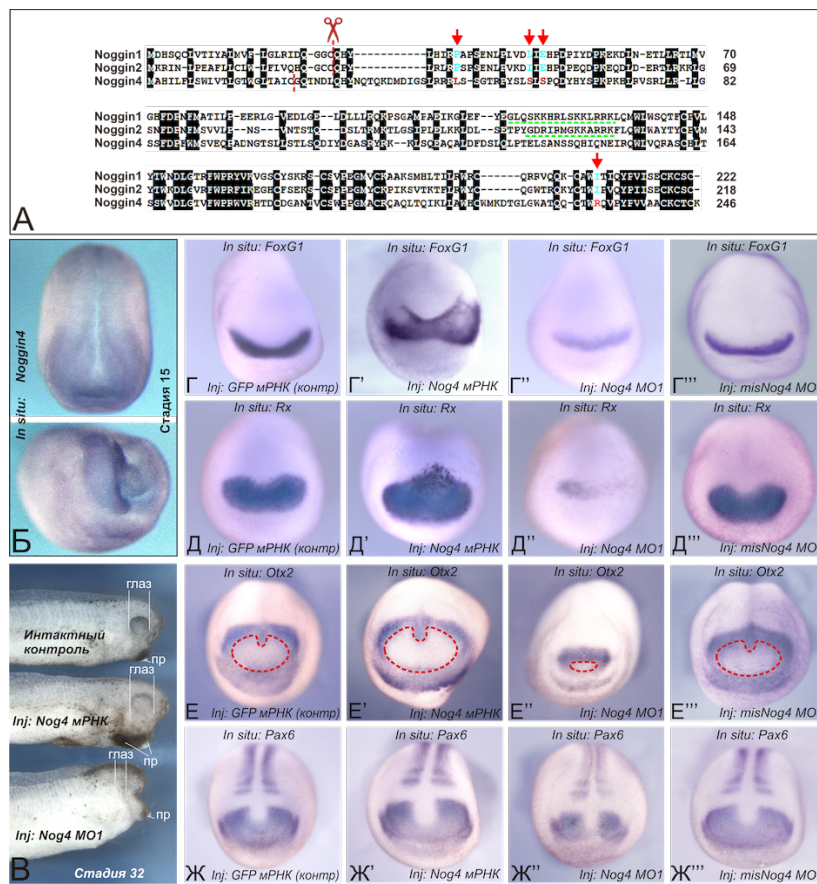
Общий вид зародышей на стадии поздней бластулы (А), в начале гастрюляции (Б), на стадии средней (В) и поздней (Г) гастрюлы; вид с вегетативного полюса, дорсальная сторона сверху. (Д) Общий вид зародышей на стадии ранней (Д) и средней (Е) нейрулы; вид с дорсальной стороны, головной полюс сверху. (В') Сагиттальный срез зародыша на стадии средней гастрюлы; область дорсальной губы бластопора, передний конец слева. Поперечные срезы зародышей на стадии ранней (Г') и поздней (Е') гастрюлы; область презумптивного переднего мозга, дорсальная сторона сверху. (Ж) Контрольная гибридизация со смысловым зондом к мРНК *Noggin4*. бл – бластопор, дгб – дорсальная губа бластопора, нп – нервная пластинка, с – сомиты, х – хорда. Размер масштабной линейки на всех рисунках – 100 мкм.



## Исследование влияния *Noggin4* на развитие осевых и головных структур

Принимая во внимание полученные ранее данные об относительно низкой степени сходства первичной структуры *Noggin4* и его гомологов (Рис. 3А), мы предположили, что, в отличие от *Noggin1* и *Noggin2*, *Noggin4* не способен индуцировать вторичные осевые комплексы.

Сравнительный эксперимент по влиянию эктопической экспрессии *Noggin1* и *Noggin4* на фенотип зародышей показал, что, в отличие от *Noggin1*, при инъекции мРНК *Noggin4* в вентральные бластомеры индукция вторичной оси тела не происходит вне зависимости от концентрации вводимой мРНК (Рис. 4). Несмотря на это, *Noggin4* заметно влияет на развитие переднеголовных структур: при повышении уровня экспрессии *Noggin4* на стадии хвостовой почки формируются увеличенные глаза и присоска. При подавлении экспрессии *Noggin4* на той же стадии наблюдается обратный эффект (В). При искусственном повышении экспрессии *Noggin4* у головастиков формируются увеличенные колбовидные глаза (Рис. 5Б, Д). При подавлении экспрессии наблюдаются уменьшение линейных размеров головы и туловища и формирование уменьшенного циклопического глаза.



**Рис. 3. Свойства *Noggin4***

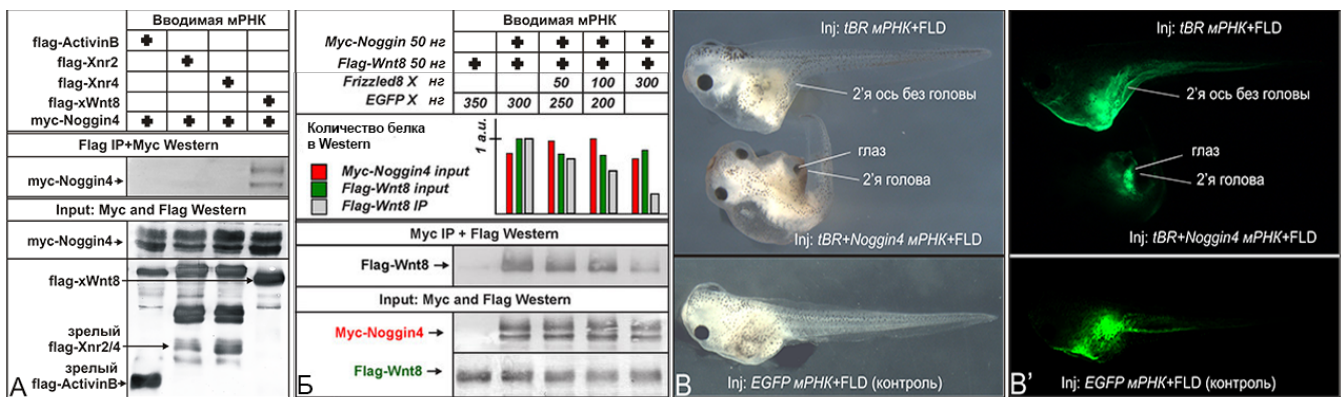
(А) Выравнивание аминокислотных последовательностей *Noggin1*, *Noggin2* и *Noggin4*. Позиции, ответственные за связывание с BMP4, отмечены красными стрелками. Места отщепления сигнального пептида и гепарин-связывающие сайты помечены красным и зеленым пунктиром, соответственно. (Б) Гибридизация *in situ* в тотальных препаратах зародыша шпорцевой лягушки на стадии средней нейрулы с антисмысловым *dig*-зондом к *Noggin4*. Сверху вид с дорсальной стороны, снизу право-фронтальный вид. (В) Влияние введения мРНК *Noggin4* (80%, n = 120) и MO1 *Noggin4* (85%, n = 130) на развитие переднеголовных структур. Пр – присоска. Гибридизация *in situ* *dig*-зондами к мРНК *FoxG1*, *Rx*, *Otx2* и *Pax6* зародышей (средняя нейрула), инъектированных: (Г-Ж) контрольной мРНК *GFP* (0%, n = 40; 0%, n = 50; 0%, n = 40; 0%, n = 30 нарушений развития, соответственно); (Г'-Ж') *Noggin4* mRNA (85%, n = 30; 61%, n = 35; 81%, n = 40; 65%, n = 40 нарушений развития, соответственно); (Г''-Ж'') *Noggin4* MO1 (90%, n = 50; 86%, n = 40; 60%, n = 40; 60%, n = 40 нарушений развития, соответственно); (Г'''-Ж''') контрольными *misNoggin4* MO1 (0%, n = 30; 0%, n = 30; 0%, n = 40; 0%, n = 30 нарушений развития, соответственно). Красным пунктиром (Е'-Е''') обозначены области презумптивного роstralного переднего мозга. Вид спереди, дорсальная сторона сверху.





Влияние экспрессии *Noggin4* на развитие головы наблюдается и в экспериментах по гибридизации *in situ*. Так, при искусственном усилении экспрессии *Noggin4* на стадии средней нейрулы наблюдается передне-латеральное расширение зон экспрессии маркеров презумптивного переднего мозга – *FoxG1*, *Rx*, *Otx2* и *Rax6* (Рис. 3). Вместе с тем, области экспрессии этих генов в нервной пластинке под действием МО демонстрируют существенное сокращение линейных размеров (Рис. 3, Рис. 5).

Известно, что для эктопической индукции минимального полного вторичного осевого комплекса (туловищный и головной отделы), необходимо и достаточно одновременно подавить активность *Wnt/β-catenin* и *BMP*. Подавление только *BMP*-каскада индуцирует развитие вторичной оси без головных структур. Учитывая эти данные, а также свидетельства того, что *Noggin4* негативно регулирует активность *Wnt/β-catenin*-пути, мы проверили, способна ли эктопическая экспрессия *Noggin4* при подавлении *BMP*-каскада индуцировать полные осевые комплексы. Для этого мы ко-инъекцировали вентральные бластомеры мРНК доминант-негативного *BMP*-рецептора (*tBR*) с мРНК *Noggin4*. Результаты этого эксперимента показывают, что при подавлении *BMP*-пути *Noggin4* действительно способен индуцировать полные вторичные оси, включая передний мозг и циклопические глаза, приблизительно у 60% экспериментальных зародышей (Рис. 6В, В'). Вместе с этим, введение мРНК *tBR* приводит к формированию туловищных отделов без головных структур.



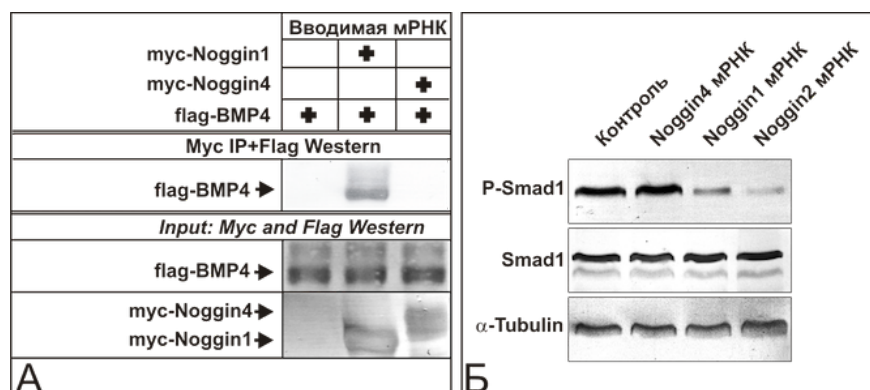
**Рис. 6. Способность *Noggin4* связывать лиганды разных сигнальных путей**

(А) Анализ взаимодействия *Noggin4* с *ActivinB*, *Xnr2*, *Xnr4* и *XWnt8* при помощи ко-иммунопреципитации. (Б) *Frizzled8* конкурирует с *Noggin4* за связывание *Wnt8* в экспериментах по ко-иммунопреципитации. 2-клеточные зародыши инъекцировали мРНК *Noggin4* и *Wnt8*, либо этими мРНК в смеси с возрастающими количествами мРНК *Frizzled8*. Ко-иммунопреципитацию проводили с использованием нативных экстрактов средних гаструл. (В) Индукция вторичной головы с циклопическим глазом при ко-инъекции мРНК *Noggin4* и *tBR* (60%, n = 70). При инъекции чистой мРНК *tBR* индуцируется только вторичный осевой комплекс без головы (80%, n = 70). При инъекции контрольной мРНК *EGFP* индукции вторичных осей не происходит (100%, n = 60). (В') Область, содержащая ко-инъекцированный *FLD*.

## Оценка влияния *Noggin4* на активность специфических люциферазных репортеров

Неспособность *Noggin4* обеспечивать развитие вторичных осевых структур при эктопической экспрессии указывает на то, что данный белок не оказывает влияния на активность BMP-сигнального пути, подавление которого является необходимым условием нейральной индукции. С другой стороны, выявленная нами способность *Noggin4* к антериоризации фенотипа указывает на то, что он может функционировать подобно ингибиторам Wnt/ $\beta$ -catenin и/или Activin/Nodal. Из данных других авторов известно, что подавление активности этих сигнальных путей необходимо для развития головных структур. Для проверки гипотезы о том, что *Noggin4* не влияет на активность BMP-сигнального пути и для изучения влияния *Noggin4* на активность путей Wnt/ $\beta$ -catenin и Nodal/Activin мы использовали плазмиды, несущие ген люциферазы под контролем Smad2-связывающих цис-регуляторных элементов (pBRE-Luc – BMP-каскад; pARE-Luc – Nodal/Activin-каскад; pTOPFlash – Wnt/ $\beta$ -catenin-каскад).

В отличие от своих гомологов, *Noggin4* не влияет на активность BRE- и ARE-репортеров (Рис. 8), вне зависимости от концентрации инъектируемой мРНК. С другой стороны, введение мРНК *Noggin4* в зародыши при синхронной активации репортера TOPFlash дозозависимо снижает его активность. Кроме того, при оверэкспрессии одного из внутриклеточных эффекторов Wnt/ $\beta$ -catenin пути –  $\beta$ -catenin – введение мРНК *Noggin4* не оказывает заметного влияния на активность TOPFlash-репортера, активированного экзогенной мРНК  $\beta$ -catenin. Это указывает на то, что *Noggin4* реализует свою молекулярную функцию во внеклеточном пространстве на уровне не ниже рецепторов Wnt8.



**Рис. 7** Сравнение способности *Noggin1*, *Noggin2* и *Noggin4* связывать BMP4 и влиять на внутриклеточную концентрацию фосфорилированного Smad1

(А) Сравнение способности *Noggin1* и *Noggin4* связывать BMP4 при помощи ко-иммунопреципитации. (Б) В отличие от *Noggin1* и *Noggin2*, оверэкспрессия *Noggin4* не вызывает снижения концентрации эндогенного эффектора фосфорилированного Smad1.

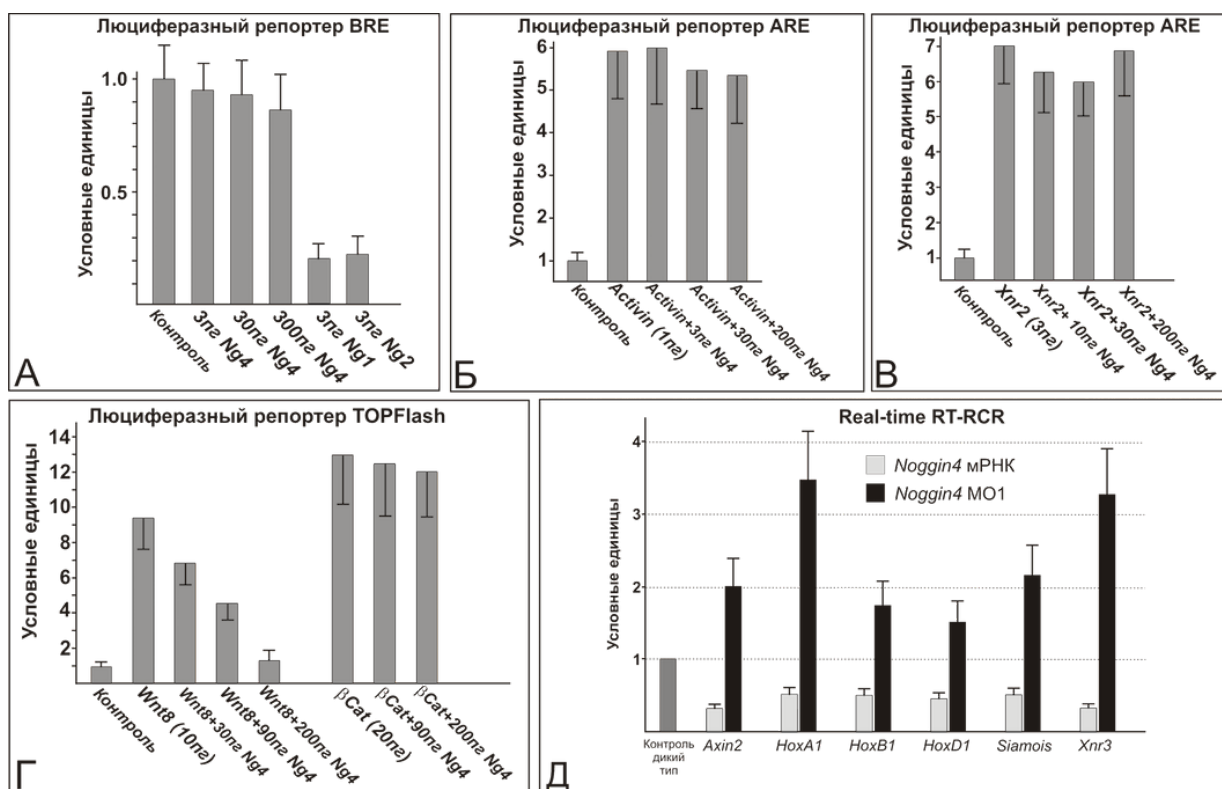


## **Изучение способности Noggin4 связывать лиганды разных сигнальных путей**

Для изучения способности Noggin4 связывать лиганды сигнальных путей нами были получены плазмидные конструкции, кодирующие производные различных белков, меченные специфическими антигенными эпитопами flag и мус на N- или C-конце зрелого полипептида, а именно BMP4 (BMP-каскад); ActivinB, Xnr2, Xnr4 (Nodal/Activin каскад) и Wnt8 (канонический Wnt каскад).

Результаты экспериментов по ко-иммунопреципитации указывают на то, что в условиях, в которых мус-Noggin1 образует комплекс с flag-BMP4, мус-Noggin4 не связывает данный белок (Рис. 7А). Эти данные согласуются с результатами эксперимента по измерению концентрации фосфорилированного Smad1, одного из ключевых переносчиков сигнала в составе внутриклеточной части BMP-каскада. Фосфорилируясь внутриклеточным киназным доменом TGF $\beta$ -рецептора I типа, P-Smad1 приобретает способность взаимодействовать с другими внутриклеточными участниками каскада и, таким образом, обеспечивать передачу сигнала в ядро. Количественное измерение внутриклеточной концентрации активного P-Smad1 в зародышах с повышенной экспрессией белков семейства Noggin позволяет оценить степень их влияния на активность BMP-сигнального пути. В отличие от обоих своих гомологов, Noggin4 при оверэкспрессии не влияет на концентрацию P-Smad1 (Рис. 7Б). Кроме того, ко-иммунопреципитация flag-меченных лигандов Nodal/Activin-каскада – ActivinB, Xnr2 и Xnr4 – с мус-Noggin4 показывает, что Noggin4 не образует комплексов ни с одним из изученных белков (Рис. 6А).

Одновременно мы обнаружили, что мус-Noggin4 способен к образованию комплекса с лигандом Wnt-сигнального пути, flag-Wnt8 (Рис. 6А). При этом он конкурирует за связывание с Frizzled8 – специфическим мембранным рецептором лиганда Wnt8, экспрессирующимся в передней нейроэктодерме (Рис. 6Б). Важно, что результаты этого эксперимента зависят от способа выделения: при выделении белков из тотального лизата зародышей нам не удалось увидеть образования комплекса между мус-Noggin4 и flag-Wnt8, а при выделении белков, секретированных в межклеточное пространство зародыша с использованием бескальциевой среды CMFM, было впервые показано образование устойчивого комплекса мус-Noggin4 и flag-Wnt8. Это может объясняться тем, что оба белка представляют собой секретлируемые морфогены с обогащенной остатками цистеина первичной структурой, а их правильный посттрансляционный процессинг и адекватные конформационные модификации являются необходимым условием для сохранения их функциональных свойств.



**Рис. 8. Влияние Noggin1, Noggin2 и Noggin4 на активность специфических люциферазных репортеров**

(А) Влияние Noggin1, Noggin2 и Noggin4 на экспрессию BMP-специфического люциферазного репортера BRE. 2-клеточные зародыши инъецировали плазмидой BRE самой по себе (контроль), либо в смеси с мРНК Noggin1/Noggin2 в неизменной концентрации либо мРНК Noggin4 в возрастающих концентрациях. (Б, В) Влияние Noggin4 на экспрессию Smad2-специфического репортера ARE, активируемого лигандами ActivinВ или Xnr2. (Г) Влияние Noggin4 на экспрессию Wnt/ $\beta$ -catenin-специфического репортера TOPFlash, активируемого Wnt8 и  $\beta$ -catenin. (Д) количественный qRT-PCR анализ экспрессии прямых генетических мишеней канонического Wnt-сигнального пути – Axin2, HoxA1, HoxB1, HoxD1, Siamois и Xnr3 – в зародышах на стадии поздней гаструлы (стадия 12), инъецированных на стадии 4 клеток мРНК Noggin4 либо Noggin4 MO1. Уровни экспрессии каждого из тестируемых генов в зародышах дикого типа приняты за единицу.

### Изучение влияния Noggin4 на экспрессию генов-мишеней Wnt/ $\beta$ -catenin пути

Будучи прямым ингибитором Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального пути, Noggin4 должен предсказуемо влиять на уровни экспрессии прямых генов-мишеней данного сигнального каскада. Метод qRT-PCR прямых генетических мишеней этого сигнального пути, включая такие гены как Axin2, HoxA1, HoxB1, HoxD1, Siamois и Xnr3, позволил нам обнаружить, что в зародышах, дефицитных по Noggin4, уровень экспрессии этих генов значительно повышается и, напротив, снижается при гиперэкспрессии Noggin4 (Рис. 8Д).

Итак, мы получили свидетельства того, что:

– эктопическая экспрессия Noggin4 не способна индуцировать развитие вторичного осевого комплекса;

- Noggin4 не связывает лиганды сигнальных каскадов Nodal/Activin и BMP, не влияет на люциферазную активность специфических репортерных плазмид и не оказывает заметного влияния на концентрацию внутриклеточного P-Smad1;
- экспрессионные паттерны маркеров переднеголовных структур (FoxG1, Rx, Otx2 и Pax6) изменяются под влиянием повышения и понижения уровня экспрессии Noggin4;
- под действием Noggin4 происходит морфологическая антериоризация фенотипа – увеличение линейных размеров головы и присоски, увеличение и изменение формы глаз, а при подавлении его экспрессии наблюдаются обратные эффекты;
- Noggin4 способен индуцировать минимальные вторичные осевые комплексы, включая голову с циклопическим глазом, при одновременном подавлении сигнализации в каскаде BMP (эктопическая ко-экспрессия с tBR);
- Noggin4 действует на уровне не ниже мембранного рецептора Frizzled8 и при этом способен образовывать комплекс с Wnt8, конкурируя с Frizzled8 за связывание с ним;
- Noggin4 подавляет активность репортерных плазмид, селективно активируемых сигнализацией в каноническом каскаде Wnt;
- искусственное повышение и понижение экспрессии Noggin4 вызывает синхронные изменения уровней экспрессии ряда генов-мишеней сигнального каскада Wnt/ $\beta$ -catenin.

В совокупности, полученные данные предоставляют исчерпывающие свидетельства в пользу способности Noggin4 напрямую взаимодействовать с лигандом Wnt8, связывать его в межклеточном пространстве и конкурентно блокировать его взаимодействие со специфическими рецепторами Frizzled8. Это, в свою очередь, приводит к подавлению активности каскада Wnt/ $\beta$ -catenin, снижению уровня экспрессии его непосредственных генетических мишеней и проявлению ряда наблюдаемых фенотипических эффектов.

#### **Свидетельства нелокальности физиологического действия Noggin4**

Мы обнаружили, что белок Noggin4 проявляет свое физиологическое действие не только локально, но и в районах, лежащих за пределами области его повышенной/пониженной экспрессии. Признаки такого поведения Noggin4 обнаруживаются при сравнении контрольных зародышей, унилатерально инъецированных мРНК EGFP (Рис. 13А-А”, В-В”), с зародышами, асимметрично инъецированными мРНК Noggin4 в один из передне-дорсальных бластомеров на стадии 8 клеток. На картинах гибридизации *in situ* с dig-зондами к переднеголовным маркерам FoxG1, Rx, Otx2 и Pax6 на стадии средней нейрулы видно, что увеличение линейных размеров области экспрессии вышеперечисленных генов проявляется не только в части зародыша,

состоящей из нагруженных экзогенной мРНК *Noggin4* потомков инъецированного бластомера (Рис. 13Б, Г, Д, Е; на флюоресцентных фотографиях (Б'-Е') эти зоны отмечены несекретируемым зеленым флюоресцентным красителем FLD), но и в областях, где экзогенная мРНК *Noggin4* отсутствует (отмечены стрелками).

При асимметричной гиперэкспрессии *Noggin4* мы обнаружили нелокальную морфологическую антериоризацию фенотипа (Рис. 13Ж-Ж''), подобно той, что наблюдается при унилатеральной гиперэкспрессии мРНК *Noggin4* (Рис. 5В): увеличение линейных размеров присоски не только в области экспрессии экзогенной мРНК (на флюоресцентной фотографии (Ж') соответствует окрашенной области), но и в области, где экзогенная мРНК отсутствует (на фотографиях помечена стрелками).

### Оценка способности *Noggin4* к диффузии в межклеточном пространстве *in vivo*

Для подтверждения роли *Noggin4* в качестве ингибитора *Wnt8* необходимо оценить его способность к перемещению в межклеточном пространстве и сравнить его с другими членами семейства *Noggin*, а так же с белком *Wnt8*. Для этих целей мы изготовили плазмидные конструкции, кодирующие секретируемые рекомбинантные белки *Noggin1/2/4* и *Wnt8* с флюоресцентными метками EGFP или TagRFP (Рис. 9).

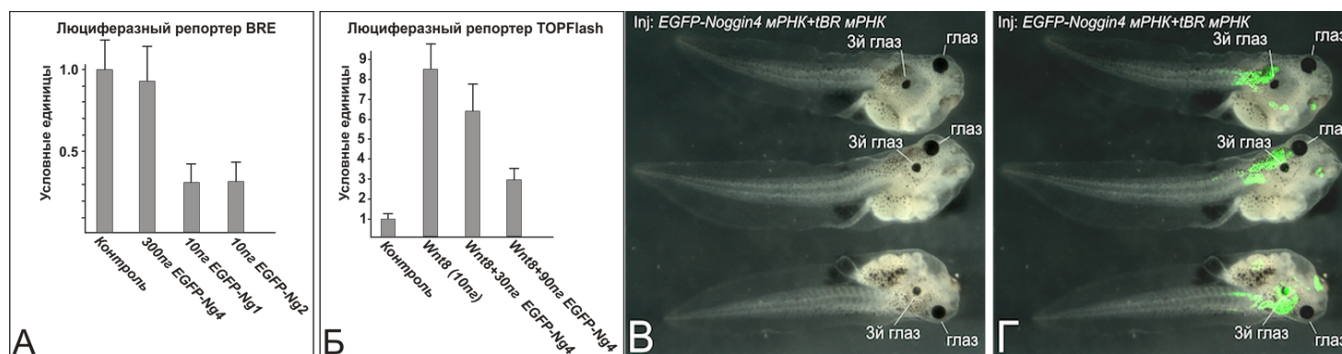


Рис. 9. *Noggin1*, *Noggin2*, *Noggin4* и *Wnt8*, меченные EGFP или TagRFP, секретируются в межклеточное пространство анимальной эктодермы зародышей *Xenopus laevis*

(А) Принципиальная схема строения флюоресцентно-меченных секретируемых рекомбинантных белков. Красным пунктиром показано место отщепления сигнального пептида. (Б-Ж) Прижизненная визуализация полученных фьюжн-белков в межклеточном пространстве анимальной эктодермы зародышей *X. laevis*. 4-клеточные зародыши инъецировали в анимальные бластомеры мРНК, кодирующими различные рекомбинантные белки, после чего на стадии ранней-средней гаструлы их наблюдали с анимального полюса при помощи конфокального лазерного микроскопа.

При проверке рекомбинантных белков на предмет сохранения ими молекулярной и физиологической активности, в соответствии с ранее полученными данными для немеченных *Noggin1/2/4*, их рекомбинантные аналоги сохраняли способность подавлять люциферазную активность соответствующих репортеров (Рис. 10А, Б; ср. Рис. 8А, Г). мРНК EGFP-*Noggin4*

сохраняла способность индуцировать вторичные полные осевые комплексы при эктопической ко-экспрессии с ингибитором BMP-каскада tBR (Рис. 10В, Г; ср. Рис. 6В, В').



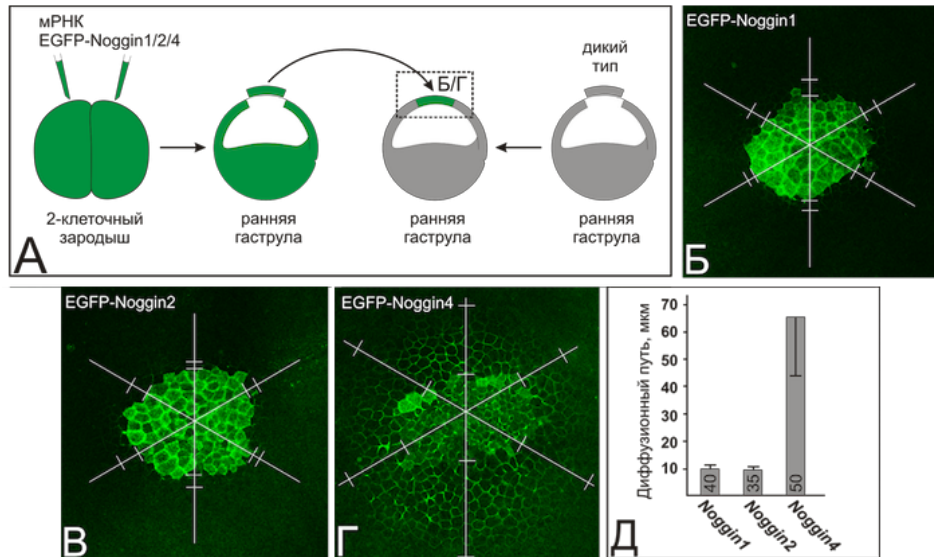
**Рис. 10. Реконструированные конструкции *Noggin1*, *Noggin2* и *Noggin4*, меченные EGFP, сохраняют молекулярные и физиологические активности своих немеченных аналогов**

(А) EGFP-Noggin1 и EGFP-Noggin2 подавляют экспрессию BMP-специфического люциферазного репортера BRE в зародышах *Xenopus laevis*. Зародыши инъецировали плазмидой репортера BRE самой по себе (контроль), либо в смеси с мРНК EGFP-Noggin1 или EGFP-Noggin2. (Б) EGFP-Noggin4 подавляет экспрессию Wnt/ $\beta$ -catenin-специфического люциферазного репортера TOPFlash в зародышах *Xenopus laevis*. Зародыши инъецировали плазмидой репортера TOPFlash самой по себе (контроль), либо в смеси с мРНК XWnt8 и увеличенной концентрацией мРНК EGFP-Noggin4. (В, Г) мРНК EGFP-Noggin4, ко-инъецируемая с мРНК ингибитора BMP, доминант-негативным BMP-рецептором tBR, индуцирует развитие вторичного осевого комплекса, включая циклопические глаза в головастиках *Xenopus laevis* (50%, n=70). Две разные группы головастиков, полученных в независимых экспериментах, фотографировали на стадиях 39 и 46, соответственно. На (В) два верхних головастика показаны с правой стороны, нижний головастик показан с брюшной стороны.

Относительные уровни экспрессии EGFP-Noggin4 и *Noggin4* дикого типа в тканях и количества этих белков в межклеточном пространстве мы измеряли при помощи qRT-PCR в эксплантатах дорсальной эктодермы (Рис. 12). По нашим оценкам, концентрации эндогенной мРНК *Noggin4* в зародышах дикого типа в среднем в 20 раз ниже, чем концентрация синтетической мРНК EGFP-Noggin4 в эмбрионах, использованных в FRAP-экспериментах. При условии, что эффективность трансляции эндогенной мРНК *Noggin4* не может быть ниже таковой для более длинной мРНК EGFP-Noggin4, мы заключили, что концентрация эндогенного белка *Noggin4* не может быть ниже 1/20 от концентрации белка EGFP-Noggin4. Принимая концентрацию белка EGFP-Noggin4 равной 1 мкМ, мы считаем концентрацию эндогенного белка *Noggin4* в межклеточном пространстве равной  $5 \cdot 10^{-8}$  М.

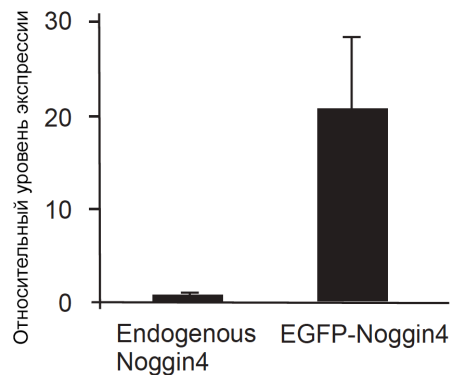
Для оценки диффузионных свойств реконструированных белков в межклеточном пространстве мы провели серию экспериментов по пересадке эксплантатов анимальной эктодермы зародышей, экспрессирующих EGFP-Noggin1/2/4, в область крыши бластоцеля зародышей дикого типа на стадии поздней бластулы (Рис. 11). После приживания в полученных зародышах при помощи лазерного конфокального микроскопа измерялось расстояние, которое реконструированные флуоресцентные белки из трансплантатов преодолевали в межклеточном пространстве

реципиента. Полученные значения диффузионного пути для EGFP-Noggin4 существенно превосходят значения для EGFP-Noggin1/2. Эти результаты указывают на то, что белок EGFP-Noggin4 распространяется в межклеточном пространстве с существенно более высокой скоростью, чем EGFP-Noggin1 и EGFP-Noggin2.



**Рис. 11. Диффузия Noggin1, Noggin2 и Noggin4 из эктодермальных эксплантатов**

(А) Принципиальная схема эксперимента. 2-клеточные зародыши *Xenopus laevis* инъецировали мРНК рекомбинантных белков Noggin1/2/4, инкубировали до стадии поздней бластулы и использовали для получения эксплантатов крыши бластоцеля, которые пересаживали на интактные зародыши и после приживления наблюдали движение флюоресцентных белков под конфокальным микроскопом. Область зародыша, изображенная на (Б-Г), обозначена пунктирным прямоугольником. (Б-Г) Примеры трансплантатов спустя 60 минут после пересадки. В отличие от клеток реципиента, цитоплазма клеток донора содержит флюоресцентные белки EGFP-Noggin1/2/4. Для сравнения диффузионных свойств исследуемых белков в каждом эксплантате измеряли диффузионный путь в шести направлениях (белые линии, расходящиеся из центра эксплантата под углом 60°) от границы эксплантата до точек, где уровень флюоресценции EGFP в межклеточном пространстве становится неотличимым от фона (пары белых отметок на радиальных линиях). (Д) Средний диффузионный путь и стандартное отклонение, вычисленные для каждой группы эксплантатов (количество эксплантатов указано на каждом из столбцов).



**Рис. 12. Относительные концентрации эндогенной мРНК Noggin4 и мРНК EGFP-Noggin4 в эктодермальных эксплантатах эмбрионов на стадии средней гастролы**

Значение  $D$ , вычисленное для Noggin4 на основании кривых характерного времени FRAP, составило  $3.8 \pm 1.3$  мкм<sup>2</sup>/с. Это значение находится вблизи теоретической оценки  $D$  для Noggin4 (8.0 мкм<sup>2</sup>/с), вычисленное при помощи гидродинамического моделирования, что согласуется с фактом отсутствия в структуре этого белка потенциальных сайтов связывания гепарина. На основании этих данных были измерены коэффициенты диффузии ряда белков.

На основании формулы

$$I_N(t) = 1 - \left( \frac{4\pi Dt}{w^2} \right)^{-\frac{1}{2}}$$

мы вычислили эффективные коэффициенты диффузии для изучаемых белков:

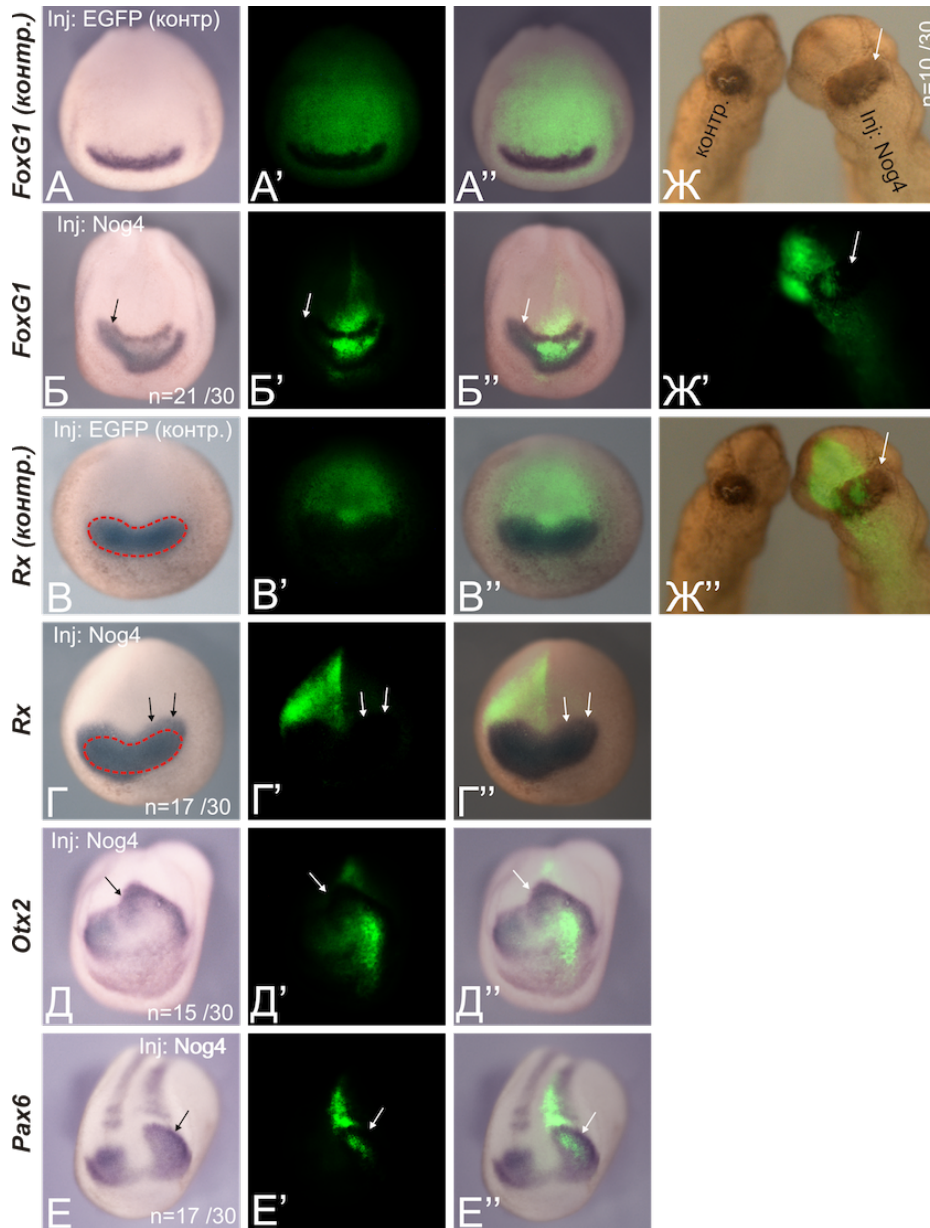
	Данные FRAP	Гидродинамическое моделирование
EGFP-Noggin1	0.05±0.03	8.0
EGFP-Noggin2	0.05±0.03	8.0
EGFP-Noggin4	3.75±1.3	8.0
EGFP-Wnt8	0.08±0.03	–
EGFP-hep	0.68±0.26	17.9
EGFP-hep + Wnt8	0.42±0.12	–
EGFP-Noggin4 + Wnt8	0.12±0.06	–
Noggin1	–	11.4

Количественные данные способности к диффузии для других известных антагонистов Wnt недоступны, однако вероятно, что свойства Noggin4 делают его уникальным среди таких факторов, поскольку все они, включая DAN, Dkk, Cerberus и Frzb/sFRP, содержат в структуре гепарин-связывающие сайты, из-за чего их свободная диффузия должна быть затруднена.

Нами был разработан новый подход к изучению диффузии секретируемых белков в межклеточном пространстве в условиях *in vivo*. Способность флюоресцентно меченных морфогенов к диффузии в эмбриональных тканях обычно изучается при помощи анализа FRAP-кинетик в квадратной области, содержащей множество клеток. Однако для корректного расчета коэффициента диффузии необходимо определить размерность диффузионного пространства. Нецелочисленная размерность межклеточного пространства существенно затрудняет использование такого метода и усложняет расчеты. При этом время снятия FRAP-кинетик обычно требует десятков минут. Побочные процессы, такие как деградация и/или секреция белка и гибель зародышей, способны влиять на параметры восстановления флюоресценции и исказить результаты, что требует учета в вычислениях. Разработанный нами подход лишен



вышеупомянутых неудобств, поскольку позволяет напрямую оценить реальную скорость распространения через измерение времени полувосстановления флюоресценции после фотобликинга в “одиночном” межклетнике, что существенно сокращает время измерения и упрощает дальнейшие вычисления.



**Рис. 13. Нелокальность действия Noggin4**

(А-А'', В-В'') Контрольный зародыш, ињецированный унилатерально в дорсальные бластомеры мРНК EGFP с FLD на стадии 8 клеток и гибридованный на стадии средней нейрулы с dig-зондом к FoxG1 (А-А'') и Rx (В-В''). (Б-Б'', Г-Е'') Зародыши, ињецированные мРНК Noggin4 с FLD на стадии 8 клеток в один из дорсальных бластомеров и гибридованные dig-зондами к FoxG1 (Б-Б''), Rx (Г-Г''), Otx2 (Д-Д'') и Pax6 (Е-Е''). Стрелками обозначены области, в которых оверэкспрессия соответствующих генов-маркеров не совпадает с локализацией FLD, что подтверждает нелокальность действия Noggin4. (А'-Е') флюоресцентные фотографии зародышей (А-Д). Наложение фотографий (А-Д) и (А'-Е'). (Ж-Ж'') Расширенная присоска интактной стороны зародыша на стадии хвостовой почки (справа), ињецированного в правые дорсальный и вентральный бластомеры на стадии 8 клеток подтверждает нелокальность активности Noggin4.



## Моделирование влияния *Noggin4* на передне-задний градиент сигнальной активности *Wnt8*

В нервной пластинке зародышей *Xenopus* *Wnt8* экспрессируется от ее заднего края вплоть до границы между презумптивными задним и средним мозгом, соответствующей заднему краю зоны экспрессии гена *otx2* в передней нервной пластинке. Перемещаясь от этой границы, *Wnt8* образует градиент с минимумом вблизи передней границы нервной пластинки. Для точной регуляции этого градиента в зародыше *Xenopus laevis* эндогенный *Noggin4* должен конкурировать с рецепторами *Frizzled* за связывание с *Wnt8*.

Мы провели количественную оценку эффектов конкуренции эндогенного *Noggin4* за связывание *Wnt8* с одним из основных его рецепторов в передней эктодерме, *Frizzled8*. Концентрацию эндогенного белка *Noggin4* в межклеточном пространстве зародыша мы оценили в 50 нМ. Для простоты мы предположили, что: (1) в пределах передней нейроэктодермы *Noggin4* распределен равномерно; (2) *Frizzled8* также распределен в передней нейроэктодерме в тотальной концентрации 50 нМ; (3) концентрация *Wnt8* образует передне-задний убывающий градиент с максимальным значением в 50 нМ в районе границы между презумптивным задним и средним мозгом, понижаясь в направлении переднего края нервной пластинки, согласно логистической сигмоидной функции (Рис. 14). Мы постулировали сигмоидный характер градиента концентрации *Wnt8* как наиболее соответствующий форме экспериментально измеренного градиента *Wnt/β-catenin*-сигнализации в презумптивной нервной пластинке. Наконец, мы считали, что аффинность *Noggin4* к *Wnt8* не превышает 100 нМ, тогда как аффинность *Wnt8* к *Frizzled8* равна 10 нМ.

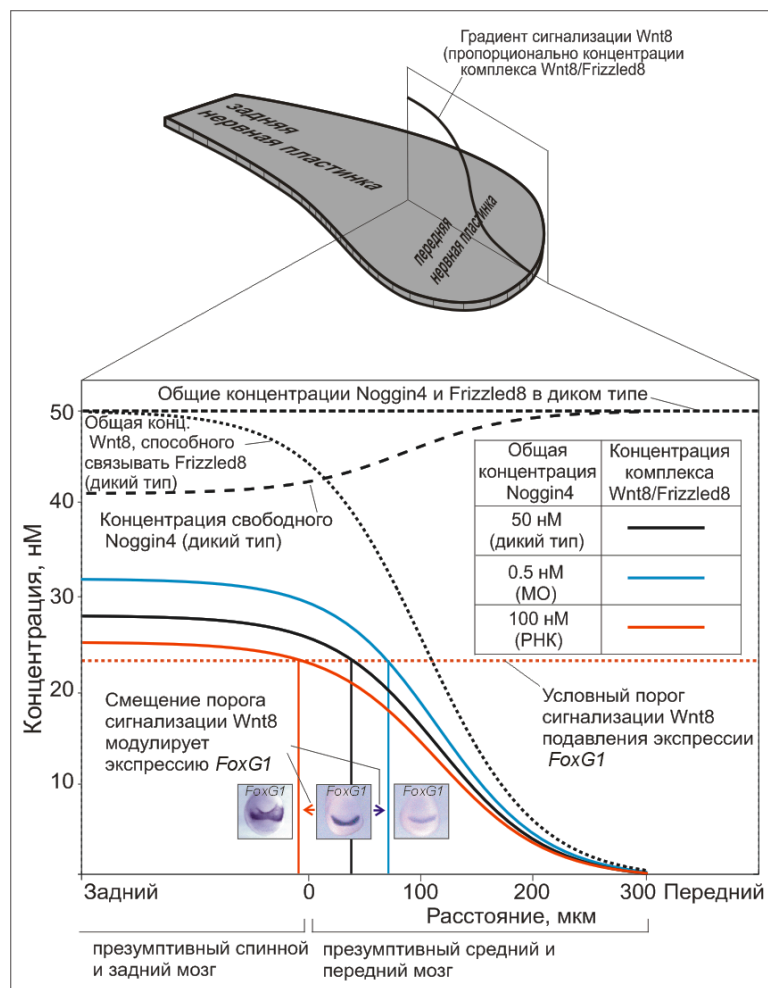
Данные предположения позволили рассчитать концентрационный градиент комплекса *Wnt8-Frizzled* при изменениях количества *Noggin4* вдоль средней линии области экспрессии *otx2* в передней нервной пластинке. Результаты проведенного моделирования качественно воспроизводят результаты наших экспериментов по стимулированию и подавлению экспрессии *Noggin4* при помощи инъекции его мРНК или специфических МО. Эти фактические изменения концентрации *Noggin4* пространственно смещали условный порог градиента активности *Wnt8* на величину порядка 100 мкм (Рис. 14).

Таким образом, и проведенные нами эксперименты, и количественные оценки подтверждают, что *Noggin4* исполняет роль дальнедействующего ингибитора *Wnt8*-сигнализации, регулируя передне-задний градиент сигнальной активности каскада *Wnt/β-catenin*.

Согласно опубликованным нами данным трех независимых методов – количественной иммунопреципитации, поверхностного плазмонного резонанса и FRAP-экспериментов *in vivo* по разработанной нами методике, – *Noggin4* взаимодействует с *Wnt8* с умеренной аффинностью и константой связывания  $K_D$  в пределах от 10 до 100 нМ. Такое значение  $K_D$ , очевидно, выше, чем

определенное в работах других авторов значение для комплекса Wnt8 с рецептором Frizzled или Frzb/sFRP3 – 10 нМ. С другой стороны, проведенное нами математическое моделирование показало, что даже значение  $K_D$  в 100 нМ позволяет белку Noggin4 эффективно регулировать градиент сигнальной активности Wnt8, руководящий передне-задней разметкой нервной пластинки.

Важно, что при моделировании влияния Noggin4 на сигнальный градиент Wnt8 существование самого градиента было постулировано как начальное условие. Таким образом, предсказания на основе моделирования не зависят от специфических механизмов формирования этого градиента (свободная диффузия, транспортные белки, везикулярный транспорт или сигнальные филоподии).



**Рис. 14. Моделирование влияния Noggin4 на передне-задний градиент сигнальной активности Wnt8**

При нейруляции Wnt8, распространяясь из задних областей в пределах передней нервной пластинки и взаимодействуя в ней с Frizzled8, образует градиент сигнальной активности (сплошная черная линия в прямоугольнике вдоль срединной линии нервной пластинки). Цветные кривые в увеличенной версии этого прямоугольника (ниже) выражают теоретически рассчитанное пространственное распределение концентрации комплекса Wnt8/Frizzled8 при трех концентрациях Noggin4: дикий тип, сниженная (инъекция Noggin4 МО) и повышенная (инъекция мРНК Noggin4). Три фотовставки показывают предполагаемые эффекты соответствующего пространственного смещения условного порога концентрации комплекса Wnt8/Frizzled8 экспрессии переднемозгового маркера FoxG1.

## Выводы

1. Изучено и описано пространственное-временное распределение экспрессии Noggin4 в раннем развитии куриного зародыша *Gallus gallus*.
2. Показано, что белок Noggin4, в отличие от своих гомологов, не способен оказывать влияние на активность сигнальных путей BMP и Nodal/Activin как *in vitro*, так и *in vivo*.
3. Продемонстрирована способность белка Noggin4 связывать лиганд канонической ветви сигнального пути Wnt/ $\beta$ -catenin, Wnt8, и подавлять его сигнальную активность в условиях *in vitro* и *in vivo*.
4. Обнаружено уникальное для известных секретируемых внеклеточных ингибиторов Wnt-сигнализации свойство Noggin4: его вычисленный коэффициент диффузии в межклеточном пространстве более чем на порядок превосходит данный показатель его гомологов.
5. На основании результатов экспериментов и математического моделирования предложена модель регуляции белком Noggin4 градиента сигнальной активности Wnt8 в процессе ранней разметки нервной пластинки у эмбрионов *Xenopus laevis*.
6. Разработан новый, оптимизированный для условий *in vivo* подход к изучению распространения секретируемых белков в межклеточном пространстве зародыша, позволяющий напрямую оценить реальную скорость их перемещения на основе применения генетических конструкций с флюоресцентными метками и измерения кинетик времени полувосстановления флюоресценции после фотобличинга (FRAP) в индивидуальном межклеточном сегменте.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Eroshkin F., Nesterenko A., **Borodulin A.**, Martynova N., Ermakova G., Gioeva F., Orlov E., Belogurov A., Lukyanov K., Bayramov A., and Zاراisky A. (2016) Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. *Sci.Rep.* **6**, Article number: 23049.
2. Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., **Бородулин А.В.**, Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Зарайский А.Г. (2016) Секретируемый белок Noggin4 участвует в формировании переднеголовных структур шпорцевой лягушки, ингибируя Wnt/beta-catenin сигнальный каскад. *Онтогенез* **47(4)**: 229-234.
3. **Borodulin A.V.**, Eroshkin F.M., Bayramov A.V. and Zاراisky A.G. (2012) Noggin4 expression during chick embryonic development. *Int.J.Dev.Biol.* **56**: 403-406.
4. Мартынова Н.Ю., Нестеренко А.М., Орлов Е.Е., Ерошкин Ф.М., **Бородулин А.В.**, Байрамов А.В., Зарайский А.Г. (2016) Взаимодействие секретируемых белков Noggin4 и Wnt8 из эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. *Биоорганическая химия* **42(3)**: 1-4.

## Тезисы докладов

Бородулин А.В., Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., Иванова А.С., Мартынова Н.Ю., Нестеренко А.М., Орлов Е.Е., Зарайский А.Г. (ИБХ РАН, Москва) **Белок Noggin4 – регулятор активности внутриклеточных TGF- $\beta$  и Wnt сигнальных каскадов в развитии и регенерации зародыша шпорцевой лягушки.** XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», посвященная 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН. Москва, 11-15 февраля 2013 г.