

7.2 РОЛЬ НОВОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО РЕГУЛЯТОРА РЕГЕНЕРАЦИИ И РАЗВИТИЯ МОЗГА - *c-Answer* - В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ПУРИНЭРГИЧЕСКОГО РЕЦЕПТОРА P2Y1 И РЕЦЕПТОРА ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ FGFR4

Короткова Д.Д.^{1,2}, Иванова А.С.¹, Мартынова Н.Ю.¹, Любецкий В.А.³, Селиверстов А.В.³, Нестеренко А.М.^{1,4}, Терёшина М.Б.¹, Зарайский А.Г.¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва

³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва

⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ, Москва
Электронный адрес: ddkorotkova@gmail.com

Ген *c-Answer* был идентифицирован нашей лабораторией совместно с лабораторией математических моделей в биологии (ИППИ РАН) с помощью биоинформатического скрининга геномов представителей всех классов позвоночных животных, направленного на поиск генов, исчезнувших в ходе эволюции на этапе перехода к теплокровным животным. Ранее нами были впервые описаны физиологические функции *c-Answer*, кодирующего трансмембранный белок, и установлено его участие в регенерации и развитии мозга шпорцевой лягушки посредством взаимодействия с рецептором факторов роста фибробластов - FGFR4 и рецептором пуринаргического сигнального пути - P2Y1.

Целью настоящей работы было изучение механизмов и роли взаимодействия *c-Answer* с рецепторами P2Y1 и FGFR4, а также подтверждение установленной ранее роли *c-Answer* в регенерации хвоста головастика шпорцевой лягушки и в развитии мозга путем нокаута гена *c-Answer* с помощью системы CRISPR/Cas9. Чтобы выяснить, какие аминокислотные домены *c-Answer* участвуют в его взаимодействии с P2Y1 и FGFR4 рецепторами, был создан ряд делеционных мутантов *c-Answer*, меченных эпитопом MYC. Связывание этих мутантов с P2Y1 и FGFR4, мечеными FLAG, было изучено методом ко-иммунопреципитации. В результате было установлено, что за взаимодействие с обоими рецепторами в основном отвечает внеклеточный домен *c-Answer*. Также с помощью ко-иммунопреципитации целого *c-Answer* и его делеционных мутантов, меченных MYC и FLAG, мы выяснили, что, в основном, благодаря взаимодействию внутриклеточного и трансмембранного доменов данный белок способен образовывать гомодимер.

Для выяснения характера действия *c-Answer* на пуринаргический сигнальный путь нами была разработана методика по детекции уровня ионов кальция в культуре клеток зародышей, ко-экспрессирующих *c-Answer* и рецептор P2Y1, с помощью Ca²⁺-сенсора Case12. В результате мы установили, что *c-Answer* оказывает стимулирующее влияние на работу пуринового рецептора P2Y1. Нами также было установлено, что нокаут гена *c-Answer*

методом CRISPR/Cas9 приводит к снижению способности к регенерации хвоста у головастиков, а также вызывает общее уменьшение их размеров, включая уменьшение размеров мозга и глаз. Полученные результаты хорошо согласуются с гипотезой о стимулирующем влиянии *c-Answer* на пуриnergический и Fgf-сигнальные пути, которые, по данным литературы, играют важную роль в развитии головного мозга, глаз и в регенерации, а также в процессах роста различных органов и тканей, в том числе, в процессе роста головного мозга. Основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что исчезновение *c-Answer* в эволюции у предков теплокровных животных, в том числе, человека, могло быть одной из причин потери у них способности к регенерации конечностей. Однако, отсутствие *c-Answer* могло привести к созданию у предков теплокровных условий для прогрессивного развития головного мозга в результате изменения активности Fgf и пуриnergического сигнальных каскадов.