

СЕКРЕТИРУЕМЫЙ БЕЛОК NOGGIN4 УЧАСТВУЕТ В ФОРМИРОВАНИИ ПЕРЕДНЕГОЛОВНЫХ СТРУКТУР ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ, ИНГИБИРУЯ WNT/BETA-CATENIN СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД

© 2016 г. А. В. Байрамов, Ф. М. Ерошкин, А. В. Бородулин,
Н. Ю. Мартынова, Г. В. Ермакова, А. Г. Зарайский

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10*

E-mail: andrbayr@gmail.com, azaraisky@yahoo.com

Поступила в редакцию 05.11.2015 г.

Окончательный вариант получен 01.03.2016 г.

Белки семейства Noggin являются важными регуляторами раннего развития нервной системы позвоночных. Долгое время считалось, что у позвоночных есть только один ген Noggin (Noggin1), основной функцией которого является ингибирование BMP сигнального каскада при формировании дорсовентральной полярности зародыша. После открытия других белков семейства Noggin было проведено исследование свойств белка Noggin2 и было показано, что кроме ингибирования BMP он принимает участие в модуляции Nodal/Activin и Wnt/beta-catenin каскадов в раннем развитии головных структур амфибий. Задачей настоящей работы было исследование функциональных свойств еще одного белка семейства Noggin – Noggin4. В работе показано, что белок Noggin4 играет важную роль в развитии головных структур шпорцевой лягушки, подавляя активность Wnt/beta-catenin сигнального каскада. При этом, в отличие от Noggin1 и Noggin2, Noggin4 не способен подавлять активность TGF-beta сигнальных каскадов (BMP и Nodal/Activin).

Ключевые слова: Noggin, Noggin4, Wnt/beta-catenin сигнальный каскад, развитие головных структур позвоночных.

DOI: 10.7868/S0475145016040029

ВВЕДЕНИЕ

Ген Noggin, впервые идентифицированный в лаборатории Ричарда Харланда в 1991 г., продолжает вызывать большой интерес у исследователей в связи с тем, что белковый продукт данного гена – секретлируемый белок Noggin – играет важную роль в регуляции клеточной дифференцировки у позвоночных, как в индивидуальном развитии, так и у взрослого организма (Smith, Harland, 1992). Эта роль Noggin обусловлена его способностью связывать ростовые факторы семейства BMP (от *bone morphogenetic protein*), блокируя их взаимодействие с рецепторами, что приводит к ингибированию внутриклеточного BMP сигнального каскада, вовлеченного в регуляцию множества онтогенетических процессов (Gorpe J. et al., 2002). В частности, при детерминации зачатка центральной нервной системы амфибий, Noggin продуцируется клетками шпемановского организатора и блокирует BMP сигнальный каскад в клетках презумптивной нейроэктодермы. В результате, в этих клетках включается программа нейральной дифференцировки. Одновременно Noggin подавляет BMP-сигнализацию в клетках дорсальной

мезодермы, стимулируя в них активацию TGFbeta сигнального каскада второго типа, запускаемого факторами Activin и Nodal. Результатом этого является дифференцировка клеток презумптивной мезодермы в клетки скелетной мускулатуры. Наиболее ярко эти свойства Noggin можно продемонстрировать, инъецируя синтетическую РНК, кодирующую данный белок, в вентральные blastomeres эмбриона шпорцевой лягушки на стадии 4–8 клеток. В результате индуцируется вторичная ось тела, включающая нервную трубку и сомиты (Smith, Harland, 1992; Bayramov et al., 2011).

До недавнего времени считалось, что у позвоночных есть только один ген Noggin с описанными выше свойствами, однако исследования последних лет показали наличие у представителей различных классов позвоночных ряда гомологов Noggin, образующих целое семейство (Fletcher et al., 2004; Eroshkin et al., 2005). На функциональном уровне было показано, что роль Noggin белков в развитии позвоночных не ограничивается лишь функцией ингибирования BMP сигнального каскада, и Noggin белки обладают способностью регулировать активность Nodal/Activin и так назы-

ваемого “канонического” Wnt (Wnt/beta-catenin) сигнальных каскадов, играющих ключевые роли в клеточной дифференцировке и развитии головных структур позвоночных (Bayramov et al., 2011; Yuan et al., 2015).

Однако данные о белках семейства Noggin, имеющиеся на сегодняшний день в литературе, касаются в основном белков Noggin1 и Noggin2, функция и структура которых в той или иной мере гомологична таковым белка Noggin млекопитающих. В то же время, самый необычный представитель семейства, белок Noggin4, по-прежнему остается неизученным. На уровне первичной аминокислотной последовательности у Noggin4, по сравнению с белком Noggin1, наблюдается ряд замен в участках, которые были описаны как принципиально важные для обеспечения функции связывания молекул BMP (Groppe et al., 2002, рис. 1). Это ставит вопрос о способности Noggin4 связывать молекулы BMP и выступать в качестве антагониста BMP сигнала.

Исследования паттерна экспрессии гена Noggin4 показали, что он начинает экспрессироваться в онтогенезе несколько раньше, чем Noggin1 и Noggin2, и обнаруживается как методом обратной транскрипции-ПЦР, так и методом гибридизации *in situ* уже на стадии ранней гастролы (Eroshkin et al., 2005). Экспрессия Noggin4 наблюдается при этом и у предствителей земноводных и птиц (*Xenopus* и у *Gallus*) сходна и, в целом, комплементарна области экспрессии гена Noggin1 (Eroshkin et al., 2005; Vorodulin et al., 2012). Поскольку эти особенности паттерна экспрессии гена Noggin4, наряду с аминокислотной последовательностью, могут отражать его функциональные отличия от гомологов, мы провели данную работу, посвященную исследованию свойств Noggin4.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

ДНК конструкции, синтетические мРНК, люциферазные тесты

Плазмиды ActivinB, Xnr2, Xnr4, XWnt8, Noggin1, Noggin4 описаны в Bayramov et al., 2011 и Eroshkin et al., 2006. Они содержат кодирующую рамку соответствующего гена в экспрессионном векторе (pCS2 или pSP64 в случае Activin). В экспериментах применялись синтетические мРНК, полученные в результате транскрипции этих плазмид. Для синтеза мРНК *in vitro* использовались наборы mMessage Machine SP6 Kit (Ambion), линейаризация плазмид на основе вектора pCS2 проводилась рестриктазой *NotI*, на основе вектора pSP64 – рестриктазой *AseI*.

Для проведения люциферазных тестов эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* на стадии 2–4 бластомеров были инъецированы смесью одной

из репортерных плазмид, содержащих ген люциферазы под контролем цис-регуляторных элементов промотора, распознаваемого белками-эффекторами исследуемых сигнальных каскадов GL3-ARE-Luc (Pierreux et al., 2000); TOPflash, Millipore; TCFm-Luc (Hikasa et al., 2010), с плазмидой pCMV- β -GAL (в количестве 50 пг каждой из плазмид на эмбрион) и соответствующей мРНК. Эксплантаты аниимальной эктодермы вырезались на стадии поздней бластулы (стадия 9 по Ньюкопу (Nieuwkoop, Faber, 1967)), а эксплантаты дорсальной губы blastостопора – на стадии ранней гастролы (стадия 10). После вырезания эксплантаты культивировались до стадии средней гастролы (стадия 11), отбирались в количестве 10 эксплантатов на точку в трех повторностях и подготавливались для измерения люциферазной активности согласно протоколу Luciferase Assay system (Promega). Измерения проводились на люцинометре TD-20/20 Luminometer (Turner Designs) при комнатной температуре.

Морфолиновые олигонуклеотиды, гибридизация in situ, ко-иммунопреципитация

Нокдаун Noggin4 осуществлялся путем инъекции морфолинового олигонуклеотида (производство Gene Tools) в концентрации 0.4 mM и объеме 3–4 нл:

Noggin4 MO (комплементарен положению –20...+5 мРНК Noggin4)

5'-ACCATATTCCCTGTCTTGGAGATTA.

В качестве контроля использовался морфолиновый олигонуклеотид, содержащий аминокислотные замены:

misNoggin4 MO –

5'-TCCAGTATACCTATCTAGGATATTC.

При инъекциях мРНК и морфолино смешивались с флуоресцентной меткой Fluorescein Lysine Dextran (FLD) (Invitrogen, 40 kD, 5 μ g/ μ L).

Гибридизация *in situ* проводилась на целых зародышах, согласно протоколу описанному Харландом (Harland, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, ярким выражением способности белков Noggin1 и Noggin2 подавлять TGF-beta и Wnt сигнальные каскады является способность их мРНК индуцировать развитие дополнительных осей тела при вентральной микроинъекции в зародыши шпорцевой лягушки на стадии 8 бластомеров (Smith, Harland, 1992; Bayramov et al., 2011). В то же время, как оказалось, инъекции мРНК Noggin4 не приводят в аналогичных экспериментах к формированию дополнительных осей тела.

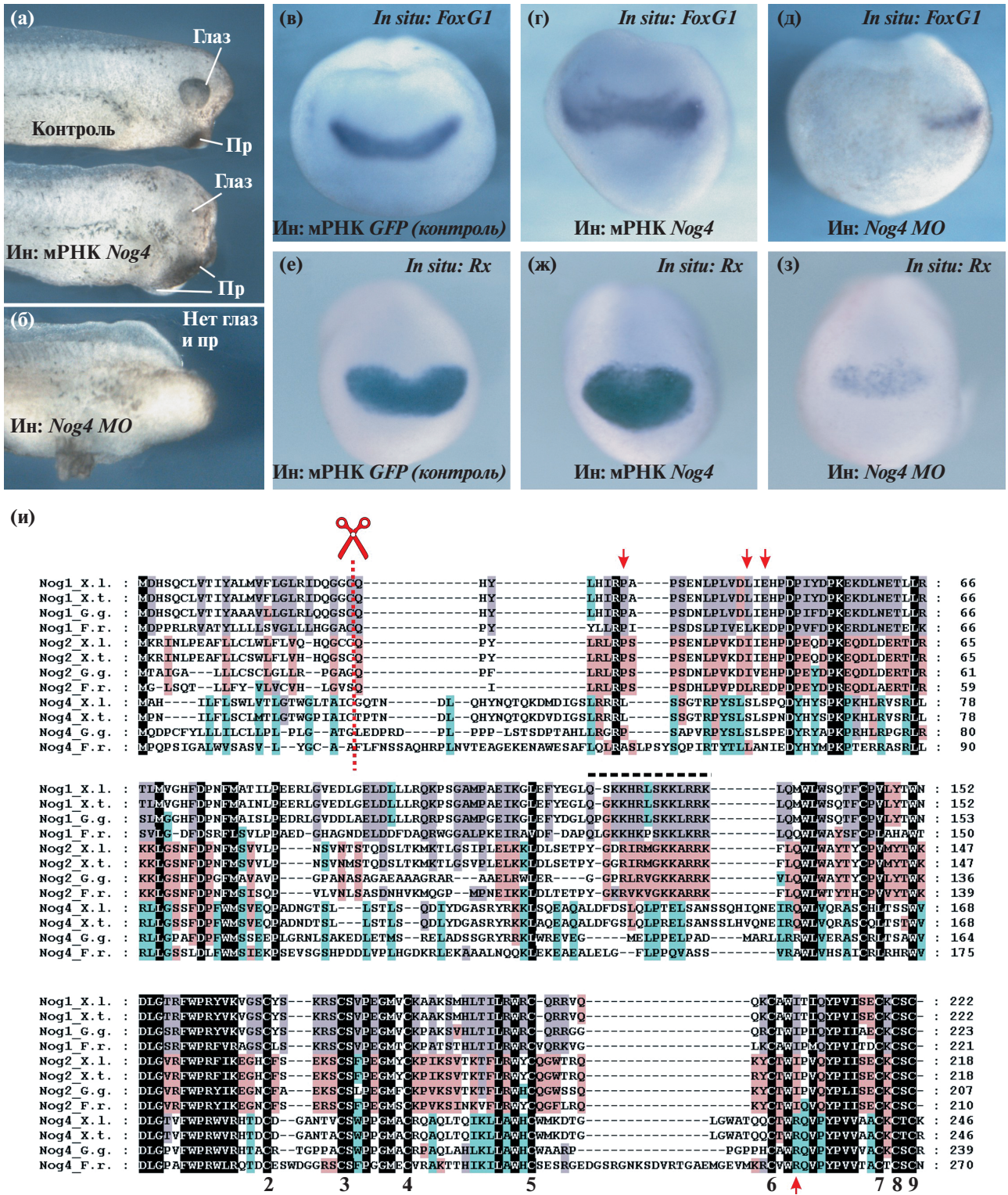


Рис. 1. а – Инъекции мПНК *Noggin4* в дорзальную область зародышей шпорцевой лягушки приводят к аномалиям развития головных структур. б – Подавление трансляции мПНК *Noggin4* приводит к редукции головных структур зародышей. в–г – Изменения паттерна экспрессии гена *FoxG1* при гиперэкспрессии (г) и подавлении экспрессии (д) мПНК *Noggin4*. е–ж – Изменение паттерна экспрессии гена *Rx* при гиперэкспрессии (ж) и подавлении экспрессии (з) мПНК *Noggin4*. и – Сравнение аминокислотных последовательностей белков семейства *Noggin* у представителей разных классов позвоночных. Ножницами показан сайт отщепления сигнального пептида. Стрелками показаны аминокислоты, играющие, согласно Grope et al. (2002), принципиальную роль в связывании молекул BMP.

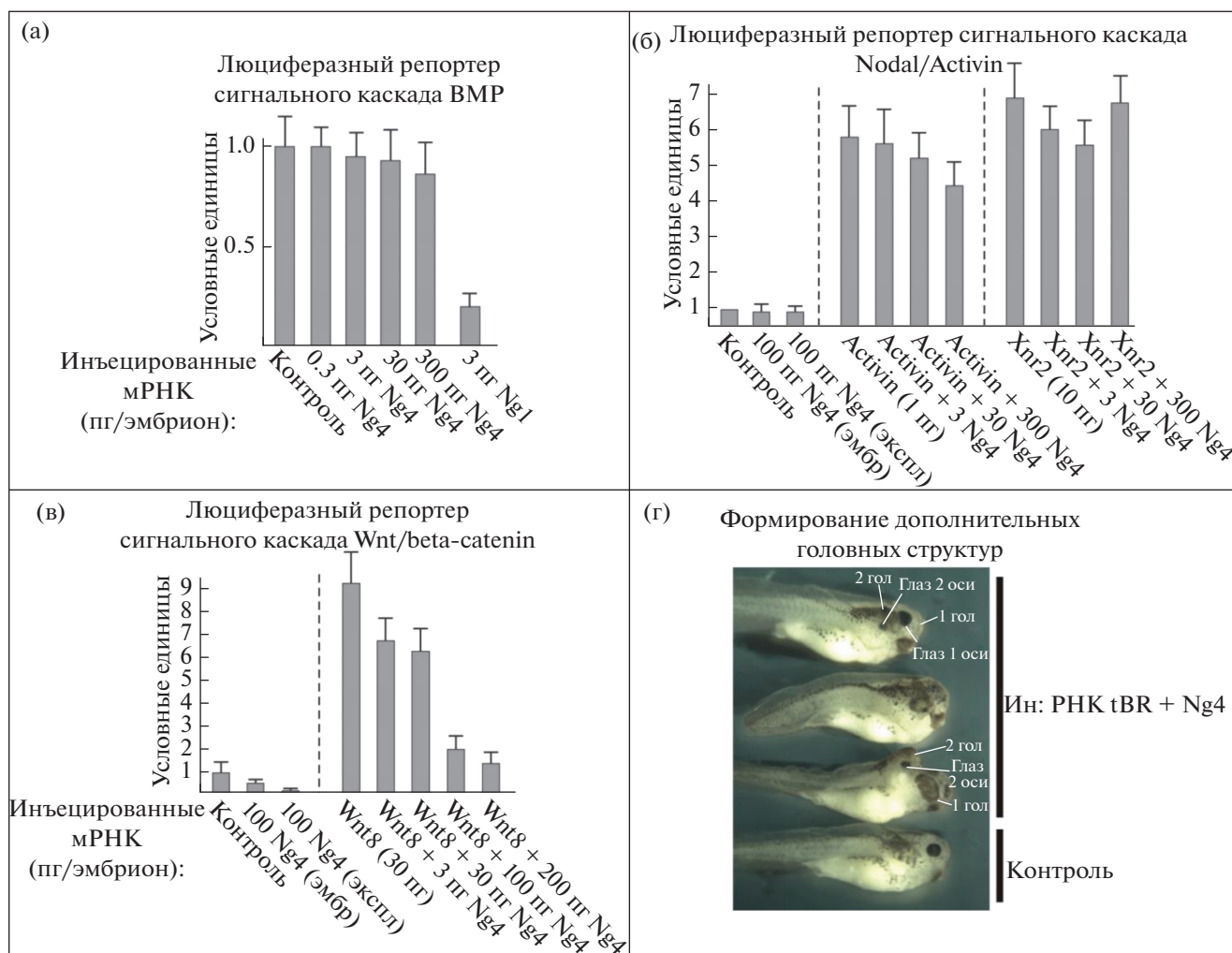


Рис. 2. а – *Noggin4*, в отличие от *Noggin1*, не способен ингибировать сигнальный каскад BMP как в нативных зародышах и эксплантатах анимальной эктодермы (слева), так и при его активации с помощью мРНК *Wnt8* (справа). б – *Noggin4* не способен ингибировать сигнальный каскад *Nodal/Activin* как в нативных зародышах и эксплантатах анимальной эктодермы (слева), так и при его активации с помощью мРНК *Activin* или *Xnr2* (справа). Детекция активности BMP и *Nodal/Activin* каскадов осуществлялась с помощью репортерных конструкций *TCFm-Luc* и *GL3-ARE-Luc* соответственно. в – *Noggin4* ингибирует *Wnt/beta-catenin* каскад как в нативных зародышах и эксплантатах анимальной эктодермы (слева), так и при его активации с помощью мРНК *Wnt8* (справа). Детекция активности *Wnt* каскада осуществлялась с помощью репортерной конструкции *TopFlash*. г – *Noggin4* способен индуцировать формирование дополнительных осей тела, содержащих переднеголовые структуры (глаза) при микроинъекции его мРНК в смеси с мРНК трюнкированного рецептора *tBR*.

Инъекции мРНК *Noggin4* в дорзальную область зародышей на стадии 8 бластомеров приводят к нарушениям развития головных структур основной оси – присоски, глаз (рис. 1а). Подавление трансляции *Noggin4* морфолиновыми олигонуклеотидами вызывает нарушения формирования головного отдела зародышей, anomalies развития глазных структур и переднего мозга, что указывает на вовлеченность *Noggin4* в развитие этих структур (рис. 1б). На более ранних стадиях эти фенотипические anomalies подтверждаются нарушениями экспрессии маркеров переднеголовных структур (*FoxG1*, *Rx*), детектируемыми мето-

дом гибридизации *in situ* (рис. 1в–1з). Эти результаты указывают на вовлеченность *Noggin4* в развитие головных структур шпорцевой лягушки.

Согласно литературным данным, в формировании переднеголовных структур позвоночных принимают участие несколько внутриклеточных сигнальных каскадов – *Smad1* и *Smad2* зависимые TGF-beta (соответственно BMP и *Nodal/Activin*) каскады, а также *Wnt/beta-catenin* каскад (Piccolo et al., 1999; Niehrs et al., 1999). Кроме того, ранее уже было показано участие белков *Noggin1* и *Noggin2* в модуляции активности этих каскадов (Bayramov et al., 2011). Исходя из этого, для пони-

мания роли Noggin4 в раннем развитии передне-головных структур, нами была исследована его способность модулировать вышеперечисленные сигнальные каскады. Исследование было проведено с применением люциферазных репортерных конструкций. Для оценки влияния Noggin4 на внутриклеточные сигнальные каскады в люциферазных тестах были использованы следующие репортерные конструкции: TCFm-Luc (для BMP каскада), GL3-ARE-Luc (для Nodal/Activin каскада), TOP-flash (для Wnt/beta-catenin каскада) экспрессионный вектор pCMV- β -GAL (в качестве неспецифической репортерной плазмиды для нормализации результатов), а также мРНК Noggin4, Activin, Xnr2, Wnt8.

Исследование способности Noggin4 модулировать активность Nodal/Activin и Wnt/beta-catenin сигнальных каскадов исследовали на фоне экспериментальной активации этих каскадов, которую проводили путем микроинъекций мРНК ActivinB (или Xnr2) и Wnt8 соответственно. В случае BMP каскада, его искусственную активацию не проводили, поскольку уровень чувствительности репортера и уровень естественной активности этого каскада оказались достаточными для данного исследования.

При оценке относительных уровней активности каскадов, уровень их интактной активности принимался за 1.

В проведенных люциферазных тестах Noggin4 не обнаружил способности подавлять активность BMP сигнального каскада (рис. 2а), что соответствует литературным данным, согласно которым для связывания молекул BMP белком Noggin (на примере Noggin1) важны 4 аминокислотных остатка, которые у белка Noggin4 отличаются от таковых у Noggin1 (рис. 1и). Также Noggin4 не обнаружил способности влиять на активность Nodal/Activin сигнального каскада как в интактных эксплантатах анимальной эктодермы и целых зародышах, так и на фоне активации этого каскада в эксплантатах при помощи ActivinB и Xnr2 (рис. 2б).

В то же время было показано, что мРНК Noggin4 может подавлять активность Wnt/beta-catenin каскада как в интактных эксплантатах анимальной эктодермы и целых зародышах, так и при его активации мРНК Wnt8 (рис. 2в).

Согласно литературным данным (Niehrs, 1999; Piccolo et al., 1999), для формирования передне-головных структур необходимо одновременное подавление сразу трех сигнальных каскадов – BMP, Nodal/Activin и Wnt/beta-catenin. Исходя из этого, доказательством способности Noggin4 ингибировать Wnt/beta-catenin-каскад может служить способность мРНК Noggin4 вызывать формирование дополнительных передне-головных структур у зародышей на фоне экспериментального ингибирования

BMP и Nodal/Activin каскадов. Такое ингибирование можно обеспечить при помощи специфического ингибитора BMP и Nodal/Activin каскадов – трюнкированного рецептора tBR (truncated BMP receptor) (Graff et al., 1994). Сам по себе трюнкированный рецептор tBR, не обладая способностью ингибировать Wnt/beta-catenin каскад, может индуцировать формирование дополнительных осей, содержащих лишь туловищный отдел без головных структур. Noggin4, ингибируя только Wnt/beta-catenin каскад, как указывалось выше, сам по себе вообще не способен индуцировать формирование дополнительных осей. Однако в сумме tBR и Noggin4, дополняя свойства друг друга, индуцируют формирование дополнительных осей с головными структурами (рис. 2г). Это доказывает наличие у Noggin4 способности ингибировать Wnt/beta-catenin сигнальный каскад.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В совокупности, полученные в работе данные позволяют утверждать, что Noggin4 вовлечен в формирование головных структур шпорцевой лягушки на ранних стадиях в качестве ингибитора Wnt/beta-catenin сигнального каскада. При этом по функциональным свойствам Noggin4 существенно отличается от других представителей семейства Noggin – Noggin1 и Noggin2. В отличие от своих гомологов, Noggin4 не обладает способностью подавлять активность BMP и Nodal/Activin сигнальных каскадов, а выступает в раннем развитии шпорцевой лягушки в качестве ингибитора Wnt/beta-catenin каскада.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Martynova N.Y. et al. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling // *Development*. 2011. V. 138. P. 5345–5356.
- Borodulin A.V., Eroshkin F.M., Bayramov A.V. et al. Noggin4 expression during chick embryonic development // *The International Journal of Developmental Biology*. 2013. V. 56. P. 403–406.
- Eroshkin F.M., Ermakova G.V., Bayramov A.V. et al. Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of Noggin2 and noggin4 in *Xenopus laevis* // *Gene Expr Patterns*. 2006. V. 6. P. 180–186.
- Fletcher R.B., Watson A.L., Harland R.M. Expression of *Xenopus tropicalis* noggin1 and noggin2 in early development: two noggin genes in a tetrapod // *Gene Expr Patterns*. 2004. V. 5. P. 225–230.
- Graff J.M., Thies R.S., Song J.J. et al. Studies with a *Xenopus* BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals *in vivo* // *Cell*. 1994. V. 79. P. 169–179.

- Grophe J., Greenwald J., Wiater E., Rodriguez-Leon J. et al.* Structural basis of BMP signalling inhibition by the cysteine knot protein Noggin // *Nature*. 2002. V. 420. P. 636–642.
- Harland R.M.* *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos // *Methods in Cell Biology*. 1991. V. 36. P. 685–695.
- Hikasa H., Ezan J., Itoh K., Li X. et al.* Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification // *Dev. Cell*. 2010. V. 19. P. 521–532.
- Niehrs C.* Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer // *Trends Genet.* 1999. V. 15. P. 314–319.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal Table of *Xenopus laevis*. Amsterdam: North Holland, 1967.
- Piccolo S., Agius E., Leyns L. et al.* The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals // *Nature*. 1999. V. 397. P. 707–710.
- Pierreux C.E., Nicolas F.J., Hill C.S.* Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus // *Molecular and Cellular Biology*. 2000. V. 20. P. 9041–9054.
- Smith W.C., Harland R.M.* Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos // *Cell*. 1992. V. 70. P. 829–840.
- Yuan G., Yang G., Zheng Y. et al.* The non-canonical BMP and Wnt/beta-catenin signaling pathways orchestrate early tooth development // *Development*. 2015. V. 142(1). P. 128–139.

Secreted Protein Noggin4 Participates in the Formation of Forebrain Structures in *Xenopus laevis* by Inhibiting the Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway

A. B. Bayramov, F. M. Eroshkin, A. V. Borodulin, N. Yu. Martynova,
G. V. Ermakova, and A. G. Zarausky

Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

e-mail: andrbayr@gmail.com, azarausky@yahoo.com

Received November 5, 2015; in final form, March 1, 2016

Noggin proteins are important regulators of the early development of the vertebrate nervous system. Previously, it has been traditionally thought that vertebrates have only one noggin gene (Noggin1), whose main function is the inhibition of BMP signaling pathway during the formation of dorsoventral polarity in embryos. Then other proteins of this family were discovered, and the studies of Noggin2 protein showed that noggin proteins also participate in the modulation of Nodal/Activin and Wnt/beta-catenin signaling pathways in the early development of amphibian head structures. The purpose of this study is to investigate the properties of another noggin protein, Noggin4. We proved that Noggin4 plays an important role in the formation of head structure in clawed frog, since it inhibits the activity of Wnt/beta-catenin signaling pathway. At the same time, unlike Noggin1 and Noggin2, Noggin4 does not inhibit the activity of TGF-beta signaling pathways (BMP and Nodal/Activin).

Keywords: Noggin, Noggin4, Wnt/beta-catenin signaling pathway, formation of head structures in vertebrates