

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

профессор, д.б.н., Зарайский Андрей Георгиевич

Москва – 2023 г.

Оглавление

1.	Список сокращений.	5
2.	Введение.....	6
3.	Актуальность темы исследования.	9
4.	Научная новизна и практическая значимость работы.	10
5.	Цель и задачи исследования.....	11
6.	Обзор литературы.	12
6.1.	Появление экспериментальной эмбриологии. Открытие феномена эмбриональной регуляции.	12
6.2.	Регуляционный и мозаичный тип развития животных.....	16
6.3.	Открытие эмбриональных индукций. Опыты Хёрстадиуса и Шпемана.	24
6.3.1.	Опыты Хёрстадиуса: эмбрион как саморегулирующаяся система далекодействующих сигналов.	24
6.3.2.	Опыты Шпемана и Мангольд. Эмбриональный организатор как источник далекодействующих саморегулирующихся сигналов.	25
6.3.3.	Распространенность шпемановских индукций среди вторичноротых.	29
6.3.4.	Аналогичные шпемановскому организатору структуры у первичноротых.	31
6.4.	Механизмы формирования дорзо-вентральной оси.....	33
6.4.1.	Первичная эмбриональная индукция. Открытие ньюкуповского центра.....	33
6.4.2.	Молекулярный механизм формирования шпемановского организатора. Взаимодействие ньюкуповского центра и VCNE-центра.	36
6.4.3.	Механизмы дорзо-вентральной разметки.	38
6.4.3.1.	Открытие молекулярных основ шпемановской индукции.....	38
6.4.3.2.	Молекулярный механизм BMP-каскада.....	42
6.4.3.3.	Роль BMP-каскада в дорзо-вентральной разметке среди зуметазой.	44
6.5.	Молекулярные механизмы эмбрионального скейлинга.	58
6.5.1.	Модели паттернинга. Градиентная модель Вольперта и Крика. Реакционно-диффузионная модель Тьюринга.	58
6.5.2.	Модели эмбрионального скейлинга.	59
6.5.2.1.	Скейлинг в градиентной модели Вольперта-Крика.	59

6.5.2.2.	Скейлинг в модели синтеза-диффузии-деградации.	60
6.5.2.3.	Скейлинг с помощью размер-зависимого модулятора. Пассивная модуляция.	62
6.5.2.4.	Активная модуляция. Модели «экспандер-репрессор» и «индуктор-контрактор».	65
6.5.2.5.	Модели скейлинга дорзо-вентральной оси.	68
6.5.2.6.	Поиск новых модуляторов. Скейлеры.	69
7.	Результаты.	72
7.1.	Все известные модели скейлинга, основанные на модуляции морфогенетического градиента, имеют элементы со значительной разницей в концентрации.	72
7.2.	Поиск новых скейлеров с помощью сравнения транскриптомов интактных и уменьшенных зародышей шпорцевой лягушки.	72
7.3.	Исследование экспрессии гена <i>матриксной металлопротеиназы-3</i> в раннем развитии шпорцевой лягушки.	76
7.4.	Нокдаун <i>mmp3</i> приводит к уменьшению сомитной мезодермы и нервной пластинки, но одновременно к увеличению ното хорда.	77
7.5.	<i>Mmp3</i> расщепляет секретируемые белки <i>Noggin1</i> и <i>2</i> и препятствует деградации <i>Chordin</i> путем разрушения металлопротеиназы <i>Tolloid-like1</i>	82
7.6.	В соответствии с ролью <i>Mmp3</i> как экспандера для <i>Chordin</i> , подавление функции <i>Mmp3</i> вызывает расширение вентрального маркера <i>sizzled</i>	87
7.7.	Подавление <i>Chordin</i> вызывает сужение (скейлинг) сомитов и нервной пластинки, а активация <i>Noggin1/2</i> вызывает расширение (антискейлинг) ното хорда.	88
7.8.	Моделирование <i>Mmp3</i> -опосредованного скейлинга.	92
8.	Обсуждение.	99
9.	Выводы.	102
10.	Материалы и методы.	103
10.1.	Материалы.	103
10.1.1.	Среды и растворы.	103
10.1.2.	Антитела, коммерческие наборы и реактивы, бактериальные штаммы.	107
10.1.3.	Олигонуклеотиды морфолино.	111
10.1.4.	Модельные объекты и программное обеспечение.	112
10.1.5.	Оборудование.	113

10.2.	Методы.....	115
10.2.1.	Манипуляции с эмбрионами шпорцевой лягушки.....	115
10.2.2.	Выделение тотальной РНК из эмбрионов.....	116
10.2.3.	Высокопроизводительное секвенирование.....	117
10.2.4.	Создание генетических конструкций.....	117
10.2.5.	Синтез РНК <i>in vitro</i>	121
10.2.6.	Получение антител.....	122
10.2.7.	Белковый электрофорез и вестерн-блоттинг.....	122
10.2.8.	Гибридизация <i>in situ</i>	123
10.2.9.	Иммуногистохимия.....	124
10.2.10.	Количественная ОТ-ПЦР.....	124
10.2.11.	CRISPR/Cas9-нокаут.....	126
10.2.12.	Статистический анализ данных.....	126
10.2.13.	Математическое моделирование и скрининг <i>in silico</i>	126
11.	Список литературы.....	127

1. Список сокращений.

ADMP	Anti-dorsalizing morphogenetic protein
Ala	Аланин
APC	Adenomatous polyposis coli
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog
BCNE	Blastula chordin and noggin expression
BMP	Bone morphogenetic protein
Chrd	Chordin
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cv-2	Crossveinless 2
Dkk1	Dickkopf 1
Dpp	Decapentaplegic
Dsh	Dishevelled
ENAF	Early notochord activating factors
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
foxA	Forkhead box A
Frz7	Frizzled 7
Frzb1	Frizzled-related protein 1
GBP	GSK3 β binding protein
GDF5	Growth and differentiation factor 5
Glu	Глутамин
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HNF3b	Hepatocyte necrosis factor 3 beta
IGFBP5	Insuline-like growth factor binding protein 5
INS	Initial notochord seed
ISH	In situ hybridization
lim1	Lens intrinsic membrane protein 1
Mix1	Mix paired homeobox 1
mM	МИЛЛИМОЛЬ
Mmp3	Matrix metalloprotease 3
MMR	Marc's modified ringer
Nog	Noggin
not1	Notochord homeobox 1
Otx2	Orthodenticle homeobox 2
pMad	Phosphorylated Mothers against decapentaplegic
SDD	Synthesis, diffusion, degradation
sFRP2	Secreted frizzled-related protein 2
Shh	Sonic hedgehog
Sog	Short gastrulation
Sr	Scaling ratio
Ss	Scaling score
TCF-3	Transcription factor 3
TGF β	Transforming growth factor beta
Tll1	Tolloid-like1
Tsg	Twisted gastrulation
Tub	Tubulin

Wnt	Wingless & Int-1
Xlr	Xenopus tolloid-related
Xnr	Xenopus nodal-related
Вент.	Вентральный
ВКМ	Внутренняя клеточная масса
г	грамм
Град.	Градусы
Дорс.	Дорсальный
Конт.	Контроль
	Количественная полимеразная цепная реакция в реальном
кОТ-ПЦР	времени
л	литр
Латеральн.	Латеральный
МО	Морфолиновые олигонуклеотиды
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
пг	пикограмм
пмоль	пикомоль
Уменьш.	Уменьшенный
УФ	Ультрафиолет
ЭЭТ	Экстраэмбриональная ткань

2. Введение.

Одним из замечательных свойств развития животных является феномен эмбриональной регуляции, то есть восстановления нормальной структуры эмбриона после искусственного изменения его размеров (Cooke, 1981; Inomata et al., 2013; Morgan, 1924; Cooke, Webber, 1985a, b; Driesch, 1891; Sander, 1976; Uygur et al., 2016). К примеру, при разделении двух бластомеров эмбриона морского ежа после первого деления дробления из изолированных бластомеров образуются пропорционально сложенные маленькие плютеусы (Driesch, 1891).

Согласно современным представлениям, пространственная разметка эмбриональных зачатков происходит на основе градиентов секретируемых факторов-морфогенов, чаще всего имеющих белковую природу. Эмбриональные клетки способны воспринимать пороговые концентрации морфогена, что приводит к разметке зародыша вдоль градиента на разные эмбриональные зачатки. В свою очередь, градиенты морфогенов в эмбрионе формируются в результате работы специализированных генно-белковых сетей, функционирующих по типу реакционно-диффузионных (РД) систем (Almuedo-Castillo et al., 2018; De Robertis, Moriyama, 2016; Belintsev, 1983; Gierer, Meinhardt, 1972; Kicheva et al., 2007; Plouhinec et al., 2013; Tabata, Takei, 2004). Таким образом очевидно, что эмбриональная регуляция при изменении размеров зародыща может происходить только в

результате пропорционального скейлинга (от английского scale – масштаб) градиентов морфогенов, генерируемых в таких РД системах (Kolmogorov et al., 1937; Meinhardt, 2008; Umulis, Othmer, 2013).

С введением молекулярно-биологических методик в биологию развития за последние годы было найдено и исследовано несколько саморегулирующихся морфогенетических градиентов, формирующихся на основе уже известных генно-регуляторных сетей и построены их математические модели (Almuedo-Castillo et al., 2018; Ben-Zvi et al., 2008; De Robertis, Moriyama, 2016; Garcia et al., 2013; Inomata et al., 2013; Plouhinec, De Robertis, 2009). Однако возможно ли обнаружить новые регуляторы морфогенетических градиентов, способных к скейлингу, используя современные методы молекулярной биологии? Если такой способ существует, то появилась бы возможность поиска совершенно новых, еще не описанных механизмов эмбрионального скейлинга.

В лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза (ИБХ РАН) впервые было высказано предположение о том, что скейлинг морфогенетических градиентов мог бы осуществляться продуктами особых генов-скейлеров, уровень экспрессии которых зависит от размера эмбриона. В подтверждение этому нами было продемонстрировано *in silico*, что все существующие на данный момент модели саморегулирующихся систем действительно содержат компонент, концентрация которого должна сильно меняться в ответ на изменение размера зародыша (Нестеренко и Зарайский, 2019; Orlov et al., 2022). Кроме того, было предположено, что, помимо случая, когда сама генная система, формирующая градиент морфогена, включает в свой состав ген(ы), реагирующий(е) на размер эмбриона, могут существовать системы, в которых генерируемый градиент морфогена регулируется неким внешним по отношению к этой системе геном-скейлером, также способным «чувствовать» размер эмбриона (Orlov et al., 2022). В последнем случае функции генерации градиента морфогена и скейлинга этого градиента оказываются разделенными между двумя независимыми друг от друга системами. Как представляется, такое разделение функций позволяет наиболее эффективно решать задачу генерации способного к скейлингу морфогенетического градиента.

На основании этих теоретических предсказаний был разработан метод прицельного поиска генов-скейлеров как генов, дифференциально экспрессирующихся в эмбрионах нормального и искусственно уменьшенного размера. Этот метод впервые был опробован на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* – известного модельного объекта биологии развития. Для этого сравнивались транскриптомные профили целых эмбрионов, и эмбрионов, развившихся из первых двух разделенных бластомеров. В результате был

выявлен очень короткий ряд генов, чья экспрессия существенно отличалась в уменьшенных зародышах, полученных из разделенных бластомеров, по сравнению с интактными. Среди этих генов наше внимание особенно привлек ген матричной металлопротеиназы 3 (*mmp3*), – экспрессия которого сильно снижалась в уменьшенных зародышах. Данный ген кодирует секретлируемый фермент, активно участвующий в процессинге разнообразных внеклеточных белков в различных контекстах. Таким образом, *Mmp3* является отличным потенциальным кандидатом на роль скейлера, регулирующего градиент морфогена в эмбрионе с помощью протеолитического расщепления молекул морфогена во внеклеточном пространстве.

Действительно, обнаружено, что при нокдауне или нокауте *mmp3* происходила переразметка эмбриональных зачатков вдоль дорзо-вентральной оси зародыша, сходная с той, что происходит в уменьшенных зародышах и приводящая к пропорциональному уменьшению сомитной мезодермы и нервной пластинки, а также – что было показано в раннее в работах других авторов (Cooke, Webber, 1985a, b) – к непропорциональному увеличению осевой мезодермы, т.е. к своеобразному антискейлингу. Как было установлено в дальнейшем, *Mmp3* регулирует градиент активности BMP-каскада – основного клеточного каскада, размечающего эмбрион вдоль дорзо-вентральной оси. Наиболее заметную роль в формировании данного градиента играет лиганд этого каскада белок BMP4 и его антагонист Chordin (Piccolo et al., 1996). Chordin продуцируется клетками дорсальной губы бластопора (шпемановским организатором) во внеклеточное пространство, где он блокирует связывание BMP4 со своим рецептором, формируя контр-градиент активности каскада (Ben-Zvi et al., 2008; Inomata et al., 2013; Plouhinec et al., 2013). Кроме того, существует ряд других модуляторов BMP-каскада в эмбрионе лягушки, например, белок *Noggin1*, который также продуцируется клетками шпемановского организатора (De Robertis, Moriyama, 2016; Smith, Harland, 1992). Вдобавок было установлено, что на стадии ранней гастрюлы, когда и происходит основная разметка зачатков осевых органов, похожий паттерн экспрессии и функцию имеет также гомолог *Noggin1* – *Noggin2*. В итоге было выяснено, что *Mmp3* расщепляет медленно диффундирующие белки *Noggin1* и *2* и предотвращает протеолитическую деградацию белка Chordin протеазой *Tolloid-like1*, расщепляя последнюю. Как было подтверждено соответствующей математической моделью, сниженный уровень экспрессии *mmp3* в уменьшенных эмбрионах приводит к скейлингу сомитной мезодермы и нервной пластинки, которые регулируются градиентом быстро диффундирующего белка Chordin, и одновременно к антискейлингу осевой мезодермы за счет накопления в области хорды

медленно диффундирующих *Noggin1* и *Noggin2*. Таким образом, *tmpr3* действительно проявляет все свойства, предсказанные выдвинутой гипотезой для генов-скейлеров, регулируя морфогенетические градиенты белков BMP4, Chordin и *Noggin1/2* в зависимости от размера эмбриона. В свою очередь, эти результаты хорошо подтверждают гипотезу о генах-скейлерах, а также эффективность разработанного метода для их прицельного поиска.

3. Актуальность темы исследования.

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 *Mmpr3*. А именно, была открыта способность *Mmpr3* 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 также выяснение их роли в формировании целостной структуры эмбриона – одна из самых актуальных задач биологии в целом и биологии развития в частности.

4. 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 также 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.

5. 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 гастролы 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 гастролы.

6. Обзор литературы.

6.1. Появление экспериментальной эмбриологии. Открытие феномена эмбриональной регуляции.

Открытие феномена эмбриональной регуляции, то есть восстановления нормального плана строения эмбриона после оперативного удаления его части, связан с первыми шагами новой – тогда, второй половине-конце XIX века – дисциплины биологии – экспериментальной эмбриологии. Первые эксперименты с эмбрионами, однако, проводились задолго до первых работ экспериментальных эмбриологов: начиная с 20-х годов XIX века Этьен Сент-Илер стал проводить эксперименты с эмбрионами с целью получения аномально развивающихся зародышей. Таким образом Сент-Илер доказывал важность влияния внешних факторов на эмбриогенез (Oppenheimer, 1968; Dupont, 2017). Экспериментальные эмбриологи (как их будут называть впоследствии) поставили себе обратную задачу – воздействуя на эмбрион, понять механизм нормального развития. Одним из первых таких исследователей стал французский врач и физиолог Лоран Шабри, изучавший развитие асцидии *Ascidella aspersa*. Основной темой его работы стало изучение тератогенного влияния разрушения бластомеров эмбриона: он заметил, что раннее развитие асцидии мозаично (Lawrence, Levine, 2006): разрушение одного из двух первых бластомеров приводило к формированию половинной личинки, образованной только левой или правой стороной. Разрушение отдельных бластомеров на более поздних стадиях приводило к образованию дефектных личинок с отсутствующими частями – в зависимости от того, какой бластомер был поврежден, из чего Шабри сделал вывод, что – по крайней мере у асцидий – при разделении бластомеров происходит необратимое разделение детерминантов, определяющих дальнейшее развитие, и при разрушении бластомера детерминанты, необходимые для образования части эмбриона, теряются, что приводит к формированию частичной личинки (Fischer, 1990). Кроме того, разрушение отдельных бластомеров и анализ полученных аномалий развития позволил исследовать роль отдельных бластомеров и в нормальном развитии (Chabry, 1887; Oppenheimer, 1968; Fischer, 1990). Результаты экспериментов Шабри о мозаичном развитии асцидии, однако, не были им концептуализированы в теорию. Концептуализацией процессов развития, однако, одновременно с опытами Шабри, занялся немецкий физиолог Вильгельм Ру, сформулировавший знаменитую программу *Entwicklungsmechanik* (пер. с нем. «механика развития»), определившую направления и сформулировавшую задачи биологии развития

на много десятилетий вперед (Sander, 1991). Целью программы Ру стало изучение процесса развития как механистического, причинно-следственного процесса, поддающегося исследованию с помощью экспериментального воздействия на эмбрион. Взяв за основу теорию орган-образующих зародышевых регионов Вильгельма Гиса, гласившую, что в цитоплазме яйцеклетки содержится упрощенная структура будущего организма, и различные участки цитоплазмы ответственны за формирование отдельных эмбриональных структур, Ру считал, что развитие животных может реализовываться за счет двух концептуально различных механизмов – мозаичного развития и регуляционного. В первом случае яйцо содержит в не проявленном виде всю будущую структуру зародыша, и между отдельными орган-образующими регионами нет взаимодействия. Во втором случае яйцо имеет простую структуру, и сложность организма возникает из взаимодействия и дифференцировки простых частей (Maienschein, 1991; Sander, 1991). Но, несмотря на то, что Ру (как и Шабри) не отрицал возможности существования регуляционных механизмов развития, сформулированная им теория ядерных детерминантов предполагает строгий мозаицизм. Согласно этой теории, при дроблении бластомеров происходит неравномерное распределение ядерного материала, что приводит к необратимой дифференцировке клеток на самых ранних стадиях развития (Roux, 1885; Dupont, 2017). Надо заметить, что одновременно с Ру похожую теорию зародышевой плазмы разрабатывал Август Вейсман (Maienschein, 1991).

Вильгельм Ру, считавший теоретическое обоснование необходимым предварением любого эксперимента, приступил к экспериментам только после проведенной им теоретической работы (Roux, 1894, 1885; Sander, 1991). Он предложил простой опыт для проверки своей теории: если первое деление дробления эмбриона лягушки определяет левую и правую сторону организма, то хромосомные детерминанты также должны разделяться между бластомерами неравномерно на «левые» и «правые». Для этого Ру разрушал раскаленной иглой один из двух бластомеров эмбриона и инкубировал зародыш до более поздней стадии. Действительно, из подобных эмбрионов развивались половинные эмбрионы, содержащие только структуры левой или правой стороны (Рис. 1; Roux, 1888). Следовательно, гипотеза Вейсмана подтвердилась в данном опыте: дифференцировка клеток целиком зависит от содержащихся внутри клеток цитоплазматических детерминантов, автономно управляющих их дифференцировкой. Такой тип эмбрионального развития был назван мозаичным.



Рис.1 Опыт Вильгельма Ру по разрушению одного из двух бластомеров эмбриона амфибии (из Barresi, Gilbert, 2020, с изм.).

Однако, опыты по воздействию на отдельные бластомеры продолжил другой знаменитый пионер экспериментальной эмбриологии Ганс Дриш, который использовал в качестве объекта исследования эмбрионы морского ежа. Дриш разделял эмбрион морского ежа на отдельные бластомеры на стадии вплоть до 4-х бластомеров с помощью встряхивания или помещения в бескальциевую среду. При этом, в отличие от опыта Ру, не происходило разрушения соседних бластомеров. В результате из разделенных подобным образом клеток образовывались не частичные квази-личинки, а пропорционально сложенные маленькие плютеусы (Рис. 2, А; Driesch, 1892). Этот результат разительно отличался от полученного Ру – бластомер, отделенный от соседнего, способен «чувствовать» свое окружение и соответствующим образом изменять программу своего развития, чтобы получился пропорциональный эмбрион. Такая способность к сохранению нормальных пропорций организма при различных внешних или внутренних изменениях, таких как удаление части зародыша, рост, искусственная перегруппировка клеток в эмбрионе, была названа эмбриональной регуляцией (*embryonic self-regulation*). Кроме того, к эмбриональной регуляции также относят сохранение инвариантности эмбриональной разметки при естественной вариабельности размеров эмбрионов внутри одного вида или у близкородственных видов (Umulis, Othmer, 2013).

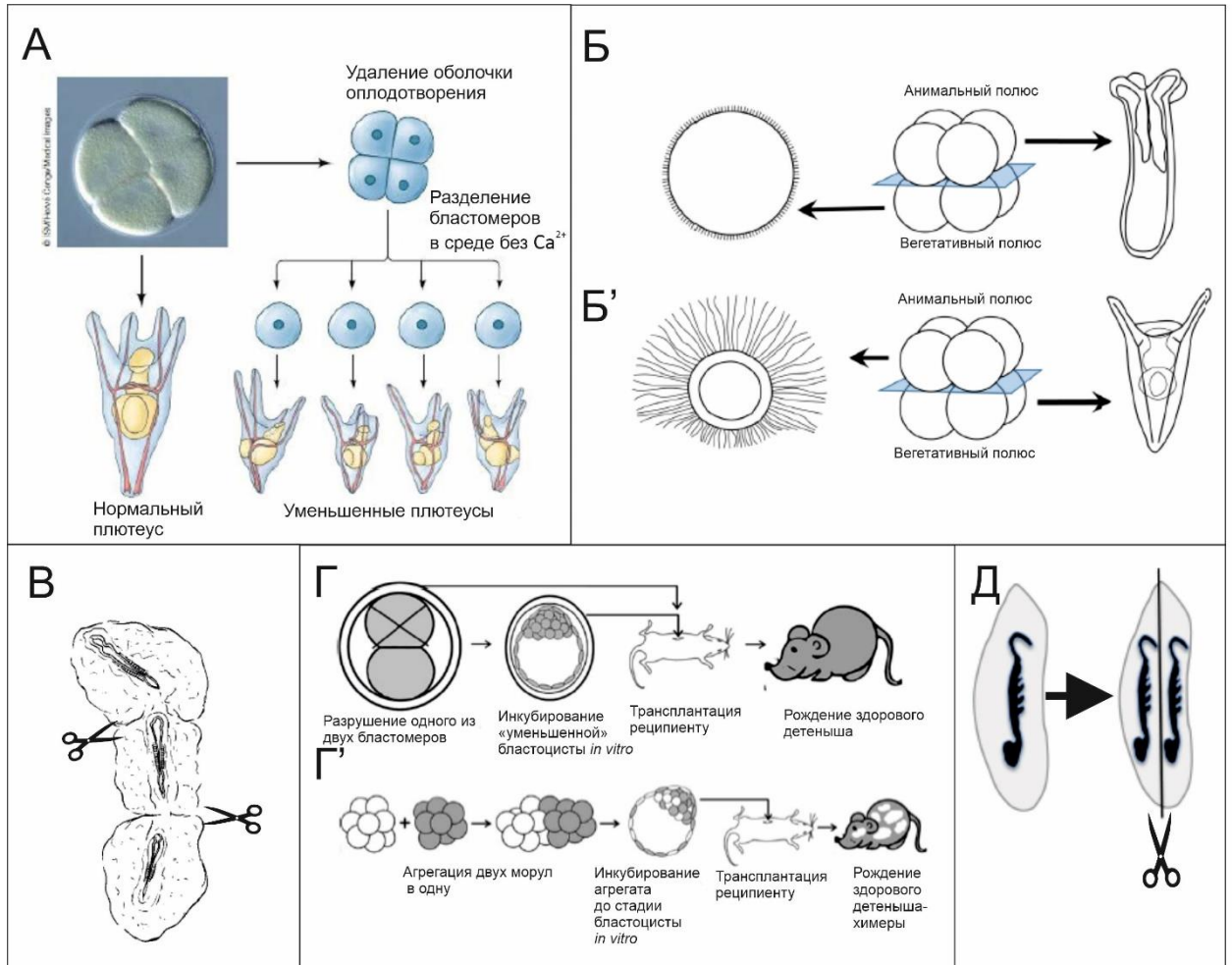


Рис. 2. Примеры эмбриональных регуляций (из Barresi, Gilbert, 2020; Meinhardt, 2008; Monti, 2014; Sachs et al., 2015; Genikhovich, Technau, 2017, с изм.).

(А) Опыт Г. Дриша по разделению бластомеров эмбриона морского ежа. (Б, Б') Сокращение регуляционных потенций эмбриона в ходе дробления из-за неравномерного распределения цитоплазматических детерминантов при дроблении. К регуляции способна лишь та часть эмбриона, которая содержит материал для формирования blastopore organizer: анимальный квартет бластомеров у нематостеллы (Б), и вегетативный у морского ежа (Б'). (В) Высокая степень регуляции у куриного эмбриона: при разрезании эмбриона даже более, чем на 2 части из получаемых фрагментов образуется уменьшенный эмбрион. (Г, Г') Регуляция у млекопитающих на примере мышинового эмбриона: полноценный эмбрион может быть получен как из одного из ранних бластомеров (Г), так и при слиянии двух и более эмбрионов в единый эмбрион-химеру (Г'). (Д) Пример высокой степени регуляции у первичноротых на примере развития разделенной дорсальной и вентральной половины эмбриона цикады.

Создавшееся противоречие между опытом Дриша и Ру – каким же образом развиваются эмбрионы: мозаично или регуляционно – было преодолено в опыте будущего генетика Томаса Ханта Моргана на эмбрионах амфибий: вместо того, чтобы разрушать один из бластомеров, Морган аккуратно удалял его (Morgan, 1895). Таким образом ему

удалось избежать образования обширной раневой поверхности, препятствующей эмбриональной регуляции. Скорее всего, как было продемонстрировано в позднейших работах на эмбрионах амфибий, для успешной переразметки уменьшенного эмбриона необходимо восстановление целостности эмбрионального эпителия (Kageura, Yamana, 1983). В этой связи стоит дополнительно заметить, что данное условие может не требоваться для успешной переразметки эмбриона морского ежа, поскольку при повторении опыта Ру с разрушением одного из бластомеров на эмбрионах *Lytechinus pictus* из выжившего бластомера развивались нормальные уменьшенные личинки (Khaner, 1993). С другой стороны, было показано, что половинные зародыши развиваются сначала как полу-бластулы (что и было продемонстрировано в работе Khaner, 1993), имеющие открытый бластоцель, который затем «схлопывается», образуя нормальную уменьшенную бластулу, имеющую интактный эпителий (Driesch, 1891; Шмуклер и др., 1981). Так что и в случае развития половинных зародышей морского ежа может требоваться интактный эпителий на стадии бластулы. К сожалению, процесс развития бластулы в работе Khaner (1993) до предполагаемого «схлопывания» и отделения её от мертвого бластомера не был задокументирован.

6.2. Регуляционный и мозаичный тип развития животных.

Несмотря на то, что гипотеза Ру была экспериментально опровергнута на моделях амфибии и морского ежа, наличие мозаицизма в развитии животных было подтверждено во многих других случаях, несмотря на неудачный опыт Ру. Опыты Шабри, демонстрирующие мозаичное развитие асцидий, были впоследствии воспроизведены Конклином (Conklin, 1905). Эти опыты, однако, как и опыт Ру, имели существенный недостаток – развивающаяся часть зародыша оставалась прикреплена к мембране разрушенного бластомера, что могло мешать регуляции. Однако, Беррилл в опытах по разделению левого и правого бластомера асцидии подтвердил выводы Шабри и Конклина: из двух первых разделенных бластомеров развивались аномальные личинки без признаков регуляции паттерна. (Berrill, 1932).

Кроме асцидий, начиная с самых ранних этапов развития, мозаицизм был преимущественно обнаружен у первичноротых животных. Например, Вильсон в 1904 году на примере эмбриона брюхоногого моллюска *Patella coerulea* показал, что изолированные клетки проспективного трохобласта развивались именно в ту структуру, которая

образовывалась в интактном эмбрионе, демонстрируя этим яркий пример мозаичного развития (Wilson, 1904; Гилберт, 1994). Но наиболее известным примером мозаицизма, как принято считать, является развитие нематоды *Caenorhabditis elegans*. Развитие каждой ее клетки от оплодотворения и до стадии взрослого организма строго детерминировано, и судьба каждой эмбриональной клетки одинакова у всех личинок, так что оказалось возможным картировать судьбу каждой из 959 ее соматических клеток (Sulston et al., 1983, Lawrence, Levine, 2006; Martinez Arias et al., 2013).

Вторичноротые животные, за исключением, очевидно, оболочников, в свою очередь демонстрировали явное преобладание регуляционного развития (Wilson, 1893; Lawrence & Levine, 2006; Martinez Arias et al., 2013). Кроме того, высокая регуляционная способность была показана для эмбрионов книдарий (Sánchez Alvarado, 2008; Fritzenwanker et al., 2007; Lee et al., 2007). Однако, полная регуляция паттерна в эмбрионах вторичноротых и книдарий все равно происходит только на самых ранних стадиях дробления – на стадии нескольких бластомеров. Разделение эмбрионов морского ежа на стадии 8-и бластомеров уже приводит к формированию слабо дифференцированных аномальных эмбрионов из 4-х анимальных бластомеров (т.н. *dauerblastula* (нем.)– «задержанная бластула») и почти правильно сложенных личинок из четверки вентральных бластомеров (Рис. 2 Б; Hörstadius, 1973; Гилберт, 1994). Похожий результат, за исключением того, что регуляция происходила в анимальных бластомерах, получен на модели книдарии *Nematostella vectensis* (Рис. 2 Б'; Fritzenwanker et al., 2007; Lee et al., 2007). Такой результат связан с тем, что для подавляющего числа животных характерно неравномерное распределение цитоплазматических детерминантов в ооцитах, возникающее в процессе их созревания, и/или вследствие процессов, инициируемых оплодотворением (Gerhart et al., 1989; Angerer, Angerer, 2000; Gardner, 2001; Lee et al., 2007; Lemaire et al., 2009). Например, у эмбриона морского ежа цитоплазматические детерминанты неравномерно распределены вдоль анимально-вегетативной оси. После оплодотворения такая анизотропия яйца приводит к накоплению транскрипционного фактора бета-катенина на вегетативной стороне эмбриона (Weitzel et al., 2004). Накопление бета-катенина на одной из сторон зародыша необходимо для формирования бластопора у гаструл большинства типов животных, наличие которого необходимо для формирования осей зародыша и его паттернинга (Kraus et al., 2016; Loh et al., 2016). Третье деление дробления эмбриона морского ежа проходит перпендикулярно анимально-вегетативной оси, что приводит к тому, что в анимальном квартете бластомеров не оказывается зоны будущего формирования бластопора, и такие эмбрионы будут

развиваться аномально. Та же причина лежит в основе появления мозаицизма для вегетативных бластомеров нематостеллы – аккумулярование бета-катенина происходит в анимальных бластомерах (Lee et al., 2007). Таким образом, развитие животных, принятое считать регуляционным, чаще всего совмещает черты регуляционного и мозаичного развития.

Экстремальным исключением из этого правила можно считать развитие млекопитающих и птиц (по крайней мере, изученных видов). Например, куриный эмбрион можно разрезать на 4 части, и из каждой части образуется нормальный зародыш, вне зависимости от ориентации разреза и наличия зачатка организатора (Рис 2, В; см. обзор Meinhardt, 2008; Moriyama, De Robertis, 2018). О высокой степени регуляционной способности эмбрионов млекопитающих свидетельствуют, во-первых, наблюдения о естественно рождающихся однойцевых близнецах у различных видов (один из ярких примеров – облигатная полиэмбриония девятипоясного броненосца, у которого из единой зиготы образуется 4 эмбриона; Carter, 2018); а также эксперименты по разделению ранних бластомеров (Рис. 2 Г) и созданию химерных эмбрионов: агрегация клеток двух или более эмбрионов в один приводит к хаотичному нарушению структуры будущего эмбриона, и, тем не менее, такое вмешательство с высокой вероятностью приводит к рождению правильно сложенного организма нормального размера (Рис. 2 Г'; Tarkowski, 1961, 1963, 1998; Minz, 1962; из обзора Suwińska, 2012). При этом регуляция размера эмбриона происходит уже в начале гастрюляции (Rands, 1986; Power, Tam, 1993; из обзора Martinez Arias et al., 2013).

При искусственном разделении бластомеров мыши, однако, удастся получить, хотя с низкой эффективностью, жизнеспособное потомство только из первых двух разделенных бластомеров (Mullen et al., 1970; Tsunoda, McLaren, 1983), а из первых 4-х разделенных бластомеров ни в одном случае не удастся получить жизнеспособное потомство (Rossant, 1976). Было предположено, что такая низкая регуляционная способность уже первых бластомеров мыши связана с тем, что при уменьшении размера бластоцисты мыши до критического размера количества клеток во внутренней клеточной массе (ВКМ) становится недостаточно для нормального развития (Rossant, 1976; Morris et al., 2012). Это предположение подтверждается опытами на других видах млекопитающих, имеющих больший диаметр зиготы и, соответственно, достаточно большое количество клеток во ВКМ: жизнеспособное потомство было получено из отдельных бластомеров 8-и клеточных эмбрионов у кролика (Moore et al., 1968; хотя в этой работе все же не был поставлен вопрос – все ли 8 бластомеров в одном эмбрионе кролика могут нормально

развиваться?); все 4 разделенные пары бластомеров 8-и клеточных эмбрионов овцы могут давать жизнеспособное потомство (Willadsen, 1981), причем разделенные бластомеры на 8-клеточной стадии развивались преимущественно в трофэктодерму, не содержащую ВКМ, что подтверждает критическую важность стерического фактора (в данном случае количества клеток) для успешной регуляции у млекопитающих (хотя в отдельных случаях также были получены ягнята из бластомеров 8-и клеточной стадии).

Наличие фактора, ограничивающего развитие уменьшенных зародышей млекопитающих, однако, не говорит о начавшейся детерминации судьбы бластомеров. То, что даже на более поздних стадиях отдельные бластомеры сохраняют способность восстанавливать план развития всего организма, было продемонстрировано в опытах по т.н. тетраплоидной комплементации: отдельные бластомеры (диплоидные) агрегировались вместе с тетраплоидными клетками. Полученная химера имеет уже достаточное количество клеток для нормального развития, в отличие от уменьшенного эмбриона. В процессе развития такой химеры тетраплоидные клетки вытесняются во внеэмбриональные структуры (James, et al., 1995), а эмбрион развивается исключительно из клеток диплоидного бластомера. С помощью подобных опытов было показано, что даже на 16-клеточной стадии каждый бластомер эмбриона мыши способен развиться в живой зародыш (Tarkowski et al., 2005; 2010). Однако, несмотря на высокий регуляционный потенциал бластомеров мыши на поздних стадиях, было показано, что уже на стадии 4-х бластомеров бластомеры, располагающиеся на вегетативном полюсе эмбриона, имеют существенно сниженный потенциал к успешной регуляции (Piotrowska-Nitsche et al., 2005). И, несмотря на то, что по-видимому в ооплазме яйцеклеток мыши нет дифференциально распределенных молекулярных детерминантов (в данном случае вдоль анимально-вегетативной оси) (Evsikov et al., 1994), оси, задаваемые расположением второго полярного тельца и местом проникновения сперматозоида, или же вовсе формой яйцеклетки, могут формировать систему координат позиционной информации (Wolpert, 2016), опираясь на которую происходит развитие тех или иных эмбриональных структур. Хотя необходимо отметить, что данные о наличии осей позиционной информации в эмбрионах млекопитающих крайне противоречивы: разные группы исследователей получали противоположные результаты на этот счет (см. обзор Suwińska, 2012).

Если регуляционное развитие ранних эмбрионов у многих групп вторичноротых животных на деле оказывается смешанным, регуляционно-детерминированным, с разным преобладанием регуляционного и детерминационного компонента у разных групп животных и на разных стадиях развития, то стоит выяснить, есть ли, согласно

накопленным данным, признаки регуляционного развития и у «мозаичных» животных? Действительно, представление о развитии определенных групп животных как «мозаичное» и «регуляционное» возникло во многом из отдельных, «классических», экспериментов, которые известны из учебников (Lawrence, Levine, 2006). Например, как было замечено ранее, развитие асцидий строго мозаично (см. выше). Однако, это верно лишь для уже оплодотворенного развивающегося зародыша: при разделении ооцита надвое и оплодотворении двух получившихся его половин (т.н. мерогонов), так что образуется одна диплоидная и одна гаплоидная мини-зигота, происходит развитие двух уменьшенных правильных личинок. Иными словами, эмбрионы асцидии способны к регуляции, но только до оплодотворения, которое вызывает необратимую детерминацию развития обоих бластомеров (Reverberi, Ortolani, 1962). Кроме асцидий строгий мозаицизм раннего развития показан также для гребневиков: разделенные бластомеры всегда развиваются в половинчатых особей. Однако взрослые особи становятся способны к регенерации утраченной половины при разрезании тела надвое (Martindale, 1986).

В кладе первичноротых животных, традиционно также считающихся мозаично развивающимися, представленность регуляционного и детерминированного компонента в развитии также может значительно варьировать в разных группах. Например, в кладе *Ecdyozoa* у насекомых наблюдается восстановление (чаще частичное, чем полное) паттерна передне-задней разметки эмбриона после наложения лигатуры во фронтальной плоскости посередине личинки (Sander, 1976). Из-за веретеновидной формы эмбрионов насекомых наложение лигатуры в передне-задней плоскости (для проверки регуляторной способности дорзо-вентральной разметки, соответственно) представляется крайне трудоемким. Однако, в опытах на эмбрионах цикады *Euscelis plebejus* Клаусу Зандеру удалось наложить лигатуру вдоль эмбриона: в сагиттальной и фронтальной плоскостях (Рис. 2, Д). Из обеих образующихся половин развивались уменьшенные пропорциональные личинки вне зависимости от плоскости наложения лигатуры (Sander, 1971) – пример крайне выраженного регуляционного развития.

Еще одним наглядным примером ранней регуляции у *Ecdyozoa* являются опыты по разрезанию эмбрионов пауков и мечехвостов (см. обзор Oda et al., 2020). Также ранняя эмбриональная регуляция наблюдалась в опытах по разделению первых бластомеров у эмбрионов раков, для которых характерно голобластическое дробление (у балянуса; Kajishima, 1951), а также при удалении отдельных бластомеров на стадии 8 клеток (у креветки *Parhyale hawaiensis*; Price et al., 2010). Однако, у других ракообразных регуляционный потенциал первых двух бластомеров сильно ограничен: у креветки

Sicyonia ingentis аномальная уменьшенная личинка образуется только из бластомера-предшественника мезендодермы (Hertzler, 1994). Кроме ракообразных и насекомых, также был изучен регуляционный потенциал нематод. Если для *C. elegans* показан, как уже было замечено, крайний мозаицизм развития, то в развитии нематоды *Acrobeloides nanus* дифференцировка некоторых бластомеров на ранних стадиях развития имеет регуляционный характер: при удалении бластомера АВ его проспективное значение принимает бластомер EMS. Бластомер С, в свою очередь принимает часть проспективного значения бластомера EMS. В другом эксперименте удалялся бластомер EMS. При этом бластомер С трансформируется в EMS-подобную клетку, а бластомер D принимает проспективные значения бластомера С (авторы работы отмечают, что концептуально последний эксперимент воспроизводит эксперименты Хёрстадиуса (см. далее) по удалению центральной части эмбриона, и получению нормальных уменьшенных личинок морского ежа, что является еще одним наглядным примером высокой регуляционной способности вторичноротых; Hörstadius, 1974). В результате этих регуляционных экспериментов удавалось получить нормальные уменьшенные личинки, и в отдельных случаях удавалось получить фертильные особи. При повторении же подобного опыта на модели *C. elegans* никогда не удавалось получить уменьшенные личинки (Wiegner, Schierenberg, 1999).

Второй большой кладой первичноротых животных являются спиралии. Развитие спиралей обычно считается крайне детерминированным уже на начале дробления (Гилберт, 1994). Однако, накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о присутствии регуляционного развития у спиралей (Martindale, Henry, 1995). У неравно (гетероквадрантно) дробящихся спиралей, для которых характерно перемещение цитоплазматических детерминантов в бластомер CD, определяющих впоследствии формирование дорсального организатора спиралей из потомства бластомера D, регуляционной способностью обладает бластомер CD. Причем если у некоторых аннелид, например, у *Tubifex rivulorum*, бластомер CD способен почти полностью восстанавливать изначальный паттерн личинки (Penners, 1926), то у эмбрионов моллюсков регуляция бластомера CD происходит лишь частично (Clement, 1956). У моллюсков с равным (гомоквадрантным) дроблением первых 4 бластомеров, у которых детерминация дорсального организатора происходит стохастически (кондиционно) путем взаимодействия микромеров и макромеров после пятого деления дробления, регуляционный потенциал эмбрионов также очень низок и наблюдался лишь у единичных эмбрионов, несмотря на отсутствие перемещения детерминантов к одному из бластомеров

(Martindale et al., 1985). В данном случае, как и в развитии эмбрионов мыши, ограничение на регуляцию эмбриона может накладывать пространственный фактор: те редкие бластомеры, которые восстанавливали изначальный паттерн дробления интактного эмбриона, получали способность к регуляции. Видимо, для индукции дорсального организатора у таких спиралей необходимо правильное взаиморасположение бластомеров (Martindale, Henry, 1995). Среди опытов по исследованию регуляционной способности отдельных бластомеров спиралей выделяются опыты на немертине *Cerebratulus lacteus*. Авторами было показано, что разделенные первые два бластомера *C. lacteus* успешно развивались до личиночной стадии, а дорсальные бластомеры, полученные на стадии 4-х клеток, имели признаки регуляции паттерна (Martindale, Henry, 1995). Авторы связывают повышенный по сравнению с другими спиральями (в т.ч. другими видами немертин) регуляционный потенциал *C. lacteus* с иным, чем у других спиралей, механизмом дорзо-вентральной разметки, который должен включать ингибирование дорсальной программы развития в вентральных бластомерах дорсальными бластомерами, а также с тем, что дорсальные детерминанты, формирующие затем организатор, разделяются поровну между двумя дорсальными бластомерами, а не одним D-бластомером, как у других спиралей. Разделение дорсальных детерминантов между двумя бластомерами позволяет развиваться двум разделенным бластомерам, а не одному (CD), как в случае других спиралей. Интересно, что в той же работе авторы показали, что другой вид немертины *Nemertopsis bivittata* обладал гораздо более скромными регуляционными потенциалами. Авторы связывают это с разными жизненными стратегиями этих двух видов: *C. lacteus* имеет не прямое развитие с личиночной стадией, а *N. bivittata* имеет прямое развитие. Видимо, отбор при прямом развитии направлен на ускорение детерминации тканей, входящих во взрослый организм, а при не прямом развитии отбор будет направлен на сохранение регуляционного потенциала личиночных тканей (Martindale, Henry, 1995).

Обзор экспериментальных данных, касающихся эмбриональной регуляции у животных, показывает, что регуляционный потенциал даже внутри достаточно близкородственных групп животных весьма различен, и характерен не только для вторичноротых, но также и для «мозаичных» первичноротых. Это различие может быть связано с рядом причин. Во-первых, различной жизненной стратегией видов. По-видимому, регуляционный потенциал животных с прямым развитием как правило ниже, чем с непрямым (см. выше). Например, морской еж с прямым развитием *Heliocidaris erythrogramma* имеет ограниченный регуляционный потенциал первых 2-х бластомеров по сравнению с близкородственным видом *Heliocidaris tuberculata*, у которого развитие не прямое (Henry, Raff, 1990). Во-вторых, регуляционный потенциал может быть

ограничен направлением клеточных делений, если их плоскость пересекает градиенты эмбриональных детерминантов. Наиболее яркими примерами здесь могут быть амфибии, где после второго деления дорсальные детерминанты оказываются исключительно в двух дорсальных бластомерах, и при разделении эмбриона вдоль борозды второго деления регуляция происходит только в дорсальной половине эмбриона (Spemann, 1938; Cooke, Webber, 1985a); а также большинство спиралей, где дорсальные детерминанты уже после первого деления локализуются в CD-бластомере, к которому переходит весь регуляционный потенциал зародыша (см. выше). Интересно, что если с помощью сдавливания сместить борозду первого деления так, чтобы детерминанты разделились между первыми двумя бластомерами, то при разделении таких «уровненных» бластомеров происходит регуляционное развитие маленьких зародышей (Titlebaum, 1928; Tyler, 1930; из Henry, Martindale, 1987). В-третьих, у эмбрионов, имеющих стохастический тип дифференцировки, таких как млекопитающие или спирали с гомоквадрантным дроблением (Zernicka-Goetz, Huang, 2010), даже несмотря на отсутствие цитоплазматических детерминантов, которые могут ограничивать регуляцию, регуляция может быть ограничена пространственными факторами, такими как необходимость наличия хотя бы 4 клеток ВКМ в бластоцисте мыши для нормального развития (Morris et al., 2012), или же необходимость интактного паттерна дробления для регуляционного развития бластомеров спиралей (см. выше). У млекопитающих, как было предположено, переход к выраженному регуляционному развитию связывают с переходом к внутриутробному вынашиванию: спецификация трофэктодермы и ВКМ происходит на стадии, когда эмбрион состоит из достаточно большого количества клеток, чтобы минимизировать риск потери эмбриона. Предполагается, что регулятивный потенциал в этом случае осуществляется через слабую экспрессию всеми клетками зародыша факторов первичной дифференцировки и последующей рестрикцией экспрессии факторов дифференцировки в определенных клетках за счет воздействия на эти наивные клетки глобальных химических (напр. Fgf- и Wnt-каскады; Morris et al., 2012) и механических (напр. механочувствительный Hippo-каскад) стимулов (Martinez Arias, 2013; Zhu et al., 2020).

6.3. Открытие эмбриональных индукций. Опыты Хёрстадиуса и Шемана.

6.3.1. Опыты Хёрстадиуса: эмбрион как саморегулирующаяся система далекодействующих сигналов.

Если принцип мозаичного развития должен быть основан на сегрегации неких ядерных или цитоплазматических детерминантов между клетками, то регуляционное взаимодействие должно быть основано на способности клеток воспринимать и передавать межклеточные сигналы. При этом для того, чтобы система клеток, составляющая эмбрион, была способна реагировать на глобальные изменения архитектуры эмбриона, клетки должны обладать информацией о состоянии клеток на большом расстоянии, чтобы модифицировать свое развитие и морфогенез. Таким образом, клетки эмбриона должны образовывать *саморегулирующееся морфогенетическое поле* (Harrison, 1918; De Robertis et al., 1991; De Robertis, 2009).

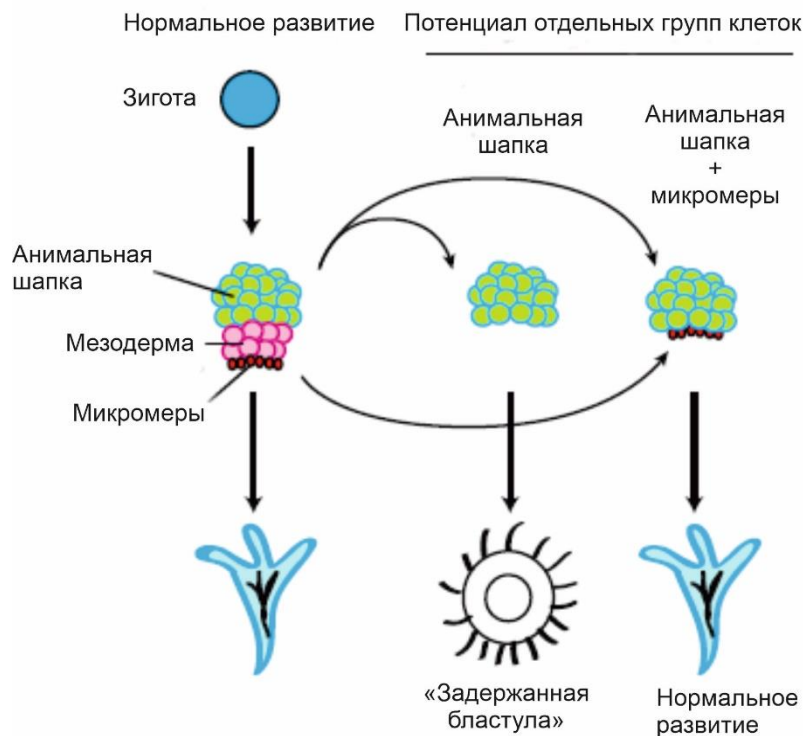


Рис. 3. Опыт С. Хёрстадиуса по инкубации анимальных эксплантатов эмбрионов морского ежа с микромерами (из Martinez Arias et al., 2013, с изм.).

Важным этапом в исследовании эмбриона как саморегулирующегося морфогенетического поля стали опыты Свена Хёрстадиуса на эмбрионах морского ежа (Рис. 3; Hörstadius, 1973; Гилберт, 1994; Martinez Arias et al. 2013). Ему удалось разделить зародыш на стадии 64 бластомеров на слои клеток вдоль анимально-вегетативной оси. Затем анимальная половина зародыша, из которой в нормальном развитии зазывается эктодерма, ко-инкубировались с клетками вегетативной половины эмбриона, из которых развивается энтодерма и часть мезодермы, или с микромерами – самыми вегетативными клетками, из которых образуется скелет плютеуса. Оказалось, что инкубирование только анимальной шапки приводит к образованию атипичного реснитчатого эпителия («задержанная бластула»), но совмещение анимальной шапки с микромерами или нижним слоем вегетативных клеток приводит к формированию нормальных уменьшенных зародышей (совмещение анимальной шапки с верхним рядом вегетативных клеток приводило лишь к частичной переразметке эксплантатов). Эти эксперименты наглядно продемонстрировали, что клетки зародыша способны чувствовать изменения структуры целого эмбриона на расстоянии, и модифицировать свою дифференцировку. Причем в вегетативной части зародыша имеется источник некоего «морфогена», создающего саморегулирующийся градиент, который воспринимают клетки морфогенетического поля.

6.3.2. Опыты Шпемана и Мангольд. Эмбриональный организатор как источник далекодействующих саморегулирующихся сигналов.

Незадолго до работ Хёрстадиуса на вопрос о природе далекодействующей сигнализации между эмбриональными клетками попытался ответить знаменитый немецкий эмбриолог Ганс Шпеман. Еще в 1903 году он заметил, что наложение лигатуры из детского волоса на эмбрион амфибии в разных плоскостях приводит к различным результатам (Spemann, 1903; из Sander, Faessler, 2001). Если лигатура накладывалась в сагиттальной плоскости, то есть в плоскости первого деления дробления, разделяющего эмбрион на левую и правую сторону, то из получившихся пузырьков образовывались нормальные близнецы (Рис. 4, А). Если же лигатура накладывалась перпендикулярно, в трансверсальной плоскости, совпадающей с бороздой второго деления-дробления, и которая разделяет эмбрион на дорсальную и вентральную плоскости, то из вентральной половины образовывался пузырек, состоящий из слабо дифференцированной, вентрализованной ткани (нем. *Bauchstück* – «кусочек живота»), а из дорсальной половины развивался вполне пропорционально сложенный эмбрион (Рис 4, Б).

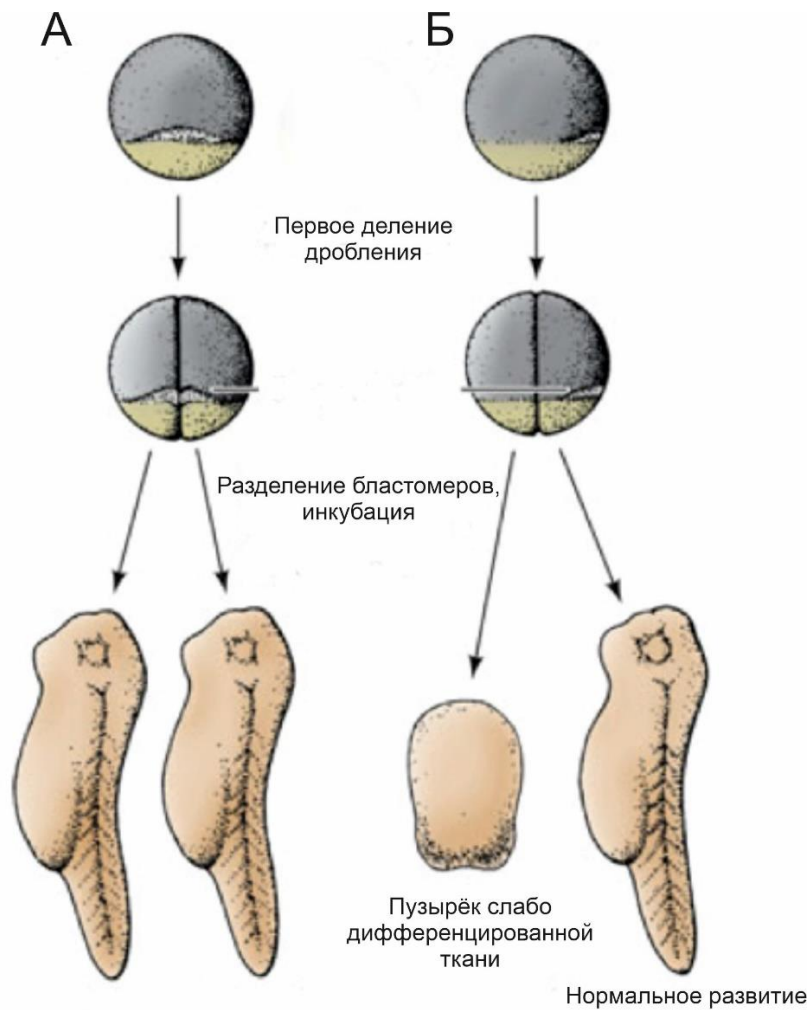


Рис. 4. Опыт Г. Шпемана по накладыванию лигатуры на эмбрион в двух плоскостях (из Gilbert, 2010, с изм.).

(А) Наложение лигатуры в сагиттальной плоскости. (Б) Наложение лигатуры во фронтальной плоскости.

Интересно, что в той половине, в которой происходила эмбриональная регуляция, располагается «серый серп» -- область кортикальной цитоплазмы, образующаяся в результате смещения кортекса яйца после входа в него сперматозоида (Gerhart et al., 1989). В зоне «серого серпа» инициируется закладка дорсальной стороны зародыша, и в этой зоне начинается процесс гастрюляции – закладывается дорсальная губа бластопора. Видимо, именно в этой зоне содержатся некие детерминанты, запускающие и руководящие процессом эмбриональной разметки. Последовавшие эксперименты Шпемана по пересадкам различных участков гастрюлы тритона в новые локации подтвердили особое значение дорсальной губы в развитии: основываясь на опыте Льюиса (1908), который совершил первый опыт по пересадке дорсальной губы бластопора на

вентральную сторону нейрулы лягушки и наблюдал формирование вторичной оси, Шпеман совершил трансплантацию губы бластопора на вентральную сторону на более подходящей стадии развития – гастрале тритона и также наблюдал формирование вторичной оси. При этом любой другой фрагмент гастралы при пересадке в новое место принимал клеточную судьбу своего окружения, то есть, состоял из наивных клеток, не способных к самодифференцировке. На тот момент Шпеман, как и Льюис, видели в формировании вторичной оси при пересадке дорсальной губы бластопора только процесс самодифференцировки, не подозревая о индукционном воздействии трансплантата, поскольку в то время считалось, что нервная пластинка у амфибий формируется из самой дорсальной губы бластопора (а не более анимальной эктодермы), поэтому, как тогда казалось исследователям, при пересадке дорсальной губы бластопора нервная пластинка развивается автономно из тканей донора, а не индуцируется подворачивающейся губой бластопора (Sander, Faessler, 2001; Gerhart, 2001). Кроме того, Шпеман не мог различить ткани донора и реципиента, поскольку использовал эмбрионы одного цвета. Однако, Шпеман, изучавший также процесс индукции хрусталика в эпидермисе глазным пузырьком, все же предполагал, что дорсальная губа бластопора может быть источником индукционного воздействия (Spemann, 1918; из Gerhart, 2001).

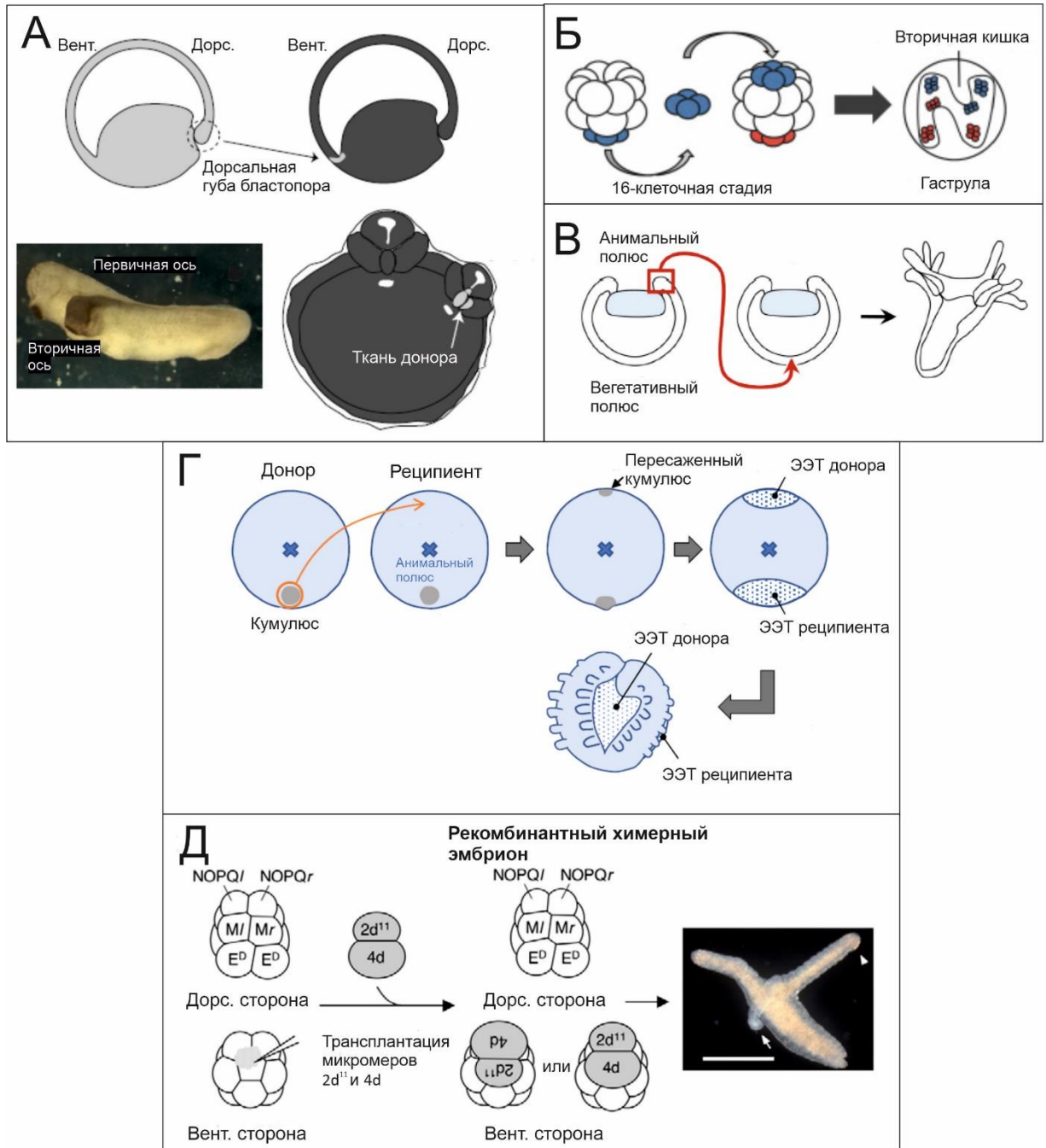


Рис. 5. Опыт Шемана-Мангольд и распространённость шемановских индукций в животном царстве (из Nakamoto et al., 2011; Houston, 2017; Oda et al., 2020; Emura, Yajima, 2022, с изм.)

(А) Схема опыта Шемана-Мангольд. (Б) Трансплантация микромеров морского ежа на анимальный полюс вызывает формирование второй анимально-вегетативной оси. (В) Пересадка губы бластопора у *N. vectensis* на аборальный полюс вызывает формирование второй орально-аборальной оси. (Г) Пересадка зачатка экстраэмбриональной ткани (кумулюса) на вентральную сторону у паука вызывает формирование вторичной передне-задней оси. ЭЭТ – экстраэмбриональная ткань. (Д) Пересадка клеток организатора спиралей (бластомеры 4d и 2d¹¹) с дорсальной стороны на вентральную предположительно индуцирует формирование вторичной оси.

Дальнейшие опыты по изучению свойств дорсальной губы бластопора были поручены аспирантке Шпемана Хильде Мангольд, осуществившей знаменитый опыт по пересадке дорсальной губы бластопора ранней гастролы тритона на вентральную часть зародыша-реципиента (Рис. 5, А; Spemann, Mangold, 1924). Для отслеживания клеточной судьбы пересаженной ткани использовали близкородственные виды тритонов, различающиеся пигментацией. При этом пересаженная ткань не принимала клеточную судьбу окружающей ткани реципиента, как происходило бы при пересадке любой другой области зародыша, но индуцировала развитие полноценного «сиамского» зародыша на вентральной стороне. При этом пересаженная ткань образовывала преимущественно осевую мезодерму, а образование нейроэктодермы и сомитной мезодермы индуцировалось пересаженной губой бластопора из окружающих тканей реципиента (Гилберт, 1994; Sander, Faessler, 2001; De Robertis, 2009). Наиболее важным свойством обнаруженного организатора является то, что он способен к индукции осевой ткани на расстоянии с помощью выделяемых во внеклеточное пространство факторов; причем эта индукция обладает свойством саморегуляции, поскольку при пересадке шпемановского организатора на вентральную сторону происходит формирование двух уменьшенных эмбрионов из одного, и, следовательно, с некоторыми допущениями такая регуляция сходна с регуляцией при уменьшении эмбриона, рассмотренная выше (Gerhart, 2001; De Robertis, 2009; Lapraz et al., 2015). Таким образом, шпемановский организатор является источником дальнедействующей сигнализации, создающей глобальное саморегулирующееся морфогенетическое поле в эмбрионе.

6.3.3. Распространенность шпемановских индукций среди вторичноротых.

Вскоре было показано, что гомологичные дорсальной губе бластопора амфибий структуры у других классов позвоночных (гензеновский узелок у амниот и щиток у костистых рыб) обладают сходной организующей способностью, а ксенотрансплантации организатора между классами позвоночных подтвердили гомологию и функциональную консервативность этих структур (см. обзоры Anderson, Stern, 2016; Kumar et al., 2021).

Поскольку шпемановский организатор представляет собой структуру, секретирующую факторы, обеспечивающие разметку всего эмбриона, и при этом объединяющие его в саморегулирующееся морфогенетическое поле (Gerhart, 2001; De Robertis, 2009), то можно ожидать, что эмбрионы прочих типов животных, способные к саморегуляции, также имеют подобные шпемановскому организатору структуры.

Косвенным подтверждением этого предположения может являться практически полное отсутствие дальнедействующей межклеточной сигнализации в развитии мозаичных эмбрионов оболочников и нематод (Nishida, 2005; Maduro, 2010). Например, недавно было показано, что вентральная сторона эмбрионов морского ежа, соответствующая дорсальной стороне эмбрионов позвоночных, с высокой степенью достоверности гомологична шпемановскому организатору позвоночных: в этой области секретруется специфичные для организатора лиганды *Chordin*, *Nodal* и *ADMP1*, необходимые для разметки и саморегуляции дорзо-вентральной оси (Xu et al., 2014; Reversade, De Robertis, 2005), а также экспрессируется ряд транскрипционных факторов, участвующих в генно-регуляторной сети шпемановского организатора: *gooseoid*, *HNF3b/foxA*, *not*, *lim1* (Lapraz et al., 2015). Кроме того, индукцию вторичной орально-аборальной оси вызывает пересадка микромеров, располагающихся на вегетативном полюсе эмбриона-будущей зоны бластопора (Рис. 5 Б; Ransick, Davidson, 1993). При этом в микромерах была замечена высокая активность Wnt-каскада, что характерно для зоны формирования будущего организатора (Logan et al., 1999) (функцию микромеров можно сравнить с функцией раннего ньюкуповского центра у амфибий (см. далее), который называют «организатор организатора», или бластульным организатором. См. Gerhart, 2001).

Однако еще ближе к основанию филогенетического древа животных помещают появление шпемановского организатора работы на книдариях (сестринской к билатериям группы животных): у гастролы нематостеллы пересадка губы бластопора в аборальную область приводит к индукции вторичной орально-аборальной оси (Рис. 5 В; Kraus et al., 2007). Более того, пересадка оральной области (гипостома) взрослой гидры в аборальную область реципиента также вызывает индукцию дополнительной орально-аборальной оси – эксперимент, осуществленный Этель Браун задолго до экспериментов Шпемана и Мангольд (Browne, 1901). В обоих случаях при этом требуется высокая активность Wnt-каскада в трансплантате, так же, как и в случае организатора позвоночных (Kraus et al., 2016). Исходя из вышеизложенного, можно утверждать, что структуры, ассоциированные с бластопором, проявляющие в той или иной степени свойства эмбрионального организатора (т.н. «аксиальный организатор»), появились уже у книдарий, а утрата организатора в ходе эволюции происходила, видимо, независимо в разных кладах. Например, у дрозофилы в ходе эволюции и формирования эмбриоадаптаций закладка дорзо-вентральной и передне-задней осей, а также первичный паттернинг зародыша, происходит в процессе созревания ооцита, а не вследствие формирования организатора

(хотя все же нельзя исключать наличие организатора у насекомых на более поздних стадиях развития, см. Sander, 1976).

6.3.4. Аналогичные шпемановскому организатору структуры у первичноротых.

Однако у пауков, для которых, как и для насекомых, также характерно формирование синцития на начальных этапах развития – который, однако, быстро целлюляризуется – область кумулюса (утолщение мезодермальных клеток на анимальной шапочке эмбриона, в процессе развития перемещающаяся на проспективную дорсальную сторону эмбриона), выполняет роль эмбрионального организатора, формирующего дорзо-вентральную полярность эмбриона за счет активности BMP-каскада, что дает основание рассматривать кумулюс функциональным аналогом шпемановского организатора (т.н. организатор Хольма; Рис. 5, Г; см. обзор Oda et al., 2020). Хольм рассматривал кумулюс пауков как эмбриональный орган, очень похожий по свойствам на шпемановский организатор. Хотя сейчас ясно, что эти органы скорее всего не гомологичны: клетки кумулюса в дальнейшем становятся частью внеэмбриональных структур, тогда как аксиальный/шпемановский организатор расположен в эмбрионе в области бластопора; организатор Хольма маркирует дорсальную сторону эмбриона паука, которая гомологична вентральной стороне позвоночных – вентральному центру, который противолежит шпемановскому организатору у позвоночных (Arendt, Nübler-Jung, 1994; De Robertis, Tejada-Muñoz, 2022). Наконец, молекулярный механизм действия организатора Хольма противоположен шпемановскому организатору и основан на секреции BMP-лигандов, а не их антагонистов, как в случае шпемановского организатора (Akiyama-Oda, Oda, 2003; 2006).

У большой клады спирально дробящихся животных также обнаруживают наличие эмбрионального центра, по своим функциям сходного с шпемановским организатором – потомство клеток бластомера D. У гетероквадрантно дробящихся спиралей в цитоплазму бластомера CD, а затем бластомера D попадает содержимое полярной лопасти, ответственное за индукцию организатора спиралей и формирования за счет его функционирования дорзо-вентральной полярности эмбриона (Гилберт, 1994). При искусственно вызванном равномерном перераспределении содержимого полярной лопасти между первыми двумя бластомерами AB и CD происходит индукция вторичной

оси у эмбриона (Henry et al., 2017) – эффект, сходный с индукцией вторичной оси при пересадке шпемановского организатора. Удаление же организатора приводит к радиализации эмбриона (Nakamoto et al., 2011). Кроме того, было показано, что пересадка микромеров 2d¹¹ и 4d (потомство бластомера D) у полихеты *Tubifex tubifex* приводит к формированию второй оси у реципиента (Рис. 4 Д; Nakamoto et al., 2011). Хотя последний эксперимент считается спорным: пересадка микромеров 2d¹¹ и 4d, которые к тому времени уже совершили свою дифференцировку в эпителий и мезодерму, соответственно, производилась в эмбрион еще более поздней стадии развития, когда, по-видимому, клетки эмбриона необратимо дифференцируются. Поскольку в работе не было показано индуцирующего воздействия трансплантата, пересаженные микромеры могли выполнять свою автономную программу развития. Пересадка клеток на более ранней стадии между эмбрионами одинаковых стадий могла бы полнее ответить на вопрос о наличии эмбрионального организатора у спиралей (Amiel et al., 2013).

Несмотря на явное сходство функций организатора спиралей и шпемановского организатора, как и в случае с организатором Хольма гомология этих структур маловероятна. Во-первых, организатор спиралей расположен на дорсальной стороне эмбриона, гомологичной вентральной стороне позвоночных. Также недавно показано, что, по-видимому, анцестральным механизмом закладки организатора у спиралей является *Egk1/2*-каскад, но не аккумуляция ядерного бета-катенина (Seudre et al., 2022), свойственная для аксиального/шпемановского организатора (Kraus et al., 2016). Авторы полагают, что, во-первых, различные модификации механизма закладки организатора, отличные от анцестрального, появились независимо в разных группах спиралей при переходе к гетероквадрантному дроблению (см. обзор Козин и др., 2019); во-вторых, организатор спиралей может быть гомологичен вентропостериоризирующему центру хордовых, который зависит от активности *Egk*-каскада (Curran, Grainger, 2000; Pasini et al., 2012). Действительно, помимо *Egk1/2*-каскада авторы наблюдали активацию также *Notch*-каскада в организаторе спиралей. У шпорцевой лягушки *Notch*-каскад также активен в вентральном центре и обладает вентропостериоризирующим действием. (Acosta et al., 2011).

6.4. Механизмы формирования дорзо-вентральной оси.

6.4.1. Первичная эмбриональная индукция. Открытие ньюкуповского центра.

Для понимания механизмов, лежащих в основе саморегуляции дорзо-вентральной оси зародыша, происходящих при дришевских и шпемановских регуляциях, нужно подробнее остановиться на молекулярных механизмах формирования дорзо-вентральной полярности. Для этого следует рассмотреть механизм формирования шпемановского организатора на своем месте. Как было замечено в начале, Г. Шпеман обнаружил, что к саморегуляции способна только та часть эмбриона, которая содержит в себе материал серого серпа. Именно в области серого серпа закладывается дорсальная губа бластопора, обладающая индукционными свойствами. В 1948 году было показано, что серый серп образуется вскоре после оплодотворения в результате процесса вращения периферийного (кортикального) слоя цитоплазмы яйца относительно глубинного слоя примерно на 30° (AnceI, Vinterberger, 1948, из Gerhart et al., 1989). При этом полоса серого цвета, возникающая при смещении двух слоев цитоплазмы, возникает из-за присутствия гранул пигмента в обоих слоях. В ряде дальнейших работ было определено, что вращение кортикального слоя возникает вследствие слияния ооцита со сперматозоидом в анимальной полусфере ооцита. При этом в анимальную ооплазму проникает центриоль сперматозоида. Эта центриоль становится затем центром сборки микротрубочек, которые организуются в длинные параллельные тяжи, идущие от центриоли вдоль плазматической мембраны в сторону вегетативного полюса. Направление роста микротрубочек при этом совпадает с направлением кортикального поворота. Вдоль этих тяжей, как было показано, перемещаются детерминанты, формирующие дорсальную сторону (Рис. 6, А). Принципиальная важность этого перемещения для дальнейшего развития демонстрировалась тем, что различные воздействия на полимеризацию микротрубочек в этот момент развития, например, УФ-излучением или охлаждением до 0 °С, полностью блокировали формирование организатора (Рис. 6, Б; см. обзор Gerhart et al., 1989). Позднее была открыта молекулярная природа этих детерминантов: среди детерминантов, перемещающихся из вегетативного полюса на дорсальную сторону, важную роль играют компоненты Wnt-каскада -- белок Dishevelled и GSK3β-связывающий белок GBP (Miller et al. 1999; Weaver et al. 2003). Их перемещение приводит к стабилизации и накоплению в ядрах на дорсальной стороне зародыша бета-катенина, эффектора Wnt-каскада (Рис. 6, В).

Это событие запускает ряд последовательных механизмов, которые приведут к формированию дорсального организатора.

Важным этапом в раскрытии этих механизмов стали опыты Ньюкупа (1973), который инкубировал различные фрагменты вегетативной полусферы бластулы с анимальными эксплантатами, которые в норме дифференцируются в эктодерму. Однако при совмещении этих двух фрагментов в анимальных эксплантатах индуцировалась мезодерма вместо эктодермы, причем дорсальный квадрант вегетативных клеток (в который перемещаются дорсальные детерминанты из вегетативного полюса) индуцировал в верхнем эксплантате дорсальную мезодерму, т.е. собственно шпемановский организатор. Вентральные же квадранты, независимо от того, брались ли самые вентральные фрагменты или латеральные, индуцировали вентральную мезодерму, причем слабо дифференцированную – наиболее вентральную, из которой возникают кровяные островки (Рис. 7, А; Гилберт, 1994). Из этого опыта можно сделать вывод, что, во-первых, мезодерма эмбрионов амфибий индуцируется сигналами, исходящими из энтодермы, и, во-вторых, дорсальная энтодерма (названная ньюкуповским центром) отличается своей способностью индуцировать шпемановский организатор. Последняя способность была продемонстрирована в опытах по пересадке клеток дорсальной энтодермы на вентральную сторону у 64-клеточных эмбрионов шпорцевой лягушки: пересаженные клетки индуцировали формирование вторичных осей, как и в случае пересадки шпемановского организатора (Рис. 7, Б; Gimlich, Gerhart, 1984). Эта индукция, поскольку предваряет формирование шпемановского организатора, может быть названа первичной эмбриональной индукцией.

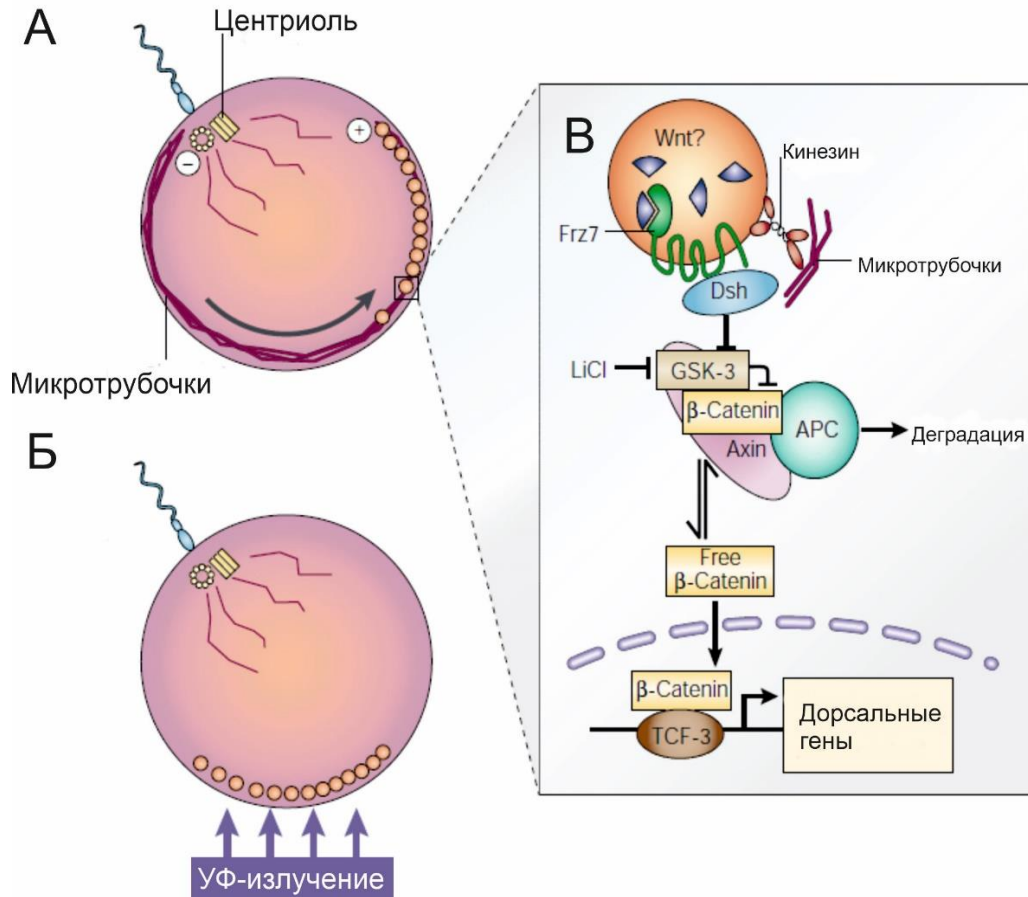


Рис. 6. Инициация дорзо-вентральной оси у зародыша лягушки (из De Robertis et al., 2000; Gilbert, 2010, с изм.).

(А) При оплодотворении ооцита в его цитоплазму вносится центриоль сперматозоида. Эта центриоль становится центром роста микротрубочек в сторону вегетативного полюса. При этом ряды микротрубочек выравниваются, и вдоль них происходит перемещение мембранных везикул, содержащих элементы Wnt-каскада (Dishevelled и GBP), на будущую дорсальную сторону, вызывая в этой области повышение активности каскада. (Б) При ингибировании роста микротрубочек с помощью УФ-радиации дорсальная сторона зародыша не формируется (В). Предполагаемая схема активации Wnt-каскада при кортикальном повороте. Мембранные везикулы, перемещенные с вегетативного полюса при помощи кинезинового транспорта, содержат белок Dishevelled (и, возможно ряд других активаторов Wnt-каскада, таких как Wnt-лиганды (Tao et al., 2005)), который инактивирует комплекс белков, в который входит киназа GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 beta), белки Axin и APC (Adenomatous Polyposis Coli). Активность этого комплекса вызывает фосфорилирование бета-катенина киназой GSK3 β , что приводит к его протеасомной деградации. Белок Dishevelled ингибирует этот комплекс, что приводит к аккумулярованию бета-катенина в дорсальной области. Аккумулярованный бета-катенин может проникать в ядро, где он активирует ряд генов, таких как гены *nodal-related* в ньюкуповском центре, и гены ВСНЕ-центра (*chordin*, *siamois/twin* и др.).

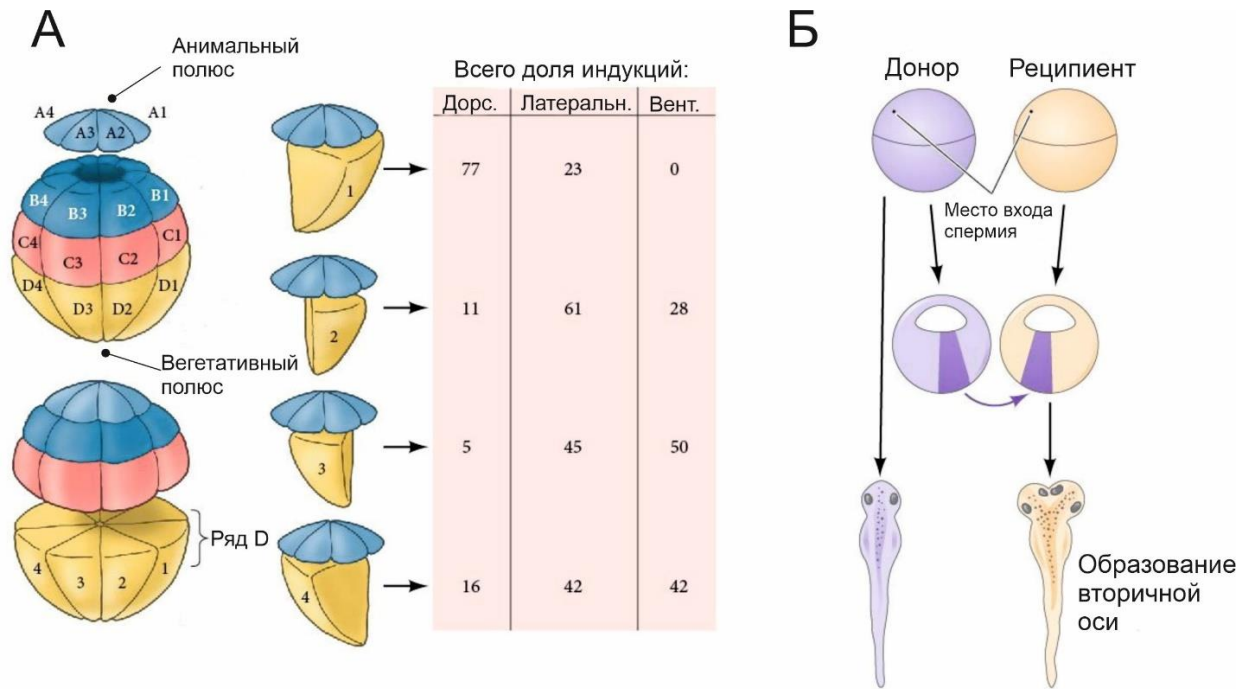


Рис. 7. Ньюкуповский центр и первичная эмбриональная индукция (Gilbert, 2010, с изм.).

(А) Опыт Ньюкупа по инкубированию анимальной шапочки с разными частями энтодермы. Энтодермальные клетки индуцируют мезодерму вместо эктодермы в анимальной шапочке, при этом дорсальная энтодерма индуцирует дорсальную мезодерму. (Б) Опыт по пересадке дорзовегетативных бластомеров на вентральную сторону с последующей индукцией вторичной оси.

6.4.2. Молекулярный механизм формирования шпемановского организатора.

Взаимодействие ньюкуповского центра и ВСNE-центра.

Способность энтодермы к мезодермальной индукции основана на действии транскрипционного фактора VegT, чья мРНК накоплена в вегетативной части ооцита, и Vg1 – секретируемого фактора семейства TGF β . После активации зиготического генома на стадии средней бластулы (стадия 8.5; Nieuwkoop, Faber, 1994) VegT вместе с Vg1 и накопленным в ядрах на дорсальной стороне бета-катенином активируют транскрипцию факторов *nodal* (у шпорцевой лягушки это гены *xnr-1, -2, -4, -5* и *-6*) в ньюкуповском центре (Рис. 8, А, Б). При этом создается дорзо-вентральный градиент концентрации лигандов Nodal – в области наибольшей концентрации индуцируется дорсальная мезодерма, а в области низких концентраций – вентральная (De Robertis, Kuroda, 2004; Carron, Shi, 2016). На стадии средней бластулы аккумулированный в ядрах бета-катенин активирует экспрессию организатор-специфичных транскрипционных факторов *siamois/twin*. В комбинации с Nodal-каскадом, эти факторы активируют репрессор *gooseoid* в клетках

дорсальной эктодермы (презюптивной нейроэктодермы), располагающейся в более анимальной области, и не пересекающейся с ньюкуповским центром (Рис. 8, А'; Sudou et al., 2012). Транскрипционный фактор *VegT* при этом ингибирует экспрессию *siamois/twin* в клетках ньюкуповского центра, способствуя раннему пространственному разделению его с зоной экспрессии *siamois/twin* в презюптивной нейроэктодерме (Ishibashi et al., 2008). Кроме того, в дорсальной эктодерме начинают экспрессироваться и другие гены, специфичные для шпемановского организатора: гены секретируемых нейрализирующих факторов *chordin* и *noggin1*. За экспрессию этих двух организатор-специфичных маркеров область дорсальной эктодермы бластулы была названа BCNE-центром (Рис. 7, Б; Blastula Chordin and Noggin Expression Center) (Kuroda et al., 2004). Экспрессия *chordin* в BCNE-центре зависит от аккумулированного ядерного бета-катенина, а также частично от Nodal-каскада в вегетативной части BCNE-центра (Castro Colabianchi et al., 2021). При этом в организаторе экспрессия *chordin* поддерживается преимущественно Nodal-каскадом (Wessely et al., 2001).

Хотя BCNE-центр экспрессирует ряд организатор-специфичных генов, он не обладает свойствами организатора, поскольку при его пересадке на вентральную сторону не происходит нейрализации окружающей эктодермы и формирования вторичной оси, тогда как пересадка ньюкуповского центра приводит к формированию полной вторичной оси (Gimlich, Gerhart, 1984). Однако, при локальном нокауте *chordin* в BCNE-центре происходила потеря ее способности к нейрализации секретируемыми факторами шпемановского организатора в ходе гастрюляции, то есть, экспрессия *chordin* в BCNE-центре необходима для пре-детерминации этой территории к вертикальной нейральной индукции подвораживающейся мезодермы шпемановского организатора (Kuroda et al., 2004).

В ходе дальнейшего развития, уже на стадии поздней бластулы, вегетативная часть BCNE-центра в ходе радиальной интеркаляции смещается ещё вегетативнее, входя в соприкосновение с ньюкуповским центром, образуя мезодермальную часть организатора. Также зона экспрессии *vegt* частично объединяется с зоной экспрессии *siamois*, активируя в ньюкуповском центре ген *cerberus*, и ген *gooseoid* в мезодермальной части будущего организатора (Рис 8, Б'). Далее, на стадии поздней бластулы Nodal-каскад активирует гены транскрипционных факторов *lim1*, *mix1* и *otx2* в ньюкуповском центре (энтодермальной части будущего организатора) и *vegt*, *lim1*, *mix1* и *otx2* в мезодермальной части организатора, и наоборот, *gooseoid* и *chordin* в ньюкуповском центре (Рис 8, Б''). Наконец, *vegt*, *lim1*, *mix1*, *otx2* и *siamois* активируют ген важного осевого индуктора

шпемановского организатора *cerberus* в мезодерме организатора, заканчивая процесс формирования шпемановского организатора (Рис. 8, В, В'; Sudou et al., 2012). Таким образом, инициация дорзо-вентральной полярности происходит за счет активности Wnt-каскада (при кортикальном повороте) с сопутствующей активностью Nodal-каскада при индукции мезодермы. Дальнейшая дифференцировка дорзо-вентральной оси будет происходить уже за счет активности сформированного шпемановского организатора.

6.4.3. Механизмы дорзо-вентральной разметки.

6.4.3.1. Открытие молекулярных основ шпемановской индукции.

Способность шпемановского организатора к индукции дифференцировки и эмбриональной разметки должна основываться на выделении организатором веществ-индукторов, влияющих на окружающие ткани и меняющими их дифференцировку. Для поиска подобных индукторов был разработан метод помещения «индуктора» между двумя фрагментами недифференцированного эмбрионального эпителия. В случае успешной индукции, эпителий дифференцировался в нейроэктодерму (Holtfreter, 1936). Однако результаты этих поисков были мало обнадеживающими: оказалось, что индукторами нейральной дифференцировки могут быть как мертвые шпемановские организаторы (разрушенные нагревом или алкоголем), так и препараты рибосом, стеролы, краситель метиленовый синий, и даже крупинки песка (De Robertis, 2009). Подобный результат не был обнадеживающим, и открытие химической природы шпемановской индукции растянулось на многие годы – вплоть до конца 80-х годов XX века, когда в биологии развития стали применяться методы молекулярной генетики. Новые молекулярные методы, в первую очередь методы скрининга библиотек кДНК и гибридизации *in situ*, давали возможность эмбриологам находить гены, активность которых локализована в определенных структурах эмбриона. Такие гены с большой вероятностью были бы ответственны за развитие этих структур. Таким образом был обнаружен первый ген, экспрессия которого локализована в главной структуре гастрულიрующего эмбриона-шпемановском организаторе – гомеобоксный ген *gooseoid* (Cho et al., 1991). Активация этого гена приводила к запуску программы дифференцировки, специфичной для клеток шпемановского организатора, поскольку инъекция синтетической мРНК этого гена в вентральные бластомеры приводила к

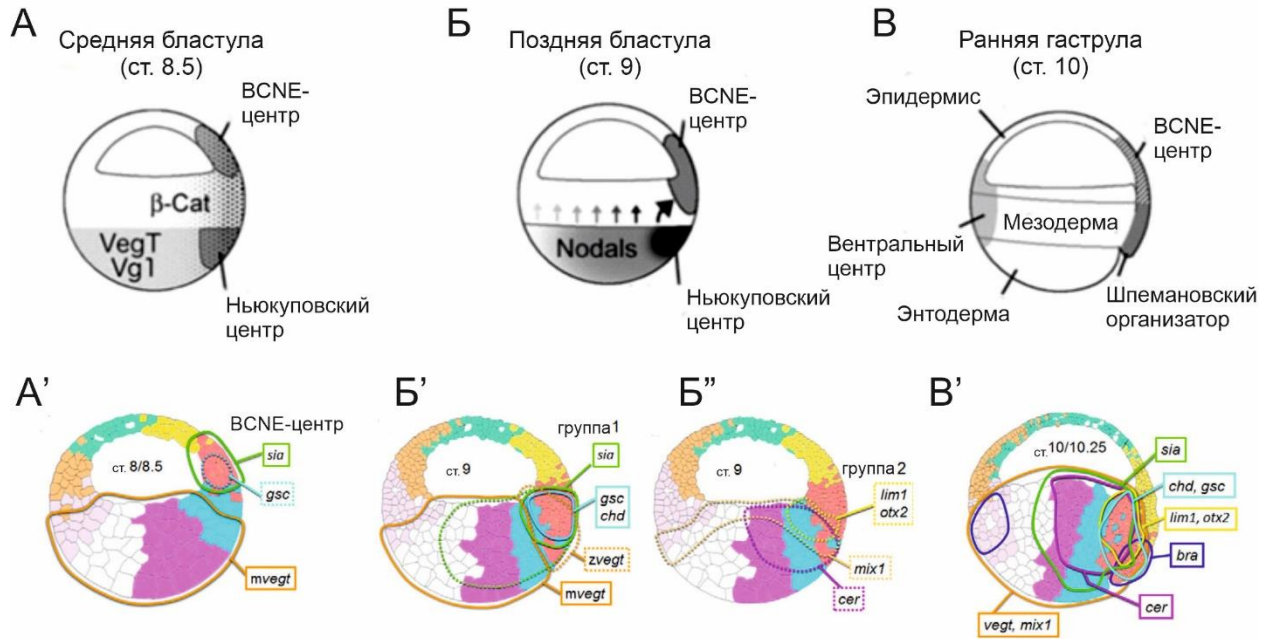


Рис. 8. Индукция шпемановского организатора из ньюкуповского центра и BCNE-центра у бластулы лягушки (из De Robertis, Kuroda, 2004; Sudou et al., 2012, с изм.).

(А) Вследствие кортикального поворота на стадии средней гастрюлы (стадия 8.5) в ядрах дорсальных клеток аккумулируется бета-катенин, что приводит к формированию BCNE-центра в дорсальной эктодерме. С другой стороны, вегетативные клетки экспрессируют транскрипционный фактор VegT и секретируемый лиганд Vg1. Их взаимодействие с градиентом ядерного бета-катенина приводит к формированию ньюкуповского центра, секретирующего факторы Nodal. (А') Аккумулированный бета катенин запускает экспрессию в BCNE-центре транскрипционных факторов *siamois/twin* и *goosecoid*. (Б) На стадии поздней бластулы (стадия 9) вследствие радиальной интеркаляции дорсальной эктодермы BCNE-центр входит в соприкосновение с ньюкуповским центром, образуя мезодерму шпемановского организатора. Факторы Nodal, секретируемые ньюкуповским центром, начинают влиять на экспрессию генов в BCNE-центре. (Б') Экспрессия генов BCNE-центра (группа 1: *chordin*, *goosecoid*, *siamois*) смещается в область зачатка шпемановского организатора и поддерживается факторами Nodal. Также в BCNE-центре индуцируется экспрессия зиготического *vegt* (*zvegt*) (Б'') в ньюкуповском центре на стадии поздней бластулы начинается экспрессия генов *cerberus*, *mix*, *lim1* и *otx2* (группа 2). (В) К началу гастрюляции формируется шпемановский организатор, состоящий из клеток дорсальной эндомезодермы (ньюкуповского центра) и вегетативной части клеток BCNE-центра, составляющих мезодермальную часть организатора. Анимальная часть BCNE-центра представляет собой презумптивную нейорэктодерму. (В') К началу гастрюляции гены группы 1 начинают экспрессироваться также в клетках бывшего ньюкуповского центра, а гены группы 2 – в клетках части бывшего BCNE-центра, составляющих мезодерму организатора: BCNE-центр и ньюкуповский центр объединяются в единый шпемановский организатор (Sudou et al., 2012; Carron, Shi, 2016).

формированию вторичных осей у эмбриона, то есть, к тому же результату, что наблюдался в опытах Шпемана и Мангольд. Следующим важным этапом в изучении молекулярных механизмов шпемановских индукций было обнаружение первого секретлируемого фактора шпемановского организатора – белка *Noggin1* (Smith, Harland, 1992). В этой работе исследователи показали, что инъекция синтетической мРНК *Noggin* в вентрализованные с помощью УФ-излучения эмбрионы приводит к восстановлению дорзо-вентральной разметки. Это означало, что индукционные свойства шпемановского организатора могут быть результатом секреции организатором белкового морфогена. Однако в тот момент еще не был известен молекулярный механизм действия белка *Noggin*. Но уже в 1996 году в той же лаборатории была определена мишень для *Noggin*: оказалось, что *Noggin* способен связываться во внеклеточном пространстве с лигандом BMP4, и ингибировать тем самым BMP-зависимый клеточный каскад (Zimmerman et al., 1996). Высокая активность BMP-каскада в эмбрионе приводит к дифференцировке клеток в вентральные структуры: эпидермис и латеральную мезодерму, а ингибирование BMP-каскада приводит к дифференцировке клеток в дорсальные структуры – нейроэктодерму и осевую мезодерму. Таким образом, секретлируемый шпемановским организатором фактор не запускает дифференцировку клеток, а наоборот – подавляет действие индуктора и позволяет клеткам дифференцироваться по умолчанию, то есть в дорсальные структуры (De Robertis, 2006).

С проникновением новых методов в лабораторную практику, и с новым возрастанием интереса к шпемановской индукции благодаря открытию первых генов, специфических для организатора, стали накапливаться данные о факторах, секретлируемых как дорзальным организатором, так и вентральными клетками (Рис. 9, А). Оказалось, что клетки шпемановского организатора секретруют целый «коктейль» белковых факторов, которые во внеклеточном пространстве ингибируют ряд клеточных каскадов, таких как BMP-каскад (*Noggin1/2*, *Chordin*, *Follistatin* и др.), *Nodal*-каскад (*Noggin1/2*, *Cerberus*, *Lefty*) и *Wnt*-каскад (*Dickkopf1*, *Noggin1/2*, *Cerberus*, *sFRP2* и др.) (см. обзоры De Robertis, 2009; Thisse, Thisse, 2015; De Robertis, Tejeda-Muñoz, 2022). При этом один и тот же белковый фактор может влиять на несколько каскадов: например, факторы *Cerberus* и *Noggin1/2* ингибируют сразу три каскада: BMP-, *Activin/Nodal*- и *Wnt*-каскад (Рис. 9, Б). Ингибирование этих трех каскадов в области шпемановского организатора необходимо для развития головы (Piccolo et al., 1999; Bayramov et al., 2011; Inui et al., 2012; Мартынова и др., 2016; Байрамов и др., 2017).

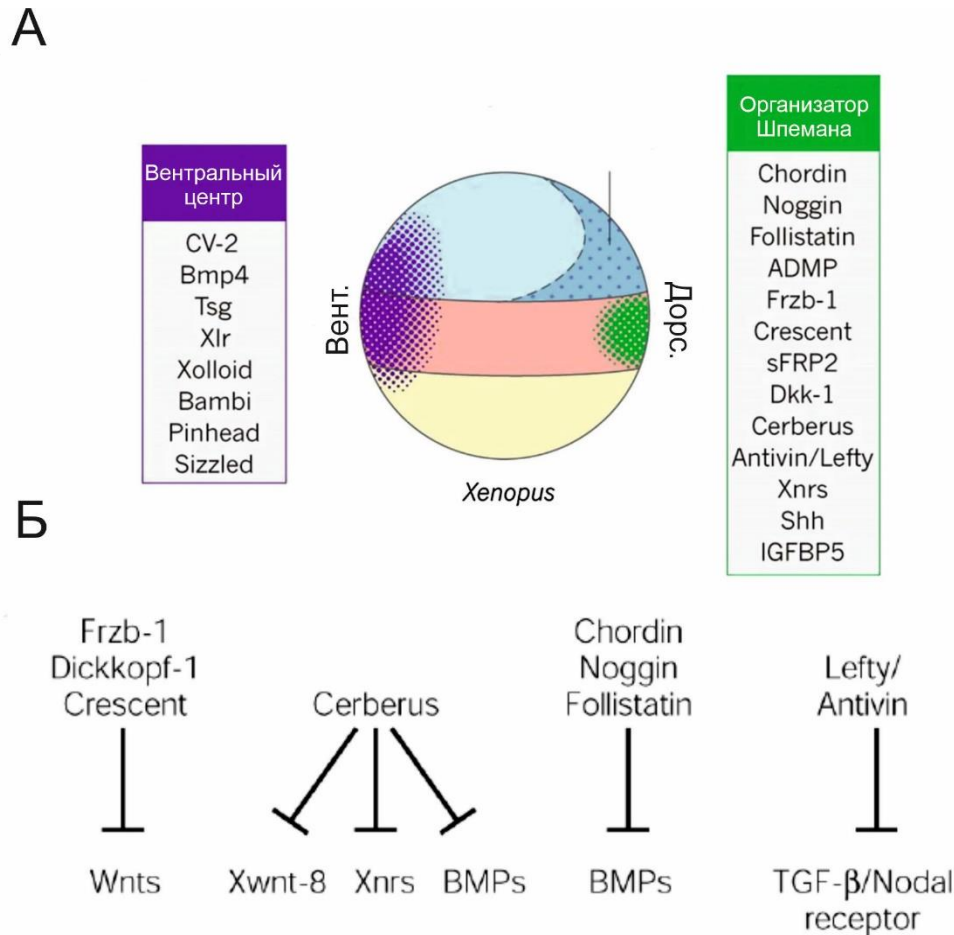


Рис. 9. Факторы, секретируемые дорсальным и вентральным центром у эмбрионов шпорцевой лягушки (из Lowe et al., 2015 и De Robertis et al., 2000 с изм.).

(А) Список основных факторов, секретируемых в шпемановском организаторе и вентральном центре. (Б) Факторы шпемановского организатора ингибируют каскады клеточной сигнализации: Wnt-каскад, Activin/Nodal-каскад (Xnr, Xenopus Nodal Related), BMP-каскад.

Если дорсальная сторона зародыша секретирует в основном антагонисты клеточных каскадов, то на вентральной стороне сосредоточена экспрессия лигандов-активаторов клеточных каскадов, поэтому вентральный полюс эмбриона иногда называют «вентральным центром» (De Robertis, Kuroda, 2004). Для вентрального центра характерна экспрессия лигандов двух классов: BMP4 и -7, а также Wnt8, активирующие BMP-каскад и Wnt-каскад, соответственно. Активность обоих каскадов обеспечивает вентральную дифференцировку эмбриона. Таким образом, на первый взгляд, шпемановская индукция основывается на выделении во внеклеточное пространство ингибиторов морфогенов из

шпемановского организатора, с одной стороны, и секреции в вентральном центре самих морфогенов, с другой. Градиенты ингибиторов и морфогенов, взаимодействуя во внеклеточном пространстве, формируют финальный внутриклеточный градиент активности каскада, запускающего дифференцировку морфогенетического поля зародыша вдоль дорзо-вентральной оси.

Однако, в процессе накопления данных о секретируемых шпемановским организатором и вентральным центром факторах оказалось, что шпемановский организатор также секретирует ряд активирующих BMP-каскад молекул, а вентральный центр, наоборот, ряд молекул, имеющих анти-BMP активность. Например, в области шпемановского организатора экспрессируются BMP-лиганды ADMP (Anti-Dorsalizing Morphogenetic Protein) и BMP2, которые, так же, как и лиганды BMP4/7, активируют BMP-каскад и тем самым препятствуют дорсализации (Reversade, De Robertis, 2005; Inomata et al., 2008). С другой стороны, в вентральном центре экспрессируются модуляторы BMP-каскада, обладающие ингибирующим эффектом на BMP-каскад: Crossveinless-2 (Ambrosio et al., 2008; Serpe et al., 2008, Zhang et al., 2010), Twisted Gastrulation (Oelgeschläger et al., 2000; Blitz et al., 2003; Xie, Fisher, 2005; Wills et al., 2006) и Sizzled (Collavin, Kirschner, 2003; Lee et al., 2006). Данная кажущаяся избыточность системы, однако, создает возможность тонкой регуляции морфогенетических градиентов на дальнем расстоянии. О моделях такой регуляции будет сказано далее.

6.4.3.2. Молекулярный механизм BMP-каскада.

Как было показано выше, активность шпемановского организатора основана на регуляции (в основном, ингибировании) нескольких клеточных сигнальных каскадов. Один из этих каскадов, BMP-каскад, преимущественно ответственен за разметку дорзо-вентральной оси, причем эта функция каскада эволюционно консервативна среди билатеральных животных и кишечнополостных (Bier, De Robertis, 2015).

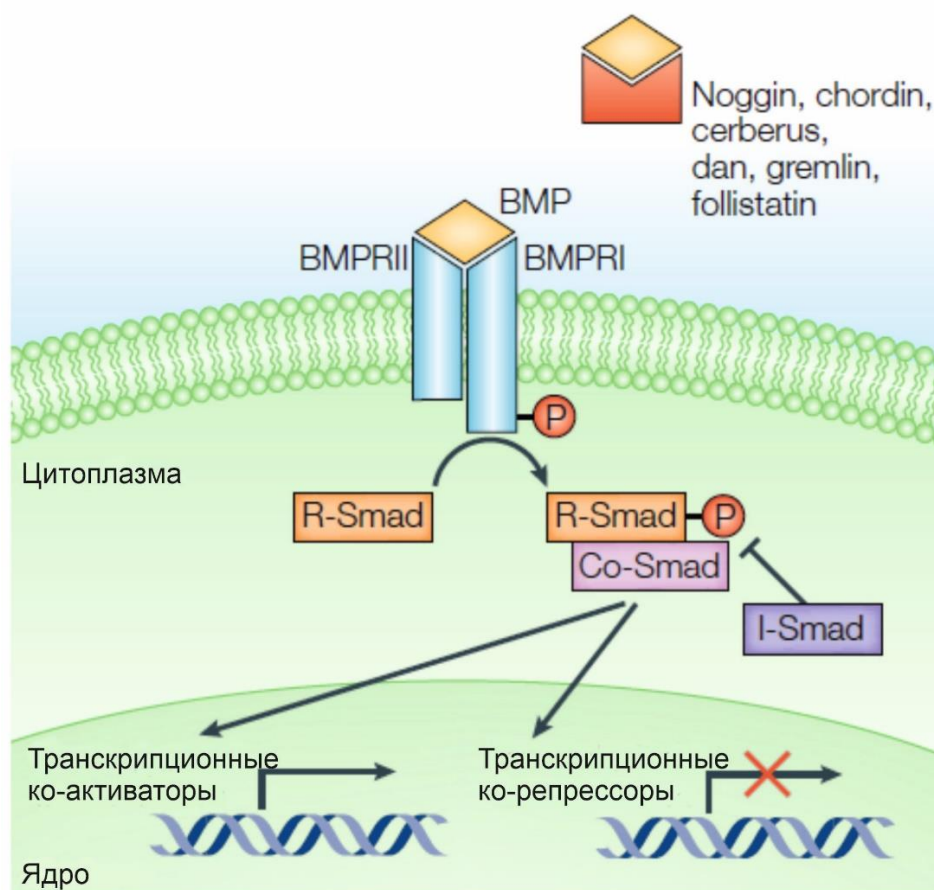


Рис. 10. Схема активации BMP-каскада (из Liu, Niswander, 2005).

Белки семейства BMP (Bone Morphogenetic Proteins) представляют большое семейство лигандов внутри суперсемейства белков TGF β (Transforming Growth Factor β). Белки TGF β представляют собой секретируемые белки, способные трансформировать (менять статус) клетки. Белки этого семейства распространены среди всех эуметазой (Schenkelaars et al., 2017) и влияют на множество процессов, таких как клеточная дифференцировка, разметка тканей, пролиферация клеток, апоптоз и др. Белки этого семейства можно разделить на два главных подсемейства: TGF β и BMP. Белки семейства TGF β состоят из сигнального пептида, необходимого для секреции, пропептида и зрелого пептида. Секреция белка происходит в неактивной форме, состоящей из пропептида и зрелого пептида, причем молекулы белка образуют димеры, формируя дисульфидные связи как в пропептиде, так и в зрелом пептиде. При секреции белка происходит отщепление пропептида с помощью протеазы Furin, высвобождая зрелый пептид. Зрелый белок представляет собой гетеро- или гомодимер, причем димерный пропептид способен связываться с высвобожденным зрелым белком, выполняя роль скаффолда, а также регулятора его активности. Активация TGF β -каскада происходит путем связывания зрелого димера сначала с соответствующей серин-треониновой рецепторной киназой II

типа, а затем и I типа, что вызывает её фосфорилирование киназой II типа. Фосфорилированная киназа I типа в свою очередь фосфорилирует цитоплазматические трансдукторы сигнала – белки Smad. Лиганды подсемейства TGF β активируют белки Smad2/3, а подсемейство BMP-лигандов активирует Smad1/5/8. После фосфорилирования белков Smad2/3 или Smad1/5/8 (рецепторные, или R-Smad) с ними связывается общий для обоих подсемейств каскадов белок Smad4 (общий, или Co-Smad). Образовавшийся тройной комплекс, состоящий из двух рецепторных Smad и одного Smad4, перемещается в ядро, где меняет экспрессию соответствующих генов. Важно отметить, что во внеклеточном пространстве BMP-лиганды могут блокироваться целым рядом секретлируемых ингибиторов, такими как Chordin, Noggin, Follistatin, DAN, Gremlin и др. (см. обзоры Niu, Niswander, 2005; Moustakas, Heldin, 2009).

6.4.3.3. Роль BMP-каскада в дорзо-вентральной разметке среди эуметазой.

Помимо функции в формировании костной ткани, отраженной в названии этой группы лигандов, BMP-сигнальный каскад участвует во множестве клеточных процессов. Одной из таких функций является участие BMP-каскада в дифференцировке дорзо-вентральной оси у животных. Анализ мутантов, имеющих аномалии в дорзо-вентральной разметке, показал, что многие из генов, влияющих на дорзо-вентральную разметку, являются элементами и модуляторами BMP-каскада: у рыбки данио в ходе скрининга были выявлены мутанты *swirl* (ген *bmp2b*), *snailhouse* (*bmp7*), *chordino* (*chordin*), *mini fin* (*tolloid-like*), *lost-a-fin* (BMP-рецептор I типа *alk8*; Mintzer et al., 2001), *somitabun* и *pigtail* (*smad5*), *ogon/mercedes* (*sizzled*). При этом в ходе скрининга у дрозофилы на дорзо-вентральную разметку зародыша также влияли гены BMP-каскада, гомологичные генам позвоночных: *decapentaplegic* (*bmp2/4* у позвоночных), *screw* (*bmp5/7*), *short gastrulation* (*chordin*), *twisted gastrulation* (ортолог позвоночных имеет то же название), *tolloid* (*tolloid-like*) (De Robertis, Kuroda, 2004; Bier, De Robertis, 2015). На модели шпорцевой лягушки было показано, что градиент активности BMP-каскада размечает все три зародышевых листка: эктодерму, мезодерму и энтодерму (Dale, Wardle, 1999; Rankin et al., 2011). В эктодерме низкая активность BMP-каскада вызывает нейтрализацию – так называемую дифференцировку эктодермы «по умолчанию» -- то есть, нейтрализация в действительности происходит в отсутствие стимуляции BMP-лигандами (De Robertis, Kuroda, 2004). Самая низкая активность BMP-каскада у амфибий наблюдается на дорсальной стороне, в области шпемановского организатора, где выделяемые организатором ингибиторы BMP-лигандов способствуют нейтрализации эктодермы. Более

высокая активность BMP-каскада вызывает дифференцировку плакод и нервного гребня на границе нейроэктодермы и эпидермиса (Wilson et al., 1997; Marchant et al., 1998). Самая высокая активность BMP-каскада вызывает дифференцировку эпидермиса на вентральной стороне эмбриона. Аналогично эктодерме, мезодерма также дифференцируется вдоль dorso-вентральной оси вдоль градиента активности BMP-каскада: область наиболее низкой активности BMP-каскада, находящаяся в шпемановском организаторе, дифференцируется в осевую мезодерму (нотохорд). Увеличивающаяся активность BMP-каскада латеральнее вызывает дифференцировку сомитной мезодермы, а высокая активность – вентральной мезодермы (Dale, Wardle, 1999). Сходные данные были получены также на другом позвоночном – рыбке данио (Neave et al., 1997).

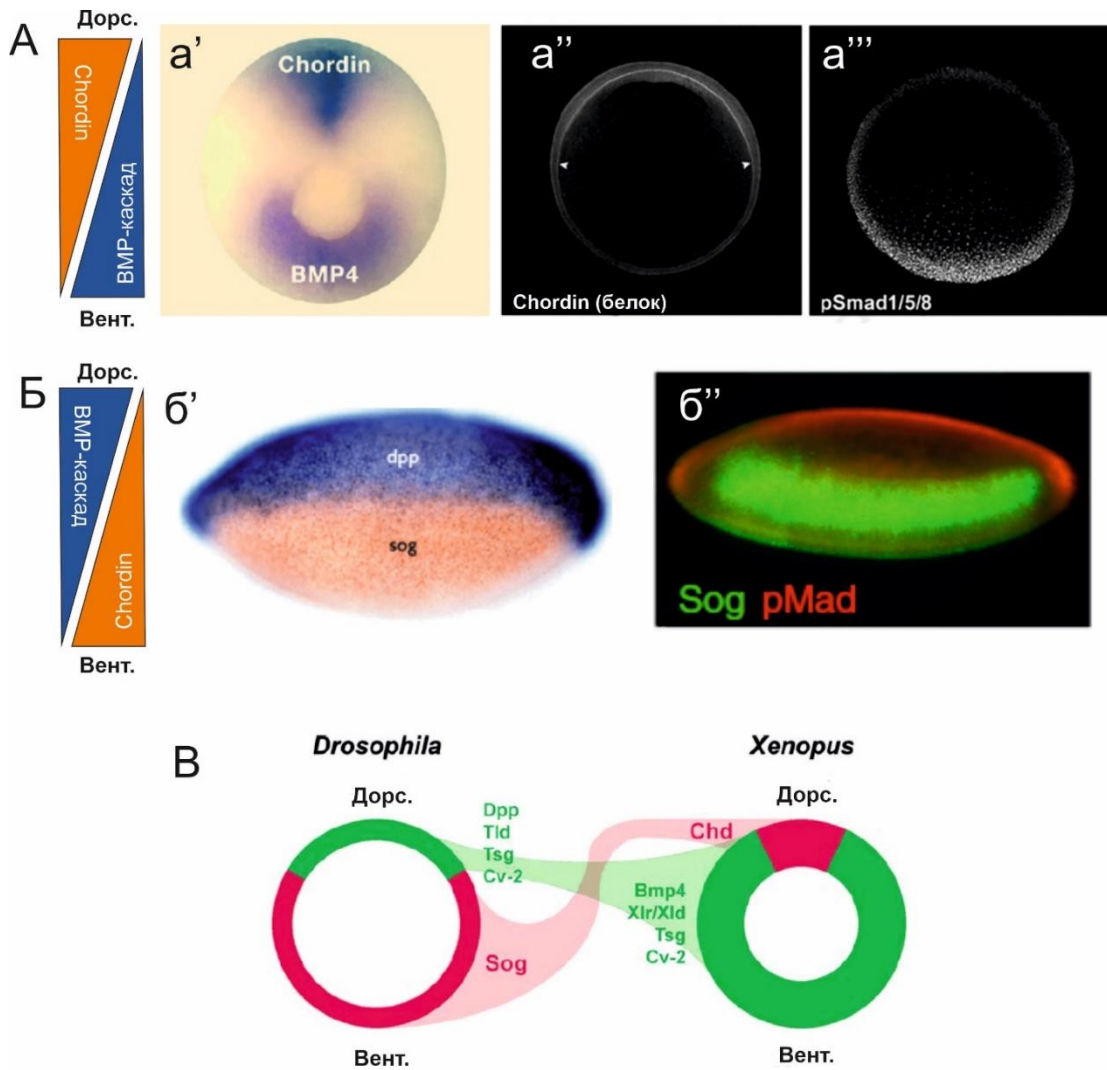


Рис. 11. Двугradientная модель разметки дорзо-вентральной оси на примере шпорцевой лягушки и *D. melanogaster* (из De Robertis, Kuroda, 2004; Wharton, Serpe, 2013; De Robertis, Tejada-Muñoz, 2022; с изм.).

(А) У шпорцевой лягушки на дорсальной стороне локализована экспрессия *chordin*, а на вентральной — *bmp4* (а'). *Chordin*, будучи секретлируемым антагонистом BMP-каскада, формирует дорзо-вентральный градиент (а'') ингибирования BMP, что, в свою очередь, приводит к формированию градиента активности BMP-каскада (окрашивание на фосфорилированный Smad1/5/8) (а'''). (Б) У дрозофилы гомолог *chordin* *Sog* экспрессируется на вентральной стороне, а гомолог *BMP2/4* *dpp* экспрессируется дорсально (б'). При этом взаимодействие этих двух белков также регулирует дорзо-вентральную разметку дрозофилы, формируя резкий пик активности BMP-каскада на дорсальной средней линии (б'', окрашивание красным). (С) Кроме *Chordin/Sog* и *BMP2/4/Dpp* существует ряд белков-регуляторов BMP-каскада, чья экспрессия инвертирована у шпорцевой лягушки и дрозофилы. Из этого следует консервативность механизма дорзо-вентральной разметки у билатерий, а также подтверждает гипотезу о инверсии дорзо-вентральной оси у хордовых.

Дорзо-вентральная разметка дрозофилы, как уже было отмечено, также зависит от активности генов, вовлеченных в BMP-каскад. Как и у позвоночных, экспрессия таких генов неравномерна вдоль дорзо-вентральной оси: если у позвоночных на дорсальной стороне, в области организатора, сосредоточена экспрессия секретлируемых ингибиторов BMP-каскада (*chordin*, *noggin*, *folliculin* и пр.), а на вентральной стороне экспрессируются гены BMP-лигандов и гены, входящие в группу синэкспрессии (*crossveinless-2*, *twisted gastrulation*, *tolloid*) (Рис. 11, А, В), то у дрозофилы экспрессия этих двух групп генов инвертирована вдоль дорзо-вентральной оси (Рис. 11, Б, В). Эти молекулярные данные, полученные сравнительно недавно, подтверждают давнюю гипотезу Ж. Сент-Илера (1822) о «перевороте» плавающего предка позвоночных, так что ко дну была теперь обращена его спинная сторона (Arendt, Nübler-Jung, 1994; De Robertis, Tejeda-Muñoz, 2022). Однако, существенным отличием системы дорзо-вентральной разметки дрозофилы от системы позвоночных является отсутствие второго центра продукции BMP-лигандов в области продукции антагонистов к ним. У шпорцевой лягушки в области шпемановского организатора экспрессируются лиганды ADMP и BMP2, которые, связавшись с белком Chordin, диффундируют к вентральному полюсу эмбриона, где высвобождаются от ингибирующего действия Chordin с помощью металлопротеазы Tolloid-like и активируют BMP-каскад на дальнем расстоянии (De Robertis, Tejeda-Muñoz, 2022). Этот механизм переноса лигандов (*shuttling*), как предполагается, обеспечивает клетки эмбриона дальнедействующей связью с остальными клетками, обеспечивая тем самым точную настройку и регуляцию дорзо-вентральной разметки (Рис. 12; Joubin, Stern, 1999; Reversade, De Robertis, 2005; Ben-Zvi et al., 2008).

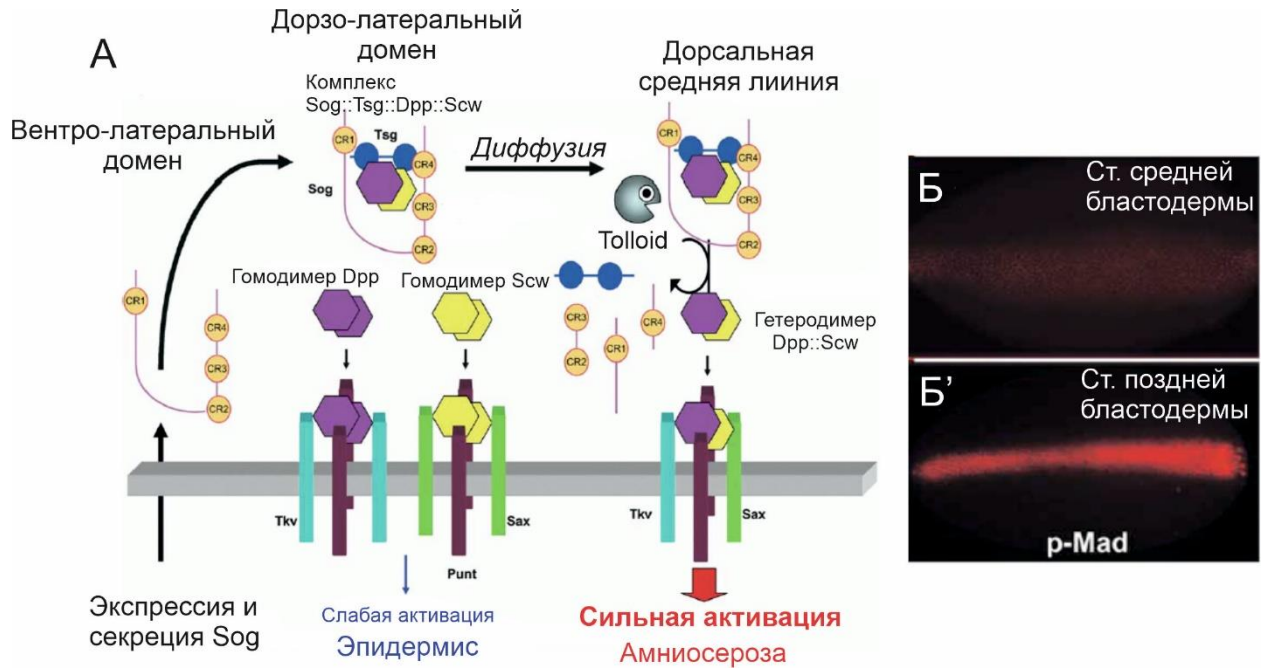


Рис. 12. Шаттлинг BMP-лигандов на модели дрозофилы (из Shimmi et al., 2005; с изм.).

(А) Схема механизма. Секретированный в вентро-латеральной области Chordin/Sog образует гетеротетрамер с белком Tsg, который способен связываться и с Chordin/Sog и с BMP-лигандами, и гетеромерным BMP-лигандом Dpp::Scw, к которому Chordin имеет большее сродство, чем к соответствующим гомодимерам. Образующийся комплекс вследствие диффузии достигает дорсальной области, где происходит расщепление Chordin/Sog с помощью протеазы Tolloid, что сопровождается высвобождением BMP-лиганда, который связывается с гетеротетрамерным рецепторным комплексом, состоящим из общего для Dpp и Scw рецептора Punt (BMP-рецептор II типа) и двух BMP-рецепторов I типа: Saxophone (Sax), связывающегося с Scw, и Thickveins (Tkv), связывающегося с Dpp, соответственно. Протеолитическое разрушение Chordin/Sog вызывает дополнительную диффузию комплекса в дорсальную область (шаттлинг), а активация гетеродимером гетеротетрамерного рецептора приводит к максимальной активации BMP-каскада. В результате функционирования этого механизма на дорсальной средней линии эмбриона формируется отчетливая полоса активности BMP-каскада (ср. градиент pMad на стадии средней бластодермы (Б) и поздней бластодермы (Б')).

Напротив, у дрозофилы отсутствует второй центр экспрессии BMP-лигандов, ассоциированный с экспрессией *sog/chordin*. Более того, функции BMP-каскада в разметке дорзо-вентральной оси дрозофилы ограничены лишь дифференцировкой эктодермы на собственно эктодерму и амниосерозу. Тем не менее, шаттлинг BMP-лигандов с помощью Sog и Tsg с латеральной области эмбриона на дорсальную среднюю линию имеет ключевое значение для формирования амниосерозы у дрозофилы (Ferguson, Anderson, 1992; Wharton et al., 1993; Francois et al., 1994; Ashe, Levine, 1999; Shimmi et al., 2005).

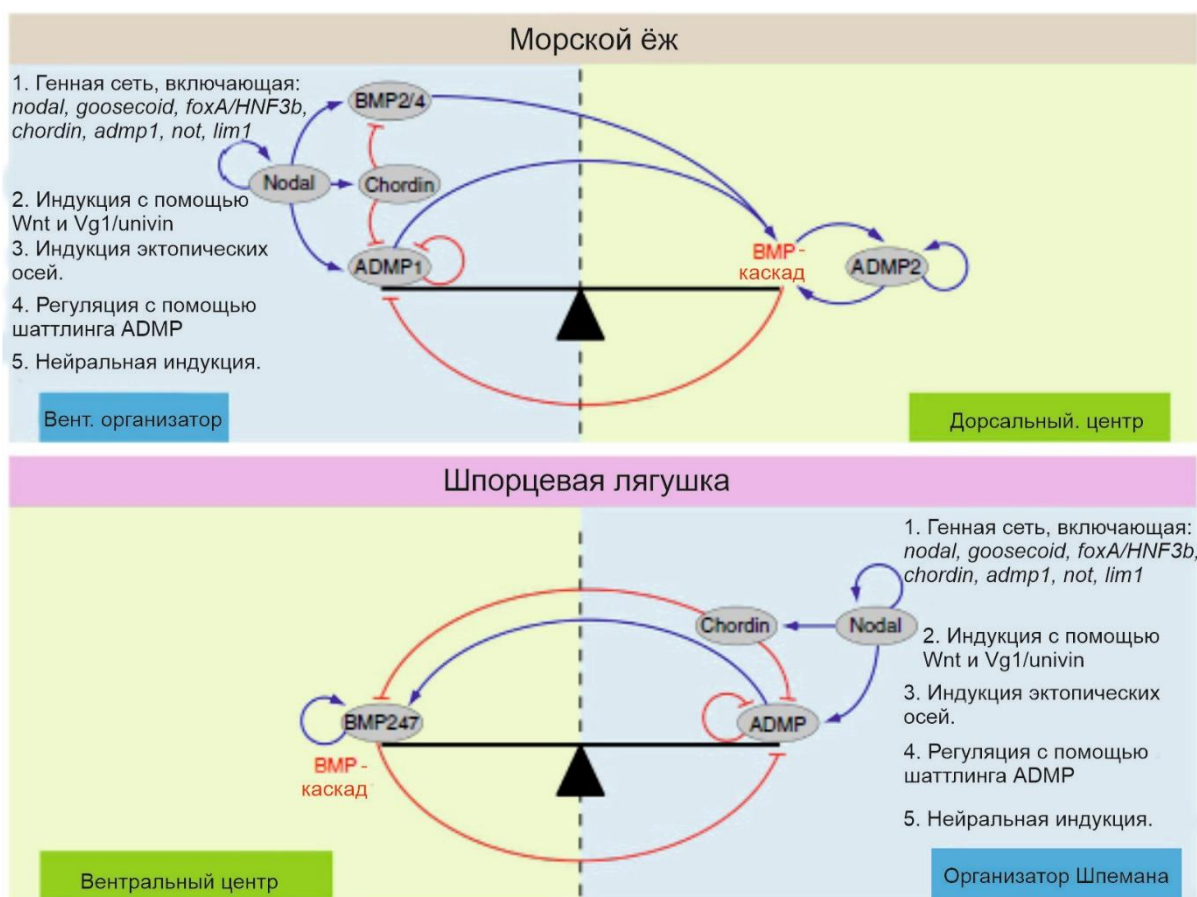


Рис. 13. Эволюционная консервативность механизма дорзо-вентральной разметки морского ежа и шпорцевой лягушки (из Lapraz et al., 2015).

Поскольку у таких эволюционно далеких животных, как позвоночные и насекомые, относящиеся к вторичноротым и первичноротым животным, соответственно, имеется общий механизм дорзо-вентральной разметки с помощью BMP-лигандов и их антагонистов, экспрессия которых сосредоточена на противоположных полюсах оси, можно считать, что этот обобщенный механизм является прототипическим для билатерий (Bier, De Robertis, 2015). Недавние исследования на других модельных объектах, однако, показали существенную вариативность механизма дорзо-вентральной разметки среди других групп животных. Эти данные, во-первых, могут скорректировать модель исходного механизма дорзо-вентральной разметки общего предка билатерий, а также позволить лучше понять принципы, на которых основана саморегуляция этого механизма.

Например, у типа полухордовых, сестринской группы для типа хордовых (Röttinger, Lowe, 2012; Irie et al., 2018), экспрессия внеклеточных элементов BMP-каскада сходна с таковой у позвоночных: *chordin* и *admp1* ко-экспрессируются на вентральной стороне, гомологичной дорсальной стороне хордовых, а *bmp2/4* и *bmp5/8*, а также ген *admp2*, на дорсальной (Röttinger et al., 2015). Как и у позвоночных, экспрессия *bmp2/4*

находится под положительной обратной связью с активностью BMP-каскада, а экспрессия *admp1* активируется при подавлении BMP-каскада (Lowe et al., 2006). Хотя BMP-каскад и регулирует дорзо-вентральную разметку эмбриона полухордовых, активность BMP-каскада не влияет на нейрализацию эктодермы. Интересно, что нервная система полухордовых является диффузной, и не образует единого эмбрионального зачатка, требующего механизма паттернинга.

У иглокожих, образующих группу *Ambulacraria* вместе с полухордовыми, *bmp2/4* ко-экспрессируется на вентральной стороне вместе с *chordin*, и, в отличие от позвоночных и дрозофилы, экспрессия *bmp2/4* подавляется BMP-каскадом. Было продемонстрировано, что за счет быстрой диффузии лиганды BMP2/4 достигают противоположного дорсального полюса эмбриона и активируют BMP-каскад вдали от источника собственной секреции и секреции своего ингибитора-белка Chordin – механизм, сходный с транслокацией (шаттлингом) BMP-лигандов у дрозофилы и позвоночных (Рис. 13; Lapraz et al., 2009; Lapraz et al., 2015). Как и у полухордовых, у иглокожих ген *admp* дублирован: ген *admp1* ко-экспрессируется с *chordin*, и его экспрессия подавляется активностью BMP-каскада, что свидетельствует о консервативности функции *admp1* с единственным оставшимся геном *Admp* позвоночных. Ген *admp2* при этом экспрессируется на дорсальной стороне, как и у полухордовых. Его экспрессия, как и *bmp4/7* позвоночных и *dpp* дрозофилы, активируется самим BMP-каскадом, что приводит к стабилизации высокой активности BMP-каскада на дорсальной стороне и формированию выраженного градиента. То есть, несмотря на то, что экспрессия *bmp2/4* у иглокожих переместилась в зону экспрессии *chordin*, за счет чего *bmp2/4* функционально стал дублировать *admp1*, у них сохраняется два противоположащих центра экспрессии BMP-лигандов, как и у полухордовых и хордовых.

Из рассмотрения генно-регуляторных сетей, ответственных за дифференцировку дорзо-вентральной оси у хордовых, полухордовых и иглокожих, образующих группу вторичноротых животных, можно сделать вывод о высокой эволюционной консервативности дорзо-вентральной разметки у вторичноротых: действительно, у всех трех групп животных имеется два центра секреции BMP-лигандов. Один из них совмещен с центром секреции антагониста Chordin, способного перемещать с помощью механизма шаттлинга неактивные BMP-лиганды на противоположную сторону, где располагается второй центр. Лиганды второго центра, вместе с перемещенными лигандами из первого центра, способны к самоактивации, что стабилизирует высокую активность BMP-каскада в области второго центра. Наличие этих двух центров секреции BMP-лигандов

обеспечивает саморегуляцию дорзо-вентральной разметки у позвоночных: при хирургическом удалении вентрального центра у позвоночных *Chordin* перемещает ADMP в связанном неактивном состоянии в латеральную область, где расщепляется протеазой Tolloid-like, активируя ADMP, приводящий к связыванию с BMP-рецепторами и регенерации вентрального центра с помощью автоактивации BMP-каскада (Reversade, De Robertis, 2005; Ben-Zvi et al., 2008). Учитывая, что все три перечисленные группы вторичноротых обладают сходной высокой регуляционной способностью (см. для полухордовых Colwin, Colwin, 1950), можно предположить, что подобный прототипический механизм дорзо-вентральной разметки (в первую очередь подразумевающий наличие центра синэкспрессии *admp* и *chordin*) способствует высокому регуляционному потенциалу эмбрионов.

В этой связи особенно интересны сообщения о сохранении этой генно-регуляторной сети у оболочников – ближайшей родственной группы для позвоночных (Delsuc et al., 2006; Röttinger, Lowe, 2012; Irie et al., 2018). У более базальной к позвоночным и оболочникам группы бесчерепных хордовых, к которым относятся ланцетники, сохраняется описанная выше схема дорзо-вентральной разметки вторичноротых (Yu et al., 2007) и также высокая способность к регуляции (Conklin, 1933). Однако, развитие оболочников эволюционировало в сторону крайнего мозаицизма, сопровождавшегося ослаблением роли дальнедействующих межклеточных сигналов и усилением роли цитоплазматической сегрегации в дифференцировке клеток (Lemaire et al., 2008; Lemaire, 2009). Тем не менее, на более поздней, личиночной, стадии развития экспрессия дорзо-вентральных маркеров *admp*, *bmp2/4* и *chordin* сходна с их экспрессией у гастролы позвоночных, и гены *admp* и *BMP2/4* находятся под схожим транскрипционным контролем (Imai et al., 2004; Imai et al., 2012). Было показано, что *admp* в данном случае регулирует дорзо-вентральную разметку хвостовой эктодермы личинок. Учитывая вышесказанное о роли BMP-каскада в регуляции дорзо-вентральной разметки на различных этапах онтогенеза, можно предположить, что на личиночной стадии развитие оболочников может быть отчасти регуляционным.

Если у вторичноротых животных механизм дорзо-вентральной разметки во многих отношениях сходен (по крайней мере, среди изученных объектов), что свидетельствует о его вероятной эволюционной консервативности в группе, то среди первичноротых было обнаружено существенно большее разнообразие механизмов дорзо-вентральной разметки. Например, у насекомых была обнаружена существенная вариабельность в паттернах экспрессии внеклеточных элементов BMP-каскада (Рис. 14, А). Например, если у

дрозофилы паттерны экспрессии *dpp* и *sog* локализованы соответственно на дорсальной и вентральной стороне, то у мушки-бабочницы *Clogmia ambipunctata* (также двукрылое) экспрессия *dpp* разделена на передний и задний домены, расположенные вентрально, частично перекрываясь с доменом экспрессии *sog* (Wotton et al., 2017). Данная схема весьма напоминает ко-экспрессию *admp* и *chordin* у позвоночных и *bmp2/4* и *chordin* у морского ежа. У жука *Tribolium castaneum*, наездника *Nasonia vitripennis* и пчелы *Apis mellifera* экспрессия *dpp* не имеет четко выраженной дорзо-вентральной полярности. При этом зона высокой активности BMP-каскада в данных случаях, как и у дрозифилы, расположена тонкой полосой вдоль дорсальной средней линии. Видимо, механизм шаттлинга комплекса Dpp::Sog::Tsg нивелирует различия в паттернах экспрессии генов, создавая четкую координатную сеть дорзо-вентральной дифференцировки (Wotton et al., 2017). Паттерны экспрессии отдельных генов могут легко при этом меняться в ходе эволюции: несмотря на высокую консервативность механизма распределения мРНК в ооците, сами сигнальные последовательности мРНК, распознаваемые системой распределения, могут легко меняться (Wilson et al., 2013). Такой механизм может быть использован для изменения плана строения организма в ходе эволюции при сохранении общего принципа раннего эмбриогенеза, что наблюдается у насекомых.

В связи с этим особо примечательно отсутствие гена *sog* у осы *Nasonia vitripennis* (у медоносной пчелы *A. mellifera* *sog* присутствует, но экспрессируется уже после гаструляции) и прямокрылого *Gryllus bimaculatus* (Özüak et al., 2014; Pechmann et al., 2021), что делает невозможным создание выраженного градиента BMP-сигналинга с помощью механизма шаттлинга комплекса Sog::Dpp::Tsg. В случае *N. vitripennis* было предположено, что шаттлинг может происходить в комплексе Dpp::Tsg. Другая возможность заключается в том, что дорсально экспрессирующийся в ооцитах рецептор BMP *thickveins* создает пик активности BMP-каскада на дорсальном полюсе с помощью автоактивации каскада. С другой стороны, у *G. bimaculatus*, потерявшего ген *sog* независимо, дорзо-вентральная разметка в ходе конвергентной эволюции стала больше зависеть от Toll-каскада, как и в случае *D. melanogaster*. Необходимо также заметить, что у перечисленных трех видов насекомых с нефункциональным *sog* в геноме присутствует ген *admp*, утерянный у других насекомых. Возможно, данная закономерность имеет и функциональное значение: можно предположить, что ADMP-лиганд имеет специфическую способность к Sog/Chordin-независимому шаттлингу, связываясь с другими секреторируемыми белками, связывающимися BMP-лиганды, например, Tsg или DAN (Kenny et al., 2014).

Помимо BMP-каскада, в формировании дорзо-вентральной оси у насекомых активное участие принимает Toll-каскад, что является отличительным признаком эмбриогенеза у всех насекомых (у других групп животных Toll-каскад участвует в неспецифическом иммунитете) (Рис. 14, Б). У таких насекомых как *Drosophila* и *Tribolium* Toll-каскад принимает основное участие в разметке дорзо-вентральной оси, а BMP-каскад отвечает за дальнейшую разметку эктодермы. Напротив, у перепончатокрылых (*N. Vitripennis*) и полужесткокрылых (*Oncopeltus fasciatus*) преимущественно BMP-каскад формирует дорзо-вентральную разметку (Sachs et al., 2015). Поскольку полужесткокрылые являются довольно примитивной группой насекомых с прямым развитием, исследователи предполагают, что эволюционно первичный механизм дорзо-вентральной разметки у насекомых был основан на саморегулирующемся динамическом градиенте BMP-каскада, где Toll-сигналинг выполнял функцию инициации смещения экспрессии элементов BMP-каскада вдоль будущей дорзо-вентральной оси (хотя в другой работе было показано, что руководящая роль одного или другого каскада в формировании дорзо-вентральной оси могла меняться в различных группах в ходе конвергентной эволюции. См. Pechmann et al., 2021). Модель, предложенная исследователями, могла бы объяснить удивительную способность к регуляции дорзо-вентральной оси эмбрионов полужесткокрылых (Sander, 1971), однако, для этого потребуются трудоемкие эксперименты по разделению эмбрионов вдоль передне-задней оси.

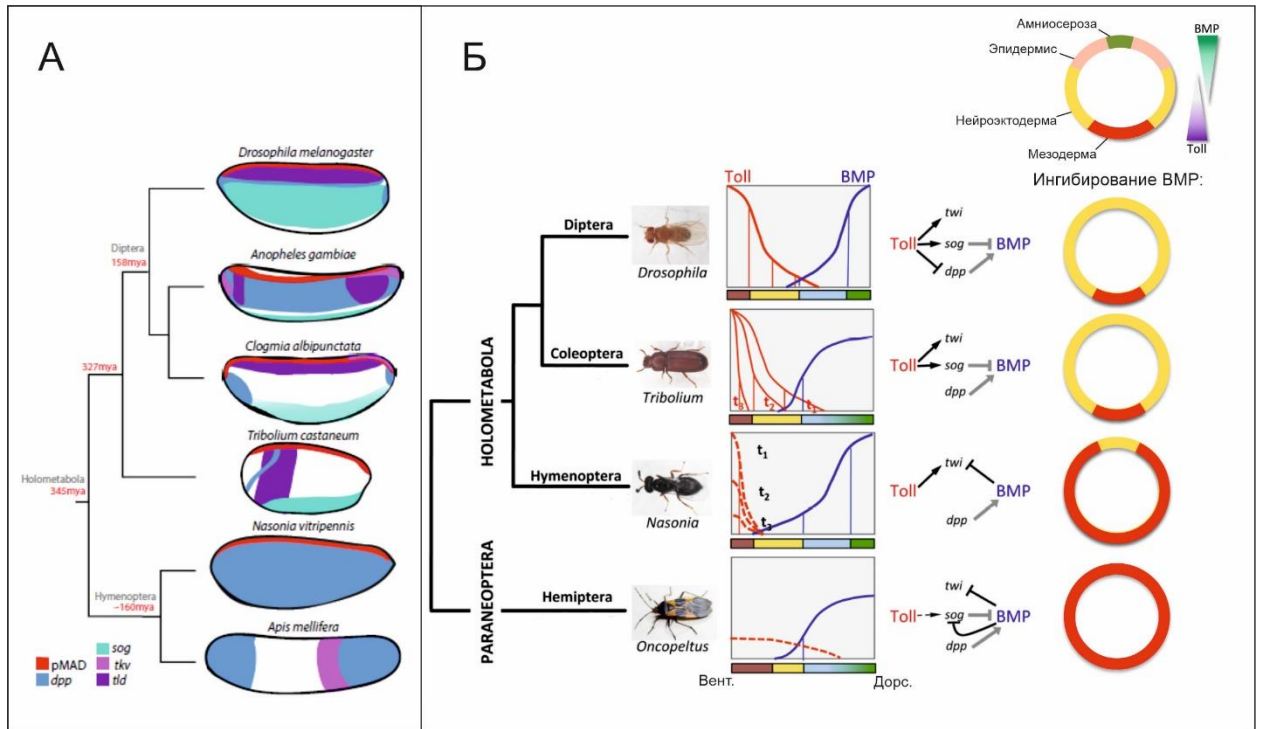


Рис. 14. Разнообразие экспрессии участников BMP-каскада и механизма dorso-ventralной разметки у насекомых (из Sachs et al., 2015; Wotton et al., 2017; Pechmann et al., 2021, с изм.).

(А) Несмотря на удивительную схожесть процесса формирования градиента активности BMP-каскада с образованием пика на дорсальной средней линии, экспрессия элементов BMP-каскада в различных кладах насекомых сильно отличается. (Б) Помимо BMP-каскада в формировании dorso-ventralной оси насекомых принимает участие Toll-каскад. В различных кладах насекомых вовлеченность Toll-каскада в этот процесс различна: если у двукрылых (*Diptera*) Toll-каскад приносит основной вклад в дифференцировку dorso-ventralной оси, то у эволюционно отдаленных полужесткокрылых (*Hemiptera*) основной вклад приносит BMP-каскад, что может быть причиной крайней регуляционной пластичности эмбрионов полужесткокрылых.

Кроме насекомых, механизм формирования dorso-ventralной полярности у членистоногих в достаточной степени изучен у хелицеровых – группы, наиболее эволюционно удаленной от насекомых (Thomas et al., 2020). Как уже было сказано, клетки кумулюса эмбрионов паука способны к индукции вторичных осей при пересадке на ventральную сторону (Oda et al., 2020), что напоминает действие шпемановского организатора, но, как было уже отмечено, мало вероятно, чтобы эти структуры были гомологичны. Действительно, было показано, что клетки кумулюса экспрессируют *bmp4/dpp*. Экспрессия его антагониста *sog* сначала оказывается радиально-симметричной, а затем локализуется в ventральной области. Нокаунт *sog* приводит к утрате ventральных структур (дорсализации), в том числе нейроэктодермы, что функционально сближает пауков с позвоночными и насекомыми, но нокаунт *dpp* приводит к блокированию

формирования самой дорзо-вентральной полярности и радиализации эмбриона (Akiyama-Oda, Oda, 2003; 2006). Более того, локальное применение BMP4 человека на вентральной стороне приводит к формированию частичной вторичной оси (Pechmann, 2020).

Полученные молекулярные данные кардинально отличаются от данных, полученных на позвоночных: получается, что у пауков молекулой, способной организовывать и регулировать дорзо-вентральную разметку, оказываются не антагонисты BMP-каскада, а сами BMP-лиганды. Таким образом, если все же допустить гомологию кумулюса пауков и вентрального центра позвоночных, то несомненным эволюционным отличием хелицеровых от позвоночных является приобретение этим центром функции организатора с помощью неизвестного молекулярного механизма, основанного на действии BMP-лигандов. Исследователи, однако, предполагают, что организационные свойства кумулюса пауков могут быть основаны на механизме, сходным с таковым у полужесткокрылых насекомых, у которых, как было показано выше, и дорсальный, и вентральный центр эмбриона способны к саморегуляции (Sander, 1971; Sachs, 2015; Oda et al., 2020).

Если для пауков показана эмбриональная регуляция, основанная (по крайней мере, частично) на действии BMP-каскада, то развитие нематод, также относящихся к экдизозоям, крайне мозаично. В ходе эволюции у *C. elegans* остался единственный BMP-лиганд, участвующий в формировании кутикулы (Madaan et al., 2020). Кроме этого, у *C. elegans* отсутствуют секретируемые ингибиторы BMP-каскада (Kenny et al., 2014). Подобная редукция репертуара элементов BMP-каскада у животного, не способного к эмбриональной регуляции, косвенно подтверждает его необходимость для регуляции эмбрионов.

В связи с описанной ролью BMP-каскада в формировании дорзо-вентральной полярности и регуляции эмбриональной разметки у пауков интересны данные о механизмах дорзо-вентральной полярности у спиралей, отличающихся большим разнообразием. Например, у пиявки *Helobdella austinensis* регуляция дорзо-вентральной разметки осуществляется не канонической парой Chordin/BMP2/4, а парой Gremlin/BMP5/8 (Kuo, Weisblat, 2011). У моллюска *Crepidula fornicata* (Lyons et al., 2020) экспрессия элементов BMP-каскада не имеет выраженной дорзо-вентральной полярности, и у этого вида BMP-каскад участвует лишь в организатор-независимой разметке передних структур. У аннелид *Chaetopterus pergamentaceus* и *Capitella teleta* дорзо-вентральная разметка зависит от активности Nodal-каскада, а не BMP-каскада (Lanza, Seaver, 2020a, 2020b). У других моллюсков, однако, наблюдается иная картина. У *Ilyanassa obsoleta*

организатор-зависимая дорзо-вентральная разметка зависит от Dpp/Bmp2/4 (Lambert et al., 2016); у *Crassostera gigas* *bmp2/4* и *chordin* экспрессируются на разных полюсах дорзо-вентральной оси (Tan et al., 2017), и недавно показано, что функция организатора спиралей в дорзо-вентральной дифференцировке зависит от градиента BMP-каскада, создаваемого вентрально экспрессирующимся *chordin* и более равномерно экспрессирующимся *bmp2/4* (Tan et al., 2022). Эта работа демонстрирует, что несмотря на значительное разнообразие молекулярных механизмов формирования дорзо-вентральной оси у спиралей, первоначальный механизм разметки мог быть сходен с общим для билатерий механизмом формирования градиента pSMAD1/5/8 с помощью секреции лигандов BMP2/4 и их антагонистов, в первую очередь Chordin (Bier, De Robertis, 2015).

Кроме регуляции дорзо-вентральной разметки в эмбриогенезе, у спиралей обнаружено участие пары BMP2/4/ADMP в поддержании дорзо-вентральной полярности на гораздо более поздних стадиях онтогенеза: у планарии *Schmidtea mediterranea* система BMP2/4/ADMP регулирует регенерацию дорзо-вентральной разметки у взрослой особи при парасагиттальной резекции (Gaviño, Reddien, 2011). Сходный механизм также обнаружен у группы *Xenacoelomorpha* (Srivastava et al., 2014), кледы со спорным филогенетическим статусом, которую относят или к вторичноротым, или к самым базальным билатериям, то есть, к сестринской для первичноротых и вторичноротых группе. Так или иначе, они эволюционно далеки от спиралей, и значит, подобный механизм регенерации может быть очень древним и консервативным для всех билатерий (Kimura et al., 2021).

У более примитивно устроенных животных, не обладающих билатеральной симметрией, гены элементов BMP-каскада также обнаружены, и, несмотря на то, что у просто устроенных животных нет вторичной, дорзо-вентральной, оси, и, следовательно, BMP-каскад должен участвовать в иных процессах, требующих межклеточной сигнализации, нежели дорзо-вентральная разметка, появляются данные, что участие BMP-каскада в формировании эмбриональных осей выходит за рамки билатерий. Например, показано, что у планул губок элементы BMP-каскада асимметрично экспрессируются вдоль передне-задней оси (Adamska et al., 2007). Также наблюдали гетерогенность экспрессии генов BMP-каскада у гребневиков (Pang et al., 2011). У трихоплакса обнаружена асимметрия экспрессии генов некоторых элементов BMP-каскада, таких как *bmp2/4*, *bmp3* и *chordin-like*, и на основании этих данных исследователями было выдвинуто предположение о гомологии «дорзо-вентральной» оси у трихоплакса и орально-аборальной оси книдарий (DuBuc et al., 2019).

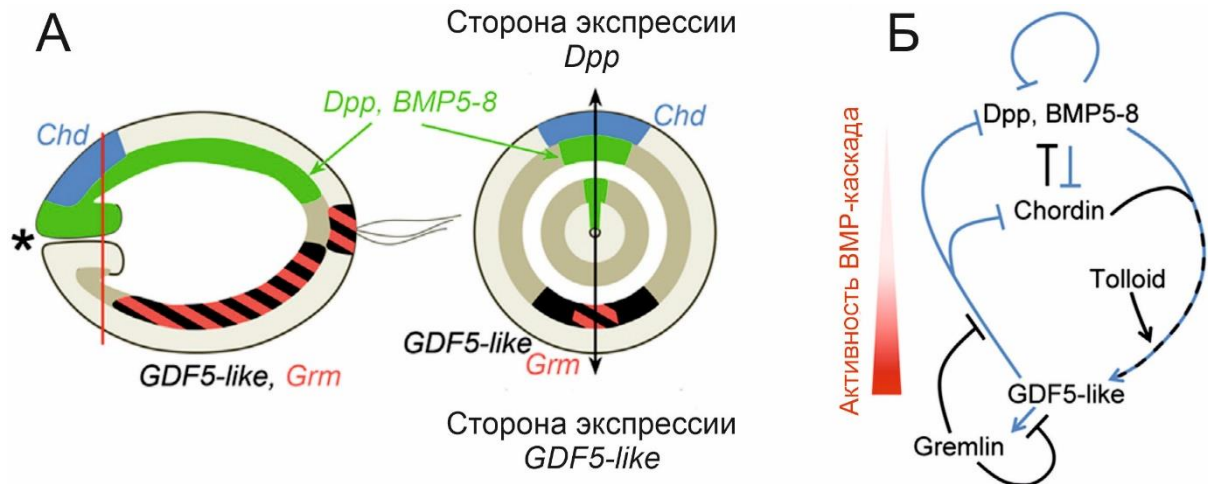


Рис. 15. Механизм дорзо-вентральной разметки у *N. vectensis*.

(А) Экспрессия элементов BMP-каскада вдоль директивной оси. Астериском обозначен оральный полюс. *Grm* – *Gremlin*. (Б) Схема функционирования генно-регуляторной сети, состоящих из элементов из (А).

В этой же статье авторы также продемонстрировали наличие гена *chordin* у губки *Oscarella carmela* и гена, содержащего фрагмент Chordin (CR-домен) у гребневика *M. leidy*.

Однако среди не-билатерий особый интерес имеют данные, полученные на модели нематостеллы (Рис. 15). Нематостелла относится к коралловым полипам (*Anthozoa*), для которых характерно наличие т.н. директивной оси – дополнительной оси симметрии, совпадающей со щелью ротового отверстия. Было показано, что на одном полюсе оси экспрессируется *chordin*, *dpp/bmp2/4* и *bmp5/8*, а на другом – BMP-лиганд *gdf5-like* и секретируемый ингибитор BMP-лигандов *gremlin*. На стороне, противоположной от той, где экспрессируется *chordin*, формируется зона фосфорилированного pSMAD1/5/8. Данный паттерн экспрессии напоминает паттерн, наблюдаемый у шпорцевой лягушки (ко-экспрессия *chordin/admp/bmp2* на дорсальной стороне, и *bmp4/7* на вентральной) и морского ежа (ко-экспрессия *chordin/admp1/bmp2/4* на вентральной стороне и экспрессия *admp2* на дорсальной). Было продемонстрировано, что градиент активности BMP-каскада, формируемого рассматриваемыми генами, регулирует разметку вдоль директивной оси, в частности, экспрессию *hox*-генов (ср. с регуляцией BMP-каскадом *hox*-генов у шпорцевой лягушки; Wacker et al., 2004). Подавление *dpp/bmp2/4* приводило к подавлению фосфорилирования SMAD1/5/8 на противоположном конце оси, что свидетельствует о наличии шаттлинга комплекса

Chordin::Dpp вдоль оси. Полученные данные по экспрессии генов BMP-каскада и консервативности механизма паттернинга (в первую очередь, шаттлинга, который обеспечивает дальное действие позиционной информации при разметке) свидетельствуют в пользу гомологии директивной оси и дорзо-вентральной оси билатерий (см. обзор Genikhovich, Technau, 2017). Учитывая, что нематостелла способна к эмбриональной регуляции, механизм саморегуляции директивной/дорзо-вентральной оси может быть эволюционно древним и иметь универсальные черты среди *Parahoxozoa*.

6.5. Молекулярные механизмы эмбрионального скейлинга.

6.5.1. Модели паттернинга. Градиентная модель Вольперта и Крика.

Реакционно-диффузионная модель Тьюринга.

В связи с явным прогрессом экспериментальной эмбриологии возникла закономерная потребность в теоретическом описании процессов морфогенеза, таких как дифференцировка, морфогенез, саморегуляция, и так далее. Безусловным прорывом в таком описании можно считать модель реакции-диффузии, сформулированную Аланом Тьюрингом в 1952 году (Turing, 1952). Эта модель предполагает наличие двух веществ-«морфогенов», реагирующих друг с другом определенным образом, причем диффузия одного вещества сильно выше, чем у другого. Если применить эти условия к изначально гомогенному клеточному полю эмбриона, где присутствуют только случайные флуктуации концентраций этих двух веществ, то некоторые флуктуации со временем будут амплифицироваться, тогда как другие будут гаситься. Таким образом, со временем в клеточном поле возникнет паттерн – чередующиеся зоны с высокой и низкой концентрацией морфогена. Данная модель была конкретизирована Гирером и Мейнхардтом (Рис. 16, А, Б; Gierer, Meinhardt, 1972; Meinhardt, 2008; Torii, 2012; Landge, 2020) предложившим частный случай модели Тьюринга – модель «активатор-ингибитор»: секретлируемое вещество-активатор способно активировать продукцию себя и своего ингибитора. При этом диффузия ингибитора гораздо больше, чем активатора. В клеточном поле случайные всплески концентрации активатора будут амплифицироваться за счет положительной обратной связи. Однако это приведет к продукции ингибитора, который, быстро удаляясь за счет диффузии из зоны амплификации активатора, подавляет синтез активатора в некоторой окрестности от зоны амплификации, не подавляя роста самой зоны. Функционирование такой системы приводит к образованию периодических

структур в изначально гомогенной среде. Изменяя параметры системы, можно менять форму и частоту паттерна (Рис. 16, В). В дальнейшем эта модель оказалась хорошо применима для описания ряда молекулярных механизмов формирования периодических эмбриональных структур, таких как полосы на коже рыбки данио (Nakamasu et al., 2009); или пальцы (Rasporovic et al., 2014), а также разметки трех зародышевых листков у позвоночных и определения границ эмбрионального организатора у морского ежа с помощью морфогена Nodal и его ингибитора Lefty (Müller et al., 2012; Almuedo-Castillo et al., 2018; Haillot et al., 2015). Однако, значительным недостатком классической реакционно-диффузионной схемы является ее неспособность к регуляции паттерна в зависимости от размера (Cooke, 1975). Поскольку эмбриональные регуляции являются неотъемлемой чертой развития большинства животных, впоследствии были предложены другие модели паттернинга.

6.5.2. Модели эмбрионального скейлинга.

6.5.2.1. Скейлинг в градиентной модели Вольперта-Крика.

Первые предположения о том, каким образом эмбриональное поле может саморегулироваться, появились одновременно с появлением первых моделей возможных механизмов дифференцировки зародыша. Первой такой моделью стала модель «французского флага» Л. Вольперта (Рис. 16, Г; Wolpert, 1968; Umulis, Othmer, 2013; Šarek, Müller, 2019). Согласно его гипотезе, разметка различных зачатков на клеточном поле происходит за счет формирования градиента морфогена. Клетки поля считывают концентрацию морфогена дискретно, воспринимая пороги концентрации, что обеспечивает формирование устойчивых зачатков («полос флага»). Если градиент линейен, то есть, концентрация морфогена представляет собой линейную функцию, то, как заметил Вольперт, при неизменности краевых условий, то есть концентрации морфогена по краям клеточного поля, скейлинг происходит автоматически. Эта модель была дополнена Ф. Криком (Crick, 1970), постулировавшим, что краевые условия должны задаваться с одной стороны притоком морфогена из источника, а с другой стороны поля – стоком из поля. Изначально в поле концентрация морфогена нулевая, но морфоген, диффундируя от источника к стоку, создает свой градиент, причем, как рассчитал Крик, градиент достигнет стационарного состояния за сравнимое с процессами морфогенеза время (Šarek, Müller, 2019). В модели Крика, так же, как и в модели Вольперта, при сохранении

краевых условий будет наблюдаться абсолютный скейлинг (Šarek, Müller, 2019). Однако, модель Вольперта-Крика является скорее умозрительной, поскольку не рассматривает вопрос о том, каким образом могут сохраняться краевые условия градиента при изменении размера клеточного поля (Šarek, Müller, 2019).

6.5.2.2. Скейлинг в модели синтеза-диффузии-деградации.

С накоплением данных о распространении морфогенов в живых системах, например, Dpp, Wingless и Bicoid у дрозофилы (Gregor et al., 2008; Kicheva et al., 2007), была предложена более реалистичная минимальная модель эмбрионального паттернинга – модель синтеза-диффузии-деградации (SDD): из источника исходит поток морфогена j_0 , который диффундирует с коэффициентом диффузии D вдоль клеточного поля длины L . Внутри клеточного поля происходит линейная деградация морфогена с коэффициентом k . При достижении системой равновесного состояния формируется экспоненциальный градиент морфогена с параметрами M_0 , характеризующим концентрацию морфогена вблизи источника, и λ – кривизной градиента (Рис. 16, Д). Для того, чтобы в системе происходил скейлинг, параметры уравнения градиента должны стать независимы от L . Этого можно достичь только изменением параметров j_0 , D , или k (Рис. 16, Е; Umulis, Othmer, 2013). Например, меняя лишь один параметр, увеличивая приток j_0 при изменении размера зародыша (например, при его росте), можно добиться определенной – хотя и не совершенной – переразметки (Šarek, Müller, 2019). Подобная модель скейлинга за счет модуляции притока морфогена была применена к скейлингу градиента транскрипционного фактора Bicoid при внутривидовой вариативности размера эмбрионов дрозофилы: у искусственно отобранных увеличенных эмбрионов наблюдалась увеличенная пропорционально объему продукция Bicoid на переднем конце, что обеспечивало приблизительно точный скейлинг (Рис. 16, Ж). Такой несовершенный, хотя и простой, механизм скейлинга может быть дополнительно скомпенсирован при дальнейшей дифференцировке (Cheung et al., 2011; Umulis, Othmer, 2013).

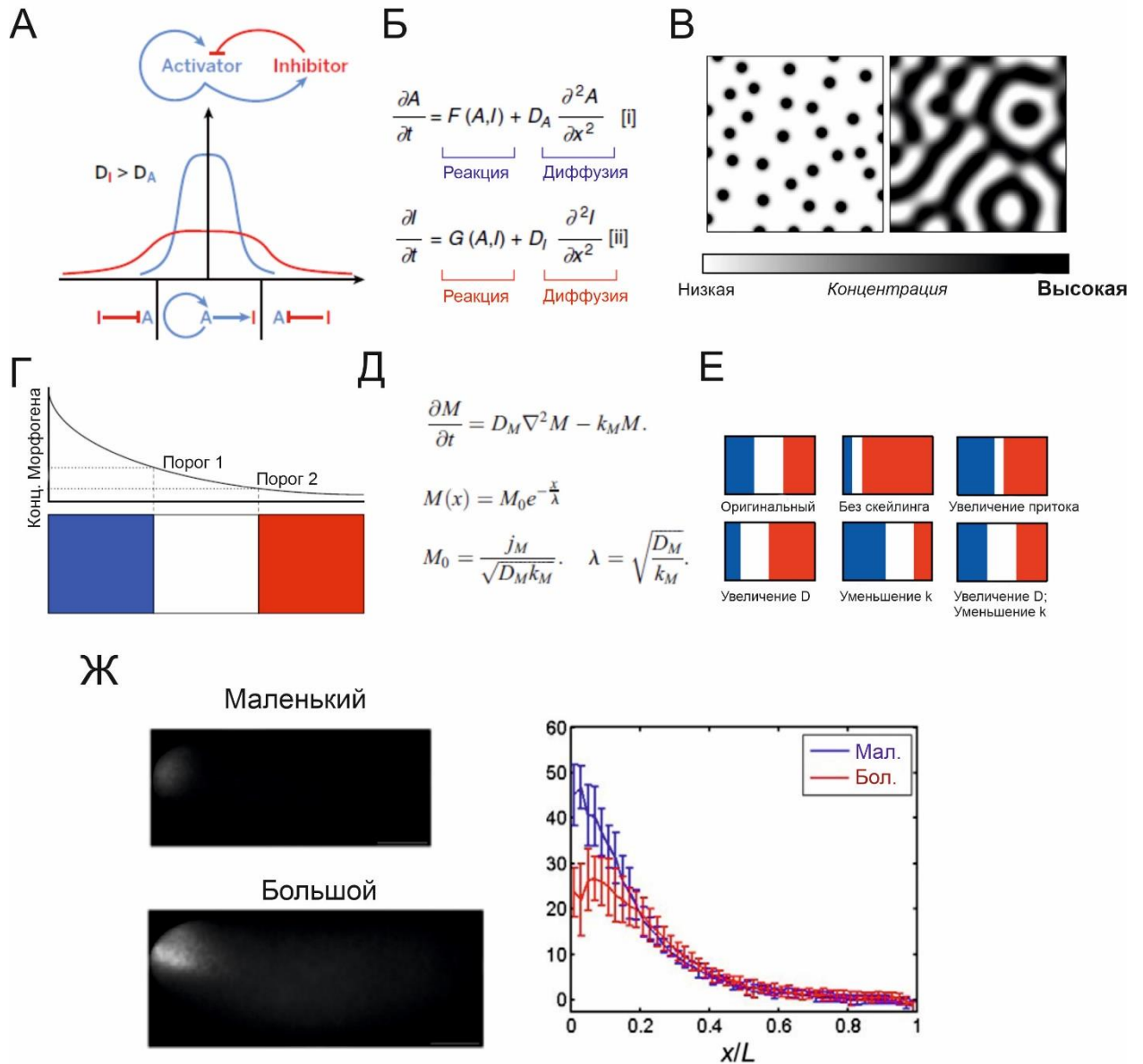


Рис. 16. Основные модели эмбрионального паттернинга: модели Тьюринга и градиентные модели Вольперта-Крика (из Cheung et al., 2011; Torii, 2012; Umulis, Othmer, 2013; Bier, De Robertis, 2015; Čapek, Müller, 2019; Landge et al., 2020, с изм.).

(А) Схема модели «активатор-ингибитор», основанной на модели реакции-диффузии Тьюринга. (Б) Простейшая система уравнений, описывающая модель «активатор-ингибитор». (В) Пример вариации паттерна в модели «активатор-ингибитор» при изменении лишь одного параметра. (Г) Модель «французского флага» Вольперта. (Д) Дифференциальная запись и решение модели «синтеза-диффузии-деградации» – усовершенствованной модели диффузионного градиента Ф. Крика. (Е) Анализ параметров модели «синтеза-диффузии-деградации» для обеспечения идеального скейлинга. (Ж) Пример «приблизительного» скейлинга градиента Bicoid путем изменения притока морфогена для внутривидовой вариации размера *D. melanogaster*.

6.5.2.3. Скейлинг с помощью размер-зависимого модулятора. Пассивная модуляция.

Совершенный скейлинг в модели синтеза-диффузии-деградации, как показал анализ *in silico*, возможен лишь при изменении двух параметров, например, D и k при неизменном j_0 (Рис. 16, E): для правильного скейлинга зародыша при его росте должна ускоряться диффузия и снижаться деградация морфогена. Таким образом, главным вопросом моделирования процессов скейлинга является вопрос о механизмах, с помощью которых эмбрион «чувствует» свой размер и подстраивает параметры градиента в реальном времени. Для этого на молекулы морфогена должны действовать другие молекулы-модуляторы, активность которых зависит от размера эмбриона. Такие модуляторы можно разделить на два класса: на активные модуляторы, чья активность зависит от концентрации морфогена в системе, и на пассивные модуляторы, чья активность преимущественно зависит только от размера эмбриона и слабо зависит от морфогена (Umulis, Othmer, 2013; Šapek, Müller, 2019). На сегодняшний день экспериментальное подтверждение нашли преимущественно модели, основанные на активной модуляции градиента. Основные типы таких моделей и экспериментально обнаруженные механизмы скейлинга, ими описываемые, будут рассмотрены далее.

Модели скейлинга с пассивной модуляцией основаны на включении в реакционную систему модулятора, изменяющего диффузию или деградацию морфогена, чья активность зависит только от размера эмбриона (Рис. 17, A). Такая зависимость может быть достигнута, к примеру, изменением концентрации модулятора в эмбрионе, когда меняется размер эмбриона, но не меняется скорость синтеза модулятора (Umulis, Othmer, 2013; Šapek, Müller, 2019). Например, в случае градиентов, образующихся в едином синцитии эмбрионов дрозофилы, в качестве пассивного модулятора предложили инвариантное от размера эмбриона количество ядер в синцитии. Ядра в данном случае могут выполнять функцию «ловушек», захватывающих морфоген и влияющих на деградацию или диффузию морфогена. Увеличение размера эмбриона приведет к «снижению концентрации» ядер в эмбрионе, и, следовательно, к изменению диффузии и деградации морфогена. Подобная схема была предложена для скейлинга градиента Bicoid для межвидовых вариаций размеров эмбрионов дрозофилы, хотя пока эта модель не нашла экспериментального подтверждения (Umulis, Othmer, 2013). Однако, пассивная модуляция градиента с помощью ядер кортекса была экспериментально продемонстрирована для градиента фосфорилированного pErk в эмбрионах дрозофилы (Correy et al., 2008).

Возможный пример пассивной модуляции градиента был недавно продемонстрирован в случае скейлинга трёх зародышевых листков эмбрионов рыбки данио (Almuedo-Castillo et al., 2018). Известно, что одним из основных морфогенов, ответственных за дифференцировку трёх зародышевых листков является Nodal, морфоген семейства TGF β (Schier, 2009). Формирование градиента Nodal происходит путем его взаимодействия со своим высокомолекулярным ингибитором Lefty и является одним из наиболее ясных примеров тьюринговского механизма «активатор-ингибитор», показанных экспериментально (Рис. 17 Б, В; Müller et al., 2012; Haillot et al., 2015). В развивающемся эмбрионе данио *nodal* и *lefty* ко-экспрессируются в т.н. краевой зоне – наиболее вегетативных клетках бластодермы. Активно диффундирующий Lefty быстро достигает анимального полюса, где заранее блокирует действие Nodal, что приводит к дифференцировке эктодермы. Клетки, находящиеся вегетативнее, находятся ближе к источнику Nodal и поэтому подвержены активации значительно более медленным Nodal-лигандом, что приводит к мезэндодермальной дифференцировке этих клеток. При удалении анимальных клеток размер клеточного поля сокращается, и Lefty быстрее достигает края поля по сравнению с не оперированными эмбрионами. Это приводит к формированию повышенной концентрации Lefty в межклеточном пространстве уменьшенных эмбрионов, и, следовательно, сужению градиента Nodal, что приводит к переразметке (Рис. 17, Г). Поскольку экспрессия *lefty* находится под положительным транскрипционным контролем Nodal-каскада, данный механизм можно рассматривать как пример активной модуляции типа «индуктор-контрактор» (см. далее; Nesterenko, Zaraisky, 2019). Авторами Almuedo-Castillo et al. (2018) показано, однако, что внешняя экспозиция как интактных, так и уменьшенных эмбрионов с белковой конструкцией Lefty1-GFP приводила к скейлингу градиента Nodal. Кроме того, при экспозиции эмбрионов с низкомолекулярным ингибитором Nodal-каскада уменьшенные эмбрионы требовали большей концентрации ингибитора для скейлинга эмбриона, чем интактные. Следовательно, данную модель скейлинга также можно отчасти рассматривать как модель с пассивной модуляцией (Čapek, Müller, 2019).

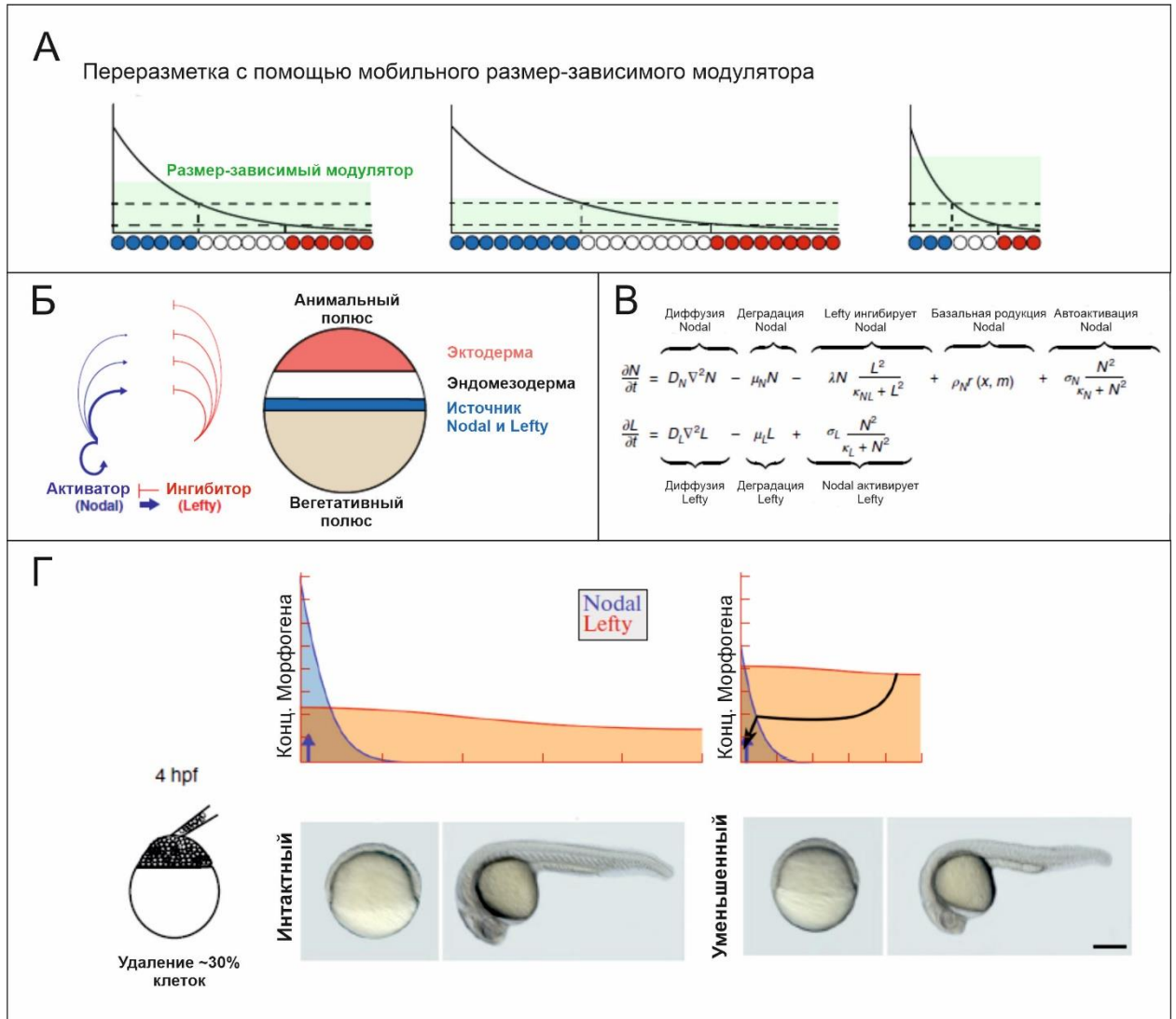


Рис. 17. Пассивная модуляция градиента с помощью мобильного модулятора (из Almedo-Castillo et al., 2018; Čapek, Müller, 2019; Nesterenko, Zaraisky, 2019, с изм.).

(А) Схема модели. (Б) Механизм разметки зародышевых листков у рыбки данио с помощью пары Nodal-Lefty. (В) Дифференциальная запись модели «активатор-ингибитор» на примере пары Nodal-Lefty. (Г) Механизм скейлинга градиента Nodal в уменьшенных эмбрионах данио. Слева показана схема удаления части клеток, в результате которой получали уменьшенные зародыши.

6.5.2.4. Активная модуляция. Модели «экспандер-репрессор» и «индуктор-контрактор».

Наиболее распространенной в исследованиях на данный момент моделью скейлинга можно считать модель «экспандер-репрессор» (Ben-Zvi, Barkai, 2010; см. напр. обзоры Ben-Zvi et al., 2011b; Shilo, Barkai, 2017; Ćarek, Müller, 2019). Данная модель постулирует наличие в клеточном поле двух веществ: репрессора и экспандера (Рис. 18, А). Репрессор представляет собой морфоген, который диффундирует из источника и формирует градиент, обеспечивая разметку поля. С противоположной от источника репрессора стороны располагается домен синтеза экспандера. Экспандер представляет собой модулятор морфогена, который усиливает диффузию (или же подавляет деградацию) репрессора. При этом репрессор ингибирует синтез экспандера при достижении репрессором пороговой концентрации. При распространении градиента репрессора всё больше клеток поля воспринимают пороговую концентрацию репрессора и прекращают синтез экспандера. При достижении пороговой концентрации репрессора во всём поле синтез экспандера в нём полностью подавляется, и диффузия репрессора прекращается. Если в процессе формирования градиента будет происходить рост поля, то домен, где экспрессируется экспандер, будет увеличиваться, а значит, будет увеличиваться продукция экспандера, и градиент будет расширяться пропорционально увеличившемуся полю, пока не произойдет подавление экспрессии экспандера во всём поле. Наоборот, при уменьшении размера эмбриона зона экспрессии экспандера будет сокращена, и, следовательно, будет затруднена диффузия репрессора. Эта модель, как показывают расчеты, обеспечивает идеальный скейлинг (Ben-Zvi, Barkai, 2010).

Модель «экспандер-репрессор» была применена к описанию целого ряда механизмов скейлинга в разных системах. Например, было предположено наличие пары «экспандер-репрессор» в процессе формирования градиента Dpp – ортолога BMP-лигандов позвоночных – при росте имагинального диска (зачатка крыла) дрозофилы (Рис. 17, Б). В данном случае экспрессия *dpp* происходит в узкой полоске, расположенной вдоль медио-латеральной оси, которая разделяет зачаток крыла приблизительно пополам на переднюю и заднюю части (Vuilleumier et al., 2010; Hamaratoglu et al., 2011). В обе половины происходит секреция Dpp, что приводит к формированию градиента морфогена. Интересно, что несмотря на то, что в процессе развития зачаток увеличивается в 60 раз, градиент Dpp идеально подстраивается под размер зачатка, что и вызвало у исследователей особый интерес к этому механизму. В результате был обнаружен

модулятор градиента Dpp – секретлируемый белок Pentagone. Pentagone связывается с гепаран-сульфат протеогликаном Dally и облегчает диффузию Dpp. При этом Dpp подавляет экспрессию *pentagone*, смещая её в латеральную область зачатка. Обнаруженные характеристики взаимодействия градиента Dpp и Pentagone, следовательно, идеально соответствовали модели «экспандер-репрессор» (Ben-Zvi et al., 2011a). Недавнее исследование, однако, опровергает функцию Pentagone в качестве экспандера: концентрация экспандера в клеточном поле должна быть достаточно равномерной для обеспечения скейлинга, что было экспериментально опровергнуто для градиента Pentagone. Авторами предложена альтернативная модель, в которой градиент Dpp подавляет деградацию своего лиганда путем весьма сложного механизма подавления функции своих рецепторов и ко-рецепторов, который, однако, также способен к скейлингу, как показывают расчеты авторов (Zhu et al., 2020). Несмотря на то, что механизм скейлинга градиента Dpp исключительно с помощью Pentagone подвергнут сомнению, взаимодействие Dpp и Pentagone *per se*, видимо, является высоко консервативным механизмом регуляции градиента BMP среди животных: схожий механизм взаимодействия пары Dpp-Pentagone был показан на модели растущего грудного плавника у данио. В данном случае, однако, авторами все же применена простомодель «экспандер-репрессор» для описания данного взаимодействия (Mateus et al., 2020).

Поскольку у уменьшенного эмбриона все органы должны соответственно пропорционально уменьшиться, то можно ожидать, что существуют отдельные механизмы скейлинга для органов. Например, у уменьшенных эмбрионов данио также уменьшается размер нервной трубки. Было показано, что при этом происходит скейлинг всех 13 доменов нервной трубки. Предполагается, что скейлинг может происходить с помощью регуляции градиента Sonic Hedgehog – морфогена, секретлируемого в вентральной нервной трубке и необходимого для разметки вентральной её части. При этом в качестве экспандера служит секретлируемый матриксный белок Scube2: Sonic Hedgehog подавляет экспрессию *scube2*, который в свою очередь распространяет градиент первого (Рис. 18, В; Collins et al., в печати; Čapek, Müller, 2019).

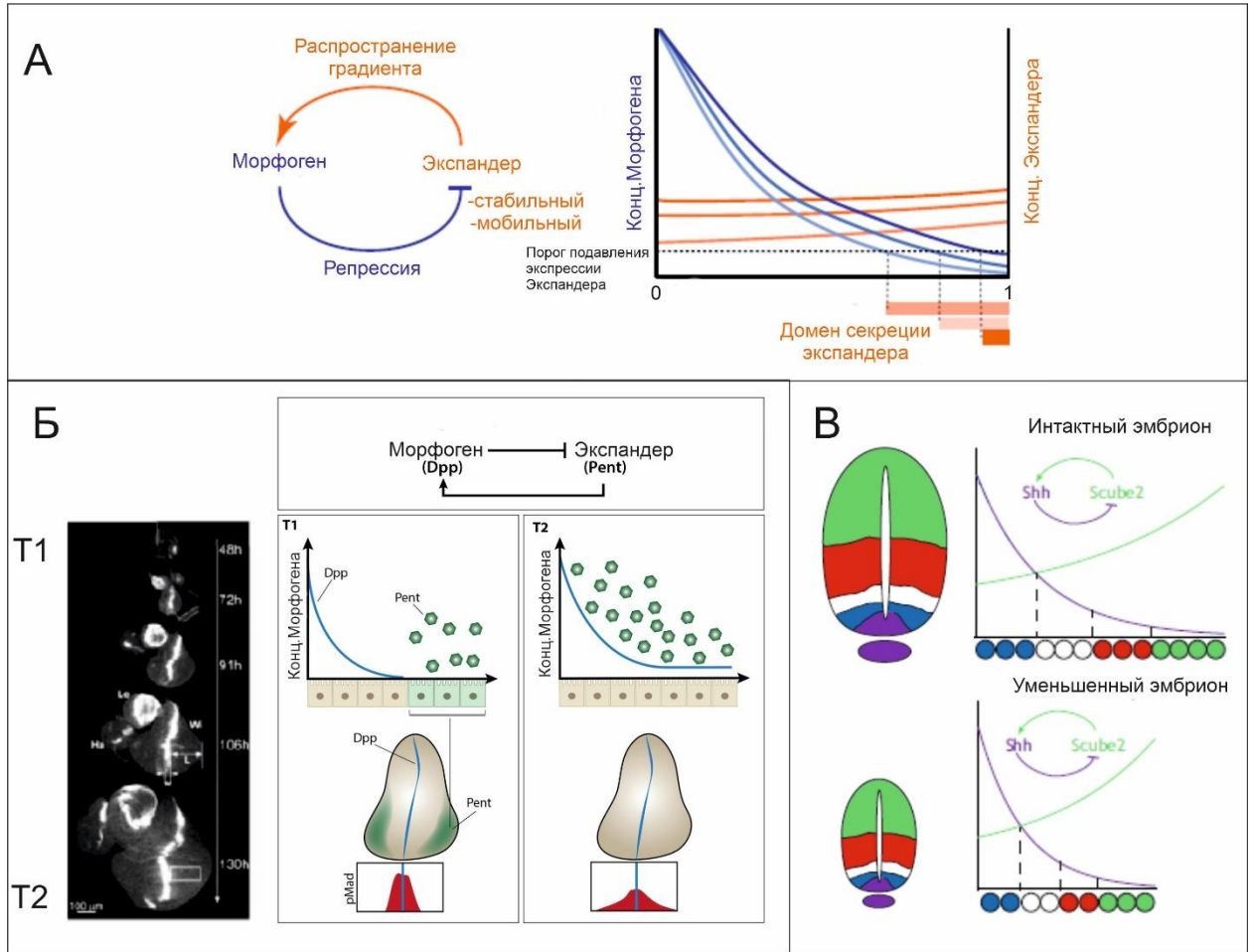


Рис. 18. Модель «экспандер-репрессор» (из Ben-Zvi et al., 2011b; Shilo, Barkai, 2017; Ćarek, Müller, 2019, с изм.).

(А) Схема модели. (Б) В растущем имагинальном диске (от времени T1 до T2) происходит пропорциональное росту расширение градиента Dpp за счет активности Pentagone по механизму «экспандер-репрессор». (В) Модель скейлинга нервной трубки с помощью пары Sonic Hedgehog (Shh) и Scube2 по механизму «экспандер-репрессор».

«Зеркальной» моделью к модели «экспандер-репрессор» является модель «индуктор-контрактор», которая также обладает свойством скейлинга (Ćarek, Müller, 2019; Nesterenko, Zaraisky, 2019). К модели этого типа можно отнести рассмотренный ранее механизм скейлинга градиента Nodal у данио (Almuedo-Castillo et al., 2018), а также механизм тонкой регуляции активности Toll-каскада на вентральной стороне эмбриона дрозофилы с помощью индуцируемого Toll-каскадом ингибитора Toll-рецептора WntD (Rahimi et al., 2016).

6.5.2.5. Модели скейлинга дорзо-вентральной оси.

Модель «экспандер-репрессор» была изначально сформулирована для механизма ADMP-зависимой саморегуляции дорсальных половин бластул шпорцевой лягушки (Spemann, 1903, из Čapek, Müller, 2019; Reversade, De Robertis, 2005; Ben-Zvi et al., 2008; Ben-Zvi, Barkai, 2010). Действительно, если произвести нокдаун *admp* в отделенных дорсальных половинах бластулы (Рис. 19, Б), то в них не будет происходить регуляции паттерна и восстановления вентрального зачатка (Рис. 19, Б', Б''). Как отмечалось выше, зона экспрессии *admp* и *bmp2* находится на противоположном полюсе эмбриона от зоны экспрессии прочих BMP-лигандов и совпадает с зоной экспрессии их антагониста *chordin*. При этом ADMP способен, как и прочие белки BMP, активировать BMP-каскад, однако активация BMP-каскада приводит к подавлению *admp*, а не активации, как в случае остальных BMP-лигандов -4 и -7 (Рис. 19, А; Reversade, De Robertis, 2005). Исходя из этих данных была сформулирована простейшая модель ADMP-зависимой регенерации вентрального зачатка: ко-экспрессия *chordin* и *admp* приводит к образованию подвижного комплекса Chordin::ADMP или Chordin::BMP2, у которых скорость диффузии намного выше, чем у несвязанного ADMP или BMP2, имеющего гепаран-сульфат-связывающий сайт, затрудняющий диффузию (Орлов и др., 2017). С помощью механизма шаттлинга, аналогичного шаттлингу у дрозофилы, комплекс перемещается на вентральную сторону, где ADMP высвобождается и активирует BMP-рецепторы. При удалении вентральной половины бластулы ADMP достигает нового вентрального полюса эмбриона и регенерирует зону активности BMP-каскада *de novo* за счет положительной обратной связи между BMP-каскадом и *bmp4/7*. Восстановленный градиент BMP-каскада в свою очередь ограничивает дорсализацию и, соответственно, экспрессию *admp* в дорсальной области (Рис. 19, В). В данной модели экспандером является ADMP, поскольку за счет своего шаттлинга и активации в вентролатеральном домене приводит к распространению градиента активности BMP-каскада. Соответственно, репрессором является градиент активности BMP-каскада, ограничивающий экспрессию *admp* в крайней дорсальной области (Ben-Zvi, et al., 2008; Ben-Zvi, Barkai, 2010).

Кроме ADMP таким же важным участником регуляции дорсальной половины бластулы у шпорцевой лягушки является секретлируемый Frizzled-подобный белок Sizzled (Рис. 19, Г, Г'); Lee et al., 2006; Inomata et al., 2013). В отличие от прочих секретлируемых Frizzled-подобных белков Sizzled не имеет Wnt-блокирующей функции, но способен ингибировать протеазу Tolloid, расщепляющую Chordin. Несмотря на то, что *sizzled*

экспрессируется в вентральном центре и находится под положительным транскрипционным контролем BMP-каскада, *Sizzled* имеет анти-BMP активность – пример, аналогичный паре ADMP-Chordin на дорсальной стороне (Рис. 19, А). В данном случае экспандером является *Sizzled*, который способствует распространению градиента репрессора Chordin (градиент ингибирования BMP-каскада) путем блокирования его протеолитической деградации. При удалении вентральной части зародыша удаляется также источник секреции *Sizzled*, что приводит к активации протеолиза Chordin и, следовательно, скейлингу градиента (Рис. 19, Д).

6.5.2.6. Поиск новых модуляторов. Скейлеры.

В ходе анализа параметров двух основных типов моделей скейлинга «экспандер-репрессор» и «индуктор-контрактор» (Нестеренко, Зарайский, 2019) было выявлено важное их свойство: для обеспечения идеального скейлинга градиента морфогена (репрессора и индуктора, соответственно) в эмбрионах различного размера концентрации молекул экспандера или контрактора в большом и уменьшенном эмбрионе должны существенно различаться (Рис. 20; Orlov et al., 2022). Из этого следует, что новые модуляторы морфогенетических градиентов (скейлеры) могут быть найдены путем сравнения концентраций веществ (например, мРНК модулятора или непосредственно молекул модулятора) в нормальных и уменьшенных эмбрионах. Интересно, что это различие было недавно продемонстрировано для уже обнаруженных скейлеров ADMP и *Sizzled*: на транскрипционном уровне с помощью количественного ПЦР было показано сильное различие в уровне экспрессии *admp* и *sizzled* при натуральной вариабельности размеров эмбрионов шпорцевой лягушки (Leibovich et al., 2020). Кроме того, есть свидетельства об изменении экспрессии *sizzled* при регуляции сагиттально разрезанной бластулы шпорцевой лягушки (Sosa et al., 2019). Следовательно, омиксные технологии (например, сравнение транскриптома или протеома интактных и уменьшенных зародышей) могли бы помочь обнаружить новые механизмы модуляции морфогенетических градиентов при эмбриональной регуляции (Нестеренко, Зарайский, 2019).

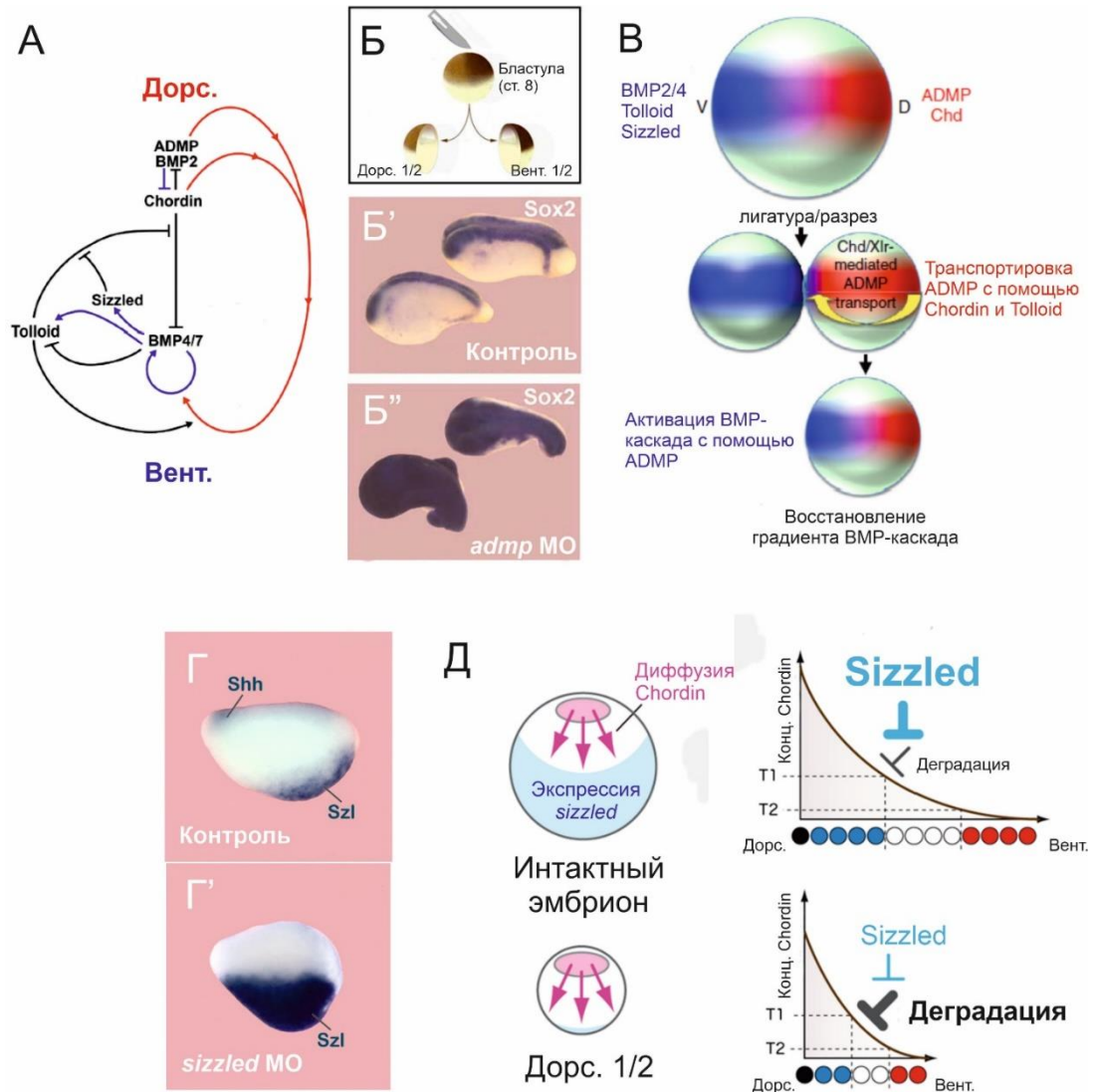


Рис. 19. Модели скейлинга дорзо-вентральной оси эмбрионов шпорцевой лягушки (из Reversade, De Robertis, 2005; Lee et al., 2006; Umulis et al., 2009; Inomata et al., 2013; Inomata, 2017; De Robertis, Tejeda-Muñoz, 2022, с изм.).

(А) Схема взаимодействия BMP-лигандов и их модуляторов при паттернинге дорзо-вентральной оси шпорцевой лягушки. (Б) Схема опыта по получению уменьшенных эмбрионов из дорсальных эксплантатов бластулы. (Б'-Б'') Нормальный скейлинг в дорсальных эксплантатах контрольных эмбрионов (Б') и нарушенный скейлинг эмбрионов с подавленной трансляцией *admp* MO, определенный с помощью анализа экспрессии маркера нейроэктодермы *sox2*. (В) Модель *Admp*-зависимой регенерации вентрального зачатка в дорсальных эксплантатах. (Г-Г') Нормальный скейлинг в дорсальных эксплантатах контрольных эмбрионов (Г) и нарушенный скейлинг эмбрионов с подавленной трансляцией *sizzled* (Г'), определенный с помощью анализа экспрессии маркера дорсальной мезодермы *sonic hedgehog* (*shh*) и маркера вентральной мезодермы *sizzled* (*szl*). (Д) Модель скейлинга градиента Chordin в дорсальных половинах разрезанных бластул с помощью Sizzled.

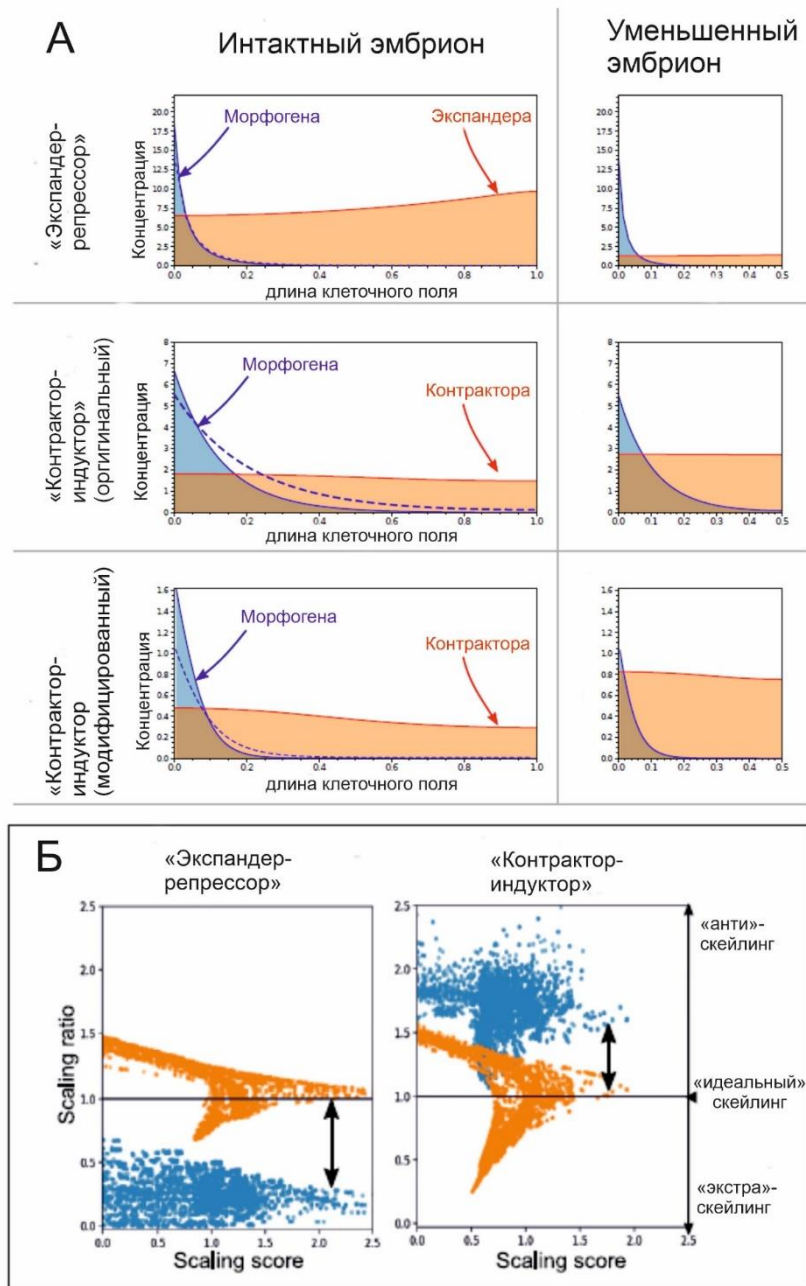


Рис. 20. Анализ существующих моделей скейлинга. Введение понятия «скейлер» (из Orlov et al., 2022 с изм.).

(А) Графическое представление значительного изменения концентрации модулятора градиента (модуляторы, значительно изменяющие свою концентрацию при скейлинге было решено назвать скейлерами) при скейлинге в моделях «экспандер-репрессор» и «индуктор-контрактор». (Б) *In silico* анализ параметров моделей из (А), при которых достигается скейлинг. На оси абсцисс обозначен параметр *Scaling score*, который характеризует качество скейлинга. На оси ординат отложен параметр *Scaling ratio*, обозначающий отношение концентрации вещества в интактном и уменьшенном эмбрионе. Видно, что при идеальном скейлинге концентрация морфогена (оранжевый) в эмбрионах разного размера практически не меняется. Однако у модуляторов-скейлеров (синий) при идеальном скейлинге (*Scaling score* ~2.0) происходит резкое изменение концентрации в системе (обозначена стрелкой).

7. Результаты.

7.1. Все известные модели скейлинга, основанные на модуляции

морфогенетического градиента, имеют элементы со значительной разницей в концентрации.

Как было показано в обзоре литературных данных, большинство моделей формирования морфогенетических градиентов основаны на механизме синтеза-диффузии-деградации. Среди них можно выделить модели скейлинга: «экспансии-репрессии» (RE) и «контракции-индукции» (IC) (Almuedo-Castillo et al., 2018; Ben-Zvi and Barkai, 2010; Eldar et al., 2002; Šapek, Müller, 2019; Genikhovich et al., 2015; Kicheva et al., 2007). В RE-моделях всегда можно выделить элемент, участвующий в расширении градиента морфогена («экспандер»), а в IC-моделях, соответственно, «контрактор» морфогена (Рис. 20, А). Несмотря на то, что моделей скейлинга достаточно много, большинство из них так или иначе сводимы к RE- и IC-моделям. Используя метод, описанный у Ben-Zvi и Barkai (2010) было проанализировано более 400 000 наборов параметров таких моделей (Orlov et al., 2022). Во время этого теста была проанализирована способность градиента BMP-каскада к скейлингу в уменьшенных эмбрионах с помощью вычисления параметра, характеризующего инвариантность градиента при скейлинге (Scaling score, Ss), а с помощью вычисления параметра, характеризующего изменение концентраций веществ при скейлинге (Scaling ratio, Sr) рассчитывалась инвариантность концентраций веществ при скейлинге. Оказалось, что чем выше качество скейлинга градиента в модели (большие значения Ss), тем больше различалась концентрация экспандеров и контракторов в эмбрионах нормального и уменьшенного размера (Рис. 20, Б). Таким образом экспандеры/контракторы могут быть размер-зависимыми модуляторами градиентов, или «скейлерами». Данный результат имеет важное практическое следствие. Например, сравнивая нормальные и уменьшенные эмбрионы на уровне генома, транскриптов или белков с помощью омиксных технологий, можно найти новые механизмы скейлинга морфогенетических градиентов. В данной работе были проанализированы уровни мРНК в нормальных и уменьшенных эмбрионах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*.

7.2. 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 Cooke, Webber (1985

a,b) по разделению и инкубированию левого и правого бластомера дробящейся зиготы (Рис. 21, 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. 21, Г; маркер *sox2*) и сомитной мезодермы (Рис. 21, Д; маркер *cardiac actin*). Однако, у таких эмбрионов наблюдалась диспропорционально большой зачаток хорды (Рис. 21, Е; окрашивание на маркер *chordin*). Интересно, что в работе Cooke, Webber (1985b) также наблюдалось диспропорциональное увеличение осевой мезодермы. Однако, подобные анализированным эмбрионы (около 70% пар) тем не менее развивались в нормально сложенных головастиков (Рис. 21, 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 (adjusted p-value < 0.1) в интактных и полученных из разделенных бластомеров эмбрионах (Таблица 1; Рис. 21, З). Важно, что, хотя и с несколько меньшей статистической достоверностью (adjusted p-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. 21, Ж, И). Кодированный фермент является секретлируемой протеазой ряда сигнальных факторов, ассоциированных с внеклеточным матриксом (Agnihotri et al., 2001; Chin et al., 1985; Ito et al., 1996; Stegemann et al., 2013), 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 (Ben-Zvi et al., 2008; Reversade, De Robertis, 2005; Inomata et al., 2013; Plouhinec et al., 2013; Moriyama, De Robertis, 2018). 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. 22, 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 (Reversade, De Robertis, 2005). Тогда как экспрессия *sizzled* снижалась только в дорсальной части, но сильно увеличивалась в вентральной, что можно объяснить разной активностью BMP-каскада в дорсальных и вентральных половинках, влияющей на экспрессию *sizzled* (Lee et al., 2006; Inomata et al., 2013). 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. 22, Б). 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 эксплантах бластулы, которые не способны к регуляции), во-вторых, не является артефактом в результате проведенной операции по разделению бластомеров, о чем говорят данные по удалению отдельных бластомеров на более поздних стадиях. 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	220.76	48.66	0.22	-2.18	1.88E-05	0.0194
<i>tp63.S</i>	tumor protein 63 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>atp6v1c2.L</i>	v-type 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	-1.61	2.01E-06	0.0039
<i>Xelaev18009066m</i>	mast stem cell growth factor receptor kit	690.02	251.64	0.36	-1.46	1.35E-06	0.0029
<i>actg1.S</i>	cytoplasmic type 5 isoform x1	5640.72	16320.38	2.89	1.53	1.47E-08	0.0001
<i>znf34.L</i>	krueppel-like factor 5 isoform x1	533.11	176.57	0.33	-1.59	7.65E-07	0.0025
<i>Xetro180028501m.1</i>	vcl 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	0.0026
<i>slc16a8-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	3169.98	1017.47	0.32	-1.64	1.08E-06	0.0026
<i>actg1.L</i>	cytoplasmic 2	2336.81	5389.94	2.31	1.21	1.11E-05	0.0145
<i>Xelaev18043710m</i>	--NA--	2285.38	5023.72	2.20	1.14	2.36E-05	0.0230
<i>Xelaev18036326m</i>	hepcidin 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	2.63E-06	0.0047
<i>szl.L</i>	<i>Xelaev18017689m.g</i>	1326.51	502.38	0.38	-1.40	0.000343837	0.2316

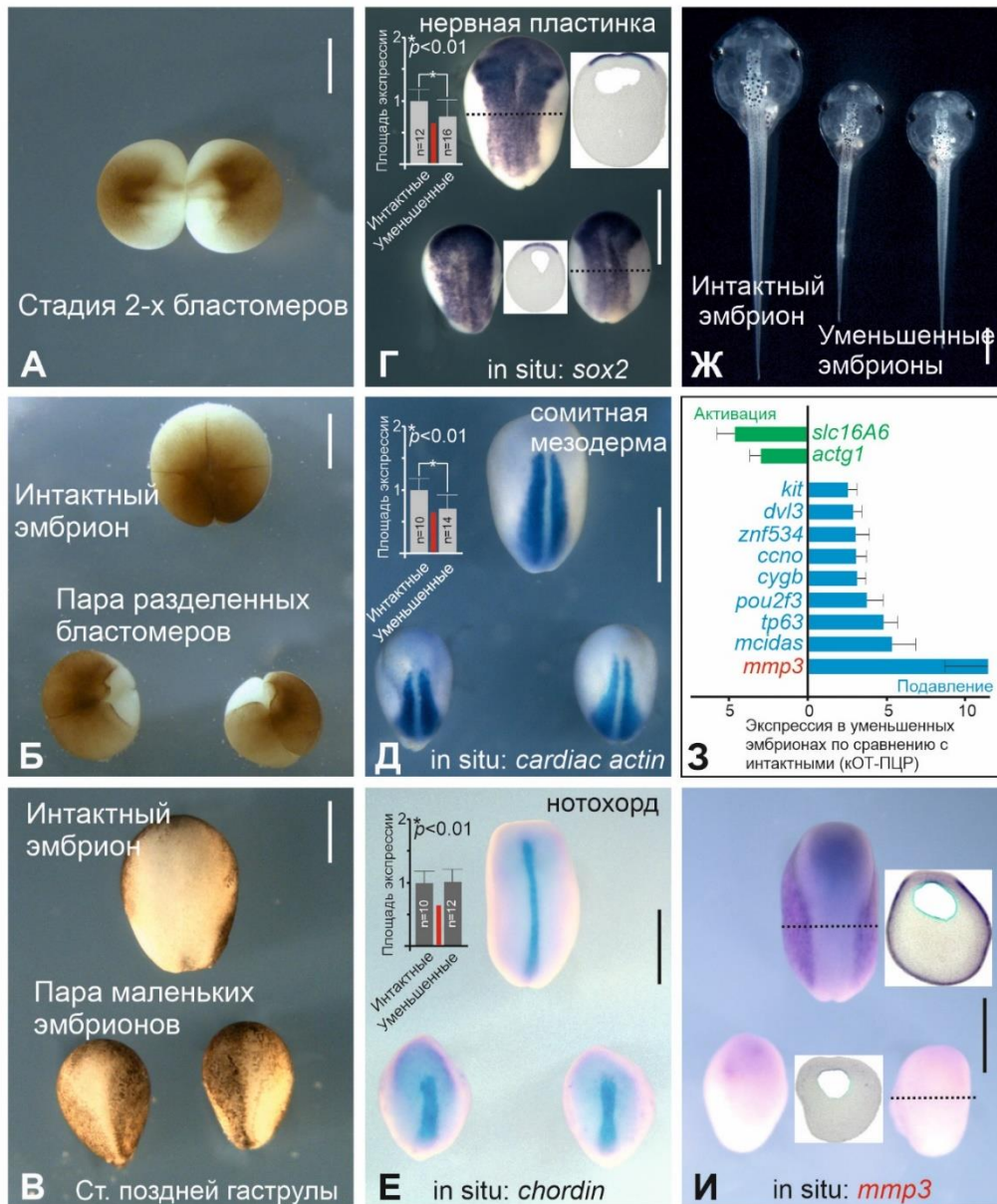


Рис. 21. Получение уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки и поиск потенциальных скейлеров.

(А-В) Получение уменьшенных эмбрионов путем разделения левого и правого бластомера на стадии 2-х клеток с последующим инкубированием пар сдостадии поздней гастрюлы/ранней рейрулы. (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.

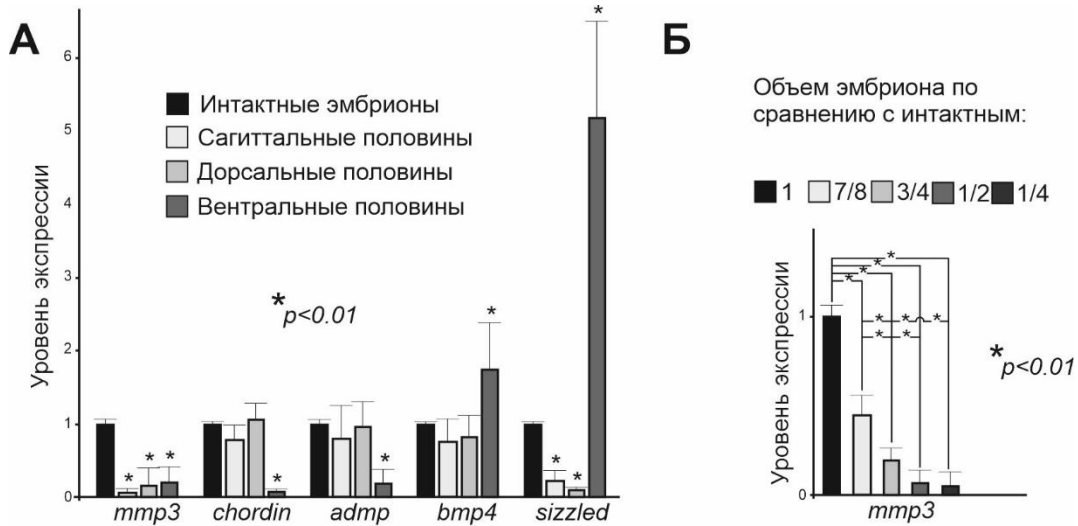


Рис. 22. кОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов эмбрионов шпорцевой лягушки на стадии поздней гастрюлы (стадия 12.5).

(А) Эмбрионы уменьшались с помощью рассечения бластул (стадия 8) в сагиттальной плоскости на пару сагиттальных половин или во фронтальной плоскости на дорсальную и вентральную половину. При этом экспрессия *mmp3* снижается во всех типах половин. Экспрессия *sizzled* снижалась только в сагиттальных и дорсальных половинах, но росла в вентральных. Для проверки корректности опыта также анализировалась экспрессия *chordin*, *admp* и *bmp4*. Полученные уровни экспрессии этих генов для разных типов половин совпадают с литературными данными (Reversade, De Robertis, 2005; Lee et al., 2006; Inomata et al., 2013). (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.

7.3. Исследование экспрессии гена *матриксной 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. 23, А, Б, В). Затем, в конце гастрюляции, экспрессия *mmp3* в дорсальной эктодерме падает, но сохраняется в дорсальной мезодерме (Рис. 23, 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 23, 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* (Inomata et al., 2013; Khokha et al., 2005; Plouhinec, De Robertis, 2009). Следует заметить, что и во время гастрюляции *mmp3* также экспрессируется рядом с щелью Браше.

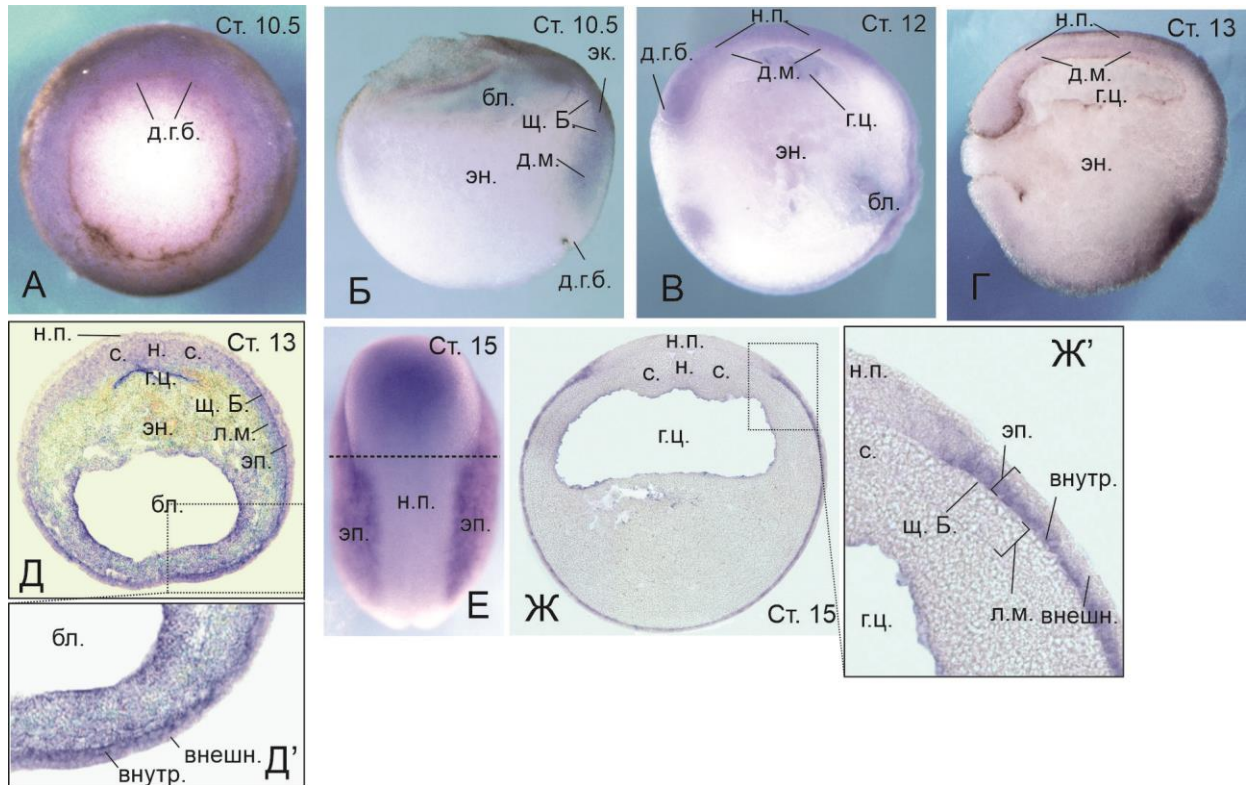


Рис. 23. Анализ экспрессии гена матриксной металлопротеиназы-3 в раннем развитии шпорцевой лягушки с помощью гибридизации с антисмысловым зондом к *tmpr3*.

(А) Экспрессия *tmpr3* на ранней гаструре (стадия 10.5), вид со стороны желточной пробки. (Б) Сагиттальный срез эмбриона, аналогичного в (А). (В) Сагиттальный срез средней/поздней гастреры (стадия 12). (Г) Сагиттальный срез поздней гастреры/ранней нейрулы (стадия 13). (Д) Трансверсальный срез эмбриона, аналогичного в (Г). (Д') Экспрессия *tmpr3* в эпидермисе. (Е) Экспрессия *tmpr3* 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 *tmpr3* 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.

7.4. Нокдаун *tmpr3* приводит к уменьшению сомитной мезодермы и нервной пластинки, но одновременно к увеличению нотохорда.

Для того, чтобы определить, действительно ли *tmpr3* вовлечен в разметку ранних эмбрионов шпорцевой лягушки, был использован метод специфичного подавления трансляции белка с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов. В результате инъекции морфолино к *tmpr3* (*tmpr3*-МО, 5 пмоль/эмбрион) происходило уменьшение нервной пластинки и сомитной мезодермы (маркеры *sox2* и *cardiac actin*, соответственно) (Рис. 24, А-Б"), что согласуется с наблюдаемой переразметкой (скейлингом) этих структур в уменьшенных эмбрионах (Рис. 24, В-Г"). Интересно, что с

уменьшением сомитной мезодермы и нейроэктодермы при подавлении трансляции *mtpr3* происходило увеличение зачатка хорды, что также согласуется с данными о непропорциональном увеличении размера хорды при переразметке уменьшенных зародышей (антискейлинге) (Рис. 24, Д-Е’). Корректность полученных с помощью морфолино данных была проверена с помощью восстановления активности *Mtpr3* в зародышах путем ко-инъекции *mtpr3-МО* и 20 пг/эмбрион мРНК *mtpr3*, лишенной сайта связывания с этим морфолино, что приводило к частичному восстановлению фенотипа, вызванного инъекцией анти-*mtpr3* морфолино (Рис. 25). Кроме этого, была проверена возможность получения недостоверных данных о размерах эмбриональных зачатков из-за возможного изменения их толщины вследствие изменения клеточных движений при инъекции анти-*mtpr3* морфолино или после операции по уменьшению зародышей: инъекция *mtpr3-МО* или уменьшение эмбрионов не приводила к существенному изменению толщины зачатков хорды и сомитов, следовательно, оценка их объема с помощью измерения площади проекции зачатков на поверхность эмбрионов позволяет корректно измерять изменение размеров зачатков (Рис. 26). Важность активности *Mtpr3* для переразметки эмбриональных зачатков при регуляции эмбриона была также дополнительно подтверждена в опытах по оверэкспрессии *mtpr3* в целых и уменьшенных эмбрионах (Рис. 27). Так, инъекция 20 пг/эмбрион мРНК *mtpr3* приводит к расширению нервной пластинки и сомитов у целых эмбрионов и у уменьшенных эмбрионов (Рис. 27, А-А’’, Б-Б’’, Г-Г’’, Д-Д’’), сильно нарушая нормальную эмбриональную переразметку у последних. Аналогично, инъекция мРНК *mtpr3* вызывает сужение хорды у целых и уменьшенных эмбрионов по сравнению с неинъецированными (Рис. 27, В-В’’, Е-Е’’). Параллельно с мРНК *mtpr3* также производилась инъекция *mtpr3-МО* в те эмбрионы, которые затем подвергались разрезанию: поскольку в уменьшенных эмбрионах эндогенный уровень мРНК *mtpr3* должен быть очень низок, то дополнительный нокдаун *mtpr3* с помощью морфолино не имел выраженного эффекта, что подтверждает функциональную значимость изменения экспрессии *mtpr3* для эмбриональной переразметки в уменьшенных зародышах (Рис. 27, А’’, Б’’, В’’).

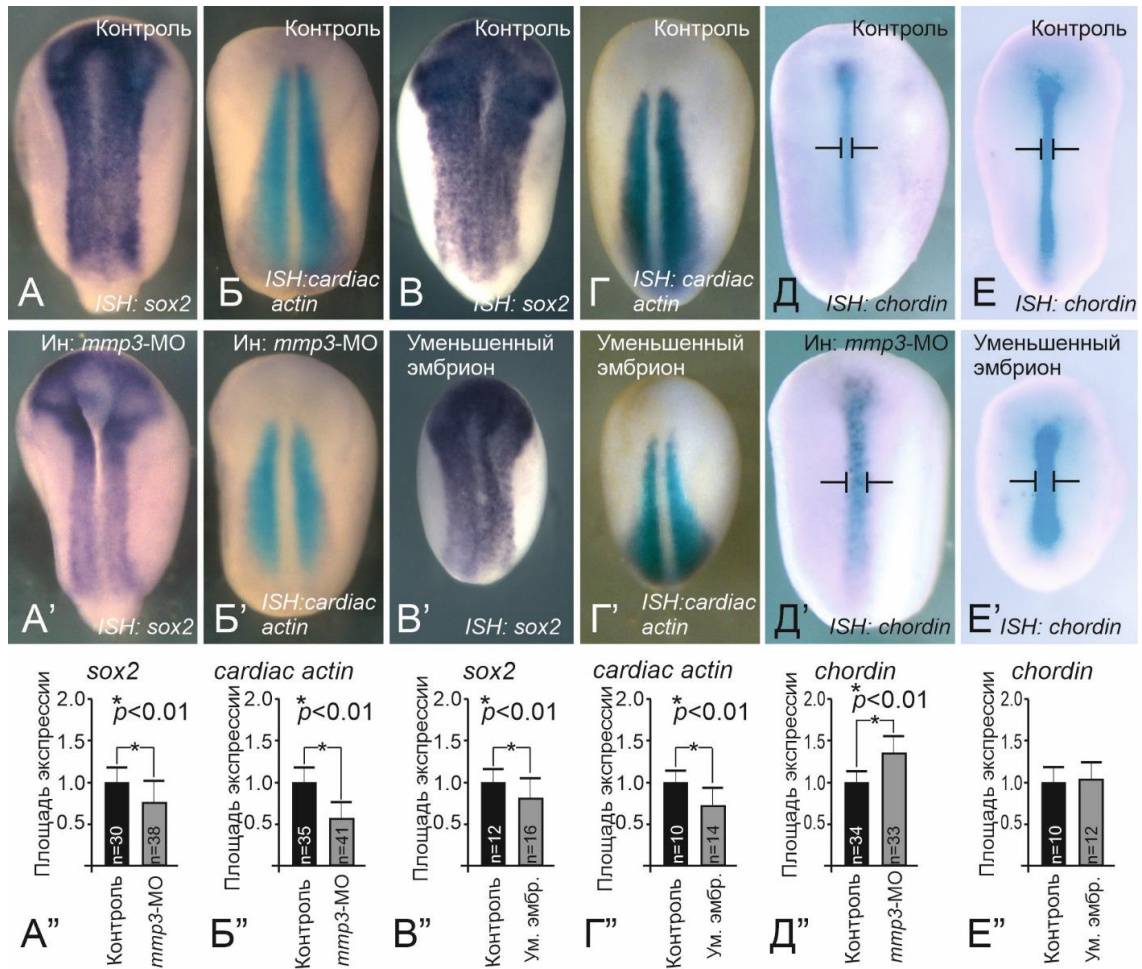


Рис. 24. Эффект нокадауна *ttp3* на экспрессию осевых маркеров эмбрионов шпорцевой лягушки.

(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. Обозначения: ум. эмбр. – уменьшенный эмбрион.

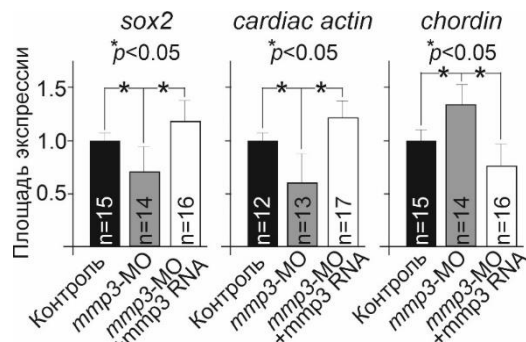


Рис. 25. Восстановление эффектов, вызванных *ttp3*-МО, с помощью ко-инъекции *ttp3*-МО и мРНК *ttp3*, лишенной сайта связывания с *ttp3*-МО.

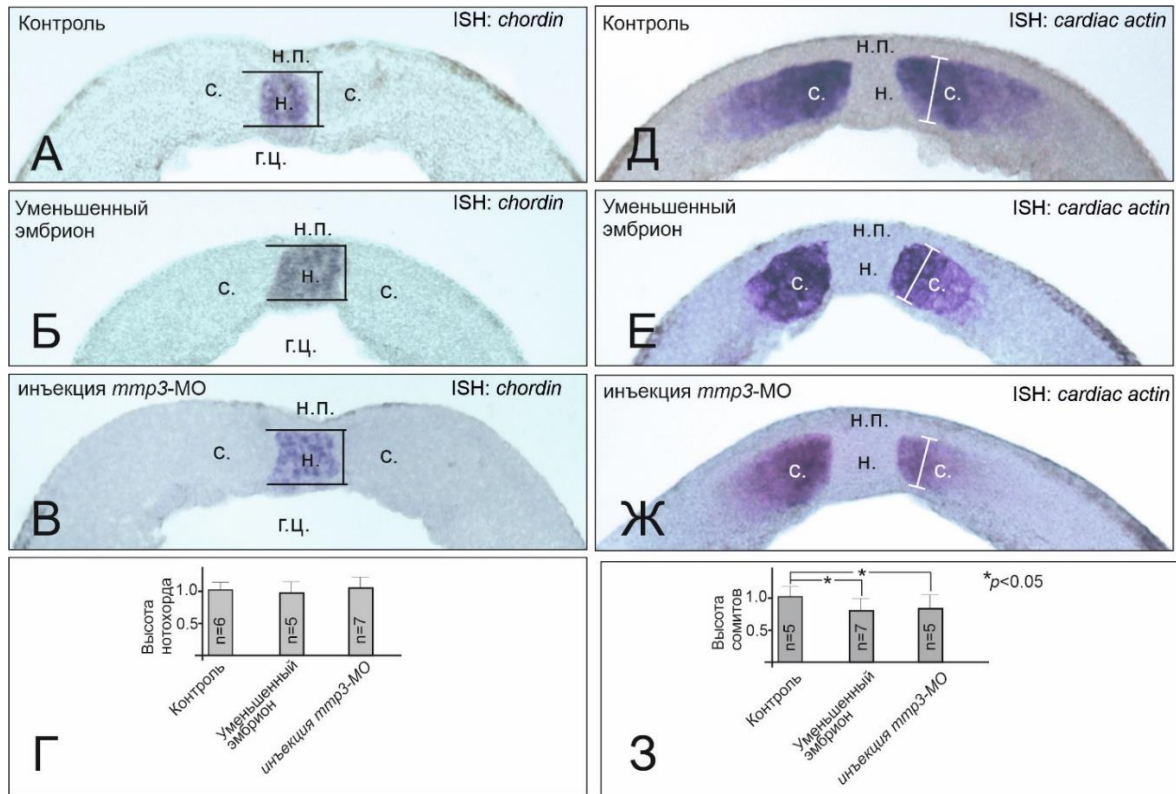


Рис. 26. Эффект инъекции *ttp3-MO* и операции по уменьшению зародышей на толщину зачатков хорды и сомитов.

(А) Сагиттальный срез контрольного эмбриона, окраска на *chordin*. (Б) Сагиттальный срез уменьшенного эмбриона, окраска на *chordin*. (В) Сагиттальный срез эмбриона, инъекцированного *ttp3-MO*, окраска на *chordin*. (Г) Расчет толщины зачатка хорды в образцах. (Д) Сагиттальный срез контрольного эмбриона, окраска на *cardiac actin*. (Е) Сагиттальный срез уменьшенного эмбриона, окраска на *cardiac actin*. (Ж) Сагиттальный срез эмбриона, инъекцированного *ttp3-MO*, окраска на *cardiac actin*. (З) Расчет толщины сомитов в образцах. Толщина сомитов у уменьшенных эмбрионов и эмбрионов, инъекцированных *ttp3-MO* несколько ниже, чем у контрольных. Однако, поскольку в рассматриваемых экспериментах наблюдается только уменьшение сомитов, то оценка разницы объемов зачатков сомитов при экспериментальном воздействии остается корректной. Обозначения: г.ц. – гастроцель; н. – нотохорд; н.п. – нервная пластинка; с. – сомит.

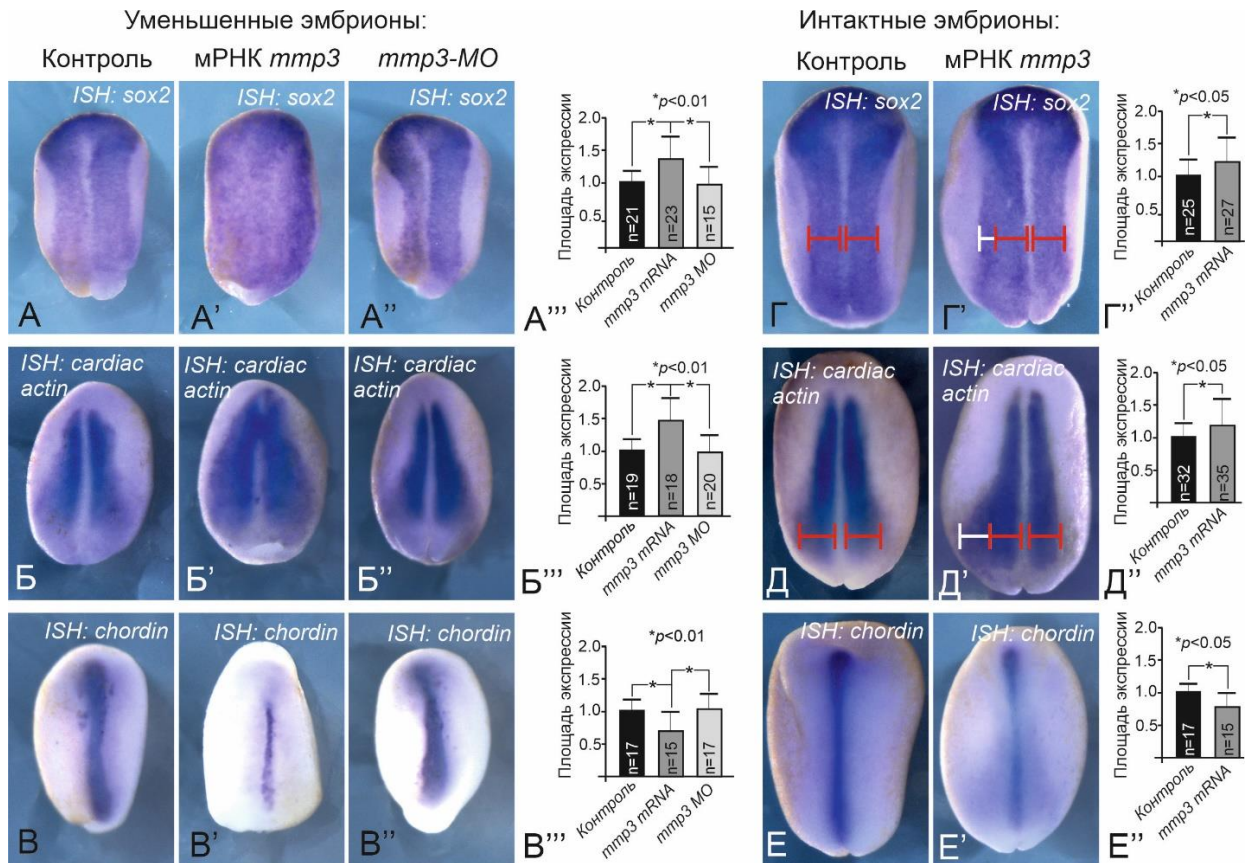


Рис. 27. Влияние гиперэкспрессии и нокадауна *ttp3* на разметку осевых зачатков у целых и уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки.

(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 эмбрионов (Orlov et al., 2022, см. в статье Видео S1). 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 *tmpr3* может приводить к полному скейлингу эмбриона. При этом для пропорциональной переразметки целого эмбриона необходимо небольшое снижение активности *tmpr3*, что приводит к небольшому изменению размера эмбриональных зачатков, под которое эмбрион может «подогнать» свой размер. Однако сильное снижение активности *tmpr3* 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 *tmpr3*, поскольку их изначальный объем в два раза меньше, и для них будет требоваться сильная переразметка.

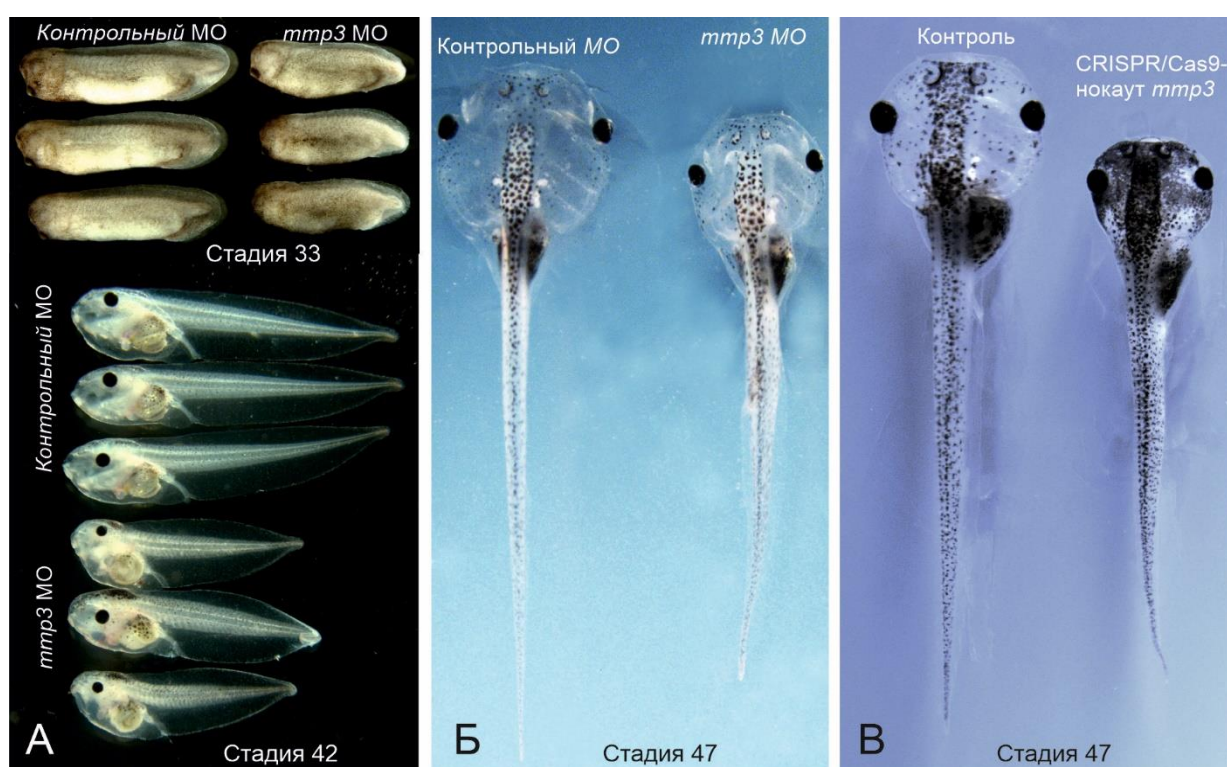


Рис. 28. Подавление активности *tmpr3* приводит к развитию уменьшенных зародышей.

(А) Инъекция *tmpr3*-МО приводит к уменьшению зародышей. Вид стадий 33 и 42. (Б) Инъекция сниженной концентрации *tmpr3*-МО приводит к формированию уменьшенных нормальных зародышей. (В) Нокаут *tmpr3* с помощью CRISPR-Cas9 также приводит к формированию уменьшенных зародышей.

7.5. Mmp3 расщепляет секретлируемые 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 (Jasuja et al., 2004; Nesterenko et al., 2015). Исходя из этого, был протестирован ряд секретрируемых морфогенов, ответственных за дорзо-вентральную разметку, на способность подвергаться протеолитической деградации с помощью Mmp3. Сначала были проверены белки-антагонисты BMP-каскада, секретрируемые в шпемановском организаторе: Cerberus, Chordin, Follistatin и Noggin1. Кроме того, был протестирован морфоген Noggin2. Несмотря на то, что ранее экспрессия *noggin2* была обнаружена только на стадии нейрулы в переднем крае нервной пластинки (Eroshkin et al., 2006; Fletcher et al., 2004), более тщательный анализ его экспрессии в данной работе выявил также присутствие слабой экспрессии *noggin2* в шпемановском организаторе (Рис. 29, Г). Кроме того, данные по экспрессии *noggin2* были подтверждены с помощью single-cell-транскриптомной базы данных эмбрионов шпорцевой лягушки (Briggs et al., 2018). Учитывая, что мРНК *noggin2* транслируется примерно в 200 раз активнее, чем мРНК *noggin1* (Вауганов et al., 2011), присутствие даже слабой экспрессии *noggin2* на стадии гатсрулы может влиять на разметку дорзо-вентральной оси. Когда меченные Мус-эпитопом конструкции мРНК *chordin*, *cerberus*, *follistatin*, *noggin1* и *noggin2* ко-инъецировались в эмбрионы шпорцевой лягушки вместе с мРНК *mmp3*, не было замечено деградации Cerberus и Follistatin (Рис. 30, А, Б). Однако наблюдалось сильное ослабление полос детекции конструкций Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2 при их ко-экспрессии с Mmp3 (Рис. 30, 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 (Correia et al., 2013) (Рис. 30, 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) (Piccolo et al., 1997) (Рис. 30, 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. 30, Ж, З). Также снижение концентрации Chordin в межклеточной среде было выявлено у уменьшенных эмбрионов, в

которых происходит естественное снижение экспрессии *mmp3* (Рис. 30, 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 *myc-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. 31, А). Также не было замечено деградации зрелой формы *Tolloid-like1* при ко-инъекции соответствующей мРНК и мРНК мутантной формы *mmp3(Glu219Ala)* (Рис. 31, 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 (Sun et al., 2014). Также в межклеточном пространстве присутствует преимущественно зрелая форма *Tolloid-like1*, которая также претерпевает процессинг после секреции (Gomis-Rüth et al., 2012). Данное предположение было проверено экспериментально: при разделении внутриклеточной и внеклеточной фракции эмбрионов шпорцевой лягушки, экспрессирующих мРНК *myc-tolloid-like1*, во внутриклеточной фракции наблюдали преимущественно незрелую форму белка, тогда как во внеклеточной фракции – зрелую. При этом ко-экспрессия *myc-tolloid-like1* и *mmp3* приводит к практически полному исчезновению зрелой формы *Tolloid-like1* во внеклеточной фракции (Рис. 31, 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 дорзо-вентральной разметки: *ADMP*, *BMP4* и *Sizzled*. Однако, было показано, что *Mmp3* не влияет на стабильность этих белков (Рис. 31, Г-Е). Также необходимо заметить, что гены *mmp3*, *tolloid-like1*, *noggin1/2* и *chordin* ко-экспрессируются в эмбрионе в области энтодермы и мезодермы шпемановского организатора как раз на тех стадиях развития (во время гаструляции), когда происходит основная разметка дорзо-вентральной оси, что, видимо, обеспечивает оптимальное взаимодействие этих белков (Рис. 29).

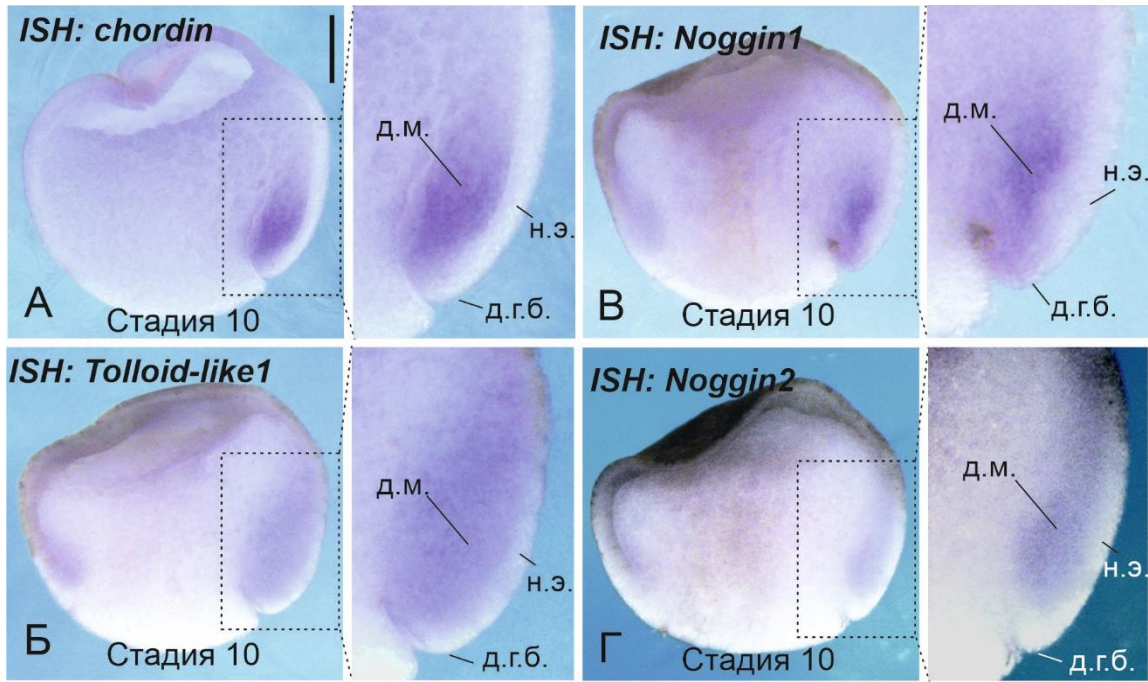


Рис. 29. Экспрессия *chordin*, *tolloid-like1*, *noggin1/2* на ранней гастреле (стадия 10) шпорцевой лягушки.

(А) Экспрессия *chordin*. (Б) Экспрессия *tolloid-like1*. (В) Экспрессия *noggin1*. (Г) Экспрессия *noggin2*. Справа показаны увеличенные изображения области шпемановского организатора (дорсальной мезодермы). Обозначения: д.г.б. – дорсальная губа бластопора; д.м. – дорсальная мезодерма; н.э. – нейроэктодерма.

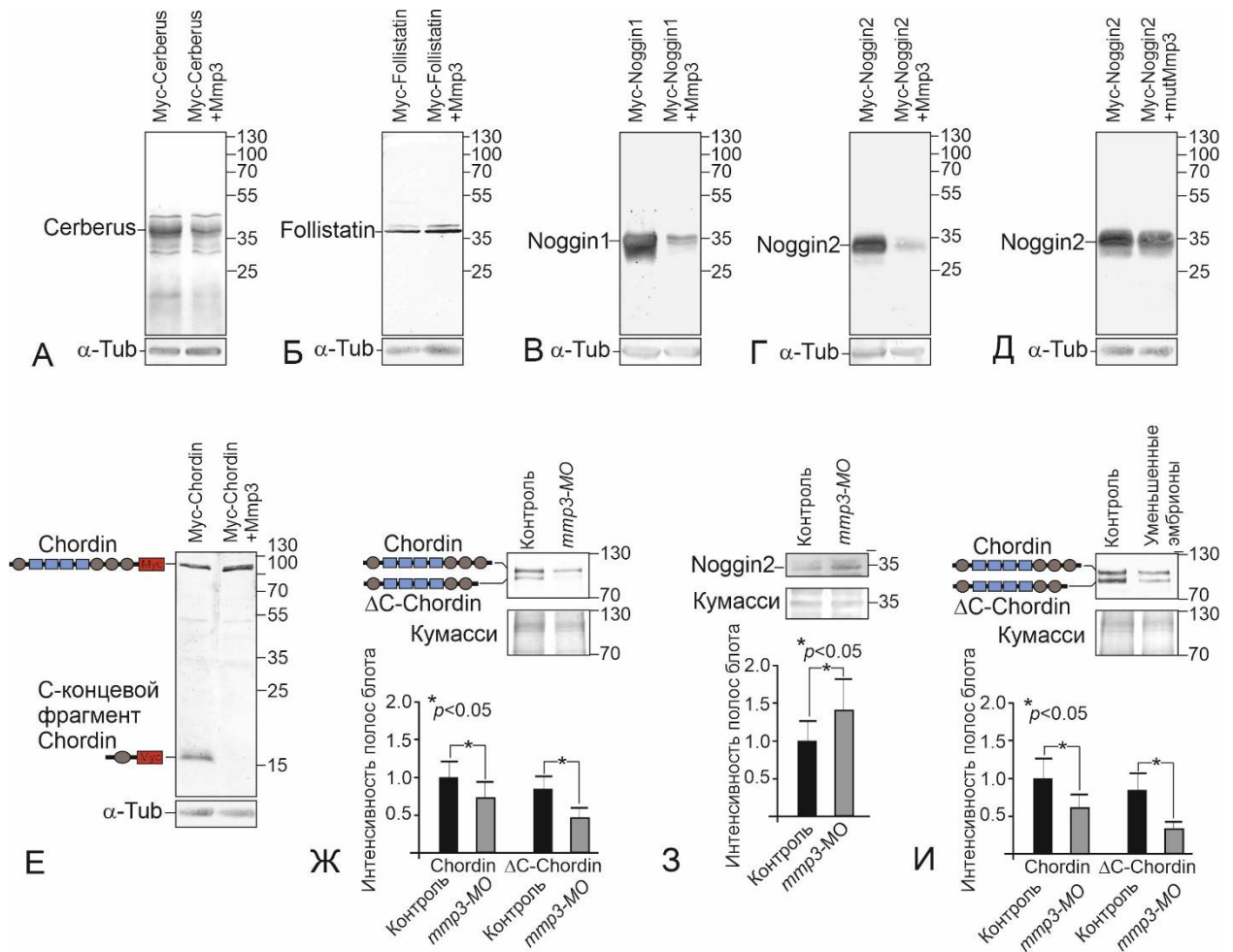


Рис. 30. Исследование воздействия Mmp3 на секретируемые факторы шпемановского организатора.

(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 *ttp3* с помощью МО приводит к снижению концентрации двух активных форм Chordin в межклеточном пространстве: интактного Chordin и частично процессированного протеазой Tolloid-like Δ C-Chordin, который также обладает сильной анти-BMP-активностью (Yu et al., 2000). (З) Подавление трансляции *ttp3* 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 – антитела анти- α -Tubulin. В (Ж, З, И) на форец наносилась сконцентрированная межклеточная фракция ~20-30 эмбрионов. Контроль загрузки – окрашивание геля Кумасси.

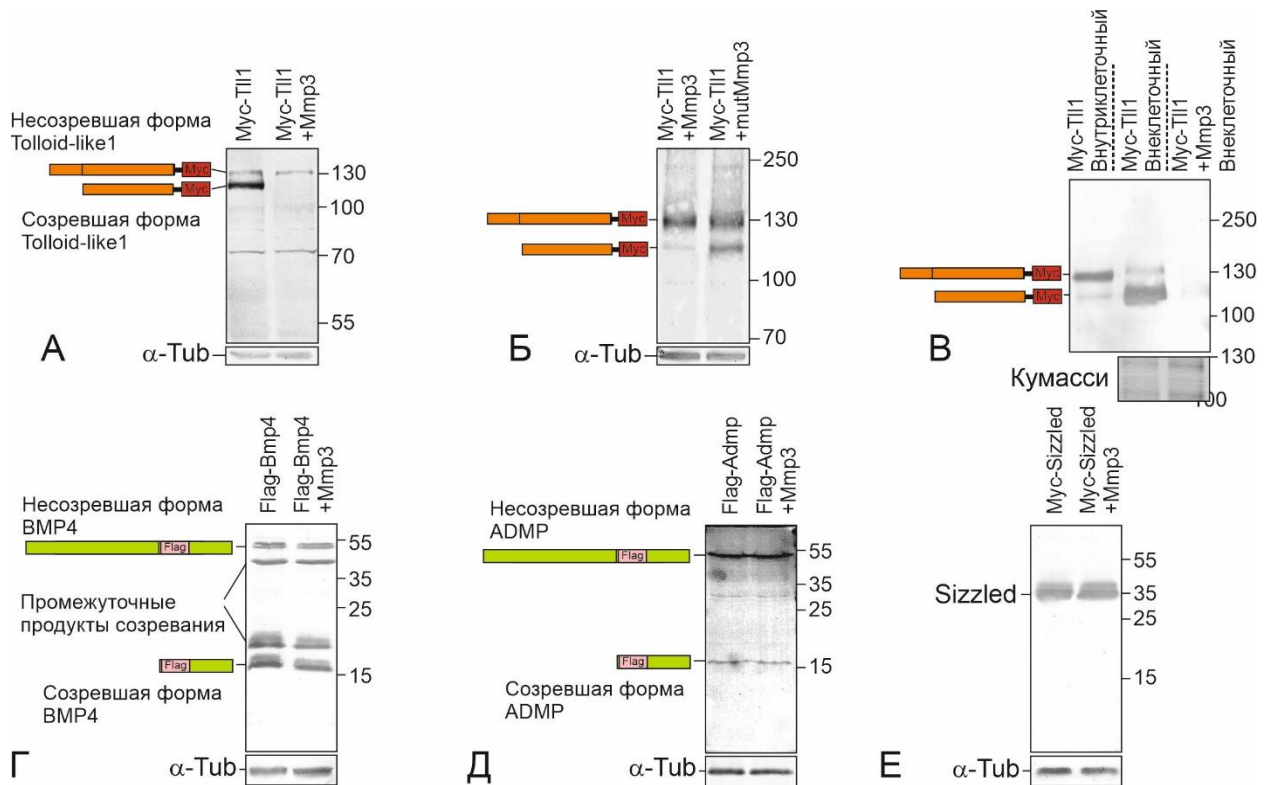


Рис. 31. Исследование воздействия Mmp3 на Tolloid-like1 и на некоторых участниках дорзо-вентральной разметки.

(А) Mmp3 расщепляет только 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).

7.6. 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. 32, Б, Б'). Более того, согласно с обнаруженным ингибиторным эффектом Mmp3 на зрелую форму Tolloid-like1, ко-инъекция морфолино к *mmp3* и *tolloid-like1* предотвращало это расширение (Рис. 32, В, В'). Наконец, ко-инъекция морфолино к *mmp3*, *tolloid-like1* и *chordin* вновь приводило к расширению домена экспрессии *sizzled* (Рис. 32, Г, Г'), что полностью подтверждает предположенное функциональное (в данном случае эпистатическое) взаимодействие генов данных белков *in vivo*.

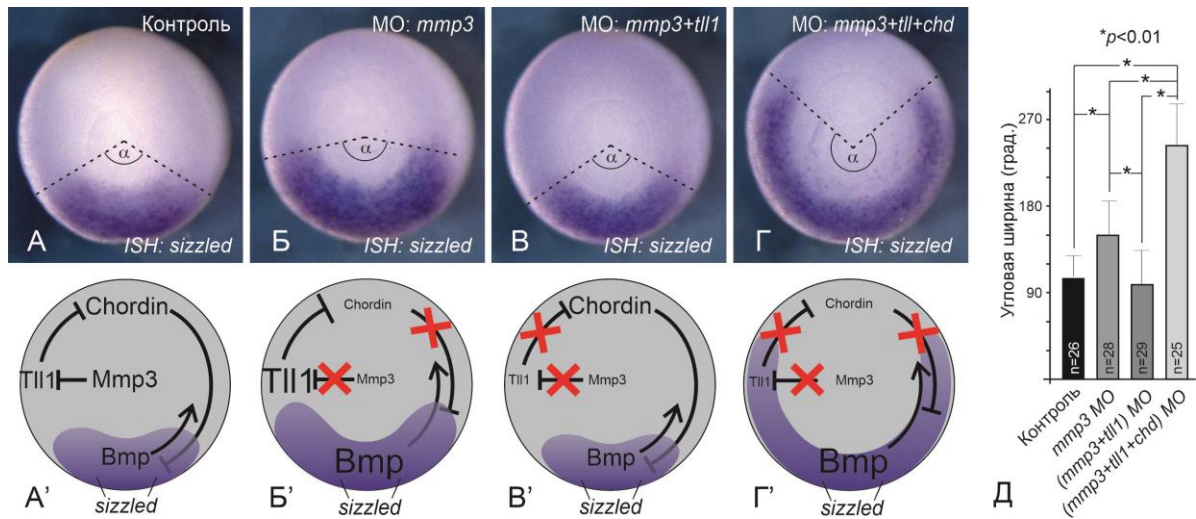


Рис. 32. Влияние *mmp3* на экспрессию вентрального гена-маркера *sizzled*.

(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 для (А-Г).

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

Для того, чтобы выяснить детально 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. 33, А, Б). Сходный эффект наблюдался при гиперэкспрессии ингибитора Chordin *tolloid-like1* (Рис. 33, В). Однако, при подавлении *chordin* не происходило изменения размера нотохорда (Рис. 33, Г). Также не наблюдалось изменения размера нотохорда, сомитов и нервной пластинки при подавлении Noggin1/2 (Рис. 33, А, Б, Г). Однако при одновременном подавлении *chordin* и одного или обоих *noggin1/2* происходило уменьшение нотохорда (Рис. 34, А), при этом в случае одновременного подавления *chordin* и обоих *noggin1/2* не происходило дополнительного уменьшения нотохорда по сравнению с подавлением *chordin* и какого либо из *noggin1/2* (Рис. 34, А). Полученный результат хорошо

согласуется с предыдущими данными, согласно которым инициация значительной части зачатка ното хорда происходит еще до гаструляции по BMP-независимому механизму (Ding et al., 2017; Stewart and Gerhart, 1991). Однако, когда ното хорд имеет диспропорционально увеличенный размер в случае уменьшенных эмбрионов или инъецированных *mmp3-MO*, инъекция *noggin2-MO* (но не *noggin1-MO* или *chordin-MO1+2*) приводит к уменьшению таких увеличенных ното хордов (Рис. 34, Б; Рис. 35, А). Сильное уменьшение ното хорда также наблюдалось в уменьшенных зародышах при подавлении *chordin* и *noggin1/2* (Рис. 35, 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 ното хорда (Рис. 36, 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 ното хорда 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. 36, Б). Подытожив, можно заключить, что при Mmp3-зависимом скейлинге Chordin ответственен за скейлинг сомитов, нервной пластинки и ното хорда, а Noggin1/2 ответственен только за антискейлинг ното хорда.

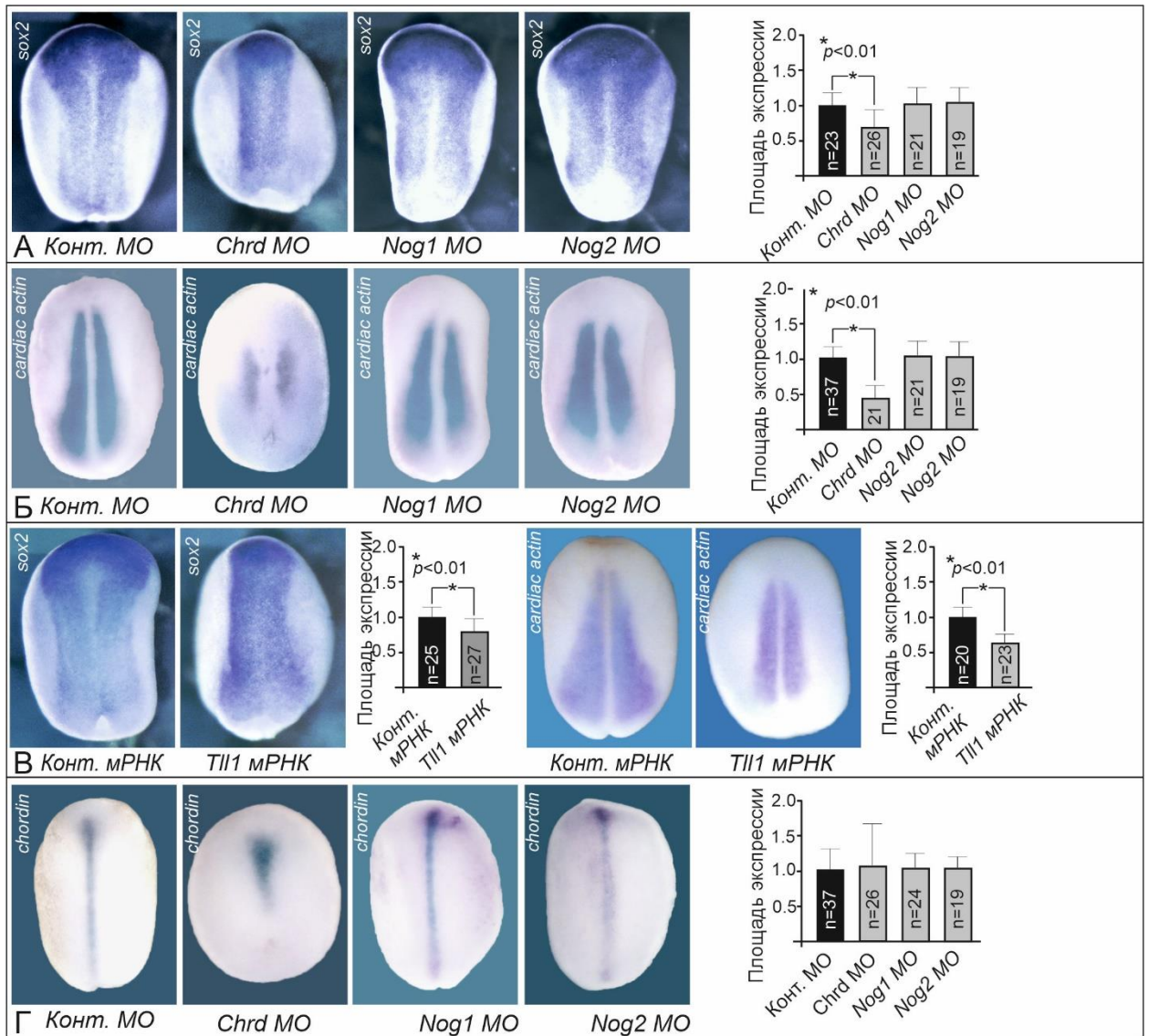


Рис. 33. Влияние подавления *chordin* и *noggin1/2* на размер зачатков ното хорда, сомитов и нервной пластинки.

(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 *tolloid-like1 (tll1)* также приводит к уменьшению нервной пластинки и сомитов. (Г) Подавление *chordin* или *noggin1/2* не влияет на размер ното хорда.

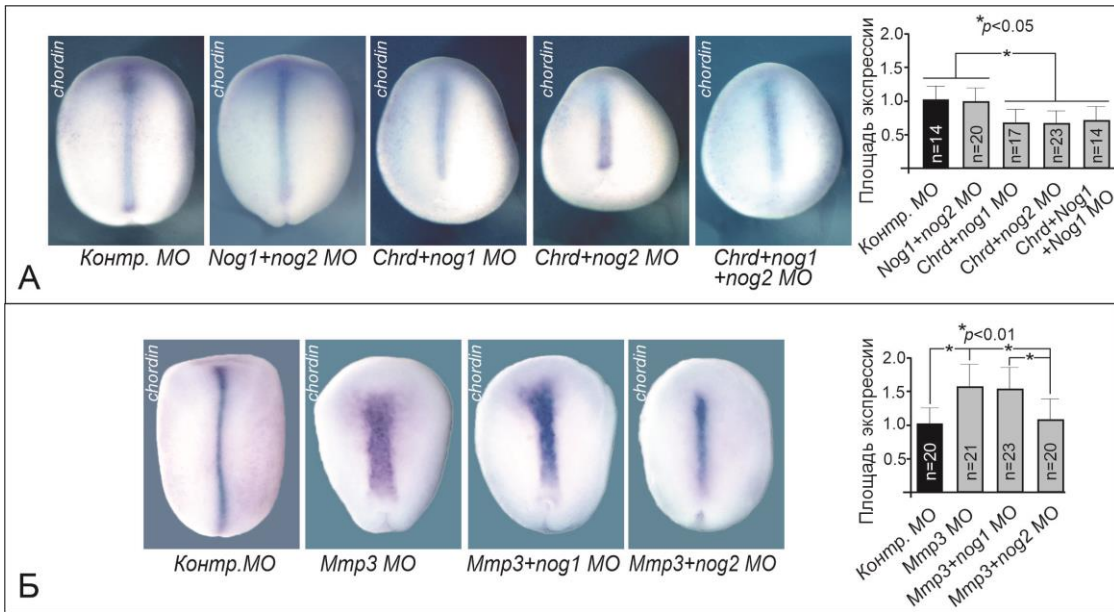


Рис. 34. Влияние совместного нокдауна (*chordin+noggin1/2*) и (*mmp3+noggin1/2*) на размер зачатка хорды в эмбрионах нормального размера.

(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.

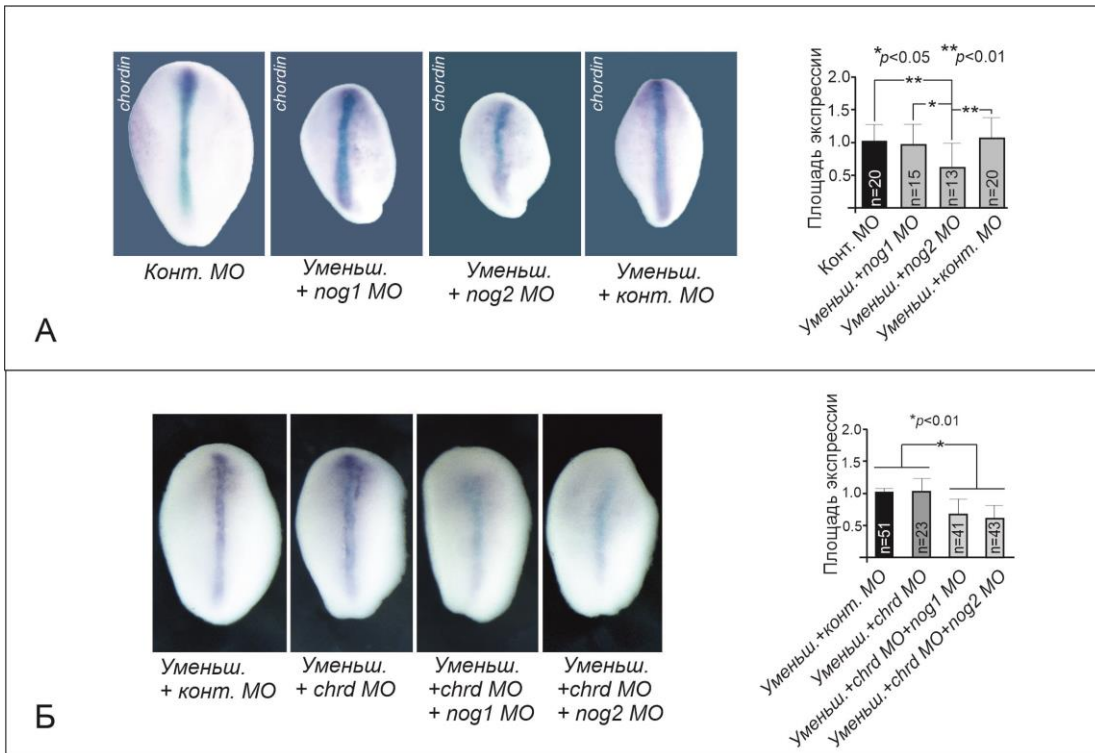


Рис. 35. Влияние одиночного нокдауна *chordin*, *noggin1* или *noggin2* и двойного нокдауна (*chordin+noggin1/2*) на размер нотохорда в уменьшенных эмбрионах.

(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*.

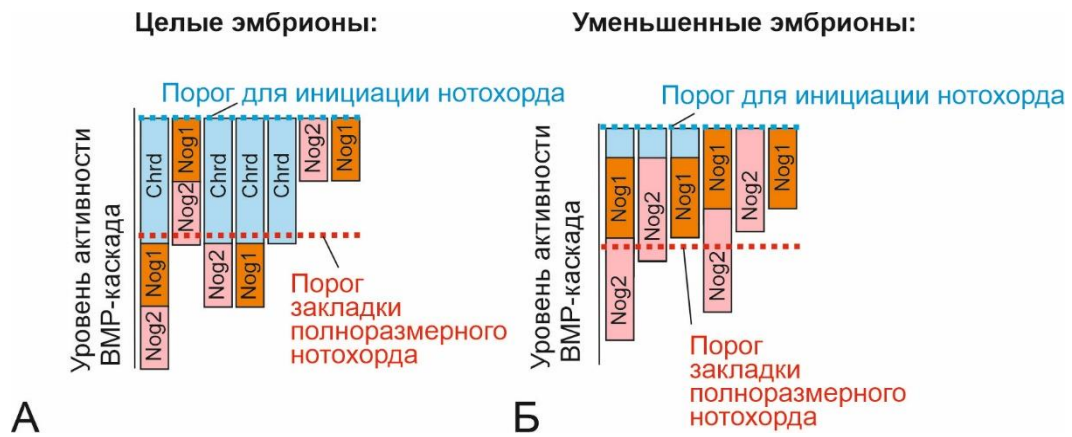


Рис. 36. Предполагаемая схема формирования зачатка нотохорда белками Chordin и Noggin1/2.

(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 нотохорда снижена. Наоборот, за счет повышения уровня Noggin1/2 в уменьшенных эмбрионах их роль в разметке возрастает.

7.8. 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 нотохорда и сомитов определяются во время начала и середины периода гаструляции (Domingo, Keller, 2000; Zaraiskii, 1991). Границы между этими зачатками определяются пространственно-временным градиентом активности BMP-каскада, который формируется в краевой зоне эмбриона (Plouhinec et al., 2013). Этот градиент активности формируется благодаря диффузии секретируемых в шпемановском организаторе антагонистов BMP-каскада, к которым принадлежит Chordin и Noggin1/2 (Piccolo et al., 1996; Slack, Forman, 1980; Smith, Harland, 1992; Plouhinec et al., 2013). Так называемый ранний, или бластульный, шпемановский организатор формируется на будущей дорсальной стороне бластулы под действием бета-катенина и Nodal-каскада (Ding et al., 2017; Fagotto et al., 1997; Gimlich, Gerhart, 1984; Stewart, Gerhart, 1991; Wylie et al., 1996; Xanthos et al., 2002; Zhang et al., 1998) (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. 37, А справа). С началом гаструляции ингибиторы BMP Chordin и Noggin1/2 начинают диффундировать из INS, что приводит к расширению области организатора (Рис. 37, А, см. стрелки). Однако, поскольку клетки краевой зоны теряют компетенцию к дифференцировке в клетки ното хорда примерно в середине гаструляции (Domingo and Keller, 2000), 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 другой 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 инициированных 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 (Orlov et al., 2022, см. в статье Рис. S6A). Все взаимодействия на Рис. 37, А описываются системой из четырех реакционно-диффузионных уравнений (Рис. 37, В; см. подробнее в Orlov et al., 2022). 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. 37, Г. Согласно модели, территория INS (синий на Рис. 37, 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 (Eroshkin et al., 2016; Inomata et al., 2013; Nesterenko et al., 2015), 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. 37, 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 (Inomata et al., 2013; Pomreinke et al., 2017). 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 (Рис. 24, Д, Д'). 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 гаструляции INS уменьшенных эмбрионов диспропорционально увеличивается (Рис. 38, 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 флорсорилированного 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 гаструляции у эмбрионов с низкой концентрацией Mmp3 в краевой зоне (т.е. у инъецированных *mmp3*-МО и уменьшенных зародышей) происходит расширение зоны, свободной от фосфорилированного pSmad1/5/8 (Рис. 38, А, А', В, В'). При этом подавление *noggin2* в уменьшенных эмбрионах устраняло этот эффект (Рис. 38, Д, Д'), что дополнительно подтверждает полученные данные о *Noggin1/2*-зависимом увеличении зачатка хорды в уменьшенных зародышах. Однако уже на стадии средней гаструлы (стадия 11) подавление *mmp3* в целых зародышах приводило к сужению свободной от pSmad1/5/8 зоны (Рис. 38, Б, Б'), что также соответствует «идеальному» скейлингу сомитов в уменьшенных эмбрионах (Рис. 38, Г, Г'). Действительно, в ходе дальнейшей гаструляции происходит закладка зачатков сомитов, которая, по допущению модели и согласно полученным данным, происходит за счет активности *Chordin*, но не *Noggin1/2* (Рис. 38, Е, Е'; подавление *noggin2* в уменьшенных эмбрионах на средней гаструле уже не влияет на границы градиента BMP-каскада). Таким образом, подавление *mmp3* приводит к деградации *Chordin* на средней гаструле и смещению градиента BMP-каскада дорсальнее. Для дополнительной проверки произведенных вручную измерений в Рис. 38, которые могут вследствие субъективных особенностей исследователя дать ошибку, был использован метод автоматического анализа изображений на основе машинного обучения. Как можно видеть на Рис. 39, 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. 39, 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. 39, Г). Таким образом, данные по окраске pSmad1/5/8 подтверждают выдвинутую модель антискейлинга нотохорда (Рис. 37, Г). Что же касается сомитов и нейроэктодермы, то их латеральные края определяются преимущественно градиентом Chordin, который примерно на порядок быстрее диффундирует, чем Noggin1/2 (Inomata et al., 2013) (Рис. 37, 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. 33, А, Б).

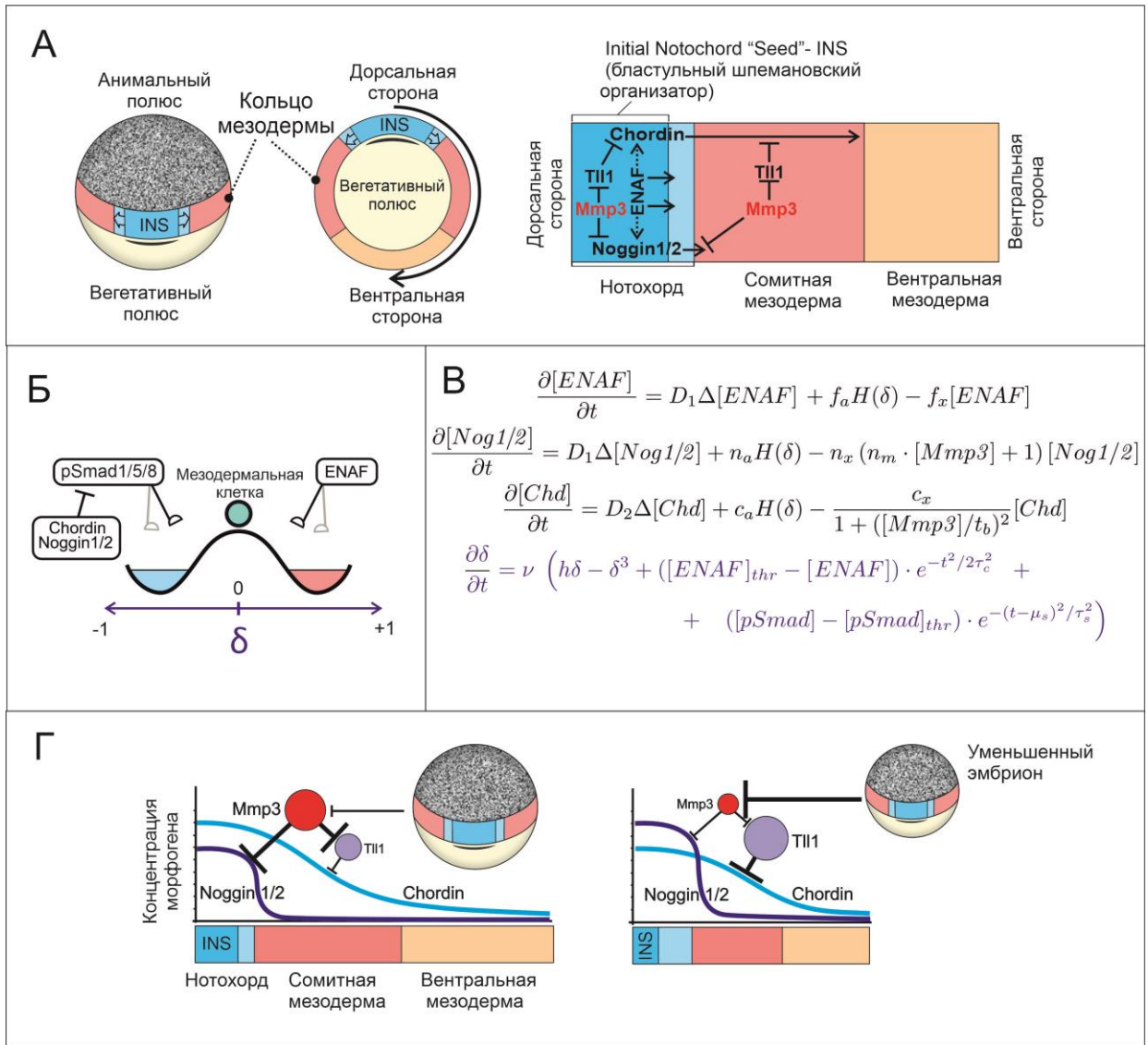


Рис. 37. Модель Mmp3-опосредованного скейлинга эмбриона.

(А) Геометрическая составляющая модели представляет собой половину краевой зоны мезодермы на стадии ранней гаструлы (слева). Все рассматриваемые взаимодействия, как предполагается, происходят в развертке этого полукольца (справа): *Noggin1/2* и *Chordin* регулируют размеры хорды и сомитов, соответственно; *ENAF* индуцирует первичный зачаток нотохорда и также экспрессию *chordin* и *noggin1/2*; *Mmp3* расщепляет *Noggin1/2*, но стабилизирует *Chordin* с помощью расщепления *Tolloid-like1*. (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.

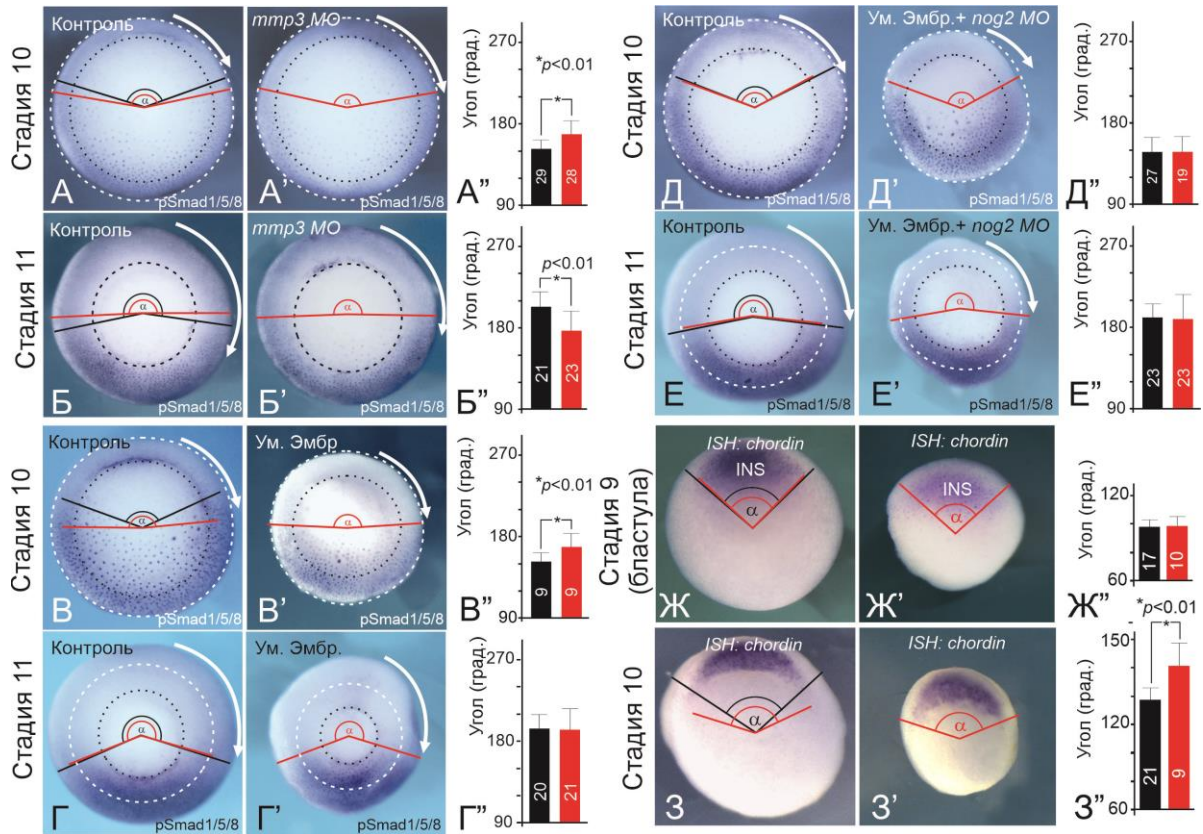


Рис. 38. Анализ изменений градиента активности BMP-каскада (pSMAD1/5/8) при подавлении *mmp3*, *noggin2*, и при уменьшении эмбриона.

(А, А') Подавление *mmp3* 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 *mmp3* 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 размечивание территории сомитов, осуществляемое *Chordin*, но не *Noggin2*. (Ж, Ж', З, З') 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 (З') по сравнению с интактными (Ж). Это соответствует данным, полученным в (В, В'). (А'', Б'', В'', Г'', Д'', Е'', Ж'', З'') Результаты ручного измерения границ градиентов для соответствующих экспериментов.

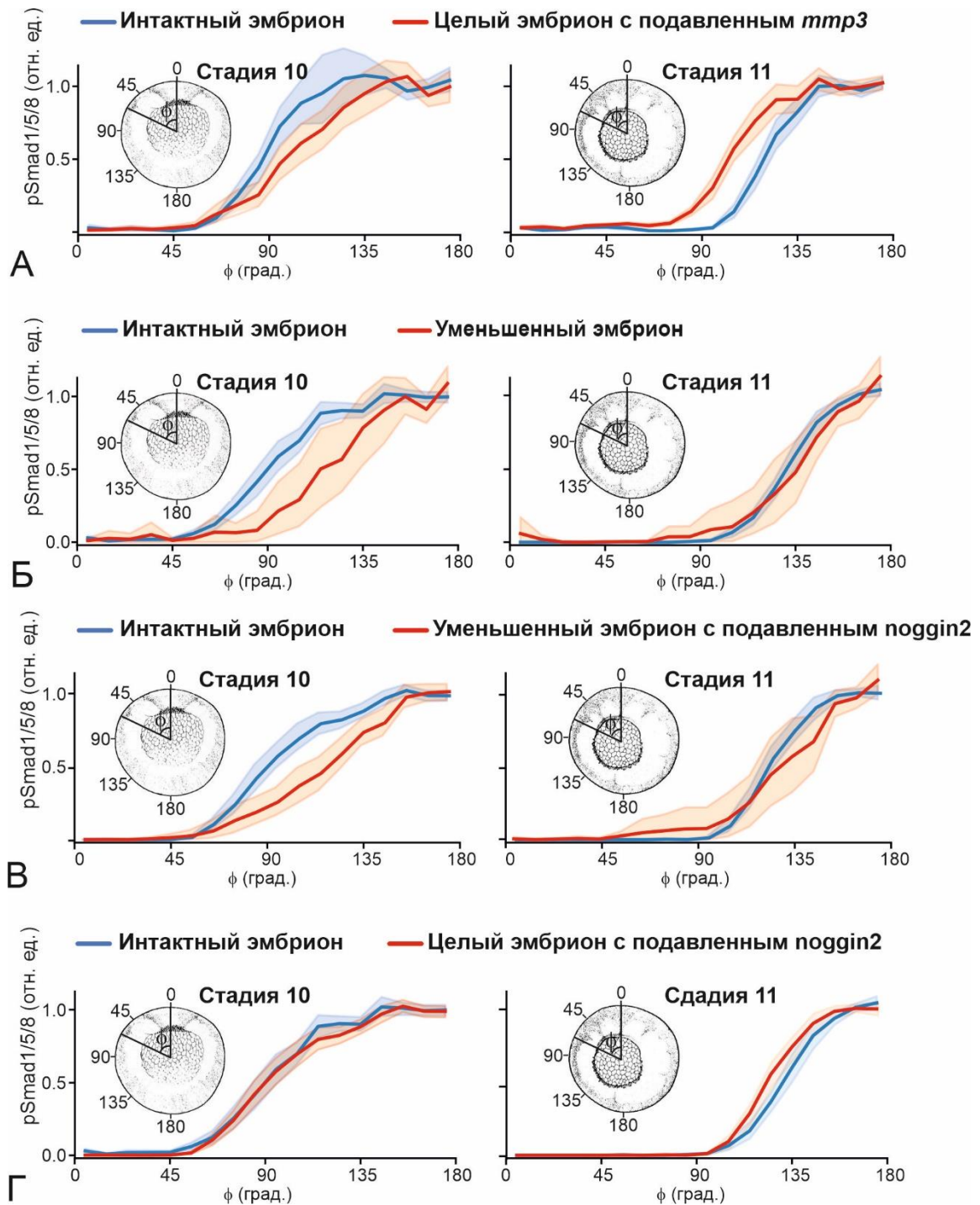


Рис. 39. Автоматический расчет градиента BMP-каскада.

(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.

8. Обсуждение.

Данная работа была изначально основана на предположении, что простейший механизм, с помощью которого эмбрион может «ощущать» изменение своего размера и соответственно подстраивать под этот размер эмбриональную разметку, может быть основан на регуляции скейлерами – белками, значительно изменяющими свою концентрацию в эмбрионе в зависимости от размера зародыша. Было также предположено, что регуляция концентрации хотя бы некоторых скейлеров может происходить за счет размер-зависимой экспрессии соответствующих генов. Кроме того, такое размер-зависимое изменение экспрессии скейлера должно быть достаточно сильным, чтобы отличаться от естественных флуктуаций экспрессии генов. Таким образом, сравнение транскриптомов интактных и уменьшенных зародышей действительно выявило ряд генов, сильно меняющих свою экспрессию при уменьшении зародыша. Можно предположить, что скейлеры необходимы для тех реакционно-диффузионных систем, которые не способны к автоматической модуляции градиента. В таком случае скейлеры выполняют роль внешнего размер-зависимого агента (пассивного модулятора), которые не являются элементом самой реакционно-диффузионной системы. Однако, проведенный скрининг *in silico* существующих реакционно-диффузионных моделей скейлинга показал, что во *всех* таких моделях присутствуют модуляторы, значительно меняющие свою концентрацию в зависимости от размера системы. В данном случае такие скейлеры являются активными модуляторами системы, поскольку являются элементом реакционно-диффузионного механизма. Таким образом, можно предположить, что любые реакционно-диффузионные системы, способные к размер-зависимому скейлингу, имеют в качестве модуляторов скейлеры.

Данные предположения были проверены экспериментально, с помощью высокопроизводительного секвенирования транскриптомов целых и уменьшенных зародышей шпорцевой лягушки. Для получения более точного результата уменьшенные эмбрионы были получены с помощью деления первых двух бластомеров эмбриона, а не путем разрезания эмбриона на стадии бластулы в сагиттальной плоскости, что является гораздо менее трудоемким методом, однако, получаемые таким способом уменьшенные эмбрионы чаще всего развиваются аномально и не достигают, в отличие от полученных из отдельных бластомеров, личиночной стадии (De Robertis, 2006; Inomata et al., 2013; Sosa et al., 2019). Состоятельность полученных данных секвенирования косвенно подтверждаются небольшим количеством генов, дифференциально экспрессирующихся в

уменьшенных зародышах. Действительно, изначальное предположение о наличии скейлеров подразумевает, что таких белков в развивающемся зародыше должно быть очень мало.

Для подтверждения сформулированной концепции скейлеров было продемонстрировано, что один из найденных потенциальных скейлеров – секретлируемая металлопротеиназа Mmp3 - действительно регулирует скейлинг дорзо-вентральной оси. При этом нельзя исключать, что и другие обнаруженные гены также могут быть скейлерами.

Поскольку реакционно-диффузионные механизмы в целом широко распространены в развитии, можно предположить, что подход, примененный в данной работе, может быть распространен на другие случаи эмбриональных регуляций. Например, данный метод может быть применен к эмбриональным регуляциям других видов животных, таких как морской еж, кишечнополостные, другие позвоночные животные и пр., а также для поиска скейлеров для отдельных органов, способных к регуляции своего паттерна, на более поздних стадиях развития. Подобный направленный поиск скейлеров может расширить наше знание о механизмах эмбриональных регуляций и помочь в поиске новых реакционно-диффузионных механизмов эмбриональной разметки.

Детальное исследование роли Mmp3 при эмбриональной регуляции показало, что противоположный эффект Mmp3 на стабильность Chordin и Noggin1/2 может не только объяснить скейлинг сомитов и нейроэктодермы, но и антискейлинг хорды, наблюдавшийся в уменьшенных зародышах (Cooke, Webber, 1985b). Модель, созданная для объяснения наблюдавшихся эффектов, предполагает образование в период гаструляции т.н. дорсализующей волны, распространяющейся из бластульного зачатка шпемановского организатора (INS), который уже на стадии бластулы начинает секретировать дорсализующие факторы Chordin и Noggin1/2. Это предположение согласуется с более ранними классическими экспериментами, также продемонстрировавшими наличие дорсализующей «волны», которая начинает распространяться с началом гаструляции из шпемановского организатора, который закладывается раньше, на стадии бластулы (Smith et al., 1985). В более ранних моделях авторы рассматривали зачаток нотохорда как источник дорсализующих факторов постоянного размера, который не меняется в процессе развития (Inomata et al., 2013; Francois et al., 2009). В модели, представленной в данной работе, уже учитывается возможность варьировать размер шпемановского организатора в зависимости от концентрации Noggin1/2, которая регулируется с помощью Mmp3. В этой связи нужно

заметить, что в данной работе наблюдалось постепенное расширение дорсальной зоны, свободной от фосфорилированного pSmad1/5/8, в процессе гастрюляции. Поскольку фосфорилированный pSmad1/5/8 является прямым эффектором BMP-каскада, можно предположить, что распространение зоны, свободной от pSmad1/5/8, является результатом распространения дорсализующей волны (Smith et al., 1985; Harland, 2008). Также можно заметить, что профиль градиента pSmad1/5/8 достаточно пологий в дорзо-латеральной области, поэтому можно предположить, что дифференцировка ното хорда и сомитов в дорзо-латеральной области эмбриона происходит не за счет достижения определенных пороговых значений градиента BMP вдоль дорзо-вентральной оси, а за счет различного времени достижения дорсализующей волны определенного участка эмбриона. Подобное предположение вполне согласуется с недавней работой на рыбке данио, в которой показано, что только лишь часть генов-эффекторов BMP-каскада реагируют на определенные пороговые значения активности BMP-каскада (Rogers et al., 2020). Исходя из вышеизложенного можно предположить, следовательно, что в вентральной области, где градиент pSmad1/5/8, наоборот, резкий, BMP-зависимая разметка происходит с помощью порогового механизма, тогда как в дорзолатеральной области с помощью различного времени экспозиции клеток к градиенту активности BMP-каскада. В подтверждение этой модели можно привести недавнее исследование, в котором продемонстрировано, что 3 вентральных гена эмбриона данио реагируют на градиент BMP по механизму восприятия пороговых концентраций (Greenfeld et al., 2021).

Полученная в данной работе модель, однако, рассматривает механизм дорзо-вентральной разметки и её скейлинга в сильно упрощенном виде: во-первых, помимо *Mmp3* в скейлинге дорзо-вентральной оси шпорцевой лягушки принимают участие по крайней мере еще два уже известных скейлера – *Sizzled* и *ADMP*, причем в результате транскриптомного секвенирования в данной работе было продемонстрировано, что в уменьшенных эмбрионах экспрессия *sizzled* также существенно уменьшается, что дополнительно подтверждает валидность примененного в работе метода.

Кроме этого, в рассматриваемой модели рассмотрено лишь два дорсализующих фактора – *Chordin* и *Noggin1/2*, тогда как факторов, регулирующих дорзо-вентральную разметку эмбриона, значительно больше. Эти факторы, не рассматриваемые моделью по отдельности, были включены в неё как интегральный компонент, который индуцирует формирование шпемановского организатора – *ENAF*. Таким образом, для получения полной картины скейлинга дорзо-вентральной разметки необходимы дополнительные исследования.

9. 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 секретлируемые антагонисты BMP-каскада белки *Noggin1/2*, но стабилизирует секретлируемый 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.

10. Материалы и методы.

10.1. Материалы.

10.1.1. Среды и растворы.

Все растворы готовятся на деионизированной воде типа 1, если не указано иное.

Среда LB (Lysogeny Broth):

Реагент	Концентрация
NaCl	585 mM
Пептон	10 г/л
Дрожжевой экстракт	5 г/л

1xMMR (Marc's Modified Ringer):

Реагент	Концентрация
NaCl	100 mM
KCl	1.8 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM
ХЕПЕС-NaOH (HEPES-NaOH, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты натриевая соль) pH 7.6	5 mM

1xCMFM (Calcium/Magnesium-free Medium):

Реагент	Концентрация
NaCl	88 mM
KCl	1 mM

NaHCO ₃	2.4 mM
Tris-HCl pH 7.6	7.5 mM

1xPBS (Phosphate Buffered Saline):

Реагент	Концентрация
NaCl	120 mM
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	7 mM
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	3 mM
KCl	2.7 mM

1xPTW: к 1xPBS добавить 0.1% Tween-20.

MEMFA (MOPS, EGTA, Magnesium Sulfate, Formic Aldehyde):

Реагент	Концентрация
МОПС (MOPS, Натриевая соль морфолинпропансульфоновой-3 кислоты) pH 7.4	100 mM
ЭГТА (EGTA, этилен гликоль тетраацетат)	2 mM
Mg ₂ SO ₄	1 mM
формальдегид	3.7 %

20xSSC (Saline-Sodium Citrate Buffer):

Реагент	Концентрация
NaCl	3 M
цитрат натрия двуводный (Na ₃ Ci*2H ₂ O)	300 mM

50xРаствор Денхардта (50xDenhardt's Solution):

Реагент	Концентрация
Бычий сывороточный альбумин	1 %

Ficoll	1 %
Поливинилпирролидон	1 %

РН-буфер (прегибридизационный буфер):

Реагент	Концентрация
Формаид	50 %
20x SSC	5x
РНК Torula	1 мг/мл
50x Denhardt's solution	1x
Tween-20	0.1 %
10% CHAPS	0.1 %
ЭДТА	10 mM

Малеиновый буфер (МAB):

Реагент	Концентрация
Малеиновая кислота, pH 7.5	100 mM
NaCl	150 mM

Буфер для щелочной фосфатазы (AP-буфер):

Реагент	Концентрация
Трис-HCl, pH 9.5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM
Tween-20	0,1 %
левамизол	2 mM

1xБуфер для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле (1xTAE-буфер):

Реагент	Концентрация
Трис	40 mM
ЭДТА	1 mM
ледяная уксусная кислота (ЛУК)	20 mM

Довести ЛУК до pH 8.0	
-----------------------	--

1xБуфер для ко-иммунопреципитации (1xCo-IP-буфер):

Реагент	Концентрация
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	8.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Triton-X100	1 %

4xБуфер для нанесения образцов для электрофореза белков в полиакриламидном геле по Леммли (4xLaemmli Sample Buffer)

Реагент	Концентрация
Трис-HCl, pH 6.8	200 mM
додецилсульфат натрия (SDS)	8 %
глицерин	40 %
β-меркаптоэтанол	20%
бромфеноловый синий	0.2 %

1xБуфер для электрофореза белков в полиакриламидном геле:

Реагент	Концентрация
Трис	25 mM
глицин	14.4 г/л
додецилсульфат натрия	0.1 %

1xБуфер для вестерн-блоттинга:

Реагент	Концентрация
1xБуфер для электрофореза белков в полиакриламидном геле	80 %
метанол	20 %

10.1.2. Антитела, коммерческие наборы и реактивы, бактериальные штаммы.**Таблица 2.**

Реагент	Источник	Кат. №
Антитела		
Поликлональные анти-Chordin. Источник: кролик.	Лаборатория молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН	N/A
Поликлональные анти-Noggin2. Источник: кролик.	Лаборатория молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН	N/A
Моноклональные анти-c-Мус, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Источник: мышь.	Sigma-Aldrich	#A5963; RRID:AB_258265
Моноклональные анти-Flag ® M2, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Источник: мышь.	Sigma-Aldrich	#A9469; RRID:AB_439699
Анти-IgG кролика, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Источник: коза.	Sigma-Aldrich	#A3937; RRID:AB_258122
Моноклональные анти- α -тубулин. Источник: мышь.	Sigma-Aldrich	#T9026; RRID:AB_477593

Анти-IgG мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Источник: коза.	Sigma-Aldrich	#A3562; RRID:AB_258091
Анти-дигоксигенин Fab-фрагменты, конъюгированные с щелочной фосфатазой.	Roche	#11093274910; RRID:AB_514497
Анти-pSmad1/5 (Ser463/465). Источник: кролик.	Cell Signaling	#9516; RRID:AB_491015
Бактериальные штаммы.		
<i>E. coli</i> штамм DH5 α	N/A	N/A
<i>E. coli</i> штамм BL21	N/A	N/A
Реактивы, пептиды и белки		
Хорионический гонадотропин человека	Московский эндокринный завод	N/A
Протеиназа К	Evrogen	#EK102
ДНКаза I	ThermoFischer	#EN0525
Бычий сывороточный альбумин	Sigma-Aldrich	#A2153
РНК Torula	Sigma-Aldrich	#R6625
Этил 3-аминобензоат метансульфонат	Sigma-Aldrich	#A5040
N-концевой пептид Chordin (19 а.к.)	Лаборатория лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН	N/A
Стабилизированный субстрат для щелочной фосфатазы Western Blue®	Promega	#S3841

Субстрат для щелочной фосфатазы BM Purple	Roche	#11442074001
Субстрат для щелочной фосфатазы NBT/BCIP	Roche	#11681451001
Набор для Dig-мечения РНК-зондов DIG RNA Labeling Mix	Roche	#11277073910
Блокирующий реагент для гибридизации с нуклеиновыми кислотами	Roche	#11096176001
Сыворотка новорожденного телёнка, термоинактивированная	Sigma-Aldrich	#12023C
Коктейль ингибиторов протеаз	Sigma-Aldrich	#P8340
PMSF	Roche	#PMSF-RO
Бриллиантовый синий G	Sigma-Aldrich	#B8522
Среда для заключения препаратов Mowiol® 4-88	Sigma-Aldrich	#81381

CNBr-активированная сефароза Sepharose™ 4B	GE Healthcare	N/A
Коммерческие наборы		
Набор для синтеза мРНК mMessage mMachine™ SP6,T7 kit	ThermoFisher	#AM1340, #AM1344
Набор для очистки РНК NucleoSpin RNA purification columns	Macherey Nagel	#REF 740955.50
TruSeq Stranded mRNA Prep	Illumina	N/A
TruSeq SBS sequencing kit version 4	Illumina	N/A
GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit	Invitrogen	#A29377
GeneArt™ Platinum™ Cas9 Nuclease	Invitrogen	#B25640, B25641
Эндонуклеазы рестрикции Acc65I, BamHI, HindIII, NotI, XbaI, XhoI	ThermoFischer	#ER0901, #ER0051, #ER0501, #ER0591, #ER0681, #ER0692
T4-лигаза	ThermoFischer	#EL0011
Ингибитор РНКаз RiboLock	ThermoFischer	#EO0381
Набор NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel	
Реагент для выделения РНК ExtractRNA	Evrogen	#BC032

Набор для очистки РНК CleanRNA Standard	Evrogen	#BC033
Набор с обратной транскриптазой MMLV RT kit	Evrogen	#SK021
Набор для высокоточной ПЦР со сложных матриц Encyclo Plus PCR kit	Evrogen	#PK101
Набор для высокоточной специфичной ПЦР Tersus Plus PCR kit	Evrogen	#PK221
Смесь для количественной ПЦР в реальном времени 5X qPCRmix-HS SYBR	Evrogen	#PK147L

10.1.3. Олигонуклеотиды морфолино.

Таблица 3.

Реагент	Источник	Кат. №
Олигонуклеотиды морфолино		
<i>mmp3-MO:</i> AACATCTTGCGCTCCSCTCAGCTTC	Gene Tools	N/A
<i>control-MO:</i> CCTCTTACSCTCAGTTACAATTTATA	Gene Tools	N/A

<i>noggin1-MO:</i> TCACAAGGCACTGGGAATGATCCAT	Gene Tools	N/A
<i>noggin2-MO:</i> CCTCAGGCAGATTTATCCTCTTCAT	Gene Tools	N/A
<i>chordin-MO1:</i> ACGTTCTGTCTCGTATAGTGAGCGT	Gene Tools	N/A
<i>chordin-MO2:</i> ACAGCATTTTTGTGGTTGTCCCGAA	Gene Tools	N/A
<i>tolloid-like1-MO:</i> AGATGAGCCAAGAAGGCATGTTCAT	Gene Tools	N/A

10.1.4. Модельные объекты и программное обеспечение.

Таблица 4.

Описание	Источник	Кат. №
Модельные объекты		
Шпорцевая лягушка (<i>Xenopus laevis</i>), дикий тип	Nasco	#LM00456; RRID:XEP_Xla100
Программное обеспечение и алгоритмы		
Excel	Microsoft	N/A
Prism8	GraphPad	N/A
ImageJ	Schneider et al., 2012	https://imagej.nih.gov/ij/
iLastik	Berg et al., 2019	https://www.ilastik.org
bcl2fastq v1.8.4 3 Conversion Software	Illumina	https://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184.html
FastQC	N/A	https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
TopHat2	Kim et al., 2013	https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml

HTseq	Anders et al., 2015	https://htseq.readthedocs.io/en/master/
DESeq package	Anders et al., 2012	https://www.bioconductor.org/packages//2.10/bioc/html/DESeq.html
Blast2GO	Conesa et al., 2005	https://www.blast2go.com/
KAAS	Moriya et al., 2007	https://www.genome.jp/kegg/kaas/
Подбор мишеней для CRISPR/Cas9	Labun et al., 2019	http://chopchop.cbu.uib.no/
Single-cell-транскриптом шпорцевой лягушки	Briggs et al., 2018	https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/currentDatasetsList_xenopus_v2.html
Скрипт для анализа данных Briggs et al., 2018	Orlov et al., 2022	https://github.com/comcon1/xenopus-jamboree-analyzer

10.1.5. Оборудование.

Таблица 5.

Модель	Производитель
Миницентрифуга-вортекс Microspin FV-2400	BioSan
Ледогенератор KF45	Porkka
Настольная микроцентрифуга miniSpin	Eppendorf
Термостат "Гном"	ДНК-Технология
Настольная центрифуга с охлаждением 5415R	Eppendorf
Напольная центрифуга с охлаждением GR412	Jouan
Спектрофотометр NanoPhotometer®	Implen

Микропипетки автоматические переменного объема Pipetman	Gilson
3D-шейкер Nutator	Clay Adams
Источник питания для электрофореза EPS 301	Amercham Pharmacia Biotech
Источник питания для электрофореза “Эльф-4”	ДНК-Технология
Форма для заливки полиакриламидного геля Hoefer Mighty Small Dual Mini Gel Caster	Hoefer
Аппарат для электрофореза Hoefer Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis System	Hoefer
Прибор для полусухого вестерн-блоттинга Amersham ECL Semi-Dry Blotters	Amercham Biosciences
Трансиллюминатор ЕТХ-20.М	Vilber Lourmat
Микроинъектор FemtoJet	Eppendorf
Флуоресцентный стереомикроскоп M205	Leica
Флуоресцентный микроскоп BZ-9000E	Keyence
Стереомикроскоп KL300 LED	Leica
Вибратом HM650	Microm
Амплификатор для КОТ-ПЦР ДТпрайм	ДНК-Технология
Амплификатор ProFlex	Applied Biosystems
Орбитальный шейкер-термостат SciEra	Bellco® Biotechnology
Орбитальный шейкер-инкубатор C24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Система для получения воды типа 1 Milli-Q Water Purification System	Millipore
Система для получения воды типа 3 RiOs-DI®3	Millipore
Весы аналитические CE124-C	Сартогосм
Весы аналитические Adventurer™	Ohaus
pH-метр PB-11	Sartorius
Термостат водяной Ultratherm BWT-U	Biosan

Программируемый термостат с охлаждением MIR-254	Panasonic
Система автоматизированного электрофореза 4200 TapeStation	Aligent
Секвенатор HiSeq 2500	Illumina
Кельвинатор U410 Premium	New Brunswick Scientific

10.2. Методы.

10.2.1. Манипуляции с эмбрионами шпорцевой лягушки.

Получение, оплодотворение и микроинъекции в эмбрионы шпорцевой лягушки были произведены по стандартному протоколу (Sive et al., 2000; Parshina et al., 2020; Martynova et al., 2021). Разделение бластомеров шпорцевой лягушки на стадии 2-х клеток производилось по протоколу, основанному на протоколах Cooke, Webber, 1985b и Kagawa, Yamana, 1983. А именно: эмбрионы оплодотворялись по стандартной методике и инкубировались при комнатной температуре 20 минут до переворачивания икринок анимальным полюсом вверх. Затем с них снимали галерту с помощью 2% раствора цистеина в 0.1xMMR в течение 10 мин. Затем эмбрионы 5 раз быстро отмывали в 0.1xMMR и переносили на чашку Петри, покрытую агарозой с 0.5xMMR. В агарозе предварительно были сделаны лунки с помощью нагретого стеклянного капилляра диаметром 1.2 мм, запаянного с одного конца. Диаметр запаянного кончика подбирался таким образом, чтобы диаметр полученной лунки был примерно 0.75 мм для инкубирования разделенных бластомеров и 1.2 мм для инкубирования контрольных эмбрионов. После переноса эмбрионов в чашку Петри с эмбрионов аккуратно снимали вителлиновую мембрану с помощью ювелирных пинцетов. Для правильной ориентации борозды первого деления освобожденные от оболочки эмбрионы ориентировались анимальным полюсом вверх. Процесс снятия вителлиновых оболочек производился вплоть до начала процесса дробления эмбрионов. С началом процесса дробления производилось удаление несимметрично дробящихся эмбрионов и эмбрионов, у которых борозда первого деления не проходила вдоль будущей сагиттальной оси, которую у большинства эмбрионов можно было наблюдать по чуть вытянутому пятну пигмента на вентральной стороне анимальной сферы. Отобранные эмбрионы инкубировали далее – до тех пор, пока перемычка между двумя бластомерами не становилась тонкой, так что

эмбрион был похож на «восьмерку». Тогда с помощью двух пинцетов один из бластомеров вращали вокруг второго, так что перемычка между бластомерами становилась совсем тонкой, так что её можно было рассечь с помощью пинцета без серьезного вреда для эмбриона. Полученные таким образом парные бластомеры переносились в объединенные парами лунки, так что в дальнейшем можно было наблюдать за развитием отдельных пар бластомеров, полученных из одного эмбриона. Параллельно с разделенными бластомерами в лунки более крупного диаметра помещали целые эмбрионы в качестве контроля. После окончания процедуры разделения бластомеров эмбрионы инкубировались при 20-23 °С до стадии ранней бластулы, затем переносились в покрытую агарозой чашку Петри с 0.1xMMR с лунками большего диаметра и инкубировались далее до требуемой стадии, при температуре не ниже 15 °С. В процессе инкубации проверяли нормальность развития внутри пар разделенных бластомеров: нормальными считались те бластомеры, у которых синхронно происходила закладка дорсальной губы бластопора и весь процесс гаструляции как между собой, так и в сравнении с контрольными зародышами.

В случаях, когда в уменьшенных эмбрионах подавлялась трансляция мРНК с помощью морфолино, эмбрионы после снятия галерты переносились в чашку Таразаки с 4% фикоλλом в 0.5xMMR, где производили инъекцию морфолино в еще не дробящиеся эмбрионы. Затем эмбрионы переносились в чашку Петри для разделения бластомеров по описанному выше «стандартному» протоколу.

Для получения уменьшенных зародышей путём разрезания эмбриона на стадии бластулы использовался стандартный протокол (Reversade, De Robertis, 2005; Inomata et al., 2013; De Robertis, Moriyama, 2016).

10.2.2. Выделение тотальной РНК из эмбрионов.

Для проведения кОТ-ПЦР и создания гететических конструкций РНК из эмбрионов выделяли с помощью реагента ExtractRNA (Evrogen) с последующей дополнительной очисткой с помощью РНК-связывающих колонок CleanRNA Standard (Evrogen), используя протоколы производителя. Для одной пробы лизировали 5-7 эмбрионов нужной стадии. Поскольку в процессе выделения РНК с помощью однофазного фенол-гуанидин тиоцианатного реагента происходит некоторая нежелательная контаминация мРНК фрагментами ДНК, после выделения РНК с помощью ExtractRNA проводили

дополнительную обработку образцов ДНКазой I (ThermoFischer) по протоколу производителя. После обработки ДНКазой I образец очищали с помощью колонок CleanRNA Standard.

10.2.3. Высокпроизводительное секвенирование.

Пары нормально развивающихся уменьшенных эмбрионов лизировались для выделения тотальной РНК параллельно с контрольными эмбрионами на стадии поздней гастрюлы (стадия 12.5) в трех независимых экспериментах. Выделение РНК производили с помощью набора NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). Качество образцов РНК проверялось на TapeStation, а количество определялось при помощи Qubit. Образцы РНК готовились к секвенированию с помощью набора TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) по протоколу, рекомендованному производителем. Последовательности адаптеров, использованных для приготовления библиотек: Read1: 5'-

AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'; Read2: 5'-

AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'.

Готовые библиотеки были смешаны эквимолярно, качество библиотек было проверено при помощи кПЦП и Agilent TapeStation. Библиотеки были отсеквенированы на 1 дорожке Illumina HiSeq 2500 (101 цикл) с односторонними ридами длиной 100 н.п. в компании «Евроген». Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили в R-пакете программы DESeq (Anders et al., 2012). Аннотированные гены со статистически значимой дифференциальной экспрессией между опытными и контрольными образцами (по крайней мере двукратное различие в уровне экспрессии, а также значение достоверности с поправкой (seq. Benjamini-Hochberg correction) на множественные сравнения (FDR-adjusted p-value) меньше 0.05) размещены в Таблице 1. Аннотацию проводили в Blast2GO (Conesa et al., 2005), а также в KAAS используя KEGG Ontology (Moriya et al., 2007).

10.2.4. Создание генетических конструкций.

Для создания необходимых генетических конструкций сначала синтезировали цепь кДНК на основе выделенной из эмбрионов тотальной РНК с помощью набора MMLV RT kit (Eurogen), используя протокол производителя. Для облегчения клонирования нужных

фрагментов ДНК выбирались препараты тотальной РНК из эмбрионов тех стадий, на которых количество мРНК интересующего гена было максимально. Для этого использовались профили зависимости экспрессии генов от стадии развития (Session et al., 2016), размещенные на онлайн-ресурсе xenbase.org.

На основе синтезированной кДНК производили клонирование фрагментов ДНК с помощью высокоточной ПЦР, используя набор Encyclo Plus PCR kit (Evrogen), используя протокол производителя, и затем очищали реакционную смесь с помощью ДНК-связывающих колонок Cleanup Standard (Evrogen), также используя протокол производителя. Полученный ПЦР-продукт обрабатывали нужными эндонуклеазами рестрикции (ThermoFischer) и интродуцировали в экспрессионный вектор pCS2+, обработанный теми же рестриктазами (с внесенным заранее эпитопом 3xМус или без эпитопа. См. Таблицу 6) или же сразу интродуцировали в Т-вектор pAL2T (Evrogen) без обработки рестриктазами. Для лигирования ПЦР-продукта и вектора использовали T4-лигазу (ThermoFischer). Затем реакционная смесь, содержащая продукт лигирования, трансформировалась в компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α с последующим наращиванием биомассы, содержащей отдельные клоны (выбиралось 2-3 клон для наращивания). Для внесения изменений в уже полученные конструкции использовали набор для высокоточной ПЦР Tersus Plus PCR kit (Evrogen). Стратегии клонирования конкретных конструкций даны ниже, в Таблице 6:

Таблица 6.

Название конструкции	Стратегия клонирования
pCS2-3xМус	Олигонуклеотиды 5'- <u>TCGAG</u> CAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGA ACAGAAGCTGATATCGGAGGAAGACCTAGAGCAG AAACTCATCTCTGAAGAGGATCTG <u>TGA</u> T-3'; и 5'- <u>CTAGA</u> <u>TCA</u> CAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTG CTCTAGGTCTTCCTCCGATATCAGCTTCTGTTCCAG ATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGC-3'; кодирующие 3xМус-эпитоп со стоп-кодоном (в прямоугольнике, здесь и далее) с «липкими концами» для лигирования в XhoI и XbaI сайты (сайты для рестрикции/лигирования подчеркнуты, здесь и далее), были ренатурированы

	<p>друг на друга и внесены в подготовленный сайт XhoI-XbaI в плазмиде <i>pCS2+</i>.</p>
<i>pCS2-chordin-myc</i>	<p>Транслируемая область мРНК <i>chordin</i> была амплифицирована с кДНК нейрулы шпорцевой лягушки с помощью праймеров 5'- <u>AATTGAATTCATGCAGTGTCCCCCAT</u>-3' и 5'- <u>CATCGATCTAGATCAGCTAAGCTTAAACTCCATGG</u> <u>AGTCCTT</u>-3'; затем внесена в сайт EcoRI-XbaI плазмиды <i>pCS2+</i>. Затем праймеры 5'- <u>AGCTTAGGTGGAGGTCAGCCTTATGAGCAGAACT</u> <u>CATCTCTGAAGAGGATCTGGAACAGAAGCTGATAT</u> <u>CGGAGGAAGACCTAGAGCAGAACTCATCTCTGA</u> <u>AGAGGATCTGCTCAGGCTTAT</u>-3' и 5'- <u>CTAGATAAGCCTGAGCAGATCCTCTTCAGAGATGA</u> <u>GTTTCTGCTCTAGGTCTTCCTCCGATATCAGCTTCT</u> <u>GTTCCAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCAT</u> <u>AAGGCTGACCTCCACCTA</u>-3', кодирующие 3xMyc-эпитоп, были ренатурированы друг на друга и внесены в подготовленный сайт HindIII-XbaI в плазмиде <i>pCS2-chordin</i>. Здесь и далее старт-кодон обозначен жирным шрифтом.</p>
<i>pCS2-mmp3</i>	<p>Транслируемая область мРНК <i>mmp3</i> была амплифицирована с кДНК нейрулы шпорцевой лягушки с помощью праймеров 5'- <u>AATTGGATCCGCCGCCACCATGTTTCTCTCCTGGC</u> <u>TCC</u>-3' and 5'- <u>AATTCTCGAGTCA</u>TTTGCAGCTCATCCATC-3'; затем внесена в сайт BamHI-XhoI плазмиды <i>pCS2+</i>.</p>
<i>pCS2-mmp3-myc</i>	<p>Транслируемая область мРНК <i>mmp3</i> была амплифицирована с плазмиды <i>pCS2-mmp3</i> с помощью праймеров 5'- <u>AATTGGATCCGCCGCCACCATGTTTCTCTCCTGGC</u> <u>TCC</u>-3' и 5'- <u>AATTCTCGAGTTTGCAGCTCATCCATC</u>- 3' и затем внесена в сайт BamHI-XhoI плазмиды <i>pCS2-</i></p>

	<i>3xMyc.</i>
<i>pCS2-mmp3(E239A)/ pCS2-mmp3(E239A)-myc</i>	<p>Неактивная форма <i>mmp3</i>, несущая мутацию E239A в каталитическом центре создана с помощью двух ПЦР с одним из специфических для <i>mmp3</i> комплементарных праймеров 5'- GTTGCTGCCCATGCGTTTGGCCATTCC-3' и 5'- GGAATGGCCAAACGCATGGGCAGCAAC-3', имеющих мутированный кодон, и соответствующим вектор-специфическим праймером, в качестве матрицы используя плазмиду <i>pCS2-mmp3</i> или <i>pCS2-mmp3-myc</i>. Получившиеся ампликоны отжигались друг на друга, образуя мутированную открытую рамку считывания гена <i>mmp3</i>, которая амплифицировалась ПЦР вектор-специфическими фланкирующими праймерами. Получившийся ампликон вносился в сайт BamHI-XhoI плазмид <i>pCS2+</i> или <i>pCS2-3xMyc</i>.</p>
<i>pCS2-myc-sizzled</i>	<p>Транслируемая область мРНК <i>sizzled</i> была амплифицирована с плазмиды кДНК гастролы (стадия 11) шпорцевой лягушки с помощью праймеров 5'- AATTGGATCCGCCGCCACCATGACTGGAGTCTTCC TGCT-3' и 5'- AATTCTCGAGTTAACATTTATGGTGTCTCCAC-3', затем внесена в сайт BamHI-XhoI плазмиды <i>pCS2-3xMyc</i>.</p>
<i>pCS2-tolloid1-myc</i>	<p>Транслируемая область мРНК <i>tolloid-like1</i> была амплифицирована с кДНК нейрулы шпорцевой лягушки с помощью праймеров 5'- AATTGGATCCGCCGCCACCATGAACATGCSTTCTT GGCTC-3' и 5'- AATTCTCGAGACCTCSTTTGGTATGTAGAATGTCTT GAT-3', затем внесена в сайт BamHI/XhoI плазмиды <i>pCS2-3xMyc</i>.</p>

<i>pAL2T-mmp3 antisense</i>	<p>Транслируемая область мРНК <i>mmp3</i> была амплифицирована с плазмиды <i>pCS2-mmp3</i> с помощью праймеров 5'- <u>ААТТGGATCCGCGCCACCA</u>TGTTTCTCTCCTGGC ТСС-3' и 5'- <u>ААТТCTCGAGTTTGCAGSTCATCCATC</u>- 3' и затем внесена в Т-вектор <i>pAL2T</i>. Нужная ориентация вставки определялась с помощью ПЦР.</p>
<i>pAL2T-nog2 antisense</i>	<p>Транслируемая область мРНК <i>noggin2</i> была амплифицирована с кДНК нейрулы шпорцевой лягушки с помощью праймеров 5'- <u>ААТТGAATTCGCGCCACCA</u>TGAAGAGGATAAAT СТGCCTG-3' и 5'- <u>ААТТCTCGAGACCTCCGCATGAACA</u>CTTACACTCT GAA-3' и затем внесена в Т-вектор <i>pAL2T</i>. Нужная ориентация вставки определялась с помощью ПЦР.</p>

10.2.5. Синтез РНК *in vitro*.

Синтетическая мРНК для оверэкспрессии белков в эмбрионах синтезировалась с помощью набора *mMessage mMachine™ SP6 kit* (ThermoFischer) согласно протоколу производителя. В качестве матрицы для синтеза использовались векторы *pCS2+* с внесенными в них генетическими конструкциями. Перед синтезом мРНК векторы линеаризовали с помощью эндонуклеаз рестрикции *Acc65I* или *NotI*, сайты которых расположены далее 3'-конца генетической конструкции

Для синтеза dig-меченых РНК-зондов для гибридизации *in situ* использовали набора *mMessage mMachine™ T7 kit* (ThermoFischer) согласно протоколу производителя. В качестве матрицы использовались векторы *pCS2+* или *pAL2T* с внесенными в них генетическими конструкциями. Перед синтезом мРНК векторы линеаризовали с помощью эндонуклеаз рестрикции, сайты для которых расположены перед 5'-концом внесенных конструкций.

10.2.6. Получение антител.

Анти-Chordin антитела, распознающие N-концевой участок зрелого белка, получали по описанной методике (Piccolo et al., 1996) с некоторыми изменениями. А именно: для выделения антител из выворотки кролика использовали оставшийся пептид, использовавшийся для иммунизации кролика, который был иммобилизован на СВг-сефарозе (GE Healthcare), используя проткол производителя. Для элюции антител использовали 0.2 М раствор глицина (pH 2.7), который протом титровали до физиологического значения pH с помощью 1 М Трис-НСl, pH 8.8.

Антитела к *Noggin2* получали по ранее использованной методике (Иванова и др., 2018), используя систему белковой экспрессии QIAexpressionist™ (Qiagen) согласно протоколу производителя. Для этого открытая рамка считывания мРНК *noggin2* была предварительно внесена в экспрессионный вектор *pQE80*, содержащий гексогистидиловую метку на N-конце. Для очистки синтезированного белка использовали смолу Ni-NTA, связывающую гексогистидиловую метку. Поскольку синтезированный в бактериях *Noggin2* при физиологических условиях выпадал в осадок, то иммобилизацию на СВг-сефарозе производили в 8 М карбамиде, что несколько снижает эффективность реакции. Специфичность и чистоту полученных антител проверяли с помощью вестерн-блоттинга лизатов эмбрионов, инъецированных мРНК соответствующих конструкций.

10.2.7. Белковый электрофорез и вестерн-блоттинг.

Для исследования деградации белков эмбрионы инъецировались 100 пг мРНК только исследуемой конструкции в качестве образца без деградации, и смесью 100 пг мРНК исследуемой конструкции и 100 пг мРНК конструкции *tmr3* в качестве образца с деградацией. На стадии поздней гаструлы (стадия 13) эмбрионы лизировали в 1xCo-IP-буфере и проводили электрофорез образцов в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующим вестерн-блоттингом, используя стандартный протокол. Иммунодетекция блотов осуществлялась с помощью моноклональных анти-Мус и анти-Flag-антител (Sigma-Aldrich), конъюгированных с щелочной фосфатазой, в концентрации 1:2000. Детекция проводилась с помощью колориметрического метода с использованием субстрата для щелочной фосфатазы Western Blue (Promega). Контролирование загрузки в отдельных образцах осуществлялось с помощью инкубации образцов с мышинными

моноклональными анти- α -тубулиновыми антителами и вторичными антителами к иммуноглобулину мыши, конъюгированными с щелочной фосфатазой в концентрации 1:30000. Детекция эндогенного Chordin и Noggin2 осуществлялась соответствующими полученными антителами (см. выше). Анти-Chordin-антитела использовались в концентрации 1:500, а анти-Noggin2-антитела в концентрации 1:200. В качестве вторичных антител использовали антитела к иммуноглобулину кролика, конъюгированные с щелочной фосфатазой, в концентрации 1:30000. Выделение белков из межклеточного пространства эмбрионов производили основываясь на опубликованном протоколе (Inomata et al., 2013) с некоторыми изменениями (Eroshkin et al., 2016; Martynova et al., 2016; Bayramov et al., 2017): 20-30 эмбрионов на стадии 13 помещали в 2 мл стеклянные виалы с 1 мл 1xCMFM, в который добавляли 5 mM ЭДТА для ускорения дизагрегации клеток. Виалы располагали горизонтально на орбитальном шейкере на 10-20 минут до полной дизагрегации эмбрионов на отдельные клетки. Затем виалы ставили вертикально и дожидались осаждения клеток. Потом отбирали полученную среду, центрифугировали 5 мин. при 1000 g для полного удаления клеток, отбирали супернатант и преципитировали белки из среды с помощью трихлоруксусной кислоты. Преципитат центрифугировали 15 мин. при 4 °C с ускорением 13000 g, промывали 2 раза в ацетоне, высушивали и растворяли в 2x буфере Лэммли (для этого 4x буфер Лэммли смешивали пополам с 1xCo-IP-сбуфером). Полученные образцы разделяли поровну, и проводили два параллельных электрофореза в полиакриламидном геле: один гель подвергался вестерн-блоттингу с последующей иммунодетекцией, а второй окрашиванию Кумасси для контроля загрузки в образцах.

10.2.8. Гибридизация *in situ*.

Гибридизацию *in situ* проводили по стандартной методике (Harland, 1991). Для гибридизации сагиттальных половин фиксированные эмбрионы промывали в 1xPBS и разрезали в сагиттальной плоскости микроскальпелем для глазной хирургии. Затем эмбрионы переводили в 96% этанол и проводили стандартную гибридизацию *in situ*. Окрашенные эмбрионы фотографировали с помощью стереомикроскопа Leica M205. Для гибридизации срезов эмбрионы фиксировали, промывали в 96% этаноле и затем в 1xPBS. Затем эмбрионы заключали в 4% агарозу в 1xPBS и делали серийные срезы эмбрионов толщиной 30 мкм с помощью вибратора. Полученные срезы промывали в 96% этаноле и затем проводили стандартную гибридизацию *in situ*, затем фотографировали с помощью

микроскопа Keyence BZ-9000E. Площади доменов экспрессии, окрашенных в ходе гибридизации, рассчитывались в ImageJ.

10.2.9. Иммуногистохимия.

Иммуногистохимический анализ производили по отработанной ранее методике с рядом изменений (Иванова и др., 2018; Tereshina et al., 2019). Окрашивание на фосфорилированный pSmad1/5/8 производили по собственной методике. Эмбрионы нужной стадии фиксировались в MEMFA в течение 1.5 часов, затем 3 раза промывались в 96% этаноле и потом переводились в 1хPTW. Потом эмбрионы переводили в 0.5 мл РН-буфера и инкубировали 3 ч при 60 °С для инактивации эндогенной пероксидазной и фосфатазной активности. После этого эмбрионы переводили в 1хPTW и затем снова фиксировали в MEMFA в течение 1 ч. Затем эмбрионы переводили в 1хPBS и производили обесцвечивание эмбрионов в 10% перекиси водорода в 50% этаноле в УФ-свете в течение нескольких часов, до полного обесцвечивания образцов. Затем образцы промывали 3 раза в 1хPTW и блокировали в 20% сыворотке телёнка в 1хPTW в течение 30 мин. Затем к сыворотке добавляли первичные антитела к pSmad1/5/8 (Cell Signaling) в концентрации 1:200 и инкубировали при 4 °С в течение ночи. Затем производили отмыв лишних антител в 1хPTW (5 раз по 1 ч.), блокировали в 20% сыворотке телёнка в 1хPTW в течение 30 мин, и затем добавляли вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой, в концентрации 1:2000. Образцы оставляли на ночь при 4 °С, затем 5 раз по часу отмывали в 1хPTW от лишних антител и переводили в буфер для щелочной фосфатазы, в который добавляли субстрат NBT/BCIP, с помощью которого происходило окрашивание образцов. По завершении окрашивания эмбрионы отмывались от субстрата в 1хPTW, фиксировались в MEMFA в течение 1 ч. и затем промывались и хранились в 96% этаноле.

10.2.10. Количественная ОТ-ПЦР.

кОТ-ПЦР проводили по опубликованной ранее методике (Ivanova et al., 2013). Праймеры, использованные в работе, представлены ниже в Таблице 7:

Таблица 7

Название гена	Последовательности праймеров (5'→3')
<i>myb.S</i>	forward: TAA GTC CTA CAC AAG CCC TCT G; reverse: TTC CAT CCT GCT GCA AGA CA;
<i>tp63.S</i>	forward: GGA AAC CAC AAA TGG GCT GC; reverse: ACT CCA CAA TTT TGG GAA CTG C;
<i>dvl3.L</i>	forward: ACC TGT GTC AGT TAT GGG GC; reverse: CCC CAG AAT TCT TTG TGG GGT T;
<i>myb.L</i>	forward: CCA CCT GAG CGA CAA TTT GC; reverse: CAA TTC ACA GCG ACA TTG CCA;
<i>atp6v1c2.L</i>	forward: TGA GAG GGG TCA CTG GGA TT; reverse: GCA TGT TCC TGG GCT ACA CT;
<i>rasal1.L</i>	forward: GAT GCT GAG GCA CAG GTT CT; reverse: CGT CTT GCA GGG GAG GAT AC;
<i>mcidas.L</i>	forward: ATA ACC TAA TGA AAG AGC GGT C; reverse: TCC TCT AGG CTC CGT TTC AC;
<i>mcidas.S</i>	forward: ACA TCG ACA GGG CTG AAC TC; reverse: GGG AAA TGC CAA GGT CCT GA;
<i>ccno.S</i>	forward: CAG AAC TGA GCC TGG CAG AT; reverse: ATT TCC AGG CAA CAC ACA GC;
<i>kit.S</i>	forward: GCA GTT GGC ATG TGT CTT CC; reverse: ACA AAC TCC ATC TGC ACC GA;
<i>actg1.S</i>	forward: GCC TGG TTG GCA TAC AGT CT; reverse: CAG CCC CTG TAA CCT AAA GGA;
<i>znf534.L</i>	forward: TGC TCC TGA TGG TTG CAC CT; reverse: ATC CTA TGG GAG ACA GCC ATT C;
<i>val.L</i>	forward: AAG TTT GCC CGA AGT CCA GC; reverse: CAC AGG GGT CCC TTT TGG TT;
<i>mab21l3.S</i>	forward: CCC AGC ATT TAC AGA TGA TT; reverse: CCA GGT CCT TCC AGG CTT;
<i>mmp3.L</i>	forward: CAA TGG ACG TTG GGA CCT CA; reverse: CAA AGC ATT GGG GTC GTT GG;
<i>slc16a6.L</i>	forward: GGG TGC CCT GTT CTT AGC AT; reverse: ACT GGC AGC TCC

	TTC ACA TC;
<i>globinY.L</i>	forward: AGT TAA CAA CTT TCA GTT GCT; reverse: TCT GCT CCA AGG GCT TCT;
<i>actg1.L</i>	forward: GTG AAA GGC TGC CAA TCT GC; reverse: AGC GCT TTA ACC ATT ATG TGG A;
<i>hepacidin-like.L</i>	forward: GGT TGG ACA TCG TCT CCC AG; reverse: AAT ATA AAG GAG CGG CCG AGG;
<i>pou2f3.L</i>	forward: TTA CAG CAA CTC AAG TTC CT; reverse: CTG CTT TGT GCA ATA TCT CA;

10.2.11. CRISPR/Cas9-нокаут.

Нокаут производили по опубликованной методике (Korotkova et al., 2019).

10.2.12. Статистический анализ данных.

Для парных сравнений использовали тест Стьюдента для непарных выборок с неравной дисперсией. Для множественных сравнений использовали ANOVA-тест. Анализ производили в Graphpad Prism8 (Parshina et al., 2022).

10.2.13. Математическое моделирование и скрининг *in silico*.

Методы, использованные для создания математических моделей, а также симуляции *in silico* подробно описаны в Orlov et al., 2022.

11. Список литературы.

1. 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.
2. Гилберт, С. Биология развития: В 3-х т. Пер. с англ. // М.: Мир. 1994. Т.2. С. 5-64.
3. 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.
4. Козин, В. В., Борисенко, И. Е., Костюченко, Р. П. Участие канонического сигнального пути Wnt в определении полярности тела и клеточной идентичности у *Metazoa*: новые данные о развитии губок и аннелид // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2019. № 1. С. 19-30.
5. 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.
6. Нестеренко А.М., Зарайский А.Г. Механизмы эмбрионального скейлинга // Онтогенез. 2019, Т. 50, №36 С. 149-156.
7. 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.
8. Шмуклер, Ю.Б., Чайлахян, Л.М., Смолянинов, В.В., Блиох, Ж.Л., Карпович, А.Л., Гусарева, Э.В., Найдено, Т.Х., Хашаев, З.Х.-М., Медведева, Т.Д. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. II. Датированное механическое разделение бластомеров. // Онтогенез. 1981. Т. 12. № 4. С. 398 – 403.
9. Acosta, H., López, S. L., Revinski, D. R., Carrasco, A. E. Notch destabilises maternal beta-catenin and restricts dorsal-anterior development in *Xenopus*. // Development. 2011. Т. 138. № 12. С. 2567–2579.

10. Adamska, M., Degnan, S. M., Green, K. M., Adamski, M., Craigie, A., Larroux, C., Degnan, B. M. Wnt and TGF-beta expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning. // *PloS one*. 2007. T. 2. № 10. C. e1031.
11. Agnihotri, R., Crawford, H. C., Haro, H., Matrisian, L. M., Havrda, M. C., Liaw, L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). // *The Journal of biological chemistry*. 2001. T. 276. № 30. C. 28261–28267.
12. Akiyama-Oda, Y., Oda, H. Axis specification in the spider embryo: dpp is required for radial-to-axial symmetry transformation and sog for ventral patterning. // *Development*. 2006. T. 133. № 12. C. 2347–2357.
13. Akiyama-Oda, Y., Oda, H. Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. // *Development*. 2003. T. 130. № 9. C. 1735–1747.
14. Almuedo-Castillo, M., Bläßle, A., Mörsdorf, D., Marcon, L., Soh, G.H., Rogers, K.W., Schier, A.F., Müller, P. Scale-invariant patterning by size dependent inhibition of Nodal signalling. // *Nat. Cell Biol*. 2018. T. 20. C. 1032–1042.
15. Ambrosio, A. L., Taelman, V. F., Lee, H. X., Metzinger, C. A., Coffinier, C., De Robertis, E. M. Crossveinless-2 Is a BMP feedback inhibitor that binds Chordin/BMP to regulate *Xenopus* embryonic patterning. // *Developmental cell*. 2008. T. 15. № 2. C. 248–260.
16. Amiel, A. R., Henry, J. Q., Seaver, E. C. An organizing activity is required for head patterning and cell fate specification in the polychaete annelid *Capitella teleta*: new insights into cell-cell signaling in Lophotrochozoa. *Developmental biology*. 2013. T. 379. № 1. C. 107–122.
17. AnceI, P. Vintemberger, P. (1948). Recherches sur le determinisme de la symetrie bilaterale dans l'oeuf des Amphibiens. // *Bull Biol. FT. Belg*. 1948. T. 31 (Suppl.). C. 1-182.
18. Anders, S., Pyl, P. T., Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. // *Bioinformatics*. 2015. T. 31. № 2. C. 166–169.
19. Anders, S., Reyes, A., Huber, W. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. // *Genome research*. 2012. T. 22. № 10. C. 2008–2017.
20. Anderson, C., Stern, C. D. Organizers in Development. Current topics in developmental biology. 2016. T. 117. C. 435–454.

21. Angerer, L. M., Angerer, L. C. Animal–Vegetal Axis Patterning Mechanisms in the Early Sea Urchin Embryo. // *Dev. Biol.* 2000. T. 218. C. 1–12.
22. Arendt, D., Nübler-Jung, K. Inversion of dorsoventral axis? // *Nature*. 1994. T. 371. № 6492. C. 26.
23. Ashe, H. L., Levine, M. Local inhibition and long-range enhancement of Dpp signal transduction by Sog. // *Nature*. 1999. T. 398. № 6726. C. 427–431.
24. Barresi, M.J.F., Gilbert, S.F. *Developmental biology*, 12th Edition. // Oxford University Press. 2020. C. 92.
25. Barresi, M.J.F., Gilbert, S.F. *Developmental biology*, 12th Edition. // Oxford University Press. 2020. C. 404-413.
26. Bayramov, A. V., Eroshkin, F. M., Martynova, N. Y., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Zaraisky, A. G. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. // *Development*. 2011. T. 138. № 24. C. 5345–5356.
27. Belintsev, B.N. Dissipative structures and the problem of biological pattern formation. // *Sov. Phys. Usp.* 1983. T. 26. C. 775–800.
28. Ben-Zvi, D., Barkai, N. Scaling of morphogen gradients by an expansion-repression integral feedback control. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. T. 107. № 15. C. 6924–6929.
29. Ben-Zvi, D., Pyrowolakis, G., Barkai, N., Shilo, B. Z. Expansion-repression mechanism for scaling the Dpp activation gradient in *Drosophila* wing imaginal discs. // *Current biology*. 2011. T. 21. № 16. C. 1391–1396.
30. Ben-Zvi, D., Shilo, B. Z., Fainsod, A., Barkai, N. Scaling of the BMP activation gradient in *Xenopus* embryos. // *Nature*. 2008. T. 453. № 7199. C. 1205–1211.
31. Berg, S., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C. N., Kausler, B. X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., Eren, K., Cervantes, J. I., Xu, B., Beuttenmueller, F., Wolny, A., Zhang, C., Koethe, U., Hamprecht, F. A., Kreshuk, A. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. // *Nature methods*. 2019. T. 16. № 12. C. 1226–1232.
32. Berrill, N. T. The Mosaic Development of the Ascidian Egg. // *Biological Bulletin*. 1932. T. 63. № 3. C. 381-386.
33. Bier, E., De Robertis, E. M. EMBRYO DEVELOPMENT. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. // *Science*. 2015. T. 348. № 6242. C. aaa5838.

34. Blitz, I. L., Cho, K. W., Chang, C. Twisted gastrulation loss-of-function analyses support its role as a BMP inhibitor during early *Xenopus* embryogenesis. // *Development*. 2003. T. 130. № 20. C. 4975–4988.
35. Briggs, J. A., Weinreb, C., Wagner, D. E., Megason, S., Peshkin, L., Kirschner, M. W., Klein, A. M. The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. // *Science*. 2018. T. 360. № 6392. C. eaar5780.
36. Browne, E. The production of new hydrants by the insertion of small grafts. // *J. Exp. Zool.* 1901. T. 7. C. 1–37.
37. Čapek, D., Müller, P. Positional information and tissue scaling during development and regeneration. // *Development*. 2019. T. 146. № 24. dev177709.
38. Carron, C., Shi, D. L. Specification of anteroposterior axis by combinatorial signaling during *Xenopus* development. // *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*. 2016. T. 5. № 2. C. 150–168.
39. Carter A. M. Classics revisited: Miguel Fernández on germ layer inversion and specific polyembryony in armadillos. // *Placenta*. 2018. T. 61. C. 55–60.
40. Castro Colabianchi, A. M., Tavella, M. B., Boyadjián López, L. E., Rubinstein, M., Franchini, L. F., López, S. L. Segregation of brain and organizer precursors is differentially regulated by Nodal signaling at blastula stage. // *Biology open*. 2021. T. 10 № 2. C. bio051797.
41. Chabry L. Contribution a l'embryologie normale et teratogique des Ascidies simples. // *J. Anat. Physiol.* 1887. T. 23. C. 167–319.
42. Cheung, D., Miles, C., Kreitman, M., Ma, J. Scaling of the Bicoid morphogen gradient by a volume-dependent production rate. // *Development*. 2011. T. 138. № 13. C. 2741–2749.
43. Chin, J. R., Murphy, G., Werb, Z. (Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. // *The Journal of biological chemistry*. 1985. T. 260. № 22. C. 12367–12376.
44. Cho, K. W., Blumberg, B., Steinbeisser, H., De Robertis, E. M. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *goosecoid*. // *Cell*. 1991. T. 67. № 6. C. 1111–1120.
45. Clement, A. C. Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. II. The development of isolated blastomeres. *J. Exp. Zool.* 1956. T. 123. № 3. C. 427–445.

46. Collavin, L., Kirschner, M. W. The secreted Frizzled-related protein Sizzled functions as a negative feedback regulator of extreme ventral mesoderm. // *Development*. T. 130. № 4. C. 805–816.
47. Collins, Z. M., Ishimatsu, K., Tsai, T. Y. C. Megason, S. G. A Scube2-Shh feedback loop links morphogen release to morphogen signaling to enable scale invariant patterning of the ventral neural tube. // 2019.
<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/11/13/469239>
48. Colwin, A.L., Colwin, L.H. The developmental capacities of separated early blastomeres of an enteropneust, *Saccoglossus kowalevskii*. // *J. Exp. Zool.* 1950. T. 115. C. 263-295.
49. Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. // *Bioinformatics*. 2005. T. 21. № 18. C. 3674–3676.
50. Conklin, E. G. Mosaic development in ascidian eggs. // *J. Exp. Zool.* 1905. T. 2. C. 145-223.
51. Conklin, E.G. The development of isolated and partially separated blastomeres of *Amphioxus*. // *J. Exp. Zool.* 1933. T. 64. C. 303-375.
52. Cooke, J. Control of somite number during morphogenesis of a vertebrate, *Xenopus laevis*. // *Nature*. 1975. T. 254. № 5497. C. 196–199.
53. Cooke, J. Scale of body pattern adjusts to available cell number in amphibian embryos. // *Nature*. 1981. T. 290. C. 775–778.
54. Cooke, J., Webber, J.A. Dynamics of the control of body pattern in the development of *Xenopus laevis* I. Timing and pattern in the development of dorsoanterior and posterior blastomere pairs, isolated at the 4-cell stage. // *Development*. 1985a. T. 88. C. 85–112.
55. Cooke, J., Webber, J.A. Dynamics of the control of body pattern in the development of *Xenopus laevis* II. Timing and pattern in the development of single blastomeres (presumptive lateral halves) isolated at the 2-cell stage. // *Development*. 1985b. T. 88. C. 113–133.
56. Coppey, M., Boettiger, A. N., Berezhkovskii, A. M., Shvartsman, S. Y. Nuclear trapping shapes the terminal gradient in the *Drosophila* embryo. // *Current biology*. 2008. T. 18. № 12. C. 915–919.
57. Crick F. Diffusion in embryogenesis. // *Nature*. 1970. T. 225. № 5231. C. 420–422.
58. Curran, K. L., Grainger, R. M. Expression of activated MAP kinase in *Xenopus laevis* embryos: evaluating the roles of FGF and other signaling pathways in early induction and patterning. // *Developmental biology*. 2000. T. 228. № 1. C. 41–56.

- 59.
60. Dale, L., Wardle, F. C. A gradient of BMP activity specifies dorsal-ventral fates in early *Xenopus* embryos. // *Seminars in cell & developmental biology*. 1999. T. 10. №3. C. 319–326.
61. De Robertis E. M. Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. // *Mechanisms of development*. 2009. T. 126. №11-12. C. 925–941.
62. De Robertis, E. M., Kuroda, H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. // *Annual review of cell and developmental biology*. 2004. T. 20. C. 285–308.
63. De Robertis, E. M., Larraín, J., Oelgeschläger, M., Wessely, O. The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nature reviews. Genetics*. 2000. T. 1. № 3. C. 171–181.
64. De Robertis, E. M., Morita, E. A., Cho, K. W. Gradient fields and homeobox genes. // *Development*. 1991. T. 112. № 3. C. 669–678.
65. De Robertis, E. M., Tejada-Muñoz, N. Evo-Devo of Urbilateria and its larval forms. // *Developmental biology*. 2022. T. 487. C. 10–20.
66. De Robertis, E.M., Moriyama, Y. The chordin morphogenetic pathway. // *Curr. Top. Dev. Biol*. 2016. T. 116. C. 231–245.
67. Ding, Y., Ploper, D., Sosa, E. A., Colozza, G., Moriyama, Y., Benitez, M. D., Zhang, K., Merkurjev, D., De Robertis, E. M. Spemann organizer transcriptome induction by early beta-catenin, Wnt, Nodal, and Siamois signals in *Xenopus laevis*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. T. 114. № 15. C. E3081–E3090.
68. Domingo, C., Keller, R. Cells remain competent to respond to mesoderm-inducing signals present during gastrulation in *Xenopus laevis*. // *Developmental biology*. 2000. T. 225. № 1. C. 226–240.
69. Driesch, H. *Entwicklungsmechanische Studien I: Der Wert der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermen-Entwicklung*. // *Zeitschrift Für Wissenschaftliche Zool*. 1891. T. 53. C. 160–178.
70. DuBuc, T. Q., Ryan, J. F., Martindale, M. Q. "Dorsal-Ventral" Genes Are Part of an Ancient Axial Patterning System: Evidence from *Trichoplax adhaerens* (Placozoa). // *Molecular biology and evolution*. 2019. T. 36. № 5. C. 966–973.
71. Dupont, J. C. Wilhelm His and mechanistic approaches to development at the time of *Entwicklungsmechanik*. // *History and philosophy of the life sciences*. 2017. T. 39. № 3. 1-21.

72. Eldar, A., Dorfman, R., Weiss, D., Ashe, H., Shilo, B. Z., Barkai, N. Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning. // *Nature*. 2002. T. 419. № 6904. C. 304–308.
73. Emura, N., Yajima, M. Micromere formation and its evolutionary implications in the sea urchin. // *Current topics in developmental biology*. 2022. T. 146. C. 211–238.
74. 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., Zaraisky, A. G. Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. // *Scientific reports*. 2016. T. 6. C. 23049.
75. Evsikov, S. V., Morozova, L. M., Solomko, A. P. Role of ooplasmic segregation in mammalian development. // *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1994. T. 203. № 4. C. 199–204.
76. Faber, J., Nieuwkoop, P.D. Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis (1st ed.). // *Garland Science*. 1994.
77. Fagotto, F., Guger, K., Gumbiner, B. M. Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/GSK/beta-catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. // *Development*. 1997. T. 124. № 2. C. 453–460.
78. Ferguson, E. L., Anderson, K. V. Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. // *Cell*. 1992. T. 71. № 3. C. 451–461.
79. Fischer, J. L. Experimental embryology in France (1887-1936). // *Int. J. Dev. Biol.* 1990. T. 34. № 1. C. 11–23.
80. Francois, P., Vonica, A., Brivanlou, A. H., Siggia, E. D. Scaling of BMP gradients in *Xenopus* embryos. // *Nature*. 2009. T. 461 № 7260. C. E1–E2.
81. Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J. W., Emery, J., Bier, E. Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. // *Genes & development*. 1994. T. 8. № 21. C. 2602–2616.
82. Fritzenwanker, J. H., Genikhovich, G., Kraus, Y., and Technau, U. Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis*. // *Dev. Biol.* 2007. T. 310. C. 264-279.
83. Garcia, M., Nahmad, M., Reeves, G.T., Stathopoulos, A. Sizedependent regulation of dorsal-ventral patterning in the early *Drosophila* embryo. // *Dev. Biol.* 2013. T. 381. C. 286–299.
84. Gardner, R. L. Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. // *Development*. 2001. T. 128. C. 839-847.

85. Gaviño, M. A., Reddien, P. W. A Bmp/Admp regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. // *Current biology*. 2011. T. 21. № 4. C. 294–299.
86. Genikhovich, G., Fried, P., Prünster, M. M., Schinko, J. B., Gilles, A. F., Fredman, D., Meier, K., Iber, D., Technau, U. Axis Patterning by BMPs: Cnidarian Network Reveals Evolutionary Constraints. // *Cell reports*. 2015. T. 10. № 10. C. 1646–1654.
87. Genikhovich, G., Technau, U. On the evolution of bilaterality. // *Development*. 2017. T. 144. № 19. C. 3392–3404.
88. Gerhart, J. Evolution of the organizer and the chordate body plan. // *Int. J. Dev. Biol.* 2001. T. 45. № 1. C. 133–153.
89. Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowning, B., Stewart, R. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. // *Development*. 1989. T. 107 (Suppl.). C. 37–51.
90. Gierer, A., Meinhardt, H. (1972). A theory of biological pattern formation. // *Kybernetik*. 1972. T. 12. C. 30–39.
91. Gierer, A., Meinhardt, H. A theory of biological pattern formation. // *Kybernetik*. 1972. T. 12. № 1. C. 30–39.
92. Gilbert, S.F. *Developmental biology*, 9th Edition. // Sinauer Associates, Inc. 2010.
93. Gimlich, R. L., Gerhart, J. C. Early cellular interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. // *Developmental biology*. 1984. T. 104. № 1. C. 117–130.
94. Greenfeld, H., Lin, J., Mullins, M. C. The BMP signaling gradient is interpreted through concentration thresholds in dorsal-ventral axial patterning. // *PLoS biology*. 2021. T. 19. № 1. C. e3001059.
95. Gregor, T., McGregor, A. P., Wieschaus, E. F. Shape and function of the Bicoid morphogen gradient in dipteran species with different sized embryos. // *Developmental biology*. 2008. T. 316. № 2. C. 350–358.
96. Haillot, E., Molina, M. D., Lapraz, F., Lepage, T. The Maternal Maverick/GDF15-like TGF- β Ligand Panda Directs Dorsal-Ventral Axis Formation by Restricting Nodal Expression in the Sea Urchin Embryo. // *PLoS biology*. 2015. T. 13. № 9. C. e1002247.
97. Hamaratoglu, F., de Lachapelle, A. M., Pyrowolakis, G., Bergmann, S., Affolter, M. Dpp signaling activity requires Pentagone to scale with tissue size in the growing *Drosophila* wing imaginal disc. // *PLoS biology*. 2011. T. 9. № 10. C. e1001182.

98. Harland, R. Induction into the Hall of Fame: tracing the lineage of Spemann's organizer. // *Development*. 2008. T. 135. № 20. C. 3321–3323.
99. Harland, R. M. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. // *Methods in cell biology*. 1991. T. 36. C. 685–695.
100. Harrison, R. G. Experiments on the development of the fore-limb of *Amblystoma*, a self-differentiating equipotential system. // *J. exp. Zool.* 1918. T. 25. C. 413–461.
101. Henry J.Q., Perry K.J., Martindale M.Q. β -catenin and Early Development in the Gastropod, *Crepidula fornicata*. // *Integr. Comp. Biol.* 2010. T. 50. № 5. C. 707–719.
102. Henry J.Q., Perry K.J., Wever J., Seaver E., Martindale M.Q. β -Catenin is required for the establishment of vegetal embryonic fates in the nemertean, *Cerebratulus lacteus* // *Dev. Biol.* 2008. T. 317. № 1. C. 368–379.
103. Henry, J. J., Martindale, M. Q. The organizing role of the D quadrant as revealed through the phenomenon of twinning in the polychaete *Chaetopterus variopedatus*. // *W.Roux's Arch. Dev. Biol.* 1987. T. 196. №8. C. 499–510.
104. Henry, J. J., Raff, R. A. Evolutionary change in the process of dorsoventral axis determination in the direct developing sea urchin, *Heliocidaris erythrogramma*. *Dev. Biol.* 1990. T. 141. C. 55–69.
105. Henry, J. Q., Lyons, D. C., Perry, K. J., Osborne, C. C. Establishment and activity of the D quadrant organizer in the marine gastropod *Crepidula fornicata*. // *Developmental biology*. 2017. T. 431. № 2. C. 282–296.
106. Hertzler, P. L., Wang, S. W., & Clark, W. H., Jr. Mesendoderm cell and archenteron formation in isolated blastomeres from the shrimp *Sicyonia ingentis*. // *Dev. Biol.* 1994. T. 164. № 2. C. 333–344.
107. Holland, L.Z. Genomics, evolution and development of amphioxus and tunicates: The Goldilocks principle. // *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. 2015. T. 324B. C. 342–352.
108. Hörstadius, S. *Experimental Embryology of Echinoderms*. // Oxford, UK: Clarendon Press. 1973.
109. Houston, D.W. Vertebrate Axial Patterning: From Egg to Asymmetry. In: Pelegri, F., Danilchik, M., Sutherland, A. (eds) *Vertebrate Development. Advances in Experimental Medicine and Biology*. // Springer, Cham. 2017. T. 953.
110. Imai, K. S., Daido, Y., Kusakabe, T. G., Satou, Y. Cis-acting transcriptional repression establishes a sharp boundary in chordate embryos. // *Science*. 2012. T. 337. № 6097. C. 964–967.

111. Imai, K. S., Hino, K., Yagi, K., Satoh, N., Satou, Y. Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks. // *Development*. 2004. T. 131. № 16. C. 4047–4058.
112. Inomata, H. Scaling of pattern formations and morphogen gradients. // *Dev Growth Differ*. 2017. T. 59. C. 41–51.
113. Inomata, H., Haraguchi, T., Sasai, Y. Robust stability of the embryonic axial pattern requires a secreted scaffold for chordin degradation. // *Cell*. 2008. T. 134. № 5. C. 854–865.
114. Inomata, H., Shibata, T., Haraguchi, T., Sasai, Y. Scaling of dorsalventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals. // *Cell*. 2013. T. 153. C. 1296–1311.
115. Inui, M., Montagner, M., Ben-Zvi, D., Martello, G., Soligo, S., Manfrin, A., Aragona, M., Enzo, E., Zacchigna, L., Zanconato, F., Azzolin, L., Dupont, S., Cordenonsi, M., Piccolo, S. Self-regulation of the head-inducing properties of the Spemann organizer. // *PNAS*. 2012. T. 109. № 38. C. 15354–15359.
116. Irie, N., Satoh, N., Kuratani, S. The phylum Vertebrata: a case for zoological recognition. // *Zoological letters*. 2018. T. 4. № 32.
117. Ishibashi, H., Matsumura, N., Hanafusa, H., Matsumoto, K., De Robertis, E. M., Kuroda, H. Expression of Siamois and Twin in the blastula Chordin/Noggin signaling center is required for brain formation in *Xenopus laevis* embryos. // *Mechanisms of development*. 2008. T. 125. № 1-2ю C. 58–66.
118. Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I. B., Enghild, J. J., Sasaguri, Y., Mori, Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. // *The Journal of biological chemistry*. 1996. T. 271. № 25. C. 14657–14660.
119. Ivanova, A. S., Tereshina, M. B., Ermakova, G. V., Belousov, V. V., Zaraisky, A. G. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles. // *Scientific reports*. 2013. T. 3. C. 1279.
120. James, R. M., Klerkx, A. H. E. M., Keighren, M., Flockhart, J. H., West, J. D. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid <=> diploid chimaeras. // *Dev. Biol*. 1995. T. 167. C. 213–226.
121. Joubin, K., Stern, C. D. Molecular interactions continuously define the organizer during the cell movements of gastrulation. // *Cell*. 1999. T. 98. № 5. C. 559–571.
122. Kageura, H., Yamana, K. Pattern regulation in isolated halves and blastomeres of early *Xenopus laevis*. // *J. Embryol. exp. Morph*. 1983. T. 74. C. 221-234.

123. Kajishima, T. Development of isolated half blastomeres of *Balanus*. // *Zool. Mag.* 1951. T. 61. C. 18–21.
124. Karanth, S., Schlegel, A. The Monocarboxylate Transporter SLC16A6 Regulates Adult Length in Zebrafish and Is Associated With Height in Humans. // *Frontiers in physiology.* 2019. T. 9. C. 1936.
125. Kenny, N. J., Namigai, E. K., Dearden, P. K., Hui, J. H., Grande, C., Shimeld, S. M. The Lophotrochozoan TGF- β signalling cassette - diversification and conservation in a key signalling pathway. // *The International journal of developmental biology.* 2014. T. 58. № 6-8. C. 533–549.
126. Khaner, D. The potency of the first two cleavage cells in echinoderm development: the experiments of Driesch revisited. // *W.Roux's Arch. Dev. Biol.* 1993. T. 202. C. 193-197.
127. Kicheva, A., Pantazis, P., Bollenbach, T., Kalaidzidis, Y., Bittig, T., Jülicher, F., González-Gaitán, M. Kinetics of morphogen gradient formation. // *Science.* 2007. T. 315. C. 521–525.
128. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S. L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. // *Genome biology.* 2013. T. 14. № 4. C. R36.
129. Kimura, J. O., Ricci, L., Srivastava, M. Embryonic development in the acoeal *Hofstenia miamia*. // *Development.* 2021. T. 148. № 13. C. dev188656.
130. Kolmogorov, A., Petrovskii, I., Piscunov, N. (1937). A study of the equation of diffusion with increase in the quantity of matter, and its application to a biological problem. // *Boll. Mosc. Univ. Math. Mech.* 1937. T. 1. C. 1–25.
131. Korotkova, D. D., Lyubetsky, V. A., Ivanova, A. S., Rubanov, L. I., Seliverstov, A. V., Zverkov, O. A., Martynova, N. Y., Nesterenko, A. M., Tereshina, M. B., Peshkin, L., Zaraisky, A. G. Bioinformatics Screening of Genes Specific for Well-Regenerating Vertebrates Reveals *c-answer*, a Regulator of Brain Development and Regeneration. // *Cell reports.* 2019. T. 29. № 4. C. 1027–1040.e6.
132. Kraus, Y., Aman, A., Technau, U., Genikhovich, G. Pre-bilaterian origin of the blastoporal axial organizer. // *Nat. Comm.* 2016. T. 7. C. 11694.
133. Kraus, Y., Fritzenwanker, J. H., Genikhovich, G., Technau, U. The blastoporal organiser of a sea anemone. // *Current biology.* 2007. T. 17. № 20. C. R874–R876.
134. Kumano, G., Ezal, C., Smith, W. C. ADMP2 is essential for primitive blood and heart development in *Xenopus*. // *Developmental biology.* 2006. T. 299. № 2. C. 411–423.

135. Kumar, V., Park, S., Lee, U., Kim, J. The Organizer and Its Signaling in Embryonic Development. // *Journal of developmental biology*. 2021. T. 9. № 4. C. 47.
136. Kuo, D. H., Weisblat, D. A. A new molecular logic for BMP-mediated dorsoventral patterning in the leech *Helobdella*. // *Current biology*. 2011. T. 21. № 15. C. 1282–1288.
137. Kuroda, H., Wessely, O., De Robertis, E. M. Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. // *PLoS biology*. 2004. T. 2. № 5 to C. E92.
138. Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., Valen, E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. // *Nucleic acids research*. 2019. T. 47. № W1. C. W171–W174.
139. Lambert, J. D., Johnson, A. B., Hudson, C. N., Chan, A. Dpp/BMP2-4 Mediates Signaling from the D-Quadrant Organizer in a Spiralian Embryo. // *Current biology*. 2016. T. 26. № 15. C. 2003–2010.
140. Landge, A. N., Jordan, B. M., Diego, X., Müller, P. Pattern formation mechanisms of self-organizing reaction-diffusion systems. // *Developmental biology*. 2020. T. 460. № 1. C. 2–11.
141. Lanza, A. R., Seaver, E. C. Functional evidence that Activin/Nodal signaling is required for establishing the dorsal-ventral axis in the annelid *Capitella teleta*. // *Development*. 2020b. T. 147. № 18. C. dev189373.
142. Lanza, A.R., Seaver, E.C. Activin/Nodal signaling mediates dorsal–ventral axis formation before third quartet formation in embryos of the annelid *Chaetopterus pergamentaceus*. // *EvoDevo*. 2020a. T. 11. C. 17.
143. Lapraz, F., Besnardeau, L., Lepage, T. Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network. // *PLoS biology*. 2009. T. 7. № 11. C. e1000248.
144. Lapraz, F., Hailot, E., Lepage, T. A deuterostome origin of the Spemann organiser suggested by Nodal and ADMPs functions in Echinoderms. // *Nature Communications*. 2015. T. 6. C. 8434.
145. Lawrence, P. A., Levine, M. Mosaic and regulative development: two faces of one coin. // *Curr. Biol*. 2006. T. 16. C. R236-R239.
146. Lee, H. X., Ambrosio, A. L., Reversade, B., De Robertis, E. M. Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tollid proteinases. // *Cell*. 2006. T. 124. № 1. C. 147–159.

147. Lee, P. N., Kumburegama, S., Marlow, H. Q., Martindale, M. Q., Wikramanayake, A. H. Asymmetric developmental potential along the animal-vegetal axis in the anthozoan cnidarian, *Nematostella vectensis*, is mediated by Dishevelled. // *Dev. Biol.* 2007. T. 310. № 1. C. 169–186.
148. Leibovich, A., Edri, T., Klein, S. L., Moody, S. A., Fainsod, A. Natural size variation among embryos leads to the corresponding scaling in gene expression. // *Developmental biology.* 2020. T. 462. № 2. C. 165–179.
149. Lemaire P. Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians. // *Developmental biology.* 2009. T. 332. № 1. C. 48–60.
150. Lemaire, P., Smith, W. C., Nishida, H. Ascidians and the plasticity of the chordate developmental program. // *Current biology.* 2008. T. 18. № 14. C. R620–R631.
151. Lewis, W.H. Transplantation of the lips of the blastopore in *Rana palustris*. // *Amer. J. Anat.* 1908. T. 7. C. 137-141.
152. Logan, C. Y., Miller, J. R., Ferkowicz, M. J., McClay, D. R. Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. // *Development.* 1999. T. 126. № 2. C. 345–357.
153. Loh, K. M., van Amerongen, R., Nusse, R. Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. // *Developmental cell.* 2016. T. 38. № 6. 643–655.
154. Lowe, C. J., Clarke, D. N., Medeiros, D. M., Rokhsar, D. S., Gerhart, J. The deuterostome context of chordate origins. // *Nature.* 2015. T. 520. № 7548. C. 456–465.
155. Lowe, C. J., Terasaki, M., Wu, M., Freeman, R. M., Jr, Runft, L., Kwan, K., Haigo, S., Aronowicz, J., Lander, E., Gruber, C., Smith, M., Kirschner, M., Gerhart, J. Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. // *PLoS biology.* 2006. T. 4. № 9. C. e291.
156. Lyons, D. C., Perry, K. J., Batzel, G., Henry, J. Q. BMP signaling plays a role in anterior-neural/head development, but not organizer activity, in the gastropod *Crepidula fornicata*. // *Developmental biology.* 2020. T. 463. № 2. C. 135–157.
157. Madaan, U., Faure, L., Chowdhury, A., Ahmed, S., Ciccarelli, E. J., Gumienny, T. L., Savage-Dunn, C. Feedback regulation of BMP signaling by *Caenorhabditis elegans* cuticle collagens. // *Molecular biology of the cell.* 2020. T. 31. № 8. C. 825–832.

158. Maduro, M.F. Cell fate specification in the *C. elegans* embryo. // *Developmental Dynamics*. 2010. T. 239. C. 1315-1329.
159. Maienschein, J. The origins of Entwicklungsmechanik. // *A conceptual history of modern embryology*. New York: Plenum Press. 1991. C. 43-61.
160. Marcelino, J., Sciortino, C.M., Romero, M.F., Ulatowski, L.M., Ballock, R.T., Economides, A.N., Eimon, P.M., Harland, R.M., Warman M.L. Human disease-causing NOG missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. T. 98. №20. C. 11353-11358.
161. Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N., Mayor, R. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. // *Developmental biology*. 1998. T. 198. № 2. C. 319–329.
162. Martindale, M. Q. The ontogeny and maintenance of adult symmetry properties in the ctenophore, *Mnemiopsis mccradyi*. // *Dev. Biol.* 1986. T. 118. № 2. C. 556–576.
163. Martindale, M. Q., Doe, C. Q. and Morrill, J. B. The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorso-ventral polarity in the equal-cleaving spiralian, *Lymnaea palustris*. // *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1985. T. 194. C. 281-295.
164. Martindale, M. Q., Henry, J. Q. Modifications of cell fate specification in equal-cleaving nemertean embryos: alternate patterns of spiralian development. // *Development*. 1995. T. 121. № 10. C. 3175–3185.
165. Martín-Durán, J. M., Marlétaz, F. Unravelling spiral cleavage. // *Development*. 2020. T. 147. № 1. C. dev181081.
166. Martinez Arias, A., Nichols, J., Schröter, C. A molecular basis for developmental plasticity in early mammalian embryos. // *Development*. 2013. T. 140 № 17. C. 3499–3510.
167. Martynova N.Y., Parshina E.A., Zaraisky A.G. Protocol for separation of the nuclear and the cytoplasmic fractions of *Xenopus laevis* embryonic cells for studying protein shuttling // *STAR Protocols*. 2021. T. 2. № 2. C. 100449.
168. Martynova, N. Y., Ermolina, L. V., Ermakova, G. V., Eroshkin, F. M., Gyoeva, F. K., Baturina, N. S., Zaraisky, A. G. The cytoskeletal protein Zyxin inhibits Shh signaling during the CNS patterning in *Xenopus laevis* through interaction with the transcription factor Gli1. // *Developmental biology*. 2013. T. 380. № 1. C. 37–48.

169. Mateus, R., Holtzer, L., Seum, C., Hadjivasiliou, Z., Dubois, M., Jülicher, F., Gonzalez-Gaitan, M. BMP Signaling Gradient Scaling in the Zebrafish Pectoral Fin. // *Cell reports*. 2020. T. 30. № 12. C. 4292–4302.e7.
170. Meinhardt H. Models of biological pattern formation: from elementary steps to the organization of embryonic axes // *Current Topics in Developmental Biology*. 2008. T. 81. № 7. C. 1–63.
171. Mintz, B. Formation of genotypically mosaic mouse embryos. // *Am. Zool.* 1962. T. 2. C. 432.
172. Mintzer, K. A., Lee, M. A., Runke, G., Trout, J., Whitman, M., Mullins, M. C. Lost-a-fin encodes a type I BMP receptor, Alk8, acting maternally and zygotically in dorsoventral pattern formation. *Development*. 2001. T. 128. № 6. C. 859–869.
173. Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S., Sasai, Y. *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. // *Development*. 1998. T. 125. № 4. C. 579–587.
174. Monti, M. Mouse Development From Oocyte to Stem Cells. // *European Journal of Histochemistry : EJH*. 2014. T. 58. № 1. C. 146-147.
175. Moore, N. W., Adams, C. E., Rowson, L. E. A. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. // *J. Reprod. Fertil.* 1968. T. 17. C.527–531.
176. Morgan, T.H. Half embryos and whole embryos from one of the first two blastomeres. // *Anat. Anz.* 1895. T. 10. C. 623–638.
177. Morgan, T.H. Two embryos from one egg. // *The Scientific Monthly*. 1924. T. 18. C. 529–546.
178. Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C., Kanehisa, M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. // *Nucleic acids research*. 2007. T. 35(Web Server issue). C. W182–W185.
179. Moriyama, Y., De Robertis, E. M. Embryonic regeneration by relocalization of the Spemann organizer during twinning in *Xenopus*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018. T. 115. № 21. C. E4815–E4822.
180. Morris, S. A., Guo, Y., Zernicka-Goetz, M. Developmental plasticity is bound by pluripotency and the Fgf and Wnt signaling pathways. // *Cell reports*. 2012. T. 2 №4. C. 756–765.
181. Moustakas, A., Heldin, C. H. The regulation of TGFbeta signal transduction. // *Development*. 2009. T. 136. № 22. C. 3699–3714.

182. Mullen, R. J., Whitten, W. K., Carter, S. C. Studies on chimeric mice and half-embryos. In: Annual report of the Jackson Laboratory. // Bar harbor, Maine, 1970. C. 67–68.
183. Müller, P., Rogers, K. W., Jordan, B. M., Lee, J. S., Robson, D., Ramanathan, S., Schier, A. F. Differential diffusivity of Nodal and Lefty underlies a reaction-diffusion patterning system. // Science. 2012. T. 336. № 6082. C. 721–724.
184. Nakamasu, A., Takahashi, G., Kanbe, A., Kondo, S. Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009. T. 106. № 21. C. 8429–8434.
185. Nakamoto, A., Nagy, L. M., & Shimizu, T. Secondary embryonic axis formation by transplantation of D quadrant micromeres in an oligochaete annelid. // Development. 2011. T. 138. № 2. C. 283–290.
186. Nakayama, T., Blitz, I. L., Fish, M. B., Odeleye, A. O., Manohar, S., Cho, K. W., Grainger, R. M. Cas9-based genome editing in *Xenopus tropicalis*. // Methods in enzymology. 2014. T. 546. C. 355–375.
187. Neave, B., Holder, N., Patient, R. A graded response to BMP-4 spatially coordinates patterning of the mesoderm and ectoderm in the zebrafish. // Mechanisms of development. 1997. T. 62. № 2. C. 183–195.
188. Nesterenko, A. M., Orlov, E. E., Ermakova, G. V., Ivanov, I. A., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Martynova, N. Y., Zaraisky, 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. T. 468. № 1-2. C. 331–336.
189. Nieukoop, P. D. The "organization center" of the amphibian embryo: its spatial organization and morphogenetic action. Adv. Morphogen. 1973. T. 10. C. 1-39.
190. Nieuwkoop P. D., Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). // Oxford, UK: Taylor and Francis. 1994.
191. Nishida, H. Specification of embryonic axis and mosaic development in ascidians. // Developmental Dynamics. 2005. T. 233. C. 1177-1193.
192. Oda, H., Iwasaki-Yokozawa, S., Usui, T., Akiyama-Oda, Y. Experimental duplication of bilaterian body axes in spider embryos: Holm's organizer and self-regulation of embryonic fields. // Development genes and evolution. 2020. T. 230. № 2. C. 49–63.

193. Oelgeschläger, M., Larraín, J., Geissert, D., De Robertis, E. M. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. // *Nature*. 2000. T. 405. №6788. C. 757–763.
194. Oppenheimer, J. M. Some historical relationships between teratology and experimental embryology. // *Bulletin of the history of medicine*. 1968. T. 42. № 2. C. 145–159.
195. Orlov, E. E., Nesterenko, A. M., Korotkova, D. D., Parshina, E. A., Martynova, N. Y., Zaraisky, 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. T. 57. № 1. C. 95–111.e12.
196. Özüak, O., Buchta, T., Roth, S., Lynch, J. A. Ancient and diverged TGF- β signaling components in *Nasonia vitripennis*. // *Development genes and evolution*. 2014. T. 224. № 4-6. C. 223–233.
197. Pang, K., Ryan, J. F., Baxevanis, A. D., Martindale, M. Q. Evolution of the TGF- β signaling pathway and its potential role in the ctenophore, *Mnemiopsis leidyi*. // *PloS one*. 2011. T. 6. № 9. C. e24152.
198. 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., Zaraisky, A. G., Martynova, N. Y. // Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status. *Cell reports*. 2020. T. 33. № 7. C. 108396.
199. Parshina, E. A., Orlov, E. E., Zaraisky, 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. T. 23. № 10. C. 5627.
200. Pasini, A., Manenti, R., Rothbacher, U., & Lemaire, P. Antagonizing retinoic acid and FGF/MAPK pathways control posterior body patterning in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*. *PloS one*. 2012. T. 7. № 9. C. e46193.
201. Pechmann M. Embryonic development and secondary axis induction in the Brazilian white knee tarantula *Acanthoscurria geniculata*, C. L. Koch, 1841 (Araneae; Mygalomorphae; Theraphosidae). // *Development genes and evolution*. 2020. T. 230 № 2. C. 75–94.
202. Pechmann, M., Kenny, N. J., Pott, L., Heger, P., Chen, Y. T., Buchta, T., Özüak, O., Lynch, J., Roth, S. Striking parallels between dorsoventral patterning

- in *Drosophila* and *Gryllus* reveal a complex evolutionary history behind a model gene regulatory network. // *eLife*. 2021. T. 10. C. e68287.
203. Penners, A. Experimentelle Untersuchungen zum Determinationsproblem am Keim von *Tubifex rivulorum* Lam. II. Die Entwicklung teilweise abgetöteter Keime. // *Zeit. f. wiss. Zool.* 1926. T. 187. C. 1-140.
204. Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E.M.D. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. // *Cell*. 1996. T. 86. C. 589–598.
205. Plouhinec, J.-L., De Robertis, E.M. Systems biology of the selfregulating morphogenetic gradient of the *Xenopus* gastrula. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009. T. 1. C. a001701.
206. Plouhinec, J.-L., Zakin, L., Moriyama, Y., De Robertis, E.M. Chordin forms a self-organizing morphogen gradient in the extracellular space between ectoderm and mesoderm in the *Xenopus* embryo. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. T. 110. C. 20372–20379.
207. Pomreinke, A. P., Soh, G. H., Rogers, K. W., Bergmann, J. K., Bläßle, A. J., Müller, P. Dynamics of BMP signaling and distribution during zebrafish dorsal-ventral patterning. // *eLife*. 2017. T. 6. C. e25861.
208. Price, A. L., Modrell, M. S., Hannibal, R. L., Patel, N. H. Mesoderm and ectoderm lineages in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* display intra-germ layer compensation. // *Dev. Biol.* 2010. T. 341. №. C. 256–266.
209. Rahimi, N., Averbukh, I., Haskel-Ittah, M., Degani, N., Schejter, E. D., Barkai, N., Shilo, B. Z. A WntD-Dependent Integral Feedback Loop Attenuates Variability in *Drosophila* Toll Signaling. // *Developmental cell*. 2016. T. 36. №4. C. 401–414.
210. Rankin, S. A., Kormish, J., Kofron, M., Jegga, A., Zorn, A. M. A gene regulatory network controlling *hhx* transcription in the anterior endoderm of the organizer. // *Developmental biology*. 2011. T. 351. № 2. C. 297–310.
211. Ransick, A., Davidson, E. H. A complete second gut induced by transplanted micromeres in the sea urchin embryo. // *Science*. 1993. T. 259. № 5098. C. 1134–1138.
212. Raspopovic, J., Marcon, L., Russo, L., Sharpe, J. Modeling digits. Digit patterning is controlled by a *Bmp-Sox9-Wnt* Turing network modulated by morphogen gradients. // *Science*. 2014. T. 345. № 6196. C. 566–570.
213. Reverberi, G., Ortolani, G. Twin larvae from halves of the same egg in ascidians. // *Dev. Biol.* 1962. T. 5. C. 84–100.

214. Reversade, B., De Robertis, E. M. Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field. // *Cell*. 2005. T. 123. № 6. C. 1147–1160.
215. Rogers, K. W., ElGamacy, M., Jordan, B. M., Müller, P. Optogenetic investigation of BMP target gene expression diversity. // *eLife*. 2020. T. 9. C. e58641.
216. Rossant, J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1976. T. 36. C. 283–290.
217. Röttinger, E., DuBuc, T. Q., Amiel, A. R., Martindale, M. Q. Nodal signaling is required for mesodermal and ventral but not for dorsal fates in the indirect developing hemichordate, *Ptychodera flava*. // *Biology open*. 2015. T. 4. № 7. C. 830–842.
218. Röttinger, E., Lowe, C. J. Evolutionary crossroads in developmental biology: hemichordates. *Development*. 2012. T. 139. №14. C. 2463–2475.
219. Roux, W. Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. 5. Über die künstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungskugeln, sowie über die Nachentwicklung (Postgeneration) der fehlenden Körperhälfte. // *Virchows Archiv*. 1888. T. 114. C. 113–153, 246–291.
220. Roux, W. Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. I. Zur Orientierung über einige Probleme der embryonalen Entwicklung. // *Zeitschrift für Biologie*. 1885. T. 21. C. 411–524.
221. Roux, W. Einleitung zum Archiv für Entwicklungsmechanik. // *Arch. Embryol.* 1894. T. 1. C. 1–42.
222. Sachs, L., Chen, Y. T., Drechsler, A., Lynch, J. A., Panfilio, K. A., Lässig, M., Berg, J., Roth, S. Dynamic BMP signaling polarized by Toll patterns the dorsoventral axis in a hemimetabolous insect. // *eLife*. 2015. T. 4. C. e05502.
223. Sánchez Alvarado, A., The shredding of a caricature. // *Cell*. 2008. T. 135. C. 991–992.
224. Sander, K. Landmarks in developmental biology: Wilhelm Roux and his programme for developmental biology. // *W.Roux's Arch. Dev. Biol.* 1991. T. 200. № 1. C. 1–3.
225. Sander, K. Pattern formation in longitudinal halves of leaf hopper eggs (Homoptera) and some remarks on the definition of "Embryonic regulation". // *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*. 1971. T. 167. №4. C. 336–352.
226. Sander, K. Specification of the basic body pattern in insect embryogenesis. // *Adv. Insect Physiol.* 1976. T. 12. C. 125–238.

227. Sander, K., Faessler, P. E. Introducing the Spemann-Mangold organizer: experiments and insights that generated a key concept in developmental biology. // *Int. J. Dev. Biol.* 2001. T. 45. № 1. C. 1–11.
228. Sawant, A., Chanda, D., Isayeva, T., Tsuladze, G., Garvey, W. T., Ponnazhagan, S. Noggin is novel inducer of mesenchymal stem cell adipogenesis: implications for bone health and obesity. // *The Journal of biological chemistry.* 2012. T. 287. №15. C. 12241–12249.
229. Schenkelaars, Q., Pratlong, M., Kodjabachian, L., Fierro-Constain, L., Vacelet, J., Le Bivic, A., Renard, E., Borchiellini, C. Animal multicellularity and polarity without Wnt signaling. // *Scientific reports.* 2017. T. 7. № 1. C. 15383.
230. Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. // *Nature methods.* 2012. T. 9. № 7. C. 671–675.
231. Serpe, M., Umulis, D., Ralston, A., Chen, J., Olson, D. J., Avanesov, A., Othmer, H., O'Connor, M. B., Blair, S. S. The BMP-binding protein Crossveinless 2 is a short-range, concentration-dependent, biphasic modulator of BMP signaling in *Drosophila*. // *Developmental cell.* 2008. T. 14. № 6. C. 940–953.
232. Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S. J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J. B., Simakov, O., Putnam, N., Stites, J., ... Rokhsar, D. S. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. // *Nature.* 2016. T. 538. № 7625. C. 336–343.
233. Seudre, O., Carrillo-Baltodano, A. M., Liang, Y., Martín-Durán, J. M. ERK1/2 is an ancestral organising signal in spiral cleavage. // *Nature communications.* 2022. T. 13. № 1. C. 2286.
234. Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H., O'Connor, M. B. Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell.* 2005. T. 120. № 6. C. 873–886.
235. Sive, H. L., Grainger, R. M., Harland, R. M. Early development of *Xenopus laevis*: a laboratory manual. // Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor; New York. 2000. C. 91-141.
236. Sive, H. L., Grainger, R. M., Harland, R. M. Microinjection of RNA and preparation of secreted proteins from *Xenopus* oocytes. // *Cold Spring Harbor protocols.* 2010. T. 2010. № 12. C. pdb.prot5538.

237. Slack, J. M., Forman, D. An interaction between dorsal and ventral regions of the marginal zone in early amphibian embryos. // *Journal of embryology and experimental morphology*. 1980. T. 56. C. 283–299.
238. Smith, J. C., Dale, L., Slack, J. M. Cell lineage labels and region-specific markers in the analysis of inductive interactions. // *Journal of embryology and experimental morphology*. 1985. T. 89. C. 317–331.
239. Smith, W.C., Harland, R.M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. // *Cell*. 1992. T. 70. C. 829–840.
240. Sosa, E. A., Moriyama, Y., Ding, Y., Tejada-Muñoz, N., Colozza, G., De Robertis, E. M. Transcriptome analysis of regeneration during *Xenopus laevis* experimental twinning. // *The International journal of developmental biology*. 2019. T. 63. № 6-7. C. 301–309.
241. Spemann, H. *Embryonic Development and Induction*. // Yale Univ. New Haven. 1938.
242. Spemann, H. *Entwicklungsphysiologische Studien am Tritonei III*. // *Arch. f. Entw. mech*. 1903. T. 16. C. 551-631.
243. Spemann, H. Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo. I-IV. // *W. Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organ*. 1918. T. 43. C. 448-555.
244. Srivastava, M., Mazza-Curll, K. L., van Wolfswinkel, J. C., Reddien, P. W. Whole-body acoel regeneration is controlled by Wnt and Bmp-Admp signaling. // *Current biology*. 2014. T. 24. № 10. C. 1107–1113.
245. Stegemann, C., Didangelos, A., Barallobre-Barreiro, J., Langley, S. R., Mandal, K., Jahangiri, M., Mayr, M. Proteomic identification of matrix metalloproteinase substrates in the human vasculature. // *Circulation. Cardiovascular genetics*. 2013. T. 6. № 1. C. 106–117.
246. Steimle, J. D., Rankin, S. A., Slagle, C. E., Bekeny, J., Rydeen, A. B., Chan, S. S., Kweon, J., Yang, X. H., Ikegami, K., Nadadur, R. D., Rowton, M., Hoffmann, A. D., Lazarevic, S., Thomas, W., Boyle Anderson, E., Horb, M. E., Luna-Zurita, L., Ho, R. K., Kyba, M., Jensen, B., Zorn, A.M., Conlon, F.L., Moskowitz, I. P. Evolutionarily conserved Tbx5-Wnt2/2b pathway orchestrates cardiopulmonary development. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. T. 115. №45. C. E10615–E10624.
247. Stewart, R. M., Gerhart, J. C. Induction of notochord by the organizer in *Xenopus*. // *Roux's archives of developmental biology*. 1991. T. 199. № 6. C. 341–348.

248. Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H., Taira, M. Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. // *Development*. 2012. T. 139. № 9. C. 1651–1661.
249. Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. // *Dev. Biol.* 1983. T. 100. C. 64–119.
250. Suwińska A. Preimplantation mouse embryo: developmental fate and potency of blastomeres. // *Results and problems in cell differentiation*. 2012. T. 55. C. 141–163.
251. Tabata, T., Takei, Y. Morphogens, their identification and regulation. // *Development*. 2004. T. 131. C. 703–712.
252. Tan, S., Huan, P., Liu, B. Expression patterns indicate that BMP2/4 and Chordin, not BMP5-8 and Gremlin, mediate dorsal-ventral patterning in the mollusk *Crassostrea gigas*. // *Development genes and evolution*. 2017. T. 227. № 2. C. 75–84.
253. Tan, S., Huan, P., Liu, B. Molluskan Dorsal-Ventral Patterning Relying on BMP2/4 and Chordin Provides Insights into Spiralian Development and Evolution. // *Molecular biology and evolution*. 2022. T. 39. № 1. C. msab322.
254. Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C. C., Lin, X., Heasman, J. Maternal *wnt11* activates the canonical *wnt* signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. 2005. T. 120. № 6. C. 857–871.
255. Tarkowski, A. K. Mouse chimaeras developed from fused eggs. // *Nature*. 1961. T. 190. C/ 857–860.
256. Tarkowski, A. K. Mouse chimaeras revisited: recollections and reflections. // *Int. J. Dev. Biol.* 1998. T. 42. C. 903–908.
257. Tarkowski, A. K. Studies on mouse chimeras developed from eggs fused in vitro. // *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1963. T. 11. C. 51–71.
258. Tarkowski, A. K., Ozdzinski, W. and Czołowska, R. Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. // *Int. J. Dev. Biol.* 2005. T. 49. C. 825-832.
259. Tarkowski, A. K., Suwińska, A., Czołowska, R. and Ożdżeński, W. Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. // *Dev. Biol.* 2010. T. 348. C. 190-198.
260. Tereshina, M. B., Ivanova, A. S., Eroshkin, F. M., Korotkova, D. D., Nesterenko, A. M., Bayramov, A. V., Solovieva, E. A., Parshina, E. A., Orlov, E. E., Martynova, N.

- Y., Zaraisky, A. G. 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. T. 57. № 5. C. e23293.
261. Thisse, B., Thisse, C. Formation of the vertebrate embryo: Moving beyond the Spemann organizer. // *Seminars in cell & developmental biology*. 2015. T. 42. C. 94–102.
262. Thomas, G. W. C., Dohmen, E., Hughes, D. S. T., Murali, S. C., Poelchau, M., Glastad, K., Anstead, C. A., Ayoub, N. A., Batterham, P., Bellair, M., Binford, G. J., Chao, H., Chen, Y. H., Childers, C., Dinh, H., Doddapaneni, H. V., Duan, J. J., Dugan, S., Esposito, L. A., Friedrich, M., ... Richards, S. Gene content evolution in the arthropods. // *Genome biology*. 2020. T. 21. № 1. C. 15.
263. Titlebaum, A. Artificial production of janus embryos. // *PNAS*. 1928. T. 14. C. 245-247.
264. Tsunoda, Y., McLaren, A. Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. // *J. Reprod. Fertil*. 1983. T. 69. C. 315–322.
265. Turing, A.M. The chemical basis of morphogenesis. // *Philosophical Transactions of the Royal Society (part B)*. 1952. T. 237. C. 37–72.
266. Tyler, A. Experimental production of double embryos in annelids and mollusks. // *J. Exp. Zool*. 1930. T. 57. C. 347-407.
267. Umulis, D., O'Connor, M. B., Blair, S. S. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. // *Development*. 2009. T. 136. № 22. C. 3715–3728.
268. Umulis, D.M., Othmer, H.G. (2013). Mechanisms of scaling in pattern formation. // *Development* 140, 4830–4843.
269. Uygur, A., Young, J., Huycke, T.R., Koska, M., Briscoe, J., Tabin, C.J. Scaling pattern to variations in size during development of the vertebrate neural tube. // *Dev. Cell*. 2016. T. 37. C. 127–135.
270. Vuilleumier, R., Springhorn, A., Patterson, L., Koidl, S., Hammerschmidt, M., Affolter, M., Pyrowolakis, G. Control of Dpp morphogen signalling by a secreted feedback regulator. // *Nature cell biology*. 2010. T. 12. №6. C. 611–617.
271. Wacker, S. A., McNulty, C. L., Durston, A. J. The initiation of Hox gene expression in *Xenopus laevis* is controlled by Brachyury and BMP-4. // *Developmental biology*. 2004. T. 266. № 1. C. 123–137.
272. Weitzel, H. E., Illies, M. R., Byrum, C. A., Xu, R., Wikramanayake, A. H., & Ettensohn, C. A. Differential stability of beta-catenin along the animal-vegetal axis of

- the sea urchin embryo mediated by dishevelled. // *Development*. T. 131. № 12. C. 2947–2956.
273. Wessely, O., Agius, E., Oelgeschläger, M., Pera, E. M., De Robertis, E. M. Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin-dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Developmental biology*. 2001. T. 234. №1. C. 161–173.
274. Wharton, K. A., Ray, R. P., Gelbart, W. M. An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the *Drosophila* embryo. // *Development*. 1993. T. 117. № 2. C. 807–822.
275. Wiegner, O., Schierenberg, E. Regulative development in a nematode embryo: a hierarchy of cell fate transformations. // *Dev. Biol.* 1999. T. 215. C. 1–12.
276. Willadsen, S. M. The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8- cell sheep embryos. // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1981. T. 65. C. 165–172.
277. Wills, A., Harland, R. M., Khokha, M. K. Twisted gastrulation is required for forebrain specification and cooperates with Chordin to inhibit BMP signaling during *X. tropicalis* gastrulation. // *Developmental biology*. 2006. T. 289. №1. C. 166–178.
278. Wilson, E. B. Amphioxus, and the mosaic theory of development. // *J. Morphol.* 1893. T. 8. C. 579–639.
279. Wilson, E. B. Experimental studies on germinal localization. I The germ regions of in the egg of *Dentalium*. II Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium*. // *J. Exp. Zool.* 1904. T. 1. C. 1-72.
280. Wilson, M. J., Dearden, P. K. RNA localization in the honeybee (*Apis mellifera*) oocyte reveals insights about the evolution of RNA localization mechanisms. // *Developmental biology*. 2013. T. 375. № 2. C. 193–201.
281. Wilson, P. A., Lagna, G., Suzuki, A., Hemmati-Brivanlou, A. Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development*. 1997. T. 124. № 16. C. 3177–3184.
282. Wolpert L. Positional Information and Pattern Formation. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2016. T.117. 597–608.
283. Wolpert, L. The French flag problem: a contribution to the discussion on pattern development and regulation. // In *Towards a Theoretical Biology* (ed. C. H.Waddington). 1968. C. 125-133.
284. Wotton, K.R., Alcaine-Colet, A., Jaeger, J., Jiménez-Guri, E. Non-canonical dorsoventral patterning in the moth midge *Clogmia albipunctata*. // *EvoDevo*. 2017. T. 8. № 20.

285. Wylie, C., Kofron, M., Payne, C., Anderson, R., Hosobuchi, M., Joseph, E., Heasman, J. Maternal beta-catenin establishes a 'dorsal signal' in early *Xenopus* embryos. // *Development*. 1996. T. 122. № 10. C. 2987–2996.
286. Xanthos, J. B., Kofron, M., Tao, Q., Schaible, K., Wylie, C., Heasman, J. The roles of three signaling pathways in the formation and function of the Spemann Organizer. // *Development*. 2002. T. 129. № 17. C. 4027–4043.
287. Xie, J., Fisher, S. Twisted gastrulation enhances BMP signaling through chordin dependent and independent mechanisms. // *Development*. 2005. T. 132. №2. C. 383–391.
288. Xu, P. F., Houssin, N., Ferri-Lagneau, K. F., Thisse, B., Thisse, C. Construction of a vertebrate embryo from two opposing morphogen gradients. // *Science*. 2014. T. 344. № 6179. C. 87–89.
289. Yu, J. K., Satou, Y., Holland, N. D., Shin-I, T., Kohara, Y., Satoh, N., Bronner-Fraser, M., Holland, L. Z. Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. // *Nature*. 2007. T. 445. №7128. C. 613–617.
290. Zaráiskiĭ, A. G. Samoorganizatsiia pri determinatsii razmerov osevykh struktur v émbriogeneze shportsevoĭ liagushki [Self-organization in the determination of the size of the axial structures in the embryogenesis of the clawed toad]. *Ontogenez*. 1991. T. 22. № 4. C. 365–374.
291. Zernicka-Goetz, M., Huang, S. Stochasticity versus determinism in development: a false dichotomy? // *Nature reviews. Genetics*. 2010. T. 11. № 11. C. 743–744.
292. Zhang, J. L., Patterson, L. J., Qiu, L. Y., Graziussi, D., Sebald, W., Hammerschmidt, M. Binding between Crossveinless-2 and Chordin von Willebrand factor type C domains promotes BMP signaling by blocking Chordin activity. // *PLoS one*. 2010. T. 5. № 9. C. e12846.
293. Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C., Heasman, J. The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. // *Cell*. 1998. T. 94. № 4. C. 515–524.
294. Zhu, M., Cornwall-Scoones, J., Wang, P., Handford, C. E., Na, J., Thomson, M., Zernicka-Goetz, M. Developmental clock and mechanism of de novo polarization of the mouse embryo. // *Science*. 2020. T. 370. № 6522. C. eabd2703.
295. Zhu, Y., Qiu, Y., Chen, W., Nie, Q., Lander, A. D. Scaling a Dpp Morphogen Gradient through Feedback Control of Receptors and Co-receptors. // *Developmental cell*. 2020. T. 53. № 6. C. 724–739.e14.