

УДК 577.25

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСМИТТЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МОРСКОГО ЕЖА *Paracentrotus lividus*

© 2012 г. Д. А. Никишин, М. Н. Семенова, Ю. Б. Шмуклер

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: yurishmukler@yahoo.com

Поступила в редакцию 16.08.11 г.

Окончательный вариант получен 11.01.12 г.

Известно, что нейротрансмиттеры, в т.ч. серотонин и ацетилхолин, выполняют целый ряд донервных функций в раннем развитии морских ежей. Для выявления конкретных рецепторных компонентов, вовлеченных в эти процессы, был проведен анализ баз данных, и среди EST-клонов, полученных из ранних зародышей *Paracentrotus lividus*, выявлены нуклеотидные последовательности, гомологичные серотониновому рецептору 4 типа и α_6 - и α_{10} -субъединицам никотинового холинорецептора. Экспрессия этих транскриптов в раннем развитии продемонстрирована методом ОТ-ПЦР. Эти результаты являются первым молекулярно-биологическим свидетельством экспрессии рецепторов серотонина и ацетилхолина в раннем развитии морских ежей.

Ключевые слова: серотониновый рецептор, никотиновый холинорецептор, морские ежи, раннее развитие.

В истории изучения эмбриональных функций нейротрансмиттеров ацетилхолин (АХ) — первый, чье присутствие было обнаружено в гаметах и ранних зародышах (Numanó, 1953). Единственное объяснение этому нетривиальному для той поры факту, выдвинутое его открывателем, состояло в том, что этот нейротрансмиттер запасен впрок для реализации функций на более поздних стадиях развития. Эта неудовлетворительная по многим соображениям гипотеза, особенно если учесть обнаружение в ранних зародышах ацетилхолинэстеразы (Piomboni et al., 2001), долгое время оставалась единственной.

Систематические исследования эмбриональных функций нейротрансмиттеров, начатые Бузниковым и его сотрудниками, продемонстрировали участие этих веществ в ряде процессов раннего развития, в частности, в регуляции клеточного цикла, контроле состояния цитоскелета и межбластомерных взаимодействиях (Бузников, 1967; Vuznikov et al., 1996), существуют также данные об участии серотонина в установлении лево-правой асимметрии зародышей (Fukumoto et al., 2005). Специфический эмбриостатический эффект антагонистов АХ был показан на зародышах морских ежей (Бузников, 1967), а затем подтвержден на зародышах шпорцевой лягушки (Shmukler et al., 1986). В последнем случае механизм, вероятно, опосредован мускариновыми холинорецепторами (м-ХР). Позже были найдены и эффекты, связанные с никотиновыми холинорецепторами (н-ХР)

поверхностной мембраны зародышей морских ежей (Vuznikov et al., 1997).

Параллельно в лаборатории К. Фалуджи с помощью эмбриофизиологических и иммунохимических методов были обнаружены как м-, так и н-ХР в гаметах морского ежа (Falugi, Prestipino, 1989; Falugi, 1993, см. также Falugi et al., in press). Однако до сих пор нет молекулярно-биологических доказательств экспрессии холинорецепторов в раннем развитии морских ежей. Парадоксально, что также отсутствуют соответствующие данные относительно серотонергической системы — наиболее изученной у зародышей морских ежей, являвшихся основным объектом исследования донервных функций нейротрансмиттеров. Данная работа призвана заполнить этот пробел.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение гамет средиземноморского морского ежа *Paracentrotus lividus* (о. Кипр), искусственное оплодотворение и инкубация зародышей проводились стандартными методами (см. Vuznikov, Podmarev, 1990). Зародыши (100 мкл) фиксировали в 1 мл RNAlater (Ambion, США), тотальную РНК выделяли гуанидинтиоцианатным методом с помощью TRI Reagent (Sigma, США) и обрабатывали ДНКазой I (Fermentas, США) по протоколам фирм производителей. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре BioPhotometer (Eppendorf, Германия). 1 мкг РНК использовали для обратной

транскрипции, проведенной с помощью набора Синтез первой цепи кДНК (рендом) (Силекс, Россия) в 25 мкл реакционной смеси по протоколу производителя. ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini (BIO RAD, США) с использованием 1 мкл кДНК, 10 пмоль специфических олигонуклеотидов (Литех, Россия) и набора Амплификация ДНК с Colored Taq полимеразой (Силекс, Россия) по протоколу фирмы производителя. Параметры амплификации: денатурация 30 с при 95°C, отжиг 30 с при $T_{отж}$, элонгация 30 с при 72°C, 30 циклов. Анализ продуктов проводили с помощью агарозного гель-электрофореза и системы детекции Gel Doc XR (BIO-RAD, США). Для исключения ложноположительного результата проводили отрицательные контроли – ПЦР без матрицы и ПЦР без обратной транскрипции. В качестве положительного контроля использовали ген актина.

Специфические олигонуклеотиды подбирали в программе Lasergene PrimerSelect (DNASTar, США): актин (AM566072) прямой 5'-GAGAC-GAGGCCAGAGCAAGAGA-3', обратный 5'-CAGCGGTGGTGGTGAAGAGTAGC-3', длина продукта 450 пн, $T_{отж}$ 60°C; н-ХР- α_6 (AM219455) прямой 5'-ACTTCGCACCCGCCAACC-3', обратный 5'-GAGCCAAAAGCCTATCAGCATCAG-3', длина продукта 164 пн, $T_{отж}$ 56°C; н-ХР- α_{10} (AM596500) прямой 5'-ATTGATATGGAC-GAGAAAAACC-3', обратный 5'-CATACCGCT-GAAACCACTGT-3', длина продукта 189 пн, $T_{отж}$ 50°C; 5-НТ₄ (AM600436) прямой 5'-ATGCCGGAT-GAGACCAATACCA-3', обратный – 5'-GGCCAG-GCTGACCACGAA-3', длина продукта 219 пн, $T_{отж}$ 56°C.

Нуклеотидные последовательности из международных баз данных NCBI Nucleotide и EST анализировали средствами NCBI BLAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выявления рецепторов, экспрессирующихся в раннем развитии *P. lividus*, средствами BLAST (NCBI) была проанализирована база данных EST (*P. lividus*). С помощью алгоритма tblastx был проведен поиск в базе данных нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки, гомологичные человеческому никотиновому рецептору (α_7 -субъединица н-ХР). Из множества EST клонов, имеющих гомологию с этой последовательностью, были отобраны клоны, полученные из яиц или ранних зародышей (клоны, обозначенные EGG или CLEB). Сравнение этих последовательностей выявило, что они являются вариантами двух последовательностей: AM219455 и AM596500, которые, как показал анализ базы данных мРНК *Strongylocentrotus purpuratus* методом tblastx, кодируют белки, гомологичные белкам ХР_001193674 и ХР_001192769, сходным с α_6 - и α_{10} -субъединицами

н-ХР-рецептора (н-ХР- α_6 и н-ХР- α_{10}), соответственно (рис. 1А).

Выявление экспрессии рецепторов серотонина производили иным способом. С помощью алгоритма blastn в базе данных EST (*P. lividus*) был проведен поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных известным последовательностям рецепторов серотонина *S. purpuratus*. Был найден один EST клон, AM600436, имеющий гомологию с серотониновым рецептором и полученный из ранних зародышей. Кодированная им аминокислотная последовательность обладает значительной гомологией с гипотетическим белком LOC589531 *S. purpuratus* (рис. 1А). Анализ аминокислотной последовательности LOC589531 методом blastp показал, что он является семидоменным рецептором, сопряженным с G-белком (GPCR) и имеет наибольшую гомологию с рецепторами серотонина 4 типа (5-НТ₄) млекопитающих (рис. 1Б).

Таким образом, анализ баз данных выявил три последовательности, которые предположительно экспрессируются на ранних стадиях эмбрионального развития, и кодируют белки, гомологичные α_6 - и α_{10} -субъединицам н-ХР и 5-НТ₄-рецептору.

Для экспериментальной проверки этих результатов к отобраным последовательностям были подобраны специфические олигонуклеотиды и проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии этих последовательностей в раннем эмбриогенезе *P. lividus*. Библиотеки кДНК для проведения ПЦР были получены из неоплодотворенных яйцеклеток, а также на стадиях зиготы, двух бластомеров, мезенхимной бластулы и призмы. Результаты показаны на рис. 2. Продукты ПЦР ожидаемой величины были получены во всех пробах и для всех генов, в том числе и для контрольного гена актина. Таким образом, нами показано, что в раннем эмбриогенезе морского ежа *P. lividus* действительно экспрессируются мРНК, кодирующие белки, гомологичные α_6 - и α_{10} -субъединицам н-ХР и 5-НТ₄.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные об экспрессии в раннем эмбриогенезе морского ежа мРНК метаболитного рецептора 5-НТ₄, а также субъединиц н-ХР с некоторыми оговорками соответствуют ранее накопленным сведениям. Действительно, на ранних зародышах морских ежей показано, что антагонисты серотонина специфически блокируют деления дробления (Бузников, 1967), а их эмбриостатическое действие ослабляется добавлением дибутирил-цАМФ (Шмуклер и др., 1984). Экзогенный серотонин вызывает повышение внутриклеточного уровня цАМФ (Садокова, 1989). В клетках ранних зародышей морского ежа иммуноцитохимически обнаружена активность аденилатциклазы, локализованная после оплодо-

A

2	NMSRDFISIP	ANTFV	VVQHTG	AMDWLF	PAITTS	SACKMNI	Q	LPFD	TQQCVL	TFYP	PWTL	D	61						
127	DLDRDFISIP	EADTFV	IYQYTG	AMDWLF	PAITTS	SACKMNI	Q	YFPFD	TQQCVL	TFYP	PWTL	D	186						
62	ESKMRFFAK	NDEDAL	QKRYVR	NGIWSL	TNFAPAN	Q	SFKY	ICCPYP	PNDHIS	Y	TLTFT	TREYG	121						
187	ESKMRFFAK	NDEDAL	QARYVR	NGIWSM	TDFKPE	N	SFRY	ICCPYP	PNDHIR	Y	TLTFT	DREYG	246						
122	FFVSNIV	VPAVFL	TALMLI	GFWLHP	DSGEEKI	AFTV	TNLLAL	ILFQQL	VS	SDSMPP	IGEP	RS	181						
247	FFLSNIV	VPAIFL	TSLMLV	GFWLHP	DSGEEKV	AFTV	TNLLAL	ILFQQL	VS	SDSMPP	IGEP	RS	306						
182	ILVTCFF	MLVVLS	GCTVFF	SVLVLR		206	t-AM219455												
307	IIVTCFF	MLVVVSG	CSVFF	SVLVLR		331	XP_001193674												
108	GVYGTAD	EYRLND	KFSEYS	NIIRP	VEKSSD	AITV	LLGAAI	QQIID	MDEKN	QVITL	NLWM		167						
11	GVYGTQD	EYRLND	MFA	NYSNI	IRPVER	SADPID	VLLGAAI	QQIID	MDEKN	QVITL	NLWM		70						
168	RM-----	QWTD	SNL	VWTP	SEYGN	TTVLI	IPI	DTI	WRPDI	LLYS	NADSG	FSG	MMETS	SASI	221				
71	RMHFLFI	QWTD	SNL	KWNP	ADYGD	TTVLI	VPIE	TI	WRPDI	VLL	TNAD	SS	FNG	MMTS	SASI	130			
222	SHDGIVR	WNAPAM		234	t-AM596500														
131	SHDGIVR	WNAPAI		143	XP_001192769														
131	TKSAFIM	STSDMP	DETNT	TEEM	LTSARP	GEDFR	F	TDYH	QRLV	LAI	I	FILIS	VIG	SIGNS	310				
39	TETAFTM	S-----	GEVNT	TDET	GS	GG---	GKDFR	F	TDYN	QRLV	LAI	I	FIVIS	V	VGSIGNS	90			
311	IVIAAV	AMSRKL	R	TATN	VFVSL	AIADLL	TN	LFLP	WNV	V	ALL	SEDRS	Q	WPMEES	LCVMAA	490			
91	IVIAAV	AMSRKL	R	TATN	VFVSL	AIADLL	TN	LFLP	WNV	I	ALL	NEDRE	Q	WPMEES	LCVMAA	150			
491	IILYTC	VGSSV	YSLAA	I	GLNRF	V	LITQ	PIHV	YHHY	YSK	ARMG	I	MVMT	WAI	PLLS	LPL	670		
151	IILYTC	VGSSV	YSLAA	I	GLNRF	V	LITQ	PIHV	YHHY	YSK	VRM	G	I	MVMT	W	VIPL	FLS	LPL	210
671	IFGLG	ELGYD	AKYGTCT		721	t-AM600436													
211	IFGLG	QLGYD	AKYGTCT		227	XP_001201917													

B

70	QRLVIAIT	FVIVIS	VVGSIG	NSIVIA	AVAMSR	KLRT-AT	NV	FV	SLAI	ADLL	TN-L	FLP	WN	127																																								
18	EKVVL	LTF	AVVIL	MAILGN	LLVM	VAVCRD	RQLR	KIK	TNYE	FIV	SLA	FADLL	VSVL	VMP	EG	77																																						
128	VIALLN	EDRE	QWPME	ESLCV	MAAII	LYTC	VGSS	VYS	LAAI	GLNRF	V	LIT-Q	PIHV	YHHY	186																																							
78	AIELV---	QDI	WAYG	EMFCL	VRTSL	DVLL	TTAS	IFH	CCISL	DRY	YAI	CCOPL	-VYR	NKM	133																																							
187	SKVRM	GIMV	MFTW	VIPL	FLS	LPLIF	GLG	QLG-----	YDAKY	GTCT	HKTS	HP	LS	235																																								
134	TPLRIA	LM	GGC	WVLP	MFIF	SFLP	IMQ	GWNNI	GIVD	VIE	KRKF	SHNS	NSTW	CVFM	VNKP--	191																																						
236	DYYS	L	QAV	I	YPI	PLT	VIL	VSY	V	AIYV	H	RAHT	KTIT	EIQ	DTSE	SSS	THK	PKR	RESTA	295																																		
192	--Y	AT	CS	V	VAF	YIF	FL	MV	L	AYR	I	YV	T	A	K	E	H	A	Q	I	Q	M	L	R	A	G	A	T	S	E	S	R	P	Q	P	A	D	Q	H	S	T	H	249											
296	RRSISK	RQVE	ITK	NLFY	V	CA	FV	LC	ITP-Y	CAS	L	V	P	G	S	E	S	F	I	P---	W	A	G	A	I	L--	M	N	A	C	349																							
250	RM---	R	T	E	T	K	A	A	K	T	L	C	V	I	M	G	C	F	C	W	A	P	F	F	V	T	N	I	V	D	E	F	I	D	Y	T	V	P	E	Q	V	W	A	F	L	W	L	G	Y	I	N	S	G	306
350	INPVI	YATK	HPHE	E	K	K	V	M	F	A	I	R	C	R	L	S	A	I	P	E	P	S	S	D	C	L	R	A	Q	G	P	I	P	393	XP_001201917																			
307	LNPF	L	Y	A	F	L	N	K	S	F	R	A	F	L	I	L	C	D	D	E	R	Y	K	R	P	---	I	L	G	T	V	P	345	NP_032339																				

Рис. 1. Сравнение (BLAST) аминокислотных последовательностей исследуемых генов.

Черным выделены совпадающие аминокислоты, серым – аминокислоты со сходными физико-химическими свойствами. (А) Сравнение транслированных *in silico* последовательностей EST *P. lividus* (t-AM219455, t-AM596500 и t-AM600436) с последовательностями белков н-XP- α_6 (XP_001193674), н-XP- α_{10} (XP_001192769) и LOC589531 (XP_001201917) *S. purpuratus*. (Б) Сравнение аминокислотных последовательностей белка LOC589531 *S. purpuratus* (XP_001201917) с 5-HT₄ мыши (NP_032339).

творения в эндоплазматическом ретикулуме, а во время первого деления дробления — в микроворсинках контактной области, при этом наиболее выраженная реакция наблюдается в местах наибольшего сближения бластомеров (Ростомян и др., 1985). Обнаружение экспрессии мРНК 5-НТ₄ делает этот рецептор весьма вероятным кандидатом на ключевую роль в серотонергических процессах раннего эмбриогенеза морского ежа, поскольку этот тип рецептора способен активировать аденилатциклазу (Barnes, Sharp, 1999).

Экспрессия мРНК α_6 - и α_{10} -субъединиц на всех исследованных в данной работе стадиях развития указывает на возможность присутствия н-ХР у ранних зародышей морского ежа *P. lividus*, что соответствует иммуногистохимическим данным (Falugi, 1993). Именно эти рецепторы, вероятно, обеспечивают эмбриостатический эффект антагонистов н-ХР на “форболовой модели” — блокаду раннего развития морских ежей, происходящую предположительно через рецепторы поверхностной мембраны (Buznikov et al., 1997).

В то же время в опытах с использованием пэтч-кламп (в конфигурации whole-cell) на дробящихся зародышах *P. lividus* никотин и агонисты н-ХР эпибатидин и метилкарбамилхолин лишь в некоторых случаях вызывали небольшие входящие токи, тогда как агонисты 5-НТ₃-рецептора (5НТQ, SR 57277A, квивазин, метилквивазин) стабильно индуцировали входящие токи, наиболее выраженные в период формирования борозд первого и второго делений дробления, и при микроапликации, и при добавлении лиганда в экспериментальную камеру (Shmukler et al., 2008). Причина такой ситуации может заключаться в своеобразии рецепторов зародышей морских ежей, которые, вероятно, существенно отличаются по чувствительности к лигандам, разработанным и протестированным на млекопитающих. Кроме того, лиганды 5-НТ₃-рецепторов обладают относительно высокой эффективностью в отношении 5-НТ₄-рецепторов (Glenpon et al., 2004). Это удивительно, поскольку 5-НТ₄-рецептор является метаботропным, тогда как 5-НТ₃-рецептор — каналный ионотропный и по структуре сходен с н-ХР. Сходство 5-НТ₃- и н-ХР весьма значительно, в частности, аминокислотная последовательность 5-НТ_{3A}-рецептора крысы (P35563) совпадает с последовательностью α_{10} -субъединицы н-ХР крысы (NP_072161) на 89%, а с последовательностью предшественника α_6 -субъединицы (NP_476532) на 96%.

В заключение отметим, что решение вопроса о природе эмбриональных нейротрансмиттерных рецепторов у ранних зародышей морских ежей, наличие которых подтверждено теперь не только фармакологическими и электрофизиологическими, но и молекулярно-биологическими методами, требует дальнейших исследований. В частности,

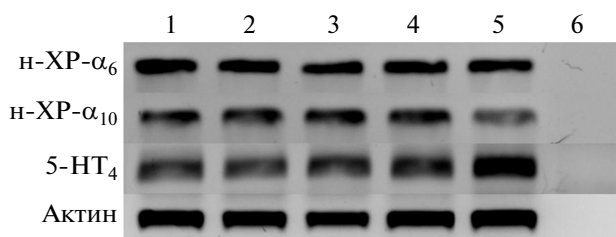


Рис. 2. ОТ-ПЦР анализ экспрессии трансмиттерных рецепторов в раннем развитии *P. lividus*.

Стадии развития: 1 — неоплодотворенная яйцеклетка; 2 — зигота; 3 — два бластомера; 4 — мезенхимная бластула; 5 — призма, 6 — негативный контроль (ПЦР без матрицы).

необходимо получение полной последовательности рецепторов, а также изучение экспрессии соответствующих белков.

Благодарности. Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-00144 и № 11-04-01469. Авторы благодарят сотрудников лаборатории биофизики развития кафедры эмбриологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, а также лаборатории молекулярно-генетических основ онтогенеза ИБР РАН за большую методическую помощь в проведении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М.: Наука, 1967. 265 с.
- Ростомян М.А., Абрамян К.С., Бузников Г.А., Гусарева Э.В. Электронно-цитохимическое выявление аденилатциклазы у ранних эмбрионов морского ежа // Цитология. 1985. Т. 27. С. 877–881.
- Садокова И.Е. Участие серотонина в регуляции уровня циклических нуклеотидов у ранних зародышей морских ежей // Онтогенез. 1989. Т. 20. № 1. С. 63–69.
- Шмуклер Ю.Б., Бузников Г.А., Григорьев Н.Г., Мальченко Л.А. Влияние циклических нуклеотидов на чувствительность ранних зародышей морских ежей к цитотоксическим нейрофармакологическим препаратам // Бюлл. эксп. биол. мед. 1984. Т. 97. № 3. С. 354–355.
- Barnes N.M., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function // Neuropharmacology. 1999. V. 38. P. 1083–1152.
- Buznikov G.A., Shmukler Yu.B., Lauder J.M. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? // Cell. Molec. Neurobiol. 1996. V. 16. № 5. P. 532–559.
- Buznikov G.A., Koikov L.N., Shmukler Yu.B., Whitaker M.J. Nicotine antagonists (piperidines and quinuclidines) reduce the susceptibility of early sea urchin embryos to agents evoking calcium shock // Gen. Pharmacol. 1997. V. 29. № 1. P. 49–53.
- Buznikov G.A., Podmarev V.G. Sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Animal

- species for developmental studies. V. 1. Invertebrates. N.-Y.—London: Consultants Bureau, 1990. P. 253–285.
- Falugi C. Localization and possible role of molecules associated with the cholinergic system during “non-nerve” developmental events // *Eur. J. Histochem.* 1993. V. 37. № 4. P. 287–294.
- Falugi C., Prestipino G. Localization of putative nicotinic cholinergic receptors in the early development of *Paracentrotus lividus* // *Cell Mol. Biol.* 1989. V. 35. № 2. P. 147–161.
- Falugi C., Diaspro A., Ramoino P., Russo P., Aluigi M.G. The sea urchin, *Paracentrotus lividus*, as a model to investigate the onset of molecules immunologically related to the α -7 subunit of nicotinic receptors during embryonic and larval development // *Current Drug Targets*, in press.
- Fukumoto T., Kema I.P., Levin M. Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 9. P. 794–803.
- Glennon R.A., Dukat M., Westkaemper R.B. Serotonin receptor subtypes and ligands // *Psychopharmacology*: the Fourth Generation of Progress. Lippincott Williams & Wilkins, 1995.
- Numanoi H. Studies on the fertilization substances. IV. Presence of acetylcholine-like substance and cholinesterase in echinoderm-germ cells during fertilization // *Scient. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo.* 1953. V. 3. № 2. P. 193–200.
- Piomboni P., Baccetti B., Moretti E., Gambera L., Angelini C., Falugi C. Localization of molecules related to cholinergic signaling in eggs and zygotes of the sea urchin, *Paracentrotus lividus* // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2001. V. 33. № 1–2. P. 187–193.
- Shmukler Yu.B., Grigoriev N.G., Buznikov G.A., Turpaev T.M. Regulation of cleavage divisions: participation of “pre-nerve” neurotransmitters coupled with second messengers // *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. V. 83. C. № 2. P. 423–427.
- Shmukler Yu.B., Silvestre F., Tosti E. 5-HT-receptive structures are localized in the interblastomere cleft of *Paracentrotus lividus* early embryos // *Zygote.* 2008. V. 16. № 1. P. 79–86.

Expression of Transmitter Receptor Genes in Early Development of Sea Urchin *Paracentrotus lividus*

D. A. Nikishin, M. N. Semenova, and Yu. B. Shmukler

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilov 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: yurishmukler@yahoo.com

Abstract—Neurotransmitters (including serotonin and acetylcholine) perform a number of pre-nerve functions in early sea urchin development. To detect the particular receptor components involved in these processes, we carried out a database search and nucleotide sequences homologous to serotonin receptor type 4, and the α_6 - and α_{10} -subunits of nicotinic acetylcholine receptor were found among EST-clones from early *Paracentrotus lividus* embryos. Expression of these transcripts during early development was demonstrated using RT-PCR. These results are the first molecular biology evidence of serotonin and acetylcholine receptor expression in sea urchin early embryogenesis.

Keywords: serotonin receptor, nicotinic cholinergic receptor, sea urchins, early development.