

УДК 591

**ПРИСУТСТВИЕ ГОМЕОБОКСНОГО ГЕНА КЛАССА *ANF*
У ТИХООКЕАНСКОЙ МИНОГИ *LETHENTERON CAMTSCHATICUM*
ПОДТВЕРЖДАЕТ ГИПОТЕЗУ О ВАЖНОСТИ ПОЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ *ANF*
ДЛЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ КОНЕЧНОГО МОЗГА
В ЭВОЛЮЦИИ ПОЗВОНОЧНЫХ**

© 2017 г. А. В. Байрамов^{а, *}, Г. В. Ермакова^а, Ф. М. Ерошкин^а,
А. В. Кучерявый^б, Н. Ю. Мартынова^а, А. Г. Зарайский^{а, **}

^аИнститут биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

^бИнститут проблем экологии и эволюции им. А.М. Северцова РАН
119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33

*E-mail: andrbayr@gmail.com

**E-mail: azaraisky@yahoo.com

Поступила в редакцию 19.10.2016 г.

Окончательный вариант получен 14.02.2017 г.

Существенной особенностью позвоночных, в том числе человека, является наличие у них сложно-структурированного головного мозга, передний отдел которого – теленцефалон, или конечный мозг – не имеет аналогов у других групп животных. Ранее в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН был открыт специфичный для позвоночных моногенный класс гомеобоксных генов *Anf*, играющий ключевую роль в развитии теленцефалона. Из всех позвоночных гены *Anf* не были обнаружены только у представителей самой древней группы – у бесчелюстных рыб (современные миноги и миксины), при том что конечный мозг у этих животных описан. Согласно литературным данным, ветвь, ведущая к бесчелюстным, отделилась от общего ствола позвоночных на самых ранних этапах их эволюции и обнаружение гена *Anf* у бесчелюстных важно, поскольку могло бы подтвердить выдвинутую ранее гипотезу о том, что возникновение теленцефалона в эволюции было связано с появлением гомеобоксного гена *Anf*. В настоящей работе впервые описан ген *Anf* у тихоокеанской миноги *Lethenteron camtschaticum*, исследован паттерн и динамика его экспрессии на ранних стадиях развития этого вида миног и проведена трансляция его полноразмерной кДНК в эукариотической системе экспрессии (зародышах шпорцевой лягушки).

Ключевые слова: *Anf*, *Lanf*, круглоротые, миноги, *Lethenteron camtschaticum*, развитие конечного мозга

DOI: 10.7868/S0475145017040024

ВВЕДЕНИЕ

Одним из отличительных признаков позвоночных, в том числе человека, является наличие у них сложноструктурированного головного мозга, состоящего из нескольких отделов: заднего, среднего и переднего – рострального отдела эмбрионального мозга из которого развиваются такие важнейшие структуры взрослого организма, как большие полушария и глаза.

В раннем эмбриогенезе передний мозг формируется из наиболее ростральной части нервной трубки и подразделяется на теленцефалон или конечный мозг (кора, подкорковое вещество и базальные ганглии) и диенцефалон (таламус, гипоталамус, эпифиз и глаза). Из всех этих структур, теленцефалон представляет собой наиболее

сложноустроенный отдел головного мозга, играющий принципиальную роль в процессах высшей нервной деятельности позвоночных. Хотя этот отдел мозга описан у всех ныне живущих позвоночных, его эволюционное происхождение до сих пор остается слабо изученным (Sugahara et al., 2013).

Исследования переднеголовных структур у низших хордовых проводились до настоящего времени преимущественно путем анализа экспрессии специфических генов-маркеров (Venkatesh et al., 1999; Holland and Short, 2008; Irimia, 2010).

Так, у ланцетника в мозговом пузыре была обнаружена экспрессия гена *FoxG1*, хотя эта структура, судя по всему, не является прямым гомологом теленцефалона более эволюционно продвинутых групп хордовых (Toresson et al., 1998). У оболочни-

ков теленцефалона как морфологической структуры обнаружено не было (Fritzsche, 1996).

У миног в переднеголовных структурах была обнаружена экспрессия *Pax6* и *Emx*, что указывает на наличие у них структур, аналогичных паллиуму челюстноротых (Murakami et al., 2001). При этом отмечается (Murakami et al., 2005), что конечный мозг миног является более сложноустроенным, чем считалось ранее, однако кора и гипоталамус у этой группы развиты еще достаточно слабо. В вентральной части конечного мозга миног была обнаружена экспрессия *Dlx1/6* (Murakami et al., 2001). Ортолог гена *Otx2* также был обнаружен у миног, его экспрессия начинается в спинной губе бластопора на самых ранних стадиях развития и в дальнейшем продолжается в области переднего мозга, до границы между средним и задним мозгом (Suda et al., 2009).

Ген *Anf* был впервые описан в нашей лаборатории в 1992 году у шпорцевой лягушки (Zaraisky et al., 1992). Проведенные исследования 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 и, учитывая тот факт, что гены класса *Anf*, специфично экспрессируются у всех исследованных позвоночных в клетках зачатка переднего мозга на самых ранних стадиях его развития, но при этом 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 гена *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 регионов 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. Важным подтверждением этой гипотезы стало бы обнаружение гена(ов) класса *Anf* у представителей самой эволюционно древней группы позвоночных — бесчелюстных рыб, однако, до настоящего времени, в отличие от всех основных генов-регуляторов развития конечного мозга, генов *Anf* у бесчелюстных обнаружено не было. Напротив, согласно опубликованному в 2013 году данным, в полученной геномной последовательности миноги *Petromyzon marinus* генов *Anf* найдено

не было, хотя, как признают сами авторы данной работы, их данные не являются полными, поскольку для секвенирования ими была использована ДНК из печени взрослых особей, которые, как было выяснено уже после окончания проекта, теряют во время эмбриогенеза до 20% генома (Smith et al., 2013). При этом, в доступных в Интернете геномных библиотеках камчатской миноги (*Lethenteron camtschaticum*) нами были обнаружены короткие последовательности, гомологичные фрагментам *Anf* других классов позвоночных.

Поскольку вопрос наличия гена *Anf* у бесчелюстных принципиально важен для выдвинутой нами ранее гипотезы о роли *Anf* в развитии конечного мозга позвоночных, мы предприняли попытку клонирования гомеодомена, а затем и полноразмерной кДНК гена *Anf* этого вида миног.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Сбор зародышей *L. camtschaticum* был произведен в ходе экспедиции на полуостров Камчатка (биостанция Радуга ИБМ ДВО РАН). Зародыши получались путем искусственного оплодотворения. Стадии определялись согласно Tahara (Tahara, 1988). Для гибридизации *in situ* зародыши фиксировались в растворе MEMFA. Зародыши шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* были получены в лаборатории путем искусственного оплодотворения, стадии определялись согласно таблицам нормального развития Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1956).

Клонирование кДНК *Anf* *L. camtschaticum* (*Lanf*), синтез РНК. Фрагмент кДНК *Lanf*, содержащий гомеодомен, был получен путем ПЦР со следующими вырожденными праймерами:

Прямой-1

5'-TG GTATAGXZGCCGXZGZCC;

Прямой-2

5'-AGAZGCCGXAGZCCXUGUAC;

Обратный-1

5'-XGCACUXCGYTTCTGYAACCA;

где U – A or C; X – A, G, C or T; Y – C or T; Z – A or G.

Для ПЦР использовался набор фирмы Evrogen с полимеразой Encuslo. Первый раунд ПЦР (30 циклов) был проведен с праймерами Прямой-1 и Обратный-1, после чего продукт был разведен в 1000 раз и подвергнут второму раунду ПЦР (20 циклов) с праймерами Прямой-1 и Обратный-1. Итоговый продукт был заколонирован в вектор pGEM-T и отсекуен. На основе полученного сиквенса были спроектированы пары праймеров для получения 5'- и 3'-концов *Lanf* методом RACE (Matz et al., 1999). Продукты, полученные этим

методом также были клонированы в вектор pGEM-T и отсеквенированы.

В итоге, полная кДНК *Lanf* была получена путем ПЦР с крайних праймеров и также отсеквенирована. Для получения полной кДНК *Lanf* использовались следующие праймеры:

Lanf-прямой: 5'-AGAACAAAATCCACCGC-CGA,

Lanf-обратный: 5'-GTACAGGTGAGTGGGT-GAGTCA.

Синтетическая мРНК *Lanf* была получена при помощи набора для *in vitro* транскрипции mMessage Machine SP6 Kit (Ambion) после линейаризации плазмиды pCS2 рестриктазой *NorI*.

Биоинформатика. Филогенетический анализ последовательностей гомеодоменов 960 аминокислот был проведен методом Neighbor-Joining (Saitou и Nei, 1987) в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013). Процент, в котором указанные группировки сохранялись в бутстрэп-тесте (1000 репликаций), указаны рядом с ветвями (Felsenstein, 1985). Дерево укоренено алгоритмом UPGMA. Отбор белков для анализа в случае семейств Otx, Goosecoid, Anf был проведен согласно (Kitamura et al., 2002). В случае других семейств были взяты гены представителей беспозвоночных (насекомые, нематода, морские ежи, анемона и асцидия) и позвоночных (круглоротые, амфибии, млекопитающие).

Гомеодоменные последовательности, использованные в анализе, приведены ниже:

>LcAnf (*Lethenteron camtschaticum*, KX245018)
 SRRPRTSFKKSQVLLLEHVFRAPYPGIELAQSVSRRVGVDEDRVQVWFQNRARMRRAY
 >CmAnf (*Callorhinchus milii*, XM_007890539.1)
 GRRARTVFSRSQIEVLEEFRRNCYPGIDVREQLAHKLTLEDRIQIWFQNRRAKQKRSH
 >AbAnf (*Acipenser baeri*, U65435)
 GRRPRTAFSGTQIEVLESVFRVNPYPGIDVREELACKLELDEDRIQIWFQNRRAKLRSH
 >DrAnf (*Danio rerio*, NM_131349)
 GRRPRTAFSSVQIKILESQVNSYPGIDIREELAKKLQLEDRIQIWFQNRRAKLRSH
 >XlAnf (*Xenopus laevis*, X60099)
 GRRPRTAFTRSQIEILENVFRVNSYPGIDVREELASKLALDEDRIQIWFQNRRAKLRSH
 >AcAnf (*Anolis carolinensis*, XM_003217755.3)
 GRRPRTAFTRNQIEILESQVNSYPGIDVREELAQLDLDEDRIQIWFQNRRAKLRSH
 >GgAnf (*Gallus gallus*, U65436.1)
 GRRPRTAFTRNQIEVLENVFKMNSYPGIDIREELARKLDLEDRIQIWFQNRRAKLRSH
 >HsAnf (*Homo sapiens*, U82811)
 GRRPRTAFTQNQIEVLENVFRVNCYPGIDIREDLAQLNLEDRIQIWFQNRRAKLRSH
 >SpPmar1 (*Strongylocentrotus purpuratus*, NM_214508)
 RRRRPTVFTLQLQILETAFNDNQYDPITAREQLASSLKIGEDRILVWFQNRARLRAS
 >HpMicro1 (*Hemicentrotus pulcherrimus*, AB072733)
 PRRRPTVFTLQLQILETAFNDNQYPGITTREQLASSLKLGEDRILVWFQNRRLRRAS
 >XlOtx2 (*Xenopus laevis*, AAA85388)
 QRRERTTFTRAQLDILEALFAKTRYPDIFMREEVALKINLPESRVQVWFKNRRAKCRQQQ
 >HpOtxL (*Hemicentrotus pulcherrimus*, AB061768)
 QRRERTTFTRAQLDVLETFLSRTRYPDIFMREEVAMKINLPESRVQVWFKNRRAKCRQQQ
 >SpOtx (*Strongylocentrotus purpuratus*, S76899)
 QRRERTTFTRAQLDVLETFLSRTRYPDIFMREEVAMKINLPESRVQVWFKNRRAKCRQQQ
 >DmOtd (*Drosophila melanogaster*, CAA41732)
 QRRERTTFTRAQLDVLEALFGKTRYPDIFMREEVALKINLPESRVQVWFKNRRAKCRQQQ
 >MmOTX (*Mus musculus*, NP_001273410.1)
 QRRERTTFTRAQLDVLEALFAKTRYPDIFMREEVALKINLPESRVQVWFKNRRAKCRQQQ
 >NvOTX (*Nematostella vectensis*, ABB83750.1)
 QRRERTTFTKNQLLEELFAKTRYPDIFMREEVAIKINLPESRVQVWFKNRRAKARQQA
 >CiOtx (*Ciona intestinalis*, AAG59802.1)
 QRRERTTFTRAQLDILEALFGKTRYPDIFMREEVALKINLPESRVQVWFKNRRAKCRQQV

>LcOtxA (*Lethenteron camtschaticum*, BAA33409.1)
 QRRERTTFFTRAQLDVLEALFSKTRYPDIFMREEVALKINLPESRVQVWFKNRRRAKCRQQQ
 >XIGoosecoid (*Xenopus laevis*, M63872)
 KRRHRTIFTDEQLEALENLFQETKYPDVGTREQLARRVHLREEKVEVWFKNRRRAKWRRQK
 >MmGsc (*Mus musculus*, EDL18791.1)
 KRRHRTIFTDEQLEALENLFQETKYPDVGTREQLARKVHLREEKVEVWFKNRRRAKWRRQK
 >SpGsc (*Strongylocentrotus purpuratus*, AF315231.1)
 KRRHRTIFTTEEQLEQLEATFEKTHYPDVMLREELAIKVDLKEERVEVWFKNRRRAKWRKQK
 >DmGsc (*Drosophila melanogaster*, U52968.1)
 KRRHRTIFTTEEQLEQLEATFDKTHYPDVVLRQLALKVDLKEERVEVWFKNRRRAKWRKQK
 >NvGsc (*Nematostella vectensis*, ABB72464.1)
 KRRHRTIFTTEEQLELLETTFFQKTHYPDVLLREELAMKVDLKEERVEVWFKNRRRAKWRKQK
 >LcGsc (*Lethenteron camtschaticum*, AHE76143.1)
 KRRHRTIFTDEQLGALEELFEQNQYPDVSMREQLARRVHLREERVEVWFKNRRRAKWRRQK
 >XenPax6 (*Xenopus laevis*, U77532)
 LQRNRTSFTQEQIEALEKEFERETHYPDVFARERLAAKIDLPEARIQVWFSNRRRAKWRREE
 >MmPax6 (*Mus musculus*, NP_038655.1)
 LQRNRTSFTQEQIEALEKEFERETHYPDVFARERLAAKIDLPEARIQVWFSNRRRAKWRREE
 >LcPax6 (*Lethenteron camtschaticum*, BAB62531.1)
 LQRNRTSFTQEQIEALEKEFERETHYPDVFARERLASKIDLPEARIQVWFSNRRRAKWRREE
 >SpPax6 (*Strongylocentrotus purpuratus*, XP_003727316.1)
 LQRNRTSFTAQQIEELEKEFERETHYPDVFARERLAQKIDLPEARIQVWFSNRRRAKWRREE
 >DmEyeless (*Drosophila melanogaster*, NP_524628.2)
 LQRNRTSFTNDQIDSLEKEFERETHYPDVFARERLAGKIGLPEARIQVWFSNRRRAKWRREE
 >XIPax3 (*Xenopus laevis*, AAI08574)
 QRRGRTTFTAQLEELERAFERTHYPDYITREELAQRACLTEARVQVWFSNRRRARWRKQA
 >LcPax3 (*Lethenteron camtschaticum*, ADP37890.1)
 QRRSRTTFTAQLEEELEKAFERTHYPDYITREELAQRCLKTEARVQVWFSNRRRARWRKQA
 >XIRx1 (*Xenopus laevis*, BC170331.1)
 HRRNRTTFTTYQLHELERAFAEKSHYPDVYSREELAMKVNLPVVRVQVWFQNRRAKWRRQE
 >MmRx (*Mus musculus*, NP_038861.2)
 HRRNRTTFTTYQLHELERAFAEKSHYPDVYSREELAGKVNLPVVRVQVWFQNRRAKWRRQE
 >DmDRx (*Drosophila melanogaster*, CAA11241.1)
 HRRNRTTFTTYQLHELERAFAEKSHYPDVYSREELAMKVNLPVVRVQVWFQNRRAKWRRQE
 >NvRX (*Nematostella vectensis*, ABB83751.1)
 LRRNRTTFTTFQLHELERAFAEKSHYPDVYITREELALKISLPEVVRVQVWFQNRRAKWRRQE
 >SpSpp (*Strongylocentrotus purpuratus*, XP_782307.1)
 HRRNRTTFTTYQLHELERAFAEKSHYPDVYSREELALKVNLPVVRVQVWFQNRRAKWRRQE
 >XINkx2 (*Xenopus laevis*, AAG17405)
 RRKRRVLFSAQVYELERRFKQKQKYLAPEREHLASMIHLTPTQVKIWFQNHRYKMKRQA
 >LcNkx2.1 (*Lethenteron camtschaticum*, AMN92148.1)
 RRKRRVLFSAQVYELERRFKQKQKYLAPEREHLASMIHLTPTQVKIWFQNHRYKMKRQA
 >MmNkx-2.1 (*Mus musculus*, NP_033411.3)
 RRKRRVLFSAQVYELERRFKQKQKYLAPEREHLASMIHLTPTQVKIWFQNHRYKMKRQA
 >SpNK2.1 (*Strongylocentrotus purpuratus*, NP_999800.1)
 RRKRRVLFSAQVYELERRFKQKQKYLAPEREHLANLINLTPTQVKIWFQNHRYKMKRQT
 >CeNK2 (*Caenorhabditis elegans*, AAB81844.1)
 RRKRRVLFSAQVYELERRFKQAKYLTAPERELANSIRLTPTQVKIWFQNHRYKCKRQE
 >NvNK2-Tinman (*Nematostella vectensis*, ABG67775.1)
 RRKPRVLFSAQVYELERRFKGQKYLAPERDHLASLLKLTNPQVKIWFQNKRYKCKKQA
 >DmScarecrow (*Drosophila melanogaster*, AAF26436.1)
 RRKRRVLFSAQVYELERRFKQQRYSAPEREHLASLIHLTPTQVKIWFQNHRYKCKRQA

>XIDlx5 (*Xenopus laevis*, NM_001090564.1)
 IRKPRTIYSSFQLAALQRRFQKTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNKRSKIKKIM
 >LcDlx (*Lethenteron camtschaticum*, BAH03341.1)
 IRKPRTIYSSFQLAALQRRFQQTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNRRSKFKKIG
 >MmDLX5 (*Mus musculus*, NP_034186.2)
 VRKPRTIYSSFQLAALQRRFQKTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNKRSKIKKIM
 >DmDII (*Drosophila melanogaster*, AAB24059.1)
 MRKPRTIYSSLQQLNRRFQRTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNRRSKYKMM
 >SpDII (*Strongylocentrotus purpuratus*, NP_001123282.1)
 LRKPRTIYTSLQQLNQRFHQTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNRRSKYKKIL
 >NvDLX (*Nematostella vectensis*, ABB86447.1)
 IRKPRTIYSSFQRLRELNKRFIKTQYLALPERADLAAYLGLTQTQVKIWFQNRRSKFKKTL
 >XIEmx1 (*Xenopus laevis*, NM_001093430)
 PKRIRTAFFSPSQQLLRLERSFEKNHYVVGAEKQLATGLSLSETQVKVWFQNRRTKYKRQK
 >LcEmx (*Lethenteron camtschaticum*, BAB13506.1)
 PKRIRTAFFSPSQQLLRLEHAFEKNHYVVGAEKQLASSLSLSETQVKVWFQNRRTKYKRQK
 >MmEmx1 (*Mus musculus*, CAA48752.1)
 PKRIRTAFFSPSQQLLRLERAFKKNHYVVGAEKQLAGSLSLSETQVKVWFQNRRTKYKRQK
 >DmEmpty spiracles (*Drosophila melanogaster*, NP_731868.1)
 PKRIRTAFFSPSQQLLKLEHAFESNQYVVGAEKALANLNLSETQVKVWFQNRRTKHKRMQ
 >SpEmx1pred (*Strongylocentrotus purpuratus*, XP_783008.1)
 PKRIRTAFFSPSQQLLRENAFEKNHYVVGAEKQLAASLNLTLTETQVKVWFQNRRTKYKRIK
 >NvEMXa (*Nematostella vectensis*, ABB86466.1)
 PKRIRTAFTPTQLLHLENAFEKNHYIVGTERKQLASYLNLSETQIKVWFQNRRTKWKRRQ
 >XIEn2 (*Xenopus laevis*, NM_001101743)
 DKRPRTAFTADQLQRLKAEFQTNRYLTERRRQSLAQELSLNESQIKIWFQNKRAKIKKAT
 >LcEngrailedA (*Lethenteron camtschaticum*, ABU41241.1)
 EKRPRTAFSSEQLSRLKAEFQASRYLTEARRQALAQELQLENAQIKIWFQNKRAKLLKAS
 >MmEn2 (*Mus musculus*, CAA68362.1)
 DKRPRTAFTAELQRLKAEFQTNRYLTERRRQSLAQELSLNESQIKIWFQNKRAKIKKAT
 >DmEngrailed (*Drosophila melanogaster*, BAN82731.1)
 EKRPRTAFSSEQLARLKREFNENRYLTERRRQQLSSELGLNEAQIKIWFQNKRAKIKKST
 >SpEngr-like pred (*Strongylocentrotus purpuratus*, XP_794753.1)
 EKRPRTAFSASQLQRLKQEFQSNYLTERRRALAKELTLESQIKIWFQNKRAKIKKAT
 >XIHOXA1 (*Xenopus laevis*, NP_001079188)
 PNTARTNFTTKQLTELEKEFHFNKYLTRARRVEIAAALQLNETQVKIWFQNRMMKQKKRE
 >LcHox1 (*Lethenteron camtschaticum*, BAF63519.1)
 IATQRTNFSTKQLTELEKEFHFNKYLTRARRVEIAAALQLNETQVKIWFQNRMMKQKKRE
 >MmHoxA1 (*Mus musculus*, NP_034579.3)
 PNAVRTNFTTKQLTELEKEFHFNKYLTRARRVEIAASLQLNETQVKIWFQNRMMKQKKRE
 >SpHox-B1pred (*Strongylocentrotus purpuratus*, XP_781966.2)
 NNNGRTNFTNKQLTELEKEFHFNKYLTRARRIEIAAMLGLNETQVKIWFQNRMMKEKKKM

Обратная транскрипция-ПЦР. Для количественного ПЦР в реальном времени были отобраны три группы по 30 зародышей *L. camtschaticum* указанных стадий развития. Тотальная РНК была выделена с помощью набора для выделения РНК MASHEREY-NAGEL согласно протоколу производителя. 250 нг тотальной РНК, выделенной из каждой пробы, было использовано для обратной транскрипции с помощью ревертазы M-MLV фирмы Promega в присутствии 10 пмоль олиго-dT праймера фирмы Evrogen согласно протоколу. В качестве

контроля использовалась аналогичная реакционная смесь без ревертазы (-ОТ контроль). Количественный ПЦР был проведен на приборе DTPrim4 фирмы ДНК Технология, с использованием 2 мкл первой цепи (или -ОТ контроля) на реакцию и применением 5-кратной реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR фирмы Evrogen. В реакции использовались указанные ниже праймеры в финальной концентрации 5 пмоль каждый, а общий объем реакции доводился до 25 мкл водой, очищенной в приборе milli-Q. Для ПЦР использовалась стандартная про-

грамма из 40 циклов с горячим стартом. Данные ПЦР импортировались в Microsoft Excel и анализировались методом ДДС_т. Нормализация полученных результатов проводилась по двум контрольным ге-

нам: *орнитиндекарбоксилазе (ODC)* и фактору элонгации *EF1alpha*. Для количественно ПЦР в реальном времени использовались следующие пары праймеров:

Lanf-ОТПЦР-прямой GGCCTCGCACGTCTTCA
Lanf-ОТПЦР-обратный CTCGTCCACGCCGACTCT
EF1alpha-ОТПЦР-прямой AGAACGTGTCTGTCAAGGATGT
EF1alpha-ОТПЦР-обратный TAGCCGGCATTGATCTGGCCA;
ODC-ОТПЦР-прямой CCGTCCGGTATCATCGCCAAG
ODC-ОТПЦР-обратный CGAAGAGGATGCAGTTGAAG.

Гибридизация *in situ*

Фрагмент кДНК *Lanf*, использованный в качестве зонда для гибридизации *in situ*, был получен с помощью ПЦР со следующей парой праймеров:

Lanf-*insitu*-прямой CGGCGCTCCAGAAGTTCATTCTC
Lanf-*insitu*-обратный CACCGCGCGGAGCTGCGACTCG.

Гибридизация *in situ* была проведена на целых зародышах согласно протоколу, описанному в Sugahara et al., 2015. Оболочку зародышей удаляли микропинцетом до фиксации. Фиксацию проводили в растворе параформальдегида (MEMFA) в течение ночи на 4°C. Предгибризационный и гибридизационный буфер содержали: 50% формамид, 5×SSC, 100 мкг/мл гепарин, 100 мкг/мл tRNA, 5 мМ EGTA, 1% chaps, 2% Tween 20. После предгибризации (1 час 70°C), зародыши инкубировались ночь на 70°C в гибридизационном буфере, содержащем 5 мкг/мл Dig-меченой РНК пробы, промывались (дважды в гибридизационном буфере, дважды в двукратном растворе SC на 70°C, дважды в 0.2-кратном растворе SSC при комнатной температуре, а также в растворе MAB) и инкубировались в блокирующем буфере (MAB + + 2% блокирующего реагента (Roch) + 20% телячьей сыворотки (Sigma)) 2 часа при комнатной температуре. Затем эмбрионы инкубировались с антиDig-Fab фрагментом, конъюгированным с алкальной фосфатазой (фирмы Roche, разведение 1 : 1500 в блокирующем буфере) в течение ночи на 4°C.

Затем эмбрионы были 8 раз промыты в буфере MABT (MAB + 0.1% Triton X100) и помещены в алкалинфосфатазный буфер на 20 мин при комнатной температуре. Краситель BM purple (Roch) был использован для проявки.

30 мкм срезы гибридизованных эмбрионов выполнялись на вибраторе Microm HM 650 (зародыши помещались в 4% агарозные блоки).

Фотографирование производилось на стереомикроскопе Leica M205.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предположительная нуклеотидная последовательность гомеодомена *Anf* тихоокеанской миноги *L. camtschaticum* была обнаружена в базах данных по гомологии с геном *Anf* представителей других классов позвоночных, в частности *Xenopus laevis* (рис. 1a). 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*.

Исходя из обнаруженной в базах данных ДНК последовательности, был спроектирован ряд олигонуклеотидных праймеров (в общей сложности 8 прямых и 6 обратных праймеров) для ПЦР с первой цепи, синтезированной на основе проб тотальной РНК ранних стадий развития *L. camtschaticum*. Поскольку экспрессия генов *Anf* у других позвоночных описана только в головном отделе, для повышения эффективности ПЦР были подготовлены пробы, содержащие мРНК головных отделов зародышей миног (согласно методике, описанной в Kazanskaya et al., 1997). Важной особенностью как ДНК, так и РНК миноги, существенно осложняющей применение ПЦР-методов, является повышенное содержание GC-пар (в среднем 48% у японской миноги против 42% у человека (по данным Проекта по секвенированию генома японской миноги, <http://jlampreygenome.imcb.a-star.edu.sg/>)). 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 (компания Evrogen).

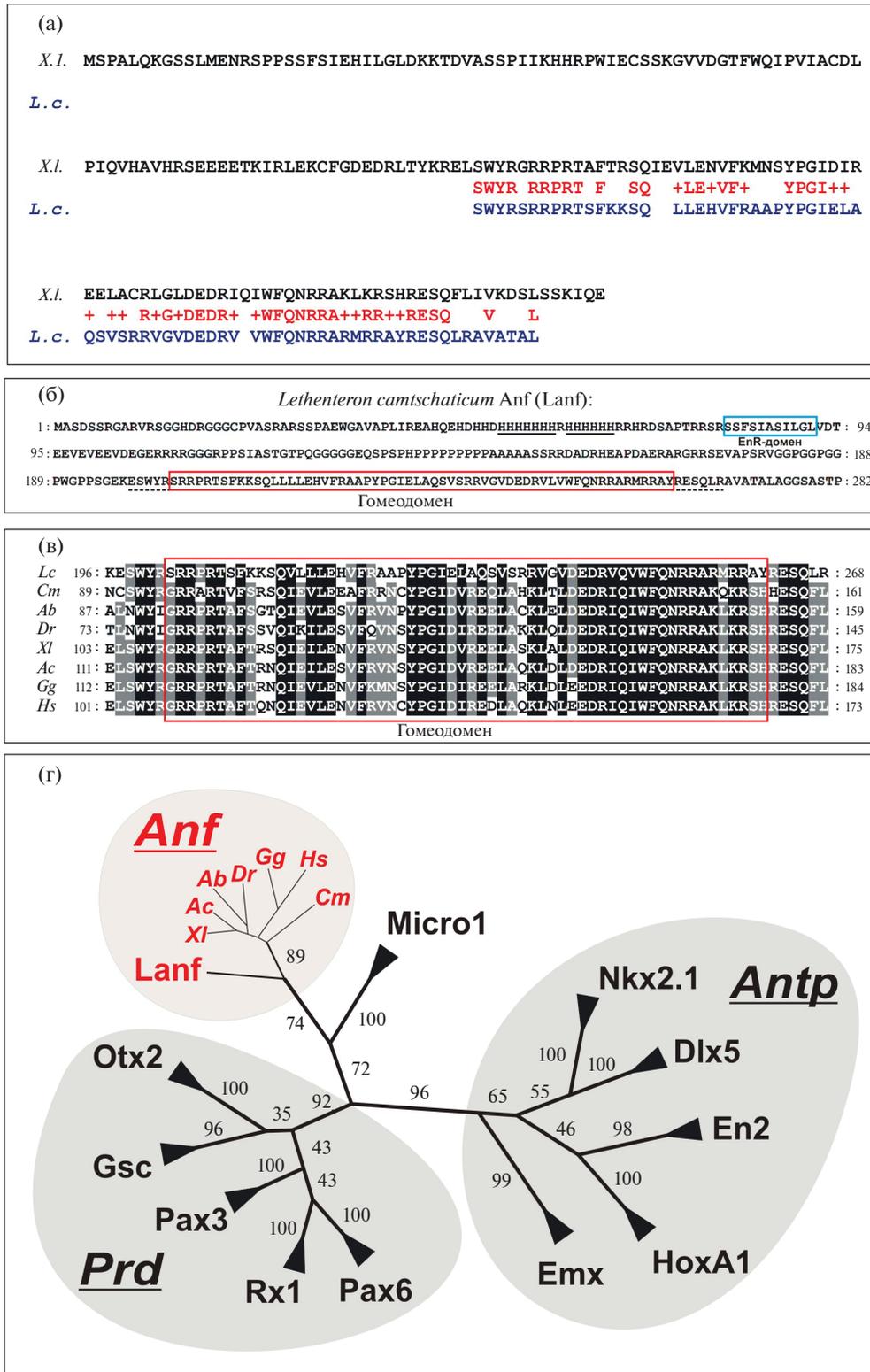


Рис. 1. (а) – фрагменты геномных библиотек *L. camtschaticum* (синим), гомологичные последовательности Ханф шпорцевой лягушки *X. laevis* (черным). (б) – аминокислотная последовательность белка Anf *L. camtschaticum*, (в) – сравнение аминокислотной последовательности гомеодомена Anf *L. camtschaticum* с последовательностями белков Anf представителей других классов позвоночных; (г) – результаты филогенетического анализа аминокислотных последовательностей гомеодоменов белков Anf представителей разных классов позвоночных и ряда других гомеобоксных белков, проведенный методом Neighbor Joining в программе MEGA6. В случае семейства Anf приведены гены следующих представителей позвоночных: *Lc* – минога *L. camtschaticum*, *Cm* – акула *Callorhynchus milii*, *Ab* – осетр *Acipenser baeri*, *Dr* – рыба *Danio rerio*, *Xl* – шпорцевая лягушка *X. laevis*, *Ac* – ящерица *Anolis carolinensis*, *Gg* – курица *Gallus gallus*, *Mm* – мышь *Mus musculus*, *Hs* – человек *Homo sapiens*.

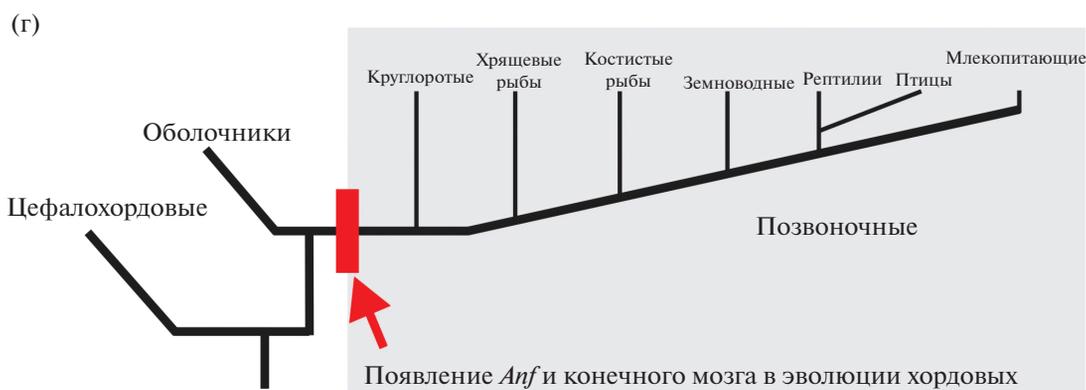
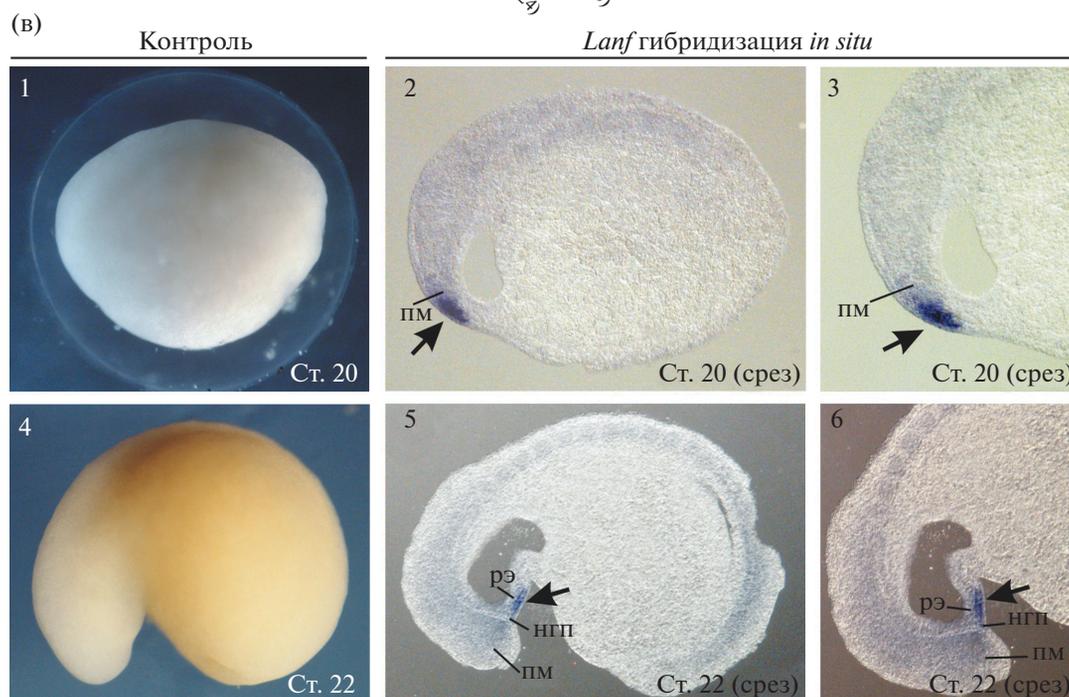
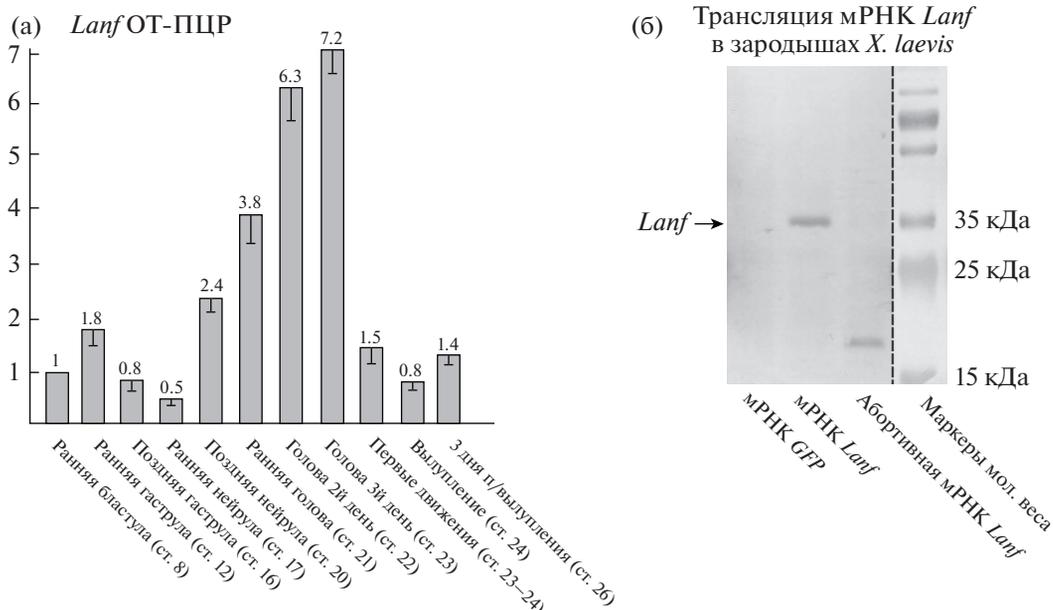


Рис. 2. (а) — анализ динамики экспрессии эндогенной мРНК *Lanf* на ранних стадиях развития зародышей *L. camtschaticum* методом обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР). (б) — детекция экспрессии экзогенного белка *Lanf* гистидиновыми антителами. (в) — анализ паттерна экспрессии эндогенной мРНК *Lanf* на ранних стадиях развития *L. camtschaticum* методом гибридизации *in situ*. 1, 4 — общий вид зародышей, 2, 3, 5, 6 — срезы зародышей гибридизованных *in situ* с зондом к мРНК *Lanf*. Область экспрессии *Lanf* показана стрелками, пм — передний мозг, рэ — ротовая эктодерма, нпг — назально-гипофизарная плакода. (г) — появление генов класса *Anf* у предковых позвоночных, отображенное на эволюционном древе хордовых.

Кроме того, для повышения специфичности использовался ступенчатый ПЦР (последовательный переход с внешних праймеров на внутренние). Только применение всех этих модификаций ПЦР методики позволило получить сначала фрагмент (гомеодомен) кДНК *Anf*, а потом и его полную последовательность. Как было выяснено впоследствии, при 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. Возможно отчасти этим объясняется тот факт, что ранее, при секвенировании генома миног ген *Anf* обнаружен не был.

В результате применения ПЦР с описанными модификациями нами была получена предположительная последовательность гена и белка *Anf* тихоокеанской миноги (рис. 1б).

Проведенный анализ аминокислотной последовательности показал, что гомеодомен *Anf* *L. camtschaticum* (*Lanf*) обнаружил высокую степень сходства (75–85%) с гомеодоменами белков *Anf* представителей других классов позвоночных (рис. 1в) и при построении филогенетического дерева располагается ближе к белкам *Anf*, чем к другим гомеобоксным белкам (рис. 1г). Взаимное расположение репрессорного *Engrailed* домена (ближе к N-концу белка) и гомеодомена (ближе к C-концу белка) *Lanf* также характерно для других представителей класса *Anf*. Экзон-интронная организация гена *Lanf*, проанализированная по базе данных WGS contigs помощью BLAST также сходна с таковой для других генов *Anf* — рамка считывания *Lanf* разбита тремя интронами, два из которых приходятся на гомеодомен.

Важно отметить, что наиболее близкие к белкам *Anf* гомеодоменные белки семейства *Micro*, описанные японскими исследователями у морских ежей (Nishimura и др., 2004), несмотря на высокое сходство последовательности гомеодомена, отличаются от белков *Anf* по ряду существенных признаков. Так, они не имеют специфических консервативных для *Anf* аминокислотных последовательностей, фланкирующих гомеодомен, не имеют *Engrailed*-домена на N конце белка, и обладают другой экзон-интронной структурой. Кроме того,

собственно гомеодомен у *Micro*, в отличие от *Anf*, расположен ближе к N-, а не к C-концу белка.

В совокупности, эти данные доказывают, что ген, кДНК которого была получена нами в ПЦР, действительно относится к классу *Anf*.

При анализе аминокислотной последовательности *Lanf* оказалось, что в этом белке содержится последовательность из 13 гистидиновых аминокислот, расположенных рядом, что дало возможность попробовать оценить экспрессию полученной мРНК *Lanf* с помощью коммерчески доступных гистидиновых антител. Этот эксперимент был проведен на зародышах шпорцевой лягушки. мРНК *Lanf* была получена путем трансляции *in vitro* с помощью набора mMessage-Machine (Ambion). мРНК *Lanf* была микроинъекцирована в развивающиеся зародыши шпорцевой лягушки на стадии 2 бластомеров в количестве 300–500 пг мРНК на 1 бластомер. Зародыши культивировались до стадии поздней гастролы. После этого проводилось тотальное выделение белков из микроинъекцированных зародышей и анализ наличия белка *Lanf* при помощи анти-гистидиновых антител. В качестве контролей была использована мРНК *GFP*, а также abortивная мРНК *Lanf* со сбитой рамкой считывания (белок не транслируется до конца). В итоге, в образцах после микроинъекции мРНК *Lanf* было обнаружено наличие белка, по весу примерно соответствующего белку *Lanf* (расчетный вес белка *Lanf* — 32 кДа) (рис. 2б). О том, что данный белок является белком *Lanf* свидетельствует и то, что в случае abortивной мРНК *Lanf* также наблюдалась экспрессия белка, узнаваемого гистидиновыми антителами, но по весу существенно более короткого (около 17 кДа).

В целом, описанные выше результаты показывают наличие у тихоокеанской миноги гена *Lanf*, который может быть успешно транслирован в эукариотической системе экспрессии.

Однако этот факт не снимает вопроса об активности гена *Lanf* в эмбриогенезе миног. Доказательством транскрипции мРНК *Lanf* мог бы стать анализ профиля его экспрессии методом количественного ПЦР в реальном времени и паттерна экспрессии методом гибридизации *in situ*.

Анализ экспрессии *Lanf* проводился на 11 стадиях развития — от ранней бластулы (стадия 8 по Tahara, 1988) до 3 дней после вылупления (стадия 26).

Было обнаружено, что некоторое возрастание экспрессии (примерно в 2 раза по сравнению со стадией бластулы) наблюдается на стадии ранней гаструлы, однако затем уровень экспрессии спадает. Более существенное возрастание начинается на стадии поздней нейрулы, усиливается на стадии формирования головного выроста (стадии 21–23), после чего уровень экспрессии снижается на стадии 5–20 сомитов (эта стадия характеризуется также первыми движениями зародыша). В дальнейшем уровень экспрессии остается на относительно низком уровне. Таким образом, максимум экспрессии *Lanf* ограничен во времени и приходится на стадии поздней нейрулы и формирования головного выроста.

Проведенное сравнение профиля экспрессии *Lanf* с профилем экспрессии его гомолога у шпорцевой лягушки, гена *Xanf*, обнаружило сходство в динамике экспрессии двух генов. В качестве заметного отличия можно лишь отметить, что активация экспрессии *Lanf* у миноги происходит на сравнительно более поздней стадии, чем у шпорцевой лягушки – на стадии поздней нейрулы у миноги и на стадии ранней гаструлы у шпорцевой лягушки. Этот факт может быть хорошей иллюстрацией концепции терминальной надставки, согласно которой эволюционные инновации могут успешней закрепляться в ходе естественного отбора, если они возникают на более поздних стадиях развития, поскольку позднее появление снижает риск нарушений базовых программ развития (Richardson and Keuck, 2002; Raff and Raff, 2009). Однако, для более полного понимания картины необходимо также проанализировать экспрессию других генов, вовлеченных в формирование переднего мозга, что выходит за рамки настоящей работы.

Пространственная экспрессия *Lanf* была проанализирована методом гибридизации *in situ*. К сожалению, этим методом нам не удалось обнаружить экспрессию *Lanf* во время гаструляции, вероятно из-за его очень низкого уровня на этой стадии. Экспрессия *Lanf* обнаруживалась начиная с 20 стадии в передней части зачатка головного мозга и в поверхностной эктодерме, покрывающей эту область мозга. Такой паттерн экспрессии схож с паттернами экспрессии *Anf* у других исследованных позвоночных животных (Kazanskaya et al., 1997; Ermakova et al., 1999; Dattani et al., 1999). В ходе дальнейшего развития, экспрессия *Lanf* в области презумптивного диэнцефалона и конечного мозга постепенно снижается, и к стадии 22–23 остается только в ротовой эктодерме и области гипофиза (рис. 2в) (Uchida et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе впервые показано наличие гена класса *Anf* у представителя бесчелюстных позвоночных – животных, у пред-

ков которых впервые в эволюции появляется конечный мозг – самый передний отдел головного мозга, впоследствии развившийся в структуры, обеспечивающие высшую нервную деятельность у животных и человека.

Кроме этого, полученные данные являются важным подтверждением выдвинутой ранее гипотезы о том, что появление генов класса *Anf* у позвоночных явилось важным, если не ключевым, фактором в возникновении у них конечного мозга (рис. 2г).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ (проект № 15-04-04343). Эксперименты по гибридизации *in situ* и изготовлению срезов выполнены за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

Авторы выражают благодарность к. б. н. М.Ю. Ковалеву и сотрудникам биостанции Радуга ИБМ ДВО РАН, к. б. н. Г.А. Базыкину, Е.А. Соловьевой, О.В. Аверьяновой и Евгению Орлову за помощь в выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Dattani M.T., Martinez-Barbera J.P., Thomas P.Q. et al. HESX1: a novel gene implicated in a familial form of septo-optic dysplasia // Acta Paediatr. 1999. V. 88. P. 49–54.
- Ermakova G.V., Solovieva E.A., Martynova N.Y. et al. The homeodomain factor *Xanf* represses expression of genes in the presumptive rostral forebrain that specify more caudal brain regions // Developmental Biology. 2007. V. 307. P. 483–497.
- Ermakova G.V., Alexandrova E.M., Kazanskaya O.V. et al. The homeobox gene, *Xanf-1*, can control both neural differentiation and patterning in the presumptive anterior neurectoderm of the *Xenopus laevis* embryo // Development. 1999. V. 126. P. 4513–4523.
- 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.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
- Fritzsche B. Similarities and differences in lancelet and craniate nervous systems // Isr. J. Zool. 1996. V. 42. P. 147–160.
- Holland L.Z., Short S. Gene duplication, co-option and recruitment during the origin of the vertebrate brain from the invertebrate chordate brain // Brain Behav. Evol. 2008. V. 72. P. 91–105.
- Irimia M., Pineiro C., Maeso I. et al. Conserved developmental expression of *Fezf* in chordates and *Drosophila*

- and the origin of the Zona Limitans Intrathalamica (ZLI) brain organizer // *Evodevo*. 2010. V. 1. P. 7.
- Kazanskaya O.V., Severtzova E.A., Barth K.A. et al. *ANF*: a novel class of homeobox genes expressed at the anterior end of the main embryonic axis of vertebrates // *Gene*. 1997. V. 200. P. 25–34.
- Kitamura K., Nishimura Y., Kubotera N. et al. Transient activation of the micro1 homeobox gene family in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) micromere // *Dev. Genes Evol.* 2002. V. 212. P. 1–10.
- 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.
- Matz M., Shagin D., Bogdanova E. et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR // *Nucleic Acids Research*. 1999. V. 27. P. 1558–1560.
- Murakami Y., Uchida K., Rijli F.M. et al. Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans // *Dev. Biol.* 2005. V. 280. P. 249–259.
- Murakami Y., Ogasawara M., Sugahara F. et al. Identification and expression of the lamprey Pax6 gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates // *Development*. 2001. V. 128. P. 3521–3531.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis*. Amsterdam: North Holland, 1967.
- Nishimura Y., Sato T., Morita Y. et al. Structure, regulation, and function of micro1 in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* // *Dev. Genes Evol.* 2004. V. 214. P. 525–536.
- Raff R.A., Raff E.C. Evolution in the light of embryos: seeking the origins of novelties in ontogeny / In: *Forms and Function in Developmental Evolution* // Cambridge University Press, 2009.
- Richardson M.K., Keuck G. Haeckel's ABC of evolution and development // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2002. V. 77. P. 495–528.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. V. 4. P. 406–425.
- Smith J.J., Kuraku S., Holt C. et al. Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. P. 415–421.
- Suda Y., Kurokawa D., Takeuchi M. et al. Evolution of Otx paralogue usages in early patterning of the vertebrate head // *Dev. Biol.* 2009. V. 325. P. 282–295.
- Sugahara F., Murakami Y., Adachi N. et al. Evolution of the regionalization and patterning of the vertebrate telencephalon: what can we learn from cyclostomes? // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23. P. 475–483.
- Sugahara F., Murakami Y., Kuratani S. Gene expression analysis of lamprey embryo. Springer New York, 2015.
- Tahara Y. Normal stages of development in the lamprey, *Lampetra reissneri* (Dybowski) // *Zoological Science*. 1988. V. 5. P. 109–118.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Toresson H., Martinez-Barbera J.P., Bardsley A. et al. 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.* 1998. V. 208. P. 431–439.
- Uchida K., Murakami Y., Kuraku S. et al. Development of the adenohypophysis in the lamprey: evolution of epigenetic patterning programs in organogenesis // *Journal of Experimental Zoology*. 2003. V. 300. P. 32–47.
- Venkatesh T.V., Holland N.D., Holland L.Z. et al. Sequence and developmental expression of amphioxus *AmphiNk2-1*: insights into the evolutionary origin of the vertebrate thyroid gland and forebrain // *Dev. Genes Evol.* 1999. V. 209. P. 254–259.
- Zaraisky A.G., Ecochard V., Kazanskaya O.V. et al. The homeobox-containing gene *XANF-1* may control development of the Spemann organizer // *Development*. 1995. V. 121. P. 3839–3847.
- Zaraisky A.G., Lukyanov S.A., Vasiliev O.L. et al. A novel homeobox gene expressed in the anterior neural plate of the *Xenopus* embryo // *Developmental Biology*. 1992. V. 152. P. 373–382.

Presence of the Homeobox Gene *Anf* in Lamprey *Lethenteron camtschaticum* Support the Hypothesis That Emergence of Telencephalon in Vertebrates Evolution Was due to the Advent of *Anf* Genes

A. V. Bayramov¹, *, G. V. Ermakova¹, F. M. Eroshkin¹, A. V. Kucheryavy², N. Y. Martynova¹, and A. G. Zaraisky¹, **

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997, Russia

²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

*e-mail: andrbayr@gmail.com

**e-mail: azaraisky@yahoo.com

Received October 19, 2016; in final form, February 14, 2017

An important feature of vertebrates, including *Homo sapiens*, is their complex brain, the anterior part of which — telencephalon — is unique among other animal groups. Earlier in the Laboratory of molecular bases of em-

bryogenesis of IBCH RAS we found monogenic class of homeobox genes *Anf* specific for vertebrate that play a key role in the telencephalon development. Among all vertebrates genes *Anf* were not found only in the most ancient group — cyclostomates (modern lampreys and hagfish), while the telencephalon was described in these animals. According to the literature, the branch leading to cyclostomates, separated from the vertebrate common trunk at the earliest stages of their evolution, about 650 million years ago, and the discovery of *Anf* gene in cyclostomates is important, as it would confirm the hypothesis that the emergence of telencephalon in evolution was due to the advent of the homeobox gene *Anf*. In this paper *Anf* gene was first described in the Pacific lamprey *Lethenteron camtschaticum*, the pattern and dynamics of its expression at the early stages of development of this lamprey were studied and the translation of his full-length cDNA in a eukaryotic expression system (*Xenopus* embryos) was held.

Keywords: Anf, Lanf, cyclostomates, *Lethenteron camtschaticum*, telencephalon development