

## ВЛИЯНИЕ РЕТИНОИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ *Hox*-ГЕНА *Post2* ПОЛИХЕТ СЕМЕЙСТВА NEREIDIDAE

© 2017 г. Н. И. Бакаленко\*, А. В. Позняк, Е. Л. Новикова, М. А. Кулакова

*Санкт-Петербургский государственный университет  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9*

\*E-mail: bakalenko@gmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2016 г.

Ретиноевая кислота (РК) играет существенную роль в развитии и регенерации позвоночных животных. Сигналинг ретиноевой кислоты (РК сигналинг) напрямую регулирует экспрессию генов *Hox*-кластера, и таким образом, участвует в паттернировании передне-задней оси зародыша позвоночных. Взаимосвязь между ретиновым сигналингом и *Hox*-генами до сих пор была показана только для представителей Chordata. В представленной работе мы инкубировали ювенильных червей и регенератов двух видов полихет семейства Nereididae – *Alitta virens* и *Platynereis dumerilii* – с предшественником ретиноевой кислоты *транс*-ретиальдегидом. Мы показали, что и в норме, и при регенерации, передняя граница экспрессии *Hox*-гена *Post2* под влиянием ретиальдегида смещается к переднему концу у обеих полихет. Наши данные указывают на взаимосвязь сигналинга ретиноевой кислоты с *Hox*-генами у представителей первичноротых животных.

*Ключевые слова:* *Hox*-гены, сигналинг ретиноевой кислоты, полихеты

**DOI:** 10.7868/S0475145017030028

### ВВЕДЕНИЕ

Ретиноевая кислота (РК) – первый морфоген, обнаруженный у позвоночных животных. Функциональный антагонизм градиентов ретиноевой кислоты и сигналингов Fgf и Wnt лежит в основе сегментации пресомитной мезодермы и заднего мозга позвоночных, а также определяет место закладки передней конечности (цит. по Rhinn, Dolle, 2012). Благодаря способности стимулировать дифференцировку и регулировать апоптоз, РК участвует в развитии многих органов и тканей позвоночных (Cunningham, Duester, 2015). В частности, ретиноевая кислота связана с развитием глаза, сердца, легких, дифференцировкой базальных ганглиев переднего мозга, гемопоэзом, индукцией мейоза в сперматоцитах (Molotkova et al., 2007; Kumar, Duester, 2010; Vrade et al., 2011; Kumar et al., 2013). Кроме того, показано, что ретиноевая кислота влияет на регенерацию, в частности, на восстановление конечности и хвоста *Urodelia* (Maden, Hind, 2003), а также регенерацию внутренних органов (печени, почек, ЦНС) (Gudas, 2012).

Эти и многие другие функции ретиноевой кислоты осуществляются за счет регуляции экспрессии различных генов-мишеней. РК связывается с рецептором ретиноевой кислоты RAR и изменяет его конформацию, что делает возможным гетеродимеризацию с другим рецептором RXR. RAR и

RXR относятся к суперсемейству ядерных рецепторов. В ядре гетеродимер RAR/RXR работает как транскрипционный фактор – активирует экспрессию генов, имеющих в регуляторных зонах мотив RARE (Retinoic Acid Response Element). Известно множество генов-мишеней ретиноевого сигналинга (Cunningham, Duester, 2015). Среди них особенно интересны *Hox*-гены – кластерные гены, отвечающие за регионализацию передне-задней оси зародыша. Известно, что отдельные *Hox*-гены млекопитающих могут регулироваться ретиноевой кислотой напрямую благодаря наличию мотивов RARE в их промоторах (Santini et al., 2003) или опосредованно, через RAR-активацию вышестоящих факторов (Houle et al., 2000). Ретиноевая кислота регулирует экспрессию *Hox*-генов в ромбомерах и спинном мозге позвоночных животных, и, таким образом, влияет на осевой паттернинг ЦНС (Chang et al., 2016).

Сигнальный путь ретиноевой кислоты долгое время считался эволюционным приобретением позвоночных, однако в последние годы появилось множество данных о роли РК в развитии беспозвоночных животных из ветви вторичноротых (Deuterostomia). Ключевые факторы метаболизма РК и ретиноевого сигналинга были обнаружены у представителей различных групп вторичноротых животных, например, у ланцетника *Branchiostoma floridae*, асцидии *Ciona intestinalis*, морского ежа

*Strongylocentrotus purpuratus* и кишечноротового *Saccoglossus kowalevskii* (Canestro et al., 2006; Nagatomo et al., 2003; Albalat, 2009). У представителя головохордовых, ланцетника *Branchiostoma floridae* РК-сигналинг, по всей видимости, влияет на спецификацию передне-задней оси ЦНС через регуляцию *Hox*-генов, как и у позвоночных животных (Schubert et al., 2006). У оболочников связь ретиноевой кислоты с осевым паттернированием нервной системы не так очевидна, однако, экзогенная ретиноевая кислота нарушает развитие нервной трубки у асцидии *Ciona intestinalis* (Nagatomo et al., 2003) и приводит к смещению вперед передней границы экспрессии *Hox1* у другой асцидии – *Halocynthia roretzi* (Katsuyama et al., 1995). Таким образом, регуляторный каскад РК → *Hox*-гены → осевое паттернирование ЦНС возможен и у оболочников. Экзогенная ретиноевая кислота не влияет на спецификацию передне-задней оси морского ежа, но на определенных стадиях вызывает задержку в развитии личинки (Sciarrino, Matranga, 1995).

Поиск компонентов РК сигналинга и исследования его функции проводились также для некоторых групп первичноротых животных (Protostomia). Оказалось, что у линяющих первичноротых (Ecdysozoa) отсутствуют некоторые важные компоненты РК сигналинга (Albalat, 2009). Например, ни у одного из исследованных представителей этой эволюционной ветви не были обнаружены ортологи рецептора ретиноевой кислоты RAR и гена *cup26*, отвечающего за катаболизм РК. Тем не менее, у саранчи *Locusta migratoria* обнаружены эндогенные ретиноиды и показан физиологический ответ на воздействие экзогенной ретиноевой кислоты. Отмечено, что РК влияет на нейральную дифференцировку, рост и регенерацию аксонов, а также ингибирует метаморфоз (Bui-Gobbels et al., 2015).

В отличие от Ecdysozoa, среди представителей второй ветви первичноротых Lophotrochozoa обнаружены животные, имеющие все ключевые факторы метаболизма и сигналинга ретиноевой кислоты, характерные для позвоночных, например, моллюски *Lottia gigantea* и *Lymnea stagnalis*, а также аннелида *Capitella capitata* (Albalat, 2009). Показано, что у моллюска *Lymnea stagnalis*, как и у насекомых, ретиноевая кислота связана с дифференцировкой нейронов, ростом и регенерацией аксонов (Farrar et al., 2009).

Таким образом, современные данные согласуются с гипотезой, что сигналинг ретиноевой кислоты уже был у общего предка всех билатеральных животных, и его роль была связана с дифференцировкой нервной системы. Функция спецификации передне-задней оси за счет регуляции генов *Hox*-кластера предположительно возникла в ранней эволюции Chordata (Marletaz, 2006; Camp-Paysa et al., 2008). Однако наши представления о

связи между РК-сигналингом и *Hox*-генами ограничены исследованиями исключительно вторичноротых животных. На сегодняшний момент не опубликовано никаких данных о влиянии ретиноевой кислоты на экспрессию *Hox*-генов у Protostomia. Чтобы ответить на вопрос об эволюционном возрасте регуляторных взаимоотношений РК и *Hox*-генов, необходимо исследовать, в первую очередь, те группы первичноротых животных, у представителей которых обнаружен полный набор компонентов РК сигналинга и описана экспрессия *Hox*-генов. Таким таксоном является, например, класс Polychaeta (Kulakova et al., 2007; Frobisius et al., 2008; Albalat, 2009; Bakalenko et al., 2013).

Наша работа выполнена на двух представителях этого класса – полихетах семейства Nereididae *Platynereis dumerilii* и *Alitta virens*. На растущих и регенерирующих червях мы проверили, изменяется ли экспрессия *Hox*-гена *Post2* в ответ на воздействие *транс*-ретиноальдегида (all-trans retinal; atRal) – предшественника ретиноевой кислоты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Животные*

Черви *Platynereis dumerilii* содержатся в культуре в лаборатории экспериментальной эмбриологии (кафедра эмбриологии СПбГУ). Для инкубации с *транс*-ретиноальдегидом мы отбирали ювенильных червей, имеющих от 14 до 24 сегментов. Эксперименты с регенерацией проводились на червях размером 20–21 сегмент.

Эмбриональная культура *Alitta virens* была поставлена на МБС “Картеш” (Белое море, губа Чупа). На стадии нектохеты личинки транспортировались в лабораторию экспериментальной эмбриологии, и там дорастивались до постларвальной стадии развития. В данной работе мы использовали червей, имеющих 18–22 сегмента.

### *Экспериментальные процедуры*

**Инкубация ювенильных *P. dumerilii* с *транс*-ретиноальдегидом.** Интактные черви *P. dumerilii* были помещены в морскую воду, содержащую 0.1% ДМСО и 40 мкМ *транс*-ретиноальдегид (15 особей). Инкубация проводилась в течение 48 ч. Контрольная группа (15 животных) инкубировалась в морской воде с 0.1% ДМСО также 48 ч. Ретиноальдегид не стабилен при свете, поэтому все инкубации проводились в темноте. Затем животные были зафиксированы 4% параформальдегидом.

**Инкубация регенерирующих нерид с *транс*-ретиноальдегидом.** Перед операцией ювенильных червей анестезировали, помещая их на 5 мин в морскую воду с гвоздичным маслом (Sigma). Затем под бинокулярной лупой животных разреза-

ли пополам (по числу сегментов). Передние половины *P. dumerilii* сразу после операции помещали в 40 мкМ раствор *транс*-ретиальдегида с 0.1% ДМСО (16 особей). Контрольную группу (14 особей) инкубировали в 0.1% ДМСО.

Для передних половин *A. virens* использовали *транс*-ретиальдегид в концентрации 60 мкМ. Использование более высокой, по сравнению с *P. dumerilii*, концентрации связано с большим размером и худшей проницаемостью покровов *A. virens*. В контрольной группе *A. virens* было 18 животных, в эксперименте — 17.

Регенерирующих животных обоих видов фиксировали через 24 ч, 3 и 7 сут после операции 4% параформальдегидом.

**Гибридизация *in situ*.** Экспрессию *Post2* выявляли с помощью метода гибридизации *in situ* на целых животных по протоколу, описаному в наших предыдущих работах (Bakalenko et al., 2013; Novikova et al., 2013). Результаты гибридизации анализировали и фотографировали на микроскопе DMRXA (Leica) с оптикой Номарского в центре “Chromas”.

**Статистическая обработка результатов.** Для каждого животного визуально определяли количество сегментов, в которых обнаруживается экспрессия изучаемого гена. Затем считали процент сегментов, экспрессирующих ген интереса, от общего количества сегментов и рассчитывали средние значения (%) для каждой из групп животных. Достоверность отличия средних в контрольных и опытных группах оценивали с помощью критерия Манна—Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Влияние транс-ретиальдегида на постларвальный рост и регенерацию нерид, выявленное на светооптическом уровне*

После инкубации интактных ювенильных червей в 40 мкМ растворе ретиналя в течение 48 часов не было обнаружено никаких морфологических изменений относительно контроля.

У регенератов, инкубированных в ретиальдегиде, на начальных этапах регенерации также не было отмечено морфологических отличий от контрольных животных. На 3 день после операции мы заметили некоторую задержку в формировании пигидия у червей, инкубированных с ретиальдегидом, по сравнению с контролем. Через 7 дней после операции различия становятся практически незаметными.

### *Влияние транс-ретиальдегида на экспрессию Pdu-Post2 у ювенильных P. dumerilii*

У ювенильных *P. dumerilii* транскрипты *Pdu-Post2* обнаруживаются в эктодерме и ганглиях ЦНС задних сегментов, пигидии и пигидиальных циррах. Рисунок экспрессии *Pdu-Post2* имеет вид

задне-переднего градиента. Наиболее интенсивно окрашиваются пигидий и самые молодые сегменты, по мере удаления сегмента от зоны роста экспрессия в нем затухает (рис. 1а).

У животных, инкубированных с ретиальдегидом, рисунок экспрессии *Pdu-Post2* принципиально не меняется, однако градиент экспрессии имеет больший размах, передняя граница области экспрессии сдвинута вперед по сравнению с контрольной группой (рис. 1а, 1б). Так, у червей из контрольной группы *Pdu-Post2* в среднем экспрессируется в  $36.7 \pm 0.9\%$  сегментов, в то время как у животных, инкубированных с *транс*-ретиальдегидом, этот ген экспрессируют  $44 \pm 1.1\%$  сегментов (рис. 2а).

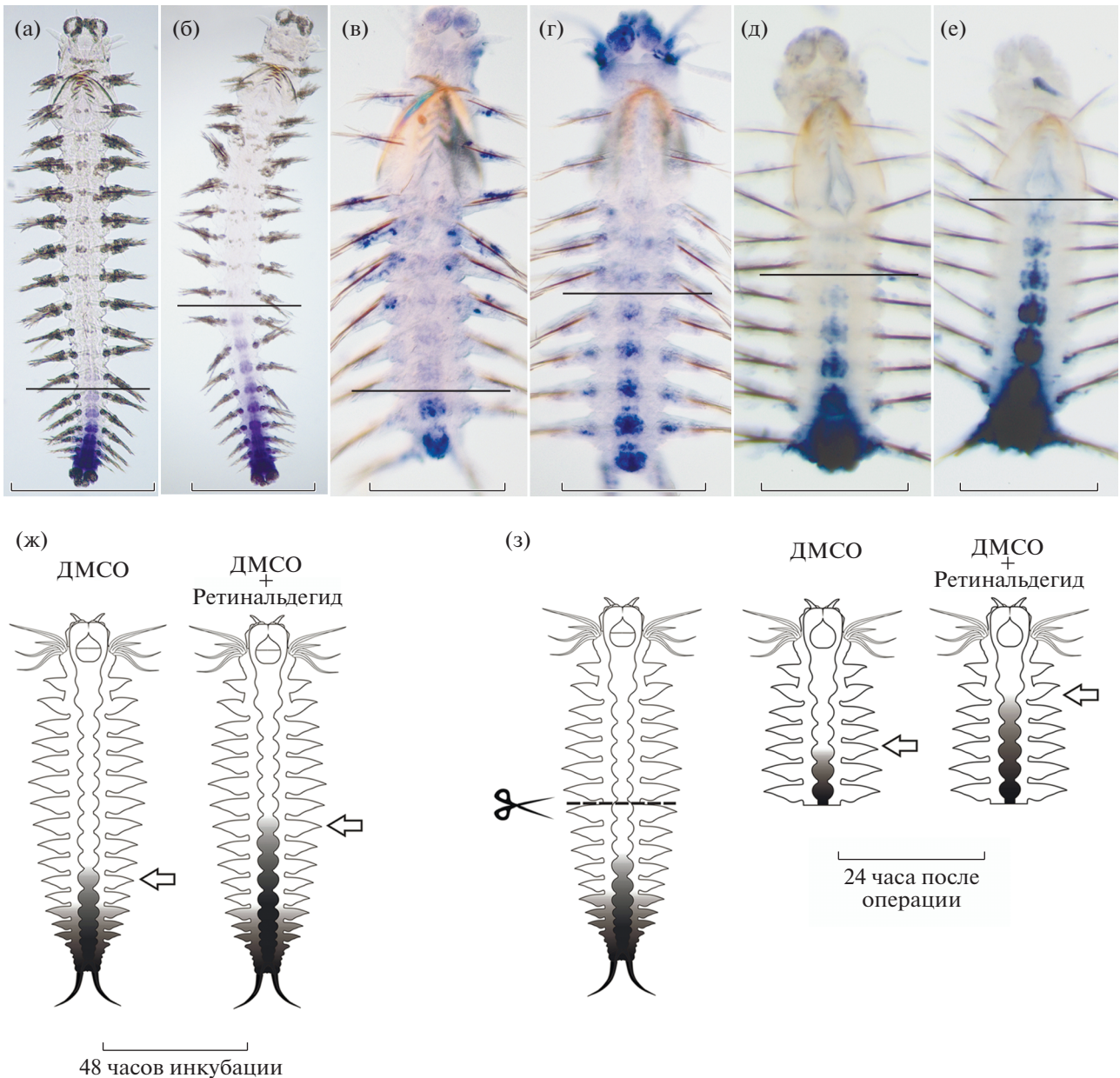
### *Влияние транс-ретиальдегида на экспрессию Post2 при регенерации P. dumerilii и A. virens*

Экспрессия *Nvi-Post2* в ходе задней регенерации подробно описана нами ранее (Novikova et al., 2013). *Pdu-Post2* на всех этапах регенерации демонстрирует такую же картину экспрессии, что и *Nvi-Post2*. У обеих нерид паттерн экспрессии *Post2* быстро изменяется: его транскрипты не обнаруживаются на уровне разреза до операции, однако спустя 4 ч экспрессия *Post2* возникает в ганглиях ближайшего к разрезу сегмента. К 24 ч экспрессия распространяется вперед, формируя градиент (рис. 1в). На 3 суток транскрипты *Post2* обнаруживаются во вновь сформированном пигидии и зачатках цирр, в нервной системе экспрессия затухает. Через 7 дней мы наблюдаем интенсивную экспрессию *Post2* в молодых сегментах, пигидии и пигидиальных циррах.

У регенератов *P. dumerilii*, инкубированных с 40 мкМ ретиальдегидом, на ранних этапах регенерации инкубация с *транс*-ретиальдегидом приводит к смещению передней границы экспрессии *Pdu-Post2* к переднему концу. Этот эффект наиболее выражен через 24 ч после операции (рис. 1в, 1г). Количество сегментов, в которых обнаруживаются транскрипты *Pdu-Post2*, в контрольной группе составило  $25 \pm 2.7\%$ , в экспериментальной группе —  $41.3 \pm 2\%$  (рис. 2б).

Сходные результаты мы получили для регенератов *A. virens*. Спустя 24 ч после операции передняя граница зоны экспрессии *Nvi-Post2* заметно сдвинута рострально по сравнению с контрольной группой (рис. 1д, 1е). У контрольных червей экспрессия *Nvi-Post2* обнаруживается в среднем в  $49.9 \pm 1\%$  сегментов, в то время как у червей, инкубированных с ретиальдегидом *Nvi-Post2* экспрессируется в  $65.1 \pm 2.2\%$  сегментов (рис. 2в).

На поздних стадиях регенерации мы не обнаружили явных отличий червей, инкубированных с ретиальдегидом, от контрольных. Через 3 дня после операции *Pdu-* и *Nvi-Post2* активно транскри-



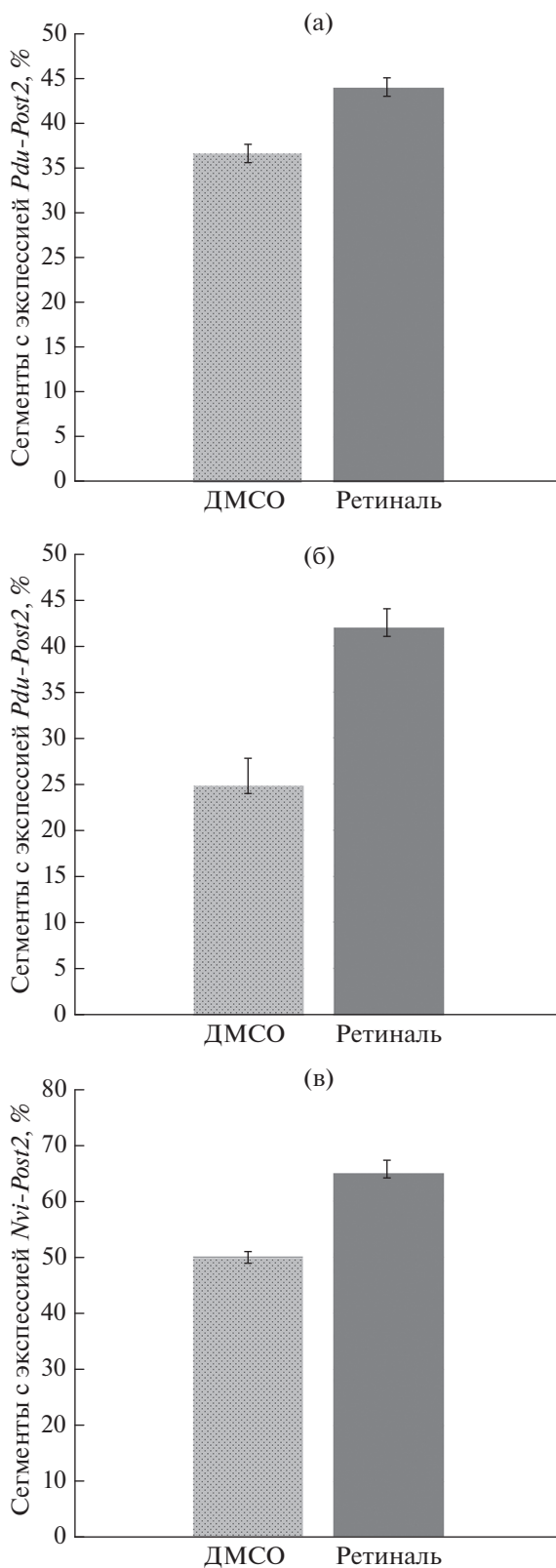
**Рис. 1.** (а, б) Экспрессия *Pdu-Post2* у ювенильных червей *P. dumerilii*. (а) Контроль (инкубация 48 ч в морской воде с 0.1% ДМСО). (б) Эксперимент (инкубация 48 ч с 0.1% ДМСО и 40 мкМ *транс*-ретиноальдегидом). (в, г) Экспрессия *Pdu-Post2* у регенератов *P. dumerilii* (24 ч после операции). (в) Контроль (инкубация с 0.1% ДМСО). (г) Эксперимент (инкубация с 0.1% ДМСО и 40 мкМ *транс*-ретиноальдегидом). (д, е) Экспрессия *Nvi-Post2* у регенератов *A. virens* (24 ч после операции). (д) Контроль (инкубация с 0.1% ДМСО). (е) Опыт (инкубация с 0.1% ДМСО и 40 мкМ *транс*-ретиноальдегидом). (а–е) Все животные сфотографированы с вентральной стороны, передний конец сверху. Черной линией показана передняя граница области экспрессии. (ж, з) Схема. Смещение к головному концу передней границы экспрессии *Post2* у нереид после инкубации с *транс*-ретиноальдегидом. Стрелками показана передняя граница области экспрессии *Post2*. (ж) Ювенильные черви. (з) Регенераты. Пунктирной линией показано место разреза.

бируется во вновь сформированном пигидии и постепенно затухает в ганглиях старого тела у регенератов из обеих групп. Через 7 дней после операции черви из контрольной и опытной групп также имеют сходные паттерны экспрессии во вновь сформированном пигидии и молодых сегментах. Экспрессия в ганглиях старого тела полностью пропадает.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### *Сигналинг ретиновой кислоты в ходе роста и регенерации: морфологические проявления воздействия*

В данной работе мы наблюдали влияние *транс*-ретиноальдегида на рост и регенерацию многощетинковых червей, *P. dumerilii* и *A. virens*.



**Рис. 2.** Диаграммы среднего числа сегментов, в которых обнаруживается экспрессия *Post2* (% от общего числа сегментов тела). На всех диаграммах ряд данных слева (светло-серый) представляет контроль – животных, инкубированных с 0.1% ДМСО, ряд справа (темно-серый) показывает экспериментальных животных, инкубированных с *транс-ретиналем*. Планка погрешностей показывает стандартную ошибку среднего арифметического. *n* – объем выборки. (а) Экспрессия *Pdu-Post2* у ювенильных червей *P. dumerilii*. (б) Экспрессия *Pdu-Post2* у регенератов *P. dumerilii* (24 часа после операции). (в) Экспрессия *Nvi-Post2* у регенератов *A. virens* (24 ч после операции).

Инкубация с *транс*-ретиноальдегидом не оказывает заметного воздействия на постларвальный рост и процесс регенерации нервид и морфологию новых задних структур. Мы отмечаем только небольшую задержку в формировании пигидия.

В научной литературе описаны примеры более выраженного, чем в случае *P. dumerilii* и *A. virens*, морфологического эффекта от воздействия ретиноевой кислоты в ходе восстановительных процессов у животных. Например, для двух представителей группы Lophotrochozoa, планарий *Girardia tigrina* и *Schmidtea mediterranea* было показано, что РК ингибирует регенерацию головного конца, блокируя пролиферацию необластов, но не оказывает эффекта при восстановлении заднего конца тела (Ermakova et al., 2009).

У амфибий, на примере которых было впервые продемонстрировано влияние ретиноевой кислоты на регенерацию, воздействие РК приводило к позиционным нарушениям: в процессе формирования новой конечности происходила проксимализация регенерирующих структур, и в результате от места разреза на уровне зигоподия отрастала целая конечность (Niazi, Saxena, 1978; Maden, 1982).

Вероятно, для более детального анализа воздействия ретиноальдегида на рост и регенерацию *P. dumerilii* и *A. virens* необходимо изучение гистологических срезов и проведение тестов на клеточную пролиферацию и апоптоз.

#### *Изменение границ экспрессии Hox-генов под действием ретиноевой кислоты*

Мы показали, что в центральной нервной системе у *Alitta virens* и *Platynereis dumerilii* передняя граница экспрессии заднего *Hox*-гена *Post2* сдвигается вперед при воздействии *транс*-ретиноальдегида в ходе нормального роста и во время регенерации (рис. 1ж, 1з).

Сигналинг ретиноевой кислоты играет важную роль в определении границ экспрессии *Hox*-генов в заднем мозге и спинном мозге зародышей позвоночных (Linville et al., 2004; Hernandez et al., 2007; Rhinn, Dolle, 2012). *Hox*-гены паралогичных групп 1–4 коллинеарно экспрессируются в ромбомерах заднего мозга. Они важны для установления и поддержания позиционной специфичности ромбомеров (Rijli et al., 1998). Нокаут по ключевым компонентам РК-сигналинга, таким как ретиноальдегид дегидрогеназа или рецептор ретиноевой кислоты RAR приводил к смещению границ экспрессии *Hox*-генов назад (Niederreither et al., 2000; Sirbu et al., 2005). Например, у зародыша мыши с мутантным геном ретиноальдегид дегидрогеназы 2 (*Raldh2*) заметно меняются картины экспрессии генов *Hoxb1*, *Hox3a*, *Hox3b*, *Hox4b*, и *Hox4d*. У эмбрионов дикого типа зоны экспрессии

этих генов имеют четкие передние границы, совпадающие с границами ромбомеров, а у *Raldh2* –/– мутантов они экспрессируются диффузно, и области экспрессии смещаются ближе к заднему концу (Niederreither et al., 2000). На морфологическом уровне у мутантов *Raldh2* –/– наблюдается “антериоризация” центральной нервной системы, распространение назад структур и типов нейронов, в норме находящихся ближе к переднему концу. Воздействие экзогенной ретиноевой кислоты на зародыши позвоночных и ланцетника, напротив, приводит к сдвигу вперед границ экспрессии *Hox*-генов и “постериоризации” нервной системы, то есть распространению вперед задних структур (Bel-Vialar et al., 2002; Oosterveen et al., 2003; Maves, Kimmel, 2005). Например, ростральный сдвиг границ экспрессии *Hox*-генов происходил при обработке ретиноевой кислотой бластулы ланцетника *Branchiostoma floridae* (Schubert et al., 2006). В норме *Hox*-гены у личинки ланцетника имеют коллинеарные передние границы экспрессии в нервной трубке. Инкубация с ретиноевой кислотой зародыша *B. floridae* на стадии поздней бластулы приводила к смещению передних границ экспрессии пяти исследуемых генов *AmphiHox1*, *AmphiHox2*, *AmphiHox3*, *AmphiHox4* и *AmphiHox6* к переднему концу. Сходный эффект экзогенная ретиноевая кислота оказывала на экспрессию *Hoxb1–5* куриного эмбриона (Bel-Vialar et al., 2002).

Интересно отметить, что в большинстве исследований способность отвечать на воздействие ретиноевой кислоты показана, в основном, для *Hox*-генов, расположенных ближе к 3'-концу кластера (Bel-Vialar et al., 2002; Schubert et al., 2006). В регуляторных зонах многих из них обнаружены мотивы RARE (Santini et al., 2003; Mainguy et al., 2003; Wada et al., 2006). Взаимосвязь с РК сигналингом *Hox*-генов, расположенных ближе к 5'-концу кластера, особенно *Hox*-генов задней группы, менее очевидна. Например, инкубация куриного эмбриона с ретиноевой кислотой на стадиях поздней гаструлы и нейрулы приводит к смещению передней границы экспрессии *Hoxb4*, но не влияет на экспрессию *Hox*-гена задней группы *Hoxb9*. Более того, электропорация доминантной негативной формы рецептора ретиноевой кислоты  $\alpha 1$  (*dnAR $\alpha$ 1*) не препятствует установлению нормального паттерна экспрессии *Hoxb9*, в то время как активация *Hoxb4* в этом случае подавляется (Bel-Vialar et al., 2002). Эти результаты означают, что ретиноевый сигналинг не нужен для нормальной активации *Hoxb9* в ЦНС куриного зародыша, однако, не исключают полностью его чувствительности к ретиноевой кислоте – возможно, задние *Hox*-гены могут реагировать на нее на других стадиях и/или на другую концентрацию. Влияние РК на экспрессию 5' *Hox*-генов обнаружено у мыши. У зародыша мыши на определенной стадии

развития, уже после первичной активации экспрессии *Hox*-генов, сдвигаются вперед передние границы доменов экспрессии *Hoxb5–9* в нервной системе. Поскольку этот сдвиг не происходит у мутантов *Raldh2*  $-/-$ , можно заключить, что для него необходим сигналинг ретиноевой кислоты (Oosterveen et al., 2003; Ahn et al., 2014). В регуляторных зонах *Hoxb5–13* не обнаруживаются последовательности RARE, однако показано, что РК может влиять на экспрессию 5' *Hox*-генов через мотивы RARE, расположенные между *Hoxb4* и *Hoxb5*, а также к 3'-концу от *Hoxb4* (Ahn et al., 2014). Кроме того, влияние ретиноевого сигналинга может быть опосредованным, например, через транскрипционные факторы Cdx (Young et al., 2009).

По-видимому, ретиноевая кислота влияет на *Hox*-ген *Post2* нереид и *Hox*-гены хордовых похожим образом – вызывает смещение передней границы областей экспрессии к головному концу. Возможно, у аннелид РК сигналинг тоже играет значительную роль в установлении границ экспрессии *Hox*-генов. Чтобы подтвердить это предположение, необходимо исследовать влияние ретиноевой кислоты на все *Hox*-гены нереид на различных стадиях развития, особенно в ларвальный период жизни.

#### РК-сигналинг у первичноротых

До сих пор в научной литературе не было данных, подтверждающих наличие у первичноротых “классического” пути сигналинга ретиноевой кислоты и его влияние на экспрессию каких-либо конкретных генов-мишеней.

Немногочисленные данные о ретиноевом сигналинге, полученные для представителя Ecdysozoa *Locusta migratoria*, позволяют предположить, что механизм РК сигналинга у насекомых заметно отличается от “классического” пути, описанного у позвоночных. Например, у позвоночных РК сигналинг индуцируется, в основном, транс-изомером молекулы ретиноевой кислоты (all-trans-Retinoic Acid), в то время как у насекомых преобладает 9-*цис*-изомер и для него же описано экзогенное воздействие (Nowickij et al., 2008; Sukiban et al., 2014). У позвоночных ретиноевая кислота связывается с рецептором RAR, а эффектором сигнального пути является гетеродимер RAR/RXR, в то время как у Ecdysozoa РК связывается с RXR, и он способен активироваться непосредственно от связывания с лигандом, без димеризации (Nowickij et al., 2008). На сегодняшний день не известны гены-мишени РК сигналинга у представителей Ecdysozoa.

Среди представителей Lophotrochozoa влияние ретиноевой кислоты было описано у моллюска *Lymnaea stagnalis*. На культуре нейрональных

клеток *L. stagnalis* было продемонстрировано, что РК способствует росту и ветвлению аксонов, действуя как нейротрофический фактор (Farrar et al., 2009). Оказалось, что механизм, лежащий в основе этого воздействия, не имеет ничего общего с классическим путем РК-сигналинга. Он не связан с транскрипцией каких-либо генов. В данном случае ретиноевая кислота непосредственно влияет на  $Ca^{2+}$ -каналы, модулируя поток ионов через них и вызывая локальный синтез белков с запасенных мРНК (Farrar et al., 2009).

В представленной работе мы показали, что инкубация с *транс*-ретиноальдегидом приводит к изменению области экспрессии, по крайней мере, одного *Hox*-гена у нереид. Эти изменения позволяют считать, что у *P. dumerilii* и *A. virens* присутствуют и функционируют все элементы, необходимые для превращения ретиноальдегида в ретиноевую кислоту и полноценного РК сигналинга. Наши данные говорят в пользу регуляторной взаимосвязи, прямой или опосредованной, между сигнальным путем ретиноевой кислоты и *Hox*-генами у аннелид – представителей Protostomia, что меняет представления об эволюционном возрасте этой взаимосвязи, смещая его в сторону общего предка билатеральных животных.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие РК сигналинга в осевой регионализации обычно рассматривается исключительно в связи с эмбриогенезом и эволюцией хордовых. Эта функция ретиноевой кислоты реализуется за счет контроля над генами *Hox*-кластера – ключевыми спецификаторами передне-задней оси. В нашей работе впервые показано влияние РК сигналинга на экспрессию по крайней мере одного *Hox*-гена – *Post2* – у первичноротых животных из эволюционной ветви Lophotrochozoa. Наши результаты – аргумент в пользу взаимосвязи ретиноевого сигналинга с работой *Hox*-генов, а, значит, и с паттернированием передне-задней оси у общего предка билатеральных животных. Однако, чтобы достоверно показать анцестральность этих регуляторных отношений, необходимо исследовать их молекулярный механизм с привлечением как можно большего числа объектов, относящихся к Protostomia.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ББС ЗИН РАН “Картеш” и ЦКП “Хромас” за содействие в проведении полевых и исследовательских работ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01531-а и грантом СПбГУ № 1.38.209.2014.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahn Y., Mullan H.E., Krumlauf R. Long-range regulation by shared retinoic acid response elements modulates dynamic expression of posterior *Hoxb* genes in CNS development // *Dev. Biol.* 2014. V. 388. P. 134–144.
- Albalat R. The retinoic acid machinery in invertebrates: Ancestral elements and vertebrate innovations // *Mol. Cell Endocrinol.* 2009. V. 313. P. 23–35.
- Bakalenko N.I., Novikova E.L., Nesterenko, Kulakova M.A. *Hox* gene expression during postlarval development of the polychaete *Alitta virens* // *EvoDevo.* 2013. 4:13.
- Bel-Vialar S., Itasaki N., Krumlauf R. Initiating *Hox* gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the *HoxB* genes in two distinct groups // *Development.* 2002. V. 129. P. 5103–5115.
- Brade T., Kumar S., Cunningham T.J., Chatzi C., Zhao X., Cavallero S., Li P., Sucof H.M., Ruiz-Lozano P., Duester G. Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial *Igf2* // *Development.* 2011. V. 138. P. 139–148.
- Bui-Gobbels K., Quintela R.M., Braunig P. et al. Is retinoic acid a signal for nerve regeneration in insects? // *Neural Regener. Res.* 2015. V. 10. № 6. P. 901–903.
- Campo-Paysaa F., Marletaz F., Laudet V., Schubert M. Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins // *Genesis.* 2008. V. 46. P. 640–656.
- Canestro C., Postlethwait J.H., Gonzalez-Duarte R., Albalat R. Is retinoic acid genetic machinery a chordate innovation? // *Evol. Dev.* 2006. V. 8. № 5. P. 394–406.
- Chang J., Skromne I., Ho R.K. *CDX4* and retinoic acid interact to position the hindbrain-spinal cord transition // *Dev. Biol.* 2016. V. 410. № 2. P. 178–189.
- Cunningham T.J., Duester G. Mechanisms of retinoic acid signaling and its roles in organ and limb development // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi 10.1038/nrm3932
- Ermakova O.N., Ermakov A.M., Tiras Kh.P., Lednev V.V. Retinoic acid as a regulator of planarian morphogenesis // *Rus. J. Dev. Biol.* 2009. V. 40. № 6. P. 367–372.
- Farrar N.R., Dmetrichuk J.M., Carlone R.L., Spencer G.E. A novel, nongenomic mechanism underlies retinoic acid-induced growth cone turning // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. P. 14136–14142.
- Fröblius A.C., Matus D.Q., Seaver E.C. Genomic organization and expression demonstrate spatial and temporal *Hox* gene collinearity in the lophotrochozoan *Capitella* sp. 1 // *PLoS One.* 2008. V. 3. e4004.
- Gudas L.J. Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states // *Biochim Biophys Acta.* 2012. V. 1821. № 1. P. 213–221.
- Hernandez R.E., Putzke A.P., Myers J.P., Margaretha L., Moens C.B. *Cyp26* enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development // *Development.* 2007. V. 134. P. 177–187.
- Houle M., Prinós P., Iulianella A., Bouchard N., Lohnes D. Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 20. № 17. P. 6579–6586.
- Katsuyama Y., Wada S., Yasugi S., Saiga H. Expression of the labial group *Hox* gene *HrHox-1* and its alteration induced by retinoic acid in development of the ascidian *Halocynthia roretzi* // *Development.* 1995. V. 121. P. 3197–3205.
- Kulakova M., Bakalenko N., Novikova E., Cook C.E., Eliseeva E., Steinmetz P.R., Kostyuchenko R.P., Dondua A., Arendt D., Akam M., Andreeva T. *Hox* gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa) // *Dev. Genes Evol.* 2007. V. 217. P. 39–54.
- Kumar S., Cunningham T.J., Duester G. Resolving molecular events in the regulation of meiosis in male and female germ cells // *Sci. Signal.* 2013. V. 6. e25.
- Kumar S., Duester G. Retinoic acid signaling in perioptic mesenchyme represses Wnt signaling via induction of *Pitx2* and *Dkk2* // *Dev. Biol.* 2010. V. 340. P. 67–74.
- Linville A., Gumusaneli E., Chandraratna R.A., Schilling T.F. Independent roles for retinoic acid in segmentation and neuronal differentiation in the zebrafish hindbrain // *Dev. Biol.* 2004. V. 270. P. 186–199.
- Maden M. Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb // *Nature.* 1982. V. 295. P. 672–675.
- Maden M., Hind M. Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule // *Dev. Dynam.* 2003. V. 226. P. 237–244.
- Mainguy G., In der Rieden P.M.J., Berezjov E., Woltering J.M., Plasterk R.H.A., Durston A.J. A position-dependent organisation of retinoid response elements is conserved in the vertebrate *Hox* clusters // *Trends Genet.* 2003. V. 19. № 9. P. 476–479.
- Marletaz F., Holland L.Z., Laudet V., Schubert M. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates // *Int. J. Biol. Sci.* 2006. V. 2. № 2. P. 38–47.
- Maves L., Kimmel C.B. Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid // *Dev. Biol.* 2005. V. 285. P. 593–605.
- Molotkova N., Molotkov A., Duester G. Role of retinoic acid during forebrain development begins late when *Raldh3* generates retinoic acid in the ventral subventricular zone // *Dev. Biol.* 2007. V. 303. P. 601–610.
- Nagatomo K., Ishibashi T., Satou Y., Satoh N., Fujiwara S. Retinoic acid affects gene expression and morphogenesis without upregulating the retinoic acid receptor in the ascidian *Ciona intestinalis* // *Mech. Dev.* 2003. V. 120. P. 363–372.
- Niaz I.A., Saxena S. Abnormal hind limb regeneration in tadpoles of the toad, *Bufo andersoni*, exposed to excess vitamin // *Folia Biol. (Krakow).* 1978. V. 26. P. 3–8.
- Niederreither K., Vermot J., Schuhbauer B., Chambon P., Dollé P. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo // *Development.* 2000. V. 127. P. 75–85.
- Nowickij S.M., Chithalen J.V., Cameron D., Tyshenko M.G., Petkovich M., Wyatt G.R., Jones G., Walker V.K. Locust retinoid X receptors: 9-Cis-retinoic acid in embryos from a primitive insect // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 9540–9545.
- Oosterveen T., Niederreither K., Dolle P., Chambon P., Meijlink F., Deschamps J. Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' *Hoxb* genes in posterior hindbrain // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 2. P. 262–269.
- Rhinn M., Dolle P. Retinoic acid signalling during development // *Development.* 2012. V. 139. P. 843–858.



- Rijli F.M., Gavalas A., Chambon P. Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the Hox selector genes // *Int. J. Dev. Biol.* 1998. V. 42. P. 393–401.
- Santini S., Boore J.L., Meyer A. Evolutionary conservation of regulatory elements in vertebrate Hox gene clusters // *Genome Res.* 2003. V. 13. № 6A. P. 1111–1122.
- Schubert M., Holland N.D., Laudet V., Holland L.Z. A retinoic acid-Hox hierarchy controls both anterior/posterior patterning and neuronal specification in the developing central nervous system of the cephalochordate amphioxus // *Dev. Biol.* 2006. V. 296. P. 190–202.
- Sciarrino S., Matranga V. Effects of retinoic acid and dimethylsulfoxide on the morphogenesis of the sea urchin embryo // *Cell Biol. Int. Rep.* 1995. V. 19. P. 675–680.
- Sirbu I.O., Gresh L., Barra J., Duyster G. Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression // *Development.* 2005. V. 132. P. 2611–2622.
- Sukiban J., Bräunig P., Mey J., Bui-Göbbels K. Retinoic acid as a survival factor in neuronal development of the grasshopper, *Locusta migratoria* // *Cell Tissue Res.* 2014. V. 358. P. 303–312.
- Wada H., Escriva H., Zhang S., Laudet V. Conserved RARE localization in amphioxus Hox clusters and implications for Hox code evolution in the vertebrate neural crest // *Dev. Dynam.* 2006. V. 235. P. 1522–1531.
- Young T., Rowland J.E., van de Ven C., Bialecka M., Novoa A., Carapuco M., van Nes J., de Graaff W., Duluc I., Freund J.N., Beck F., Mallo M., Deschamps J. Cdx and Hox genes differentially regulate posterior axial growth in mammalian embryos // *Dev. Cell.* 2009. V. 17. № 4. P. 516–526.

## Effect of Retinoids on *Post2 Hox* gene Expression in Nereid Polychaetes

N. I. Bakalenko\*, A. V. Poznyak, E. L. Novikova, and M. A. Kulakova

Saint Petersburg University, St. Petersburg, 199034

\*e-mail: bakalenko@gmail.com

Received September 27, 2016

Retinoic acid (RA) plays an important role in vertebrate development and regeneration. RA signalling directly regulates the expression of Hox genes, being in this way involved in the patterning of the anterior-posterior (AP) axis of vertebrate embryos. So far the relationship between retinoic acid signalling and *Hox* genes has been shown only for chordates. In this study we incubated juvenile worms and regenerating worms of two polychaete species from the family Nereididae, *Alitta virens* and *Platynereis dumerilii*, with all-trans-retinal, the precursor of retinoic acid. Under the influence of all-trans-retinal the anterior expression boundary of *Post2 Hox* gene shifted towards the anterior end both in intact and in regenerating worms of both species. Our data indicate the existence of a relationship between RA signalling and *Hox* genes in Protostomia.

**Keywords:** *Hox* genes, RA signaling, polychaetes