

Изучение функции нового белка холоднокровных *c-Answer* и его роли в пуринаргическом и FGF сигнальных путях

Научный руководитель – Зарайский Андрей Георгиевич

Короткова Дарья Дмитриевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: ddkorotkova@gmail.com

Ранее в нашей лаборатории было показано, что исчезновение некоторых генов в эволюции позвоночных могло обусловить появление различий между группами позвоночных в отношении способности к регенерации и степени развития мозга. Гены, специфичные для холоднокровных позвоночных, были идентифицированы с помощью биоинформатического метода. В данной работе на модели шпорцевой лягушки мы продемонстрировали, что один из таких генов одновременно вовлечен в регуляцию развития мозга и регенерации посредством участия в FGF и пуринаргическом сигнальных путях.

Исследование первичной структуры *c-Answer* показало, что он является трансмембранным белком, наиболее гомологичным рецептору факторов роста фибробластов FGFR4. При этом у *c-Answer*, в отличие от FGFR4, отсутствует тирозинкиназный домен в цитоплазматической части и один из Ig-доменов во внеклеточной части. Мембранная локализация *c-Answer* подтверждена с помощью конфокальной микроскопии эмбрионов шпорцевой лягушки, экспрессирующих гибридный белок *c-Answer* и EGFP.

Участие *c-Answer* в регенерации и развитии мозга установлено в ходе изучения его экспрессии методами гибридизации *in situ* и qRT-PCR и ряда экспериментов по искусственному ингибированию и активации функции *c-Answer* путем инъекций в эмбрионы анти-смысловых морфолиновых олигонуклеотидов к мРНК *c-Answer* и синтезированной *in vitro* мРНК *c-Answer* соответственно.

Для определения возможных путей функционирования *c-Answer* у эмбрионов с подавленной/активированной экспрессией *c-Answer* методом гибридизации *in situ* изучали изменение экспрессии генов-маркеров развития мозга. Показано, что *c-Answer* влияет на экспрессию гомеобоксных генов-регуляторов развития глаз *Pax6*, *Rx* и гена-индуктора конечного мозга, фактора роста фибробластов *Fgf8*.

Полученные данные позволили предположить, что *c-Answer* участвует в двух сигнальных путях, один из которых активируется при связывании *Fgf8* с тирозинкиназным рецептором FGFR4, другой - при связывании внеклеточных пуриновых нуклеотидов с рецептором P2Y1, сопряженным с G-белком. Возможные взаимодействия *c-Answer* с белками, участвующими в этих каскадах, проверены методом ко-иммунопреципитации с последующим вестерн-блоттингом. Для этого были созданы конструкции для экспрессии в эмбрионах двух известных изоформ *Fgf8* - *Fgf8a* и *Fgf8b*, их рецептора FGFR4, рецептора АДФ - P2Y1, меченных Flag-олигопептидом, и *c-Answer*, меченного Мус-олигопептидом. В качестве отрицательного контроля использовали конструкцию для экспрессии фрагмента трансмембранного механо-чувствительного канала *Piezo1*, также меченного Flag. В результате было выявлено взаимодействие *c-Answer* с рецепторами FGFR4 и P2Y1.

Таким образом, можно заключить, что *c-Answer* участвует в регенерации и развитии мозга у холоднокровных в роли модулятора сигнальных путей, регулирующих эти процессы. Способность *c-Answer* взаимодействовать с разными типами рецепторов и его экспрессия в раневом эпителии отражена нами в его названии: **cold-blooded Animals specific wound - epithelium receptor-binding protein**.