

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
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

Байрамов Андрей Вячеславович

**Генетические основы эволюции плана строения и
появления новых структур у позвоночных**

Специальность – 1.5.3 Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва, 2024

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН)

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор **Зарайский Андрей Георгиевич**

Официальные оппоненты:

Каменский Петр Андреевич, доктор биологических наук, профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Шидловский Юлий Валерьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник, заведующий Лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии, ФГБУН Институт биологии гена РАН

Воскобойникова Ольга Степановна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Лаборатории ихтиологии ФГБУН Зоологический Институт РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

Защита состоится 16 октября 2024 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: 117997, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте Института ibch.ru.

Автореферат разослан « »

2024 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
Олейников Владимир Александрович



АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Проблема преобразования плана строения организма в ходе эволюции – одна из важнейших в биологии. План строения тела позвоночных существенно усложнился по сравнению с их ближайшими родственниками, беспозвоночными хордовыми – представителями бесчерепных (ланцетников) и оболочников (асцидий), которые по своему образу жизни являются малоподвижными фильтраторами. Эволюционный успех позвоночных во многом связан с появлением и развитием у них ряда важных морфологических особенностей, обеспечивших возможность ведения более активного образа жизни. Большая подвижность и возможность активного питания были обеспечены появившимися парными конечностями и челюстным аппаратом. Возможность ориентации в пространстве и способность к обработке большого объема внешней информации неразрывно связаны с усложнением и преобразованием нервной системы и, в первую очередь, головного мозга.

Современные исследования эволюционной истории и механизмов появления новых признаков являются областью пересечения нескольких научных дисциплин – палеонтологии, эволюционной биологии, сравнительной морфологии, эмбриологии, а также, в последнее время – молекулярной биологии и биоинформатики. Накапливающиеся данные показывают, что на геномном уровне основой морфологических преобразований, помимо изменений регуляторных элементов генов и точечных мутаций в их белок-кодирующих последовательностей, может быть появление и утрата отдельных генов. В качестве одного из важнейших путей появления новых генов рассматриваются геномные полиплоидизации (как правило дупликации), в ходе которых происходит увеличение числа копий исходных генов и возникает больше возможностей для преобразования структуры и свойств отдельных паралогов. Дупликации могут затрагивать как отдельные гены, так и более протяженные участки генома, вплоть до полногеномных дупликаций, при которых происходит удвоение всего генома организма. Согласно принятой на сегодняшний день точке зрения, на ранних этапах эволюции позвоночных имели место как минимум два раунда полногеномных дупликаций, которые могли стать основой для последующего преобразования и усложнения плана строения.

Исторически, значительная часть знаний об эмбриональном развитии позвоночных получена в ходе работы с традиционными лабораторными объектами, такими как

эмбрионы мышей, кур, амфибий (в первую очередь - шпорцевых лягушек *Xenopus sp.*), костистых рыб (в первую очередь – рыбки *Danio rerio*).

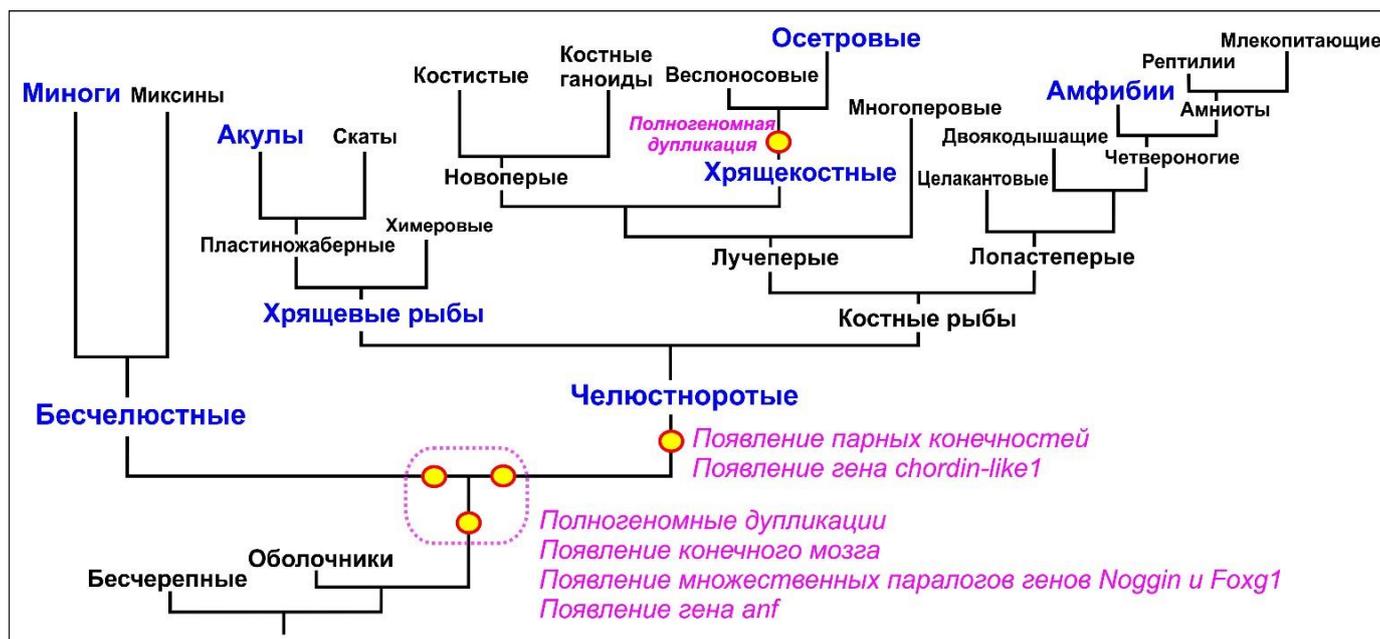


Рисунок 1. Схематическое филогенетическое дерево основных групп современных позвоночных. Синим обозначены группы, представители которых исследовались в настоящей работе. Фиолетовым обозначены вопросы, затронутые в настоящей работе.

Идея настоящей работы состоит в том, что для исследования молекулярных механизмов, обеспечивших появление новых структур и признаков, лучше всего подходят представители филогенетических групп, у которых исследуемые признаки появляются впервые в эволюции. Очевидно, лабораторная практика ограничена возможностью экспериментальной работы лишь с живущими в наши дни современными представителями древних эволюционных линий, которые отличаются от предковых форм. Однако, у представителей архаичных таксонов, в любом случае, выше вероятность сохранения (и, следовательно, обнаружения) особенностей первичных генетических механизмов, лежавших в основе появления новых структур. Для исследований конечного мозга такой базальной группой являются бесчелюстные, у которых впервые в эволюции этот отдел переднего головного мозга морфологически сформировался. В случае парных конечностей архаичными носителями признака являются хрящевые рыбы, парные плавники которых рассматриваются в качестве базовой модели не только в силу эволюционной древности группы, но и в силу строения эндоскелетных элементов.

В соответствии с этой идеей, в настоящей работе изучение семейств генов, участвующих в развитии переднего мозга и парных конечностей позвоночных, были

проведены на миногах, как представителях бесчелюстных, базальной ветви современных позвоночных, а также акулах и осетрообразных, как наиболее архаичных представителях челюстноротых (Рисунок 1). Значительная часть функциональных исследований была проведена на амфибиях, как представителях наземных позвоночных и удобном «традиционном» лабораторном объекте с широким арсеналом разработанных и доступных к применению методик и экспериментальных протоколов. Особенности экспрессии ортологов исследуемых генов были также проанализированы у представителей ближайших родственников позвоночных – бесчерепных (ланцетников) и оболочников.

В совокупности, исследования, проведенные с филогенетически важными объектами – эмбрионами миног, акул и осетровых, позволили получить новую информацию о роли и вкладе сформировавшихся у позвоночных семейств регуляторных генов в развитие морфологического плана строения и появлении новых структур, ставших важными предпосылками для эволюционного успеха позвоночных.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ

Целью настоящей работы было изучение особенностей эволюции нескольких семейств генов, регулирующих формирование плана строения позвоночных и исследование их роли в развитии уникальных структур - конечного мозга и парных конечностей.

Задачи работы включали исследования филогении, геномной синтении, особенностей экспрессии и функциональных свойств регуляторных генов семейств *Noggin*, *Foxg1*, *Anf* и *Chordin*, а также их роли в морфогенезе конечного мозга и парных конечностей позвоночных.

Основными модельными объектами в работе являлись современные представители эволюционно древних групп позвоночных – миног, как представителей бесчелюстных, а также хрящевых рыб и осетрообразных, как архаичных представителей челюстноротых. Функциональные исследования включали работу с эмбрионами амфибий.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ

В ходе проведения работы разработана уникальная для нашей страны методика содержания и систематического получения в лабораторных условиях живых эмбрионов

речной миноги *Lampetra fluviatilis*, как представителя эволюционно древней линии позвоночных - бесчелюстных.

Проведена оптимизация комплекса лабораторных методик для работы с филогенетически важными, в силу своего архаизма, немодельными объектами – эмбрионами миног, хрящевых и осетрообразных рыб.

В работе впервые описаны множественные паралоги генов *noggin* и *foxg1* у представителей миног, акул и осетровых рыб. Гены этих семейств принимают участие в формировании переднего мозга позвоночных, и регуляции клеточной дифференцировки. Впервые исследованы функциональные свойства генов *noggin2* и *noggin4* челюстноротых, их роль в раннем развитии и участие в регенерационных процессах.

Впервые описан и исследован ген класса *Anf* у миног, как представителей бесчелюстных. Обнаружение гена *lanf* (*Lamprey **anf***) у миног позволило подтвердить выдвинутую ранее гипотезу о важности появления гена *anf* для возникновения уникального конечного мозга позвоночных. Конечный мозг впервые в эволюции появился именно у бесчелюстных и в ходе дальнейшей эволюции развился в кору больших полушарий, обеспечивающую высшие формы нервной активности у позвоночных, в том числе у приматов и человека.

Исследованы гены семейства *Chordin* у позвоночных. Впервые показано, что ген *chordin-like1* появился у челюстноротых и может быть связан с возникновением у представителей этой группы уникальных по своему строению парных конечностей. Изначально парные конечности появились в эволюции челюстноротых в виде плавников предковых рыб, а затем преобразовались в специализированные формы плавников современных костистых рыб и пятипалую конечность наземных позвоночных.

В работе впервые показано, что механизмы нейральной индукции и ранней осевой дифференцировки эмбрионов миног могут отличаться от классической модели нейральной индукции, разработанной в первую очередь на амфибиях.

АПРОБАЦИЯ ДИССЕРТАЦИИ И ПУБЛИКАЦИИ

Материалы диссертации опубликованы в 40 статьях в рецензируемых журналах, включены в состав 4х патентов. Результаты работы были представлены в виде приглашенных докладов и стендовых сообщений на 9 всероссийских и международных конференциях.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературных данных, Результаты, Обсуждение результатов, Материалы и методы исследования и Выводы. Текст диссертации изложен на 382 страницах машинописного текста, содержит 127 Рисунков и 6 Таблиц. Список цитированной литературы включает 488 работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Гены семейства *Noggin* – регуляторы раннего развития позвоночных

Проведенный анализ доступных геномных баз данных показал, что у представителей беспозвоночных хордовых – бесчерепных (ланцетников) и оболочников - в геноме присутствует по одному гену *noggin*.

С момента открытия секретируемого белка *Noggin* в качестве нейрального индуктора в 1992 году у позвоночных долгое время исследовался один ген и его белковый продукт – *Noggin1*. Единственным исключением были костистые рыбы, у которых, были обнаружены и описаны три гена *Noggin* - *noggin1*, *noggin2* и *noggin3*, появление которых связывалось с геномной дупликацией, произошедшей в эволюционной ветви костистых рыб. В качестве основной функции *Noggin* традиционно рассматривалось ингибирование сигнального каскада BMP.

В ходе проведенного в настоящей работе поиска гомологов гена *Noggin* у позвоночных, как у бесчелюстных, так и у челюстноротых, были обнаружены и описаны несколько паралогов *noggin*.

Гены семейства *Noggin* у бесчелюстных

Поиск генов семейства *Noggin* бесчелюстных был проведен в доступных геномных библиотеках тихоокеанской миноги (*Lethenteron camtschaticum*) и морской миноги (*Petromyzon marinus*). В результате у миног было обнаружено 4 гена *noggin*: *nogginA*, *nogginB*, *nogginC*, *nogginD*. Для установления филогенетического родства белков *Noggin* позвоночных был проведен филогенетический анализ их аминокислотных последовательностей (Рисунок 2) и анализ локальной геномной синтении (состав соседних генов) генов *noggin* позвоночных (Рисунок 3).

Проведенные анализы филогении и синтении показывают, что среди генов *noggin* челюстноротых уверенно выделяются три паралога – *noggin1*, *noggin2* и *noggin4*. Общие соседние гены у *noggin* бесчелюстных и челюстноротых обнаруживаются, однако

однозначной попарной ортологии по этому признаку между генами *noggin* бесчелюстных и челюстноротых не наблюдается.

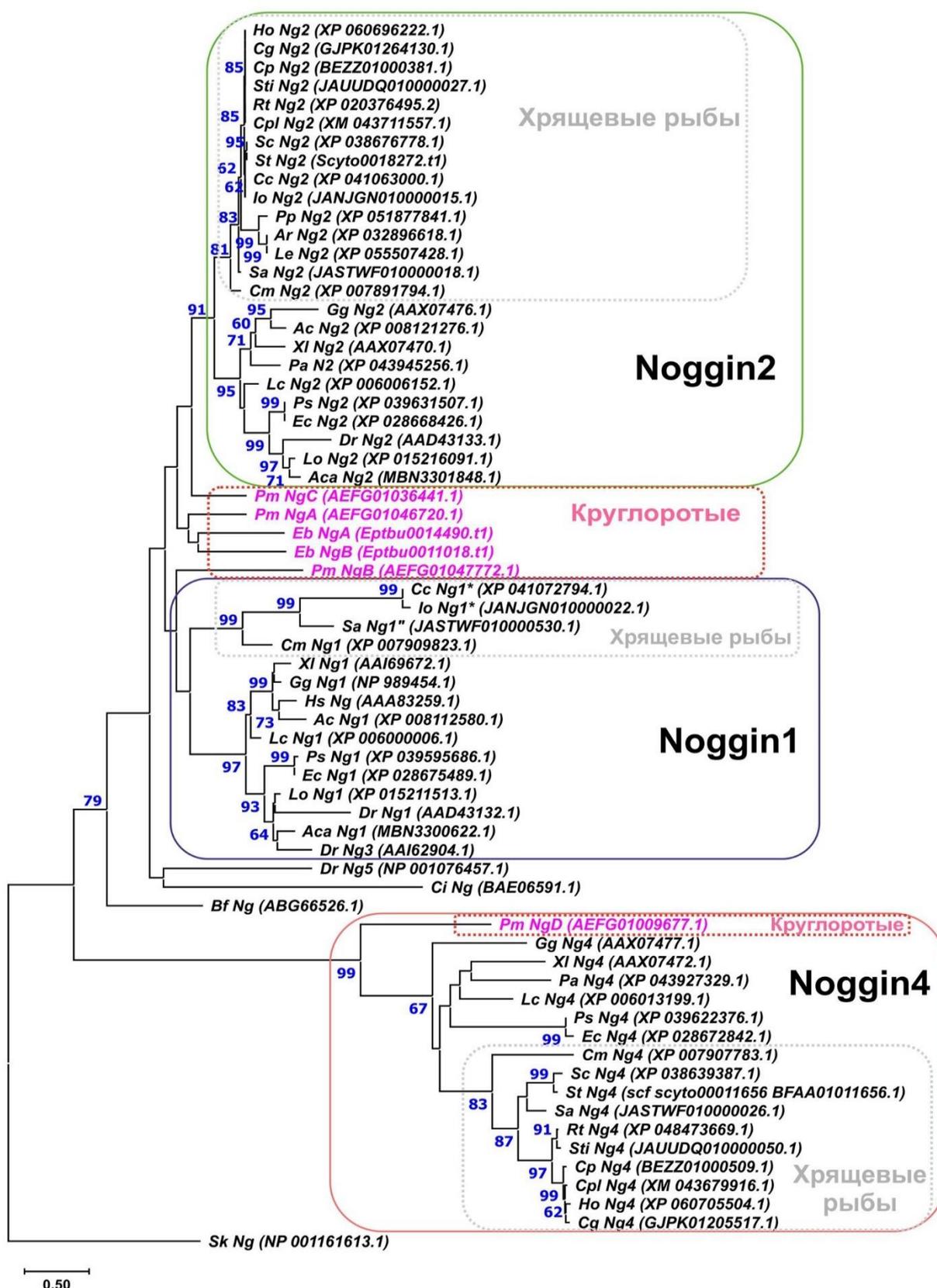


Рисунок 2. Филогенетическое дерево белков *Noggin* позвоночных, построенное по алгоритму максимального правдоподобия (ML). Показаны значения бутстрэп-теста >50.

Ac – *Anolis carolinensis*, Aca – *Amia calva*, Ar – *Amblyraja radiata*, Bf – *Branchiostoma floridae*, Cc - *Carcharodon carcharias*, Cg – *Chiloscyllium griseum*, Cp – *Chiloscyllium punctatum*, Cpl – *Chiloscyllium plagiosum*, Cm - *Callorhinchus milii*, Ci – *Ciona intestinalis*, Dr – *Danio rerio*, Eb – *Eptatretus burgeri*, Ec - *Erpetoichthys calabaricus*, Gg – *Gallus gallus*, Ho – *Hemiscyllium ocellatum*, Hs – *Homo sapiens*, Io – *Isurus oxyrinchus*, Lc – *Latimeria chalumnae*, Le – *Leucoraja erinacea*, Lo – *Lepisosteus oculatus*, Pa – *Protopterus annectens*, Pm – *Petromyzon marinus*, Pp – *Pristis pectinata*, Ps – *Polypterus senegalus*, Rt - *Rhincodon typus*, Sa - *Squalus acanthias*, Sc - *Scyliorhinus canicula*, Sk – *Saccoglossus kowalevskii*, St – *Scyliorhinus torazame*, Sti – *Stegostoma tigrinum*, Xl – *Xenopus laevis*.

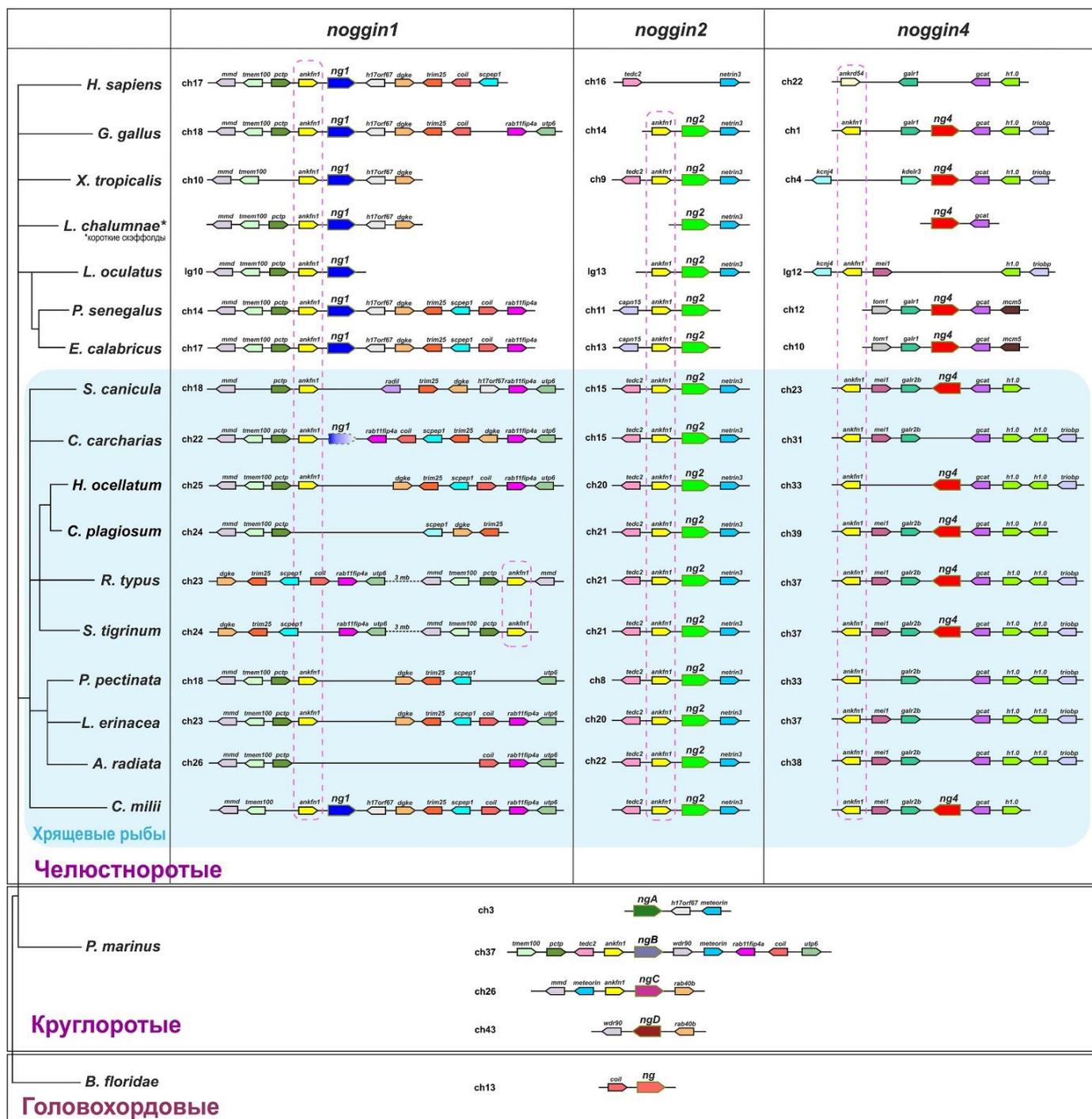


Рисунок 3. Анализ локальной геномной синтении генов *noggin* позвоночных

Было выявлено, что одним из характерных генов-соседей для всех генов *noggin* челюстноротых является ген *ankfn1*. Это указывает на единство происхождения (монофилию) всех трех паралогов *noggin* челюстноротых. Также ген *ankfn1* обнаружен в окрестностях генов *nogginB* и *nogginC* морской миноги. На 3'-конце генов *nogginA* и *noggin1* обнаружен общий ген *C17ORF67*. Монофилия генов *noggin* миног подтверждается наличием общего соседнего гена *meteorin* в окрестностях генов *nogginA* и *nogginB*, а также общего соседнего гена *rab40b* в окрестностях генов *nogginC* и *nogginD* и общего соседнего гена *wdr90* в окрестностях генов *nogginB* и *nogginD*.

На общность происхождения генов *noggin* позвоночных указывает и присутствие гена *coil* в окрестностях гена *nogginB* миноги, гена *noggin1* челюстноротых и единственного гена *noggin* ланцетника (Рисунок 3). В сочетании с присутствием одного гена *noggin* у бесчерепных, оболочников и полухордовых, полученные данные анализа филогении и локальной геномной синтении свидетельствуют о формировании семейства генов *noggin* позвоночных в результате как минимум двух раундов полногеномных дупликаций на ранних этапах эволюции группы.

Динамика экспрессии генов *noggin* на ранних стадиях развития речной миноги *L. fluviatilis* была проанализирована методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Было выявлено, что гены *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* после оплодотворения экспрессируются на низком уровне, однако начиная со стадии поздней нейрулы уровень их экспрессии возрастает. Экспрессия *nogginD* наблюдается на относительно постоянном уровне, не превышающем уровень экспрессии на стадии бластулы.

Пространственные паттерны экспрессии генов *noggin* у эмбрионов речной миноги *L. fluviatilis* были исследованы методом гибридизации *in situ* (Рисунок 4, Рисунок 5).

К моменту исследования генов *noggin* миног для их ортологов у челюстноротых - генов *noggin1* и *noggin2* - уже была описана способность вызывать формирование комплекса дополнительных осевых структур (вторых осей тела) при эктопической экспрессии. Также было показано, что *noggin4* такой способностью не обладает. Для оценки функциональной активности генов *nogginA*, *nogginB*, *nogginC* и *nogginD* речной миноги аналогичные тесты были проведены с их синтетическими мРНК, которые были инъецированы в вентральную область эмбрионов шпорцевой лягушки. Было выявлено, что мРНК *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* индуцируют формирование полных дополнительных

(вторичных) осей тела, содержащих переднеголовые структуры (глаза) у эмбрионов шпорцевой лягушки (Рисунок 6).

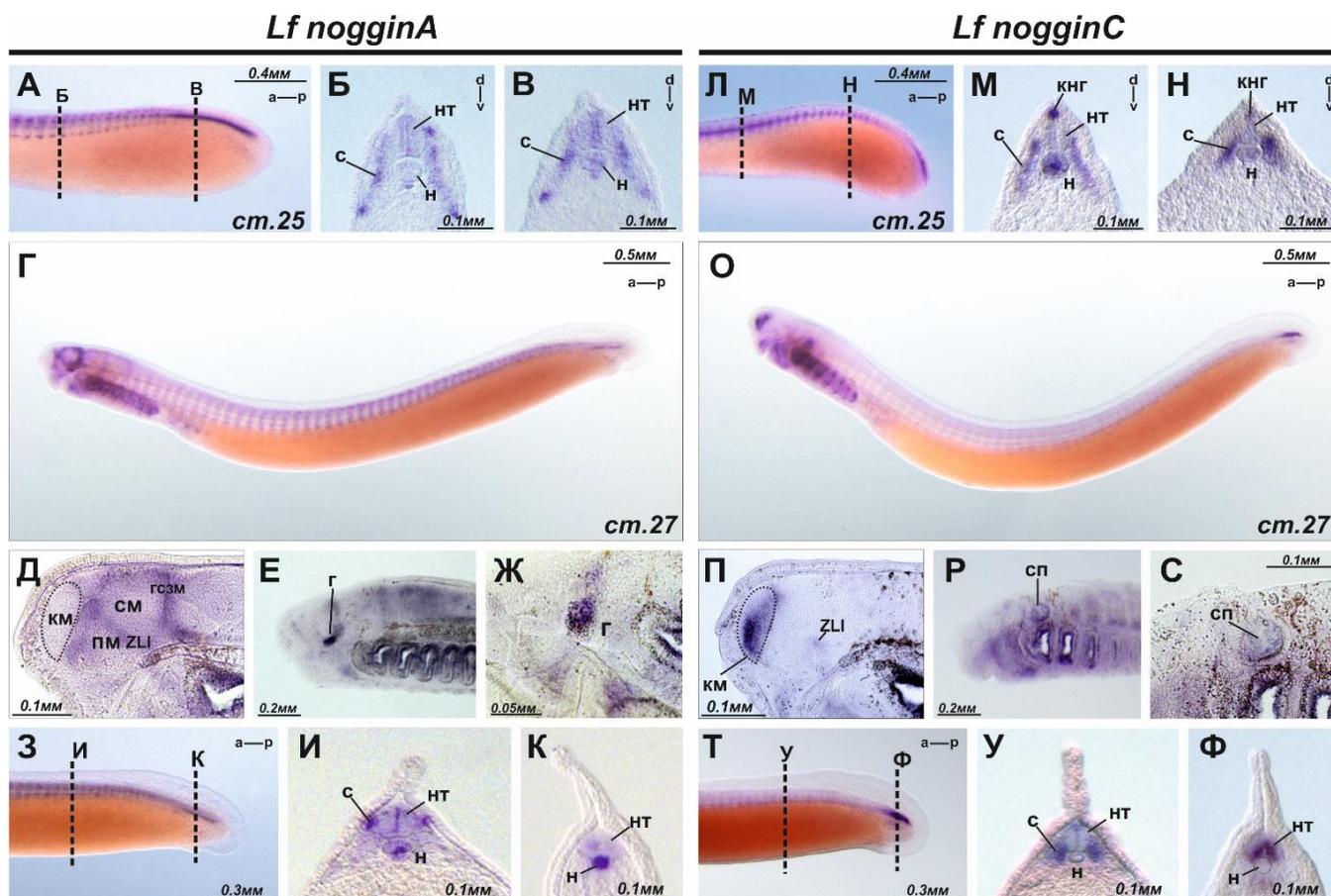


Рисунок 4. Сравнение паттернов экспрессии генов *nogginA* (А - К) и *nogginC* (Л - Ф).

А - В – На стадии 25 (стадия ранней предличинки) ген *nogginA* экспрессируется в сомитах, нотохорде, гипохорде и нервной трубке.

Г – Экспрессия гена *nogginA* на стадии 27 (предличинка).

Д - Ж – Продольные срезы эмбрионов на стадии 27 позволяют обнаружить экспрессию гена *nogginA* на границе конечного и промежуточного отделов мозга, в *zona limitans intrathalamica*, на границе среднего и заднего отделов и в глазах.

З – К – У личинок экспрессия гена *nogginA* существенно возрастает в нотохорде (н) растущего хвоста.

Л - Н – на стадии 25 ген *nogginC* экспрессируется в сомитах, нотохорде, нервной трубке и клетках нервного гребня

О - Экспрессия гена *nogginC* на стадии 27.

П - С – Продольные срезы позволяют обнаружить экспрессию *nogginC* в вентральной части конечного мозга и слабую экспрессию в ZLI ушных капсулах.

Т - Ф – на стадии 27 ген *nogginC* экспрессируется в сомитах, нотохорде и нервной трубке в туловищном отделе (У), однако в хвостовой части (Ф) его экспрессия обнаруживается только в нервной трубке.

Сокращения: ZLI - *zona limitans intrathalamica*, г – глаз, гсзм – граница среднего и заднего мозга, км – конечный мозг, н – нотохорд, нт – нервная трубка, пм – промежуточный мозг, с – сомиты, кнг - клетки нервного гребня, см – средний мозг, сп - слуховой пузырек.

Lf_nogginB

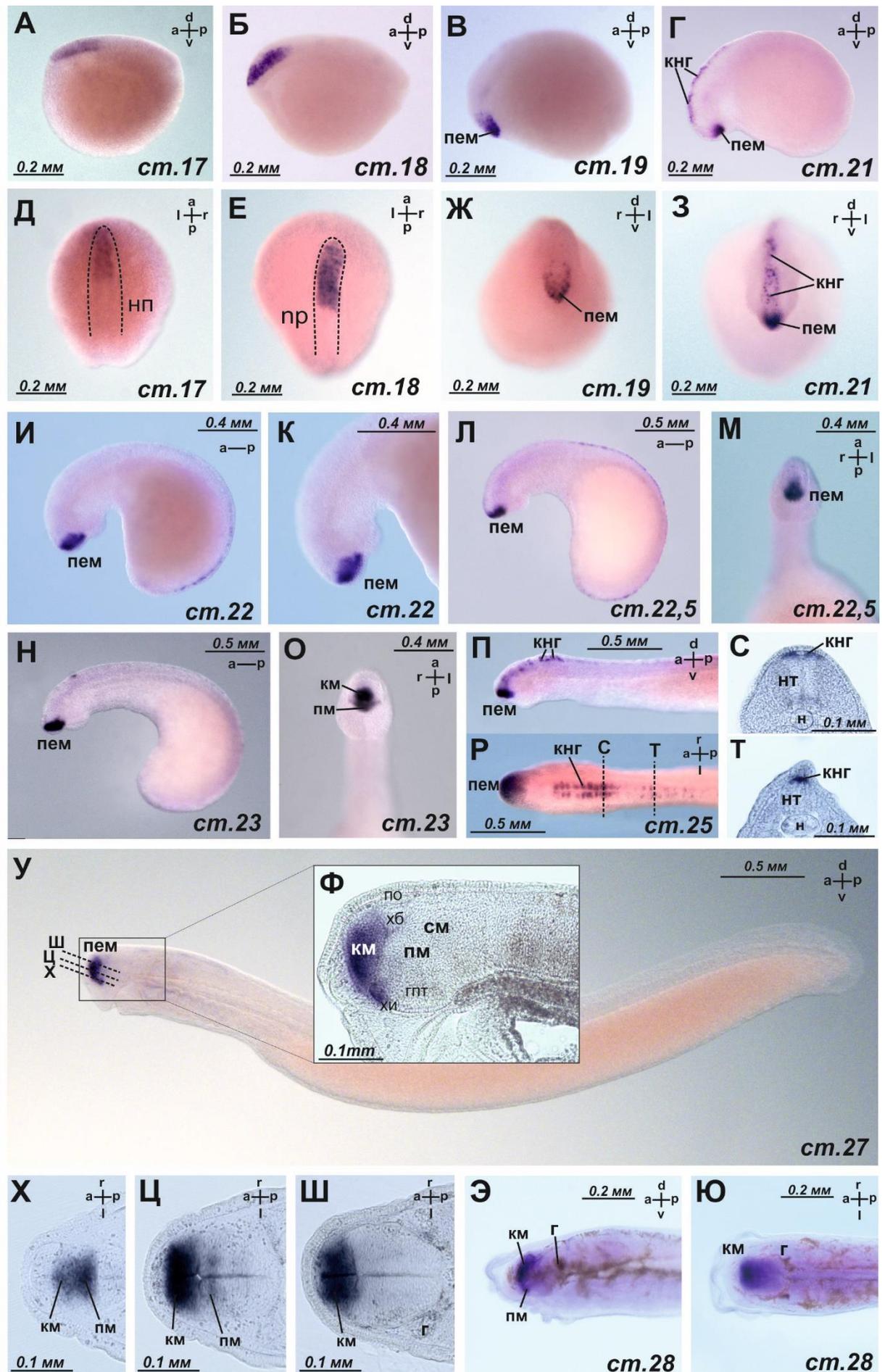


Рисунок 5. Паттерн экспрессии гена *nogginB* *L. fluviatilis*.

А, Д - На стадии 17 (поздняя нейрула) ген *nogginB* экспрессируется на переднем конце нервной трубки.

Б, Е - На стадии 18 экспрессия *nogginB* усиливается в области переднего и заднего мозга и ослабевает в дорсальной части зачатка среднего мозга.

В, Г, Ж, З - на стадиях 19-21 (стадия головного выроста) экспрессия *nogginB* обнаруживается в зачатке переднего мозга (**В, Ж**) и дорсальных клетках нервной трубки (**Г, З**), предположительно клетках нервного гребня.

И - Т - На стадиях 22-25 *nogginB* экспрессируется в области конечного мозга и вентральной части промежуточного мозга и, как показывают срезы (**С, Т**) - в клетках нервного гребня

У - экспрессия *nogginB* на стадии 27 (предличинка).

Ф - продольный срез эмбриона на стадии 27 позволяет зафиксировать экспрессию *nogginB* в дорсальной и вентральной частях конечного мозга, а также **зрительной хиазме**.

Х, Ц, Ш - горизонтальные срезы головного отдела эмбрионов на стадии 27.

Э, Ю - экспрессия *nogginB* на стадии 28.

Сокращения приведены на Рисунке 4.

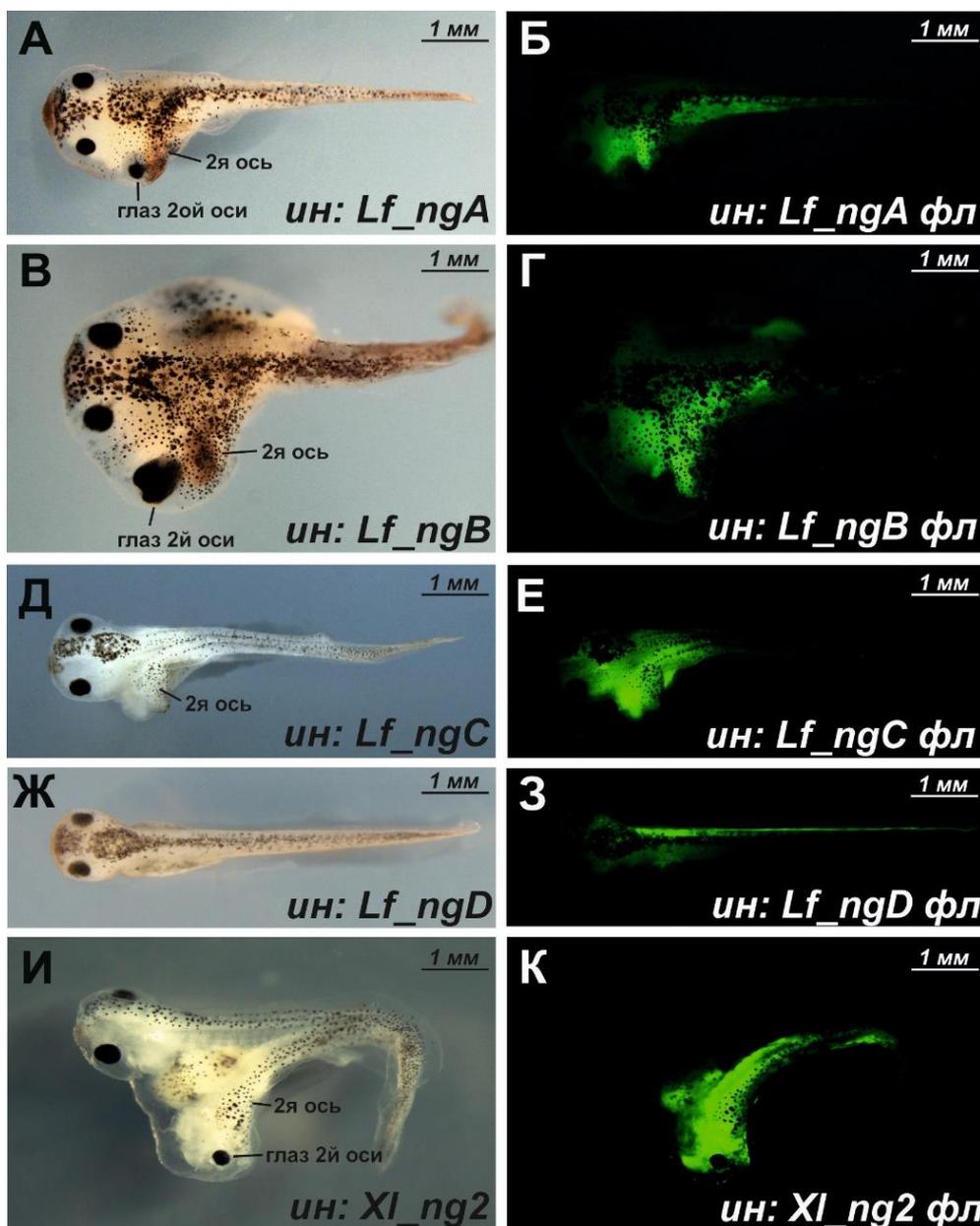


Рисунок 6.
Гены *noggin* миног демонстрируют функциональную активность и эволюционный консерватизм свойств.

Инъекции мРНК генов *nogginA* (**А, Б**), *nogginB* (**В, Г**) и *nogginC* (**Д, Е**) миног в эмбрионы шпорцевой лягушки *X. laevis* индуцируют формирование дополнительных осей тела, включая переднеголовные структур, аналогично эффекту экспрессии мРНК *noggin2* шпорцевой лягушки (**И, К**). Инъекции мРНК *nogginD* формирование дополнительных осей не индуцирует (**Ж, З**).

Это подтверждает функциональную активность генов *noggin* миног и эволюционный консерватизм свойств белков Noggin позвоночных. Белок NogginD, ранее, обнаруживший гомологию с *Noggin4*, подобно своему ортологу, не обладает способностью индуцировать формирование дополнительных осевых структур.

Гены семейства Noggin у челюстноротых

Проведенный филогенетический анализ, представленный на Рисунке 2, показал, что у хрящевых рыб из трех генов *noggin*, описанных у челюстноротых, все три паралога присутствуют только у наиболее базальной ветви – представителей подкласса Цельноголовых (каллоринхи) и у одного из базальных представителей акул – катрана (*S. acanthias*). У всех рассмотренных представителей Пластиножаберных (акул и скатов) стабильно присутствует только ген *noggin2*. У части рассмотренных видов исчез ген *noggin4*. При этом, в геномах большинства проанализированных представителей Пластиножаберных отсутствует ген *noggin1* (за исключением катрана, *noggin1* которого содержит ряд нехарактерных замен и псевдогенов у *C. carcharias* и *I. oxyrinchus*).

Подтверждением исчезновения *noggin1* у хрящевых является его отсутствие между характерными генами соседями у *A. radiata*, *P. pectinata*, *S. canicula* и *C. plagiosum* (Рисунок 3). У *R. typus* и *S. tigrinum* наблюдается нарушение расположения генов в области потенциальных окрестностей *noggin1*. В геноме *C. carcharias* псевдоген *noggin1* располагается в области, соответствующей расположению *noggin1* и имеет характерные для *noggin1* соседние гены. У *C. milii* все три гена *noggin* имеют характерные для челюстноротых соседние гены.

Анализ паттерна экспрессии *noggin2* и *noggin4* был проведен на эмбрионах серой кошачьей акулы *C. griseum* методом гибридизации *in situ*, позволяющем визуализировать области активной транскрипции генов на целых зародышах и гистологических срезах. Было обнаружено, что на стадиях 24 и 27 *noggin2* диффузно экспрессируется в конечном и среднем мозге, но отсутствует в передней части промежуточного мозга (Рисунок 7 А - Г). Также экспрессия *noggin2* обнаруживается вдоль дорсального края хвоста (Рисунок 7 Д). Ген *noggin4* на стадиях 24 и 27 экспрессируется диффузно в конечном, промежуточном и среднем отделах головного мозга (Рисунок 7 К-Н). В отличие от *noggin2*, экспрессия *noggin4* не обнаруживается вдоль дорсального края хвоста (Рисунок 7 О), но, в то же время, в отличие от *noggin2*, наблюдается в сомитах туловища и хвоста (Рисунок 7 П и Е). На

срезах головной области эмбрионов видно, что на стадии 26 *noggin2* и *noggin4* экспрессируются в клетках желудочковой зоны конечного, промежуточного и среднего мозга (Рисунок 7 Ж-И, Р - Т).

При инъекциях в эмбрионы *X. laevis* мРНК *noggin2 C. griseum* индуцирует вторичные оси тела, в том числе полные, с переднеголовными структурами и глазами.

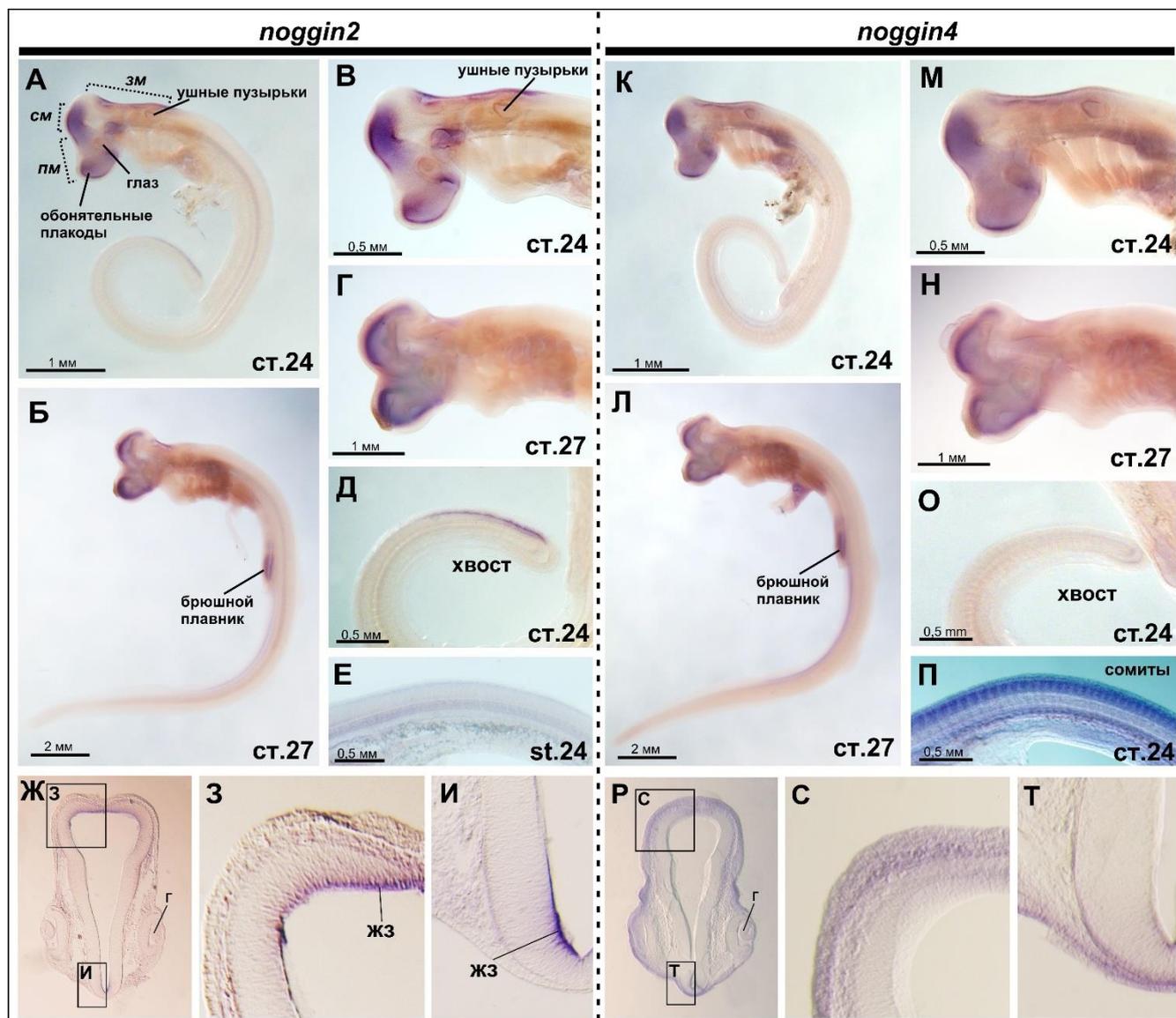


Рисунок 7. Пространственная экспрессия генов *noggin2* (А - И) и *noggin4* (К - Т) у эмбрионов серой кошачьей акулы *C. griseum*. Ж - И и Р - Т – поперечные срезы головной области на стадии 26.

г – глаз, жз – желудочковая зона, зм – задний мозг, пм – передний мозг, см – средний мозг.

У амфибий, как представителей наземных позвоночных, были обнаружены и описаны три паралога *noggin* – *noggin1*, *noggin2* и *noggin4*.

Паттерны пространственной экспрессии генов *noggin* у эмбрионов *X. laevis* были исследованы методом гибридизации *in situ*. Было показано, что экспрессия *noggin2*

наблюдается в области зачатка переднего мозга (Рисунок 8 О, П). В отличие от *noggin1*, *noggin2* не экспрессируется на стадии 26 в присоске, хорде и в туловищной области нервной трубки. Ген *noggin4* демонстрирует диффузный паттерн, экспрессируясь в эктодерме (Рисунок 8 С).

Проведенные функциональные тесты показали, что *Noggin2* индуцирует формирование полных вторичных осей тела у эмбрионов *X. laevis* (Рисунок 8 А-В). *Noggin4* такой активностью не обладает (Рисунок 8 Т). Было показано, что *Noggin2* (как и *Noggin1*) активизирует экспрессию нейральных маркеров и ингибирует эпидермальную дифференцировку (Рисунок 8 Г-Е). При этом, в отличие от *Noggin1*, *Noggin2* может подавлять мезодермальную дифференцировку и дорсализующую активность *Noggin1*. Это указывает на способность *Noggin2*, кроме BMP, подавлять активность других сигнальных каскадов, необходимых для мезодермальной дифференцировки.

На эмбрионах шпорцевой лягушки *X. laevis* было проведено исследование способности белков *Noggin* модулировать активность ключевых внутриклеточных сигнальных каскадов, регулирующих клеточную дифференцировку (Рисунок 9). Было установлено, что мРНК *noggin2* транслируется в эмбрионах значительно эффективней *noggin1*, у которого 5'-нетранслируемая последовательность обладает ингибиторными свойствами (Рисунок 9 А - Г). Методами анализа фосфорилирования молекул Smad и в экспериментах с применением люциферазных репортерных конструкций была показана способность белков *Noggin1* и *Noggin2* ингибировать активность не только BMP, но и Nodal/Activin и Wnt сигнальных каскадов (Рисунок 9 Ж - Н). Методами ко-иммунопреципитации и иммуноблоттинга была показана способность белков *Noggin* напрямую связывать белки-лиганды, в норме активирующие каскады Nodal/Activin и Wnt (Рисунок 9 Д, Е). Белок *Noggin4*, не обладает способностью ингибировать каскад BMP (что соответствует наличию в аминокислотной последовательности *Noggin4* замен в положениях, согласно литературным данным, критически важных для обеспечения способности *Noggin* белков связывать молекулы BMP), а также Nodal/Activin каскады (Рисунок 10 А, Б). В то же время, *Noggin4* обнаружил способность подавлять активность Wnt/ β -catenin сигнального каскада и связывать белок Wnt8, активирующий этот каскад (Рисунок 10 В - Д). Способность *Noggin4* белок Wnt8 была показана методом ко-иммунопреципитации и подтверждена методом поверхностного плазмонного резонанса (Рисунок 10 Д). Функциональным подтверждением способности *Noggin4* ингибировать

активность Wnt сигнального каскада стала способностью мРНК *noggin4* вызывать формирование полных вторичных осей тела в смеси с мРНК трункированного рецептора tBR - специфического ингибитора BMP и Nodal/Activin каскадов (Рисунок 10 E).

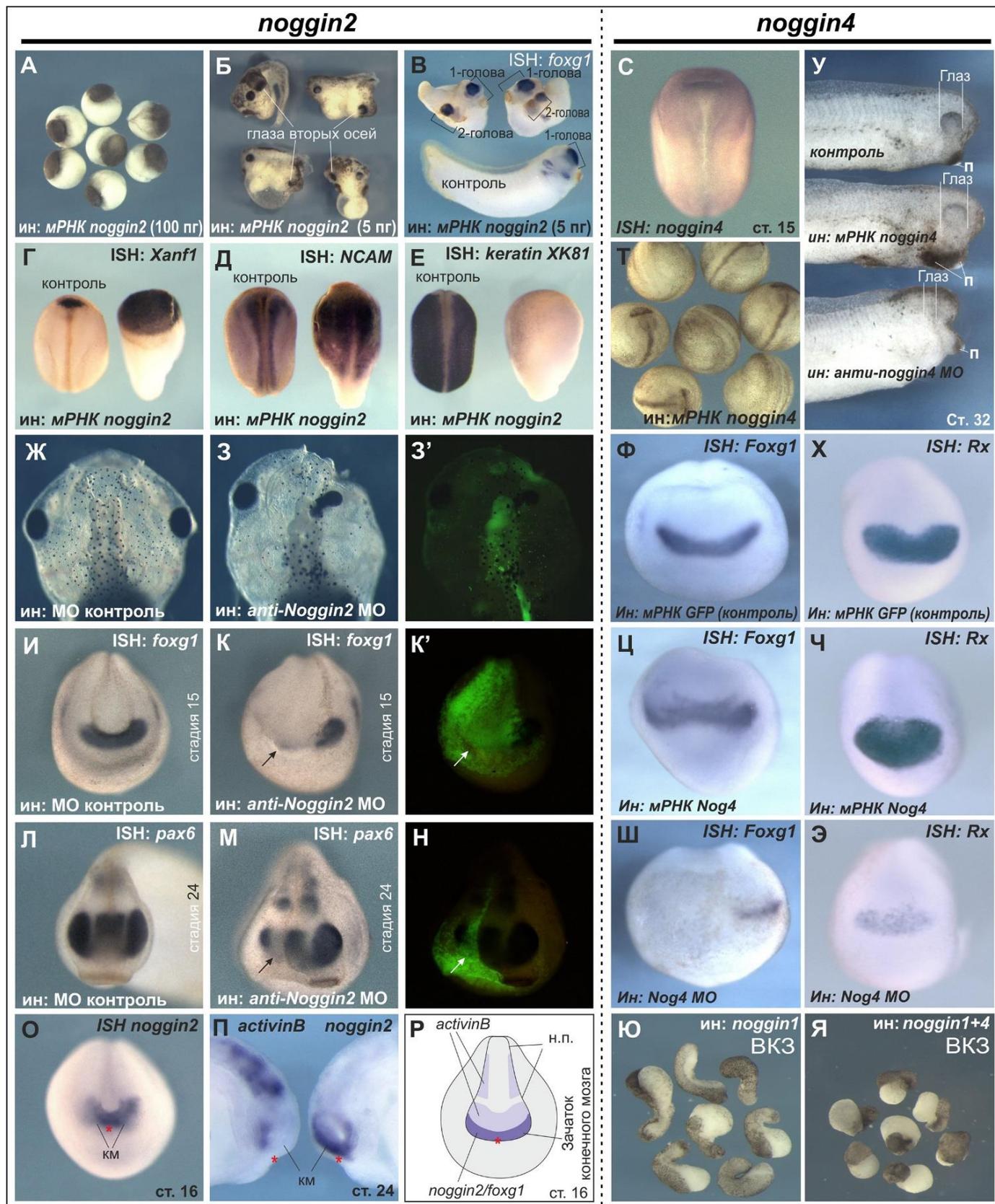


Рисунок 8. Исследование функциональных свойств генов *noggin2* и *noggin4* шпорцевой лягушки и их роли в развитии переднеголовных структур.

А - Вентральные инъекции 40 пг синтетической мРНК *noggin2* в эмбрионы *X. laevis* на ранних стадиях развития приводят к формированию грибообразного фенотипа.

Б, В - Вентральные инъекции 5 пг мРНК *noggin2* в эмбрионы *X. laevis* на ранних стадиях развития приводят к формированию полных вторичных осей тела, содержащих переднеголовые структуры.

Г – Е - гибридизация *in situ* контрольных эмбрионов (слева на каждой их фотографий) и эмбрионов, инъецированных мРНК *noggin2* с пробами мРНК указанных генетических маркеров показывает усиление нейральной (**В, Г**) и подавление эпидермальной (**Д**) дифференцировки.

Ж – Н - Нарушения развития переднеголовных структур и экспрессии переднеголовных маркеров при подавлении трансляции эндогенной мРНК *noggin2* при помощи МО.

О - На стадии средней нейрулы *noggin2* в норме экспрессируется в области переднего края нервной пластинки.

П - Экспрессия *activinB* и *noggin2* в половинках эмбрионов на стадии хвостовой почки. В отличие от *noggin2*, *activinB* не экспрессируется в зачатке конечного мозга.

Р - Схема экспрессии *activinB*, *foxl1* и *noggin2* на стадии средней нейрулы, вид спереди.

С – Диффузный паттерн экспрессии *noggin4* на стадии нейрулы

Т – влияние экспериментальной активации и подавления экспрессии *noggin4* на формирование глаз у эмбрионов

У – отсутствие индукции вторичных осей тела у эмбрионов при инъекциях мРНК *noggin4*

Ф – Э - Экспериментальные изменения уровня экспрессии *noggin4* приводит к нарушениям экспрессии генов-маркеров *foxl1* и *rx* на ранних стадиях развития эмбрионов *X. laevis*

Ю, Я – мРНК *noggin4* подавляет активность мРНК *noggin1* в эксплантатах вентральной маргинальной зоны (ВМЗ).

Было установлено, что экспериментальное подавление экспрессии генов *noggin2* и *noggin4* приводит к аномалиям развития переднеголовных структур и нарушениям экспрессии ряда ключевых переднеголовных маркеров (Рисунок 8 Ж-Н, У-Э). Было показано, что ингибирование экспрессии *activinB* белком *Noggin2* необходимо для развития переднего мозга. Это подтверждается как сопоставлением взаимокomплементарных паттернов экспрессии генов *activinB* и *noggin2* в нормальном развитии эмбрионов *X. laevis* (Рисунок 8 О – Р), так и проведенными экспериментами с трансгенными головастиками, эктопически экспрессирующими *activinB* в переднеголовой области под контролем промотора гена *xanf1* (*xenopus anfl1*). В эксперименте у всех трансгенных эмбрионов, эктопически экспрессирующих *activinB* на переднем крае нервной пластинки, наблюдалась редукция переднеголового отдела мозга, включая глаза.

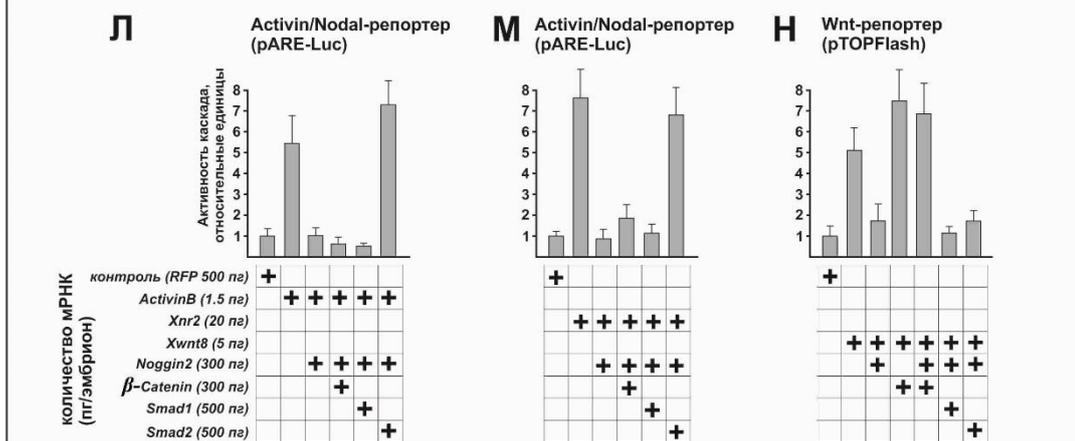
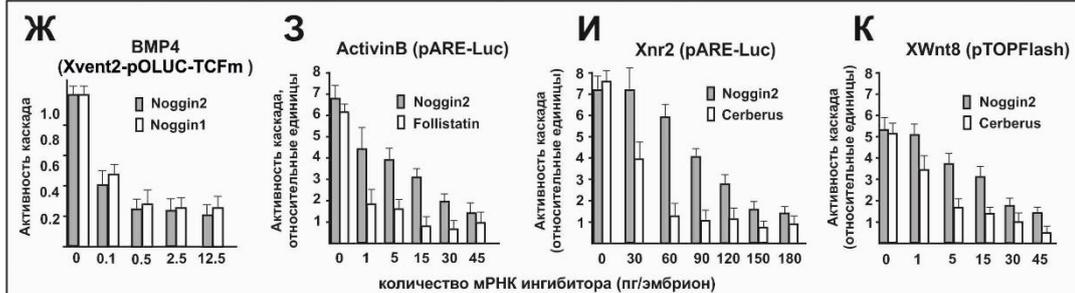
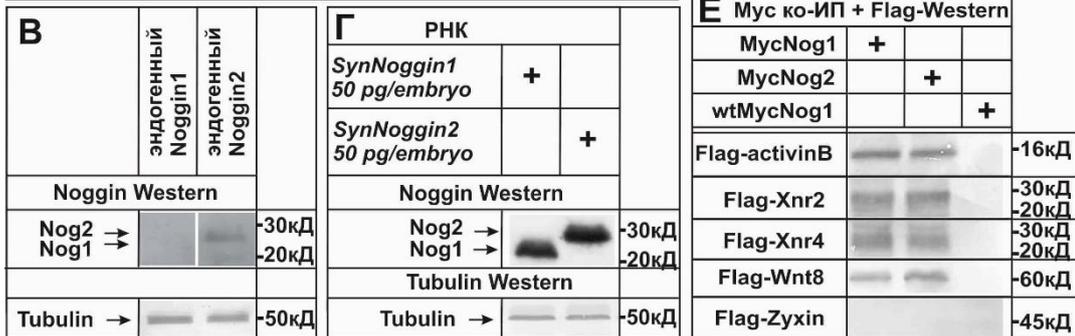
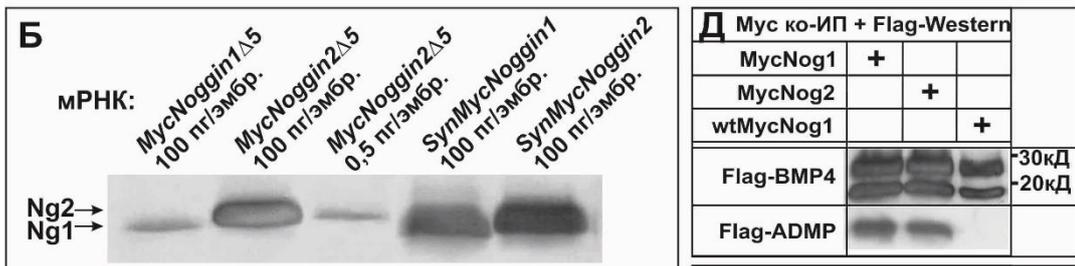
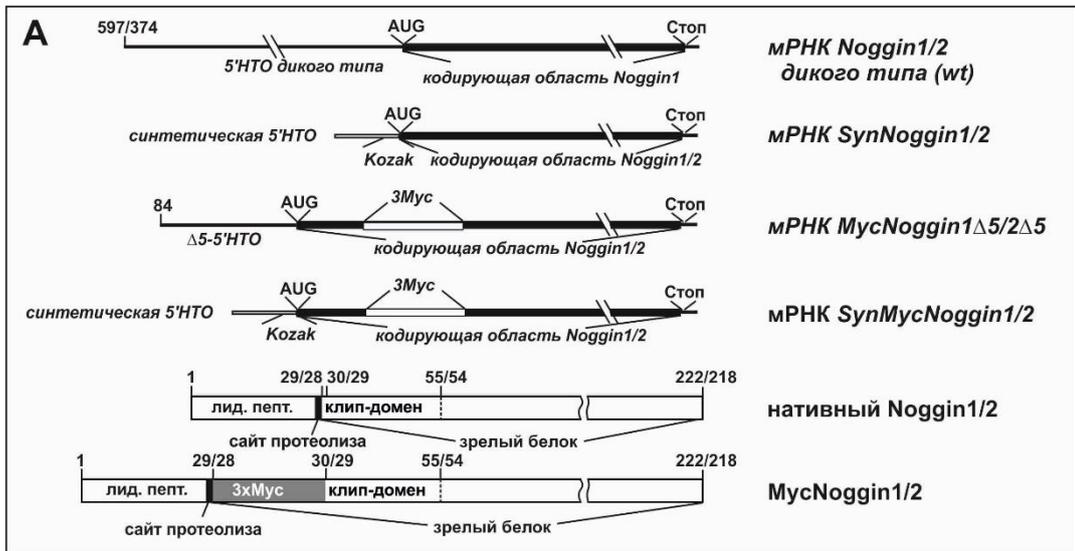


Рисунок 9. Исследование функциональных свойств белка Noggin2 шпорцевой лягушки методами ко-иммунопреципитации и в люциферазных тестах.

А - Схемы основные мРНК и белков, использованные в экспериментах.

Б - Сравнение уровней трансляции мРНК *mycNoggin1Δ5* и *mycNoggin2Δ5* методом иммуноблоттинга с антителами против мус-пептида.

В, Г - Количество белков Noggin1 и Noggin2 в эмбрионах, оцененное методом иммуноблоттинга со специфическими антителами, значительно превышает количество Noggin1 (на В нанесены эндогенные белки, на Г – оверэкспрессированные).

Д, Е - Способность белков Noggin1 и Noggin2 связывать лиганды ADMP, BMP, ActivinB, Wnt8, Xnr2, Xnr4 и Wnt8, участвующие в активации соответствующих сигнальных каскадов, выявленная методом ко-иммунопреципитации. Zuxin приведен в качестве отрицательного контроля.

Ж-К - Noggin2 ингибирует активность указанных сигнальных каскадов в люциферазных тестах (приведено сравнение Noggin2 с описанными в литературе белками-ингибиторами этих сигнальных каскадов).

Л-Н - подтверждение специфичности ингибирования сигнальных каскадов белков Noggin2 в люциферазных тестах

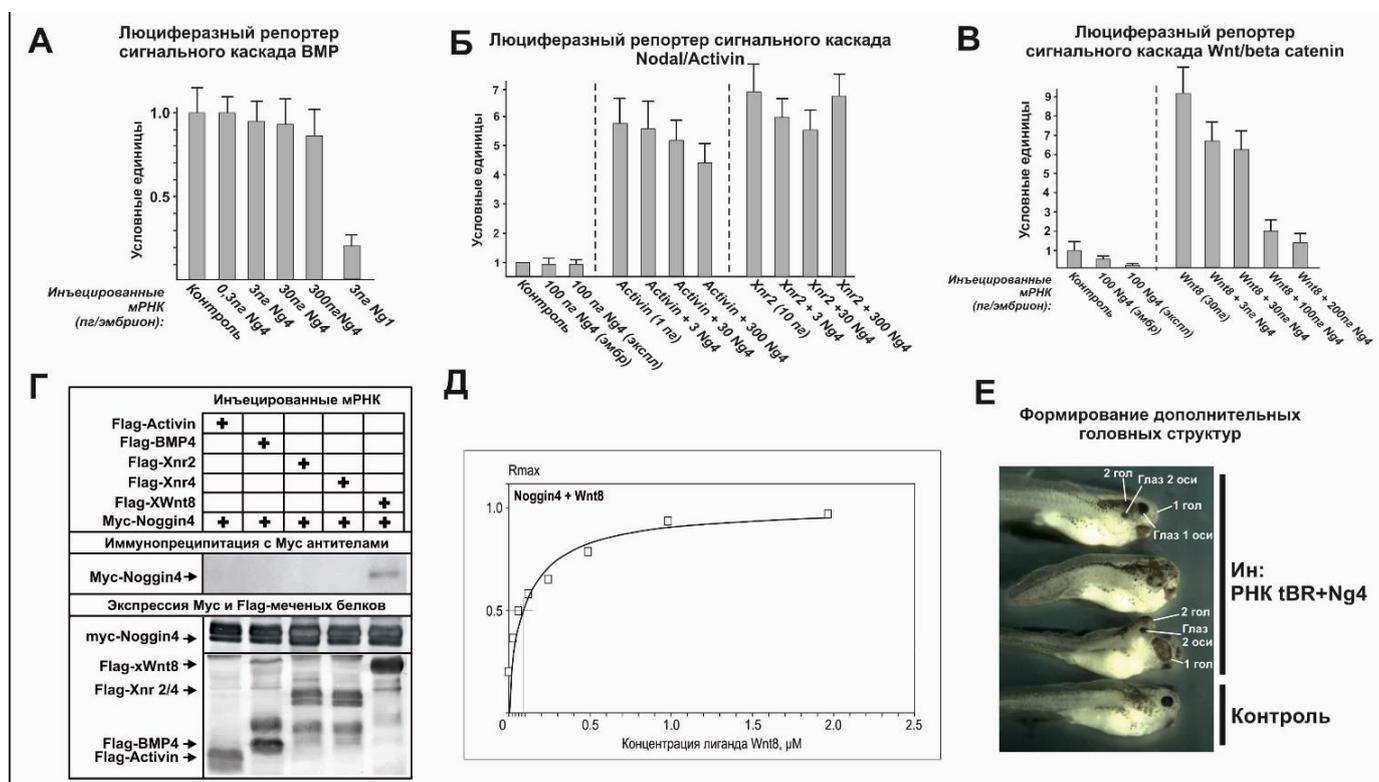


Рисунок 10. Исследование функциональных свойств белка Noggin4 шпорцевой лягушки.

А, Б – Белок Noggin4 не обладает способностью ингибировать сигнальные каскады BMP и Nodal/Activin в люциферазных тестах.

В - в люциферазных тестах Noggin4 ингибирует эндогенную активность сигнального каскада Wnt/ β -catenin.

Г - Белок Noggin4 способен связывать белок Wnt8 и не способен связывать белки Activin, BMP4, Xnr2, Xnr4.

Д – Кривая титрования, полученная методом ППР для взаимодействия иммобилизованных белков Noggin4 и Wnt8.

Е - Noggin4 способен индуцировать формирование полных осей тела, содержащих переднеголовные структуры (глаза) при инъекции в смеси с трунктированным рецептором tBR.

Проведенное исследование вовлеченности генов *noggin* в процессы регенерации показало активацию их экспрессии в регенерирующей почке хвоста и конечностей. Наибольший уровень активации наблюдался для гена *noggin4*. На трансгенных головастиках было показано, что белок *Noggin4*, в отличие от *Noggin1* и *Noggin2*, способен оказывать стимулирующее влияние на регенерацию конечностей у *X. laevis*.

Множественные паралоги переднеголовных генов *foxg1* у позвоночных

Три паралога foxg1 у эволюционно древних групп позвоночных

Проведенный анализ доступных геномных сиквенсов морской миноги (*P. marinus*) и камчатской миноги (*L. camtchaticum*) показал наличие у этих представителей бесчелюстных трех паралогов *foxg1*.

Поиск белков *Foxg1* челюстноротых также был проведен в доступных базах геномных данных, и выборка включила представителей всех описанных групп – хрящевых рыб (каллоринх, представители скатов и акул), хрящевых ганоидов (стерлядь, лопатонос), лучеперых и мясистолапастных рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих. Поиск последовательностей для анализа показал, что наблюдаемая у высших позвоночных (птиц, млекопитающих и некоторых рептилий) ситуация наличия одного гена *foxg1* не является характерной для позвоночных в целом. У хрящевых, осетрообразных и костных рыб присутствуют, как правило, три паралога *foxg1*. У некоторых представителей осталось два гена (каллоринх *C. milii*), а у костистых рыб, вследствие прошедшей у них дополнительной геномной дупликации есть четыре паралога *foxg1*. Поскольку у ближайших родственников позвоночных - бесчерепных и оболочников - обнаружено по одному *foxg1* гену, можно предположить, что появление трех паралогов *foxg1* у позвоночных стало результатом двух раундов (полно)геномных дупликаций в ранней эволюции группы.

Для установления сходства обнаруженных последовательностей белков *Foxg1* позвоночных был проведен филогенетический анализ их аминокислотных последовательностей (Рисунок 11), а также анализ локальной геномной синтении генов *foxg1* (Рисунок 12). Кроме генов и белков позвоночных в анализ были включены гены и белки *Foxg1* представителей бесчерепных, оболочников, а также полухордовых.

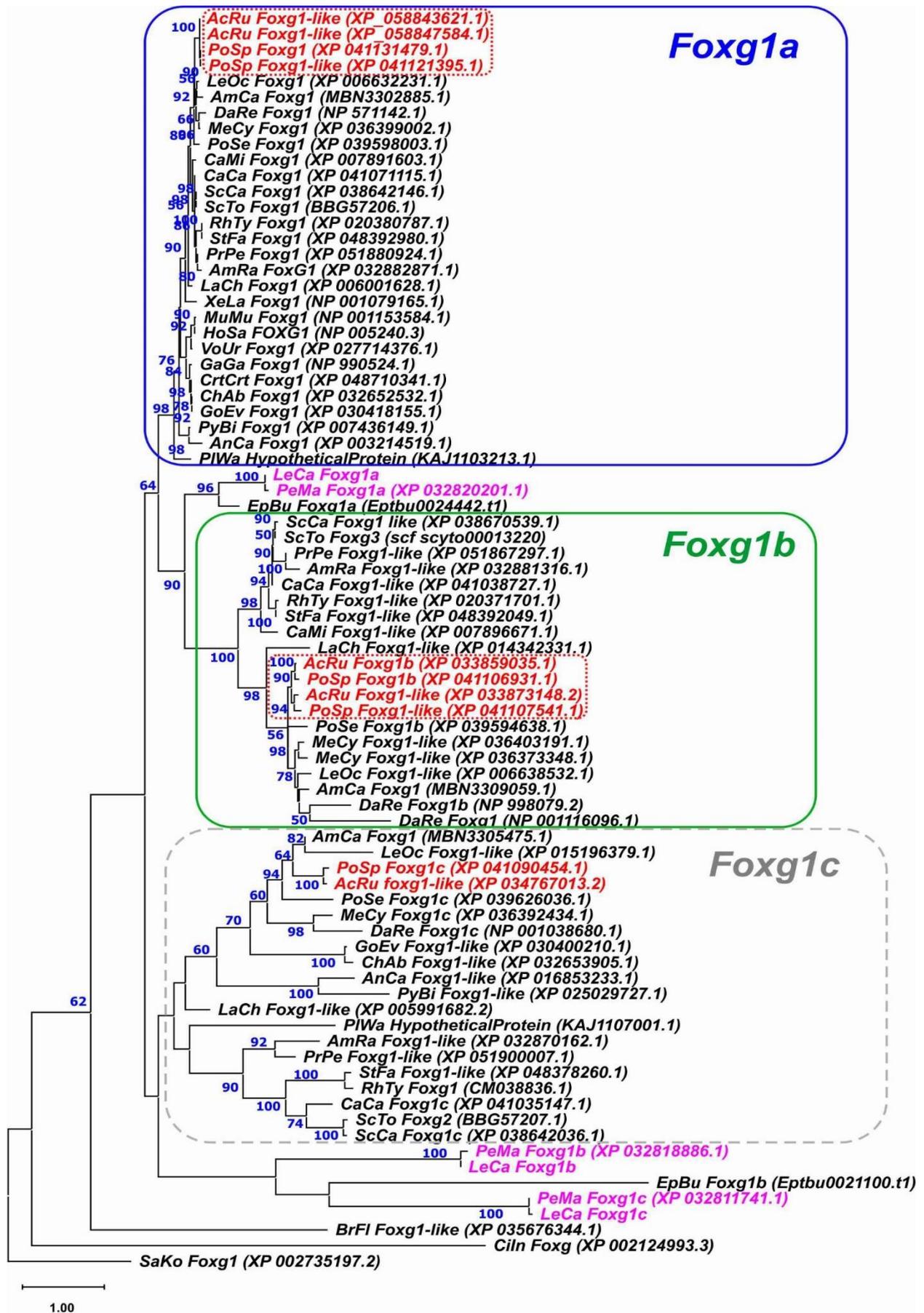


Рисунок 11. Филогенетическое дерево белков Foxg1 позвоночных, построенное методом максимального правдоподобия (Maximum likelihood, ML). Показаны значения бутстрэп-теста >50

AcRu - *Acipenser ruthenus*; *AmCa* – *Amia calva*; *AmRa* – *Amblyraja radiata*; *AnCa* – *Anolis carolinensis*; *BrFl* – *Branchiostoma floridae*; *CaCa* - *Carcharodon carcharias*; *CaMi* - *Callorhynchus milii*; *ChAb* - *Chelonoidis abingdonii*; *CiIn* – *Ciona intestinalis*; *CrtCrt* – *Caretta caretta*; *DaRe* – *Danio rerio*; *EpBu* – *Eptatretus burger*; *GaGa* – *Gallus gallus*; *GoEv* - *Gopherus evgoodei*; *HoSa* – *Homo sapiens*; *LaCh* – *Latimeria chalumnae*; *LeCa* – *Lethenteron camtchaticum*; *LeOc* – *Lepisosteus oculatus*; *MeCy* – *Megalops cyprionoides*; *MuMu* – *Mus musculus*; *PeMa* – *Petromyzon marinus*; *PlWa* - *Pleurodeles waltl*; *PoSe* – *Polypterus senegalus*; *PoSp* – *Polyodon spathula*; *PrPe* – *Pristis pectinate*; *PyBi* – *Python bivittatus*; *RhTy* - *Rhincodon typus*; *SaKo* – *Saccoglossus kowalevskii*; *ScCa* - *Scyliorhinus canicula*; *ScTo* - *Scyliorhinus torazame*; *StFa* – *Stegostoma fasciatum*; *VoUr* - *Vombatus ursinus*; *XeLa* – *Xenopus laevis*.

В сумме, результаты проведенных филогенетических анализов показывают, что белки Foxg1 бесчелюстных и челюстноротых уверенно кластеризуются внутри каждой из групп, но выраженной ортологии белков Foxg1 между этими эволюционными линиями не прослеживается. Анализ локальной геномной синтении показал, что гены *foxg1* челюстноротых уверенно разделяются на три группы паралогов – *foxg1a*, *foxg1b* и *foxg1c*. В то же время, каждый из генов *foxg1* бесчелюстных имеет общих соседей с несколькими генами *foxg1* у челюстноротых (общие гены-соседи приведены в таблице на Рисунке 12). Это, свидетельствуя в пользу общности происхождения рассматриваемых генов, затрудняет выявление пар ортологов среди них.

Исследование пространственной экспрессии генов *foxg1* было проведено у речной миноги, как представителя бесчелюстных, и стерляди, как представителя осетрообразных - одной из эволюционно древних групп челюстноротых.

У речной миноги все три паралога *foxg1* экспрессируются в конечном мозге, хотя и в разных его участках – *foxg1β* экспрессируется в вентральной зоне конечного мозга, *foxg1γ* – в краевой зоне вентральной части конечного мозга (Рисунок 13, Рисунок 14). Экспрессия обоих генов наблюдается с 23 стадии. Ген *foxg1α* диффузно экспрессируется во всем конечном мозге. Экспрессия всех паралогов *foxg1* в области конечного мозга продолжается вплоть до стадии предличинки (стадия 30).

В ушных структурах экспрессируется только ген *foxg1β* (Рисунок 14). В глазных стебельках и глазных пузырях экспрессируется ген *foxg1γ*. В жаберных дугах у речной миноги экспрессируются все три паралога *foxg1*. Также все паралоги *foxg1* экспрессируются в сенсорных ганглиях, но паттерны их экспрессии различаются (Рисунок 13). В верхней и нижней губе экспрессируются гены *foxg1γ* и *foxg1α*.

Сравнивая экспрессию трех генов *foxxg1* у стерляди (Рисунок 15), можно отметить, что наиболее широкий паттерн экспрессии демонстрирует *foxxg1a*. *Foxxg1a* экспрессируется в конечном мозге, обонятельных мешках, зрительных пузырьках, ушных плакодах и ганглиях черепных нервов.

Паттерн экспрессии *foxxg1b* имеет общие черты с паттерном экспрессии *foxxg1a*; однако, в отличие от *foxxg1a*, *foxxg1b* не экспрессируется в конечном мозге и обонятельных мешках. Экспрессия гена *foxxg1c* обнаруживается только в ушной плакоде.

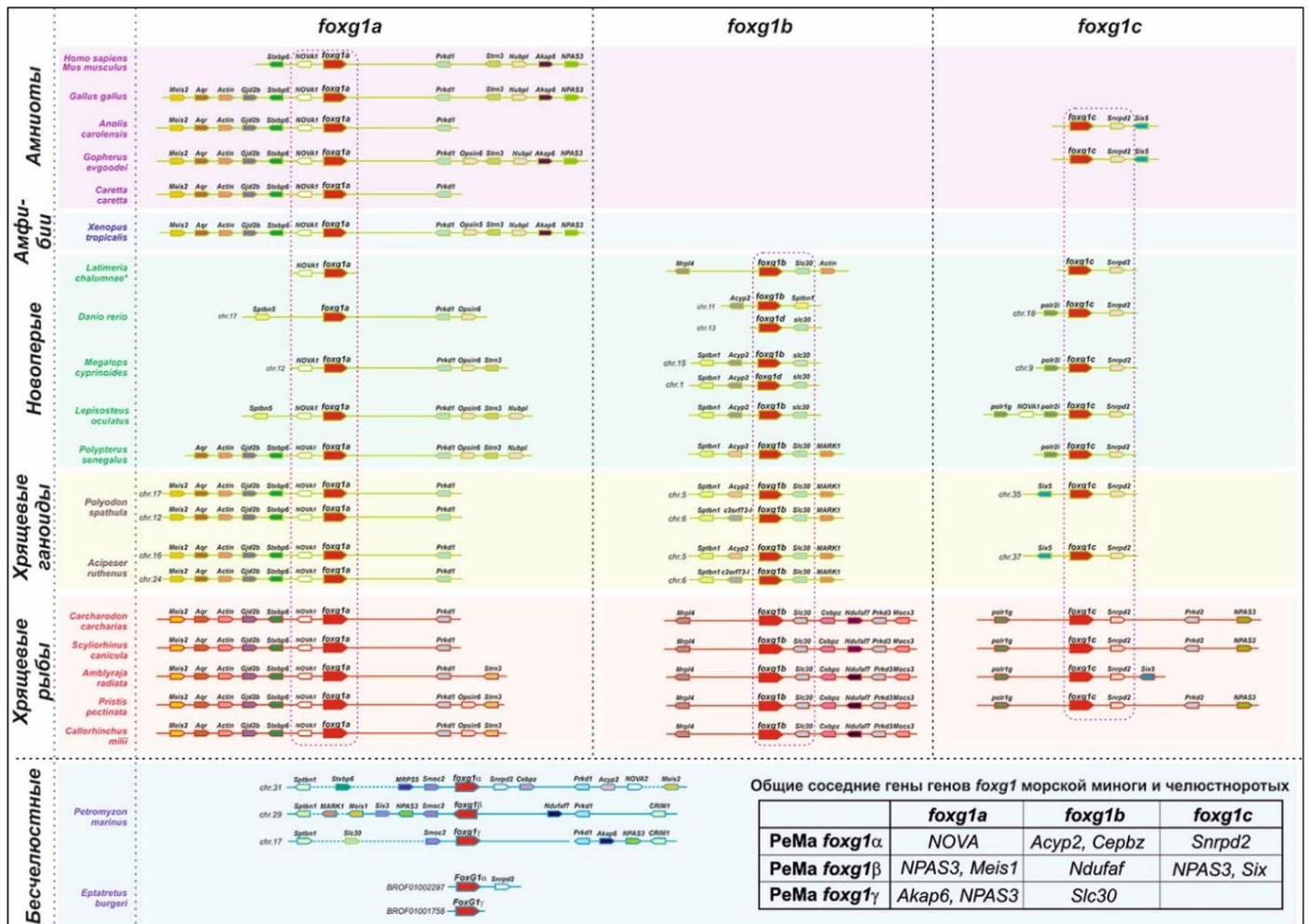


Рисунок 12. Анализ локальной геномной синтении генов *foxxg1* позвоночных.

На основании проведенного анализа особенностей экспрессии можно констатировать, что сравнение характера экспрессии гена *foxxg1* у речной миноги и стерляди не позволяет достоверно установить попарную ортологию с уникальными особенностями экспрессии ортологов, общими для обоих видов.

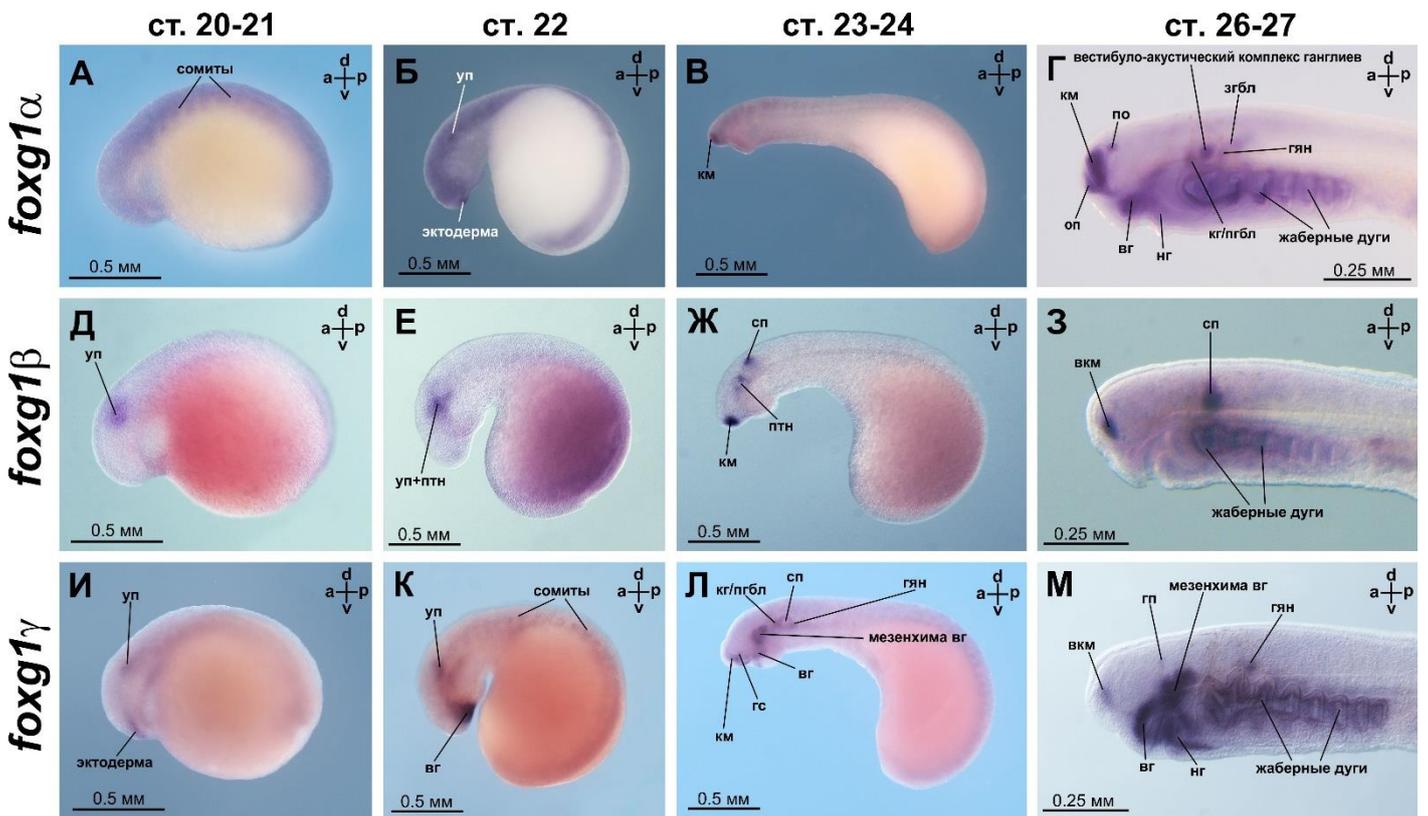


Рисунок 13. Сравнение паттернов экспрессии генов *foxg1* у речной миноги *L. fluviatilis*. Сокращения приведены на Рисунке 12.

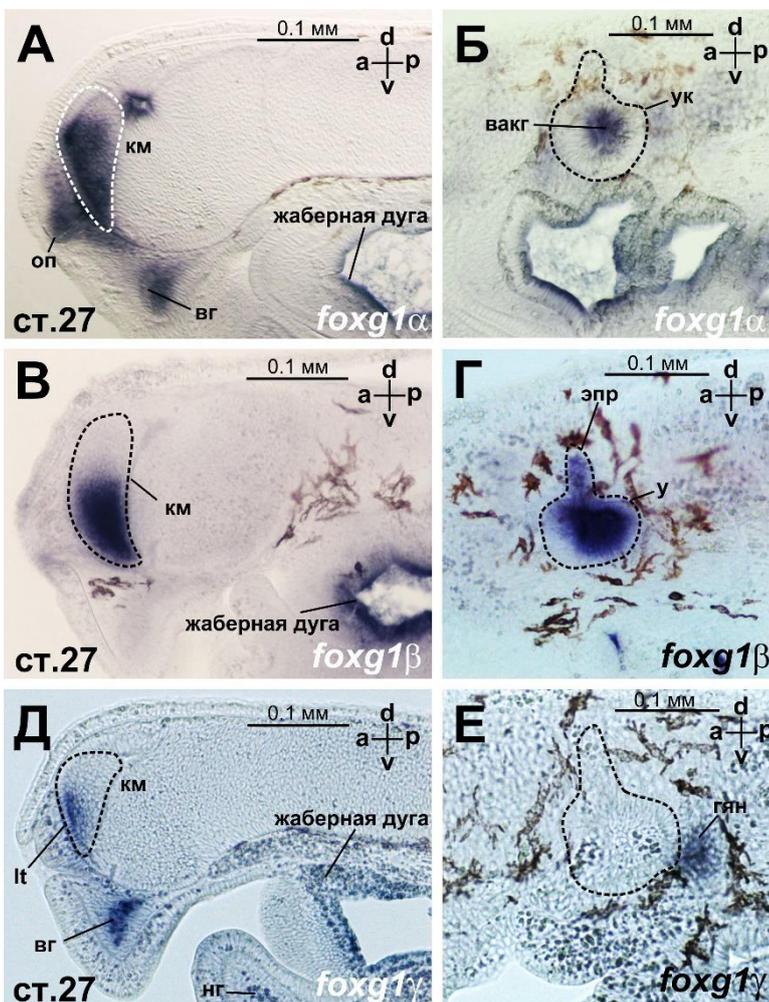


Рисунок 14. Экспрессия генов *foxg* на сагиттальных срезах головной области *L. fluviatilis* на стадии 27. А, Б – экспрессия гена *foxg1 alpha*, В, Г – экспрессия гена *foxg1 beta*, Д, Е – *foxg1 gamma*.

Сокращения: аг – акустический ганглий, вагк – вестибулярно-акустический комплекс ганглиев, вг – верхняя губа, вкм – вентральная область конечного мозга, гп – глазные пузыри, гс – глазные стебельки, гян – ганглий языкоглоточного нерва, згбл – задний ганглий боковой линии, кг/пгбл – коленчатый ганглий/передний ганглий боковой линии, км – конечный мозг, нг – нижняя губа, оп – обонятельная плакода, по – пинеальный орган, птн - плакода тройничного нерва, сп - сплетниевидный ганглий, сп – слуховой пузырек, у – ушные структуры; ук - ушная капсула, уп - ушная плакода, эп - эпибранхиальная плакода, эпр – эндолимфатический проток, lt – lamina terminalis.

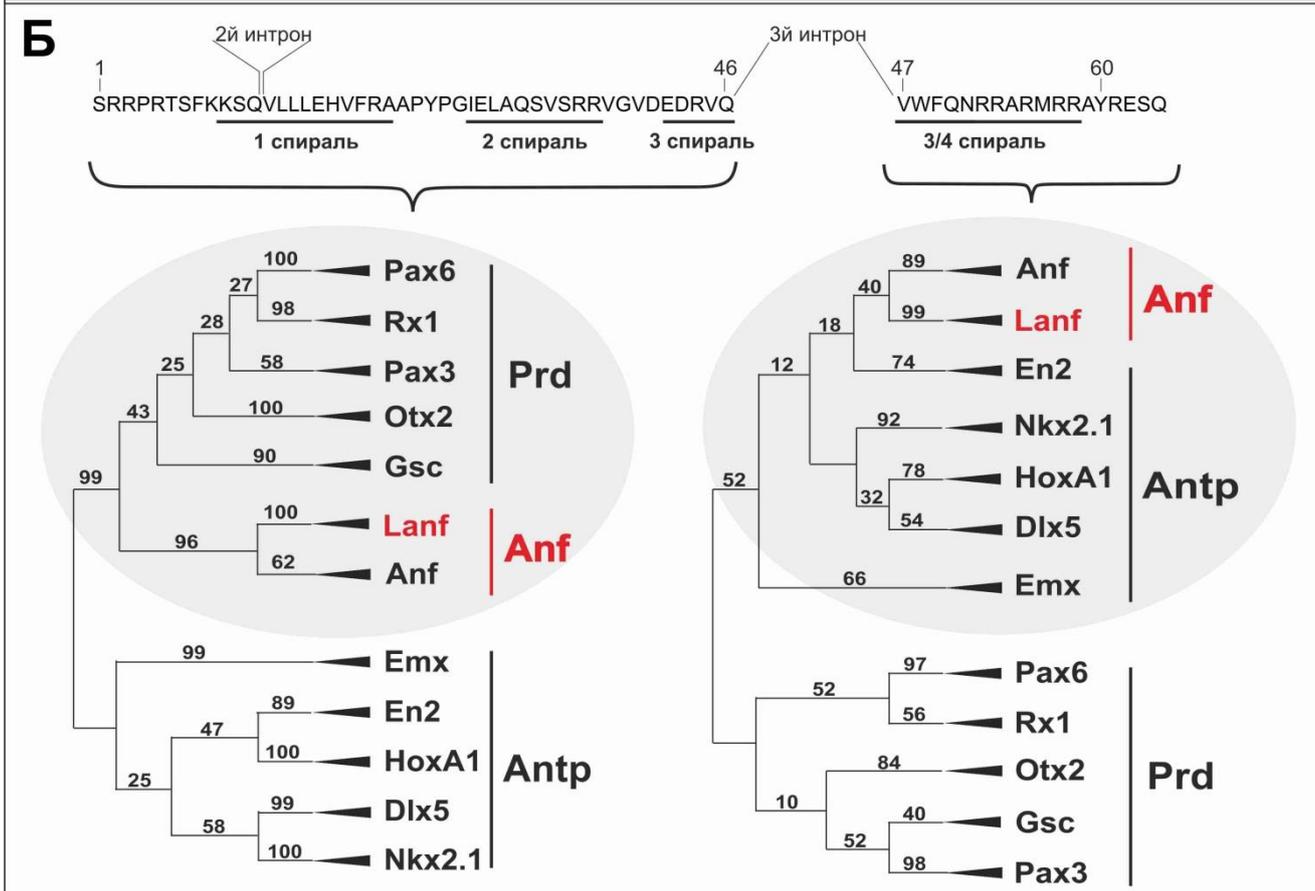
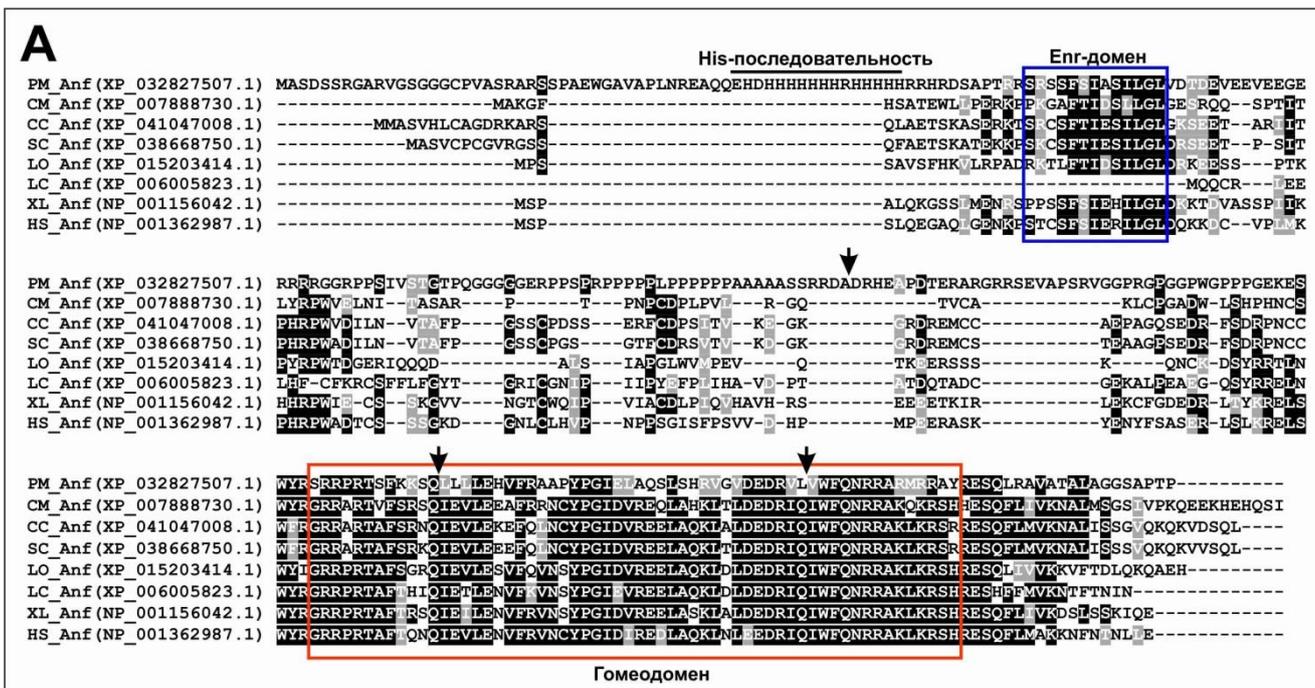


Рисунок 16. А - Анализ аминокислотной последовательности белков Anf представителей разных классов позвоночных; Б - схема филогенетического анализа N- и C-частей гомеодомена Anf с соответствующими участками гомеодоменов классов Antp и Prd. Стрелками показаны границы экзонов.

HS - *Homo sapiens*, CC - *Carcharodon carcharias*, CM - *Callorhynchus milii*, LC - *Latimeria chalumnae*, LO - *Lepisosteus oculatus*, PM - *Petromyzon marinus*, SC - *Scyliorhinus canicula*, XL - *Xenopus laevis*.

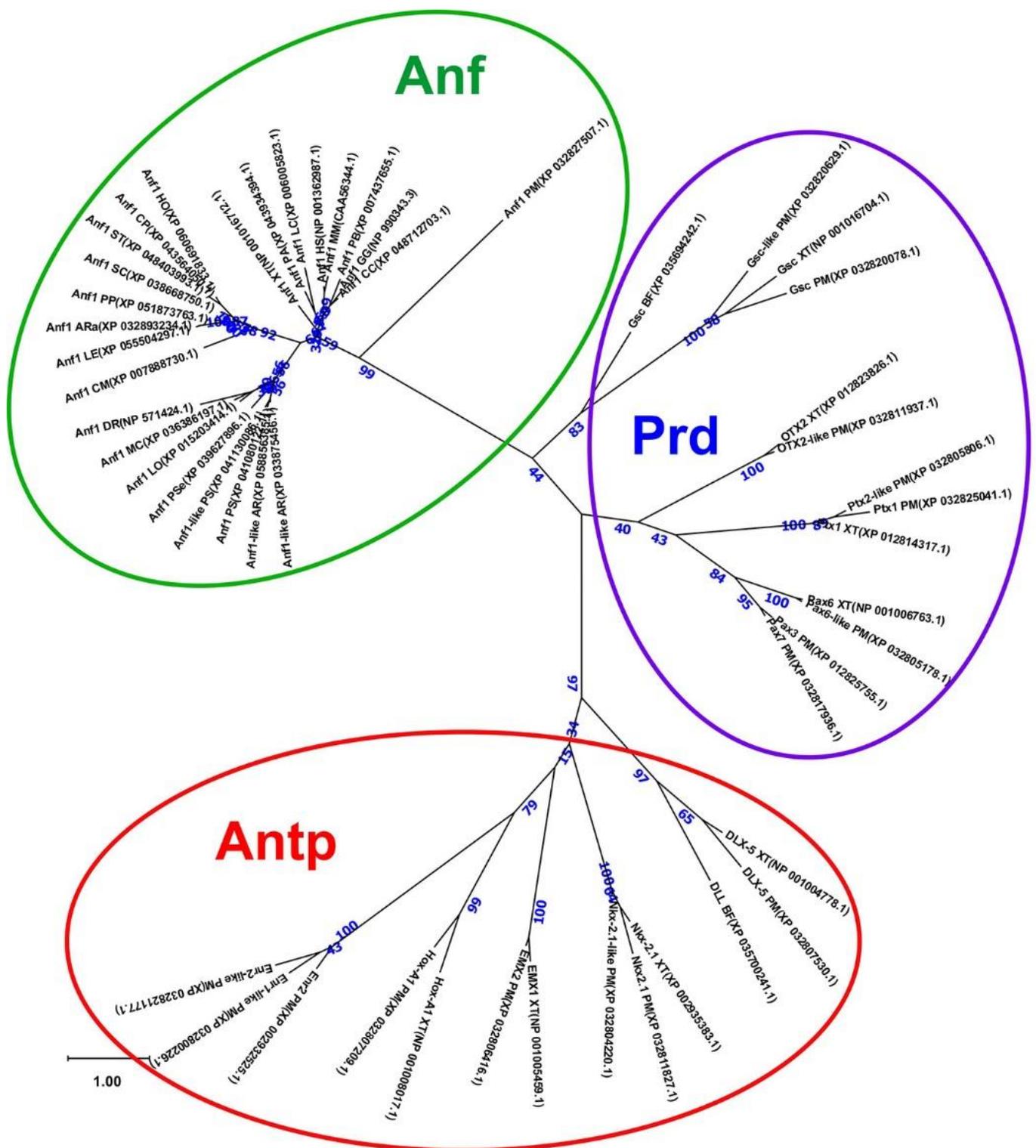


Рисунок 17. Филогенетический анализ последовательностей гомеодоменных белков разных классов.

Экспрессия гена *lanf* (*lamprey anf*) у речной миноги была обнаружена начиная со стадии поздней нейрулы в передней части зачатка головного мозга и в поверхностной эктодерме, покрывающей эту область мозга (Рисунок 18 А, Б). Экспрессия *lanf* в нервной ткани на стадии нейрулы локализуется на территории, соответствующей части переднего

мозга - в области презумптивного конечного мозга и передней части промежуточного мозга, непосредственно над доменом экспрессии *shh*, расположенным в прехордальной мезодерме (Рисунок 18 В). Такой паттерн экспрессии сходен с паттернами экспрессии генов *anf* у других исследованных позвоночных (Kazanskaya et al., 1997, Ermakova et al., 1999, Dattani et al., 1999). В ходе дальнейшего развития, экспрессия гена *lanf* в области презумптивного промежуточного и конечного мозга постепенно снижается, и к стадии 22-23 остается только в ротовой эктодерме и области гипофиза (Рисунок 18 Г).

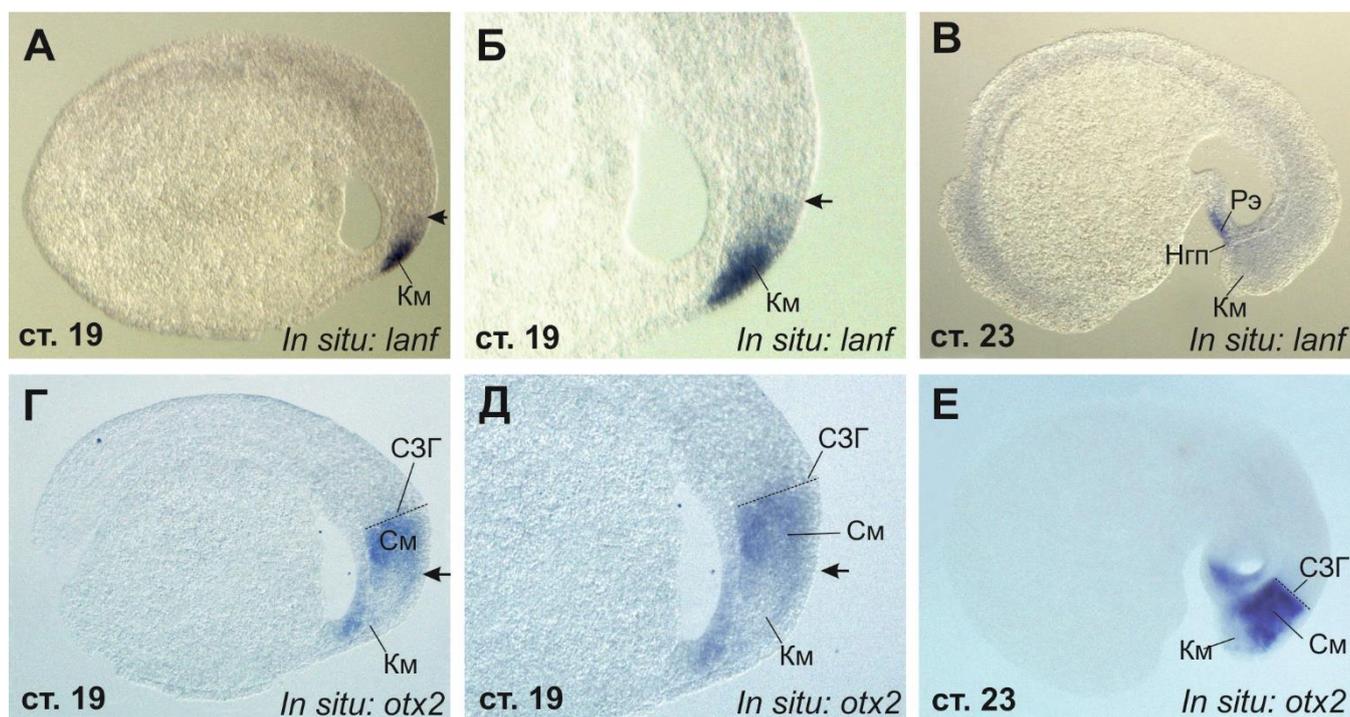


Рисунок 18. Анализ паттерна экспрессии *lanf* на сагиттальных срезах эмбрионов речной миноги и его сравнение с паттерном экспрессии гена *otx2*.

А, Б - На стадии 19 ген *lanf* (А – общий вид, Б – головной отдел крупным планом) экспрессируется в передней нейроэктодерме, в зоне, соответствующей будущей ротовой эктодерме (Рэ) и переднему мозгу (Пм), включая презумптивные конечный мозг и промежуточный мозг. Стрелка показывает дорзальную границу области экспрессии *lanf*. Передняя часть эмбрионов расположена справа, дорзальная - сверху.

В - На стадии 23 экспрессия *lanf* наблюдается только в ротовой эктодерме (Рэ) и назально-гипофизарной плакоде (Нгп).

Г, Д - На тех же стадиях, что приведены для *lanf* на (А, Б), экспрессия *otx2* наблюдается в гораздо более широкой зоне передней эктодермы, роstralной границы среднего и заднего отделов мозга (СЗГ) и в подлежащей мезодерме. Важно, что в наиболее переднем участке нейроэктодермы, как раз в котором экспрессируется *lanf*, экспрессии *otx2* не наблюдается.

Е - На стадии 23 *otx2* продолжает экспрессироваться в переднем регионе, будучи подавлен в наиболее передней его части.

В люциферазном тесте с использованием участка промотора гена *xanf1* (*xenopus anf*), которая является мишенью своему собственному белковому продукту, было показано, что белок Lanf выступает в качестве ингибитора транскрипции.

Путем экспериментального изменения уровня экспрессии *lanf* с помощью инъекций его синтетической мРНК и морфолиновых олигонуклеотидов была исследована способность Lanf модулировать экспрессию генов *otx2* и *foxg1β* у эмбрионов миног.

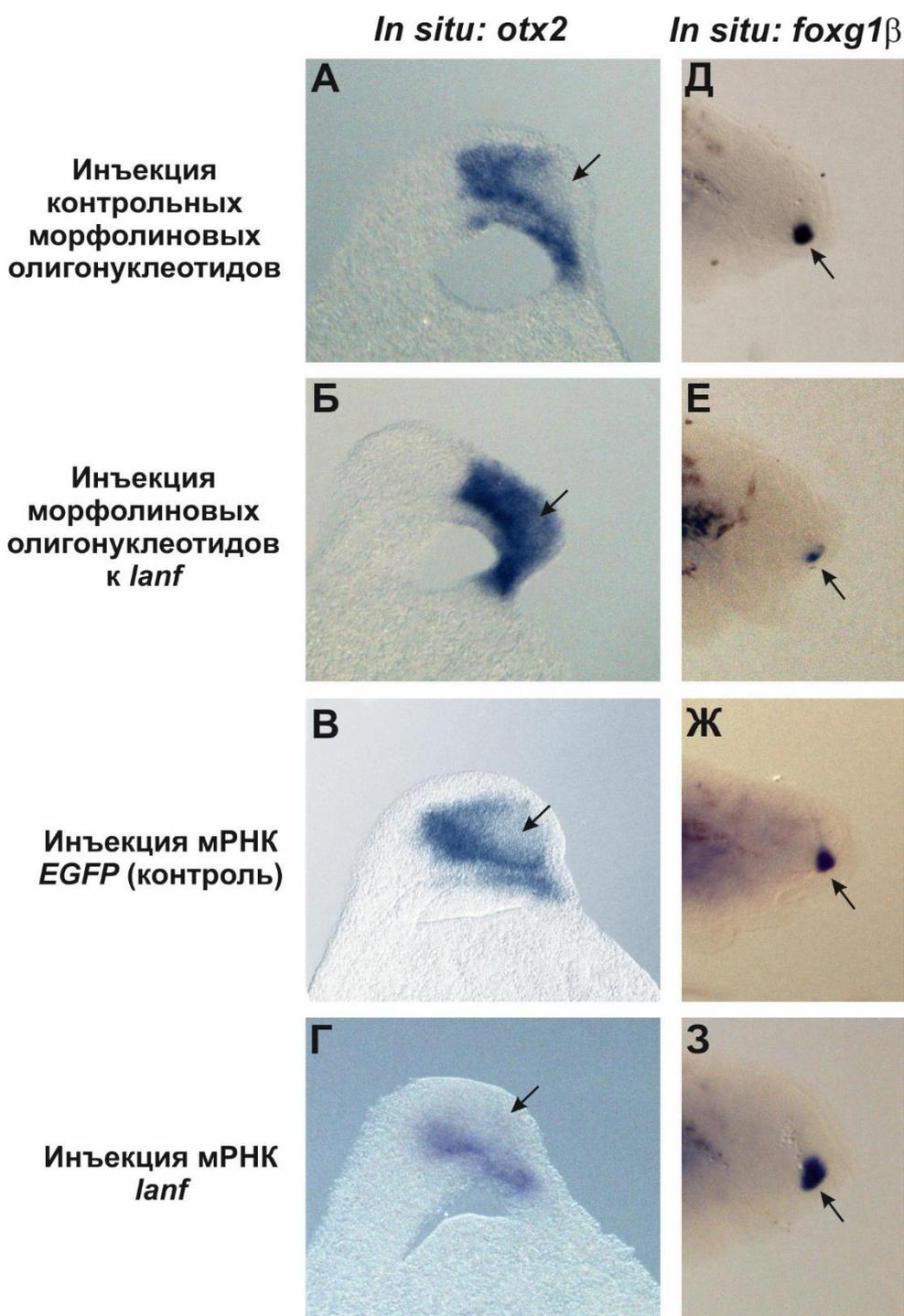


Рисунок 19. Lanf подавляет экспрессию гена *otx2* в передней части нервной пластинки и усиливает экспрессию гена *foxg1β* в этой области.

А – Г - В норме (А), экспрессия гена *otx2* подавляется в передней части нервной пластинки (стрелка), но наблюдается в этой области (стрелка) в случае подавления трансляции гена *lanf* специфическими МО

(Б). Повышение уровня экспрессии *lanf*, напротив, усиливает подавление экспрессии *otx2* по сравнению с контролем (ср. В и Г) Передний конец эмбриона сверху, дорзальная область – слева.

Д – З - Изменения уровня экспрессии гена *lanf* оказывают на экспрессию гена *foxg1β* обратный, по сравнению с *otx2*, эффект. Передний конец эмбриона справа; дорзальная область – сверху.

Было показано, что подавление трансляции эндогенной мРНК *lanf* усиливает экспрессию гена *otx2* (Рисунок 19 А, Б) и, напротив, подавляет экспрессию гена *foxg1b* (Рисунок 19 Д, Е). При инъекциях мРНК *lanf*, напротив, наблюдается подавление экспрессии *otx2* (Рисунок 19 В, Г) и расширение области экспрессии *foxg1β* (Рисунок 19 Ж, З). Полученные данные подтверждают ингибиторное влияние Lanf на экспрессию *otx2* в раннем развитии речной миноги и способность Lanf усиливать экспрессию переднеголовного гена *foxg1β*.

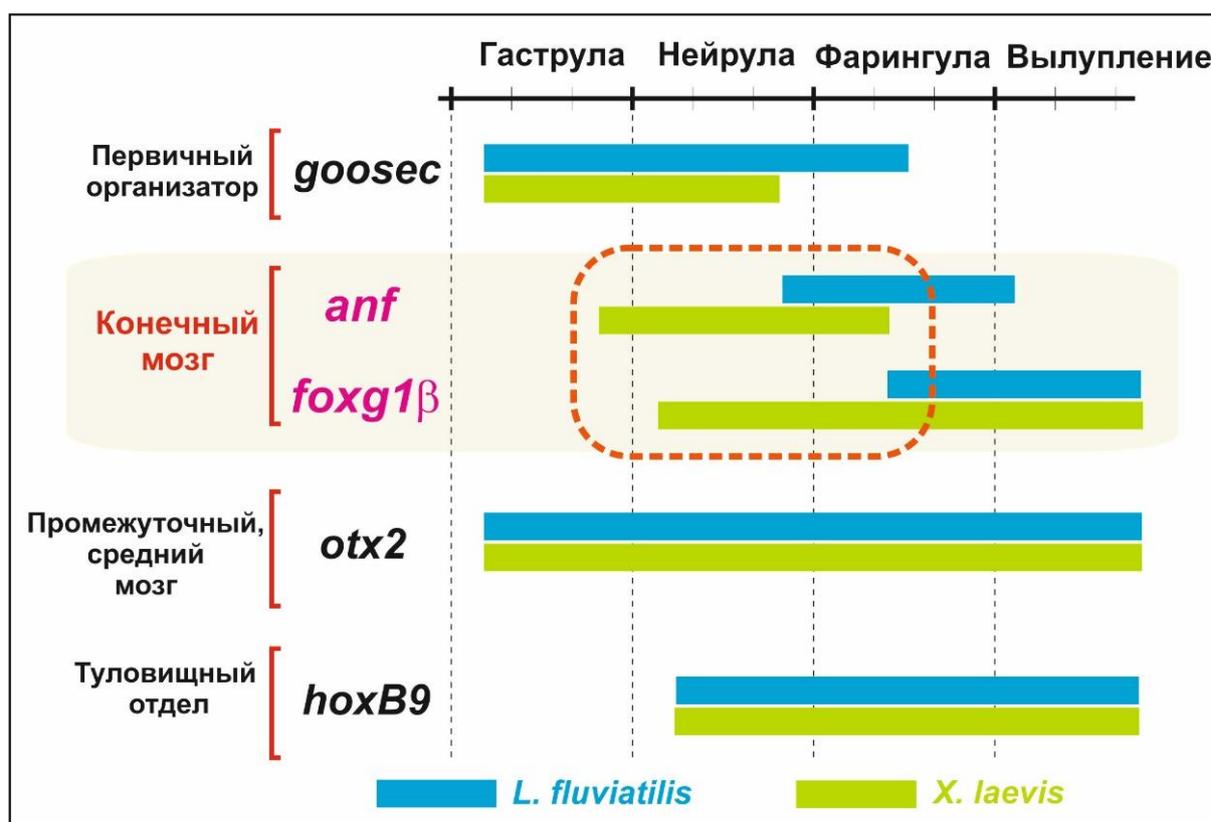


Рисунок 20. Схема проведенного сравнительного анализа динамики экспрессии исследованных генов у речной миноги и шпорцевой лягушки.

В совокупности, полученные результаты говорят о том, что по своим функциональным характеристикам ген *lanf* миног соответствует своим гомологам, описанным у других позвоночных, обладает репрессорными свойствами и, подобно ранее изученным генам *anf* других позвоночных может подавлять экспрессию гена *otx2* и усиливать экспрессию переднеголовного маркера – гена *foxg1β*.

Проведенный анализ экспрессии показал, у речной миноги ген *lanf* начинает активно экспрессироваться со стадии поздней нейрулы, в то время как у шпорцевой лягушки возрастание экспрессии *lanf* наблюдается на сравнительно более ранних стадиях - еще до начала нейруляции. Похожая гетерохрония наблюдается у миноги и в случае гена *foxg1β*. У шпорцевой лягушки единственный ген *foxg1* начинает экспрессироваться уже в конце гастрюляции – начале нейруляции в клетках зачатка конечного мозга, в то время как у миног экспрессия *foxg1β* (паралога *foxg1*, раньше других обнаруживающегося в области переднего мозга) наблюдается в области конечного мозга на стадии головного выроста, т.е. уже после окончания нейруляции. Аналогичной гетерохронии экспрессии генетических маркеров более каудальных областей эмбрионов не наблюдалось (Рисунок 20).

Гены и белки семейства Chordin и их роль в появлении парных конечностей позвоночных

Филогенетический анализ белков семейства Chordin показал, что у представителей большинства групп позвоночных, кроме белка Chordin, есть два Chordin-подобных белка Chordin-like, номенклатура которых была принята согласно Nakayama et al., 2001, 2004. По первичной структуре белки Chordin и Chordin-like различаются в первую очередь количеством и характером расположения цистеин-богатых доменов. Белок Chordin содержит четыре таких домена – один на N-конце и три на C-конце белка, а белки Chordin-Like в основном содержат три цистеин-богатых домена.

Анализ локальной геномной синтении показал, что гены *chordin* и *chordin-like2* являются древними и присутствовали у общих предков бесчелюстных и челюстноротых. Синтения *chordin-like2* и соседнего с ним гена *polD3* прослеживается даже на уровне первично- и вторичноротых (Рисунок 21). В то же время, ген *chordin-like1* появился только у челюстноротых.

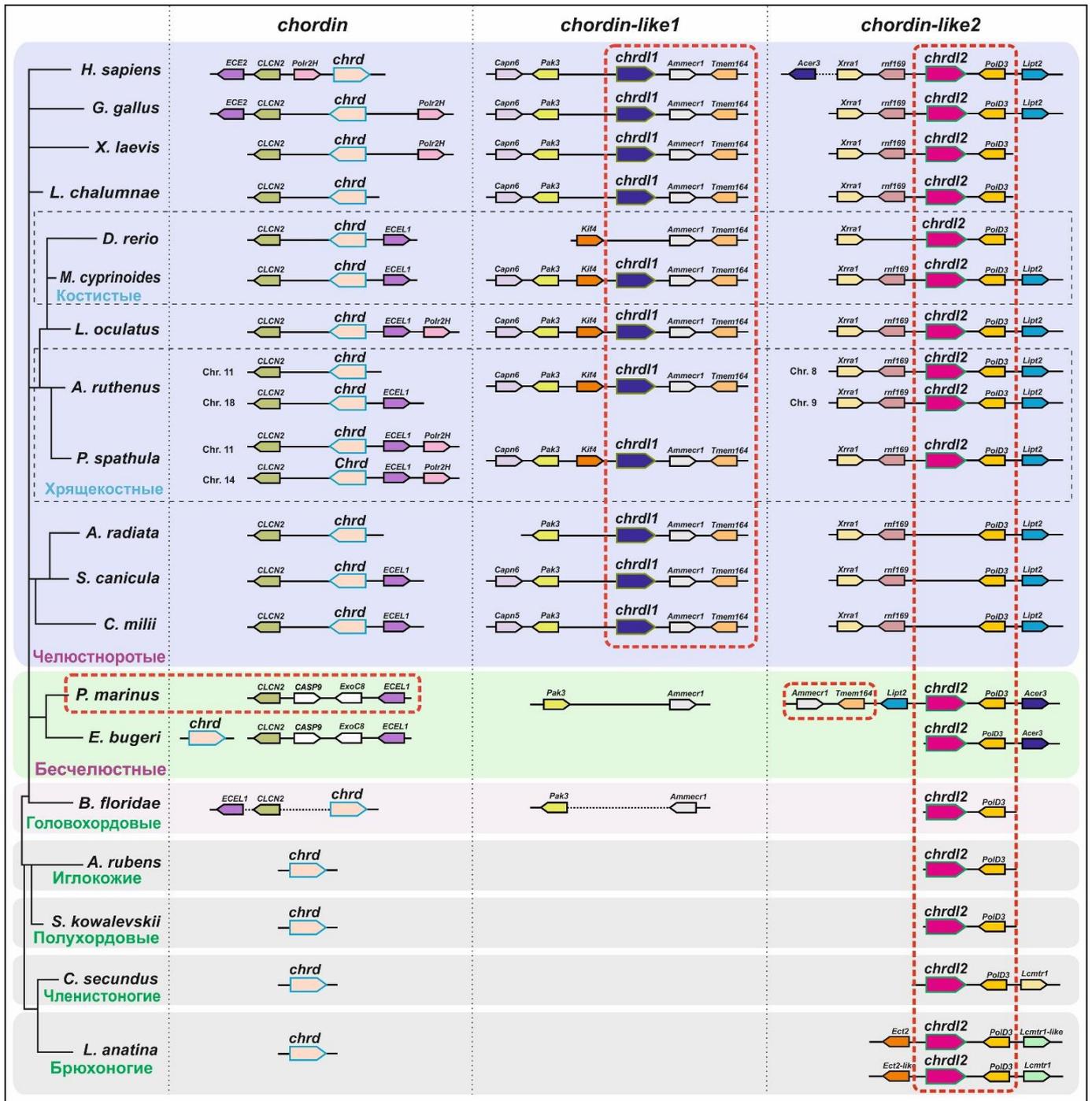


Рисунок 21. Анализ локальной геномной синтении генов семейства *Chordin* позвоночных и представителей некоторых групп беспозвоночных. Ортологи *chordin-like2* обнаружены у представителей разных групп двусторонне симметричных животных. Ген *chordin-like1* обнаружен только у челюстноротых. У миног отсутствует ген *chordin*.

Характер экспрессии нового гена chordin-like1 у представителей эволюционно древних групп челюстноротых указывает на возможную роль этого гена в появлении плавников

Для оценки возможной роли гена *chordin-like1* в появлении отдельных морфологических структур была исследована его активность у представителей групп, в

которых *chordin-like1* и исследуемые морфологические структуры появляются впервые. Наиболее эволюционно древними представителями челюстноротых, доступными для лабораторных исследований в наши дни, являются хрящевые и осетрообразные рыбы.

Проведенный анализ экспрессии *chordin-like1* у эмбрионов серой кошачьей акулы *S. griseum* (Рисунок 22) показал, что его паттерн имеет ярко выраженный локальный характер. Активность *chordin-like1* наблюдается лишь в нескольких структурах эмбриона – жаберных дугах и плавниках, что указывает на возможное сходство механизмов формирования этих структур у акул. Паттерн экспрессии *chordin-like1* в парных и спинных плавниках очень схожий – экспрессия наблюдается в задней части формирующегося плавника, что может свидетельствовать о сходстве механизма формирования парных и непарных плавников у акул. Начало экспрессии *chordin-like1* в спинных и брюшных плавниках наблюдалось еще до их формирования в качестве морфологической структуры, что может свидетельствовать о раннем участии *chordin-like1* в инициации плавниковых зачатков.

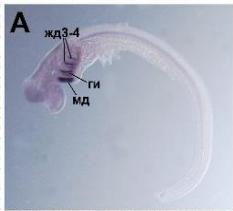
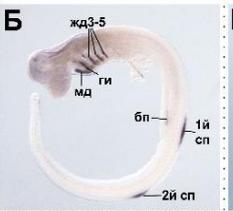
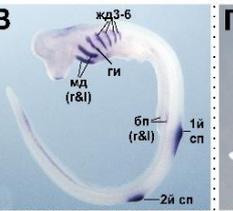
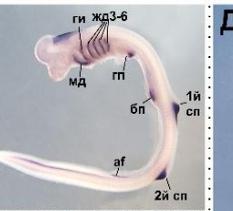
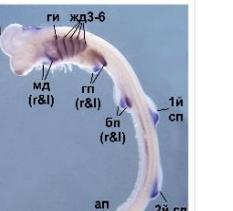
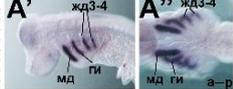
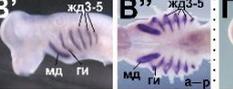
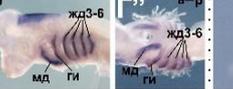
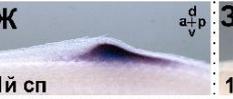
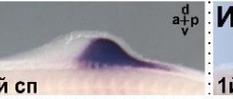
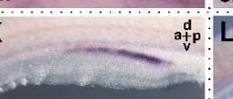
<i>Chiloscyllium griseum</i>	Стадия 24	Стадия 25	Стадия 26	Стадия 27	Стадия 28
Целый зародыш	А 	Б 	В 	Г 	Д 
Жаберные дуги	А'  А'' 	Б'  Б'' 	В'  В'' 	Г' Г''	Д' Д''
1й спинной плавник	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	Е  1й сп	Ж  1й сп	З  1й сп	И  1й сп
2й спинной плавник	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	К  2й сп	Л  2й сп	М  2й сп	Н  2й сп
Грудной плавник	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	О  гп	П  гп	Р  гп
Брюшной плавник	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	С  бп	Т  бп	У  бп	Ф  бп
Анальный плавник	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	Экспрессия <i>Chordin-Like1</i> не обнаружена	Х  ап	Ц  ап

Рисунок 22. Анализ пространственной экспрессии гена *chordin-like1* на ранних стадиях развития серой кошачьей акулы *S. griseum*. Экспрессия *chordin-like1* наблюдается в формирующихся зачатках плавников.

Экспрессия *chordin-like1* в развивающихся плавниках была обнаружена и описана у предличинок стерляди *A. ruthenus* и шпорцевой лягушки *X. laevis* (Рисунок 23 А-3).

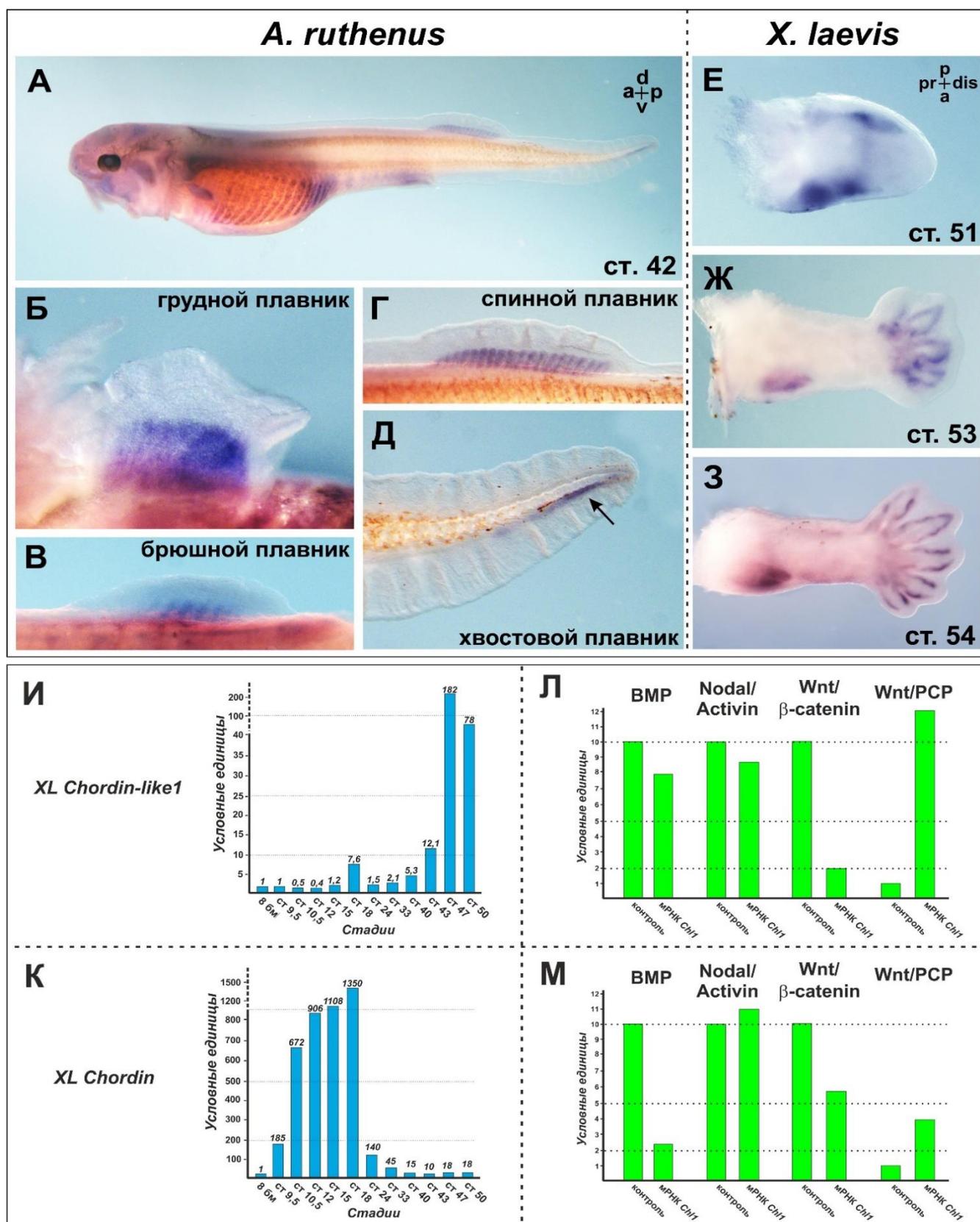


Рисунок 23. Анализ экспрессии гена *chordin-like1* у предличинки стерляди *A. ruthenus* на стадии 42 (А - Д) и шпорцевой лягушки *X. laevis* (Е - З). И, К – динамика экспрессии *chordin-like1* и *chordin* у эмбрионов *X. laevis*. Л, М – Модуляция активности сигнальных каскадов белками Chordin-like1 и Chordin в люциферазных тестах.

В функциональных экспериментах была обнаружена способность белка Chordin-like1 незначительно (по сравнению с Chordin) снижать активность BMP сигнального каскада, а также слабо снижать активность Nodal/Activin каскада. Наиболее выраженный эффект Chordin-like1 наблюдался в отношении Wnt сигнальных каскадов и выражался в ингибировании активности Wnt/beta-catenin каскада и, то же время, активации Wnt/PCP каскад. Эти результаты показывают, что функциональные свойства Chordin-like1 не дублируют в полной мере свойства белка Chordin, который рассматривается в первую очередь как ингибитор BMP сигнального каскада и индуцирует формирование неполных осей у *Xenopus*. Кроме того, динамика экспрессии генов *chordin-like1* и *chordin* в развитии эмбрионов шпорцевой лягушки существенно различается: *chordin* активно экспрессируется на ранних стадиях (гаструла – поздняя нейрула, Рисунок 23 К), в то время как возрастание уровня экспрессии *chordin-like1* наблюдается у головастиков на значительно более поздних стадиях (стадии 43-47, Рисунок 23 И).

Анализ особенностей экспрессии гена chordin-like2 у речной миноги

Ген *chordin-like2* – единственный ген семейства *chordin*, обнаруженный у миног. Достоверная экспрессия *chordin-like2* у речной миноги была обнаружена на стадиях после вылупления в отдельных структурах – глазах, верхней губе, дорсальной части хвостового отдела нервной трубки, жаберных дугах и, наиболее выражено – в эндостиле (Рисунок 24). Эндостиль является частью пищеварительной системы, органом, выделяющим секрет для улавливания пищевых частиц у организмов-фильтраторов. Он присутствует у беспозвоночных хордовых – ланцетников и оболочников, а из позвоночных описан только у личинок миног. В литературе показана гомология эндостиля с щитовидной железой более эволюционно молодых групп позвоночных.

Особенности эмбриональной индукции у миног

Обнаруженное в работе отсутствие у миног одного из ключевых ранних индукторов - гена *chordin* - может указывать на отличия механизмов эмбриональной дифференцировки у миног от описанной модели эмбриональной индукции у челюстноротых. Эти отличия подтверждаются неспособностью генов *noggin* запускать осевую индукцию и вызывать формирование вторичных осей тела у эмбрионов речной миноги. Проводимые в течение трех лет эксперименты показали отсутствие способности мРНК *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* индуцировать вторичные оси тела у эмбрионов миног (Рисунок 25 А, А'), при том, что у

эмбрионов *X. laevis* эти мРНК вторичные оси индуцировали (Рисунок 6). Аналогичное отсутствие дополнительных осей у миног наблюдалось при инъекции мРНК *noggin1* и *noggin2* шпорцевой лягушки, а также мРНК генов *chordin* и *cerberus*, описанных у шпорцевой лягушки в качестве эмбриональных индукторов.

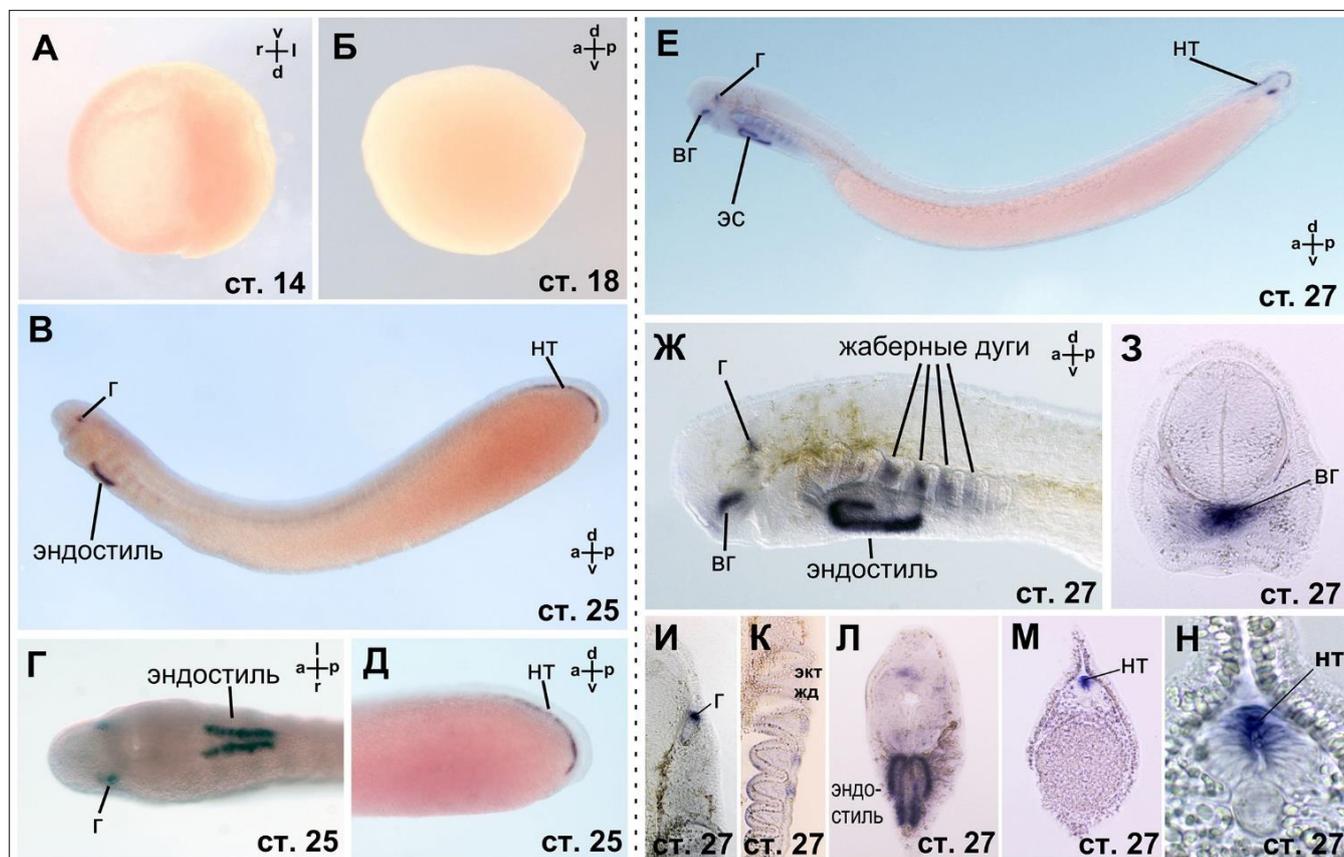


Рисунок 24. Пространственная экспрессия гена *chordin-like2* у речной миноги

У речной миноги индукция вторичных осей тела с частотой, достоверно превышающей контрольные эксперименты, наблюдалась только при инъекции мРНК гена *wnt8a* (Рисунок 25 Б – В). Методом иммуноблоттинга было показано, что отсутствие осевой индукции у миног не связано с деградацией инъекционной мРНК (Рисунок 25 Г).

Полученные данные по фосфорилированию молекул Smad1/5 в эмбрионах миног показывают, что основная внутриклеточная часть механизма осевой индукции на уровне подавления фосфорилирования Smad1/5 (то есть активности BMP сигнального каскада) у миног может быть сходна с челюстноротыми (Рисунок 25 Д). Отсутствие детектируемой экспрессии BMP у речной миноги на стадии гастрюлы методом гибридизации *in situ* может быть связано с малым абсолютным количеством мРНК BMP в эмбрионах на ранних стадиях и недостаточной чувствительностью метода гибридизации *in situ* (Рисунок 25 Е). В то же время, в сочетании с отсутствием у миног важного нейтрального индуктора, гена

chordin (Рисунок 21), полученные функциональные данные позволяют предположить, что как механизм активации фосфорилирования Smad1/5 на стадии гастрюлы, так и механизм его последующего подавления в области нервной пластинки у миног могут отличаться от механизма, описанного у амфибий.

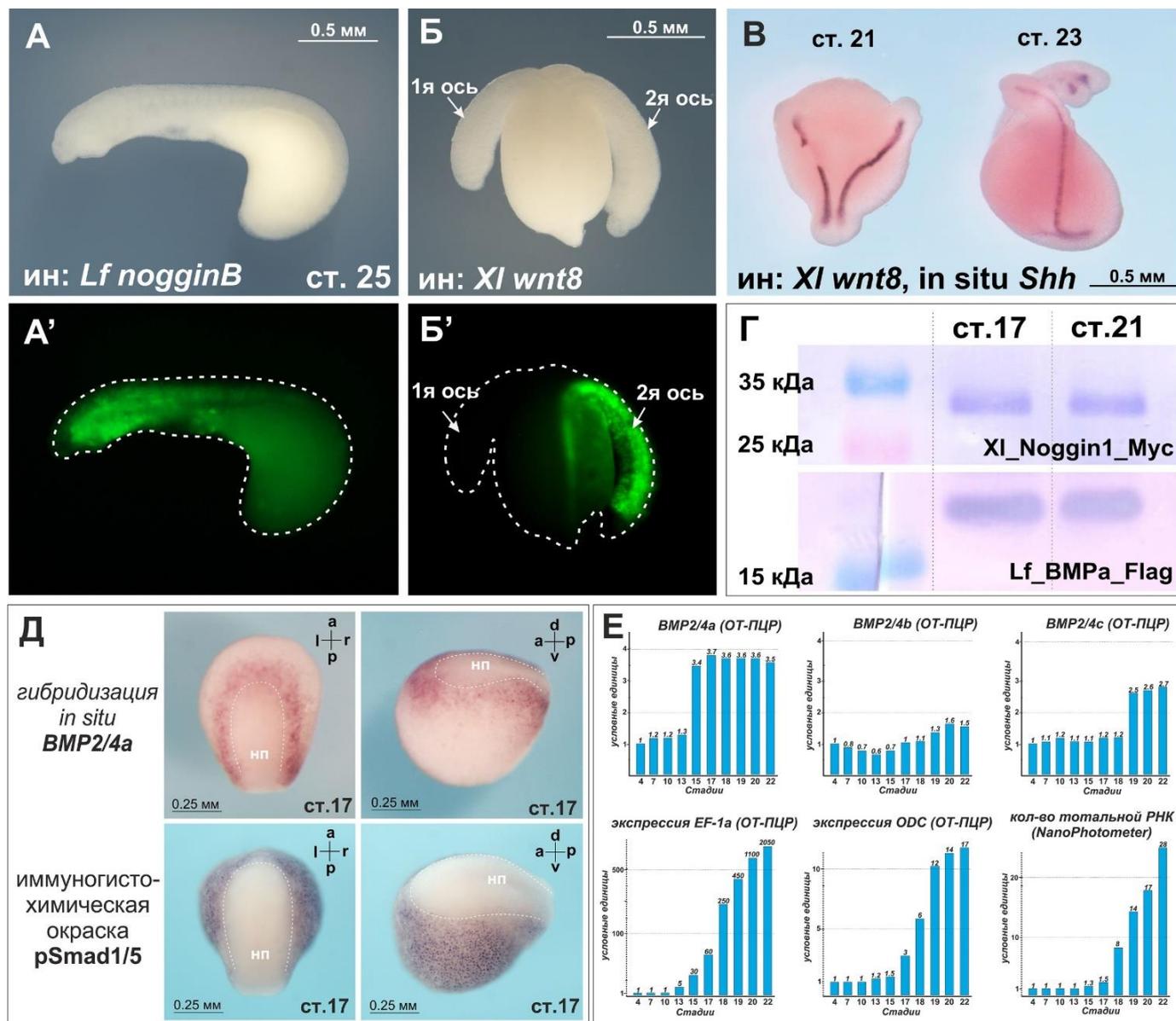


Рисунок 25. Особенности нейральной индукции у миног на примере *L. fluviatilis*.

А, А' - Инъекции мРНК *nogginB* не индуцируют вторичные оси у *L. fluviatilis*.

Б, Б' – Инъекции мРНК *wnt8a* амфибии индуцируют вторичные оси у *L. fluviatilis*.

В – Выявление вторичных осей у эмбрионов *L. fluviatilis* с помощью гибридазации *in situ* мРНК *sonic hedgehog* (*shh*).

Г – белки, транскрибуемые с инъекцированных мРНК *Xl_noggin1-Myc* и *Lf_BMPa-Flag*, выявляются у эмбрионов миноги на 17 и 21 стадиях.

Д – Экспрессия *BMP2/4a*, выявленная методом гибридазации *in situ* и окрашивание антителами к фосфорилированным молекулам Smad1/5 у эмбрионов *L. fluviatilis*. нп-нейральная пластинка

Е - Динамика экспрессии генов *BMP* у *L. fluviatilis* методом ОТ-ПЦР и оценка общего количества мРНК в эмбрионах *L. fluviatilis* на ранних стадиях развития.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Консерватизм паттернов экспрессии и функциональных свойств генов *noggin* у речной миноги и шпорцевой лягушки

До недавнего времени считалось, что у позвоночных есть только один ген *noggin* (*noggin1*). В настоящей работе описаны новые гены семейства *Noggin* у представителей разных эволюционных линий позвоночных – бесчелюстных и челюстноротых. Исследована филогения, локальная геномная синтения, особенности экспрессии и функциональные свойства генов семейства *Noggin*. Детальные функциональные исследования проведены на амфибиях, как наиболее удобном в техническом плане, лабораторном объекте.

С целью выявления попарной ортологии проведен сравнительный анализ экспрессии генов семейства *Noggin* у миног и амфибий.

Исследование генов семейства *Noggin* у челюстноротых показали, что три паралога *noggin*, обнаруженные в этой группе, *noggin1*, *noggin2* и *noggin4*, различаются по характеру экспрессии и функциональным свойствам. В отличие от *noggin1*, экспрессия впервые описанного гена *noggin2 X. laevis* начинается на стадии ранней нейрулы, в полоске клеток на переднем крае нервной пластинки, где область экспрессии *noggin2* частично накладывается на область экспрессии *noggin1*. В отличие от *noggin1*, экспрессия *noggin2* не была обнаружена в хорде. Особенностью экспрессии *noggin4* является диффузный паттерн.

Обнаруженные гены *noggin* миног имеют много общих черт с экспрессией генов *noggin* шпорцевой лягушки и гомологами у других групп позвоночных. Ген *nogginA* речной миноги начинает экспрессироваться на сравнительно более поздних стадиях, чем *noggin1* у шпорцевой лягушки, и экспрессия обнаруживается в хорде мезодерме, а затем в сомитах и головных структурах, включая производные нервного гребня. Ген *nogginB* речной миноги, подобно гену *noggin2 X. laevis*, впервые обнаруживается на ранней стадии нейрулы в передней части нервной трубки и впоследствии экспрессируется в клетках конечного мозга и нервного гребня, но не в хорде. Ген *nogginC* имеет общие черты экспрессии как с *nogginA* (экспрессия в мезодермальных производных), так и с *nogginB* (экспрессия в клетках конечного мозга и нервного гребня). Ген *nogginD*, подобно *noggin4*, имеет диффузный паттерн экспрессии, наблюдаемый с начала стадии нейрулы в нервной пластинке и позже во всей нервной системе.

Сходства генов *noggin* миног и челюстноротых обнаруживаются и на функциональном уровне. Эктопическая экспрессия *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* у эмбрионов *X. laevis* индуцирует формирование дополнительных полных осей тела, включающих передний мозг с глазами.

Способность индуцировать в составе осей переднеголовые структуры указывает на способность белков Noggin миног подавлять активность не только BMP, но и других регуляторных внутриклеточных сигнальных каскадов, в частности Nodal/Activin и Wnt.

Ген *nogginD* миног, подобно гену *noggin4*, не обнаружил способность индуцировать вторичные оси тела у эмбрионов амфибий.

Обнаруженный функциональный консерватизм указывает на участие генов *noggin* в механизмах, регулирующих раннее развитие сходных морфологических структур как у бесчелюстных, так и у челюстноротых. Подобное сходство позволяет предположить, что эти механизмы могли возникнуть до расхождения эволюционных линий бесчелюстных и челюстноротых и они, возможно, являются частью базовой регуляторной сети, сформировавшейся у предков позвоночных и сыгравшей важную роль в развитии особенностей плана строения тела у всех позвоночных.

В этом контексте чрезвычайно интересной выглядит экспрессия генов *nogginB* миноги и *noggin2* шпорцевой лягушки в такой уникальной структуре позвоночных, как зачаток конечного мозга. По результатам проведенного филогенетического анализа, появление генов *nogginB/noggin2* произошло у позвоночных, вероятно, в результате имевших место геномных дупликаций. Можно предположить, что появление генов *nogginB/noggin2* на ранних этапах эволюции позвоночных, могло быть одной из необходимых предпосылок возникновения у них конечного мозга.

У хрящевых рыб обнаружена уникальная для позвоночных редукция гена *noggin1*, описанного в качестве одного из ключевых регуляторов ранней дифференцировки у амфибий. Это отсутствие *noggin1* у большинства исследованных акул и скатов, вторично, поскольку у базальной группы хрящевых рыб – Цельноголовых - присутствуют все три паралога *noggin*, описанные у других челюстноротых – *noggin1*, *noggin2* и *noggin4*.

Исследованные у серой кошачьей акулы *C. griseum* паттерны экспрессии *noggin2* и *noggin4* оказались сходны с паттернами ортологов этих генов у других позвоночных. Функциональные свойства генов *Noggin C. griseum* также соответствуют описанным ранее свойствам их гомологов других челюстноротых. Согласно литературным данным, на

представителях разных классов позвоночных показано участие регуляторной петли BMP/Noggin в формировании костно-хрящевого скелета у позвоночных. В связи с этим выдвинута гипотеза о связи появления и закрепления в эволюции Пластиножаберных их уникального хрящевого скелета, появившегося вторично, со сдвигом регуляторного баланса BMP/Noggin в этой группе при исчезновении гена *noggin1*.

Белки Noggin1 и Noggin2 - ингибиторы Nodal/Activin и Wnt сигнальных каскадов

В качестве основной функции «классического» Noggin1 в литературе традиционно рассматривалось ингибирование активности BMP сигнального каскада, что и определяет индукционные свойства белка Noggin. В настоящей работе показано, что белки Noggin1 и Noggin2 обладают способностью модулировать активность, не только BMP, но и Nodal/Activin и Wnt сигнальных каскадов. Ингибиторная активность Noggin в отношении Nodal/Activin и Wnt каскадов менее выражена, чем у других описанных ингибиторов – Follistatin и Cerberus и ранее не была обнаружена в экспериментах с мРНК *noggin1* дикого типа, которая содержит ингибиторную последовательность в 5'-нетранслируемой области, снижающей уровень трансляции белка приблизительно в 200 раз. В низких концентрациях ингибиторная активность в отношении BMP каскада является для Noggin доминирующей.

В настоящей работе впервые показано, что Noggin2, экспрессируясь на переднем крае нервной пластинки, выступает в роли ингибитора ActivinB в этой области, обеспечивая нормальное развитие переднеголовных структур.

Исследования белка Noggin4 показали, что он может выступать в качестве антагониста канонического Wnt/ β -catenin сигнального каскада и напрямую связывать молекулы белка Wnt8. Также было показано, что нарушения нормальной экспрессии *noggin4* приводят к активации Wnt/PCP сигнального каскада. Суммарные данные о влиянии белков Noggin на активность исследованных внутриклеточных сигнальных каскадов представлена на Рисунке 26.

Кроме вовлеченности в процессы нормального развития, показано возрастание уровня экспрессии *noggin4* при регенерации как у миног, так и у амфибий. В экспериментах с трансгенными линиями шпорцевой лягушки показана способность Noggin4 активировать регенерационные процессы у головастика шпорцевой лягушки на стадиях, на которых в норме способность к регенерации утрачивается.

Исходя из того, что у ближайших родственников позвоночных - беспозвоночных хордовых (бесчерепных и оболочников) и полухордовых - был обнаружен один ген *noggin*, была выдвинута гипотеза о появлении множественных паралогов *noggin* позвоночных от единого предкового гена в результате как минимум двух раундов геномных дупликаций на ранних этапах эволюции группы. Монофилия генов *noggin* позвоночных подтверждается присутствием в окрестностях всех паралогов *noggin* гена *ankfn* и ряда других общих соседних генов (Рисунок 27).

Множественные паралоги переднеголового гена *foxg1* у современных представителей эволюционно древних групп позвоночных

В настоящей работе впервые описано наличие трех паралогов *foxg1* у миног, как представителей бесчелюстных. Проведен анализ экспрессии генов *foxg1* у речной миноги. Также впервые описана экспрессия трех генов *foxg1* у стерляди, как представителя осетровых рыб - одной из древнейших групп челюстноротых, доступных для исследований в наши дни.

Выявленные особенности первичных аминокислотных последовательностей, локальной геномной синтении и экспрессионных паттернов свидетельствуют об общности происхождения и родстве генов *foxg1* у всех позвоночных, однако не позволяют достоверно вывить пары ортологов в линиях бесчелюстных и челюстноротых.

Филогения паралогов *foxg1* осетрообразных соответствует предложенной в литературе модели предковой геномной дупликации с последующей асинхронной редиплоидизацией, а дупликация генов *foxg1b* до разделения линий *Polyodon* и *Acipenser* подтверждает геномную дупликацию, произошедшую на уровне общего предка осетрообразных.

Появление на ранних этапах эволюции позвоночных трех паралогов важного регуляторного переднеголового гена *foxg1* могло стать одним из триггеров развития у них переднего мозга и, в частности, появления уникального конечного мозга, отсутствующего у бесчерепных и оболочников. После дупликации отдельные копии генов могли получить возможность выйти из-под давления естественного отбора и приобрести ряд новых функций (неофункционализация), что могло поспособствовать формированию эволюционно новых переднеголовных структур и сенсорных систем. В то же время, исходя из анализа паттернов экспрессии видно, что для генов *foxg1* характерна

субфункционализация, в результате которой наиболее широкий паттерн (и, вероятно, функциональную роль) у челюстноротых демонстрирует ген *foxgla*, сохранившийся у более эволюционно молодых групп наземных позвоночных. Возможно, в ходе эволюции, после того как основные механизмы развития переднеголовных структур сформировались, большинство функций стал выполнять ген *foxgla*, а гены *foxglb* и *foxglc* могли демонстрировать тенденцию к исчезновению.

Обнаружение гена *anf* у миног подтверждает гипотезу о роли появления *anf* в возникновении конечного мозга у позвоночных

Гомеобоксные гены класса *Anf/Hesx1* (далее *Anf*) являются одними из ключевых регуляторов ранней дифференцировки переднего мозга позвоночных. В ходе предыдущих работ была выдвинута гипотеза о том, что репрессорная активность *Anf* в передней части зачатка центральной нервной системы у предков позвоночных обеспечила образование в этом регионе особой зоны, клетки которой оказались свободны от инструктирующего влияния генов, определяющих судьбу более задних регионов нервной системы. В результате эта передняя зона нейрального зачатка, экспрессирующая *Anf*, получила свободу эволюционировать в новом направлении, что и привело, в конце концов, к образованию переднего мозга. Эта гипотеза получила важное подтверждение в результате обнаружения гомологов *anf* у трех видов миног *L. camtschaticum*, *L. fluviatilis* и *P. marinus* описанного в настоящей работе.

Проведенные функциональные исследования показали, что ген *anf* миног по своим свойствам сходен с генами *anf* челюстноротых, обладает ингибиторной активностью, подавляя экспрессию гена *otx* и усиливая экспрессию ключевого регулятора развития конечного мозга – гена *foxg1*. Это подтверждает выдвинутую гипотезу о том, что появление генов класса *Anf* было существенным, если не ключевым, фактором в возникновении у позвоночных структур конечного мозга (Рисунок 28).

На основе анализа последовательностей гомеодомена *Anf* и представителей других классов гомеодоменных белков – Prd и Antp была выдвинута гипотеза гибридного происхождения гена *anf* путем совмещения экзонов гомеобоксных генов разных классов.

Обнаруженная в работе гетерохрония экспрессии переднеголовных генов *anf* и *foxglβ* у миног соответствует гипотезе о том, что этот отдел мозга, являясь наиболее эволюционно

молодым отделом центральной нервной системы, мог появиться у предков позвоночных в качестве надстройки на поздних стадиях их эмбрионального развития.

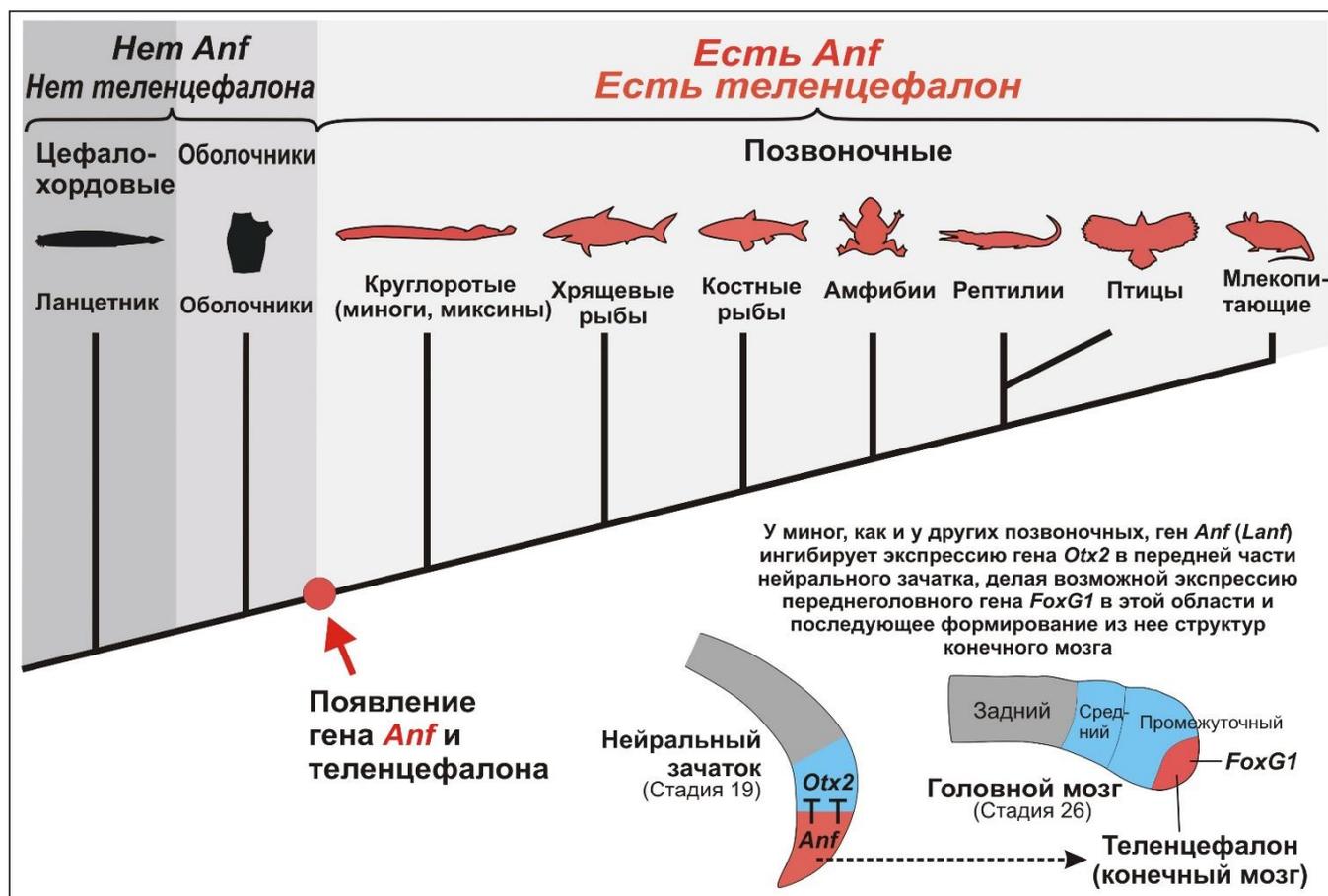


Рисунок 28. Появление гена *anf* в эволюции позвоночных соответствует возникновению у них структур конечного мозга.

Появление гена *chordin-like1* могло стать важным фактором возникновения парных плавников и челюстного аппарата челюстноротых

Как показал анализ филогении и локальной геномной синении, ген *chordin-like1* впервые появился в эволюции у челюстноротых, вероятно, в результате дупликации эволюционно древнего гена *chordin-like2*, что подтверждается наличием в окрестности обоих генов общих соседей - генов *ammecr1* и *tmem164*.

Было выявлено, что *chordin-like1* экспрессируется в плавниках и формирующихся жаберных дугах серой кошачьей акулы, плавниках у стерляди и конечностях амфибий. Это может указывать на сходство механизмов формирования этих структур и служить свидетельством в пользу гипотезы появления парных плавников на основе механизмов, сложившихся при возникновении эволюционно более древних непарных плавников.

Тот факт, что экспрессия *chordin-like1* в плавниках акул начинается в плавниках на самых ранних стадиях их индукции, еще до того, как зачаток плавника морфологически формируется, позволяет предположить, что появление этого гена могло сыграть важную роль в закладке и развитии парных конечностей у челюстноротых.

Функционально *chordin-like1* обладает способностью модулировать активность сигнальных каскадов Wnt, участие которых в развитии зачатков конечностей описано в литературе.

Молекулярный механизм ранней осевой дифференцировки у миног может отличаться от амфибий

В результате инъекций мРНК генов миног *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* в эмбрионы речной миноги был получен неожиданный результат по отсутствию индукции вторичных осей тела у эмбрионов, что отличается от результатов получаемых на эмбрионах амфибий. В сочетании с отсутствием в доступных геномных базах данных миног гомологов генов *chordin* и *cerberus*, описанных в качестве ранних факторов нейральной индукции и осевой дифференцировки у челюстноротых, полученные данные свидетельствуют о возможных фундаментальных различиях механизмов нейральной индукции и закладки осевых структур у миног и челюстноротых, что планируется исследовать в дальнейшем. Единственным геном семейства *Chordin* у миног является ген *chordin-like2*, экспрессирующийся в эндостиле на стадиях, значительно более поздних, чем стадии осевой дифференцировки. При этом, на стадии гаструлы у миног наблюдается фосфорилирование Smad5/8, свидетельствующее об активации BMP сигнального каскада, а на стадии нейрулы ингибирование этого фосфорилирования в области нервной пластинки. В совокупности полученные данные свидетельствуют о возможных отличиях ранних этапов эмбриональной индукции у миног от классической модели нейральной индукции, разработанной преимущественно на эмбрионах амфибий. Исследования особенностей молекулярного механизма эмбриональной индукции у миног и выявление факторов, играющих роль ключевых индукторов, могут стать предметом последующих работ.

ВЫВОДЫ

1. Разработана уникальная для нашей страны методика содержания и систематического получения в лабораторных условиях живых эмбрионов речной миноги *L. fluviatilis*, как представителя эволюционно древней линии позвоночных - бесчелюстных.
2. Проведена оптимизация комплекса лабораторных методов для работы с филогенетически важными, в силу своего архаизма, немодельными объектами – эмбрионами миног, хрящевых рыб и осетрообразных.
3. Описаны новые гены семейства *Noggin* у позвоночных, их функциональные свойства исследованы у представителей нескольких филогенетических линий: миног (как представителей бесчелюстных), хрящевых рыб и наземных позвоночных (амфибий и птиц).
4. Показана роль новых генов *noggin2* и *noggin4* в формировании переднеголовных структур челюстноротых и регуляции активности внутриклеточных сигнальных каскадов BMP, Nodal/Activin и Wnt.
5. Обнаружена редукция (мутагенез, псевдогенизация и полная делеция) одного из ключевых нейтральных индукторов – гена *noggin1* у хрящевых рыб, что является уникальной ситуацией для позвоночных.
6. Показана активация генов семейства *Noggin* при регенерации у миног и амфибий, а также способность белка *Noggin4* активировать регенерационные процессы у головастиков шпорцевой лягушки на стадиях, на которых в норме способность к регенерации утрачивается.
7. Описано наличие и исследованы особенности экспрессии множественных паралогов одного из ключевых регуляторов развития переднеголовных структур позвоночных - гена *foxg1* - у современных представителей эволюционно древних групп позвоночных: миног и осетрообразных.
8. Обнаружен и описан ген *anf* у миног, показана эволюционная корреляция и подтверждена гипотеза о функциональной связи появления генов класса *Anf* с возникновением конечного мозга у позвоночных.

9. Исследована филогения регуляторных генов семейства *Chordin* у позвоночных, показано, что ген *chordin-like2* является древним геном двустороннесимметричных животных, а ген *chordin-like1* впервые появляется только у челюстноротых.
10. Изучен характер экспрессии и функциональные свойства гена *chordin-like1* у современных представителей филогенетически древних линий челюстноротых: пластиножаберных, осетрообразных, амфибий. Показана эволюционная корреляция появления гена *chordin-like1* с формированием парных конечностей челюстноротых.
11. Отмечены особенности механизма осевой дифференцировки у миног в отсутствие у них одного из ключевых нейтральных индукторов позвоночных – гена *chordin*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Ermakova GV, Kucheryavyu AV, Muge NS, Mischenko AV, Zaisky AG, **Bayramov AV.**, 2024. Three foxg1 paralogues in lampreys and gnathostomes - brothers or cousins? *Front. Cell Dev. Biol.* 11:1321317. doi: 10.3389/fcell.2023.1321317
2. Ermakova G., Meyntser I., Zaisky A., **Bayramov A.**, 2024. Loss of *noggin1*, a Classic Embryonic Inducer Gene, in Elasmobranchs, *Scientific Reports* 14, 3805. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54435-9>
3. Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V., Zaisky, A.G., **Bayramov A.V.**, 2024. The Molecular Mechanism of Body Axis Induction in Lampreys May Differ from That in Amphibians, *Int J Mol Sci*, 25(4), 2412, doi: 10.3390/ijms25042412
4. **Bayramov A. V.**, Yastrebov S.A., Mednikov D. N., Araslanova K. R., Ermakova G. V., Zaisky A. G., 2024. Paired Fins in Vertebrate Evolution and Ontogeny, *Evolution and Development*, e12478. <https://doi.org/10.1111/ede.12478>
5. Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V., Zaisky, A.G., **Bayramov A.V.**, 2024. Three foxg1 genes in lampreys are a legacy of whole-genome duplications at the early stages of vertebrate evolution, *Russ. J. Dev. Biol.*, in press
6. Ermakova GV, Muge NS, Mischenko AV, Zaisky AG, **Bayramov AV**, 2024. Sturgeon foxg1 genes support a model of ancestral genomic duplication followed by asynchronous rediploidization, *Russ. J. Dev. Biol.*, in press
7. Ermakova G. V., Kucheryavyu A. V., Eroshkin F. M., Zaisky A. G., **Bayramov A. V.**, 2024. Genetic basis of morphological transformations: genes of Noggin and Foxg1 families as a legacy of whole-genome duplications in the early evolution of vertebrates, *Paleontological Journal*, in press
8. Bayramov A. V., Yastrebov S.A., Mednikov D. N., Araslanova K. R., Ermakova G. V., Zaisky A. G., 2024. Origin and mechanisms of development of paired fins, *Russ. J. Dev. Biol.*, in press
9. Ermakova, G.V., Zaisky, A.G., **Bayramov AV.**, 2023. Reconstruction of ancestral genomes as a key to understanding the early evolution of vertebrate genotype, *Russ. J. Dev. Biol.*, Vol. 54, Suppl. 1, S1–S9. DOI: 10.1134/S1062360423070020

10. **Bayramov, A.V.**, Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V. et al., 2022. Lamprey as Laboratory Model for Study of Molecular Bases of Ontogenesis and Evolutionary History of Vertebrata. *J. Ichthyol.* 62, 1213–1229. <https://doi.org/10.1134/S0032945222060029>
11. Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V., Zaraisky, A.G., and **Bayramov, A.V.**, 2021. Comparative analysis of expression patterns of genes of the *Noggin* family at early stages of development of the head structures of the European river lamprey *Lampetra fluviatilis*, *Russ. J. Dev. Biol.*, vol. 52, no. 1, pp. 33–41. <https://doi.org/10.1134/S1062360421010033>
12. G. V. Ermakova, A. V. Kucheryavyu, F. M. Eroshkin, N. Yu. Martynova, A. G. Zaraisky, **A. V. Bayramov**, 2021. Study of the Early Telencephalon Genes of Cyclostomes as a Way to Restoring the Evolutionary History of This Unique Part of the Central Nervous System of Vertebrates, *Paleontological Journal*, Vol. 55, No. 7, pp. 38–51. <https://doi.org/10.1134/S0031030121070030>
13. **Bayramov, A.V.**, Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V., and Zaraisky A.G., 2021. Genome duplications as the basis of vertebrates' evolutionary success, *Russ. J. Dev. Biol.*, vol. 52, no. 3, pp. 141–163. <https://doi.org/10.1134/S1062360421030024>
14. Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V., Zaraisky, A.G., **Bayramov AV.**, 2020. Discovery of four *Noggin* genes in lampreys suggests two rounds of ancient genome duplication. *Commun Biol* 3, 501 <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01234-3>
15. **Bayramov, A.V.**, Ermakova, G.V., and Zaraisky, A.G., 2020. Genetic mechanisms of the early development of the telencephalon, a unique segment of the vertebrate central nervous system, as reflecting its emergence and evolution, *Russ. J. Dev. Biol.*, vol. 51, no. 3, pp. 162–175. <https://doi.org/10.1134/S1062360420030054>
16. Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V., Zaraisky, A.G., and **Bayramov, A.V.**, 2020. Heterochrony of the expression of *Lanf* and *Foxgl* in lamprey confirms the appearance of the telencephalon as an evolutionarily young superstructure in the central nervous system of vertebrates, *Russ. J. Dev. Biol.*, vol. 51, no. 4, pp. 246–254. <https://doi.org/10.1134/S1062360420040049>
17. Ermakova G.V., Kucheryavyu A.V., Zaraisky A.G., **Bayramov A.V.**, 2019. The expression of *FoxG1* in early development of European river lamprey *Lampetra fluviatilis* demonstrates significant heterochrony with that in other vertebrates. *Gene Expression Pattern*, 34:119073, doi: 10.1016/j.gep.2019.119073.
18. Tereshina MB, Ivanova AS, Eroshkin FM, Korotkova DD, Nesterenko AM, **Bayramov AV**, Solovieva EA, Parshina EA, Orlov EE, Martynova NY, Zaraisky AG., 2019. 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*. 57(5): e23293. doi: 10.1002/dvg.23293.
19. **Bayramov, A.V.**, Ermakova, G.V., Kucheryavyu, A.V., and Zaraisky, A.G., 2018. Lampreys – «living fossils» in researches of early development and regeneration of the vertebrates, *Russ. J. Dev. Biol.*, vol. 49, no. 6, pp. 327–338. <https://doi.org/10.1134/S1062360418080015>
20. Eroshkin Ф. М., **Байрамов А. В.**, Ермакова Г.В, Зарайский А. Г., Мартынова Н. Ю. 2018, Молекулярные механизмы пространственной и временной регуляции экспрессии гомеобоксного гена *Hanfl* в раннем развитии зачатка переднего мозга у шпорцевой лягушки, *Биоорганическая химия*, №3(44), с. 303-315, DOI: 10.7868/S0132342318030065
21. Ermakova G., **Bayramov A.**, Eroshkin F., Kucheryavyu A., Martynova N., Zaraisky A. The homeobox gene *Anf/Hesx1* underlies emergence of the vertebrate telencephalon: important

- proof from lampreys, 2017, 42th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS), *FEBS JOURNAL* 284 (Suppl. 1), p. 245, doi: 10.1111/febs.14174
22. **Bayramov, A.V.**, Ermakova, G.V., Eroshkin, F.M., et al., 2017. Presence of homeobox gene of *Anf* class in Pacific lamprey *Lethenteron camtschaticum* confirms the hypothesis about the importance of emergence of *Anf* genes for the origin of telencephalon in vertebrate evolution, *Russ. J. Dev. Biol.*, vol. 48, no. 4, pp. 241–251. <https://doi.org/10.1134/S1062360417040026>
 23. **Bayramov, A.V.**, Eroshkin, F.M., Martynova, N.Y. et al., 2017. The secreted protein Noggin4 is an activator of the Wnt/PCP-signaling pathway. *Russ J Bioorg Chem* 43, 216–219. <https://doi.org/10.1134/S1068162017020029>
 24. Eroshkin, F.M., Martynova, N.Y., **Bayramov, A.V.**, Ermakova G. V., Ivanova A. S., Korotkova D. D., Zaraisky A. G., 2017. Interaction of secreted factor Agr2 with its potential receptors from the family of three-finger proteins. *Russ J Bioorg Chem* 43, 344–346. <https://doi.org/10.1134/S1068162017030049>
 25. **Bayramov AV**, Ermakova G.V., Eroshkin F.M., Kucheryavyy A.V., Martynova N.Y., Zaraisky AG., 2016. The presence of the *Anf/Hesx1* homeobox in lampreys indicates that it may play important role in telencephalon emergence. *Scientific Reports*, 23;6:39849. doi: 10.1038/srep39849
 26. Eroshkin FM, Nesterenko AM, Borodulin AV, Martynova NY, Ermakova GV, Gyoeva FK, Orlov EE, Belogurov AA, Lukyanov KA, **Bayramov AV**, Zaraisky AG., 2016. Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. *Scientific Reports* 6:23049. doi: 10.1038/srep23049.
 27. **Bayramov, A.V.**, Eroshkin, F.M., Borodulin, A.V. et al., 2016. Secreted protein Noggin4 participates in the formation of forebrain structures in *Xenopus laevis* by inhibiting the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Russ J Dev Biol* 47, 202–206. <https://doi.org/10.1134/S1062360416040020>
 28. Martynova, N.Y., Nesterenko, A.M., Orlov, E.E. Eroshkin, F.M., Borodulin, A.V., **Bayramov AV**, Zaraisky AG., 2016. The interaction of secreted proteins Noggin4 and Wnt8 from *Xenopus laevis* embryos. *Russ J Bioorg Chem* 42, 340–342. <https://doi.org/10.1134/S1068162016030110>
 29. Eroshkin, F.M., Fedina, N.V., Martynova, N.Y., **Bayramov AV**, Zaraisky AG., 2015. A point mutation of the Noggin2 protein increasing its binding capacity to activin. *Russ J Bioorg Chem* 41, 675–677. <https://doi.org/10.1134/S1068162015060059>
 30. Nesterenko A.M., Eroshkin F.M., **Bayramov A.V.**, Martynova Y.N., Ermakova G.V., Borodulin A.V., Kukushkin D.V., Zlenko D.V., Zaraisky A.G., 2013. Hetero- and homodimerisation of cystein-knot Noggin proteins studied with molecular dynamics. Conference: 38th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS). *FEBS JOURNAL* 2013V: 280 Special Issue, p. 125, Abstract SW02.S7–46
 31. Ерoшкин Ф. М., **Байрамов, А. В.**, Аверьянова, О. В., Соловьева, Е. А., Серебрякова, М. В., Зарайский, А. Г., Мартынова Н. Ю., 2013. Получение секретируемых белков семейства Noggin и определение их биологической активности. *Биоорганическая химия*, том 39, с. 1–6. DOI: 10.7868/S0132342313020048
 32. Eroshkin, F.M., **Bayramov, A.V.**, Martynova, N.Y., Zaraisky AG., 2012. Use of the luciferase reporter constructs for investigation of the capacity of Noggin2 protein to inhibit cell signaling pathways in *Xenopus laevis* embryos. *Russ J Bioorg Chem* 38, 338–340. <https://doi.org/10.1134/S106816201203003X>

33. Borodulin A.V., Eroshkin FM, **Bayramov AV**, Zaraisky A.G., 2012. Noggin4 expression during chick embryonic development. *Int J Dev Biol*, 56, 403-6. doi: 10.1387/ijdb.120020az.
34. **Bayramov A.V.**, Eroshkin FM, Martynova NY, Ermakova GV, Solovieva EA and Zaraisky AG, 2011, Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development*, 138, 5345-5356. doi: 10.1242/dev.068908
35. Tereshina MB, **Bayramov AV**, Zaraisky AG., 2011. Expression patterns of genes encoding small GTPases Ras-dva-1 and Ras-dva-2 in the *Xenopus laevis* tadpoles. *Gene Expr Patterns*. 11(1-2):156-61. doi: 10.1016/j.gep.2010.10.009.
36. **Bayramov AV**, Eroshkin FM, Martynova NYu, Ermakova GV, Solovieva EA, Zaraisky AG, 2011. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *J Cell Sci*, 124 (24): e1. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.105031>
37. **Bayramov A**, Eroshkin F., Martynova N., Ermakova G., Solovieva E., Serebryakova M., Zaraisky A., 2009. Noggin2 can modulate Activin signaling and is essential for normal forebrain development, *Mechanisms of Development*, v.126, S107, doi: 10.1016/j.mod.2009.06.186
38. Eroshkin F.M. Ermakova G.V., **Bayramov, A.V.**, and Zaraisky A. G., 2006, Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of noggin2 and noggin4 in *Xenopus laevis*. *Gene Expression Patterns*, 6, 180-186. doi: 10.1016/j.modgep.2005.06.007.
39. **Bayramov AV**, Martynova NY, Eroshkin FM, Ermakova GV, Zaraisky AG., 2004. The homeodomain-containing transcription factor X-nkx-5.1 inhibits expression of the homeobox gene Xanf-1 during the *Xenopus laevis* forebrain development. *Mechanisms of Development*, 121(12):1425-41. doi: 10.1016/j.mod.2004.08.002.
40. Martynova N, Eroshkin F, Ermakova G, **Bayramov A**, Gray J, Grainger R, Zaraisky A., 2004, Patterning the forebrain: FoxA4a/Pintallavis and Xvent2 determine the posterior limit of Xanf1 expression in the neural plate. *Development*, 131(10):2329-38. doi: 10.1242/dev.01133.

Патенты:

1. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого TGF-beta фактором Vg1 в клетках животных, Патент РФ N RU 2391352, 2010 г.
2. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого TGF-beta фактором Derriere в клетках животных, Патент РФ N RU 2407799, 2010 г.
3. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого фактором Wnt8 в клетках животных с помощью белков семейства Noggin Патент РФ N 2473561, 2011 г.
4. Зарайский А.Г. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М. Способ блокирования активности Activin с помощью Noggin2. Патент РФ N2354662, 2009.