

**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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Зарайский Андрей Георгиевич

Москва, 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ	16
1.1. Современные представления о филогении позвоночных	16
1.2. Немодельные объекты в эволюционной биологии развития	19
1.2.1. <i>Миноги – современные представители бесчелюстных, древнейшей эволюционной линии позвоночных</i>	21
1.2.2. <i>Хрящевые рыбы – базальная филогенетическая ветвь челюстноротых</i>	29
1.2.3. <i>Осетрообразные – современные представители одной из древнейших групп челюстноротых</i>	31
1.3. Подходы и методы исследования особенностей экспрессии и функциональных свойств генов у немодельных объектов	34
1.4. Геномные дубликации, как важнейшая предпосылка эволюционного успеха позвоночных	42
1.4.1. <i>Модели полногеномных дубликаций в ранней эволюции позвоночных</i>	49
1.5. Конечный мозг – уникальная инновация позвоночных	52
1.5.1. <i>Гены семейства <i>Noggin</i> позвоночных – ранние эмбриональные индукторы, участвующие в развитии переднего мозга</i>	56
1.5.2. <i>Гены <i>foxg1</i> – ключевые регуляторы развития переднего мозга позвоночных</i>	59
1.5.3. <i>Ген <i>anf</i> – уникальный ген позвоночных, участвующий в закладке зачатка конечного мозга</i>	60
1.6. Парные конечности – важная составляющая эволюционного успеха позвоночных	62
1.6.1. <i>Предпосылки появления парных плавников: нехордовые вторичноротые и беспозвоночные хордовые</i>	64
1.6.2. <i>Разнообразие и особенности строения парных плавников у позвоночных</i>	68
1.6.3. <i>Появление парных плавников в эволюции позвоночных: палеонтологические данные</i>	74
1.6.4. <i>Особенности развития непарных и парных плавников и поиск переходного состояния</i>	81
1.6.5. <i>Гомология непарных и парных плавников</i>	88
1.6.6. <i>Эпителиально-мезенхимный переход в зачатках парных конечностей</i>	89
1.6.7. <i>Генетические механизмы формирования плавников</i>	91
1.6.8. <i>Теории происхождения парных плавников</i>	94
1.7. Особенности эмбриональной индукции у миног, как современных представителей древнейшей эволюционной ветви позвоночных	99

1.8. Внутриклеточные сигнальные каскады	102
1.9. Регенерация у позвоночных	107
2. РЕЗУЛЬТАТЫ	110
2.1. Гены семейства <i>Noggin</i> – регуляторы раннего развития позвоночных	110
2.1.1. Гены семейства <i>Noggin</i> бесчелюстных	110
2.1.1.1. Анализ филогении и геномной синтении генов и белков <i>Noggin</i> миног и челюстноротых	112
2.1.1.2. Исследование динамики экспрессии генов <i>poggin</i> речной миноги	117
2.1.1.3. Исследование пространственной экспрессии генов <i>poggin</i> на ранних стадиях развития речной миноги <i>L. fluviatilis</i>	118
2.1.1.4. Исследование функциональной активности и эволюционного консерватизма свойств генов <i>poggin</i> миног	125
2.1.2. Гены семейства <i>Noggin</i> челюстноротых	128
2.1.2.1. Анализ филогении и геномной синтении генов <i>poggin</i> хрящевых рыб	128
2.1.2.2. Пространственная экспрессия генов <i>poggin2</i> и <i>poggin4</i> у серой кошачьей акулы	138
2.1.2.3. мРНК акульего гена <i>poggin2</i> индуцирует полные дополнительные оси у <i>Xenopus laevis</i>	143
2.1.2.4. Гены семейства <i>Noggin</i> наземных позвоночных на примере амфибий	146
2.1.2.5. Экспрессия генов <i>poggin2</i> и <i>poggin4</i> в эмбриональном развитии <i>X. laevis</i>	148
2.1.2.6. <i>Noggin2</i> индуцирует формирование полных вторичных осей тела у эмбрионов <i>X. laevis</i>	152
2.1.2.7. В нормальном развитии мРНК <i>poggin2</i> транслируется с большей эффективностью, чем <i>poggin1</i>	157
2.1.2.8. <i>Noggin2</i> индуцирует нейральную и подавляет мезодермальную дифференцировку в экплантатах тканей <i>X. laevis</i>	161
2.1.2.9. Белки <i>Noggin</i> обладают способностью подавлять фосфорилирование молекул <i>Smad2</i> в эмбрионов <i>X. laevis</i>	162
2.1.2.10. Белки <i>Noggin1</i> и <i>Noggin2</i> , кроме молекул BMP могут связывать лиганды TGF- β и Wnt сигнальных каскадов	168
2.1.2.11. Белки <i>Noggin1</i> и <i>Noggin2</i> могут ингибировать сигнальные каскады <i>Activin/Nodal</i> и <i>Wnt</i>	170
2.1.2.12. Активность <i>Noggin2</i> в передней части нервной пластинки важна для развития переднего мозга	174
2.1.2.13. Ингибирование <i>ActivinB</i> белком <i>Noggin2</i> необходимо для развития переднего мозга	175
2.1.2.14. <i>Noggin4</i> участвует в развитии головных структур, но не индуцирует формирование дополнительных осей	179

2.1.2.15.	<i>Исследование роли Noggin4 в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов</i>	182
2.1.2.16.	<i>Подтверждение способности белка Noggin4 связывать Wnt8 методом ко-иммунопреципитации белков, выделенных из внеклеточной фракции эмбрионов</i>	191
2.1.2.17.	<i>Анализ связывания белка Noggin4 с Wnt8 методом поверхностного плазмонного резонанса</i>	193
2.1.2.18.	<i>Noggin4 дополняет свойства трунктированного ВМР рецептора и в смеси с ним индуцирует полные вторичные оси у эмбрионов шпорцевой лягушки</i>	194
2.1.2.19.	<i>Исследование влияния уровня экспрессии гена poggin4 на подвижность клеток в эксплантатах дорсальной маргинальной зоны эмбрионов</i>	195
2.1.2.20.	<i>Исследование влияния Noggin4 на активность «неканонического» Wnt/PCP сигнального каскада</i>	197
2.1.2.21.	<i>Исследование паттерна экспрессии poggin4 у эмбрионов курицы (<i>Gallus gallus</i>)</i>	199
2.1.3.	<i>Исследование роли генов и белков Noggin в регенерации</i>	203
2.1.3.1.	<i>Анализ профиля экспрессии генов семейства Noggin в ходе регенерации хвостового отдела эмбрионов речной миноги <i>L. fluviatilis</i></i>	203
2.1.3.2.	<i>Исследование характера и динамики экспрессии генов poggin в регенерации хвоста и конечностей <i>X. laevis</i> методом количественного ПЦР в реальном времени</i>	205
2.1.3.3.	<i>Сравнение профилей экспрессии генов poggin с профилями экспрессии генов, вовлеченных в процесс регенерации</i>	207
2.1.3.4.	<i>Анализ экспрессии EGFP под контролем промоторов poggin1, poggin2 и poggin4 в ампутированных конечностях трансгенных головастика шпорцевой лягушки</i>	209
2.1.3.5.	<i>Оценка функциональной важности Noggin белков в процессе регенерации</i>	210
2.2.	<i>Семейство переднеголовных генов Foxg1 позвоночных</i>	213
2.2.1.	<i>Три паралога foxg1 у эволюционно древних групп позвоночных</i>	213
2.2.1.1.	<i>Динамика и особенности пространственной экспрессии генов foxg1 у речной миноги (<i>L. fluviatilis</i>)</i>	221
2.2.1.2.	<i>Паттерны экспрессии генов foxg1 у стерляди (<i>A. ruthenus</i>)</i>	230
2.2.2.	<i>Оценка вероятных сроков дупликации генов foxg1</i>	235
2.2.3.	<i>Филогения генов foxg1 осетрообразных соответствует модели предковой геномной дупликации с последующей асинхронной редиплоидизацией</i>	238
2.3.	<i>Исследование связи появления генов класса Anf с возникновением конечного мозга</i>	240
2.3.1.	<i>Появление гена anf по времени соответствует возникновению конечного мозга</i>	241
2.3.2.	<i>Филогенетический анализ белков Anf позвоночных</i>	246

2.3.3. Гены <i>anf</i> миног	251
2.3.3.1. Экспериментальная экспрессия κДНК <i>anf</i> миног в эмбрионах <i>X. laevis</i>	251
2.3.3.2. Анализ пространственного паттерна экспрессии <i>lanf</i> и его сопоставление с паттернами экспрессии <i>otx2</i> и <i>foxd1β</i>	256
2.3.3.3. Ген <i>anf</i> миног является транскрипционным репрессором	258
2.3.3.4. Анализ способности мРНК <i>lanf</i> подавлять экспрессию гена <i>otx2</i> и активировать экспрессию одного из ключевых генов-регуляторов развития переднего мозга - гена <i>foxd1β</i>	260
2.3.4. Гетерохрония экспрессии генов <i>anf</i> и <i>foxd1β</i> у миног	263
2.4. Гены семейства <i>Chordin</i> и их роль в появлении парных конечностей позвоночных	269
2.4.1. Гены семейства <i>Chordin</i> позвоночных	269
2.4.2. <i>Chordin-like1</i> – новый ген челюстноротых	274
2.4.2.1. Исследование экспрессии гена <i>chordin-like1</i> у серой кошачьей акулы	275
2.4.2.2. Исследование экспрессии <i>chordin-like1</i> у стерляди	279
2.4.2.3. Анализ экспрессии <i>chordin-like1</i> у шпорцевой лягушки	280
2.4.2.4. Исследование функциональных свойств генов <i>chordin-like</i> позвоночных	282
2.4.3. <i>Chordin-like2</i> – древний ген билатерий	285
2.4.3.1. Анализ динамики и паттерна экспрессии гена <i>chordin-like2</i> у речной миноги	285
2.5. Особенности эмбриональной индукции у миног	287
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	297
3.1. Семейство генов <i>Noggin</i> позвоночных	297
3.1.1. Консерватизм паттернов экспрессии генов <i>noggin</i> у речной миноги и шпорцевой лягушки	297
3.1.2. Утрата <i>noggin1</i> у хрящевых рыб - уникальная ситуация для позвоночных	300
3.1.3. Гены <i>noggin2</i> и <i>noggin4</i> хрящевых рыб консервативны по характеру экспрессии и функциональным свойствам	302
3.1.4. Утрата <i>noggin1</i> может быть связана с особенностями строения хрящевого скелета Пластиножаберных	303
3.1.5. Белки <i>Noggin1</i> и <i>Noggin2</i> - ингибиторы <i>Nodal/Activin</i> и <i>Wnt</i> сигнальных каскадов	307
3.1.6. <i>Noggin4</i> модулирует активность <i>Wnt</i> сигнальных каскадов и участвует в регенерации	308
3.1.7. Предполагаемый сценарии появления и эволюции генов семейства <i>Noggin</i> позвоночных	310
3.2. Семейство генов <i>Foxg1</i> позвоночных	312
3.2.1. Гены <i>foxg1</i> у миног	312
3.2.2. Гены <i>foxg1</i> у челюстноротых	313

3.2.3. Филогения паралогов <i>foxg1</i> осетрообразных подтверждают модель предковой геномной дупликации с последующей асинхронной редиплоидизацией	319
3.3. Гены класса <i>Anf</i> у миног	320
3.3.1. Обнаружение гена <i>anf</i> у миног подтверждает гипотезу о роли появления <i>anf</i> в возникновении конечного мозга у позвоночных	320
3.3.2. Гипотеза гибридного происхождения уникальных генов класса <i>Anf</i> позвоночных	321
3.4. Появление гена <i>chordin-like1</i> могло стать важным фактором возникновения парных плавников и челюстного аппарата челюстноротых	323
3.5. Молекулярный механизм ранней осевой дифференцировки у миног может отличаться от амфибий	326
4. ВЫВОДЫ	331
5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	333
5.1. Материалы	333
5.1.1. Реактивы	333
5.1.2. Ферментные препараты	334
5.1.3. Лабораторное оборудование	334
5.1.4. Лабораторные животные	335
5.1.5. Буферы, растворы и микробиологические среды	338
5.2. Методы	339
5.2.1. Биоинформатический анализ филогении и локальной геномной синтении исследуемых генов	339
5.2.2. Получение полноразмерных кДНК исследуемых генов методом обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР)	340
5.2.3. Оценка динамики экспрессии исследуемых генов методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени	343
5.2.4. Синтетические мРНК и морфолиновые олигонуклеотиды	344
5.2.5. Гибридизация <i>in situ</i>	347
5.2.6. Люциферазные тесты	348
5.2.7. Ко-иммунопреципитация и иммуноблоттинг	350
5.2.8. Поверхностный плазмонный резонанс	353
6. БЛАГОДАРНОСТИ	354
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	355
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	357

ВВЕДЕНИЕ

Проблема формирования и преобразования планов строения организмов в ходе эволюции – одна из важнейших в биологии. Накапливающиеся данные показывают, что на геномном уровне основой таких преобразований, помимо изменений регуляторных элементов и точечных мутаций белок-кодирующих последовательностей, могут быть как появление новых генов, так и их утрата в отдельных эволюционных линиях. В качестве одного из важнейших путей появления новых генов рассматриваются геномные полиплоидизации (как правило, дубликации), в ходе которых происходит кратное увеличение числа копий исходных генов и появляется больше степеней свободы для преобразования структуры и свойств отдельных паралогов. Дубликации могут касаться как отдельных генов, так и более протяженных участков генома, вплоть до полногеномных дубликаций, в ходе которых происходит удвоение всего генома организма. Согласно принятой на сегодняшний день точке зрения, на ранних этапах эволюции позвоночных произошли как минимум два раунда полногеномных дубликаций, которые могли стать основой для последующего преобразования усложнения плана строения.

Эволюционный успех позвоночных связан с появлением и развитием у них ряда важных морфологических особенностей, обеспечивших возможность ведения более активного образа жизни по сравнению с предковыми группами. Большая подвижность и возможность активного питания во многом были обеспечены парными конечностями и челюстным аппаратом. Возможность ориентации в пространстве и способность к обработке большого количества внешней информации неразрывно связаны с усложнением и преобразованием нервной системы, в первую очередь ее центрального отдела и головного мозга.

В настоящей работе описаны и исследованы несколько семейств регуляторных генов, участвующих в формировании плана строения эмбрионов позвоночных. Некоторые из исследованных генов описаны впервые. Гены семейств *Noggin*, *Foxg1* и *Anf* принимают участие в

формировании переднего мозга позвоночных, в том числе уникального конечного мозга, который впервые появившись у бесчелюстных, в ходе дальнейшей эволюции развился в кору больших полушарий, обеспечивающую высшие формы нервной активности у эволюционно молодых групп животных, в том числе у приматов и человека.

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

Идея настоящей работы состоит в том, что для исследования механизмов появления новых структур и признаков лучше всего подходят представители филогенетических групп, у которых эти 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 таких представителей архаичных таксонов в любом случае выше вероятность сохранения (и, следовательно, обнаружения) особенностей первичных генетических механизмов, лежавших в основе появления новых структур. Для конечного мозга такими «первопроходцами» являются бесчелюстные, у которых впервые в эволюции этот ростральный отдел мозга морфологически сформировался. Для парных конечностей наиболее 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, спектр живых объектов в настоящей работе сложно считать традиционным для лабораторных исследований. Изучение

семейств регуляторных генов были проведены на миногах, как представителях бесчелюстных, акулах и осетровых, как наиболее архаичных представителях челюстноротых. Значительная часть функциональных исследований была проведена на амфибиях, как представителей наземных позвоночных и удобном «традиционном» лабораторном объекте с широким арсеналом разработанных и доступных к применению методик и протоколов. Особенности экспрессии ортологов исследуемых генов были также проанализированы у представителей ближайших родственников позвоночных – ланцетников и оболочников.

В совокупности, исследования, проведенные с филогенетически важными объектами, позволили получить новую информацию о роли и вкладе сформировавшихся у позвоночных семейств регуляторных генов в развитии морфологического плана строения и появлении новых структур, внесших вклад в эволюционный успех позвоночных.

Цель и задачи исследования

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.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) Провести адаптацию спектра базовых лабораторных методов для работы с немодельными живыми объектами – эмбрионами миног, как представителей бесчелюстных, а также хрящевых рыб и осетрообразных, как представителей архаичных групп челюстноротых.

2) Исследовать гены семейства *Noggin* у представителей двух ветвей позвоночных – бесчелюстных и челюстноротых. Выявить паралоги генов *noggin* в каждой из исследуемых групп животных, путем проведения анализа филогении и локальной геномной синтении.

3) Провести экспериментальные исследования функциональных

свойств генов семейства *Noggin* у позвоночных и выявить их роли в раннем развитии переднеголовных структур.

4) Исследовать переднеголовые гены семейства *Foxg1* у представителей бесчелюстных и челюстноротых.

5) Провести поиск и функциональное исследование генов класса *Anf* у миног для подтверждения выдвинутой ранее гипотезы о ключевой роли появления генов класса *Anf* в возникновении у предков позвоночных уникального отдела головного мозга – конечного мозга.

6) Исследовать гены семейства *Chordin* у представителей эволюционно древних групп позвоночных – миног, акул и осетрообразных. Исследовать особенности структуры, экспрессии и функциональных свойств генов *chordin-like* у миног и челюстноротых и установить их возможный вклад в формирование 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.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Исследования регуляторных генов, проводимые на представителях эволюционно древних групп, позволяют реконструировать историю формирования генных семейств и выявлять генетические механизмы, лежавшие в основе появления морфологических признаков в эволюции. В эволюционно молодых группах животных, к которым относится большинство классических лабораторных моделей, может происходить частичная утрата паралогов отдельных генов, не позволяющая производить подобные реконструкции.

2. Увеличение числа паралогов регуляторных генов семейств *Noggin* и *Foxg1* в результате геномных дупликаций на ранних этапах эволюции позвоночных могло стать важной предпосылкой для усложнения

плана строения и развития головного мозга у представителей этой группы животных.

3. Появление гена *anf*, произошедшее на уровне общего предка позвоночных, до разделения эволюционных линий бесчелюстных и челюстноротых, стало важным фактором для возникновения уникального конечного мозга.

4. Появление нового гена *chordin-like1* у челюстноротых могло стать одной из предпосылок для появления у них парных конечностей.

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

Публикации по теме диссертации

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, Mugue NS, Mischenko AV, Zارايسкий 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., Kucheryavyy A. V., Eroshkin F. M., Zارايسкий 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., Zارايسкий A. G., 2024. Origin and mechanisms of development of paired fins, *Russ. J. Dev. Biol.*, in press
9. Ermakova, G.V., Zارايسкий, 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., Kucheryavyy, 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., Kucheryavyy, A.V., Zارايسкий, 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. Kucheryavyy, F. M. Eroshkin, N. Yu. Martynova, A. G. Zارايسкий, **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., Kuchryavyy, A.V., and Zارايسкий 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., Kucheryavyy, A.V., Zارايسкий, 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 Zارايسкий, 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., Zارايسкий, A.G., and **Bayramov, A.V.**, 2020. Heterochrony of the expression of *Lanf* and *Foxg1* 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., Zارايسкий 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, Zارايسкий 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 Zارايسкий, 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 *Xanf1* 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., Zارايسкий A., 2017. The homeobox gene *Anf/Hesx1* underlies emergence of the vertebrate telencephalon: important proof from lampreys, 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., Zaisky 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., Zaisky 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**, Zaisky 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**, Zaisky 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**, Zaisky 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., Zaisky 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. Eroshkin 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., Zارايسкий 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**, Zارايسкий 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 Zارايسкий 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**, Zارايسкий 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, Zارايسкий 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., Zارايسкий 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 Zارايسкий 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, Zارايسкий 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, Zارايسкий 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. Зараиский А.Г. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М. Способ блокирования активности Activin с помощью Noggin2. Патент РФ N2354662, 2009 г.

2. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зараиский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого TGF-beta фактором Vg1 в клетках животных, Патент РФ N RU 2391352, 2010 г.

3. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зараиский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого TGF-beta фактором Derriere в клетках животных, Патент РФ N RU 2407799, 2010 г.

4. **Байрамов А.В.**, Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Серебрякова М.В., Соловьева Е.А., Зараиский А.Г. Способ блокирования сигнального пути, активируемого фактором Wnt8 в клетках животных с помощью белков семейства Noggin Патент РФ N 2473561, 2011 г.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1. Современные представления о филогении позвоночных

План морфологического строения позвоночных может быть охарактеризован целым рядом уникальных особенностей, обеспечивших животным, относящимся к этой группе потенциал для освоения большого разнообразия экологических ниш и наблюдаемый долгосрочный эволюционный успех. Среди таких особенностей нельзя не упомянуть хорошо развитый головной мозг, включающий три основных отдела, в том числе уникальный ростральный отдел – теленцефалон (telencephalon) или конечный мозг, защищенный черепом из хрящевой и/или костной ткани; хорошо развитую периферическую нервную систему и связанные с ней парные сенсорные органы; внутреннее ухо с полукружными каналами и вестибулярным аппаратом; дыхательный аппарат с мускулатурой, обеспечивающей возможность активного дыхания; многокамерное сердце, формируемое сердечной мускулатурой; глоточные артерии с эндотелиальной выстилкой; сегментированную систему почечной фильтрации (Janvier, 2003; Gee, 2018; York and McCauley, 2020). Эти инновации, затронувшие развитие практически всех основных систем организма: сенсорных органов, нервной, дыхательной и кровеносной систем, мускулатуры и скелета позволили ранним эволюционным формам позвоночных перейти к более активному образу жизни и питания, освоить новые места обитания и экологические ниши и, в конечном итоге, обеспечили наблюдаемый сегодня эволюционный успех группы (York and McCauley, 2020).

Схематичное филогенетическое дерево основных групп современных позвоночных и их ближайших родственников представлено на Рисунке 1.

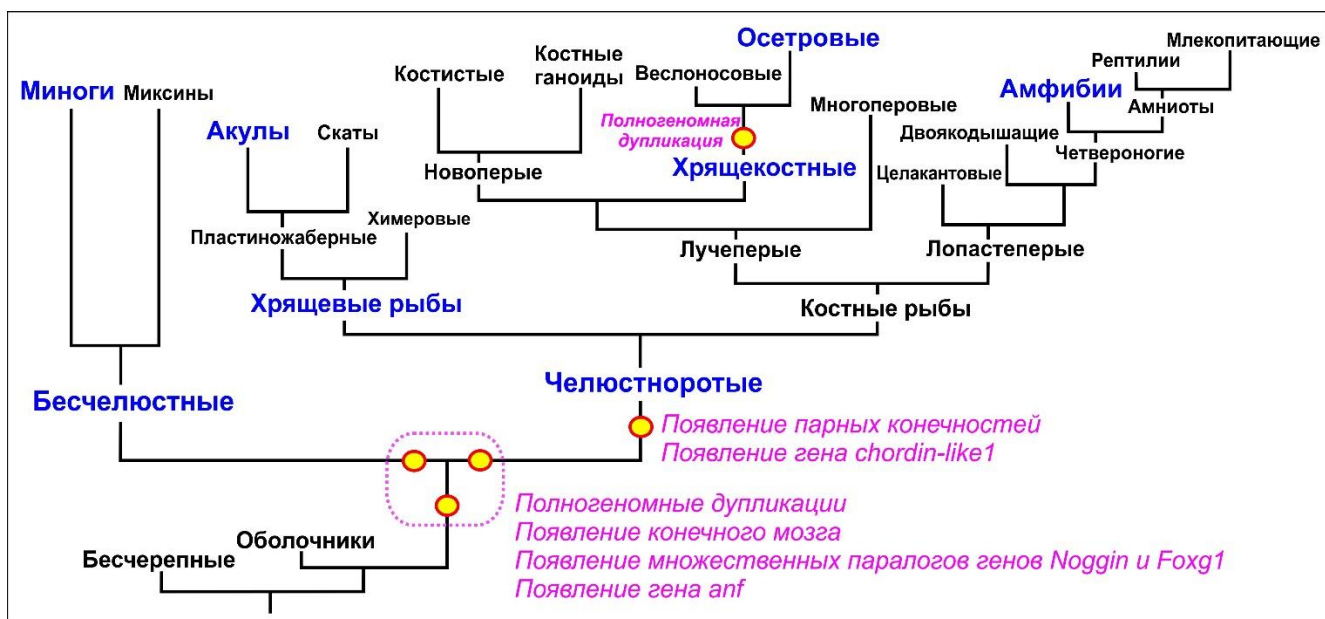


Рисунок 1. Схематическое филогенетическое дерево основных групп современных позвоночных. Красным шрифтом обозначены группы, представители которых исследовались в настоящей работе.

Ближайшими родственниками позвоночных являются беспозвоночные хордовые – бесчерепные (ланцетники) и оболочники (асцидии). Долгое время предполагалось, что ланцетники филогенетически расположены ближе к позвоночным, и морфологический анализ строения взрослых особей выступал в качестве подтверждения этой точки зрения, однако, проведенный анализ геномов показал, что ланцетники представляют собой сестринскую группу для позвоночных и оболочников. В этом случае ближайшими родственниками позвоночных являются оболочники, несмотря на то, что планом строения хордовых у них обладает только личиночная стадия (Delsuc et al., 2006, 2008).

Для исследования механизмов, лежавших в основе появления новых структур, и реконструкции их вероятного предкового состояния лучше подходят группы, в которых эти структуры появляются впервые в эволюции. У представителей этих групп с большой вероятностью могли сохраниться древние механизмы и паттерны экспрессии генов регуляторов, участвовавших в первичном формировании исследуемых признаков. Для позвоночных эволюционно древними группами являются бесчелюстные и

базальные челюстноротые – хрящевые и хрящекостные рыбы. Класс хрящевых рыб включают две эволюционных ветви – подкласс Цельноголовые (Holosephali, каллоринхи) и полкласс Пластиножаберные (Elasmobranchii), включающий акул и скатов. В англоязычной литературе надотряд скатов (Batomorpha), включающий четыре отряда, часто подразделяется на «skates» или отряд скатообразные (Rajiformes, ромботелые скаты) и «rays», включающие отряды Torpediniformes (электрические скаты), Pristiformes (пилорылообразные) и Myliobatiformes (хвостокколообразные) (Nelson et al., 2016). Современными представителями хрящекостных рыб выступают осетрообразные. Иногда к этой же группе относят и многоперовых, однако в последнее время более выражена тенденция рассматривать многоперовых в качестве сестринской группы по отношению ко всем остальным лучеперым рыбам (Nelson et al., 2016).

По данным литературы, линии челюстноротых и бесчелюстных разделились на ранних этапах позвоночных, в Палеозое. Предполагается, что это разделение могло состояться уже в кембрийском периоде, на временном горизонте порядка 535-462 млн лет назад (Janvier, 2006; Kuraki and Kuratani, 2006; Feinberg and Mallatt, 2013). В качестве наиболее древнего ископаемого представителя миног на сегодняшний день описан *Priscomyzon riniensis*, обнаруженный в Южной Африке (Gess et al., 2006). Этот представитель ископаемых миног Девонского периода уже обладал отдельными морфологическими признаками, характерными для всей группы, такими как ротовая воронка округлой формы, а также строение жаберного отдела. Возраст *P. riniensis* оценивается порядка 360 млн лет.

Дожившие до наших дней представители бесчелюстных подразделяются на два класса – миксины и миноги), существенно отличающихся как внешне, так и по особенностям биологии (Ваграмов et al, 2018).

Эволюционная ветвь челюстноротых базально разделяется на линии хрящевых и костных рыб (Рисунок 1). Предполагается, что дивергенция предков этих групп произошла около 450 миллионов лет назад и

сопоставление особенностей строения и формирования доживших до наших дней представителей хрящевых может являться важной составляющей реконструкции эволюционной истории челюстноротых (Irisarri et al., 2017; Kuratani, 2021).

1.2. Немодельные объекты в эволюционной биологии развития

Существенная часть актуальных знаний об эмбриональном развитии позвоночных получена в ходе работы с традиционными лабораторными объектами, такими как эмбрионы мышей, кур, амфибий (в первую очередь - шпорцевых лягушек), костистых рыб (в первую очередь – рыбки *Danio rerio*) (Gilbert, 2006; Bayramov et al., 2022).

Такой выбор модельных объектов для исследований не случаен - основными преимуществами этих животных с точки зрения лабораторной практики являются относительная простота их содержания и техническое удобство работы с ними в лаборатории – в первую очередь возможность регулируемого получения живых эмбрионов для проведения экспериментов практически в любое время года. Вследствие этого имеются детально разработанные протоколы для работы и содержания как эмбрионов, так и взрослых особей в лабораторных условиях, отработаны экспериментальные методики и подходы для работы с ними. Получены качественно отсеквенированные и проанализированные (аннотированные) геномные и транскриптомные сиквенсы. Все эти особенности и наработанные знания, безусловно, значительно повышают продуктивность лабораторной работы и обеспечивают возможность проведения функциональных экспериментов.

В то же время, для изучения эволюционной истории позвоночных особую ценность приобретают исследования, так называемых, «немодельных» объектов – представителей групп, занимающих важные филогенетические узлы на эволюционном древе позвоночных. Информативная ценность таких объектов объясняет возрастающий в последние годы интерес к их исследованиям. К таким объектам, по мере

движения по филогенетическому дереву позвоночных «от корней к кроне», можно отнести бесчелюстных, которые представляют собой сестринскую группу с челюстноротыми, а также базальные группы челюстноротых, такие как хрящевые рыбы, хрящекостные рыбы (осетрообразные и многоперовые), костные ганоиды (Dahn et al., 2007; Ota et al., 2007; Oisi et al., 2013; Green and Bronner, 2014; Braasch et al., 2015; McCauley et al., 2015; Pasquier et al., 2017).

Современных бесчелюстных, как представителей группы, отделившейся от челюстноротых на самых ранних этапах эволюции позвоночных можно рассматривать как «живых ископаемых», доживших до наших дней и, с большой вероятностью, сохранивших черты предкового для позвоночных плана строения. Основные направления исследований миног рассмотрены в обзорной статье Байрамова и соавторов «Миноги – «живые ископаемые» в исследованиях раннего развития и регенерации позвоночных» 2018 (Bayramov et al., 2018, <https://doi.org/10.1134/S1062360418080015>).

При изучении формирования уникальных признаков челюстноротых (таких, к примеру, как парные конечности, челюстной аппарат, костный скелет), бесчелюстные могут выступать в качестве внешней группы, у которой эти признаки отсутствуют. Правда, для установления того первично ли это отсутствие или оно носит вторичный характер как правило требуются комплексные исследования, соотносящие генетические данные с палеонтологическими и эмбриональными исследованиями. Исследования миног как древних позвоночных затрагивают вопросы формирования головного мозга и связанных с ним органов чувств. Самый передний отдел головного мозга – конечный мозг – не описан у беспозвоночных, в том числе и ближайших родственников позвоночных – ланцетников и оболочников и, таким образом, он уникален для позвоночных. Впервые в эволюции конечный мозг появляется именно у бесчелюстных и, на сегодняшний день, описан как у миног, так и у миксин.

Работы с хрящевыми рыбами актуальны в контексте исследований возникновения и эволюционного развития кожного скелета, а также

появления у позвоночных парных плавников. Базальные группы лучепёрых - осетрообразные (Acipenseriformes) и костные ганоиды (Holostei: панцирные щуки и амия) – важны для исследования процессов преобразования и специализации плавников, а также эволюции органов чувств (York and McCauley, 2020). Бесчелюстные, разделение которых с челюстноротыми произошло на ранних стадиях эволюции позвоночных, в силу своей архаичности, являются ценным объектом для изучения формирования плана строения позвоночных и появления их морфологических особенностей (Shimeld and Donoghue, 2012).

Хотя для работы с немодельными объектами в лаборатории применяется тот же спектр стандартных методик и подходов, в каждом случае может возникать необходимость корректировки разработанных ранее протоколов в связи с особенностями того или иного объекта.

1.2.1. Миноги – современные представители бесчелюстных, древнейшей эволюционной линии позвоночных

С опорой на морфологические данные, проблема выявления эволюционного родства миксин, миног и челюстноротых обсуждалась достаточно продолжительное время. У миксин не наблюдается некоторых важных признаков, характерных для миног и челюстноротых, в частности выраженных позвонков (Ota et al., 2011), глаз, содержащих хрусталик и обладающих окуломоторными свойствами, органов электрических чувств (Miyashita et al., 2019; Shimeld and Donoghue, 2012). По этой причине, анализ морфологических характеристик подталкивал исследователей к заключению, что миксины представляют собой сестринскую группу для миноги и челюстноротых, то есть их предки отделились от линии предковых позвоночных раньше разделения миног и челюстных («краниатная» теория) (Janvier, 1981). Однако, исследования филогении с опорой на генетические данные склоняют к признанию круглоротых монофилетической группой, включающей миксин и миног, и являющейся сестринской группой для

челюстноротых. Такая точка зрения предполагает, что наблюдаемое упрощение морфологии миксин имеет вторичную природу («циклостоматная» теория) (Delsuc et al., 2006; Kuraku and Kuratani, 2006). И в этом случае, постулируется, что разделение ветвей бесчелюстных и челюстноротых произошло раньше, разделения предковых бесчелюстных на миног и миксин. Согласно имеющимся оценкам разделение эволюционных линий миног и миксин могло произойти в диапазоне 470–390 миллионов лет назад (Kuraki and Kuratani, 2006; Osorio and Retaux, 2007). Общие черты эмбриологического развития миксин и миног выступают в качестве аргумента в пользу их монофилетического происхождения (Oisi et al., 2013).

Экологической особенностью взрослых миксин является их глубоководный образ жизни, в силу чего они крайне труднодоступны. У эмбрионов миксин очень медленное развитие, протекающее в течение нескольких месяцев. Для искусственного содержания миксин требуются специальные лабораторные условия (Ota et al., 2007; Kuratani and Ota, 2008; Shimeld and Donoghue, 2012). Исследование Оты и коллег (Ota et al., 2007), посвященное развитию клеток нервного гребня у пиявкорота Бургера *Eptatretus burgeri*, стало первой работой об онтогенезе миксин за более чем столетний период. В последние годы изучение миксин проводится лабораторией под руководством проф. Куратани (Ota et al., 2007; Oisi et al., 2013; Sugahara et al., 2016).

Существенным преимуществом миног перед миксинами является их относительная доступность для исследований. В настоящее время ихтиологами описано около 40 видов миног, живущих в умеренных широтах обоих полушарий (Renaud, 2011; Pereira et al., 2021). Развитие эмбрионов в природе происходит на песчаных и галечниковых грунтах при температуре воды порядка 11–18°C. Скорость развития, как и у других пойкилотермных животных, определяется температурой окружающей среды и как правило составляет около трех недель. При инкубации в лабораторных условиях при постоянной температуре 14 градусов по Цельсию, вылупление эмбрионов

(предличинок) речной миноги происходит примерно через 2-2,5 недели после осеменения (Tsimbalov et al., 2018), а в случае колебаний температуры в диапазоне 11–15°C время до вылупления может составлять порядка двух недель (Hume et al., 2013). Такие сроки показывают, что в целом развитие эмбрионов миног происходит медленнее, чем у классических лабораторных объектов, в частности костистых рыб и амфибий. Это само по себе делает миног интересным объектом для исследования ранних этапов онтогенеза, когда у стандартных объектов все события происходят очень быстро и у представителей эволюционно более молодых групп оказываются несколько «сжаты» во времени. На сегодняшний день имеются подробные таблицы развития для нескольких видов миног: *Ichthyomyzon fossor*, *I. castaneus*, *I. unicuspsis* (Smith et al., 1968), *Petromyzon marinus* (Piavis, 1961; Smith et al., 1968; Richardson and Wright, 2003), *Lethenteron appendix* (Smith et al., 1968), *L. reissneri* (Tahara, 1988), *L. camtschaticum* (Kuratani et al., 2001), *Entosphenus tridentatus* (Reyes, 2008). Также имеются публикации, рассматривающие анатомию развития миног, в частности, работа Ричардсона и коллег (Richardson et al., 2010).

Вылупившиеся личинки миног – пескоройки через несколько дней после выхода из оболочек покидают свои гнёзда и расселяются по окрестной речной системе (Pavlov et al., 2014), где, как правило, проводят несколько лет (по разным данным от трёх до пяти).

Схема жизненного цикла миног представлена на Рисунке 2.

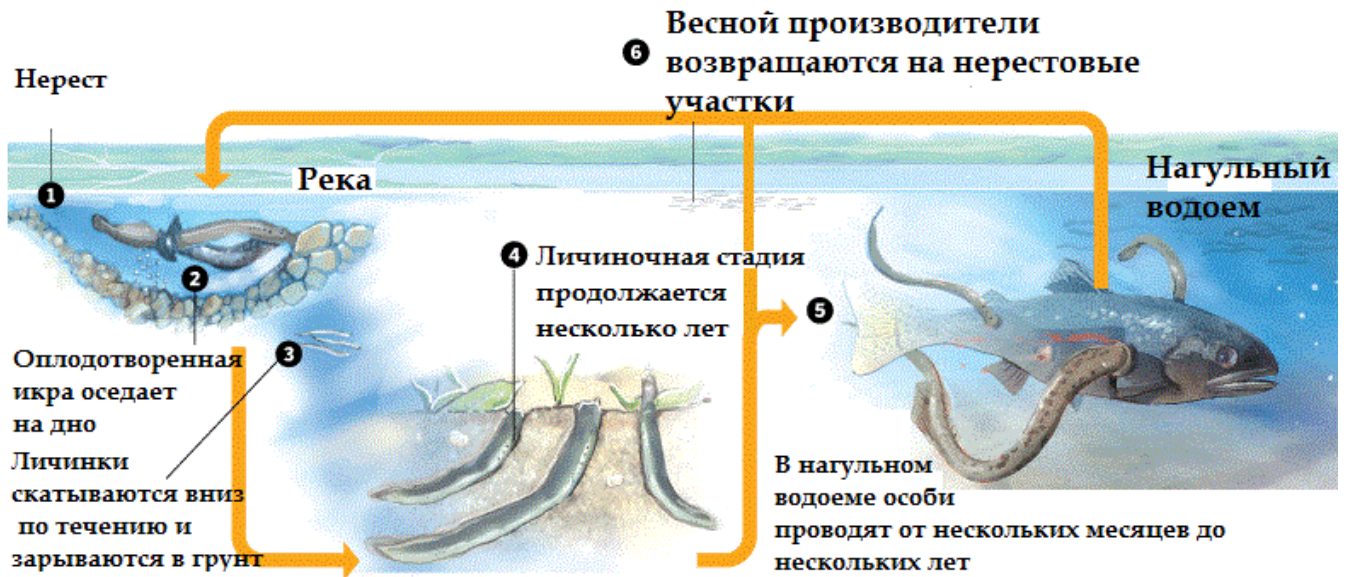


Рисунок 2. Схема, отражающая основные стадии жизненного цикла миноги (по U.S. Fish & Wildlife Service, <https://invadedplanet.wordpress.com/2017/11/20/not-a-demogorgon-lamprey-invasion-in-the-great-lakes/>).

По морфологическим характеристикам миноги имеют как общие с челюстноротыми признаки, так и ряд существенных отличий. К общим для миног и челюстноротых признакам можно отнести наличие головного и спинного мозг, хорды, черепа, жаберных дуг (хотя их морфологическое строение и взаимное расположение отдельных составляющих элементов у миног и челюстноротых различается). К числу отличий миног от челюстноротых относятся – отсутствие челюстей (отраженное в названии надкласса), и выполнение питательной функции ртом-присоской, формирующейся в ходе метаморфоза (личинка миноги пескоройка по пищевому поведению является фильтратором); открытый пинеальный орган (у челюстноротых преобразующийся в эпифиз), наличие во внутреннем ухе двух полукружных каналов, отсутствие парных конечностей (Kuratani et al., 2001; Osório and Retéux, 2007).

Миноги обладают рядом физиологических свойств, сходных с описанными у позвоночных, такими как регенеративные способности и адаптивный иммунитет. Так, описана способность миног регенерировать поврежденный спинной мозг и восстанавливать его функциональную

активность даже во взрослом состоянии (Cohen et al., 1986; Herman et al., 2018). Описанная система адаптивного иммунитета у миног также имеет общие черты с челюстноротыми, однако сформировалась, судя по всему, независимо (Osorio and Reteux, 2008; Kasamatsu, 2012).

При лабораторной работе с любым объектом критически важным является получение качественных геномных сиквенсов исследуемого организма. По большому счету, полноценная лабораторная работа становится возможной только при условии наличия таких сиквенсов. В случае миног качественное секвенирование оказалось непростой задачей по целому ряду причин. С технической стороны секвенирование ДНК миног затруднено высоким содержанием GC-пар в нуклеотидных последовательностях, что создает трудности для применения таких базовых рутинных лабораторных технологий как ПЦР и основанного на нем секвенирования по Сэнгеру (см Рисунок 3). Сборка полученных сиквенсов в скэффолды, а в дальнейшем в контиги и хромосомы затрудняется большим количеством хромосом в кариотипе миног, которые представляют собой последствия нескольких раундов геномных дупликаций в эволюции группы и присутствие большого количества высококопийных сателлитных элементов, значительная доля которых расположена в хромосомах, специфичных для зародышевой линии (Smith et al., 2013, 2018, Timoshevskiy et al., 2019, Nakatani et al., 2021). Можно лишь отметить, что для морской миноги с момента получения и публикации первых сиквенсов (в 2013 году, Smith et al., 2013) до момента получения полноценной версии генома собранной до хромосомного уровня (актуальная версия стала доступна в 2020 году: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_010993605.1/) прошло семь лет, а отдельные уточнения продолжают вноситься до сих пор (Timoshevskaya et al., 2023).

Еще одна особенность раннего развития миног – плановая геномная перестройка (PGR от **P**rogrammed **G**enome **R**earrangement), начинающаяся уже в ходе ранних клеточных делений. Эта перестройка генома включает

элиминирование части (около 20 процентов) полного генома, в абсолютных значениях - около 0.5 миллиардов нуклеотидов из общей протяженности генома порядка 2.3 миллиардов нуклеотидов (Smith et al., 2018). Начинаясь как правило на седьмом делении, такая перестройка продолжается до трёх суток, и после этого полная версия генома остается только в клетках зародышевой линии, а соматические клетки несут редуцированную версию. Это обстоятельство также замедлило получение полногеномного сиквенса миног, поскольку изначально секвенировался геном соматической ткани и только в 2018 году был отсеквенирован геном зародышевой линии (Smith et al., 2018). Сходная геномная перестройка наблюдается и в геноме миксин (Marlétaz et al., 2024).

Самым обстоятельно изученным видом миног (и круглоротых в целом) на сегодняшний день является морская минога *Petromyzon marinus*. Исторически исследование этого вида было обусловлено не только исключительно научным интересом, в частности, расположением миног на эволюционном древе позвоночных, но во многом и вполне прикладными прагматическими обстоятельствами, продиктованными влиянием этого вида на экосистему. В 1930-х годах, морская минога, попав в акваторию Великих озер, стала представлять значительную угрозу для местной ихтиофауны и спровоцировала вымирание некоторых популяций коммерчески важных видов рыб (Timoshevskaya et al., 2023). Таким образом, экономическая значимость экологического влияния вида, стимулировала его изучение.

Секвенирование и сборка генома морской миноги существенно упростила и стимулировала получение сиквенсов и других видов миног. На сегодняшний день, геномы со сборкой хромосомного уровня уже получены для трехзубой миноги (*Entosphenus tridentatis*), арктической миноги (*Lethenteron camtchshaticum*) и дальневосточной миноги *Lethenteron reissneri* (Hess et al., 2020, Nakatani et al., 2021). Разделение этих видов произошло около 12–13 миллионов лет назад (что примерно соответствует времени разделения линий орангутанга и человека), а отделение их предка от линии *P.*

marinus состоялось от 30 до 162 миллионов лет назад по оценкам разных авторов (Timoshevskaya et al., 2023, Marlétaz et al., 2023).

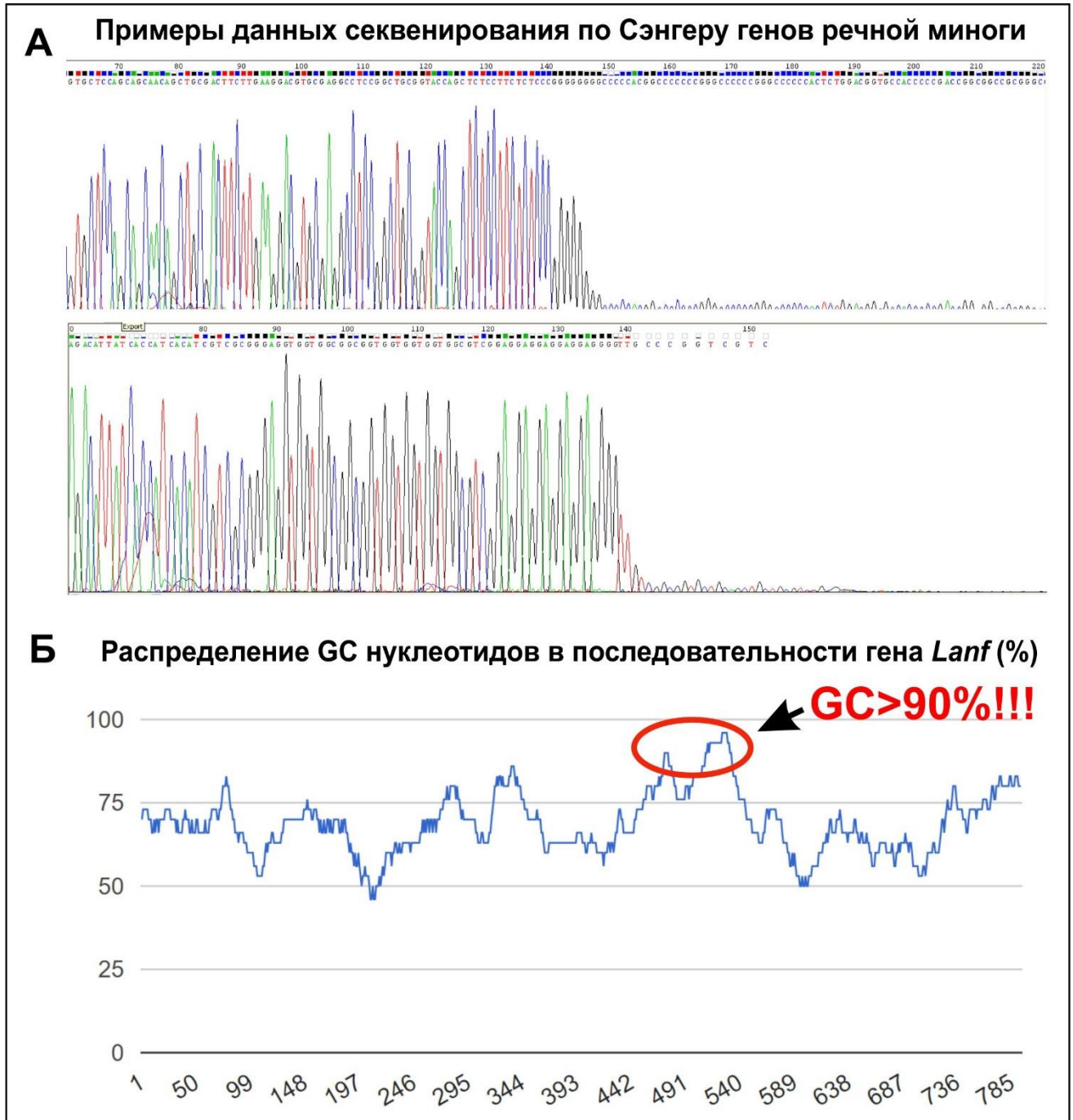


Рисунок 3. А – примеры сиквенсов генов миног, полученных в ходе выполнения настоящей работы, Б – нуклеотидная последовательность гена *lanf* речной миноги (см. ниже) с локальным содержанием GC пар более 90%.

При проведении филогенетического анализа генов миног, неоднократно обращал на себя внимание тот факт, что на филогенетических деревьях

миножьи гены, как правило, уверенней кластеризуются друг с другом, чем со своими ортологами у челюстноротых. Общее число генов у миног и челюстноротых при этом может быть одинаковым, что дополнительно свидетельствует в пользу их ортологии (Qiu et al., 2011). С целью изучения этого эффекта был проведен анализ гомеобоксных генов *Emx*, для которых уже была показана дупликация в линии миног (Tank et al., 2009). В результате оказалось, что уверенная кластеризация нескольких миножьих генов может быть следствием сходных, но независимых, преобразований их последовательностей в разных сестринских копиях (Noro et al., 2015). Такое свойство миножьих генов было названо «миножьим диалектом» (“lamprey dialect”) (Onimaru and Kuraku, 2018). Подобные изменения нуклеотидного состава генов миног, к сожалению, значительно снижают информативность применяемых стандартных методов и алгоритмов филогенетического анализа. В таких случаях возникает необходимость проведения дополнительных исследований другими методами. Информацию о родстве генов может дать анализ локальной геномной синтении, состоящий в оценке генов в окрестностях исследуемого гена и поиске гомологичных генов-соседей. Данные о сходстве регуляторных элементов можно получить путем анализа особенностей временной и пространственной экспрессии исследуемых генов. Информативным может оказаться и оценка функциональных свойств генов и их эволюционного консерватизма.

В целом можно отметить, что в последние годы неуклонно возрастает интерес к миногам как к «немодельному», но многообещающему объекту для лабораторных исследований (Green and Bronner, 2014; McCauley et al., 2015; Yang et al., 2016; Bayramov et al., 2018; York et al., 2019).

Несмотря на все вышеописанные трудности, в работе с миногами возможно применение многих современных лабораторных методик и подходов. При наличии половозрелых производителей, можно получить большое количество икры и эмбрионов с помощью искусственного осеменения в лаборатории, развивающиеся эмбрионы доступны для

проведения инъекций синтетических материалов (мРНК, морфолиновые олигонуклеотиды) *in vivo*. Удобно проводить анализ фенотипических эффектов, поскольку эмбрионы открыто развиваются в растворе и скорость их развития можно регулировать путем изменений температуры. Для анализа особенностей экспрессии исследуемых генов может быть применен метод гибридизации *in situ* как на целых эмбрионах, так и на срезах (Sugahara et al., 2015, Ermakova et al., 2020). Можно проводить экспериментальную модуляцию экспрессии исследуемых генов с помощью морфолинового нокдауна (Bayramov et al., 2016). Также описаны эксперименты по редактированию генома миног с помощью системы CRIPR/Cas (Square et al., 2015; Zu et al., 2016). Все эти технические возможности адаптации классических лабораторных методов для работы с миногами способствуют росту интереса к их исследованиям и накоплению новых данных по этой наиболее архаичной группе современных позвоночных.

1.2.2. Хрящевые рыбы - базальная филогенетическая ветвь челюстноротых

Хрящевые рыбы являются древнейшими представителями современных челюстноротых. Уникальное филогенетическое положение этой группы позвоночных объясняет возрастающий интерес к их исследованиям в последние годы, что напрямую отражается в существенно возросшем объеме доступной информации по секвенированным геномам и транскриптомам представителей хрящевых рыб (Seixas et al., 2023).

С морфологической точки зрения у хрящевых рыб есть ряд уникальных особенностей, таких как отсутствие плавательного пузыря, жаберной крышки, наличие плакоидной чешуи, гомологичной зубам позвоночных и, конечно, хрящевой скелет. Класс хрящевых рыб разделяется на два подкласса – Пластиножаберные (Elasmobranchii) и Цельноголовые (Holocephali).

Подкласс Пластиножаберных включает акул (надотряд Selachimorpha) и скатов (надотряд Batoidea) и насчитывает более 1200 различных видов (Amaral et al., 2018). Подкласс Цельноголовых включает химер (каллоринхов), которых описано около 56 видов (White et al., 2022). Благодаря филогенетическому положению, как одной из базальных эволюционных ветвей челюстных общих предок которой отделился от общего ствола с костными рыбами около 450 миллионов лет назад, исследования развития акул и скатов позволили получить много информации о морфологической эволюции позвоночных (Irisarri et al., 2017, Kuraku, 2021). Вопросы, которые ставятся в рамках эволюционной биологии развития хрящевых рыб, включают происхождение челюстного аппарата, происхождение парных конечностей, развитие мозжечка, дентиновой чешуи, жаберного аппарата (Kuraku, 2021).

Лабораторные исследования ранних стадий развития акул сопряжены с рядом технических трудностей, таких как необходимость содержания производителей в морском аквариуме достаточного объема, небольшое количество яиц, плотная непрозрачная оболочка яиц, затрудняющая точное определение стадий развития *in vivo* (Рисунок 3; Рисунок 4; Musa et al., 2018). В то же время, в силу эволюционной древности, исследования акул имеют большую ценность для понимания базовых механизмов раннего развития позвоночных в целом.

Отражением возрастающего интереса к исследованиям хрящевых стало секвенирование в последние годы целого ряда геномов представителей группы – большой белой акулы *Carcharodon carcharias* (Marra et al., 2019), зебровой акулы *Stegostoma tigrinum* (Yamaguchi et al., 2023), ежового ската *Leucoraja erinacea* (Marlétaz et al., 2023) и других. Доступная база данных с поисковым браузером, включающая геномы целого ряда представителей хрящевых была составлена и опубликована консорциумом Squalomix - <https://transcriptome.riken.jp/squalomix/blast/> (Nishimura et al., 2022).

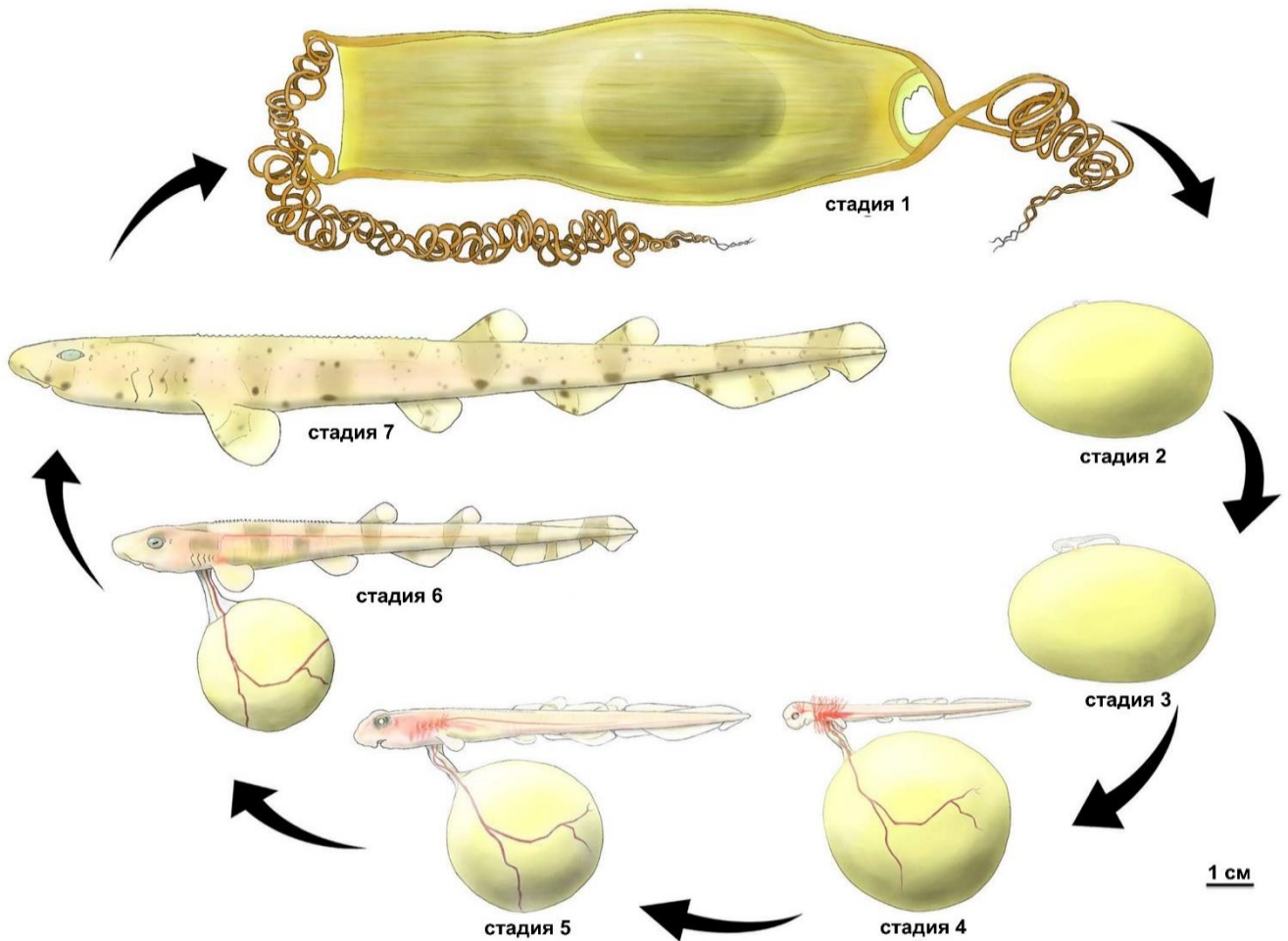


Рисунок 4. Схема основных стадий развития акулы (по Musa et al., 2018).

1.2.3. Осетрообразные – современные представители одной из древнейших групп челюстноротых

Осетрообразные (Acipenseriformes), представители подотряда, хрящевых ганоидов или хрящекостных рыб (Chondrostei), по некоторым оценкам отделились от общего эволюционного ствола позвоночных около 350 млн лет назад, вскоре после разделения линий лучеперых и двоякодышащих рыб (Sallan, 2014). Для осетрообразных характерна низкая скорость эволюционных изменений, а раннее развитие икры внешне больше похоже на развитие икры амфибий, чем рыб, что свидетельствует в пользу их архаичности (Liu et al., 2018; Du et al., 2020; Cheng et al., 2021). Особенностью генотипа осетрообразных является наблюдаемая у них

полиплоидия, с числом хромосом от 120 до 360–380 у разных видов (Havelka et al., 2013). Такая склонность к полиплоидизации может объясняться, хотя бы отчасти, тем, что анализ генома не выявил у представителей осетровых (стерляди) выраженных половых хромосом, наличие которых, как указывалось ранее, может служить ограничителем дупликационных изменений (Du et al., 2020). Таким образом в целом геном осетрообразных претерпел как минимум три раунда полногеномных дупликаций – два раунда, согласно современным представлениям, общих для челюстноротых (Nakatani et al., 2021; Bayramov et al., 2023) и как минимум один раунд в линии осетрообразных. Исследователи склоняются к тому, что полиплоидия осетров носит автоплоидный характер. При этом, неожиданным оказался очень высокий процент сохранения генов после дупликаций – в среднем около 70%, а для отдельных групп генов, таких как гены глутаматных рецепторов – до 88.5%. Восемь кластеров *Нох*-генов у стерляди насчитывают 88 генов. При этом отмечается, что, в отличие от костистых рыб, утрата генов у осетров как правило происходит вследствие утраты крупных участков генома – плеча хромосомы или даже хромосомы целиком без заметных перестроек в геноме, вследствие чего хромосомы осетров в основном имеют дискретно диплоидный или тетраплоидный статус.

Вопрос сроков геномной дупликации в линии осетрообразных остается на сегодняшний день дискуссионным. Рассматриваются два альтернативных сценария: 1) дупликация на уровне общего предка осетрообразных (то есть общая для сестринских ветвей *Polyodon* и *Acipenser*) и 2) независимые дупликации в каждом из этих родов. Первый сценарий описан в качестве модели предкового разрешения онологов (Ancestral Ohnologue Resolution (AOR)), а второй – модели специфичного для линии разрешения онологов (Lineage-specific Ohnologue Resolution (LOR, по Robertson et al., 2017; Redmond et al., 2023). Эти сценарии сначала исследовались на примере дупликации лососевых рыб, геном которых в дополнение к общим для челюстноротых двум раундам ПГД претерпел еще две дупликации –

специфичную для костистых и еще один раунд на уровне общего предка лососевых (Robertson et al., 2017). Сроки дубликации костистых оцениваются около 320 млн лет назад, в то время как дубликация у лососевых предположительно произошла около 80-90 млн лет назад (Glasauer and Neuhauss, 2014; Macqueen and Johnston, 2014; Lien et al., 2016). Для эволюционной линии осетрообразных также была описана специфическая геномная дубликация (Du et al., 2020), однако при этом у генов этой группы наблюдались филогенетические паттерны характерные как для AOR, так и для LOR моделей. Это привело к выдвижению модели предковой дубликации с последующей асинхронной редиплоидизацией (Redmond et al., 2023). Тетраплоидное состояние, возникающее в результате геномной дубликации, рассматривается как неустойчивое (в том числе в силу возникающей мультивалентности хромосом) и после дубликации геном проявляет тенденцию к возврату в диплоидное состояние. Это может происходить разными способами. Один из них – возврат к диплоидности путем элиминирования вторых копий. Другой путь – функциональная дивергенция дублицировавшихся генов и участков хромосом, когда они перестают быть идентичными. Этот процесс может быть растянут по времени и, если видообразование (произошедшее, к примеру, в силу экологически причин) застанет этот процесс редиплоидизации на полпути, при филогенетическом анализе может наблюдаться смешение паттернов кластеризации генов, характерных для AOR и LOR моделей (Redmond et al., 2023).

Из хрящевых ганоидов в последние годы стали доступны геномы представителей осетрообразных - стерляди *Acipenser ruthenus* (Du et al., 2020), *Polyodon spathula* (Cheng et al., 2021, Bi et al., 2021).

1.3. Подходы и методы исследования особенностей экспрессии и функциональных свойств генов у немодельных объектов

В ходе изучения особенностей экспрессии и функциональных свойств гена (или группы генов) у объекта, который не относится к числу традиционных лабораторных моделей, часто приходится сталкиваться с ситуацией, когда ген не описан у исследуемого животного, но гомологи его известны у представителей других групп (Ваурамов et al., 2021). В таком случае возможен следующий алгоритм исследования (схематично он представлен на Рисунке 5, а также подробно рассмотрен в статье Ермакова et al., 2021, <https://doi.org/10.1134/S0031030121070030>).

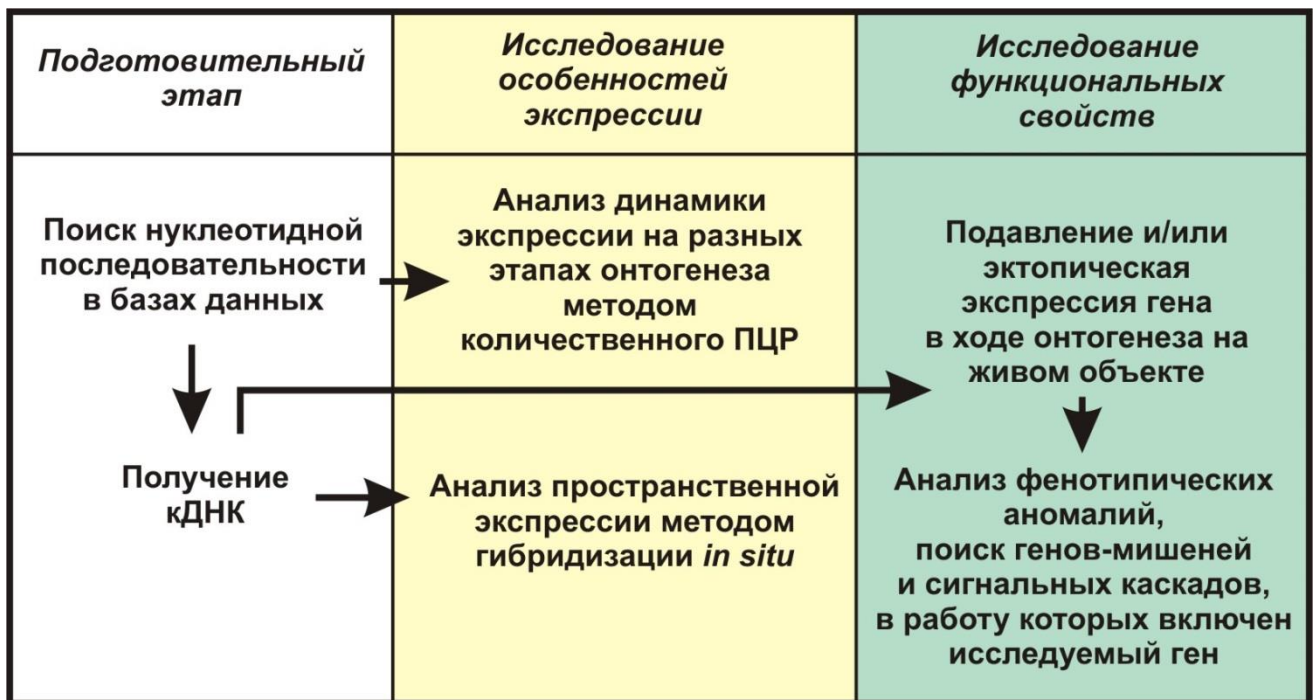


Рисунок 5. Алгоритм исследования особенностей экспрессии и функциональных свойств отдельного гена у модельного объекта.

Начинается исследование с поиска последовательности исследуемого гена в доступных базах данных геномных ДНК и транскриптомов исследуемого организма. За основу при таком поиске берутся, как правило, уже описанные последовательности гомологов этого гена у других групп позвоночных.

После того, как найдена последовательность исследуемого гена нужно получить его кДНК в материальном виде. Это можно сделать методом обратной транскрипции, с последующей амплификацией нужного гена в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Для этого из тканей изучаемого животного выделяется тотальная РНК, образцы которой содержат в себе и мРНК всех транскрибируемых на момент взятия образца генов. Затем, с помощью фермента обратной транскриптазы, на основе этой матричной мРНК синтезируется комплементарная цепь кДНК которая, в свою очередь, выступает матрицей для дальнейшей амплификации интересующего нас гена в ПЦР.

На выходе получается фрагмент кДНК исследуемого гена, который может быть клонирован в экспрессионный вектор (бактериальную плазмиду), который может быть использован для решения экспериментальных и практических задач.

Исследование пространственного паттерна экспрессии можно исследовать методом гибридизации *in situ* на целых эмбрионах и гистологических срезах (Рисунок 6). Этот метод позволяет визуализировать на зафиксированном в параформальдегиде целом эмбрионе, или его срезах области, в которых присутствует мРНК, т.е. происходила на момент фиксации активная транскрипция исследуемого гена. Для этого на полученной ранее кДНК в качестве матрицы проводится *in vitro* транскрипция антисмысловой мРНК нашего гена (т.е. мРНК зонда читается в обратном направлении с 3'-конца гена и получается комплементарной нормальной мРНК). При этом, в транскрипции используются меченые нуклеотиды, которые в дальнейшем дадут специфическую окраску. В ходе процедуры гибридизации задача состоит в том, чтобы пропитать зафиксированный ранее эмбрион раствором, содержащим антисмысловую меченую мРНК (зонд) и дать ей возможность там, где присутствует нормальная эндогенная мРНК нашего гена, сформировать двойную спираль по принципу комплементарности (гибридизоваться). После этого избыток

антисмысловой мРНК отмывается и производится «проявка», т.е. окрашивание гибридизовавшегося зонда. В результате на эмбрионе видны области транскрипции исследуемого гена.

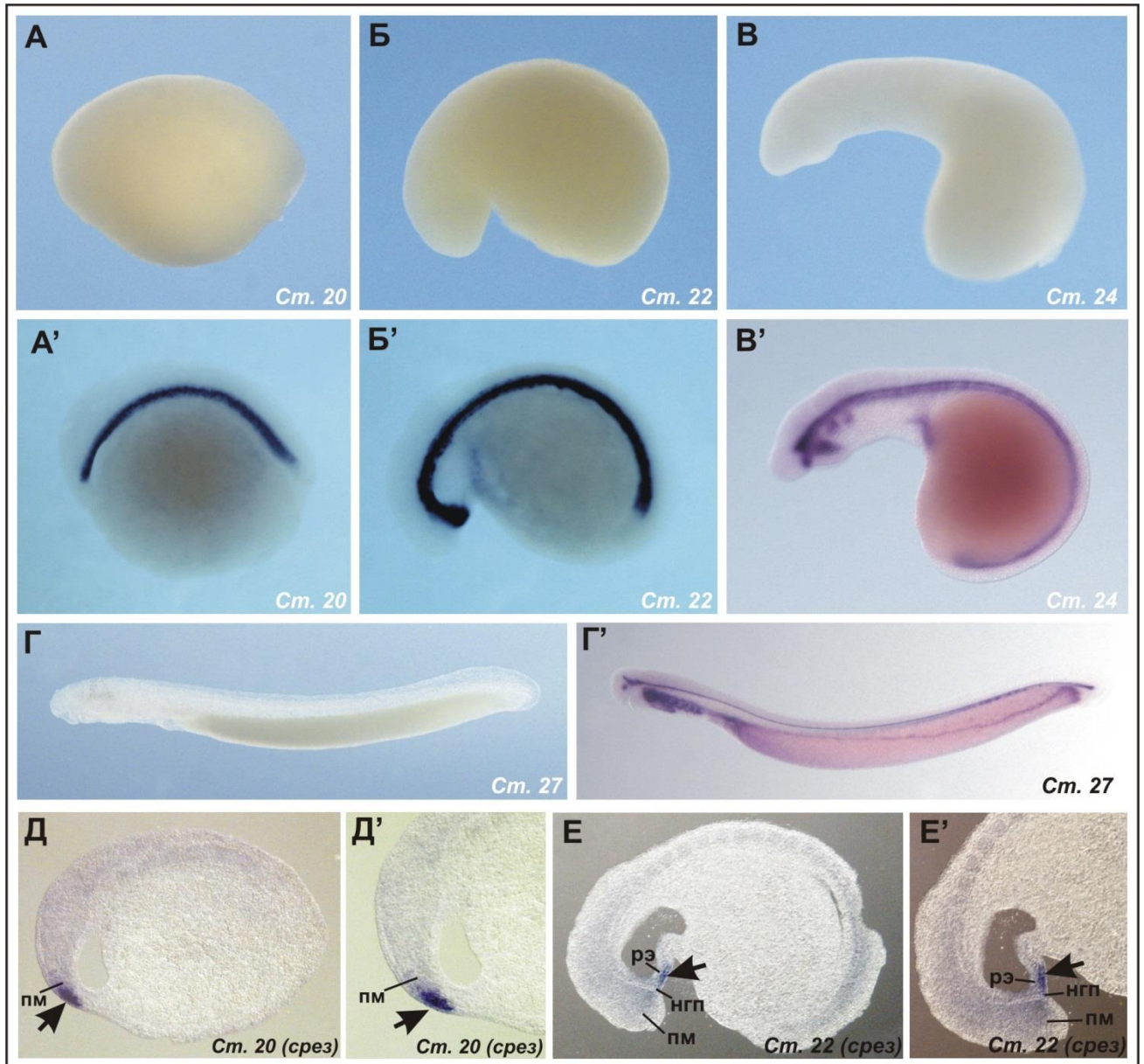


Рисунок 6. Анализ экспрессии генов *sonic hedgehog* и *lanf* в раннем развитии речной миноги методом гибридизации *in situ*.

А - Г' - Анализ паттерна экспрессии гена *sonic hedgehog* на целых эмбрионах.

А, Б, В – общий вид эмбрионов речной миноги на указанных стадиях развития.

А', Б', В' – визуализация экспрессии гена *sonic hedgehog* в нотохорде методом гибридизации *in situ*.

Д - Е' - паттерн экспрессии гена *lanf* на сагиттальных срезах эмбрионов миног. Область экспрессии *lanf* показана стрелками, пм – передний мозг, рэ – ротовая эктодерма, нгп - назально-гипофизарная плакода.

Анализ динамики экспрессии генов во времени проводится методом количественной ПЦР в реальном времени. От обычного ПЦР этот метод отличается тем, что позволяет не только получить готовый продукт, но и отслеживать динамику его наработки в реакции, за счет добавления в реакционную смесь интеркалирующего красителя и анализа уровня его сигнала после каждого раунда ПЦР. Это позволяет повысить чувствительность метода и формализовать обработку результатов, что важно при анализе уровней экспрессии на больших сериях образцов.

Функциональные исследования генов проводятся, как правило, путем модуляции их активности на живых эмбрионах выбранного модельного объекта. С одной стороны, можно ингибировать экспрессию гена и это информативно с точки зрения анализа его эндогенной функции. Проблема в том, что большинство генов полифункциональны и вовлечены в регуляцию нескольких процессов, причем вклад в развитие может по-разному проявляться на разных стадиях. В этих случаях подавление экспрессии может приводить к целому спектру аномалий, как прямых, так и опосредованных, которые не всегда возможно однозначно трактовать. Кроме того, зачастую, нарушения экспрессии важных регуляторов, особенно на ранних стадиях онтогенеза, может приводить к летальному исходу, что полностью отменяет возможность исследования долгосрочных эффектов. Таким образом, подход, основанный на ингибировании активности исследуемых генов, очевидно, может сталкиваться с определенными ограничениями. Тем не менее, ввиду своей высокой потенциальной информативности, он активно применяется и здесь возможны некоторые методологические вариации. Можно ингибировать активность гена на уровне мРНК – за счет малых интерферирующих РНК или их более устойчивых аналогов – морфолиновых олигонуклеотидов (МО) (Summerton and Weller, 1997; Рисунок 7). Разработчиком МО и их производителем в настоящее время является компания GeneTools (<https://www.gene-tools.com/>). Этот метод достаточно прост в применении – короткие антисмысловые фрагменты,

комплементарные 5'-области мРНК исследуемого гена инъецируются в развивающийся эмбрион в самом начале дробления (как правило стадия 2-4 бластомеров). Попадая в цитоплазму эти фрагменты специфически связываются с областью стартового кодона, тем самым физически блокируя рибосоме возможность начать трансляцию белка. Этот метод успешно применяется на объектах таких объектах, как рыбы и амфибии, икра которых развивается открыто в водной среде и доступна для экспериментальных манипуляций.

Другой подход, набирающий популярность в последнее время – редактирование генома на уровне ДНК с применением системы CRIPR/Cas (Asmatow and Zawdie, 2021). В этом случае в эмбрион вводится фермент каспаза и специфические олигонуклеотиды, которые указывают ферменту locus введения двуцепочечного разрыва в цепь ДНК, который приводит к инактивации гена. Этот метод пока выглядит несколько более трудоемким, особенно в части корректного анализа результатов.

Еще одно направление исследования функциональной активности гена – это экспериментальное повышение уровня его экспрессии и эктопическая экспрессия, т.е. экспрессия за пределами нормального паттерна (Рисунок 8). Самый распространенный подход в этом случае – инъекции синтетической мРНК гена в живые эмбрионы. Для визуализации области, содержащей инъецируемую мРНК к ней, как правило, добавляется флуоресцентный краситель, не оказывающий влияния на развитие эмбрионов.

В дальнейшем, эмбрионы, подвергнутые экспериментальной модуляции экспрессии исследуемого гена, могут быть проанализированы по ряду параметров (Рисунок 8).

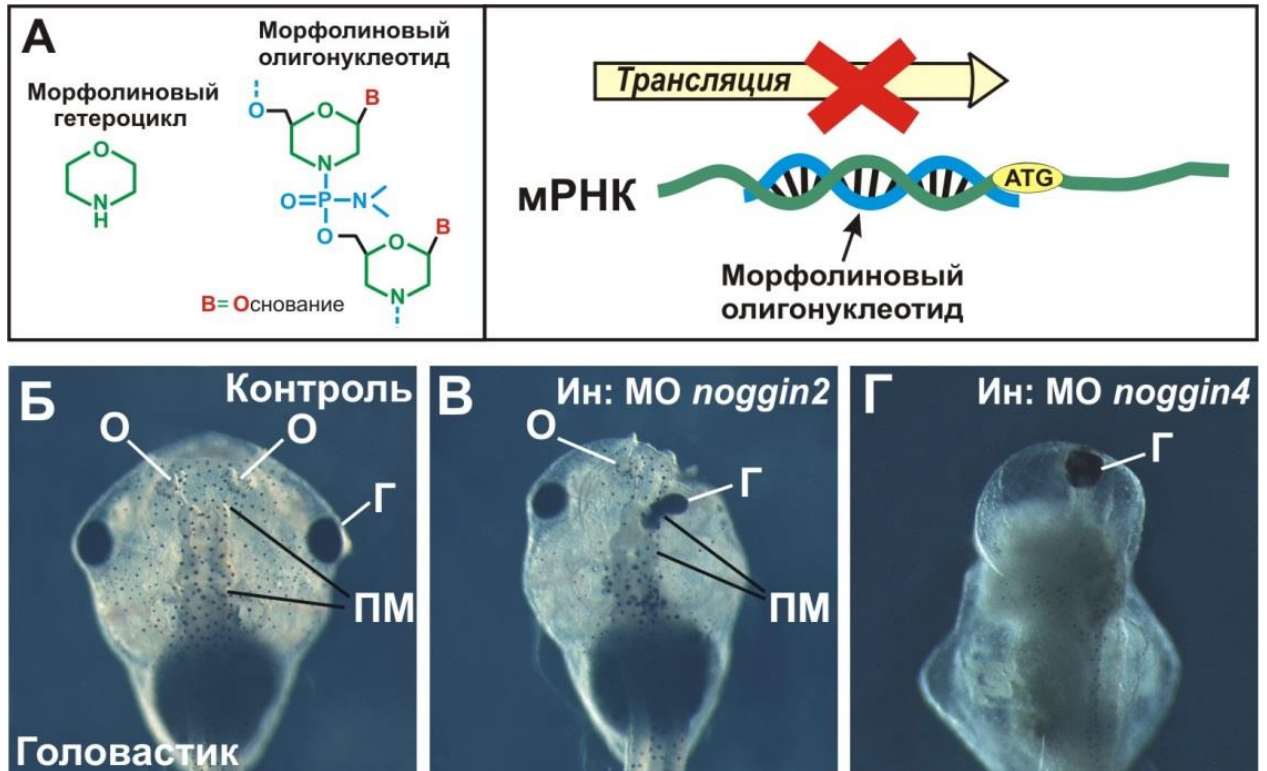


Рисунок 7. А - Ингибирование трансляции эндогенных мРНК путем микроинъекций в эмбрионы антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (МО). Б – Г – подавление экспрессии генов *noggin2* и *noggin4* приводит к аномалиям развития головных структур у головастика шпорцевой лягушки. ПМ – передний мозг, О – обонятельные капсулы, Г – глаза (по Ermakova et al., 2021).

В первую очередь это фенотипические эффекты. Здесь оцениваются морфологические аномалии развития эмбрионов, подвергнутых воздействию по сравнению с контрольной выборкой.

Затем, как правило, анализируется влияние модуляции исследуемого гена на экспрессию и активность других генов и сигнальных каскадов. Для этого вполне подходят уже описанные методы количественного ПЦР и гибридизации *in situ*. Просто, в данном случае, оцениваться будут динамика и паттерн экспрессии уже не исследуемого гена, а его потенциальных мишеней.

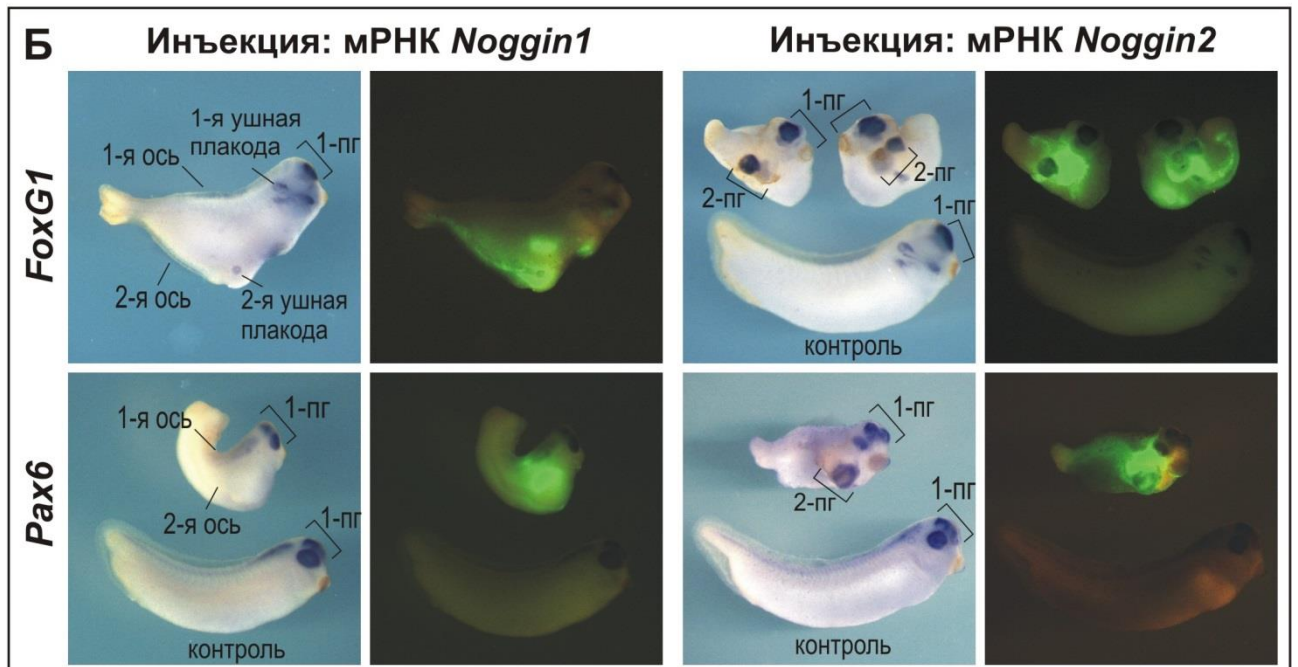
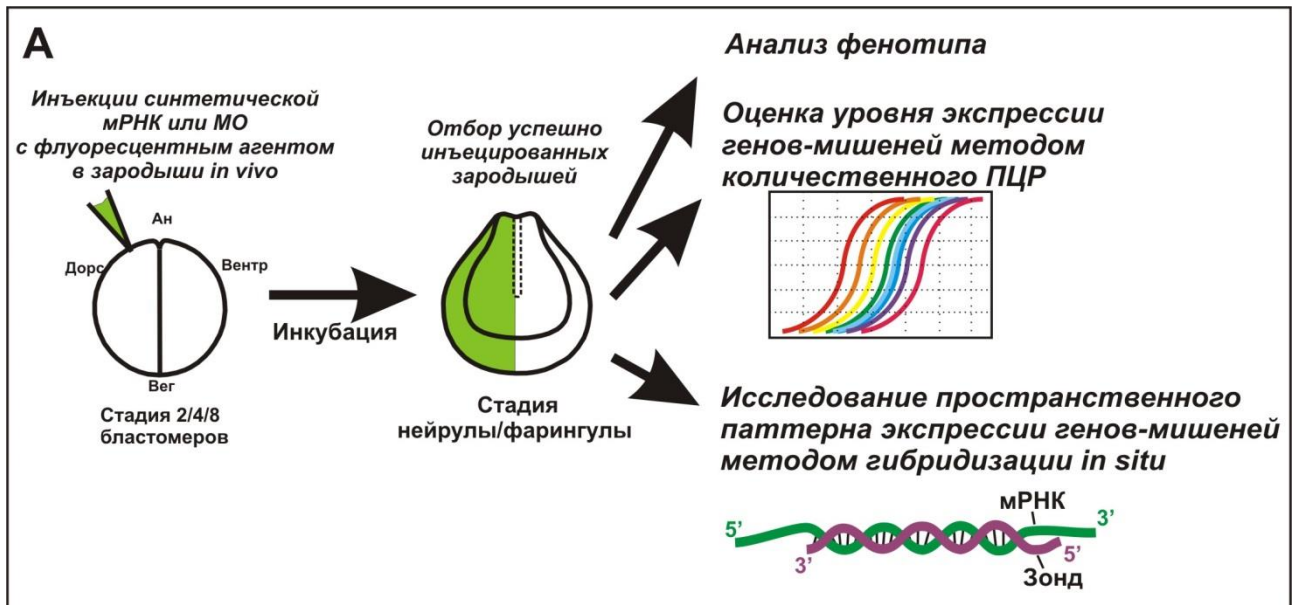


Рисунок 8. А - Алгоритм исследования влияния эктопической экспрессии целевого гена на развитие эмбрионов и экспрессию потенциальных генов-мишеней. Б – экспериментальная эктопическая экспрессия генов *noggin1* и *noggin2* приводит к индукции вторичных осей тела у эмбрионов шпорцевой лягушки. В случае эктопической экспрессии гена *noggin2* формируются полные оси, содержащие переднеголовые структуры, в которых наблюдается индукция экспрессии переднеголовных генов *foxg1* и *rax6*.

Для количественной оценки способности исследуемого гена влиять на активность того или иного внутриклеточного сигнального каскада применяется подход, основанный на использовании люциферазных репортерных конструкций. В качестве таких конструкций могут выступать

химерные конструкции, содержащие регуляторные элементы, распознаваемые специфическими транскрипционными факторами, в норме являющимися эффекторами исследуемых сигнальных каскадов, под контролем которых находится ген люциферазы. В этой конструкции участок с цис-регуляторными элементами выступает в роли сенсора активности каскада, а ген люциферазы – в качестве репортера, активность которого можно количественно оценить. Для каждого каскада используются специфические репортерные конструкции, содержащих ген люциферазы под контролем промотора, содержащего цис-регуляторные элементы (последовательности нуклеотидов), которые распознаются транскрипционными факторами-эффекторами, участвующими в функционировании данного сигнального каскадов. При специфическом связывании такого белка - эффектора с регуляторными элементами репортерных конструкций происходит активация экспрессии гена люциферазы и, как следствие, накопление белка люциферазы в эмбрионах по мере их культивирования. Количество белка люциферазы в эмбрионах может быть оценено путем измерения люминисценции в растворе с помощью люминометра.

Для понимания механизма влияния исследуемого гена на активность того или иного гена мишени или сигнального каскада часто возникает необходимость оценить способность белка, кодируемого нашим исследуемым геном связываться с другими белками, лигандами или ко-факторами.

Для определения способности белков взаимодействовать друг с другом применяются методы ко-иммунопреципитации и иммуноблоттинга. Суть метода ко-иммунопреципитации состоит в том, что, синтетические мРНК, кодирующие меченые специфическими полипептидами исследуемые белки, микроинъекцируются в эмбрионы на стадиях 2-4 бластомеров. После микроинъекций эмбрионы инкубируются какое-то время, и затем проводится тотальное выделение синтезированных в них белков.

Лизаты, содержащие наработанные белки, способность к связыванию которых исследуется в эксперименте, могут в дальнейшем смешиваться и инкубироваться.

При условии способности исследуемых белков взаимодействовать друг с другом, в результате инкубации смеси лизатов эмбрионов, содержащих исследуемые белки, между ними происходит образование белковых комплексов. Благодаря наличию в исследуемых белках, мРНК которых были экспериментально микроинъецированы в эмбрионы, полипептидных меток разных типов, каждый из этих белков при очистке может быть специфически и независимо абсорбирован при помощи аффинных сорбентов на основе агарозы с иммобилизованными моноклональными антителами.

После специфической абсорбции одного из исследуемых белков на смоле и последующей его элюации со смолы, методом иммуноблоттинга определяется наличие в элюате другого исследуемого белка. Это проводится при помощи специфических к аминокислотной последовательности-метке антител. В результате, наличие в элюате обоих исследуемых белков (при том, что на смоле специфически абсорбировался лишь один из них), указывает на способность этих белков напрямую взаимодействовать (связываться) друг с другом.

Все эти описанные подходы применялись при исследовании особенностей экспрессии и функциональных свойств генов, представленных в настоящей работе.

1.4. Геномные дубликации, как важнейшая предпосылка эволюционного успеха позвоночных

Гипотеза о возможном вкладе полногеномных дубликаций в эволюционные преобразования позвоночных впервые была выдвинута Сусуму Оно (Susumo Ohno) в 1970 г. в его классической книге «Эволюция путем дубликации генов» (Evolution by Genes Duplications, Ohno, 1970).

Подробно современное состояние проблемы полногеномных дубликаций рассмотрено в обзорных статьях Байрамова и соавторов «Геномные дубликации как основа эволюционного успеха позвоночных», 2021 (Bayramov et al., 2021, <https://doi.org/10.1134/S1062360421030024>) и «Реконструкция предковых геномов как ключ к пониманию ранней эволюции генотипа позвоночных», 2023 (Bayramov et al., 2023, DOI: 10.1134/S1062360423070020).

Как следует из самого их названия, полногеномные полиплоидизации (и дубликации, как наиболее частый их вариант) приводят к увеличению в организме количества копий (в случае дубликации – удвоению) всех хромосом. Кроме полногеномных, возможны и локальные удвоения отдельных участков генома или отдельных генов. Считается, что полногеномные дубликации могут случаться как следствие нарушений мейотических процессов или при митотических удвоениях в материнских половых клетках или на ранних этапах онтогенеза (Van de Peer 2009, 2017, Moriyama and Koshiya-Takeushi, 2018). В плане потенциала для эволюционных преобразований, существенным результатом полногеномных дубликаций является то, что их результатом становится увеличение копий не только смысловых белок-кодирующих элементов (генов или всего набора генов организма, т.е. экзома), но и удвоение некодирующих участков, которые содержат регуляторные последовательности и определяют активность и паттерны экспрессии сами генов.

Распространенным сценарием после полиплоидизации является возврат к исходному диплоидному состоянию – ре-диплоидизация. Это происходит по мере накопления хромосомами большого количества изменений, в результате чего они перестают быть квадριвалентными в мейозе (MacKintosh and Ferrier, 2017). В результате ре-диплоидизации восстанавливается изначальная парность имеющихся хромосом, а организм снова становится диплоидным. Однако, несмотря на утрату полиплоидности и возврат к исходному диплоидному статусу, прошедшие такой путь геномы как правило

все же, сохраняют отдельные последствия (признаки) своего полиплоидного периода, в качестве которых выступают дублицированные копии отдельных генов. В некоторых случаях бывает непросто установить являются ли такие копии результатом полногеномной полиплоидизации с последующей редиплоидизацией или имело место простое удвоение числа отдельных генов (Redmont et al., 2023).

Согласно современным представлениям, полногеномных дубликаций, результаты которых сохранились в генотипах организмов в течение дальнейшей эволюции произошло не так много и у растений они наблюдаются чаще, чем у животных (MacKintosh and Ferrier, 2017). По некоторым оценкам, до 35 процентов современных растений являются полиплоидными, а у животных этот показатель существенно ниже - менее 1 процента (David, 2022). У некоторых классов позвоночных (птицы, млекопитающие) примеры подиплоидов до сих пор не описаны. Такую разницу традиционно связывают с ограничениями полового размножения у животных, наличием в их кариотипе обособленных половых хромосом и с высоковероятным нарушением определения половой принадлежности у животных при их полиплоидизации (Mable, 2004; Orr, 1990; Wertheim et al., 2013). Кроме того, показано, что оплодотворение яйцеклетки двумя сперматозоидами или мейотические нарушения, часто приводят к несовместимым с жизнью нарушениям у млекопитающих и птиц (Sahoo et al., 2017, Forstmeier et al., 2010).

На сегодняшний день общепринятой является точка зрения, согласно которой в ранней эволюции позвоночных (на горизонте порядка 500 млн лет назад) произошли одна или две полногеномные дубликации. В течение дальнейшего эволюционного развития позвоночных отдельные полногеномные дубликации происходили у рыб: у осетрообразных, у костистых рыб, а в последующем и у отдельных групп этой клады, например, лососевых (Du et al., 2020, Meyer et al., 2005, Dehal and Boore, 2005). Примером тетраплоидизации у рыб выступают и два близких вида костистых

– обыкновенный карп (сазан) *Cyprinus carpio* и золотая рыбка *Carassius auratus* (Li et al., 2021, Chen et al., 2019). Предполагается, что полиплоидизация произошла у общего предка этих видов около 12-14 млн лет назад.

Среди наземных позвоночных тетраплоидизация описана у классического лабораторного объекта - шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Высказывается предположение, что пара диплоидных предков данного вида, разделившись около 34 миллионов лет назад, в последствие гибридизовалась около 17-18 миллионов лет назад, сформировав тетраплоидный организм (Session et al., 2016). Хромосомный набор *X. laevis*, включающий 36 хромосом возник вследствие гибридизации двух предковых 18-хромосомных видов. В последствии два субгенома эволюционировали асимметрично, в результате чего L-субгеном остался более консервативным, а S-субгеном подвергся более существенным перестройкам, в том числе выпадениям отдельных участков (Session et al., 2016). Наблюдаемое сегодня соотношение сохранности паралогов в двух субгеномах *X. laevis* равно 1.35 (Nakatani et al., 2021).

Дупликации также описаны у беспозвоночных - две у паукообразных и одна у коловраток (Nossa et al., 2014, Schwager, 2017, Kenny et al., 2016, Flot et al., 2013).

Было показано, что современные диплоидные пивные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, и пять близких к ним родов возникли в результате геномной дупликации их общего предка, случившейся ориентировочно 100 миллионов лет назад (Scannell, 2007).

Последствия четырех полногеномных дупликаций, имевших место около 150–200 миллионов лет назад были описаны у цветковых растений (Soltis et al., 2008, 2009).

У грибов обнаружены последствия одной полногеномной дупликации (Scannell et al., 2007).

Полученные данные демонстрируют, что полногеномные дубликации случались в разные эволюционные периоды в самых разных линиях живых организмов. В то же время, если принимать во внимание эволюционные временные масштабы, можно констатировать, что результирующие полногеномные дубликации на эволюционном пути происходили все же достаточно редко – они представляют собой единичные события на горизонтах в десятки и сотни миллионов лет.

При взгляде на филогенетическое дерево можно отметить, что закрепившиеся в эволюции полногеномные дубликации происходили у столь успешных и разнообразных линий живых организмов, как цветковые растения и позвоночные животные (Moriyama and Koshiba-Takeushi, 2018, Meyer et al., 2005, Dehal and Boore, 2005, Jaillon et al., 2004, Tang et al., 2008, Putnam et al., 2008). Напрашивается предположение, что предпосылки для эволюционного успеха и состоявшегося освоения многообразных экологических ниш представителями этих эволюционных линий во многом были созданы именно дубликациями геномов их предков.

Попытки выявления общих характеристик успешных полногеномных дубликаций приводят к выводу, что большая часть успешных дубликаций представляли собой гибридизации между видами с различающимися геномами (или аллоплоидными дубликациями). Правда, полногеномная дубликация костистых рыб, как и последовавшая за ней дополнительная геномная дубликация у лососевых рассматриваются как автоплоидные (дубликация собственного генома вида) (MacKintosh and Ferrier, 2017; Christensen and Davidson, 2017; Martin and Holland, 2014). Предполагается вероятность того, что значительные различия родительских хромосом в случае аллоплоидизации подталкивают к более быстрому восстановлению диплоидного состояния геномов потомков, уже упоминавшейся выше ре-диплоидизации. В случае автоплоидизации ре-диплоидизация больше растянута во времени и носит более градиентный характер (Otto, 2007).

Хотя чаще всего после полногеномных дупликаций происходит утрата большинства дублицировавшихся генов (подробнее варианты судьбы генов после дупликации будут рассмотрены ниже), низкий процент «выживания» дочерних копий генов после дупликаций не свидетельствует о несущественности вклада дупликаций в эволюционную судьбу организмов. Сравнительный анализ показывает, что геномы позвоночных, прошедших через полногеномные дупликации, в среднем содержат большее количество генов, чем обнаружено у их ближайших родственников (беспозвоночных хордовых), причем это обогащение функционально не равномерно. Так, по сравнению с ланцетником *Branchiostoma floridae*, в геномах позвоночных присутствует больше генов транскрипционных факторов и генов, связанных с развитием нервной системы (Putnam et al., 2008). Иными словами, то, что тетраплоидизация и, как правило, следующая за ней ре-дупликация, не выражаются в кратном увеличении общего числа генов, эти события могут приводить к обогащению генома отдельными подмножествами функционально важных генов, вовлеченных в формирование определенных признаков и свойств организмов (Brunet et al, 2006).

Копии генов, появившиеся в результате полногеномных дупликаций, были названы онологами, в честь Сусумо Оно, первым обратившим внимание ученого сообщества на проблему геномных дупликаций.

Подробно вероятные сценарии судьбы дублицировавшихся генов рассмотрены в ряде обзорных статей:

Здесь лишь вкратце отметим, что возможны несколько основных вариантов (Рисунок 9):

- утрата функциональности или исчезновение одной из дочерних копий (нефункционализация) представляет собой наиболее вероятный сценарий, по некоторым оценкам затрагивающий до 85% дублицировавшихся генов (Brunet et al., 2006)

- разделение функций материнского гена между дочерними копиями (субфункционализация). Возможен вариант пространственного разделения

функций, что, как правило, сопряжено с накоплением различий в регуляторных областях, приводящим к изменениям паттернов экспрессии рассматриваемых копий гена). Другой вариант - распределение двух или нескольких функций исходного гена между дочерними копиями.

- появление у дублицировавшегося гена новой функции (неофункционализация), что является маловероятным, но наиболее продуктивным сценарием (Glasauer and Neuhauss, 2014).

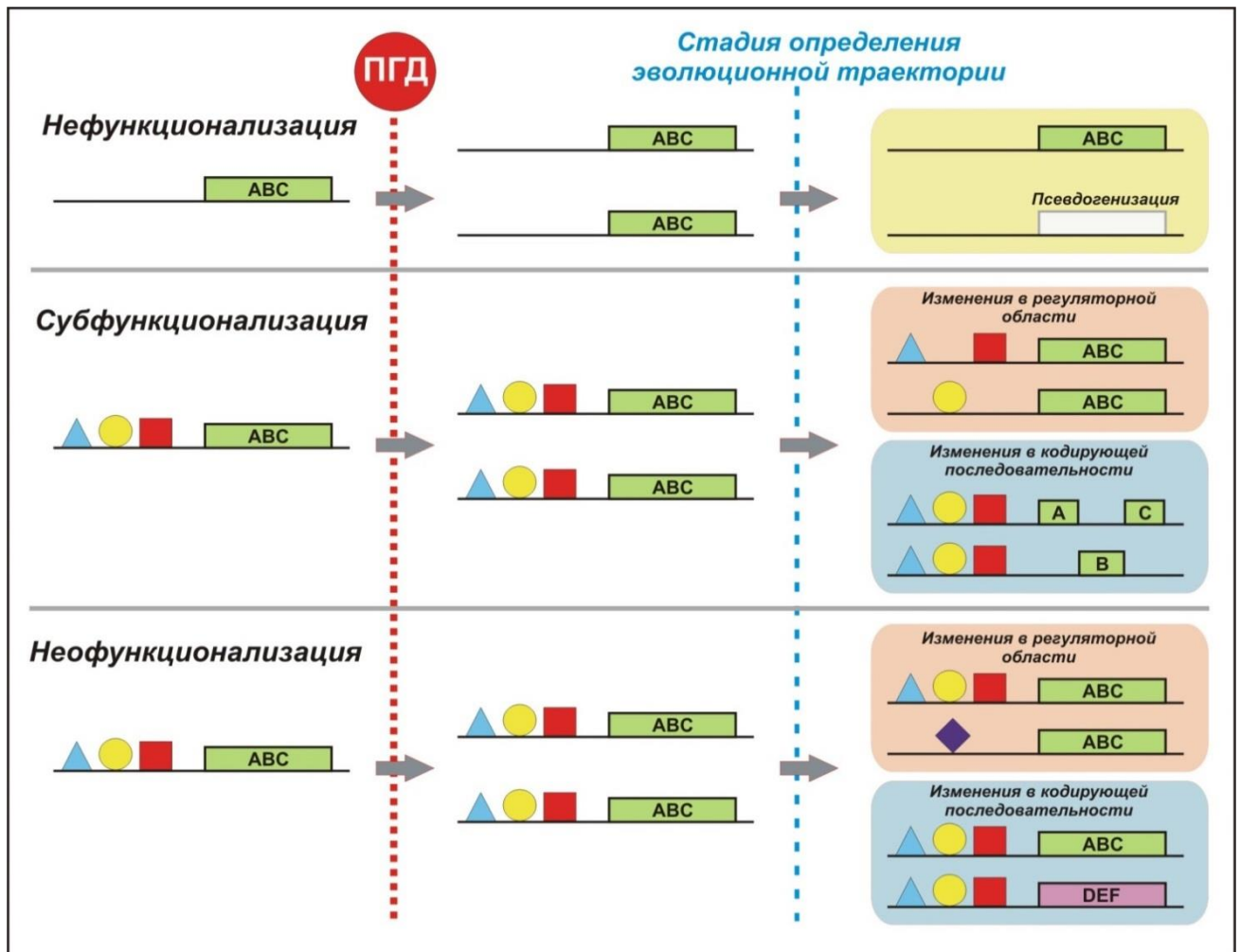


Рисунок 9. (по Bayramov et al., 2021, Moriyama and Koshiba-Takeushi, 2018). Варианты сценариев эволюции дублицированных генов.

Как и в случае субфункционализации, такая «перспективная» мутация может случиться в регуляторной (чаще) или кодирующей (реже) последовательностях гена (Kassahn et al. 2009, Braasch et al. 2006; Douard et al. 2008). Показано, что происходящие в результате мутационных изменений

в регуляторных областях генов нарушения и сдвиги исходных паттернов их экспрессии отражаются в морфологических изменениях (Vuolo et al., 2016; Guerreiro et al., 2013, Moriyama and Koshiba-Takeushi, 2018).

1.4.1. Модели полногеномных дупликаций в ранней эволюции позвоночных

По вопросу полногеномных дупликаций, произошедших на ранних этапах эволюции позвоночных, на сегодняшний день консенсусным мнением является признание как минимум двух раундов ПГД у круглоротых и челюстных. При этом, как правило, наблюдается консенсус в том, что один раунд произошел на уровне общего предка до разделения этих двух линий (Holland and Osampó Daza, 2018). А вот вопрос тайминга второго раунда (и вероятных последующих раундов) – до сих пор обсуждается. Классической моделью, предложенной еще S. Ohno (Ohno, 1970) является сценарий двух раундов ПГД в последствии поддержанная уже на основе генетических исследований (Mehta et al., 2013).

В то же время, в последние годы на основе анализа получаемых данных высокопроизводительного геномного секвенирования был выдвинут ряд альтернативных гипотез, предполагающих для бесчелюстных и челюстноротых один общий и один или несколько независимых раундов ПГД (Smith et al., 2015, 2018, Sacerdot et al. 2018, Simakov et al. 2020, Nakatani et al., 2021). Выдвинутые на сегодняшний день гипотезы и аргументы в их поддержку подробно рассмотрены Байрамовым с соавторами в двух обзорных статьях (Bayramov et al., 2021, 2023). Основным импульсом для возобновления дискуссий и выдвижения альтернативных теорий стал отсеквенированный геном морской миноги *P. marinus* и последовавшие за ним геномные сиквенсы нескольких других видов. В последние годы к ним добавились геномные сиквенсы миксины пиявкорота Бургера (*E. burgeri*).

С опорой на полученные результаты геномного секвенирования морской миноги (Smith et al., 2015, 2018) была предложена альтернативная гипотеза

об одном раунде полногеномной дупликации до разделения бесчелюстных и челюстноротых, в сочетании с серией локальных дупликаций (Рисунок 10).

Рассмотрение предполагаемых сценариев ранней эволюции генотипа позвоночных во многом опирается на анализ данных высокопроизводительного секвенирования, объём которых существенно вырос в последние годы. В то же время, для верификации выдвигаемых гипотез большой интерес представляет анализ ортологов отдельных семейств регуляторных генов в линиях бесчелюстных и челюстноротых.

В контексте этой проблемы семейства из трех и более генов, появившихся в результате двух раундов дупликаций и сохранившихся у бесчелюстных и челюстноротых вызывают большой интерес, поскольку оценка их ортологии может дать дополнительные аргументы в пользу одного из сценариев. Свидетельством того, что гены произошли в результате дупликаций у позвоночных может служить наличие лишь одной копии у ближайших родственников – беспозвоночных хордовых (ланцетники, оболочники) и полухордовых (баляногloss). Классическим примером тут являются Нох гены, один кластер которых описан у ланцетника, шесть у миног и четыре у челюстноротых (Рисунок 11, Parker et al., 2019; Bayramov et al., 2021).

В рамках настоящей работы исследованы семейства генов *Noggin* и *Foxg1* у позвоночных. У ближайших родственников позвоночных – бесчерепных и оболочников описано по одному гену *noggin* и *foxg1*, в то время как у представителей бесчелюстных и челюстноротых обнаружено несколько паралогов каждого из генов. Такие генные семейства с большой вероятностью произошли в результате геномных дупликаций у предковых форм. Гены *noggin* и *foxg1* описаны у позвоночных в качестве важнейших регуляторов широкого спектра онтогенетических процессов и уникальных структур, таких как конечный мозг.

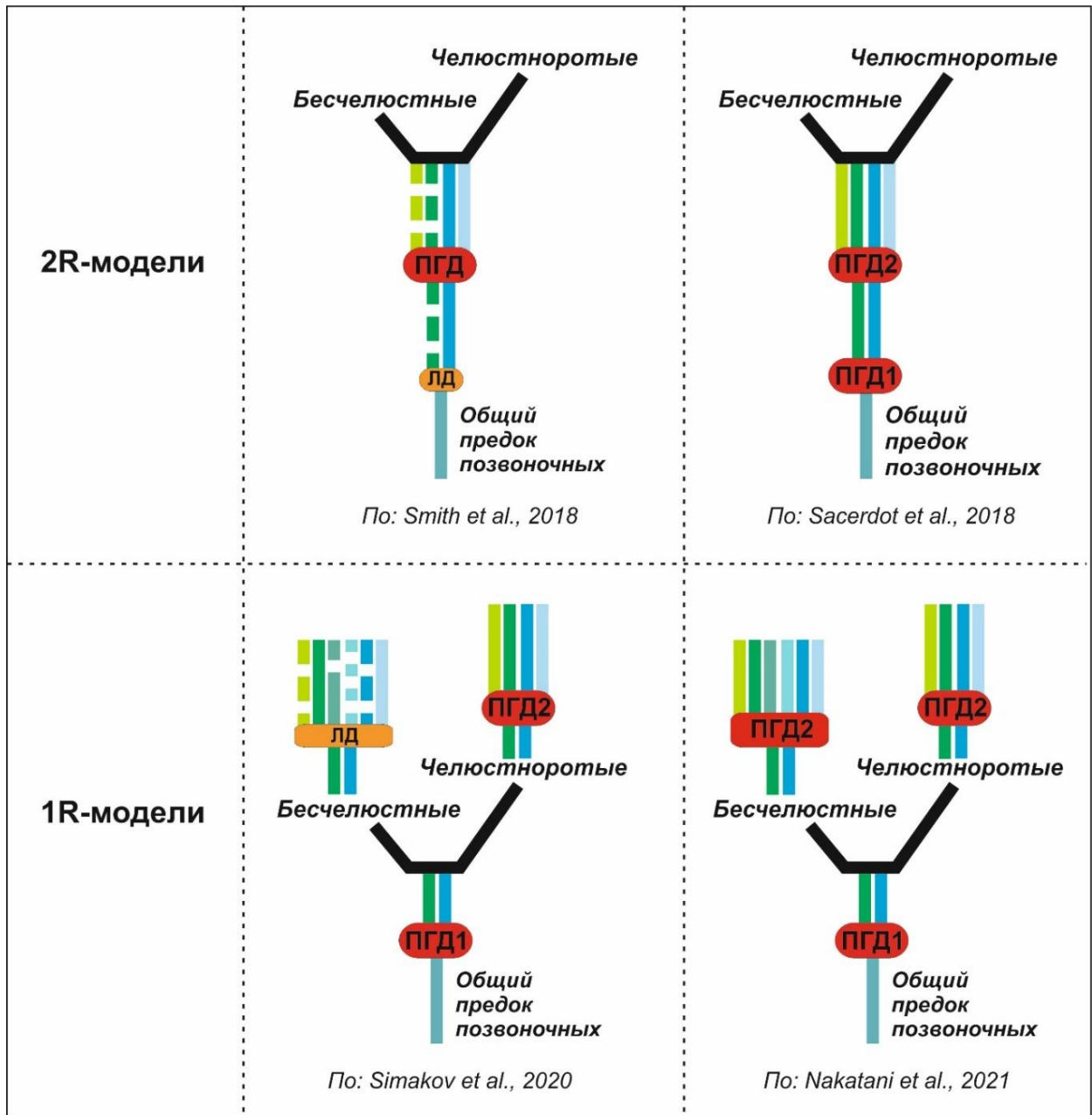


Рисунок 10. Схемы рассматриваемых на сегодняшний день моделей геномных дупликаций на ранних этапах развития позвоночных. ПГД – полногеномные дупликации, ЛД – локальные дупликации (по Bayramov et al., 2021)

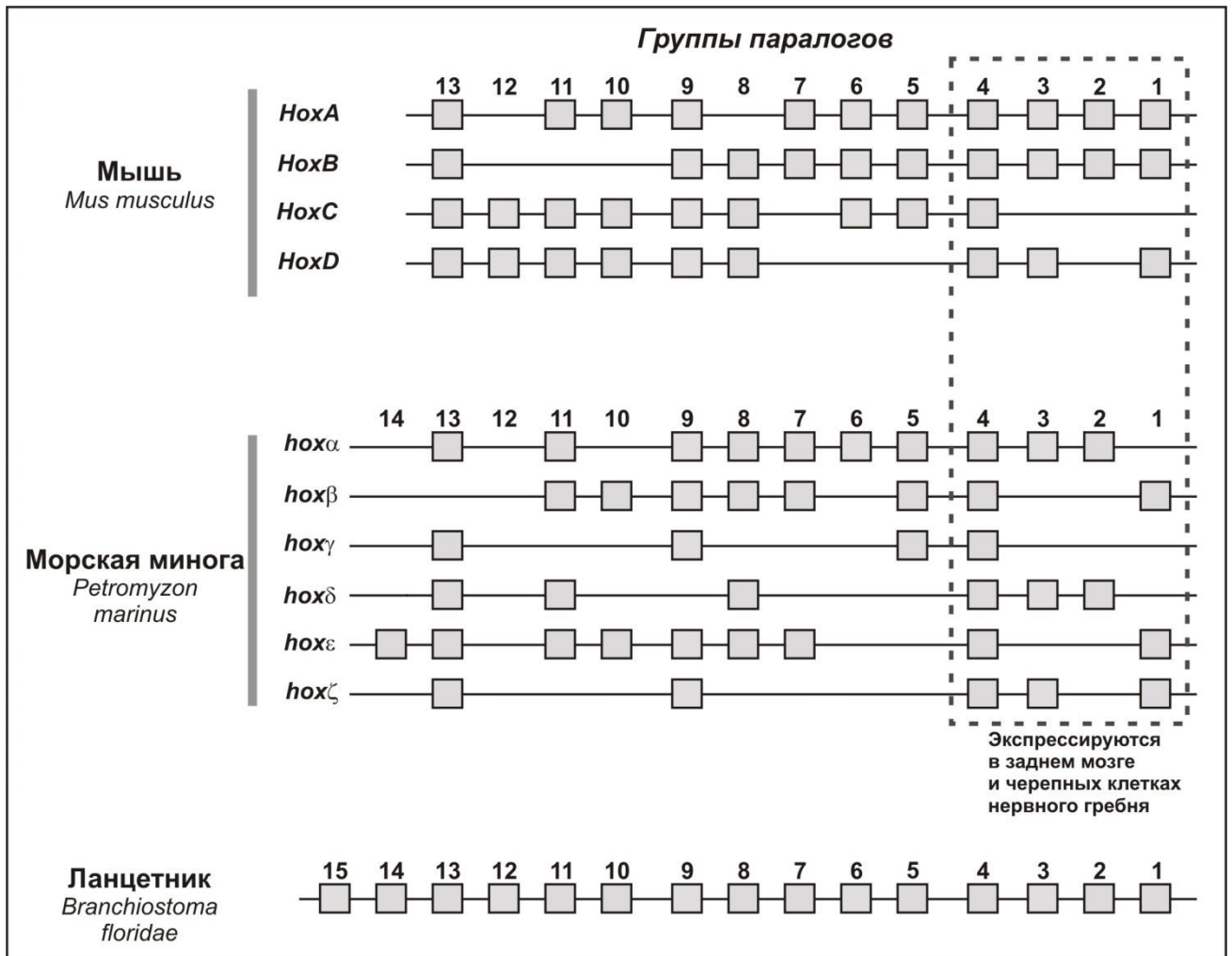


Рисунок 11. (по Bayramov et al., 2021; Parker et al., 2019a). Кластеры *Hox*-генов, обнаруженные у ланцетника, миног и млекопитающих.

1.5. Конечный мозг – уникальная инновация позвоночных

Появление и эволюционное развитие уникального отдела переднего мозга – конечного мозга, или теленцефалона, стало одним из важнейших морфологических новоприобретений позвоночных. Конечный мозг обеспечил возможность осуществления высших форм нервной деятельности у позвоночных, в том числе и человека. По современным представлениям конечный мозг отсутствует у беспозвоночных хордовых (ланцетников и оболочников) и в качестве отдельной морфологической структуры впервые в эволюции появляется у бесчелюстных. Это формирует интерес к изучению механизмов раннего развития конечного мозга у миног, как архаичных представителей современных позвоночных. Современное состояние

проблемы изучения молекулярных основ появления и развития конечного мозга в эволюции позвоночных рассмотрены в обзорной статье Байрамова и соавторов «Генетические механизмы раннего развития конечного мозга, как отражение истории появления и эволюции этого уникального отдела центральной нервной системы позвоночных», 2020 (Bayramov et al., 2020, <https://doi.org/10.1134/S1062360420030054>).

Дифференцировка зачатка конечного мозга происходит на ранних этапах индивидуального развития позвоночных. Передняя часть формирующейся нервной трубки сепарируется на три мозговых пузыря, соответствующих зачаткам будущих переднего, среднего и заднего отделов мозга: прозенцефалон, мезенцефалон и ромбэнцефалон. В дальнейшем передний мозг подразделяется на два отдела – ростральный конечный мозг (теленцефалон) и прилегающий к нему промежуточный мозг (диэнцефалон). В структуре конечного мозга выделяют два отдела – дорсальную кору (паллиум) и вентральные подкорковые структуры (субпаллиум), дающие начало базальным ядрам мозга (Sugahara et al., 2017).

Сравнительные исследования особенностей экспрессии и функциональных свойств основных регуляторных генов, участвующих в дифференцировке и развитии конечного мозга у представителей разных эволюционных групп позвоночных, открывает возможности для выявления молекулярных механизмов, послуживших предпосылкой и обеспечивших появление и эволюционное развитие конечного мозга.

Каждый из отделов мозга может быть охарактеризован экспрессией тех или иных специфических транскрипционных регуляторов, зачастую консервативных у разных групп позвоночных. В коре выявляется экспрессия генов *emx1/2* и *rax6*, участвующих в формировании этого отдела, гена *tbr1*, вовлеченного в дифференцировку глутаматэргических нейронов (Murakami et al., 2001; Derobert et al., 2002, Tank et al., 2009). В подкорковой области описана экспрессия генов семейства *Dlx*, регулирующих развитие ГАМК-эргических нейронов (Рисунок 12; Myojin et al., 2001; Murakami et al., 2001;

Neidert et al, 2002; Medina, 2009; Marin and Rubenstein, 2001). Выявление и описание экспрессии *raxb* и *dlx* у миног стало решающим подтверждением наличия конечного мозга у этих животных. При этом отмечалось, что кора и гипоталамус у миног развиты еще в слабой степени (Murakami et al., 2005).

По основным морфологическим характеристикам головной мозг миног сходен с мозгом костистых рыб, за исключением отдельных особенностей, таких как хорошо развитый эпифиз и слабо развитый мозжечок (Sugahara et al., 2017).

Поиск консервативных для позвоночных переднеголовных генов у миног, в сочетании с исследованиями на миксинах, позволили составить картину геноархитектуры передних отделов мозга у круглоротых (Рисунок 12). Были описаны два ортолога гена *nkx2.1* – гены *nkx2.1/2.4B* и *nkx2.1/2.4C*, экспрессия которых наблюдается в вентральной зоне подкорковой области конечного мозга. Поскольку у челюстноротых ген *nkx2.1* описан в качестве маркера медиального ганглионарного бугорка (Sussell et al., 1999), эта находка указывает на наличие у миног структур, гомологичных медиальному ганглионарному бугорку челюстноротых, из которого, как уже отмечалось, развивается двигательный центр паллидум, ранее считавшийся отсутствующим у бесчелюстных (Sugahara et al., 2016).

В области заднего мозга у миног были обнаружены гомологи генов, участвующих в развитии ромбической губы и мозжечка челюстноротых – гены *atoh1*, *wnt1* и *ptfla* (Wullimann et al., 2011). Это указывает на то, что генетические основы формирования этой структуры мозга, морфологически отсутствующей у бесчелюстных, могли сформироваться еще до эволюционного разделения бесчелюстных и челюстноротых.

Интересно, при этом, что экспрессия у миног гена *raxb* и его паралога *raxbB* (Feiner et al., 2014), не была обнаружена в дорсальной части заднего мозга, где этот ген в норме экспрессируется у челюстноротых (Sugahara et al., 2017).

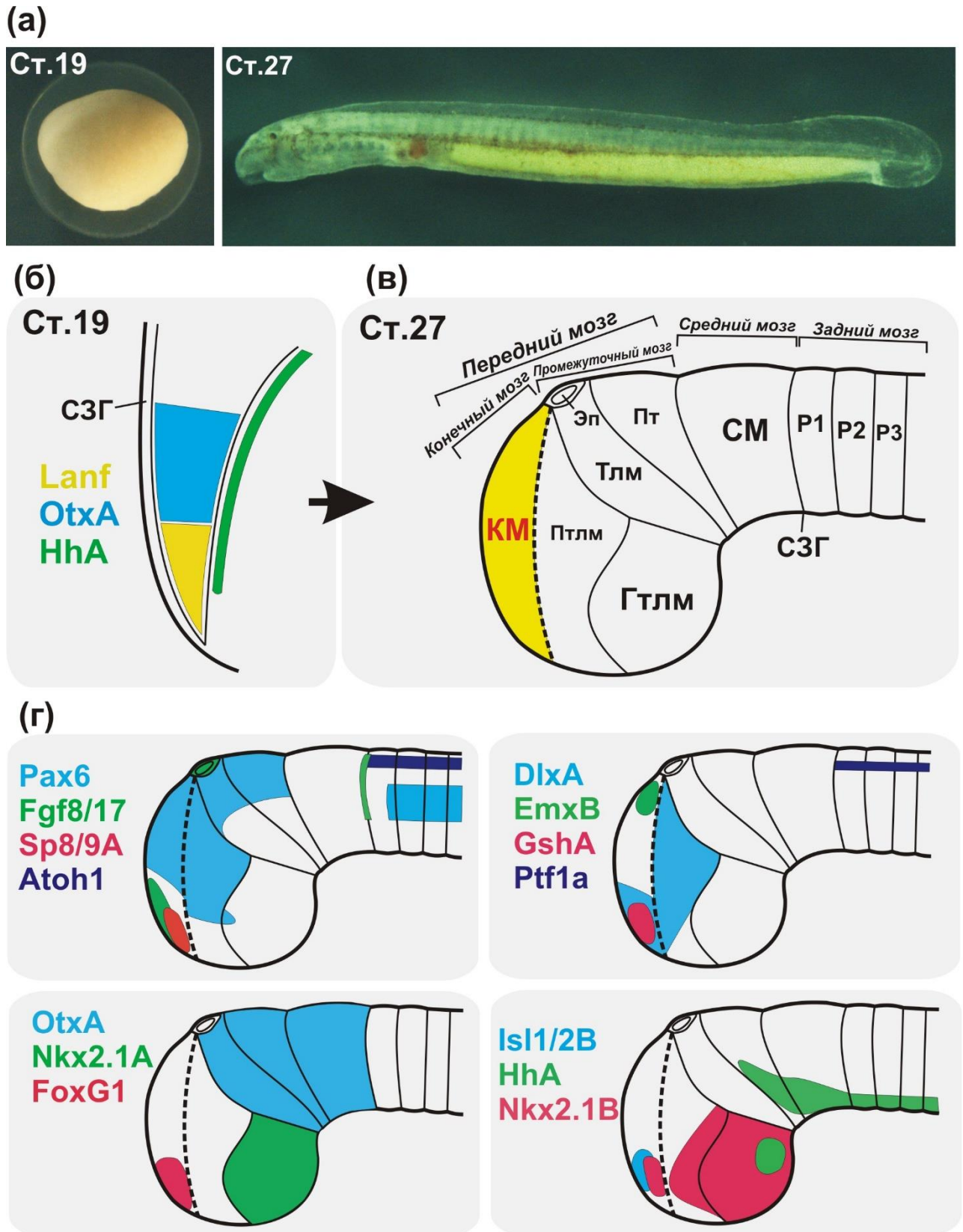


Рисунок 12. Схема строения головного мозга миног и области экспрессии исследованных регуляторных генов (по Murakami et al., 2001, 2002; Sugahara et al., 2016; Ваграмов et al., 2016). Стадии развития приведены по Tahara, 1988.

(а) эмбрионы речной миноги *L. fluviatilis* (на стадиях 19 и 27)

(б) закладка переднеголовных структур на стадии поздней нейрулы (стадия 19) и экспрессия ранних переднеголовных генов.

(в) морфология и основные отделы головного мозга миноги на стадии 27.

(г) области экспрессии описанных в литературе переднеголовных генов маркеров на стадии 27.

км – конечный мозг; гтлм – гипоталамус; птлм – преталамус; тлм – таламус; пт – претектум; см – средний мозг; сзг – граница среднего и заднего мозга; P1, P2, P3 – ромбомеры 1, 2, 3; эп – эпифиз.

Экспрессия раннего регулятора развития мозга – гена *otx* у миног, начинается на самых ранних этапах онтогенеза, в районе спинной губы бластопора, а у личинки наблюдается в области переднего и среднего отделов мозга, до границы между средним и задним мозгом (Tomsa and Langeland, 1999; Suda et al., 2009).

1.5.1. Гены семейства *Noggin* позвоночных – ранние эмбриональные индукторы, участвующие в развитии переднего мозга

Одним из важнейших событий в истории молекулярной биологии развития стало открытие в 1992 году гена *noggin*, мРНК которого восстанавливало развитие дорсальных структур у вентрализованных ультрафиолетовым облучением эмбрионов (Smith and Harland 1992). В последствии было установлено, что эксплантаты анимальной эктодермы шпорцевой лягушки, под действием белка *Noggin*, дифференцируются в передне-нейральную ткань (Lamb et al. 1993). Было выявлено, что *Noggin* является секретлируемым белком, способным выполнять основные функции организатора - индуцировать развитие нервной ткани в дорсальной эктодерме и дорсализовать клетки мезодермы, которые без подобного влияния были бы вовлечены в состав вентральной мезодермы (Smith and Harland 1992; Smith et al., 1993; Lamb et al., 1993). В ходе дальнейших исследований было получено большое количество данных, свидетельствующих о том, что гены семейства *Noggin* являются важнейшими регуляторами раннего развития и клеточной дифференцировки у

большинства многоклеточных животных, в том числе у позвоночных. Гены *Noggin* участвуют в широком спектре онтогенетических процессов, включая развитие уникального для позвоночных отдела головного мозга - конечного мозга (Smith and Harland 1992; Smith et al., 1993; Lamb et al., 1993; Krause et al., 2011, Вауганов et al., 2011). Формирование спинно-брюшной дифференцировки нервной трубки шпорцевой лягушки связано с установлением градиентов *Noggin* (Knecht and Harland, 1997). У мышинных эмбрионов, вместе с белком *Sonic Hedgehog*, *Noggin* вовлечен в индукцию экспрессии гомеобоксного гена *pax1* в процессе установления паттерна нервной трубки и сомитной мезодермы (McMahon et al., 1998). В качестве ингибитора внутриклеточного сигнального каскада BMP, *Noggin* участвует в развитии хрящевых тканей и структур (Botchkarev et al., 1999), клеток Кортиева органа (Hwang et al. 2010), глазного бокала и хрусталика (Gerhart et al. 2009), дифференцировку волосяных фолликулов (Brunet et al., 1998; Botchkarev et al., 1999; Shi and Massague, 2003). Обладая способностью блокировать активность сигнального каскада BMP, *Noggin1* зачастую используется в экспериментальной практике в роли ингибитора этого каскада (Tsumaki et al., 2002).

Долгое время проводимые исследования были посвящены исключительно гену *noggin1*, считавшимся у позвоночных единственным, однако впоследствии были описаны три паралога генов *noggin* у челюстноротых (*noggin1*, *noggin2*, *noggin4*), а затем и у бесчелюстных (*nogginA*, *nogginB*, *nogginC*, *nogginD*) (Fletcher et al., 2004, Eroshkin et al., 2006, Ermakova et al., 2020). Сам факт наличия нескольких генов *noggin* у бесчелюстных был впервые отмечен для морской миноги *P. marinus* на основе геномных данных (Kuraku and Kuratani, 2011). Однако, в силу того, что эта работа была сфокусирована на широкоформатном анализе генов, утраченных в ранней эволюции млекопитающих, гены *noggin P. marinus*, хотя и были включены в филогенетический анализ, не были описаны и исследованы.

Таким образом, на сегодняшний день можно говорить о том, что у позвоночных есть не один ген *noggin*, а полноценное семейство *Noggin*, и свойства их существенно шире описанного ранее подавления BMP сигнального каскада. Гомология между генами бесчелюстных и челюстноротых была показана на уровнях аминокислотных последовательностей, геномной синтении, особенностей экспрессии и на функциональном уровне (Ermakova et al., 2020). Разные гены семейства *Noggin* различаются между собой по функциональным свойствам. Так, гомологи генов *noggin1* и *noggin2* способны ингибировать активность BMP и демонстрируют весь спектр функциональных активностей, характерных для «классического» *Noggin*. Причем, оказалось, что функциональные свойства белков *Noggin1* и *Noggin2* существенно шире подавления BMP каскада и включают способность *Noggin* ингибировать внутриклеточные Nodal/Activin и Wnt каскады (Bayramov et al., 2011). При этом белок *Noggin4* имеет ряд аминокислотных замен, нарушающих его способность связывать молекулы BMP и ингибировать активность BMP каскада, но не препятствующих его связыванию с лигандами семейства Wnt (Eroshkin et al., 2016). В силу этого *Noggin4* не обладает характерной для других *Noggin* способностью индуцировать развитие вторичных осей тела, хотя принимает участие в формировании головного отдела эмбриона благодаря своему ингибирующему действию на канонический Wnt-каскад. Эти данные являются одним из результатов настоящей работы и будут подробнее рассмотрены ниже в соответствующем разделе.

Гены семейства *Noggin* описаны не только у всех исследованных представителей позвоночных, но присутствуют и у беспозвоночных, обладая весьма консервативными функциональными свойствами. Так, было показано, что кДНК гена *noggin* гидры (*Hydra vulgaris*) и планарии (*Schmidtea mediterranea*) могут индуцировать дополнительные оси у шпорцевой лягушки (Chandramore et al., 2010, Molina et al., 2011).

1.5.2. Гены *foxg1* – ключевые регуляторы развития переднего мозга позвоночных

Ген *foxg1*, кодирующий Forkhead-связывающий домен содержащий транскрипционный фактор играет ключевую роль в индукции и развитии конечного мозга – уникального отдела переднего мозга позвоночных (Kumamoto and Hanashima, 2017). Нарушения экспрессии *foxg1* приводят к аномалиям развития и уменьшению размеров переднего мозга (Xuan et al., 1995). У мышей *Foxg1* регулирует спецификацию вентрального отдела конечного мозга и участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток предшественников через модуляцию Fgf и BMP сигналов (Martynoga et al., 2005; Manuel et al., 2010). У человека последствия мутаций, приводящих к потере функции или изменению экспрессии гена *FOXG1*, называются синдромом FOXG1 (Wong et al., 2019, 2023, Craig et al., 2020). Кроме конечного мозга *Foxg1* играет принципиальную роль в морфогенезе и гистогенезе внутреннего уха (Pauley et al., 2006; Ding et al., 2020). Общие сведения об истории исследований *Foxg1*, его роли и регуляции в раннем развитии позвоночных подробно рассмотрены в обзоре Kumamoto and Hanashima, 2017. Ген(ы) *foxg1* ранее были описаны у всех групп позвоночных, а также беспозвоночных. Гомолог *foxg1* у дрозофилы, ген *slp1/2*, экспрессируется в головном отделе эмбрионов (Grossniklaus et al., 1994). У полухордовых ген *foxg1* градиентно экспрессируется в хоботке с максимумом на его переднем конце (Pani et al., 2012). У эмбрионов асцидий ген *foxg* экспрессируется на передней границе нервной пластинки и участвует в дифференцировке сенсорных нейронов (Liu and Satou, 2019). У ланцетника экспрессия *foxg1* начинается в передней части первого сомита, а позже, на третьи сутки развития - в отдельных клетках мозгового пузыря (Toresson et al., 1998). У взрослого ланцетника ген *foxg1* экспрессируется в широком переднем домене, который занимает большую часть мозгового пузырька, что, по мнению авторов, сходно с ранней экспрессией *Foxg1* у

эмбрионов мышей на стадии E8.5 до деления конечного мозга на парные пузырьки (Benito-Gutiérrez et al., 2021).

У миног, как представителей бесчелюстных была описана экспрессия *foxg1* и показана ее гетерохрония по сравнению с гомологами у челюстноротых (Higuchi et al., 2019, Ermakova et al., 2019). Домен экспрессии *foxg1* в области переднего мозга был описан и у миксин, что в сумме с экспрессией там же других маркерных генов – *raxb*, *emxB* указывает на вероятную гомологию этого участка с конечным мозгом челюстноротых (Sugahara et al., 2016).

В эволюционной линии челюстноротых гены *foxg1* были описаны у представителей всех групп, причем исторически, по умолчанию, у большинства челюстноротых (за исключением костистых рыб), долгое время предполагалось наличие одного паралога *foxg1*. Лишь сравнительно недавно у акул были описаны три гена *foxg1* (Hara et al., 2018).

1.5.3. Ген *anf* – уникальный ген позвоночных, участвующий в закладке зачатка конечного мозга

Одним из ключевых факторов раннего развития конечного мозга челюстноротых является ген *anf*, представитель одноименного моногенного класса гомеобоксных генов *anf*, открытый в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН в 1992 году (Zaraisky et al., 1992). Ген *xanf* (**X**enopus **a**nterior **n**eural **f**old) был так назван на основании его паттерна его экспрессии на переднем крае нервной пластинки эмбрионов *X. laevis*. Впоследствии были открыты и описаны ортологи *xanf* у других видов позвоночных, включая человека (Zaraisky et al., 1995, Kazanskaya et al., 1997, Ermakova et al., 1999, Ermakova et al., 2007). Ортолог *anf* был идентифицирован у мышей двумя другими исследовательскими группами и получил обозначение *Hesx1* или *Rpx* на основании его экспрессии в мышечных ES клетках и в кармане Ратке (Thomas et al. 1995; Dattani et al., 1999; Hermes et al., 1996). Хотя гены *anf* были выявлены у представителей

большинства классов позвоночных, гомологи этих генов не были обнаружены у беспозвоночных, в том числе у ближайших родственников позвоночных — беспозвоночных хордовых. Важно отметить, что такое распределение коррелирует с наличием конечного мозга у позвоночных, который является уникальной областью переднего мозга, которая, по-видимому, отсутствует у всех других животных и формируется из передней нервной складки, где экспрессируется ген *anf*. Эксперименты на амфибиях и мышцах включавшие изменения уровней экспрессии *anf*, подтвердили существенную роль этого гена в развитии конечного мозга (Ermakova et al., 1999, Ermakova et al., 2007; Dattani et al., 1999). У мышей с подавленной функцией *Anf/Hesx1* конечный мозг и глаза редуцированы или отсутствуют на ранних стадиях сомитов (Andoniadou et al., 2013).

Ген *anf* не был обнаружен в геномах исследованных беспозвоночных.

У челюстноротых экспрессия гена *anf* обнаруживается в клетках зачатка переднего мозга на самых ранних стадиях его развития (Zaraisky et al., 1992; Zaraisky et al., 1995; Kazanskaya et al., 1997). Было установлено, что в области презумптивного переднего мозга *anf* выступает в качестве транскрипционного репрессора, ингибирующего экспрессию генов, участвующих в развитии более каудальных отделов мозга (Ermakova et al., 1999; Eroshkin et al., 2002; Martynova et al., 2004; Bayramov et al., 2004; Ermakova et al., 2007).

На основании совокупности полученных данных была выдвинута гипотеза о том, что появление этого гена *anf* у предков позвоночных могло стать одной из важнейших предпосылок к возникновению конечного мозга (Ermakova et al., 2007). В рамках этой гипотезы, репрессорная активность *anf* в передней части зачатка центральной нервной системы у предков позвоночных обеспечила формирование в этом регионе особой зоны, клетки которой оказались свободны от регуляторного влияния генов, индуцирующих развитие более постериорных отделов нервной системы. В результате передняя область нейрального зачатка, экспрессирующая *anf*,

получила возможность эволюционировать в новом направлении, став фундаментом для формирования конечного мозга.

В то же время, ген *anf* не был обнаружен у представителей наиболее архаичной группы современных позвоночных – бесчелюстных, в том числе при геномном секвенировании морской миноги *P. marinus* (Smith et al., 2013). Важность поиска гена *anf* у представителей бесчелюстных является важным с точки зрения подтверждения выдвинутой гипотезы, поскольку у этой группы позвоночных конечный мозг появляется впервые в эволюции. В связи с этим в настоящей работе был предпринят поиск генов класса *anf* у миног.

1.6. Парные конечности – важная составляющая эволюционного успеха позвоночных

Парные конечности стали важнейшей морфологической инновацией позвоночных, обеспечившей им возможность передвигаться не только в воде, но также на суше и в воздухе. Подробно современные представления о проблеме появления в эволюции и онтогенеза парных конечностей рассмотрены в обзорной статье Байрамова и соавторов (Bayramov et al., 2024, Paired Fins in Vertebrate Evolution and Ontogeny).

Самая древняя форма парных конечностей, появившихся в эволюции позвоночных – это плавники рыб, которые повышают стабильность положения тела и маневренность водных животных. Стабильность отражает способность устойчиво двигаться по предсказуемой (заданной) траектории, когда тело находится в динамическом равновесии и может создавать контролирующие усилия в постоянно меняющейся среде (Webb, 2006), а маневренность означает способность произвольно менять скорость и направление движения (Webb, 1997). Кроме обеспечения маневренности и стабилизирующей роли, плавники челюстноротых, как парные, так и непарные, часто играют важную роль в качестве вспомогательных или даже ведущих органов активного перемещения рыбы в пространстве. Так, у многих скатов и химер основную локомоторную нагрузку несет не

миохордальный комплекс туловища и связанный с ним хвостовой плавник, а крупные и мускулистые грудные плавники (Breder, 1926; Combes and Daniel, 2001; Rosenberger, 2001). Особенно важной в осуществлении активного движения стала роль производных от парных плавников рыб конечностей четвероногих в связи с выходом позвоночных на сушу.

Проблема появления парных конечностей позвоночных привлекает внимание биологов начиная с XIX века. Исследователи-морфологи выдвинули ряд теорий, ни одна из которых на сегодняшний день не получила решающего подтверждения. Наиболее обсуждаемыми в последнее время идеями являются теория происхождения парных плавников из боковой плавниковой складки, сформулированная независимо Дж. К. Течером (Thacher, 1877), С. Дж. Майвартом (Mivart, 1879) и Ф. Бальфуром (Balfour, 1881), и теория происхождения плавников из задней жаберной дуги К. Гегенбаура (Gegenbaur, 1878). Открытие парных вентролатеральных плавниковых складок у вымерших панцирных бесчелюстных галеаспид - одной из стволовых групп челюстноротых, может выступать в качестве палеонтологического свидетельства в пользу теории Бальфура (Gai et al., 2022). Однако, как будет рассмотрено ниже, согласно палеонтологическим данным о плавниках ископаемых бесчелюстных, вентролатеральные складки галеаспид также могут являться лишь косвенным свидетельством в поддержку этой теории. Теория Гегенбаура, поначалу благосклонно принятая многими крупными исследователями, подверглась в начале прошлого века обстоятельной критике и долгое время считалась устаревшей и представляющий лишь исторический интерес (Goodrich, 1930; Dzerzhinsky, 2005). Однако, в последние годы внимание к этой теории было восстановлено, после получения дополнительных данных о сходстве паттернов экспрессии генов *shh*, *fgf8* и *dlx*, в жаберных дугах и зачатках плавников, что может свидетельствовать в пользу возможной гомологии этих структур (Sleight and Gillis, 2020). Помимо теории боковой складки и жаберной теории, актуальность на сегодняшний день имеет и теория У.

Грегори о первичной связи парных плавников с шипами (Gregory and Raven, 1941). Оказалось, что многие палеонтологические данные хорошо согласуются с этой теорией.

Трудность заключается в том, что для создания цельной картины возникновения парных конечностей необходимо получить и объединить несколько групп данных: палеонтологические, морфологические, эмбриологические и генетические.

Гомология парных плавников рыб и конечностей наземных позвоночных показана убедительно: она подтверждается как эмбриологическими, так и палеонтологическими, и генетическими данными (Shubin et al., 2006; Mercader, 2007; Boisvert et al., 2008; Onimaru et al., 2021).

1.6.1. Предпосылки появления парных плавников: нехордовые вторичноротые и беспозвоночные хордовые

Один из важных вопросов в рамках проблемы происхождения парных плавников позвоночных – вопрос о том, когда и на каком филогенетическом уровне эти плавники возникли. Встречаются ли предшественники парных плавников позвоночных у других хордовых и родственных им типов? Отталкиваясь от гипотезы сложного предка всех билатерий, обладавшего метамерными парными конечностями, В. В. Малахов с соавторами предположили, что общий предок вторичноротых также обладал вентрально расположенными метамерными конечностями и находящимися дорзальнее их жаберными отверстиями (Ezhova and Malakhov, 2020). В ходе дальнейшей эволюции вторичноротых конечности срослись между собой в левую и правую плавниковые складки. Эти складки изогнулись вверх и прикрыли собой жаберные отверстия, образовав, таким образом, перибранхиальную полость. У полухордовых эти складки сохранились в виде генитальных крыльев, содержащих метамерные гонады. У хордовых, в связи с весьма вероятной инверсией сторон их тела (Малахов, 1996), складки оказались над жаберными отверстиями, образовав метаплевральные складки

головохордовых, тоже содержащие гонады. Предполагается, что метаплевральные складки низших хордовых были унаследованы примитивными позвоночными, у которых они преобразовались в грудные и брюшные плавники (Ezhova and Malakhov, 2020).

Из выдвинутой гипотезы следует, что парные плавниковые складки намного древнее непарной плавниковой складки, появившейся, скорее всего, уже непосредственно у хордовых в связи с появлением у них ундуляционного типа плавания, обеспечиваемого миохордальным комплексом. Но этому противоречат палеонтологические данные, согласно которым, у большинства древнейших хордовых имелась только непарная плавниковая складка, а парных складок как раз не было. Парные складки не описаны у современных оболочников, рассматриваемых как сестринская группа для позвоночных. А вот непарная плавниковая складка в хвостовом отделе у активно передвигающихся личинок оболочников имеется.

Не углубляясь в критику теории сложного предка всех билатерий, необходимо отметить, что, если у базальных вторичноротых (и базальных билатерий) уже были метамерные конечности, в последствии вошедшие в состав плавниковых складок и парных плавников, то тогда парные плавники должны были бы возникнуть в онтогенетическом развитии не как структуры-надстройки после формирования осевого плана строения, а сразу при его формировании, как имманентно принадлежащая ему составляющая. Но показано, что плавники возникают именно как структуры-надстройки (Tulenko et al., 2013), что ставит под сомнение первую часть гипотезы о происхождении парных складок вторичноротых от метамерных конечностей.

Как парные плавниковые складки, так и управляемые мускулатурой подвижные парные плавники, встречающиеся у некоторых нехордовых вторичноротых, вероятно, могли независимо возникать в разных группах *de novo*. Яркий пример – подвижные мускулистые парные плавники двужаберных головоногих моллюсков (Coleoidea). Эти моллюски смогли обзавестись плавниками только после того, как изначально наружная

раковина предков Coleoidea погрузилась в ходе эволюции внутрь тела (Kroger et al., 2011). В ранней редакции своей гипотезы Малахов и коллеги (Малахов и Галкин, 1998) гомологизировали генитальные крылья кишечнодышащих, метаплевральные складки головохордовых (ланцетников) и парные вестиментальные крылья глубоководных червей вестиментифер – представителей погонофор, которых рассматривали в качестве отдельного типа вторичноротых животных (Малахов, 1996). Однако, по мере накопления новых, в первую очередь молекулярных, данных по погонофорам исследователи пришли к выводу, что эти животные являются очень своеобразной группой кольчатых червей (Annelida) (Halanych, 2005). Таким образом, вестиментальные крылья, характерные только для части погонофор, содержащие особые грушевидные железы для выделения материала жилых трубок этих червей и никогда не содержащие гонад – еще один пример возникновения парных плавникоподобных складок *de novo*.

Гомологизация генитальных крыльев кишечнодышащих с метаплевральными складками головохордовых тоже является дискуссионным вопросом. Филогенетически кишечнодышащие (Enteropneusta) относятся к типу полухордовых. К этому же типу относятся крыложаберные (Pterobranchia), морфологически существенно отличающиеся от кишечнодышащих. У крыложаберных генитальные крылья отсутствуют. У кишечнодышащих генитальные крылья тоже не являются обязательным признаком – они могут как быть хорошо развитыми, так и полностью отсутствовать. Так, у представителей семейства Ptychoderidae генитальные крылья хорошо развиты. А среди Harrimaniidae есть как формы, совсем лишенные крыльев (например, *Saccoglossus mereschkowski*, гонады которого образуют метамерные выпячивания по бокам тела), так и формы с двумя (!) парами крыльев: дорзальной и вентральной, расположенными над и под жаберными отверстиями (Westheide et al., 2008). В рамках такого разнообразия трудно определить, какое из состояний признака являлось предковым для полухордовых в целом. Когда генитальные крылья хорошо

развиты, их внутреннее пространство, как правило, практически полностью заполнено гонадами.

Под термином «метаплевральные складки головохордовых» обычно понимается пара длинных вентролатеральных невысоких складок-килей, расположенных по бокам от перибранхиальной полости (Willey, 1894). Эти складки развиваются у личинок ланцетников над формирующимися жаберными щелями. В рамках теории инверсии хордовых по своему топографическому положению наджаберные складки личинок ланцетников соответствуют формирующимся под жаберными отверстиями генитальным крыльям кишечнодышащих. В то же время морфологически метаплевральные складки головохордовых сильно отличаются от генитальных крыльев кишечнодышащих. Складки ланцетников не содержат никаких эндоскелетных элементов и приводящих их в движение мускулов. Внутреннее пространство метаплевральной складки не содержит гонад и заполнено остатками вентролатеральных целомов. Таким образом, метаплевральные складки бесчерепных не имеют эндогенных структур и не выступают у ланцетников ни в качестве носителей гонад, как генитальные крылья кишечнодышащих, ни в качестве подвижных элементов, как конечности позвоночных (Wiley, 1894). Вероятно, метаплевральные складки головохордовых могут играть роль пассивных килей-стабилизаторов движения, а также, судя по исследованиям гидродинамических свойств парных вентральных складок вымерших бесчелюстных галеаспид, сообщать при движении животного подъемную силу его телу (Gai et al., 2022). У представителей рода *Branchiostoma* обе метаплевральные складки начинаются ростральной атриопора и тянутся вперед вплоть до ротового отверстия (Гуртовой и др., 1976). У другого рода головохордовых – *Epigonichthys* – левая метаплевральная складка продолжается назад срединной непарной вентральной складкой (Poss and Boschung, 1996). Вентролатеральные парные складки взрослых ланцетников представляют собой остатки личиночных метаплевральных складок. У личинок

ланцетников на медиальной поверхности каждой складки возникает дополнительная поперечная складка. Разрастаясь в виде карнизов медиально, левая и правая поперечные складки встречаются и срастаются на средней линии (Держинский и др., 2014), образуя собой дно атриальной полости. В дне атриальной полости образуется особая поперечная листовидная мышца, которая позволяет сжимать атриальную полость и выбрызгивать из нее воду через атриопор и ротовое отверстие. Это важно для прочистки атриопора и рта от засорения слишком крупными объектами (Держинский и др., 2014), а также интенсивного вывода из атриальной полости половых продуктов.

Подытоживая, можно отметить, что метаплевральные складки ланцетника сходны с генитальными крыльями кишечнодышащих только по критерию расположения относительно жаберных отверстий и при допущении, что в эволюции хордовых произошла инверсия сторон тела. По другим признакам - особенностям строения и функционирования - это совершенно разные структуры. Вполне вероятно, что парные складки появились в этих двух группах независимыми путями: генитальные крылья кишечнодышащих сформировались в качестве вместилища разросшихся гонад, а метаплевральные складки головохордовых, возможно, возникли как побочный продукт развития атриальной полости.

1.6.2. Разнообразие и особенности строения парных плавников у позвоночных

Типичный морфологический план строения современных рыб включает несколько непарных и две пары парных плавников. Непарные, или медианные, плавники – это хвостовой, один или два (редко больше) спинных и один (очень редко два) анальных плавника. Парные – это грудные и брюшные плавники, которые крепятся к туловищу посредством плечевого и тазового поясов. Древние группы рыб, такие как хрящевые (химеры, акулы и скаты), многопёровые и осетрообразные, отличаются строением парных плавников от более эволюционно молодых костистых рыб.

В качестве базовой модели парного плавника позвоночных часто рассматривается трибазальный грудной плавник акулы (Рисунок 13). Скелет такого плавника состоит из эндоскелетных элементов (базалий и радиалий) и экзоскелетных лучей (актинотрихий, цератотрихий или – у костных рыб – лепидотрихий). Эндоскелетные элементы плавника подразделяются на два уровня – базалии и радиалии. Базальных элементов обычно три: проптеригий, мезоптеригий и метаптеригий. Поэтому плавник и называется трибазальным.

У примитивных лучеперых рыб – многопёров и осетрообразных – грудной плавник тоже трибазальный (Davis, 2004). В то же время у высших лучеперых рыб – костистых – метаптеригий оказался полностью редуцирован. В основании плавника костистых рыб находятся только остатки про- и мезоптеригия и радиалии, а по мнению некоторых исследователей – даже исключительно радиалии, которые, в свою очередь, подразделились на проксимальные и дистальные элементы (Yano et al., 2012; Enny et al., 2020). Лопасть плавника костистых рыб в основном сформирована сильно развитыми лучами экзоскелета – лепидотрихиями, не имеющими никаких гомологов у наземных позвоночных (Рисунок 13; Yano et al., 2012; Cass et al., 2021).

Напротив, у мясистолопастных рыб проптеригий и мезоптеригий редуцируются, а метаптеригий разрастается, сегментируется и иногда становится очень длинным, порождая жгутовидный плавник (например, у африканской двоякодышащей рыбы *Protopterus*). Радиальные элементы у мясистолопастных отходят от члеников метаптеригия или только с одной стороны, или с двух сторон. В первом случае плавник называется унисериальным архиптеригием, во втором – бисериальным архиптеригием (Рисунок 13). К ветви мясистолопастных рыб относятся и наземные позвоночные. Традиционная точка зрения предполагает, что конечность наземных позвоночных возникла из унисериального архиптеригия (Schmalhausen, 1964), но некоторые авторы считают, что из бисериального

(Mednikov, 2014). В любом случае, основу внутреннего скелета наземной конечности образовала метаптеригиальная ось.

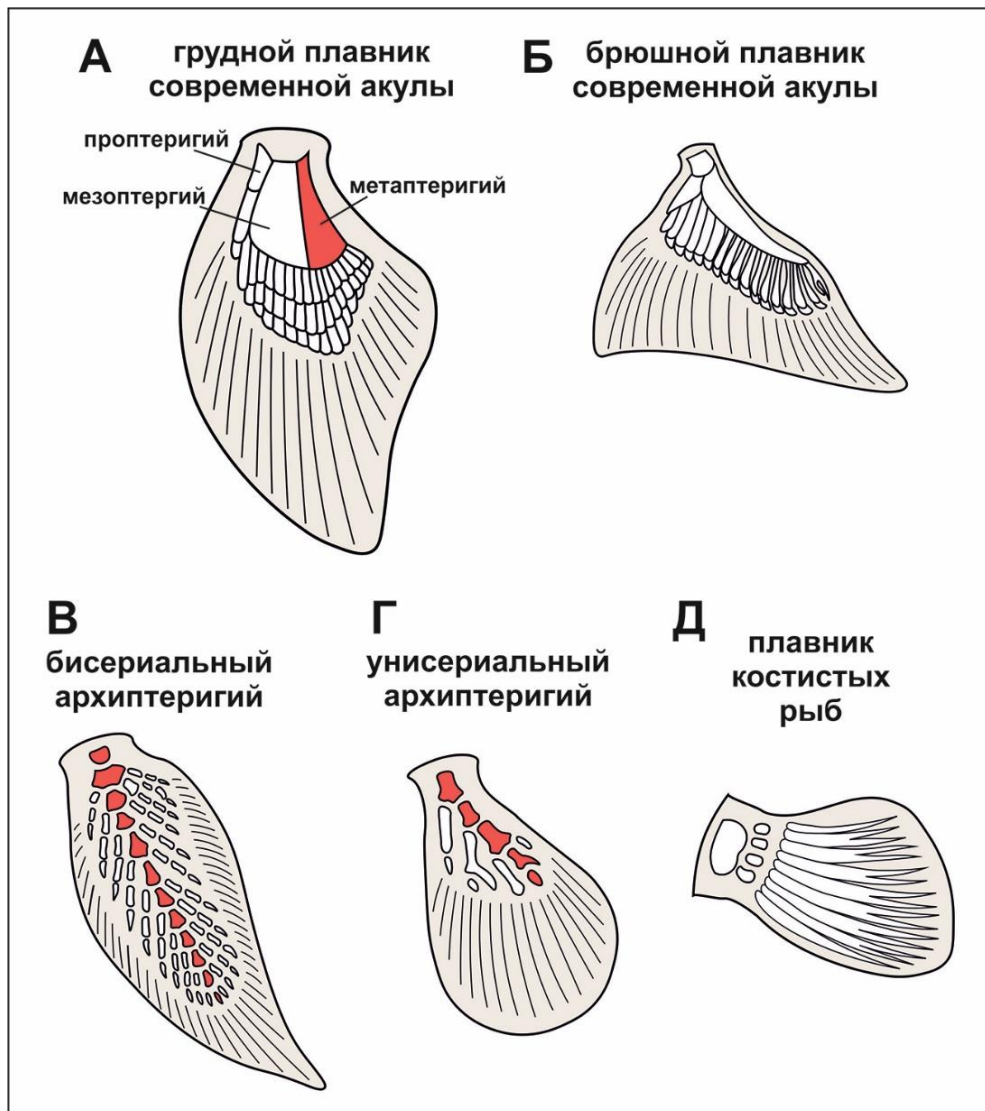


Рисунок 13. Многообразие парных плавников челюстноротых. Метаптеригий и метаптеригиальная ось показаны красным.

Таким образом, лучеперые и мясистолапастные рыбы демонстрируют противоположные направления редукции плавника с последующим вторичным усложнением и специализацией оставшейся части в каждой из эволюционных ветвей (Рисунок 14; Hawkins et al., 2021; Thompson et al., 2021). Но каким был плавник у общего предка всех современных рыб? Решение этого вопроса требует обращения к палеонтологическим данным.

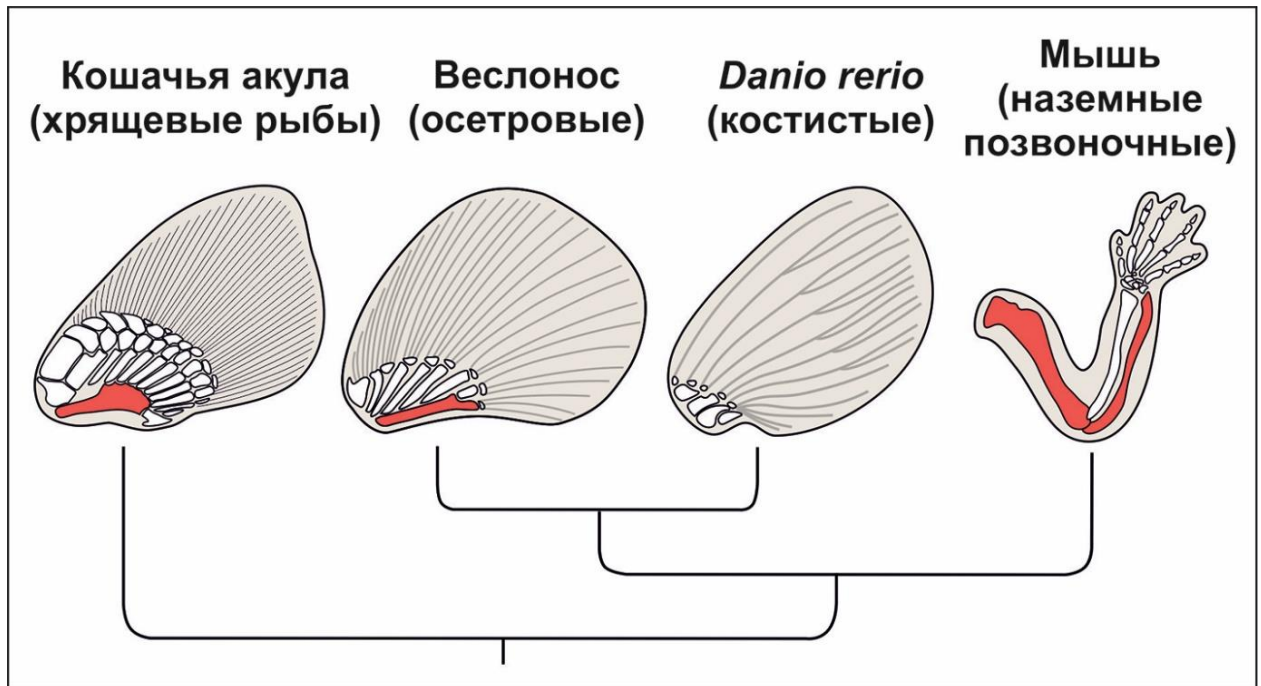


Рисунок 14. Грудные плавники акул, осетрообразных и костистых рыб и конечности млекопитающих. Метаптеригий отмечен красным. Трибазальный плавник хрящевых и близкий к нему по строению плавник осетрообразных рыб содержат наиболее полный набор эндоскелетных элементов. Плавники современных костистых рыб и конечности наземных позвоночных представляют собой два направления редукции предковой конечности, с последующим вторичным усложнением и специализацией в каждой из эволюционных ветвей.

В 2003 году была описана раннедевонская акула *Doliodus*, у которой грудной плавник имеет мощный шип из твердого материала и за ним – мясистую часть с шестью или семью радиалиями, примыкающими с проксимальной стороны к остаткам мезо- и (или) метаптеригия (Miller et al., 2003). С другой стороны, в 1998 году был открыт *Psarolepis* – рыба из самых низов девона, очень близкая к общему предку всех костных рыб (Zhu et al., 1999). Скелет его грудного плавника состоит из шипа и четырех хрящевых элементов, вероятно, соответствующих базалиям. В дальнейшем выяснилось, что все древнейшие костные рыбы имеют плавники с несколькими хрящевыми или костными лучами в основании и часто с плавниковыми шипами (Zhu and Yu, 2009).

Еще в первой половине XX века американский палеонтолог Уильям Кинг Грегори считал обязательным элементом первых парных плавников

шпы (Gregory, 1936; Gregory and Raven, 1941). Дело в том, что это чрезвычайно характерный элемент плавников раннепалеозойских позвоночных. Плавниковые шпы встречаются у акантод, панцирных рыб, ископаемых акул и у некоторых бесчелюстных; теперь, благодаря современным находкам, в этот список можно добавить и костных рыб. Например, у акантод все плавники, кроме хвостового имеют на своем переднем краю твердые массивные шпы. Акантоды – древняя и примитивная группа рыб, которую многие современные палеонтологи считают парафилитической. Не исключается, что среди них были предки как хрящевых, так и костных рыб (Ahlberg, 2009). Гипотезу Грегори называют теорией плавниковых шпов (Дзержинский, 2005).

Современные палеонтологические находки подтверждают, что плавниковые шпы, вероятно, действительно являются общим признаком всех древних рыб. К тому же детальное исследование плечевого пояса *Doliodus* показало, что его строение можно охарактеризовать как промежуточное между акулами и акантодами (Maisey et al., 2017), что можно рассматривать в качестве аргумента в пользу теории Грегори.

В итоге можно реконструировать следующую последовательность событий. Предковый план строения плавника включал твердый шип и порядка четырех базальных элементов, наблюдаемые у *Psarolepis*. Редукцией одного из базальных элементов такой плавник преобразуется в трибазальный, как у раннедевонской костной рыбы *Achoania* (Zhu, Yu, 2009), у многопёров, осетрообразных и акул. Хотя и у современных акул грудной плавник не всегда строго трибазальный, иногда в нем бывает и четыре базальных элемента (Шимкевич, 1922). Когда шип исчез, эволюционные преобразования мясистой лопасти плавника продолжились. При редукции этой мясистой части получился плавник костистых рыб, почти целиком состоящий из кожной «оторочки». Альтернативный путь эволюции – редукция большинства базальных лучей, кроме одного (метаптеригиального), который

разрастается и сегментируется, формируя плавник с членистой осью – унисериальный, а впоследствии и бисериальный архиптеригий.

С функциональной точки зрения плавники могут использоваться в активном или пассивном режимах. Активный механизм означает мышечное управление подвижностью конечностей, чтобы изменить структуру потока и создать направленную турбулентность, а пассивный определяет направление потока и турбулентности через структуру управляющих элементов, независимо от их подвижности (Fish and Lauder, 2017). Пассивный режим использования парных плавников, судя по всему, более архаичен. У акул, осетрообразных, а также у девонских лучеперых рыб рода *Cheirolepis* парные плавники занимают горизонтальное положение в вентральной части тела (Moy-Thomas and Miles, 1971; Pearson and Westoll, 1979; Bemis et al., 1997). Базальные и радиальные элементы хорошо развиты и являются частью выступающей из тела плавниковой лопасти. Такие плавники представляют собой малоподвижные структуры, основная функция которых, очевидно, состоит в том, чтобы модулировать подъемную силу, создаваемую гетероцеркальным хвостом (Ferry and Lauder, 1996). Точно такую же адаптивную роль могли успешно исполнять и древние плавники, укрепленные шипами.

У мясистолопастных рыб парные плавники благодаря редукции всех базальных элементов, кроме метаптеригия, становятся прикрепленными к поясу только в одной точке (стенобазальными), что сильно увеличивает их подвижность. Такие плавники можно использовать не только для регуляции водного потока, но и для опоры при передвижении по дну или проползании в зарослях (Шмальгаузен, 1964). У костистых рыб остатки базалий и радиалий погружены в стенку тела, и выступающая лопасть плавника сформирована подвижными лепидотрихиями. При этом грудные плавники часто смещаются дорсально и располагаются по бокам туловища. Плавники костистых используются для создания колебательных движений и движущей силы.

Итак, в целом можно сказать, что в базовом варианте парные плавники используются в качестве рулей, которые при крейсерском горизонтальном движении сами по себе не создают дополнительной подъемной силы, но способствуют маневренности животного (Wilga and Lauder, 1999). Более специализированные и подвижные плавники продвинутых костных рыб могут выступать не только в качестве рулей, но и в качестве вёсел. Это наблюдается не только у костистых рыб, но и у современной мясистолапастной рыбы – латимерии (Медников, 2022).

1.6.3. Появление парных плавников в эволюции позвоночных: палеонтологические данные

Палеонтологическая летопись головохордовых очень бедна. Из кембрийских отложений известно лишь несколько форм, которых или сближают с современными головохордовыми, или по-разному интерпретируют как стволовых вторичноротых, стволовых хордовых или стволовых черепных (Larouche et. al., 2019). В качестве головохордовых интерпретируются *Cathaymyrus* и *Zhongxiniscus* из нижнего кембрия Китая (Luo et. al., 2001, Shu et. al., 1996). Тела этих животных вытянутые, веретеновидные с s-образными миомерами, у *Cathaymyrus* видны многочисленные тесно сближенные жаберные щели в обширной глотке. Тело *Cathaymyrus* полностью лишено каких-либо плавников, а у *Zhongxiniscus* был развит один или, возможно, два хорошо выраженных спинных плавника без следов каких-либо внутренних скелетных лучей (Luo et. al., 2001, Shu et. al., 1996, Larouche et.al., 2019). Еще одной вымершей формой, обычно относимой к группе головохордовых, является *Palaeobranchiostoma* из ранней Перми Южной Африки. На отпечатке этого животного четко просматривается структура, интерпретируемая как хорда, которая идет до переднего конца тела, и многочисленные жаберные щели (Oelofsen and Loock, 1981). Интересно, что в отличие от ланцетника хорда не доходит до задней оконечности хвостового плавника, заканчиваясь в его основании (Briggs and

Kear, 1993). Парных плавниковых складок или парных плавников у *Palaeobranchiostoma* не наблюдается, зато есть хорошо выраженные непарные плавники: небольшой округлый хвостовой плавник, снабженный плавниковыми лучами, крупный выступающий вниз брюшной плавник и горбовидный, покрытый рядом шипов, спинной плавник (Briggs and Kear, 1993, Oelofsen and Loock, 1981). Своеобразные плавники и дорзальный ряд шипов *Palaeobranchiostoma* резко отличают эту форму от современных головохордовых. К сожалению, в настоящее время *Palaeobranchiostoma* описан в единственном экземпляре, и в отсутствие новых данных надежно реконструировать его экологические характеристики затруднительно (Briggs and Kear, 1993).

Древнейшей формой двигательных придатков позвоночных, судя по всему, является срединная плавниковая складка, располагающаяся вдоль спины и хвостовой области (Freitas et al., 2014, Zhang and Hou, 2004). На протяжении всей эволюции позвоночных подобные плавниковые складки были характерным признаком групп, обитающих в воде, от миног до костных рыб и личинок амфибий (Ромер и Парсонс, 1992; Peterson et al., 2004). Морфология непарных плавников различается – от простых недифференцированных складок до высокоспециализированных структур, увеличивающих мобильность, облегчающих спаривание или выполняющих защитные функции (Freitas et al., 2014).

Согласно палеонтологическим данным, парные конечности появились в эволюции позвоночных уже на ранних этапах эволюции группы (Рисунок 15). Вполне вероятно, что генетическим фундаментом этой инновации позвоночных, как и многих других, послужили происходившие в начале их эволюции полногеномные дубликации (Ohno, 1970, Bayramov et al., 2021). Но как именно и у кого парные плавники впервые возникли – остается неясным.

Первыми свидетельствами возможного присутствия парных плавников у позвоночных являются парные (предположительно) плавниковые складки нижнекембрийских бесчелюстных, найденных в Китае (Shu et al., 1999). В

этих лентовидных складках, описанных у *Haikouichthys* и *Myllokunmingia*, не было обнаружено элементов внутреннего скелета и мускулатуры, хотя остатки мягких тканей в исследованных образцах присутствовали. С учетом сохранности образцов, единого мнения по их трактовке нет. Не исключено, что эти вентральные плавниковые складки древнейших позвоночных были непарными (Shu et al., 2003).

Многочисленные формы как парных, так и непарных плавников были описаны у представителей разных групп ископаемых бесчелюстных, обладавших твердым экзоскелетом – чешуей или панцирем.

У гетеростраков, появившихся в позднем ордовике и богато представленных в силуре и девоне, были хорошо выражены хвостовые плавники, преимущественно гомоцеркальные. Кроме того, у них имелись латеральные кили, часто шипообразные, состоявшие из твердых пластинок, которые неподвижно соединялись с покровным скелетом. Эндоскелетных элементов этих структур не сохранилось (Coates, 2003). В качестве гомологов парных плавников они, как правило, не рассматриваются.

У остеоостраков, которых многие специалисты считают ближайшими родственниками челюстноротых (Janvier, 1981, 2015), хвостовой плавник гетероцеркальный с уникальной дополнительной горизонтальной лопастью, а единственные парные плавники расположены прямо над жаберным аппаратом. Грудные плавники остеоостраков – судя по всему, первый достоверный пример плавников с эндоскелетом и мускулатурой. У представителя этой группы *Norseaspis* сохранился головной панцирь с местом прикрепления грудных плавников. В перихондрально окостеневшем поясе конечностей сохранились впадины для крепления мускулатуры, отверстия для сосудов и нервов, а также место сочленения с эндоскелетными элементами плавника (Coates, 2003). В то же время в строении грудных плавников остеоострак не удается найти общих черт с парными плавниками челюстноротых, и гомология между ними сомнительна (Новицкая и Каратаюте-Талимаа, 1986; Новицкая, 2006).

У телодонтов помимо хвостового, спинного и анального плавников есть аналоги грудных плавников, находящиеся, как и у остеоострак, над рядом жаберных щелей. Впрочем, у силурийского телодонта *Shielia* есть еще и вторые парные плавники (аналоги брюшных), и они расположены ниже уровня жабр (Mars and Ritchie, 1998). Эндоскелет этих плавников пока не описан.

У анаспид имелся хорошо развитый гипоцеркальный хвостовой плавник и (у большинства) анальный плавник. Парные плавники располагались сразу за жаберным отделом и были длинными, у некоторых представителей (*Pharyngolepis*) они доходили до анальной области. Однако парные плавники анаспид находятся ниже ряда жаберных щелей, поэтому их сериальная гомология с парными плавниками остеоостраков или телодонтов сомнительна. Скорее их можно считать аналогами брюшных плавников, не имеющих твердого скелета (у *Jamoytius*; Sansom et al., 2010) или имеющих внутренний скелет, состоявший из множества параллельных радиалий (Janvier, 1987).

Вентролатеральные плавниковые складки, похожие на брюшные плавники анаспид, были описаны у галеаспид (Gai et al., 2022) и морфологически близких им остеоострак. Согласно проведенному моделированию, плавниковая складка такого типа могла пассивно создавать дополнительную подъемную силу при движении. Ее возможную эволюционную роль мы обсудим ниже.

У челюстноротых парные плавники всегда представлены грудными и брюшными, если не учитывать случаев редукции. У панцирных рыб (плакодерм), которых некоторые авторы считают предками всех остальных рыб (Zhu et al., 2013), парные плавники достаточно разнообразны. У петалихтиид расширенные грудные плавники отдаленно напоминают парные плавники остеоострак. У антиархов описаны монобазальные грудные плавники, закованные в панцирь с уникальными для позвоночных экзоскелетными сочленениями и напоминающие по виду конечности членистоногих. Во всех случаях плечевой пояс представляет собой

эндоскелетную структуру, прикрепленную к внутренней стороне массивного грудного панциря. Передний край грудного плавника несет шип, сформированный выростом этого панциря (Gregory and Raven, 1941; Coates, 2003).

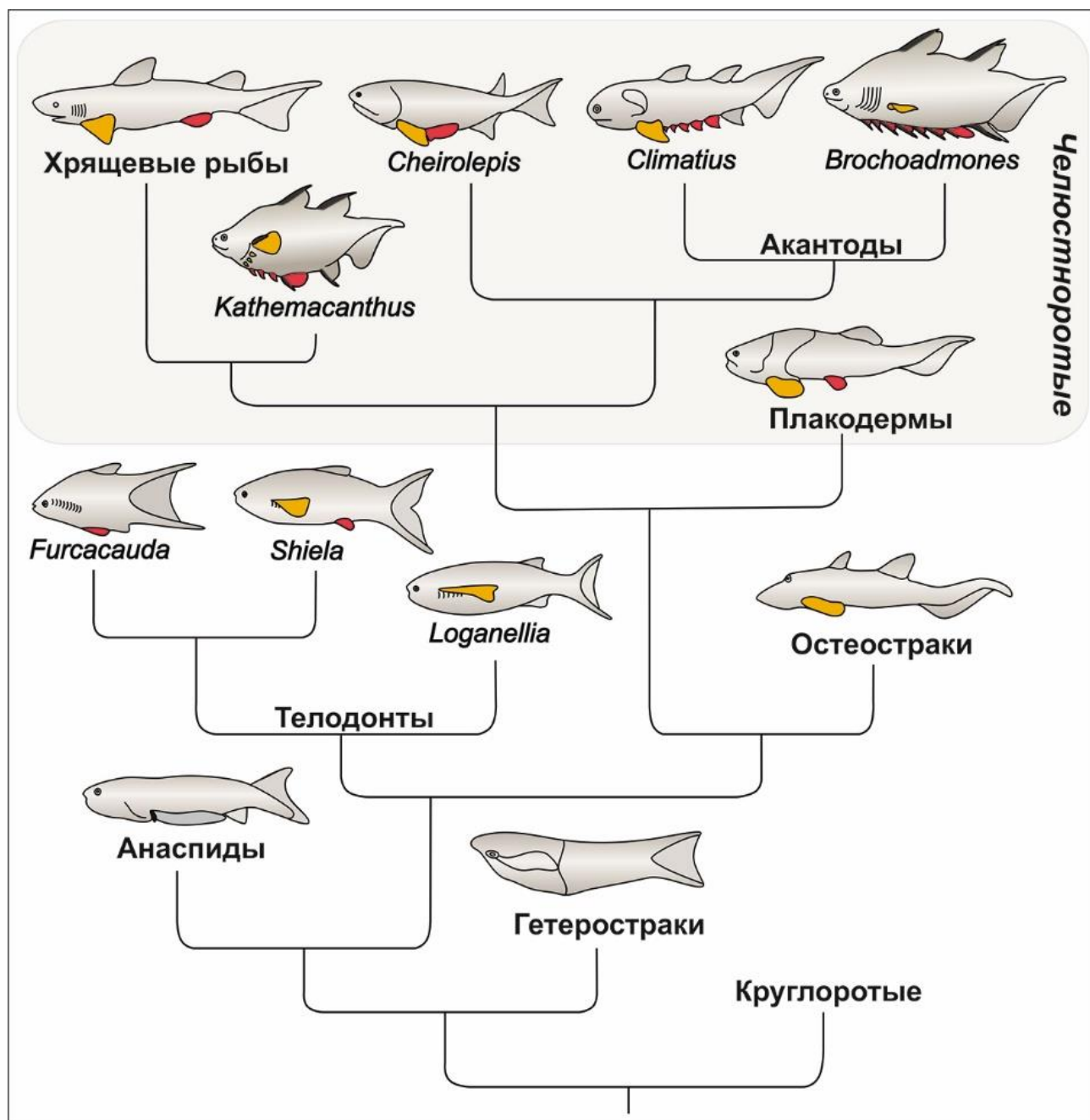


Рисунок 15. Разнообразие и предполагаемая гомология парных плавников у вымерших представителей позвоночных (по Wilson et al., 2007)

Для плавников акантод и ископаемых хрящевых рыб также характерны плавниковые шипы. У акантод их несут на переднем краю все плавники,

кроме хвостового – два спинных, грудной, брюшной и анальный. Типичный плавник акантоды состоит из двух компонентов: впереди – твердый шип, а за ним – мясистая лопасть с хрящевым скелетом, напоминающим скелет трибазального плавника акулы (Держинский, 2005). Именно такой тип плавника в теории Грегори рассматривался в качестве исходного (см. выше). Но, кроме того, у акантод наблюдался уникальный для позвоночных признак: множественность парных плавников. У многих представителей акантод между грудными и брюшными плавниками располагаются до пяти пар дополнительных плавников, также снабженных шипами. Этот факт зачастую рассматривается в подтверждение теории боковой складки, когда дополнительные плавники интерпретируются в качестве ее остатков. В то же время, ряд палеонтологов считают, что образование дополнительных парных плавников у акантод – вторичное явление (Татаринов, 1987).

Как правило, акантоды имеют одну пару массивных грудных плавников и несколько пар более грацильных брюшных (Watson, 1937). Все брюшные плавники одной стороны лежат на одной линии, в то время как грудные плавники расположены существенно шире. Ось расположения брюшных плавников располагается медиальной пары грудных, вплоть до слияния брюшных плавников левой и правой сторон тела у семейства *Acanthodidae* (Zajíc, 1995). При этом у *Acanthodidae* спереди от непарного брюшного плавника располагаются парные каналы боковой линии, что свидетельствует о вторичности непарного состояния (Beznosov, 2009).

Такое взаимное расположение грудных и брюшных плавников противоречит классической версии теории боковой складки, которая предполагает, что грудные и брюшные плавники, имея общее происхождение, располагаются на одной линии.

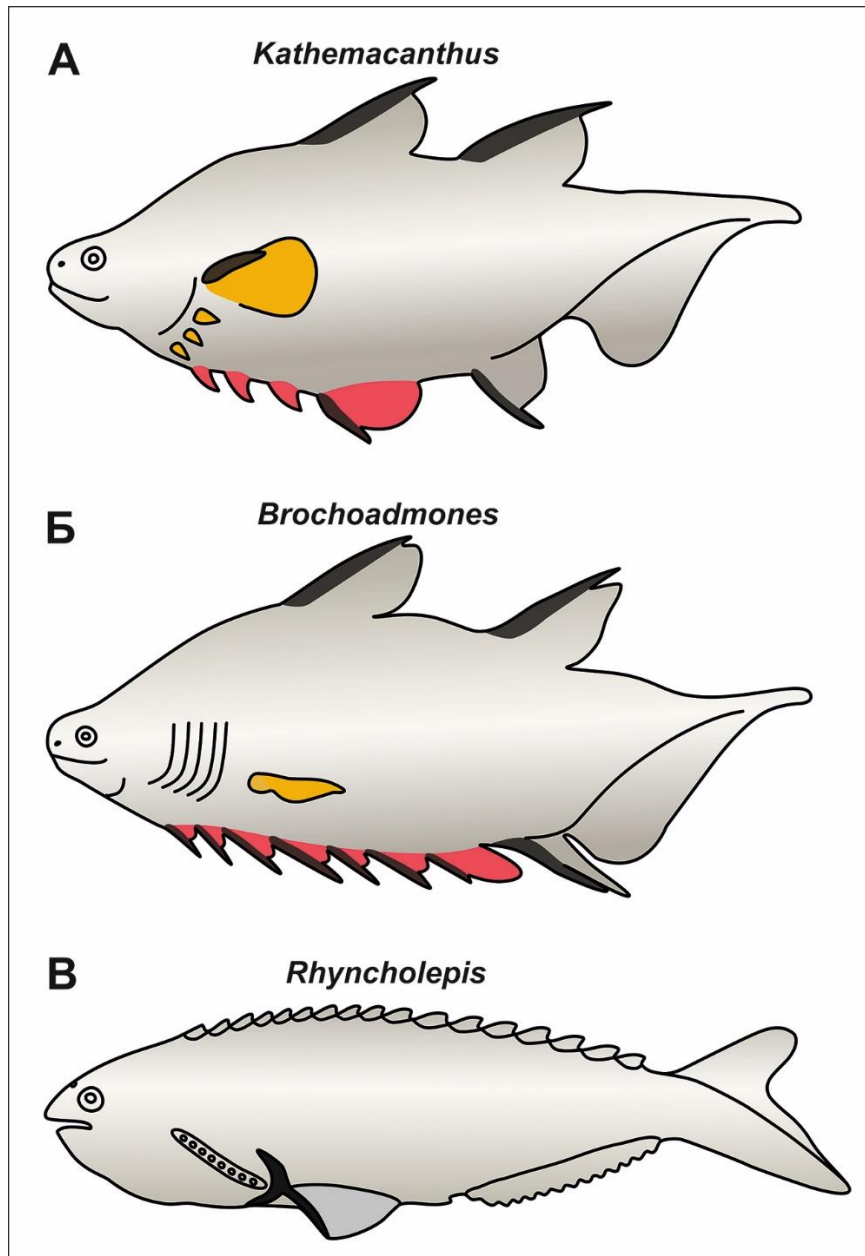


Рисунок 16. А, Б – множественные парные плавники у вымерших девонских рыб: *Kathemacanthus* (хрящевые рыбы) and *Brochoadmones* (акантоды). В – *Rhyncholepis* (Anapsida).

У раннедевонской хрящевой рыбы *Kathemacanthus* (которую изначально рассматривали в качестве акантоды; Hanke and Wilson, 2010) взаимное расположение серий множественных грудных и брюшных плавников также исключает сериальную гомологию между ними (Рисунок 16 А); Gagnier and Wilson, 1996).

У раннедевонской акантоды *Brochoadmones* грудной плавник расположен над серией из семи брюшных (Hanke and Wilson, 2006) и не является частью этой серии (Рисунок 16 Б).

Таким образом, плавники вымерших рыб демонстрируют существенное многообразие как строения, так и расположения на теле животных.

1.6.4. Особенности развития непарных и парных плавников и поиск переходного состояния

Поскольку первыми в палеонтологической летописи появляются непарные плавники, предполагается, что основы программы развития плавников сначала сформировались в развитии непарных плавников, а потом проявились и в развитии парных (Freitas et al., 2006). Эндоскелет всех исследованных непарных плавников развивается из параксиальной мезодермы (ПМ), в то время как скелет парных – из мезодермы боковой пластинки (МБП). Исключением тут является только преанальная непарная плавниковая складка, которая будет подробнее рассмотрена ниже. По передне-задней оси МБП челюстноротых подразделяется на переднюю кардиогенную мезодерму (КМ) и заднюю мезодерму боковой пластинки (ЗМБП), а в поперечной плоскости – на внешнюю соматическую (париетальную) мезодерму и внутреннюю спланхническую (висцеральную) мезодерму (Рисунок 17 А, Б; Tanaka and Onimaru, 2012). Соматическая мезодерма формирует стенку тела, в то время как спланхническая – внешний слой пищеварительного тракта. Полость, возникающая между этими слоями МБП, представляет собой целом.

По мнению некоторых исследователей, регионализация мезодермы боковой пластинки с расщеплением ее на внешнюю (соматическую) и внутреннюю (спланхническую) части является инновацией, присущей только челюстноротым, которая и стала предпосылкой появления парных конечностей (Tanaka and Onimaru, 2012; Tanaka, 2016). В частности, на это указывает наличие экспрессии соматического маркера *Irх3* у миноги (в

отличие от челюстноротых) только в зоне кардиогенной мезодермы (Onimaru et al. 2011). Однако недавно расщепление боковой пластинки было обнаружено и в туловище эмбрионов миног, при помощи трансмиссионной электронной микроскопии, хотя формирующийся при этом целом имеет очень маленький объем (Onai, 2023). Таким образом, вопрос регионализации МБП у круглоротых пока остается дискуссионным.

Зачатки парных плавников формируются в качестве выростов соматоплевры – ткани, включающей соматическую ЗМБП и прилегающую к ней эктодерму (Tanaka, 2016, Tanaka et al. 2002; Freitas and Cohn 2004). Следует заметить, что термин «соматоплевра» в разных работах может трактоваться по-разному. В классической сравнительной анатомии под ним, как правило, подразумевают листок целомического эпителия, прилегающий к внешней стенке тела (см., например: Малахов и Ганцевич, 2019), а в эмбриологии – тот же листок в совокупности с покровной эктодермой, которую он подстилает (Бочаров, 1988). Мы используем термин «соматоплевра» во втором значении, поскольку это обусловлено функционально. Показано, что сигнальная связь эктодермы и МБП важна для формирования почек конечностей (Capdevila et al., 2001). У миног отсутствие парных плавников связывают с отсутствием соматоплевры, поскольку МБП у них отделена от эктодермы и ограничена выстилкой целома, располагаясь медиальнее или вентральнее миомеров и не достигая боковой стенки тела (Tulenko et al., 2013).

На эмбрионах данио и мышях было показано, что разграничение зон кардиогенной мезодермы и задней мезодермы боковой пластинки контролируется таким морфогеном, как ретиноевая кислота. Именно она обеспечивает формирование области ЗМБП, где могут развиваться передние конечности (Waxman et al. 2008; Zhao et al. 2009). Экспериментальное расширение зоны КМ при подавлении экспрессии гена ретинальдегиддегидрогеназы 2 (*raldh2*) – фермента, катализирующего синтез ретиноевой кислоты – у мышей приводит к подавлению экспрессии гена *hoxa1* и

нарушению развития передних конечностей (Ruckebusch et al. 2008; Sirbu et al. 2008; Zhao et al. 2009). У эмбрионов данио, мутантных по гену *raldh2*, отсутствуют грудные плавники, что, видимо, связано с подавлением экспрессии гена *hox5b* (Begemann et al. 2001; Waxman et al. 2008). Ретиноевая кислота участвует в регионализации МБП, модулируя экспрессию Нох-генов (Lo and Frasch, 2003; Waxman et al. 2008; Moreau et al., 2019; Chisaka and Capecchi, 1991).

Одним из маркерных генов МБП является ген *hand2* (Tzung et al. 2023), в то время как экспрессия гена *nkx2.5* характерна для КМ (Deimling and Drysdale, 2009). Для соматической и спланхической МБП также найдены свои гены-маркеры. До дифференцировки вся МБП характеризуется экспрессией гена *foxF1*, который после деления продолжает экспрессироваться только в спланхической МБП, а в соматической области начинается экспрессия гена *irx3* (Funayama et al. 1999). У данио экспрессия *zrx3a* описана в грудных плавниках (McDonald et al. 2010), в то время как экспрессия *zfoxf1* – в мезодермальном слое пищеварительного тракта (Zheng et al. 2011), что подтверждает участие именно соматической мезодермы в формировании парных плавников.

При исследовании эволюционной истории любой новой структуры неизбежно возникает вопрос о том, какие предпосылки для ее появления сформировались в более древних группах, филогенетически предшествующих рассматриваемому новшеству. В случае парных конечностей такими группами будут бесчелюстные (поскольку у их современных представителей – миног и миксин – парных конечностей нет), оболочники и ланцетники.

Показано, что у ланцетника гомолог гена *hand2* (маркера МБП) – ген *amphiHand* и гомолог *nkx5.2* (маркера КМ) – ген *amphiNkx2* экспрессируются вместе в вентральной мезодерме, соответствующей МБП челюстноротых. Перекрытие зон экспрессии этих двух генов свидетельствует об отсутствии у ланцетника регионализации МБП на КМ и ЗМБП (Onimaru et al. 2011). У

миног МБП, экспрессирующая *LjHandA*, уже подразделена на КМ и ЗМБП, что подтверждается дифференциальной экспрессией генов *LjTbx20* и *LjMyb* (Onimaru et al. 2011). Однако соматоплевра у миног еще не формируется (Tulenکو et al., 2013). Кроме того, в МБП не обнаруживается доменов экспрессии генов, инициирующих формирование почки конечности. У челюстноротых в качестве таких генов-инициаторов описаны *Tbx4*, *Tbx5*, *Fgf10* и *Fgf8*, а экспрессия их миножьих гомологов – генов *LjTbx4/5*, *LjFgf7/10/22* и *LjFgf8/17* в стенке тела эмбрионов не найдена (Onimaru et al. 2011).

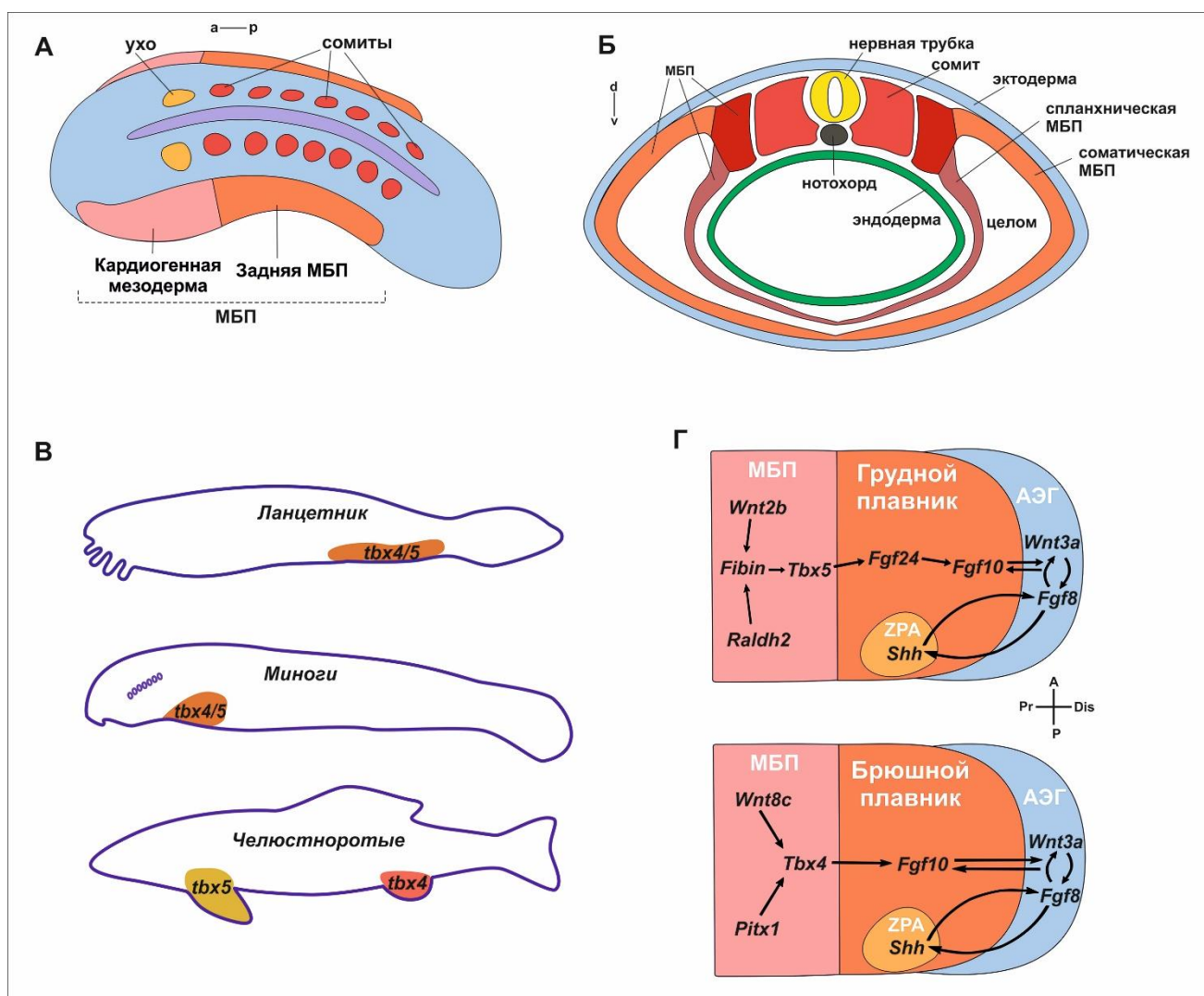


Рисунок 17. А, Б – дифференцировка мезодермы у позвоночных. В – экспрессия гена *tbx4/5* у разных групп позвоночных. Г – сигнальные модули, активные при формировании зачатков конечностей.

Традиционно предполагалось, что мышечная основа парных плавников может формироваться двумя способами. Более архаичным считается путь прямого продолжения выростов вентральной части дермо-миотомов в зачаток плавника, что наблюдается в грудных плавниках акул. Более эволюционно молодой механизм – миграция соматических миобластов в зачатки конечностей, что наблюдается у большинства челюстноротых (Haines and Currie, 2001). Однако, было показано, что в брюшных плавниках костистых рыб наблюдается промежуточный механизм, сочетающий вентральные выросты миотомов и сравнительно короткий путь миграции миобластов (Cole et al., 2011). А некоторое время назад были получены данные, показывающие, что и при формировании плавников у акул мезодермальные клетки-предшественники также проходят короткую стадию свободной миграции с последующей реагрегацией, что свидетельствует в пользу эволюционной первичности такого механизма формирования мышечной основы парных плавников у челюстноротых (Okamoto et al., 2017). Предполагается, что появление мигрирующих миогенных клеток-предшественников могло стать одной из ключевых предпосылок для возникновения конечностей (Onai, 2023).

При оценке возможности переноса механизма развития непарных плавников на развитие парных, неизбежно встает вопрос о наличии описанных примеров переходных этапов этого процесса. Последние данные позволяют ответить на этот вопрос утвердительно. У личинок костистых рыб на примере рыбки данио описано две непарных медианных плавниковых складки. Хвостовая (большая) складка начинается на середине спинной стороны тела, огибает дорсально и вентрально хвостовую область и граничит сзади с анальным отверстием. Преанальная (малая) плавниковая складка, сокращенно ПАПС (preanal fin fold, PAFF), находится на вентральной стороне желточного мешка впереди от ануса. При метаморфозе обе личиночные складки резорбируются. Большая складка замещается тремя взрослыми плавниками – спинным, хвостовым и анальным, скелетные элементы которых

формируются параксиальной мезодермой. На месте ПАПС никаких взрослых плавников не формируется. Таким образом, она представляет собой временную (провизорную) личиночную структуру (Parichy et al., 2009).

Каковы же эмбриональные источники ПАПС? Мезенхима большой плавниковой складки окрашивается фотоконвертируемым белком Kaede под контролем промотора гена *tbx16l*, что подтверждает ее происхождение от параксиальной мезодермы, в то время как в ПАПС такая окраска не обнаруживается (Tzung et al., 2023). Зато в ПАПС наблюдается экспрессия гена *Hand2* – маркера мезодермы боковой пластинки, что свидетельствует о формировании ПАПС из МБП. Нокаут *Hand2* приводит к недоразвитию производных МБП, таких как сердечная мышца, грудные плавники, мезотелий и в том числе ПАПС (Yelon et al., 2000).

Экспрессия *Hand2* в ПАПС, в отличие от других непарных плавников, наблюдалась не только у данио, но и у медаки и у личинок веслоноса. Таким образом, личиночная ПАПС, формируемая МБП, вероятно, является древним признаком как минимум всех лучеперых рыб. Экспрессии *HandA* в личиночной ПАПС была обнаружена и у морской миноги, у которой слабая экспрессия *HandA* почему-то присутствует и в переднем спинном плавнике. У двоякодышащей рыбы рогозуба и головастиков шпорцевой лягушки тоже описана ПАПС, и у головастика в ней обнаружены *Hand2*-позитивные клетки. Итак, мезенхима ПАПС берет свое начало от МБП в большинстве основных ветвей современных позвоночных – у бесчелюстных, лучеперых и мясистолапастных (Tzung et al., 2023).

Наличие ПАПС в развитии панцирной щуки, амии и многих костистых рыб отмечалось морфологами ранее (Goodrich, 1930). Более того, некое подобие преанального плавника есть у миксин (Janvier, 1981). Это единственный случай в современной фауне, когда ПАПС не является провизорным признаком, а присутствует у взрослого животного.

Несмотря на описанный консерватизм, ПАПС не обнаружена у хрящевых рыб, предположительно в силу вторичного исчезновения (Tzung et al., 2023).

Таким образом, онтогенетически ПАПС можно рассматривать как переходную структуру между непарными плавниками (производными параксиальной мезодермы) и парными плавниками (производными боковой пластинки). Вопрос: может ли ПАПС удваиваться?

Описано, что у мутантов по гену *Chordin* происходит удвоение анального плавника (Abe et al., 2014). Ген *Chordin* у всех двусторонне-симметричных животных, кроме хордовых, экспрессируется на брюшной стороне эмбриона, и только у хордовых – на спинной (Lowe et al., 2006). Белок *Chordin* является антагонистом белков семейства BMP. Подавление экспрессии гена *chordin* низкими концентрациями морфолиновых олигонуклеотидов (МО) у данио порождает ряд вентрализованных фенотипов, включая удвоение или даже мультипликацию ПАПС, что указывает на зависимость удвоения ПАПС от модуляции BMP-сигнала. Подобный фенотип наблюдается и у личинок данио одомашненной линии Ranchu. Наличие в этих парных ПАПС экспрессии *Hand2* показывает, что удвоение производных боковой пластинки может происходить как в экспериментах, так и в природе. Примечательно, что область расположения ПАПС располагается на передне-задней оси тела как раз между зонами будущих грудных и брюшных плавников, перекрываясь с вероятной компетентной зоной, которая могла дать начало парным конечностям (Yonei-Tamura et al., 2008).

Таким образом, ПАПС можно рассматривать как переходную структуру между непарными и парными плавниками. Ввиду отсутствия в ПАПС оформленного скелета, вероятность обнаружения подобной структуры у ископаемых форм минимальна. В палеонтологической летописи преанальные плавники описаны у таких кембрийских хордовых, как *Haikouella* и *Haikouichthys* (хотя здесь непонятно, парные они или непарные), и у

нижнедевонского представителя анаспид под названием *Kerreralepis*, где предположительно непарный преанальный плавник представляет собой ряд выступающих пластин (Larouche et al., 2019, Blom, 2012). Кроме того, непарный преанальный плавник в виде ряда пластин описан у некоторых гетерострак (Janvier, 1981). На то, что боковая пластинка в области ПАПС способна формировать скелетные элементы, указывает ее бесспорное участие в образовании скелета взрослых парных плавников у той же данио, а также пример аксолотлей, где происходящие из МБП фибробласты образуют хрящи при регенерации конечностей (Kragl et al., 2009; Lee et al., 2013).

1.6.5. Гомология непарных и парных плавников

Поскольку непарные плавники являются эволюционными предшественниками парных, опередившими их появление более чем на 100 миллионов лет, выглядит логичным уже упоминавшееся выше предположение, о том, что морфогенетические механизмы, контролирующие расположение, индукцию, рост и строение плавников, могли изначально сложиться на средней линии тела, а потом быть задействованными в формировании парных плавников (Freitas et al., 2006).

У ланцетника непарный плавник представляет собой простую складку без внутреннего скелета (Delsuc et al., 2006; Gee, 2008; Putnam et al., 2008). У современных круглоротых непарные плавники уже содержат эндоскелетные радиалии (Coates, 1994; Zhang and Hou, 2004). У хрящевых и костных рыб присутствуют отдельные спинные, хвостовой и анальный плавники, содержащие комплекс эндоскелетных радиалий (а иногда и базалий) и кожных плавниковых лучей (Freitas et al., 2014). Такая эволюционная ретроспектива соответствует тезису о том, что основные морфологические компоненты плавников сначала сформировались в непарных плавниках, а позже проявились при появлении парных (Coates, 1994; Freitas et al., 2006).

Эта идея находит подтверждение и на генетическом уровне. Анализ экспрессии генов в непарных и парных плавниках обнаружил и там и там

характерную ступенчатую экспрессию *Hox*-генов, генов *Tbx18*, *prdm16* (Freitas et al., 2006, Miyamoto et al., 2022).

Общими для парных и непарных плавников являются и некоторые регуляторные модули. Показано, что регуляторная петля *Gli3/Shh*, описанная изначально в развитии конечностей наземных позвоночных и, предположительно, модулирующая пролиферативные процессы дистальной мезенхимы, присутствует как в парных грудных, так и в спинном плавнике медаки – представителя костистых рыб (Letelier et al., 2021).

В качестве важного регуляторного модуля, контролирующего рост плавникового зачатка, описана петля положительной обратной связи *Fgf–Shh*. В развивающейся почке парной конечности *Fgf* экспрессируется дистально по апикально-эктодермальному гребню (АЭГ или AER от apical ectodermal ridge), в то время как *Shh* – в области задней мезенхимы, зоне поляризирующей активности (ЗПА или ZPA от zone of polarizing activity) (Niswander et al., 1994). В регуляторном взаимодействии *Fgf* и *Shh* участвуют и другие факторы, такие как *Grem1* и *BMP4*. В то же время, активность модуля *Fgf–Shh* была показана в спинных плавниках канального сома *Ictalurus punctatus*, а экспрессия генов *Fgf* и *Shh* обнаружена в непарных плавниках представителей других групп рыб – хрящевых и осетрообразных (Hawkins et al., 2022). Это подтверждает идею об эволюционном единстве механизмов формирования непарных и парных плавников.

1.6.6. Эпителиально-мезенхимный переход в зачатках парных конечностей

В качестве одной из важных пусковых составляющих механизма формирования конечностей на клеточном уровне рассматривается эпителиально-мезенхимный переход спланхноплевро (ЭМП), предваряющий активную пролиферацию мезодермальных клеток (Gros and Tabin, 2014). Миогенные клетки-предшественники, мигрирующие в область будущего зачатка конечности из вентральной части дермо-миотома (см. выше),

аккумулируются под слоем эпидермиса и формируют почку конечности (Zuniga, 2015)

Впервые ЭМП при индукции зачатка конечности был описан у куриных эмбрионов. Оказалось, что до начала формирования почки конечности соматоплевра демонстрирует скорее эпителиальные характеристики, нежели мезенхимные. Однако впоследствии меченые эпителиальные клетки меняют свою поляризованную форму, покидают эпителиальный слой и проявляют уже мезенхимные характеристики (Newton and Smith, 2021). Отмечается, что если не все, то большая часть мезенхимных клеток почки конечности формируется из эпителиальной соматоплевры (Gros and Tabin, 2014).

Это показывает, что стартовым событием формирования почки конечности является не пролиферация клеток в туловищной стенке, а локальное появление мезенхимных клеток в результате ЭМП, предшествующего пролиферации. Экспериментальное подавление ЭМП путем оверэкспрессии *RhoA* в области будущей почки конечности полностью блокирует ее формирование (Gros and Tabin, 2014). В качестве факторов, инициирующих ЭМП, рассматриваются гены *Tbx5* и *Fgf10*. В то же время у мышей показано, что блокада экспрессии *Tbx5* и *Fgf10* нарушает не начало формирования зачатка конечности, а его будущий нормальный рост (Jin et al., 2019). Это указывает на вероятное участие иных индукционных сигналов в инициации ЭМП. В качестве возможных кандидатов рассматриваются *TWIST1*, *SNAIL1* и *PRX1*, однако детали механизма пока остаются не выясненными (Newton and Smith, 2021).

Как уже отмечалось выше, некоторое время назад ЭМП был описан для мезенхимных клеток-предшественников у акул, что подтверждает консервативность этого процесса у челюстноротых (Okamoto et al., 2017). В то же время сравнение экспрессии маркеров миогенных клеток-предшественников генов *Hgf* и *Met* у миног и челюстноротых (акул, птиц и млекопитающих) показало различия в механизмах ЭМП у разных групп позвоночных (Adachi et al., 2018).

1.6.7. Генетические механизмы формирования плавников

Согласно современным представлениям, для индукции парных плавников исключительно важны гены Т-боксных транскрипционных факторов группы Tbx4/5 (Рисунок 17 В). У челюстноротых гены *tbx5* и *tbx4* экспрессируются в зачатках грудных и брюшных плавников соответственно (Gibson-Brown et al., 1996; Tanaka et al., 2002). Поскольку у ланцетников описан единственный ген *tbx4/5*, предполагается, что два паралога *tbx* челюстноротых возникли в результате дупликации предкового гена у ранних позвоночных с последующей субфункционализацией дочерних копий (Minguillon et al., 2009). Несмотря на то, что парные конечности у ланцетника отсутствуют, его ген *tbx4/5* способен индуцировать формирование конечностей у мыши, если обеспечить его своевременную экспрессию в компетентных тканях. Это свидетельствует о том, что функциональность *tbx4* и *tbx5* у челюстноротых сформировалась скорее путем изменений на регуляторном уровне, чем на уровне строения белков (Minguillon et al., 2009).

Ген *tbx5* – самый ранний ген, экспрессия которого описана в презумптивной мезенхиме грудных плавников (Tamura et al., 1999; Vegemann, Ingham, 2000; Ruvinsky et al., 2000). Показано, что ген *tbx5* критически важен для индукции плавника. При подавлении его экспрессии у костистых рыб нарушается развитие грудных плавников, что было показано как на мутантной линии *hst*, так и путем экспериментального подавления его экспрессии с помощью морфолиновых олигонуклеотидов (Mercader, 2007). В отсутствие экспрессии *tbx5* клетки МБП остаются разрозненными и не агрегируют в компактную почку плавника (Ahn et al., 2002; Garrity et al., 2002). Это позволяет рассматривать Tbx5 как фактор, участвующий в контроле миграции мезенхимных клеток предшественников в зону формирования плавникового зачатка. Tbx5 активирует экспрессию фактора роста *fgf10*, который передает индукционный сигнал в прилегающую эктодерму (Fischer et al., 2003). Важность гена *tbx5* отмечалась и для ЭМП на начальных этапах развития конечностей (Gros and Tabin, 2014).

Как только зачаток плавника начинает расти за счет концентрации и пролиферации мезенхимных клеток, в эктодерме на его дистальной поверхности формируется апикальный эктодермальный гребень (АЭГ) (Grandel and Schulte-Merker, 1998). АЭГ стимулирует рост зачатка в дистальном направлении, экспрессируя ключевые факторы роста – *fgf8* и *wnt3* (Рисунок 17 Г). Нарушение этих сигналов приводит к ранним аномалиям формирования плавникового зачатка (Fischer et al., 2003; Nagayoshi et al., 2008).

По мере роста плавникового зачатка его передне-задняя дифференцировка координируется сигнальным центром, расположенным в области задней мезенхимы – ЗПА (Akimenko and Ekker, 1995; Hoffman et al., 2002). Основным сигнальным фактором там является *Shh*. Показано, что ЗПА и экспрессия *shh* консервативны у разных групп позвоночных, в том числе у хрящевых рыб (Dahn et al., 2007, Tickle and Towers, 2017). Экспериментальный нокаут *Shh* приводит к нарушениям передне-заднего паттерна плавника и уменьшению его размеров (Dahn et al., 2007).

Сигнал *Shh* участвует в росте формирующегося плавника через установление петли положительной обратной связи с АЭГ, запуская экспрессию *fgf8*, который в свою очередь усиливает экспрессию *fgf10* и самого *shh* в мезенхимной части плавника (Enny et al., 2020). Утрата компонентов этой регуляторной петли приводит к нарушению формирования АЭГ и фенотипическим аномалиям развития плавников (Norton et al., 2005). Судя по экспрессии генов *fgf8* и *fgf10* в АЭГ и мезенхиме зачатков грудных плавников скатов, эта регуляторная петля у рыб достаточно консервативна (Nakamura et al., 2015).

По мере роста АЭГ развивается в апикальную складку (АС), формируемую двумя слоями эктодермы и мезенхимными клетками, мигрирующими между ними (Yano et al., 2012). В ходе дальнейшей дифференцировки клеток-предшественников формируются актинотрихии – будущие эктодермальные плавниковые лучи (Durán et al., 2011).

Актинотрихии состоят из коллагеновых и неколлагеновых компонентов, последние (актинодины) синтезируются генами семейства *And* (Zhang et al., 2010). Впоследствии актинотрихии замещаются кожными окостенениями – лепидотрихиями, основными составляющими плавниковых лучей.

Сравнительные исследования представителей хрящевых (кошачья акула), осетрообразных (веслонос) и костистых рыб (медака и данио) обнаружили у всех этих животных ступенчатый паттерн генов кластеров *HoxA* и *HoxD* в эндохондральном диске (будущий эндоскелет плавника) и апикальной складке. Продемонстрирована консервативность регуляторного участия *Hox*-генов в развитии конечностей позвоночных, включая и конечности тетрапод (Enny et al., 2020).

В то же время описаны и некоторые уникальные особенности генетических механизмов формирования плавников, характерные для отдельных групп рыб. Так, для закладки и формирования плавника у костистых рыб важен ген *fgf24*. На начальном этапе *fgf24* экспрессируется в мезенхиме плавникового зачатка, а позже в АЭГ. Он активирует экспрессию *fgf10* и участвует в регуляции миграции клеток в плавниковый зачаток (Мао et al., 2015). Мутация *fgf24* (*ikaraus*) приводит к полному отсутствию грудных плавников, хотя экспрессия *tbx5* активируется нормально (Fischer et al., 2003). Интересно, что ген *fgf24* был утрачен у наземных позвоночных, и, возможно, это сыграло свою роль в трансформации плавника в наземную конечность (Enny et al., 2020).

Для индукции брюшных плавников у костистых рыб может быть важен ген *pitx1*, подавление которого связано с нарушениями развития тазового пояса конечностей (Cole et al. 2003; Shapiro et al. 2004). В свою очередь, подавление гена *fibin* у данио выражается в отсутствии индукции грудных плавников и экспрессии *tbx5* (Wakahara et al., 2007).

1.6.8. Теории происхождения парных плавников

Как уже отмечалось, проблема происхождения парных конечностей позвоночных привлекает к себе особое внимание биологов начиная с XIX века. Исследователи-морфологи выдвинули ряд теорий, две из которых остаются наиболее обсуждаемыми в наши дни. Это теория происхождения парных плавников из боковой складки, сформулированная Ф. Бальфуром (Balfour, 1881) и теория происхождения плавников из задней жаберной дуги К. Гегенбаура (Gegenbaur, 1878).

Теория боковой складки предполагает образование грудных и брюшных плавников из общей протяженной вентролатеральной складки путем редукции ее средней части (Balfour, 1881; Thacher, 1877). Жаберная теория Гегенбаура предполагает формирование элементов плечевого пояса и структур грудных плавников из скелетных элементов жаберной дуги и одного из ее лучей (Gegenbaur, 1859). Проблема в том, что обе теории, по сути, являются гипотетическими реконструкциями. Решающих эмбриологических, палеонтологических и или генетических доказательств пока не получила ни одна из них. В то же время отдельные факты удается найти в поддержку каждой из точек зрения (Tulenko et al., 2013; Diogo, 2020; Sleight and Gillis, 2020; Onai, 2023).

Как показано выше, найдены общие генетические механизмы формирования непарных и парных плавников, а также описаны примеры удвоения непарных плавников, что свидетельствует в пользу теории боковой складки (Freitas et al., 2006; Dahn et al., 2007; Letelier et al., 2018, Tzung et al., 2023). Дополнительным доводом в ее пользу может служить наличие компетентных полос вдоль тела, описанных у челюстноротых и представляющих собой зоны, в которых возможна экспериментальная индукция эктопических парных конечностей (Balinsky, 1956; Yonei-Tamura et al., 2008). С другой стороны, выявлены сходства паттернов экспрессии генов *Shh*, *Fgf8*, *Dlx* в жаберных лучах и парных конечностях, что свидетельствует в пользу жаберной теории (Sleight and Gillis, 2020).

Обратимся еще раз к палеонтологии. Теория Гегенбаура не имеет никаких палеонтологических подтверждений. Если бы она была верна, эволюционно исходным типом парного плавника был бы бисериальный архиптеригий. Однако, как показано выше, это не соответствует современным палеонтологическим данным. Но и сходство в экспрессии регуляторных генов между жаберными элементами и плавниками скорее всего не случайно. Существует мнение, что здесь приложимо понятие глубокой гомологии (*deep homology*), которое предполагает задействование общих основ механизмов развития на уровне участия отдельных генов и регуляторных модулей, но не обязательно – общее происхождение сравниваемых органов (Gillis et al., 2009).

Теория боковой складки тоже не имеет прямых палеонтологических подтверждений. В качестве такого подтверждения долго рассматривались парные плавники акантод: ряд небольших плавничков, расположенных между грудными и брюшными плавниками, легко проинтерпретировать как остатки единой складки (Watson, 1937). Однако, судя по современным палеонтологическим данным, эта интерпретация неверна. Грудные плавники акантод и родственных им древних хрящевых рыб относятся к разным рядам (ряд грудных плавников проходит гораздо дорсальнее) и не являются сериальными гомологами друг друга. Детально исследовавший этот вопрос канадский палеонтолог М. Уилсон и его коллеги выделяют у раннепалеозойских позвоночных две группы плавниковых структур: к первой относятся единственные парные плавники остеострак, передние парные плавники телодонтов и грудные плавники рыб, ко второй – задние парные плавники телодонтов, все парные плавники анаспид и брюшные плавники рыб (Wilson et al., 2007). Вывести их из единой плавниковой складки затруднительно.

В качестве модификаций теории боковой складки предлагались идеи, что первыми появились или грудные (Coates, 1993; Thorogood and Ferretti, 1993), или, наоборот, брюшные плавники (Tabin and Lauffer, 1993). Гипотеза

первичности грудных плавников основана в первую очередь на палеонтологических данных, согласно которым грудные плавники появляются в палеонтологической летописи раньше брюшных. Правда, как уже отмечалось выше, гомология грудных плавников вымерших групп с грудными плавниками современных челюстноротых вызывает сомнения. Гипотеза первичности брюшных плавников, в свою очередь, опирается на генетические данные по коллинеарным паттернам экспрессии *Hox*-генов, которые в брюшных плавниках (но не в грудных) совпадают с паттерном экспрессии в туловище. Однако эта идея спорна палеонтологически: пока не описаны группы позвоночных, имевшие только брюшные плавники (Don et al., 2013).

На основе совокупности морфологических и палеонтологических данных была предпринята попытка сформулировать компромиссную теорию, включающую в себя элементы теорий Бальфура и Гегенбаура (Diogo, 2020). Одной из предпосылок такого синтеза служит существенная разница строения грудных и брюшных плавников, особенно у эволюционно древних групп позвоночных. Например, у современных осетрообразных рыб грудной плавник трибазальный. В его основании находятся три базальных эндоскелетных элемента – проптеригий, мезоптеригий и метаптеригий, к которым дистально прилегают радиальные элементы (Davis et al., 2004). В то же время в брюшном плавнике число базальных элементов значительно больше, и оно практически соответствует количеству радиальных (Mabee and Noordsy, 2004). Интересно, что еще Дж. Тэчер в XIX веке считал брюшной плавник осетровых самым примитивным из всех известных парных плавников (Thacher, 1877). Схожие различия в строении грудных и брюшных плавников наблюдаются у акул (Enault et al., 2016). Кроме эндоскелетных элементов, между плавниками отмечена разница в строении мягких тканей – мышц, кровеносной системы, нервов, причем не только на взрослых стадиях, но и в ходе онтогенеза (Diogo, 2020). Грудные плавники опережают брюшные по времени появления в онтогенезе, а если вслед за Ф. Жанвье (Janvier, 1981,

2015) считать рыб потомками остеострак – то и в эволюции. Наконец, на глубокие различия между грудными плавниками указывают и рассмотренные выше палеонтологические данные М. Уилсона. Все это подталкивает к мысли, что грудные и брюшные плавники имеют различное происхождение. Р. Диого рассматривает их как «частичные сериальные гомологи», предполагая к тому же, что плечевой пояс (но не тазовый!) сформировался из элементов жаберного скелета (Diogo, 2020). Если это верно, то грудной плавник может иметь смешанное происхождение: пояс – из висцеральных структур, а свободная часть – из остатков боковой плавниковой складки либо одной из нескольких таких складок.

Но откуда взялись эти складки? Исследователи, описавшие ПАПС (см. выше), предполагают, что иллюстрацией переходного состояния могут послужить ископаемые бесчелюстные из группы анаспид. Их вытянутые лентовидные «брюшные плавники» сходны с плавниками, которые могли бы образоваться в результате расщепления непарного преанального плавника (Tsung et al., 2023). Кроме того, вентролатеральные плавниковые складки, похожие на брюшные плавники анаспид, были описаны у представителя другой группы древних бесчелюстных, а именно галеаспид (Gai et al., 2022). Есть подобные складки и у остеострак, у которых они сочетаются с грудными плавниками. Однако горизонтальные грудные плавники остеострак расположены над жабрами, в то время, как и у анаспид, и у галеаспид, и у самих остеострак брюшные плавниковые складки располагаются ниже уровня жаберных щелей. К тому же у остеострак они до жабр не доходят.

С этой точки зрения интересны анаспиды, относящиеся к родам *Rhyncholepis* и *Pharyngolepis* (Рисунок 16 В; Ritchie, 1980; Tsung et al., 2023). У них есть типичные для анаспид лентовидные брюшные плавниковые складки. Но впереди такая складка переходит в крупный треугольный плавник, снабженный на переднем краю мощным шипом, основание которого охватывает сзади последнюю жаберную щель сзади, заходя длинными отростками как ниже, так и выше нее. Возможно, здесь зафиксирован тот

самый момент установления ассоциации между плавниковой складкой и жаберным аппаратом, который в смежных эволюционных ветвях привел к формированию плечевого пояса и настоящего грудного плавника. После миграции грудного плавника в дорсальном направлении остаток вентролатеральной складки сформировал брюшной плавник и при нем – тазовый пояс, никак не связанный с жаберным аппаратом. Этот сценарий включает в себя элементы теории боковой складки, теории жаберного происхождения плавников и теории первичности брюшных плавников, каждая из которых, судя по всему, верна лишь частично.

Подытоживая полученные на сегодняшний день данные и выдвинутые теории, описывающие происхождение парных конечностей у позвоночных можно обозначить ряд ключевых тезисов:

1) Подтвержденной гомологии парных конечностей челюстноротых с внешне сходными структурами представителей их современных и ископаемых родственных групп (полухордовых, беспозвоночных хордовых и бесчелюстных) на сегодняшний день не выявлено. Парные плавники челюстноротых можно рассматривать в качестве морфологически уникальных структур.

2) Механизм формирования плавников в эволюции впервые возник при появлении непарных плавников, а впоследствии проявился при развитии парных, что подтверждается как палеонтологическими, так и генетическими данными.

3) Гистологической основой формирования парных плавников является мезодерма боковой пластинки и единственный гомологичный пример среди непарных плавников – преанальная плавниковая складка личинок костных рыб. В основе всех остальных непарных плавников лежит параксиальная мезодерма. В рамках теории боковой складки, ПАПС может рассматриваться в качестве рудимента переходного состояния от непарных к парным плавникам.

4) Грудные и брюшные плавники морфологически существенно различаются между собой и, возможно, имели разное происхождение.

5) В последние годы получены новые свидетельства как в пользу теории боковой складки, так и в пользу теории жаберного происхождения плавников, что стимулирует поиск компромиссной теории, предполагающий разные пути появления грудных и брюшных плавников, демонстрирующих частичную сериальную гомологию.

1.7. Особенности эмбриональной индукции у миног, как современных представителей древнейшей эволюционной ветви позвоночных

Механизмы ранней эмбриональной дифференцировки и нейральной индукции изучаются в биологии развития с первой четверти 20го века. Классическая модель нейральной индукции, берущая свое начало с экспериментов Г. Шпеманна и Х. Мангольд, проведенных на эмбрионах амфибий (Spemann and Mangold, 1924), отводит центральную роль в нейральной дифференцировке индуктивному центру (Шпеманновскому организатору). Клетки эмбрионального «организатора» экспрессируют антагонисты BMP сигнала (белки Noggin, Follistatin, Chordin), разрешая нейральную дифференцировку и индуцируя формирование полноценной оси тела. У представителей других классов позвоночных также были обнаружены организационные центры (зародышевый щиток у костистых рыб, Гензеновский узелок у птиц и млекопитающих), однако вопрос функциональной полноценности этих структур в качестве организатора остается дискуссионным (Martinez Arias and Steventon, 2018).

В работах с разными модельными объектами было показано, что нейральная индукция и осевая дифференцировка далеко не всегда сводится к модулированию активности BMP сигнального каскада. Было показано, что у птиц принципиально важную роль в нейральной индукции играют

сигнальные пути связанные с факторами роста фибробластов FGF, и, возможно, Wnt, в то время как BMP каскад участвует в установлении границ нервной пластинки (Stern, 2005). У сестринских хордовых групп – полухордовых и иглокожих - нейральная дифференцировка ограничено чувствительна к изменениям BMP сигнала и существенную роль может играть Wnt каскад (Lowe et al., 2006; Angerer et al., 2011). Одной из потенциальных причин разнообразия строения и свойств организаторов в разных группах позвоночных могут являться различия в пространственной структуре эмбрионов и типах их дробления. Пространственно-временная цельность классического шпеманновского организатора амфибий выглядит в этом ряду скорее частным случаем, чем базовым сценарием (Martinez Arias and Steventon, 2018).

Исследования особенностей закладки зародышевых слоев позвоночных и роли генов *sox* в этих процессах также ставят под вопрос то, насколько наблюдаемая у амфибий картина отражает предковое для позвоночных состояние (Takeuchi et al., 2009).

Наблюдаемое разнообразие механизмов эмбриональной индукции и ее регуляции у представителей разных классов позвоночных повышает интерес к исследованию этих процессов у миног, как эволюционно архаичных представителей группы.

Исследования экспрессии материнских генов *soxB* и *soxF* у морской миноги показали, что, несмотря на внешнее сходство картины раннего дробления зиготы миног и амфибий, на вегетативном полюсе у миног, в отличие от амфибий, присутствует внезародышевая желтковая масса, в которой не наблюдается экспрессия генов *sox* (Cattell et al., 2012). По количеству и распределению желтка в яйцеклетке миноги занимают промежуточное положение между богатыми желтком яйцеклетками костистых рыб и птиц с меробластическим типом дробления и более бедными желтком яйцеклетками амфибий с голобластическим дроблением. Это может быть отражением эволюционной древности миног.

Предполагается, что голобластический тип дробления миног, при котором вегетативные бластомеры являются внезародышевыми питательными желтковыми клетками, мог быть предковым для позвоночных (Рисунок 18), а голобластическое дробление амфибий, при котором все бластомеры входят в состав зародышевых слоев, появился вторично (Takeuchi et al., 2009). Меробластическое дробление костистых рыб и амниот (рептилии, птицы), в свою очередь, возникало в каждой из групп независимо (Arendt and Nubler-Jung, 1999).

Исследование регуляторных каскадов и сигнальных белков, работающих на ранних этапах нейральной индукции у миног, представляет большой интерес для понимания функциональной взаимосвязи разных сигнальных путей у представителей более эволюционно молодых классов позвоночных.

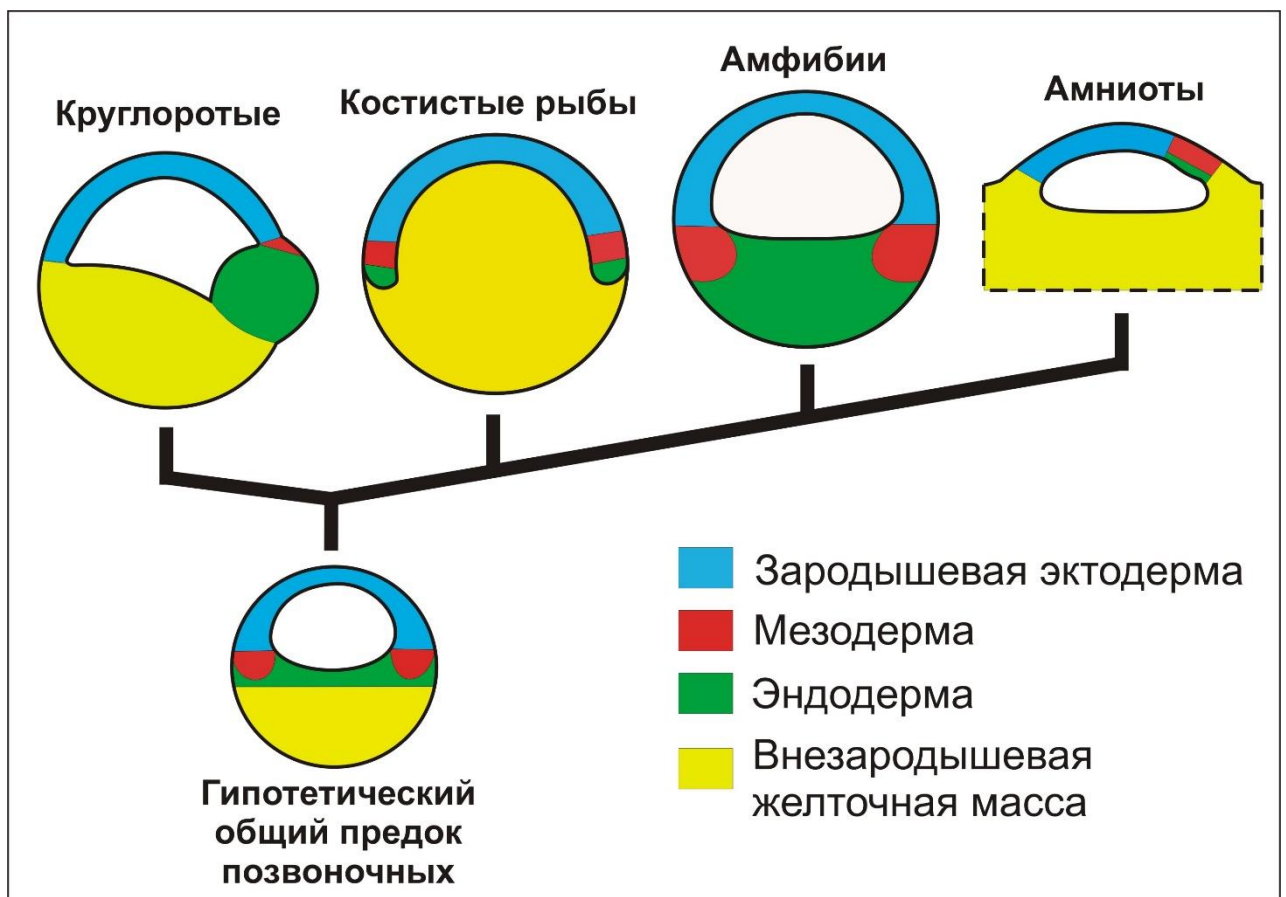


Рисунок 18. Схема зародышевых слоев на стадии ранней гаструлы у разных групп позвоночных (по Takeushi et al., 2009).

1.8. Внутриклеточные сигнальные каскады

Сигнальные каскады, регулируемые факторами роста семейств BMP, Nodal и Activin, относящихся к надсемейству трансформирующего фактора роста b (TGF-b) участвуют в широком спектре биологических процессов. Они включают клеточную и тканевую дифференцировку в ходе эмбрионального развития и заживления ран, восстановление и реконструкцию костной ткани во взрослом организме, канцерогенез, воспалительные процессы различной природы и многие другие (Kitisin et al., 2007)

Также выявлена связь нарушений регуляции активности TGF-beta сигнальных каскадов с развитием раковых опухолей различных типов (Shen et al., 2003).

У двухсторонне-симметричных животных BMP каскад и его антагонисты (в первую очередь Chordin) участвуют в дорсо-вентральной дифференцировке эмбрионов. В то же время дифференцировка вдоль передне-задней оси во многом определяется активностью Wnt-каскада. Это послужило основой для формирования концепции "молекулярных декартовых координат" ("BMP - Wnt") для двусторонне-симметричных животных (Niehrs 2010).

Семейство ростовых факторов BMP, включающее около 20ти описанных на сегодняшний день белков – мультифункциональные участники многих ключевых клеточных процессов. Эксперименты с трансгенными животными, а также опыты по блокаде активности этих факторов роста показали их ключевую роль в развитии нейральных и хрящевых структур, тканей сердца печени и легких. Также факторы BMP играют важную роль в развитии костей (Chen et al., 2004). Нарушения активности BMP сигнального каскада связано как с заболеваниями сосудов и скелетных структур, так и с онкологическими заболеваниями (Miyazono et al., 2010).

Activin/Nodal каскад градиентно участвует в индукции мезодермы у позвоночных: высокая активность данного каскада определяет

дифференцировку дорсальной мезодермы, а низкая – вентральной (Jones et al. 1995). Гены *Nodal* необходимы для формирования эмбрионального организатора у птиц и млекопитающих. Кроме того, факторы *Nodal* участвуют в формировании право-левой асимметрии у многих животных (Oliverio et al., 2010).

Белки семейства *Activin* (одного из семейств надсемейства TGF-beta) участвуют в таких физиологических процессах, как пролиферация и метаболизм клеток, поддержание гомеостаза и иммунный ответ. Понимание того, каким образом контролируется активность внутриклеточного каскада, активируемая факторами семейства *Activin* может не только привести к более полному пониманию механизмов, лежащих в основе клеточного роста и апоптоза, но также и послужить основой для терапии онкологических и других заболеваний (Chen et al., 2006).

Представители другого семейства TGF-beta факторов роста – семейства *Nodal* участвуют в закладке эндодермальной и мезодермальной тканей, установлении паттерна нервной системы, а также право-левой асимметрии эмбрионов (Tian and Meng, 2006). Нарушения экспрессии этих белков приводят к аномалиям развития эндодермы и мезодермы, циклопии, смещению сердца и других внутренних органов.

Активация TGF- β сигнальных каскадов происходит в результате взаимодействия ростового фактора, в норме активирующего данный каскад, с внеклеточными доменами мембранных рецепторов I и II типов (Рисунок 19). Это взаимодействие приводит к запуску процесса фосфорилирования молекул белков *Smad* в цитоплазме клетки. Фосфорилирование молекул *Smad*, таким образом, является принципиальным этапом функционирования TGF-beta сигнальных каскадов. При этом, на основе того, какие ростовые факторы участвуют в активации каскада и какие молекулы *Smad* фосфорилируются и участвуют в его функционировании, все TGF-beta сигнальные каскады разделяются на 2 типа – *Smad1* и *Smad2*-зависимые сигнальные каскады. Фосфорилированные молекулы *Smad1*, 5, 8 (в случае

ВМР каскада) и молекулы Smad2, 3 (в случае Nodal/Activin каскада) образуют комплекс с молекулами Smad4 и транспортируются в ядро, где модулируют активность генов-мишеней.

На сегодняшний день идентифицирован ряд белков межклеточного матрикса, являющихся антагонистами различных ростовых факторов надсемейства TGF-beta - например, белков семейства ВМР (Balemans and Van Hul, 2002; Avsian-Kretchmer and Hsueh, 2004).

К антагонистам ВМР относятся такие белки как Chordin, Noggin1, Cerberus и Follistatin.

Белки ВМР, как и Activin, синтезируются в виде белков-предшественников. Секретированные димеры ВМР активируют сигнальный каскад, связываясь с серин/треонин-киназными рецепторами I и II типа. Рецепторы типа II после взаимодействия с молекулами ВМР фосфорилируют рецепторы типа I, которые в свою очередь активируют внутриклеточные белки Smad1 (Smad1, Smad5 и Smad8) путем фосфорилирования.

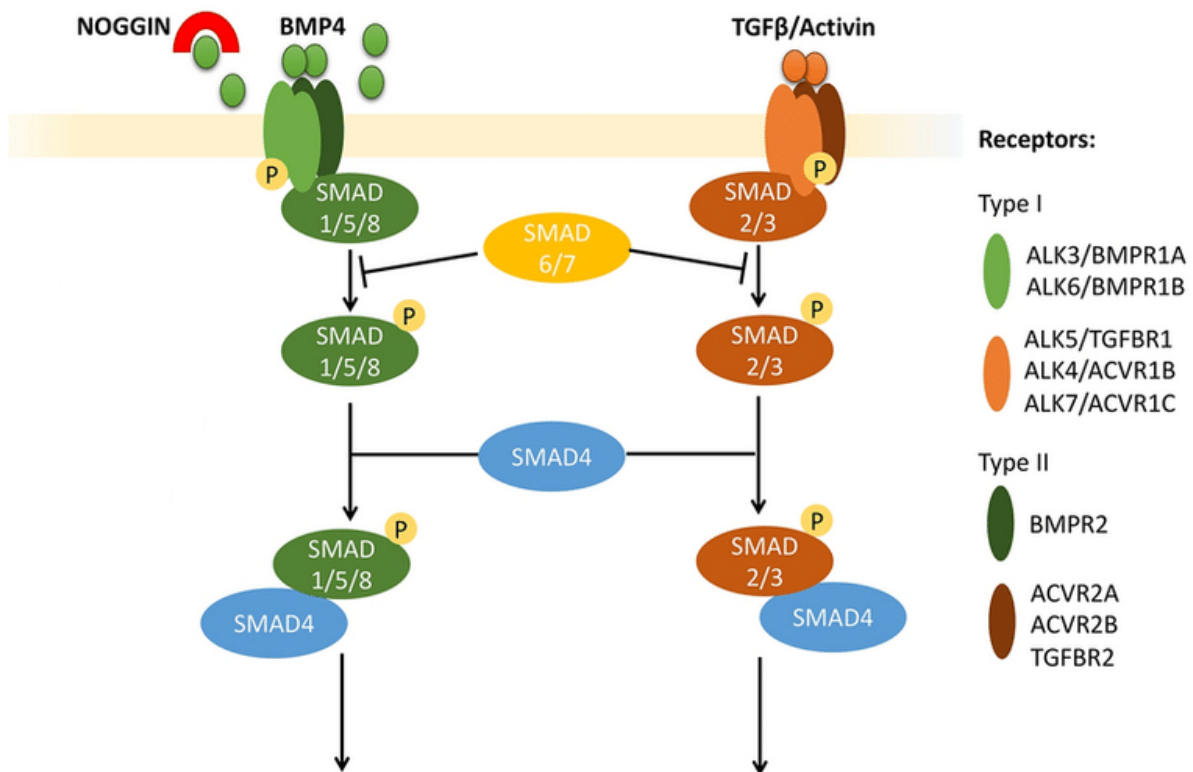


Рисунок 19. Схема ВМР и Activin сигнальных каскадов (по Roberts et al., 2022).

Сигнальный каскад Wnt представляет собой эволюционно древний регуляторный путь, участвующий в регуляции клеточной дифференцировки, миграции, формирования клеточной полярности и органогенеза. Белки Wnt представляют собой секретируемые гликопротеины, N-концевым внеклеточным цистеин-богатым доменом связывающиеся с рецепторами семейства Frizzled (Fz).

Важнейшим путем регулирования активности сигнального каскада Wnt является внеклеточное связывание молекул Wnt секретируемыми антагонистами каскада. В случае успешного связывания молекул Wnt с рецепторным комплексом, сигнал передается на цитоплазматический фосфопротеин Dishevelled (Dsh/Dvl) (Рисунок 20). На этом уровне сигнал Wnt подразделяется, на три функционально различных каскадах: «канонический» (активность которого осуществляется через посредничество β -Catenin), и «неканонические»: каскад клеточной полярности в пласте (PCP, от Planar Cell Polarity) и Wnt/Ca²⁺. Канонический и неканонические Wnt-каскады активируются разными белками Wnt. Ключевым событием передачи сигнала по каноническому Wnt каскаду является накопление внутриклеточного белка β -Catenin и его перемещение в ядро.

Wnt/ β -Catenin каскад играет ключевую роль в целом ряде биологических процессов. В эмбриогенезе шпорцевой лягушки описана ранняя и поздняя функциональные активности Wnt-каскада. Ранняя функция включает установление дорсо-вентральной полярности эмбриона после оплодотворения и локализацию ньюкуповского центра и шпемановского организатора. На более поздних стадиях, после гастрюляции Wnt выступает в роли морфогена, определяющего (наряду с ретиноевой кислотой и FGF) передне-заднюю дифференцировку эмбриона. В этом процессе белки Wnt обладают выраженным постериоризирующим эффектом.

Неканонические Wnt каскады участвуют в регуляции роста аксонов, в том числе аксонов конечного мозга, соматически-сенсорных нейронов спинного мозга и аксонов кортикоспинального тракта (Lyuksyutova et al.

2003). Белок Wnt5a выступает в роли хеморепеллента в ходе роста нейронов кортиспинального тракта (Li et al., 2010).

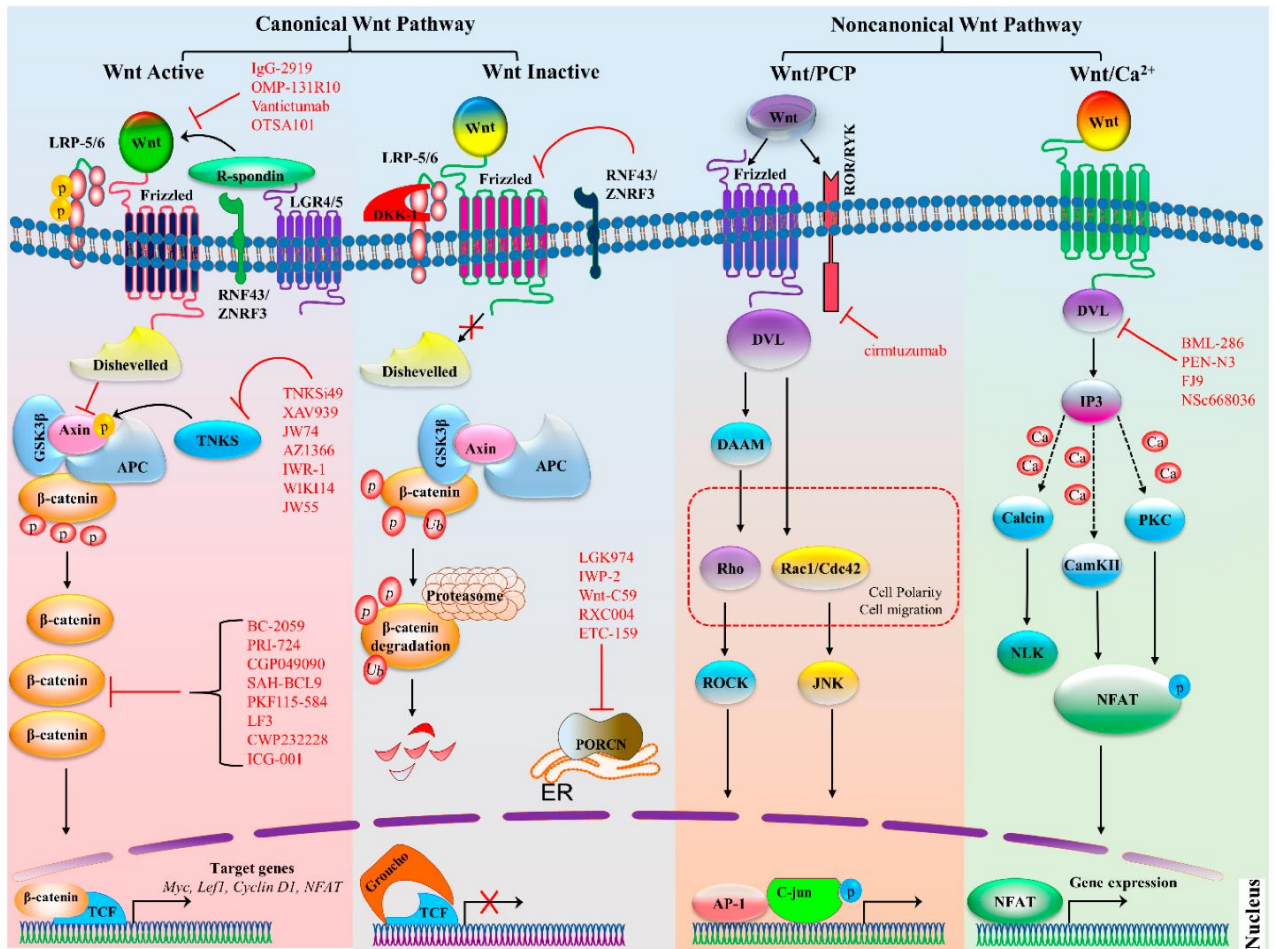


Рисунок 20. Схема Wnt сигнальных каскадов (по Naseeb et al., 2019).

Показано, что Wnt/β-Catenin каскад играет важную роль в функционировании эмбриональных стволовых клеток и индуцированных полипотентных стволовых клеток у представителей разных классов позвоночных. Считается, что Wnt необходим для поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии, спецификации мезэндодермальной линии и предотвращения нейроэктодермальной дифференцировки (Ten Berge et al., 2011). Однако роль Wnt лигандов и рецепторов в поддержании плюрипотентности остается предметом дискуссий (Wend et al., 2010).

Показано, что нарушения активности Wnt-каскада могут быть причиной многочисленных онкологических заболеваний, таких как рак молочной

железы (Nusse and Varmus 1982), прямой кишки (Polakis 1997), карциномы печени (Clevers 2000) и других.

У позвоночных описаны секретлируемые белки, выступающие в роли регуляторов Wnt-каскада. Во внеклеточном матриксе обнаружены секретлируемые белки, связывающиеся с белками Wnt и конкурентно нарушающими их связывание с Fz или с LRP5/6, что приводит к подавлению активности Wnt каскада. Такими белками являются Dickkopf (Dkk), Wnt-ингибиторный фактор (WIF), растворимые Frizzled-родственные белки (sFRP), Cerebrus, Frzb и Wise и другие. Эти ингибиторы формируют градиент активности Wnt каскада.

Белок Cerberus описан в качестве одного из ключевых ингибиторов Wnt каскада в раннем онтогенезе (Bouwmeester et al. 1996). В нормальном развитии шпорцевой лягушки *cerberus* экспрессируется в передней эндодерме, включая шпемановский организатор, и обладает уникальным свойством индуцировать при экспериментальной эктопической экспрессии вторичные головы, без формирования туловищных структур. Согласно современным представлениям, молекулярные механизмы индукции туловищных структур и головных структур различаются – индукция туловищных зависит от функционирования Nodal и Wnt каскадов, тогда как индукция головы требует одновременного подавления Wnt и BMP каскадов (Glinka et al. 1997).

1.9. Регенерация у позвоночных

Регенерация – процесс восстановления структур, от части клетки до частей тела, после естественного изнашивания или случайной утраты. У взрослых млекопитающих способность к безшрамовой регенерации тканей отсутствует, в то время как представители других классов позвоночных могут восстанавливать ткани, структуры и органы даже во взрослом состоянии (Seifert and Maden, 2014). У миног регенерация была описана на морфологическом уровне более 50 лет назад (Niazi, 1963). Было показано, что

личинки двух видов миног *Petromyzon marinus* и *Lethenteron appendix* способны регенерировать ампутированный хвост. Такой же способностью обладают и личинки речной миноги *Lampetra fluviatilis* (Рисунок 21).

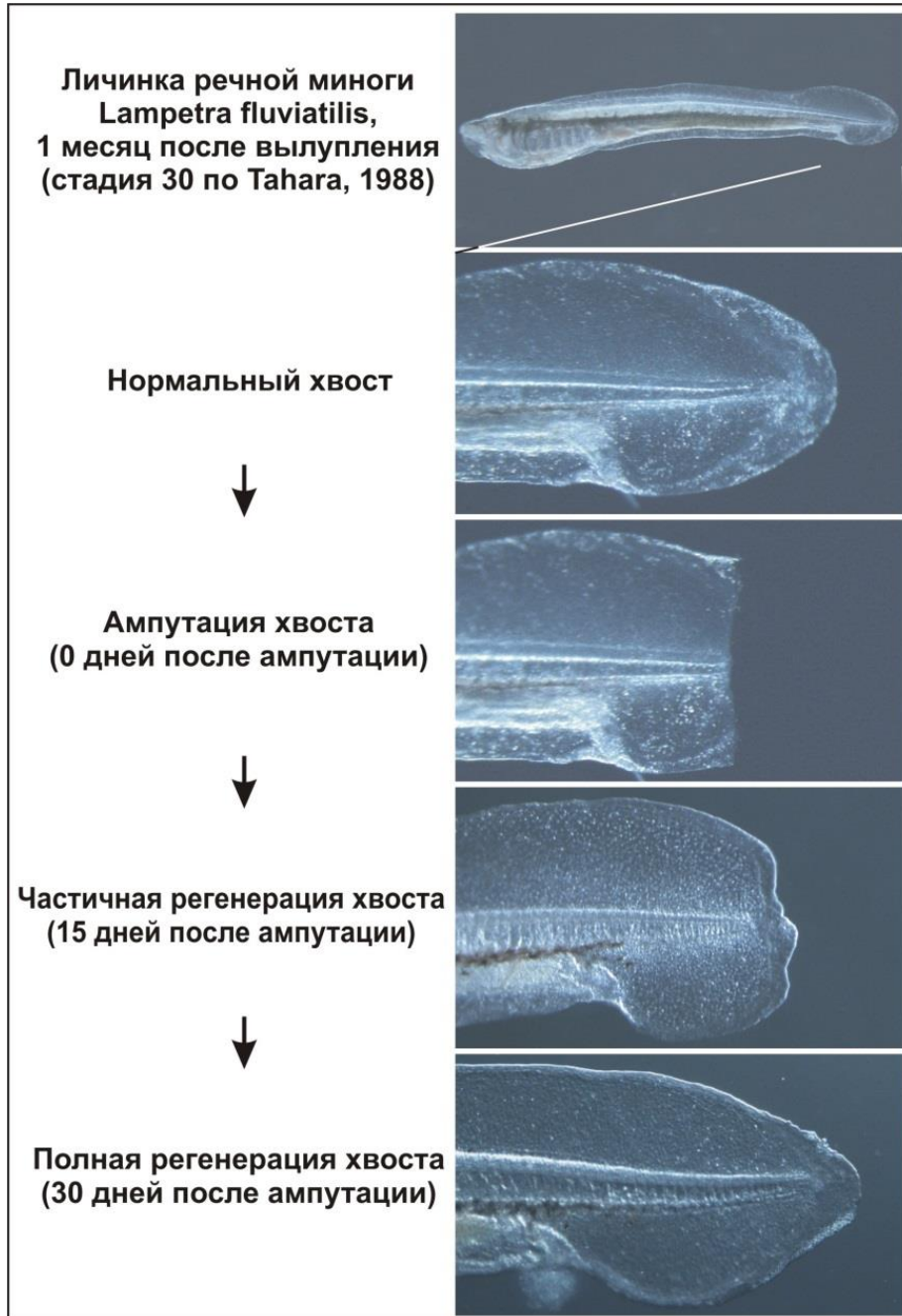


Рисунок 21. Регенерация ампутированного хвоста речной миноги *L. fluviatilis*.

На молекулярном уровне было показано, что при регенерации спинного мозга у позвоночных реактивируются сигнальные каскады, вовлеченные в изначальное развитие ЦНС, такие как Wnt, BMP, Nf каскады. Исследование

изменений уровней экспрессии генов, связанных с регенерацией при травме спинного мозга у миног показало, что многие из активируемых при регенерации генов относятся к участникам канонического и неканонического Wnt каскадов, а также факторам, активирующим рост аксонов (Herman et al., 2018). Это указывает на то, что при регенерации у миног, по всей видимости, проявляют активность транскрипционные факторы и пути высоко консервативные для позвоночных в целом.

Исследования молекулярных механизмов, которые контролируют регенерацию, выявили повторную активацию экспрессии генов и активацию сигнальных путей, которые были задействованы во время эмбрионального развития соответствующих структур. Однако такие способности к эффективной регенерации характерны в основном для низших позвоночных, рыб и амфибий, и сильно редуцированы у высших (птиц, млекопитающих). Изучение молекулярно-генетических основ данного процесса является одной из актуальных задач современной биомедицины. Не так давно стало известно, что гены *Agr* участвуют в процессах регенерации конечностей тритона, хвоста и зачатков конечностей головастиков шпорцевой лягушки, а также в регенерации плавников рыб *Danio rerio* (Kumar et al., 2007; Ivanova et al., 2013, 2015). Критическим этапом для нормального процесса регенерации является образование бластемы. И если ген *Agr2* активируется только в раневом эпителии, то ген *Agr1*, утраченный высшими позвоночными, проявляет свою активность как в клетках раневого эпителия, так и в клетках бластемы. Подавление экспрессии этих генов в плавниках рыбы *D. rerio* ведет к замедлению темпов регенерации или ее отсутствию (Ivanova et al., 2015). Полученные результаты свидетельствуют о необходимости генов *Agr* для нормального процесса регенерации придатков тела у низших позвоночных.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1. Гены семейства *Noggin* – регуляторы раннего развития позвоночных

Белок *Noggin* ранее были описан в качестве раннего эмбрионального индуктора, участвующего в эмбриональной дифференцировке. Долгое время у позвоночных был описан и исследовался только один ген *noggin* – *noggin1*, в качестве основной функции которого рассматривалось ингибирование сигнального каскада BMP. Одной из задач настоящей работы было исследование генов семейства *Noggin* у представителей архаичных групп позвоночных – миног (бесчелюстных), хрящевых и осетрообразных рыб (древних челюстноротых). Также было проведено детальное исследование функциональных свойств паралога *noggin* у шпорцевой лягушки.

Проведенный анализ доступных баз данных показал, что у беспозвоночных хордовых – ланцетников и асцидий в геноме присутствует по одному гену *noggin*. Пространственный паттерн экспрессии был исследован методом гибридизации *in situ*.

У позвоночных, как у бесчелюстных, так и у челюстноротых, были обнаружены и описаны несколько паралогов *noggin*.

2.1.1. Гены семейства *Noggin* бесчелюстных

Данный раздел работы подробно представлен в статьях Ermakova et al., 2020, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01234-3>; Ermakova et al., 2021, <https://doi.org/10.1134/S1062360421010033>).

Поиск гомологов генов семейства *Noggin* был проведен в доступных геномных библиотеках тихоокеанской миноги (*Lethenteron camtschaticum*) и морской миноги (*Petromyzon marinus*).

В результате было обнаружено 4 гена (*nogginA*, *nogginB*, *nogginC*, *nogginD*), имеющих высокую степень гомологии с генами семейства *Noggin* челюстноротых.

nogginA (*L. camtschaticum* contig 015835, sequence ID: APJL01043027.1; *P. marinus* isolate animal number 11 contig 46719, Sequence ID: AEF01046720.1);

nogginB (*L. camtschaticum* contig 045160, sequence ID: APJL01075429.1; *P. marinus* isolate animal number 11 contig 47771, sequence ID: AEF01047772.1);

nogginC (*L. camtschaticum* unplaced genomic scaffold scaffold00115, sequence ID: KE993786.1; *P. marinus* isolate animal number 11 contig 36440, sequence ID: AEF01036441.1); and

nogginD (*L. camtschaticum* contig 002783, sequence ID: APJL01035689.1; *P. marinus* isolate animal number 11 contig 9676, sequence ID: AEF01009677.1).

На основе обнаруженных в базах данных сиквенсов был осуществлен дизайн олигонуклеотидных праймеров для генов *noggin* речной миноги *Lampetra fluviatilis* (вид миног, доступный в нашем случае для систематических лабораторных исследований). Для каждого из генов *noggin* были синтезированы две пары праймеров для обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР) с первой цепи.

Методом ОТ-ПЦР на основе полученных образцов тотальной мРНК ранних стадий развития *L. fluviatilis* с применением специфических праймеров был проведен синтез полноразмерных кДНК обнаруженных генов семейства *Noggin*.

Полученные методом ОТ-ПЦР кДНК генов семейства *Noggin* *L. fluviatilis* были отсеквенированы и клонированы в экспрессионный вектор pCS2, пригодный для синтеза мРНК с последующей ее экспрессией в эукариотических клетках, а также вектор pAL-T для последующей транскрипции dig-меченых зондов для гибридизации *in situ*.

В совокупности, были описаны последовательности четырех генов семейства *Noggin* для трех видов миног (Рисунок 22) и получены полноразмерные кДНК генов *Noggin* речной миноги *L. fluviatilis*.

2.1.1.1. Анализ филогении и геномной синтении генов и белков *Noggin* миног и челюстноротых

Для установления филогенетического родства белков *Noggin* позвоночных был проведен филогенетический анализ их аминокислотных последовательностей (Рисунок 23). Важным результатом проведенного анализа стало обнаружение среди белков *Noggin* миног гомологов всех трех *Noggin* белков челюстноротых, а именно белков *Noggin1*, *Noggin2* и *Noggin4*, описанных ранее у челюстноротых (Eroshkin et al., 2006). При этом, как это часто наблюдается при филогенетическом анализе белков миног, попарная ортология с белками челюстноротых выявляется не вполне уверенно. Ряд авторов связывает такой паттерн кластеризации с особенностями аминокислотного состава белков миног (так называемый «миножий диалект») (Onimaru and Kuraku, 2011).

Уверенно кластеризуются вместе только гены *nogginD/noggin4* миног и челюстноротых.

Исходя из такого паттерна кластеризации генам/белкам миног и были присвоены буквенные индексы А, В, С, D (в отличие от числовых индексов 1, 2, 4 для генов *noggin* челюстноротых).

На следующем этапе был проведен анализ локальной геномной синтении (состав соседних генов) для генов *noggin* позвоночных (Рисунок 24). Проведенный анализ показал, что среди генов *Noggin* челюстноротых уверенно выделяются три паралога – *noggin1*, *noggin2* и *noggin4*, что соответствует данным филогенетического анализа. Общие соседние гены у *noggin* бесчелюстных и челюстноротых обнаруживаются, однако однозначной уверенной попарной ортологии по этому признаку между генами *noggin* бесчелюстных и челюстноротых не наблюдается.

Проведенный анализ показал, что одним из характерных генов-соседей для всех генов *noggin* челюстноротых является ген *ankfn1* (кодирующий Ankyrin repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1). Причем, существенно, что этот ген был обнаружен также в окрестностях гена *noggin4* у хрящевых рыб и птиц. Это указывает на единство происхождения

(монофилию) всех трех генов *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* (Рисунок 24).

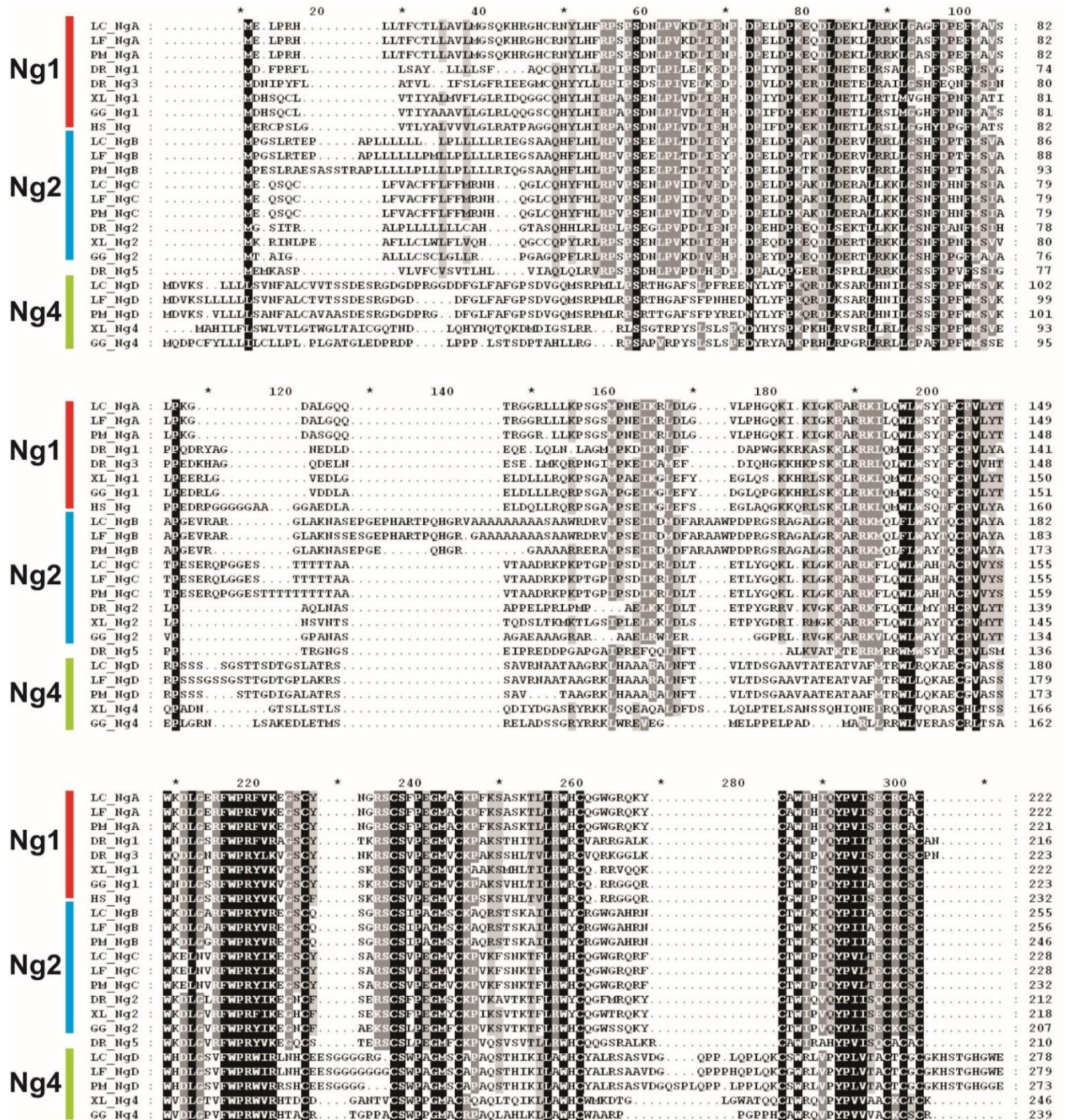


Рисунок 22. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей обнаруженных у миног белков семейства *Noggin* с последовательностями белков *Noggin* костистых рыб (*Danio rerio*, DR), амфибий (*Xenopus laevis*, XL) и птиц (*Gallus gallus*, GG). Приведены последовательности *Noggin* белков трех видов миног - тихоокеанской (*L. camtschaticum*, LC), морской (*P. marinus*, PM) и европейской речной миноги (*L. fluviatilis*, LF).

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*.

Проведенный анализ локальной геномной синтении подтвердил родство генов *noggin* миног и челюстноротых.

Происхождение *nogginA*, *nogginB*, *nogginC*, *noggin1* и *noggin2* от общего предкового гена подтверждается следующими независимыми данными. В геномных сиквенсах *P. marinus* гены *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* расположены в суперскэффолдах 00003, 00037 и 00011 соответственно (super-scaffolds – собранные после секвенирования геномные протяженные фрагменты, содержащие в среднем около 10-20 млн оснований, которые в ходе дальнейшей сборки генома объединяются в хромосомы). С другой стороны, анализ распределения консервативных групп синтении в геномах морской миноги и курицы, проведенный Смитом и соавторами (2018) показал, что эти суперскэффолды соответствуют куриным хромосомам 14 и 18, которые, по мнению авторов, произошли в результате дупликации одной предковой хромосомы 5. Куриные гены *noggin1* и *noggin2* расположены как раз в хромосомах 18 и 14, соответственно. В сочетании с полученными нами результатами, эти данные свидетельствуют в пользу того, что по крайней мере три из четырех генов *noggin* миног (гены *nogginA*, *nogginB* и *nogginC*), наряду с генами *noggin1* и *noggin2* челюстноротых, произошли от одного предкового гена. На единство происхождения гена *nogginD* с другими генами *noggin* миног указывает наличие в его окрестностях генов *rab40b* и *wdr90*, паралоги которых встречаются в качестве соседей генов *nogginC* и *nogginB* соответственно.

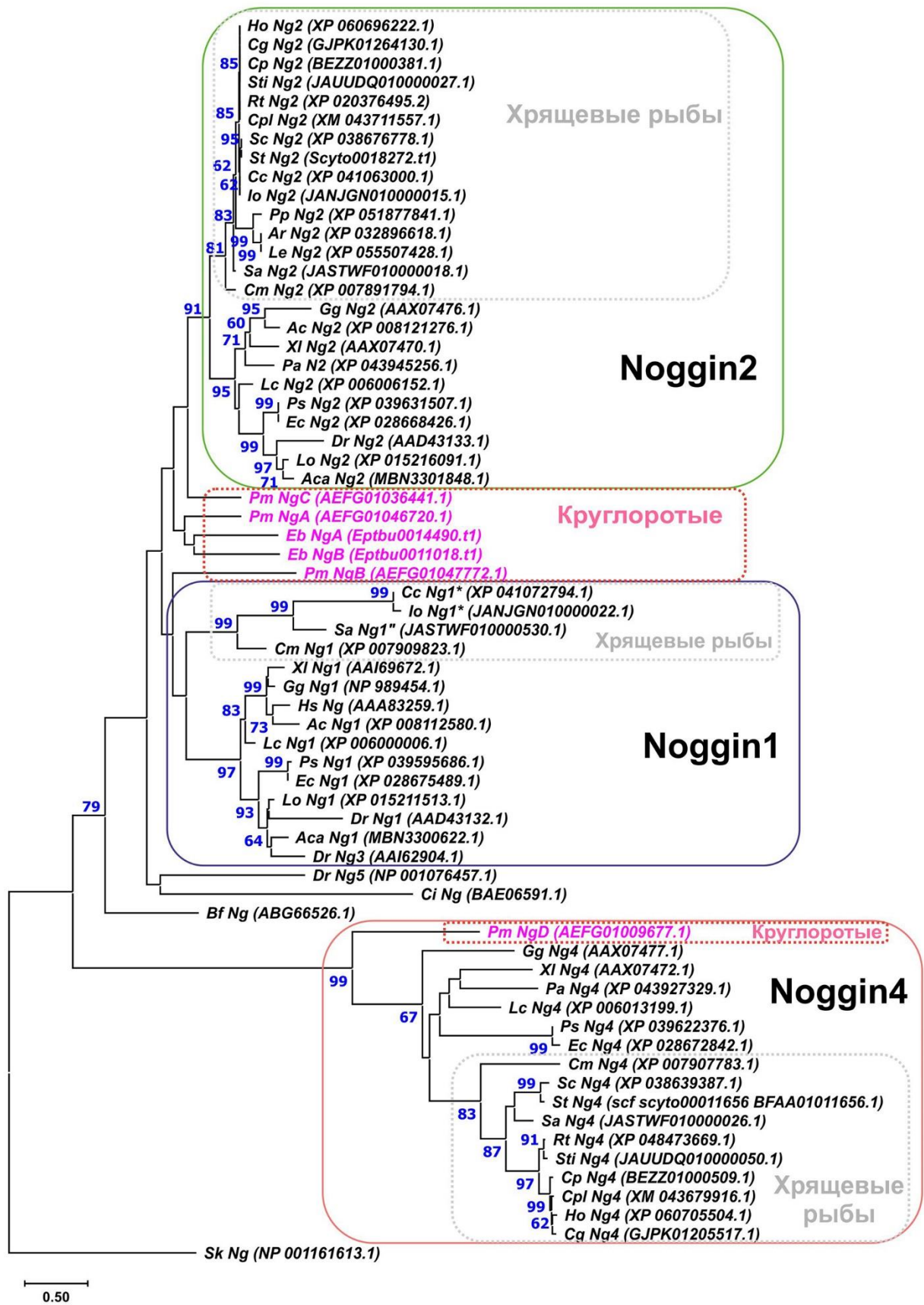


Рисунок 23. Филогенетическое дерево белков Noggin позвоночных, построенное по алгоритму максимального правдоподобия (ML). Показаны значения бутстрэп-теста >50

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*.

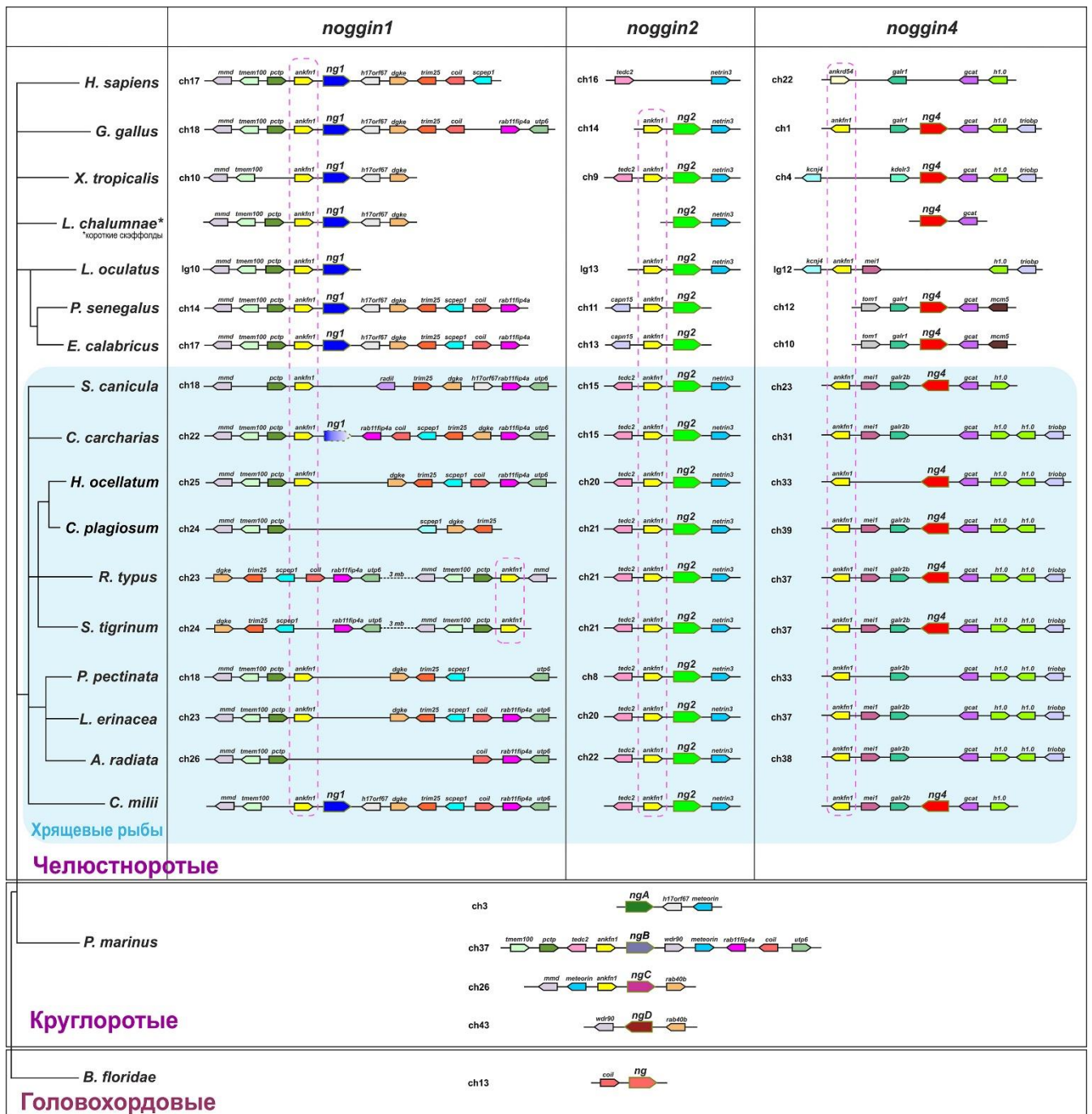


Рисунок 24. Локальная геномная синтенция генов *noggin* позвоночных.

В пользу общего происхождения генов *noggin* позвоночных свидетельствует и присутствие гена *coil* в окрестностях гена *nogginB* миноги, гена *noggin1* челюстноротых и единственного гена *noggin* ланцетника (Рисунок 24).

В сочетании с присутствием лишь одного гена *noggin*, у ближайших родственников позвоночных – беспозвоночных хордовых бесчерепных (ланцетников), оболочников (асцидий) и полухордовых, полученные данные анализа филогении и синтении свидетельствуют о формировании семейства генов *Noggin* позвоночных в результате как минимум двух раундов полногеномных дупликаций на ранних этапах эволюции группы.

2.1.1.2. Исследование динамики экспрессии генов *noggin* речной миноги

Динамика экспрессии генов *noggin* на ранних стадиях развития речной миноги *L. fluviatilis* была проанализирована методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени (Рисунок 25). Количественная ПЦР проводилась на приборе ДНК-Технология, для каждого из исследуемых генов использовались 2 независимые пары праймеров на разные участки кДНК. Дизайн праймеров был выполнен в программе Primer-BLAST. Нормировка результатов проводилась по двум генам домашнего хозяйства – *EF1a* и *ODC*.

Было выявлено, что гены *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* после оплодотворения экспрессируются на низком уровне, однако начиная со стадии поздней нейрулы уровень их экспрессии существенно возрастает.

Экспрессия *nogginD* наблюдается на относительно постоянном уровне, не превышающем уровень экспрессии на стадии бластулы.

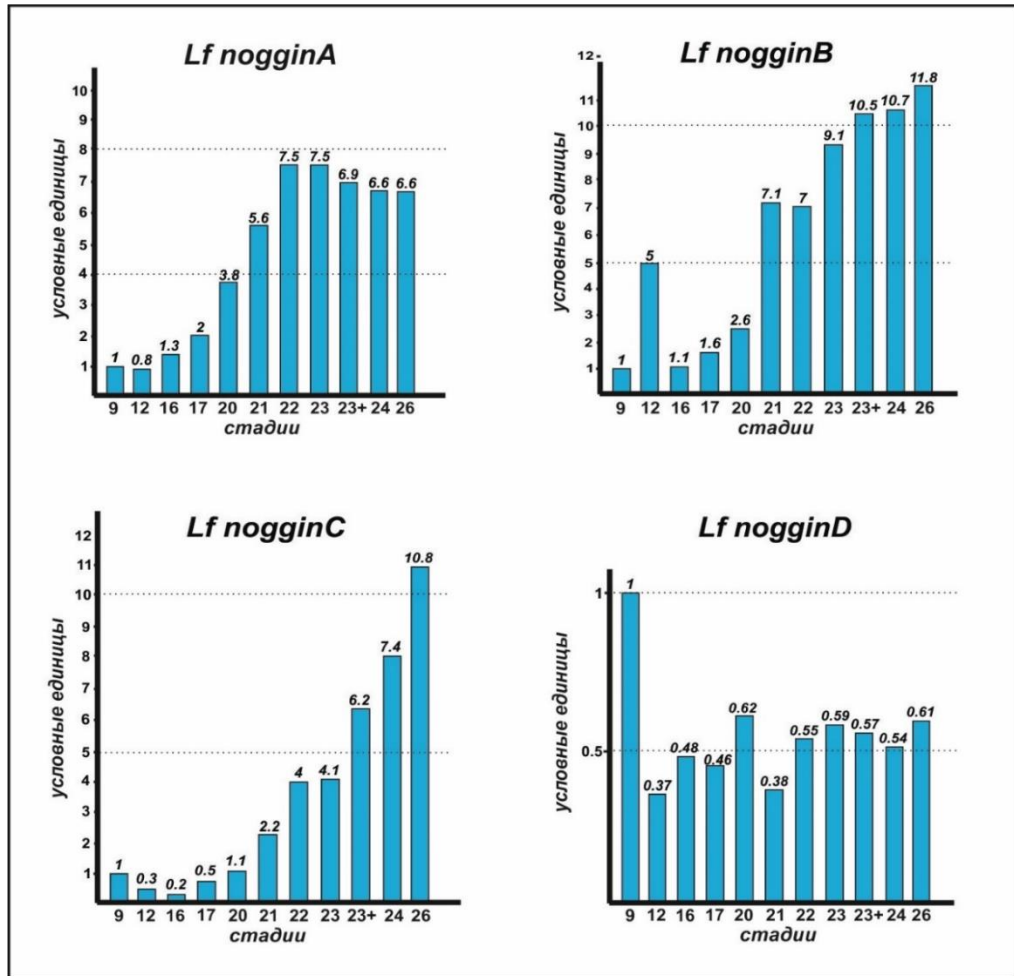


Рисунок 25. Динамика экспрессии генов *nogginA*, *nogginB*, *nogginC* и *nogginD* на ранних стадиях развития *L. fluviatilis*. Стадии указаны согласно Tahara, 1988.

2.1.1.3. Исследование пространственной экспрессии генов *noggin* на ранних стадиях развития речной миноги *L. fluviatilis*

Паттерны экспрессии генов *noggin* на ранних стадиях развития речной миноги *L. fluviatilis* были проанализированы методом гибридизации *in situ* (*in situ* hybridization, ISH) на целых эмбрионах и гистологических срезах.

На стадиях бластулы и гаструлы у речной миноги экспрессия генов *noggin* не была обнаружена методом ISH.

NogginA (Рисунок 25 А – К; Рисунок 26 А - К). Экспрессия гена *nogginA* впервые обнаруживается на стадии ранней нейрулы (стадия 17) в задней части хордомезодермы, а на стадии поздней нейрулы (стадия 20) детектируется на всем протяжении хордомезодермы (за исключением самой

передней ее части), а также в дорсальной области зачатка будущего головного мозга.

На стадии головного выроста (стадия 22) обнаруживается экспрессия *nogginA* в сомитах, в нижней губе и в области среднего мозга.

На стадиях 23-24 *nogginA* продолжает экспрессироваться в сомитах, нижней губе и хорде (по-прежнему, кроме ее антериорной части). В спинном мозге экспрессия наблюдается в основном в клетках желудочковой зоны. В головном мозге экспрессия *nogginA* наблюдается на границах отделов: в области границы конечного и промежуточного мозга (в области *zona limitans intrathalamica (ZLI)*), на границе промежуточного и среднего мозга и по границам некоторых ромбомеров в заднем мозге. В области заднего мозга экспрессия *nogginA* обнаруживается в клетках как дорсальной, так и вентральной частей нервной трубки. Такой паттерн экспрессии сохраняется до стадии 29. На стадии 27 появляется экспрессия *nogginA* в формирующихся глазах. За пределами головных структур, экспрессия гена *nogginA* выявляется в сомитах и хорде.

***NogginB* (Рисунок 27).** Экспрессия *nogginB* впервые выявляется на стадии ранней нейрулы (стадия 17) в дорсальной части головного отдела нервной трубки. Предположительно, экспрессия активна в клетках нервного гребня (КНГ) или клетках зачатка головного мозга. В течение нейруляции экспрессия *nogginB* усиливается в области всего зачатка переднего и заднего мозга и в отдельных дорсальных клетках нервной трубки – премиграторных КНГ. К концу нейруляции паттерн экспрессии меняется – интенсивность экспрессии в области переднего мозга усиливается, в то время как экспрессия в дорсальной части заднего мозга ослабевает.

На стадии головного выроста (стадия 22) экспрессия *nogginB* обнаруживается в области зачатка переднего мозга и в отдельных клетках дорсальной области нервной трубки на всем протяжении тела - начиная с головного отдела и до хвостовой части.

На последующих стадиях (стадии 25 – 29) экспрессия *nogginB* очень интенсивна в области переднего мозга. Кроме этого, экспрессия *nogginB* обнаруживается в дорсальной части среднего и заднего мозга в симметрично расположенных отдельных КНГ. Также экспрессия наблюдается в КНГ туловищного отдела.

Можно отметить, что экспрессия *nogginB* наблюдается в эволюционно молодых структурах – КНГ и области переднего мозга, включая зачаток конечного мозга. Эти структуры впервые в эволюции появились у позвоночных.

***NogginC* (Рисунок 25 Л – Т; Рисунок 26 Л - Ф).** На стадии ранней нейрулы (стадия 18) появляется экспрессия *nogginC* в двух доменах хордомезодермы - хвостовом и головном.

Впоследствии, на стадии поздней нейрулы (стадия 20) *nogginC* экспрессируется в туловищной хордомезодерме и области ушных плакод. Также появляется экспрессия в клетках нервного гребня.

На стадии поздней нейрулы (стадия 20) экспрессия *nogginC* наблюдается в области ушных плакод и в клетках нервного гребня. На более поздних стадиях окрашивается нервная трубка и мезодерма сомитов и верхней и нижней губы. На стадии 23-24, появляется экспрессия в области переднего головного мозга.

На стадии 24-25 появляется экспрессия *nogginC* в вентральной области конечного мозга и эпифизе. Также наблюдается слабое окрашивание в промежуточном отделе мозга в области ZLI и на границе среднего и заднего мозга. Экспрессия *nogginC* наблюдается также в конечном мозге и здесь она более выражена в вентральной его части. Выявляется окраска в формирующихся ушах, но эндолимфатический проток не окрашивается.

Наблюдаемый паттерн экспрессии *nogginC* сохраняется до стадии 29, когда дополнительно появляется экспрессия в эпифизе и усиливается в вентральной части переднего мозга и в хорде растущей почки хвоста.

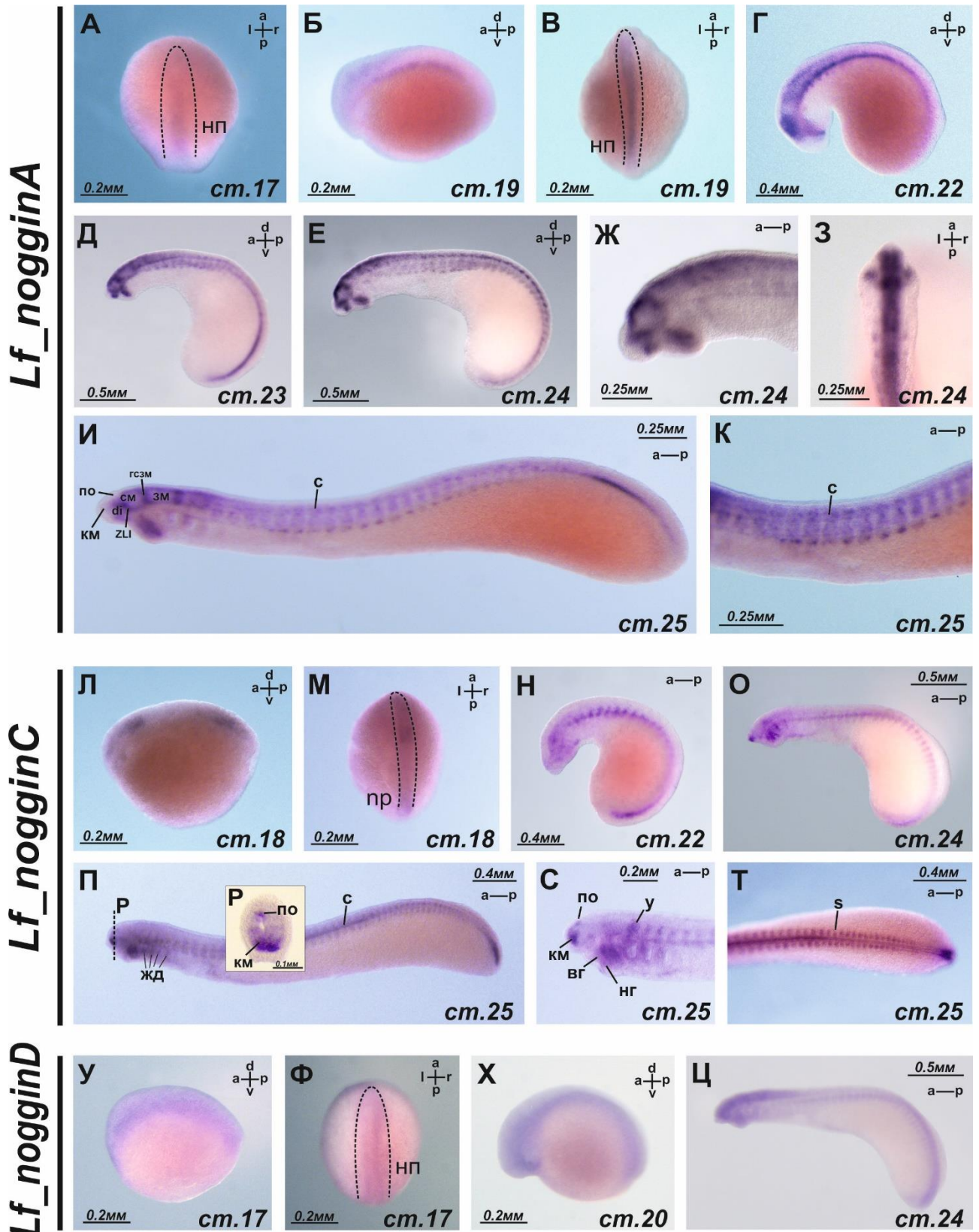


Рисунок 25. Паттерн экспрессии генов *nogginA* (А - К), *nogginC* (Л - Т) и *nogginD* (У - Ц) речной миноги *L. fluviatilis*

А – На стадии 17 ген *nogginA* экспрессируется в хвостовой хордомезодерме.

Б, В – На стадии 19 экспрессия обнаруживается в хордамезодерме, за исключением самой передней области и в дорсальной части зачатка головного мозга, так же за исключение наиболее переднего отдела.

Г – на стадии 22 экспрессия обнаруживается в нервной трубке, нотохорде, сомитах и промежуточном, среднем и заднем отделах мозга.

Д - К – На стадиях 23-25 паттерн экспрессии включает сомиты (И, К), верхнюю и нижнюю губу (Ж), нотохорд и ряд областей головного мозга: границу теленцефалона и диэнцефалона, *zona limitans intrathalamica*, границу среднего и заднего отделов мозга (Ж, И).

Л, М - На стадии 18 ген *nogginC* экспрессируется в передней и задней частях хордамезодермы.

Н – На стадии 22 экспрессия *nogginC* обнаруживается в нотохорде, нервной трубке, жаберных дугах, ушных капсулах, сомитах.

О – На стадии 24 экспрессия *nogginC* проявляется в области конечного мозга, ушных пузырьках, верхней и нижней губе.

П - С – На стадии 25 экспрессия *nogginC* обнаруживается в клетках пинреального органа (поперечный срез представлен на Р).

Т – На стадии 25 *nogginC* экспрессируется в сомитах.

У, Ф – На стадии 17 *nogginD* экспрессируется в нервной трубке.

Х, Ц – На стадиях 20-24 экспрессия *nogginD* обнаруживается в нервной системе и носит диффузный характер.

Сокращения: км – конечный мозг, н – нотохорд, нт – нервная трубка, с – сомиты, кнг - клетки нервного гребня, см – средний мозг, гзм – граница среднего и заднего мозга, пм – промежуточный мозг, г – глаз, у – ухо, по – пинеальный орган, жд – жаберные дуги, вг – верхняя губа, нг – нижняя губа, *ZLI* - *zona limitans intrathalamica*

Можно отметить, что, по своему характеру, паттерн экспрессии *nogginC* частично совмещает паттерны экспрессии генов *nogginA* (экспрессия в клетках нервного гребня, *ZLI*, на границе среднего и заднего мозга и в мезодерма) и *nogginB* (экспрессия в конечном мозге и клетках нервного гребня).

***NogginD* (Рисунок 25, У - Ц).** Экспрессия *nogginD*, как и у других генов *noggin* речной миноги, обнаруживается начиная со стадии ранней нейрулы (стадия 17). Паттерн экспрессии *nogginD* носит диффузный характер, равномерно окрашивая нервную пластинку. На последующих стадиях развития, вплоть до предличиночной стадии (стадия 29) наблюдалось лишь слабое диффузное окрашивание во всей нервной системе. Не было выявлено экспрессии *nogginD* в хорде.

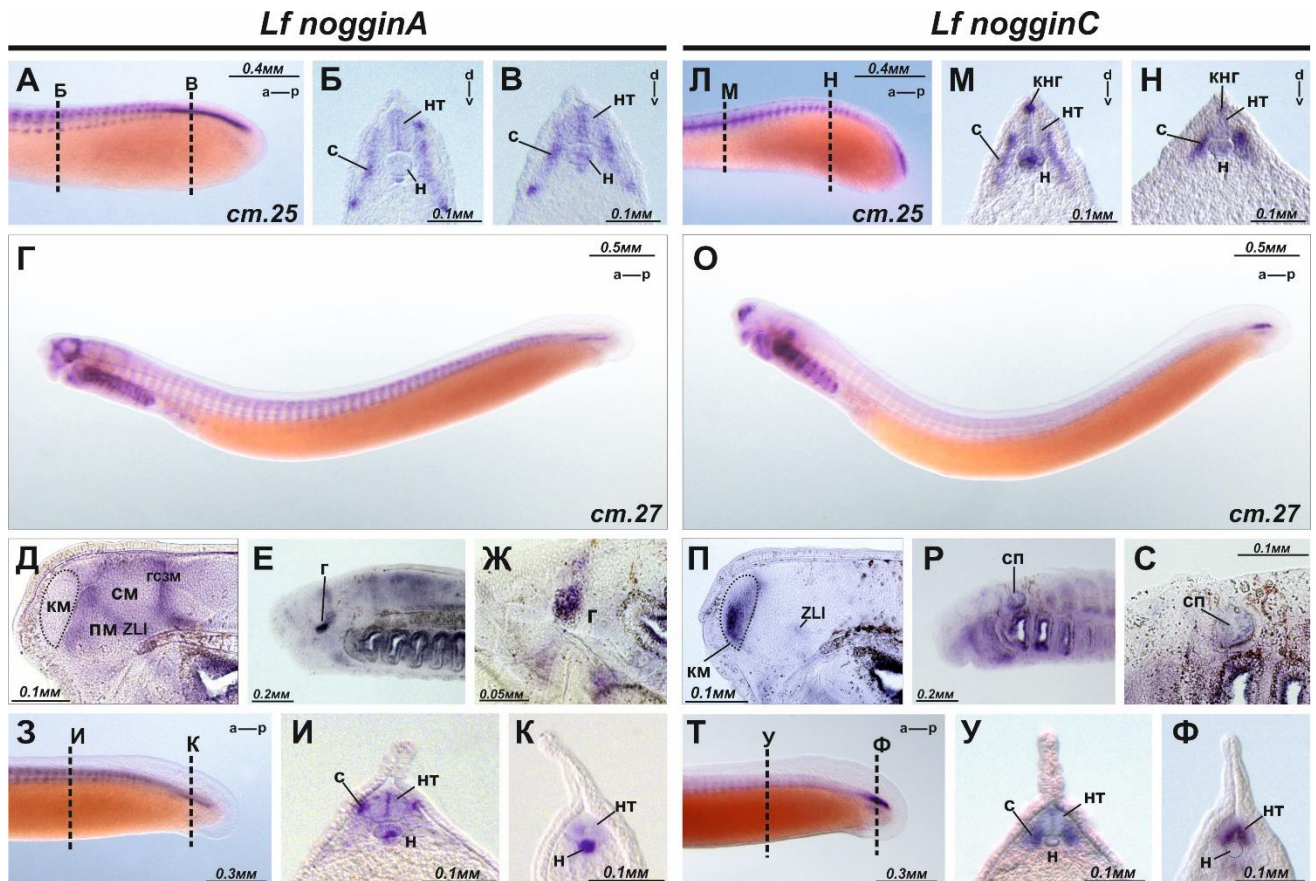


Рисунок 26. Сравнение паттернов экспрессии генов *nogginA* (А - К) и *NogginC* (Л - Ф).

А - В – На стадии 25 *nogginA* экспрессируется в сомитах, нотохорде, гипохорде и нервной трубке.

Г – Экспрессия *nogginA* на стадии 27.

Д - Ж – Продольные срезы эмбрионов на стадии 27 позволяют обнаружить экспрессию *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 *nogginA* существенно возрастает в нотохорде (n) растущего хвоста.

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

О – Экспрессия *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 *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 приведены на Рисунке 25.

Lf_nogginB

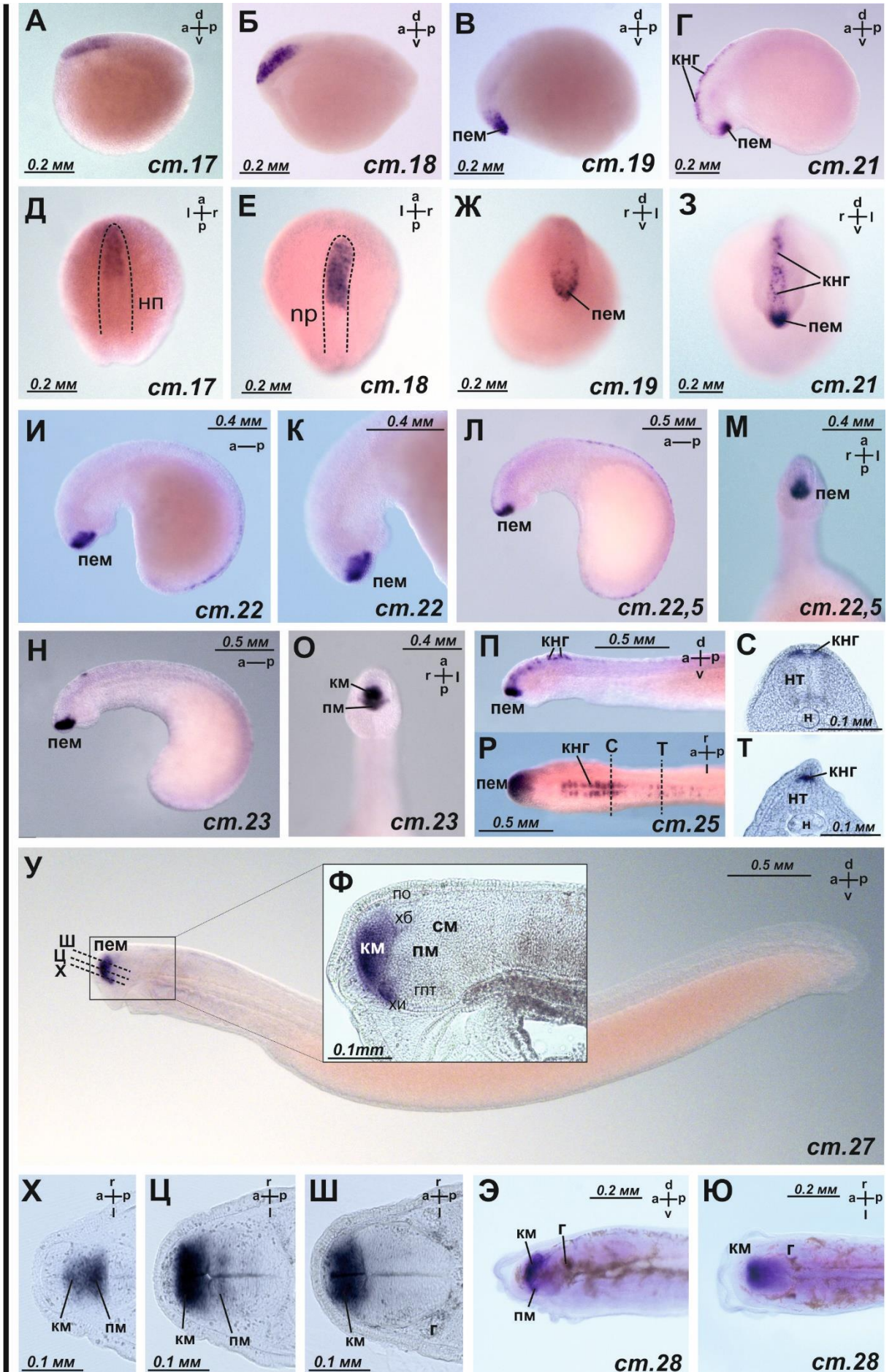


Рисунок 27. Паттерн экспрессии гена *nogginB*.

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

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

В, Г, Ж, З – на стадиях 19-21 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.

Ф – продольный срез эмбриона на стадии 27 позволяет зафиксировать экспрессию *nogginB* в дорсальной и вентральной частях конечного мозга, а также преоптической зоне гипоталамуса.

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

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

Сокращения приведены на Рисунке 25.

В целом, можно отметить, что каждый из четырех генов *noggin* миног обладает уникальными особенностями экспрессии в туловищных и головных структурах. Ген *nogginB* экспрессируется в конечном мозге с высокой интенсивностью и специфичностью (практически нет фонового окрашивания в других областях эмбриона). Это позволяет рассматривать *nogginB* в качестве перспективного маркерного гена при дальнейших исследованиях развития переднеголовных структур у миног.

2.1.1.4. Исследование функциональной активности и эволюционного консерватизма свойств генов *noggin* миног

Анализ был функциональной активности исследуемых белков семейства *Noggin* и эволюционного консерватизма их свойств у разных представителей позвоночных проведен путем микроинъекций синтетических мРНК в живые эмбрионы шпорцевой лягушки с последующим анализом фенотипических эффектов. Для *noggin1* и *noggin2* позвоночных при их эктопической экспрессии описана способность вызывать формирование комплекса дополнительных осевых структур (вторичных осей тела) у эмбрионов

шпорцевой лягушки и модулировать экспрессию нейральных маркеров. *noggin4*, напротив, такой способностью не обладают даже при значительных повышениях концентрации инъектируемой мРНК. Подробное описание исследований функциональных особенностей и активностей генов *noggin* челюстноротых представлено ниже, в соответствующей главе.

Для оценки функциональной активности генов *nogginA*, *nogginB*, *nogginC* и *nogginD* речной миноги, их синтетические мРНК были инъектированы в эмбрионы шпорцевой лягушки на стадии 8 бластомеров. Было обнаружено, что инъекции мРНК *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* индуцируют формирование полных вторичных осей тела, содержащих переднеголовные структуры (глаза) у эмбрионов шпорцевой лягушки (Рисунок 28; Рисунок 29).

Наблюдаемая индукция вторичных осей подтверждает функциональную активность белков *Noggin* миног и сходство их регуляторных свойств с белками *Noggin1* и *Noggin2* позвоночных, обладающих аналогичными свойствами (Bayramov et al., 2011). Такое сходство активностей у представителей разных групп указывает на эволюционную консервативность функциональных свойств белков *Noggin* позвоночных в целом. *NogginD*, обнаруживший сходство с *Noggin4*, подобно своему ортологу, не обладает способностью индуцировать формирование вторичных осей тела.

При этом, оказалось, что проведенные аналогичных инъекций мРНК генов *Noggin* в эмбрионы миног на стадии 8 бластомеров не вызывали у них формирование вторичных осевых структур. Эти эффекты были исследованы и представлены в соответствующей главе настоящей работы.

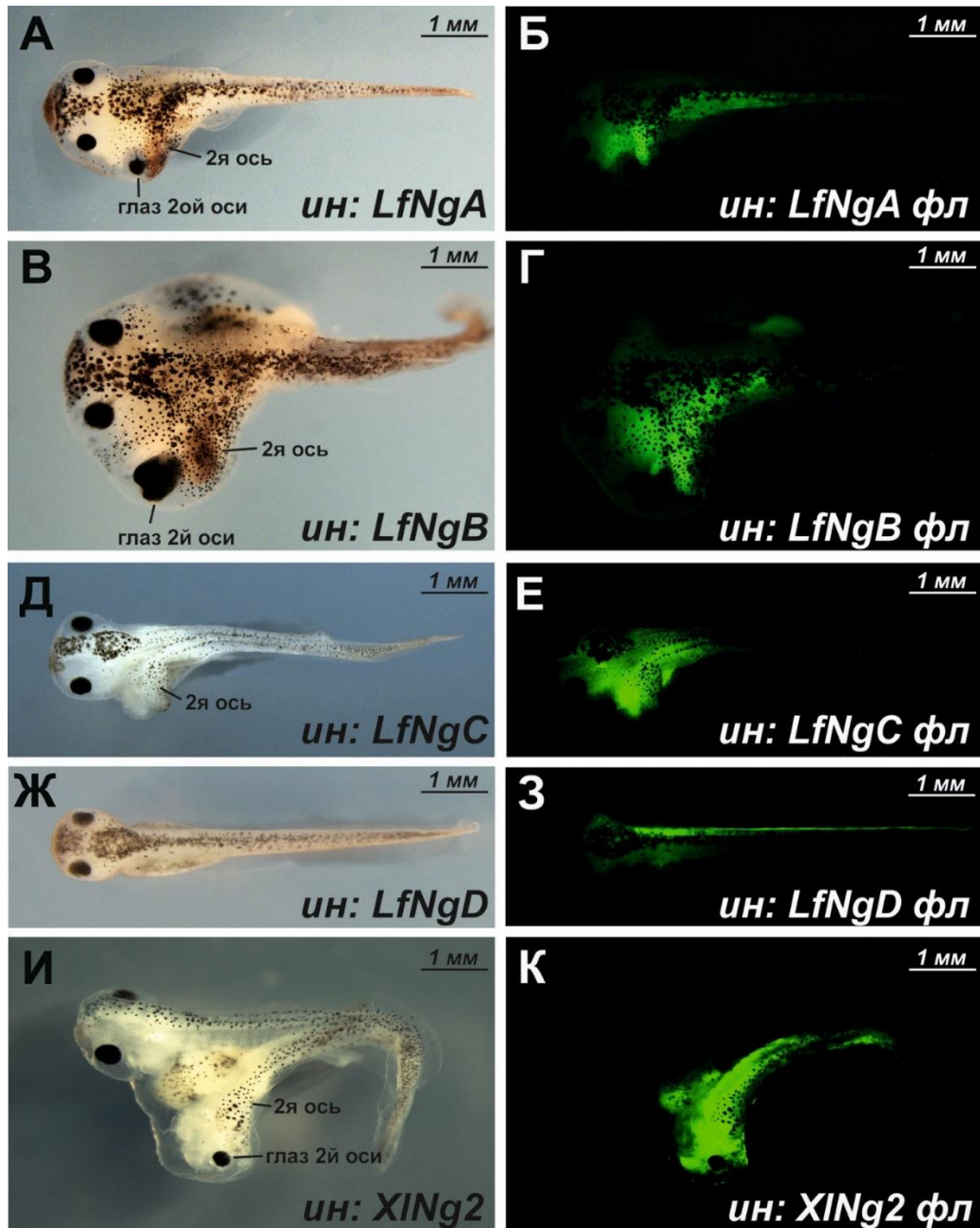


Рисунок 28. Инъекции мРНК миножьких генов *nogginA* (А, Б), *nogginB* (В, Г) и *nogginC* (Д, Е) в эмбрионы шпорцевой лягушки *X. laevis* индуцируют формирование полных дополнительных осей тела, включающих переднеголовые структуры, аналогично эффекту экспрессии мРНК *noggin2* шпорцевой лягушки (И, К). Инъекции мРНК *nogginD* формирование дополнительных осей не вызывает (Ж, З).

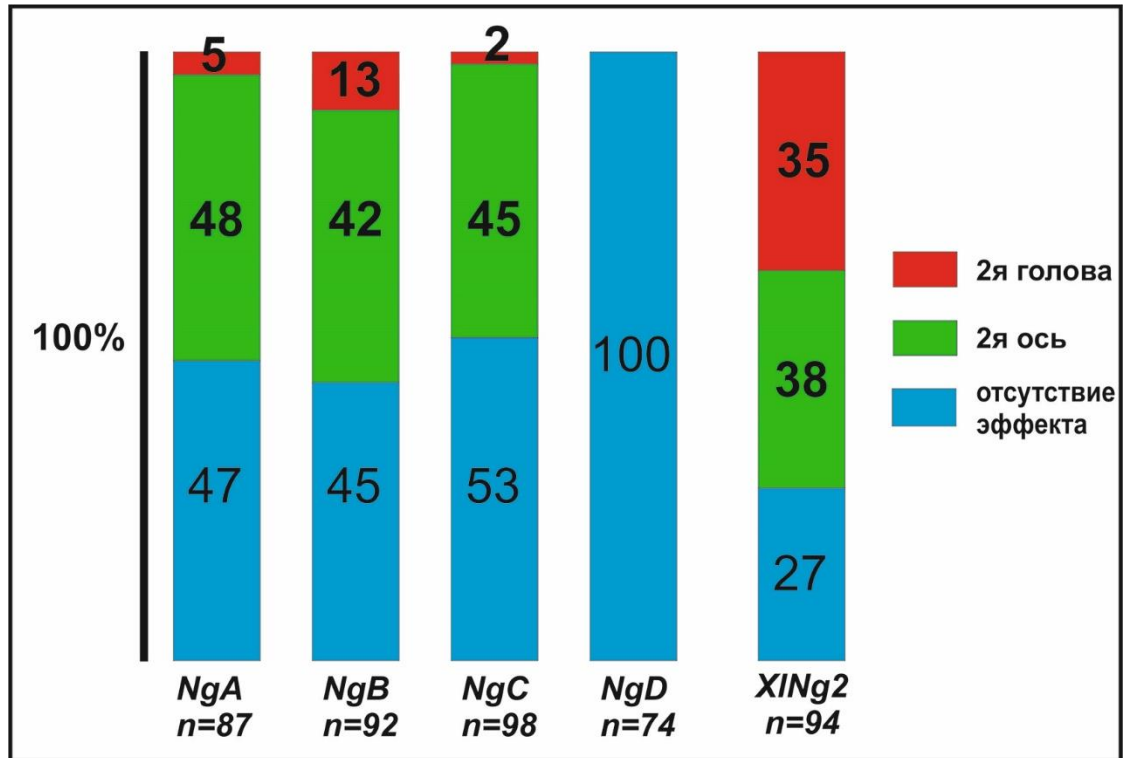


Рисунок 29. Процент индукции полных и неполных вторичных осей тела при инъекции мРНК генов *Noggin* речной миноги в эмбрионы *X. laevis*.

2.1.2. Гены семейства *Noggin* челюстноротых

Данный раздел работы подробно представлен в статьях

Ermakova et al., 2024, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54435-9>;

Bayramov et al., 2011, <https://doi.org/10.1242/dev.068908>;

Eroshkin et al., 2016, <https://doi.org/10.1038/srep23049>

Eroshkin et al., 2006, <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.06.007>

2.1.2.1. Анализ филогении и геномной синтении генов *poggin* хрящевых рыб

Поиск гомологов генов *Noggin* у хрящевых рыб был проведен в доступных геномных базах данных для каллоринха (*Callorhinchus milii*), как представителя подкласса Цельноголовых (Holocerphali, сестринской ветви подкласса Пластиножаберных), а также для представителей разных эволюционных ветвей подкласса Пластиножаберных (Elasmobranchii): скатов (обыкновенного пилорыла *Pristis pectinata*, звездчатого ската *Amblyraja*

radiata и ежового ската *Leucoraja erinacea*) и акул (обыкновенной кошачьей акулы *Scyliorhinus canicula*, японской кошачьей акулы *Scyliorhinus torazame*, китовой акулы *Rhincodon typus*, большой белой акулы *Carcharodon carcharias*, зебровой акулы *Stegostoma tigrinum*, белопятнистой кошачьей акулы *Chiloscyllium plagiosum*, коричневополосой кошачьей акулы *Chiloscyllium punctatum*, серой кошачьей акулы *Chiloscyllium griseum*, глазчатой кошачьей акулы *Hemiscyllium ocellatum*, короткоперой акулы мако *Isurus oxyrinchus* и катрана *Squalus acanthias*).

Неожиданным результатом проведенного анализа филогении и синтении генов и белков *Noggin* позвоночных (Рисунок 24, 31, 32) стало выявление отсутствия гена *noggin1* у большинства хрящевых рыб. Схематичное филогенетическое дерево представителей хрящевых рыб, геномные сиквенсы которых доступны и гены и белки *Noggin* которых были включены в проведенные анализы, приведено на Рисунке 30.

Было выявлено, что все три паралога *noggin* присутствуют только у наиболее базальной ветви хрящевых – подкласса Цельноголовых. Из представителей Пластиножаберных ген *noggin1* обнаруживается только у катрана (*S. acanthias*), который, согласно Cuhnla et al. (2017), в составе отряда *Squaliformes* занимает одно из базальных положений на филогенетическом дереве Пластиножаберных (Рисунок 30). Кроме этого, псевдогены *noggin1*, содержащие стопкодны внутри открытой рамки считывания обнаружены в геномах *I. oxyrinchus* и *S. carcharias*. Очевидно, что эти гены не функциональны. Функциональность последовательности *noggin1* катрана также вызывает вопросы. Оттранслированная последовательность белка *Noggin1* катрана содержит замены в консервативных позициях в области С-конца (валин вместо изолейцина у всех остальных *Noggin1* от ланцетника до человека) (Рисунок 34). Кроме того, мРНК этого *noggin1* не удалось обнаружить в транскриптомных сиквенсах *S. acanthias* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB14721>), где представлены только мРНК *noggin2* и *noggin4*.

В редуцированной форме псевдогена *noggin1* обнаружен в геномах короткоперой акулы мако (*I. oxyrinchus*) и большой белой акулы (*C. carcharias*). Псевдоген *noggin1 I. oxyrinchus* расположен в Scaffold_22 и имеет стоп-кодоны в открытой рамке считывания (ORF) (JANJGN010000022.1:4229860-4230732). Псевдоген *noggin1 C. carcharias* расположен в хромосоме 22 и имеет стоп-кодоны в рамке считывания (JAGDEE010000072.1:65581332-65581823). Этот же ген есть в базе данных с Gene ID: 121293691 в виде двухэкзонного варианта. Такой вариант сплайсинга теоретически позволяет получить белок без стоп-кодонов, однако, все описанные на сегодняшний день у позвоночных гены семейства *Noggin* являются одноэкзонными. Отсутствие функционального *Noggin1* у *C. carcharias* косвенно подтверждается и тем фактом, что нам не удалось обнаружить фрагменты кДНК *Noggin1* этого вида акул в базах EST. Обнаруженные у хрящевых рыб транслированные последовательности генов и псевдогенов *noggin1* приведены ниже:

> *C. milii* *Noggin1* (XP_007909823.1)

MDLSRRRLTVYLATLLLCVWVRLGAGQHLYLHLRSPSPDHLPLLELLEPPDPDLDPKDKD
MDETTLRKKLANFDPNFMALRLPEGWEPEAGAPEPGLRHRPGGFMPNHIRRVDFVVA
GRKQRLSKKLRRRLQLWLWSYTHCPVLYTWKDLGDRFWPRYIREGSCYSGRSCSFPEGM
SCKKAKASTKTLRWHCPRRELHRPCAWIPVQYSIISECKCSC

> *S. acanthias* *Noggin1* (JASTWF010000530.1)

MMDRSPYLLPLYLGLWGQLVFGQHLYLLRSPSPDHLPLLELLELPDPELDPKESDLDEA
TLRQKLASDFDPEYMSLRPPEGGRTPDPGPIPHIRRIELGPQQRLKGGRRRLQQWL
WGRTRCPVSYRWRDLGRRFWPRFIKEGRCSRRRSCSFPGMTCKKAKSASKTVLRWHC
PHRDREPHRDREPHRDRDCRWVPVQYSIISGCSCSC

> *C. carcharias* *Noggin1* translated pseudogene (JAGDEE010000072.1)

MLTLYLGLWSRSVSGQHLYLQLRPAATQHPLELWERPDPELDPKDSDLDEVTLRLKL
ARDLDPDFMSPRFPPEPVPRVSEGAPYTAGWDEPRSAHPHWVSRKGWRFELWLQDR
SRYPVT*SWRDLGTRFIREGPGSRVHSCSIPVGLTCKQNKCKISKTQLS*YCPQWDRERHC
RWIPVRYLIISACSCSS

> *I. oxyrinchus* *Noggin1* translated pseudogene (JANJGN010000022.1)

MLTLYLGLWSRSVSGQHLYLQLRPAATQHPLELWERPDPELDPKDSDLDEVTLRLKL
ARDLDPDFMSPWFLGPELVPRVSEGVPTAGRDEPGSAPHWVSRKGWRFELRLQDRS
RCPVT*SWRDLGTRFIREGLGSRVHSCSIPVGLTYKQNKCKISKTQLSWNCPQWDRERHC
RWIQVRYLIISACSCSS

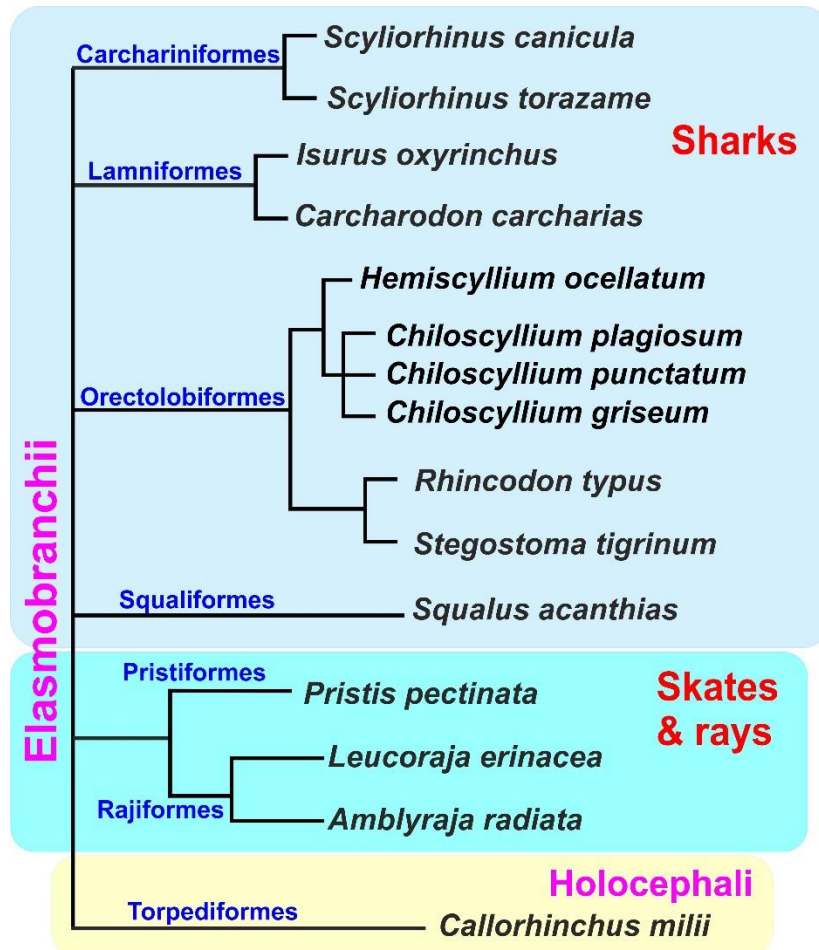


Рисунок 30. Схематическое филогенетическое дерево представителей хрящевых рыб, включенных в анализ филогении генов и белков *Noggin*.

Проведенный филогенетический анализ, представленный на Рисунках 31 и 32, показывает, что белки *Noggin* хрящевых в целом кластеризуются с гомологами других челюстноротых, хотя во всех случаях тяготеют к образованию подгрупп внутри ветвей отдельных белков *Noggin*.

Множественное выравнивание белков *Noggins* хрящевых рыб и некоторых других челюстноротых показано на Рисунок 33, аналогичное выравнивание для белков *Noggin1* приведено на Рисунке 34.

На филогенетическом дереве белки *Noggin1* хрящевых рыб группируются ближе к *Noggin1* челюстноротых, но не очень уверенно (значение бутстрэп теста <50) и образуют подгруппу внутри клады *Noggin1*.

Noggin2 обнаруживается у всех рассмотренных хрящевых рыб и кластер *Noggin2* этой группы вполне уверенно обособлен внутри в ветви *Noggin2* челюстноротых.

Ген *noggin4* был обнаружен у *C. milii*, *R. typus*, *S. canicula*, *S. torazame*, *C. plagiosum*, *C. punctatum*, *C. griseum*, *S. tigrinum*, *H. ocellatum* and *S. acanthias*. В то же время, в геномах *C. carcharias*, *I. oxyrinchus*, *A. radiata*, *L. erinacea* и *P. pectinate* *noggin4* обнаружен не был. Белки *Noggin4* челюстноротых очень уверенно кластеризуются в общую ветвь, внутри которой белки хрящевых имеют тенденцию к сближению, но с разной степенью надежности при разных алгоритмах построения дерева.

В целом, проведенный анализ показал, что из трех генов *noggin*, описанных у челюстноротых, все три паралога присутствуют только у наиболее базальной ветви хрящевых рыб – представителей подкласса Цельноголовых и у одного из базальных представителей акул – катрана (*S. acanthias*). У всех рассмотренных представителей Пластиножаберных 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 псевдогена, сохранившегося у *C. carcharias* и *I. oxyrinchus*).

Для подтверждения результатов филогенетического анализа и отсутствия генов *noggin1* у рассмотренных представителей хрящевых рыб был проведен анализ локальной геномной синтении генов *Noggin* у представителей хрящевых и других челюстноротых, представленный в рамках общего анализа локальной синтении генов *Noggin* позвоночных на Рисунке 24.

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 – *Callorhynchus 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*.

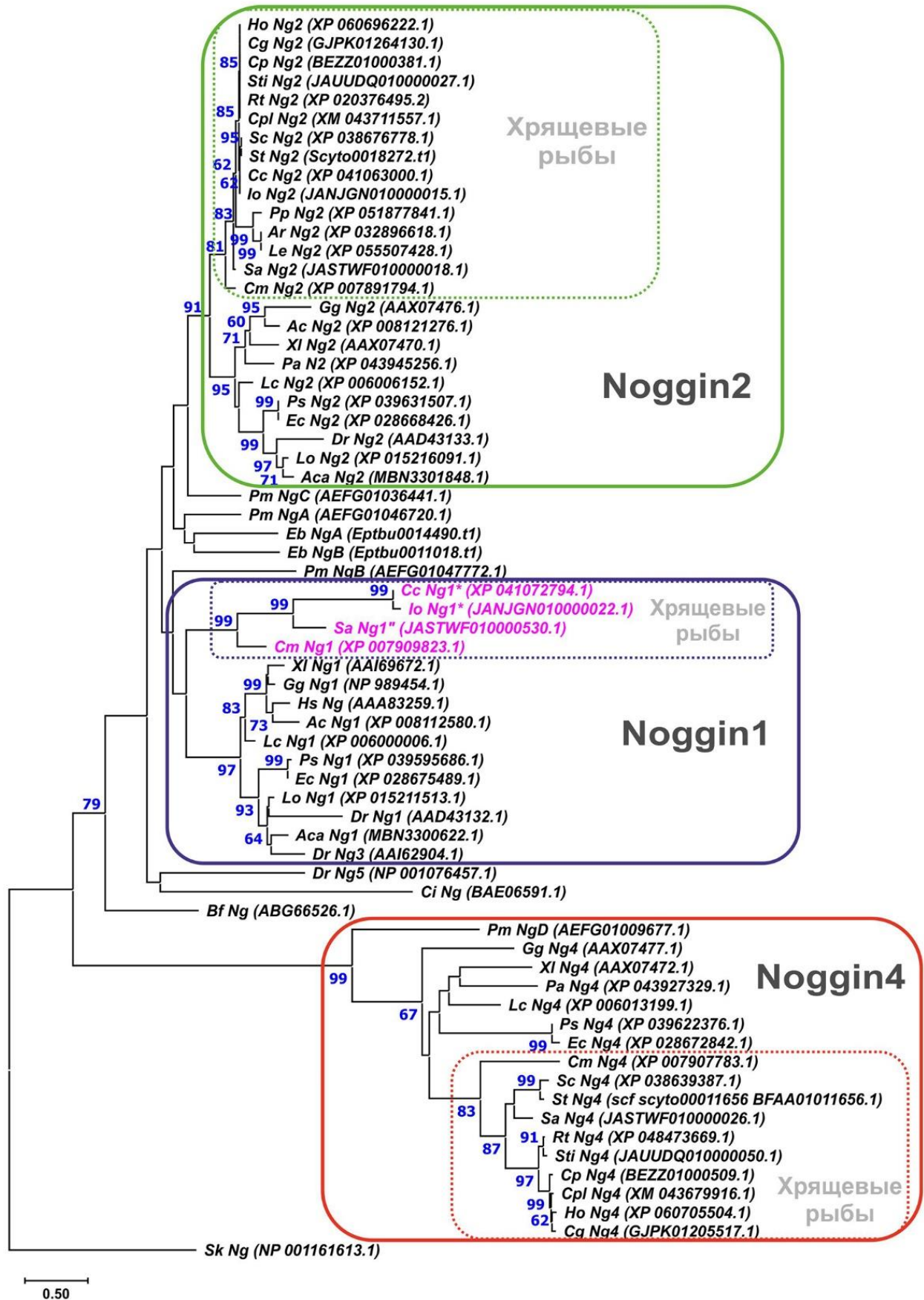


Рисунок 31. Филогенетическое дерево белков Noggin позвоночных, построенное по алгоритму максимального правдоподобия (ML). Показаны значения бутстрэп-теста >50

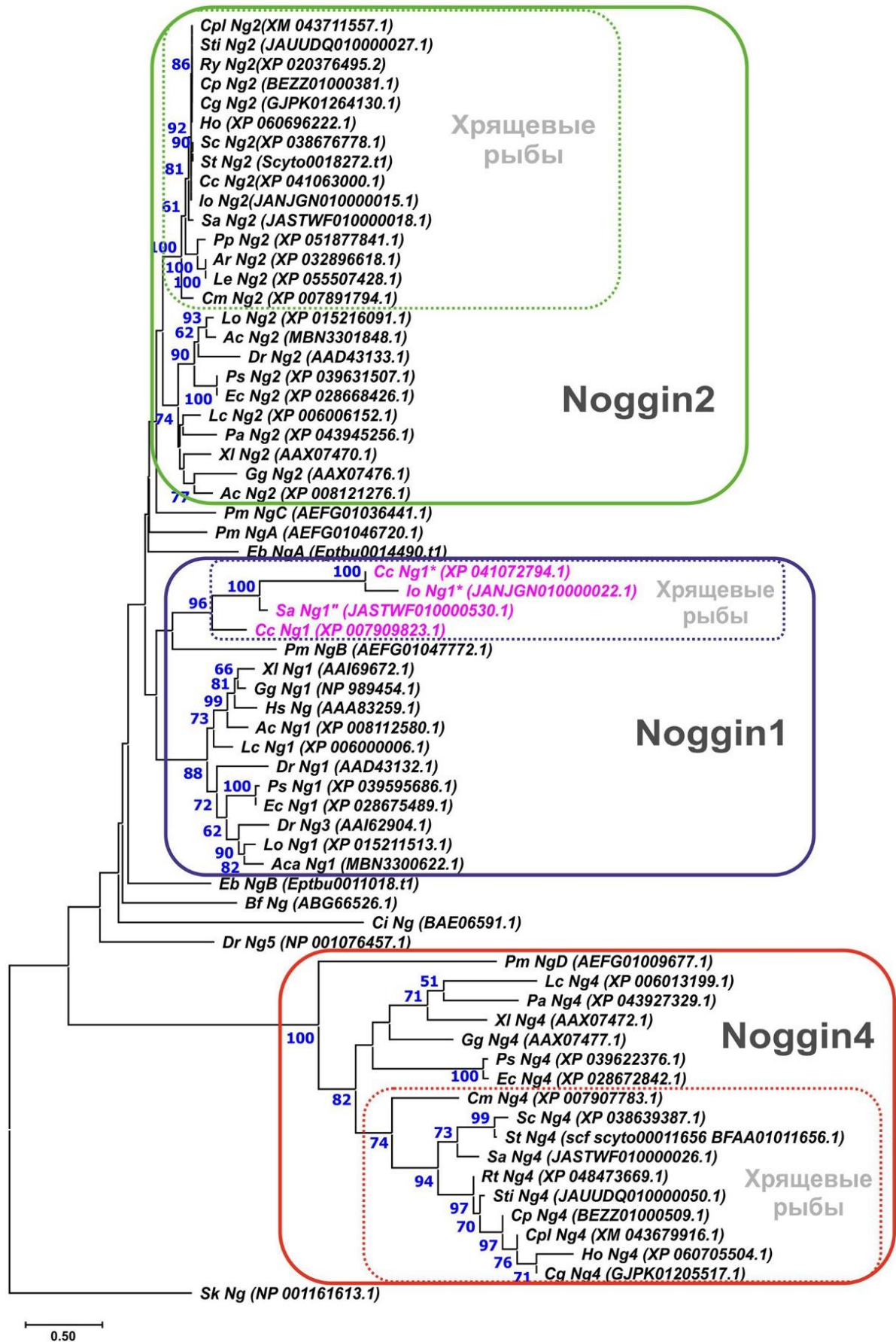


Рисунок 32. Филогенетическое дерево белков Noggin позвоночных, построенное по алгоритму Neighbour Joining (NJ). Показаны значения бутстрэп-теста >50

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90...
Hs_Ng (AAA83259.1) -----MERCPSLGVTTVALVWVGLRATPVGGOHYLHRRPAPSDNLPVMDLIEHPDPEIDPKKID
Gg_Ng1 (NP_989454.1) -----MDHSQCL-VTLYAAAVLGLRLQOCSGOHYLHRRPAPSDNLPVMDLIEHPDPEIDPKKID
Xl_Ng1 (AAI69672.1) -----MDHSQCL-VTLYALMFLGLRIDQGGCOHYLHRRPAPS NLPVMDLIEHPDPEIDPKKID
Cc_Ng1* (XP_041072794.1) -----MLTLYLG----LWSRSVSGOHYLQLRPAAOHPPLHLLHWRPDPDLDPKDSI
Cm_Ng1 (XP_007909823.1) -----MDLSRRRLTYLATLTCVWVRLCAGOHYHRRPSPSDHLPALHLLIEHPDPEIDPKKID
Gg_Ng2 (AAAX07476.1) -----MTAIG---ALLLCSGGLR-P--CAGOPFLRRPSPSDNLPVMDLVEHPDPEIDPKKID
Xl_Ng2 (AAAX07470.1) -----MKRINLPEAFLLCLWFLVQHQ--GCCOPYLRLRSPS NLPVMDLIEHPDPEIDPKKID
Sc_Ng2 (XP_038676778.1) -----MELPQYMLSCFC LLLQH--GLCOPYLHRRPSPS LPLVMDLIEHPDPEIDPKKID
Ry_Ng2 (XP_020376495.2) -----MELPQYMLSCFC LLLQH--GLCOPYLHRRPSPS LPLVMDLIEHPDPEIDPKKID
Cp_Ng2 (XM_043711557.1) -----MELPQYMLSCFC LLLQH--GLCOPYLHRRPSPS LPLVMDLIEHPDPEIDPKKID
Ar_Ng2 (XP_032896618.1) -----MELPQYMLSCFC LLLQH--GLCOPYLHRRPSPS LPLVMDLIEHPDPEIDPKKID
Rt_Ng2 (XP_048473669.1) -----MELPQYMLSCFC LLLQH--GLCOPYLHRRPSPS LPLVMDLIEHPDPEIDPKKID
Cm_Ng2 (XP_007891794.1) -----MELPQYMLSCFC LLLQH--GLCOPYLHRRPSPS LPLVMDLIEHPDPEIDPKKID
Cc_Ng2 (XP_041063000.1) -----MELPQYMLSCFC LLLQH--GLCOPYLHRRPSPS LPLVMDLIEHPDPEIDPKKID
Gg_Ng4 (AAAX07477.1) -----MQDPCFYLLILCLLPL-----PLGATGLEDPRDP-PPP-LSTSPTAHLHRRGSPAPVRRPYSLSHSPD-DYRMAPKPRH
Xl_Ng4 (AAAX07472.1) -----MAHILFLSWLVLTG-----TWGLTACGQTNL-DQHYNQTKMDIGSLRRRLSSGTRPYSLSHSPQ-DYHYSKPKH
Sc_Ng4 (XP_038639387.1) MAREFSYSGLALVSCYIFILHHCVKSSSPARGQSHSDVLTGKAAIKHPAPRPDSQAESAIVRKRASNVRRPYSLSHSPD-DYHYSKPKH
Rt_Ng4 (XP_048473669.1) MPREVSHTVATLFFPCQAIIVLLLVQSGLLAQPRSHSDAQAGRPGRIRPTPRPGSEAESASRKRASNVRRPYSLSHSPD-DYHYSKPKH
Cp_Ng4 (XM_043679916.1) MPRELPRTAATPFPCQAIIVLLLVQSGLLAQPRSHSDAQAGRPGRIRPTPRPGSEAESASRKRASNVRRPYSLSHSPD-DYHYSKPKH
Cm_Ng4 (XP_007907783.1) -----MSWPAVLCCSLAWY-----PPASRLRIRPGRKGS---ATPKPVAEVESAVRKRASNVRRPYSLSHSPD-DYHYSKPKH

.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180...
Hs_Ng (AAA83259.1) LNETLLRSLGGHMDGFMATSPEDRPGGGGAAGGADLAELDQLLRORPSCAPESETRGLFSG-LAQGRKQIISKLRRLQLQWLWS
Gg_Ng1 (NP_989454.1) LNETLLRSLGGHFDENFMAMSLPEDRLG-----VDLAELDQLLRORPSCAPESEIKGLFYDG-LQPGKRIISKLRRLQLQWLWS
Xl_Ng1 (AAI69672.1) LNETLLRSLGGHFDENFMAMSLPEDRLG-----VDLAELDQLLRORPSCAPESEIKGLFYDG-LQPGKRIISKLRRLQLQWLWS
Cc_Ng1* (XP_041072794.1) LDEVTLRLILARDIDDFEMSPRFEG-----PEP-----VE-----
Cm_Ng1 (XP_007909823.1) MDETLRRLKLANFDENFMARLREGW-----EPEAGAPVGLSHREGCFPHIIRVDFVW---AAGRQIISKLRRLQLQWLWS
Gg_Ng2 (AAAX07476.1) LDERTLRKLGSHFDFCFMVAVFG-----PANASAGAEAAACRAR---AAELRWLR---GCPALRVGKKARRRQLQWLWA
Xl_Ng2 (AAAX07470.1) LDERTLRKLGSNFDENFMSVLLFN-----SVNTSTODSLTMTLCSHLEIKRRLLSLSE--TPYGRMILGKKARRRQLQWLWA
Sc_Ng2 (XP_038676778.1) LDERTLRKLGSHFDFCFMVAVFG-----PDSQSDPNSRFPLCAMNDIKRRLLSLSE--TPYGRMILGKKARRRQLQWLWS
Rt_Ng2 (XP_020376495.2) LDERALRKLGSHFDFCFMVAVFG-----LDDSPSRDPNSRFPLCAMNDIKRRLLSLSE--TPYGRMILGKKARRRQLQWLWS
Cp_Ng2 (XM_043711557.1) LDERALRKLGSHFDFCFMVAVFG-----LDDSPSRDPNSRFPLCAMNDIKRRLLSLSE--TPYGRMILGKKARRRQLQWLWS
Ar_Ng2 (XP_032896618.1) LDERTLRKLGSHFDFCFMVAVFG-----ADPSAPDPGGRLPLCAMNDIKRRLVSE--TPYGRMILGKKARRRQLQWLWS
Cm_Ng2 (XP_007891794.1) LDERTLRKLGSHFDFCFMVAVFG-----GAFATPRDPNSRFPLCAMNDIKRRLLSLSE--TPYGRMILGKKARRRQLQWLWS
Cc_Ng2 (XP_041063000.1) LDERTLRKLGSHFDFCFMVAVFG-----LDDSPSRDPNSRFPLCAMNDIKRRLLSLSE--TPYGRMILGKKARRRQLQWLWS
Gg_Ng4 (AAAX07477.1) LRPGRRLRLGPAFDFCFMVAVFG-----PLGRNLSAKEDDEMTSRELADSSGGRYRKRWREEG-----MELPELPAD---MARLLRRWLVE
Xl_Ng4 (AAAX07472.1) LRVSRRLRLGSSDFDFCFMVAVFG-----PADN---GTSLLSTLSQDIYDGAARYRKRKSSAEQAALFDSLQLPTELSANSSQIHNIQRWLWVQ
Sc_Ng4 (XP_038639387.1) LNAARKMLKLGSSDFDFCFMVAVFG-----SRRGNKSHG-DTLNLRDLAAGAVRSRKRWREAEQRLLVVG-ISPAGRAEGNTEAEARQAWKQWLVE
Rt_Ng4 (XP_048473669.1) LDSRRLRKLGLPAFDFCFMVAVFG-----GRHRNESERDDQLQSLSELAALRLRCKWDEARLPLP-----AGMASEADRAQWRRLWVR
Cp_Ng4 (XM_043679916.1) LDPRLRKLGLGSSDFDFCFMVAVFG-----GRHGNESERGHQLQSLSELAALRLRCKWDEARLPLP-----AAVASEADRAQWRRLWVR
Cm_Ng4 (XP_007907783.1) LNPRLRKLGLGSSDFDFCFMVAVFG-----LVSRSRRLTEPANRYQKRRHEAEARLGL-----GAGGDGERALARWLVK

...190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270...
Hs_Ng (AAA83259.1) QTCVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SKRSQSVPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORRG-----QR-CGWIPVQYPIIIECKKSC-
Gg_Ng1 (NP_989454.1) QTCVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SKRSQSVPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORRG-----QR-CGWIPVQYPIIIECKKSC-
Xl_Ng1 (AAI69672.1) QTCVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SKRSQSVPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORRVQ-----QR-CAWITVQYQYPIIIECKKSC-
Cc_Ng1* (XP_041072794.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Cm_Ng1 (XP_007909823.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Gg_Ng2 (AAAX07476.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Xl_Ng2 (AAAX07470.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Sc_Ng2 (XP_038676778.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Rt_Ng2 (XP_020376495.2) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Cp_Ng2 (XM_043711557.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Ar_Ng2 (XP_032896618.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Cm_Ng2 (XP_007891794.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Cc_Ng2 (XP_041063000.1) YTHCPVPIYAVNDLGSRFWPRNVKVGSCN-SGRSCSEPEGMVCKEAKSVHLTFLRWRCORR-----H-GRWIPVQYPIIIECKKSC-
Gg_Ng4 (AAAX07477.1) RASCRITSAVVDLGPVFWPRNVHTDGDGANTVCSNPPGMACVQAQLTQIKQLAWHCVMMKDTGLGWATQOCTTRQVQYPIIIECKKSC-
Xl_Ng4 (AAAX07472.1) RASCRITSAVVDLGPVFWPRNVHTDGDGANTVCSNPPGMACVQAQLTQIKQLAWHCVMMKDTGLGWATQOCTTRQVQYPIIIECKKSC-
Sc_Ng4 (XP_038639387.1) VASCPITSAVVDLGPVFWPRNVHTDGDGSKVGCSPPPGMACVQAQLTQIKQLAWHCVMMKDTGLGWATQOCTTRQVQYPIIIECKKSC-
Rt_Ng4 (XP_048473669.1) EASCPITSAVVDLGPVFWPRNVHTDGDGRASCSPPPGMACVQAQLTQIKQLAWHCVMMKDTGLGWATQOCTTRQVQYPIIIECKKSC-
Cp_Ng4 (XM_043679916.1) EAVCPITSAVVDLGPVFWPRNVHTDGDGRASCSPPPGMACVQAQLTQIKQLAWHCVMMKDTGLGWATQOCTTRQVQYPIIIECKKSC-
Cm_Ng4 (XP_007907783.1) VASCPITSAVVDLGPVFWPRNVHTDGDGRASCSPPPGMACVQAQLTQIKQLAWHCVMMKDTGLGWATQOCTTRQVQYPIIIECKKSC-

```

Рисунок 33. Множественное выравнивание белков Noggin позночных

Hs - *Homo sapiens*, Gg - *Gallus gallus*, Xl - *Xenopus laevis*, Cc - *Carcharodon carcharias*, Cm - *Callorhinchus milii*, Sc - *Scyliorhinus canicula*, Rt - *Rhincodon typus*, Cp - *Chiloscyllium plagiosum*

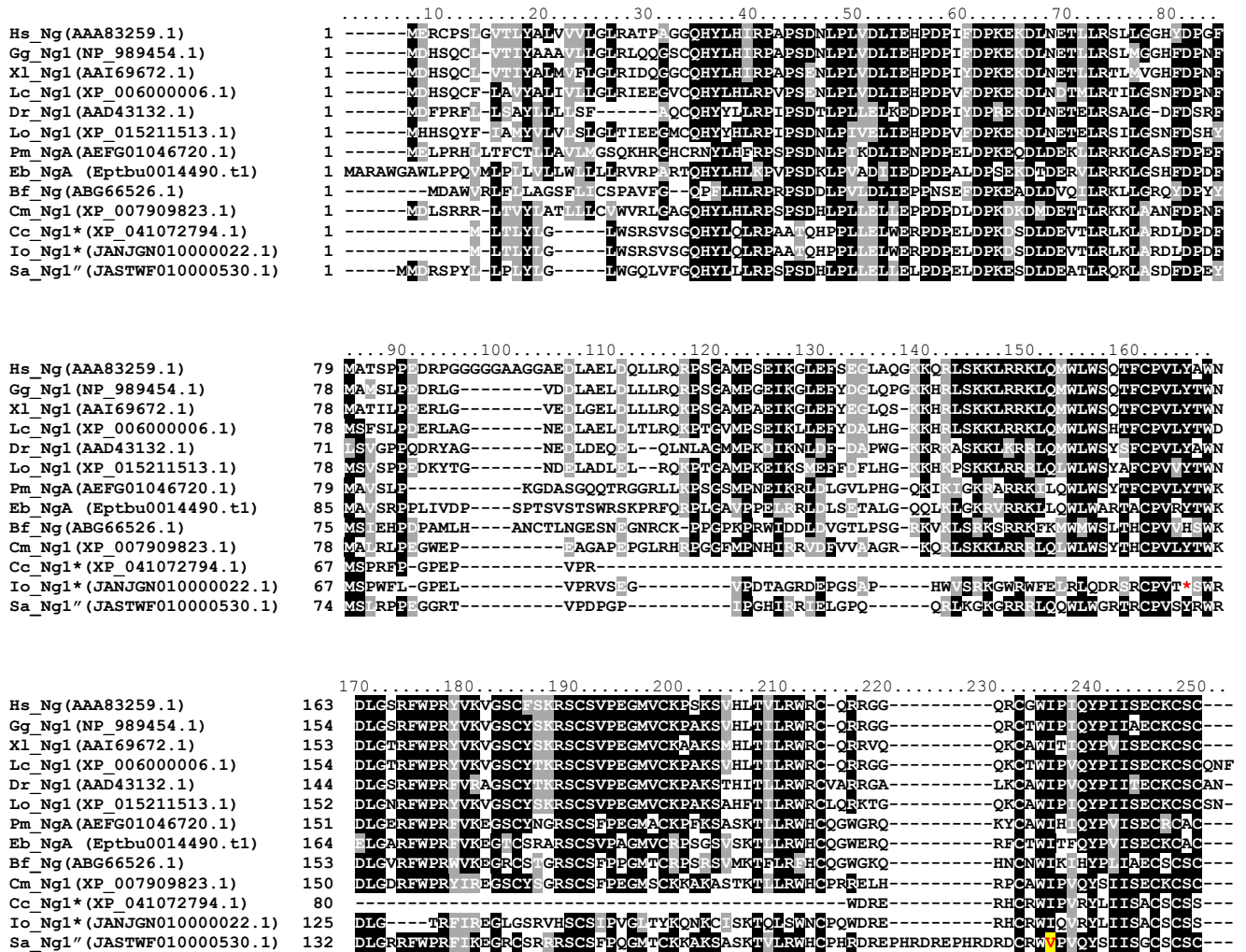


Рисунок 34. Множественное выравнивание белков Noggin1 позвоночных, в том числе генов и псевдогенов *Noggin1* хрящевых.

Bf – *Branchiostoma floridae*, Cc - *Carcharodon carcharias*, Cm - *Callorhynchus milii*, Cp - *Chiloscyllium plagiosum*, Dr – *Danio rerio*, Eb – *Eptatretus burgeri*, Gg - *Gallus gallus*, Hs - *Homo sapiens*, Io – *Isurus oxyrinchus*, Lc – *Latimeria chalumnae*, Lo – *Lepisosteus oculatus*, Pm – *Petromyzon marinus*, Rt- *Rhincodon typus*, Sa – *Squalus acanthias*, Sc - *Scyliorhinus canicula*, Xl - *Xenopus laevis*.

Задачами анализа геномной синтении является выявление ортологии генов *Noggin* хрящевых рыб и других челюстноротых, а также подтверждение отсутствия гомологов *noggin1* в окрестностях характерных для него соседних генов. Такой анализ позволяет снизить вероятность того, что *noggin1* не был обнаружен в рассмотренных геномных сиквенсах по техническим причинам - в силу неполноты имеющихся геномных сиквенсов или несовершенства поисковых алгоритмов.

Как уже отмечалось выше, проведенный анализ локальной геномной синтении показал, что одним из характерных генов-соседей для всех паралогов *noggin* является ген *ankfn1* (кодирующий Ankyrin repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1), что свидетельствует о монофилетическом происхождении генов *noggin* челюстноротых.

Для установления ортологии генов *noggin* у представителей разных групп позвоночных важным является выявление уникальных генов-соседей (свидетелей) для каждого из ортологов. Проведенный анализ показал, что такими уникальными генами-свидетелями для *noggin2* являются гены *netrin-3* и *tedc2* (кодирующий tubulin epsilon and delta complex protein 2), а для *noggin4* – гены *gcat* (кодирующий glycine C-acetyltransferase), *galr2b* (кодирующий galanin receptor 2b-like) и *meil* (кодирующий meiosis inhibitor protein 1). Эти гены-свидетели обнаружены в окрестностях генов *noggin* у всех рассмотренных хрящевых рыб, а также присутствуют у представителей других групп челюстноротых. Таким образом, по набору соседних генов можно достаточно уверенно установить ортологическую принадлежность каждого из генов *noggin*. Дополнительным подтверждением отсутствия генов *noggin4* у *C. carcharias*, *A. radiata* и *P. pectinata* является их отсутствие в синтеничном участке генома – между генами *galr2b* и *gcat*, где *noggin4* в норме расположен у всех остальных представителей хрящевых рыб и других представителей челюстноротых (Рисунок 24).

Для окрестностей гена *noggin1* характерно присутствие следующих генов-свидетелей: в 5'-области это гены *tmem100* (кодирующий transmembrane protein 100), *mmd* (кодирующий monocyte to macrophage differentiation factor), *pctp* (кодирующий phosphatidylcholine transfer protein). В 3' области это гены: *c17orf67*, *dgke* (кодирующий diacylglycerol kinase, epsilon), *trim25* (кодирующий tripartite motif containing 25), *scpep1* (кодирующий serine carboxypeptidase 1), *coil* (кодирующий coilin p80). В геноме каждого конкретного животного не обязательно присутствует полный набор этих соседей, но часть из них всегда присутствует и эти гены (за

исключением *ankfn1*) являются уникальными соседями *noggin1*. Подтверждением исчезновения *noggin1* у хрящевых является его отсутствие между характерными генами-свидетелями у *A. radiata*, *P. pectinata*, *S. canicula* и *C. plagiosum*. У *R. typus* и *S. fasciatum* наблюдается нарушение расположения генов в области потенциальных окрестностей *noggin1*. В геноме *C. carcharias* псевдоген *noggin1* располагается в области синтении и имеет характерные для *noggin1* соседние гены. У *C. milii* все три гена *noggin* имеют характерные для челюстноротых специфические соседние гены.

Таким образом, результаты анализа локальной геномной синтении подтверждают выдвинутую гипотезу об общности происхождения всех трех паралогов *noggin* челюстноротых. Также подтверждаются данные филогенетического анализа, указавшего на наличие у всех рассмотренных хрящевых рыб ортологов *noggin2*, исчезновение у ряда представителей группы генов *noggin4* и исчезновения миноги представителей Пластиножаберных генов *noggin1*. Тот факт, что исчезновение отдельных генов *noggin1* и *noggin4* наблюдается только у представителей Пластиножаберных, в то время как у базальной группы хрящевых рыб – подкласса Цельноголовых - присутствуют все три гена *noggin*, указывает на то, что исчезновение *noggin* у Пластиножаберных носит вторичный характер и, возможно является результатом эволюционной специализации представителей этой группы.

2.1.2.2. Пространственная экспрессия генов *noggin2* и *noggin4* у серой кошачьей акулы

Поскольку отсутствие *noggin1* у большинства рассмотренных Пластиножаберных является уникальной ситуацией для позвоночных, анализ паттерна экспрессии имеющихся у них генов *noggin2* и *noggin4* представляет большой интерес. В частности, интересно оценить насколько ген *noggin2*, который по данным предыдущих работ у исследованных представителей челюстноротых близок по своим особенностям к *noggin1*, но существенно

отличается от него по области активной экспрессии, может пространственно компенсировать отсутствие гена *noggin1*.

Анализ паттерна экспрессии *noggin2* и *noggin4* был проведен на эмбрионах серой кошачьей акулы *Chiloscyllium griseum* методом гибридизации *in situ* (ISH). Для повышения специфичности наблюдаемого сигнала условия ISH были модифицированы относительно стандартных: температуру гибридизации зонда повышали до 70°C (вместо стандартных 65°C), а концентрации зонда и алкалин-фосфатазных антител, которыми производится проявка были снижены вдвое по сравнению со стандартными (подробнее см. в разделе «Материалы и методы»).

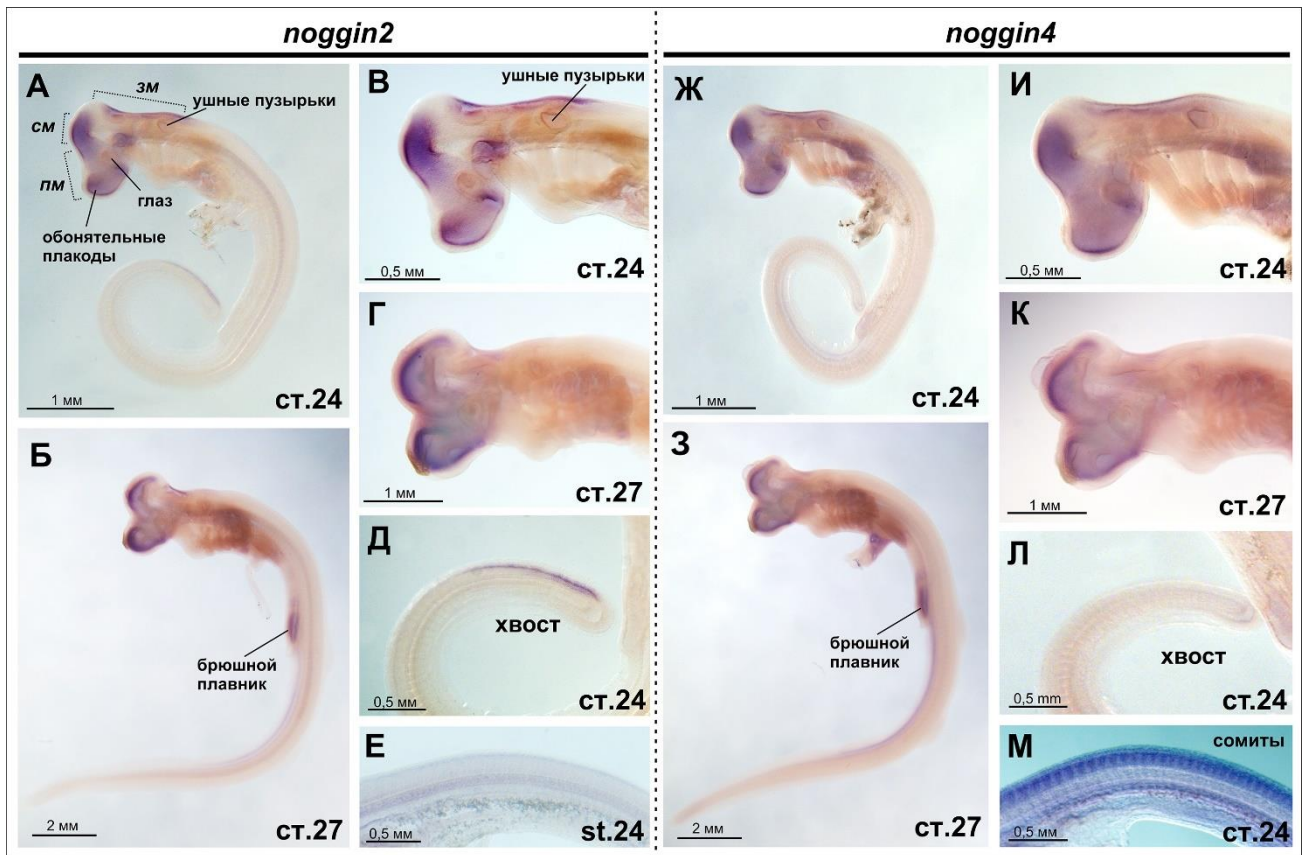


Рисунок 35. Пространственная экспрессия генов *noggin2* (А - Е) и *noggin4* (Ж – М) на ранних стадиях развития эмбрионов серой кошачьей акулы *Chiloscyllium griseum*.

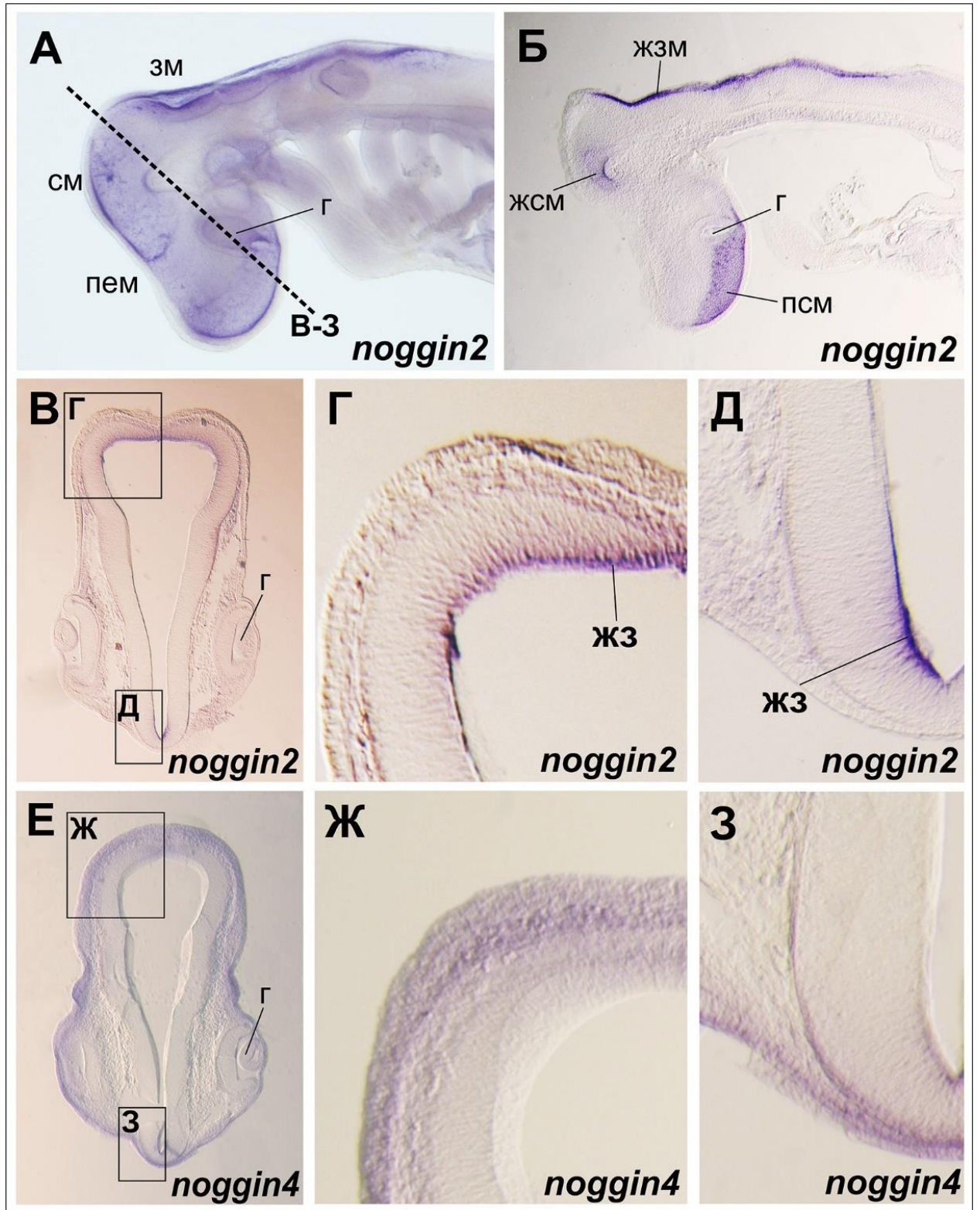


Рисунок 36. Экспрессия генов *noggin2* (А - Д) и *noggin4* (Ж - 3), показанная на срезах эмбрионов серой кошачьей акулы *S. griseum*. А, Б (сагиттальный срез) – стадия 24, В – 3 – срезы в указанной плоскости на стадии 26.

Г – глаз, жз – желудочковая зона, жзм – желудочек заднего мозга, жсм – желудочек среднего мозга, зм – задний мозг, пем – передний мозг, см – средний мозг.

В области головного мозга на стадии 24 *noggin2* диффузно экспрессируется в конечном и среднем мозге, но отсутствует в передней части промежуточного мозга (Рисунок 35 А, В). Как показано на срезах (Рисунок 36 В – Д), *noggin2* локализуется в полоске клеток желудочковой зоны переднего, среднего и заднего мозга. Также экспрессия *noggin2* обнаруживается вдоль дорсального края хвоста (Рисунок 35 Д).

Ген *noggin4* на стадии 24 экспрессируется диффузно в конечном, промежуточном и среднем отделах головного мозга (Рисунок 35 Ж, И; Рисунок 36 Е - З). В отличие от *noggin2*, экспрессии *noggin4* вдоль дорсального края хвоста не обнаруживается (Рисунок 35 Л). При более длительной инкубации с алкалин-фосфатазными антителами при проявке в стандартных условиях ISH *noggin4*, в отличие от *noggin2*, выявляется в сомитах туловища и хвоста (Рисунок 35 М и Е; Рисунок 37).

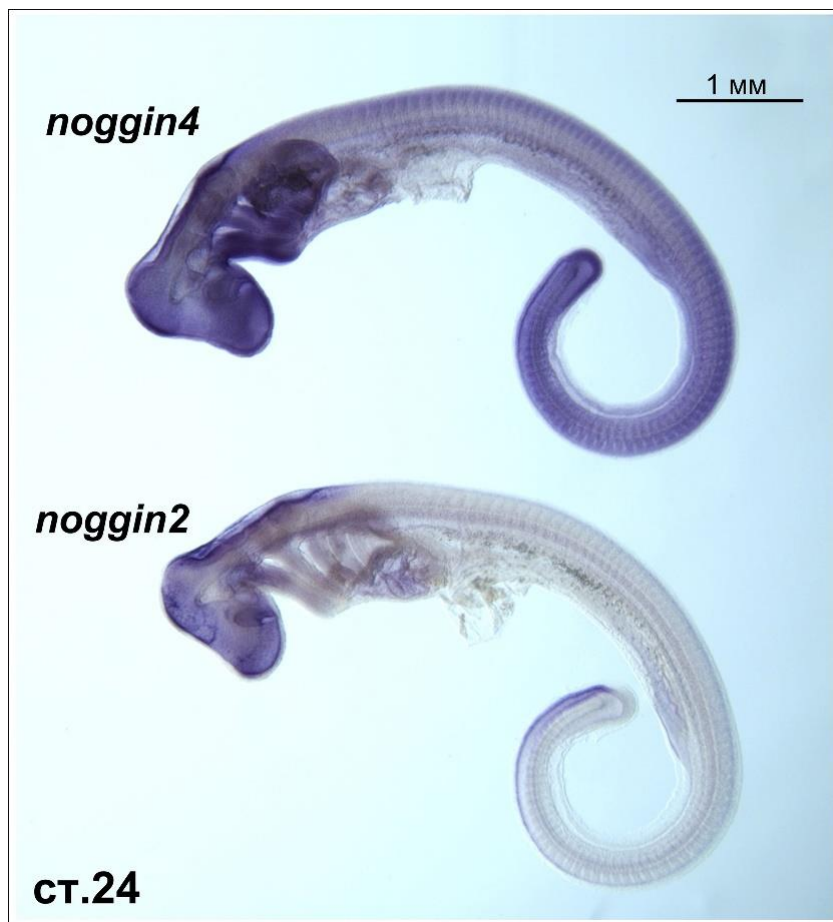


Рисунок 37. Различия паттернов экспрессии *noggin4* и *noggin2* в сомитах эмбрионов *C. griseum* на стадии 24.

На стадии 27 *noggin2* и *noggin4* экспрессируются в клетках желудочковой зоны конечного, промежуточного и среднего мозга (Рисунок 35 Б, Г, З, К). Также их экспрессия обнаружена в формирующихся зачатках брюшных плавников.

Поскольку наблюдаемые диффузные паттерны *noggin2* и *noggin4* могут вызвать вопросы относительно специфичности наблюдаемых сигналов, были проведены эксперименты ISH с контрольными (смысловыми) зондами *noggin2* и *noggin4*, по первичной последовательности соответствующие мРНК генов *noggin*, а не комплементарных им (Рисунок 38). Практически полное отсутствие окрашивания в этих экспериментах (за исключением некоторого неспецифического сигнала в четвертом желудочке) подтверждает специфичность наблюдаемых паттернов экспрессии *noggin2* и *noggin4* у эмбрионов *C. griseum*.

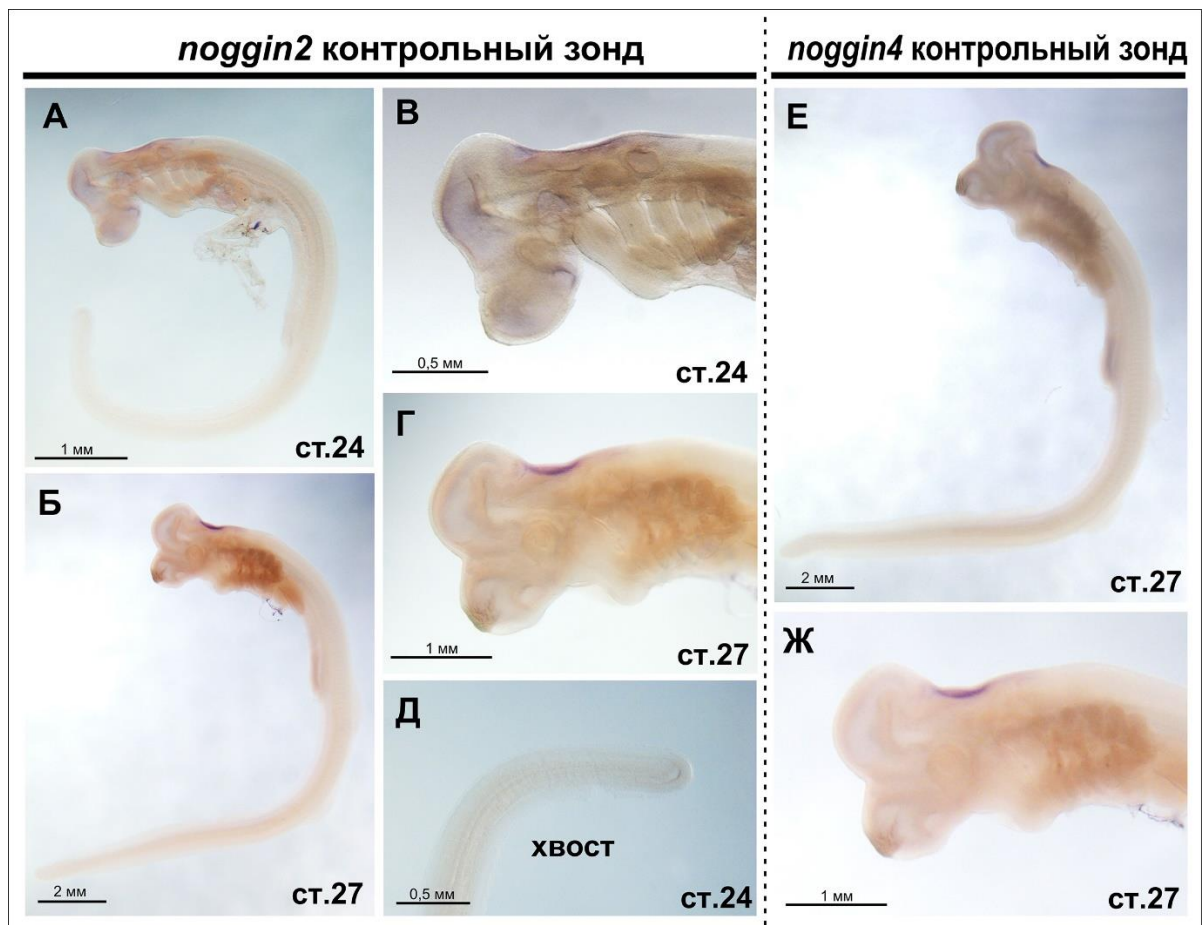


Рисунок 38. Гибридизация *in situ*, выполненная с применением контрольных (прямых смысловых) зондов *noggin2* и *noggin4*.

Таким образом, *noggin2* и *noggin4* *C. griseum* демонстрируют паттерн экспрессии, аналогичный таковому у ортологов *noggin2* и *noggin4* у *D. rerio* и *Xenopus sp.* (Fletcher et al., 2004, Eroshkin et al., 2006, Fürthauer et al., 1999). Диффузная экспрессия *noggin2* и *noggin4* наблюдалась в области головы *X. laevis* (см. Eroshkin et al., 2006 Figure 3 B, C, E, F).

2.1.2.3. мРНК акульего гена *noggin2* индуцирует полные дополнительные оси у *X. laevis*

Поскольку функциональные эксперименты на эмбрионах акул *in vivo* затруднительны в силу особенностей строения их яиц и развития эмбрионов, проверка функциональной активности генов *noggin* хрящевых рыб была проведена на эмбрионах *X. laevis*. Была оценена способность мРНК *noggin2* и *noggin4* серой кошачьей акулы *C. griseum* индуцировать дополнительные оси у эмбрионов *X. laevis*. Для этого синтетические мРНК *noggin2* и *noggin4* серой кошачьей акулы были инъецированы в экваториальную зону вентральной области эмбрионов *X. laevis* на стадии 8 бластомеров. В результате было обнаружено, что мРНК акульего *noggin2* инъецированная в эмбрионы *X. laevis* в количестве 50 пг/ эмбрион приводит к остановке нормального развития на стадии нейрулы и формированию характерных грибоподобных фенотипов, описанных ранее для мРНК шпорцевой лягушки (Рисунок 39 А, Б; Рисунок 40). Схожие фенотипические эффекты наблюдались при инъекциях мРНК *noggin2* *X. laevis* (Bayramov et al., 2011). Подробней это характерное свойство *noggin2* рассмотрено в разделе, посвященном исследованиям генов *noggin* амфибий. Инъекции меньших количеств мРНК *noggin2* (5 пг на эмбрион) приводили к индукции дополнительных осей тела в 53% случаев (n=250), в том числе полных, содержащих переднеголовые структуры и глаза в 8% случаев (Рисунок 39 В-3). В некоторых случаях, в том числе, наблюдалось формирование полноценных вторых голов с полноценными переднеголовными отделами и

парными глазами (Рисунок 39 Ж, З). Подобная индуктивная активность также была описана для *noggin2* *X. laevis*.

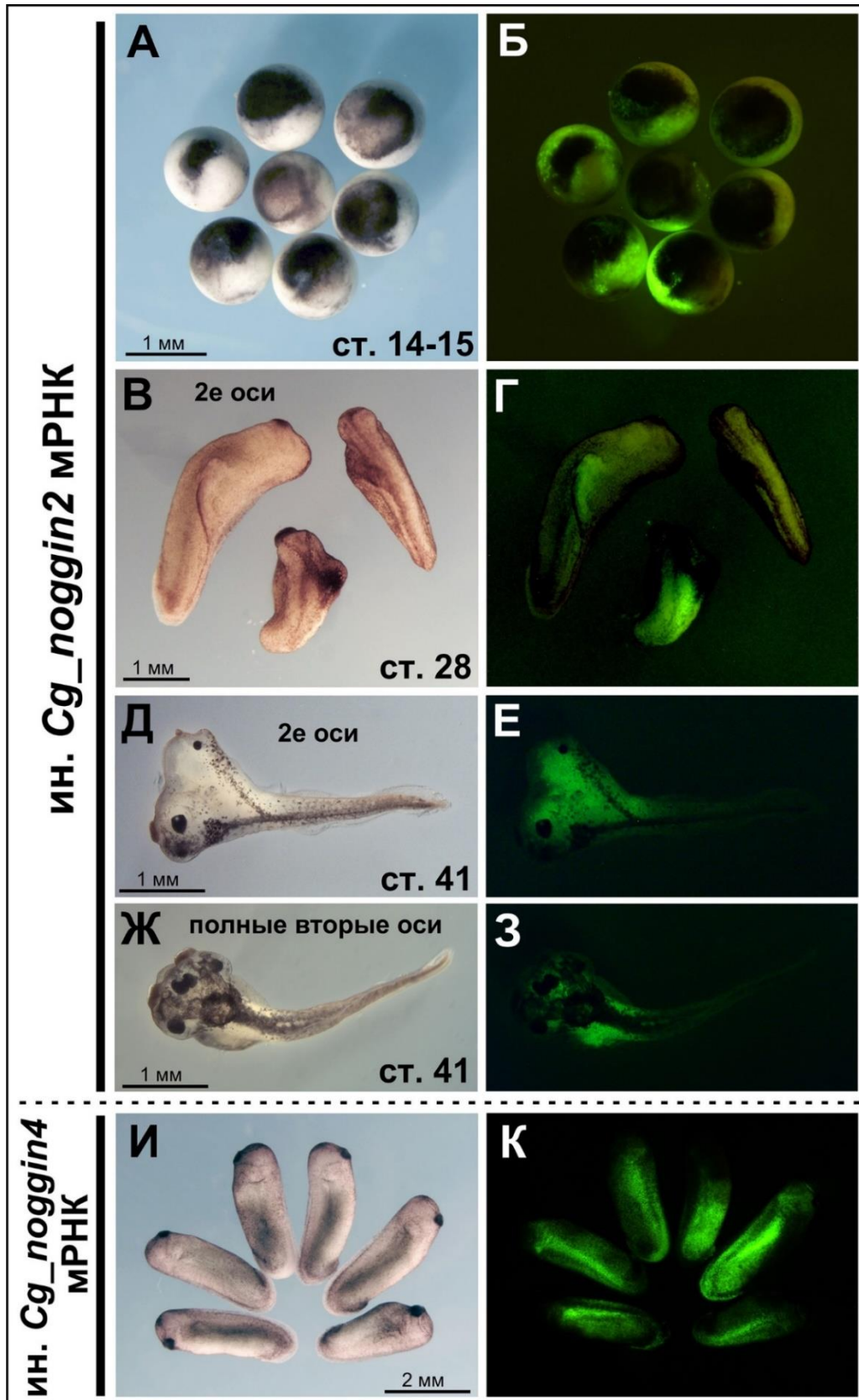


Рисунок 39. мРНК *noggin2* *C. griseum* индуцирует формирование дополнительных осей тела при инъекциях в эмбрионы *X. laevis*.

А, Б - в высоких концентрациях (50 пг на эмбрион) мРНК *noggin2* *S. griseum* вызывает нарушения нормального развития на стадии нейрулы и формирование грибоподобных фенотипических эффектов.

В – З – инъекции мРНК *noggin2* *S. griseum* в количестве 5 пг на эмбрион приводят к индукции дополнительных осей тела, в том числе содержащих полноценные переднеголовые структуры и парные глаза.

И, К - *noggin4* не индуцирует вторичные оси у *X. laevis*.

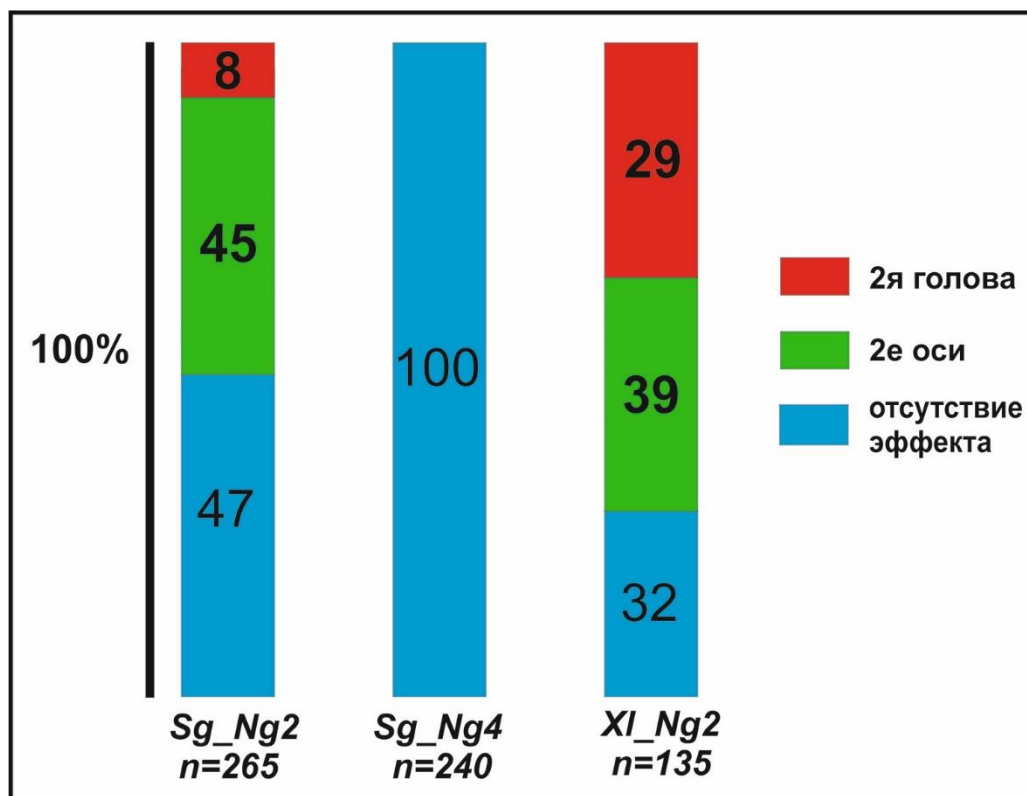


Рисунок 40. Процент индукции вторичных осей тела при инъекциях мРНК *noggin2* и *noggin4* *S. griseum* в эмбрионы *X. laevis* по сравнению с мРНК *X. laevis* *noggin2*.

мРНК акульевого *noggin4*, подобно мРНК *noggin4* *X. laevis*, не проявила способности индуцировать формирование вторых осей у *X. laevis* (Рисунок 39 И, К).

Полученные результаты демонстрируют функциональную активность и консервативность свойств акульих генов *noggin2* и *noggin4*.

2.1.2.4. Гены семейства *Noggin* наземных позвоночных на примере амфибий

С момента открытия *Noggin* в качестве нейрального индуктора в 1992 году у амфибий и других 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 (Furthauer et al., 1999). Первым свидетельством наличия у амфибий более чем одного гена *noggin* стало описание у *X. tropicalis* гена *noggin2*, близкого по гомологии гену *noggin2* костистых рыб (Fletcher et al., 2004).

В рамках настоящей работы кДНК последовательности генов *noggin* были обнаружены в результате поиска генов *X. laevis*, потенциально вовлеченных в регуляторную сеть гомеобоксного гена *xanf1* и контролируемое им раннее развитие передней нейроэктодермы. Поиск был проведен методом вычитающей гибридизации образцов кДНК эксплантатов передней эктодермы двух выборок эмбрионов *X. laevis*: в одной выборке трансляция *Xanf1* была ингибирована с использованием морфолиновых олигонуклеотидов (МО) специфичных к мРНК *xanf1*, а в другой - эмбрионы были инъецированы контрольными МО.

Среди 19 клонов, идентифицированных при дифференциальном скрининге библиотек полученных в ходе вычитания, два клона содержали кДНК, кодирующие ранее неизвестные белки, содержащие цистиновые узлы.

Один из них обнаружил близкую гомологию с белком *Noggin2*, описанным ранее у рыбок данио (идентичность аминокислотных последовательностей 67%), и поэтому был назван *Noggin2*.

Другой белок с цистиновым узлом продемонстрировал только 30% идентичности аминокислотной последовательности как с *Noggin1*, так и с *Noggin2*.

Этот белок был назван Noggin4, с учетом ранее клонированного Noggin3 рыбки данио. Белок Noggin3 рыбки данио является близким гомологом Noggin1 (их аминокислотная идентичность 62%), поэтому, вероятно, Noggin1 и Noggin3 *D. rerio* произошли в результате геномной дупликации, характерной для линии костистых рыб. При этом, белок Noggin4, по сравнению с белками Noggin1 и Noggin2, содержит ряд аминокислотных замен в позициях, функционально важных для связывания молекул BMP и описанных ранее (Groppe et al., 2002) (Рисунок 41).

Проведенный поиск гомологов обнаруженных генов *noggin2* и *noggin4* у представителей других групп позвоночных обнаружил их наличие у птиц (*Gallus gallus*) и костистых рыб (*Fugu rubripes*).

У млекопитающих был найден только один ген *noggin1*, за исключением человека, в геноме которого (в хромосоме 22) был обнаружен псевдоген *noggin4*. Этот псевдоген содержит три сбоя рамки считывания и три стоп-кодона, которые прерывают предполагаемую область кодирования. Гомологичность этого псевдогена гену *noggin4* удалось показать тем фактом, что восстановленная гипотетическая кодирующая рамка демонстрирует более высокую гомологию с генами *noggin4* (35–43%), чем другими *noggin* (20–28%).

Таким образом, в результате проведенного скрининга были обнаружены два новых паралога *noggin* у шпорцевой лягушки *X. laevis*, а при дальнейшем анализе доступных геномных сиквенсов и у представителей других групп позвоночных: птиц и костистых рыб.

У ближайших родственников позвоночных – ланцетников и оболочников был описан единственный ген *noggin*.

Филогенетический анализ белков Noggin и анализ локальной геномной синтении генов *noggin* позвоночных представлены выше на Рисунках 31 и 32.

Множественное выравнивание белков Noggin *X. laevis* представлено на Рисунке 24.

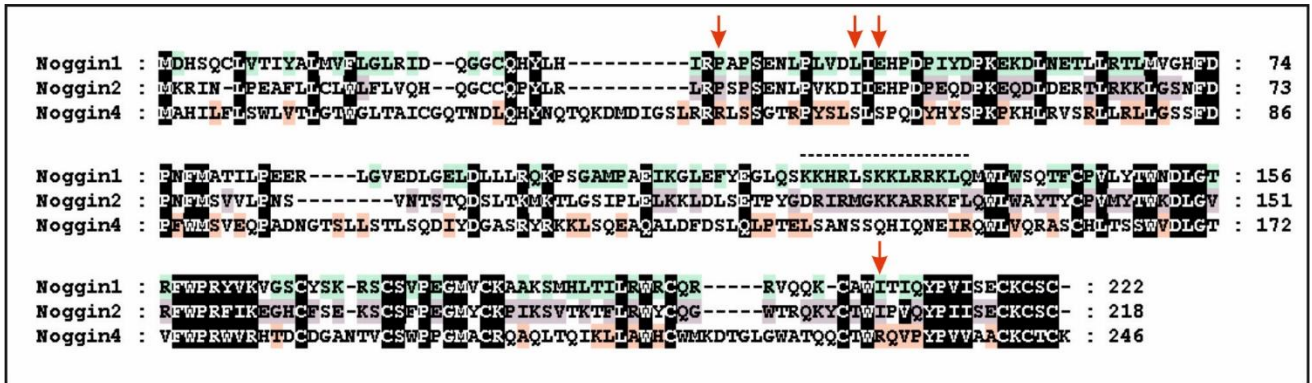


Рисунок 41. Множественное выравнивание белков Noggin *X. laevis*. Красными стрелками показаны аминокислотные последовательности, принципиально важные для связывания молекул BMP (по Groppe et al., 2002).

2.1.2.5. Экспрессия генов *noggin2* и *noggin4* в эмбриональном развитии *X. laevis*

Динамика экспрессии генов *noggin2* и *noggin4* на ранних стадиях развития эмбрионов *X. laevis* была исследована методом ОТ-ПЦР (Рисунок 42, А).

Экспрессия *noggin2* впервые обнаруживается на стадии поздней гастрюлы, после чего интенсивность сигнала возрастает. Экспрессия *noggin4* впервые обнаруживается уже на стадии бластулы и существенно возрастает в начале гастрюляции.

Таким образом, временной профиль экспрессии *noggin4* во всем эмбрионе похож на ранее описанный *noggin1* (Smith and Harland, 1992), в то время как экспрессия *noggin2* начинается на более поздних стадиях.

Паттерны пространственной экспрессии генов *noggin2* и *noggin4* у эмбрионов *X. laevis* были проанализированы методом гибридизации *in situ* и сопоставлены с экспрессией гена *noggin1* (Рисунок 42, Б – И; Рисунок 43).

В отличие от данных ОТ-ПЦР, экспрессию *noggin2* у *X. laevis* не удалось обнаружить методом гибридизации *in situ* на стадии гастрюлы. Возможно, это связано с более низкой чувствительностью метода гибридизации *in situ* к количеству детектируемой РНК, в которой ограничением является абсолютное количество исследуемой мРНК в эмбрионе и при применении

этого метода, в отличие от ОТ-ПЦР, не происходит амплификации исходной мРНК.

Методом гибридизации *in situ* начало экспрессии *noggin2* обнаруживается на стадии ранней и средней нейрулы (стадия 14), в тонкой полоске переднего края нервной пластинки (Рисунок 42, Д). В дальнейшем интенсивность экспрессии *noggin2* в этой области возрастает (Рисунок 42, Е, Ж), и на более поздних стадиях (стадия 24), экспрессия *noggin2* наблюдается в области зачатка переднего мозга, преимущественно в его дорсальной части (Рисунок 42, З). На стадии 26 слабая экспрессия *noggin2* наблюдалась в дорсальной части заднего мозга, дорсальных областях сомитов и зачатке сердца (Рисунок 42, И).

В отличие от *noggin1* (Fletcher et al., 2004), *noggin2* не экспрессируется на стадии 26 в присоске, хорде и в туловищной области нервной трубки.

В целом, паттерн экспрессии *noggin2* у *X. laevis* оказался идентичен паттерну экспрессии его ортолога у *X. tropicalis* (Fletcher et al., 2004).

Ген *noggin4* в начале гаструляции экспрессируется диффузно по всему анимальному полушарию, с максимумальным уровнем в презумптивной передней нейроэктодерме (Рисунок 43, А - Г). Как было выявлено на срезах, в отличие от *noggin1*, экспрессия *noggin4* на этой стадии обнаруживается в эктодермальном слое (Рисунок 43, М - О). На этой стадии *noggin1* экспрессируется во внутренних слоях дорсальной губы бластопора, в презумптивных мезодермальных клетках, т.е. область экспрессии *noggin1* комплементарна области экспрессии *noggin4* (Рисунок 43, М, Н).

На стадии гаструлы экспрессия *noggin4* продолжается в эктодерме, сохраняя максимум в передней части презумптивной нервной пластинки. На стадиях средней и поздней нейрулы максимум экспрессии *noggin4* по-прежнему наблюдается передней нервной складке (Рисунок 43, Д-З).

На стадии 24 и позже *noggin4* экспрессируется преимущественно в головной и дорсальной части эмбриона (Рисунок 43, И-Л). Область экспрессии включает эпидермис головы, дорсальную часть нервной трубки,

включая область переднего мозга, ушные пузырьки, цементную железу и производные нервного гребня, включая жаберные дуги.

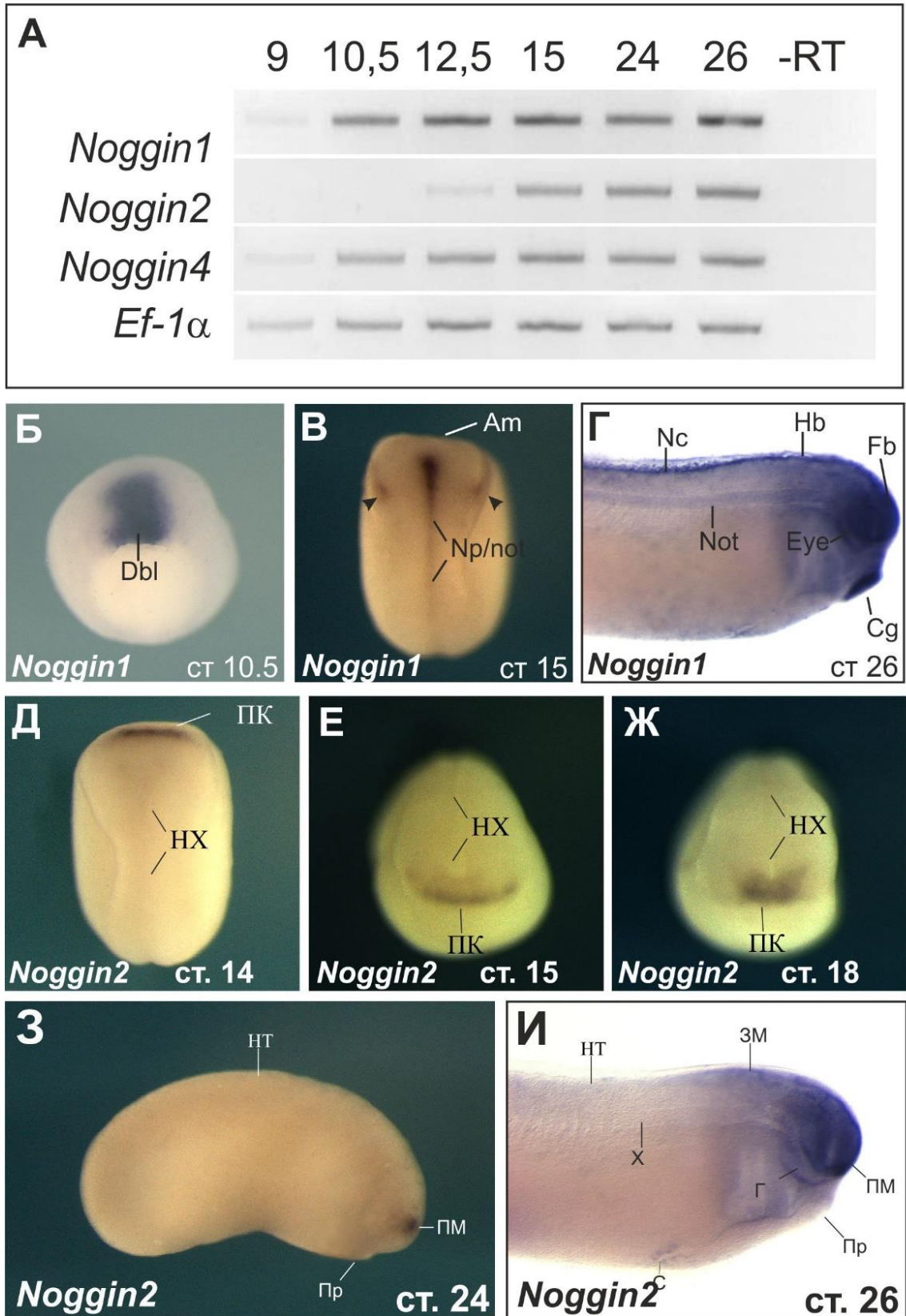


Рисунок 42. Динамика экспрессии генов *noggin* и пространственные паттерны экспрессии генов *noggin1* и *noggin2* у *X. laevis*.

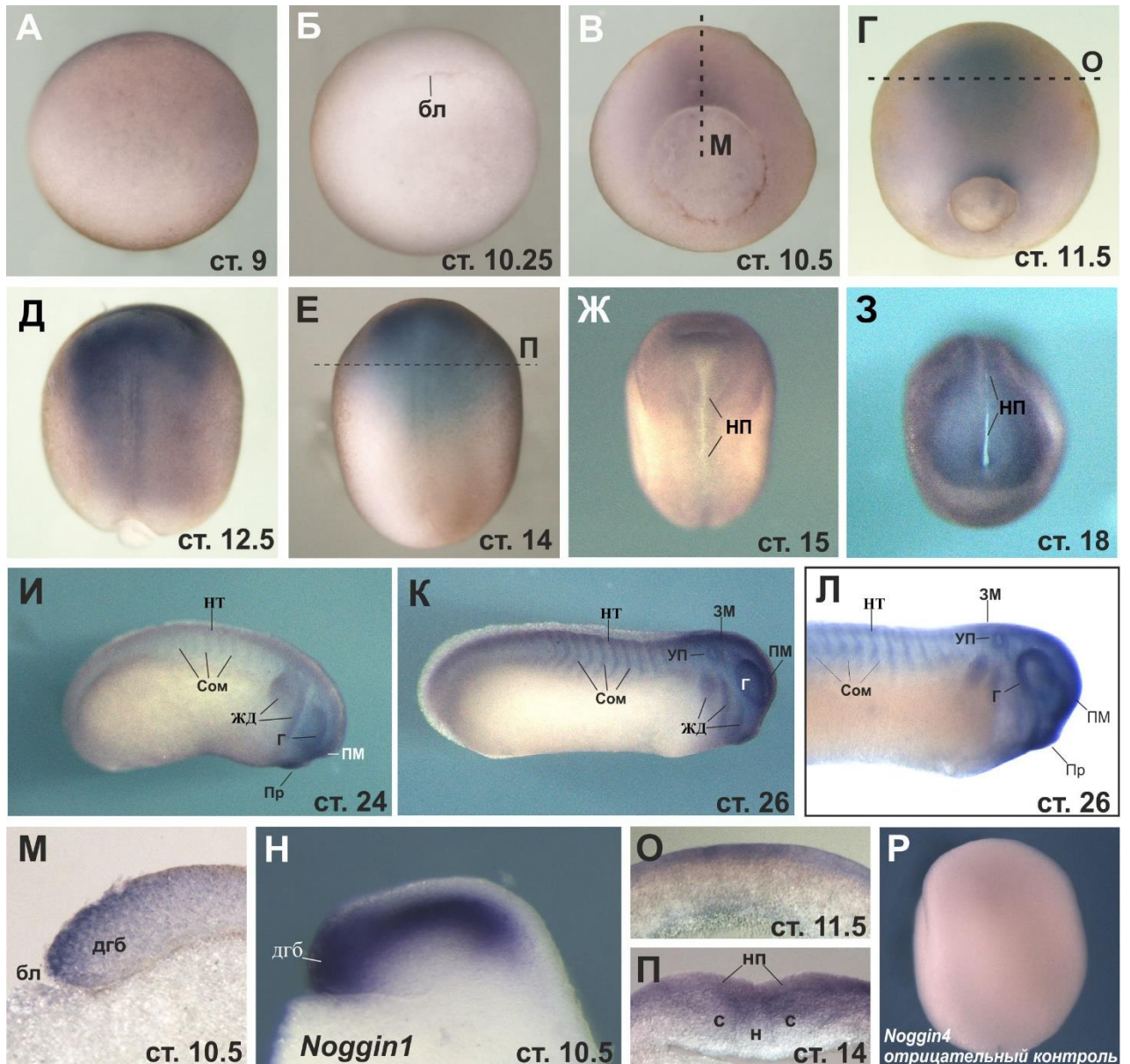


Рисунок 43. Паттерн экспрессии гена *noggin4* у *X. laevis*

Таким образом, если паттерн экспрессии *noggin2* имеет общие черты с паттерном *noggin1*, то экспрессия *noggin4*, практически отсутствующая в мезодермальных клетках, скорее комплементарна паттерну экспрессии *noggin1*.

В совокупности с различиями аминокислотной последовательности *Noggin4*, в том числе заменами аминокислот в позициях, критических важных для связывания BMP (а регуляция BMP каскада исторически рассматривалась в качестве основной функции *Noggin*) (Рисунок 41), такие

особенности паттерна экспрессии *noggin4* могут являться отражением его функциональной специфичности.

После изучения паттерна экспрессии генов *noggin2* и *noggin4* было проведено исследование их функциональных свойств и ролей в раннем развитии шпорцевой лягушки.

2.1.2.6. *Noggin2* индуцирует формирование полных вторичных осей тела у эмбрионов *X. laevis*

Для выявления возможных функциональных различий между генами *noggin1* и *noggin2* была проанализирована способность их мРНК индуцировать формирование вторичных осей тела у эмбрионов *X. laevis*. В соответствии с данными Смита и Харланда (Smith and Harland, 1992; Smith et al., 1993), инъекции широкого диапазона концентраций (20-400 пг/бластомер) мРНК *noggin1* с полноразмерной 5'-нетранслируемой областью или ее версии с частичной делецией 5'-нетранслируемой области (*noggin1 Δ5*) в вентральные бластомеры эмбриона шпорцевой лягушки на стадии 4-8 клеток индуцируют формирование неполных вторичных осей без переднеголовных структур (Рисунок 44 А).

В то же время, при инъекции полноразмерной мРНК *noggin2* или ее версии с частичной делецией 5'-нетранслируемой области *noggin2Δ5* в тех же концентрациях вторичные оси не индуцировались. Вместо этого нормальное развитие эмбрионов было заблокировано на стадии ранней нейрулы, и происходило формирование “грибовидных” фенотипов (Рисунок 44 Б). Анализ экспрессии специфических генов маркеров в таких эмбрионах выявил значительное увеличение уровня и зоны экспрессии передних нейронов, отмеченное увеличением экспрессии маркера конечного мозга *xanf1* (Рисунок 44 В). Кроме того, наблюдалось ингибирование эктодермальной дифференцировки с расширением экспрессия пан-нейрального маркера *NCAM* и одновременным снижением дифференцировки эпидермиса (экспрессия маркера кератина) и скелетных мышц (экспрессия

мышечного актина) (Рисунок 44 Г - Е). Эти данные свидетельствуют о том, что *noggin2* может нейтрализовать эмбриональную эктодерму, направляя ее дифференцировку в сторону конечного мозга.

Для оценки возможности эмбрионов успешно пройти нейруляцию при более низких концентрациях мРНК *noggin2*, она была инъецирована в эмбрионы в концентрации 3-5 пг/бластомер. В этом случае происходило образование полных вторичных осей тела с медиально расположенными циклопическими глазом и передним мозгом (отмеченными экспрессией *foxg1* и *raxb*) у 35% инъецированных эмбрионов (Рисунок 44 Ж-И, Рисунок 45 В, В', Д, Д').

Подавление мезодермальной дифференцировки геном *noggin2*, в отличие от *noggin1*, было показано на примере ингибирования экспрессии раннего мезодермального маркера *brachyury* при инъекциях соответствующих мРНК (Рисунок 45 А – Б'). На это же указывают и результаты экспериментов с использованием эксплантатов вентральной краевой зоны (ventral marginal zone, VMZ) эмбрионов на стадии ранней гаструлы. Микроинъекции мРНК *noggin1* в эмбрионы на начальных стадиях развития вызывают сильное удлинение данных эксплантатов, преобразуя их вентральную мезодерму в мышечную (дорсализация) (Рисунок 44, Л, Рисунок 46). В отличие от этого, подобно нативным эксплантатам VMZ, эксплантаты эмбрионов предварительно микроинъецированных мРНК *noggin2* остаются округлыми (Рисунок 44, М, Рисунок 46).

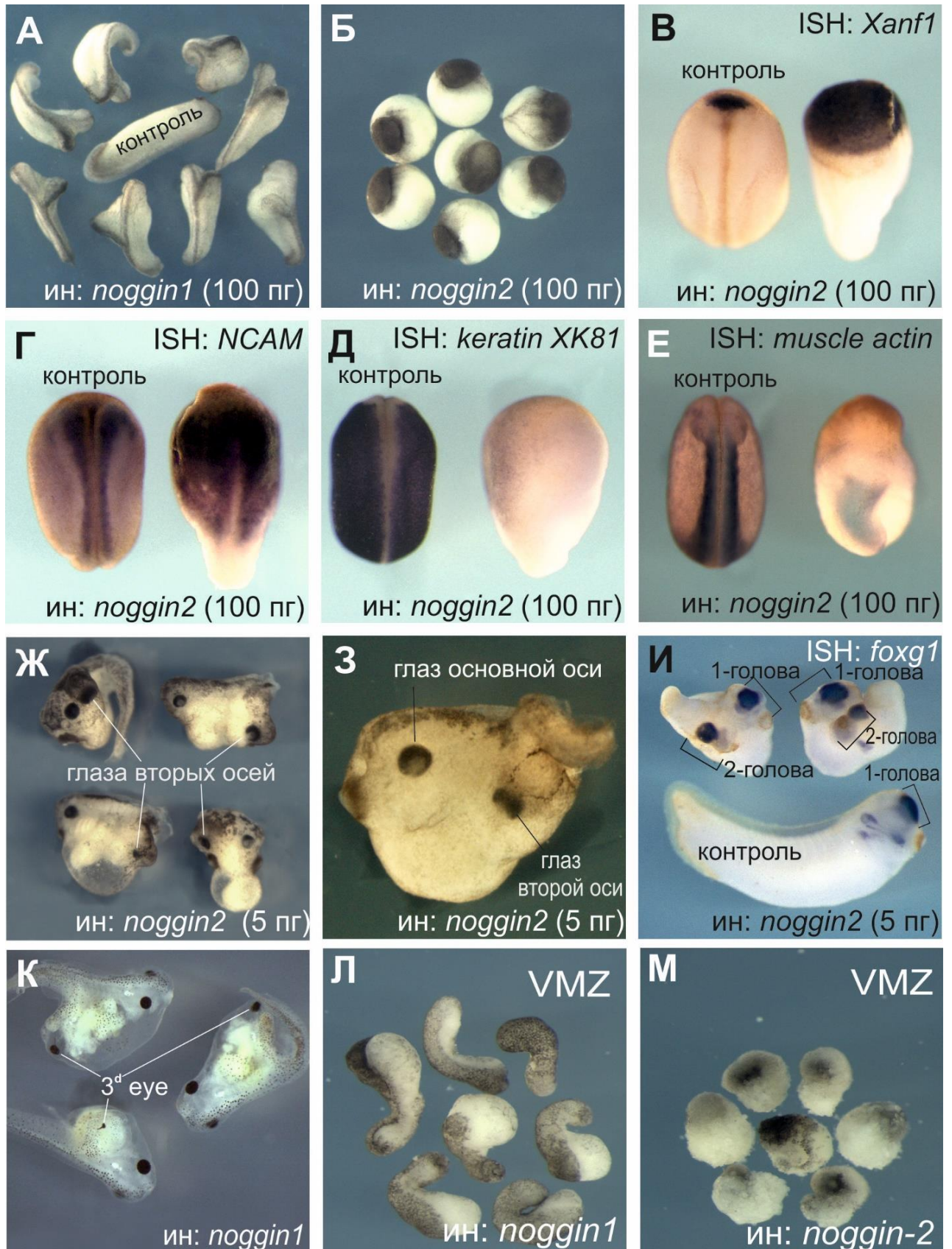


Рисунок 44. Фенотипические эффекты экспериментального повышения экспрессии *noggin1* и *noggin2* в эмбрионах *X. laevis*. Влияние микроинъекций мРНК *noggin1* и *noggin2* на дифференцировку нервной и мышечной тканей эмбрионов *X. laevis* и вытягивание тканевых эксплантатов.

А - Инъекции 40 пг мРНК *noggin1Δ5* в вентральную область эмбрионов шпорцевой лягушки на ранних стадиях развития приводят к формированию вторичных осей тела (87%, всего - 82 эмбрионов).

Б - Инъекции 40 пг мРНК *noggin2* в вентральную область эмбрионов шпорцевой лягушки на ранних стадиях развития приводят к формированию грибообразного фенотипа (90%, всего 75).

В – 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) и мезодермальной (Е) дифференцировок. Сигнал – темно-синий.

Ж – И - Вентральные инъекции 5 пг мРНК *noggin2* в эмбрионы *X. laevis* на ранних стадиях развития приводят к формированию полных вторичных осей тела, содержащих переднеголовые структуры (84%, всего - 92 эмбриона).

К - Вентральные инъекции 5 пг мРНК *noggin1* синтетической 5'-нетранслируемой областью в эмбрионы *X. laevis* приводят к формированию полных вторичных осей тела, содержащих переднеголовые структуры (78%, всего - 84 эмбриона).

Л - Эксплантаты вентральной краевой зоны (VMZ) эмбрионов, инъецированных вентральном РНК *noggin1* удлиняются к концу нейруляции благодаря дифференцировки скелетной мускулатуры.

М - Эксплантаты вентральной краевой зоны (VMZ) эмбрионов, инъецированных вентральном РНК *noggin2* к концу нейруляции сохраняют округлую форму.

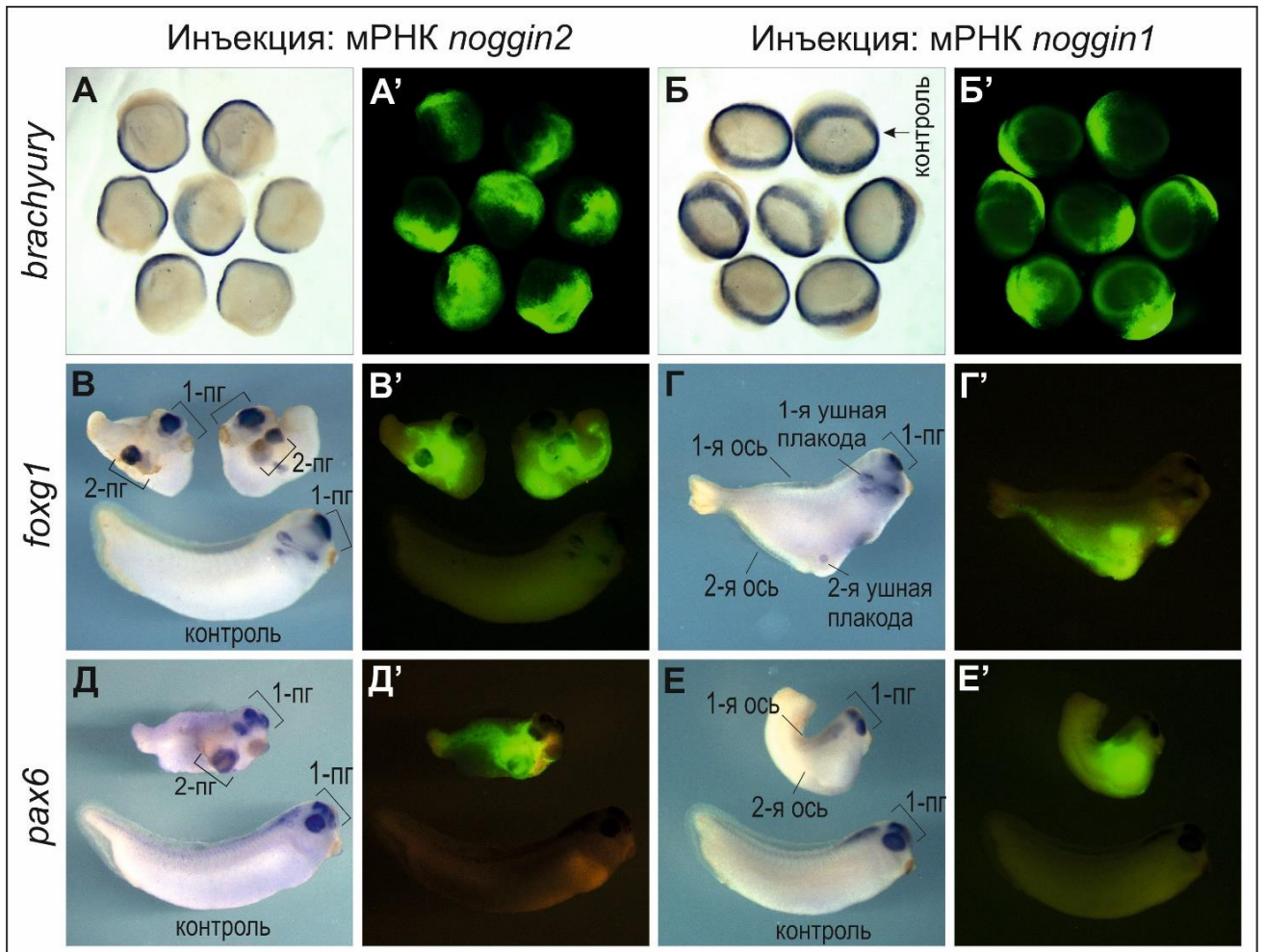


Рисунок 45. Эффекты гиперэкспрессии *noggin1* и *noggin2* в эмбрионах *X. laevis* на экспрессию мезодермального маркера гена *brachyury* и переднеголовных маркеров *foxg1* и *rax6*.

А, А' - Подавление экспрессии мезодермального молекулярного маркера (*brachyury*) у эмбрионов, инъектированных мРНК *noggin2*. А' – зеленый флуоресцентный краситель показывает распределение инъектированного материала.

Б, Б' - Экспрессия мезодермального молекулярного маркера (*brachyury*) у эмбрионов, инъектированных мРНК *noggin1* не обнаруживают изменений по сравнению с контрольным эмбрионом (стрелка).

В, В', Д, Д' – Индукции вторичных осей тела у эмбрионов, инъектированных 2-5 нг мРНК *noggin2* в один из вентральных бластомеров. Наличие экспрессии молекулярных маркеров *foxg1* и *rax6* указывает на наличие в дополнительных осях переднеголовных и глазных структур.

Г, Г', Е, Е' - Дополнительные оси тела, формирующиеся при инъекциях 40 нг мРНК *noggin1Δ5* с участком нативной 5'-нетранслируемой области в один из вентральных бластомеров эмбриона не содержат переднеголовных и глазных структур.

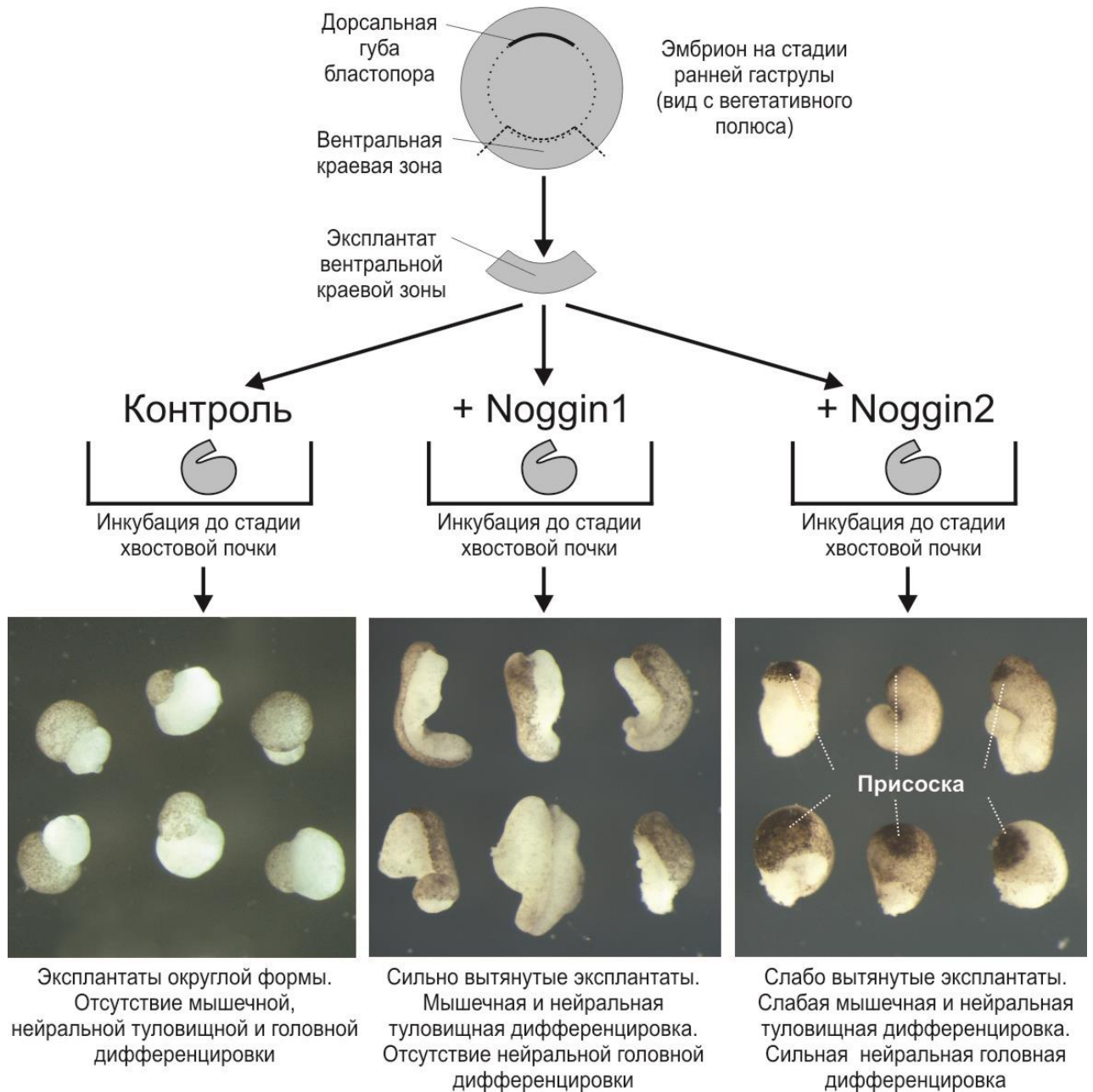


Рисунок 46. *Noggin1* индуцирует мышечную и туловищную нейральную дифференцировку в эксплантатах вентральной краевой зоны эмбрионов (VMZ) *X. laevis*., в то время как *Noggin2* в первую очередь нейральную головную дифференцировку.

2.1.2.7. В нормальном развитии мРНК *noggin2* транслируется с большей эффективностью, чем *noggin1*

Эффекты, наблюдаемые при эктопической экспрессии *noggin2* сходны с эффектами головного индуктора *cerberus*, который обладает способностью одновременно ингибировать BMP, Nodal/Activin и Wnt

сигнальные каскады (Piccolo et al., 1999). Исходя из этого, было проведено исследование способности белков *Noggin1* и *Noggin2* связывать лиганды этих сигнальных каскадов. Это исследование было проведено методом ко-иммунопреципитации. На первом этапе, принимая во внимание данные Смита и Харланда (Smith and Harland, 1992), которые предположили возможное ингибиторное влияние 5'-нетранслируемой области мРНК *noggin1* дикого типа на трансляцию белка, было проведено сравнение трансляции мРНК *noggin1*, содержащих разные варианты 5'-нетранслируемой области. Все исследованные мРНК несли в своем составе последовательность, кодирующую мус-полипептид, связываемый коммерчески доступными специфическими антителами для дальнейшей детекции методом ко-иммунопреципитации. Оказалось, что мРНК *noggin1*, содержащая полноразмерную 5'-нетранслируемую область дикого типа или часть этой последовательности, состоящую из 84 аминокислот (*noggin1Δ5*), описанную ранее (Smith and Harland, 1992), транслировалась приблизительно в 200 раз менее эффективно, чем аналогичная мРНК *mus-noggin2* (Рисунок 47, А, Б). В то же время не наблюдалось существенной разницы между трансляцией мРНК *mus-noggin1* и мРНК *mus-Nnoggin2*, в которых 5'-нетранслируемые области дикого типа были заменены на синтетические 5'-последовательности, содержащие консенсусные сайты Козака (Рисунок 47, Б).

Важно отметить, что такая разница в трансляции мРНК *noggin1* и *noggin2* дикого типа не компенсируется в нормальном развитии разницей их концентраций, поскольку, согласно данным ОТ-ПЦР, обе мРНК присутствуют в клетках передней части нервной пластинки в сопоставимых количествах (Рисунок 47, В). Это свидетельствует о том, что концентрация эндогенного белка *Noggin2* в эмбрионах в нормальном развитии может быть намного выше, концентрации *Noggin1*.

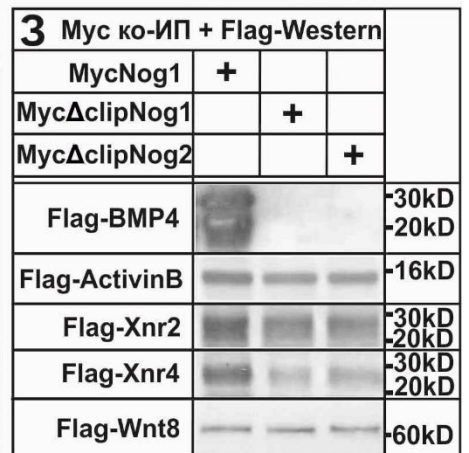
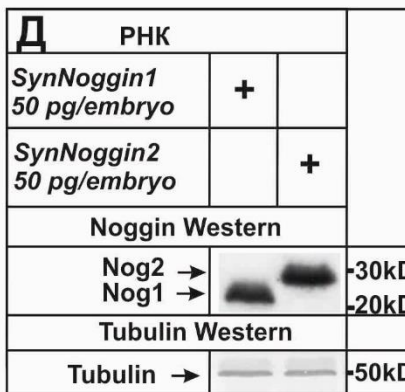
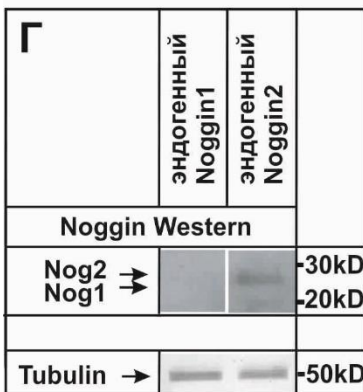
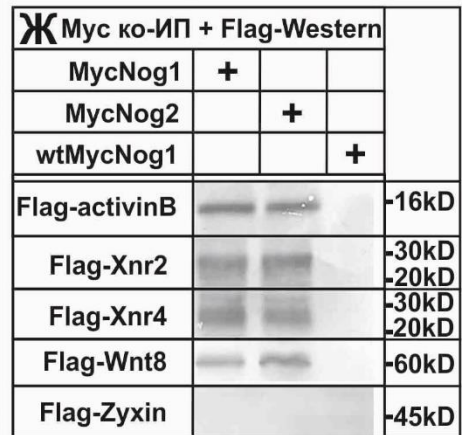
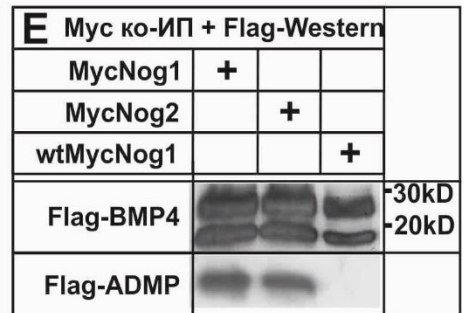
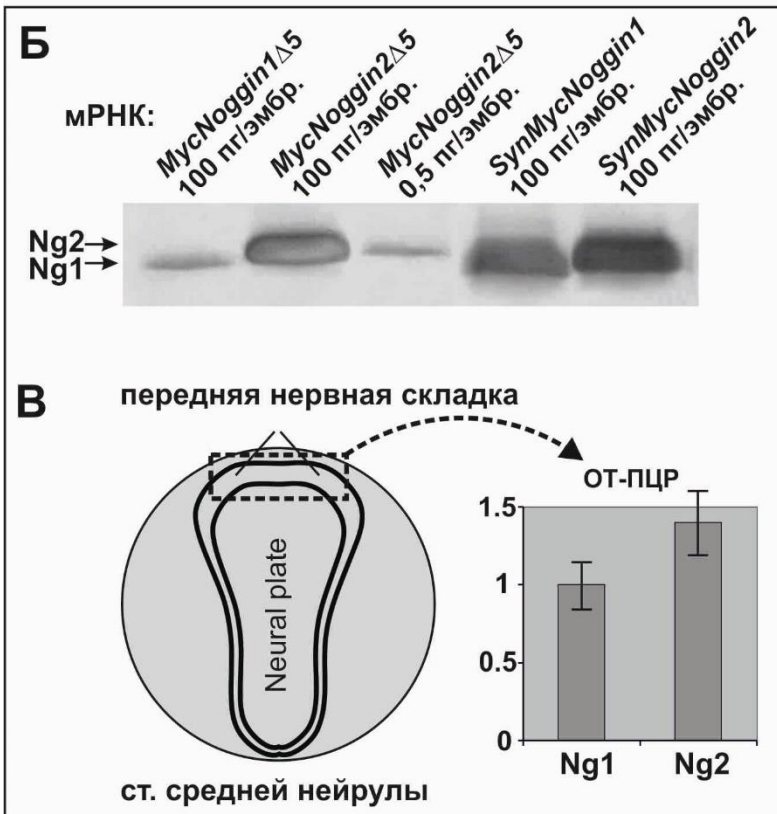
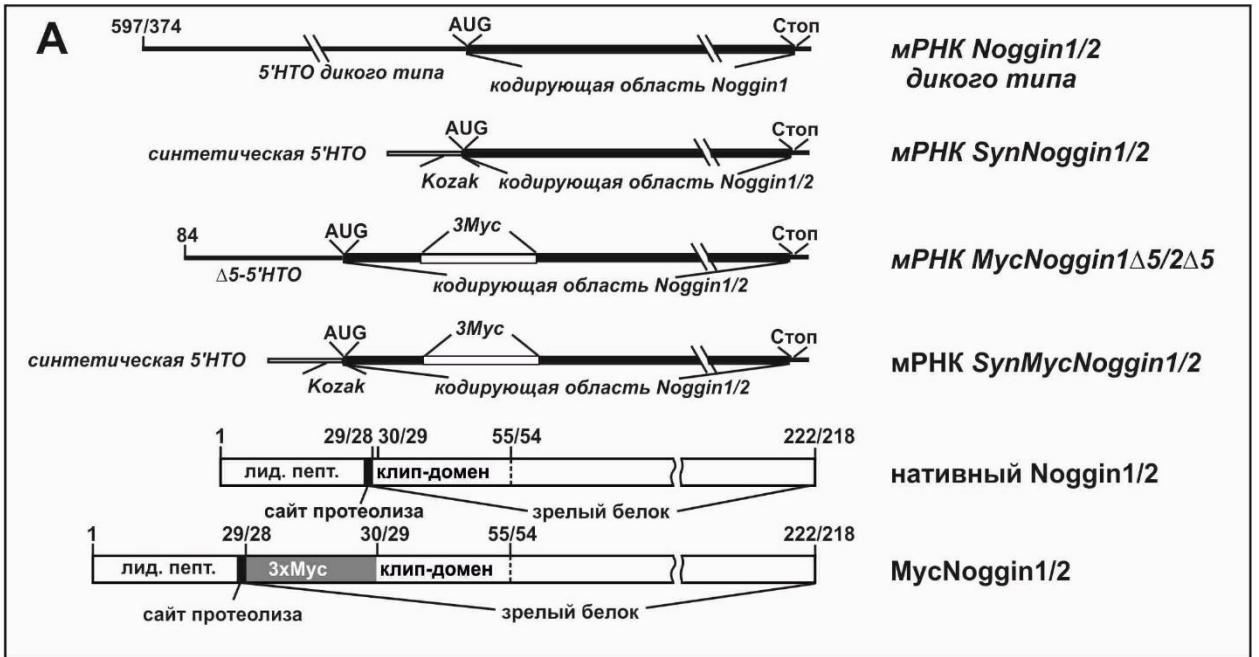


Рисунок 47. (по Вауганов et al., 2011 с изменениями). мРНК *noggin1* и *noggin2* транслируются с разной эффективностью и обладают способностью связывать TGF- β - и Wnt-лиганды.

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

Б - Сравнение способности к трансляции мусNoggin1 Δ 5 и мусNoggin2 Δ 5 методом иммуноблоттинга с антителами против мус-пептида.

В - Количество мРНК *noggin1* и *noggin2* в области передней нервной пластинки, оцененное методом ОТ-ПЦР, примерно одинаково.

Г, Д - Количество белка Noggin2 в эмбрионах, оцененное методом иммуноблоттинга с антителами против этих белков, значительно превышает количество Noggin1 (на **Г** нанесены эндогенные белки, на **Д** – оверэкспрессированные).

Е – З - Способность белков Noggin1 и Noggin2 и их Δ -клип мутантов связывать ADMP, BMP, ActivinB, Wnt8, Xnr2, Xnr4 и Wnt8, выявленная методом ко-иммунопреципитации. Zuxin приведен в качестве отрицательного контроля.

Чтобы проверить эту гипотезу, была предпринята попытка обнаружить эндогенные белки Noggin1 и Noggin2 в эксплантатах передней части нервной пластинки на стадии средней нейрулы с помощью антител к специфическим олигопептидам Noggin1 и Noggin2. Хотя в этих экспериментах не удалось обнаружить какой-либо специфический сигнал для Noggin1, слабый, но достоверный сигнал наблюдался с антителами к Noggin2 (Рисунок 47, Г). При инъекции мРНК *noggin1* и *noggin2* с синтетическими 5'-нетранслируемыми областями эти антитела выявили сходный уровень экспрессии, что соответствует результату, полученному ранее с помощью мус-антител (Рисунок 47, Д). Эти данные подтверждают гипотезу о более низкой концентрации эндогенного белка Noggin1 по сравнению с эндогенным белком Noggin2.

Исходя из этих результатов, в последующих экспериментах применялись мРНК мус-Noggin1 и мус-Noggin2 с синтетической 5'-нетранслируемой областью, содержащей консенсусный сайт Козака, что позволило уравнивать трансляцию этих матриц.

2.1.2.8. *Noggin2* индуцирует нейральную и подавляет мезодермальную дифференцировку в эксплантатах тканей *X. laevis*

Для независимого тестирования влияния *Noggin2* на клеточную дифференцировку были проведены эксперименты с использованием метода обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР) по сравнению экспрессии различных генетических маркеров в эксплантатах "наивной" анимальной эктодермы (animal caps – AC), полученных из эмбрионов на стадии ранней гаструлы, в которые предварительно инъецировали мРНК *noggin2*. Также были использованы эксплантаты, вентральной краевой зоны (VMZ) эмбрионов на стадии ранней гаструлы, для анализа воздействий *Noggin2* на дифференцировку мезодермы.

Схема эксперимента представлена Рисунке 48, А.

Методом ОТ-ПЦР оценивалось влияние эктопической экспрессии *noggin2* на экспрессию тканеспецифических генетических маркеров (генов нейроэктодермы, эпидермиса, мышц, поздней мезодермы и энтомезодермы) в эксплантатах анимальной эктодермы (AC) и вентральной краевой зоны (VMZ) эмбрионов шпорцевой лягушки. Для нормирования результатов оценивался уровень экспрессии гена домашнего хозяйства - фактора элонгации *EF1 α* .

Было показано, что *Noggin2*, как и *Noggin1* активизирует экспрессию нейральных маркеров *NCAM*, *Xanf1* и ингибирует экспрессию эпидермального маркера *keratin* (Рисунок 48 Б). В отличие от *Noggin1*, активизирующего экспрессию мышечного маркера *actin* в эксплантатах вентральной краевой зоны, *Noggin2* экспрессию этого маркера не только индуцировал, но и обнаружил способность подавлять его экспрессию при инъекции в смеси с *Noggin1*.

Таким образом, в проведенных экспериментах *Noggin2* продемонстрировал выраженную нейрализующую активность сходную с активностью *Noggin1* и выразившуюся в активации экспрессии нейральных и ингибировании эпидермального маркеров. В то же время, в отличие от

Noggin1, Noggin2 оказал ингибиторное влияние на мышечную дифференцировку. Способность Noggin2 нейтрализовать эктодерму в сочетании с его способностью подавлять дорзализующую активность Noggin1 указывает на то, что Noggin2, кроме BMP, может связывать другие факторы, необходимые для мезодермальной дифференцировки.

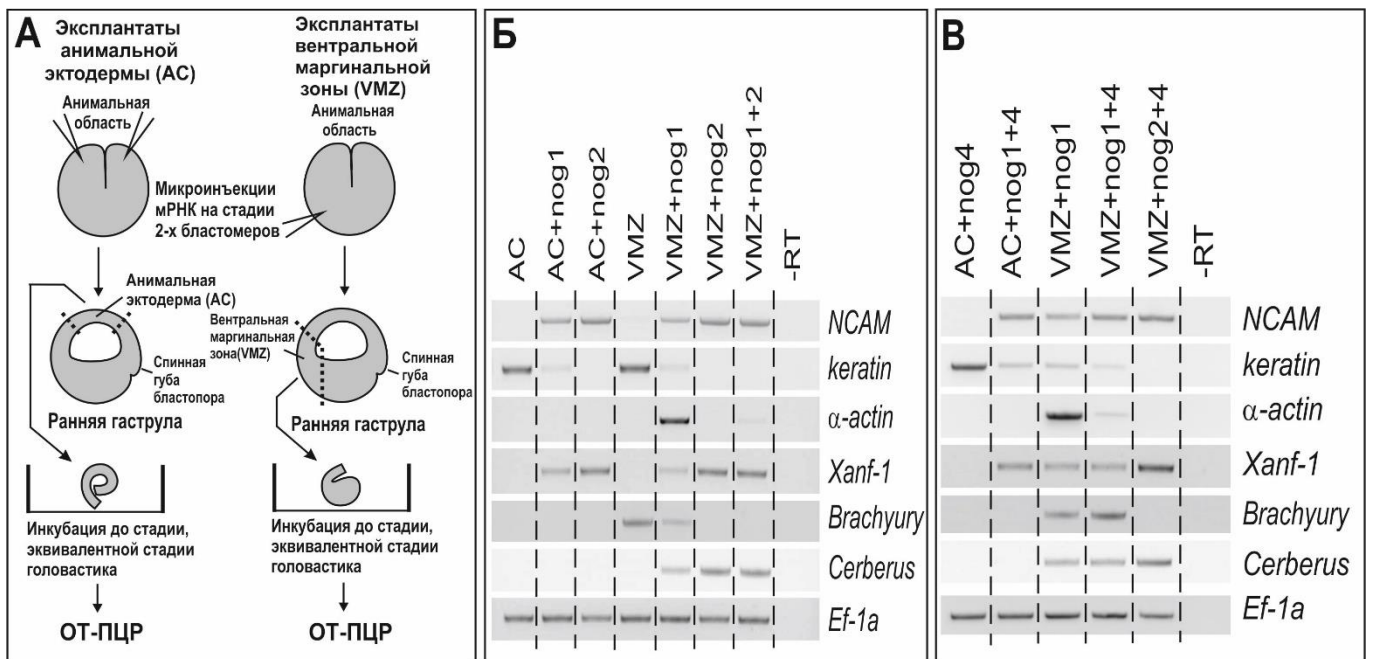


Рисунок 48. Анализ влияния мРНК *noggin* на клеточную дифференцировку эксплантатах анимальной эктодермы (animal caps – AC) и вентральной маргинальной зоны эмбрионов (ventral marginal zone - VMZ) *X. laevis* проведенный методом ОТ-ПЦР.

А. Схема экспериментов.

Б, В - Обратная транскрипция – ПЦР анализ проб тотальной РНК эксплантатов эктодермы анимальной области эмбрионов и эксплантатов вентральной маргинальной зоны эмбрионов, микроинъекцированных мРНК *noggin1* и *noggin2* с праймерами к нейроэктодермальным (*NCAM*, *Xanf-1*), эпидермальным (*keratin*), мышечным (*a-actin*), постериорному мезодермальному (*brachyury*) и эндомезодермальному (*cerberus*) молекулярным маркерам и фактором элонгации *Ef-1a* в качестве контроля количества мРНК

2.1.2.9. Белки *Noggin* обладают способностью подавлять фосфорилирование молекул *Smad2* в эмбрионах *X. laevis*

Фосфорилирование молекул белков *Smad* является принципиальным этапом функционирования как BMP, так и nodal/activin сигнальных каскадов.

Фосфорилированные молекулы Smad1, 5, 8 (в случае BMP каскада) и молекулы Smad2, 3 (в случае nodal/activin каскада) образуют комплекс с молекулами Smad4 и транспортируются в ядро, где модулируют активность генов-мишеней. При этом, само фосфорилирование молекул Smad является прямым и непосредственным следствием взаимодействия лиганда (молекул BMP или Activin или Nodal в присутствии ко-рецептора Cripto) с комплексом мембранных рецепторов I и II типов. В связи с этим, оценка уровня фосфорилирования молекул Smad может служить индикатором активности сигнального каскада.

Одними из лигандов, запускающими активность Smad1 зависимого BMP сигнального каскада являются BMP4 и ADMP.

Лигандами, запускающими активность Smad2 зависимого nodal/activin сигнального каскада являются молекулы белка Activin или комплекс белков Nodal+Cripto.

Гомологами белка Nodal млекопитающих у шпорцевой лягушки являются белки Xnr2 (от Xenopus nodal related), а гомологами белка cripto – белки FRL.

На сегодняшний день доступны коммерческие специфические антитела к фосфорилированным формам молекул Smad, участвующим в функционировании Nodal/Activin каскада с помощью которых в эксперименте можно специфически оценить активность каждого из этих каскадов. В проведенных экспериментах использовались антитела фирмы Cell Signaling Technology: Phospho-Smad2(Ser465/467) Antibody (каталожный номер #3101).

Общая схема эксперимента, напоминает таковую для экспериментов по исследованию экспрессии генов-маркеров (Рисунок 48, А), с той лишь разницей, что вместо метода обратной транскрипции-ПЦР в данном случае применяется оценка уровня фосфорилированности белков Smad с помощью специфических антител.

В эксперименте проводится искусственная активация исследуемого каскада, при которой аномально возрастает уровень фосфорилирования молекул соответствующих Smad белков (в данном случае – белков Smad 1, 5, 8 для BMP каскада и Smad 2,3 для Nodal/Activin каскада). Данная активация проводится путем инъекций в эмбрионы шпорцевой лягушки мРНК лигандов, в норме участвующих в активации исследуемого сигнального каскада, т.е. мРНК *BMP4* или *ADMP* для BMP каскада и мРНК *activin* или смеси мРНК *xnr2* и *FRL1* для Nodal/Activin каскада. В случае, если исследуемый белок (Noggin2) действительно участвует в ингибировании исследуемого сигнального каскада, то при добавлении его мРНК в инъецируемую смесь, уровень искусственной активации каскада должен снижаться.

Оценка уровня фосфорилирования белков Smad проводится в эксперименте методом иммуноблоттинга с использованием антител, специфичных для фосфорилированной формы исследуемых Smad-белков.

В эксперименте с одной стороны исследуемый каскад специфически индуцировался путем инъекций в эмбрионы мРНК его лигандов, а с другой стороны, производилась параллельная инъекция смеси каждого из лигандов с мРНК *noggin1* (изначально использовался в эксперименте в качестве отрицательного контроля) и *noggin2*.

Инъекции проводились в развивающиеся эмбрионы шпорцевой лягушки на стадии 2-4 бластомеров. Количество инъецируемой мРНК составляло 1 нг на эмбрион. После инъекций эмбрионы культивировались в растворе 0.1x MMR (Mark's Modified Ringers, описанный в Sive et al. 2000) до стадии поздней бластулы (стадии 9 по таблицам развития Ньюкопа, описанным в Nieuwkoop and Faber, 1967).

На стадии поздней бластулы производилось микрохирургическое вырезание эксплантатов анимальной эктодермы (так называемых “анимальных шапок”) с целью избегания возможных эндогенных индукций. После этого эксплантаты культивировались в растворе 1x MMR до стадии

ранней гаструлы, после чего производилось выделение белка из эксплантатов по методике, описанной в Tanegashima et al., 2004.

Уровень фосфорилирования молекул Smad в пробах оценивался с помощью коммерческих антител.

По разнице уровней фосфорилирования молекул Smad в случае простой активации каскада при инъекции соответствующих лигандов и в случае инъекции смеси мРНК лигандов и мРНК *noggin2* и *noggin1* можно судить о влиянии данных белков на активность сигнального каскада.

В результате, белки *Noggin1* и *Noggin2* ожидаемо продемонстрировали способность подавлять фосфорилирование молекул Smad 1,5,8, индуцируемое в эксперименте путем инъекций в эмбрионы шпорцевой лягушки мРНК *BMP4* и *ADMP* (Рисунок 49 А). При этом оказалось, что ингибиторная активность в отношении BMP каскада у *Noggin1* выражена сильнее, чем у *Noggin2*.

Кроме этого, *Noggin2* продемонстрировал способность подавлять активность *Nodal/Activin* каскада, как при его активации как мРНК *activin*, так и мРНК *Xnr2+FRL1* (Рисунок 49 А). Этот результат указывает на способность белка *Noggin2* выступать в качестве антагониста сигнала *Activin*, но также и демонстрируют его способность подавлять активность *Nodal/Activin* сигнального каскада независимо от способа его активации.

В качестве контроля в данном эксперименте использовалась мРНК *noggin1*, который, согласно ранее полученным данным, не обнаружил способности подавлять сигнал *Activin* (Рисунок 49 Б). Таким образом, ожидаемым был результат о неспособности *Noggin1* ингибировать фосфорилирование молекул Smad 2,3, индуцируемое при активации *Nodal/Activin* мРНК *activin*, что и подтвердилось.

В случае же активации исследуемого каскада путем инъекции мРНК *Xnr2* в смеси с мРНК его ко-рецептора *FRL1*, белок *Noggin1* неожиданно обнаружил способность, подобно белку *Noggin2*, ингибировать фосфорилирование молекул Smad 2, 3 (Рисунок 49 Б). Это является

свидетельством вовлеченности белка *Noggin1* в функционирование *Nodal/Activin* сигнального каскада.

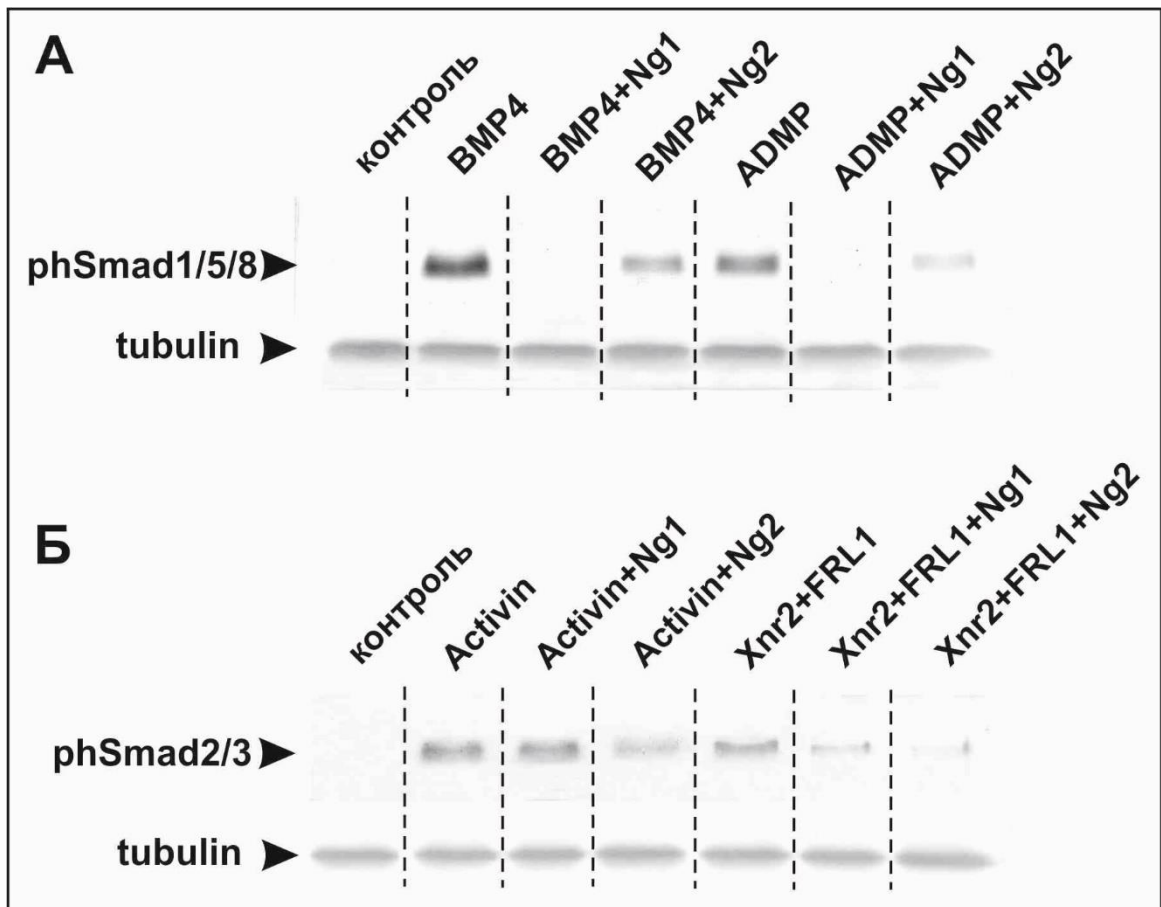


Рисунок 49. Влияние белков *Noggin1* и *Noggin2* на фосфорилирование молекул *Smad*.

А - Влияние белков *Noggin1* и *Noggin2* на фосфорилирование молекул *Smad1/5/8*, участвующих в активации *BMP* сигнального каскада. Белки *Noggin1* и *Noggin2* способны подавлять фосфорилирование молекул *Smad 1,5,8*, индуцируемое в эксперименте путем инъекций в эмбрионы шпорцевой лягушки мРНК *BMP4* и *ADMP*. Количество белка *Tubulin* анализировалось в качестве индикатора общего количества белка в разных пробах.

Б - Влияние белков *Noggin1* и *Noggin2* на фосфорилирование молекул *Smad2/3*, участвующих в активации *nodal/activin* сигнального каскада. При экспериментальной индукции *nodal/activin* сигнального каскада путем инъекций мРНК *activin*, только белок *Noggin2* способен подавлять фосфорилирование молекул *Smad2/3*. При индукции того же каскада путем инъекций смеси мРНК *Xnr2* и *FRL1* как *Noggin1*, так и *Noggin2* способны подавлять фосфорилирование молекул *Smad2/3*. Количество белка *tubulin* анализировалось в качестве индикатора общего количества белка в разных пробах.

Способность белков *Noggin1* и *Noggin2* выступать в качестве антагонистов *Xnr* сигнала была подтверждена в экспериментах на целых эмбрионах *X. laevis*. Инъекции смеси мРНК *Xnr2* и *FRL1* активируют в эмбрионах *Nodal/Activin* каскад, что приводит к формированию эктопического аналога губы бластопора и хорошо заметным аномалиям развития эмбрионов на стадии гастролы (в данном эксперименте – в 76 % случаев) (Рисунок 50 А, Б). При добавлении к инъекцируемой смеси *Xnr2* и *FRL1* мРНК *noggin1* или *noggin2* наблюдается ослабление наблюдаемого эффекта и нормализация развития эмбрионов (так называемое «спасение»). Снижение эффекта формирования эктопического аналога губы бластопора происходит до 34% в случае *noggin1* и 22% в случае *noggin2* (Рисунок 50 В, Г).

Такой результат подтверждает способность белков *Noggin1* и *Noggin2* подавлять активность *Nodal/Activin* каскада при его активации *Xnr2* в присутствии ко-рецептора *FRL1*.

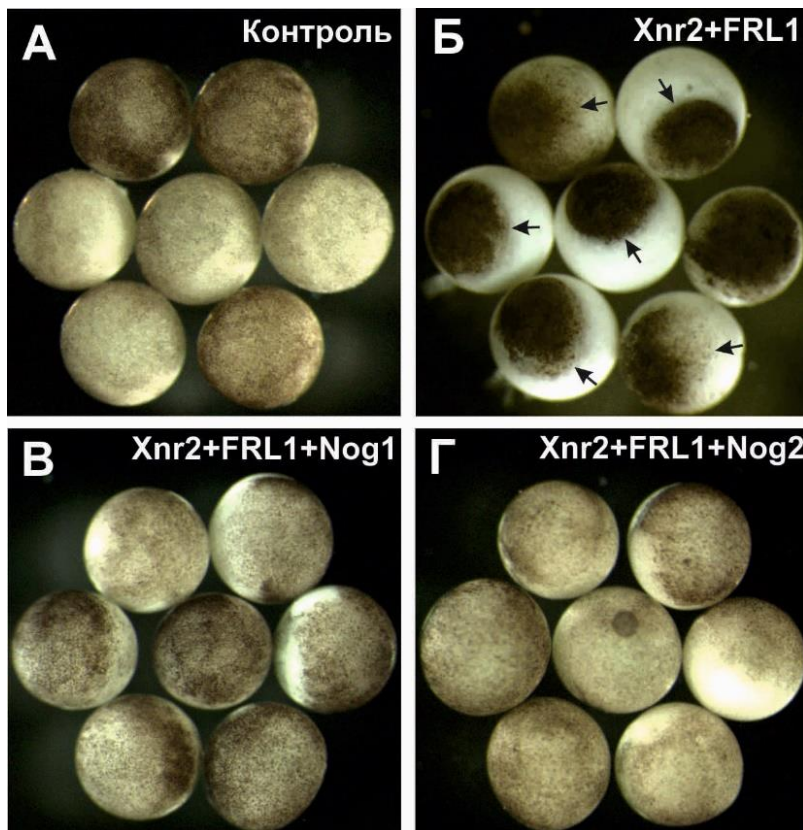


Рисунок 50. Белки *Noggin1* и *Noggin2* могут подавлять активность *nodal/activin* каскада при его активации лигандом *Xnr2* в присутствии ко-рецептора *XCR1* в эмбрионах *X. laevis* *in vivo*.

А – контрольные эмбрионы на стадии гастролы (ст. 11).
 Б – экспрессия экзогенных белков *Xnr2* и *FRL1* на ранних стадиях приводит к легко идентифицируемым аномалиям по сравнению с контролем (сравн. Б и А) – формированию эктопической губы бластопора (показаны

стрелками). В - Г - Добавление в инъекцируемую смесь мРНК *noggin1* (В) или *noggin2* (Г) нормализует развитие эмбрионов.

В целом, полученные результаты с одной стороны указывают на потенциальную вовлеченность белков *Noggin1* и *Noggin2* в регуляцию *Nodal/Activin* сигнального каскада в качестве ингибиторов, а с другой – указывают на возможные функциональные особенности каждого из двух рассмотренных *Noggin* белков.

2.1.2.10. Белки *Noggin1* и *Noggin2*, кроме молекул BMP могут связывать лиганды TGF- β и Wnt сигнальных каскадов

Для исследования механизма участия секретируемых белков *Noggin1* и *Noggin2* в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов методом ко-иммунопреципитации было проведено исследование способности *Noggin* связывать лиганды, участвующие в функционировании этих каскадов. Для проведения этого исследования были получены кДНК белков *Noggin* и лигандов-активаторов сигнальных каскадов меченые специфическими полипептидами – Мус и Flag, к которым доступны коммерческие антитела.

В рамках этого метода синтетические мРНК, кодирующие меченые специфическими полипептидами исследуемые белки были индивидуально инъецированы в эмбрионы шпорцевой лягушки на ранних стадиях развития (стадия 2 - 4 бластомеров). После инъекций эмбрионы инкубировались до стадии ранней гаструлы (стадии 10.5 по таблицам развития Ньюкопа, описанным в Nieuwkoop and Faber, 1967). После этого проводилось тотальное выделение синтезированных в развивающихся эмбрионах белков по методике, описанной в Tanegashima et al., 2004 и смешивание неочищенных экстрактов эмбрионов, инъецированных исследуемыми белками. Благодаря наличию в исследуемых белках, мРНК которых были инъецированы в эмбрионы, полипептидных меток разных типов, каждый из них при очистке может быть специфически и независимо абсорбирован на соответствующей смоле. После специфической абсорбции одного из исследуемых белков на смоле и последующей его элюации со смолы, методом иммуноблоттинга определяется наличие в элюате другого исследуемого белка. Это проводится

при помощи специфических к полипептидной последовательности-метке антител. В результате, наличие в элюате обоих исследуемых белков (при том, что на смоле специфически абсорбировался лишь один из них), указывает на способность этих белков напрямую взаимодействовать (связываться) друг с другом. В случае белков среднего размера (с молекулярной массой от 15 до 40 килодальтон) для блоттинга использовался 12% полиакриламидный гель.

Была исследована способность белков *Noggin1* и *Noggin2* связывать следующие белки-лиганды сигнальных каскадов: ADMP, BMP4 (BMP каскад); ActivinB и два гомолога *Nodal* шпорцевой лягушки, *Xnr2* и *Xnr4* (*Nodal/Activin* каскад) и *Wnt8* (*Wnt/β-catenin* каскад).

Было показано, что кроме BMP4 *Noggin1* и *Noggin2* связываются, хотя и менее эффективно, с ADMP, всеми тестируемыми лигандами TGF-β, отличными от BMP, и *Wnt8* (Рисунок 47 Е-Ж). В то же время не было обнаружено взаимодействия исследуемых лигандов с контрольным цистеин-богатым белком – *Zyxin*. Интересно, что при использовании слабо транслируемой версии мРНК *mus-Noggin1*, содержащей 5'-НТР дикого типа, сигнал выше фона был обнаружен только для BMP4 (Рисунок 47 Е - Ж). Этот результат подтверждает, что, несмотря на потенциальную способность связывать не-BMP лиганды TGFβ и Wnt, в силу низкой концентрации в эмбрионах (см. выше), *Noggin1* в нормальном развитии *de facto* может ингибировать только лиганды BMP, к которым *Noggin1* имеет гораздо более высокое сродство, чем к другим белки TGF-b или Wnt. Это согласуется с общепринятым взглядом, согласно которому *Noggin1* действует в эмбрионах преимущественно как ингибитор BMP.

Ранее было показано, что N-концевой клип-домен *Noggin1* играет критическую роль в его связывании с BMP (Groppe et al., 2002). Чтобы определить, отвечает ли один и тот же домен за связывание *Noggin1* и *Noggin2* с другими лигандами TGF-β и *Wnt8*, было проверено взаимодействие этих лигандов с *mus*-мечеными мутантами Δ-clip-*Noggin1* и

Δ -clip-Noggin2, у которых отсутствуют 28 N-концевых аминокислотных остатков зрелого белка, образующих клип-домен (Рисунок 47, А).

Удаление клип-домена резко снижало связывание Noggin1 и Noggin2 с BMP4 до фонового уровня, однако и Δ -clip-Noggin1 и Δ -clip-Noggin2 были способны связывать все протестированные не-BMP лиганды TGF β и Wnt8 (Рисунок 47, Б). Эти данные указывают на то, что за связывание Noggin1 и Noggin2 с лигандами, отличными от BMP, ответственны другие участки молекулы, а не клип-домен.

2.1.2.11. Белки *Noggin1* и *Noggin2* могут ингибировать сигнальные каскады *Activin/Nodal* и *Wnt*

Для подтверждения полученных данных по подавлению фосфорилирования молекул Smad и количественной оценки способности белков Noggin1 и Noggin2 подавлять сигнальные каскады были проведены люциферазные тесты. Для каждого сигнального каскада применялись специфические репортерные конструкции, содержащие ген люциферазы под контролем промотора, содержащего цис-регуляторные элементы (последовательности нуклеотидов). Эти элементы распознаются транскрипционными факторами-эффекторами, участвующими в функционировании данного сигнального каскада. При специфическом связывании такого белка - эффектора с регуляторными элементами репортерных конструкций происходит активация экспрессии гена люциферазы и, как следствие, накопление белка люциферазы в эмбрионах по мере их культивирования. Количество белка люциферазы в эмбрионах может быть количественно оценено путем измерения люминисценции в растворе помощью люминометра TD-20/20 Luminometer.

При исследовании активности Nodal/Activin сигнального каскада в качестве люциферазного репортера был использован вектор GL3-ARE-Luc (Pierreux et al., 2000), для Wnt каскада вектор TOPflash, Millipore, для BMP каскада вектор TCFm-Luc (Hikasa et al., 2010).

Для нормирования полученных результатов проводилась оценка общего уровня биосинтеза белка с помощью продукта трансляции инъецированного экспрессионного вектора pCMV- β -GAL.

Активация Nodal/Activin сигнального каскада проводилась путем инъекций мРНК Activin и/или Xnr – лигандов, в норме активирующих этот сигнальный каскад.

Активация Wnt сигнального каскада проводилась путем инъекций мРНК Wnt8 - лиганда, в норме активирующего этот сигнальный каскад.

При исследовании активности BMP сигнального каскада его искусственную активацию не проводили, поскольку уровень естественной активности этого каскада, в отличие от более локально активируемых Nodal/Activin и Wnt каскадов, достаточно высок и достаточен для количественного анализа. Инъекции экспрессионных репортерных векторов и мРНК *noggin1*, *noggin2*, *activin* и *xnr2* осуществлялись в анимальную область на стадии 2 бластомеров. Для обеспечения возможности последующего отбора эмбрионов, содержащих инъецированный материал, в смесь добавляли флюоресцирующий агент – Rhodamine Lysine Dextran, который при облучении ультрафиолетом флюоресцирует в красном диапазоне, спектрально не перекрываясь с сигналом люциферазы.

После инъекций развивающиеся эмбрионы шпорцевой лягушки инкубировались около 16 часов при температуре 15 градусов по Цельсию до стадии средней-поздней гаструлы (стадии 12 по таблицам развития Ньюкопа, описанным в Nieuwkoop and Faber, 1967) в растворе 0.1x MMR (Mark's Modified Ringers, описан в Sive et al., 2000). На этой стадии, с применением флуоресцентного стереомикроскопа Leica, проводился отбор эмбрионов, содержащих инъецированный материал.

Для минимизации неспецифичности полученных результатов, учитывая специфику паттерна естественной активности Nodal/Activin сигнального каскада, при количественной оценке его активации были лизированы не целые эмбрионы, а эксплантаты анимальной зоны (презумптивной

эктодермы), которые были предварительно получены микрохирургическими методами на стадии 9.

Отобранные эксплантаты были лизированы на льду в лизис буфере Cell Culture Lysis Reagen (Promega).

Для каждой измерительной точки отбор эмбрионов проводился не менее чем в трех повторностях по 10 эмбрионов (эксплантантов).

Измерение люциферазной активности в полученном лизате экспрессирующей системы проводилось с использованием коммерчески доступной системы Luciferase Assay system (Promega). Для измерения использовались 5-8 мкл лизата и 25 мкл готового стабилизированного субстрата (люциферина). Активность измеряли при помощи люциметра TD-20/20 Luminometer (Turner Designs).

Для каждого образца измерение проводилось не менее трех раз и в дальнейших расчетах использовалось среднее арифметическое полученных значений.

При оценке относительного уровня активности сигнальных каскадов, фоновый уровень их активности в отсутствие мРНК активаторов/ингибиторов принимался за 1.

Полученные результаты представлены на Рисунке 51.

Согласно полученным данным, белки Noggin1 и Noggin2 проявляют способность ингибировать эндогенный BMP сигнальный каскад (Рисунок 51, А), ингибировать активность Nodal/Activin сигнального каскада при его активации белками Activin и Xnr2 (Рисунок 51, Б, В, Д, Е), а также ингибировать Wnt/ β -catenin сигнальный каскад при его активации белком Wnt8 (Рисунок 51 Г, Ж).

Важно отметить, что полноразмерные белки Noggin, а также их делетанты без клип-домена оказались неспособны ингибировать исследуемые сигнальные каскады в случае их внутриклеточной активации мРНК Smad2 и β -катенином (Рисунок 51, Б, В, Г). Это подтверждает внеклеточный характер активности белков Noggin.

ActivinB более чем в 10 раз менее эффективно, чем follistatin, а его способность ингибировать сигнал Xnr2 и Wnt8 в 3 раза меньше, чем у cerberus (Рисунок X, Д - Ж). В то же время Noggin1 был столь же эффективен, как Noggin2, в подавлении Wnt8, но с примерно в четыре раза слабее чем Noggin2 ингибировал activinB и Xnr2.

2.1.2.12. Активность *Noggin2* в передней части нервной пластинки важна для развития переднего мозга

Чтобы установить вовлеченность *Noggin1* и *Noggin2* в развитие переднего мозга, в зачатке которого эти гены экспрессируются на стадии нейрулы, была осуществлена блокада трансляции их эндогенных мРНК при помощи специфических антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов (МО). Инъекция МО проводилась в дорзальные бластомеры развивающихся эмбрионов шпорцевой лягушки на стадии 4-8-бластомеров. Подавление трансляции мРНК *noggin1* не вызывало заметных нарушений развития, что соответствует полученным ранее литературным данным (Kuroda et al., 2004). Такой результат косвенно подтверждает сделанное ранее заключение о том, что эндогенный *Noggin1*, транслируемый с мРНК дикого типа, присутствует в эмбрионах в низких концентрациях, которые недостаточны для эффективной модуляции TGF- β или Wnt лигандов за исключением BMP (см. выше).

В то же время, головастики, инъецированные в будущую головную область МО к *noggin2*, продемонстрировали уменьшение размеров конечного мозга, глаз и носовых плакод (90%, n = 116) (Рисунок 52, А, Б). Также у этих эмбрионов наблюдалась сниженная экспрессия генов-маркеров переднеголовных (*foxg1*) и глазных (*raxb*) структур (Рисунок 52, Г - И).

При этом, в туловищной области эмбрионы, инъецированные МО к *noggin2*, не демонстрировали выраженных отклонений. Также никаких отклонений не наблюдалось у эмбрионов, инъецированных контрольными МО к *noggin2*, которые содержали 5 замен по отношению к мРНК *noggin2*.

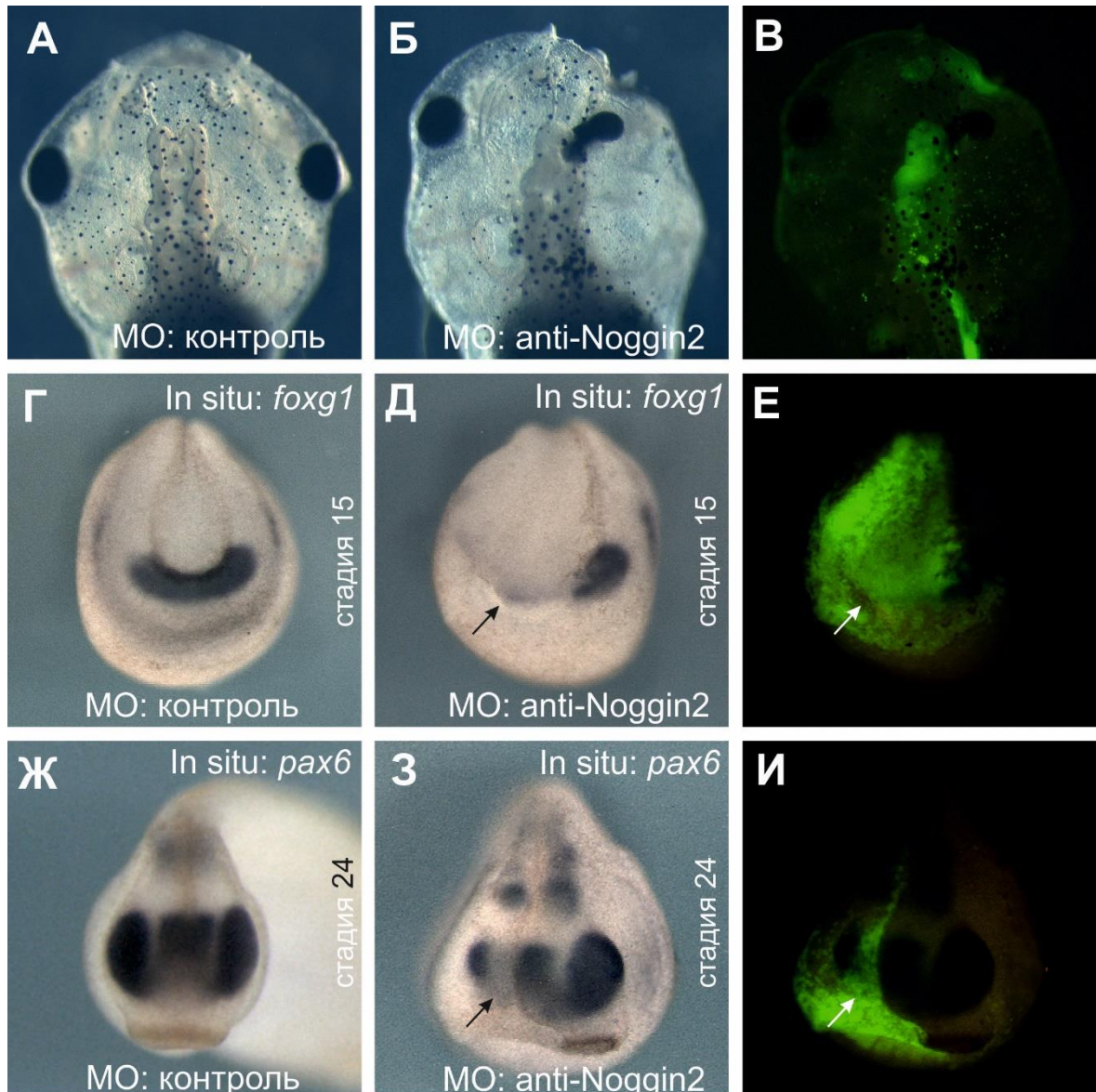


Рисунок 52. Нарушения развития переднеголовных структур и экспрессии переднеголовных маркеров при подавлении трансляции эндогенной мРНК *noggin2* при помощи МО.

2.1.2.13. Ингибирование *ActivinB* белком *Noggin2* необходимо для развития переднего мозга

Роль *Noggin2* в нормальном развитии переднего мозга может быть связана с его способностью ингибировать активность Smad2-зависимого Nodal/*Activin* сигнального каскада. Однако гены TGF- β факторов, такие как *Xnr*, не экспрессируются на стадии нейрулы в области переднего края нервной пластинки, где наблюдается экспрессия гена *noggin2* (Weeks and Melton, 1987; Jones et al., 1995; Kinoshita et al., 1995; Joseph and Melton, 1997;

Sun et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Onuma et al., 2006). Единственным фактором, участвующим в функционировании Smad2-зависимого TGF- β каскада, который экспрессируется в нужное время в нужном месте является ActivinB (Dohrmann et al., 1993).

Чтобы установить, выступает ли *Noggin2* в нормальном развитии зачатка переднего мозга в качестве антагониста ActivinB, были сопоставлены паттерны экспрессии генов *activinB* и *noggin2* в нормальном развитии эмбрионов *X. laevis* (Рисунок 53 А - 3). Для этого перед проведением гибридизации *in situ* целые эмбрионы *X. laevis* на стадии нейрулы были микрохирургически разделены на половины и одну половину каждого эмбриона гибридизовали с зондом к *activinB*, а другую — с зондом к *noggin2*. Было выявлено, что до начала нейруляции *activinB* экспрессируется на очень низком уровне, а на стадии нейрулы уровень его экспрессии начинает постепенно увеличиваться параллельно с экспрессией *noggin2*. Важно отметить, что эти два гена экспрессируются в этот период в комплементарных паттернах (Рисунок 53, Б-Ж). Экспрессия *noggin2* обнаруживается в клетках внутреннего слоя переднего нервного валика, в области, соответствующей презумптивному конечному мозгу, которая отмечена экспрессией *foxg1*, а *activinB* экспрессируется позади *noggin2* (Рисунок 53, 3). После окончания нейруляции экспрессия *noggin2* продолжается в зачатке конечного мозга, расположенном на дорсальной и латеральной сторонах передней части закрытой нервной трубки, тогда как *activinB* экспрессируется вне этой области в презумптивном заднем мозге, вентральной части презумптивного промежуточного мозга и зачатках глаз (Рисунок 53 Е, Ж). Такая взаимоисключающая экспрессия *noggin2* и *activinB* в презумптивной головной области эмбриона согласуется с возможной ингибирующей ролью *Noggin2* в передаче сигналов ActivinB.

Чтобы оценить, является ли подавление экспрессии *activinB* на переднем крае нервной пластинки существенной предпосылкой для нормального развития конечного мозга, зона экспрессии *activinB* была экспериментально

расширена в переднем направлении при помощи трансгенной технологии. Для этого был использован двухкассетный вектор, содержащий кДНК *activinB* под контролем промотора гомеобоксного гена *xanf1* и кДНК *Katushka-RFP*, управляемую промотором мышечного актина (Martynova et al., 2004; Shcherbo et al., 2007) (Рисунок 53 И). В данной конструкции промотор гена *xanf1*, обеспечивает экспериментальную экспрессию *activinB* в области передней части нервной пластинки. Поскольку по времени промотор *xanf1* в норме активируется только в конце гастрюляции, эффекты, наблюдаемые в таком эксперименте, обусловлены эктопической экспрессией *activinB* на стадиях после гастрюлы.

В результате у всех трансгенных эмбрионов, эктопически экспрессирующих *activinB* на переднем крае нервной пластинки, наблюдалась редукция переднего мозга, включая глаза (n=21). У контрольных эмбрионов, содержащих однокассетный вектор *CardAct-mKate2* такой редукции не наблюдалось (n=18) (Рисунок 53 К - М).

Аналогичные аномалии развития переднеголового отдела были получены при инъекции мРНК *activinB* в пару дорсальных бластомеров *X. laevis* в 16-32 клеточных эмбрионах в концентрации 0,1 пг/бластомер (более высокие концентрации мРНК *activinB* вызывают массивное образование бутылочных клеток в анимальном полушарии и блокаде нормального развития) (Рисунок 53 Н). В то же время частичное восстановление переднего мозга наблюдалось, когда мРНК *activinB* инъецировали совместно с 3 пг/бластомер *noggin2*, но не с мРНК *noggin1* (с высоким уровнем трансляции) (Рисунок 53 О, П).

Эти данные, в дополнение к демонстрации важности ингибирования передачи сигналов *ActivinB* в развитии переднего мозга, подтверждают важность роли *Noggin2* в подавлении сигнала *ActivinB* в клетках будущего переднего мозга.

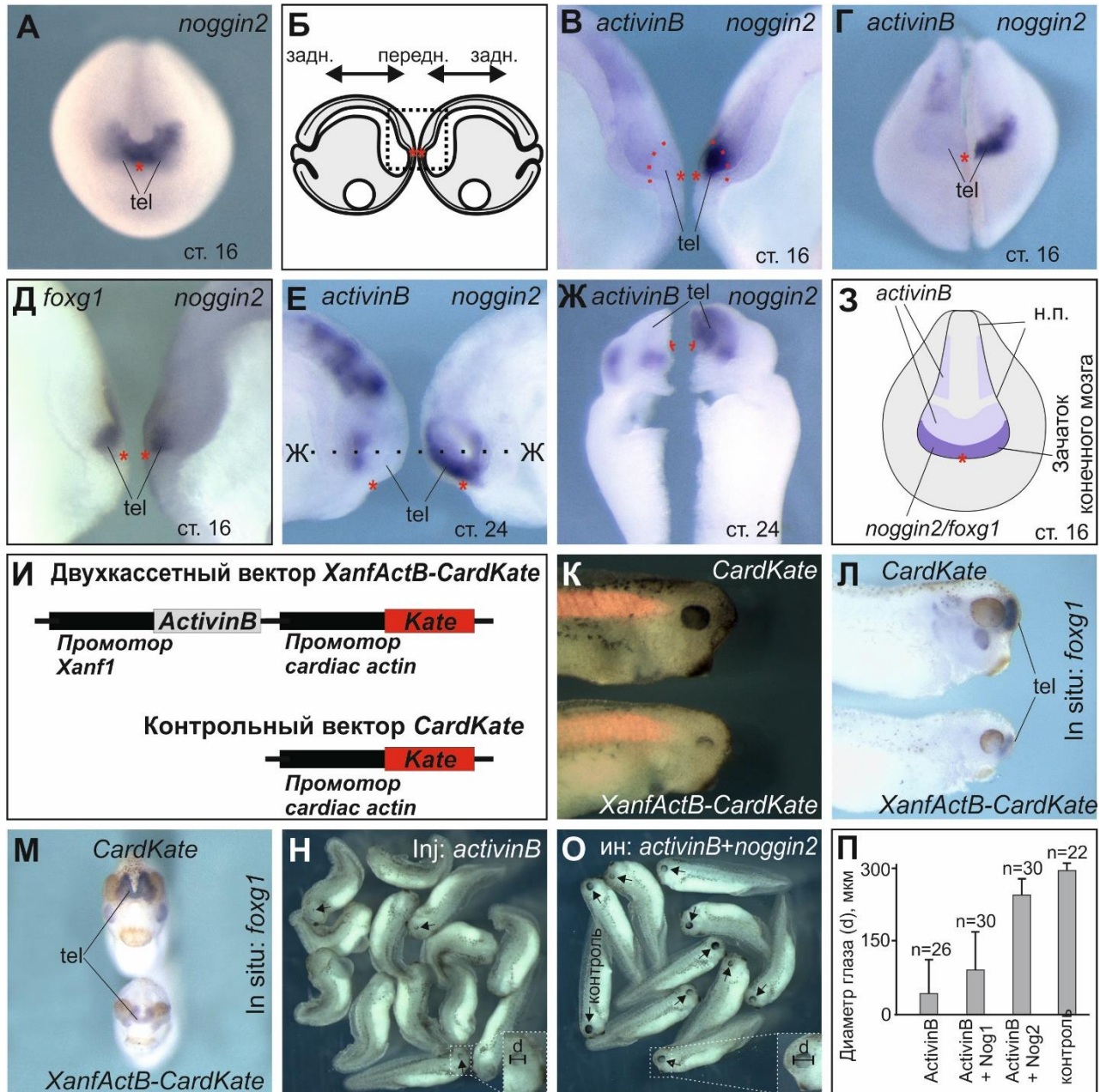


Рисунок 53. (по Bayramov et al., 2011 с изменениями). Подавление экспрессии гена *activinB* в передней части нервной пластинки важно для нормального развития зачатка переднего мозга.

А - На стадии средней нейрулы *noggin2* экспрессируется на переднем крае нервной пластинки.

Б - Схема зон гибридизации *in situ*, приведенных на В, Д, Е. Передняя граница нервной пластинки отмечена красной звездочкой.

В, Г – Сравнение паттернов экспрессии *activinB* и *noggin2* в половинках эмбрионов на стадии средней нейрулы.

Д - Сравнение паттернов экспрессии переднеголового маркера *foxg1* и *noggin2* в области переднего нервного валика.

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

З - Схема экспрессии *activinB*, *foxf1* и *noggin2* на стадии средней нейрулы, вид спереди.

И – Схема двухкассетного вектора для обеспечения экспрессии *activinB* в клетках зачатка переднего мозга под контролем промотора гена *Xanf1*

К – М - У трансгенных эмбрионов с конструкцией *XanfActB-CardKate*, наблюдается редукция глаз и конечного мозга, подтверждаемая уменьшением зоны экспрессии *foxf1*. В контрольных трансгенных эмбрионах с конструкцией *CardKate* такой редукции не наблюдается.

Н - Редукция глаз у эмбрионов, инъецированных мРНК *activinB* (0.5 пг/бм).

О - Восстановление глаз при добавлении мРНК *noggin2* к инъецируемой мРНК *activinB*.

П - Анализ размеров глаз инъецированных эмбрионов.

tel – зачаток конечного мозга (telencephalon); н.п. – нервная пластинка.

2.1.2.14. *Noggin4* участвует в развитии головных структур, но не индуцирует формирование дополнительных осей

Ярким фенотипическим индикатором способности белков *Noggin1* и *Noggin2* ингибировать активность TGF- β и Wnt сигнальных каскадов является их способность индуцировать формирование вторичных осей тела инъекции в вентральную область эмбрионов шпорцевой лягушки на стадии 8 бластомеров. В то же время было показано, что инъекции мРНК *noggin4* в подобных экспериментах не приводят к индукции дополнительных осей, что отличает *Noggin4* от его гомологов (Рисунок 54 Б, В).

Подавление трансляции эндогенной мРНК *noggin4* морфолиновыми олигонуклеотидами (МО) приводит к нарушениям формирования головных структур эмбрионов, аномалии развития глазных структур и переднего мозга, что указывает на вовлеченность *Noggin4* в развитие этих структур (Рисунок 54 А; Рисунок 55). На Рисунке 54 А показано, что повышение уровня экспрессии *noggin4* приводит к увеличению среднего размера глаз у эмбрионов, в то время как подавление его экспрессии – к уменьшению этого показателя.

Специфичность эффектов МО была подтверждена экспериментами по спасению, в которых к инъецируемым МО *noggin4* добавлялась мРНК *noggin4*, лишенная целевого сайта для МО (Рисунок 55). При добавлении

мРНК *noggin4* наблюдалось восстановление формирования глазных структур, практически полностью подавленное при инъекциях МО *noggin4* (Рисунок 55, Б, В).

Как уже рассматривалось выше, согласно данным литературы, в формировании переднеголовных структур позвоночных принимают участие несколько внутриклеточных сигнальных каскадов – Smad1 и Smad2 зависимые TGF-beta (соответственно BMP и Nodal/Activin) каскады, а также «канонический» Wnt/beta catenin каскад. Было показано участие белков *Noggin1* и *Noggin2* в модуляции активности этих каскадов (см. предыдущие разделы).

Методом гибридизации *in situ* было показано, что повышение уровня экспрессии *noggin4* приводит к расширению зоны экспрессии таких генов-маркеров будущих переднеголовных структур как *foxg1* и *rx* (Рисунок 56 Б, Д). Подавление экспрессии *noggin4* антисмысловыми МО, в свою очередь, выражается в существенном снижении уровня экспрессии этих генов-маркеров (Рисунок 56 В, Е).

Было проведено сравнение эффектов, вызываемых инъекциями мРНК *noggin4* отдельно и в сочетании с мРНК *noggin1* и *noggin2* в эксплантатах анимальной эктодермы и вентральной маргинальной зоны (Рисунок 48 В). В отличие от эффектов мРНК *noggin1* и *noggin2*, при инъекциях мРНК *noggin4* не наблюдалось активации нейральных или мезодермальных генетических маркеров. При этом, мРНК *noggin4*, будучи инъекционной в смеси с *noggin1* и *noggin2*, оказался не способен подавить нейрализирующую активность этих факторов.

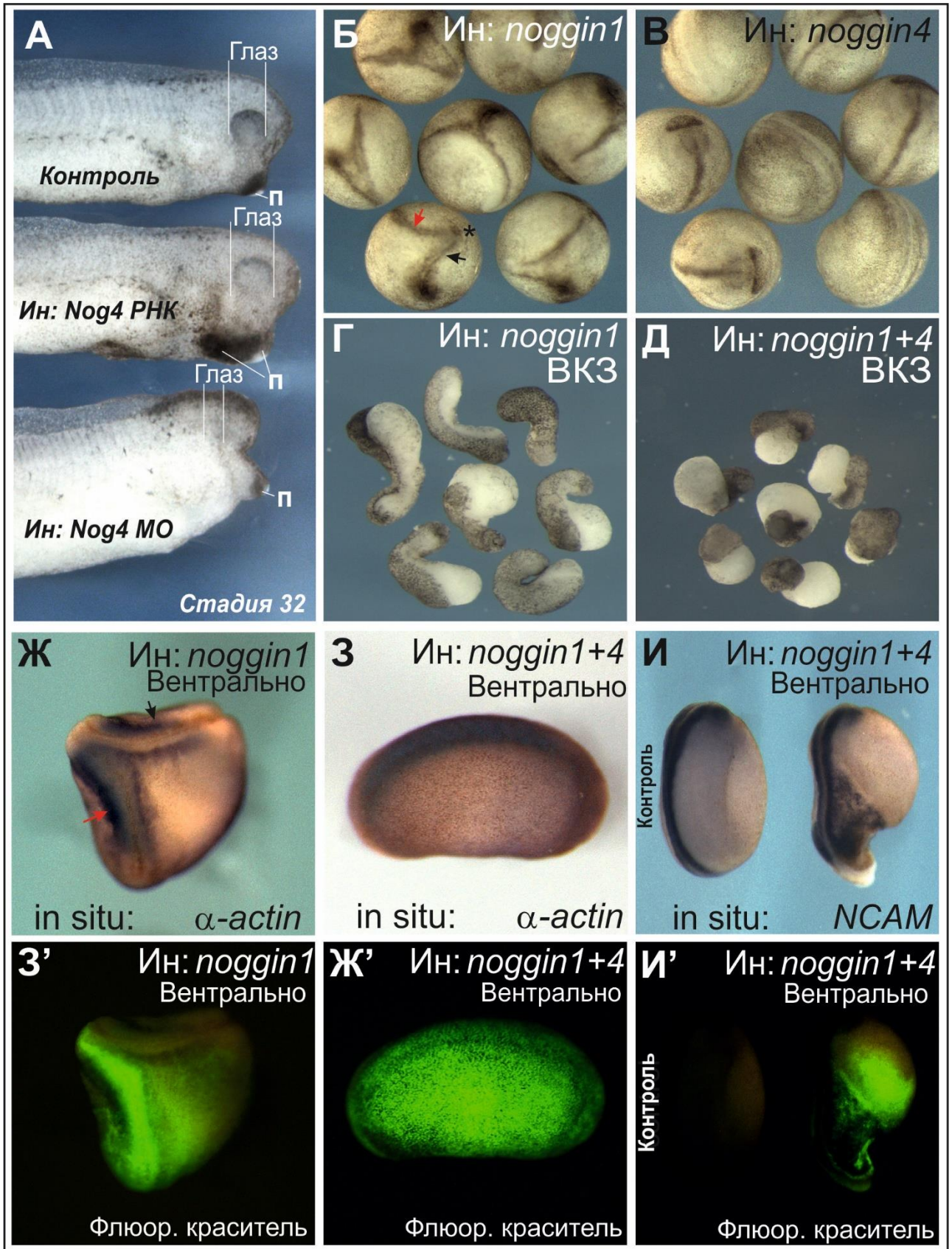


Рисунок 54. Фенотипические эффекты экспериментальной модуляции экспрессии генов *noggin* у эмбрионов *X. laevis*.

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

Б – индукция вторичных осей тела у эмбрионов при инъекциях мРНК *noggin1*

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

Г, Д – мРНК *noggin4* подавляет активность мРНК *noggin1* в эксплантатах вентральной маргинальной зоны (ventral marginal zone, vmz).

Ж, Ж' – Инъекции мРНК *noggin1* в вентральную область эмбрионf приводят к формированию дополнительной оси тела (красная стрелка) и дополнительной дифференцировке скелетной мускулатуры.

З, З' – При инъекции смеси мРНК *noggin1* и *noggin4* формирование дополнительных осей и дополнительная дифференцировка скелетной мускулатуры отсутствует.

И, И' – При инъекции в вентральную область эмбрионf смеси мРНК *noggin1* и *noggin4* наблюдается расширение области экспрессии паннейрального маркера NCAM.

Ж', З', И' – распределение инъецированного флюоресцентного красителя (FLD) позволяет детектировать область эмбрионf, содержащую инъецированный материал.

В то же время, в данном эксперименте наблюдалось подавление *noggin4* способности *noggin1* индуцировать развитие мезодермы, что выражалось в неспособности эксплантатов вентральной маргинальной зоны вытягиваться, а также в отсутствии экспрессии мезодермального маркера (Рисунок 54 Г, Д).

В совокупности, эти результаты говорят о способности *noggin4* избирательно подавлять только дорсализующую активность *noggin1*.

При инъекции в эмбрионы в смеси с мРНК *noggin1*, мРНК *noggin4*, обнаружила способность подавлять индукцию вторичных осей тела, характерную для *noggin1* (Рисунок 54 Ж, З). При инъекции в вентральную область эмбрионf смеси мРНК *noggin1* и *noggin4* наблюдается расширение области экспрессии паннейрального маркера NCAM (Рисунок 54 И, И').

2.1.2.15. Исследование роли *Noggin4* в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов

В рамках анализа функциональной активности *Noggin4* была исследована его способность влиять на активность внутриклеточных сигнальных каскадов. Эти эксперименты проводились аналогично

экспериментам с белками Noggin1 и Noggin2 с применением люциферазных репортерных конструкций, а также методом количественной ОТ-ПЦР.

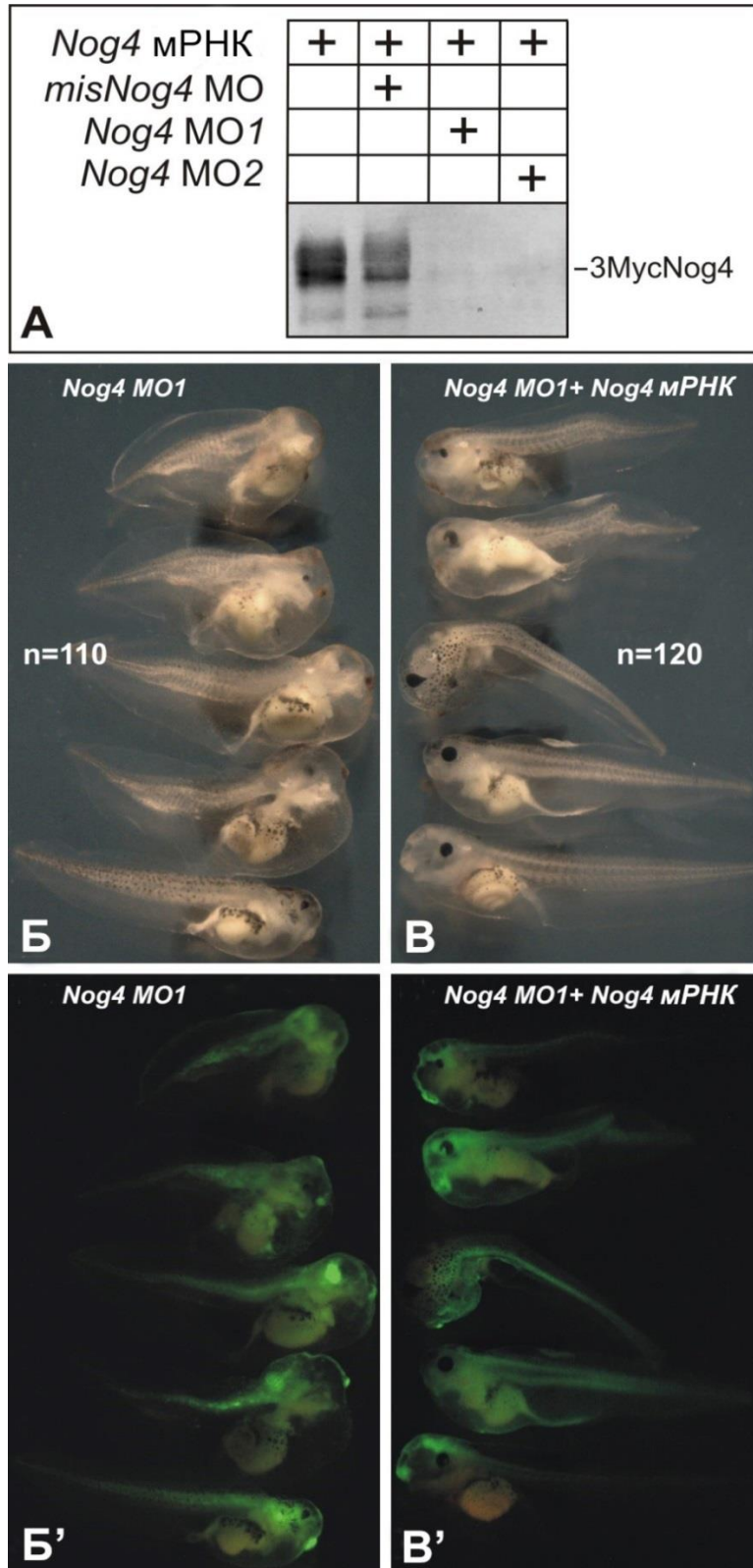


Рисунок 55. А – оценка эффективности МО по уровню трансляции белка *Noggin4* с мРНК *noggin4-мус*. Б-В' – эксперименты по «спасению». При добавлении мРНК *noggin4* к инъекцированным МО *noggin4* наблюдается частичное восстановление формирования глазных структур.

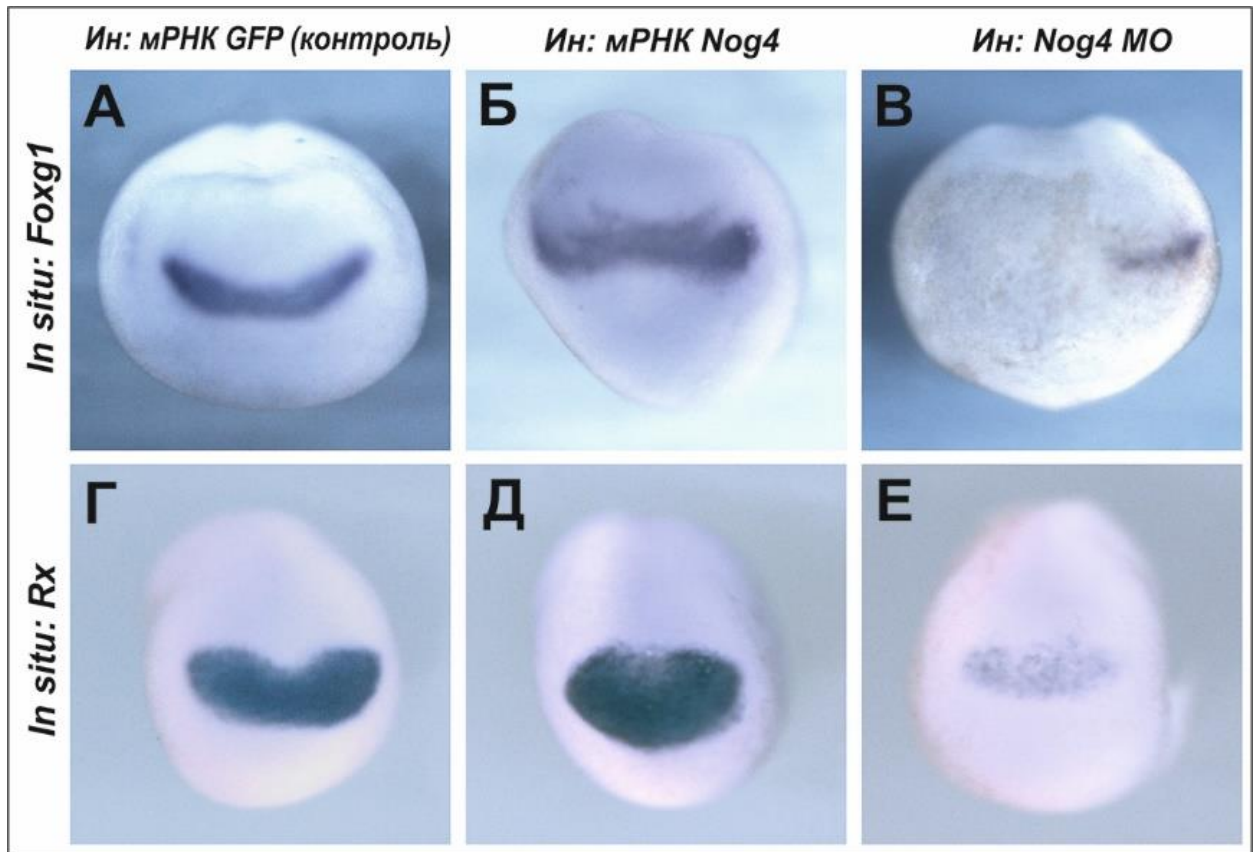


Рисунок 56. Экспериментальные изменения уровня экспрессии *noggin4* приводит к нарушениям экспрессии генов-маркеров *Foxg1* и *Rx* на ранних стадиях развития эмбрионов *X. laevis*.

Для оценки влияния *Noggin4* на BMP и Nodal/Activin каскады в люциферазных тестах применялись следующие репортерные конструкции: TCFm-Luc (для BMP каскада), GL3-ARE-Luc (для Nodal/Activin каскада), экспрессионный вектор pCMV- β -GAL (в качестве неспецифической репортерной плазмиды для нормализации результатов), а также мРНК *Noggin4*, *Activin*, *Xnr2*.

Исследование способности *Noggin4* модулировать активность Nodal/Activin сигнального каскада исследовали на фоне экспериментальной активации этого каскада, которую проводили путем инъекций мРНК *activinB* или мРНК *xnr2*. В случае BMP каскада, его искусственную активацию не проводили, поскольку уровень чувствительности репортера и уровень естественной активности этого каскада оказались достаточными для данного исследования.

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

В качестве экспериментального объекта использовались эксплантаты наивной эктодермы развивающихся эмбрионов шпорцевой лягушки. Инъекции мРНК и плазмидных конструкций проводились на стадии 2-4 бластомеров. Вырезание эксплантаты наивной эктодермы осуществлялось на 9 стадии развития (по Neuwkoop and Faber, 1967).

В проведенных люциферазных тестах *Noggin4* не обнаружил способности ингибировать BMP сигнальный каскад (Рисунок 57 А), что соответствует литературным данным, согласно которым для связывания молекул BMP белком *Noggin* (на примере *Noggin1*) важны 4 аминокислотных остатка, которые у белка *Noggin4* отличаются от таковых у *Noggin1* (Рисунок 58 А, Chen et al., 2004).

Также *Noggin4* не обнаружил способности влиять на активность *Nodal/Activin* сигнального каскада как в интактных эксплантатах анимальной эктодермы и целых эмбрионf], так и на фоне активации этого каскада в эксплантатах при помощи *ActivinB* и *Xnr2* (Рисунок 57 Б, В).

В то же время, в люциферазных тестах *Noggin4* продемонстрировал способность подавлять активность канонического *Wnt/b-catenin* каскада (Рисунок 57 Г).

Поскольку, с функциональной точки зрения, подавление *Wnt/b-catenin* каскада на фоне его экспериментальной активации говорит лишь о способности *Noggin4* выступать в роли ингибитора этого каскада, для подтверждения того, что эта способность действительно реализуется в ходе нормального развития при закладке осевых структур, нами был проведен анализ влияния изменений уровня экспрессии *Noggin4* на активность *Wnt/b-catenin* сигнального каскада в эксплантатах дорзальной губы бластопора - области естественной активности *Wnt* каскада в раннем развитии. Этот анализ был проведен методом количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 57 Д).

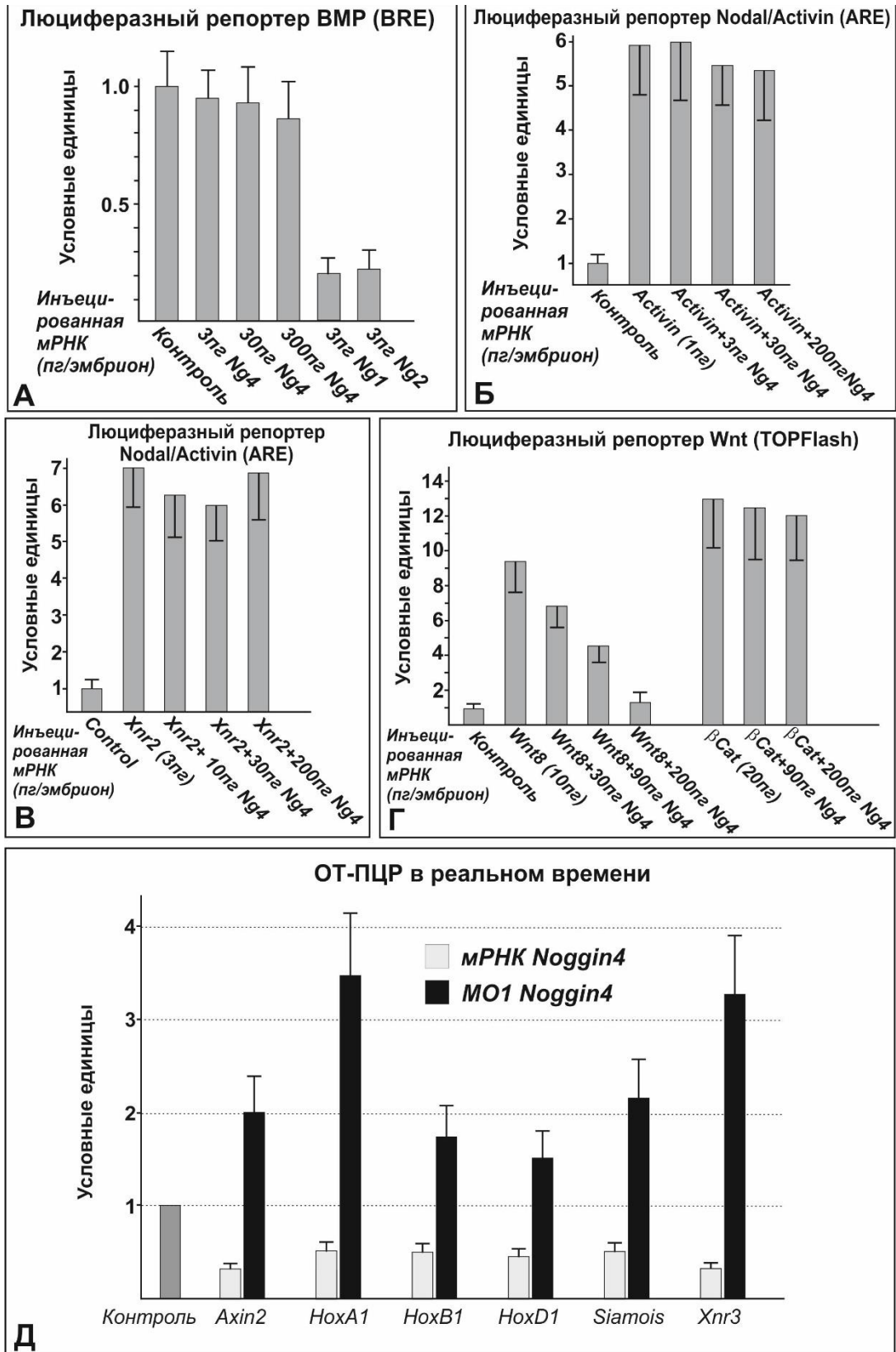


Рисунок 57. А – *Noggin4*, в отличие от *Noggin1* и *Noggin*, не обладает способностью ингибировать сигнальный каскад BMP в люциферазных тестах. Б - *Noggin4* не способен ингибировать сигнальный каскад Nodal/Activin при его активации с помощью мРНК *Activin* или *Xnr2*. Г - в люциферазных тестах *Noggin4* ингибирует эндогенную активность Wnt/ β -catenin каскада в целых эмбрионах и эксплантатах анимальной эктодермы (слева). При

экспериментальной активации Wnt/ β -catenin каскада с помощью мРНК *wnt8*, *Noggin4* также способен ингибировать его активность (справа). Д - Результаты ОТ-ПЦР генов, транскрипционный статус которых зависит от активации Wnt-каскада.

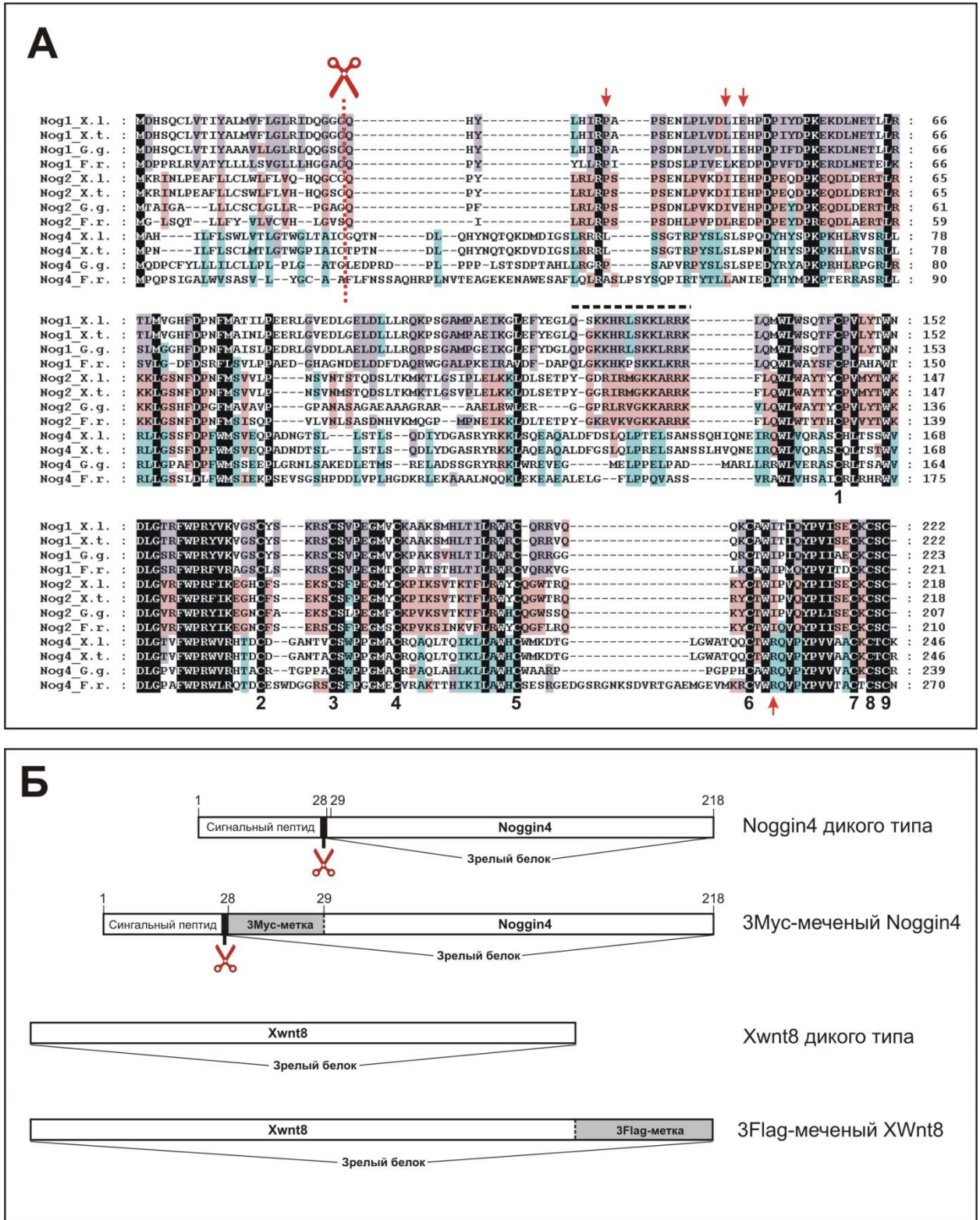


Рисунок 58. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков *Noggin* позвоночных и схемы экспрессионных конструкций, использованных в работе.

А – Сравнение аминокислотных последовательностей белков семейства *Noggin* у представителей разных классов позвоночных. Ножницами показан сайт отщепления сигнального пептида. Стрелками показаны аминокислоты играющие, согласно Chen et al., 2004, принципиальную роль в связывании молекул BMP.

Б – ДНК конструкции, использованные в работе.

Было показано, что подавление трансляции эндогенной мРНК *noggin4* при помощи MO1 приводит к повышению уровня экспрессии генов *Axin*, *HoxA1*, *HoxB1*, *HoxD1*, *Xnr3* и *Siamois* - описанных в литературе мишеней канонического Wnt каскада. Инъекции синтетической мРНК *noggin4*, напротив, снижают уровень экспрессии этих генов мишеней. Эти результаты подтверждают, что *Noggin4* действительно выступает в роли ингибитора канонического Wnt каскада на ранних стадиях развития (гаструла) в дорсальной губе бластопора. Поскольку в дальнейшем клетки дорсальной губы бластопора участвуют в формировании осевых структур, это может объяснять фенотипические аномалии, наблюдаемые у головастиков при морфолиновой блокаде трансляции эндогенной мРНК *noggin4*.

Для исследования механизма участия *Noggin4* в регуляции активности сигнальных каскадов было проведено изучение способности *Noggin4* связывать белки-лиганды в норме активирующие эти каскады. Данное исследование было проведено методом ко-иммунопреципитации.

В экспериментах использовалась рекомбинантная конструкция, кодирующая белок *Noggin4* меченый Мус полипептидом. Поскольку секретлируемые белки *Noggin* синтезируются в эукариотических клетках в форме пробелка и в дальнейшем подвергаются процессингу, в ходе которого происходит отщепление сигнальной последовательности на N-конце молекулы, Мус-метку вводили на N-конец будущего зрелого белка (Рисунок 58 Б). Аналогичные конструкции были получены нами ранее для белков *Noggin1* и *Noggin2* и было показано, что меченые таким образом *Noggin* белки в целом сохраняют функциональные свойства (наблюдается снижение их активности на 10-15 процентов).

Проведенный методом ко-иммунопреципитации анализ способности Noggin4 связывать белки, регулирующие активность TGF-beta сигнальных каскадов, не выявил его способности связываться с белком BMP4 (Рисунок 59 А). Это свойство отличает Noggin4 от белка Noggin1. Для подтверждения этой особенности Noggin4 был проведен анализ его способности ингибировать фосфорилирование молекул Smad1 – внутриклеточного участника BMP сигнального каскада. Было показано, что в отличие от Noggin1 и Noggin2, Noggin4 не обладает способностью подавлять фосфорилирование Smad1, что согласуется с данными люциферазных тестов и ко-иммунопреципитации (Рисунок 59 Б).

В экспериментах по ко-иммунопреципитации белок Noggin4 не продемонстрировал способность связываться с белками ActivinB, Xnr2, Xnr4, в норме активирующими Nodal/Activin сигнальный каскад, что соответствует данным люциферазных тестов (Рисунок 60). В то же время Noggin4 продемонстрировал способность связывать белок Wnt8, в норме активирующий канонический Wnt/ β -catenin сигнальный каскад.

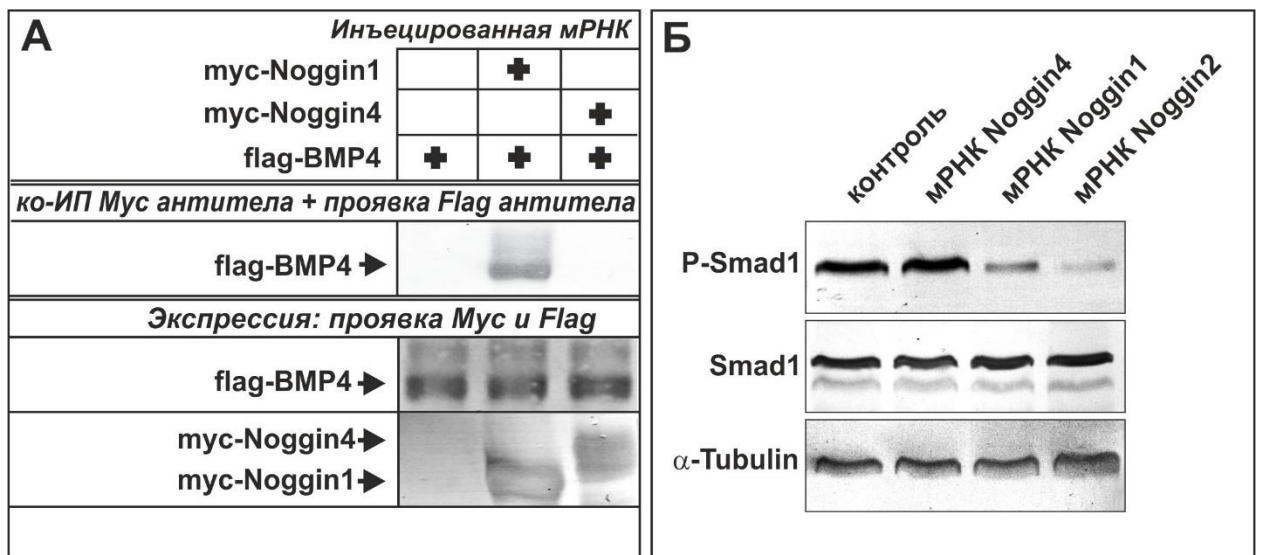


Рисунок 59. Белок Noggin4 не способен связывать белок BMP4 и ингибировать фосфорилирование молекул Smad1.

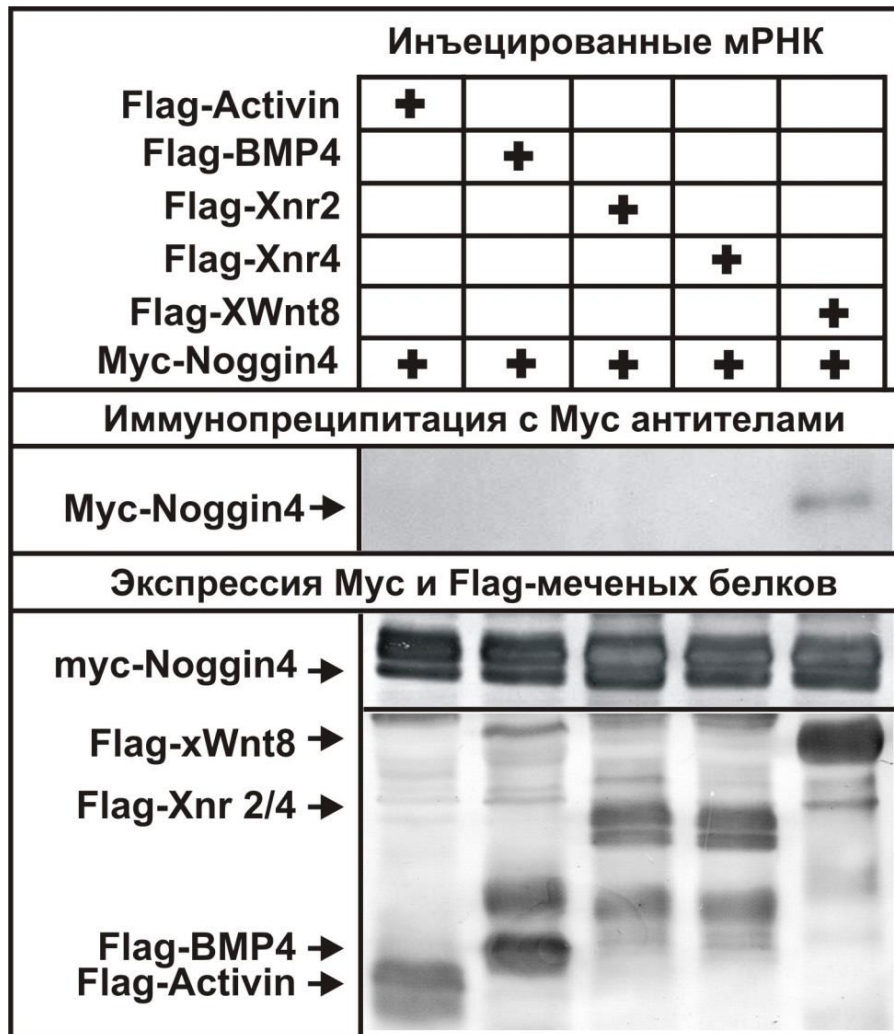


Рисунок 60. Белок Noggin4 способен связывать белок Wnt8 и не способен связывать белки Activin, BMP4, Xnr2, Xnr4.

Полученный результат ко-иммунопреципитации соответствует данным люциферазных тестов об отсутствии влияния Noggin4 на активность Nodal/Activin сигнальных каскадов и его способность подавлять активность Wnt сигнального каскада.

Для подтверждения специфичности наблюдаемого связывания Noggin4 с Wnt8 были проведены эксперименты по конкурентному вытеснению Noggin4 из комплекса Noggin4+Wnt8 путем добавления серии концентраций рецептора Frizzled8 в норме связывающего Wnt8 при нормальном функционировании Wnt сигнального каскада. Было показано, что с увеличением концентрации добавляемого Frizzled8 связывание Noggin4 с Wnt8 снижается (Рисунок 61).

	Инъецированная мРНК				
		+	+	+	+
<i>Мус-Noggin 50 нг</i>		+	+	+	+
<i>Flag-Wnt8 50 нг</i>	+	+	+	+	+
<i>Frizzled8 50 нг</i>			+		
<i>Frizzled8 100 нг</i>				+	
<i>Frizzled8 300 нг</i>					+
<i>EGFP 350 нг</i>	+				
<i>EGFP 300 нг</i>		+			
<i>EGFP 250 нг</i>			+		
<i>EGFP 200 нг</i>				+	

Ко-ИП с Мус антителами + проявка Flag антителами	
Flag-Wnt8 →	
Экспрессия Мус и Flag меченых белков	
Мус-Noggin4 →	
Flag-Wnt8 →	

Рисунок 61. Добавление возрастающих концентраций рецептора Wnt Frizzled8 конкурентно ослабляет связывание Noggin4 с Wnt8.

2.1.2.16. Подтверждение способности белка *Noggin4* связывать *Wnt8* методом ко-иммунопреципитации белков, выделенных из внеклеточной фракции эмбрионов

Для дополнительного подтверждения способности *Noggin4* связывать молекулы *Wnt8* была проведена ко-иммунопреципитация белков, выделенных из внеклеточной фракции эмбрионов *X. laevis*. Достоверность результатов, полученных в такой ко-иммунопреципитации выше, чем в случае преципитации с лизатами эмбрионов, поскольку:

1) в белке, тотально выделяемом из лизата, кроме зрелой формы содержится (и может составлять значительную долю) фракция незрелого белка, свойства которой могут существенно отличаться от свойств зрелой формы.

2) при лизисе эмбрионов используются высокие концентрации детергентов, что также может влиять на конформацию и функциональные свойства исследованных белков.

Наработка белков, как и в случае эксперимента с лизатами, проводится в эмбрионах шпорцевой лягушки, инъецированных мРНК исследуемых белков. В то же время, подобные эксперименты технически существенно сложнее, поскольку для получения достаточных количеств зрелого белка требуется диссоциировать на клетки в мягких условиях большое количество эмбрионов с предварительно снятыми оболочками. После снятия оболочек эмбрионы культивируются в маленьком объеме (10 мкл на эмбрион) в бескальциевой среде, синтезируя белок непосредственно в среде. После 2х часовой инкубации среда отбирается и используется для преципитации. Такие условия, максимально приближенные к естественным, позволяют существенно повысить специфичность связывания и достоверность получаемых результатов.

В проведенных по описанной методике экспериментах была подтверждена способность *Noggin4* связывать белок *Wnt8* (Рисунок 62).

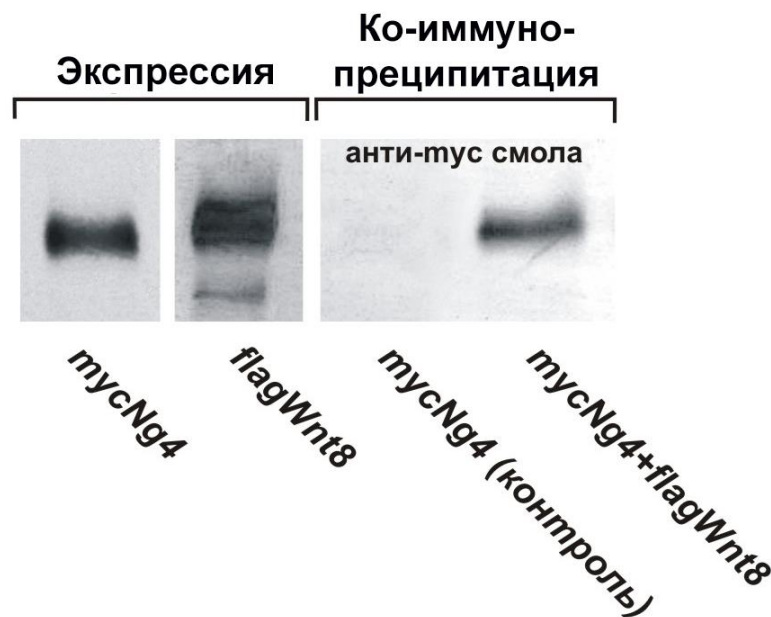


Рисунок 62. Белок *Noggin4* связывает *Wnt8* при ко-иммунопреципитации белков, выделенных из внеклеточной фракции эмбриона.

2.1.2.17. Анализ связывания белков *Noggin4* с *Wnt8* методом поверхностного плазмонного резонанса

В дополнение к методу ко-иммунопреципитации, способность белка *Noggin4* связывать белок *Wnt8* была подтверждена методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Для получения количества белка *Noggin4*, достаточного для проведения ППР-анализа, *Noggin4* был очищен из среды, в которую секретировался клетками HEK293, предварительно трансформированными экспрессионной плазмидой 3Мус-His6-*Noggin4*. Рекомбинантный белок *Wnt8*, полученный в дрожжевой системе, был получен от производителя MyBioSource, Inc., США (кат. N: MBS1208564).

Для установления концентрационной зависимости связывания исследуемых белков в экспериментах использовались разные концентрации 6His-*Wnt8* (Рисунок 63). Равновесные константы диссоциации (K_d) были получены путем нелинейной аппроксимации кривых связывания методом наименьших квадратов к модели адсорбции Ленгмюра, описывающей стехиометрию связывания 1:1. В результате, среднее значение K_d белков *Noggin4* и *Wnt8* было установлено как 90 ± 30 нМ.

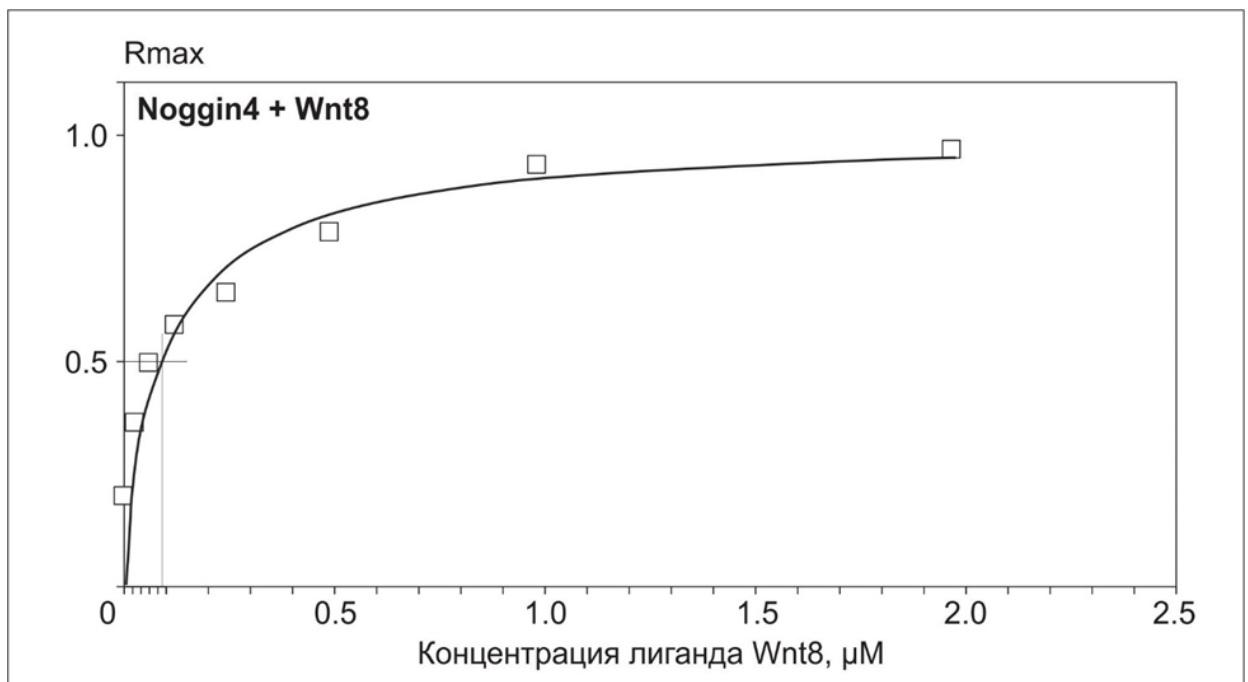


Рисунок 63. Кривая титрования, полученная методом ППР для взаимодействия иммобилизованных белков *Noggin4* и *Wnt8*.

2.1.2.18. *Noggin4* дополняет свойства трункированного BMP рецептора и в смеси с ним индуцирует полные вторичные оси у эмбрионов шпорцевой лягушки

В качестве подтверждения способности белка *Noggin4* подавлять активность канонического Wnt/ β -catenin сигнального каскада может выступать способность мРНК *noggin4* индуцировать полные вторичные оси у эмбрионов шпорцевой лягушки при ее инъекции в смеси с ингибитором BMP и Nodal/Activin каскадов - трункированным BMP рецептором (tBR). Согласно данным литературы, для индукции переднеголовных структур требуется одновременное подавление трех внутриклеточных сигнальных каскадов – BMP, Nodal/Activin и Wnt/ β -catenin (Watanabe et al., 2005). Трункированный BMP рецептор, не обладая способностью подавлять Wnt/ β -catenin каскад способен индуцировать формирование неполных осей тела, содержащих лишь туловищный отдел. мРНК *noggin4*, как было показано выше, не способна индуцировать формирование вторичных осей. При этом, в смеси с трункированным BMP рецептором *Noggin4* своей способностью ингибировать Wnt/ β -catenin каскад дополняет ингибиторные свойства трункированного BMP рецептора, что приводит к формированию полных вторичных осей, содержащих переднеголовые структуры (Рисунок 64).

В сумме полученные результаты демонстрируют, что *Noggin4* по своим функциональным свойствам отличается от других белков семейства *Noggin* – *Noggin1* и *Noggin2*.

Noggin4 не обладает способностью напрямую модулировать активность BMP и Nodal/Activin сигнальных каскадов, однако может выступать в качестве антагониста Wnt/ β -catenin сигнального каскада на ранних стадиях развития *X. laevis*.

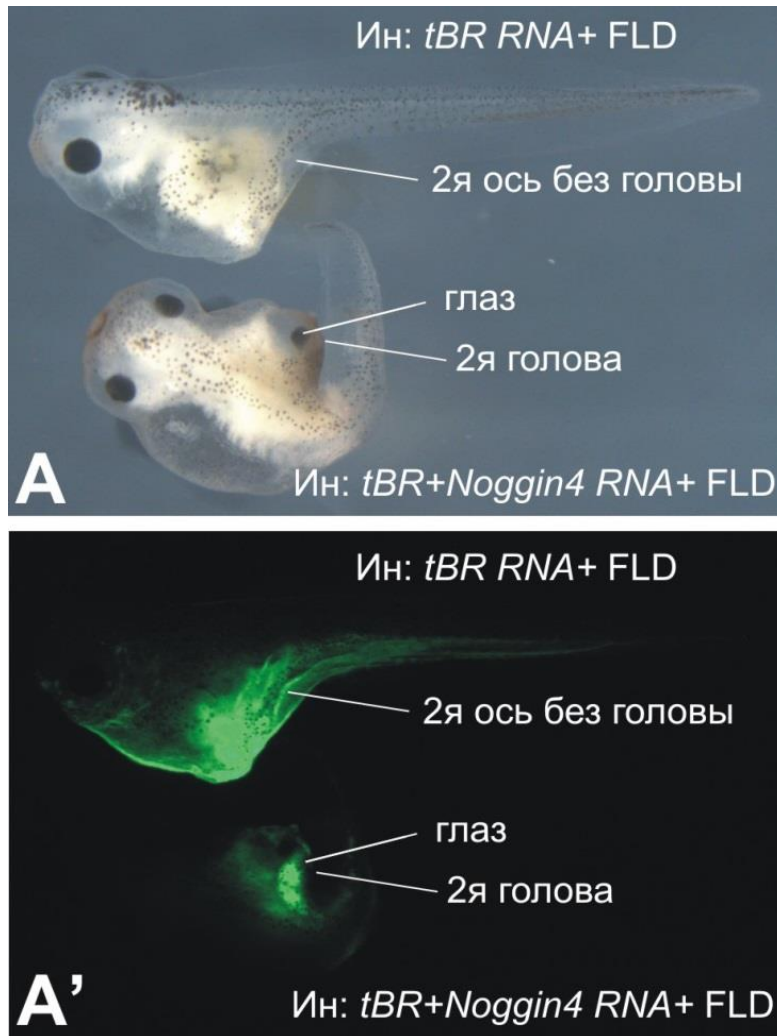


Рисунок 64. Способность *Noggin4* индуцировать формирование дополнительных осей тела, содержащих переднеголовые структуры (глаз) при инъекции в смеси с трюнктурированным рецептором *tBR*.

2.1.2.19. Исследование влияния уровня экспрессии гена *noggin4* на подвижность клеток в эксплантатах дорсальной маргинальной зоны эмбрионов

В проведенных экспериментах *Noggin4* продемонстрировал способность ингибировать вытяжение эксплантатов вентральной маргинальной зоны, индуцируемое *Noggin1* (Рисунок 54 Г, Д). При этом, согласно полученным данным люциферазных тестов и экспериментов по ко-иммунопреципитации, такое подавление клеточной подвижности белком *Noggin4* не может быть связано с его влиянием на BMP и Nodal/Activin сигнальные каскады (такое влияние не было обнаружено).

Для анализа воздействия *Noggin4* на вытяжение эксплантатов, было проведено исследование влияния экспериментальных изменений уровня экспрессии *Noggin4* на процессы конвергенции и растяжения в эксплантатах дорсальной маргинальной зоны эмбрионов. Модуляцию экспрессии *noggin4* осуществляли путем инъекций мРНК *noggin4* или МО к *noggin4*. Вытяжение эксплантатов анализировалось путем расчета отношения длины эксплантата к его ширине в области перехода эктодермы в инволюирующую мезодерму (соотношение длины к ширине - СДШ).

Было показано, что эксплантаты, инъецированные мРНК *noggin4*, не вытягивались, сохраняя округлую форму. Инъекция возрастающих концентраций МО приводила к уменьшению СДШ. Полученные результаты представлены в Таблице 1 и на Рисунке 65.

Полученные результаты показывают, что *Noggin4* является модулятором клеточных движений конвергенции и растяжения эксплантатов дорсальной маргинальной зоны эмбрионов.

Эксперимент	Количество эксплантатов (n)	СДШ
Контроль (не инъецированный)	18	3.83±0.97
Контроль (инъекция 100 пг мРНК GFP)	18	4.67±0.83
Инъекция 100 пг мРНК <i>Noggin4</i>	17	1.41±0.49
Контроль (инъекция 0.4 мМ контрольныхМО)	20	5.79±2.2
Инъекция 0.4 мМ анти-<i>Noggin4</i>-МО1	16	3.47±0.92
Инъекция 0.8 мМ анти-<i>Noggin4</i>-МО(1+2)	15	2.93±1.52

Таблица 1. Количественная оценка вытяжения келлеровских эксплантатов с помощью расчета СДШ.

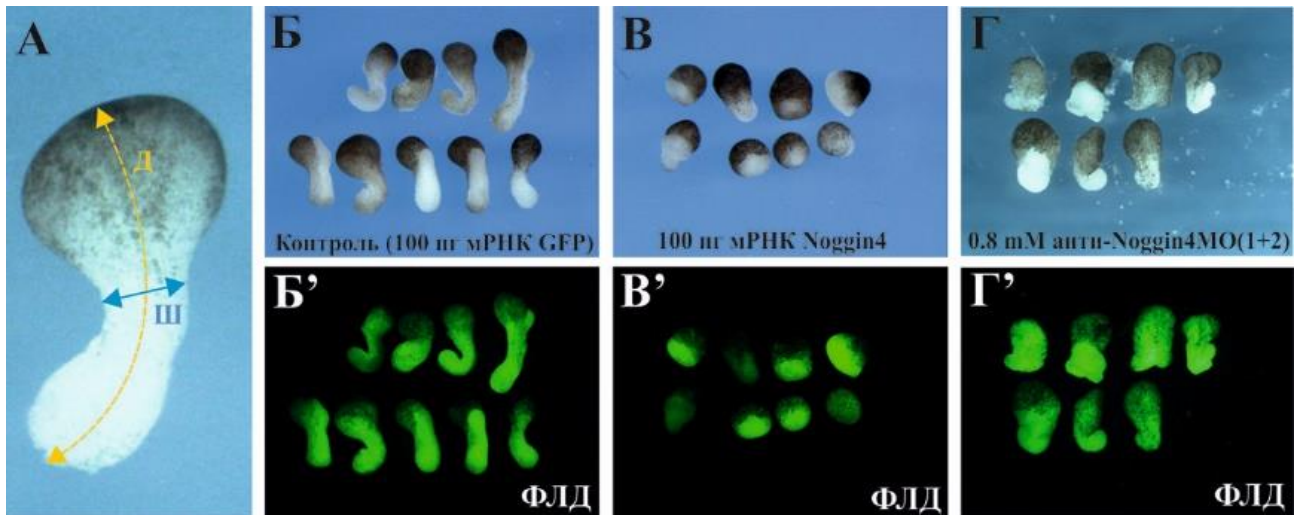


Рисунок 65. Исследование влияния экспрессии *Noggin4* на вытяжение келлеровских эксплантатов. (А) Оценка вытяжения эксплантатов, полученных из интактных эмбрионов. Остальные эксплантаты вырезались из эмбрионов, инъецированных: (Б) 100 пг мРНК GFP; (В) 100 пг мРНК *Noggin4*; (Г) 0.8 mM анти-*Noggin4*-МО (1+2).

2.1.2.20. Исследование влияния *Noggin4* на активность «неканонического» *Wnt/PCP* сигнального каскада

Согласно литературным данным, одним из ключевых сигнальных каскадах, влияющих на клеточную подвижность является «неканонический» *Wnt/PCP* (planar cell polarity) сигнальный каскад. В связи с этим, было исследовано влияние *Noggin4* на активность неканонического *Wnt* сигнального каскада.

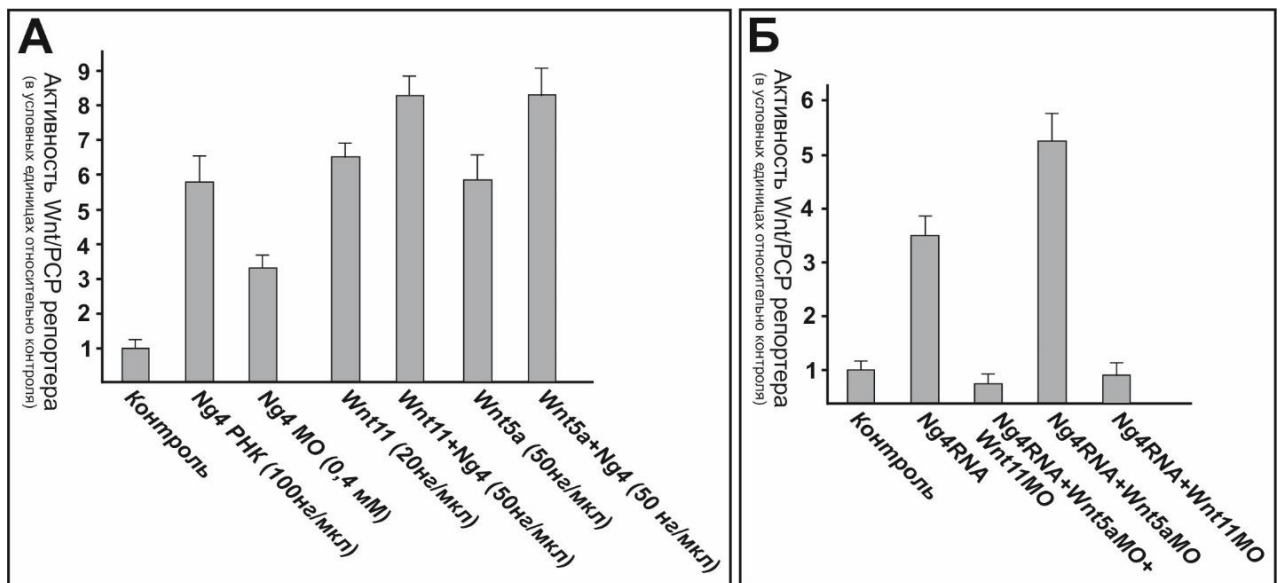
Было выявлено, что в люциферазном тесте как мРНК, так и МО *Noggin4* активируют неканонический *Wnt* сигнальный каскад (Рисунок 66 А).

В качестве лиганов-активаторов неканонических *Wnt* каскадов описаны белки *Wnt11* и *Wnt5a* и оба этих белка активируют неканонический *Wnt* каскад (Рисунок 66 А).

Чтобы установить взаимодействие с каким из лигандов является принципиальным для участия *Noggin4* в регуляции неканонического *Wnt* каскада, была проведена активация этого каскада мРНК *noggin4* на фоне подавления трансляции эндогенной мРНК *wnt5a* и *wnt11* соответствующими специфическими МО.

Последовательность примененных МО для мРНК *wnt5a*: 5'-GGTGCAACCAGGGCACAATTACTTT, для мРНК *wnt11*: 5'-CCAGTGACGGGTCGGAGCCATTGGT.

В этом эксперименте было показано, что подавление трансляции эндогенной мРНК *wnt5a* не влияет на способность мРНК *noggin4* активировать Wnt/PCP-каскад, в то время как подавление трансляции эндогенной мРНК *wnt11* блокирует активаторный потенциал Noggin4 (Рисунок 66 Б). Это говорит о том, что регуляция неканонических Wnt каскадов Noggin4 осуществляется через сигнальный путь, связанный с Wnt11.



В	Wnt5a		Wnt11	
	Wnt (flag)	+	+	+
Noggin4 (myc)	-	+	-	+
Экспрессия				
Wnt Блот: анти-Flag				
Noggin4 Блот: анти-мыс				
Ко-иммунопреципитация				
Noggin4 Блот: анти-мыс				

Рисунок 66. Оценка влияния Noggin4 на активность Wnt/PCP сигнального каскада. **А** – экспериментальное повышение и понижение уровня экспрессии *noggin4* активирует Wnt/PCP сигнальный каскад. **Б** – понижение уровня экспрессии эндогенной мРНК *wnt11* блокирует

способность *Noggin4* активировать Wnt/PCP сигнальный каскад. **В** - *Noggin4* может связывать белок *Wnt11*.

Способность *Noggin4* связываться с активаторами Wnt/PCP каскада - белками *Wnt5a* и *Wnt11* - была проанализирована при помощи ко-иммунопреципитации. Было показано, что *Noggin4* обладает способностью напрямую связывать белок *Wnt11*, но не связывается с белком *Wnt5a* (Рисунок 66 В). Этот результат подтверждает предположение о том, что модуляция Wnt/PCP-каскада белком *Noggin4* осуществляется через взаимодействие с белком *Wnt11*.

2.1.2.21. Исследование паттерна экспрессии *noggin4* у эмбрионов курицы (*Gallus gallus*)

Данный раздел работы подробно представлен в статье Borodulin et al., 2012, doi: 10.1387/ijdb.120020az

В контексте исследования консерватизма экспрессии гена *noggin4* у челюстноротых, были исследованы особенности экспрессии *noggin4* у эмбрионов курицы *G. gallus*.

Для этого была получена полноразмерная кДНК гена *noggin4* курицы и исследован пространственный и временной паттерн его экспрессии в раннем развитии куриного эмбриона. Эксперименты были проведены методом гибридизации *in situ* в тотальных препаратах куриных эмбрионов на стадиях от 4 до 12. В качестве контроля был использован ген курицы *GAnf* (Рисунок 67 И, К).

На ранних стадиях развития куриного эмбриона до стадии формирования первых сомитов экспрессия гена *noggin4* имеет выраженный диффузный характер.

На стадии 4 (Рисунок 67 А) экспрессия *noggin4* наблюдается на протяжении всей первичной полосы, за исключением области средней линии. Максимальный уровень экспрессии наблюдается в области

гензеновского узелка и ньюкуповского центра. На поперечных срезах видно распределение экспрессии *noggin4* в эпибласте. В области гензеновского узелка экспрессия носит асимметричный характер. Эта асимметрия более выражено начинает наблюдаться в начале гастрюляции (стадия 5-6, Рисунок 67 Б - Г) – уровень экспрессии выше в правой части гензеновского узелка и она смещена рострально. В области хордального выроста уровень экспрессии *noggin4*, ниже и уменьшается до фонового по направлению к антериорной части хордального выроста. На поперечном срезе показано, что экспрессия обнаруживается в эктодерме (Рисунок 67 Н).

На стадии 7 (Рисунок 67 Д) *noggin4* экспрессируется в головной складке и нервных валиках каудальнее ее. Наибольший уровень экспрессии наблюдается в нервных валиках в передней области эмбриона и градиентно снижается до фонового уровня в каудальном направлении. При формировании сомитов в каждом новообразующемся сомите наблюдается повышенный уровень экспрессии *noggin4*. В течение гастрюляции асимметрия экспрессии *noggin4* постепенно исчезает. В нервных валиках экспрессия *noggin4* наблюдается в нейроэктодерме (Рисунок 67 Л).

На стадии 8 (Рисунок 67 Е) *noggin4* продолжает экспрессироваться в нервных валиках и обнаруживается в сформировавшихся сомитах, где уровень экспрессии выше, чем в несегментированной параксиальной мезодерме.

На стадии 9 (Рисунок 67 Ж) происходит распространение экспрессии *noggin4* в нервных валиках. При этом уровень экспрессии в сформировавшихся сомитах и в головных структурах выше уровня экспрессии в нервных валиках. Расширение экспрессии вдоль нервных валиков завершается на стадии 10.

На стадии 11 в смыкающихся нервных валиках происходит снижение уровня экспрессии *noggin4*. На 12 стадии (Рисунок 67 З) уровень экспрессии *noggin4* снижается до минимума над областью закрывшейся нервной трубки,

но поддерживается в нейроэктодерме и ее производных в головной области (Рисунок 67 М).

Наблюдаемый паттерн экспрессии *noggin4* на ранних этапах развития куриных эмбрионов имеет ряд сходных черт с паттерном экспрессии *noggin4* в развитии эмбрионов шпорцевой лягушки. У обоих видов *noggin4* начинает экспрессироваться на сходных стадиях ранней гаструлы (стадия 4+ у куриных эмбрионов и стадия 10.5 у эмбрионов шпорцевой лягушки). Начало экспрессии наблюдается в презумптивной нейроэктодерме, и продолжается по мере ее дифференцировки. Паттерн экспрессии *noggin4* у обоих видов с самого начала носит диффузный характер и проявляет тенденцию к широкому распространению на производные эктодермы и, частично, на некоторые мезодермальные структуры (сомиты) по мере развития эмбриона.

Несмотря на диффузный характер экспрессии *noggin4*, можно заключить, что он экспрессируется комплементарно своему гомологу *noggin1* как у куриного эмбриона, так и у эмбриона шпорцевой лягушки (*noggin1*). Так, у куриного эмбриона в гензеновском узелке на стадии 4 наблюдается низкий уровень экспрессии *noggin1* исключительно в материале презумптивной хордомезодермы (Connolly et al., 1997; Streit and Stern, 1999; Charman et al., 2002), в вентральной части гензеновского узелка. *Noggin4*, напротив, относительно интенсивно экспрессируется в дорсальной части гензеновского узелка и вдоль первичной полоски, а также в материале презумптивной нейроэктодермы. В начале гаструляции (стадия 5) наблюдается выраженная экспрессия *noggin4* в материале дифференцированной эктодермы, особенно в нейроэктодерме.

Одновременно с этим экспрессия *noggin4* у куриного эмбриона продолжается в перемещающемся каудально, по ходу гаструляции, гензеновском узелке и в валиках первичной полоски, где *noggin1* не экспрессируется ни на каких стадиях.

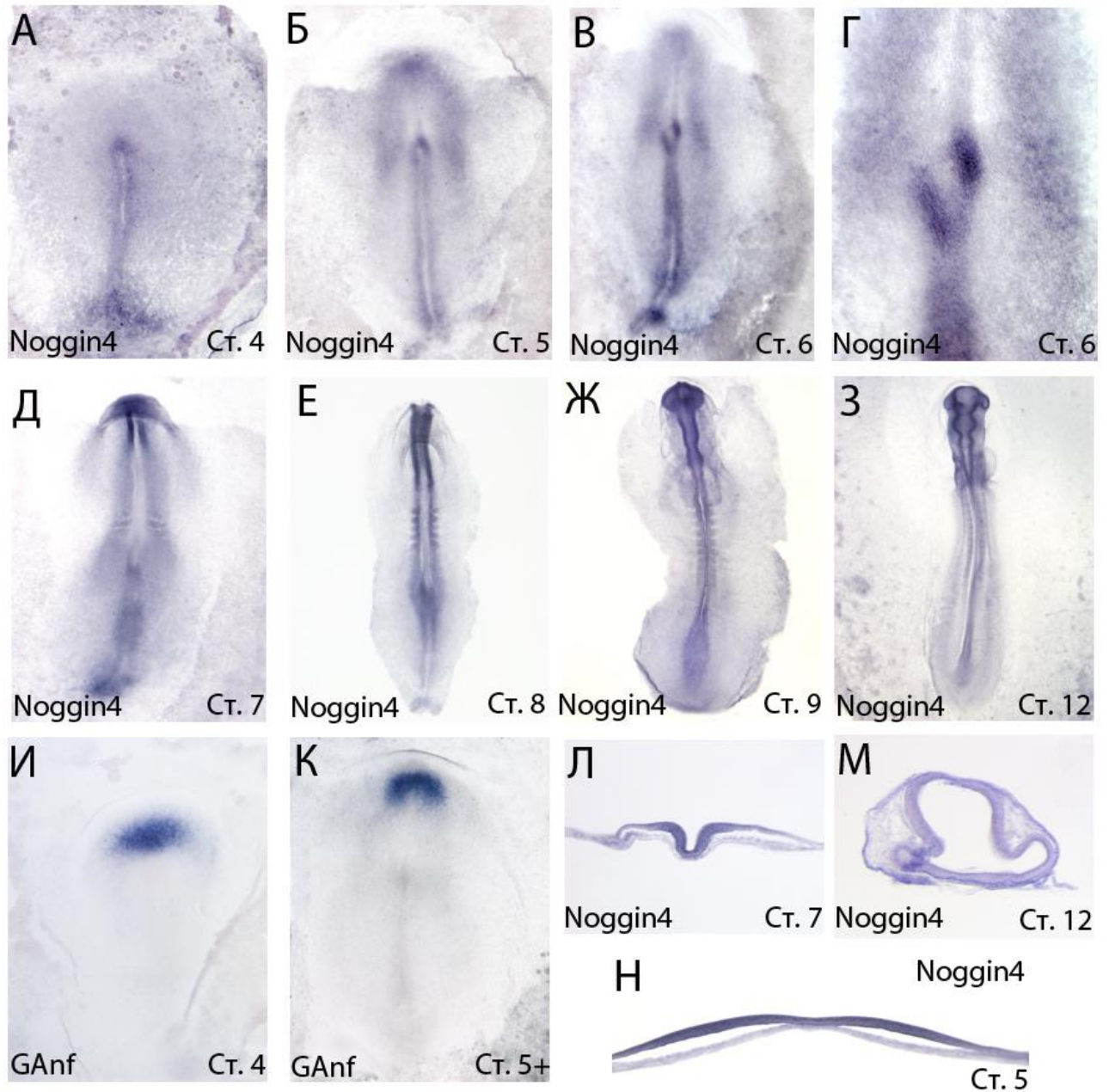


Рисунок 67. Гибридикация *in situ* мРНК *noggin4* и *GAnf* на препаратах целых куриных эмбрионов и гистологических срезах.

А-З. Экспрессия *noggin4* на ранних стадиях развития куриных эмбрионов. **А.** На стадии 4 экспрессия *noggin4* наблюдается в первичной полоске и гензеновском узелке. **Б.** На стадии 5 экспрессия *noggin4* в гензеновском узелке распределяется ассиметрично. **В, Г.** На стадии 6 продолжает наблюдаться выраженная асимметрия экспрессии *noggin4* в гензеновском узелке. **Д.** На стадии 7 (сформирована одна пара сомитов) наблюдается экспрессия *noggin4* в нервных валиках в области головных структур. **Е.** Стадия 8. **Ж.** На стадии 9 область экспрессии *noggin4* в нервных валиках расширяется в хвостовом направлении. **З.** Стадия 12. **И, К.** Паттерны экспрессии переднеголового маркера *GAnf* на ранних стадиях развития куриных эмбрионов. **Л-Н.** Экспрессия *noggin4* на поперечных срезах куриных эмбрионов ранних стадий развития. **Л.** На стадии 7 срезе на уровне

нервных валиков наблюдается экспрессия *noggin4* в нейроэктодерме. **М.** На стадии 12 на поперечном срезе на уровне глазного пузыря, экспрессия *noggin4* наблюдается во всей нейроэктодерме, в том числе, в презумптивной сетчатке. **Н.** Срез эмбриона 5 стадии роstralнее гензеновского узелка.

Таким образом, в паттернах экспрессии *noggin1* и *noggin4* у куриных эмбрионов наблюдается комплементарность – пространственная и временная.

Отдельного внимания заслуживает асимметрия экспрессии *noggin4* в гензеновском узелке на ранних стадиях (4-5) развития куриного эмбриона. Проблема латерализации (возникновения право-левой асимметрии) плана строения позвоночных животных до сих пор не решена, несмотря на впечатляющие успехи, достигнутые в этом направлении. Данные об экспрессии *noggin4* указывают на то, что *noggin4* может быть вовлечен в этот процесс, что заслуживает более подробного изучения в дальнейшем.

2.1.3. Исследование роли генов *noggin* в регенерации

2.1.3.1. Исследование профиля экспрессии генов семейства *Noggin* при регенерации хвостового отдела речной миноги

В рамках исследования вовлеченности генов *noggin* в процессы регенерации у позвоночных, был проведен анализ профиля экспрессии генов *noggin* в ходе регенерации хвостового отдела миног методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени и сопоставление профилей экспрессии *noggin* с профилями генов, вовлеченности которых в регенерацию описана в литературе.

Это исследование проводилось на живых эмбрионах речной миноги (стадий 27+) путем ампутации части хвостового отдела и отбора образцов регенерирующей ткани на разных стадиях регенерации. Схема эксперимента представлена на Рисунке 68.

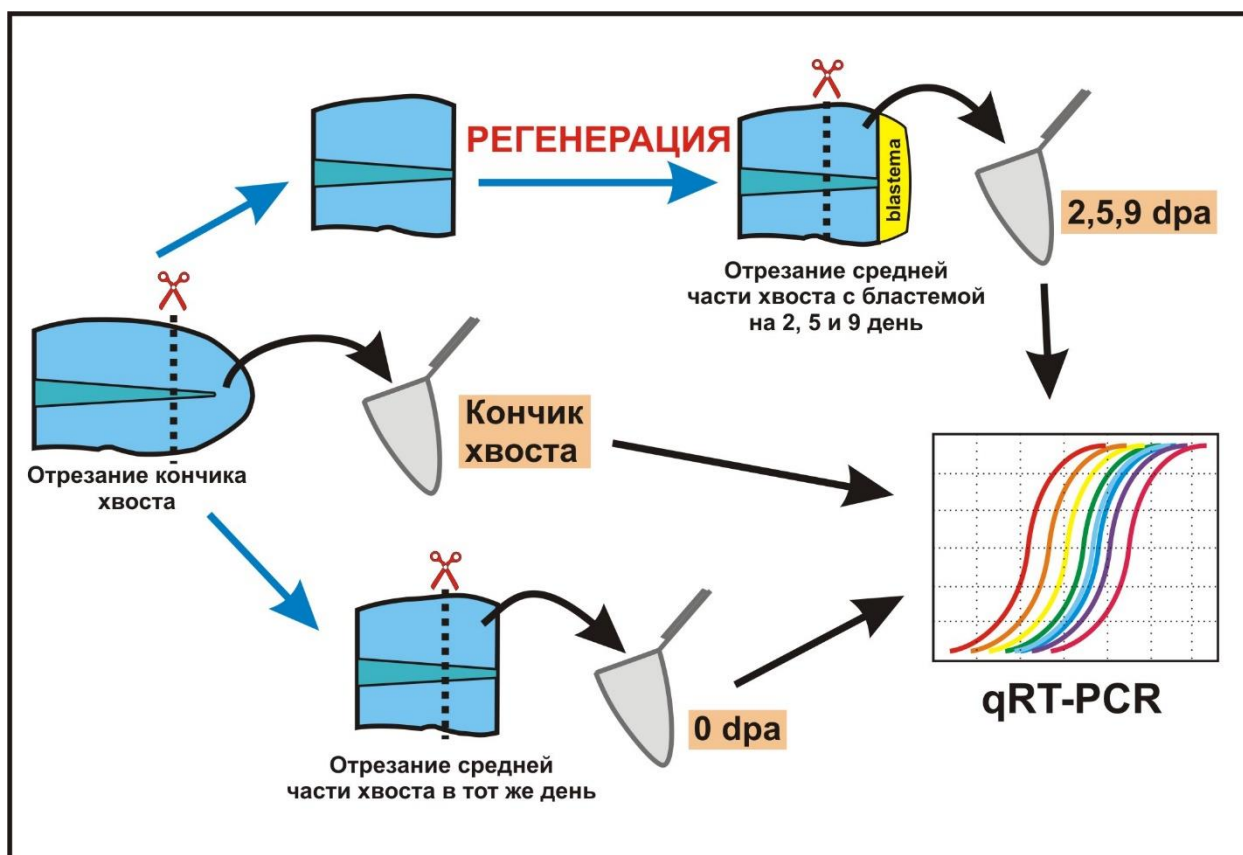


Рисунок 68. Схема эксперимента по анализу экспрессии генов при регенерации ампутированного хвоста речной миноги *L. fluviatilis*. dpa – дни после ампутации.

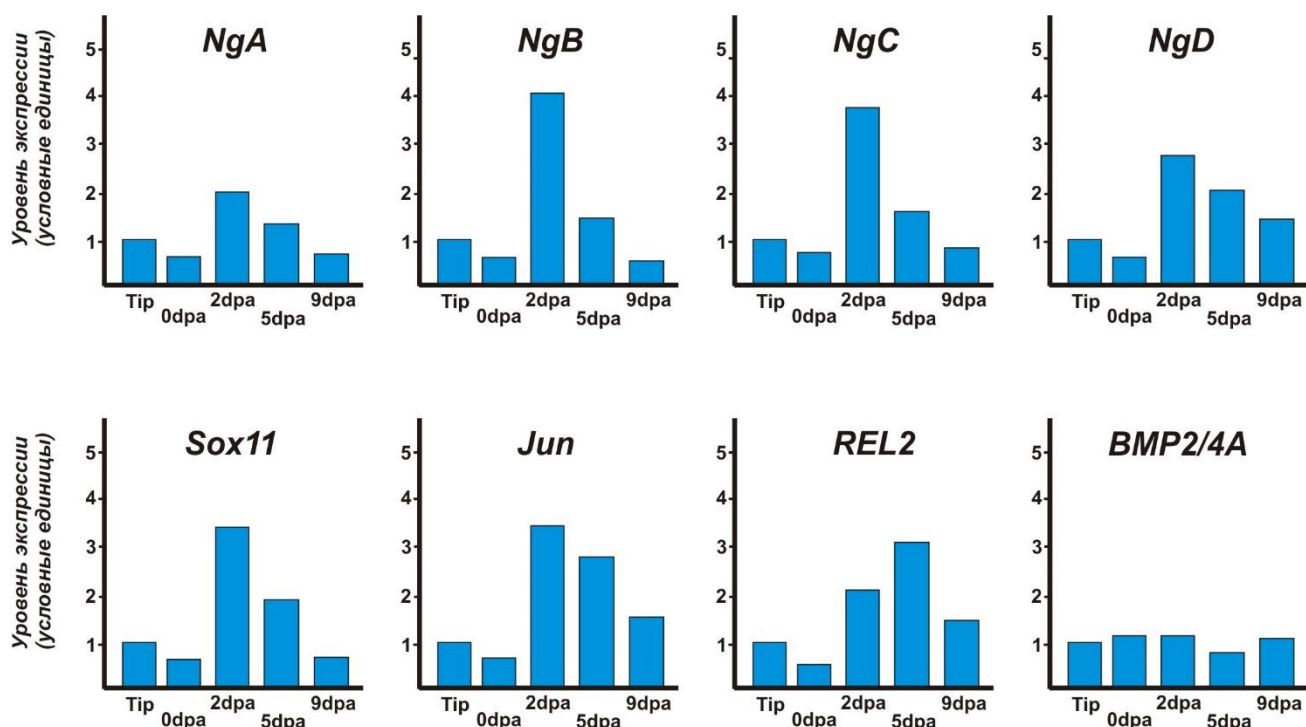


Рисунок 69. Уровни экспрессии исследованных генов в ходе регенерации хвостового отдела личинки речной миноги.

В качестве контрольных маркеров регенерации нами использовались гены *Sox11*, *Jun*, *REL2*, возрастание уровня экспрессии которых наблюдалось, согласно литературным данным (Herman et al., 2018), при регенерации спинного отдела у взрослых особей. В качестве отрицательного контроля анализировался уровень экспрессии *BMP2/4A*.

Согласно полученным данным, экспрессии генов *Noggin* возрастает на второй день после ампутации, что соответствует динамике экспрессии генов, вовлеченных в регенерационный процесс (Рисунок 69).

2.1.3.2. Исследование характера и динамики экспрессии генов *noggin* в регенерации хвоста и конечностей *X. laevis* методом количественного ПЦР в реальном времени

Одним из аспектов исследования функциональной роли белков семейства *Noggin* в морфогенезе позвоночных является исследование их вовлеченности в процессы регенерации – способности организма восстанавливать утраченные структуры. Эта способность хорошо развита у анамний и головастики шпорцевой лягушки являются удобным объектом для исследования процессов регенерации.

Для понимания возможного участия генов *noggin* в процессах регенерации была исследована динамика их экспрессии на серии последовательных стадий регенерации почки задней конечности и хвоста у головастиков шпорцевой лягушки. Анализ проводился методом количественной ОТ-ПЦР. Схема эксперимента представлена на Рисунке 70 А.

Как показано на Рисунке 70 Б, экспрессия *noggin1* и *noggin2* практически отсутствовала в интактных почках задних конечностей и не менялась при ампутации и регенерации.

При ампутации хвостов уровень экспрессии *noggin1* существенно снижался в первый день после ампутации (сравнить 1(0) и 3(1) и затем еще несколько снижался к 5-ому дню (сравнить 3(1) и 3(5)). В отличие от *noggin1*,

ампутация кончика хвоста вызывала постепенную активацию экспрессии *noggin2* до примерно 5-и кратного уровня по сравнению с интактной тканью ко второму дню регенерации.

Отличием экспрессионной динамики *noggin4* было ее резкое возрастание после ампутации, уже на первый день регенерации, причем, как в конечности, так и в хвосте (Рисунок 70 Б, сравнить 1(0) и 3(1)). Затем уровень экспрессии постепенно снижался, достигая интактного уровня на 5-й день после ампутации.

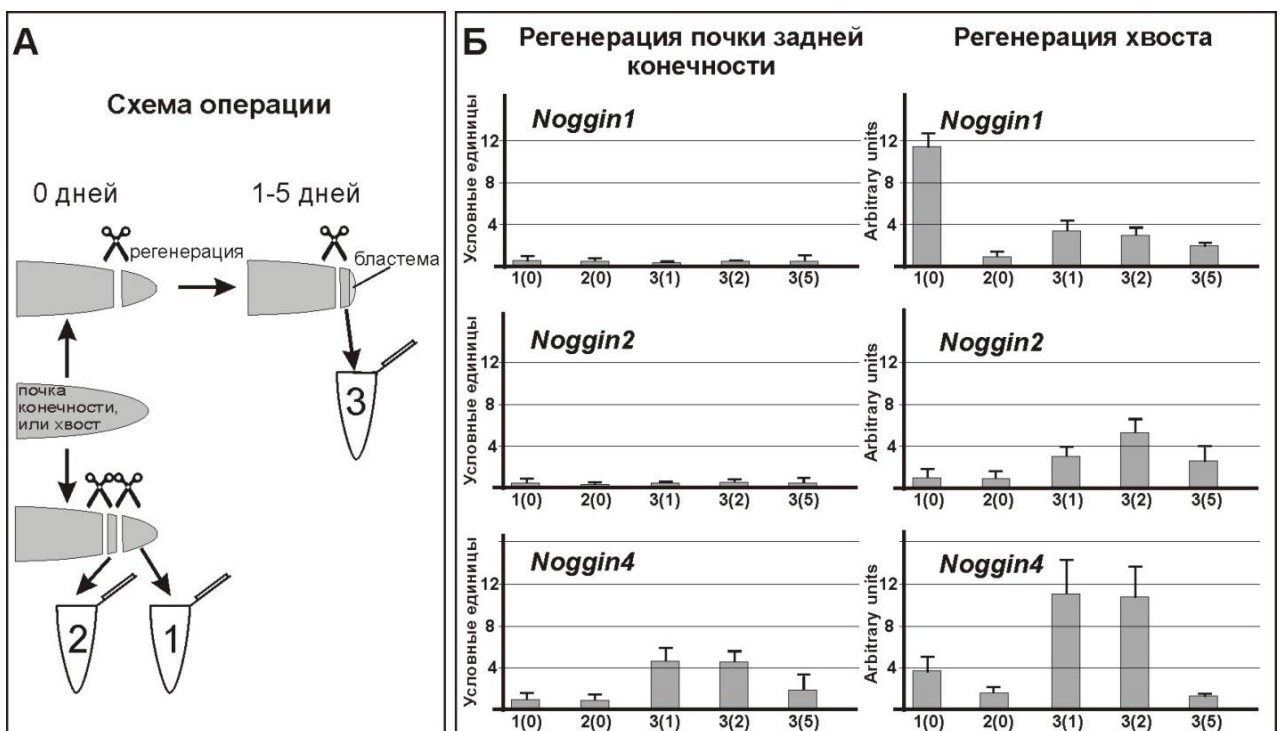


Рисунок 70. Анализ экспрессии генов семейства *noggin* в регенерирующей почке задней конечности и хвосте у головастика *X. laevis*.

Таким образом, три гена семейства *Noggin* демонстрируют различный временной паттерн экспрессии в ходе регенерации почки задней конечности и хвоста у головастика *X. laevis*. Можно предположить, что эта разница обусловлена разной ролью этих генов в регенерационных процессах.

2.1.3.3. Сравнение профилей экспрессии генов *noggin* с профилями экспрессии генов, вовлеченных в процесс регенерации

Для оценки возможной вовлеченности генов *noggin* в процессы регенерации, профили динамики экспрессии генов *noggin* в ходе регенерации ампутированных конечностей и хвостов головастиков *X. laevis* были сопоставлены с профилями экспрессии ряда описанных генов маркеров, участвующих в процессах регенерации у *X. laevis*. Профили экспрессии всех генов были получены методом ОТ-ПЦР. Поскольку было обнаружено, что эффективность процесса регенерации сильно зависит от условий содержания головастиков, в качестве маркеров этого параметра проводилась оценка экспрессия таких генов как *Fgf8*, *Msx1* и *Xagrs*, которые, согласно литературным данным, проявляют свою активность уже спустя сутки после ампутации. Экспрессия этих генов ожидаемо возрастала при регенерации как конечности, так и хвоста (Рисунок 71; Рисунок 72).

Профили экспрессии генов *noggin* в экспериментах с регенерацией почек конечностей и хвостов в целом соответствуют ранее полученным результатам. Так, в обоих случаях максимальное возрастание демонстрирует *noggin4* на второй день после ампутации, в меньшей степени возрастает экспрессия *noggin2*, а уровень экспрессии *noggin1*, напротив, снижается.

На основе полученных результатов можно констатировать, что профиль экспрессии разных генов *Noggin* в регенерации различается. Наиболее выраженным эффектом является возрастание уровня экспрессии *Noggin4* на второй день после ампутации.

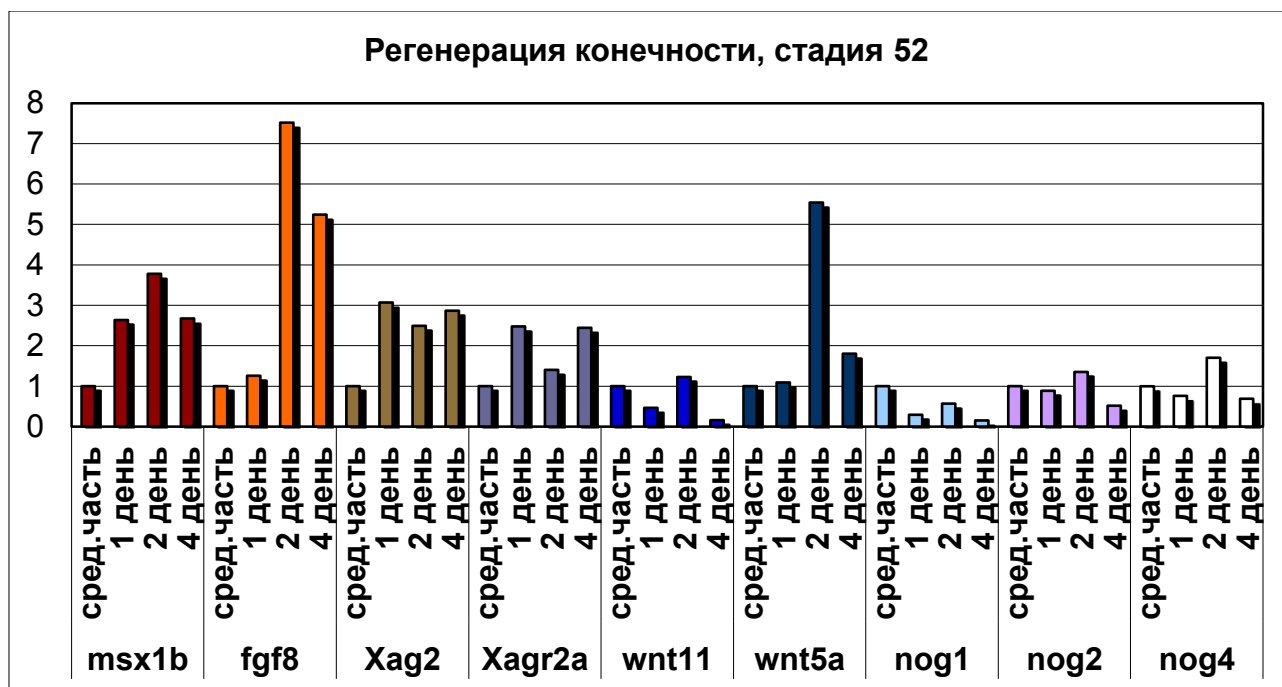


Рисунок 71. Профили экспрессии генов *Msx1*, *Fgf8*, *Xagrs*, *Wnt11* и *Wnt5a* в сравнении с профилями экспрессии генов *noggin* при регенерации почки конечности *X. laevis*.

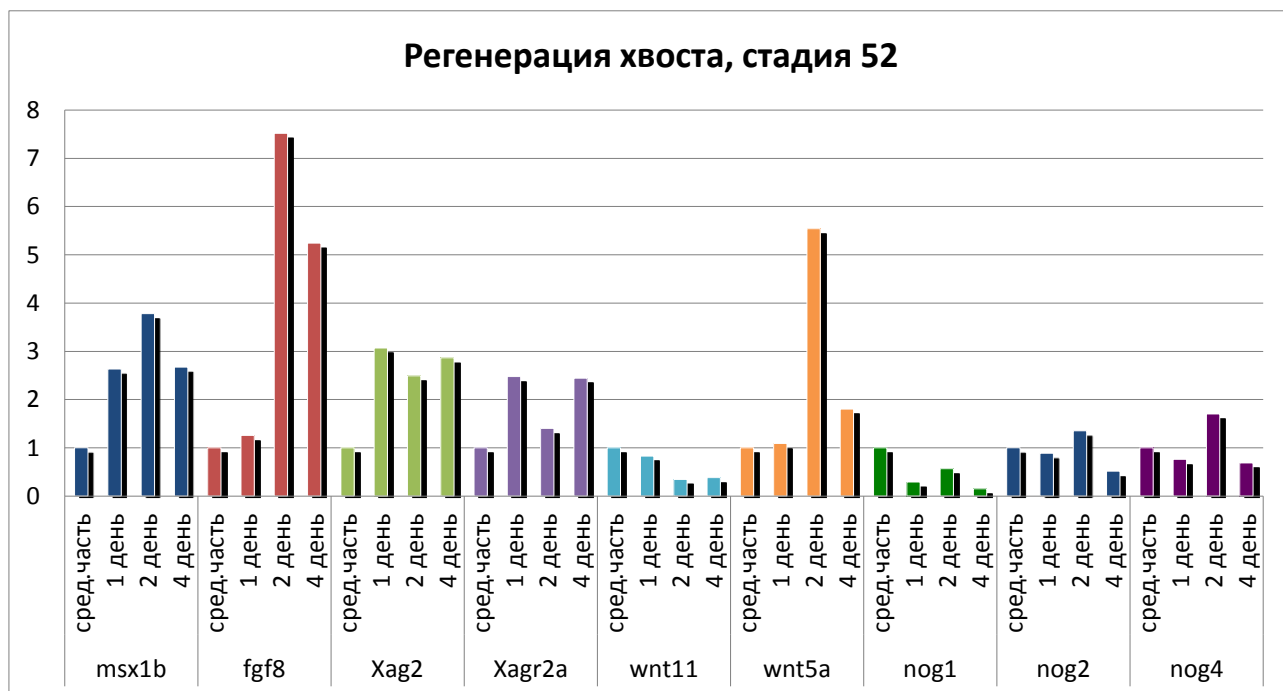


Рисунок 72. Профили экспрессии *Msx1*, *Fgf8*, *Xagrs*, *Wnt11* и *Wnt5a* в сравнении с профилями экспрессии генов *noggin* при регенерации хвоста *X. laevis*.

2.1.3.4. Анализ экспрессии EGFP под контролем промоторов *noggin1*, *noggin2* и *noggin4* в ампутированных конечностях трансгенных головастика шпорцевой лягушки

Наличие линии трансгенных головастика *X. laevis*, в геноме которых флуоресцентный белок EGFP экспрессируется под контролем промоторов генов *noggin*, дает возможность исследовать динамику экспрессии генов *noggin* (активность промоторов *noggin*) при регенерации *in vivo*. Такой анализ экспрессии EGFP в ампутированных конечностях трансгенных головастика был проведен на 53 стадии развития. В ходе этих экспериментов головастикам ампутировали только одну конечность, а вторую оставляли интактной, в качестве контроля. В результате было установлено, что в клетках эпителия оперированной конечности активация экспрессии EGFP происходила только под контролем промотора *noggin4*. При этом интенсивный сигнал EGFP можно было наблюдать уже через 18 часов после операции (Рисунок 73).

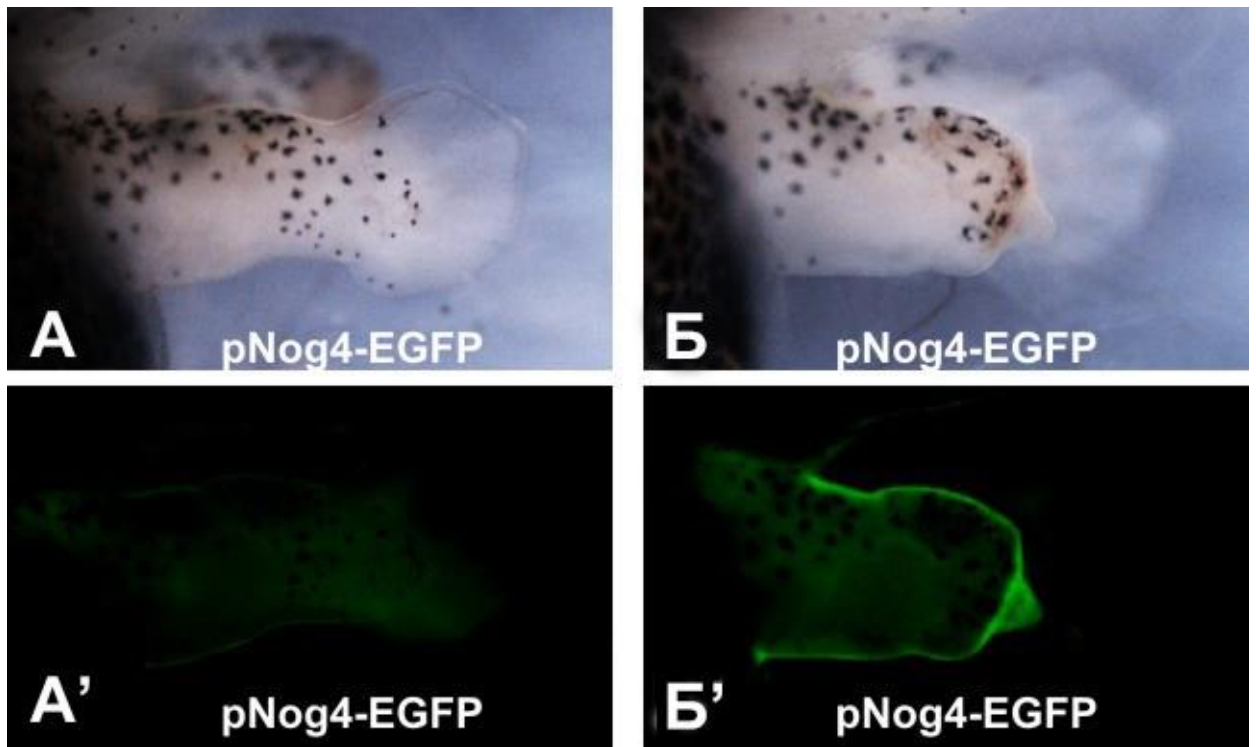


Рисунок 73. Активация экспрессии EGFP под контролем промотора *noggin4* в клетках эпителия ампутированной конечности трансгенного головастика через 18 часов после операции.

А-А'. Интактная (левая) задняя конечность трансгенного головастика шпорцевой лягушки. Наблюдается очень низкий уровень экспрессии EGFP под контролем промотора *noggin4*.

Б-Б'. Ампутированная (правая) задняя конечность того же головастика, что и на А-А'. Во всем эпителии конечности, включая раневой эпителий культуры, виден высокий уровень экспрессии EGFP под контролем промотора *noggin4*.

Эти данные хорошо согласуются с приведенными выше данными о возрастании уровня экспрессии *noggin4* в ампутированных конечностях на вторые сутки после ампутации и подтверждают активацию экспрессии *noggin4* при регенерации почки конечности у *X. laevis*.

2.1.3.5. Оценка функциональной важности белков Noggin в процессе регенерации

Для проверки вклада белков Noggin на регенерацию была исследована способность Noggin1, Noggin2 и Noggin4 активировать регенерацию задней конечности головастика *X. laevis* на стадии развития, когда в норме способность к регенерации уже утрачивается. В этой серии опытов белки Noggin нарабатывали в системе ооцитов шпорцевой лягушки. Для этого ооциты инъецировали синтетической мРНК каждого из белков *noggin* и после инкубации в течении 1 суток ооцитов в среде OR2, обогащенной белками Noggin, в этой среде культивировали головастики трансгенной линии, экспрессирующей EGFP под контролем промотора гена *Xag2*, у которых ампутировали одну из задних конечностей. Эта трансгенная линия лягушек, является удобной системой для мониторинга способности к регенерации. Используемый для данной трансгенной конструкции фрагмент промотора *Xag2* активирует экспрессию EGFP в ампутированных конечностях головастиков на тех стадиях развития, когда регенерация конечностей еще возможна, но остается неактивным в клетках культуры на стадиях, когда способность к регенерации исчезает.

В результате было установлено, что уже через 18 часов инкубации в среде обогащенной белком Noggin4, у трансгенных головастиков, у которых

на стадии 57 (когда регенерация уже не возможна) была удалена дистальная часть задней конечности, примерно в 70% случаев происходила активация экспрессии трансгена pXag2-EGFP в клетках раневой поверхности культи (Рисунок 74, А и А'). В тоже время, подобной активации экспрессии трансгена не наблюдалось при инкубации головастиков в среде, обогащенной Noggin1 или Noggin2 (Рисунок 74, Б и Б').

Это позволяет сделать вывод, что белок Noggin4, в отличие от Noggin1 и Noggin2, способен оказывать стимулирующее влияние на регенерацию конечностей у *X. laevis*. Эти данные хорошо согласуются с приведенными выше ранее результатами о том, что в ходе регенерации уже на 1 день после ампутации почки задней конечности в клетках культи происходит активация экспрессии именно эндогенного Noggin4, тогда как экспрессия Noggin1, напротив, снижается, а экспрессия Noggin2 активируется незначительно.

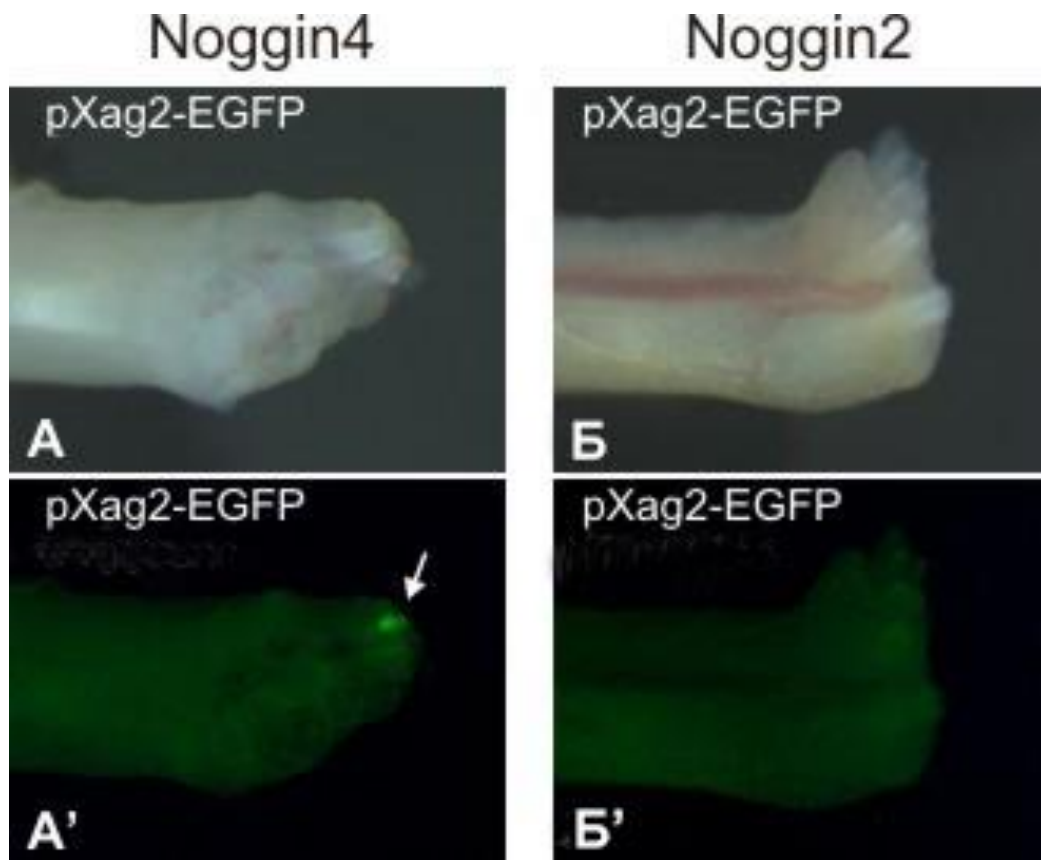


Рисунок 74. Активация экспрессии трансгенной конструкции Xag2-EGFP в клетках раневой поверхности ампутированной конечности трансгенных головастиков, обработанных белком Noggin4.

А-А'. Ампутированная на стадии 57 задняя конечность головастика указанной трансгенной линии, инкубированного 18 часов в среде, содержащей белок *Noggin4*.

Стрелка на А' указывает на клетки, экспрессирующие EGFP под контролем промотора *Xag2*.

Б-Б'. Ампутированная на стадии 57 задняя конечность головастика указанной трансгенной линии, инкубированного 18 часов в среде, содержащей белок *Noggin2*.

В отличие от головастика, обработанного *Noggin4*, активации трансгена не наблюдается.

Таким образом, можно подытожить, что в ходе регенерации у головастика шпорцевой лягушки наблюдается активация экспрессии *noggin4*, что может указывать на вовлеченность этого гена в регенерационные процессы. Это подтверждается способностью *Noggin4* активировать регенерационные процессы у головастика шпорцевой лягушки на стадиях, на которых в норме способность к регенерации утрачивается.

2.2. Семейство переднеголовных генов *Foxg1* позвоночных

Ген *Foxg1* был описан ранее как важный регулятор развития переднего мозга, который часто используется в качестве его генетического маркера. При этом, до недавнего времени у позвоночных, был описан и исследовался один ген *Foxg1* и здесь это обусловлено тем, то у большинства традиционных объектов в геноме действительно сохранился только один паралог *Foxg1*. Одной из задач работы было исследование генов *Foxg1* у эволюционно древних групп позвоночных – миног и архаичных челюстноротых (осетрообразных).

Этот раздел работы подробно представлен в статье Ermakova et al., 2024, <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1321317>

2.2.1. Три паралога *foxg1* у эволюционно древних групп позвоночных

Проведенный анализ доступной версии генома морской миноги *P. marinus* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_010993605.1/) показал наличие у этого представителя бесчелюстных трех паралогов *foxg1* – в хромосомах 17, 29 и 31. Гомологичные последовательности были также обнаружены в геномных сиквенсах камчатской миноги *L. camtchaticum* (GenBank: WFAV01000304.1, WFAV01000071.1, WFAV01000203.1; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_018977245.1/).

Для оценки родства обнаруженных последовательностей с генами *foxg1* челюстноротых был проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков, кодируемых генами *foxg1* (Рисунок 75, 76). Последовательности белков Foxg1 челюстноротых были идентифицированы в доступных базах 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. Также в анализ были включены белки Foxg1 ближайших родственников позвоночных – ланцетника, оболочников и полухордовых.

Поиск последовательностей foxg1 в доступных в NCBI геномных базах данных при помощи алгоритма BLAST для проведения филогенетического анализа показал, что наблюдаемая у высших позвоночных (птиц, млекопитающих и некоторых рептилий) ситуация наличия одного гена *foxg1* не является ситуацией, 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 дубликации есть четыре паралога *foxg1*. Поскольку у всех проанализированных ближайших родственников позвоночных (отделение которых от эволюционной линии позвоночных произошло до радиации

последних), обнаружено по одному *foxg1* гену, логичным выглядит предположение о появлении трех генов *foxg1* позвоночных в результате двух раундов (полно)геномных дупликаций.

При проведении филогенетического анализа нами были сохранены названия белков Foxg1, приведенные в базах данных.

Филогенетические деревья аминокислотных последовательностей белков Foxg1, построенные методами максимального правдоподобия (ML) и neighbor joining (NJ), показали уверенную кластеризацию белков Foxg1a челюстноротых, к которым относятся и единственные, сохранившиеся у высших позвоночных, белки Foxg1. В базах данных этим белкам чаще всего присвоено название Foxg1. Сравнительно уверенно кластеризуются белки Foxg1b. В базах данных эти белки зачастую имеют название Foxg1-like и индекс “b” был им присвоен в настоящей работе согласно геномам осетрообразных и костистых рыб. Белки Foxg1c кластеризуются наименее уверенно, формируя подгруппы белков хрящевых рыб, осетрообразных/костных рыб и объединяющиеся с ними белки латимерии и представителей рептилий. Отдельно нужно отметить, что индекс “c” для некоторых генов/белков этой группы присутствует в базах данных хрящевых, осетрообразных и костных рыб. Для избегания дальнейшей путаницы в дальнейшей работе будут использованы именно эти названия, вместо приведенных в статье Nara et al. (2018) индексов FoxG1, FoxG2, FoxG3 (где FoxG1=FoxG1a, FoxG2=FoxG1c, а FoxG3=FoxG1b).

Как видно из структуры построенных филогенетических деревьев, три белка Foxg1 миног и два белка Foxg1 миксины *E. burgeri* сравнительно уверенно группируются друг с другом, но не образуют уверенных пар с генами челюстноротых (что было бы первым свидетельством ортологии). Один из белков миног и миксин ближе к белкам Foxg1a и Foxg1b челюстноротых, а два других гена миног и ген миксины ложатся на древе отдельно, ближе к белкам ланцетника (*Branchiostoma*), асцидии (*Ciona*) и *Saccoglossus*. В силу отсутствия выраженной попарной филогенетической

кластеризации белков Foxg1 бесчелюстных и челюстноротых, генам бесчелюстных были присвоены индексы “ α ”, “ β ” и “ γ ”.

Для подтверждения ортологии Foxg1 у миног и миксин было построено неукорененное ML дерево только с белками бесчелюстных, согласно которому два белка Foxg1 миксин уверенно соответствуют белкам Foxg1 α и Foxg1 γ миног (Рисунок 77, А).

В качестве дополнительного пути поиска парной гомологии белков Foxg1 бесчелюстных и челюстноротых было построено неукорененное ML дерево, содержащее только белки основных групп позвоночных, у которых обнаружено несколько паралогов *foxg1* – миног, миксин, акул, панцирной щуки (представитель клады костных рыб, эволюционно предшествующей геномной дупликации специфичной для костистых рыб) и латимерии (представитель эволюционной линии лопастеперых костных рыб, предшествующая появления наземным позвоночным) (Рисунок 77, Б). Результаты этого анализа подтвердили отсутствие уверенной попарной кластеризации белков Foxg1 бесчелюстных и челюстноротых.

В сумме, результаты проведенных филогенетических анализов показывают, что белки Foxg1 бесчелюстных и челюстноротых достаточно уверенно кластеризуются внутри каждой из групп, но выраженной ортологии белков Foxg1 между этими эволюционными линиями не прослеживается.

В такой ситуации целесообразным выглядит проведение анализа локальной геномной синении генов *foxg1* и выявление общих генов в окрестностях *foxg1* у представителей разных групп позвоночных, которое может стать свидетельством их общего происхождения.

Результаты анализа локальной геномной синении генов *foxg1* позвоночных представлены на Рисунке 78.

Проведенный анализ локальной геномной синении выявил, что каждый из генов *foxg1* челюстноротых имеет в своем окружении ряд уникальных генов, в том числе одного ближайшего соседа – для *foxg1a* это гомологи гена *NOVA1* (neuron-specific RNA-binding protein), для *foxg1b* – *slc30* (гомологи

zink-transporter gene), для *foxg1c* – гомологи малого ядерного рибонуклеопротеина D2 *snrpd2*. Наличие таких надежных генов-свидетелей позволяет уверенно классифицировать гены *foxg1* челюстноротых. В окрестностях генов *foxg1* миног обнаруживаются многие из генов-гомологов соседей *foxg1* челюстноротых, однако перечень соседей у разных паралогов *foxg1* миног перекрывается, что не позволяет однозначно выявить попарную ортологию *foxg1* миног и челюстноротых.

Уровень собранности генома миксины (<https://transcriptome.riken.jp/squalomix/blast/>; *E. burgeri* genome assembly (Eburgeri_v1)) пока не позволяет провести полноценный анализ геномной синтении для генов этого вида, пока здесь можно лишь подтвердить ортологию генов *foxg1a* миног и миксин, уже наблюдавшуюся в филогенетическом анализе.

В целом, проведенный анализ локальной геномной синтении генов *foxg1* демонстрирует сходные с филогенетическим анализом результаты.

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 78). Это, свидетельствуя в пользу общности происхождения рассматриваемых генов, затрудняет выявление пар ортологов среди них.

У представителей осетрообразных было обнаружено пять паралогов *foxg1*. Такое количество паралогов может объясняться тремя раундами геномных дупликаций в истории генотипа осетрообразных. Два раунда, согласно современным представлениям, могли произойти на уровне предковых челюстноротых, а третий раунд – специфичный для осетрообразных (Du et al., 2020).

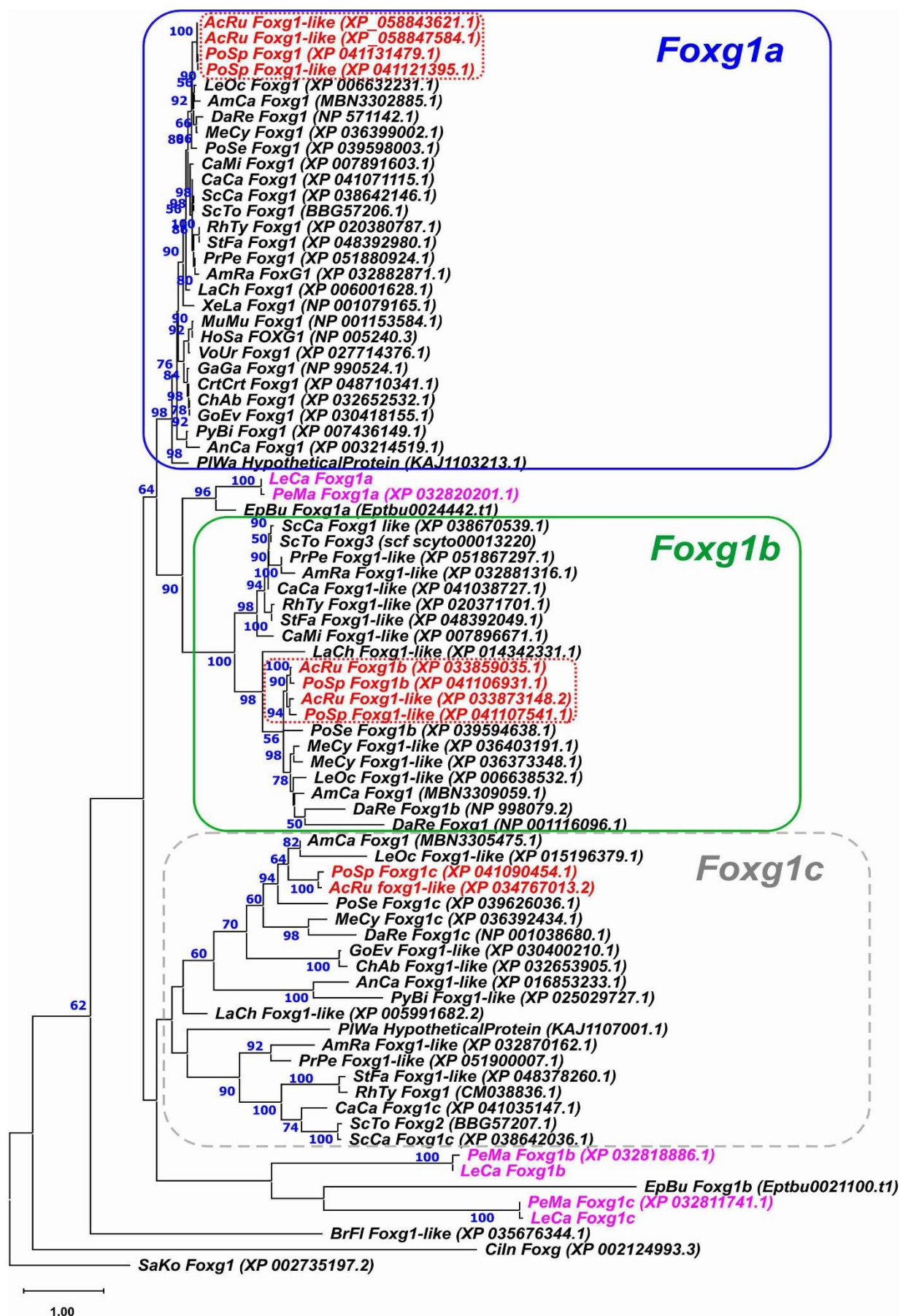


Рисунок 75. Филогенетическое дерево белков Foxg1 позвоночных, построенное методом максимального правдоподобия (Maximum likelihood, ML). Показаны значения бутстрэп-теста >50

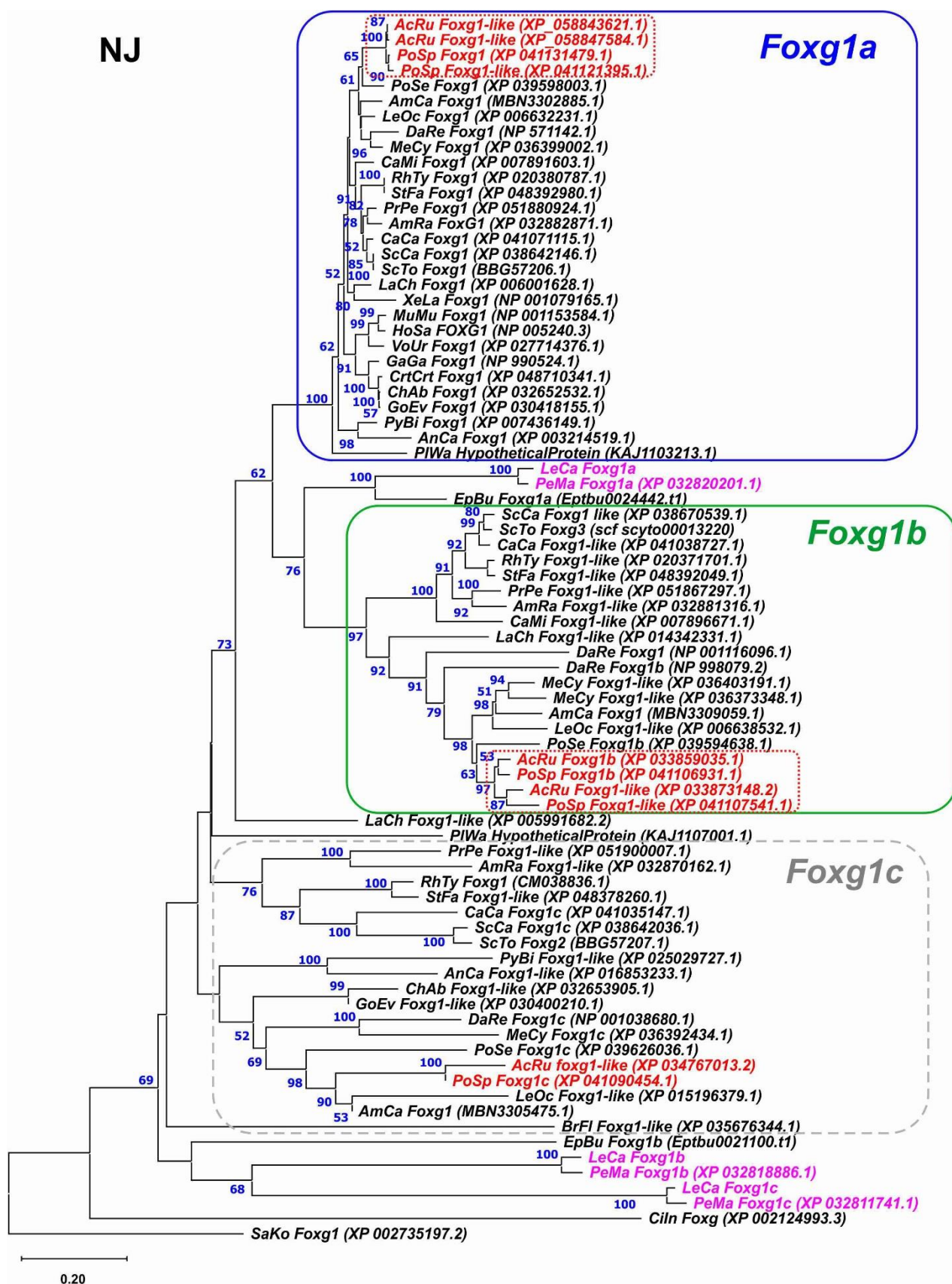
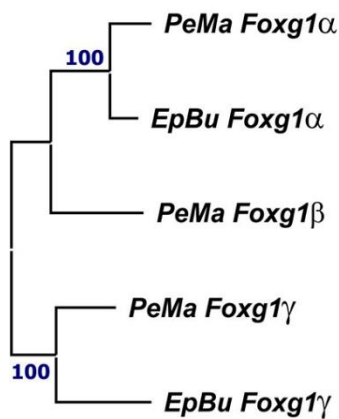


Рисунок 76. Филогенетическое дерево белков Foxg1 позвоночных построенное методом Neighbor Joining. Показаны значения бутстрэп-теста >50

AcRu - *Acipenser ruthenus*; *AmCa* – *Amia calva*; *AmRa* – *Amblyraja radiata*; *AnCa* – *Anolis carolensis*; *BrFl* – *Branchiostoma floridae*; *CaCa* - *Carcharodon carcharias*; *CaMi* - *Callorhinchus 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 Cypronoides*; *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*.

А
Бесчелюстные



Б Бесчелюстные +
челюстноротые

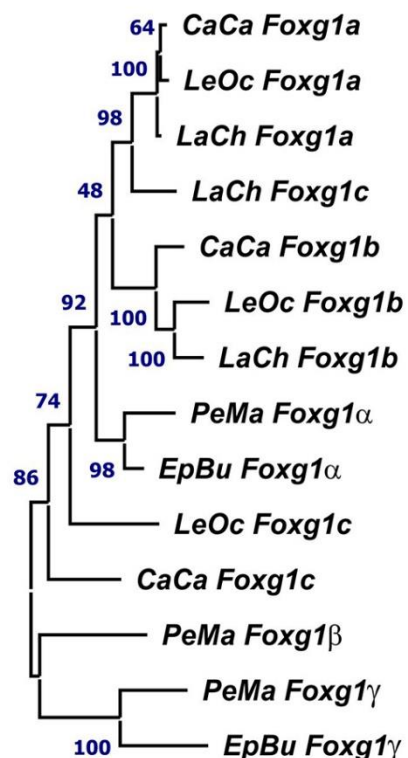


Рисунок 77. Неукорененные ML дерево только Foxg1 бесчелюстных (А) и бесчелюстных с челюстноротыми, имеющими три аллеля Foxg1 (В).

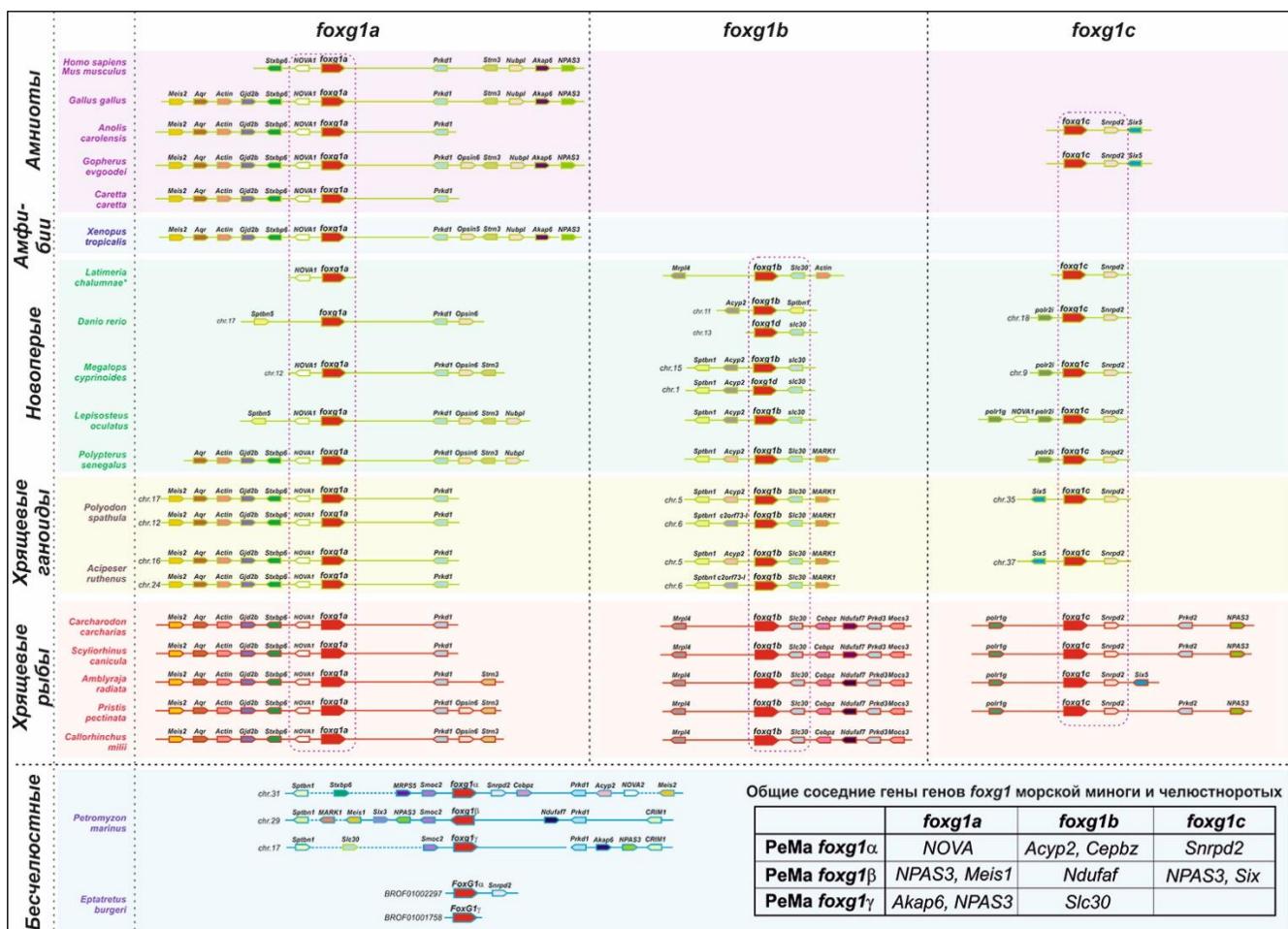


Рисунок 78. Анализ локальной геномной синтении генов *foxg1* позвоночных.

Пять генов *foxg1* осетрообразных по локальной геномной синтении распределяются в имеющиеся три группы паралога: по два гена, ортологичных *foxg1a* (гены *foxg1a* и *foxg1a'*) и *foxg1b* (гены *foxg1b* и *foxg1b'*) и один ортолог *foxg1c*. Такое распределение генов *foxg1* осетрообразных соответствует данным филогенетического анализа.

Следующим этапом поиска ортологии является сравнение паттернов экспрессии потенциальных ортологов в разных группах, которое отражает сходство или различие регуляторных элементов, поскольку при полногеномных дупликациях происходит дупликация не только кодирующих последовательностей генов, но и всех регуляторных элементов. Хотя в результате последующей субфункционализации пространственные паттерны дочерних генов могут меняться, какие-то отдельные его особенности,

характерные для предкового гена могут сохраниться и свидетельствовать об общности происхождения рассматриваемых генов (то есть их ортологии).

2.2.1.1. Динамика и особенности пространственной экспрессии генов foxg1 у речной миноги (L. fluviatilis)

Временная динамика экспрессии генов *foxg1* у миног была исследована методом ОТ-ПЦР (Рисунок 79 А).

Профиль экспрессии всех трех генов *foxg1* у речной миноги имеет общие черты – невысокий уровень на ранней стадии с последующим возрастанием, которое у генов *foxg1β* и *foxg1γ* наблюдается позже, чем у *foxg1α*.

Исследование пространственной экспрессии генов *foxg1* речной миноги было проведено методом гибридизации *in situ* на сериях ранних стадий развития - со стадии ранней нейрулы (стадия 17 по Tahara, 1988) до стадии личинки (стадия 30).

Для синтеза зондов для гибридизации *in situ* были получены кДНК генов *foxg1* речной миноги: зонд для гена *foxg1α* размером 1470 нуклеотидов, зонд для гена *foxg1β* размером 1350 нуклеотидов, зонд для гена *foxg1γ* размером 1500 нуклеотидов, содержащие почти полные кДНК исследуемых генов.

Все три паралога *foxg1* содержат последовательность, кодирующую высоко консервативный FВ-домен: нуклеотидная идентичность FВ-доменов генов *foxg1α* и *foxg1β* - 95%, а генов *foxg1α* и *foxg1γ* – 93%. Наличие таких консервативных участков может приводить к неспецифической кросс-гибридизации антисмысловых зондов с мРНК разных генов *foxg1*. Для подтверждения специфичности полученных паттернов экспрессии для каждого из генов *foxg1* были также получены по два зонда, комплементарные кДНК 5'- и 3' областей каждого из них (Рисунок 79 Б). Паттерны экспрессии генов *foxg1*, полученные при использовании 5'- и 3'-зондов подтвердили результаты, полученные с полноразмерными зондами, однако уровень

фонового окрашивания при их использовании был выше. Вероятно, это объясняется недостаточной длиной этих, сравнительно коротких, зондов.

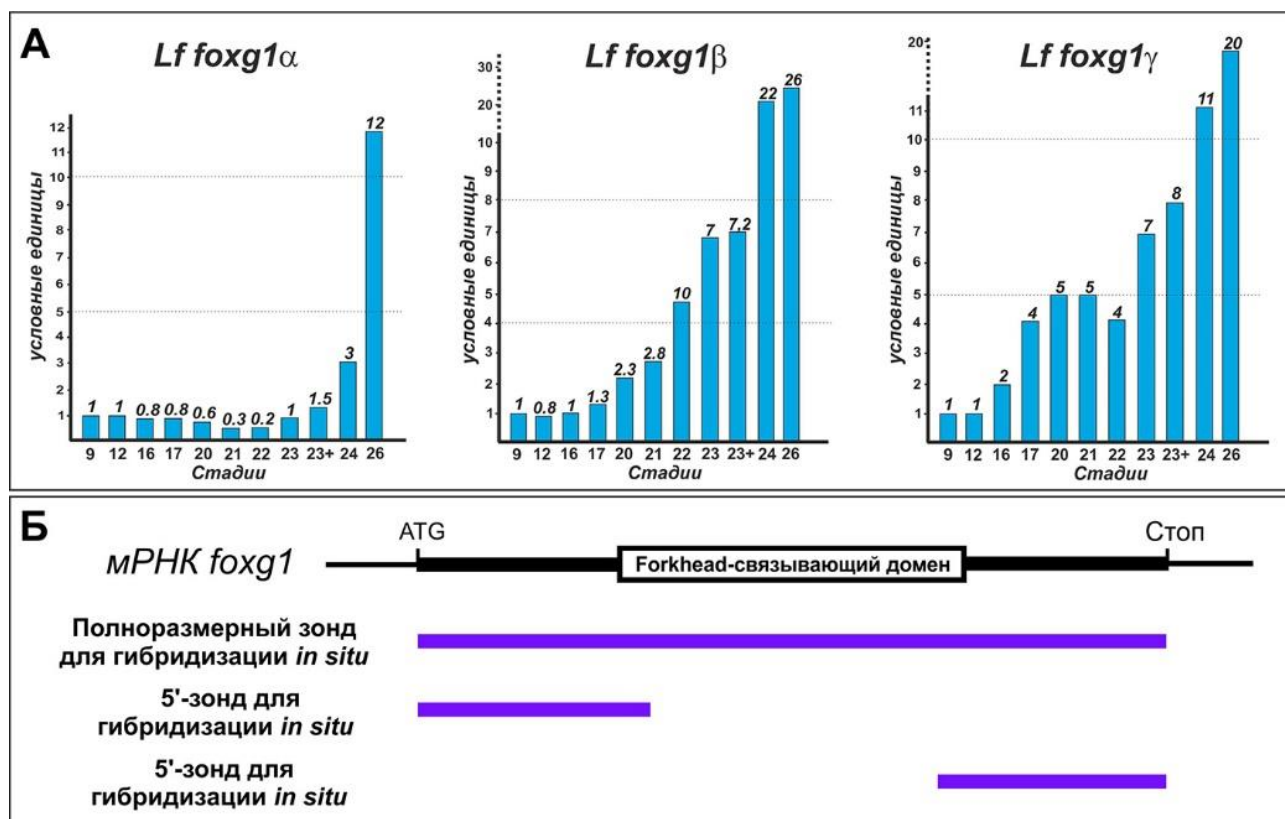


Рисунок 79. Динамика экспрессии генов *foxg1* у речной миноги (исследовано методом ОТ-ПЦР) (А) и схема зондов для гибридизации *in situ* (В).

На ранних исследованных стадиях, со стадии средней нейрулы (стадия 18) до поздней нейрулы (стадия закрытия нервной пластинки или стадия 19), гены *foxg1α* и *foxg1γ* диффузно окрашивают нервную пластинку, а экспрессия *foxg1β* не детектируется методом гибридизации *in situ* (Рисунок 80, Рисунок 81, Рисунок 82).

На стадиях 20 и 21 диффузная экспрессия *foxg1α* обнаруживается в тканях нервной пластинки и сомитов (Рисунок 80 А - Г). На стадии 22 проявляются области повышенной экспрессии в области ушных плакод и в небольшой части эктордермы, которая находится перед будущим передним мозгом (Рисунок 80 Д).

На стадии 23-24 появляется экспрессия *foxg1α* в области конечного мозга (Рисунок 80 Е). И позже, на стадиях 26-27, экспрессия *foxg1α* отчетливо выявляется во всем конечном мозге и в обонятельной плакоде (Рисунок 80 Ж-З, Рисунок 84 А). На этой стадии также выявляются зоны экспрессии *foxg1α* в области ушных пузырьков и в сенсорных ганглиях: ганглии задней латеральной линии, нижнем ганглии языкоглоточного нерва, коленчатом ганглий/переднем ганглии боковой линии. Появляется экспрессия в верхней и нижней губе и жаберных дугах. Наблюдается экспрессия в обонятельной плакоде и пинеальном органе.

На стадии 30 экспрессия наблюдается в переднем мозге, вестибуло-акустическом комплексе ганглиев и в жаберных дугах (Рисунок 1 И, К).

Экспрессия *foxg1β* впервые обнаруживается методом гибридизации *in situ* на стадии 21-22 в области ушных плакод (Рисунок 81 А - Г), в дальнейшем (стадия 23-24) – в области ушных пузырьков, плакоде тройничного нерва и в вентральном конечном мозге (Рисунок 81 Д - И). На стадии 26-27 *foxg1β* экспрессируется в вентральном конечном мозге и области ушных структур (Рисунок 81, Рисунок 84 В, Г). На стадии 30 экспрессия *foxg1β* в вентральном конечном мозге и в ушных структурах продолжается. Можно также отметить, что уровень фонового окрашивания у *foxg1β* существенно ниже, чем у *foxg1α*.

Экспрессия *foxg1γ* на стадии 21 обнаруживается в области ушных плакод (сходно с *foxg1β*) и в тонком слое эктодермы, расположенном под будущим передним мозгом (Рисунок 82 В). На стадии 22 экспрессия *foxg1γ* в головной эктодерме расширяется, захватывая область будущей верхней губы, а экспрессия в ушной плакоде продолжается (Рисунок 82 Г).

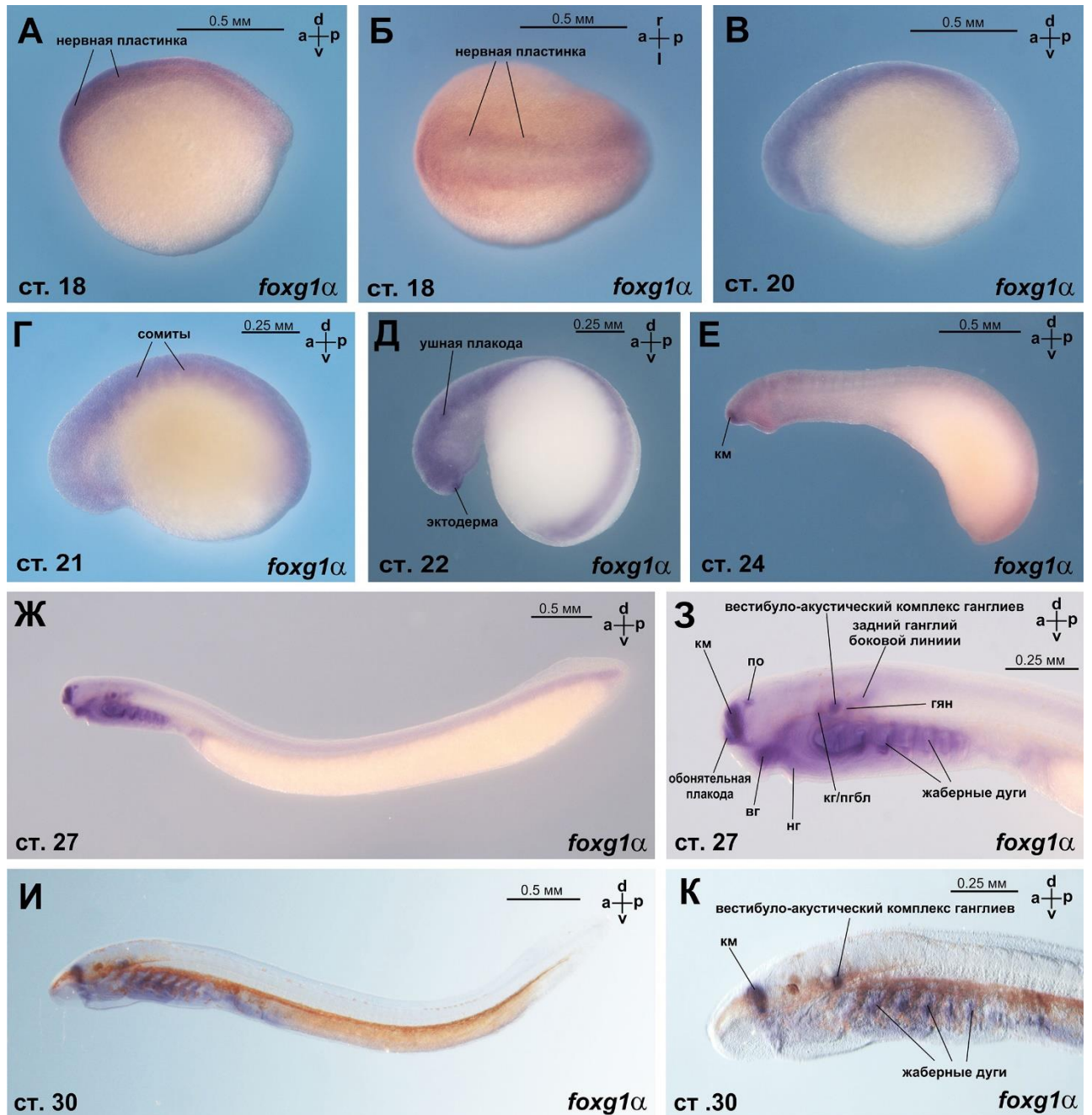


Рисунок 80. Экспрессия гена *foxg1α* у эмбрионов речной миноги *L. fluviatilis*.

вг – верхняя губа, вкм – вентральная область конечного мозга, ганг – ганглий языкоглоточного нерва, кг/пгбл – коленчатый ганглий/передний ганглий боковой линии, км – конечный мозг, нг – нижняя губа, по – пинеальный орган.

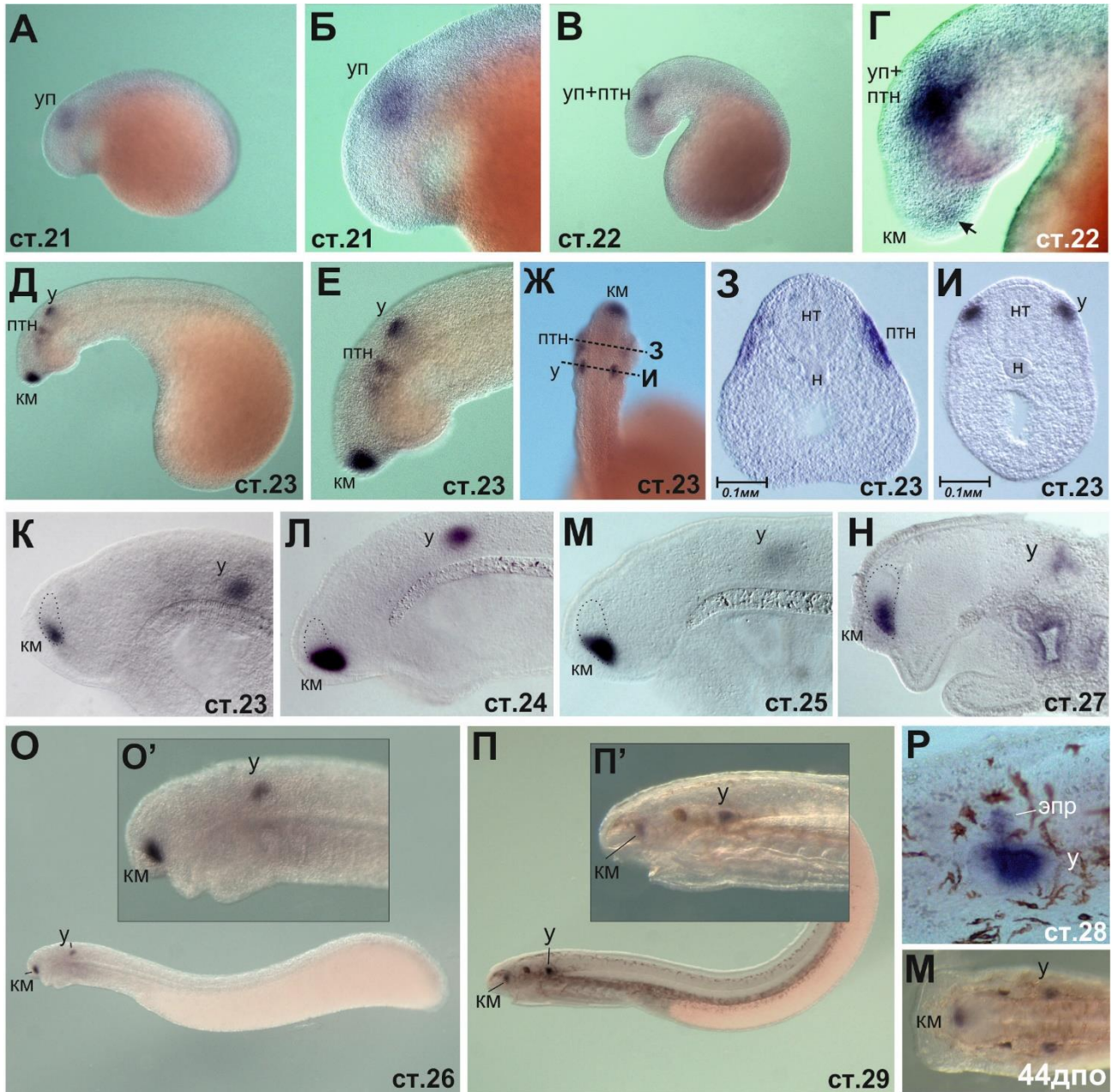


Рисунок 81. Экспрессия гена *foxg1β* у эмбрионов речной миноги *L. fluviatilis*.

дпв – дней после вылупления, гп – глазные пузыри, км – конечный мозг, птн - плакода тройничного нерва, у – ухо, уп - ушная плакода, эпр – эндолимфатический проток.

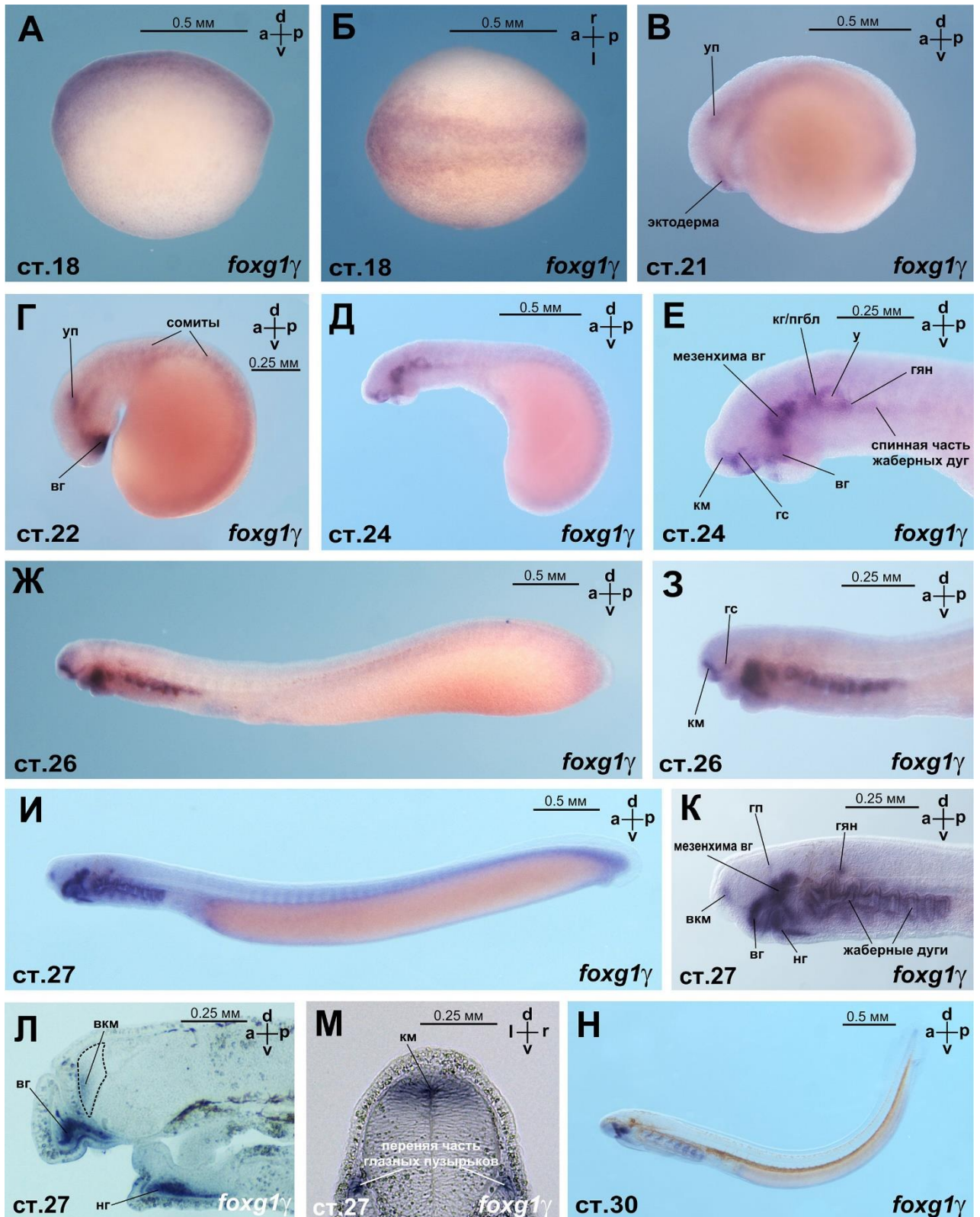


Рисунок 82. Экспрессия гена *foxg1* у эмбрионов речной миноги *L. fluviatilis*.

вг – верхняя губа, вкм – вентральная область конечного мозга, гс – глазные стебельки, гян – ганглий языкоглоточного нерва, кг/пгбл – коленчатый ганглий/передний ганглий боковой линии, км – конечный мозг, нг – нижняя губа, оп – обонятельная плакода, по – пинеальный орган.

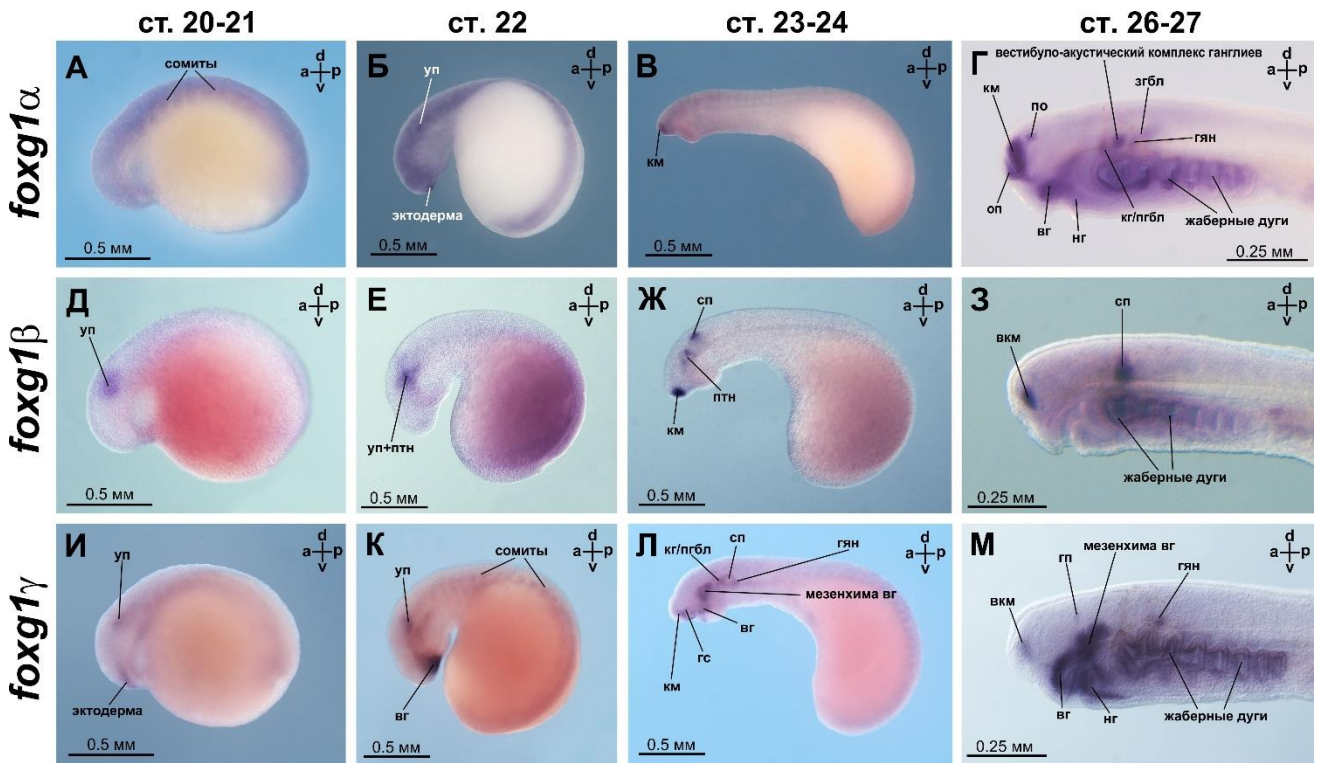


Рисунок 83. Сравнение паттернов экспрессии генов *foxg1* у эмбрионов речной миноги *L. fluviatilis*.

На стадии 23-24 начинается экспрессия *foxg1γ* в передней части конечного мозга. Слабая экспрессия *foxg1γ* наблюдается в ушных пузырьках, нижнем ганглии языкоглоточного нерва и начинает обнаруживаться экспрессия в дорзальных частях жаберных дуг (Рисунок 82 Е).

На стадии 26-27 в передней части конечного мозга и глазных стебельках *foxg1γ* экспрессируется интенсивней. Также экспрессия *foxg1γ* усиливается в дорзальных областях глоточных арок, и продолжается экспрессия в верхней и нижней губе, в ушном пузырьке и нижнем ганглии языкоглоточного нерва.

В конечном мозге, как видно на сагиттальном срезе (Рисунок 84 Д) экспрессия наблюдается в узкой самой передней части вентрального теленцефалона и в терминальной пластинке. На этой стадии появляется экспрессия в передней части глаза (Рисунок 82 М).

На стадии 30 обнаруживается экспрессия в области переднего мозга и ротового аппарата (Рисунок 82 Н).

Сравнение паттернов экспрессии трех паралога *foxg1* речной миноги на целых эмбрионах приведено на Рисунке 83. Сравнительная экспрессия генов

foxg1 на срезах головного мозга и ушных структур эмбрионов показана на Рисунке 84.

Таким образом, если классифицировать наблюдаемые паттерны экспрессии трех генов *foxg1* миног для их последующего сравнения с гомологами челюстноротых, можно отметить, что все три паралога *foxg1* миног экспрессируются в конечном мозге, хотя и в разных его участках – *foxg1β* экспрессируется в вентральной зоне теленцефалона, *foxg1γ* – в краевой зоне вентральной части теленцефалона. Экспрессия обоих генов наблюдается с 23 стадии. Ген *foxg1α* диффузно экспрессируется во всем конечном мозге, но его экспрессия начинается позже - на стадии 26. Экспрессия всех паралогов *foxg1* в области конечного мозга продолжается вплоть до стадии предличинки (стадия 30).

В ушных структурах экспрессируется только ген *foxg1β*.

В глазных структурах (глазных стебельках) экспрессируется ген *foxg1γ*.

В жаберных дугах у речной миноги экспрессируются все три паралога *foxg1*. Также все паралоги *foxg1* экспрессируются в лицевых ганглиях, но паттерны их экспрессии различаются (Рисунок 83).

В верхней и нижней губе экспрессируются гены *foxg1γ* (сильно и со слабым фоном) и *foxg1α* (слабее).

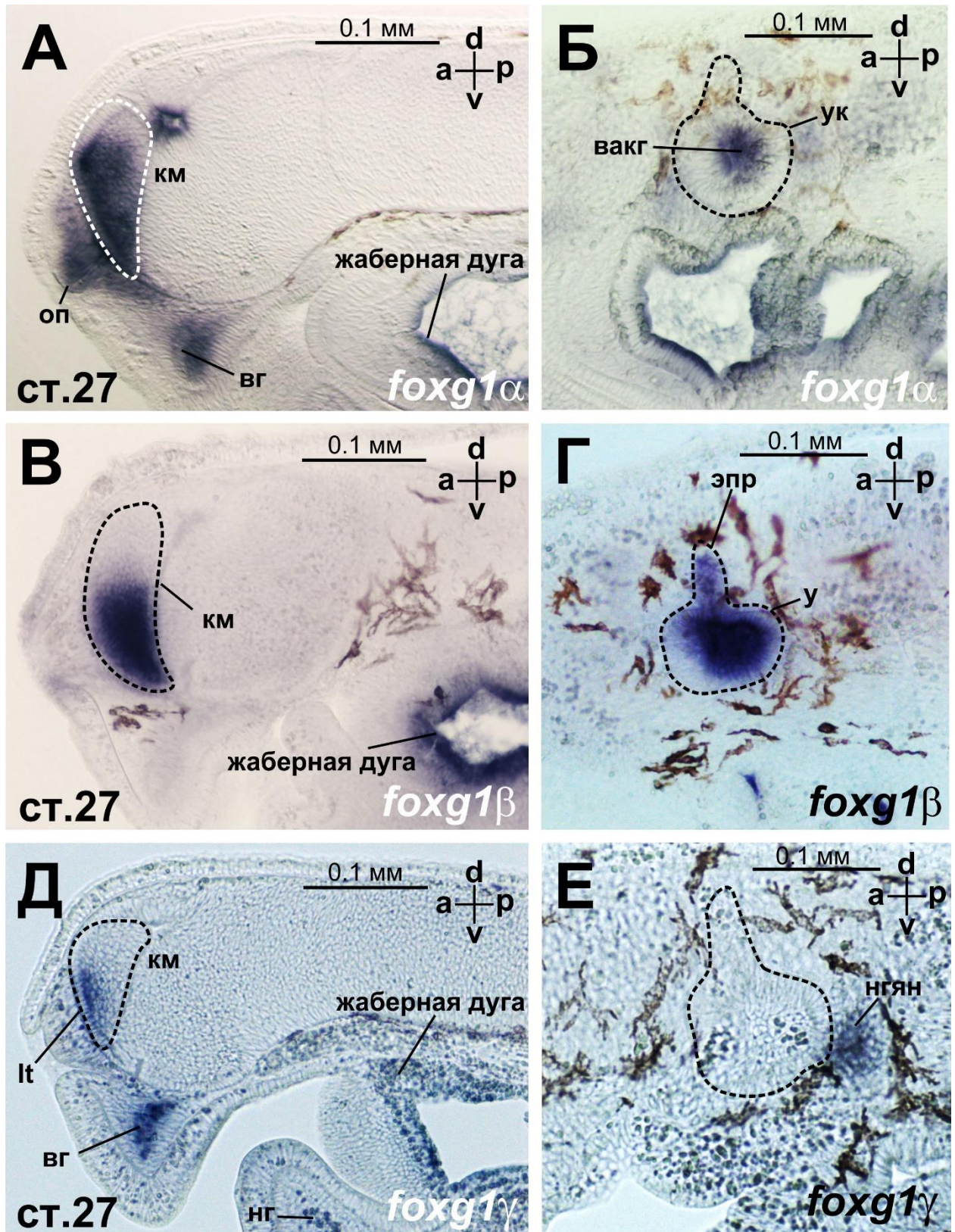


Рисунок 84. Экспрессия генов *foxg1* на сагиттальных срезах головной области речной миноги на стадии 27. А, Б – экспрессия гена *foxg1α*, В, Г – экспрессия гена *foxg1β*, Д, Е – *foxg1γ*.

вакг – вестибулярно-акустический комплекс ганглиев, ушная капсула.

2.2.1.2. Паттерны экспрессии генов *foxg1* у стерляди (*A. ruthenus*)

Исследование пространственной экспрессии *foxg1* генов у стерляди было проведено методом ISH на сериях ранних стадий развития. Два паралога генов *foxg1a* (*foxg1a* и *foxg1a'*) и *foxg1b* (*foxg1b* и *foxg1b'*) осетрообразных оказались очень сходны между собой - гомология нуклеотидных последовательностей составляет более 90%. Такая степень сходства не позволяет различить онологи *foxg1*, возникшие в результате геномной дупликации у осетрообразных методом ISH, с помощью которого исследовалась динамика пространственной экспрессия. Поэтому для проведения ISH были получены кДНК трех паралогов *foxg1* стерляди – *foxg1a* (Gene ID: 117418845), *foxg1b* (Gene ID: 117402220) и *foxg1c* (Gene ID: 117434504).

Для синтеза зондов гибридизации *in situ* были получены кДНК генов *foxg1* стерляди: зонд для гена *foxg1a* размером 1100 нуклеотидов (полная длина кодирующей последовательности гена = 1233 нуклеотида), зонд для гена *foxg1b* размером 900 нуклеотидов (полная длина кодирующей последовательности гена = 1020 нуклеотидов), *foxg1c* размером 1150 нуклеотидов (полная длина кодирующей последовательности гена = 1623 нуклеотидов), содержащие практически полноразмерные кДНК исследуемых генов.

Экспрессия *foxg1a* у стерляди обнаруживается в конечном мозге на поздней стадии нейрулы (самая ранняя из исследованных стадий). На стадиях 28–29 *foxg1a* экспрессируется в конечном мозге, обонятельных мешках и эпибранхиальных/ушных плакодах. Слабая экспрессия *foxg1a* обнаруживается в глазных пузырьках (Рисунок 85 А, Б).

На стадиях 30–33 экспрессия *foxg1a* продолжается в конечном мозге и обонятельных мешках (Рисунок 85 Е - И). Экспрессия гена *foxg1a* усиливается в глазных пузырьках. Экспрессия *foxg1a* также обнаруживается в коленчатом ганглии, слуховом ганглии и переднем ганглии боковой линии.

боковой линии, слуховом ганглии и сплетневидном ганглии (Рисунок 86 В - Ж). На стадии 35 экспрессия *foxg1b* обнаруживается в эпибранхиальных ганглиях: коленчатом ганглии и нижнем ганглии языкоглоточного нерва (Рисунок 86 З - К). На стадии 40 экспрессия *foxg1b* наблюдается в глазных пузырьках, переднем ганглии боковой линии и сплетневидном ганглии (Рисунок 86 Л - Н).

Экспрессия гена *foxg1c* на стадии поздней нейрулы обнаруживается только в ушных плакодах (Рисунок 87). На более поздних стадиях 30–31, 35 и 40, ген *foxg1c* продолжает экспрессироваться в слуховых пузырьках (Рисунок 87).

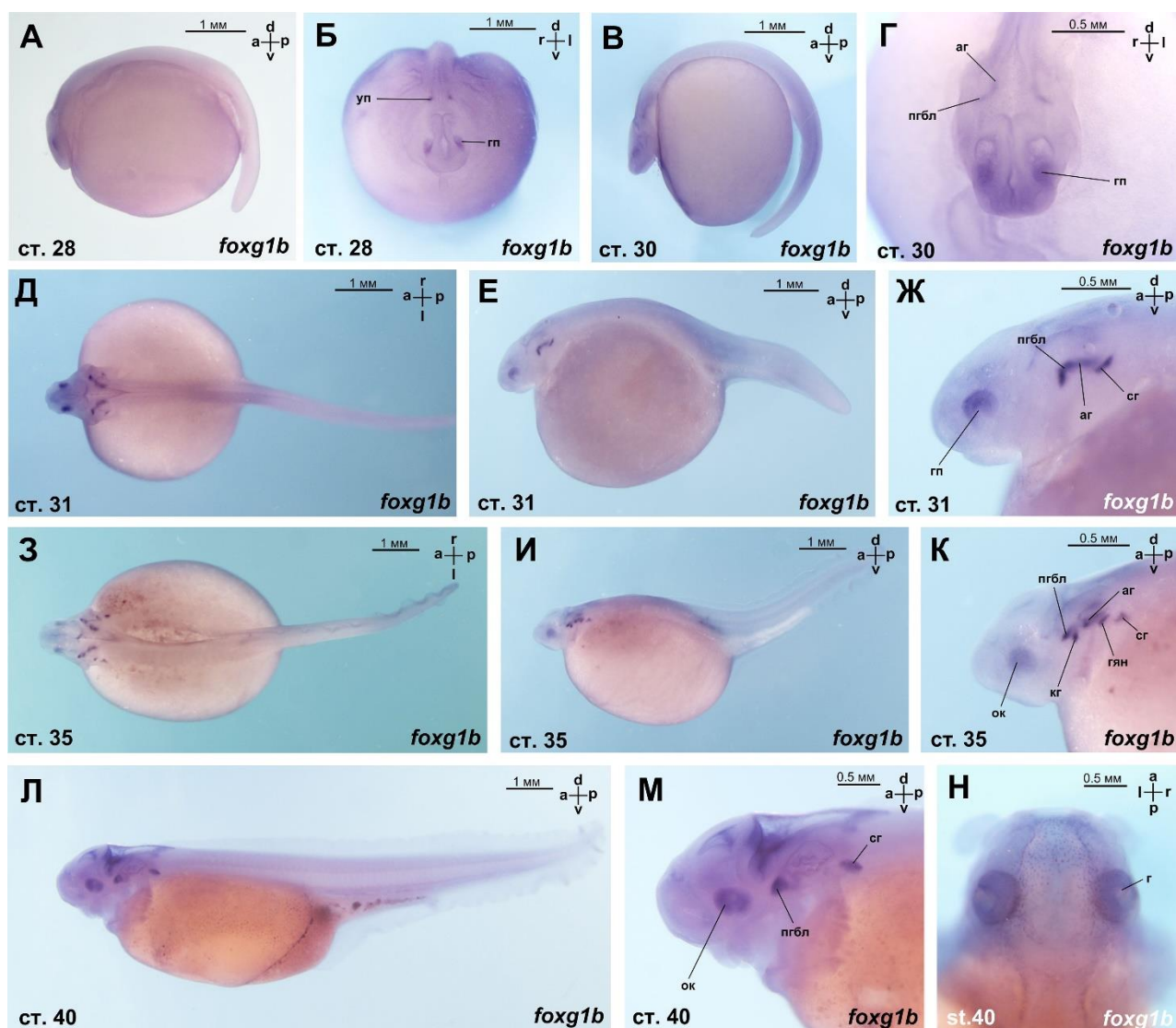


Рисунок 86. Экспрессия гена *foxg1b* у эмбрионов и предличинок стерляди (*A. ruthenus*).

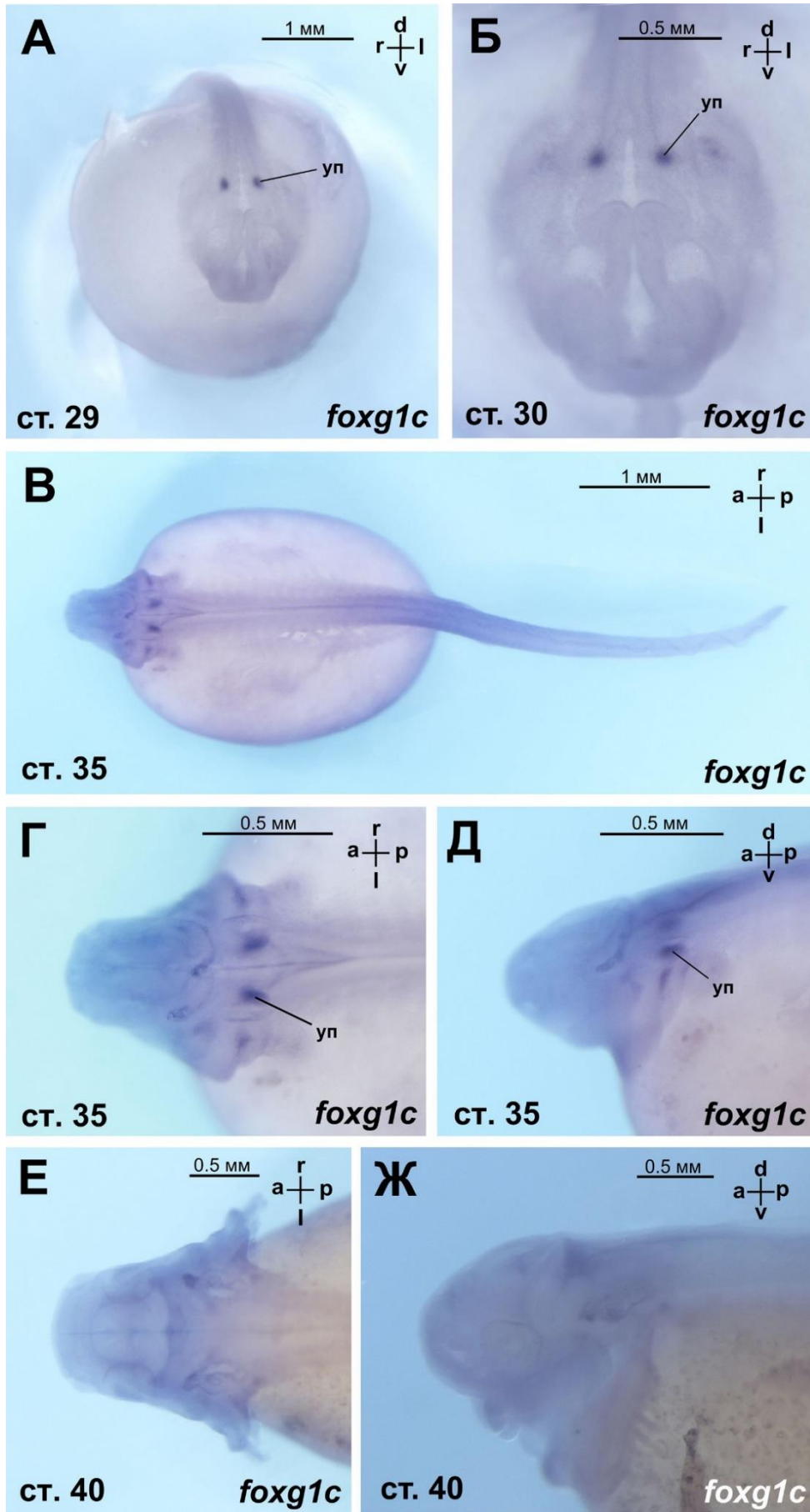


Рисунок 87. Экспрессия гена *foxg1c* у эмбрионов и предличинок стерляди (*A. ruthenus*).

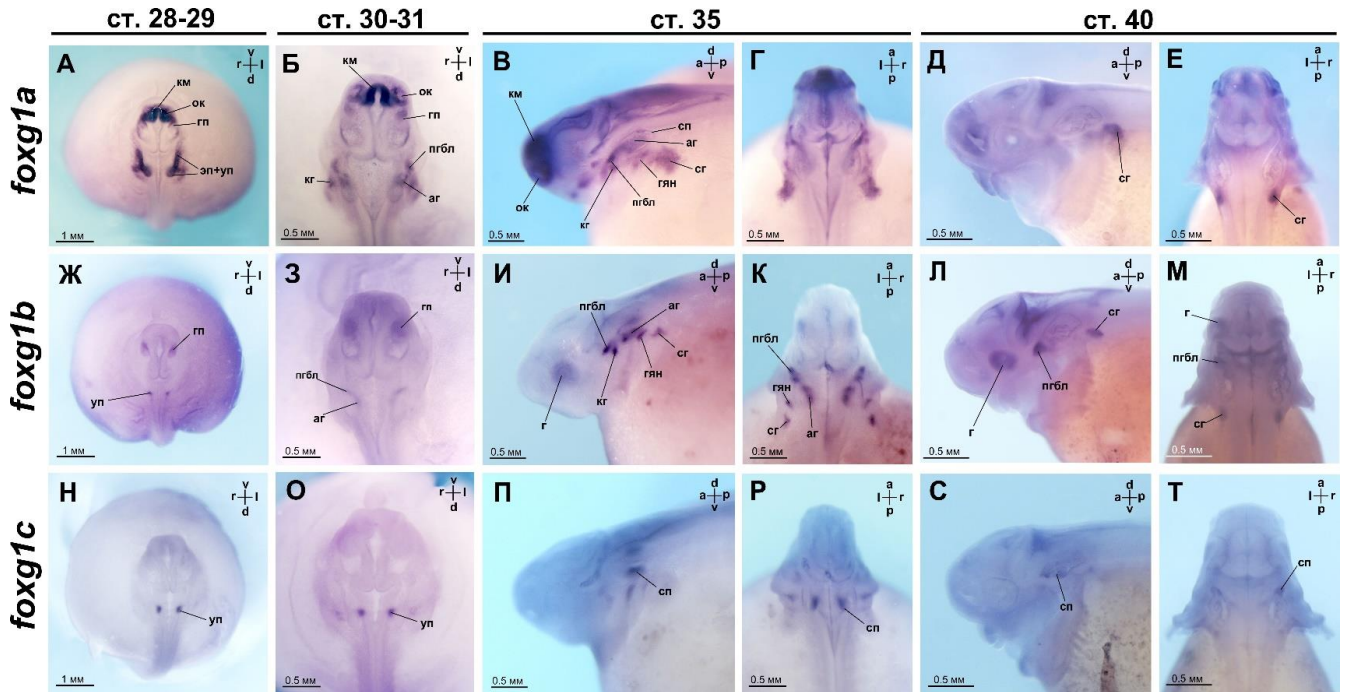


Рисунок 88. Сравнение паттернов экспрессии генов *foxg1* у эмбрионов и предличинок стерляди *A. ruthenus*.

Таким образом, в конечном мозге у эмбрионов и предличинок стерляди экспрессируется только ген *foxg1a*. Все три паралога *foxg1* экспрессируются в ушных структурах и связанных с ними ганглиях. В глазных пузырьках на ранних стадиях обнаруживается только экспрессия *foxg1b*.

Сравнивая экспрессию трех генов *foxg1* у стерляди, можно отметить, что наиболее широкий паттерн экспрессии демонстрирует *foxg1a* (Рисунок 88). Он обнаружен в конечном мозге, обонятельных мешках, зрительных пузырьках, ушных плакодах, ганглиях передней боковой линии и эпибранхиальных ганглиях.

Паттерн экспрессии *foxg1b* имеет общие черты с паттерном экспрессии *foxg1a*; однако, в отличие от *foxg1a*, *foxg1b* не экспрессируется в конечном мозге и обонятельных мешках.

Экспрессия гена *foxg1c* обнаруживается только в ушной плакоде, а затем и в глазных пузырьках.

На основании анализа особенностей экспрессии можно констатировать, что сравнение характера экспрессии гена *foxg1* у речной миноги и стерляди не позволяет достоверно установить попарную ортологию с уникальными

особенностями экспрессии ортологов, общими для обоих видов. У речной миноги все три паралога *foxg1* экспрессируются в конечном мозге, тогда как у стерляди в этой части мозга экспрессируется только *foxg1a*. В ушных плакодах на ранних стадиях формирования ушных структур как у миноги, так и у стерляди наблюдается экспрессия всех трех генов *foxg1*.

2.2.2. Оценка вероятных сроков дупликации генов *foxg1*

Наличие последовательностей дочерних генов/белков и гомологов, близких к их предковому варианту (гены/белки) ближайших родственников (ланцетников и оболочников), у которых не было геномных дупликаций, позволяет провести оценку времени разделения отдельных паралогов и сопоставить его для разных групп.

Идея и схема такого анализа представлены на Рисунке 89.

По оценке накопленных изменений последовательности гена/белка можно соотнести время появления предкового гена (а), время разделения двух дочерних паралогов (b) и их текущее состояние (с). Для генов, разделившихся давно («древних» дупликаций) и недавно («новых» дупликаций) соотношения отрезков ab и bc будут различаться. Это можно оценить на примере сравнения гомологов *foxg1* костистых рыб, которые претерпели три раунда дупликаций – 2 общих с остальными челюстноротыми и третий раунд, специфичный для костистых рыб. Как следует из анализа филогении и синтении, паралоги *foxg1a*, *foxg1b/d* и *foxg1c* появились в результате древних общих полногеномных дупликаций – первый раунд привел к появлению двух генов: *foxg1a/b/d* и *foxg1c/x*, а второй – к появлению четырех генов: *foxg1a*, *foxg1b/d* и *foxg1c* и *foxg1x*. Ген *foxg1x* впоследствии исчез. Разделение паралогов *foxg1b* и *foxg1d* произошло впоследствии - если принять, что они появились в результате ПГД в линии костистых рыб, то ее сроки оцениваются порядка 350-320 млн лет назад (Pasquer et al., 2016, Du et al., 2020). Если провести предлагаемый анализ для

генов *foxgla*, *foxglb* и *foxglc* индо-тихоокеанского тарпона (*Megalops cyprinoides*), то соотношение bc/ab для *foxgla* и *foxglb*, дублицировавшихся во втором раунде полногеномных дубликаций будет 1,23 (Рисунок 89 (I)). Для набора генов *foxglb* и *foxglc* соотношение будет другим: 0,15, что отражает появление этих генов в результате раунда дубликаций в линии костистых рыб Рисунок 89 (II).

Таким методом можно попытаться сравнить время второго раунда дубликации у бесчелюстных и челюстноротых.

Описанным методом была проведена оценка второго раунда дубликации генов *foxgl* для представителей разных групп позвоночных. Анализ включал оценку как по аминокислотным, так и по нуклеотидным последовательностям. Во все случаях соотношение bc/ab оказалось больше 1, что, по аналогии с дубликациями у костистых рыб соответствует сценарию (I), то есть древней дубликации. При оценке по ДНК в качестве внешнего гена был включен как ген *foxgl* ланцетника *Branchiostoma floridae*, так и асцидии *Ciona intestinalis*. Во всех случаях оценки оказались сопоставимы.

При аминокислотном анализе соотношения bc/ab у миног оказалось примерно в 2-3 раза выше, чем у челюстноротых, что с точки зрения формальной логики метода свидетельствует о более древней дубликации у бесчелюстных, но вероятно, может и отражать аминокислотную специфику генов миног («миножий диалект»), в силу чего они в филогенетическом анализе сближаются друг с другом уверенней, чем с ортологами в других группах.

Очевидно, результаты данного анализа носят оценочный характер и позволяют провести приблизительную оценку тайминга рассматриваемых дубликаций. Исходя из полученных соотношений, можно говорить о том, что при принятии сценария независимых дубликаций *foxgl* генов у бесчелюстных и челюстноротых можно говорить не о недавних, а о древних

дупликациях, имевших место на ранних этапах формирования генотипа обеих линий.

При этом, согласно полученным результатам, не было обнаружено уверенной попарной ортологии между отдельными генами *foxg1* бесчелюстных и челюстноротых, которая могла бы свидетельствовать в пользу гипотезы одного или двух раундов общей ПГД до разделения этих эволюционных линий. Образование трех паралогов *foxg1* могло с сопоставимой вероятностью произойти по каждому из сценариев.

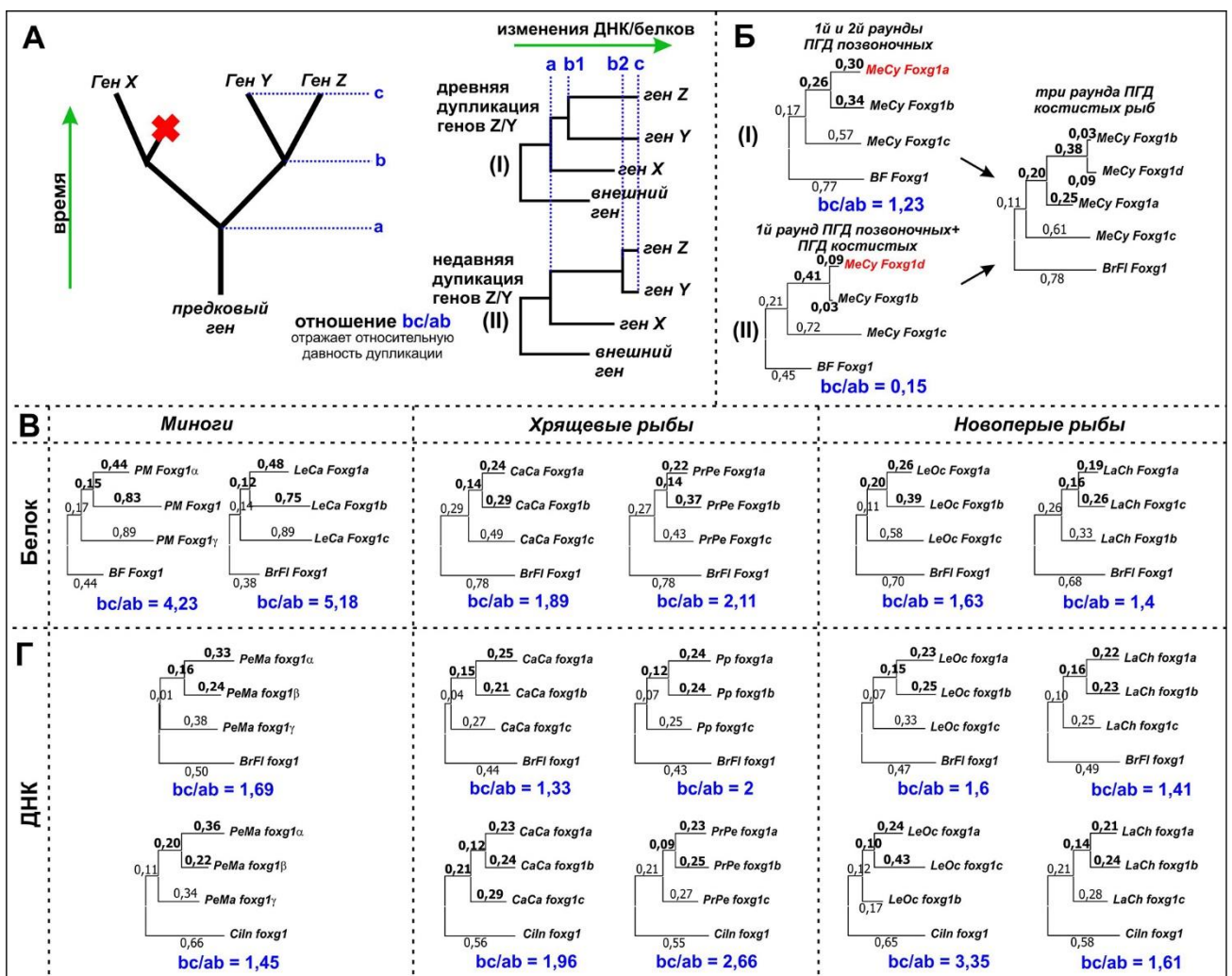


Рисунок 89. Приблизительная оценка сроков второго раунда дупликации генов *foxg1* у представителей разных групп позвоночных.

2.2.3. Филогения генов *foxg1* осетрообразных соответствует модели предковой геномной дупликации с последующей асинхронной редиплоидизацией

Как уже упоминалось, вопрос сроков геномной дупликации в линии осетрообразных остается на сегодняшний день дискуссионным. Рассматриваются два вероятных сценария: 1) дупликация на уровне общего предка осетрообразных (то есть общая для сестринских ветвей *Polyodon* и *Acipenser*) и 2) независимые дупликации в каждом из этих родов (Рисунок 90). Первый сценарий описан в качестве модели предкового разрешения онологов (Ancestral Ohnologue Resolution (AOR)), а второй – модели специфичного для линии разрешения онологов (Lineage-specific Ohnologue Resolution (LOR, по Robertson et al., 2017; Redmond et al., 2023). При этом, у генов осетрообразных наблюдались филогенетические паттерны характерные как для AOR, так и для LOR моделей. Это привело к выдвижению модели предковой дупликации с последующей асинхронной редиплоидизацией. Поскольку процесс редиплоидизации происходит не единомоментно и может быть растянут во времени в ситуации, когда видообразование (произошедшее, к примеру, в силу экологически причин) застаёт его «на полпути», при филогенетическом анализе у генов исследуемой группы может наблюдаться сочетание паттернов кластеризации, характерных для AOR и LOR моделей (Redmond et al., 2023). Для выявления филогенетического сходства белков *Foxg1* осетрообразных в контексте исследования геномной дупликации в этой группе, нами было построено неукорененное филогенетическое дерево белков *Foxg1* представителей двух родов – *Polyodon* и *Acipenser* (Рисунок 90). В проведенном анализе видно, что белки *Foxg1a/Foxg1a'* и *Foxg1b/Foxg1b'* *Polyodon* и *Acipenser* кластеризуются по-разному. В случае *Foxg1a/Foxg1a'* белки одного рода (*Polyodon* или *Acipenser*) более сходны между собой, в то время как в случае *Foxg1b/Foxg1b'* ближе друг к другу оказываются ортологи разных родов (*Foxg1b Polyodon* и *Foxg1b Acipenser* с одной стороны и *Foxg1b' Polyodon* и

Foxg1b' *Acipenser* с другой). Паттерн кластеризации Foxg1b указывает на то, что редиплоидизация генов *foxg1b* и *foxg1b'* произошла до дивергенции стерляди и веслоноса, в то время как кластеризация Foxg1a свидетельствует в пользу независимой редиплоидизации *foxg1a* и *foxg1a'* у двух родов осетрообразных.

Таким образом, паралоги *foxg1* осетрообразных демонстрируют весь спектр возможных сценариев редиплоидизации, включая элиминирование дополнительной копии. Ген *foxg1c* редуцировался путем элиминирования второй копии, гены *foxg1b* редуцировались на уровне общего предка *Polyodon* и *Acipenser* (AOR модель), а гены *foxg1a* редуцировались у *Polyodon* и *Acipenser* независимо (LOR модель) (Рисунок 90).

Дупликация генов *foxg1b* до разделения линий *Polyodon* и *Acipenser* подтверждает геномную дупликацию, произошедшую на уровне общего предка осетрообразных.

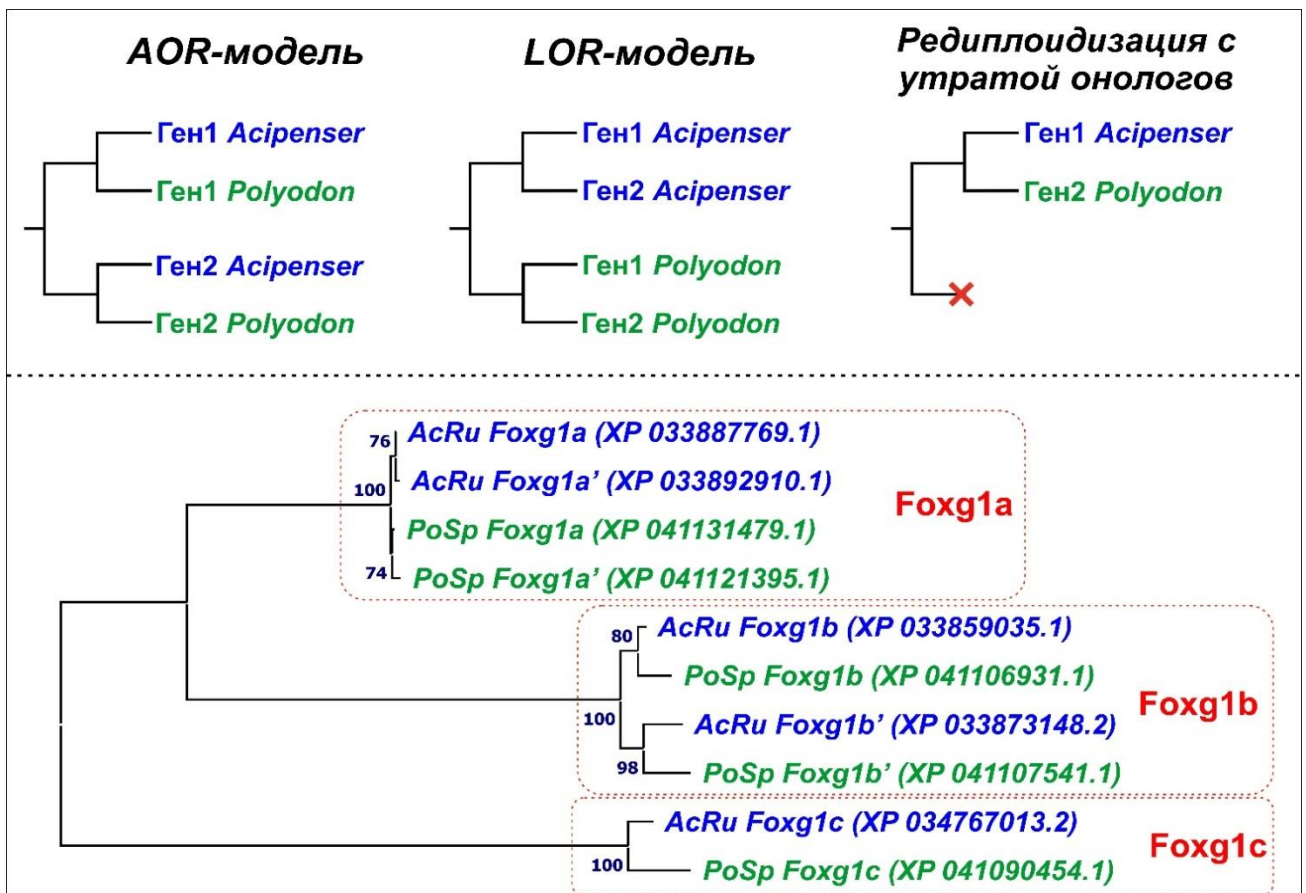


Рисунок 90. Предложенные модели разрешения ортологов и их разнообразие, наблюдаемое на филогенетическом дереве генов *foxg1* осетрообразных.

2.3. Исследование связи появления генов класса *Anf* с возникновением конечного мозга

Одна из задач работы состояла в поиске и исследовании генов класса *Anf* у миног, как представителей бесчелстных – эволюционной ветви позвоночных, у которых впервые в эволюции конечный мозг появляется в качестве морфологической структуры. Гипотеза о вероятном вкладе нового гена *Anf* в возникновение конечного мозга была выдвинута ранее, однако, ген *Anf* не был обнаружен у миног.

Этот раздел работы подробно представлен в статьях:

Bayramov et al., 2016, <https://doi.org/10.1038/srep39849>

Bayramov et al., 2017, <https://doi.org/10.1134/S1062360417040026>

2.3.1. Появление гена *anf* по времени соответствует возникновению конечного мозга

Сложноструктурированный конечный мозг является одной из особенностей современных позвоночных. Впервые в эволюции конечный мозг, как морфологическая структура, появляется у бесчелюстных (миног и миксин) (Рисунок 91). Согласно проведенным ранее исследованиям, одним из ключевых регуляторов развития конечного мозга является ген *anf*. Ген *anf* был открыт ранее у шпорцевой лягушки в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН в 1992 году и были проведены исследования его роли и механизмов регуляции его экспрессии в раннем развитии позвоночных (Zaraisky et al., 1992; Zaraisky et al., 1995; Kazanskaya et al., 1997).

Исследования генов класса *Anf* у амфибий позвоночных показали, что в клетках зачатка переднего мозга белок *Anf* играет роль специфического репрессора транскрипции, подавляя экспрессию генов, индуцирующих дифференцировку задних отделов мозга (Ermakova et al., 1999; Eroshkin et al., 2002; Martynova et al., 2004; Bayramov et al., 2004; Ermakova et al., 2007). На основании этих данных, а также учитывая тот факт, что, с одной стороны

гены класса *Anf*, специфично экспрессируются у всех исследованных позвоночных в клетках зачатка переднего мозга на самых ранних стадиях его развития, а с другой - отсутствуют у всех исследованных беспозвоночных, было сделано предположение, что возникновение этих генов у предков позвоночных могло послужить одной из ключевых предпосылок к возникновению переднего мозга (Ermakova et al., 2007). Согласно этой гипотезе, репрессорная активность *Anf* в ростральной 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 отделов нервной системы. В результате эта ростральная зона нейрального зачатка, экспрессирующая *Anf*, получила свободу эволюционировать в новом направлении, что и привело, в конце концов, к образованию переднего мозга.

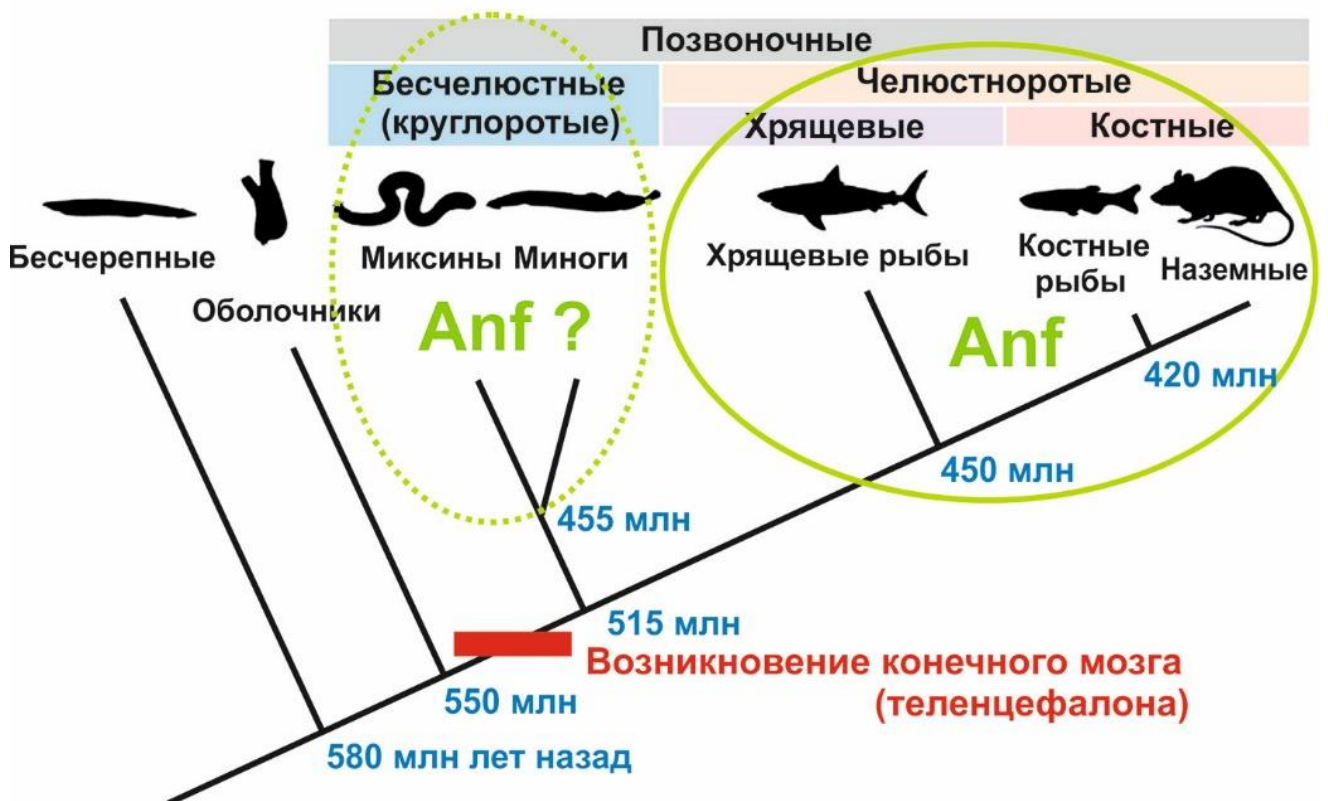


Рисунок 91. Возникновение переднего мозга в эволюции хордовых (в схеме использованы данные и временные оценки Marlétaz et al., 2023; Yu et al., 2024, и Sugahara et al., 2013). Гомеобоксные гены класса *Anf* описаны у всех высших позвоночных, но пока не обнаружены у бесчелюстных.

Для доказательства этой гипотезы был предпринят поиск гомолога *anf* у миног, как представителей самой эволюционно древней группы позвоночных – бесчелюстных. Как показано на Рисунке 91, согласно современным оценкам, разделение ветвей беспозвоночных хордовых (ланцетников и оболочников) и позвоночных произошло в эволюции около 550-580 млн лет назад, а эволюционная ветвь, ведущая к современным миногам и миксинам отделилась от общего ствола челюстноротых позвоночных около 515 миллионов лет назад. В виду того, что гомологи гена *anf* не были обнаружены у ближайших родственников – беспозвоночных хордовых, обнаружение гена *anf* у бесчелюстных представляется важным аргументом в поддержку гипотезы о роли появления гена *anf* в возникновении конечного мозга в эволюции позвоночных.

Предположительная нуклеотидная последовательность гомеодомена Anf тихоокеанской миноги была обнаружена в базах данных по гомологии с гомеодоменом гена *anf* амфибий (Рисунок 92 А). На некотором расстоянии, в 5' области от предполагаемого гомеодомена, была обнаружена также последовательность, по ряду аминокислот совпадающая с ингибиторным доменом (так называемым Engrailed-доменом) Anf описанным у других позвоночных, а также потенциальное место начала трансляции Anf.

На основе обнаруженной в базах данных ДНК последовательности, был спроектирован ряд олигонуклеотидных праймеров (в общей сложности 8 прямых и 6 обратных праймеров) для ОТ-ПЦР с первой цепи.

Работа по получению предполагаемой кДНК *anf* миног осуществлялась на основе серии образцов тотальной мРНК эмбрионов тихоокеанской миноги *L. camtschaticum*, собранных в 2014 году в ходе экспедиции на полуостров Камчатка. Собранные серии включали в себя стадии со средней гастролы до стадии 5-7 дней после вылупления.

A

X.1. MSPALQKGSSLMENRSPSSFSIEHILGLDKKTDVASSPIIKHHRPWIECSSKGVVDGTFWQIPVIACDL

L.c.

X.1. PIQVHAVHRSEEEETKIRLEKCFGDEDRLTYKRELSWYRGRRPRTAFTRSQIEVLENVFKMNSYPGIDIR

SWYR RRPRT F SQ +LE+VF+ YPGI++

L.c.

SWYRSRRPRTSFKKSQ LLEHVFRAPYPGIELA

X.1. EELACRLGLDEDRIQIWFQNRRAKLRSHRESQFLIVKDSLSSKIQE

+ ++ R+G+DED+ +WFQNRRA++RR++RESQ V L

L.c. OSVSRRVGVDEDRV VWFQNRARMRRAYRESOLRAVATAL

Б

Сравнение Engrailed домена и гомеодомена Anf представителей разных классов позвоночных

Минога	79	: SRSSFSIASILGLVD
Акула	19	: PKGAFITDSILGLGE
Осетр	14	: RKTTFITESILGLDR
Кост. рыбы	7	: SPSVFTIDSILGLDR
Амфибии	17	: PPCSFSTESILGIER
Пресмыкающиеся	28	: PSSFSIEHILGLDK
Птицы	29	: TQCSFSTESILGLEQ
Человек	17	: STCSFSTERILGLDQ

Engrailed домен

Минога	KESWYFSRRPRTSFKKSQVILLLEHVFRAPYPGIELAOSVSRRVGVDEDRVQVWFQNRARMRRAYRESQLR	: 268
Акула	NCWYRGRRARTVFSRSQIEVLEEAFFRNCYPGIDVREOLAHKLTLDDEDRIQIWFQNRRAKLRSHHESQFL	: 161
Осетр	ALNWIIGRRPRTAFSGTQIEVLESVFRVNSYPGIDVREELACKLEDEDRIQIWFQNRRAKLRSHRESQFL	: 159
Кост. рыбы	TINWYIIGRRPRTAFSSVQIKILESVEQVNSYPGIDIREELAKKLDDEDRIQIWFQNRRAKLRSHRESQFL	: 145
Амфибии	ELSWYRGRRPRTAFTRSQIEILENVFRVNSYPGIDVREELASKLALDEDRIQIWFQNRRAKLRSHRESQFL	: 175
Пресмыкающиеся	ELSWYRGRRPRTAFTRNQIEILESVEFRVNSYPGIDVREELAKLDLDEDRIQIWFQNRRAKLRSHRESQFL	: 183
Птицы	ELSWYRGRRPRTAFTRNQIEVLENVFKMNSYPGIDIREELARKLDLEEDRIQIWFQNRRAKLRSHRESQFL	: 184
Человек	ELSWYRGRRPRTAFTRNQIEVLENVFRVNSYPGIDIREELAKLNLEEDRIQIWFQNRRAKLRSHRESQFL	: 173

Гомеодомен

В

Распределение GC нуклеотидов в последовательности Lanf (%)



Рисунок 92. А - Фрагменты геномных библиотек *L. camtschaticum* (синим), гомологичные последовательности Xanf-1 шпорцевой лягушки *X. laevis* (черным).

Б - Сравнение аминокислотных последовательностей гомеодомена и Engrailed домена Anf *L. camtschaticum* с последовательностями белков Anf представителей других классов позвоночных.

В – процентное содержание GC-пар в нуклеотидной последовательности гена *lanf* *L. camtschaticum*

Важной особенностью как ДНК, так и РНК миног, является повышенное содержание GC пар. Кроме того, ДНК содержит много GC-богатых участков, образующих шпильки, затрудняющие движение полимеразы по матрице. В связи с этим, для ПЦР использовался специальный буфер для GC богатых матриц полимеразы Encyclo (компании Evrogen), а также приходилось использовать повышенное число циклов репликации. Кроме того, для повышения специфичности использовался ступенчатый ПЦР (последовательный ступенчатый переход с внешних праймеров на внутренние (nested PCR)).

Только применение всех этих модификаций ПЦР методики позволило получить сначала фрагмент (гомеодомен) кДНК *anf*, а потом и его полную последовательность. Как было выяснено, при последующем секвенировании полученной кДНК, дополнительная сложность, касающаяся уже непосредственно кДНК *anf* состояла в том, что в области 315-415 нуклеотидов от старта трансляции кДНК *Anf* содержит GC богатую шпильку, которая существенно затрудняет как ПЦР, так и секвенирование (Рисунок 92 В). Возможно, отчасти этим объясняется тот факт, что при первичном секвенировании генома морской миноги *P. marinus* в 2013 году ген *anf* обнаружен не был (Smith et al., 2013).

В результате применения ПЦР с описанными модификациями, была получена предположительная последовательность гена *anf* тихоокеанской миноги.

Проведенный анализ аминокислотной последовательности показал, что гомеодомен Anf *L. camtschaticum* (Lanf – lamprey anf) обнаружил высокую

степень сходства (75-85 %) с гомеодоменами белков *Anf* представителей других классов позвоночных и при построении филогенетического дерева располагается ближе к белкам *Anf*, чем к другим гомеобоксным белкам (Рисунок 92 Б). Взаимное расположение репрессорного *Engrailed* домена (ближе к N-концу белка) и гомеодомена (ближе к C-концу белка) *Lanf* также характерно для других представителей семейства *Anf*.

Экзон-интронная организация гена *lanf*, проанализированная по базе данных полногеномных последовательностей (WGS contigs) помощью BLAST также сходна с таковой для других генов *anf* – рамка считывания *lanf*, состоящая из четырех экзонов, разбита тремя интронами, два из которых приходится на гомеодомен. В совокупности, эти данные доказывают, что ген, кДНК которого была получена методом ПЦР действительно относится к семейству *Anf*.

Полученная кДНК *lanf* была клонирована в экспрессионный вектор pCS2.

С учетом полученной последовательности *anf* *L. camchaticum* были спроектированы праймеры и клонированы гены *anf* двух других видов миног - речной миноги *L. fluviatilis*, относящиеся к подсемейству *Lampetrinae* и морской миноги (*P. marinus*), относящейся к подсемейству *Petromyzontinae*. Это позволило подтвердить неслучайность обнаружения гена *Anf* у миног, а с другой – оценить консервативность последовательностей этого гена у миног разных подсемейств.

Для клонирования гена *anf* *P. marinus* были использованы образцы тотальной мРНК этого вида, любезно предоставленные Кучерявым А.В.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков *Anf* разных классов челюстноротых и трех видов миног представлен на Рисунке 93 А, Б. Белки *Anf* у проанализированных видов миног очень консервативны: гомеодомен *Anf* морской миноги содержит лишь одну замену в сравнении с другими видами, а домен *Engrailed* у всех трех белков полностью совпадает.

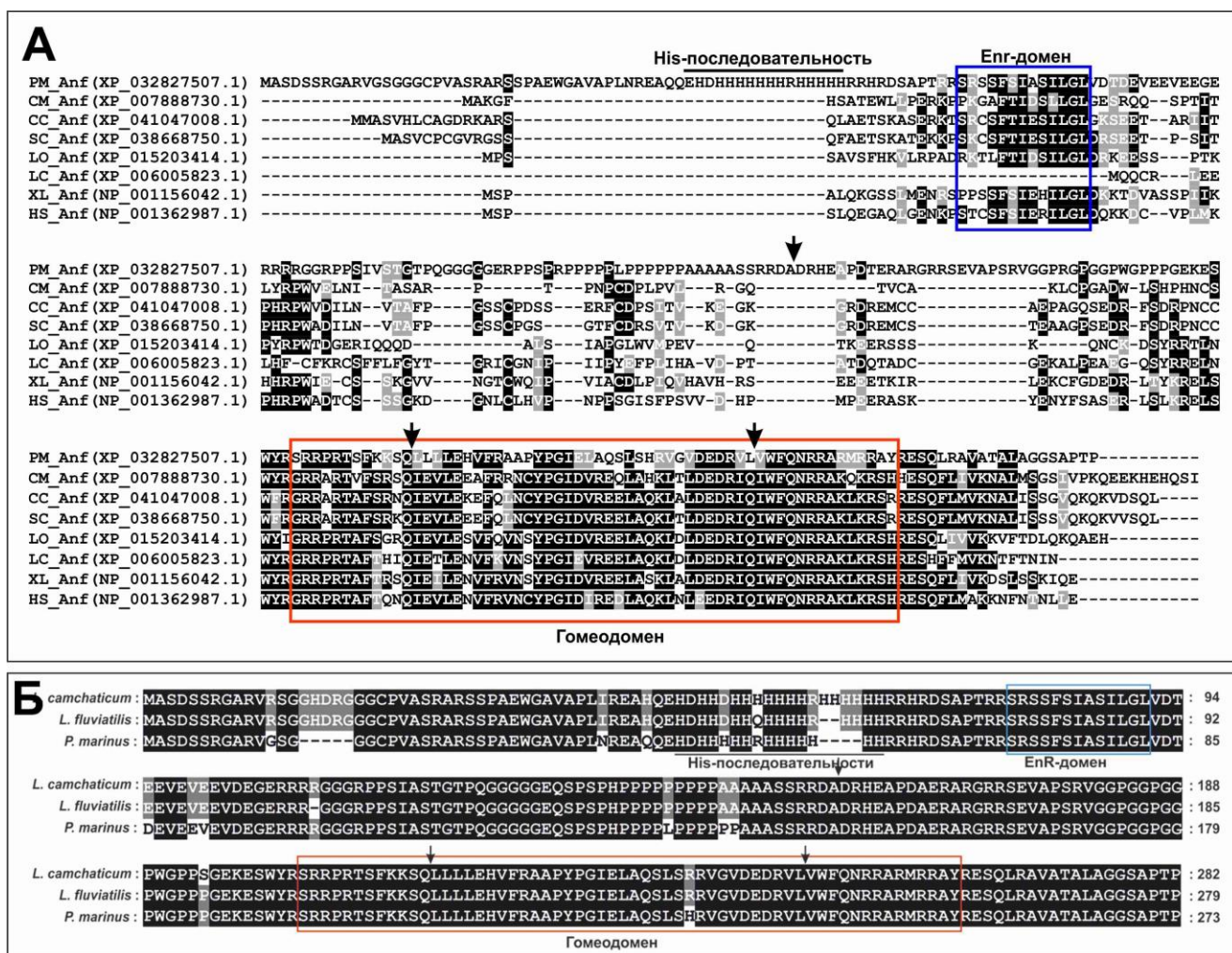


Рисунок 93. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков Anf представителей разных классов челюстноротых (А) и трех родов миног (Б).

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

2.3.2. Филогенетический анализ белков Anf позвоночных

На основе полученных последовательностей гомеодоменов было филогенетическое дерево последовательностей разных классов гомеодоменных белков у широкого спектра исследованных живых организмов (позвоночных и беспозвоночных) (Рисунок 94). Эта диаграмма подтвердила, что обнаруженные гены и кодируемые ими белки миног действительно принадлежат к классу Anf. При этом, белки класса Anf по последовательности гомеодомена занимают промежуточное положение между двумя большими классами гомеодоменных белков – ANTP

(Antennapedia) и PRD, что, возможно, отражает эволюционное происхождение генов класса Anf в результате гибридизации двух генов этих разных классов (Рисунок 95).

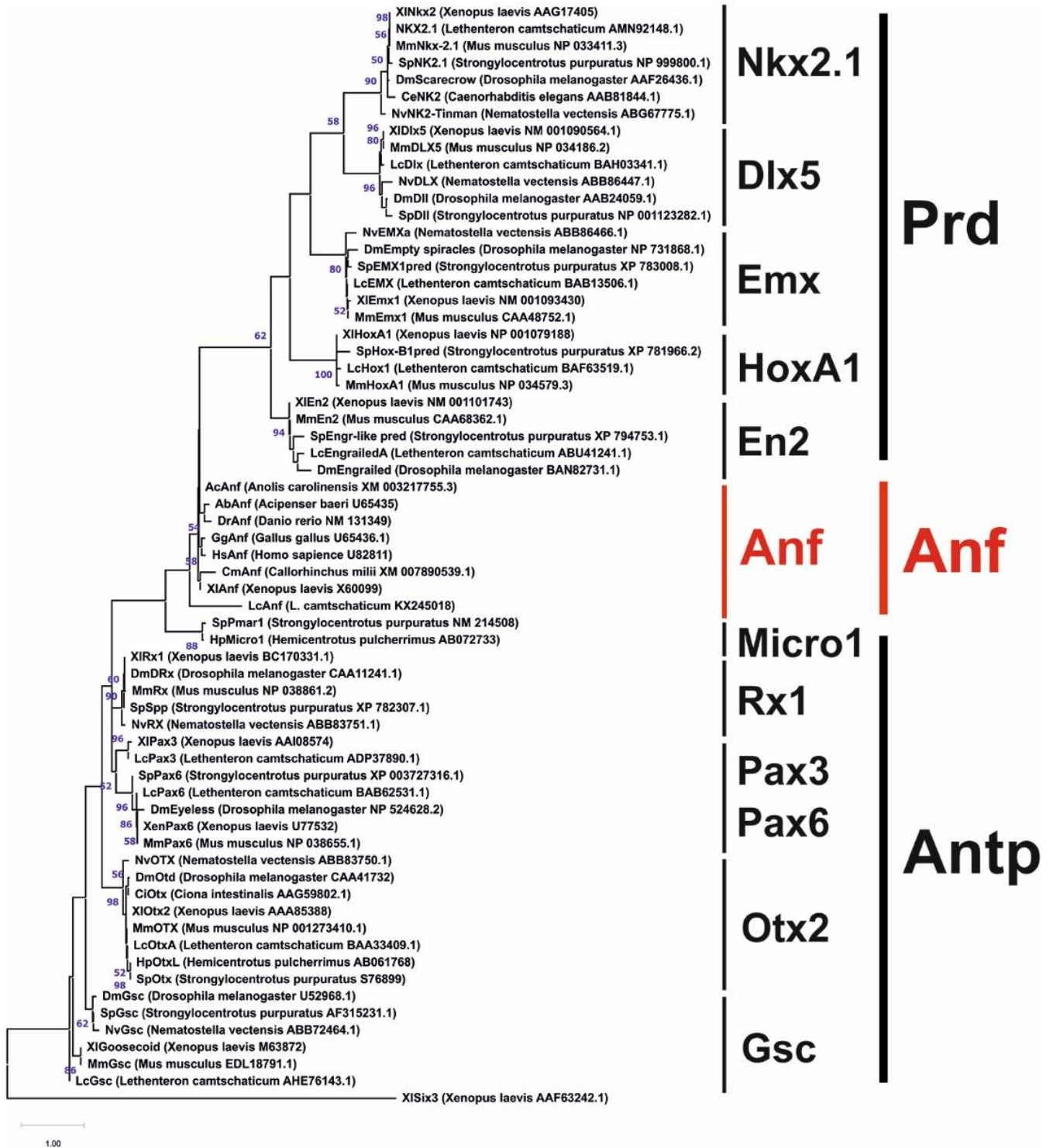


Рисунок 94. Филогенетический анализ последовательностей гомеодоменов разных классов гомеодоменных белков.

Филогенетический анализ полных последовательностей гомеодоменных белков класса Anf, Prd и Antp представлен на Рисунке 96. В проведенном анализе белки этих классов группируются в три разных кластера.

По аналогии с анализом белков Foxg1 осетрообразных, у которых описана специфическая для группы геномная дупликация, был проведен анализ филогенетической кластеризации белков Anf у представителей родов *Acipenser* и *Polyodon* (Рисунок 97 А). Проведенный анализ выявил кластеризацию друг с другом паралогов каждого из видов. Аналогичные результаты были получены при анализе других филогенетически близких к Anf белков – Otx и Goosecoid (Рисунок 97 Б, В).

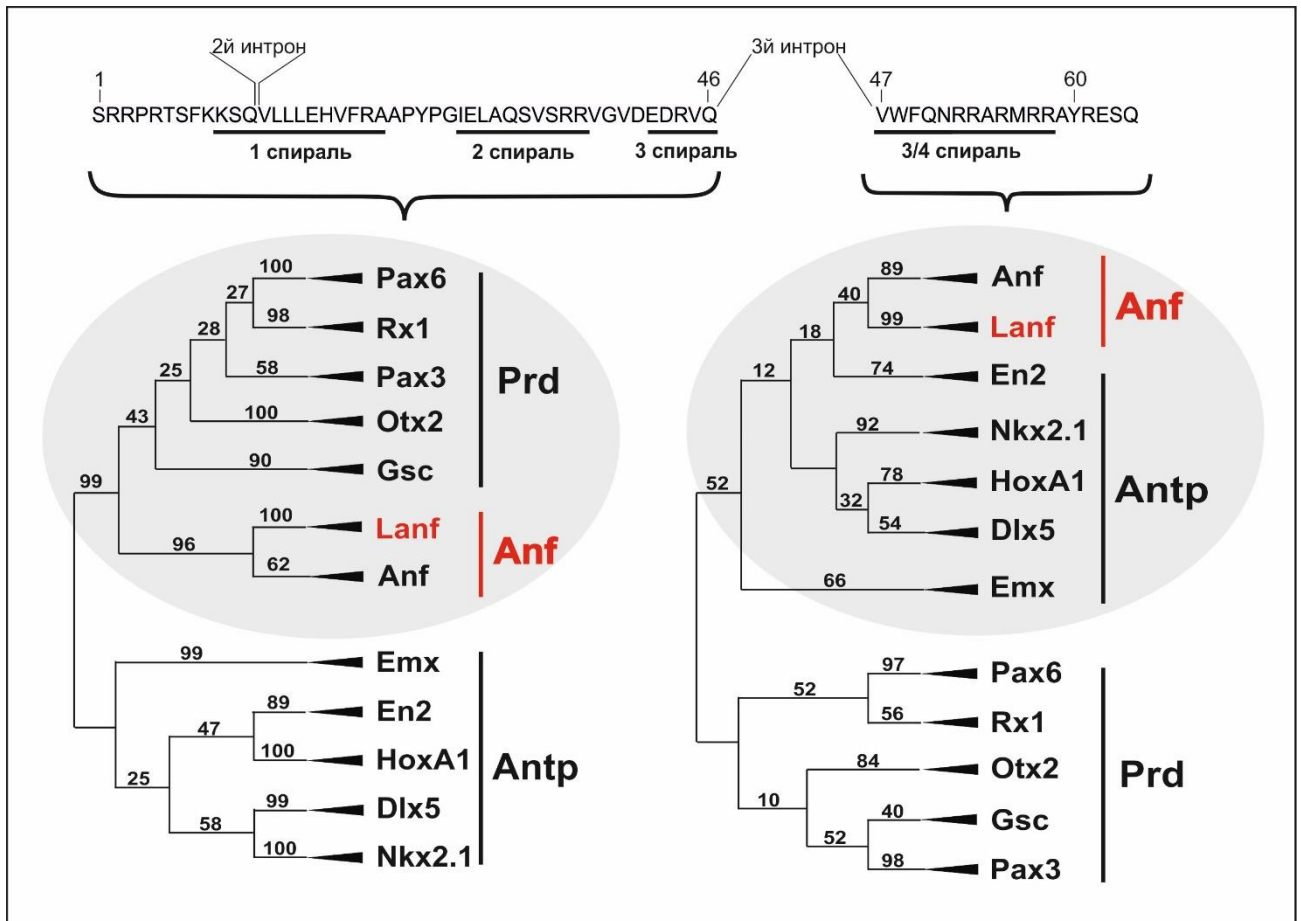


Рисунок 95. Схема филогенетического анализа N- и C-частей гомеодомена Anf с соответствующими участками гомеодоменов Antp и Prd (по Bayramov et al., 2016).

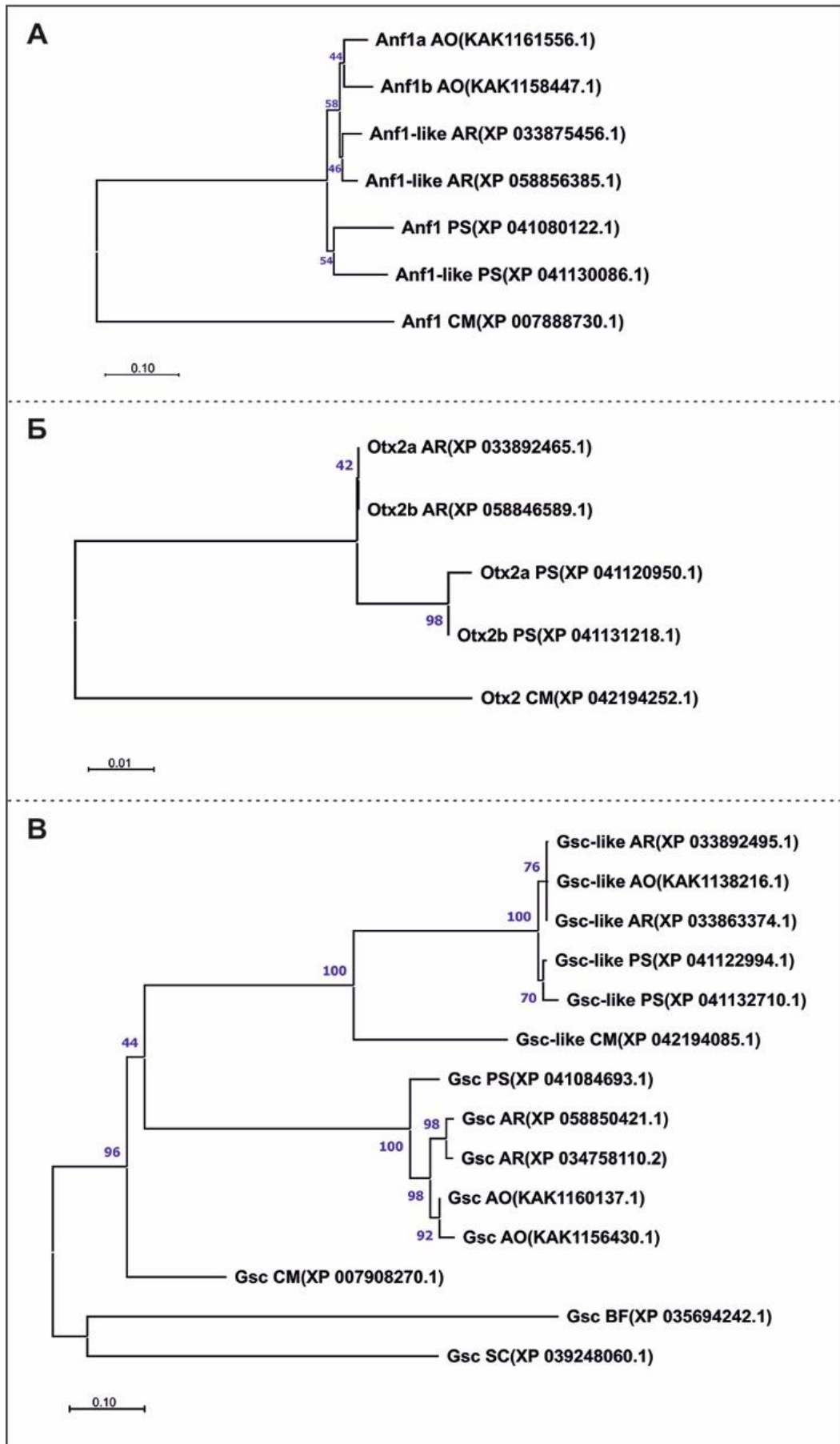


Рисунок 97. Филогенетический анализ последовательностей белков Anf, Otx2, Gsc у осетрообразных.

2.3.3. Гены *anf* миног

2.3.3.1. Экспериментальная экспрессия кДНК *anf* миног в эмбрионах *X. laevis*

Анализ первичной последовательности показал, что в белке Lanf, содержится последовательность из 13 гистидиновых аминокислот, расположенных рядом, что дало возможность оценить экспрессию полученной мРНК *lanf* с помощью коммерчески доступных гистидиновых антител. Этот эксперимент был проведен на эмбрионах шпорцевой лягушки. мРНК *lanf* была получена путем *in vitro* трансляции с помощью набора mMessageMachine (Ambion). мРНК *lanf* была микроинъецирована в развивающиеся эмбрионы шпорцевой лягушки на стадии 2 бластомеров в количестве 300-500 пг мРНК на 1 бластомер. Эмбрионы культивировались до стадии поздней гаструлы. После этого проводилось тотальное выделение белков из инъецированных эмбрионов и анализ наличия белка Lanf при помощи анти-гистидиновых антител. В качестве контролей была использована мРНК *GFP*, а также абортивная мРНК *lanf* со сбитой рамкой считывания (белок не транслируется до конца). В итоге, в образцах после инъекции мРНК *lanf* было обнаружено наличие белка, по весу примерно соответствующего белку Lanf (расчетный вес белка Lanf – 32 кДа) (Рисунок 98). О том, что данный белок является белком Lanf свидетельствует и то, что в случае абортивной мРНК *lanf* также наблюдалась экспрессия белка, узнаваемого гистидиновыми антителами, но повесу существенно более короткого (около 17 кДа).

Полученные результаты показывают наличие у тихоокеанской миноги гена *lanf*, который может быть успешно экспрессирован в эукариотической системе экспрессии. Однако этот факт не снимает вопроса о реальной активности гена *lanf* в нормальном эмбриогенезе миног.

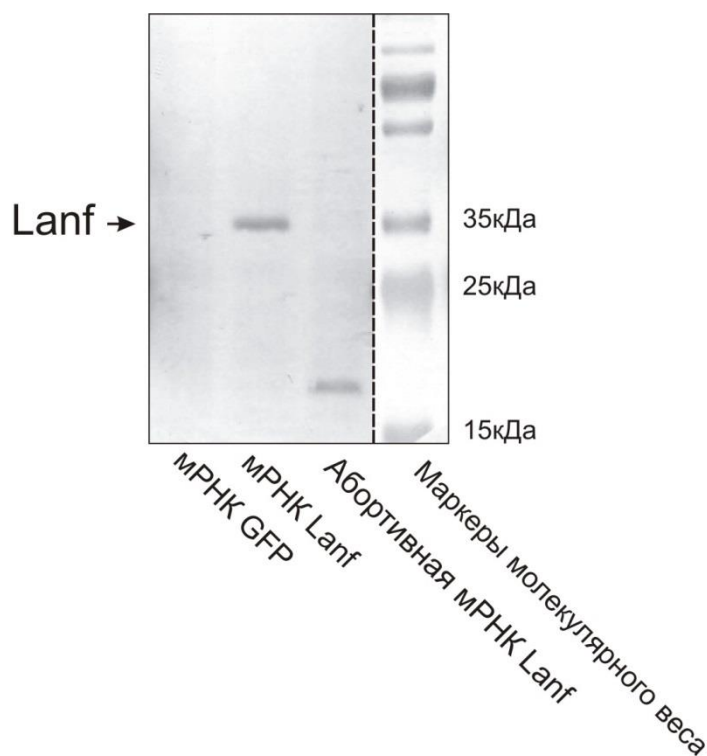


Рисунок 98. Детекция экспрессии экзогенного белка Lanf гистиридиновыми антителами.

В силу ограниченного запаса образцов мРНК *L. camtschaticum* (практически все имевшиеся образцы были израсходованы на описанные выше эксперименты) и труднодоступности (географической и сезонной) новых проб, последующие работы были проведены в лабораторных условиях на эмбрионах более доступного вида миног - речной миноги *L. fluviatilis*.

Дополнительное ограничение в работе с этим видом состоит в том, что на момент проведения работы доступных сиквенсов для него в базах данных обнаружено не было. Кроме того, получение икры в лаборатории по времени, так же как и в природе, довольно жестко лимитировано сезонностью. Начало нереста зависит от температуры, но в любом случае начинается весной или в начале лета (зависит от температурных условий) и продолжается около 2-3 недель, после чего производители погибают. Существенно растянуть процесс созревания производителей путем искусственного понижения температуры (тем самым расширив время доступности новых эмбрионов) пока не удалось. Даже при отсутствии нереста созревшие производители погибают.

В период нереста в лабораторных условиях нами были получены эмбрионы речной миноги и были собраны серии образцов мРНК разных стадий развития (от оплодотворения до стадии 4х дней после вылупления).

кДНК *lanf* *L. fluviatilis* была получена с помощью обратной транскрипции и ПЦР. Гомология последовательностей *lanf* двух видов оказалась очень высока, за исключением ряда точечных нуклеотидных замен и делеций у *L. fluviatilis*. Как показано выше (Рисунок 93) аминокислотные последовательности гомеодомена и Engrailed домена белка Anf у *L. camchaticum* и *L. fluviatilis* полностью совпадают.

Для подтверждения активной транскрипции мРНК *lanf* в нормальном развитии речной миноги был проведен анализ профиля его экспрессии методом количественного ПЦР в реальном времени на основе полученных образцов мРНК ранних стадий развития *L. fluviatilis* (Рисунок 99).

Было выявлено, что некоторое возрастание экспрессии (примерно в 2 раза по сравнению со стадией бластулы) происходит на стадии ранней гаструлы, после чего уровень экспрессии снижается. Более значительное повышение уровня экспрессии происходит на стадии поздней нейрулы, и продолжается на стадии головного выроста (стадии 21-23 по Tahara, 1988), после чего уровень экспрессии снижается на стадии 5-20 сомитов (эта стадия характеризуется также первыми движениями эмбриона). В дальнейшем уровень экспрессии остается на относительно низком уровне. Таким образом, максимум экспрессии *lanf* ограничен во времени и наблюдается на стадии поздней нейрулы – стадии головного выроста. В целом данный паттерн сходен с паттерном, наблюдаемым у шпорцевой лягушки, однако у речной миноги максимум экспрессии наблюдался на несколько более поздних стадиях.

Для оценки специфичности полученного результата было проведено сравнение профиля экспрессии *lanf* с профилями экспрессии других переднеголовных генов-маркеров, описанных у миног – *foxg1b* и *otx*. Паралог *foxg1b* был выбран для этого эксперимента в связи с тем, что согласно

проведенным (и представленным выше) исследованиям, он раньше и интенсивней других генов *foxg1* миног начинает экспрессироваться в области переднего мозга. Как было выявлено, экспрессия *foxg1b* в области переднего мозга начинается на 2-3 день формирования головного выроста (стадии 22-23 по Tahara), что достаточно точно соответствует спаду экспрессии *lanf*, а экспрессия *otx* начинается раньше *lanf*, уже на стадии ранней гастролы и в дальнейшем снижается на 3й день формирования головного выроста, т.е. на стадии максимальной экспрессии *lanf* (Рисунок 99). Проведенное сравнение с профилями экспрессии гомологов рассмотренных генов у шпорцевой лягушки обнаружило сходство в динамике экспрессии всех трех переднеголовных генов у миног и амфибий. В качестве заметного отличия можно лишь отметить сроки экспрессии *lanf* и *foxg1b* – у миног активация экспрессии этих генов происходит на сравнительно более поздних стадиях, чем у шпорцевой лягушки при том что экспрессия *otx* происходит на сопоставимых стадиях (на стадии ранней гастролы).

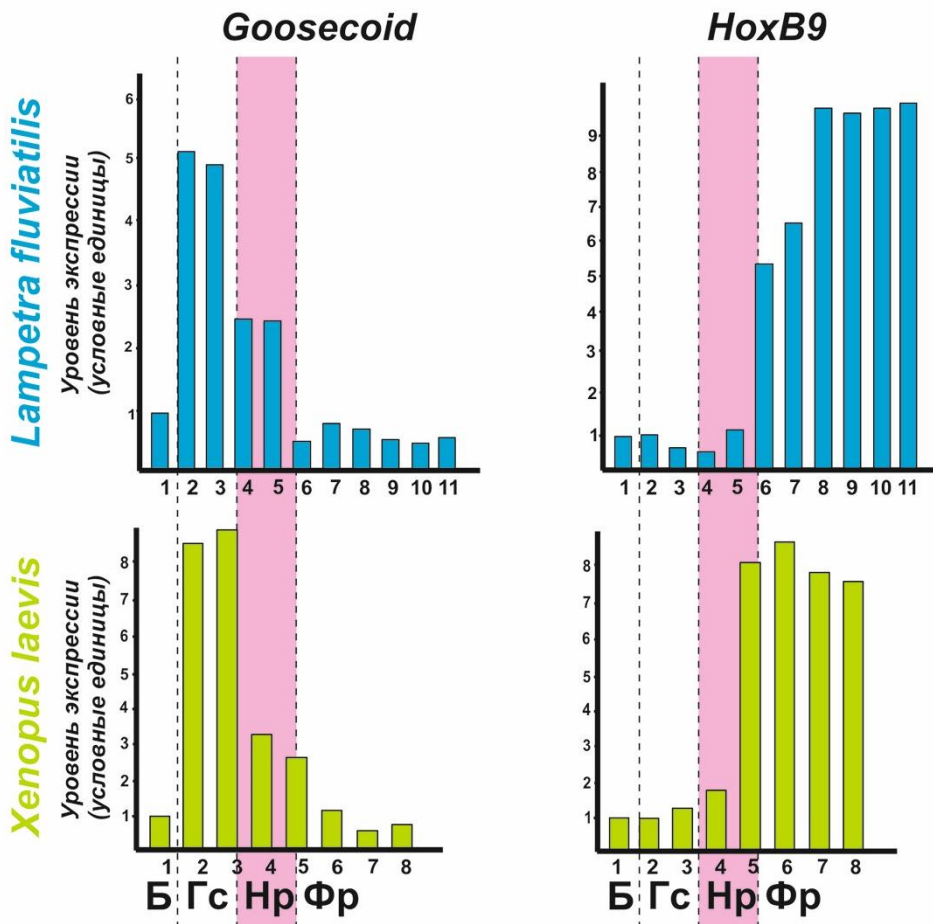
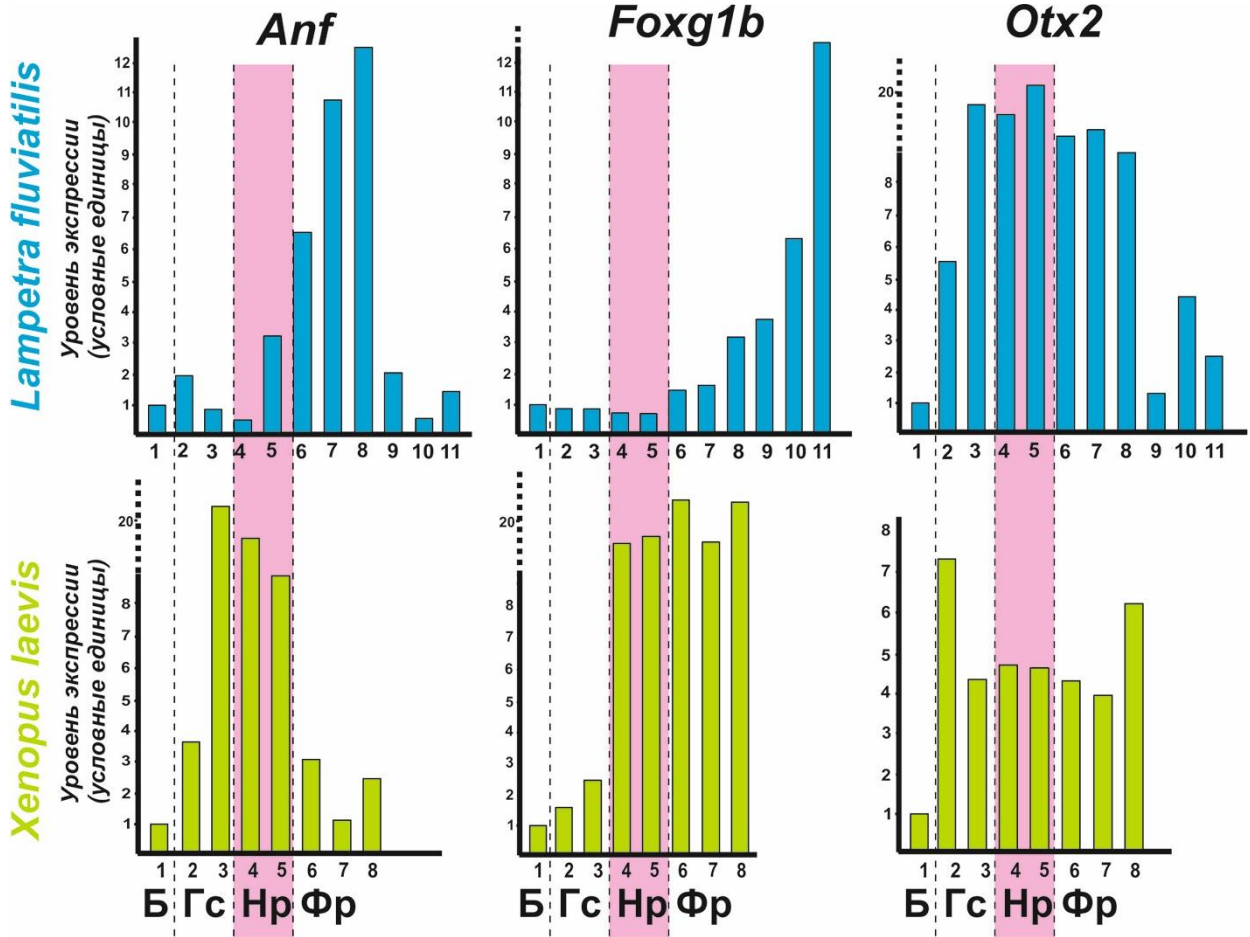


Рисунок 99. Анализ динамики экспрессии генов *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid* и *HoxB9* у речной миноги и шпорцевой лягушки, проведенный методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Обозначение проанализированных стадий развития:

<u><i>L. fluviatilis:</i></u>	<u><i>X. laevis:</i></u>
1 - бластула	1 - бластула
2 – ранняя гастрюла	2 – ранняя гастрюла
3 – поздняя гастрюла	3 – поздняя гастрюла
4 – ранняя нейрула	4 – ранняя нейрула
5 – поздняя нейрула	5 – поздняя нейрула
6 – стадия головного выроста-1	6 – стадия 20 (по Nieuwkoop and Faber, 1967)
7 – стадия головного выроста-2	7 – стадия 23 (по Nieuwkoop and Faber, 1967)
8 – стадия головного выроста-3	8 – стадия 28 (по Nieuwkoop and Faber, 1967)
9 – начало самопроизвольных движений	
10 – стадия вылупления	
11 – 3 суток после вылупления	

2.3.3.2. Анализ пространственного паттерна экспрессии *lanf* и его сопоставление с паттернами экспрессии *otx2* и *foxg1 β*

Пространственная экспрессия *lanf* была проанализирована методом гибридизации *in situ*. Этим методом не удалось обнаружить экспрессию *lanf* во время гастрюляции, вероятно, из-за его низкого уровня на этой стадии.

мРНК *lanf* была обнаружена начиная с 19 стадии в передней части зачатка головного мозга и в поверхностной эктодерме, покрывающей эту область мозга (Рисунок 100 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 100 В) (Sugahara et al., 2011). Такой паттерн экспрессии сходен с паттернами экспрессии *anf* у других исследованных позвоночных (Kazanskaya et al., 1997, Ermakova et al., 1999, Dattani et al., 1999). В ходе дальнейшего развития, экспрессия *lanf* в области презумптивного промежуточного и конечного мозга постепенно

снижается, и к стадии 22-23 остается только в ротовой эктодерме и области гипофиза (Рисунок 100 Г) (Uchida et al., 2003).

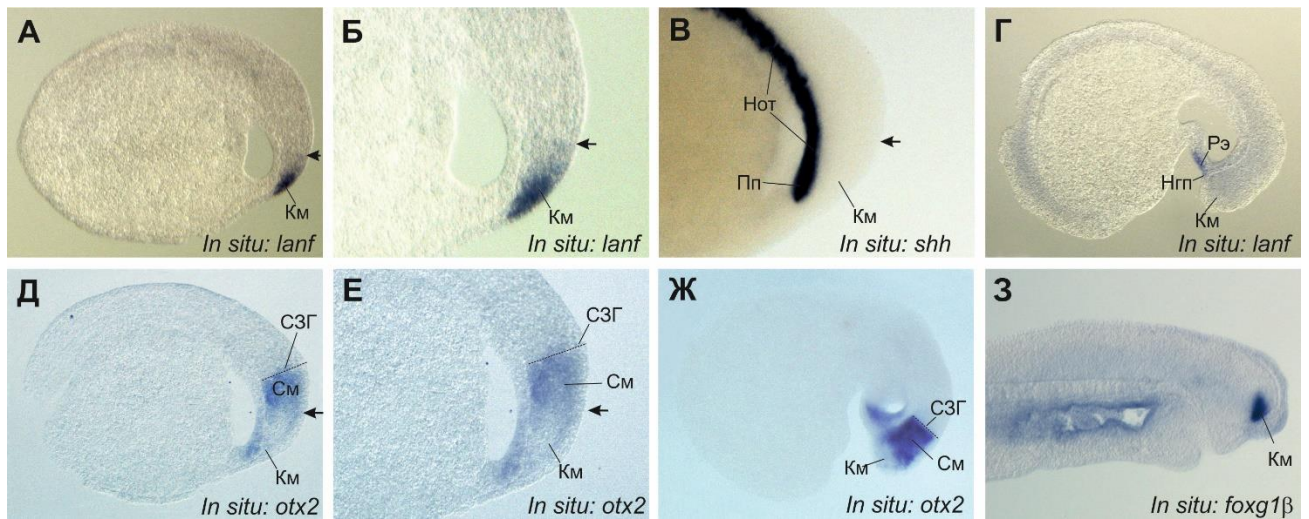


Рисунок 100. Анализ паттерна экспрессии *lanf* на сагиттальных срезах эмбрионов речной миноги (*L. fluviatilis*)

А - Б. На стадии 19 ген *lanf* (А – общий вид, Б – головной отдел крупным планом) экспрессируется в передней нейроэктодерме, в зоне, соответствующей ротовой эктодерме (Рэ) и переднему мозгу (Пм), включая презумптивный конечный мозг и промежуточный мозг. Этот регион расположен непосредственно над областью экспрессии в нотохорде *shh* (Нот) и прехордальной пластинке (Пп) (**В**).

Стрелка показывает дорзальную границу области экспрессии *lanf*. Передняя часть эмбрионов расположена справа, дорзальная - сверху.

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

Д, Е. 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.

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

З. Начиная с 23 стадии область конечного мозга (КМ) маркируется экспрессией гена *foxg1β*.

Как ранее было показано на эмбрионах шпорцевой лягушки, *anf* экспрессируется в области экспрессии *otx2*, транскрипция которого подавляется белком Anf (Ermakova et al., 2007). Как было показано, эта ингибиторная активность Anf имеет решающее значение для развития

конечного мозга, так как она позволяет регулятору и маркеру конечного мозга гену *foxg1* быть активированным на территории "очищенной" от *otx2*.

Исходя из предположения, что у миноги роль гена *anf* может быть сходной ролью с описанной ранее у шпорцевой лягушки, были сопоставлены ранние паттерны экспрессии ортологов *otx2* и *foxg1β* у эмбрионов миног. В результате, экспрессия гена *otx2* у миноги, подобно *otx2* у рыб, лягушки и мыши (Jaszai et al, 2003;. Storm et al, 2006; Ermakova et al., 2007), была обнаружена по всей передней части нервного зачатка, с минимумом экспрессии в наиболее передней области, из которой возникает конечный мозг. Важно отметить, что эта область пониженного уровня экспрессии *otx2* соответствует, как и у других видов, области экспрессии *anf* (Рисунок 100 Д, Е, Ж).

Как уже указывалось выше, экспрессия *foxg1β*, как и других паралога *foxg1*, не была обнаружена у эмбрионов миног на стадии ранней нейрулы методом гибридизации *in situ*, по всей видимости, по причине не достаточной чувствительности данного метода. Тем не менее, на более поздних стадиях экспрессия этого гена обнаруживается в области переднего мозга, то есть, области, в которой на более ранних стадиях наблюдалась экспрессия *anf* (Рисунок 100 З).

2.3.3.3. Ген *anf* миног является транскрипционным репрессором

Для подтверждения гипотезы о репрессорном характере активности Anf в зачатке конечного мозга у миног необходимо подтвердить тот факт, что белок Lanf работает как транскрипционный репрессор. Косвенно об этом свидетельствует наличие в белке Engrailed-подобного домена.

Напрямую это было показано в люциферазном тесте с использованием участка промотора гена *xanf1*, которая является мишенью своему собственному белковому продукту, и, таким образом, с высокой степенью вероятности и к белку Lanf (Eroshkin et al., 2002).

Смесь плазмиды, содержащей ген люциферазы под контролем участка промотора *xanf1* размером 2200 пар нуклеотидов с синтетической мРНК *xanf1* или мРНК *lanf* была инъецирована в эмбрионы шпорцевой лягушки на стадии 2-4-х клеток, после чего сигнал люциферазы был проанализирован на стадии средней нейрулы. В результате, как в случае мРНК *xanf1*, так и в случае мРНК *lanf* наблюдалось сильное ингибирование сигнала репортера по сравнению с контролем (смесь репортерной плазмиды с мРНК *EGFP*) (Рисунок 101). Эти результаты подтверждают способность белка Lanf выступать в качестве ингибитора транскрипции.

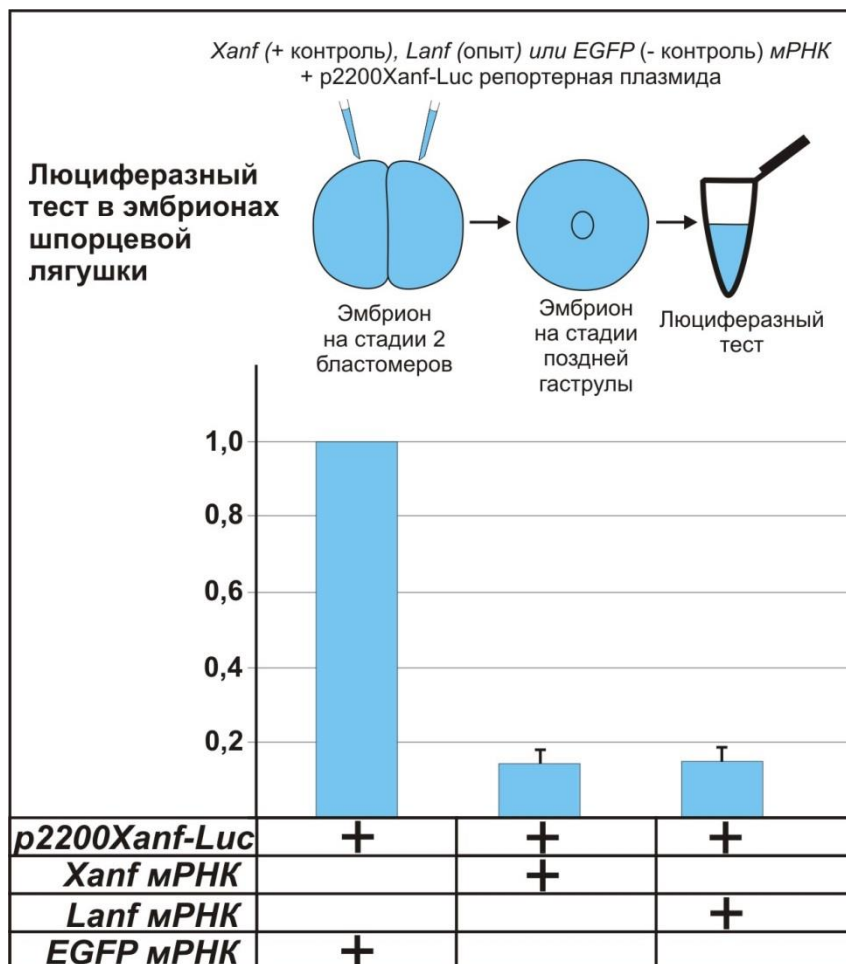


Рисунок 101. В люциферазных тестах Lanf выступает в роли транскрипционного репрессора. Будучи экспериментально экспрессируемым в эмбрионах шпорцевой лягушки (*X. laevis*), Lanf, так же, как и его ортолог у шпорцевой лягушки *Xanf1*, ингибирует экспрессию люциферазного репортера, находящегося под контролем участка промотора *xanf1*.

2.3.3.4. Анализ способности мРНК *lanf* подавлять экспрессию гена *otx2* и активировать экспрессию одного из ключевых генов-регуляторов развития переднего мозга - гена *foxg1β*

Результаты исследования пространственной экспрессии переднеголовных генов миног показали, что картина взаимного расположения зон экспрессии *lanf* и *otx2* в целом сходна с той, что наблюдается для этих генов у других представителей позвоночных и, с учетом того, что *lanf*, подобно его ортологам в других классах, может выступать в качестве ингибитора транскрипции (Рисунок 101). Это позволило предположить, что Lanf у миног может выполнять ту же функцию, что выполняют его ортологи у других позвоночных, а именно подавлять экспрессию *otx2*. Согласно выдвинутой ранее гипотезе, подобное ингибирование гена *otx2* геном *lanf* может обеспечить возможность экспрессии в этой области генов, участвующих в формировании структур будущего конечного мозга. Одним из основных генов-маркеров переднеголовных структур позвоночных является ген *foxg1β*.

Способность Lanf модулировать экспрессию *otx2* и *foxg1β* в эмбрионах миног была исследована методом гибридизации *in situ* на фоне экспериментального подавления экспрессии и, напротив, оверэкспрессии *lanf* в эмбрионах речной миноги.

Подавление трансляции эндогенной мРНК *lanf* осуществлялось при помощи смеси двух морфолиновых олигонуклеотидов:

1. *Lanf MO1* (комплементарен позициям -20- +5 мРНК *L. fluviatilis*):
5'- GCCATCTCTCGAAAAGTAATTCACG;
2. *Lanf MO2* (комплементарен позициям -46- -22 мРНК *L. fluviatilis*):
5'- ATTAGTTAATTGATCGGCGGTGGAA.

В качестве контроля использовался морфолиновый олигонуклеотид *Lanf MO1* с несколькими заменами: *misLanf MO1* - 5'- ACCAAGTCTCGTTAAAGAAATTTGCG.

Проведенная проверка подтвердила эффективность данных МО для подавления транскрипции мРНК *lanf* (Рисунок 102).

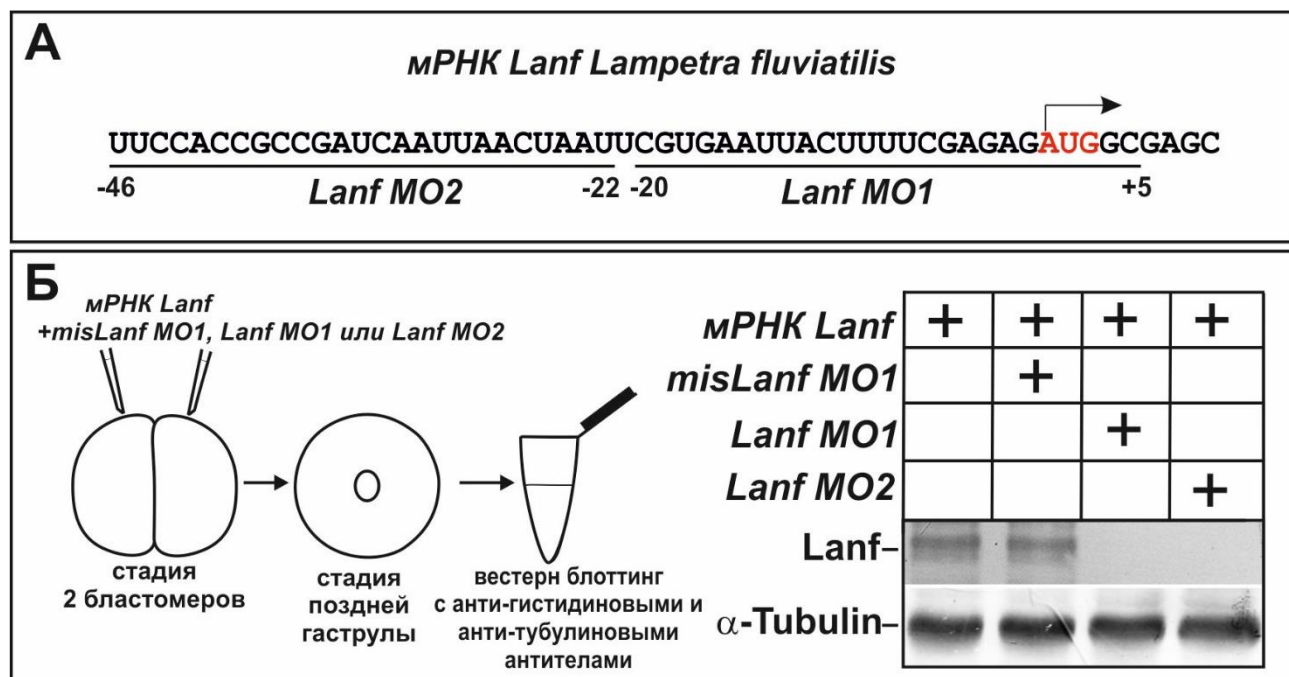


Рисунок 102. Проверка эффективности МО к мРНК *lanf*. **А** - Целевые сайты для МО1 и МО2 к мРНК *lanf* на 5'-конце мРНК *lanf L. fluviatilis*. **Б** - Схема и результаты экспериментов по проверке эффективности МО к мРНК *lanf*. мРНК *lanf* и контрольные МО были инъецированы в каждый бластомер эмбрионов *X. laevis* на стадии 2 бластомеров (100 пг/бластомер). В инъецируемую смесь добавляли контрольным МО к мРНК *lanf* и контрольные МО (8 нл 0,2 мМ водного раствора). Инъецированные эмбрионы культивировали до стадии поздней гаструлы, после чего их отбирали, лизировали и анализировали на наличие белка Lanf методом вестерн-блоттинга с помощью анти-гистидиновых антител.

Инъецированные МО к мРНК *lanf* эмбрионы речной миноги культивировались в растворе MMR и фиксировались для последующей гибридизации *in situ*.

Для экспериментального повышения уровня экспрессии *lanf* в эмбрионах, в них микроинъецирована синтетическая мРНК *lanf*. В качестве контроля использовалась мРНК *EGFP*. Инъекции проводились на стадии 2 бластомеров, эмбрионы инкубировались до стадии средней нейрулы, после чего фиксировались для гибридизации *in situ*.

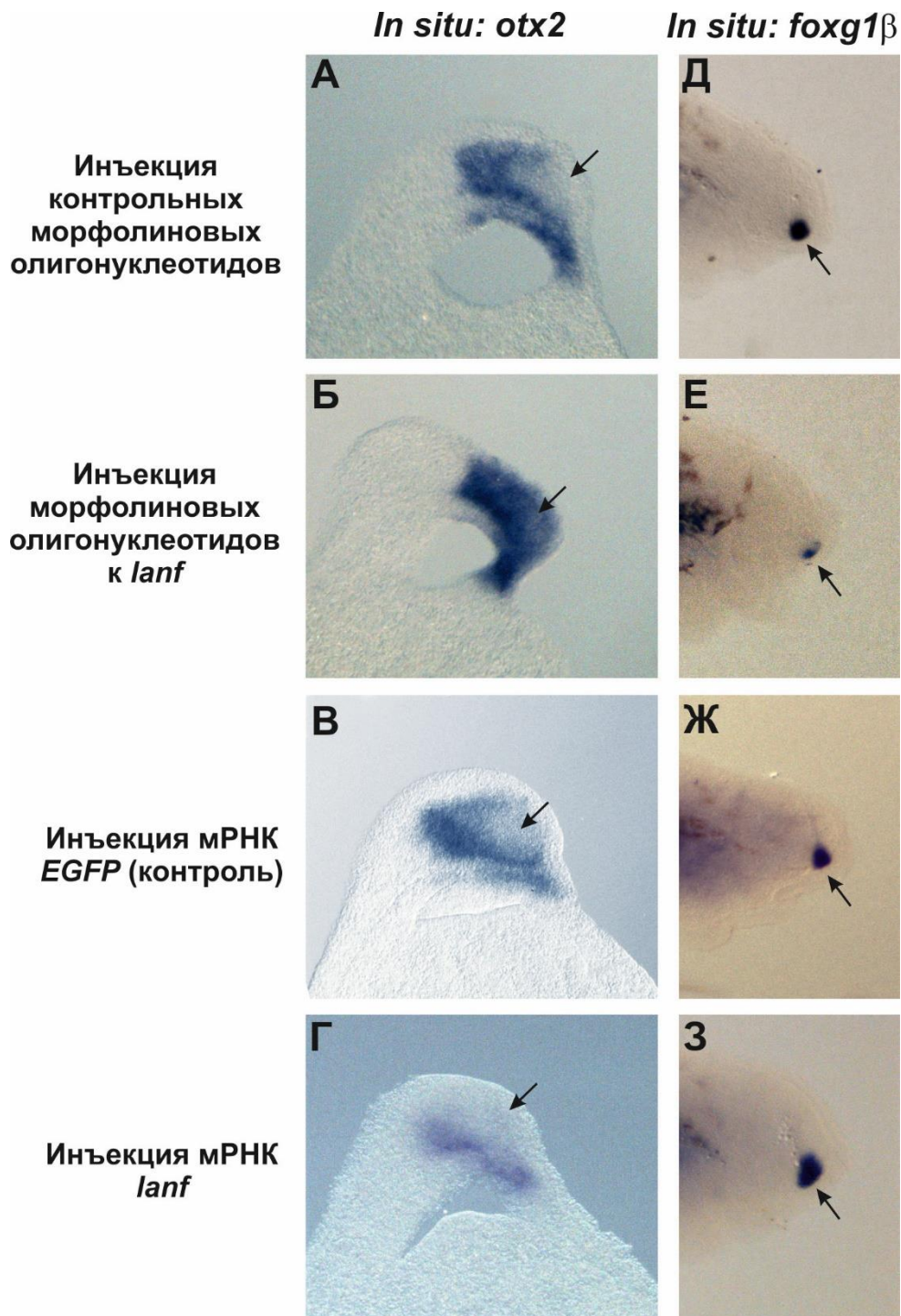


Рисунок 103. *Lanf* подавляет экспрессию гена *otx2* в передней части нервной пластинки и усиливает экспрессию гена *foxg1* в этой области.

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 морфолиновыми олигонуклеотидами (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 *foxg1 β* обратный, по сравнению с *otx2*, эффект. Передний конец эмбриона справа; дорзальная область – сверху.

В результате было показано, что подавление трансляции эндогенной мРНК *lanf* усиливает экспрессию гена *otx2* (Рисунок 103 А, Б) и, напротив, подавляет экспрессию гена *foxg1β* (Рисунок 103 Д, Е). При инъекциях мРНК *lanf*, напротив, наблюдается подавление экспрессии *otx2* (Рисунок 103 В, Г) и расширение области экспрессии *foxg1β* (Рисунок 103 Ж, З). Полученные данные подтверждают ингибиторное влияние Lanf на экспрессию *otx2* в раннем развитии речной миноги и способность Lanf усиливать экспрессию переднеголового гена *foxg1β*.

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 переднеголового маркера – гена *foxg1β*.

2.3.4. Гетерохрония экспрессии генов *anf* и *foxg1β* у миног

Этот раздел работы подробно представлен в статье Ermakova et al., 2019, <https://doi.org/10.1134/S1062360420040049>.

Согласно теории филэмбриогенеза А. Н. Северцова, одним из путей появления новых признаков в эволюции является надставка конечных стадий. В ходе последующей эволюции время их закладки может смещаться в сторону более ранних стадий, из-за чего возникают гетерохронии у разных животных. Эту закономерность, еще до работ А.Н. Северцова, отмечал Э. Геккель, который и ввел в биологию понятие гетерохронии (McNamara, 2012). Закономерности формирования новых структур и гетерохронии активно изучались на морфологическом уровне, но они практически не исследованы на уровне молекулярных механизмов формирования тех или иных структур.

При анализе особенностей динамики экспрессии генов *anf* и *foxg1 β* у миног было обнаружено, что активная фаза экспрессии этих генов у миног начинается на более поздних стадиях по сравнению с гомологами этих генов у более эволюционно молодых позвоночных – амфибий (Рисунок 99).

У шпорцевой лягушки возрастание экспрессии *anf* наблюдается еще до начала нейруляции, на стадии поздней гаструлы, в то время как у речной миноги *anf* начинает активно экспрессироваться на стадии поздней нейрулы (стадия 20 по Tahara, 1988). Похожая гетерохрония наблюдается у миноги и в случае гена *foxg1 β* . У шпорцевой лягушки единственный ген *foxg1* начинает экспрессироваться уже в конце гаструляции – начале нейруляции в клетках зачатка конечного мозга, в то время как у миног экспрессия *foxg1 β* (паралога *foxg1*, раньше других обнаруживающегося в области переднего мозга) наблюдается в области конечного мозга на стадии головного выроста, т.е. уже после окончания нейруляции (стадия 22 по Тахара (1988)).

Такая гетерохрония экспрессии генов конечного мозга 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. В то же время, для подтверждения специфичности наблюдаемого эффекта является важной сравнительная оценка экспрессии ряда других ранних генов-регуляторов развития. В качестве таких генов были выбраны гены *otx2*, *gooseoid*, *hoxb9*, экспрессия которых характерна для разных презумптивных участков и структур эмбриона.

Гомеодоменный транскрипционный фактор Otx2 играет важную роль в формировании переднего мозга и развитии глазных структур (Beby and Lamonerie, 2013). Было установлено, что эктопическая экспрессия *otx2* приводит к антериоризации эмбрионов шпорцевой лягушки (Boyl et al., 2001). Блокада экспрессии *otx2* вызывает летальный эффект, а у гомозиготных эмбрионов полностью отсутствуют структуры переднего и среднего отделов мозга. Экспериментальное снижение уровня экспрессии

otx2 приводит к нарушениям развития средних отделов мозга (Bozzy and Simeone, 2014).

Гомеобоксный ген *gooseoid* (*gsc*) экспрессируется в первичном эмбриональном организаторе как у позвоночных, так и у беспозвоночных (Blum et al., 1992; Broun et al., 1999). При вентральной эктопической экспрессии *gsc* эффективно индуцирует формирование дополнительных осей тела у шпорцевой лягушки (Cho et al., 1991). Показана способность *Gsc* подавлять активность сигнальных каскадов BMP и Wnt у разных групп позвоночных. Активно исследуется роль *gsc* в модуляции подвижности и миграционного поведения клеток (Ulmer et al., 2017).

Ген *hoxb9*, экспрессируется в мезодерме и эктодерме туловищного и хвостового отделов эмбриона, и зачастую применяется в качестве маркера задних отделов нервной системы (Sharpe et al., 1987).

Анализ динамики экспрессии описанных генов был проведен на сериях эмбрионов речной миноги и шпорцевой лягушки методом ОТ-ПЦР.

Было выявлено, что ген *otx2* и у миноги, и у шпорцевой лягушки активируется на стадии поздней гаструлы и в дальнейшем снижается (Рисунок 99).

Экспрессия гена *gooseoid* и у речной миноги и у шпорцевой лягушки активируется на стадии ранней гаструлы (Рисунок 99).

Активация экспрессии гена *hoxb9* у миног и амфибий также наблюдается на сходных стадиях (Рисунок 99).

Проведенный анализ, результаты которого представлены в виде схемы на Рисунке 104, позволяет заключить, что гетерохрония не является типичным явлением для всех проанализированных генов миног, участвующих в развитии осевых структур и головного мозга. Это подтверждает специфичность эффекта, наблюдаемого для переднеголовных генов *anf* и *foxg1β*. Подробно полученные результаты представлены в статье Байрамова и соавторов «Гетерохрония экспрессии генов *Lanf* и *Foxg1* у миноги подтверждает появление конечного мозга как эволюционно молодой

надстройки в центральной нервной системе позвоночных», 2020 (Ваграмов et al., 2020).

Согласно полученным данным, в отличие от миноги у шпорцевой лягушки *foxf1β* начинает экспрессироваться уже в конце гаструляции – начале нейруляции в клетках зачатка конечного мозга (Рисунок 104).

Гетерохронию экспрессии *foxf1β* у миноги можно дополнительно подтвердить, если сопоставить стадии развития у разных животных по количеству образовавшихся сомитов (Gorodilov, 1992, 2010). У челюстноротых, экспрессия *foxf1* наблюдается в зачатке конечного мозга в диапазоне от пресомитной стадии у шпорцевой лягушки до стадии 5-6 сомитов у рыб и млекопитающих (Toresson et al. 1998; Zhao et al., 2009; Tao and Lai, 1992) что в целом соответствует стадии ранней нейрулы. При этом у миног экспрессия *foxf1β* обнаруживается в области конечного мозга только на стадии 22 сомитов, т.е. уже после окончания нейруляции (стадия 22 по Tahara, 1988).

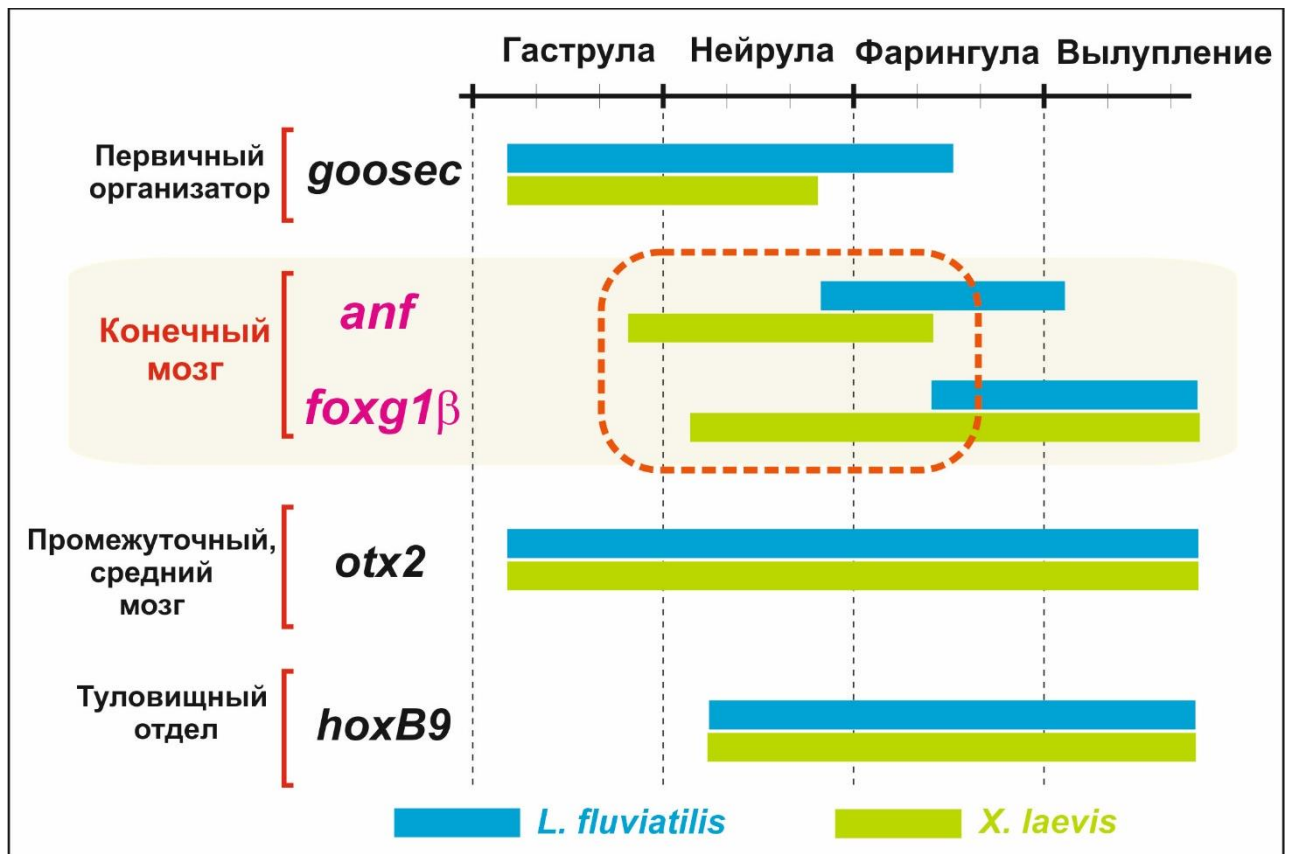


Рисунок 104. Схема сравнительного анализа динамики экспрессии регуляторных генов у речной миноги и шпорцевой лягушки.

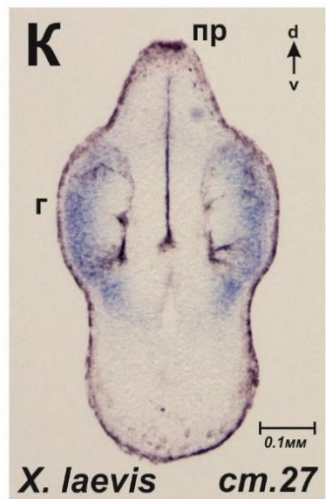
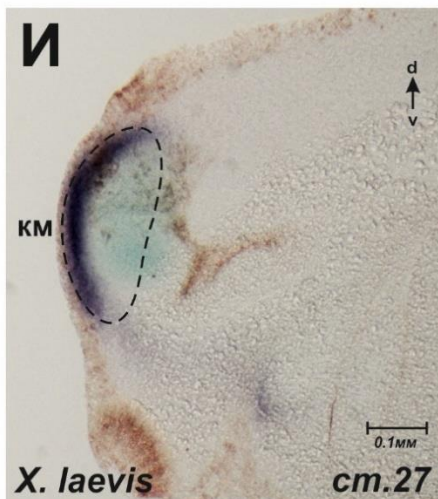
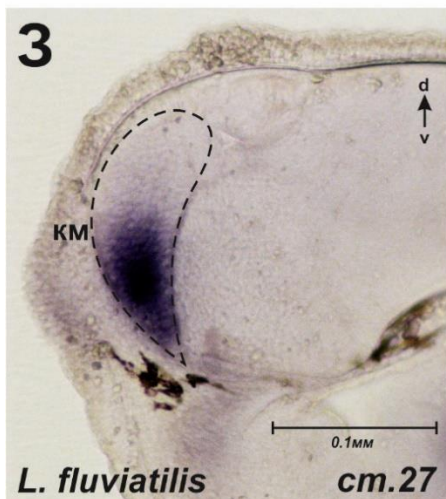
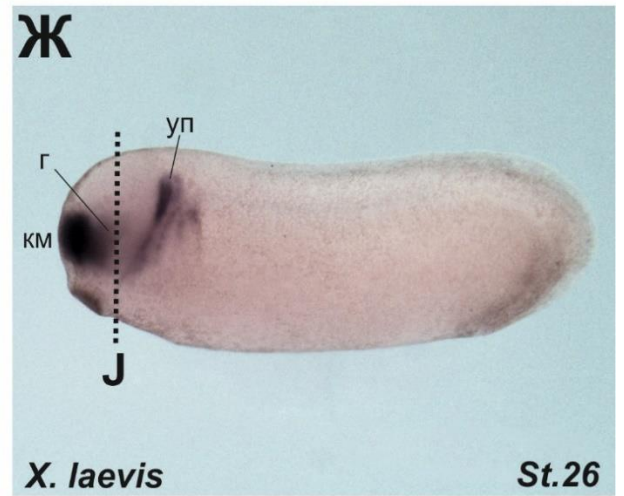
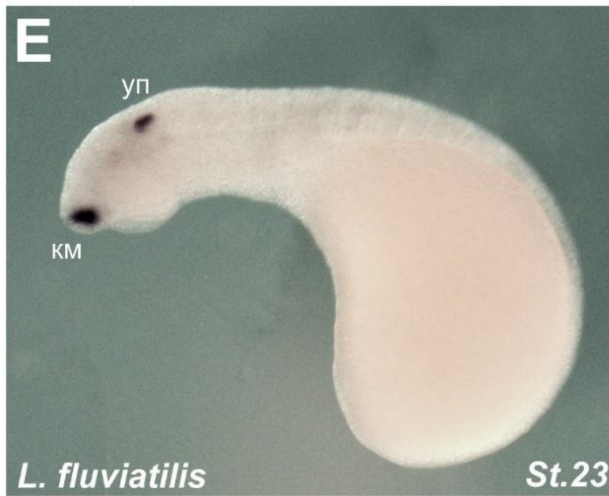
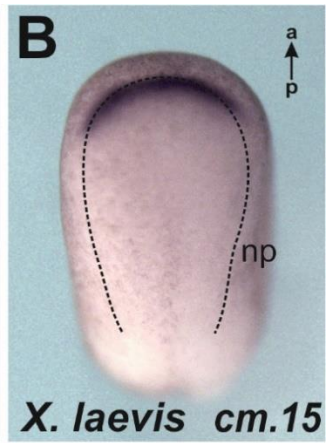
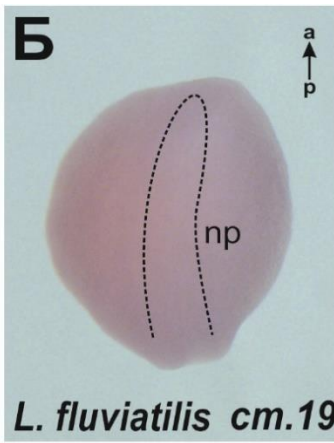
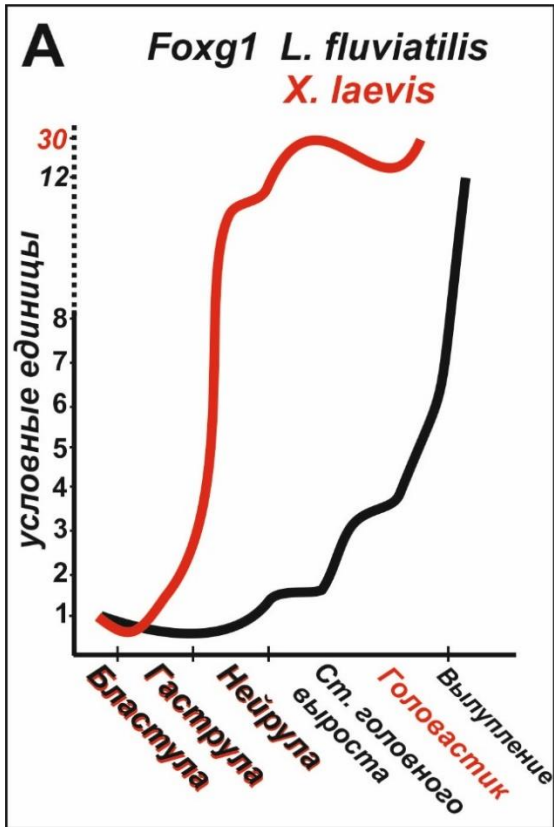


Рисунок 105. Сравнение экспрессии *foxg1 β* у эмбрионов *L. fluviatilis* и *X. laevis* (по результатам гибридизации *in situ*).

А – сравнительные временные профили экспрессии гомологов *foxg1* у *L. fluviatilis* (черный) и *X. laevis* (красный).

Б, В – на стадии нейрулы ген *foxg1 β* не обнаруживается у *L. fluviatilis* в отличие от *X. laevis*, у которого *foxg1* экспрессируется по переднему краю нервной пластинки (граница нервной пластинки отмечена пунктирной линией)

Г, Д – экспрессия гена *foxg1 β* в конечном мозге миноги

Е, Ж – экспрессия гена *foxg1* на стадии головного выроста (у миноги) и ранней стадии головастика (у шпорцевой лягушки).

З, И – разница пространственной локализации экспрессии *foxg1* в конечном мозге *L. fluviatilis* и *X. laevis* на сагиттальных срезах эмбрионов. Конечный мозг отмечен пунктиром.

Е – поперечный срез показывает экспрессию *foxg1* в глазных структурах *X. laevis*.

г – глаз, км – конечный мозг, пр – присоска, уп – ушная плакода.

Сравнение временной и пространственной экспрессии гомологов *foxg1* у эмбрионов речной миноги и шпорцевой лягушки представлено на Рисунке 105.

Основными различиями экспрессии *foxg1* у речной миноги и шпорцевой лягушки является: 1) стадия начала экспрессии и 2) пространственная разница. Более позднее начало экспрессии *foxg1 β* у миноги уже описано выше. Пространственные различия включают разницу в области экспрессии в конечном мозге. Однако, здесь стоит учитывать, что у миног, как было описано выше, присутствуют три паралога *foxg1*, причем все они экспрессируются в области конечного мозга. *foxg1 β* был выбран для оценки гетерохронии поскольку в конечном мозге его экспрессия начинается раньше других паралогов.

Если экспрессия *foxg1* у шпорцевой лягушки наблюдается на всем дорсо-вентральном протяжении конечного мозга, то у речной миноги *foxg1 β* экспрессируется только в его вентральной области (Рисунок 105 З, И).

Кроме этого, у шпорцевой лягушки наблюдается экспрессия *foxg1* в глазных структурах (Рисунок 105, К). У миног в глазных структурах экспрессируется только ген *foxg1γ*.

2.4. Гены семейства *Chordin* и их роль в появлении парных конечностей позвоночных

Ген *chordin* описан в качестве одного из ранних эмбриональных индукторов, экспрессирующихся в области шпеманновского организатора, выступающих в роли антагониста BMP сигнального каскада и участвующих в осевой дифференцировке эмбрионов. У позвоночных обнаружены белки, структурно близкие к *Chordin*, но отличающиеся от него по характеру экспрессии и, возможно, функциональным свойствам. Одной из задач работы был поиск и исследование этих белков семейства *Chordin* у представителей древних групп позвоночных и оценка их возможной роли в развитии парных конечностей челюстноротых.

2.4.1. Гены семейства *Chordin* позвоночных

В качестве одного из ключевых регуляторов ранней дифференцировки эмбрионов челюстноротых описан ген *chordin* (Plouhines et al., 2013). Кроме гена *chordin* у челюстноротых описаны сходные с ним гены – *chordin-like* (Nakayama 2001, 2004).

В рамках исследования генов семейства *Chordin* (*chordin* и *chordin-Like*) у позвоночных был проведен анализ филогении кодируемых ими белковых последовательностей.

Филогенетический анализ (Рисунок 106) подтвердил, что у представителей большинства групп позвоночных, кроме белка *Chordin*, есть два белка *Chordin-like*, номенклатура которых нами была принята согласно Nakayama 2001, 2004.

Кластеры Chordin, Chordin-like1 и Chordin-like2 группируются очень уверенно (на филогенетических деревьях, построенном по алгоритму максимального правдоподобия (ML) значение бутстрэп теста = 100) за исключением генов эволюционно наиболее древних представителей хордовых и их родственников полухордовых (*Saccoglossus*), оболочников (*Ciona*), ланцетников (*Branchiostoma*), а также гена морской миноги *P. marinus*, представителя круглоротых. Белки Chordin и Chordin-like уверенно отделяются от других, структурно похожих белков, содержащих цис-домены - CRIM1 (Cysteine Rich Transmembrane BMP Regulator 1) и CCN2 (Cellular Communication Network Factor 2), включенного в анализ в качестве внешнего гена.

По первичной структуре Chordin и Chordin-like различаются в первую очередь количеством и характером расположения цистеин-богатых доменов (Рисунок 107). Так, 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. Кроме этого белок Chordin содержит в своем составе специфические CHRД-домены.

Для установления эволюционного родства генов *chordin* и *chordin-like* был проведен поиск гомологов и анализ локальной геномной синтении этих генов как у позвоночных, так и у беспозвоночных (Рисунок 108).

Проведенный анализ 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 108).

В то же время, согласно анализу синтении, ген *chordin-like1* появился только у челюстноротых. Наличие общих соседей у *chordin-like1* челюстноротых и *chordin-like2* бесчелюстных – генов *ammecr1* (AMMECR nuclear protein 1) и *tmem164* (transmembrane protein 164) указывает на то, что *chordin-like1* мог произойти путем локальной дупликации *chordin-like2* или в результате одного из раундов полногеномных дупликаций, имевших место, в

ранней истории позвоночных. Соседями гена *chordin-like1* кроме *ammecr1* и *tmem164* являются гены *pak3* (p21 (RAC1) активируемая киназа 3) и *capn5/6* (гомологи *calpain5* и *calpain6*) у хрящевых рыб, мясистолопастных и наземных позвоночных, а также ген *kif4* (kinesin family member 4) у лучеперых (хрящекостные и новоперые рыбы).

Отсутствие *chordin-like1* у бесчелюстных и ланцетников дополнительно подтверждается отсутствием его у этих групп в окрестностях генов *pak3* и *ammecr1*, которые у бесчелюстных находятся рядом и являются обязательными соседями *chordin-like1* у челюстноротых.

Проведенный анализ генов *chordin-like* у позвоночных задает два направления исследований их роли в преобразовании плана строения позвоночных:

1) Исследование связи появления гена *chordin-like*, как нового гена челюстноротых с появлением и развитием уникальных морфологических признаков челюстноротых. К таким признакам можно отнести парные конечности, скелет жаберного аппарата, челюсти и ряда других.

2) Исследование роли *chordin-like2*, как единственного гена семейства *chordin* у миног в ранней дифференцировке эмбриона и формировании отдельных морфологических структур. Ген *chordin* у миног не обнаружен, что является уникальной ситуацией для позвоночных. У челюстноротых *chordin*, описанный в качестве антагониста BMP сигнала является одним из ключевых регуляторов ранней эмбриональной дифференцировки. Вполне вероятно, отсутствие *chordin* у миног может отражать особенности ранней осевой дифференцировки эмбрионов этой группы животных.

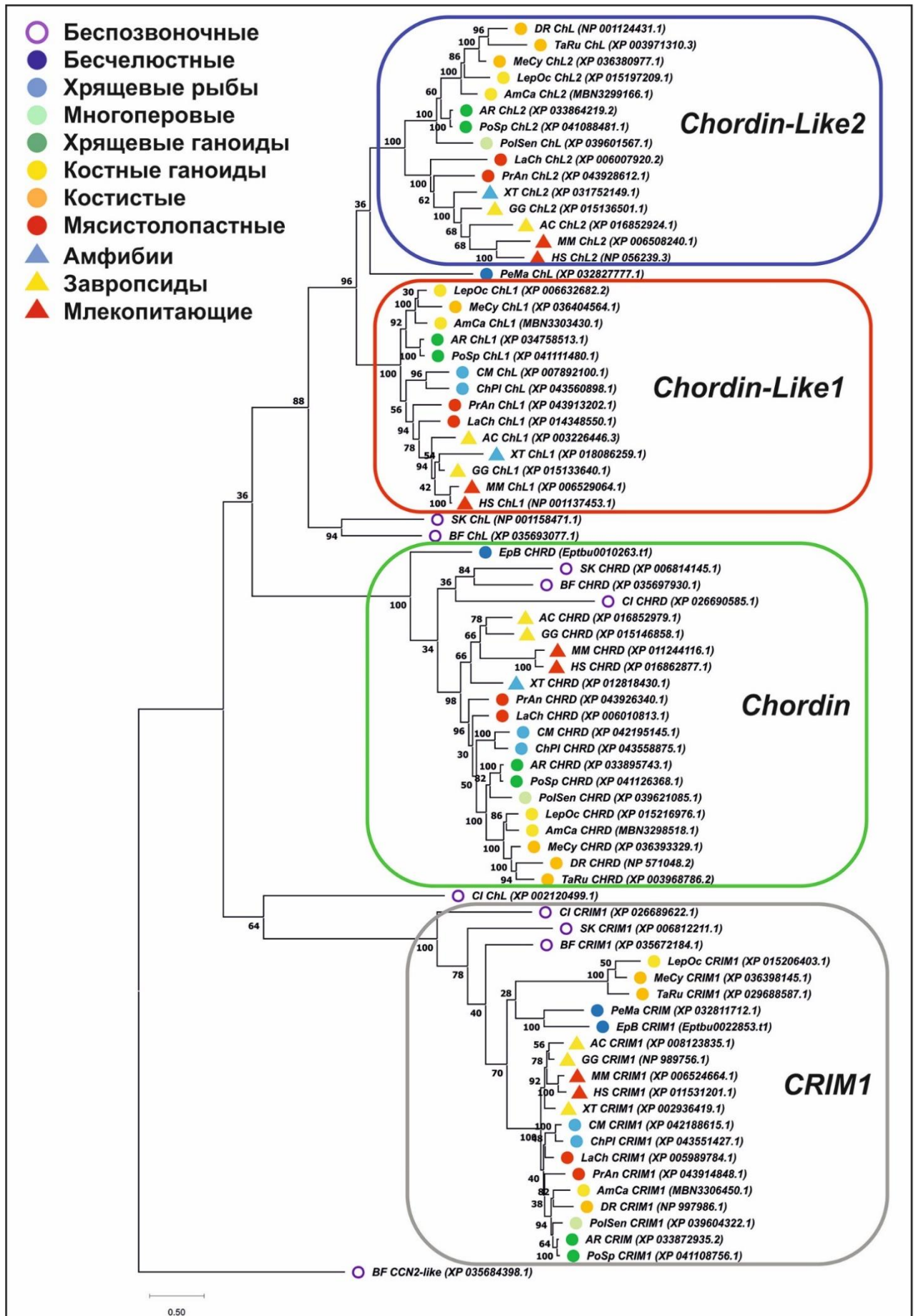


Рисунок 106. Филогенетическое дерево белков семейства Chordin хордовых, построенное методом максимального правдоподобия (ML).

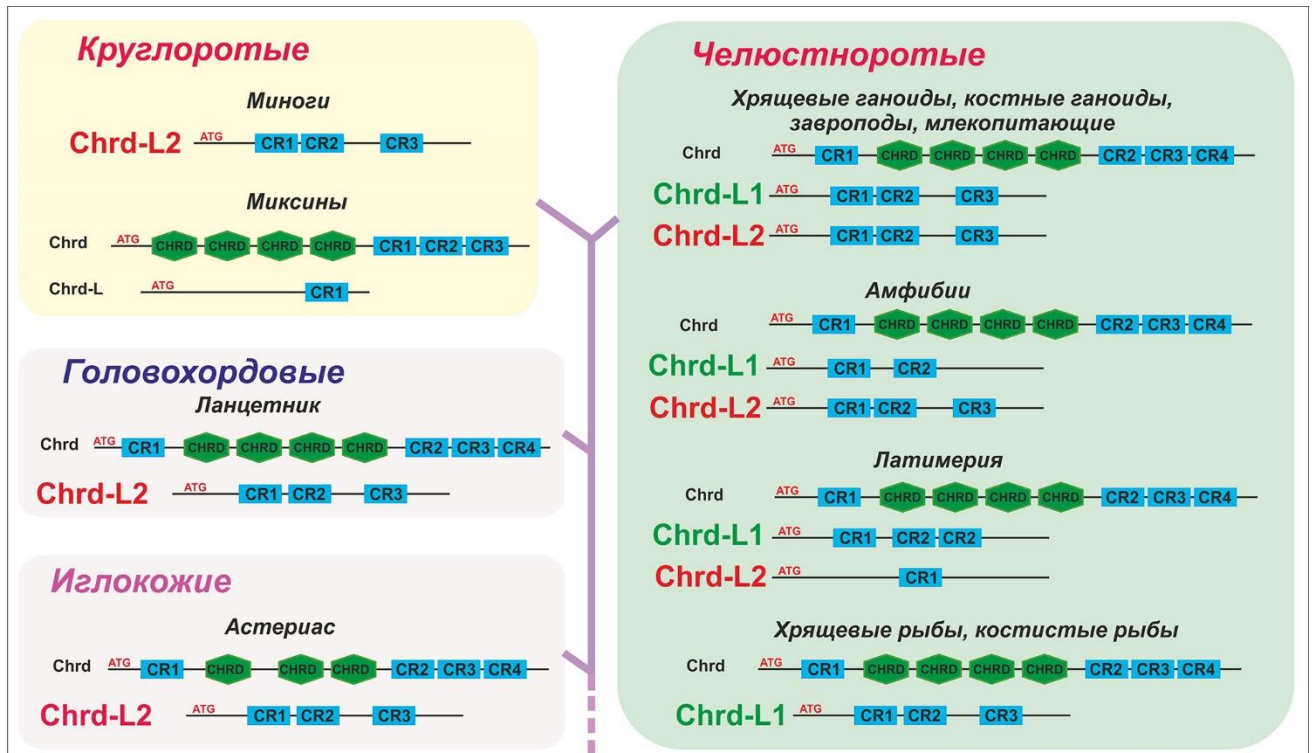


Рисунок 107. Белки семейства Chordin хордовых и иглокожих со структурой консервативных доменов.

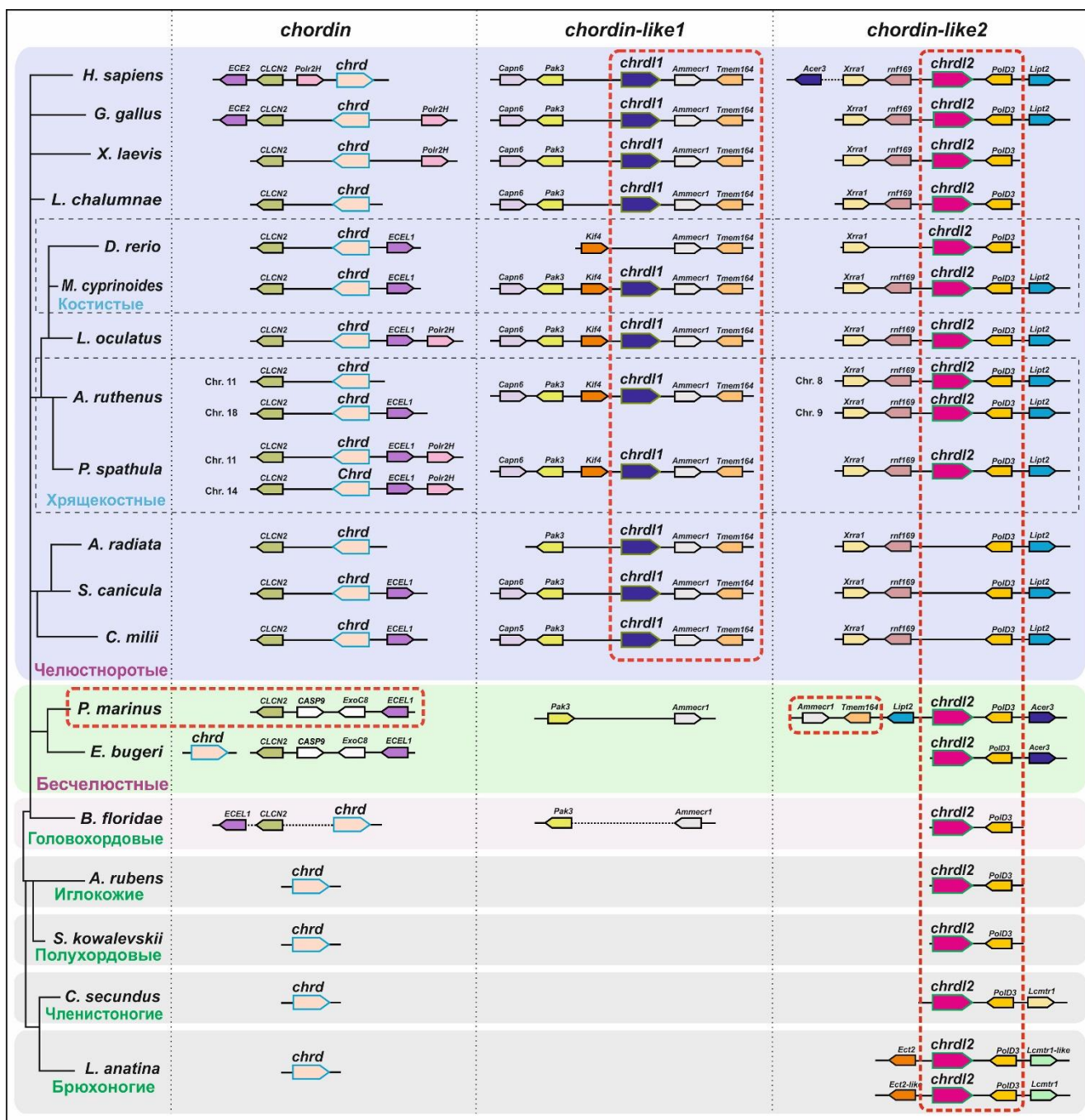


Рисунок 108. Анализ синтении генов семейства *chordin* у животных. Гены *chordin* и *chordin-like2* обнаруживаются как у позвоночных, так и у беспозвоночных, в то время как ген *chordin-like1* появляется только у челюстноротых.

2.4.2. *Chordin-like1* – новый ген челюстноротых

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. Как показал проведенный анализ, у хрящевых рыб ген *chordin-like1* является единственным *chordin-like* геном (*chordin-like2* у этой группы отсутствует), в то время, как у осетрообразных есть оба *chordin-like* гена.

Исходя из гипотезы о возможной вовлеченности *chordin-like1* в развитие таких инноваций челюстноротых, как парные конечности, жаберный аппарат и челюсти, было проведено исследование его экспрессии на ранних стадиях развития у хрящевых и осетрообразных рыб, как наиболее эволюционно древних ныне живущих представителей челюстноротых.

У хрящевых рыб анализ экспрессии *chordin-like1* был проведен на эмбрионах серой кошачьей акулы *C. griseum*, у осетровых - на эмбрионах стерляди *A. ruthenus*. Исследование паттерна экспрессии *chordin-like1* было проведено методом гибридизации *in situ*.

2.4.2.1. Исследование экспрессии гена *chordin-like1* у серой кошачьей акулы

Как показал филогенетический анализ, у акул есть только один ген *chordin-like* ген – *chordin-like1*. Его пространственно-временная экспрессия была исследована методом гибридизации *in situ* на эмбрионах акул ранних стадий – до формирования плавников (стадия 24) и далее. Морфологию стадий развития оценивали по Ballard et al., 1993.

Проведенный анализ показал, что на самой ранней из исследованных стадии (стадия 24) экспрессия *chordin-like1* у акул наблюдается в жаберных дугах, включая челюстную и гиоидную дуги (Рисунок 109). При этом экспрессия наблюдается в центральной части дуг, сформированной мезодермальной тканью (Рисунок 109).

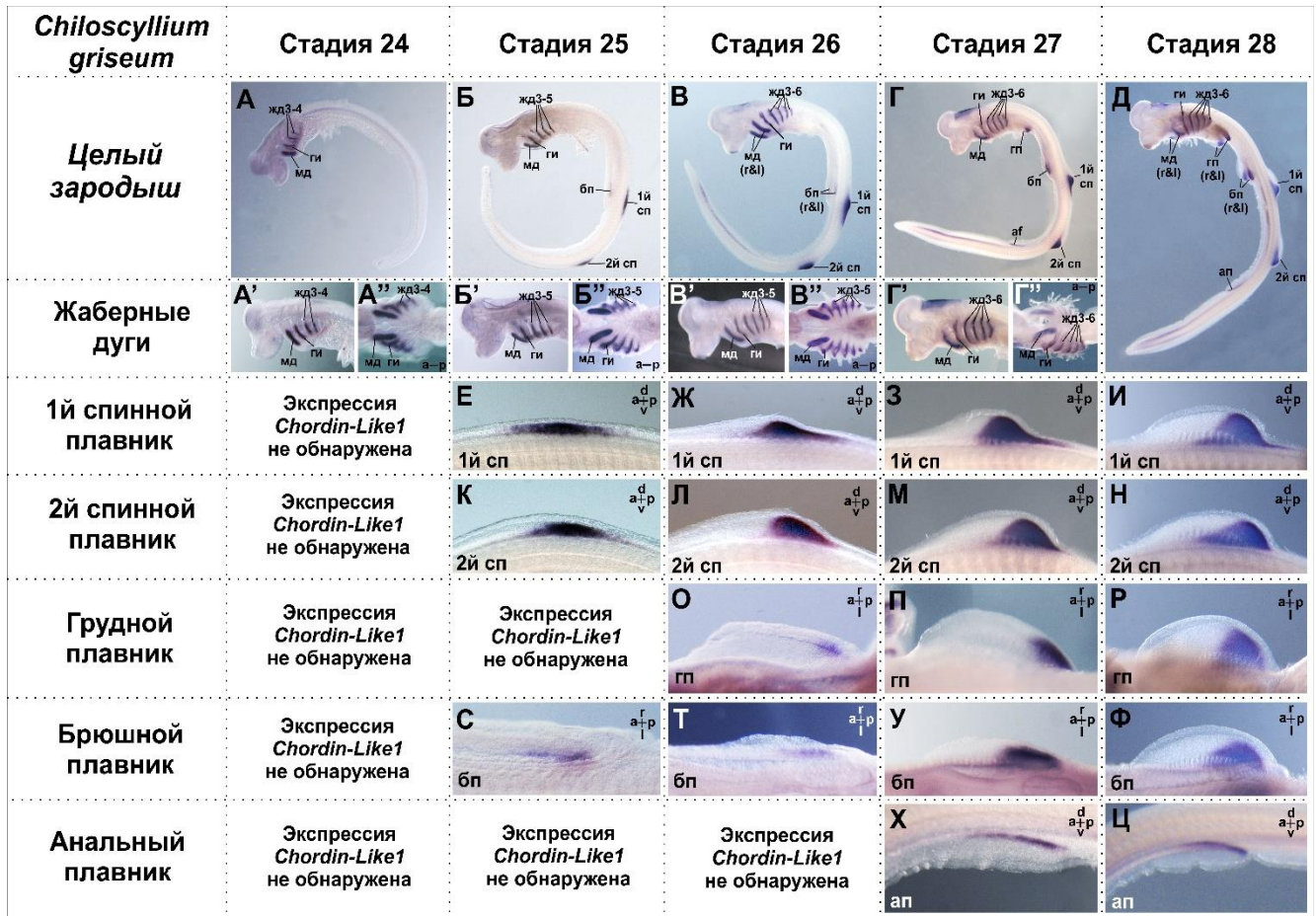


Рисунок 109. Анализ пространственной экспрессии гена *chordin-like1* на ранних стадиях развития серой кошачьей акулы *C. griseum*

На стадии 25 к экспрессии в жаберных дугах добавляется экспрессия в зачатках непарных спинных плавников и, на более слабом уровне, в парных брюшных плавниках (Рисунок 109, 110 А-В). Существенно, что на этой стадии плавники еще не представляют собой выросты и никак не оформляются морфологически.

На стадии 26, когда спинные плавники уже морфологически оформляются в виде выростов, можно говорить о том, что экспрессия *chordin-like1* наблюдается в их каудальной части. На этой стадии обнаруживается экспрессия в грудных плавниках, также в каудальной области и продолжается экспрессия в брюшных. Уровень экспрессии в парных плавниках в целом ниже, чем в жаберных дугах и непарных спинных плавниках.

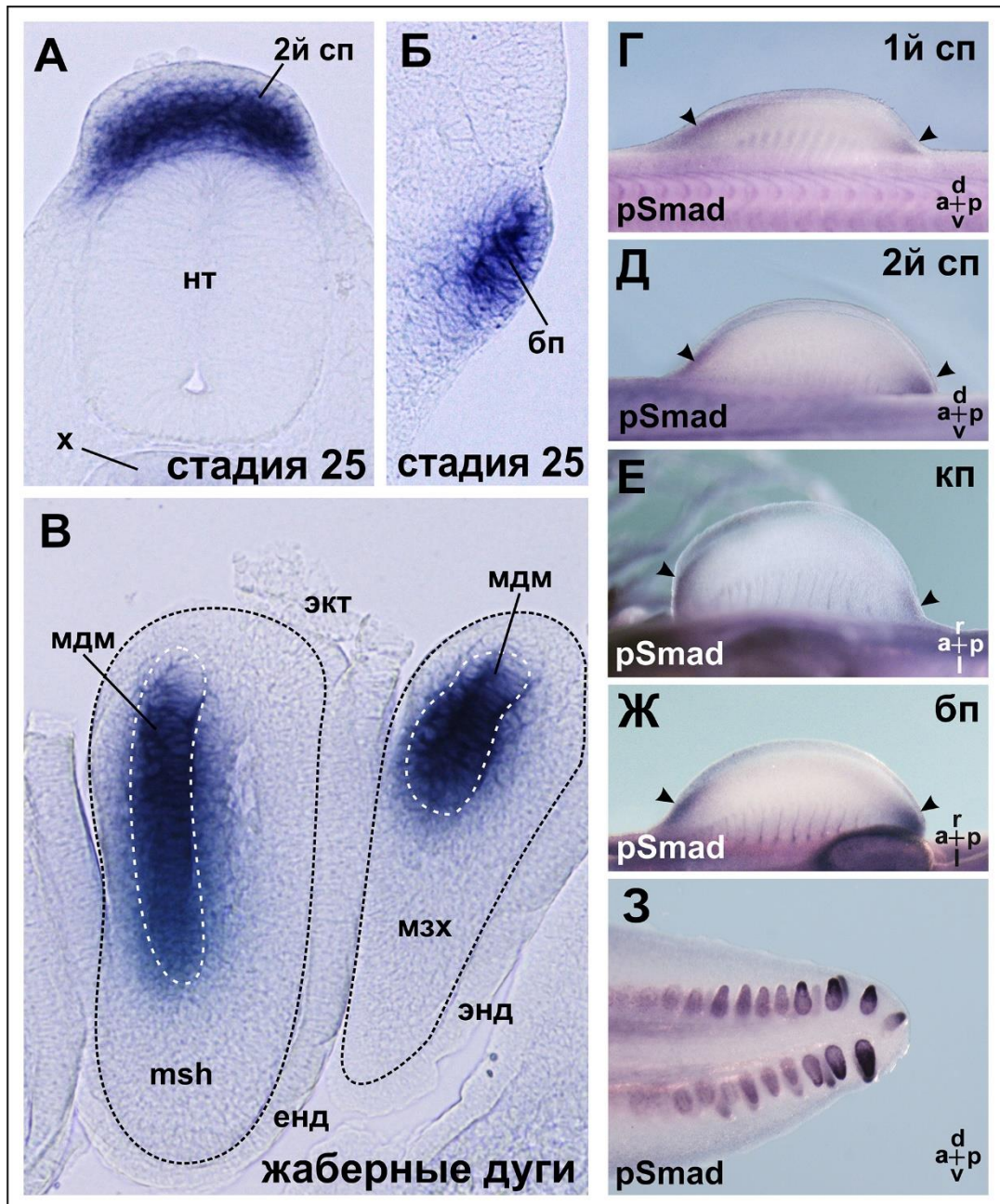


Рисунок 110. Экспрессия *chordin-like1* серой кошачьей акулы *C. griseum* в зачатках спинного (А), брюшного (Б) плавников и жаберных дугах (В), показанных на поперечных срезах. Д-З – анализ фосфорилирования Smad в зачатках плавников *C. griseum*.

На стадии 27 парные плавники уже хорошо видны в виде выростов и уровень экспрессии *chordin-like1* в них возрастает (Рисунок 109).

В целом картина экспрессии в парных и спинных плавниках похожа – экспрессия наблюдается в каудальной части всех этих плавников. На этой стадии обнаруживается невысокий уровень экспрессии в основании анального плавника и в желудочке заднего мозга.

Похожая картина наблюдается и на стадии 28 (Рисунок 109). На этой стадии парные и спинные плавники внешне очень похожи по строению и характер экспрессии *chordin-like1* в них также очень сходен.

По характеру экспрессии *chordin-like1* у кошачьей акулы видится важным отметить несколько моментов:

1. Паттерн экспрессии имеет ярко выраженный локальный характер, активность гена лишь в нескольких структурах эмбриона – жаберных дугах и плавниках, что указывает на возможное сходство механизмов формирования этих структур у акул. На более поздних стадиях добавляется экспрессия в желудочке заднего мозга.

2. 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.

3. 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.

Для оценки пространственного распределения в плавниках области экспрессии *chordin-like1* и активности BMP сигнального каскада было проведено иммуногистологическое исследование распределения фосфорилированных внутриклеточных молекул Smad1/5, участвующих в функционировании BMP каскада в формирующихся плавниках акул (Рисунок 110 Г-Ж). Было обнаружено, что фосфорилирование Smad1/5 происходит в зонах плавника свободных от экспрессии *chordin-like1*. Это может свидетельствовать о подавлении активности BMP каскада в плавниках белком Chordin-like1.

2.4.2.2. Исследование экспрессии *chordin-like1* у стерляди

Еще одной архаичной группой челюстноротых, доступной для исследований в наши дни являются осетровые. Экспрессия *chordin-like1* была проанализирована у стерляди *A. ruthenus* и была обнаружена как в парных, так и непарных плавниках (Рисунок 111).

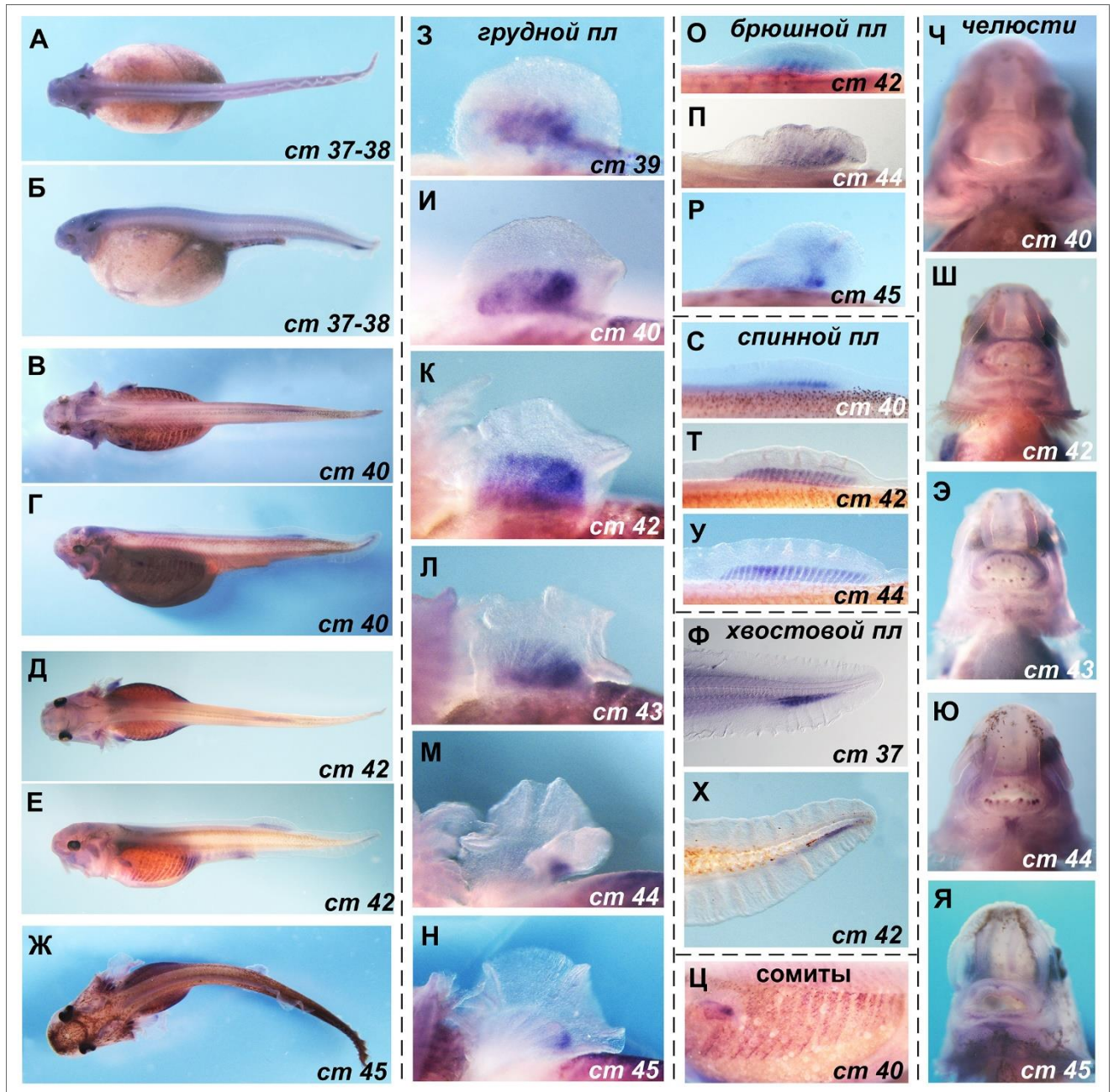


Рисунок 111. Анализ пространственной экспрессии гена *chordin-like1* у предличинки стерляди *A. ruthenus*.

2.4.2.3. Анализ экспрессии *chordin-like1* у шпорцевой лягушки

Анализ динамики экспрессии обнаруженных генов семейства *Chordin* у шпорцевой лягушки (гены *chordin*, *chordin-like1* и *chordin-like2*) был проведен методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Проведенный анализ показал, что динамика экспрессии генов *chordin-like* у шпорцевой лягушки отличается от динамики экспрессии гена *chordin* (Рисунок 112 А). Экспрессия *chordin* существенно возрастает уже на стадии гастролы, а после стадии нейрулы существенно снижается. Экспрессия генов *chordin-like* активируется на поздних стадиях (40+), что может отражать отличие функциональной роли этих генов от роли гена *chordin*, одного из ключевых регуляторов ранней эмбриональной дифференцировки. Судя по динамике экспрессии, гены *chordin-like* с большой вероятностью вовлечены в процесс эмбриогенеза на поздних стадиях и, вероятно, в формирование отдельных эмбриональных структур.

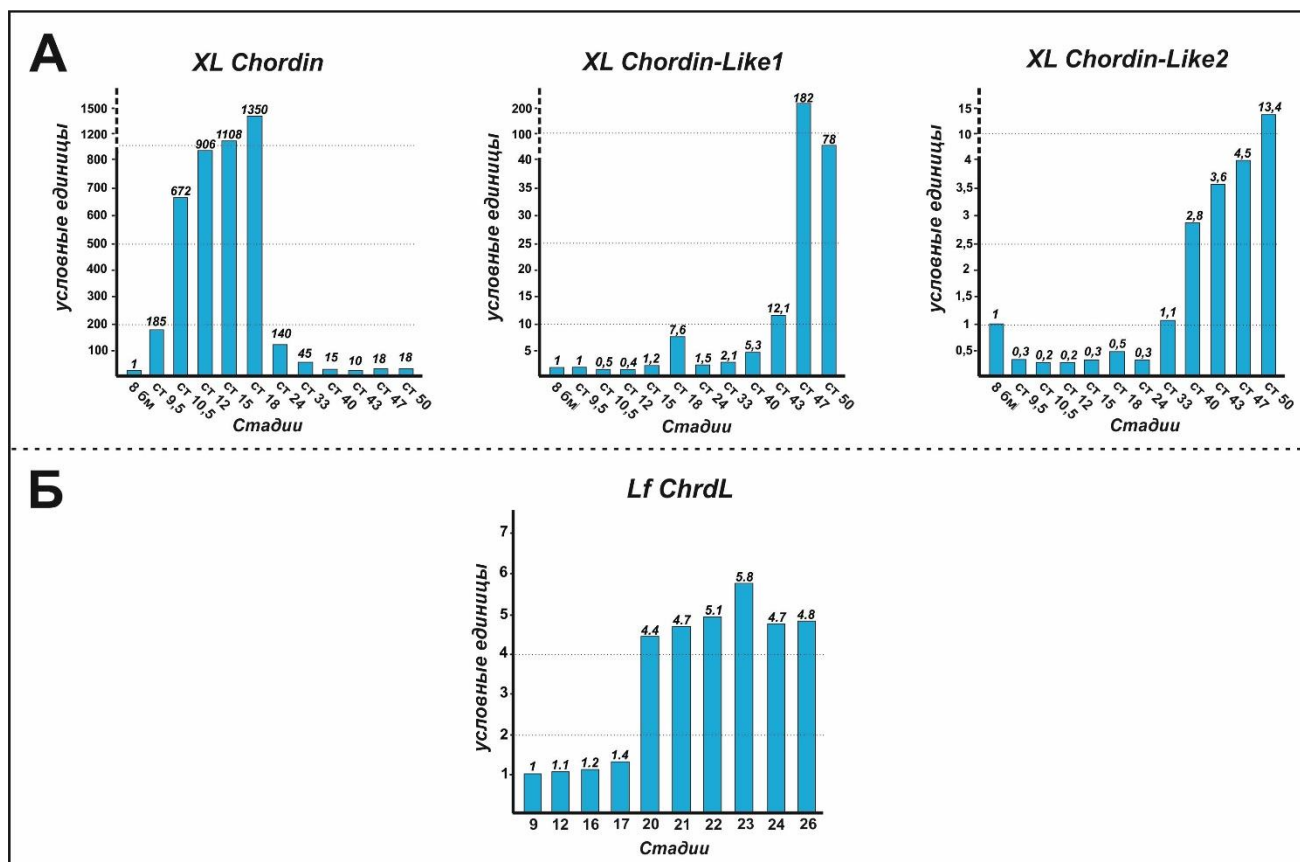


Рисунок 112. Анализ динамики экспрессии генов семейства *chordin* у шпорцевой лягушки и речной миноги, проведенный методом количественной

ОТ-ПЦР в реальном времени на ранних стадиях развития. Стадии *X. laevis* – приведены по Nieuwkoop and Faber (1967), стадии *L. fluviatilis* - по Tahara (1988).

Пространственная экспрессия гена *chordin-like1* у головастиков шпорцевой лягушки была исследована методом гибридизации *in situ*. На стадии 51 при формировании зачатка конечности *chordin-like1* экспрессируется в передней и задней краевых зонах конечности (Рисунок 113 А, Б). В дальнейшем, при формировании пальцевых зачатков, на стадии 53, *chordin-like1* экспрессируется в краевой зоне пальцевых зачатков (Рисунок 113 Г-Е). Кроме этого продолжается экспрессия в передней краевой зоне конечности. Сходный паттерн наблюдается на стадии 54 (Рисунок 113 Ж-И). Кроме экспрессии в зачатке конечности, *chordin-like1* обнаруживается в формирующихся глазных структурах (Рисунок 113 В).

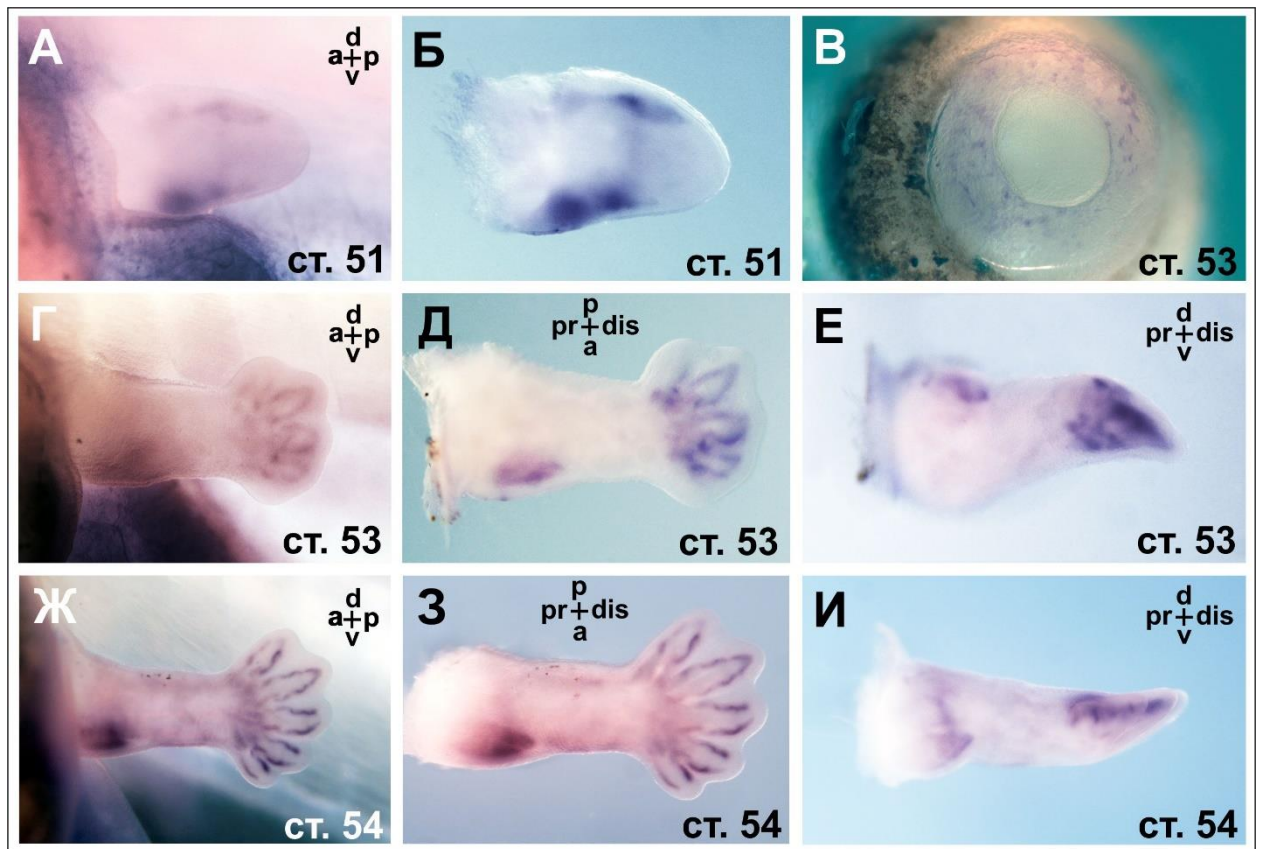


Рисунок 113. Анализ динамики экспрессии гена семейства *chordin-like1* в конечностях шпорцевой лягушки.

2.4.2.4. Исследование функциональных свойств генов *chordin-like* позвоночных

Для исследования возможной роли *chordin-like1* в формировании новых структур челюстноротых было проведено исследование его функциональных свойств. С учетом того, что эмбрионы шпорцевой лягушки являются удобной лабораторной моделью, с хорошо отработанными методами исследования, живые эмбрионы которой доступны круглогодично, изучение функциональных свойств генов *chordin-like* было проведено на эмбрионах и головастиках этого вида. У шпорцевой лягушки были обнаружены оба гена *chordin-like* - *chordin-like1* и *chordin-like2*.

Было проведено исследование способности генов *chordin-like1* и *chordin-like2* индуцировать формирование дополнительного комплекса осевых структур у эмбрионов шпорцевой лягушки. Для этого были получены и клонированы в экспрессионный вектор pCS2 кДНК генов *chordin-like* шпорцевой лягушки. Инъекции синтетических мРНК генов *chordin-like* были проведены в развивающиеся эмбрионы шпорцевой лягушки на стадии 8 бластомеров. мРНК гена *chordin-like2* обнаружила способность индуцировать дополнительные оси у эмбрионов (Рисунок 114, А). При инъекциях мРНК *chordin-like1* наблюдались фенотипические аномалии, но формирования осевых структур не происходило.

Для оценки способности *chordin-like1* модулировать активность внутриклеточных сигнальных каскадов, участвующих в ранней эмбриональной дифференцировке были проведены тесты с использованием люциферазных репортерных конструкций. Была оценена способность мРНК *chordin-like1* модулировать активность сигнальных каскадов на фоне их экспериментальной активации при помощи лигандов в норме активирующих активность каскадов (Таблица 2) и при эндогенном уровне активности (Таблица 3).

Репортер (каскад)	Фоновый уровень	Активация	Активация + <i>chordin-like1</i>
BRE (BMP4)	0,41	1,19	0,43
Activin	0,45	6,2	4,3
Xnr2	0,37	1,23	0,44
Xnr4	0,5	0,6	0,9
Wnt8	0,11	0,35	0,45
Wnt11 (PCP)	0,027	0,22	0,29

Таблица 2 – Влияние *chordin-like1* на активность репортеров внутриклеточных сигнальных каскадов на фоне их экспериментальной активации лигандами.

Репортер (каскад)	Фоновый уровень	ChL1
BRE (BMP)	0,43	0,34
Activin	1,25	1,09
Wnt8	0,11	0,022
Wnt11 (PCP)	0,01	0,12

Таблица 3 – Влияние *chordin-like1* на активность репортеров эндогенных внутриклеточных сигнальных каскадов без их экспериментальной активации.

В результате проведенных люциферазных тестов была обнаружена способность *chordin-like1* подавлять активность BMP сигнального каскада при его экспериментальной активации лигандом BMP4 и снижать активность Nodal/Activin каскада при его активации лигандом Xnr2 и в меньшей степени – ActivinB.

С точки зрения влияния на эндогенную активность каскадов *chordin-like1* обнаружил способность в 5 раз снижать активность эндогенного «канонического» Wnt/beta-catenin сигнального каскада и при этом существенно (в 10 раз) активировать «неканонический» Wnt/PCP сигнальный каскад.

Следующим этапом исследования функциональной активности белков Chordin-like1 стала проверка их способности напрямую связывать белки-лиганды, участвующие в активации исследуемых сигнальных каскадов.

Для этого была получена кДНК гена *chordin-like1*, кодирующая белок, меченый специфическим Мус-полипептидом, к которому в нашем распоряжении есть доступные коммерческие антитела. Меченые Flag-полипептидом лиганды были получены нами в ходе предыдущих работ.

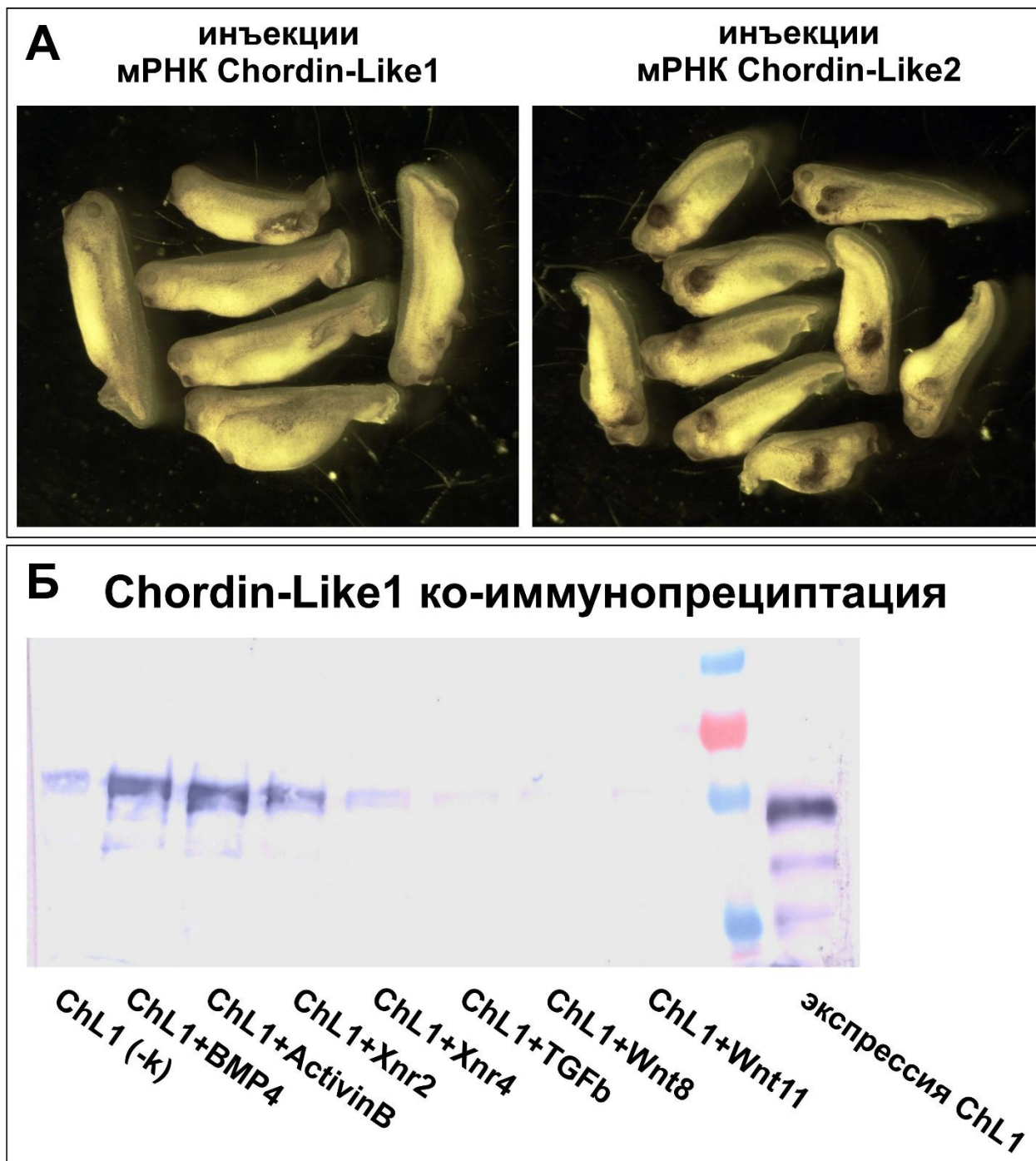


Рисунок 114. Исследования функциональных свойств генов *chordin-like*. **А** – эксперименты по индукции осевых структур мРНК *chordin-like*. **Б** – исследование способности *chordin-like1* связывать лиганды-активаторы внутриклеточных сигнальных каскадов, проведенное методом ко-иммунопреципитации.

В результате проведенных экспериментов методами ко-иммунопреципитации и иммуноблоттинга была выявлена способность белка *Chordin-like1* связывать белки BMP4, ActivinB и в меньшей степени Xnr2 (Рисунок 114, Б). Для других исследованных лигандов (белки Xnr4, TGF β , Wnt8, Wnt11) уровень сигнала связывания не превышал фоновый (контрольный) уровень. Связывание BMP4 и Xnr2 соответствует способности *Chordin-like1* подавлять активность BMP и Nodal/Activin каскадов при их экспериментальной активации показанную в люциферазных тестах. В то же время выявление механизма активации эндогенных Wnt сигнальных каскадов при инъекциях мРНК *chordin-like1*, наблюдавшейся в люциферазных тестах, требует дополнительных экспериментов.

В целом полученные результаты показывают, что функциональные свойства *Chordin-like1* не дублируют свойства, описанные для белка *Chordin*, который рассматривается в первую очередь как ингибитор BMP сигнального каскада и индуцирует формирование неполных осей у *Xenopus*.

Согласно результатам проведенных люциферазных тестов, *Chordin-like1* не влияет на активность эндогенного каскада BMP (снижает ее только в случае предварительной экспериментальной активации). В то же время *Chordin-like1* оказывает влияние на активность эндогенных Wnt каскадов, снижая активность канонического и активируя неканонический Wnt сигнальный каскады.

2.4.3. *Chordin-like2* – древний ген билатерий

2.4.3.1. Анализ динамики и паттерна экспрессии гена *chordin-like2* у речной миноги

Анализ динамики экспрессии единственного обнаруженного гена семейства *Chordin* у миног - гена *chordin-like2* был проведен на серии ранних стадий развития речной миноги *L. fluviatilis* методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени.

Проведенный анализ показал, что экспрессия *chordin-like2* у речной миноги существенно активируется на стадии поздней нейрулы (стадия 20) (Рисунок 112 Б). Ген *chordin-like2* – единственный ген семейства *chordin*, обнаруженный у миног. Настолько поздняя активация его экспрессии отличается от более ранней (на стадии гастрюлы) активации экспрессии *chordin* у шпорцевой лягушки. Это указывает на то, что функциональная активность *chordin-like2*, в отличие от *chordin*, может проявляться не на ранних этапах онтогенеза (в ходе эмбриональной индукции и ранней осевой дифференцировки), а на более поздних стадиях.

В результате проведенного анализа методом *in situ* гибридизации исследования паттерна экспрессии *chordin-like2* у эмбрионов речной миноги не было обнаружено экспрессии *chordin-like2* на ранних стадиях развития (гастрюла-нейрула), подобно тому как экспрессируется ген *chordin* у шпорцевой лягушки (Рисунок 115).

Достоверная экспрессия *chordin-like2* у речной миноги была обнаружена на более поздних стадиях (после вылупления) в отдельных структурах – глазах, верхней губе, дорсальной части хвостового отдела нервной трубки, жаберных дугах и, наиболее выражено – в эндостиле (Рисунок 115). 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 животных.

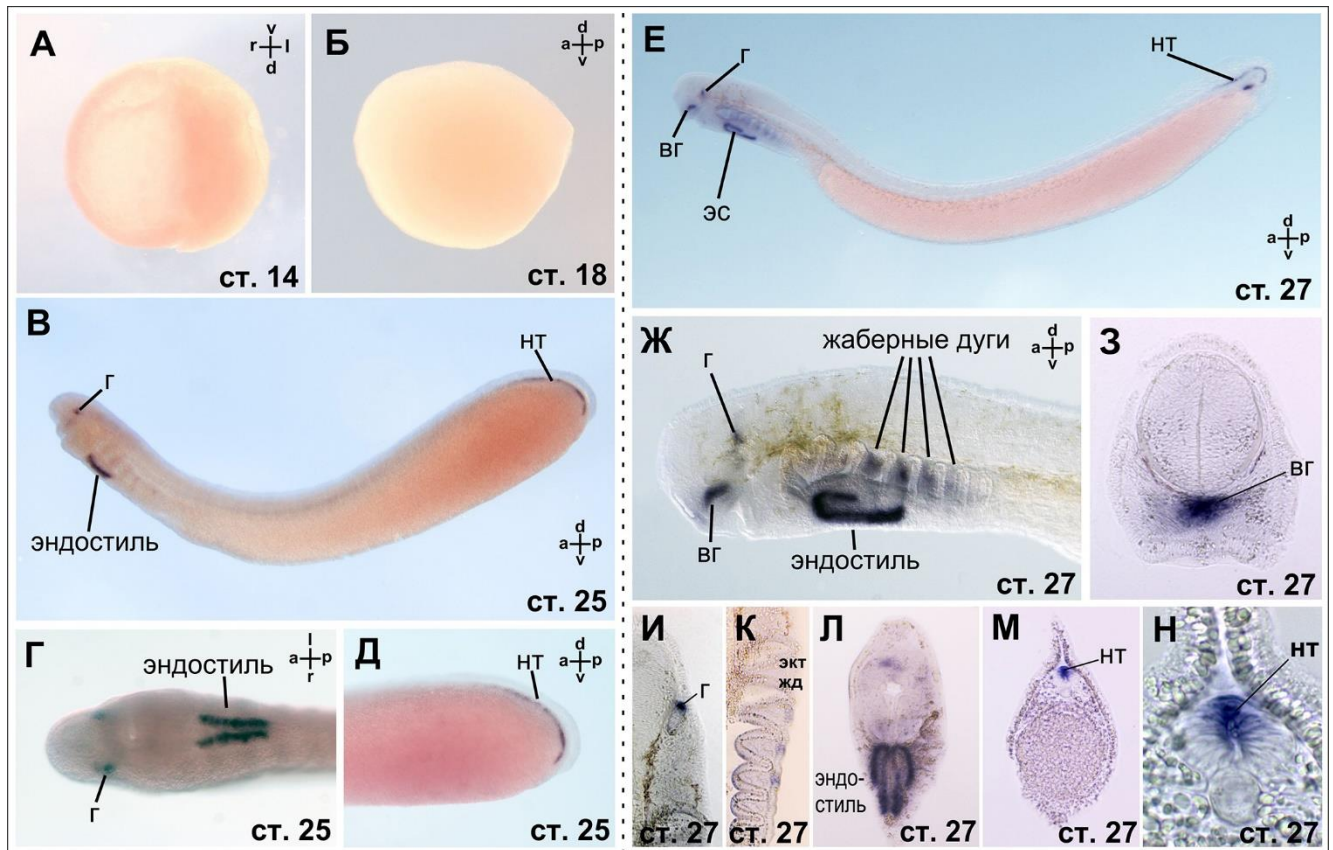


Рисунок 115. Пространственная экспрессия гена *chordin-like2* на ранних стадиях развития эмбрионов речной миноги

2.5. Особенности эмбриональной индукции у миног

Этот раздел подробно представлен в статье Ermakova et al., 2024, <https://doi.org/10.3390/ijms25042412>.

Для изучения способности белков Noggin индуцировать образование дополнительных осей тела у миног мРНК четырех генов *noggin* миног: *nogginA*, *nogginB*, *nogginC* и *nogginD* были инъецированы в эмбрионы речной миноги *L. fluviatilis* и шпорцевой лягушки *X. laevis*.

Как и ожидалось в соответствии с полученными ранее результатами (Рисунок X), инъекции мРНК *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* (в количестве 15 пг на эмбрион) успешно индуцировали вторичные оси у эмбрионов *X. laevis* (Рисунок 116 А – Д). В то же время, инъекции тех же количеств мРНК *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* (10-15 пг на эмбрион) в эмбрионы миног не приводили у них к индукции дополнительных осей тела (Рисунок 116 Ж, З, Рисунок 2 В, Г, Таблица 1). Принимая во внимание тот факт, что средний

объем эмбрионов *L. fluviatilis* примерно в 5 раз меньше, чем у *X. laevis* (диаметр икринки *L. fluviatilis* около 0,7-0,75 мм, а икринки *X. laevis* около 1,2 мм), такое количество мРНК инъецированной в эмбрионы миног обеспечивает 5-кратное избыток экзогенного материала по сравнению с экспериментами на *X. laevis*. Аналогичное отсутствие дополнительных осей у миног наблюдалось при инъекции мРНК *noggin1* и *noggin2* шпорцевой лягушки, индуктивные свойства которых хорошо исследованы и описаны в литературе (Таблица 4; Smith and Harland, 1992; Bayramov et al., 2011). Попытки увеличить количество инъецированной мРНК привели к гибели эмбрионов миног.

мРНК *nogginD* в этих экспериментах ожидаемо не индуцировал образование оси ни у миног, ни у шпорцевой лягушки, что согласуется с ранее описанными свойствами *NogginD* и его ортолога шпорцевой лягушки *Noggin4* (Таблица 4; Eroshkin et al., 2016; Ermakova et al., 2020).

Оценка индукции вторичной оси у миног затруднена тем, что у эмбрионов речной миноги на ранних стадиях (стадии 19 - 23) отсутствует пигментация, что не всегда позволяет успешно визуально выявлять оси на этих стадиях. При этом инъецированные эмбрионы часто не доживают до более поздних стадий, когда наличие дополнительных осей можно достоверно установить. В связи с этим, для учета вторичных осей на ранних стадиях, эмбрионы речной миноги, с нарушениями развития и пониженной вероятностью дожития до более поздних стадий, были зафиксированы. Для оценки количества осей у таких эмбрионов у них была оценка экспрессии гена *sonic hedgehog (shh)* методом гибридизации *in situ* (Рисунок 2). Как и у других позвоночных, у эмбрионов миног *shh* экспрессируется в хорде и вентральной части нервной трубки, начиная со стадии средней нейрулы, а позднее (со стадии 23) и в структурах переднего мозга — в гипоталамусе и в *zona limitans intrathalamica (ZLI)* (Рисунок 1, К; Osorio et al. 2005; Sugahara et al., 2011). Эмбрионы миног, без серьезных аномалий, потенциально способные дожить до более поздних стадий, культивировались до стадий 25-

27 и на этих стадиях у них производился подсчет осей тела. Таким образом, в Таблице 1 представлена сумма двух групп осей - первой, учитываемой на ранних стадиях по экспрессии *shh*, и второй, подсчитанной на более поздних стадиях по морфологическим эффектам.

Инъецированная мРНК	Кол-во независимых партий икры	Кол-во Инъецированных эмбрионов в <i>L. fluviatilis</i>	Кол-во вторичных осей	Процент индукции вторичных осей	pValue	Достоверность при $p < 0,05$
<i>Lf nogginA</i>	4	360	1	0,3%	0.67	-
<i>Lf nogginB</i>	4	360	2	0,6%	0.93	-
<i>Lf nogginC</i>	4	360	1	0,3%	0.67	-
<i>Lf nogginD</i>	4	360	1	0,3%	0.67	-
<i>Xl noggin1</i>	3	300	1	0,3%	0.77	-
<i>Xl noggin2</i>	5	540	2	0,4%	0.81	-
<i>Xl cerberus</i>	4	360	2	0,6%	0.93	-
<i>Xl chordin</i>	4	300	2	0,6%	0.81	-
<i>Xl wnt8a</i>	4	600	42	7%	$4.16 \cdot 10^{-4}$	+
ФЛД (контроль инъекций)	3	200	1	0,5%	-	-
Контроль без инъекций	4	3000	2	0,06%	0.05	-

Таблица 4. Индукция вторичных осей при инъекции синтетических мРНК указанных генов в эмбрионы речной миноги *L. fluviatilis*. Частота индукции примерно в 10-15 раз выше, чем в контрольных экспериментах, наблюдалась только в случае инъекций мРНК *wnt8a*. *Lf* – *L. fluviatilis*, *Xl* – *X. laevis*.

Критерий хи-квадрат проводили для каждого гена в сравнении с контролем инъекции ФЛД. Единственный значимый результат ($p < 0,05$) демонстрирует мРНК *wnt8a*.

Чтобы оценить специфичность наблюдаемых результатов, полученных для мРНК генов *noggin*, спектр тестируемых индукторов был расширен и в эмбрионы миног были инъецированы мРНК генов *chordin*, *cerberus* и *wnt8a* шпорцевой лягушки. В экспериментах с эмбрионами шпорцевой лягушки инъекция 50 пг/эмбрион мРНК *chordin* приводила к индукции вторичных

осей тела у 52% эмбрионов (общее число эмбрионов (n)=140). Инъекция 50 пг/эмбрион мРНК *cerberus* приводила к индукции вторичных осей у 36% эмбрионов (n = 150). Инъекция 30 пг/эмбрион мРНК *wnt8a* индуцировала вторичные оси в 64% случаев (n=120).

В экспериментах с эмбрионами речной миноги было установлено, что индукция вторичных осей с частотой, значительно (в 10-15 раз) большей, чем в контрольных опытах, наблюдалась только при инъекции в эмбрионы миног мРНК гена *wnt8a* (Таблица 4, Рисунок 116 И, К, М, Н, Рисунок 117 А, Б).

Инъекции мРНК каждого из исследуемых генов-индукторов проводились от 3 до 5 раз в независимо получаемые партии икры в течение трех лет. В силу экологических особенностей миноги являются строго сезонными животными и живые эмбрионы доступны только в период нереста (2-4 недели в году).

Возможной причиной наблюдаемого отсутствия индукции дополнительных осей у миног может быть деградация инъецированной синтетической мРНК. Развитие у миног, по сравнению со шпорцевой лягушкой, происходит медленней и, если у шпорцевой лягушки при культивировании на 18 С, стадия гаструлы с ее ранними индуктивными процессами начинается примерно через 20 часов после оплодотворения (или 18 часов после проведения инъекции), то у эмбрионов речной миноги при культивировании на 12 С аналогичная стадия, на которой происходит осевая дифференцировка эмбриона, наблюдается на четвертые сутки. Это ставит вопрос о сохранении в эмбрионе к этому моменту достаточного количества инъецированной мРНК и транслируемого на ее основе белка. Для проверки этой гипотезы в эмбрионы речной миноги были инъецированы мРНК, кодирующие *Noggin1* шпорцевой лягушки, меченый Мус-полипептидом (Xl-noggin1-Мус) (Bayramov et al., 2011), и ВМРа речной миноги меченный Flag-полипептидом (Lf-ВМРа-Flag). Наличие полипептидных меток позволило оценить количество исследуемого белка в эмбрионах на двух стадиях – стадии 17 (ранняя нейрула, Tahara, 1989) и стадии 21 (стадия головного

выроста) методом иммуноблоттинга. На рассмотренных стадиях белки Noggin1 и BMPa детектировался в сопоставимых количествах, выраженной деградации его количества на более поздней стадии не наблюдалось (Рисунок 116 О).

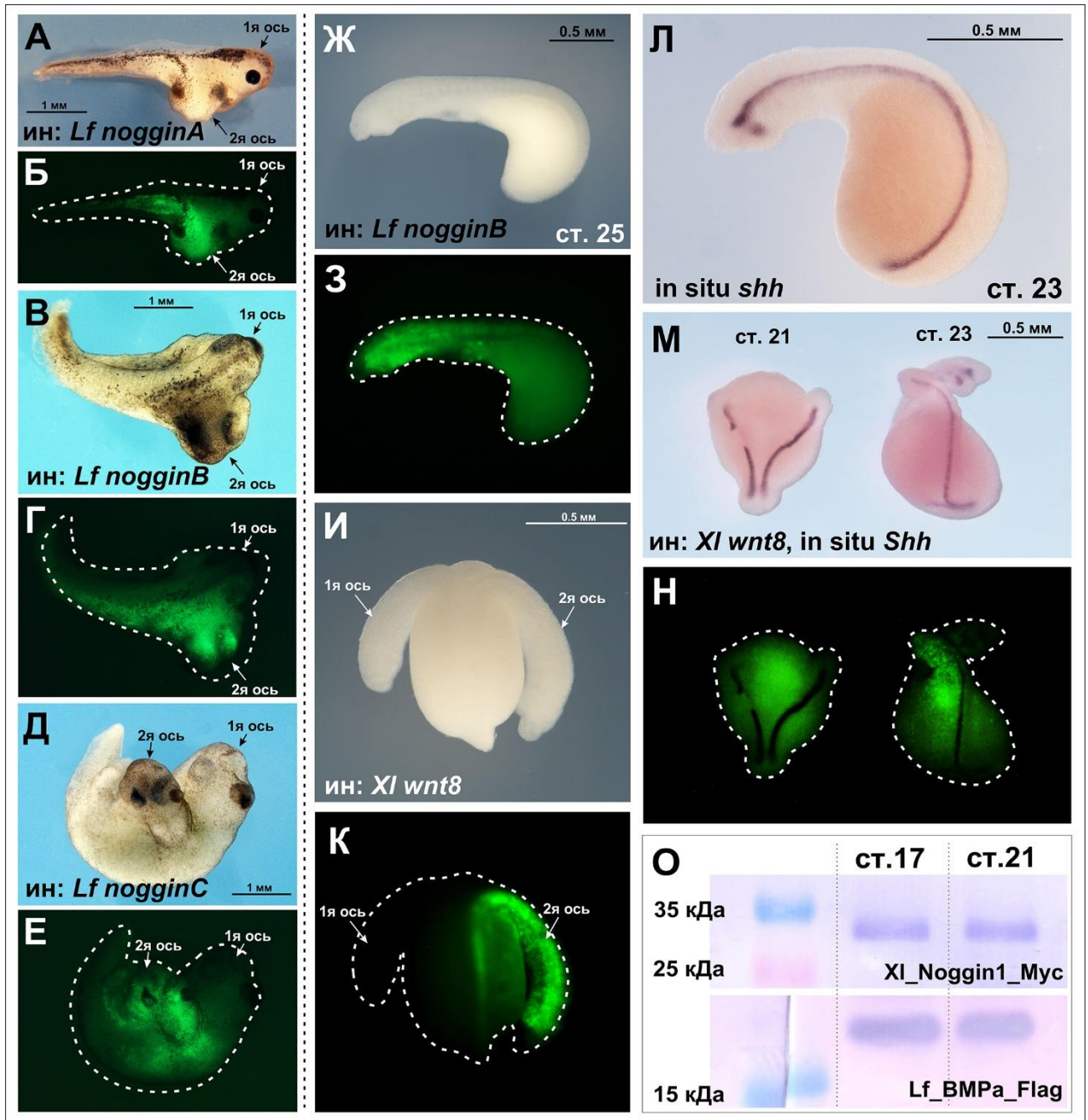


Рисунок 116. Индукция дополнительных осей тела при инъекциях генов *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* речной миноги в эмбрионах шпорцевой лягушки.

А – Е - Инъекции мРНК *nogginA*, *nogginB*, *nogginC* миног индуцируют вторичные оси у эмбрионов *X. laevis*

Ж, З - Инъекции мРНК *nogginB* не индуцируют вторичные оси у эмбрионов речной миноги.

И, К – Инъекции мРНК *wnt8a* амфибии индуцируют вторичные оси у эмбрионов *L. fluviatilis*.

Л - экспрессия *sonic hedgehog (shh)* в эмбрионах *L. fluviatilis*, обнаруженная с помощью ISH в неинъецированном контрольном эмбрионе.

М, Н – Обнаружение вторичных осей у эмбрионов *L. fluviatilis* с помощью гибридизации *in situ* мРНК *sonic hedgehog (shh)*.

О – белки, транслируемые с инъекционных мРНК *Xl_noggin1-Мус* и *Lf_BMPa-Flag*, выявляются у эмбрионов миноги на 17 и 21 стадиях.

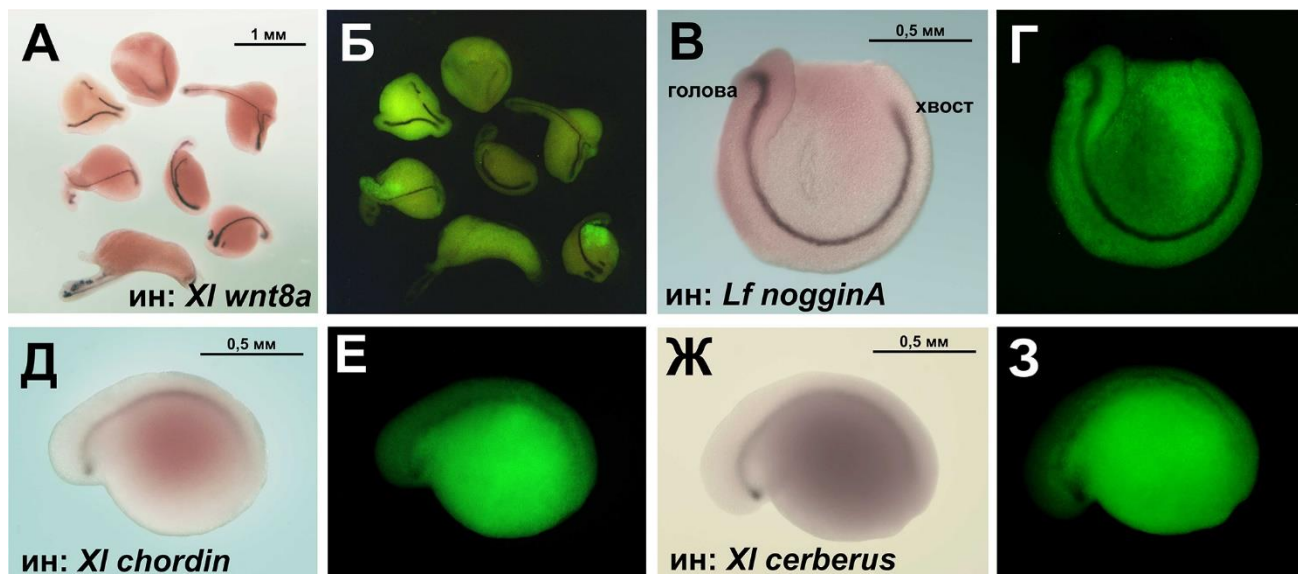


Рисунок 117. Выявление вторичных осей тела методом гибридизации *in situ* у эмбрионов речной миноги с аномалиями развития

А – Б – Разнообразие вторичных осей у эмбрионов *L. fluviatilis* после инъекции мРНК *wnt8a* шпорцевой лягушки.

В - З - эмбрионы *L. fluviatilis*, после инъекций указанных синтетических мРНК, не сформировавшие вторичные оси.

Из этого можно сделать вывод, что мРНК и белок сохраняются в эмбрионах миног при их культивировании как минимум до стадии поздней нейрулы/головного выроста и деградация инъекционной мРНК не является основной причиной наблюдаемого отсутствия индукции осей.

Одной из ключевых функций Noggins, Chordin и Cerberus традиционно считается подавление передачи сигналов BMP. У эмбрионов шпорцевой лягушки экспрессия BMP4 наблюдается в вентральной части эмбриона, начиная со стадии гаструлы (Knochel et al., 2001). У миног экспрессия *BMP2/4a*, выявленная методом гибридизации *in situ* наблюдалась относительно позже, начиная со стадии нейрулы (стадия 18), а экспрессия

других паралогов *BMP2/4* на этой стадии практически отсутствовала (McCauley and Bronner-Fraser, 2004). Такая поздняя активация экспрессии *BMP* (если это не связано с техническими ограничениями метода гибридизации *in situ*), потенциально может отражать возможную разницу в роли сигнального каскада *BMP* и, как следствие, его ингибиторов в осевой индукции у миног по сравнению с амфибиями.

На эмбрионах речной миноги была проведена оценка экспрессии *BMP* и фосфорилирования *Smad1/5*, известных в качестве внутриклеточных эффекторов сигнального каскада *BMP*. Литературные данные о характере экспрессии *BMP* были подтверждены (Рисунок 118 А-В). В то же время, фосфорилирование *Smad1/5* наблюдалось у миног с начала гаструляции (Рисунок 3 Г). На этом этапе область пониженной интенсивности окрашивания *pSmad 1/5* появляется выше и латеральнее бластопора (Рисунок 118 Г, пунктирная линия). На стадии нейрулы фосфорилирование *Smad* выражено подавляется в области нервной пластинки (Рисунок 118 Д, Е). Это указывает на то, что несмотря на отсутствие выраженной экспрессии *BMP* у эмбрионов миног на стадии гаструлы, активация эффекторов сигнального каскада *BMP* все же происходит.

В связи с этим был проведен анализ экспрессии генов *BMP2/4* в эмбрионах *L. fluviatilis* методом ОТ-ПЦР, который может быть более чувствительным, чем гибридизация *in situ*. Методом ОТ-ПЦР была выявлена активация экспрессии *BMP* у эмбрионов миног на стадии средней-поздней гаструлы (стадии 14-15 после Tahara, 1988) (Рисунок 119 А-В), то есть несколько позже, стадии ранней гаструлы (стадии 13), приведенной на Рисунке 118 А. В то же время, существенным ограничением метода ОТ-ПЦР на основе образцов тотальной мРНК целых эмбрионов является невозможность определения пространственной экспрессии изучаемых генов.

Полученные данные по фосфорилированию *Smad1/5* показывают, что основная внутриклеточная часть механизма осевой индукции на уровне подавления фосфорилирования *Smad1/5* у миног не отличается от челюстных

позвоночных. Как и у речной миноги, у шпорцевой лягушки на стадии ранней гаструлы вблизи губы бластопора выявляется зона, свободная от pSmad (Orlov et al., 2022). В области нервной пластинки на стадии нейрулы фосфорилирование Smad1/5 у миноги также ожидаемо ингибируется (Рисунок 118 Д, Е). Однако полученные данные позволяют предположить, что как механизм активации фосфорилирования Smad1/5 на стадии гаструлы, так и механизм его последующего подавления в области нервной пластинки на стадии нейрулы у миног могут отличаться от механизма, описанного у амфибий. Этот механизм может быть связан не только с активностью BMP, но и с другими факторами (Рисунок 118 Ж). Тот факт, что ни в литературных данных (McCauley and Bronner-Fraser, 2004), ни в настоящей работе не была обнаружена экспрессия *BMP2/4a* на ранних стадиях развития у миног методом гибридизации *in situ*, может быть обусловлен очень низким абсолютным количеством мРНК в эмбрионах миноги на этих стадиях по оценке уровней экспрессии генов домашнего хозяйства (EF-1a и ODC) и общему количеству РНК (Рисунок 119 Г - Е).

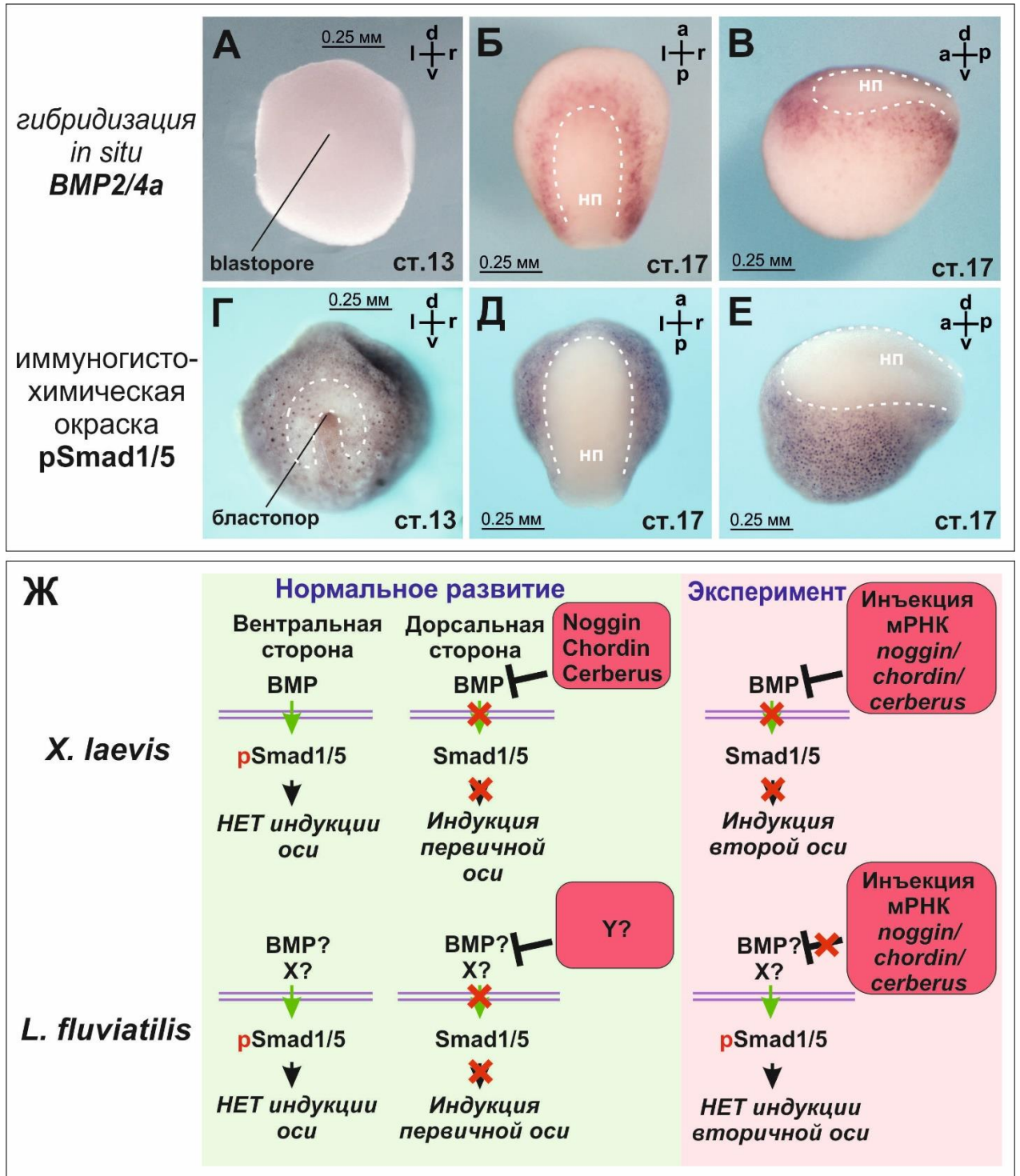


Рисунок 118. Возможные различия механизмов передачи сигналов BMP у миног и амфибий.

Экспрессия BMP2/4a, выявленная методом гибридизации *in situ* (А-В) и окрашивание антителами к фосфорилированным молекулам Smad1/5 (Г-Е) у эмбрионов *L. fluviatilis*. пр-нейральная пластинка

Ж - фосфорилирование Smad1/5 у миног может модулироваться фактором(ами), отличным от BMP, поскольку инъекции ингибиторов BMP не индуцируют вторичные оси у миноги.

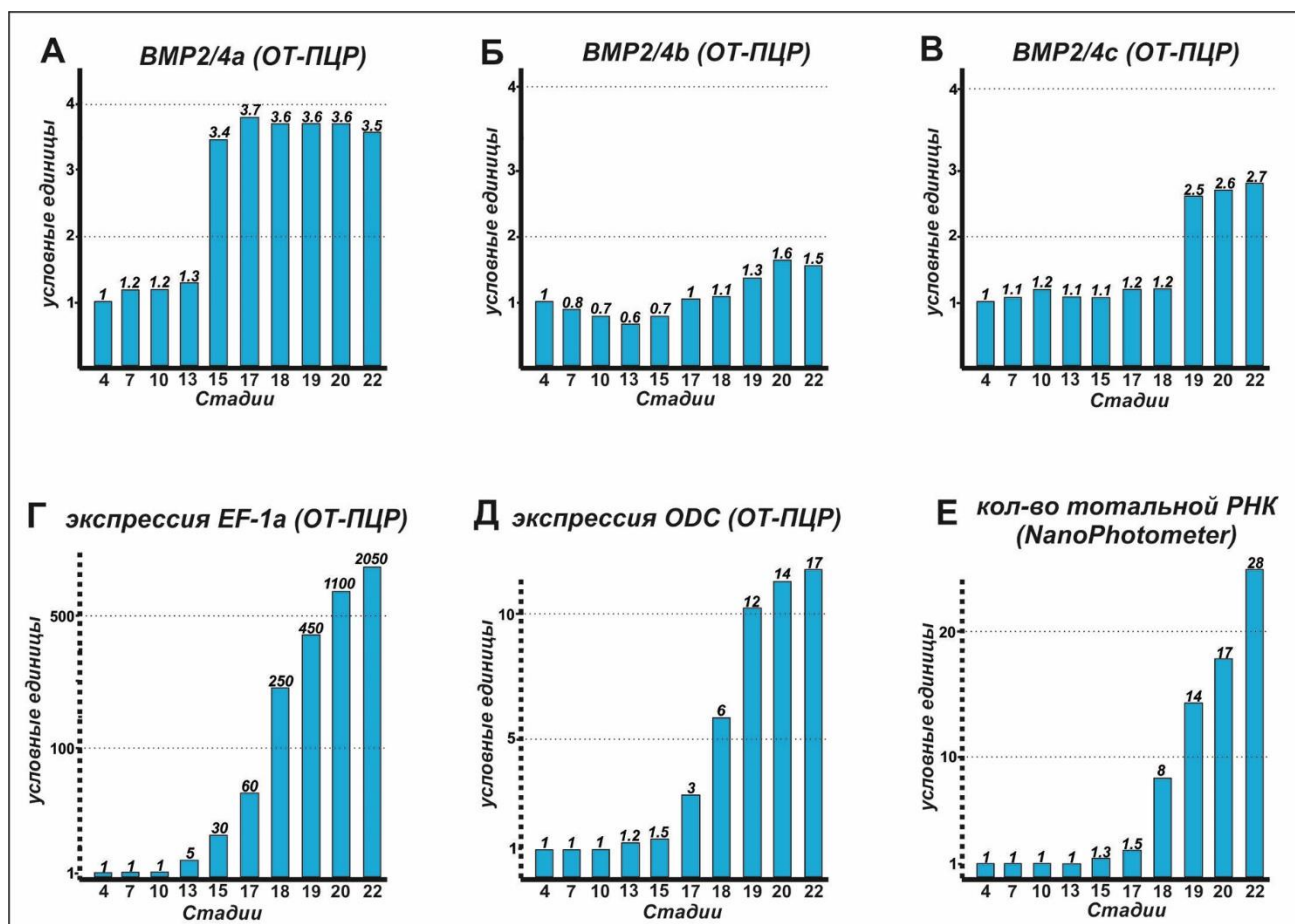


Рисунок 119. Исследование динамики экспрессии генов *BMP* у *L. fluviatilis* и оценка общего количества мРНК в эмбрионах *L. fluviatilis* на ранних стадиях развития.

А - В – ОТ-ПЦР анализ экспрессии *BMP2/4a*, *BMP2/4b* и *BMP2/4c* на ранних стадиях развития *L. fluviatilis*.

Г - Е – приблизительная оценка общего количества РНК у эмбрионов на ранних стадиях развития *L. fluviatilis*, произведенная методом ОТ-ПЦР генов «домашнего хозяйства» *EF-1a* и *ODC* на серии стадий развития (Г, Д) и путем измерения количества тотальной мРНК, выделенной из 30 эмбрионов речной миноги серии указанных стадий развития (Е).

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Семейство генов *noggin* позвоночных

3.1.1. Консерватизм паттернов экспрессии генов *noggin* у речной миноги и шпорцевой лягушки

После открытия в 1992 году белка *Noggin* в качестве эмбрионального индуктора, долгое время считалось, что у позвоночных есть только один ген *noggin* (*noggin1*). Единственным исключением были костистые рыбы, у которых было обнаружено три разных гена *noggin*. Данное отличие объяснялось дополнительным раундом геномной дупликации, произошедшей в эволюционной линии костистых рыб (Furthauer et al., 1999).

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.

Экспрессия «классического» гена *noggin1*, а также генов *noggin2* и *noggin4* подробно исследовалась у шпорцевой лягушки (Smith and Harland, 1992; Fletcher et al., 2004, Eroshkin et al., 2006). У шпорцевой лягушки экспрессия гена *noggin1* впервые обнаружена в начале гаструляции в области дорсальной губы бластопора, т. е. в области шпеманновского организатора, а в дальнейшем продолжается в хорде, средней части нервной пластинки и в полоске клеток, окружающей передний край нервной пластинки (Smith and Harland, 1992). На более поздних стадиях *noggin1* экспрессируется в хорде,

спинном мозге, зрительном пузырьке, жаберной, глоточной и нижнечелюстной дугах. Более слабая экспрессия обнаруживается в переднем мозге и в головной мезенхиме (Smith and Harland, 1992).

В отличие от *noggin1*, экспрессия *noggin2* у шпорцевой лягушки 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 (Fletcher et al., 2004, Eroshkin et al., 2006). На более поздних стадиях интенсивная экспрессия *noggin2* наблюдалась в дорсальной области развивающегося переднего мозга и менее выражено в дорсальных частях заднего мозга, дорсальных отделах сомитов и в формирующемся сердце. Кроме того, экспрессия гена *noggin2* была обнаружена в производных нервного гребня и жаберных дугах (Fletcher et al., 2004, Eroshkin et al., 2006).

Особенностью экспрессии *noggin4* является его диффузный паттерн, который впервые обнаруживается у шпорцевой лягушки на стадии гастрюлы в эпидермальном слое (Eroshkin et al., 2006). На стадии нейрулы экспрессия *noggin4* наблюдается по всей нервной пластинке, с максимумом в ее передней части, в презумптивной области головных плакод и в области будущего нервного гребня. На более поздних стадиях *noggin4* экспрессируется в эпидермисе, покрывающем нервную трубку, включая передний и спинной мозг, в слуховых пузырьках, цементных железах и производных нервного гребня, включая жаберные дуги. Тонкие полосы экспрессии наблюдались также вдоль границ 18-го сомита.

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 хордамезодерме, 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. Аналогичные эффекты наблюдались при инъекциях в эмбрионы мРНК генов *noggin* шпорцевой лягушки. 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 (Watanabe et al., 2005).

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

Подобный 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. Схожие выводы ранее были сделаны и для некоторых других регуляторных генов

после сравнительного анализа характера их экспрессии у миног и челюстноротых (Osório and Rétaux, 2008; Sugahara et al., 2016, 2017; Osório et al., 2005).

В этом контексте чрезвычайно интересной выглядит экспрессия генов *nogginB* миноги и *noggin2* шпорцевой лягушке 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.

3.1.2. Утрата *noggin1* у хрящевых рыб - уникальная ситуация для позвоночных

У хрящевых рыб обнаружена уникальная для позвоночных редукция гена *noggin1*, описанного в качестве одного из ключевых регуляторов ранней дифференцировки у амфибий.

В классической модели нейральной индукции *Noggin1* традиционно считается одним из основных факторов, участвующих в ранней эмбриональной дифференцировке путем ингибирования активности сигнального каскада BMP. Описано, что помимо своей ранней индуктивной функции *Noggin1* участвует в широком спектре процессов развития (Krause et al., 2011). Отсутствие *noggin1* у Пластиножаберных, продемонстрированное в настоящей работе путем анализа филогении и локальной геномной синтении генов *Noggin* у представителей этой группы позвоночных, может отражать особенности ранних индукционных процессов у эмбрионов Пластиножаберных.

Отсутствие *noggin1* у большинства исследованных акул и скатов, очевидно, вторично, поскольку у базальной группы хрящевых рыб, сестринской Пластиножаберным – Цельноголовых присутствуют все три

гена *noggin*, описанные у других челюстноротых – *noggin1*, *noggin2* и *noggin4*.

Среди рассмотренных Пластиножаберных, геномные сиквенсы которых получены и доступны, ДНК *noggin1* была обнаружена в геноме акулы катрана *S. acanthias*. Однако экспрессия *noggin1* у *S. acanthias* и его функциональная жизнеспособность вызывают вопросы. Так, мРНК *noggin1* не была обнаружена в базах данных транскриптомов *S. acanthias*, где присутствуют только мРНК *noggin2* и *noggin4*. Кроме того, аминокислотная последовательность Noggin1 *S. acanthias* содержит замены в консервативных положениях вблизи С-конца (валин вместо изолейцина), что отличает ее от всех других описанных Noggin1, от ланцетника до человека. Кроме того, в 5' области от данной замены Noggin1 *S. acanthias* содержит вставку аминокислотного мотива PHDRREPHRD, также отсутствующую у остальных рассмотренных белков Noggin1. Было показано, что С'-область молекулы важна для функциональной активности белков Noggin, а Noggin4 содержит R вместо I в этом положении, что коррелирует с их неспособностью связывать и ингибировать сигнал BMP. Замена валина на изолейцин и дополнительный аминокислотный мотив рядом с ним него уникальны для белка Noggin1 *S. acanthias* и не наблюдаются у других белков Noggin, от ланцетника до человека. Филогенетически катран относится к отряду Squaliformes, одной из базальных эволюционных линий акул (Cunha et al., 2017). Это подтверждает тезис о вторичности утраты *noggin1* у большинства исследованных представителей Пластиножаберных.

Кроме последовательности Noggin1 у катрана, псевдогены *noggin1* со стоп-кодонами внутри кодирующей последовательности были обнаружены в геномах короткоперой акулы мако *I. oxyrinchus* и большой белой акулы *C. carcharias*, относящихся к отряду Lamniformes и филогенетически близких друг другу (Cunha et al., 2017).

Можно дополнительно отметить, что обнаружение частичных последовательностей *noggin1* в геномах некоторых акул само по себе

указывает на чувствительность используемые алгоритмы поиска и повышают достоверность «отрицательных данных» об отсутствии гена *noggin1* у большинства проанализированных видов Пластиножаберных.

3.1.3. Гены *noggin2* и *noggin4* хрящевых рыб консервативны по характеру экспрессии и функциональным свойствам

Обнаруженные у хрящевых рыб гены *noggin2* и *noggin4*, исследованные у серой кошачьей акулы *C. griseum* демонстрируют схожие паттерны экспрессии с ортологами *noggin2* и *noggin4* у *D. rerio* и *Xenopus* (Furthauer et al., 1999, Fletcher et al., 2004; Eroshkin et al., 2006).

У *D. rerio* экспрессия гена *noggin2* была описана в передних отделах мозга и хвостовом зачатке (с большей интенсивностью в ее вентральной области), на этапах роста (Furthauer et al., 1999). У *X. tropicalis* и *X. laevis* *Noggin2* экспрессируется как в передних, так и в заднем отделах головного мозга, а также в области сердца (Fletcher et al., 2004, Eroshkin et al., 2006). Отмечалась и сравнительно слабая экспрессия в сомитах.

В то же время, характерной чертой паттерна экспрессии гена *noggin1* у *Xenopus* и *Danio* является экспрессия в осевых структурах и мезодермальных производных, начиная с их формирования на стадии гастрюлы. На стадиях фарингулы наблюдалась экспрессия в нотохорде, нервной трубке, параксиальной мезодерме и жаберных дугах (Furthauer et al., 1999, Fletcher et al., 2004).

У *C. griseum* обнаруживается экспрессия *noggin2* в головном мозге, и растущем хвосте. При этом, не было обнаружено экспрессии *noggin2* в нотохорде и осевой мезодерме *C. griseum*. Таким образом, можно заключить, что паттерн экспрессии *noggin2* у *C. griseum* соответствует экспрессии его ортологов у других позвоночных.

Ген *noggin4* у *C. griseum* демонстрирует диффузную экспрессию в головных структурах, а также сомитах туловища и хвоста. Такой паттерн

также соответствует описанному ранее паттерну *noggin4* у *X. laevis* (Eroshkin et al., 2006).

Функциональные свойства генов *noggin* *C. griseum* соответствуют описанным ранее свойствам их гомологов других челюстноротых. мРНК *noggin2* *C. griseum* продемонстрировала способность индуцировать дополнительные оси тела у эмбрионов *X. laevis*, в то время как *noggin4* такой индуктивной способности не обнаружил. Наблюдавшаяся способность мРНК *noggin2* индуцировать полные дополнительные оси, содержащие переднеголовые структуры и парные глаза свидетельствует о его способности подавлять активность как минимум сигнальных каскадов BMP и Wnt (Glinka et al. 1997, 1998). Неспособность *Noggin4* индуцировать оси может объясняться особенностями первичной аминокислотной последовательности, содержащей ряд консервативных для *Noggin4* замен, нарушающих способность этих белков связывать молекулы BMP и модулировать активность BMP сигнального каскада (Groppe et al., 2002, Eroshkin et al., 2016).

Таким образом, в отсутствие гена *noggin1*, гены *noggin2* и *noggin4* *C. griseum* демонстрируют консервативные для своих ортологов свойства. При этом сходство паттернов и функциональных свойств акульных генов *noggin2* и *noggin4* наблюдается не только с ортологам челюстноротых, но и с генами *noggin* миног (Ermakova et al., 2020), что отражает консерватизм семейства генов *noggin* у позвоночных в целом.

3.1.4. Утрата *noggin1* может быть связана с особенностями строения хрящевого скелета Пластиножаберных

Исчезновение гена *noggin1* у Пластиножаберных может быть связано с особенностями строения как эмбрионов, так и взрослых животных. Роль белка *Noggin1* как одного из ключевых ранних нейральных индукторов была продемонстрирована у амфибий, однако у других позвоночных исследования роли белка *Noggin1* в качестве раннего индуктора дают противоречивые

результаты. У эмбрионов *D. rerio*, в отличие от *Xenopus*, *noggin1* на стадии гастрюлы не экспрессируется в области первичного организатора и, следовательно, не участвует в ранней осевой дифференцировке эмбриона (Bauer et al., 1998). У куриных эмбрионов, которые сходны с эмбрионами акул по отношению объема желтка к размеру эмбриона, *noggin1* экспрессируется в области Гензеновского узла (организатора), но никаких доказательств его функциональной роли в ранней дифференцировке эмбриона получено не было (Connolly et al., 1997). Эти данные указывают на то, что роль *Noggin1* в нейральной индукции может различаться у представителей разных классов позвоночных. Возможно, что ранняя функция *noggin1* может быть заменена другими индукторами. Недавно было обнаружено, что, по крайней мере, у *X. laevis*, слабая экспрессия функционально сходных генов *noggin1* и *noggin2* наблюдается в клетках раннего шпемманновского организатора (Orlov et al., 2022). Авторы также показали, что *Noggin2* играет важную роль в определении размера зачатка хорды. Это указывает на возможность компенсации ранней функции *Noggin1* другими факторами у Пластиножаберных. Для проверки этой гипотезы, важно проанализировать экспрессию *noggin2* у Пластиножаберных на ранних стадиях эмбриогенеза. Проведение подобных исследований, а также прямых функциональных экспериментов на ранних эмбрионах Пластиножаберных остается технически сложной задачей, поскольку у доступных представителей этой группы наблюдается внутреннее оплодотворение, после чего эмбрионы развиваются в яйцах с плотной непрозрачной оболочкой в морской воде.

Поэтому, на сегодняшний день, при изучении свойств и роли генов *noggin* в онтогенезе можно лишь проводить аналогии с данными, полученными на других группах позвоночных.

Основной функцией секретируемого белка *Noggin* традиционно считается ингибирование сигнального пути BMP, участвующего в формировании соединительных тканей и внутреннего скелета позвоночных.

Скелет Пластиножаберных отличается от скелетов других классов позвоночных тем, что на протяжении всей жизни взрослого животного он почти полностью состоит из хрящевой ткани, гиалинового хряща (Pears et al., 2020). Такое состояние скелета рассматривается как вторичные, возможно, возникшее в результате преждевременной остановки образования эндохондральных окостенений, характерных для позвоночных (Gillis, 2019). При этом хрящевой скелет Пластиножаберных может укрепляться за счет поверхностной минерализации за счет образования «тессер» — шестиугольных пластинок, образующих кальцинированную оболочку элементов скелета. Отсутствие стадии гипертрофии хондроцитов при формировании хряща у Пластиножаберных и особенности строения тессер указывают на то, что кальцификация хрящевого скелета является эволюционно независимым направлением в развитии биоминерального укрепления скелета (Gillis, 2019, Dean et al., 2009; Seidel et al., 2017). Можно отметить, что этот уникальный способ формирования внутреннего хрящевого скелета у Пластиножаберных коррелирует с отсутствием *noggin1* как одного из факторов, участвующих в регуляции развития хрящевой и костной ткани.

Связь между активностью *Noggin1* и хондрогенезом у позвоночных была описана в литературе ранее. Было показано, что у *D. rerio* *noggin1* экспрессируется в презумптивных хрящевых клетках жаберных дуг, скелета головы и зачатков грудных плавников (Bauer et al., 1998). Авторы предположили, что экспрессия в развивающемся хряще может отражать исходную функцию *noggin1*, которая позже была дополнена ранней активностью в области организатора и осевой мезодермы (Bauer et al., 1998). Экспрессия паралога *noggin3* (ближайшего к *noggin1*) также наблюдалась при формировании нейрокраниума и грудного хряща у рыбки данио (Fürthauer et al., 1999). Экспрессия *noggin* в хондроцитах и его участие в хондрогенезе были обнаружены и показаны на мышах (Brunet et al., 1998). Начало экспрессии *noggin1* у мышей отмечалось с начала развития скелета в основных областях конденсации клеток в конечностях и туловище, что

указывает на его важную роль в раннем развитии скелета (Nifuji et al., 1999). При экспериментальном нокауте *noggin* у мышей наблюдаются тяжелая дисплазия хряща и дефекты суставов (Brunet et al., 1998). Повышение уровня экспрессии *noggin1* под контролем промотора коллагена, вызывающая подавление сигнала BMP, приводила к значительному сокращению хрящевых тканей и структур. Это указывает на важность сигнала BMP для развития хрящевой ткани (Tsumaki et al., 2002). Аналогичные результаты были получены при ретровирусной экспрессии *noggin1* в развивающихся конечностях птиц, где ингибирование BMP также приводило к нарушению дифференцировки хондроцитов и хондрогенеза (Pizette and Niswander, 2001). У головастика *Xenopus* повышение уровня экспрессии *noggin1* на стадиях 50–51 приводит к уменьшению количества уплотнений хряща пальцев (Jones et al., 2013). С другой стороны, было показано, что при подавлении экспрессии *noggin* у мышей наблюдается задержка или подавление ряда окостенения (Tylzanowski et al., 2006).

В совокупности эти данные указывают на участие регуляторной петли BMP/Noggin в формировании костно-хрящевого скелета у позвоночных. Можно предположить, что появление и закрепление в эволюции Пластиножаберных их уникальных гистологических характеристик скелета могло быть связано со сдвигом регуляторного баланса BMP/Noggin в этой группе при исчезновении гена *noggin1*. Однако установление доказательной связи между отсутствием *noggin1* у Пластиножаберных и отсутствием у них внутреннего скелетного окостенения требует проведения дополнительных функциональных экспериментов.

На настоящем этапе можно констатировать, что у акул, на примере, *noggin1* можно наблюдать последовательные стадии исчезновения изначально функционального гена: от ослабления экспрессии/функции гена (*C. milii* и *C. acanthias*) через его псевдогенизацию (*C. carcharias* и *I. oxyrinchus*), до его полного исчезновения из генома у большинства проанализированных видов Пластиножаберных.

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

В качестве основной функции «классического» *Noggin1* 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 *Noggin1* и *Noggin2* была показана в люциферазных тестах, методами ОТ-ПЦР и подтверждена способностью *Noggin* напрямую связывать белки-лиганды, в норме активирующие каскады *Nodal/Activin* и *Wnt*. Также ингибирование *Nodal/Activin* и *Wnt* каскадов белками *Noggin* было подтверждено способностью их делеционных (Δ clip) мутантов, лишенных способности связывать молекулы BMP, сохранять ингибиторную активность в отношении *Nodal/Activin* и *Wnt* каскадов.

Ингибиторная активность *Noggin* в отношении *Nodal/Activin* и *Wnt* каскадов менее выражена, чем у других описанных ингибиторов – *Follistatin* и *Serberus* и 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 показано, что ингибирование *Activin/Nodal*, BMP и *Wnt* белком *Noggin2* в клетках переднего края нервной пластинки необходимо для нормального развития переднего мозга.

Важность ингибирования сигналов *Wnt* и BMP в передней части нервной пластинки на стадии поздней гаструлы, т.е. именно в том месте и в то время, где и когда экспрессируется *Noggin2*, ранее была описана в литературе (Kiecker and Niehrs, 2001; Lagutin et al., 2003; Onai et al., 2004). Ингибирование *Nodal/Activin* также важно для нормального развития

головных структур, включая конечный мозг и глаза (Niehrs, 1999; Piccolo et al., 1999). В настоящей работе показано, что *Noggin2*, экспрессируясь на переднем крае нервной пластинки выступает в роли ингибитора *ActivinB* в этой области, обеспечивая нормальное развитие переднеголовных структур.

3.1.6. Noggin4 модулирует активность Wnt сигнальных каскадов и участвует в регенерации

На уровне первичной аминокислотной последовательности у белка *Noggin4*, по сравнению с белками *Noggin1* и *Noggin2*, наблюдается ряд замен в участках, которые были описаны как принципиально важные для обеспечения функции связывания молекул BMP (Groppe et al., 2002, Рисунок 1). Это соответствует показанной в работе неспособности *Noggin4* выступать в качестве антагониста BMP сигнального каскада.

Проведенные исследования паттерна экспрессии показали, что ген *noggin4* достаточно диффузно экспрессируется в анимальном полушарии. Области экспрессии гена *noggin4* у представителей разных групп позвоночных (миног, амфибий и птиц) сходны и, в целом, комплементарны области экспрессии гена *noggin1* (Eroshkin et al., 2005, Borodulin et al, 2012).

Функциональные тесты показали способность *Noggin4* выступать в качестве антагониста канонического Wnt/ β -catenin сигнального каскада и напрямую связывать молекулы белка Wnt8. Способность белка *Noggin4* связывать белок Wnt8 была показана методом ко-иммунопреципитации и методом поверхностного плазмонного резонанса. Хотя сам по себе белок *Noggin4* не обладает способностью индуцировать формирование вторичных осей тела, в сочетании с доминантно-негативной формой рецептора BMP (специфический ингибитор BMP каскада), *Noggin4* проявил способность дополнять ингибиторную активность доминантно-негативного BMP рецептора и индуцировать формирование полных вторичных осей тела у головастика шпорцевой лягушки.

Наблюдаемое влияние Noggin4 на Wnt/PCP каскад на первый взгляд выглядит противоречиво. мРНК *noggin4* активирует Wnt/PCP-каскад и может усиливать активаторный эффект мРНК Wnt11 и Wnt5a. Но и подавление трансляции эндогенной мРНК *noggin4* с помощью МО также активирует Wnt/PCP-каскад. Таким образом, можно говорить о том, что любое нарушение нормальной экспрессии *noggin4* приводит к активации Wnt/PCP сигнального каскада.

Не исключено, что такие противоречивые данные, могут быть следствием взаимного влияния друг на друга разных сигнальных каскадов и наблюдаемое влияние Noggin4 на Wnt/PCP каскад представляет собой смесь прямых и не прямых эффектов Noggin4.

Суммарные данные о влиянии белков Noggin на активность исследованных внутриклеточных сигнальных каскадов представлена на Рисунке 120.

	TGF-beta каскады			Wnt каскады	
	Smad1 зависимый каскад	Smad2 зависимый каскад		Wnt/beta-cathenin каскад	Wnt/PCP каскад
	BMP4	ActivinB	Xnr	Wnt8	Wnt11
Noggin1	+↓	+	+	+↓	—
Noggin2	+↓	+↓	+↓	+↓	—
Noggin4	—	—	—	+↓	+↑

+ Связывание

— Отсутствие связывания

↓ Ингибирование

↑ Активация

Рисунок 120. Влияние белков Noggin на активность TGF-beta и Wnt сигнальных каскадов.

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.

3.1.7. Предполагаемый сценарий появления и эволюции генов семейства *Noggin* позвоночных

Исследованная филогения, локальная геномная синтения, особенности экспрессии и функциональный анализ показывают, что белки *Noggin* позвоночных можно уверенно разделить на два кластера: *NogginA/B/C/1/2* и *NogginD/4*. Это ставит вопрос о количестве генов *Noggin* у предковых позвоночных.

В качестве аргумента в пользу гипотезы о существовании двух генов *Noggin* у предка позвоночных можно привести факт наличия множественных *noggin*-подобных генов (*noggin-like genes - nlg*) у плоского червя *Schmidtea mediterranea* (Molina et al., 2009, 2011), которые можно рассматривать как возможных предшественников гипотетических *NogginA/B/C/1/2* и *NogginD/4* у предковых позвоночных. Как показали авторы исследований генов *nlg*, используя эмбрионы *X. laevis* в качестве моделей, по крайней мере некоторые из генов *nlg* действительно способны связывать BMP, подобно белкам *Noggin1* и *Noggin2* позвоночных, а другие нет, подобно белку *Noggin4*.

Однако, проблемой проведения прямого филогенетического родства генов *nlg* плоских червей с геном *noggin4* является отсутствие гомологов *noggin4* у всех современных вторичноротых предшественников позвоночных, отделяющих их от плоских червей, в том числе ближайших родственников позвоночных – беспозвоночных хордовых и полухордовых. В этом контексте убедительней выглядит гипотеза, предполагающая независимое появление гена *noggin4* и *noggin*-подобных генов, белковые продукты которых лишены

способности связывать BMP, у позвоночных и плоских червей, соответственно. В этом случае дополнительная копия(и) *Noggin* могла сохраниться после дубликации, поскольку в дополнение к связыванию BMP, обладает способностью связывать лиганды других сигнальных каскадов, таких *Wnt* и *Nodal/Activin*, тем самым участвуя в регуляции других важных процессов развития (Bayramov et al., 2011, Eroshkin et al., 2016).

Монофилия генов *Noggin* позвоночных подтверждается наличием в окрестностях всех паралогов *Noggin* гена *ankfn* и ряда других общих соседних генов.

Предполагаемый сценарий эволюции генов *Noggin* позвоночных представлен на Рисунке 121.

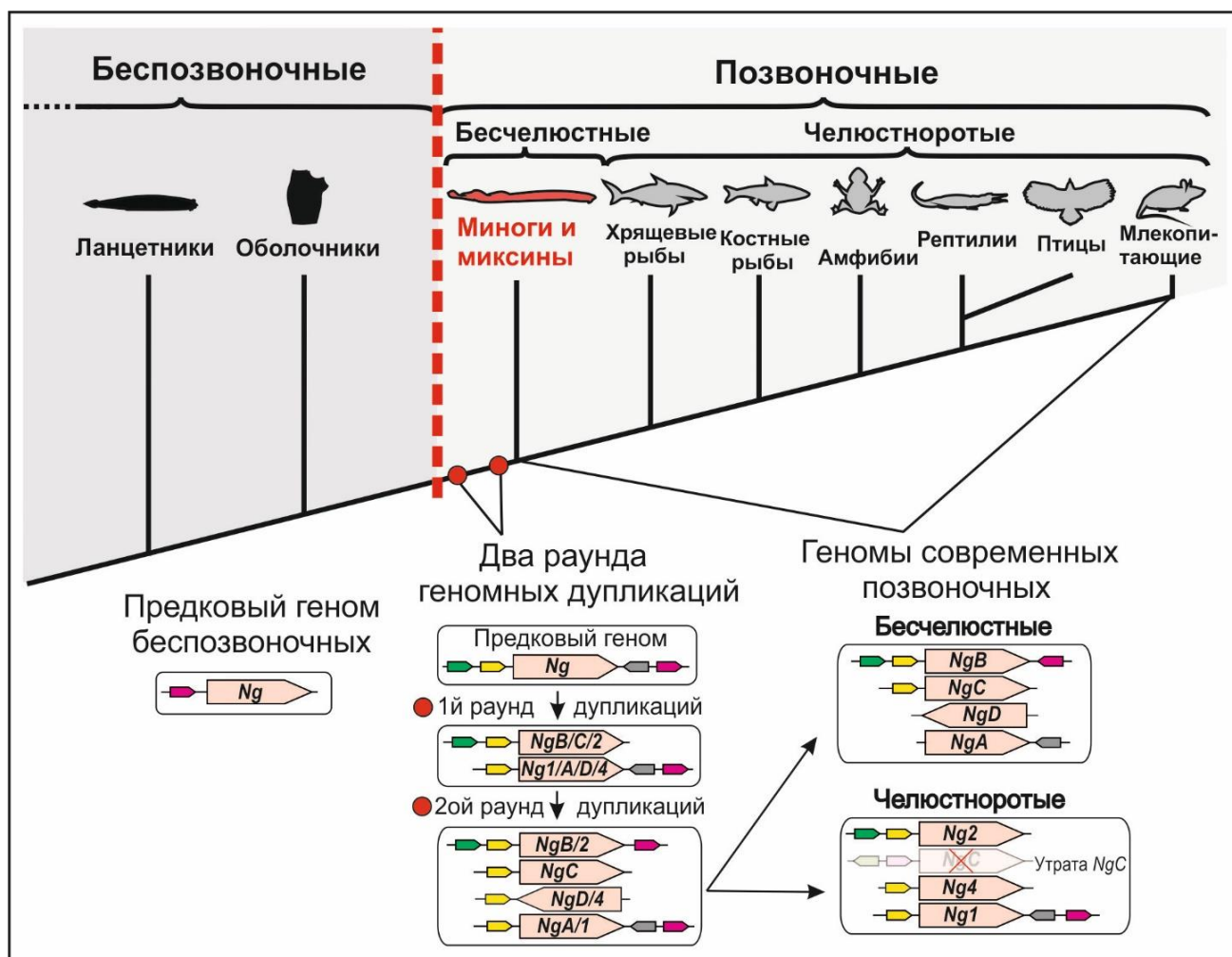


Рисунок 121. Схема предполагаемого сценария появления генов семейства *Noggin* в эволюции позвоночных.

3.2. Семейство генов *Foxg1* 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 осетрообразных рыб - одной из древнейших групп челюстноротых, доступных для исследований в наши дни. На основе проведенного анализа филогении, синтении и паттернов экспрессии предпринята попытка выявления пар ортологов (онологов) генов *foxg1* бесчелюстных и челюстноротых. Такой анализ представляет интерес в контексте проблемы тайминга второго раунда полногеномной дупликации, имевшей место на ранних этапах эволюции позвоночных. 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. Таким образом, полученные данные могут соответствовать как сценарию двух раундов у общего предка позвоночных до разделения линий бесчелюстных и челюстноротых, так и сценарию независимой дупликации в этих линиях.

3.2.1. Гены *foxg1* у миног

Гены *foxg1* у миног описывались в литературе (Higushi et al. 2019, Ermakova et al. 2019). Поскольку основной парадигмой на момент выполнения этих работ было наличие одного гена *foxg1* у позвоночных, по аналогии с высшими позвоночными, на которых и проводилась большинство работ по исследованию экспрессии и функционального вклада FoxG1 в развитие головного мозга. Кроме того, у ближайших родственников позвоночных – ланцетников и оболочников также описано по одному гену *foxg1*. Продуктивный скрининг был дополнительно затруднен недостаточной полнотой имевшихся на тот момент геномным сиквенсов круглоротых. Как

показали последующие исследования, и у бесчелюстных и у эволюционно базовых групп челюстноротых присутствуют несколько паралогов *foxg1*. Проведенный в настоящей статье анализ позволяет заключить, что предыдущие описания *foxg1* у миног относились к разным аллелям: в работе Higuchi et al. 2019 был описан ген *foxg1 α* , в то время как в работе Ermakova et al. 2019 – ген *foxg1 β* .

В работе Higuchi et al. (2019) паттерн *foxg1a* показан в контексте развития структур внутреннего уха у круглоротых. Экспрессия исследовалась на камчатской миноге – *L. camtschaticum* на стадии 25, в то время как в настоящей работе исследование паттерна методом гибридизации *in situ* проводилось на речной миноге *L. fluviatilis* на серии ранних стадий. Зонд Higuchi et al. 2019, согласно приведенному описанию, соответствовал 5'-зонду нашего исследования, то есть включал последовательность 5'-область от высоко-консервативного Forkhead binding домена (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BBG56415.1/>). К общим чертам наблюдаемого паттерна *foxg1 α* в обеих работах можно отнести экспрессию во всем конечном мозге (в то время как другие гены – *foxg1 β* и *foxg1 γ* экспрессируются только в вентральных областях конечного) и высокий уровень фонового сигнала.

3.2.2. Гены *foxg1* у челюстноротых

Описание трех генов *foxg1* у акул было приведено в работе Hara et al. 2018. В работе представлены *de novo* полногеномные сиквенсы коричневополосой кошачьей акулы и японской кошачьей акулы (*S. torazame*), а также улучшенные геномные сиквенсы китовой акулы. Ген *FoxG3* (который в нашей работе рассматривается как *foxg1b*, аргументы приведены выше в разделе, посвященном филогенетическому анализу) привлек к себе внимание в рамках геномного анализа тем, что был утрачен у наземных позвоночных. В работе Хара и коллег приведены исследования паттернов

экспрессии генов *FoxG* японской кошачьей акулы на стадиях 24 и 27 (Hara et al. 2018, Figure 4, Supplementary Figure 6). Согласно описанию, *FoxG1* (*foxg1a*) экспрессируется в конечном мозге, глазных структурах, лицевых ганглиях. На стадии 27 также показано начало экспрессии в зачатках жаберных дуг (Hara et al. 2018, Supplementary Figure 6C). Ген *FoxG3* (*FoxG1b*) на стадии 23 экспрессируется в антеродорсальном отделе сетчатки, в акустико-лицевом комплексе ганглиев, а также на слабом уровне в блуждающем ганглии и вентральном конце презумптивных жаберных дуг (см. Hara et al. 2018, Figure 4 E). На стадии 27 экспрессия в блуждающем ганглии усиливается, а в жаберных дугах исчезает. Ген *FoxG2* (*FoxG1c*) экспрессируется в акустико-лицевом комплексе ганглиев и блуждающем ганглии (см. Hara et al. 2018, Figure 4 E). Таким образом, у генов *FoxG1* акул наблюдается пространственная субфункционализация. У *FoxG1* генов, наряду с общими областями экспрессии (акустико-лицевом комплексе ганглиев и блуждающем ганглии) есть и уникальные особенности: для *FoxG1* это экспрессия в конечном мозге, ушных пузырьках, а также вентральной части глазных структур (на стадии 23) и жаберных дугах (на стадии 27). Для гена *FoxG3* это экспрессия передне-спинной области глазных структур.

В настоящей работе мы провели исследование паттернов экспрессии трех паралогов *foxg1* у другой эволюционно древней группы челюстноротых – осетрообразных рыб, на примере стерляди. Вследствие дополнительной геномной дупликации в линии осетрообразных, у представителей этой группы число паралогов генов *foxg1* увеличено. У стерляди и веслоноса нами обнаружены по 5 паралогов *foxg1*. В то же время, проведенный анализ филогении и локальной геномной синтении показал наличие у осетров трех базовых паралогов *foxg1*, ортологичных генам других челюстноротых, два из которых (*foxg1a* и *foxg1b*) представлены удвоившимися копиями, расположенными в разных хромосомах, но демонстрирующих очень высокую (более 90% по нуклеотидным последовательностям) степень гомологии друг с другом и сходство локальной геномной синтении. Если

присутствие удвоившихся паралогов *foxg1a* и *foxg1b* является уникальной особенностью осетрообразных вследствие геномной дупликации, произошедшей в этой группе, то само по себе наличие трех паралогов *foxg1a*, *foxg1b* и *foxg1c* характерно для акул, осетрообразных и костных рыб. В сочетании с одним описанным геном *foxg1* у ближайших родственников позвоночных (бесчерепных и оболочников), такой набор паралогов у эволюционно базально дивергировавших групп челюстноротых может свидетельствовать о том, что они произошли в результате двух раундов полногеномных дупликаций на ранних этапах эволюции этой группы (Nakatani et al., 2021, Bayramov et al., 2023).

Особенности пространственной экспрессии генов *foxg1* осетрообразных обнаруживают общие черты с генами *foxg1* акул. Техническим преимуществом осетров при анализе пространственной экспрессии является внешнее оплодотворение и возможность культивирования икры пресной воде в чашках Петри, по аналогии с икрой миног или стандартного лабораторного объекта *Xenopus*. У акул же эмбрионы развиваются внутри плотной оболочки яйца, и недоступны для внешних наблюдений (Musa et al., 2018). Наряду с малым количеством яиц в кладке и трудностями содержания, это создает трудности для набора достаточного количества материала нужных стадий развития.

Согласно нашим данным, *foxg1a* осетров экспрессируется в конечном мозге, обонятельных мешках, глазах (на слабом уровне), а также в акустико-лицевом комплексе ганглиев. На поздних стадиях наблюдается экспрессия в обонятельных структурах. *Foxg1b* экспрессируется в глазах, ушных структурах, в акустико-лицевом комплексе ганглиев желудочке заднего мозга. *Foxg1c* экспрессируется в ушных структурах, желудочке заднего мозга, а на поздних стадиях в ростральных усиках и на концах жаберных филламентов.

При сравнении паттернов *foxg1* стерляди и кошачьей акулы можно отметить общие черты экспрессии ортологов *foxg1a* и *foxg1b*. *Foxg1a* у обоих

видов имеет наиболее широко представленный экспрессионный паттерн, обнаруживаясь в конечном мозге, глазных и ушных структурах и комплексах ганглиев. Общей для *foxglb* является экспрессия в глазах и комплексах ганглиев. Ген *foxglc* у обоих видов демонстрирует наиболее пространственно ограниченный паттерн, у осетров представленный экспрессией в ушных структурах и заднем мозге а у акул - в комплексах ганглиев.

Таким образом, ортология трех онологов *foxgl* у челюстноротых прослеживается по совокупности анализов филогении, локальной геномной синтении и по особенностям пространственной экспрессии, отражающей сходство регуляторных элементов.

Появление на ранних этапах эволюции челюстноротых трех паралогов важного регуляторного переднеголового гена *foxgl* могло стать одним из триггеров существенно развития переднего мозга в этой группе животных и, в частности, появления уникального конечного мозга, отсутствующего у бесчерепных и оболочников. После дубликации 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. В то же время, исходя из анализа паттернов экспрессии видно, что для генов *foxgl* характерна субфункционализация, в результате которой наиболее широкий паттерн (и, вероятно, функциональную роль) 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.

В контексте вопроса второго раунда полногеномной дубликации у позвоночных интерес представляет выявление пар ортологов у представителей бесчелюстных и челюстноротых. Сделать это по данным

анализов филогении и геномной синтении не получилось. При филогенетическом анализе два из трех генов бесчелюстных уверенней группируются друг с другом, чем с генами челюстноротых.

При оценке локальной геномной синтении *foxg1* миног имеют общих соседей со всеми генами челюстноротых, что также не позволяет выявить их ортологов.

Для формализации сравнения и соотнесения особенностей экспрессии генов миног с генами стерляди и кошачьей акулы были составлены таблицы описания экспрессии (Таблица 5; Таблица 6).

	<i>AcRu_foxg1a</i>	<i>AcRu_foxg1b</i>	<i>AcRu_foxg1c</i>
<i>Lf_foxg1α</i>	Конечный мозг Ушная плакода Обонятельная плакода	Ушная плакода	Ушная плакода
<i>Lf_foxg1β</i>	Вентральная часть конечного мозга Ушная плакода	Ушная плакода	Ушная плакода
<i>Lf_foxg1γ</i>	Вентральная часть конечного мозга Ушная плакода Глазные пузыри Эпибранхиальные ганглии	Ушная плакода Глазные пузыри Эпибранхиальные ганглии	Ушная плакода

Таблица 5. сравнение экспрессии генов *foxg1* речной миноги (*Lf*) и стерляди (*AcRu*) в отдельных эмбриональных структурах.

	<i>ScTo_foxg1a</i>	<i>ScTo_foxg1b</i>	<i>ScTo_foxg1c</i>
<i>Lf_foxg1α</i>	Конечный мозг Ушная плакода Обонятельная плакода		
<i>Lf_foxg1β</i>	Вентральная часть конечного мозга Ушная плакода Жаберные дуги	Жаберные дуги (слабо)	
<i>Lf_foxg1γ</i>	Вентральная часть конечного мозга Ушная плакода Глазные пузыри Эпибранхиальные ганглии	Глазные пузыри Эпибранхиальные ганглии	Эпибранхиальные ганглии

Таблица 6. сравнение экспрессии генов *foxg1* речной миноги (*Lf*) и кошачьей акулы (*ScTo*) в отдельных эмбриональных структурах.

Проведенное сравнение показывает, что, подобно, анализу геномной синтении, в характере экспрессии генов *foxg1* миног и челюстноротых наблюдаются множественные пересечения, которое затрудняют выявление пар ортологов.

Так, у миног все три гена *foxg1* экспрессируются в области конечного мозга, в то время как у челюстноротых в конечном мозге экспрессируется только ген *foxg1a*. В ушных структурах у стерляди экспрессируются все три гена *foxg1*, в то время как у миног – только *foxg1β*. В глазных структурах у миног экспрессируется только *foxg1γ*, в то время как у акул и осетров – гены *foxg1a* и *foxg1b*. Такие множественные пересечения паттернов экспрессии с одной стороны подтверждают сходство регуляторных элементов и общность происхождения генов *foxg1* в результате геномных дупликаций, однако не дают убедительных свидетельств в пользу одного или двух общих раундов дупликации у предковых позвоночных о разделения линий бесчелюстных и челюстноротых.

Проведенная нами оценка относительного времени второго раунда дупликаций *foxg1* в линиях бесчелюстных и челюстноротых показывает, что речь в обоих случаях идет о сравнительно древних эволюционных событиях, имевших место на ранних этапах формирования генотипа обеих линий. Согласно приведенной оценке, эти раунды дупликаций имели место раньше геномной дупликации в линии костистых рыб, древность которой оценивается около 320-350 млн лет (Jaillon et al., 2004). С учетом того, что в сценарии независимых вторых раундов полиплоидизаций у бесчелюстных и челюстноротых, древность этих событий в двух линиях оценивается сходно – около 450-460 млн лет назад (Marlétaz et al., 2023), отдать предпочтение теориям одного или двух раундов геномных дупликаций в ранней эволюции позвоночных до разделения бесчелюстных и челюстноротых затруднительно.

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 *foxg1a*, 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 *foxg1a*, а гены *foxg1b* и *foxg1c* могли демонстрировать тенденцию к исчезновению.

3.2.3. Филогения паралогов foxg1 осетрообразных подтверждают модель предковой геномной дупликации с последующей асинхронной редиплоидизацией

Важным вопросом при исследовании генов *foxg1* осетрообразных является анализ филогении пяти паралогов у представителей двух линий внутри отряда, представителями которых являются стерлядь (*Acipenser*) и веслонос (*Polyodon*). Кластеризация паралогов у двух родов позволяет соотнести сроки редиплоидизации генов относительно видообразования в рамках предложенных моделей разрешения онологов (Рисунок 90). Еще одним путем редиплоидизации является утрата одной из копий дублировавшегося гена (Рисунок 90).

Филогенетический анализ показал, что весь комплекс описанных сценариев можно наблюдать на примере генов *foxg1* осетрообразных. Редиплоидизация гена *foxg1c* произошла путем элиминирования второй копии, редиплоидизация генов *foxg1b* произошла на уровне общего предка *Polyodon* и *Acipenser* (AOR модель), а редиплоидизация генов *foxg1a* - у

Polyodon и *Acipenser* независимо (LOR модель) (Рисунок 90). Такое совмещение паттернов кластеризации разных генов у родственных видов (родов) соответствует модели предковой геномной дупликации с последующей асинхронной редиплоидизацией (Redmond et al., 2023).

Кроме того, разделение двух аллелей *foxg1b* до разделения линий *Polyodon* и *Acipenser* подтверждает геномную дупликацию, произошедшую на уровне общего предка осетрообразных.

3.3. Гены класса *Anf* у миног

3.3.1. 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 (Zaraisky et al., 1992). На основании серии работ, посвященных исследованию регуляции экспрессии и функциональной активности *Anf* в передней части нервной пластинки на ранних стадиях развития (гастрულанейрула) была выдвинута гипотеза о важности появления *Anf* у предковых позвоночных для формирования конечного мозга. В настоящей работе эта гипотеза получила важное подтверждение в результате обнаружения гомологов *Anf* у трех видов миног *L. camtschaticum*, *L. fluviatilis* и *P. marinus*.

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 122; Bayramov et al., 2016).

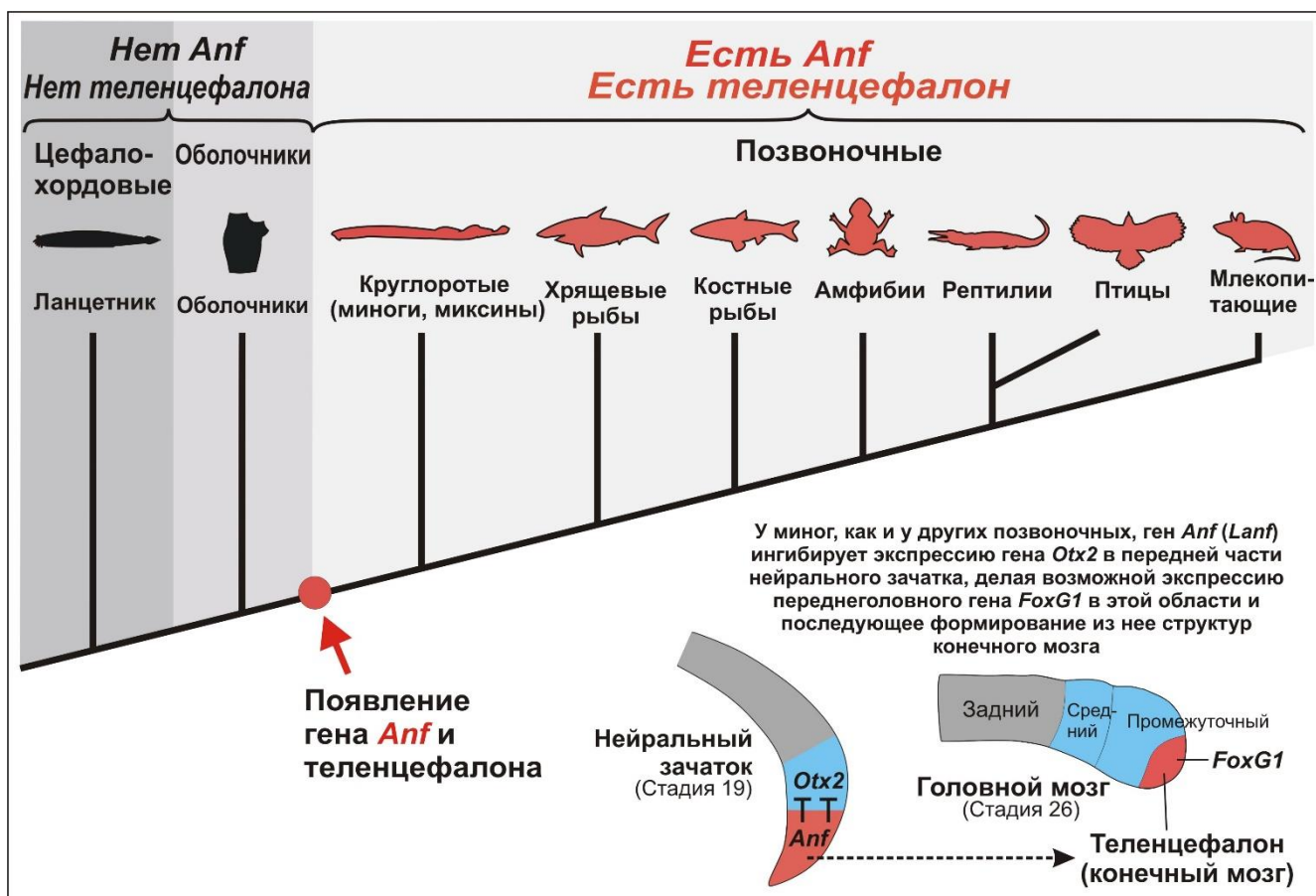


Рисунок 122. Появление гена *anf* в эволюции позвоночных соответствует возникновению у них структур конечного мозга.

3.3.2. Гипотеза гибридного происхождения уникальных генов класса *anf* позвоночных

Учитывая уникальность гена *anf* у позвоночных исследование его происхождения в ходе эволюции позвоночных представляет большой интерес.

В предыдущих исследованиях было показано, что гомеодомен *Anf* отличается от других типов гомеодоменов чрезвычайно высокой скоростью аминокислотных замен (Kazanskaya et al., 1997). Исходя из этого, одним из возможных сценариев появления гена *anf* может быть быстрая эволюция из копии другого гомеобоксного гена после его дупликации у предка позвоночных (Holland et al., 1994).

В то же время, проведенный в настоящей работе анализ показывает, что гомеодомен *Anf*, по-видимому, представляет собой гибрид двух разных

гомеодоменов, принадлежащих к классам *Prd* и *Antp*. Важно отметить, что N- и C-части *Anf*, гомологичные соответствующим участкам гомеодоменов *Prd* и *Antp* соответственно, кодируются разными экзонами, разделенными 3-м интроном в генах *Anf* у всех видов. Более того, в большинстве генов класса *Prd* и в некоторых генах класса *Antp* эти участки гомеодомена также разделены интроном. В противном случае предполагаемое соединение разных фрагментов генома с большой вероятностью могло привести к ошибкам в структуре гомеодомена вследствие сдвига рамки считывания или образования нефункционального белка.

Гипотеза гибридного происхождения гена *Anf* согласуется с некоторыми особенностями его экспрессии и физиологических функций. Если 5'-область геномной последовательности *Anf* произошла от гена класса *Prd*, то она также могла унаследовать промоторную область этого гена. Поскольку многие гены класса *Prd*, такие как *Gsc*, *Otx2*, *Pax6*, *Pitx* и *Rx*, характеризуются экспрессией в передней части эмбриона, этот промотор, унаследованный геном *Anf* от гена *Prd*, оказался способен управлять его экспрессией в передней части нервной пластинки. Этот промотор мог произойти из копии предварительно дублировавшегося гена семейства *Rx*, представители которого демонстрируют экспрессию, сходную с экспрессией *anf*.

С другой стороны, последовательность, кодирующая значительную часть спирали узнавания *Anf*, включая четыре ключевых аминокислоты в положениях 47, 50, 51 и 54, участвующие в сиквенс-специфическом контакте с ДНК, вероятно, была унаследована от одного из генов класса *Antp*. Многие гены *Antp* экспрессируются в туловищной области эмбрионов, а их белковые продукты оказывают антагонистическое воздействие на гены, экспрессирующиеся рострально. Эти особенности белков класса *Antp* могут объяснить ингибирующее влияние *Anf* на экспрессию *otx2*.

Обнаруженная в работе гетерохрония экспрессии переднеголовных генов *anf* и *foxg1b* 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.

3.4. 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 у обоих генов общих соседей - генов *atmocr1* и *tmem164*.

Экспрессия гена *chordin-like1* в зачатках парных конечностей у высших позвоночных отмечалась в литературе, хотя и вне связи с появлением конечностей в эволюции. Была показана экспрессия *chordin-like1* в зачатках конечностей у курицы (Allen et al., 2013) и в формирующихся конечностях у мыши (Coffiner et al., 2000; Nakayama et al., 2001). В настоящей работе были исследованы особенности экспрессии *chordin-like1* у представителей эволюционно древних групп челюстноротых – хрящевых и осетрообразных рыб, парные плавники которых рассматриваются в качестве базовой модели плавников челюстноротых (Hawkins et al., 2021).

Было выявлено, что ген *chordin-like1* экспрессируется в парных плавниках серой кошачьей акулы и стерляди. У акул экспрессия *chordin-like1* обнаруживалась уже на ранней стадии закладки спинных и брюшных плавников. В дальнейшем экспрессия *chordin-like1* наблюдалась в непарных и парных плавниках, а также формирующихся жаберных дугах, то есть в новых структурах челюстноротых. 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.

В качестве одного из предполагаемых сценариев появления парных плавников рассматривается их формирование в результате удвоения более эволюционно древних непарных плавников. У костистых рыб на примере золотой рыбки (*Carassius auratus*) было показано, что мутация в одном из аллелей гена *chordinA*, приводящая к нарушению трансляции полного белка в гомозиготном состоянии приводит к удвоению хвостового и анального плавников (Abe et al., 2014). Поскольку в норме у костистых рыб вследствие полногеномной дупликации у произошедшей у предков группы имеется два паралога гена *chordin* – *chordinA* и *chordinB*, то абортивность одного из генов, по всей видимости, компенсируется активностью другого. Описанная мутация в гомозиготном состоянии закрепились вследствие длительного (около 600 лет) искусственного отбора при содержании этих рыб в Китае.

Экспрессия гена *chordin-like1* в парных плавниках акул и осетрообразных носит градиентный характер с максимумом в постериорной области формирования базальных элементов, соответствующей расположению зачатка метаптеригия. Это важный эндоскелетный элемент предковой формы плавника из которого в ходе последующей эволюции сформировались скелетные элементы конечности наземных позвоночных. В то же время у костистых рыб, в ходе специализации плавников метаптеригиальный элемент был утрачен (Рисунок 123). При поиске и анализе генов *chordin-like1* у челюстноротых было выявлено, что у представителей большинства групп костистых рыб ген *chordin-like1* также был утрачен (Рисунок 124). Это может указывать на связь активности *chordin-like1* с формированием метаптеригиального эндоскелетного элемента базовой конечности челюстноротых. Это предполагает существенную роль

chordin-like1 для нормального развития пятипалой конечности наземных позвоночных, скелет которой является производным метаптеригиального базального элемента.

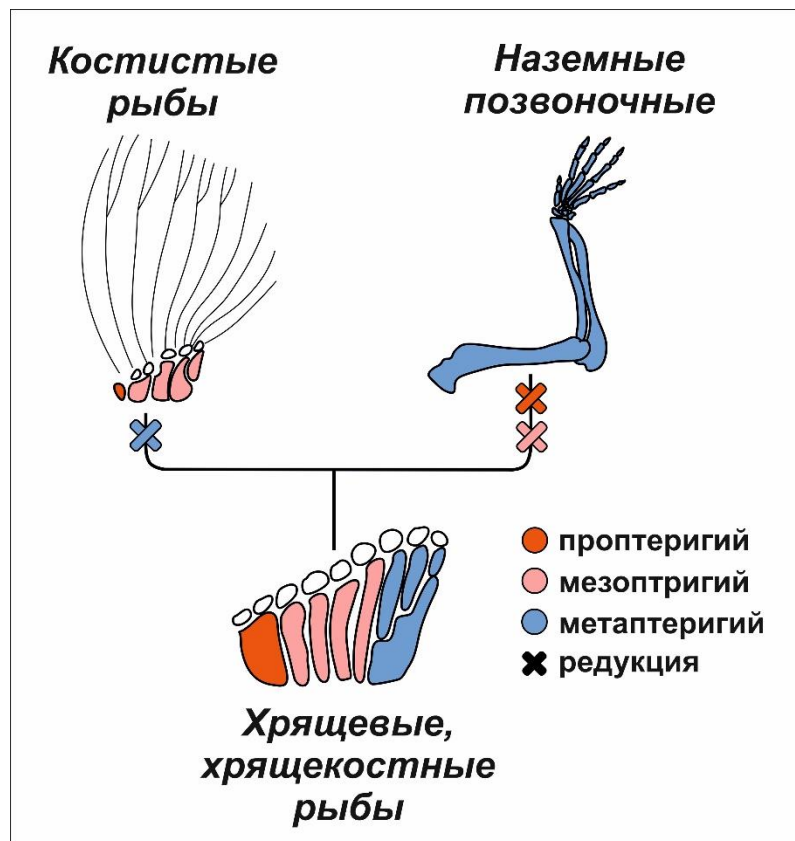


Рисунок 123. (по Thompson et al., 2021, с изменениями и дополнениями). Эволюция базальных эндоскелетных элементов передних парных конечностей. Трибазальный плавник хрящевых и осетрообразных (хрящекостных) рыб является базовой моделью для конечностей позвоночных. Плавники костистых рыб и конечности наземных позвоночных представляют собой два направления редукции предковой конечности, с последующим вторичным усложнением и специализацией в каждой из эволюционных ветвей.

Экспрессия *chordin-like1* в развивающихся конечностях шпорцевой лягушки наблюдается в краевой зоне зачатка конечности в начале его формирования, а в дальнейшем – в краевой зоне при формировании пальцев. В качестве важного сигнального модуля как при развитии пальцев наземной конечности, так и радиалий плавников акул рассматривается взаимная регуляция сигналов BMP, Wnt и Sox9 (Raspopovic et al., 2014; Onimaru et al.,

2016; Hiscock et al., 2017). Активность BMP и Wnt наблюдается в межпальцевых областях (Sato et al., 2015), а экспрессия Sox9 является маркером хондрогенеза и формирования скелетных элементов конечности (Montero et al., 2017). Таким образом, обнаруженная в работе способность *Chordin-like1* модулировать активность эндогенных BMP и Wnt сигнальных каскадов свидетельствует о его функциональной включенности в формирование зачатка конечности.

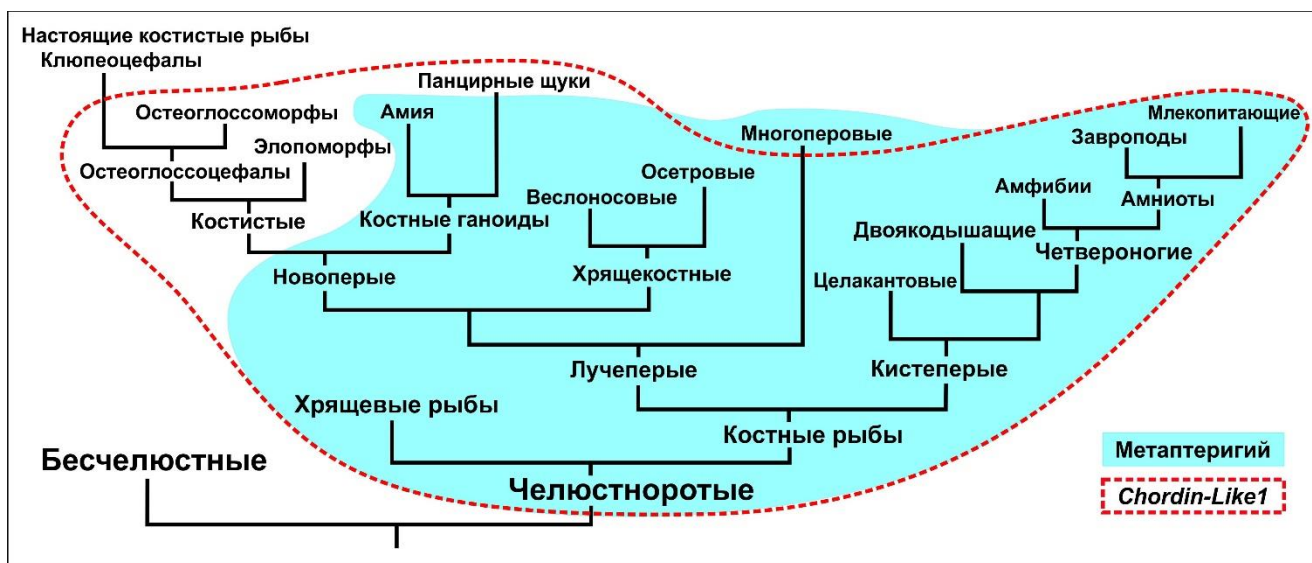


Рисунок 124. Сопоставление групп челюстноротых, имеющих метаптеригиальные производные в конечностях и наличия гена *Chordin-like1*.

3.5. 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. Способность генов *noggin*, в том числе генов *nogginA*, *nogginB* и *nogginC* миног индуцировать вторичные оси у амфибий неоднократно описывалась в литературе и подтверждалась в настоящей работе (Smith and Harland, 1992, Bayramov et al., 2011, Ermakova et al., 2020). Индукции дополнительных осей у речной миноги не происходили и при инъекциях мРНК других описанных

индукторов – генов *chordin* и *cerberus*. Для Chordin в литературе была описана способность индуцировать вторые оси у амфибий (Schmidt et al., 1995, Piccolo et al., 1997), а для Cerberus – головные структуры (Bouwmeester et al., 1996, Piccolo et al., 1999). Индукция вторичных осей у миног с частотой, существенно превышающей контрольный уровень наблюдалась лишь при инъекциях мРНК Wnt8 шпорцевой лягушки. Это соответствует данным об индуктивной активности Wnt8, полученных для представителей челюстноротых (Smith and Harland, 1991; Sokol et al., 1991; Darken and Wilson, 2001). Таким образом, если индуктивная активность Wnt8 в случае миног соответствует описанной ранее активности у челюстноротых, то по остальным проверенным в экспериментах генам-индукторам наблюдается очевидная разница в фенотипических эффектах.

Наблюдаемая в контрольных экспериментах частота получения эмбрионов с двойными осями («фоновый уровень») в целом соответствует данным Suzuki, 2016. Хотя автор не приводит детальной статистики, упоминание о полученных им как минимум 25 эмбрионов с двойными осями при количестве икры у одной самки порядка десяти тысяч икринок, позволяет оценить вероятность получения двойных осей у эмбрионов миног порядка 0,2-0,3 % (в нашем случае 0,3 – 0,6%, Таблица 1). Точная оценка здесь затруднена большим количеством икры, получаемой от одной самки, из которой успешно оплодотворяются и нормально развиваются далеко не все полученные икринки (Suzuki, 2016).

Механизмы ранней сигнализации и разметки эмбриона могут быть связаны с особенностями его строения. Здесь важно, что зигота миног, по своему строению и паттерну экспрессии ранних маркеров, судя по всему, близка к предковому для позвоночных состоянию. Яйца миног олиголецитальные, с голобластическим (полным) типом дробления. Такой тип строения яиц, в котором желток является частью эмбриона и не формирует отдельный желточный мешок, характерен и для ближайших родственников позвоночных – ланцетников и оболочников, что позволяет

считать его базовым вариантом для позвоночных (Starck et al., 2021). Более того, подобный тип яиц предполагается базовым для всех вторичноротых (Ellinson, 2009). Высказывается гипотеза, что появление меробластического (неполного) дробления и яиц с большим запасом желтка происходило независимо несколько раз в эволюции позвоночных и, как правило, было сопряжено с увеличением размеров яйца. У голобластических яиц увеличение размера ограничивается как минимум трудностями внутриклеточной сигнализации при больших объемах богатой желтком цитоплазмы, а также необходимости построения большого количества мембран при полном дроблении. В качестве возможной промежуточной формы на пути появления меробластических яиц исследовались голобластические яйца большого размера, в частности яйца листовой лягушки из Пуэрто Рико *Eleutherodactylus coqui*. Размеры икринок этой лягушки достигают диаметра 3,5 мм при средних значениях для амфибий 1,5-2,5 мм. Интересной особенностью этой амфибии является также ее прямое развитие, без стадии живущего в воде головастика. У эмбрионов *E. coqui* была описана «питательная эндодерма», которая является источником питательных веществ, но структурно не является частью развивающегося эмбриона (Ellinson, 2009). На вегетативном полюсе эмбриона морской миноги также была описана внезародышевая желтковая масса, в которой не обнаруживалась экспрессия генов *SoxB* и *SoxF* (Cattell et al., 2012). То есть, по своему строению, эмбрионы миног также занимают промежуточное положение между голобластическими зиготами осетрообразных и амфибий с одной стороны и богатыми желтком меробластическими эмбрионами хрящевых, костистых рыб и амниот с другой. Такое «промежуточное» положение яиц миног может быть отражением их эволюционной древности, а строение эмбриона может рассматриваться как базовый вариант для последующего появления как голобластических, так и меробластических типов строения (Takeuchi et al., 2009).

При этом, в отличие от полученных нами результатов на эмбрионах миног, для листовой лягушки *E. coqui* была показана индукция полных вторых осей геном *noggin1* (Fang et al., 2000). Это демонстрирует, что само по себе наличие внезародышевой энтодермы не является препятствием для индукции дополнительных осей и причина отсутствия индукции осей у миног имеет, судя по всему, функциональные причины.

Описанной особенностью ранней сигнализации у эмбрионов амфибий является экспрессия у них гена *vegT*, для которого наблюдается как матернская экспрессия, так и экспрессия на стадиях бластулы-гастролы. В то же время, у миног и исследованных костных рыб (многопер и костистые рыбы) схожий паттерн наблюдается для гена *eomes*. Это указывает на то, что амфибии, зачастую по историческим причинам рассматриваемые в качестве базового объекта, могут обладать уникальными особенностями, не релевантными для представителей других групп позвоночных. По этой причине, исследование регуляторных каскадов и сигнальных белков, работающих на ранних этапах нейральной индукции у миног, как древнейших представителей позвоночных, доступных для лабораторных исследований в наши дни, представляет большой интерес для понимания основ этих процессов у позвоночных в целом.

Приходится признать, что пока мало что известно о ранней эмбриональной дифференцировке у бесчелюстных и, в частности, миног.

Функциональная роль таких генов как *noggin* и *follistatin* в нейральной индукции круглоротых до настоящего времени не исследована, а гомологи гена *chordin* вообще не описаны. Проведенный анализ наиболее полных из доступных сегодня геномных сиквенсов морской миноги *P. marinus* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_010993605.1/) не выявил у этого вида гомологов генов *chordin* и *cerberus* челюстноротых. Данное обстоятельство, безусловно, требует дополнительной проверки (к примеру, путем секвенирования транскриптомов ранних стадий развития). Если отсутствие гена *chordin* у миног подтвердится, это будет уникальной

ситуацией для позвоночных. В настоящее время ген *chordin* описан у всех представителей позвоночных и рассматривается в качестве одного из ключевых регуляторов ранней осевой дифференцировки эмбрионов (Plouhines et al., 2013). Единственным геном семейства *chordin* у миног является ген *chordin-like2*, экспрессирующийся в эндостиле на стадиях, значительно более поздних, чем стадии осевой дифференцировки. Ген *cerberus* описан у шпорцевой лягушки в качестве ингибитора трех сигнальных каскадов – BMP, Nodal и Wnt, и показано, что его эндогенная активность необходима для развития головных структур (Piccolo et al., 1999, Silva et al., 2003).

Вкупе с полученными нами функциональными данными, отсутствие у миног гомологов ключевых регуляторов ранней эмбриональной дифференцировки челюстноротых может указывать на существенные различия механизмов нейральной индукции и закладки осевых структур у миног и челюстноротых. Дальнейшее исследование этого вопроса видится важным для понимания базовых механизмов формирования плана строения в онтогенезе и эволюции позвоночных.

4. 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 *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 нейральных индукторов позвоночных – гена *chordin*.

5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

5.1. Материалы

5.1.1. Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: этанол, изопропанол, хлороформ (Химмед), фенол, глицерин (Juro, Швейцария), ампициллин, NaCl (USB, США), KCl (Helicon, Россия), MgCl₂ (USB, США), MgSO₄ (Helicon, Россия), CaCl₂ (Fluka, Швейцария), NaOOCCH₃ (Sigma, США), NaOH (Германия), Na₂HPO₄·2H₂O (Ferak Berlin, Германия), NaH₂PO₄·2H₂O (Ferak Berlin, Германия), L-цистеин гидрохлорид (США), триэтаноламин хлорид (Aldrich, Германия), Tris Base (Helicon, Россия), EGTA (USB, США), EDTA (USB, США), MOPS (Juro, Швейцария), HEPES (Juro, Швейцария), CHAPS, цитрат натрия (MERCK, Германия), малеиновая кислота (MERCK, Германия), фиколл (Amersham Pharmacia, Швеция), параформальдегид (Sigma, США), формамид (BRL, США), поливинилпиролон (PVP) (Sigma, США), Tween 20 (Sigma, США), хориогонический гонадотропин (Sigma, США), препарат TorulaRNA (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США), агароза (USB, США), бромфеноловый синий, бромистый этидий (Plusone), FLD (Fluorescein lysine dextran) (Molecular probes, США), гормон дексаметазон (Sigma, США), циклогексимид (Fluca AG), маркер длины ДНК 1000н.п. (Fermentas), морфолино олигонуклеотиды (Vector Labs, США), смесь дигоксигенин-меченных рибонуклеотидов [3,5 mM digoxigenin-UTP+6,5 mM UTP+10 mM ATP+10 mM GTP+10 mM CTP] (Boehringer Mannheim, Enzo, Германия), ВМР (Boehringer Mannheim Purple) – субстрат для щелочной фосфатазы (Roche, Германия), блокирующий реагент, БР, blocking reagent (Roche, Германия), левамизол (Sigma, США), агар, аминокислоты (Sigma), β-меркаптоэтанол, диметилсульфоксид (DMSO), полиэтиленгликоль (PEG), ацетат лития (CLONTECH), 3-АТ (3- азотриазол) Sigma, галактоза, раффиноза Sigma.

Набор Wizard PCR Preps (Promega), набор Wizard Plus Minipreps (Promega), набор T7/SP6-mMessage mMachine (Ambion.), набор RNeasy mini kit (Qiagen).

5.1.2. Ферментные препараты:

Для транскрипции *in vitro* в работе использовали SP6, T7 и T3 РНК-полимеразы (mMessageMashine, ThermoFisher Scientific), для синтеза дигоксигенин-меченных РНК-зондов, дигоксигенин-специфичные антитела, связанные с щелочной фосфатазой anti-dig-AP-Fab fragment (Enzo, Германия), эндонуклеазы рестрикции: AgeI, XhoI, BamHI, HindIII, BglII (Promega), ДНК-лигазу фага T4 (Promega), термостабильную Taq-ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus*, термостабильную модифицированную ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* KTN (Ignatov, 1998), Pfu-полимеразу из *Pirococcus furiosus*, РНКазуH (Promega), протеиназу K (Sigma), РНАзин (Promega).

5.1.3. Лабораторное оборудование

В работе использовали напольную центрифугу с охлаждением (Jouan GR412); настольную центрифугу с охлаждением (Eppendorf 5415R); настольную центрифугу (Eppendorf minispin Cyclo Temp 202); автоматические ПЦР-амплификаторы (Eppendorf Mastercycler, ДНК-Технология); водный термостат с охлаждением (TE-8D RB-5A Techne); шейкер с термостатируемой камерой (C26 Incubator shaker Edison), термостатируемая качалка (Scello, США); качалка (Shaker S3, ELMi); спектрофотометр (Biophotometer, Eppendorf); термостат (TC-80M-2); источник постоянного тока (Hoefler PS250/2.5 AMP); pH-метр (Radelkis OP-211/2); УФ-трансиллюминатор (Vilber-Lourmat); жидкостной сцинтилляционный счетчик (BacMan), весы аналитические (Ohaus); автоматические микропипетки (Gilson), микроинъектор Femtojet (Eppendorf); флуоресцентный стереомикроскоп (Leica MZ FLIII) с цифровой камерой (Leica DC 300F); бинокулярный микроскоп Polyvar (Reichert-Jung), вортекс

(Sybron Thermolyne maxi mix); системы очистки воды (Milli-Q Water Purification system).

5.1.4. Лабораторные животные

Все эксперименты с лабораторными животными проводились в соответствии с рекомендациями, утвержденными Комитетом по животным Института биоорганической химии им. Шемякина-Овчинникова (Москва, Россия), в соответствии с Законом о животных (научные процедуры) 1986 года и Хельсинкской декларацией.

Взрослые половозрелые особи речной миноги *Lampetra fluviatilis* были выловлены в Ленинградской области. Оплодотворение икры и получение эмбрионов проводилось в лабораторных условиях путем искусственного осеменения. Стадии развития эмбрионов речной миноги определяли в соответствии с Tahara, 1988 (Рисунок 125).

Образцы тотальной РНК *L. fluviatilis* на наборе стадий получали из лизированных эмбрионов (50 эмбрионов на зонд) путем очистки с помощью набора Analytic Jena innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Берлин, Германия).

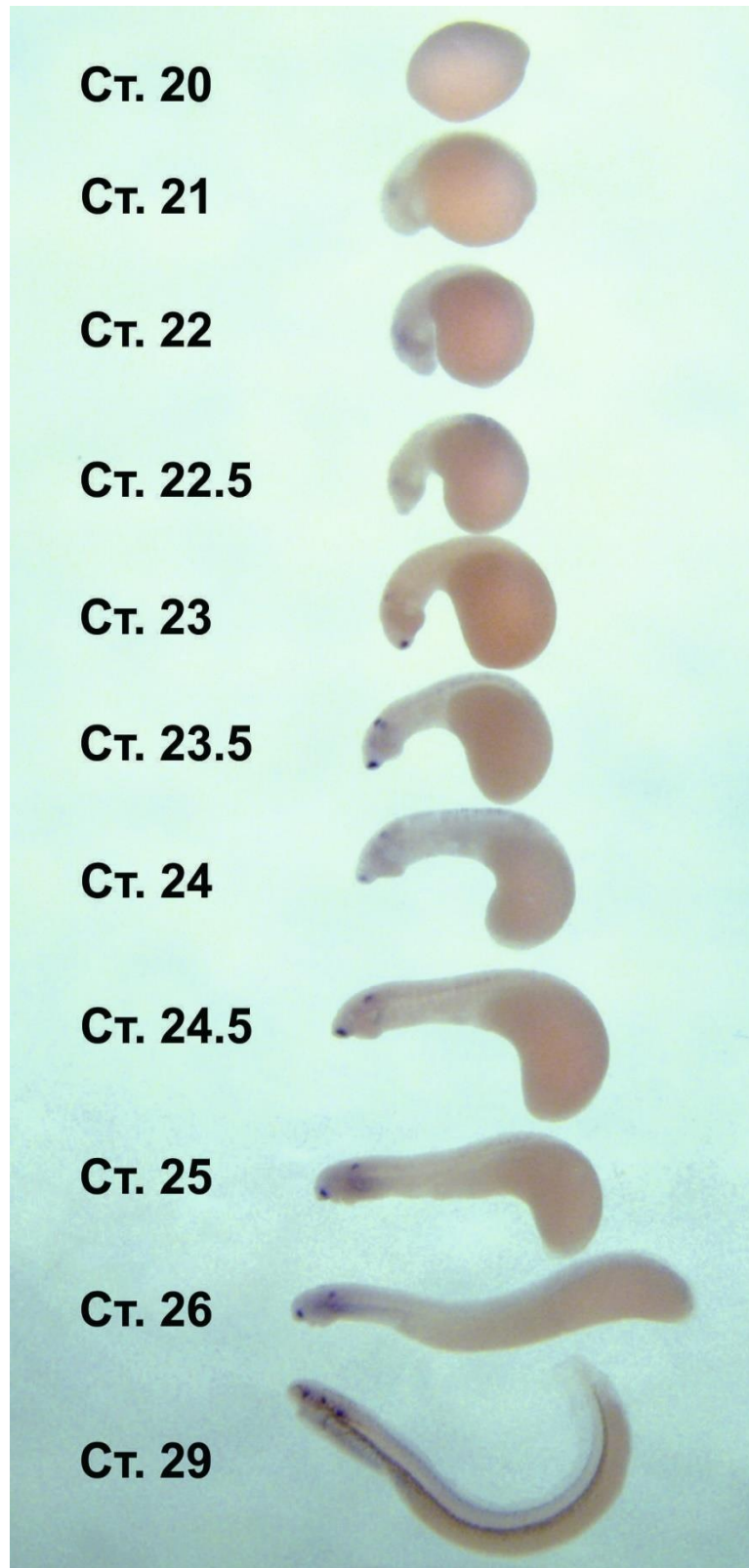


Рисунок 125. Эмбрионы речной миноги *L. fluviatilis*. Стадии развития указаны согласно Tahara (1988).

Яйца и эмбрионы серой кошачьей акулы *Chiloscyllium griseum* были собраны в сотрудничестве с научным отделом Центра океанографии и морской биологии Москвариум (Москва, Россия) (Рисунок 126). Стадии

развития *C. griseum* определяли в соответствии с Ballard et al., 1993. Образцы тотальной РНК *C. griseum* были получены из лизированного эмбриона 26 стадии путем очистки набором Analytic Jena innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Берлин, Германия).



Рисунок 126. Эмбрионы серой кошачьей акулы *Chiloscyllium griseum* до вылупления перед фиксацией для гибридизации *in situ*.

Яйца и эмбрионы стерляди *Acipenser ruthenus* были получены в Тверской области, г. Конаково, Россия (Рисунок 127). Стадию развития эмбрионов и предличинок *A. ruthenus* определяли в соответствии с Гинзбург и Деттлаф (1975) и Шмальгаузен (1975). Образцы тотальной РНК *A. ruthenus* были получены из лизированных эмбрионов стадий 29-35 путем очистки набором Analytic Jena innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Берлин, Германия).

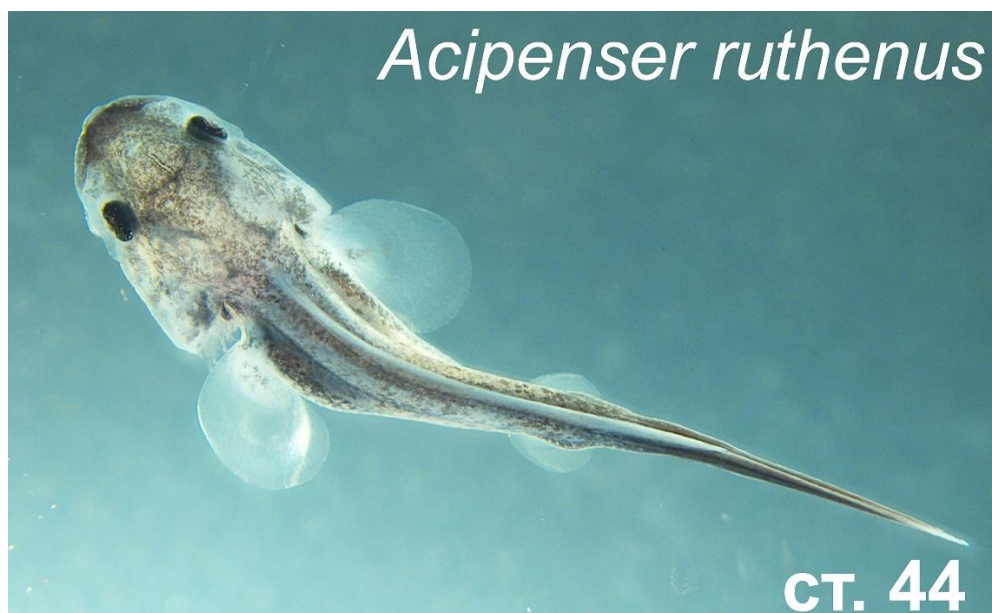


Рисунок 127. Личинка стерляди *Acipenser ruthenus* на стадии 44.

Живые эмбрионы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* были получены на базе лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН. Эта экспериментальная модель признается одной из наиболее перспективных для изучения механизмов реализации генетической информации в раннем эмбриогенезе (Koide et al., 2005, Cha et al., 2010, Wheeler et al., 2009). Кроме того, она представляет собой чрезвычайно удобную тест-систему, позволяющую быстро и эффективно исследовать процессы *in vivo*.

Стадии развития *X. laevis* определяли по таблицам развития Nieuwkoop and Faber, 1967. Образцы тотальной РНК *X. laevis* были получены из лизированных эмбрионов стадий 9-51 путем очистки набором Analytic Jena innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Берлин, Германия).

5.1.5. Буферы, растворы и микробиологические среды:

Перечень буферов, растворов и микробиологических сред, использованных в работе, соответствует перечню, приведенному в диссертации Байрамова А.В. «Гомеобоксные гены *X-nkx-5.1*, *Dlx5* и *Dlx2* в раннем развитии шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и их роль в регуляции экспрессии гомеобоксного гена *Xanf-1*», Москва, 2004.

5.2. Методы

5.2.1. Биоинформатический анализ филогении и локальной геномной синтении исследуемых генов

Поиск гомологов исследуемых генов и белков у представителей разных групп позвоночных проводился в базах данных с помощью поискового браузера Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn), Blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) и tBlastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn). Поиск проводился в доступных коллекциях нуклеотидов (nr/nt), белков (nr) и полногеномных контигов (wgs).

Множественное выравнивание белковых последовательностей осуществлялось алгоритмом ClustalW в программе MEGA11.

Филогенетический анализ последовательностей исследуемых белков позвоночных проводили методами максимального правдоподобия (ML) и Neighbor-Joining (NJ) с использованием программы MEGA11 (Tamura et al., 2021).

Выбор оптимальной модели для построения филогенетических деревьев производился в MEGA11 (опция Model).

В методе ML использовалась модель на основе матрицы JTT (Jones et al., 1992) с частотами и гамма-распределением (JTT+F+G). Процент деревьев, на которых ассоциированные таксоны сгруппировались вместе в бутстреп-тесте (500 повторов), показан рядом с ветвями (Felsenstein, 1985). Филогенетические деревья строились в масштабе, длина ветвей соответствует количеству замен на сайт.

Идентификационные номера проанализированных последовательностей указаны в деревьях.

Анализ синтении и поиск соседних генов проводился на сайте NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) на основе доступных геномных библиотек представителей исследуемых групп животных.

5.2.2. Получение полноразмерных кДНК исследуемых генов методом обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР)

Полноразмерные кДНК генов *NogginA*, *NogginB*, *NogginC* и *NogginD* *L. fluviatilis* были получены методом ОТ-ПЦР с использованием следующих пар праймеров:

Lf_NgA_full_Frw1: ATTGGATCCGGTGCCCGCGGCTCCATGAA;
Lf_NgA_full_Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGAACTGTGGTCGTGTGGA;
Lf_NgA_full_Rev1: AATCTCGAGTACAGGGCTGGTCTCAG;
Lf_NgA_full_Rev2: AATCTCGAGTCAGCAGGCGCAGCGGCA;

Lf_NgB_full_Frw1: ATTGGATCCCGCGCCGAGACCATCAT;
Lf_NgB_full_Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGCCGGGGTCCCTGCG;
Lf_NgB_full_Rev1: AATCTCGAGCCCTCGTTCGTCTCAGCAG;
Lf_NgB_full_Rev2: AATCTCGAGTCAGCAGGAGCACCTGCACTCG;

Lf_NgC_full_Frw1: ATTGGATCCCGTATGCCGAACAAATGGAG;
Lf_NgC_full_Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGGAGCAGTCGCAGTGTT;
Lf_NgC_full_Rev1: AATCTCGAGCGGATGTCCCCCATCAGC;
Lf_NgC_full_Rev2: AATCTCGAGTCAGCACGAGCATTTG;

Lf_NgD_full_Frw1: ATTGAATTCACCTTCGACGCAGCCATGGA;
Lf_NgD_full_Frw2: ATTGAATTCGCCACCATGGATGTGAAGAGC;
Lf_NgD_full_Rev1: AATCTCGAGTTTGCTGCGGGGAGATTCA;
Lf_NgD_full_Rev2: AATCTCGAGTCACTCCCATCCGTGTCC.

Здесь и в дальнейшем, для получения полноразмерных кДНК применялся метод ступенчатого ПЦР. В первом раунде ПЦР (30 циклов) применялись праймеры Frw1 и Rev1. После этого полученный ПЦР продукт очищался и использовался в качестве матрицы в следующем раунде ПЦР (20 циклов) с праймерами Frw2 (который содержит сайт Козака и стартовый кодон ATG) и Rev2.

Для ПЦР использовался набор фирмы Evrogen с полимеразой Encyclo. Полученные кДНК фрагменты были клонированы в вектор *pAL2-T* (Evrogen) и отсеквенированы.

Полноразмерные кДНК *Noggin2* и *Noggin4* *C. griseum* для гибридизации *in situ* и функциональных экспериментов были получены при помощи ступенчатого ОТ-ПЦР с использованием следующих пар праймеров:

Cg_Ng2_full_Frw1: CCGAACTGGCCCGTTTAAAA
 Cg_Ng2_full_Rev1: CTGCATGAGAACATTTCTCC
 Cg_Ng2_full_Frw2: AATGAATTCGCCACCATGGAGCTGCCACAGTATAT
 Cg_Ng2_full_Rev2: AATCTCGAGTTAACAGGAACACTTGCACT

Cg_Ng4_full_Frw1: AGGTGACGGACAACGGCGCA
 Cg_Ng4_full_Rev1: TGAACAGCCAGCAGGATGGC
 Cg_Ng4_full_Frw2: AATGAATTCGCCACCATGCCTCGGGAGCTCCCCC
 Cg_Ng4_full_Rev2: AATCTCGAGTCACCGACAGGAGCACTTGC

Полноразмерные кДНК *noggin1* и *noggin2* *X. laevis* для гибридизации *in situ* и функциональных экспериментов были получены методом ПЦР со следующими парами праймеров:

Xl_Ng2_full_Frw1: GGTТААТААGGGCTTGCTGAAC
 Xl_Ng2_full_Rev1: CTCAGGCAGATTTATCCTCTTC
 Xl_Ng2_full_Frw2: AATTACCGGTTCGCCACCATGAAGAGGATAAATCTGC
 Xl_Ng2_full_Rev2: ATCCACCGGTGATGTTCAACCCCCTTCAATG

Xl_Ng1_full_Frw1: АТААССGGTGAATTCCTCCTCTGATGCAT
 Xl_Ng1_full_Rev: АТТСТСГAGTCTCAGCATGAGCATTTGCA.
 Xl_Ng2_full_Frw2: ААТТАССGGTTCGCCACCATGGATCATTCССAGTGCC

кДНК генов *foxg1* речной миноги и стерляди были получены с помощью ПЦР со следующими парами праймеров:

Для *L. fluviatilis*:

Lf_FoxG1 α _Lf_full_1_frw; AATACAGCAGCGTGGACATGCTG; 0.04
Lf_FoxG1 α _Lf_full_2_frw; AATATGCTGGACATGGGCGATCA; 0.04
Lf_FoxG1 α _Lf_full_1_rev; AATTCACCACCACCGTCAGTG; 0.04
Lf_FoxG1 α _Lf_full_2_rev; AATTCAGTGTAAGAGACTGTT; 0.04

FoxG1 β _Lf_full_Frw1; AATCTCGAGGCTGAGGGTTCGTC; 0.04
FoxG1 β _Lf_full_Frw2; AATTGGGCTGCGTCCGGATATG; 0.04
FoxG1 β _Lf_full_Rev1; AATGTTTCAGAAACCTTAGCGAT; 0.04
FoxG1 β _Lf_full_Rev2; AATTCAGCACGCTGCGCGGTCA; 0.04

Lf_FoxG1 γ _LC_full_1_frw; AATGACCAGGGAGGGGGATGCC; 0.04
Lf_FoxG1 γ _LC_full_2_frw; AATATGCCGGACATGGCAGACC; 0.04
Lf_FoxG1 γ _LC_full_1_rev; AATCTGGGATATCTTCCTCAGTG; 0.04
Lf_FoxG1 γ _LC_full_2_rev; AATTCAGTGTCCGAAATAAGCC; 0.04

Для получения кДНК, содержащих 5' и 3' фрагменты генов *foxg1* применялись следующие пары праймеров:

Lf_FoxG1 α _in situ1_rev CCATCATGATGAGCGCGTTG
Lf_FoxG1 α _in situ2_frw GCTTTCCGCCGCGGCCCTCT
Lf_FoxG1 β _in situ1_rev GAACGGAGGCTTCTCGTACT
Lf_FoxG1 β _in situ2_frw GCTGTACTGGCCCGTATCGC
Lf_FoxG1 γ _in situ2_frw CGGCGCTCCGCGGTGTCT
Lf_FoxG1 γ _in situ1_rev ATGAGCGCGTTGTAGCTGAA

Для *A. ruthenus*:

AR_FoxG1a_in situ_Frw1; AAACAGCCTGGTGCCTGAAGC
AR_FoxG1a_in situ_Frw2; TGACAACCACCACAGATCAG;
AR_FoxG1a_in situ_Rev1; TAGTGTATAAGAGGGTTTGA
AR_FoxG1a_in situ_Rev2; CTGACTGTGATGTGGGAAGT
AR_FoxG1b_in situ_Frw1; GGATCAGAAAGAGCCGACA
AR_FoxG1b_in situ_Frw2; GAGCCTGCTGTTTCCTTCTAA
AR_FoxG1b_in situ_Rev1; TCAGTTTAAAAACGAACTAG
AR_FoxG1b_in situ_Rev2; AACCTGTTTTGATGCGACA
AR_FoxG1c_in situ_Frw1; GGATTGTCCGCGCGTCTTCA
AR_FoxG1c_in situ_Frw2; GCGCACGCTGATACTTCCAG
AR_FoxG1c_in situ_Rev1; CTCTGCCGCTGGTGTCCAGG
AR_FoxG1c_in situ_Rev3; GCTAAGTTCTACCTCAGCAG

Для получение полноразмерной кДНК гена *Lanf* *L. fluviatilis* использовались следующие праймеры:

Lanf-Forw: 5'-AGAACA AAAATTCACCGCCGA
Lanf-Rev: 5'-GTACAGGTGAGTGGGTGAGTCA

5.2.3. Оценка динамики экспрессии исследуемых генов методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени

Анализ динамики экспрессии исследуемых генов проводился методом количественной обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР) в реальном времени с использованием приведенных ниже пар специфичных олигонуклеотидных праймеров.

Праймеры для генов *Noggin L. fluviatilis*:

Lf_NgA_RT-Frw1: TGAАCTGTGGTCGTGTGGAG;

Lf_NgA_RT-Rev1: AGTGCAGGTAGTTGCGACAG;

Lf_NgA_RT-Frw2: TGGGAGGTTCGTGTTCCCTTTC;

Lf_NgA_RT-Rev2: TCGGAGATGACGGGGTACTG;

Lf_NgB_RT-Frw1: GCTGGTACTGCCGTGGGT;

Lf_NgB_RT-Rev1: ACCTGCACTCGGCTATGATG;

Lf_NgB_RT-Frw2: CGCGCAACATTTCCCTCCAC;

Lf_NgB_RT-Rev2: CTCCTCAGCACCCCTCTCGTC;

Lf_NgC_RT-Frw1: ATGGAGCAGTCGCAGTGTTT;

Lf_NgC_RT-Rev1: ACAGGGAGGTTTTCACTCGG;

Lf_NgC_RT-Frw2: GCAGCAACTTCGACCACAAC;

Lf_NgC_RT-Rev2: TGGGCTTTGGCTTCCTGTC;

Lf_NgD_RT-Frw1: GATGTGAAGAGCTTGCTGCTG;

Lf_NgD_RT-Rev1: GTCCGAAAGCGAAGAGACCA;

Lf_NgD_RT-Frw2: ACGGCGATGACTTTGGTCTC;

Lf_NgD_RT-Rev2: CCTCGTGGTTTGGAAAGCTG;

Для нормирования полученных результатов применялся ОТ-ПЦР генов «домашнего хозяйства» *EF-alpha* и *ODC L. fluviatilis* со следующими парами праймеров:

Lf_EF1alfa-Frw: AGAACGTGTCTGTCAAGGATGT;

Lf_EF1alfa_Rev: TAGCCGGCATTGATCTGGCCA;

Lf_ODC_Forw: CCGTCGGTATCATCGCCAAG;

Lf_ODC_Rev: CGAAGAGGATGCAGTTGAAG.

Праймеры для генов *foxg1 L. fluviatilis*:

FoxG1a_LC_RT_2_frw; GAAGCCAGCGACGGGAG; 0.04

FoxG1a_LC_RT_2_rev; GTTGGGACAGCTACACCGAT; 0.04

*FoxG1a*_LC_RT_3_frw; CACTCTGGCGGGTTGATTCC; 0.04
*FoxG1a*_LC_RT_3_rev; GTTGGCTGAATGTCCCGTCT; 0.04
*FoxG1a*_LC_RT_5_frw; TCCGGAGGCGGGGAG; 0.04
*FoxG1a*_LC_RT_5_rev; TCCGGGCTACGCGGC; 0.04

*FoxG1b*_LC_RT_1_frw; GAGGGATGCGACGAGGC; 0.04
*FoxG1b*_LC_RT_1_rev; TAGCTGAAGGGCGGTTTCT; 0.04
*FoxG1b*_LC_RT_2_frw; ATGGGCTTAGAGGCTTTCGG; 0.04
*FoxG1b*_LC_RT_2_rev; ACTTGACTTTGCTGCTGAGGT; 0.04
*FoxG1b*_LC_RT_3_frw; GCTCTGACTGGCCTACACG; 0.04
*FoxG1b*_LC_RT_3_rev; GTAGAAGGCGGAGAGTGCTG; 0.04

*FoxG1g*_LC_RT_1_frw; TCTTCCTTCTTCAGCATCGCC; 0.04
*FoxG1g*_LC_RT_1_rev; CACGACAGTGAGTCCGGGT; 0.04
*FoxG1g*_LC_RT_2_frw; AGGCTTCCTTCTTCCTTCTTCAG; 0.04
*FoxG1g*_LC_RT_2_rev; GAGTCCGGGTCGGGAGAT; 0.04
*FoxG1g*_LC_RT_3_frw; TGCTGCCTCTGCATTCTCAT; 0.04
*FoxG1g*_LC_RT_3_rev; GACCTGCTGCGTGGTТАCT; 0.04

Праймеры для маркерных генов *L. fluviatilis*:

Lanf-ОТПЦР-прямой GGCCTCGCACGTCCTTCA и
Lanf-ОТПЦР-обратный CTCGTCCACGCCGACTCT

Foxg1β-ОТПЦР-прямой CTTTCGGGACTTACCGTTCCA и
Foxg1β-ОТПЦР-обратный CCACTTGACTTTGCTGCTGA;

Otx2-ОТПЦР-прямой GCAGAGCGGCGGGCAGAGCAA и
Otx2-ОТПЦР-обратный CCTCTCAGAGCACCTGGAАCTT;

Gooseoid-ОТПЦР-прямой GACACGAGGACAACCGAGAG и
Gooseoid-ОТПЦР-обратный ATCACATCACACGGGCACAA

HoxB9-ОТПЦР-прямой CTGCCCCTACACCAAGTTCC и
HoxB9-ОТПЦР-обратный GATCTTCACCTGGCGCTCG

EF1alfa-ОТПЦР-прямой AGAACGTGTCTGTCAAGGATGT и
EF1alfa-ОТПЦР-обратный TAGCCGGCATTGATCTGGCCA;

ODC-ОТПЦР-прямой CCGTCGGTATCATCGCCAAG и
ODC-ОТПЦР-обратный CGAAGAGGATGCAGTTGAAG;

Праймеры для маркерных генов *X. laevis*:

OTX2a-ОТПЦР-прямой TTCAATGCTGACTGCTTGGAT и
OTX2a-ОТПЦР-обратный AGATGAGGTTTGGCCCGAG;

Foxg1-ОТПЦР-прямой ААСААGCAGGGCTGGCAGAA и
Foxg1-ОТПЦР-обратный CCGCTCTATCCATAAAGGTG;

Xanf1-ОТПЦР-прямой CCGCAGAAGAGGAGACAAAG и
Xanf1-ОТПЦР-обратный TAGTGAAAGCAGTTCGGGGT;

Goosecoid-ОТПЦР-прямой AGTGCCTCACCAAATGCTCC и
Goosecoid-ОТПЦР-обратный GTGAAGATGGTCCTGTGCCT

HoxB9-ОТПЦР-прямой AAAGTGTGTGAAGCCAACGC
HoxB9-ОТПЦР-обратный TTCTTTCTGGAGGAGCGAGC

EF-ОТПЦР-прямой TCATACAGCTCATATTGCTTGTAAGT и
EF-ОТПЦР-обратный CAAGTGGAGGATAGTCTGAGAA;

ODC-ОТПЦР-прямой GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC и
ODC-ОТПЦР-обратный TTCGGGTGATTCCTTGCCAC.

Методика проведения ОТ-ПЦР описана в Bayramov et al., 2016, 2017.

5.2.4. Синтетические мРНК и морфолиновые олигонуклеотиды

Полноразмерная кДНК гена *noggin1* была получена при помощи ПЦР со следующими праймерами:

5'-ААТТАССGGTCGCCACCATGGATCATTCCCAGTGCC и

5'- АТТСТСGAGTСТCAGCATGAGCATTTGCA

Полноразмерная кДНК гена *noggin2* была получена при помощи ПЦР со следующими праймерами:

5'-ААТТАССGGTCGCCACCATGAAGAGGATAAATCTGC и

5'-АТТСТСGAGTTAGCATGAACACTTACACTCTG-3'.

Полноразмерная кДНК гена *noggin4* была получена при помощи ПЦР со следующими праймерами:

5'- ААТТGGATССGCCACCATGGCACACATACTGTTTCG

5'- ТАТСТСGAGTСТCATTТACAGGTACACTTGCA -3'

Полноразмерная кДНК гена *BMP4* была получена при помощи ПЦР со следующими праймерами:

5'-AATTGGATCCGCCACCATGATTCCTGGTAACCGAATG-3' и
5'- AATCTCGAGTCAACGGCACCCACACCCTTCCA -3'.

Полноразмерная кДНК гена *activinB* была получена при помощи ПЦР со следующими праймерами:

5'- AATTGGATCCGCCACCATGGCTCTCCTGTTACTGCCTCTG-3' и
5'-AATGAATTTCATGCACAGCCGCACTCGTCCA-3'.

Полноразмерная кДНК гена *xnr2* была получена при помощи ПЦР со следующими праймерами:

5'-AATTGGATCCGCCACCATGATTCCTGGTAACCGAATG-3' и
5'- AATCTCGAGTCAACGGCACCCACACCCTTCCA -3'.

Полноразмерная кДНК гена *wnt8* была получена при помощи ПЦР со следующими праймерами:

5'-AATTGGATCCGCCACCATGCAAAAACACCACTTTGTTCATC
5'-ATGCATGCTCGAGTCATCTCCGGTGGCCTCT

Последовательности кДНК, кодирующие белки *Noggin*, *BMP4*, *ActivinB*, *Xnr2*, *Wnt8*, *Wnt5*, *Wnt11* меченые *Flag* и *Myc* полипептидами были получены согласно описаниям, приведенным в Bayramov et al., 2011, Байрамов и др., 2010, 2011.

Синтетические мРНК исследуемых генов были синтезированы наборами для *in vitro* транскрипции *mMessage Machine SP6 Kit* (Ambion) на матрице линейризованных плазмид *pCS2+*. При инъекциях мРНК и МО смешивались с флуоресцентным красителем *Fluorescein Lysine Dextran (FLD)* (Invitrogen, 40 kD, 5 µg/µl).

Синтез антисмысловые морфолиновых олигонуклеотидов осуществлялся компанией *Gene Tools* (США). Морфолиновые олигонуклеотиды вводились в эмбрионы на стадии 2 бластомеров путем инъекций в конечной концентрации 0,1 - 0,4 мМ (в зависимости от степени токсичности побочных эффектов) в объеме 3-4 нл.

Для гена *Lanf* применялись следующие два варианта морфолиновых олигонуклеотидов:

1. *Lanf MO1* (соответствует позициям -20- +5 от стартового кодона):

5'- GCCATCTCTCGAAAAGTAATTCACG;

2. *Lanf MO2* (соответствует позициям -46- -22 от стартового кодона):

5'- ATTAGTTAATTGATCGGCGGTGGAA.

Вариант *Lanf MO-1* с 8 нуклеотидными был использован в качестве контрольного: *misLanf MO1* - 5'- АССААГТСТСГТТААГАААТТТГСГ.

В экспериментах *Lanf MO1* и *Lanf MO2* вызывали сходные фенотипические эффекты при инъекциях в эмбрионы. Эффективность подавления трансляции применяемыми МО была проверена (Рисунок X).

Для генов *Noggin X. laevis* применялись следующие морфолиновые олигонуклеотидов (в итоговой концентрации 0.5 mM):

Для мРНК *Noggin1*, 5'-TCACAAGGCACTGGGAATGATCCAT;

Для мРНК *Noggin2*, 5'-CCTCAGGCAGATTTATCCTCTTCAT;

Для мРНК *Noggin4*:

5'-АССАТТАТТССТГТСТТГГАГАТТА на позицию -20+5 мРНК *Noggin4*.

Смесь двух МО для разных псевдоаллелей *Noggin4* на позицию +1+25

5'-GATTATAGAAGTGAGTATCTTCCAT и

5'-ATGATATAАСТАГТАТГТГТАССАТ

Контрольные МО:

misNoggin2, 5'-CaTCAggCAGAcTcATCCTCaaCAT.

misNoggin4 MO1: 5'-TCCAGTATACСТАТСТАГГАТАТТС

5.2.5. Гибридизация *in situ*

В случае генов, для которых были получены полноразмерные кДНК зонды для гибридизации *in situ* синтезировались на их основе.

Фрагменты кДНК генов *Otx2* и *Shh* для гибридизации *in situ* были получены методом ОТ-ПЦР с использованием следующих пар праймеров:

Otx2-forw GCAGAGCGGCGGGCAGAGCAA

Otx2-rev CCTCTCAGAGCACCTGGAACTT

Shh-forw GGAGCCAGCGGTCGCTACGA

Shh-rev TCCACGAGCACCGTGCCGCTC

Гибридизация *in situ* проводилась на целых эмбрионах согласно протоколу, описанному в Sugahara et al., 2015; Bayramov et al., 2016; Ermakova et al., 2021.

Срезы гибридизованных эмбрионов толщиной 30μ выполнялись на вибраторе Microm HM 650 (эмбрионы помещались в 4% агарозные блоки).

Фотографирование производилось на стереомикроскопе Leica M205.

5.2.6. Люциферазные тесты

Для количественной оценки уровней активности внутриклеточных сигнальных каскадов применялись люциферазные тесты, основанные на использовании репортерных конструкций, изменения экспрессии которых напрямую индуцируются при изменениях активности сигнального каскада. Эти конструкции содержат регуляторные элементы, распознаваемые специфическими транскрипционными факторами, в норме являющимися эффекторами исследуемых сигнальных каскадов, под контролем которых находится ген люциферазы. В этой конструкции участок с цис-регуляторными элементами выступает в роли сенсора активности каскада, а ген люциферазы – в качестве репортера, активность которого можно количественно оценить.

В качестве экспрессирующей системы применялись эмбрионы шпорцевой лягушки *X. laevis*. Для каждого исследуемого каскада используются специфические репортерные конструкции, содержащие ген люциферазы под контролем промотора, содержащего цис-регуляторные элементы, распознаваемые транскрипционными факторами-эффекторами, участвующими в функционировании данного каскада. При специфическом связывании такого белка - эффектора с регуляторными элементами репортерных конструкций происходит активация экспрессии гена

люциферазы и, как следствие, накопление белка люциферазы в эмбрионах по мере из культивирования.

При исследовании активности Nodal/Activin сигнального каскада в качестве люциферазного репортера применялся вектор GL3-ARE-Luc (Pierreux et al., 2000).

При исследовании активности Wnt сигнального каскада в качестве люциферазного репортера применялся вектор TOPflash, Millipore.

При исследовании активности BMP сигнального каскада в качестве люциферазного репортера применялся вектор TCFm-Luc (Hikasa et al., 2010).

В качестве неспецифической репортерной плазмиды для нормализации результатов целесообразно использовать экспрессионный вектор pCMV- β -GAL, Promega.

Активацию Nodal/Activin сигнального каскада проводили путем инъекций мРНК Activin и/или Xnr – лигандов, в норме активирующих этот сигнальный каскад.

Активацию Wnt сигнального каскада проводили путем инъекций мРНК *Wnt8* лиганда, в норме активирующего этот сигнальный каскад.

После инъекций развивающиеся эмбрионы шпорцевой лягушки инкубируются около 16 часов при температуре 14 градусов по Цельсию до стадии ранней гаструлы (стадии 10.5 по таблицам развития Ньюкопа, описанным в Nieuwkoop and Faber, 1967) в растворе 0.1x MMR (Mark's Modified Ringers, описан в Sive et al. 2000). На этой стадии, с применением флуоресцентного стереомикроскопа Leica, проводится отбор эмбрионов, содержащих инъецированный материал.

Полученные эксплантаты так же, как и целые эмбрионы отбирали по наличию флуоресцентной метки Rhodamine Lysine Dextran. Отбор целесообразно проводить не менее чем в трех повторностях по 10 эмбрионы (эксплантатов) для каждой измерительной точки для измерения люциферазной активности.

Для получения лизата эмбрионы гомогенизировали на льду в лизис буфере Cell Culture Lysis Reagen (Promega) - 25mM Tris-phosphate (pH 7.8), 2mM DTT, 2mM 1,2-diaminocyclohexane-N, N, N_l, N_l-tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton® X-100 - 10 мкл на 1 эмбрион или 5 мкл на 1 эксплантат и центрифугировались при 13.400 тыс об. 30 мин при 4° С.

Измерение люциферазной активности в лизате экспрессирующей системы проводили с использованием коммерчески доступной системы Lusiferase Assay system (Promega) согласно инструкции. Для измерения используется 5-8 мкл лизата и 25 мкл готового стабилизированного субстрата (люциферина). Активность измеряют при помощи люминометра TD-20/20 Luminometer (Turner Designs).

Для каждого образца проводили измерение не менее трех раз, в дальнейшем использовалось среднее арифметическое полученных значений.

Для нормирования полученных результатов путем оценки общего уровня биосинтеза белка использовалась плаزمиды рCMV-β-GAL.

Цитоплазматические инъекции осуществлялись с применением микроинъектора Eppendorf.

5.2.7. Ко-иммунопреципитация и иммуноблоттинг

Для определения способности исследуемых белков взаимодействовать друг с другом применялись методы ко-иммунопреципитации и иммуноблоттинга.

Синтетические мРНК, кодирующие меченые специфическими полипептидами исследуемые белки, инъецировались в эмбрионы шпорцевой лягушки на ранних стадиях развития (стадия 2 - 4 бластомеров). Для обеспечения возможности последующего отбора эмбрионов, содержащих инъецируемый материал, в инъецируемую смесь, наряду с мРНК, добавлялся также флуоресцирующий агент – fluorescein-lysine-dextran (FLD), который при облучении ультрафиолетом флуоресцирует. После инъекций эмбрионы инкубировались около 16 часов до стадии ранней гаструлы (стадии 10.5 по

таблицам развития Ньюкопа, описанным в 61). На этой стадии, с применением флуоресцентного стереомикроскопа, проводился отбор эмбрионов, содержащих инъецированный материал.

После этого проводилось тотальное выделение синтезированных в развивающихся эмбрионах белков.

Для снижения риска возможности неспецифического взаимодействия белков между собой и получения артефактных результатов, проводилась независимая наработка каждого из исследуемых белков в эмбрионах, и смешивание осуществлялось уже на уровне лизатов.

Смесь лизатов инкубировалась 2 часа при температуре +4 С.

При условии способности исследуемых белков взаимодействовать друг с другом, за время инкубации смеси лизатов эмбрионов, содержащих исследуемые белки, между ними происходит образование белковых комплексов. Благодаря наличию в исследуемых белках, мРНК которых были экспериментально инъецированы в эмбрионы, полипептидных меток разных типов, каждый из этих белков при очистке может быть специфически и независимо абсорбирован при помощи коммерчески доступных аффинных сорбентов на основе агарозы с иммобилизованными моноклональными антителами.

После специфической адсорбции одного из исследуемых белков на смоле и последующей его элюации со смолы, методом иммуноблоттинга определялось наличие в элюате другого исследуемого белка. Это проводилось при помощи специфических к аминокислотной последовательности-метке антител. В результате, по наличию в элюате обоих исследуемых белков (при том, что на смоле специфически адсорбировался лишь один из них), можно судить о способности этих белков напрямую взаимодействовать (связываться) друг с другом. В случае белков среднего размера (с молекулярной массой от 15 до 40 килодальтон) для блоттинга используется 12% полиакриламидный гель.

Для адсорбции меченых мус полипептидом Noggin белков использовалась мус смола, получаемая путем инкубации смеси protein A и protein G сефарозы (в соотношении 1:1) в присутствии моноклональных anti-c-мус антител (оба реагента произведены фирмой Sigma). Также использовалась уже готовая anti-c-мус смола фирмы Sigma.

Для детекции в блоте меченых Flag полипептидом белков, участвующих в функционировании TGF-beta сигнальных каскадов использовались anti-Flag антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой фирмы Sigma.

При проведении экспериментов для обеспечения сохранности выделяемых белков в обязательном порядке использовался коктейль ингибиторов протеаз фирмы Sigma.

В качестве контроля, при проведении иммуноблоттинга параллельно с исследованием способности белков адсорбироваться на мус смоле, проводился также независимый анализ экспрессии каждого из исследуемых белков в эмбрионах.

Таким образом, факт отсутствия Flag-меченого белка в элюате с мус смолы, при наличии его экспрессии и экспрессии Noggin белка, указывает на неспособность этого белка связываться с Noggin белком.

Также, в обязательном порядке, при исследовании способности каждого из приведенных белков связываться с Noggin белком, проводился контроль способности Flag меченых белков неспецифически абсорбироваться на мус смоле.

В ходе экспериментов, не было обнаружено случаев неспецифической абсорбции Flag меченых белков на мус смоле, что говорит о специфичности полученных результатов.

В качестве контроля уровня связывания ростовых факторов нативными Noggin белками в эксперименте использовался белок Noggin1, получаемый путем *in vitro* транскрипции вектора pCS2-SynMycNoggin1 (получен на 2 этапе НИР) и последующей экспрессии мРНК в эмбрионах шпорцевой

лягушки. Данный белок Noggin1 содержал в своем составе последовательность Мус-полипептида.

5.2.8. Поверхностный плазмонный резонанс

Для получения клеточной линии клеток НЕК293, секретирующей белок Noggin4, клетки НЕК293 были трансфицированы плазмидой рCMV-3Мус-6His6-Noggin4 и культивировались в среде DMEM (Gibco BRL) с добавлением 10% термообработанной фетальной телячьей сыворотки (Hyclone), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,5 мг/мл генетицина (Gibco BRL, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂. Проверка экспрессии Noggin4 осуществлялась методом иммуноблоттинга с применением анти-His-антител. Для получения белка Noggin4, клетки, посеянные на чашки Петри, культивировались в течение двух дней; затем культуральную среду собирали и из среды методом хроматографии на Ni-сефарозе (GE Healthcare) выделяли 3Мус-His6-Noggin4. После замены буфера на PBS посредством диализа полученный препарат белка замораживали в жидком азоте и хранили при -70°С до дальнейшего использования. Рекомбинантный белок Wnt8 шпорцевой лягушки, меченный 6-Hus-меткой на N-конце, наработанный в дрожжевой системе, был получен от MyBioSource, Inc., США (кат. №: MBS1208564). Измерения ППР проводились на аппарате Biacore T200. Лиганд 3Мус-6His-Noggin4 иммобилизовали на чипе CM5 (1500 RU) с помощью набора для аминосопряжения согласно инструкции производителя. Все измерения связывания проводились в буфере HBS-EP при 25 °С. Равновесные константы диссоциации (К_д) были получены посредством нелинейной аппроксимации кривых связывания методом наименьших квадратов к модели адсорбции Ленгмюра.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность:

- коллективу Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН: Мартыновой Наталье Юрьевне, Ерошкину Федору Михайловичу, Терешинной Марии Борисовне, Ивановой Анастасии Сергеевне, Соловьевой Елене Анатольевне, Аверьяновой Ольге Викторовне, Серебряковой Марине Викторовне, Паршиной Елене Анатольевне, Орлову Евгению Евгеньевичу, Шитикову Александру Дмитриевичу, Тимошиной Полине Сергеевне, Араслановой Карине Рустамовне, Ватаниной Нине Ивановне за помощь, оказанную при выполнении работы и любезно предоставленные материалы;
- научному консультанту, заведующему Лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза, профессору Зарайскому Андрею Георгиевичу за содействие и помощь как при планировании и выполнении экспериментальной части работы, так и в процессе подготовки текста и оформления диссертации;
- Ермаковой Галине Владимировне за многолетнее плодотворное сотрудничество;
- Кучерявому Александру Васильевичу за помощь в организации получения производителей речной миноги;
- Мейнцер Ирине Валерьевне и научному отделу Москвариума за помощь в получении эмбрионов серой кошачьей акулы;
- Мюге Николаю Сергеевичу и Мищенко Александру за помощь в получении эмбрионов и предличинок осетровых;
- своей семье за многолетнее терпение, поддержку и вдохновение в работе и жизни.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. – аминокислотный остаток
- БСА - бычий сывороточный альбумин
- гд - гомеодомен
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ед.- единица активности
- кДа – килодальтон
- кДНК – комплементарная ДНК
- КР - Кодирующая рамка
- КР - Кодирующая рамка
- КТ – комнатная температура
- ЛД – локальные дубликации
- М.д. – морфогенетические движения
- мМ- миллимоль
- мин. - минута
- мкг -микрограмм
- мкл- микролитр
- мл- миллилитр
- мм- миллиметр
- МО - морфолиновый олионуклеотид
- мРНК – матричная РНК
- нг- нанограмм
- НТО – нетранслируемая область
- об/мин – обороты в минуту
- ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, сопряженная с ПЦР
- п.о. – пара оснований
- ПААГ - полиакриламидный гель
- пг/эмбр. – пикограмм на эмбрион
- ПГД – полногеномная дубликация

пр. – прочее

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК –рибонуклеиновая кислота

сек. – секунда

ст. – стадия развития

тыс. – тысяча

ЦНС – центральная нервная система

ЦФ - центрифугирование

ч. – час

ЭФ - электрофорез

Anf – Anterior neural fold

E. coli- кишечная палочка *Escherichia coli*

FLD - Fluorescein lysinated dextran

GC-пары – пары гуанин-цитозин

GFP - Green Fluorescent Protein, зеленый флуоресцентный белок

PGR - Programmed Genome Rearrangement

RFP - Red Fluorescent Protein, красный флуоресцентный белок

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abe G., Lee SH., Chang M. et al.**, 2014. The origin of the bifurcated axial skeletal system in the twin-tail goldfish. *Nat Commun.* v. 5, p. 3360. <https://doi.org/10.1038/ncomms4360>
- Adachi N, Pascual-Anaya J, Hirai T, et al.**, 2018. Stepwise participation of HGF/MET signaling in the development of migratory muscle precursors during vertebrate evolution. *Zoological Lett.* v. 4:18. doi: 10.1186/s40851-018-0094-y.
- Ahlberg P. E.**, 2009. Birth of the jawed vertebrates. *Nature.* V. 457. № 7233. P. 1094–1095.
- Ahn D.G., Kourakis M.J., Rohde L.A., et al.**, 2002. T-box gene Tbx5 is essential for formation of the pectoral limb bud. *Nature.* v. 417(6890), p. 754–758. <https://doi.org/10.1038/nature00814>
- Akimenko M. A. and Ekker M.**, 1995. Anterior duplication of the sonic hedgehog expression pattern in the pectoral fin buds of zebrafish treated with retinoic acid. *Developmental Biology*, v. 170(1), p. 243–247. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1211>
- Allen JM, McGlenn E, Hill A, Warman ML.** 2013. Autopodial development is selectively impaired by misexpression of chordin-like 1 in the chick limb. *Dev Biol.* 381(1):159–69. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.06.003.
- Amaral CRL, Pereira F, Silva DA, et al.**, 2018. The mitogenomic phylogeny of the Elasmobranchii (Chondrichthyes). *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 29(6), 867–878. doi: 10.1080/24701394.2017.1376052
- Andoniadou, C. L., Martinez-Barbera, J. P.**, 2013. Developmental mechanisms directing early anterior forebrain specification in vertebrates. *Cellular and molecular life science* 70, 3739–3752.
- Andre P, Song H, Kim W, Kispert A, Yang Y.** 2015. Wnt5a and Wnt11 regulate mammalian anterior-posterior axis elongation. *Development.* Apr 15;142(8):1516–27. doi: 10.1242/dev.119065. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25813538; PMCID: PMC4392599.
- Angerer LM, Yaguchi S, Angerer RC, Burke RD.** 2016. The evolution of nervous system patterning: insights from sea urchin development. *Development.* 138(17), 3613–23. doi: 10.1242/dev.058172
- Arendt D, Nübler-Jung K.** 1999. Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development.* 126(11):2309–25. doi: 10.1242/dev.126.11.2309.
- Arendt, D. and Nubler-Jung, K.** 1994. Inversion of dorsoventral axis? *Nature* 371(6492): 26.
- Asmamaw M and Zawdie B.** 2021. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics.* 15:353–361. doi: 10.2147/BTT.S326422.
- Avsian-Kretchmer O and Hsueh AJ.** 2004. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol.* Jan;18(1):1–12. doi: 10.1210/me.2003-0227.
- Azariah J.** 1965. On the seasonal appearance of fin rays and their bearing on the reproductive cycle of *Branchiostoma lanceolatum*. *Journal of the Marine Biological Association of India.* 7, 459–461.
- Balemans W, Van Hul W.** 2002. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol.* Oct 15;250(2):231–50. PMID: 12376100.
- Balfour F.M.**, 1881. On the development of the skeleton of the pairedfins of Elasmobranchii, considered in relation to its bearing on the nature of the limbs of the vertebrata. *Proc Zool Soc Lond.* V. 1881, p. 656–671.
- Balinsky B. I.**, 1956. A new theory of limb induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* V. 42. № 10. P. 781–785.
- Ballard W.W., Mellinger J., Lechenault H.**, 1993. A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae), *Journal of Experimental Zoology* 267:318–336 doi.org/10.1002/jez.1402670309

Bauer H, Meier A, Hild M, et al., 1998. Follistatin and noggin are excluded from the zebrafish organizer. *Dev Biol.* 204(2), :488-507. doi: 10.1006/dbio.1998.9003

Bayramov A. V., Eroshkin F. M., Martynova N. Y. et al., 2011. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development.* v. 138, p.5345-5356.

Bayramov A.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M. et al., 2016. The presence of the *Anf/Hesx1* homeobox in lampreys indicates that it may play important role in telencephalon emergence. *Sci. Rep.*, V. 6. P. 39849

Bayramov A.V., Martynova N. Yu., Eroshkin F.M. et al., The homeodomain-containing transcription factor X-nkx-5.1 inhibits expression of the homeobox gene Xanf-1 during the *Xenopus laevis* forebrain development. *Mechanism of Development.* 2004. V. 121, P.1425-1441.

Bayramov AV, Eroshkin FM, Martynova NY, Ermakova GV, Solovieva EA, Zاراisky AG. 2011. Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development.* Dec;138(24):5345-56. doi: 10.1242/dev.068908.

Bayramov, A.V., Ermakova, G.V., Kucheryavyy, 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>

Bayramov, A.V., Ermakova, G.V., Kucheryavyy, A.V. et al., 2021. Genome Duplications as the Basis of Vertebrates' Evolutionary Success. *Russ J Dev Biol.* v. 52, p. 141–163. <https://doi.org/10.1134/S1062360421030024>

Bayramov, A.V., Ermakova, G.V., Kucheryavyy, A.V., and Zاراisky, 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>

Bayramov A. V., Ermakova G. V., Zاراisky A. G., 2023. Reconstruction of Ancestral Genomes as a Key to Understanding the Early Evolution of Vertebrate Genotype. *Russian Journal of Developmental Biology*, v. 54, suppl. 1, S1–S9. doi: 10.1134/S1062360423070020

Beby F. and Lamonerie T. 2013. The homeobox gene *Otx2* in development and disease // *Exp Eye Res.* v. 111, pp. 9-16

Begemann G. and Ingham P.W., 2000. Developmental regulation of *Tbx5* in zebrafish embryogenesis. *Mech Dev.* v. 90(2), p. 299-304. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00246-4.

Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L., 1997. An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of Fishes* v. 48, p. 25–71.

Benito-Gutiérrez È, Gattoni G, Stemmer M, Rohr SD, Schuhmacher LN, Tang J et al. 2021. The dorsoanterior brain of adult amphioxus shares similarities in expression profile and neuronal composition with the vertebrate telencephalon. *BMC Biol.* 19(1), 110. doi: 10.1186/s12915-021-01045-w

Beznosov P. A., 2009. A redescription of the Early Carboniferous acanthodian *Acanthodes lopatini* Rohon, 1889, *Acta Zoologica.* V. 90. P. 183–193.

Bi X., Wang K., Yang L., et al., 2021. Tracing the genetic footprints of vertebrate landing in non-teleost ray-finned fishes. *Cell.* v.184, № 5, p.1377-1391.e14. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.046.

Bisson JA, Mills B, Paul Helt JC, Zwaka TP, Cohen ED. 2015. Wnt5a and Wnt11 inhibit the canonical Wnt pathway and promote cardiac progenitor development via the Caspase-dependent degradation of AKT. *Dev Biol.* Feb 1;398(1):80-96. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.11.015.

Blom H., 2012. New birkeniid anaspid from the Lower Devonian of Scotland and its phylogenetic implications. *Palaeontology.* v. 55, p. 641–652

Blum M., Gaunt S.J., Cho K.W. et al., 1992. Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene *goosecoid*. *Cell.* v. 69, pp.1097–1106

Bocharov, Yu. S. 1988. Evolyutsionnaya embriologiya pozvonochnykh (Evolutionary Embryology of Vertebrates). Moscow: Izd. Mosk. Gos. Univ. (In Russian.)

Boisvert C.A., Mark-Kurik E., Ahlberg P.E., 2008. The pectoral fin of *Panderichthys* and the origin of digits. *Nature*. v. 456(7222), p. 636-8. doi: 10.1038/nature07339.

Borodulin, A. V., Eroshkin, F. M., Bayramov, A. V. et al., 2013. Noggin4 expression during chick embryonic development. // *The International journal of developmental biology*. V. 56, P. 403-406.

Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Roth, W. et al., Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat. Cell. Biol.* 1999. V. 1, P.158-164.

Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. 1996. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature*. Aug 15;382(6592):595-601. doi: 10.1038/382595a0. PMID: 8757128.

Boyl PP, Signore M, Annino A, Barbera JP, Acampora D, Simeone A., 2001. Otx genes in the development and evolution of the vertebrate brain. *Int J Dev Neurosci.* 19(4):353-63. doi: 10.1016/s0736-5748(01)00003-x.

Bozzi Y. and Simeone A., 2014. Otx genes and seizure susceptibility. *Molecular & Cellular Epilepsy*. v. 1. e74

Braasch I., Gehrke A. R., Smith J. J. et al., 2015. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nature Genet.* v. 47, p. 427-437.

Braasch I., Salzburger W., Meyer A., 2006. Asymmetric evolution in two fish-specifically duplicated receptor tyrosine kinase paralogs involved in teleost coloration. *Mol Biol Evol* v. 23, p. 1192–1202

Broun, M., Sokol, S. Bode, H. R., Cngsc, a homologue of gooseoid, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of Hydra. *Development* 1999. v. 126, pp. 5245–5254

Brunet F.G., Roest Crollius H., Paris M. et al., 2006. Gene loss and evolutionary rates following whole-genome duplication in teleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* v. 23, p. 1808–1816.

Brunet LJ, McMahan JA, McMahan AP & Harland RM. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. 280(5368), 1455-7. doi: 10.1126/science.280.5368.1455

Brunet, L.J., McMahan, J.A., McMahan et al., 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. V. 280, P. 1455 –1457.

Capdevila J, Izpisua Belmonte JC., 2001. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* v. 17, p. 87-132. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.87.

Cass A.N., Elias A., Fudala M.L., et al., 2021. Conserved Mechanisms, Novel Anatomies: The Developmental Basis of Fin Evolution and the Origin of Limbs. *Diversity*. v. 13, p. 384. <https://doi.org/10.3390/d13080384>

Cattell MV, Garnett AT, Klymkowsky MW, Medeiros DM. 2012. A maternally established SoxB1/SoxF axis is a conserved feature of chordate germ layer patterning. *Evol Dev*. 14(1), 104-15. doi: 10.1111/j.1525-142X.2011.00525.x

Cha SW, Heasman J. 2010. Using oocytes for Wnt signaling assays: paracrine assays and Wnt-conditioned medium. *Methods*. May;51(1):52-5.

Chandramore K, Ghaskadbi S. 2011. Evo-devo: Hydra raises its Noggin. *J Biosci.* Aug;36(3):517-29. doi: 10.1007/s12038-011-9086-1.

Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A. 2002. Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Dev Biol*. May 1;245(1):187-99. doi: 10.1006/dbio.2002.0641. PMID: 11969265.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41. doi: 10.1080/08977190412331279890.

Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2006 May;231(5):534-44. doi: 10.1177/153537020623100507.

Chen Z., Omori Y., Koren S., et al., 2019. Comparative Sequencing Program; Mullikin JC, Burgess SM. De novo assembly of the goldfish (*Carassius auratus*) genome and the evolution of genes after whole-genome duplication. *Sci Adv.* v. 5, № 6, p. eaav0547. doi: 10.1126/sciadv.aav0547.

Chen, C.H. and Shen, M.M. 2004. Two modes by which lefty proteins inhibit Nodal signaling. *Current Biology* 14(7): 618-624.

Cheng P., Huang Y., Lv Y., et al., 2021. The American Paddlefish Genome Provides Novel Insights into Chromosomal Evolution and Bone Mineralization in Early Vertebrates. *Mol Biol Evol.* v. 38, № 4, p.1595-1607. doi: 10.1093/molbev/msaa326

Chisaka O. and Capecchi M.R., 1991. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature*, v. 350, p. 473–479.

Cho K. W., Blumberg B., Steinbeisser H. et al., Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *gooseoid*. *Cell*. 1991. v. 67, pp. 1111–1120

Christensen K.A., Davidson W.S., 2017. Autopolyploidy genome duplication preserves other ancient genome duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One.* v. 12(2), p. e0173053.

Clevers, H. 2000. Axin and hepatocellular carcinomas. *Nature genetics* 24(3): 206-208.

Coates M. I. 1996. The Devonian tetrapod *Acanthostega gunnari* Jarvik: postcranial anatomy, basal tetrapod interrelationships and patterns of skeletal evolution. *Trans. R. Soc. Edinb. Earth Sci.* 87: 363–421

Coates M.I., 1993. Hox genes, fin folds and symmetry. *Nature.* v. 364, p.195–196.

Coates M.I., 2003. The evolution of paired fins. *Theory Biosci.* v. 122, p. 266–287. <https://doi.org/10.1007/s12064-003-0057-4>

Coffinier C, Tran U, Larrain J, De Robertis EM., 2001. Neuralin-1 is a novel Chordin-related molecule expressed in the mouse neural plate. *Mech Dev.* 100(1):119-22. doi: 10.1016/s0925-4773(00)00507-4.

Cohen, A.H., Mackler, S.A., and Selzer, M.E., 1986, Functional regeneration following spinal transection demonstrated in the isolated spinal cord of the larval Sea lamprey, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 83, no. 8, pp. 2763–2766. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2763>

Cole N.J., Hall T.E., Don E.K., et al., 2011. Development and evolution of the muscles of the pelvic fin. *PLoS Biol.* v. 9(10), p. e1001168. doi: 10.1371/journal.pbio.1001168.

Combes S.A., Daniel T.L., 2001. Shape, flapping and flexion: wing and fin design for forward flight. *The Journal of Experimental Biology.* 204, 2073–2085

Connolly DJ, Patel K & Cooke J., 1997. Chick *notch* is expressed in the organizer and neural plate during axial development, but offers no evidence of involvement in primary axis formation. *Int J Dev Biol.* 41(2), 389-96. PMID: 9184349.

Craig CP, Calamaro E, Fong CT, Iqbal AM, Paciorkowski AR, Zhang B., 2020. Diagnosis of FOXG1 syndrome caused by recurrent balanced chromosomal rearrangements: case study and literature review. *Mol Cytogenet.* 13(1), 40. doi: 10.1186/s13039-020-00506-1.

Cunha DB da, Rodrigues-Filho LF da S and Sales JB de L. A. 2017. Review of the Mitogenomic Phylogeny of the Chondrichthyes. *Chondrichthyes - Multidisciplinary Approach. InTech.* doi: 10.5772/intechopen.70028.

Dahn R.D., Davis M.C., Pappano W.N., et al., 2007. Sonic hedgehog function in chondrichthyan fins and the evolution of appendage patterning. *Nature.* v. 445(7125), p. 311-4. doi: 10.1038/nature05436.

Dale L. and Slack J. M.W., 1987. Regional specification within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis*. *Development*, V.100, P. 279-295.

Darken RS, Wilson PA. 2001. Axis induction by wnt signaling: Target promoter responsiveness regulates competence. *Dev Biol.* 234(1):42-54. doi: 10.1006/dbio.2001.0253.

Dattani, M. T. et al., 1999. HESX1: a novel gene implicated in a familial form of septo-optic dysplasia. *Acta Paediatr Suppl* 88, 49-54.

- David K.T.**, 2022. Global gradients in the distribution of animal polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 119, № 48, p. e2214070119. doi: 10.1073/pnas.2214070119.
- Davis M.C., Shubin N.H., Force A.**, 2004. Pectoral fin and girdle development in the basal actinopterygians *Polyodon spathula* and *Acipenser transmontanus*. *J Morphol*. v. 262(2), p.608-28. doi: 10.1002/jmor.10264.
- Dean MN, Mull CG, Gorb SN & Summers AP.** Ontogeny of the tessellated skeleton: insight from the skeletal growth of the round stingray *Urobatis halleri*. *J Anat*. 215(3), 227-39 (2009). doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01116.x
- Dehal P. and Boore J.L.**, 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* v. 3(10), p. e314.
- Deimling S.J. and Drysdale T.A.**, 2009. Retinoic acid regulates anterior–posterior patterning within the lateral plate mesoderm of *Xenopus*. *Mech. Dev*. v. 126, p. 913–923.
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H.** 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*. 439(7079), 965-8. doi: 10.1038/nature04336.
- Delsuc F, Tsagkogeorga G, Lartillot N, Philippe H.** 2008. Additional molecular support for the new chordate phylogeny. *Genesis*. 46(11):592-604. doi: 10.1002/dvg.20450. PMID: 19003928.
- Derobert Y., Baratte B., Lepage M. et al.**, Pax6 expression patterns in *Lampetra fluviatilis* and *Scyliorhinus canicula* embryos suggest highly conserved roles in the early regionalization of the vertebrate brain. *Brain Res Bull*. 2002. v. 1;57(3-4). p. 277-80
- Ding Y, Meng W, Kong W, He Z, Chai R.** 2020. The Role of FoxG1 in the Inner Ear. *Front Cell Dev Biol*. 8, 614954. doi: 10.3389/fcell.2020.614954
- Diogo R.**, 2020, Cranial or postcranial-Dual origin of the pectoral appendage of vertebrates combining the fin-fold and gill-arch theories? *Dev Dyn*. v. 249(10), p. 1182-1200. doi: 10.1002/dvdy.192.
- Dohrmann CE, Hemmati-Brivanlou A, Thomsen GH, Fields A, Woolf TM, Melton DA.** 1993. Expression of activin mRNA during early development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*. 157(2):474-83. doi: 10.1006/dbio.1993.1150.
- Don E.K., Currie P.D., Cole N.J.**, 2013. The evolutionary history of the development of the pelvic fin/hindlimb. *J Anat*. v. 222(1), p. 114-33. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01557.x.
- Douard V., Brunet F., Boussau B. et al.**, 2008. The fate of the duplicated androgen receptor in fishes: a late neofunctionalization event? *BMC Evol Biol* v. 8, p. 336
- Du K., Stöck M., Kneitz S., et al.**, 2020. The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. *Nat Ecol Evol*. v.4, № 6, p. 841-852. doi: 10.1038/s41559-020-1166-x.
- Durán I., Marí-Beffa M., Santamaría J. A., et al.**, 2011. Actinotrichia collagens and their role in fin formation. *Developmental Biology*, v. 354(1), p. 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.014>
- Dzerzhinsky F.Ya.**, 2005. Sravnitel'naja anatomija pozvonocnykh zhivotnykh. (In Russian). Moscow. 304 p.
- Dzerzhinsky F.Ya., Vasil'ev B.D., Malakhov V.V.** 2014. Zoologija pozvonocnykh. Moscow: Publishing center “Academia”. 464 p. (In Russian).
- Elinson RP.** 2009. Nutritional endoderm: a way to breach the holoblastic–meroblastic barrier in tetrapods. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 312B:526–532.
- Enault S., Auclair C., Adnet S. et al.**, 2016. A complete protocol for the preparation of chondrichthyan skeletal specimens. *J. Appl. Ichthyol*. v. 32, p. 409–415. doi: 10.1111/jai.13050
- Enny A., Flaherty K., Mori S., et al.**, 2020. Developmental constraints on fin diversity. *Dev Growth Differ*. v. 62(5), p. 311-325. doi: 10.1111/dgd.12670.
- Ermakova G. V., Kucheryavy A. V., Zaisky A. G., et al.**, 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*, v. 52(1) p. 1-10

Ermakova G.V., Alexandrova E.M., Kazanskaya O.V. et al., 1999. The homeobox gene, *Xanf-1*, can control both neural differentiation and patterning in the presumptive anterior neuroectoderm of the *Xenopus laevis* embryo. *Development.*, V. 126, P. 4513-4523

Ermakova G.V., Kucheryavyy A.V., Zاراisky A.G., et al., 2020. Discovery of four Noggin genes in lampreys suggests two rounds of ancient genome duplication. *Communication Biology*. v. 3(1), p. 532

Ermakova G.V., Solovieva E.A., Martynova N.Y. et al., 2007. The homeodomain factor Xanf represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions. *Developmental Biology*. V. 307, P. 483-497

Ermakova GV, Kucheryavyy AV, Zاراisky AG, Bayramov AV. 2019. The expression of FoxG1 in the early development of the European river lamprey *Lampetra fluviatilis* demonstrates significant heterochrony with that in other vertebrates. *Gene Expr Patterns*. 34, 119073. doi: 10.1016/j.gep.2019.119073

Ermakova, G.V., Kucheryavyy, A.V., Eroshkin, F.M. et al. 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. *Paleontol. J.* 55, 752–765. <https://doi.org/10.1134/S0031030121070030>

Eroshkin F. M., Ermakova G. V., Bayramov A. V. et al., Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of noggin2 and noggin4 in *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns*. 2006. v. 6, p. 180-186.

Eroshkin F., Kazanskaya O., Martynova N. et al., Characterization of cis-regulatory elements of the homeobox gene Xanf-1. *Gene*. 2002. V. 285, P. 279-286

Eroshkin FM, Nesterenko AM, Borodulin AV, Martynova NY, Ermakova GV, Gyoeva FK, Orlov EE, Belogurov AA, Lukyanov KA, Bayramov AV, Zاراisky AG. 2016. Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. *Sci Rep*. 6:23049. doi: 10.1038/srep23049.

Eroshkin, F. M., Ermakova, G. V., Bayramov, A. V. & Zاراisky, A. G. 2006. Multiple noggins in vertebrate genome: cloning and expression of noggin2 and noggin4 in *Xenopus laevis*. *Gene Expr. Patterns* 6, 180–6.

Ezhova O.V., Malakhov V.V. 2022. Origin of Echinodermata. *Paleontological Journal*. 56:8, 938–973. DOI: 10.1134/S0031030122080020.

Fang H, Marikawa Y, Elinson RP. 2000. Ectopic expression of *Xenopus* noggin RNA induces complete secondary body axes in embryos of the direct developing frog *Eleutherodactylus coqui*. *Dev Genes Evol*. 210(1):21-7. doi: 10.1007/pl00008184.

Feinberg T.E. and Mallatt J., 2013. The evolutionary and genetic origins of consciousness in the Cambrian Period over 500 million years ago. *Front Psychol*. V. 4 P. 667

Feiner N., Meyer A., Kuraku S., 2014. Evolution of the vertebrate Pax4/6 class of genes with focus on its novel member, the *Pax10* gene. *Genome Biol. Evol.* v. 6 p. 1635–1651

Ferry L.A. and Lauder G.V., 1996. Heterocercal tail function in leopard sharks: a three-dimensional kinematic analysis of two models. *J. Exp. Biol.*, v. 199, p. 2253–2268.

Fischer S., Draper B. W. and Neumann C. J., 2003. The zebrafish fgf24 mutant identifies an additional level of Fgf signaling involved in vertebrate forelimb initiation. *Development*, v. 130(15), p. 3515–3524. <https://doi.org/10.1242/dev.00537>

Fish F.E., Lauder G.V., 2017. Control surfaces of aquatic vertebrates: active and passive design and function. *J Exp Biol*. v. 220(Pt 23), p. 4351-4363. doi: 10.1242/jeb.149617.

Flescher, D., and F.H. Martini. 2002. Lampreys. Order Petromyzontiformes. IN Bigelow and Schroeder's Fishes of the Gulf of Maine. Third Edition. Collette, B.B. and G. KleinMacPhee (eds.) *Smithsonian Institution Press*. Washington and London. 16-19.

Fletcher R. B., Watson A. L. and Harland R. M., 2004. Expression of *Xenopus tropicalis* *noggin1* and *noggin2* in early development: two *noggin* genes in a tetrapod. *Gene Expr Patterns*. v. 5, p. 225-230.

Flot J-F., Hespels B., Li X. et al., 2013 Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *Nature*. v. 500, p. 453–457.

Forstmeier W. and Ellegren H., 2010. Trisomy and triploidy are sources of embryo mortality in the zebra finch. *Proc Biol Sci*. v. 277(1694), p. 2655–2660.

Freitas R, Zhang G, Cohn MJ., 2006. Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates. *Nature*. v. 442(7106), p.1033-7. doi: 10.1038/nature04984.

Freitas R., Gómez-Skarmeta J. L., Rodrigues P. N., 2014. New frontiers in the evolution of fin development. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol*. v. 322(7), p. 540–552.

Funayama N, Sato Y, Matsumoto K, Ogura T, Takahashi Y. 1999. Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development*. 126(18), 4129-38. doi: 10.1242/dev.126.18.4129.

Fürthauer M, Thisse B & Thisse C. 1999. Three different *noggin* genes antagonize the activity of bone morphogenetic proteins in the zebrafish embryo. *Dev Biol*. 214(1), 181-961999 doi: 10.1006/dbio.1999.9401

Gagnier P. Y. and Wilson M. V. H., 1996. Early Devonian acanthodians from northern Canada. *Palaeontology*. V. 39. № 2. P. 241–258.

Gai Z., Li Q., Ferrón H.G., et al., 2022. Galeaspid anatomy and the origin of vertebrate paired appendages. *Nature*. v. 609(7929), p. 959-963. doi: 10.1038/s41586-022-04897-6.

Garrity D. M., Childs S., and Fishman M. C., 2002. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin *Tbx5* deficiency syndrome. *Development*, v. 129(19), p. 4635–4645.

Gee H., 2008. Evolutionary biology: the amphioxus unleashed. *Nature*. 453(7198):999-1000. doi: 10.1038/453999a.

Gegenbaur C., 1859. Grundzüge der vergleichenden Anatomie. Wilhelm Engelmann.

Gerhart J, Pfautz J, Neely C, et al., 2009. *Noggin* producing, MyoD-positive cells are crucial for eye development. *Dev Biol*. 336(1), 30-41. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.022

Gess R.W., Coates M.I., Rubidge B.S., 2006. A lamprey from the Devonian period of South Africa. *Nature*. V. 443(7114). P. 981–4.

Gibson-Brown J.J., Agulnik S.I., Chapman D.L., et al., 1996. Evidence of a role for *T-box* genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev*. v. 56(1-2), p. 93-101. doi: 10.1016/0925-4773(96)00514-x.

Gilbert S. F., 2006. Developmental Biology. 9th edn. Sunderland: Sinauer Associates.

Giles S., Coates M.I., Garwood R.J., et al., 2015. Endoskeletal structure in *Cheirolepis* (Osteichthyes, Actinopterygii), An early ray-finned fish. *Palaeontology*. v. 58(5), p. 849-870. doi: 10.1111/pala.12182.

Gillis A., 2019. The Development and Evolution of Cartilage, Reference Module in Life Sciences, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90770-2>

Gillis J. A., Dahn R. D., Shubin N. H., 2009. Shared developmental mechanisms pattern the vertebrate gill arch and paired fin skeletons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 106. № 14. P. 5720–5724.

Glasauer S.M. and Neuhauss S.C., 2014. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics*.v.289(6), p. 1045-1060.

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*. 391, 357-62.

Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C. and Niehrs, C. 1997. Head induction by simultaneous repression of *Bmp* and *Wnt* signalling in *Xenopus*. *Nature*. 389, 517-9.

- Goodrich E. S.** 1930. Studies on the Structure and Development of Vertebrates. London. MacMillan. 837 p.
- Gorodilov Y.N.**, 1992. Rhythmic processes in lower vertebrate embryo genesis and their role for developmental control. *Zool.Sci.* v. 9, pp.1101–1111
- Gorodilov Y.N.**, 2010. The biological clock in vertebrate embryogenesis as a mechanism of general control over the developmental organism. *Russian Journal of Developmental Biology.* v. 41, pp. 243-260
- Grandel H., and Schulte-Merker S.**, 1998. The development of the paired fins in the zebrafish (*Danio rerio*). *Mechanisms of Development*, v. 79(1–2), p. 99–120. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00176-2)
- Gray J.** 1933 Studies in animal locomotion. I. The movement of fish with special reference to the eel. *J. exp. Biol.* 10, 88-104
- Green S.A. and Bronner M.E.**, 2014. The lamprey: A jawless vertebrate model system for examining origin of the neural crest and other vertebrate traits. *Differentiation.* v. 87, p. 44-51.
- Gregory W. K. and Raven H. C.**, 1941. Studies on the origin and early evolution of paired fins and limbs. *Annals of the New York Academy of Sciences.* V. 42. № 1. P. 273–291.
- Gregory W. K.**, 1936. The transformation of organic designs: a review of the origin and deployment of the earlier vertebrates. *Biological Reviews.* V. 11. № 3. P. 311–344.
- Groppe J, Greenwald J, Wiater E, et al.**, 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 420(6916), 636-642. doi: 10.1038/nature01245
- Gros J. and Tabin C.J.**, 2014. Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science.* v. 343(6176), p. 1253-6. doi: 10.1126/science.1248228.
- Grossniklaus U, Cadigan KM, Gehring WJ.** 1994. Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the Drosophila head. *Development.* 120(11), 3155-71. doi: 10.1242/dev.120.11.3155
- Guerreiro I., Nunes A., Woltering J.M. et al.**, 2013. Role of a polymorphism in a Hox/Pax-responsive enhancer in the evolution of the vertebrate spine. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 110(26), p. 10682–6.
- Gurtovoy N.N., Matveev B.S., Dzerzhinsky F.Ya.** 1976. Prakticheskaja zootomia pozvonochnykh. Nizshie chordovye, beschelustnye, ryby. Moscow: Vysshaja shkola. 351 p. (In Russian).
- Haines L and Currie PD.**, 2001 Morphogenesis and evolution of vertebrate appendicular muscle. *J Anat.* v. 199(Pt 1-2), p. 205-9. doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19910205.x.
- Halanych K.M.** 2005. Molecular phylogeny of siboglinid annelids (a.k.a. pogonophorans): a review. *Hydrobiologia* 535/536, 297–307
- Hanke G. F. and Wilson M. V. H.**, 2010. The putative stem-group chondrichthyans *Kathemacanthus* and *Seretolepis* from the Lower Devonian MOTH locality, Mackenzie Mountains, Canada. *Morphology, phylogeny and paleobiogeography of fossil fishes.* Munich: Verlag Dr. Friedrich Pfeil. P. 159–82.
- Hanke G. F., Wilson M. V. H.**, 2006. Anatomy of the Early Devonian acanthodian *Brochoadmones milesi* based on nearly complete body fossils, with comments on the evolution and development of paired fins. *Journal of Vertebrate Paleontology.* V. 26. № 3. P. 526–537.
- Hara Y, Yamaguchi K, Onimaru K, Kadota M, Koyanagi M, Keeley SD et al.** 2018. Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. *Nat Ecol Evol* 2, 1761–1771. doi: 10.1038/s41559-018-0673-5
- Haseeb M., Rameez H. P., Qurat U. A., Sangdun C.**, 2019. "Wnt Signaling in the Regulation of Immune Cell and Cancer Therapeutics" *Cells* 8, no. 11: 1380. <https://doi.org/10.3390/cells8111380>

Havelka M, Hulák M, Bailie DA, Prodöhl PA, Flajšhans M. 2013. Extensive genome duplications in sturgeons: new evidence from microsatellite data. *J Appl Ichthyol.* 29:704–708.

Hawkins M.B., Henke K., Harris M.P., 2021. Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish. *Cell.* v. 184(4), p. 899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003.

Hawkins M.B., Jandzik D., Tulenko F.J., et al., 2022 An Fgf-Shh positive feedback loop drives growth in developing unpaired fins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 119(10), p. e2120150119. doi: 10.1073/pnas.2120150119.

Hawkins MB, Henke K, Harris MP., 2021. Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish. *Cell.* 184(4):899-911.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003.

Herman, P.E., Papatheodorou, A., Bryant, S.A. et al. 2018. Highly conserved molecular pathways, including Wnt signaling, promote functional recovery from spinal cord injury in lampreys. *Sci Rep* 8, 742. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18757-1>

Hermesz, E., Mackem, S. and Mahon, K. A., 1996. Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 122, 41-52.

Hess J.E., Smith J.J., Timoshevskaya N. et al., 2020. Genomic islands of divergence infer a phenotypic landscape in Pacific lamprey. *Mol. Ecol.* v. 29, p. 3841–3856. <https://doi.org/10.1111/mec.15605>.

Higuchi S, Sugahara F, Pascual-Anaya J, Takagi W, Oisi Y, Kuratani S. 2019. Inner ear development in cyclostomes and evolution of the vertebrate semicircular canals. *Nature* 565, 347–350. doi: 10.1038/s41586-018-0782-y

Hikasa H., Ezan J., Itoh K., Li X. et al. 2010. Regulation of TCF3 by Wnt-dependent phosphorylation during vertebrate axis specification. *Dev. Cell.* V. 19. P. 521–532.

Hiscock TW, Tschopp P, Tabin CJ. 2017. On the Formation of Digits and Joints during Limb Development. *Dev Cell.* 41(5):459-465. doi: 10.1016/j.devcel.2017.04.021.

Hoffman L., Miles J., Avaron F., et al., 2002. Exogenous retinoic acid induces a stage-specific, transient and progressive extension of Sonic hedgehog expression across the pectoral fin bud of zebrafish. *International Journal of Developmental Biology*, v. 46(7), p. 949–956. <https://doi.org/10.1387/ijdb.12455633>

Holland L.Z. and Ocampo Daza D., 2018. A new look at an old question: when did the second whole genome duplication occur in vertebrate evolution?. *Genome Biol.* v.19(1), p. 209.

Holland N.D., Holland L.Z. 1991. The Histochemistry and fine structure of the nutritional reserves in the fin rays of lancelet, *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata = Acrania). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 72:4, 203-207,

Holland P. W., Garcia-Fernandez J., Williams N. A. and Sidow A., 1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev Suppl*, 125-133.

Hoover A.P., Daniels J. A. 2021. Computational Model for Tail Undulation and Fluid Transport in the Giant Larvacean. *Fluids*, 6, 88. <https://doi.org/10.3390/fluids6020088>

Hume J.B., Adams C.E., Mable B., and Bean C., 2013. Post-zygotic hybrid viability in sympatric species pairs: a case study from European lampreys, *Biol. J. Linn. Soc.*, vol. 108, no. 2, pp. 378–383. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.02007.x>

Hwang C.H., Guo D., Harris M.A., et al., 2010. Role of bone morphogenetic proteins on cochlear hair cell formation: analyses of Noggin and Bmp2 mutant mice. *Dev Dyn.* 239(2), 505-13. doi: 10.1002/dvdy.22200

Irisarri I, Baurain D, Brinkmann H, Delsuc F, Sire JY, et al., 2017. Phylotranscriptomic consolidation of the jawed vertebrate timetree. *Nat Ecol Evol.* Sep;1(9):1370-1378. doi: 10.1038/s41559-017-0240-5.

Ivanova A. S., Shandarin I. N., Ermakova G. V, Minin A. A., Tereshina M. B., & Zaraisky A. G., 2015. The secreted factor Ag1 missing in higher vertebrates regulates fins regeneration in *Danio rerio*. *Scientific Reports*, 5, 8123.

- Ivanova A. S., Tereshina M. B., Ermakova G. V., Belousov V. V., & Zaraisky A. G.** 2013. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles. *Scientific Reports*, 3, 1279.
- Jaillon O., Aury J.M., Brunet F., et al.,** 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. Oct 21;431(7011):946-57. doi: 10.1038/nature03025.
- Janvier P.,** 1981. The phylogeny of the Craniata, with particular reference to the significance of fossil “agnathans”. *Journal of Vertebrate Paleontology*. V. 1. № 2. P. 121–159.
- Janvier P.,** 1987. The paired fins of anaspids: one more hypothesis about their function. *Journal of Paleontology*. V. 61. № 4. P. 850–853.
- Janvier P.,** 2003. Vertebrate characters and the Cambrian vertebrates. *C.R. Palevol.* v. 2, p. 523-531.
- Janvier P.,** 2015. Facts and fancies about early fossil chordates and vertebrates. *Nature*. V. 520. № 7548. P. 483–489.
- Janvier P.,** Modern look for ancient lamprey. *Nature*. 2006. V. 433. P. 921–924
- Jin L, Wu J, Bellusci S, et al.,** 2019. Fibroblast Growth Factor 10 and Vertebrate Limb Development. *Front Genet.* v. 9:705. doi: 10.3389/fgene.2018.00705.
- Jones C.M., Kuehn M.R., Hogan B.L., Smith J.C., and Wright C.V.,** 1995. Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development (Cambridge, England)* 121(11): 3651-3662.
- Jones C.M., Kuehn M.R., Hogan B.L., Smith J.C., Wright C.V.,** 1995. Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development*. Nov;121(11):3651-62. doi: 10.1242/dev.121.11.3651.
- Jones T.E., Day R.C., Beck C.W.,** 2013. Attenuation of bone morphogenetic protein signaling during amphibian limb development results in the generation of stage-specific defects. *J Anat.* 223(5):474-88. doi: 10.1111/joa.12098.
- Joseph E.M., Melton D.A.,** 1997. Xnr4: a *Xenopus* nodal-related gene expressed in the Spemann organizer. *Dev Biol.* Apr 15;184(2):367-72. doi: 10.1006/dbio.1997.8510.
- Kasamatsu J.,** 2013. Evolution of innate and adaptive immune systems in jawless vertebrates. *Microbiol Immunol.* Jan;57(1):1-12. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00500.x.
- Kassahn K.S., Dang V.T., Wilkins S.J. et al.,** 2009. Evolution of gene function and regulatory control after wholegenome duplication: comparative analyses in vertebrates. *Genome Res.* v. 19, p. 1404–1418
- Kazanskaya OV, Severtzova EA, Barth KA, Ermakova GV, Lukyanov SA, Benyumov AO, Pannese M, Boncinelli E, Wilson SW, Zaraisky AG.,** 1997. Anf: a novel class of vertebrate homeobox genes expressed at the anterior end of the main embryonic axis. *Gene*. Oct 24;200(1-2):25-34. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00326-0.
- Kenny N. J., Chan KW., Nong W. et al.,** 2016. Ancestral whole-genome duplication in the marine chelicerate horseshoe crabs. *Heredity (Edinb).* v. 116(2), p. 190–199.
- Kiecker C. and Niehrs C.,** 2001. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* 128, 4189-201.
- Kinoshita N, Minshull J, Kirschner MW.** 1995. The identification of two novel ligands of the FGF receptor by a yeast screening method and their activity in *Xenopus* development. *Cell.* 83(4):621-30. doi: 10.1016/0092-8674(95)90102-7.
- Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B, Mishra L.,** 2007, Tgf-Beta signaling in development., *Sci STKE*. 2007(399):cm1. doi: 10.1126/stke.3992007cm1.
- Knecht A.K. and Harland R.M.,** 1997. Mechanisms of dorsal-ventral patterning in noggin- induced neural tissue. *Development*. V. 24, P. 2477-2488.
- Knöchel S, Dillinger K, Köster M, Knöchel W.,** 2001. Structure and expression of *Xenopus tropicalis* BMP-2 and BMP-4 genes. *Mech Dev.* Nov;109(1):79-82. doi: 10.1016/s0925-4773(01)00506-8.

- Koide T, Hayata T, Cho KW.**, 2005. *Xenopus* as a model system to study transcriptional regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(14):4943-8. doi: 10.1073/pnas.0408125102.
- Kragl M., Knapp D., Nacu E. et al.**, 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* v. 460, p. 60–65. <https://doi.org/10.1038/nature08152>
- Krause C, Guzman A, Knaus P.** 2011. Noggin. *Int J Biochem Cell Biol.* 43(4), 478-81 doi: 10.1016/j.biocel.2011.01.007
- Kröger B., Vinther J. and Fuchs D.**, 2011. Cephalopod origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development and molecules. *Bioessays.* 33:602–613. DOI 10.1002/bies.201100001
- Kumamoto T. and Hanashima C.**, Evolutionary conservation and conversion of Foxg1 function in brain development. *Dev Growth Differ.* 2017. V. 59, № 4, P. 258-269
- Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A., & Brockes, J. P.**, 2007. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* (New York, N.Y.), 318(5851), 772–777.
- Kuraku S, Kuratani S.**, 2011. Genome-wide detection of gene extinction in early mammalian evolution. *Genome Biol Evol.* 3:1449-62. doi: 10.1093/gbe/evr120.
- Kuraku S. and Kuratani S.**, 2006. Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences. *Zool. Sci.* v. 23, p. 1053–1064.
- Kuraku S.**, 2021. Shark and ray genomics for disentangling their morphological diversity and vertebrate evolution. *Dev Biol.* 477, 262-272. doi: 10.1016/j.ydbio.2021.06.001.
- Kuratani S. and Ota K. G.**, 2008. Hagfish (Cyclostomata, Vertebrata): searching for the ancestral developmental plan of vertebrates. *BioEssays.* v. 30, p. 167-172.
- Kuratani S.**, 2021. Evo-devo studies of cyclostomes and the origin and evolution of jawed vertebrates. *Curr Top Dev Biol.* 141:207-239. doi: 10.1016/bs.ctdb.2020.11.011.
- Kuratani S., Nobusada Y., Horigome N., et al.**, 2001. Embryology of the lamprey and evolution of the vertebrate jaws: insights from molecular and developmental perspectives, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, vol. 356, no. 1414, pp. 1615–1632. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0976>
- Kuroda H., Fuentealba L., Ikeda A., Reversade B. and De Robertis E. M.** 2005. Default neural induction: neuralization of dissociated *Xenopus* cells is mediated by Ras/MAPK activation. *Genes Dev* 19, 1022-7.
- Lagutin O. V., Zhu C. C., Kobayashi D., Topczewski J., Shimamura K., Puelles L., Russell H. R., McKinnon P. J., Solnica-Krezel L. and Oliver G.**, 2003. Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 368-79.
- Lamb T.M., Knecht A.K., Smith W.C. et al.**, 1993. Neural induction by secreted polypeptide noggin. *Science* v. 262, p. 713-718.
- Larouche O., Zelditch M. L. and Cloutier R.**, 2019. A critical appraisal of appendage disparity and homology in fishes. *Fish Fish.* v. 20, p. 1138–1175.
- Lee R. T., Knapik E. W., Thiery J. P. et al.**, 2013. An exclusively mesodermal origin of fin mesenchyme demonstrates that zebrafish trunk neural crest does not generate ectomesenchyme. *Development.* v. 140, p. 2923–2932.
- Letelier J., de la Calle-Mustienes E., Pieretti J. et al.**, 2018. A conserved Shh cis-regulatory module highlights a common developmental origin of unpaired and paired fins. *Nat Genet.* v. 50, p. 504–509. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0080-5>
- Letelier J., Naranjo S., Sospedra-Arrufat I., et al.**, 2021. The Shh/Gli3 gene regulatory network precedes the origin of paired fins and reveals the deep homology between distal fins and digits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 118(46), p. e2100575118. doi: 10.1073/pnas.2100575118.
- Li J.T., Wang Q., Huang Yang M.D., et al.**, 2021. Parallel subgenome structure and divergent expression evolution of allo-tetraploid common carp and goldfish. *Nat Genet.* v. 53, № 10, p.1493-1503. doi: 10.1038/s41588-021-00933-9.

Lien S, Koop BF, Sandve SR et al., 2016. The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature*. 533(7602): 200-5. doi: 10.1038/nature17164.

Liu J, You X, Xu P, et al., 2018. Assessing the genetic diversity of the critically endangered Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* using mitochondrial markers and genome-wide single-nucleotide polymorphisms from RAD-seq. *Sci China Life Sci*. 61(9): 1090-1098. doi: 10.1007/s11427-017-9254-6.

Liu B. and Satou Y. 2019. Foxg specifies sensory neurons in the anterior neural plate border of the ascidian embryo. *Nat Commun*. 10(1), 4911. doi: 10.1038/s41467-019-12839-6

Lo P.C. and Frasch M., 2003. Establishing A-P polarity in the embryonic heart tube: A conserved function of hox genes in *Drosophila* and vertebrates? *Trends Cardiovasc. Med*. v. 13, p. 182–187.

Lowe CJ, Terasaki M, Wu M, Freeman RM Jr, Runft L, Kwan K, et al., 2006. Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. *PLoS Biol*. 4(9), e291. doi: 10.1371/journal.pbio.0040291

Lu, W.Y., Liu, C.C., Thottassery, J.V., Bu, G.J., and Li, Y.H. 2010. Mesd Is a Universal Inhibitor of Wnt Coreceptors LRP5 and LRP6 and Blocks Wnt/beta-Catenin Signaling in Cancer Cells. *Biochemistry* 49(22): 4635-4643.

Luo H., Hu S. and Chen L. 2001. New Early Cambrian Chordates from Haikou, Kunming. *Acta Geologica Sinica*. 75:4, 345–348

Lyuksyutova, A.I., Lu, C.C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M., and Zou, Y., 2003. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science (New York, NY)* 302(5652): 1984-1988.

Mabee P. M., Crotwell P. L., Bird N. C. et al., 2002. Evolution of median fin modules in the axial skeleton of fishes. *J. Exp. Zool.* v. 294, p. 77–90.

Mabee P.M. and Noordsy M., 2004. Development of the paired fins in the paddlefish, *Polyodon spathula*. *J Morphol.* v. 261(3), p. 334-44. doi: 10.1002/jmor.10253. PMID: 15281061.

Mable B., 2004. ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’: myths and mechanisms. *Biol. J. Linn. Soc.* v. 82, p. 453–466.

MacDonald RB, Debais-Thibaud M, Martin K, Poitras L, Tay BH, Venkatesh B, Ekker M. 2010. Functional conservation of a forebrain enhancer from the elephant shark (*Callorhynchus milii*) in zebrafish and mice. *BMC Evol Biol*. 10:157. doi: 10.1186/1471-2148-10-157

MacKintosh C, Ferrier DEK. 2017. Recent advances in understanding the roles of whole genome duplications in evolution. *F1000Res*. Aug 31;6:1623. doi: 10.12688/f1000research.11792.2. PMID: 28928963; PMCID: PMC5590085.

Maisey J. G., Miller R., Pradel A. et al., 2017. Pectoral morphology in *Doliodus*: bridging the ‘acanthodian’-chondrichthyan divide. *American Museum Novitates*. V. 3875. P. 1–15.

Malakhov V.V. 1996. The origin of Chordata animals. (In Russian) *Soros Educational Journal*. 7, 2–9

Malakhov, V. V., Gantsevich, M. M. 2019. Trophosome in the vestimentiferan tubeworm *Ridgeia piscesae* Jones 1985 (Annelida, Siboglinidae) develops from cells of the coelomic lining. *Doklady Biological Sciences*, 485, 44–46.

Manuel M, Martynoga B, Yu T, West JD, Mason JO, Price DJ. et al., 2010. The transcription factor Foxg1 regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice. *Development*. 2010, 137(3): 487-97. doi: 10.1242/dev.039800.

Mao Q., Stinnett H. K. and Ho, R. K., 2015. Asymmetric cell convergence-driven zebrafish fin bud initiation and pre-pattern requires Tbx5a control of a mesenchymal Fgf signal. *Development*, v. 142(24), p. 4329–4339. <https://doi.org/10.1242/dev.124750>

Marín O. and Rubenstein J.L., 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci*. v. 2(11). p. 780-90.

Marlétaz F., de la Calle-Mustienes E., Acemel R.D., et al., 2023. The little skate genome and the evolutionary emergence of wing-like fins. *Nature*. v. 616, № 7957, p.495-503. doi: 10.1038/s41586-023-05868-1.

Marlétaz, F., Timoshevskaya, N., Timoshevskiy, V.A. et al. 2024. The hagfish genome and the evolution of vertebrates. *Nature* v. 627, p. 811–820. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07070-3>

Marra N.J., Stanhope M.J., Jue N.K., et al., 2019. White shark genome reveals ancient elasmobranch adaptations associated with wound healing and the maintenance of genome stability. *Proc Natl Acad Sci USA* v.116, № 10, p. 4446-4455. doi: 10.1073/pnas.1819778116.

Märss T., Ritchie A., 1998. Silurian thelodonts (Agnatha) of Scotland. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences*. V. 88. P. 143–195.

Martin K.J., Holland P.W., 2014. Enigmatic orthology relationships between *Hox* clusters of the African butterfly fish and other teleosts following ancient whole-genome duplication. *Mol Biol Evol*. v. 31(10), p. 2592–2611.

Martinez Arias A and Steventon B. 2018. On the nature and function of organizers. *Development*. 145(5), dev159525. doi: 10.1242/dev.159525

Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO. et al., 2005. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol*. 283(1): 113-27. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.04.005.

Martynova, N.Yu., Eroshkin, F.M., Ermakova, G.V. et al., Patterning the forebrain: FoxA4a/Pintallavis and Xvent-2 determine the posterior limit of the *Xanf-1* expression in the neural plate. *Development*. 2004. V. 131, P. 2329-2338.

McCauley D.W., Docker M.F., Whyard S. et al., 2015. Lampreys as diverse model organisms in the genomics era. *Bioscience*. v. 65, p. 1046-1056.

McCauley DW, Bronner-Fraser M. 2004. Conservation and divergence of BMP2/4 genes in the lamprey: expression and phylogenetic analysis suggest a single ancestral vertebrate gene. *Evol Dev*. Nov-Dec;6(6):411-22. doi: 10.1111/j.1525-142X.2004.04054.x.

McMahon J.A., Takada S., Zimmerman L.B. et al., 1998. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes. Dev*. V. 12, P. 1438-1452.

McNamara, K.J. 2012. Heterochrony: the Evolution of Development. *Evo Edu Outreach* 5, 203–218. <https://doi.org/10.1007/s12052-012-0420-3>

Medina L., 2009. Evolution and Embryological Development of Forebrain. *Brain Inflammation: Biomedical Imaging*. p.1172-1192

Mednikov D. N. 2022. The two-block structure of the skull of Sarcopterygii as a possible reason for the special structure of their fins. *Evolutsionnaya i funktsionalnaya anatomiya pozvonochnykh* (Evolutionary and functional morphology of vertebrates). Moscow: KMK. 189–198.

Mednikov D. N., 2014. Urodelans, Ichthyostega and the origin of the tetrapod limb // *Paleontological Journal*. V. 48. P. 1092–1103.

Mehta, T.K., Ravi, V., Yamasaki, S., et al., 2013. Evidence for at least six Hox clusters in the Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 110, no. 40, pp. 16044–16049. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315760110>

Mercader N., 2007. Early steps of paired fin development in zebrafish compared with tetrapod limb development. *Dev Growth Differ*. v. 49(6), p. 421-37. doi: 10.1111/j.1440-169X.2007.00942.x.

Meyer A. and Van de Peer Y., 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*. v. 27(9), p. 937–45.

Miller R., Cloutier R., Turner S., 2003. The oldest articulated chondrichthyan from the Early Devonian period. *Nature*. V. 425. № 6957. P. 501 –504.

- Minguillon C., Gibson-Brown J.J., Logan M.P.,** 2009. Tbx4/5 gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 106(51), p. 21726-30. doi: 10.1073/pnas.0910153106.
- Mivart S.G.,** 1879. On the fins of Elasmobranchii. *Trans Zool Soc Lond.* V. 10, p. 439-484.
- Miyamoto K., Kawakami K., Tamura, K. et al.,** 2022. Developmental independence of median fins from the larval fin fold revises their evolutionary origin. *Sci Rep* v. 12, p. 7521. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11180-1>
- Miyazono K et al.,** 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* Jan;147(1):35-51.
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M.** 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* Jan;147(1):35-51. doi: 10.1093/jb/mvp148.
- Molina MD, Neto A, Maeso I, Gómez-Skarmeta JL, Saló E, Cebrià F.** 2011. Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr Biol.* 21(4):300-5. doi: 10.1016/j.cub.2011.01.016.
- Molina MD, Saló E, Cebrià F.** 2009. Expression pattern of the expanded noggin gene family in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Gene Expr Patterns.* **9(4)**, 246–253.
- Montero JA, Lorda-Diez CI, Francisco-Morcillo J, Chimal-Monroy J, Garcia-Porrero JA, Hurle JM.** 2017. Sox9 Expression in Amniotes: Species-Specific Differences in the Formation of Digits. *Front Cell Dev Biol.* 5:23. doi: 10.3389/fcell.2017.00023.
- Moreau C., Caldarelli P., Rocancourt D., et al.,** 2019. Timed collinear activation of Hox genes during gastrulation controls the avian forelimb position. *Curr. Biol.* v. 29, p. 35-50.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.009>
- Moriyama Y. and Koshiba-Takeuchi K.,** 2018. Significance of whole-genome duplications on the emergence of evolutionary novelties. *Briefings in Functional Genomics*, v. 17(5), p. 329–338.
- Moy-Thomas and Miles,** 1971. *Palaeozoic Fishes*, Springer New York, NY, doi.org/10.1007/978-1-4684-6465-8
- Murakami Y., Ogasawara M., Sugahara F. et al.,** 2001. Identification and expression of the lamprey *Pax6* gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates // *Development.* v. 128(18). p. 3521-31
- Murakami, Y., Uchida, K., Rijli, F.M., and Kuratani, S.,** 2005. Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans, *Dev. Biol.*, vol. 280, no. 2, p. 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.008>
- Musa SM, Czachur MV, Shiels HA.** 2018. Oviparous elasmobranch development inside the egg case in 7 key stages. *PLoS One.* 13(11), e0206984. doi: 10.1371/journal.pone.0206984
- Myojin M., Ueki T., Sugahara F. et al.,** 2001. Isolation of *Dlx* and *Emx* gene cognates in an agnathan species, *Lampetra japonica*, and their expression patterns during embryonic and larval development: conserved and diversified regulatory patterns of homeobox genes in vertebrate head evolution. *J Exp Zool.* v. 15;291 (1). p. 68-84
- Nagayoshi S., Hayashi E., Abe G., et al.,** 2008. Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn*-like. *Development,* v. 135(1), p. 159–169. <https://doi.org/10.1242/dev.009050>
- Nakamura T., Klomp J., Pieretti J., et al.,** 2015. Molecular mechanisms underlying the exceptional adaptations of batoid fins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112(52), p. 15940–15945. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521818112>
- Nakatani Y., Shingate P., Ravi V. et al.,** 2021. Reconstruction of proto-vertebrate, protocyclostome and proto-gnathostome genomes provides new insights into early vertebrate evolution. *Nat. Commun.* v.12, 4489. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24573-z>.
- Nakayama N, Han CE, Scully S, Nishinakamura R, He C, Zeni L, Yamane H, Chang D, Yu D, Yokota T, Wen D.,** 2001. A novel chordin-like protein inhibitor for bone

morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. *Dev Biol.* Apr 15;232(2):372-87. doi: 10.1006/dbio.2001.0200.

Nakayama N, Han CY, Cam L, Lee JI, Pretorius J, Fisher S, Rosenfeld R, Scully S, Nishinakamura R, Duryea D, Van G, Bolon B, Yokota T, Zhang K., 2004. A novel chordin-like BMP inhibitor, CHL2, expressed preferentially in chondrocytes of developing cartilage and osteoarthritic joint cartilage. *Development.* Jan;131(1):229-40. doi: 10.1242/dev.00901.

Naumov N.P., Kartashov N.N., 1979. Zoologija pozvonochnykh (Vertebrate Zoology). Part 1. Moscow: Vysshaja shkola. (In Russian.)

Neidert A.H., Virupannavar V., Hooker G.W. et al., 2001. Lamprey *Dlx* genes and early vertebrate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 13;98(4). p. 1665-70

Nelson J. S., Grande T. C., Wilson M. V. H. 2016. Fishes of the World. 5th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, P. 116—117. doi:10.1002/9781119174844

Newton A.H. and Smith C.A., 2021. Regulation of vertebrate forelimb development and wing reduction in the flightless emu. *Dev Dyn.* v. 250(9), p. 1248-1263. doi: 10.1002/dvdy.288.

Niazi I.A., 1963. The histology of tail regeneration in the ammocoetes, *Canadian Journal of Zoology.* Volume 41

Niehrs, C. 1999. Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet* 15, 314-9.

Niehrs, C. 2010. On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development (Cambridge, England)* **137**(6): 845-857.

Nieuwkoop P. D. and Faber J., 1967. Normal Table of *Xenopus laevis*. Amsterdam : North Holland.

Nifuji A and Noda M. 1999. Coordinated expression of noggin and bone morphogenetic proteins (BMPs) during early skeletogenesis and induction of noggin expression by BMP-7. *J Bone Miner Res.* 14(12):2057-66. () doi: 10.1359/jbmr.1999.14.12.2057.

Nishimura O., Rozewicki J. Yamaguchi K., et al., 2022. Squalomix: shark and ray genome analysis consortium and its data sharing platform. *F1000Res.* v. 11, p. 1077. doi: 10.12688/f1000research.123591.1.

Niswander L., Jeffrey S., Martin G.R., et al., 1994. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature.* v. 371(6498), p. 609-12. doi: 10.1038/371609a0.

Noro M, Sugahara F, Kuraku S., 2015. Reevaluating *Emx* gene phylogeny: homopolymeric amino acid tracts as a potential factor obscuring orthology signals in cyclostome genes. *BMC Evol Biol.* v. 15(1), p.78.

Norton W. H. J., Ledin J., Grandel H., et al., 2005. HSPG synthesis by zebrafish *Ext2* and *Extl3* is required for *Fgf10* signalling during limb development. *Development,* v. 132(22), p. 4963–4973. <https://doi.org/10.1242/dev.02084>

Nossa C.W., Havlak P., Yue J-X. et al., 2014 Joint assembly and genetic mapping of the Atlantic horseshoe crab genome reveals ancient whole genome duplication. *Gigascience.* v. 3, p. 708–721.

Novitskaya L. I. 2006. Agnatha as the most ancient vertebrates. In: *Evolitsiya biosfery i bioraznoobraziya* (Evolution of the biosphere and biodiversity). Moscow: KMK. 193–207.

Novitskaya, L.I., Karatayute-Talimaa, V.N. 1986. Remarks on cladistic analysis in connection with the hypothesis of the myopterygian and the problem of the origin of gnathostomes. In: *Morfologiya i evolyutsiya zivotnykh* (Morphology and Evolution of Animals). Moscow: Nauka. 102–125. (In Russian).

Nusse, R. and Varmus, H.E. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31(1): 99-109.

Oelofsen B.W., Loock, J.C. 1981. A fossil cephalochordate from the Early Permian Whitehill formation of South Africa. *South African Journal of Science,* **77**, 178–180.

Ohno, S., 1970. Evolution by Gene Duplication, Heidelberg: Springer Berlin, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-86659-3>

- Oisi Y., Ota K. G., Kuraku S.,** 2013. Craniofacial development of hagfishes and the evolution of vertebrates. *Nature*. v. 493, p. 175-180.
- Okamoto E., Kusakabe R., Kuraku S. et al.,** 2017. Migratory appendicular muscles precursor cells in the common ancestor to all vertebrates. *Nat Ecol Evol* v. 1, p. 1731–1736. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0330-4>
- Oliverio, M., Digilio, M.C., Versacci, P., Dallapiccola, B., and Marino, B.** 2010. Shells and heart: are human laterality and chirality of snails controlled by the same maternal genes? *American journal of medical genetics* 152A(10): 2419-2425.
- Onai T.,** 2023. Organization of the body wall in lampreys informs the evolution of the vertebrate paired appendages. *J Morphol.* v. 284(3), p. e21559. doi: 10.1002/jmor.21559.
- Onai T., Sasai N., Matsui M. and Sasai Y.,** 2004. Xenopus XsalF: anterior neuroectodermal specification by attenuating cellular responsiveness to Wnt signaling. *Dev Cell* 7, 95-106.
- Onimaru K, Shoguchi E, Kuratani S, Tanaka M.,** 2011. Development and evolution of the lateral plate mesoderm: comparative analysis of amphioxus and lamprey with implications for the acquisition of paired fins. *Developmental Biology*, 359, 124–136.
- Onimaru K. and Kuraku S.,** 2018. Inference of the ancestral vertebrate phenotype through vestiges of the whole-genome duplications. *Brief Funct Genomics.* v. 17(5), p. 352-361.
- Onimaru K., Tatsumi K., Tanegashima C., et al.,** 2021. Developmental hourglass and heterochronic shifts in fin and limb development. *Elife.* v. 10, p. e62865. doi: 10.7554/eLife.62865.
- Onimaru, K., Marcon, L., Musy, M. et al.,** 2016. The fin-to-limb transition as the re-organization of a Turing pattern. *Nat Commun* 7, 11582. <https://doi.org/10.1038/ncomms11582>
- Onuma Y, Takahashi S, Haramoto Y, Tanegashima K, Yokota C, Whitman M, Asashima M.,** 2005. Xnr2 and Xnr5 unprocessed proteins inhibit Wnt signaling upstream of dishevelled. *Dev Dyn.* Dec;234(4):900-10. doi: 10.1002/dvdy.20574.
- Onuma Y, Yeo CY, Whitman M.,** 2006. XCR2, one of three Xenopus EGF-CFC genes, has a distinct role in the regulation of left-right patterning. *Development.* Jan;133(2):237-50. doi: 10.1242/dev.02188. Epub 2005 Dec 8. PMID: 16339189.
- Orlov EE, Nesterenko AM, Korotkova DD, Parshina EA, Martynova NY, Zارايسки AG.,** 2022. Targeted search for scaling genes reveals matrix metalloproteinase 3 as a scaler of the dorsal-ventral pattern in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Cell.* 57(1):95-111.e12. doi: 10.1016/j.devcel.2021.11.021
- Orr H. A.,** 1990. ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’ revisited. *Am. Nat.* v. 136, p. 759–770.
- Osorio J, Mazan S, Rétaux S.** 2005. Organisation of the lamprey (*Lampetra fluviatilis*) embryonic brain: insights from LIM-homeodomain, Pax and hedgehog genes. *Dev Biol.* 288(1), 100-12. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.08.042
- Osório J. and Rétaux S.,** The lamprey in evolutionary studies. *Dev Genes Evol.* 2008 V. 218(5). P. 221-35
- Ota K. G., Kuraku S. and Kuratani S.,** 2007. Hagfish embryology with reference to the evolution of the neural crest. *Nature.* v. 446, p. 672-675.
- Ota, K., Fujimoto, S., Oisi, Y. et al.** 2011. Identification of vertebra-like elements and their possible differentiation from sclerotomes in the hagfish. *Nat Commun* 2, 373. <https://doi.org/10.1038/ncomms1355>Miyashita et al., 2019;
- Otto S.P.,** 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell.* v. 131(3), p. 452–462.
- Pani AM, Mullarkey EE, Aronowicz J, Assimacopoulos S, Grove EA, Lowe CJ.** 2012. Ancient deuterostome origins of vertebrate brain signalling centres. *Nature.* 483(7389), 289-94. doi: 10.1038/nature10838

Parichy D. M., Elizondo M. R., Mills M. G., et al., 2009. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* v. 238, p. 2975–3015.

Parker H.J., Bronner M.E., Krumlauf R., 2019a An atlas of anterior hox gene expression in the embryonic sea lamprey head: Hox-code evolution in vertebrate. *Dev Biol.* v. 453(1), p. 19-33.

Pasquier J., Braasch I., Batzel P. et al., 2017. Evolution of gene expression after whole-genome duplication: new insights from the spotted gar genome. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* v. 328, p. 709-721.

Pavlov D.S., Nazarov D.Y., Zvezdin A.O., et al., 2014. Downstream migration of early larvae of the European river lamprey *Lampetra fluviatilis*, *Dokl. Biol. Sci.*, 459, 1, 344–347. <https://doi.org/10.1134/S0012496614060039>

Pauley S, Lai E, Fritsch B., 2006. Foxg1 is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear. *Dev Dyn.* 235(9):2470-82. doi: 10.1002/dvdy.20839.

Pears JB, Johanson Z, Trinajstić K, et al., 2020. Mineralization of the Callorhynchus Vertebral Column (Holocephali; Chondrichthyes). *Front Genet.* 11, 571694. doi: 10.3389/fgene.2020.571694

Pearson D. M., Westoll T. S., 1979. The Devonian actinopterygian *Cheirolepis* Agassiz // *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh.* V. 70. № 13–14. P. 337–399.

Pereira, A., Levy, A., Vukić, J., et al., 2021. Putting European lampreys into perspective: A global-scale multilocus phylogeny with a proposal for a generic structure of the Petromyzontidae, *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, vol. 59, no. 8, pp. 1982-1993. <https://doi.org/10.1111/jzs.12522>

Piavis G.W., 1961. Embryological stages in the sea lamprey and effects of temperature on development. *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Bull.* V. 182(61). P. 111-143.

Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM., 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature.* Feb 25;397(6721):707-10. doi: 10.1038/17820.

Piccolo S, Agius E, Lu B, Goodman S, Dale L, De Robertis EM., 1997. Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell.* Oct 31;91(3):407-16. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80424-9. PMID: 9363949; PMCID: PMC3070600.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E. M., 1999. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-10.

Pierreux C.E., Nicolas F.J., Hill C.S., 2000. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Molecular and Cellular Biology.* V. 20. P. 9041–9054

Pizette S & Niswander L., 2001. Early steps in limb patterning and chondrogenesis. *Novartis Found Symp.* 232, 23-36. doi: 10.1002/0470846658.ch3

Plouhinec JL, Zakin L, Moriyama Y, De Robertis EM., 2013. Chordin forms a self-organizing morphogen gradient in the extracellular space between ectoderm and mesoderm in the *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 17;110(51):20372-9. doi: 10.1073/pnas.1319745110.

Polakis P., 1997. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1332(3): F127-147.

Poss S. G., Boschung H. T., 1996. Lancelets (Cephalochordata: Branchiostomatidae): how many species are valid? *Israel Journal of Zoology*, 42, 13–66.

Putnam N.H., Butts T., Ferrier D.E. et al. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature.* v. 453. p. 1064–1071.

- Qiu H., Hildebrand F., Kuraku S., et al.,** 2011. Unresolved orthology and peculiar coding sequence properties of lamprey genes: the KCNA gene family as test case. *BMC Genomics*. v. 12(1), p. 325.
- Raspopovic J, Marcon L, Russo L, Sharpe J.** 2014. Modeling digits. Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. *Science*. 345(6196):566-70. doi: 10.1126/science.1252960.
- Redmond A. K., Casey D., Gundappa M. K. et al.,** 2023. Independent rediploidization masks shared whole genome duplication in the sturgeon-paddlefish ancestor. *Nat Commun*. v.14, p. 2879, doi.org/10.1038/s41467-023-38714-z
- Reese D.E., Hall C.E., Mikawa T.,** 2004. Negative regulation of midline vascular development by the notochord. *Dev. Cell* V. 6, P. 699-708.
- Renaud, C.B.,** 2011. Lampreys of the world. An annotated and illustrated catalogue of lamprey species known to date, FAO Species Cat. Fish. Purp., no. 5. Rome: FAO.
- Reyes R.C.,** 2008. Embryogenesis and ammocoete morphological development of the Pacific lamprey (*Entosphenus tridentatus* Gairdner, 1836) from the American River, California. *Tracy Technical Bull.* V. 3. P. 28
- Richardson M.K. and Wright G.M.,** 2003. Developmental transformations in a normal series of embryos of the sea lamprey *Petromyzon marinus* (Linnaeus). *J. Morph.* V. 257(3). P. 348-363
- Richardson M.K., Admiraal J., Wright G.M.,** 2010. Developmental anatomy of lampreys. *Biol Rev Camb Philos Soc.* V. 85(1). P. 1-33
- Ritchie A.,** 1980. The late Silurian anaspid genus *Rhyncholepis* from Oesel, Estonia, and Ringerike, Norway. *American Museum Novitates.* № 2699. P. 1–18.
- Roberts RM, Ezashi T, Temple J, Owen JR, Soncin F, Parast MM.,** 2022. The role of BMP4 signaling in trophoblast emergence from pluripotency. *Cell Mol Life Sci.* 79(8):447. doi: 10.1007/s00018-022-04478-w.
- Romer A., Parsons T.** 1992. *Anatomiya pozvonochnykh (Vertebrate Body)*. Moscow: Mir. (In Russian.)
- Rosenberger L. J.** 2001. Pectoral fin locomotion in batoid fishes: undulation versus oscillation. *Journal of Experimental Biology*, 204, 379–394.
- Ruvinsky I., Oates A.C., Silver L.M., et al.,** 2000. The evolution of paired appendages in vertebrates: T-box genes in the zebrafish. *Dev Genes Evol.* v. 210(2), p. 82-91. doi: 10.1007/s004270050014.
- Ryckebusch, L., Wang, Z., Bertrand, N., Lin, S. C., Chi, X., Schwartz, R., Zaffran, S., Niederreither, K.** 2008. Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105, 2913–2918.
- Sacerdot C., Louis A., Bon C., et al.,** 2018. Chromosome evolution at the origin of the ancestral vertebrate genome. *Genome Biol.* v. 19, № 1, p. 166.
- Sahoo T., Dzidic N., Strecker M.N. et al.,** 2017. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. *Genet Med.* v. 19(1), p. 83–89.
- Sallan LC.** 2014. Major issues in the origins of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 89(4):950-71. doi: 10.1111/brv.12086.
- Sansom R. S., Freedman K. I. M., Gabbott S. E. et al.,** 2010. Taphonomy and affinity of an enigmatic Silurian vertebrate, *Jamoytius kerwoodi* White. *Palaeontology.* V. 53. № 6. P. 1393–1409.
- Satoh A, Suzuki M, Amano T, Tamura K, Ide H.** 2005. Joint development in *Xenopus laevis* and induction of segmentations in regenerating froglet limb (spike). *Dev Dyn.* 233(4):1444-53. doi: 10.1002/dvdy.20484.
- Scannell D.R., Frank A.C., Conant G.C., et al.,** 2007. Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 104(20), p. 8397–8402.

Schmalhausen I. I., 1964. Proishozhdenie nazemnykh pozvonochnykh (The Origin of Terrestrial Vertebrates). Moscow: Nauka. (In Russian).

Schmidt J., Francois V., Bier E., Kimelman D., 1995. Drosophila short gastrulation induces an ectopic axis in Xenopus: evidence for conserved mechanisms of dorsal-ventral patterning. *Development*. Dec;121(12):4319-28. doi: 10.1242/dev.121.12.4319. PMID: 8575332.

Schwager E.E., Sharma P.P., Clarke T., et al., 2017. The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution. *BMC Biol.* v. 15(1), p. 62.

Seidel R., Blumer M., Pechriggl E.J., et al., 2017. Calcified cartilage or bone? Collagens in the tessellated endoskeletons of cartilaginous fish (sharks and rays). *J Struct Biol.* 200(1), 54-71. doi: 10.1016/j.jsb.2017.09.005

Seifert A.W., Maden M., 2014. New insights into vertebrate skin regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 310:129-69. doi: 10.1016/B978-0-12-800180-6.00004-9.

Seixas M.J., Domingues R.R., Antunes A., 2023. Decoding the Transcriptome of Sharks, Rays, and Chimaeras: Insights into Their Physiology, Morphology, Evolution, and Biomedical Applications. *Fishes*, 8, 271. <https://doi.org/10.3390/fishes8050271>

Session A. M., Uno Y., Kwon T., et al., 2016. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* v.538, № 7625, p.336-343. doi: 10.1038/nature19840.

Shapiro M.D., Marks M.E., Peichel C.L., et al., 2004. Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature*. v. 428(6984), p. 717-23. doi: 10.1038/nature02415. Erratum in: *Nature*. v. 439(7079), p. 1014.

Sharpe C.R., Fritz A., De Robertis E.M. et al., 1987. A homeobox-containing marker of posterior neural differentiation shows the importance of predetermination in neural induction. *Cell*. v. 50, № 5, pp. 749-58

Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zarausky, A. G., Lukyanov, S. et al., 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 4, 741-6.

Shen JL, Yan CH, Liu Y, Yan XQ, Zhang XL, Jin Y, Zhang KF, Sang ZF, Zhang GY, Li P, Fu SB. 2003. [Studies of TGF-beta/Smads expression in lung cancer]. *Yi Chuan Xue Bao.* Jul;30(7):681-6. Chinese. PMID: 14579540.

Shi Y & Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113(6), 685-700. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00432-x

Shimeld S. M. and Donoghue P. C. J., 2012. Evolutionary crossroads in developmental biology: cyclostomes (lamprey and hagfish). *Development*. v. 139, p. 2091-2099.

Shimkevich, V. M. 1922. Course of Vertebrate Comparative Anatomy. Moscow–Petrograd: Gosudarstvennoe izdatelstvo.

Shu D.G., Luo H.L., Conway Morris S. et al., 1999. Lower Cambrian vertebrates from south China. *Nature*. v. 402, p. 42–46. <https://doi.org/10.1038/46965>

Shu D.-G., Morris S. C., Zhang X.-L., 1996. A Pikaia-like chordate from the lower Cambrian of China. *Letters to Nature*, 384, 157–158.

Shu D.G., Morris S.C., Han J., et al., 2003. Head and backbone of the Early Cambrian vertebrate Haikouichthys. *Nature*. v. 421(6922), p. 526-9. doi: 10.1038/nature01264.

Shubin N.H., Daeschler E.B., Jenkins F.A. Jr., 2006. The pectoral fin of Tiktaalik roseae and the origin of the tetrapod limb. *Nature*. v. 440(7085), p. 764-71. doi: 10.1038/nature04637.

Silva AC, Filipe M, Kuerner KM, Steinbeisser H, Belo JA., 2003. Endogenous Cerberus activity is required for anterior head specification in *Xenopus*. *Development*. Oct;130(20):4943-53. doi: 10.1242/dev.00705.

Simakov O., Marlétaz F., Yue J.X. et al., 2020. Deeply conserved synteny resolves early events in vertebrate evolution. *Nat Ecol Evol.* v. 4(6), p. 820-830.

Sirbu, I. O., Zhao, X., Duester, G. 2008. Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulating *Isl1* through the *Fgf8* pathway. *Developmental Dynamics*, 237, 1627–1635.

Sive H, Grainger R, Harland R, 2000, Early development of *Xenopus laevis*. A laboratory Manual, CSHL Press.

Slack J.M. and Tannahill D.,1993. Noggin the dorsalizer. *Nature*. V. 361. P. 498-499.

Sleight V.A. and Gillis J.A., 2020. Embryonic origin and serial homology of gill arches and paired fins in the skate, *Leucoraja erinacea*. *Elife*. v. 9, p. e60635. doi: 10.7554/eLife.60635.

Smith A.J., Howell J.H., Piavis G.W., Comparative embryology of five species of lamprey of the Upper Great Lakes. *Copeia*. 1968. V. 3. P. 461–469

Smith J.J., Kuraku S., Holt C., et al., 2013. Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nat Genet*. v. 45, p. 415–21.

Smith J.J., Timoshevskaya N., Ye C., et al., 2018. The sea lamprey germline genome provides insights into programmed genome rearrangement and vertebrate evolution. *Nat. Genet*. v. 50, p. 270–277.

Smith W.C. and Harland R.M., 1992. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*. v. 70, p. 829-840.

Smith W.C., Knecht A.K., Wu M. et al., 1993. Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature*. V. 361. P. 547-549.

Smith, W. C. & Harland, R. M. 1992. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829–840.

Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T. and Melton, D. A. 1991. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* 67, 741–752.

Soltis D.E., Albert V.A., Leebens-Mack J. et al., 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *Am J Bot*. v. 96(1), p. 336–48.

Soltis D.E., Bell C.D., Kim S. et al., 2008. Origin and early evolution of angiosperms. *Ann NY Acad Sci*. v. 1133, p. 3–25.

Spemann H. and Mangold H. 1924. Induction of embryonic primordial by implantation of organizers from a different species. *Roux Arch Entw Mech* 100:599–638. [Reprinted and translated in De Robertis EM, Arechaga J, eds. (2001) *Int J Dev Biol* 45(1), 13–31] PMID: 11291841

Square T., Romášek M., Jandzik D. et al., CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis in the sea lamprey *Petromyzon marinus*: a powerful tool for understanding ancestral gene functions in vertebrates. *Development*. 2015. v. 142(23). p. 4180-7

Starck JM, Stewart JR, Blackburn DG. 2021. Phylogeny and evolutionary history of the amniote egg. *J Morphol*. Jul;282(7):1080-1122. doi: 10.1002/jmor.21380.

Stern C.D., 2005. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development*. 132(9), 2007-21. doi: 10.1242/dev.01794

Stokes, M.D., Holland, N.D. 1996. Reproduction of the Florida Lancelet (*Branchiostoma floridae*): Spawning Patterns and Fluctuations in Gonad Indexes and Nutritional Reserves. *Invertebrate Biology*, 115, 349–359.

Storm EE, Garel S, Borello U, et al., 2006. Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development*. May;133(9):1831-44. doi: 10.1242/dev.02324.

Streit A, Stern CD. 1999. Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech Dev*. Apr;82(1-2):51-66. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00013-1. PMID: 10354471.

Suda Y., Kurokawa D., Takeuchi M. et al., 2009. Evolution of *Otx* paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Dev Biol*. v. 1;325 (1). p. 282-95.

Sugahara F, Aota S, Kuraku S, et al., 2011. Involvement of Hedgehog and FGF signalling in the lamprey telencephalon: evolution of regionalization and dorsoventral patterning of the vertebrate forebrain. *Development*. 138(6), 1217-26. doi: 10.1242/dev.059360

Sugahara F., Murakami Y., Kuratani S., 2015. Gene expression analysis of lamprey embryo. Springer New York.

- Sugahara F., Pascual-Anaya J., Oisi Y. et al.**, 2016. Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain. *Nature*. V. 531. P. 97–100
- Sugahara F., Murakami Y., Adachi N. et al.**, 2013. Evolution of the regionalization and patterning of the vertebrate telencephalon: what can we learn from cyclostomes? *Curr Opin Genet Dev*. v. 23, p. 475-83
- Sugahara F., Murakami Y., Pascual-Anaya J. et al.**, 2017. Reconstructing the ancestral vertebrate brain. *Dev Growth Differ*. V. 59(4). P.163-174
- Sugahara F., Murakami Y., Pascual-Anaya J. et al.**, 2017. Reconstructing the ancestral vertebrate brain. *Dev Growth Differ*. V. 59(4). P.163-174
- Summerton J, Weller D.** 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 7(3):187-95. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.187.
- Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR.**, 1999. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev*. Jul 15;13(14):1834-46. doi: 10.1101/gad.13.14.1834.
- Sussel L., Marin O., Kimura S. et al.**, 1999. Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* v. 126. p. 3359–3370
- Suzuki D.G.**, 2016. Two-headed mutants of the lamprey, a basal vertebrate // *Zoological Lett*. v.2, p. 22. doi: 10.1186/s40851-016-0058-z.
- Tabin C. and Laufer E.**, 1993. Hox genes and serial homology. *Nature*. v. 361, p. 692–693.
- Tahara Y.**, 1988. Normal stages of development in the lamprey, *Lampetra reissneri* (Dybowski). *Zoological Science*. V. 5. P. 109-118
- Takahashi S, Yokota C, Takano K, Tanegashima K, Onuma Y, Goto J, Asashima M.** 2000. Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development*. Dec;127(24):5319-29. doi: 10.1242/dev.127.24.5319.
- Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., and Aizawa, S.** 2009. Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Dev. Biol.* 332, 90–102 doi: 10.1016/j.ydbio.2009.05.543
- Tamura K., Yonei-Tamura S., Belmonte J. C. I.**, 1999. Differential expression of Tbx4 and Tbx5 in Zebrafish Fin buds. *Mechanisms of Development*, v. 87(1–2), p. 181–184. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00126-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00126-4)
- Tanaka M.**, 2016. Developmental Mechanism of Limb Field Specification along the Anterior-Posterior Axis during Vertebrate Evolution. *J Dev Biol*. v. 4(2), p. 18. doi: 10.3390/jdb4020018.
- Tanaka M., Münsterberg A., Anderson W.G., et al.**, 2002. Fin development in a cartilaginous fish and the origin of vertebrate limbs. *Nature*. v. 416(6880), p. 527-31. doi: 10.1038/416527a.
- Tanegashima K, Haramoto Y, Yokota C, Takahashi S, Asashima M.**, 2004, Xantivin suppresses the activity of EGF-CFC genes to regulate nodal signaling., *Int J Dev Biol*. Jun;48(4):275-83.
- Tang H., Wang X., Bowers J.E., et al.**, 2008. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps. *Genome Res*. v. 18(12), p.1944–54.
- Tank E.M., Dekker R.G., Beauchamp K., et al.**, 2009. Patterns and consequences of vertebrate Emx gene duplications. *Evol Dev*. v. 11(4), p. 343–53.
- Tao W., Lai E.**, 1992. Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* v. 8, № 5, pp. 957-66
- Tatarinov, L. P.**, 1987. Essays on the Evolutionary Theory. Moscow: Nauka.
- Thacher J. K.**, 1877. Median and paired fins, a contribution to the history of vertebrate limbs. *Trans. Connecticut Acad. Sci*. V. 3. P. 281–308.

Thomas, P. Q., Johnson, B. V., Rathjen, J. & Rathjen, P. D., 1995. Sequence, genomic organization, and expression of the novel homeobox gene *Hesx1*. *The Journal of biological chemistry*. 270, 3869-3875.

Thompson A.W., Hawkins M.B., Parey E. et al., 2021. The bowfin genome illuminates the developmental evolution of ray-finned fishes. *Nat Genet* v. 53, p. 1373–1384. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00914-y>

Thorogood P. and Ferretti P., 1993. Hox genes, fin folds and symmetry. *Nature*. v. 364, p. 196. doi: 10.1038/364196a0.

Tian T., and Meng A. M., 2006. Nodal signals pattern vertebrate embryos, *Cell. Mol. Life Sci*. 63, 672–685.

Tickle C. and Towers M., 2017. Sonic Hedgehog Signaling in Limb Development // *Front Cell Dev Biol*. v. 5, p. 14. doi: 10.3389/fcell.2017.00014.

Timoshevskaya N., Eşkut K.I., Timoshevskiy V.A. et al., 2023. An improved germline genome assembly for the sea lamprey *Petromyzon marinus* illuminates the evolution of germline-specific chromosomes. *Cell Rep.* v. 42, № 3:112263. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112263

Timoshevskiy V.A., Timoshevskaya N.Y., and Smith J.J., 2019. Germline-specific repetitive elements in programmatically eliminated chromosomes of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Genes*. v. 10, 832. <https://doi.org/10.3390/genes10100832>.

Tomsa J.M. and Langeland J.A., 1999. *Otx* expression during lamprey embryogenesis provides insights into the evolution of the vertebrate head and jaw. *Dev Biol.* v. 1;207(1). p. 26-37

Toresson H, Martinez-Barbera JP, Bardsley A, Caubit X, Krauss S., 1998. Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Dev Genes Evol.* 208(8), 431-9. doi: 10.1007/s004270050200

Tsimbalov, I.A., Kucheryuavyi, A.V., and Pavlov, D.S., 2018. Results of Hybridization between Anadromous and Resident Forms of European River Lamprey *Lampetra fluviatilis*, *J. Ichthyol.*, vol. 58, no. 1, pp. 122–125. <https://doi.org/10.1134/S0032945218010137>

Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, et al., 2002. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res.* 17(5), 898-906. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.5.898

Tulenko F.J., McCauley D.W., Mackenzie E.L., et al., 2013. Body wall development in lamprey and a new perspective on the origin of vertebrate paired fins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 110(29), p.11899-904. doi: 10.1073/pnas.1304210110.

Tylzanowski P, Mebis L & Luyten FP. 2006. The Noggin null mouse phenotype is strain dependent and haploinsufficiency leads to skeletal defects. *Dev Dyn.* 235(6), 1599-607. doi: 10.1002/dvdy.20782

Tzung K.W., Lalonde R.L., Prummel K.D., et al., 2023. A median fin derived from the lateral plate mesoderm and the origin of paired fins. *Nature*. v. 618(7965), p. 543-549. doi: 10.1038/s41586-023-06100-w.

Uchida K., Murakami Y., Kuraku S. et al., 2003. Development of the adenohipophysis in the lamprey: evolution of epigenetic patterning programs in organogenesis // *Journal of experimental zoology*. v. 300, p. 32-47 Jaszai et al, 2003;

Ulmer B., Tingler M., Kurz S. et al., 2017. A novel role of the organizer gene *Gooseoid* as an inhibitor of Wnt/PCP-mediated convergent extension in *Xenopus* and mouse. *Sci Rep.* v. 7, p. 43010

Van de Peer Y., Maere S., Meyer A., 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat Rev Genet.* v. 10(10), p. 725–32.

Van de Peer Y., Mizrachi E., Marchal K., 2017. The evolutionary significance of polyploidy. *Nat Rev Genet.* v. 18, p. 411–424.

Vuolo F., Mentink R.A., Hajheidari M., et al., 2016. Coupled enhancer and coding sequence evolution of a homeobox gene shaped leaf diversity. *Genes Dev.* v. 30, p. 2370–5.

Wakahara T., Kusu N., Yamauchi H., et al., 2007. Fibin, a novel secreted lateral plate mesoderm signal, is essential for pectoral fin bud initiation in zebrafish. *Dev Biol.* v. 303(2), p. 527-35. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.041.

Warren S.M., Brunet L.J., Harland R.M. et al., 2003. The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. *Nature.* V. 422. P. 625-629.

Watanabe et al., 2005. Direct differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nature Neuroscience.* 8, 288-296.

Watson D. M. S., 1937. The Acanthodian fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* V. 228. № 549. P. 49–146.

Waxman, J. S., Keegan, B. R., Roberts R. W., Poss K., Yelon D., 2008. Hoxb5 acts downstream of retinoic acid signaling in the forelimb field to restrict heart field potential in zebrafish. *Developmental Cell,* v.15, p. 923–34.

Webb P. W., 1997. Designs for stability and maneuverability in aquatic vertebrates: What can we learn? Proceedings of the Tenth International Symposium on Unmanned Untethered Submersible Technology: Proceedings of the special session on bio- engineering research related to autonomous underwater vehicles, pp. 86-103. Lee, NH: Autonomous Undersea Systems Institute.

Webb P. W., 2004. Maneuverability-general issues. *IEEE J. Ocean Eng.* v. 29, p.547-555.

Webb, P. W., 2006. Stability and maneuverability. In *Fish Biomechanics* (ed. R. E. Shadwick and G. V. Lauder), pp. 281-332. Amsterdam: Academic Press.

Weeks DL, Melton DA., 1987. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell.* 51(5):861-7. doi: 10.1016/0092-8674(87)90109-7.

Welsch U., Schumacher U., 1984. Histochemical observations on carbohydrates in connective tissue structures and basement membranes of hemi- and cephalochordates. *Acta Zoologica,* 65, 105–112.

Wend P., Holland J.D., Ziebold U., and Birchmeier W., 2010. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Seminars in cell & developmental biology,* 21(8): 855-863.

Wertheim B., Beukeboom L.W., van de Zande L., 2013. Polyploidy in animals: effects of gene expression on sex determination, evolution and ecology, *Cytogenet Genome Res.* v.140, № 2-4, p.256-69. doi: 10.1159/000351998.

Westheide W., Rieger M. R., et al., 1988. *Invertebrate Zoology.* Vol. 1. Moscow: KMK. (In Russian.)

Wheeler GN, Brändli AW., 2009, Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *Xenopus*. *Dev Dyn.* 238(6):1287-308.

White, W.T. O’Neill, H.L. Naylor, G.J.P., 2022. Taxonomy and Diversity of Extant Elasmobranchs. In *Biology of Sharks and Their Relatives*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; pp. 31–57, ISBN 9781003262190.

Wilga C.D. and Lauder G.V., 1999. Locomotion in sturgeon: function of the pectoral fins. *J Exp Biol.* v. 202(Pt 18), p.2413-2432. doi: 10.1242/jeb.202.18.2413.

Wilson M. V. H., Hanke G. F., Märss T., 2007. Paired fins of jawless vertebrates and their homologies across the “agnathan”-gnathostome transition. *Major transitions in vertebrate evolution.* Indiana University Press. P. 122–149.

Wong LC, Huang CH, Chou WY, Hsu CJ, Tsai WC, Lee WT., 2023. The clinical and sleep manifestations in children with FOXG1 syndrome. *Autism Res.* 16(5), 953-966. doi: 10.1002/aur.2916

Wong LC, Singh S, Wang HP, Hsu CJ, Hu SC, Lee WT., 2019. FOXG1-Related Syndrome: From Clinical to Molecular Genetics and Pathogenic Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 20(17), 4176. doi: 10.3390/ijms20174176

Wullimann M.F., Mueller T., Distel M. et al., 2011. The long adventurous journey of rhombic lip cells in jawed vertebrates: a comparative developmental analysis. *Front. Neuroanat.* v. 5. p. 27

Xuan S, Baptista CA, Balas G, Tao W, Soares VC, Lai E., 1995. Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron.* 14, 1141–1152. doi: 10.1016/0896-6273(95)90262-7

Yamaguchi K., Uno Y., Kadota M., et al., 2023. Elasmobranch genome sequencing reveals evolutionary trends of vertebrate karyotypic organization. *Genome Res.* v. gr.276840.122. doi: 10.1101/gr.276840.122.

Yang XU, Si-Wei ZHU, Qing-Wei LI, 2016, Lamprey: a model for vertebrate evolutionary research. *Zool Res.* 37(5): 263–269. doi:10.13918/j.issn.2095-8137.2016.5.263

Yano T., Abe G., Yokoyama H., et al., 2012. Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development. *Development*, v. 139(16), p. 2916–2925. <https://doi.org/10.1242/dev.075572>

Yelon D., Ticho B., Halpern M.E., et al., 2000. The bHLH transcription factor hand2 plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development.* v. 127(12), p. 2573–82. doi: 10.1242/dev.127.12.2573

Yonei-Tamura S, Abe G, Tanaka Y, et al., 2008. Competent stripes for diverse positions of limbs/fins in gnathostome embryos. *Evol Dev.* v. 10(6), p. 737–45. doi: 10.1111/j.1525-142X.2008.00288.x.

York J.R. and McCauley D.W., 2020. Functional genetic analysis in a jawless vertebrate, the sea lamprey: insights into the developmental evolution of early vertebrates. *J Exp Biol.* v.223 (Pt Suppl 1), p. jeb206433.

York, J.R., Lee, E.M.J., McCauley, D.W., 2019. The Lamprey as a Model Vertebrate in Evolutionary Developmental Biology. In: Docker, M. (eds) Lampreys: Biology, Conservation and Control. Fish & Fisheries Series, vol 38. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1684-8_6

Yu, D., Ren, Y., Uesaka, M. et al., 2024. Hagfish genome elucidates vertebrate whole-genome duplication events and their evolutionary consequences. *Nat Ecol Evol.* <https://doi.org/10.1038/s41559-023-02299-z>

Zajíc J., 1995. Some consequences of recent investigations on the family Acanthodidae Huxley; 1861. *Geobios.* V. 28. P. 167–169.

Zaraisky A.G., Lukyanov S.A., Vasiliev O.L. et al., 1992. A novel homeobox gene expressed in the anterior neural plate of the *Xenopus* embryo. *Developmental Biology.* V. 152. P. 373–382

Zaraisky AG, Ecochard V, Kazanskaya OV, Lukyanov SA, Fesenko IV, Duprat AM. 1995. The homeobox-containing gene XANF-1 may control development of the Spemann organizer. *Development.* 121(11):3839–47. doi: 10.1242/dev.121.11.3839.

Zhang J., Wagh P., Guay D., et al., 2010. Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature*, v. 466(7303), p. 234–237. <https://doi.org/10.1038/nature09137>

Zhang, X. G., Hou, X. G., 2004. Evidence for a single median fin- fold and tail in the Lower Cambrian vertebrate, Haikouichthys ercaicunensis. *Journal of Evolutionary Biology*, 17, 1162–1166.

Zhao X.F., Suh C.S., Prat C.R. et al., 2009. Distinct expression of two foxg1 paralogues in zebrafish. *Gene Expr Patterns.* v. 9, № 5, pp. 266–72

Zhao, X., Sirbu, I. O., Mic, F. A., Molotkova, N., Molotkov, A., Kumar, S., Duester, G., 2009. Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Current Biology*, 19, 1050–1057.

Zheng, H., Li, S., Wu, Z., Zhang, Y., Hu, S., Yan, Y., Li, Y., 2011. Differential response of multiple zebrafish hepatic F-box protein genes to 17- α -ethinyloestradiol treatment. *Journal of Environmental Sciences*, 23, 664–670.

Zhu M. and Yu X., 2009. Stem sarcopterygians have primitive polybasal fin articulation // *Biology Letters*. V. 5. № 3. P. 372–375.

Zhu M., Yu X., Ahlberg P. E. et al., 2013. A Silurian placoderm with osteichthyan-like marginal jaw bones, *Nature*. V. 502. № 7470. P. 188–193.

Zhu M., Yu X., Janvier P., 1999. A primitive fossil fish sheds light on the origin of bony fishes. *Nature*. V. 397. № 6720. P. 607–610.

Zu Y., Zhang X., Ren J. et al., 2016. Biallelic editing of a lamprey genome using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. V. 6. P. 23496

Zuniga A., 2015. Next generation limb development and evolution: old questions, new perspectives. *Development*. v. 142(22), p. 3810-20. doi: 10.1242/dev.125757

Бочаров Ю. С., 1988. Эволюционная эмбриология позвоночных. М.: *Издательство Московского университета*. 232 с.

Дзержинский Ф. Я., 2005. Сравнительная анатомия позвоночных животных. М.: *Аспект-Пресс*. 320 с.

Ерошкин Ф. М., Байрамов А. В., Ермакова Г.В, Зарайский А. Г., Мартынова Н. Ю., 2018. Молекулярные механизмы пространственной и временной регуляции экспрессии гомеобоксного гена *Hanf1* в раннем развитии зачатка переднего мозга у шпорцевой лягушки, *Биоорганическая химия*, №3(44), с. 303-315

Малахов В. В., Ганцевич М. М., 2019. Трофосома у вестиментиферы *Ridgeia piscesae* Jones, 1985 (Annelida, Siboglinidae) развивается из клеток целомической выстилки // *Доклады Академии наук*. Т. 485. № 4. P. 519–522.

Медников Д. Н., 2022. Двухблочное устройство черепа саркоптеригий как возможная причина особого строения их плавников // *Эволюционная и функциональная морфология позвоночных. Материалы II Всероссийской конференции и школы для молодых ученых памяти Ф. Я. Дзержинского*. М.: КМК. С. 189–198.

Новицкая Л. И., 2006. Бесчелюстные (Agnatha) как древнейшие позвоночные: основные результаты исследований // *Эволюция биосферы и биоразнообразия. К 70-летию А. Ю Розанова*. М.: КМК. С. 193–207.

Новицкая Л. И., Каратайте-Талимаа В. Н., 1986. Замечания о кладистическом анализе в связи с гипотезой миоптеригий и проблемой происхождения гнатостом // *Морфология и эволюция животных*. М.: *Наука*. С. 102–125.

Ромер А. и Парсонс Т., 1992. Анатомия позвоночных. М.: *Мир*. Т. 1. 360 с.

Татаринов Л. П., 1987. Очерки по теории эволюции. М.: *Наука*. 249 с.

Шимкевич В. М., 1922. Курс сравнительной анатомии позвоночных животных. М.–П.: *Государственное изд-во*. 620 с.

Шмальгаузен И. И., 1964. Происхождение наземных позвоночных М.: *Наука*. 272 с.