

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ  
(БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПОЗВОНОЧНЫХ)

УДК 591.3

ГЕТЕРОХРОНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *Lanf* И *FoxG1* У МИНОГИ  
ПОДТВЕРЖДАЕТ ПОЯВЛЕНИЕ КОНЕЧНОГО МОЗГА  
КАК ЭВОЛЮЦИОННО МОЛОДОЙ НАДСТРОЙКИ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ  
НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2020 г. Г. В. Ермакова<sup>а</sup>, А. В. Кучерявый<sup>б</sup>, А. Г. Зарайский<sup>а</sup>, А. В. Байрамов<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997 Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.М. Северцова РАН, Ленинский проспект, д. 33, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: andrbayr@gmail.com

Поступила в редакцию 08.10.2019 г.

После доработки 25.11.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

Одной из важнейших эволюционных инноваций позвоночных является сложноструктурированный конечный мозг — теленцефалон, обеспечивающий высшие формы нервной деятельности у животных и человека. Эта работа посвящена исследованию вопроса появления конечного мозга на ранних этапах эволюции позвоночных. Есть основания полагать, что у миног, в силу их эволюционной древности, могли сохраниться некоторые паттерны экспрессии, характерные для генов, регулирующих развитие конечного мозга у самых первых позвоночных. Поэтому исследование особенностей пространственно-временных паттернов экспрессии ключевых генов-регуляторов развития конечного мозга у миног по сравнению с другими позвоночными может помочь понять молекулярные механизмы, лежавшие в основе появления и эволюционного развития этой уникальной структуры позвоночных. В этой статье приводятся результаты анализа динамики экспрессии некоторых маркеров конечного мозга и структур осевого комплекса органов, *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Gooseoid* и *HoxB9*, на ранних стадиях развития Европейской речной миноги *Lampetra fluviatilis*. Показано, что у генов миног, участвующих в дифференцировке конечного мозга (*Lanf* и *FoxG1*), наблюдается гетерохрония экспрессии по сравнению с более эволюционно продвинутым представителем позвоночных — шпорцевой лягушкой *Xenopus laevis*. Это подтверждает идею о том, что конечный мозг, являясь наиболее эволюционно молодым отделом центральной нервной системы, мог появиться у предков позвоночных в качестве надстройки на поздних стадиях их эмбрионального развития.

**Ключевые слова:** *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Gooseoid*, *HoxB9*, круглоротые, миноги, *Lampetra fluviatilis*, развитие конечного мозга

DOI: 10.31857/S0475145020040047

## ВВЕДЕНИЕ

Проблемы изучения механизмов формирования конечного мозга в онтогенезе, а также исследование факторов, которые могли привести к его появлению в эволюции являются на сегодняшний день актуальными в биологии развития. Настоящая работа посвящена рассмотрению вопроса появления конечного мозга в эволюции позвоночных в контексте молекулярных механизмов, обеспечивающих дифференцировку этого отдела центральной нервной системы. Тот факт, что все остальные типы многоклеточных животных, включая ближайших родственников позвоночных низших хордовых (ланцетники и оболочни-

ки) не имеют структур гомологичных конечному мозгу указывает, на то, что, по всей видимости, он появился в эволюции только у предков современных позвоночных. В связи с этим, важным является вопрос о генетических механизмах, лежащих в основе данного ароморфоза. Согласно теории филэмбриогенеза А.Н. Северцова, одним из путей появления новых признаков в эволюции является надставка конечных стадий. В ходе последующей эволюции время их закладки может смещаться в сторону более ранних стадий, из-за чего наблюдаются гетерохронии в развитии тех или иных структур у животных, принадлежащих к разным филогенетическим группам.

В контексте изучения механизмов появления в эволюции и развития конечного мозга, миноги являются уникальным объектом, как самые древние из ныне живущих позвоночных, у которых имеется конечный мозг. Поскольку ветвь миноги отделилась от общего ствола позвоночных на самых ранних этапах их эволюции, около 500 миллионов лет назад (Kuraki, Kuratani, 2006; Feinberg, Mallatt, 2013), у них с большой вероятностью, мог сохраниться древний тип экспрессионных паттернов генов-регуляторов развития конечного мозга, характерный для предковых форм позвоночных.

В данной работе мы провели сравнение на ранних стадиях эмбриогенеза пространственно-временных паттернов экспрессии, описанных нами ранее регуляторов раннего развития конечного мозга Европейской речной миноги *Lampetra fluviatilis*, *Anf* (*Lanf*) и *FoxG1*, с паттернами экспрессии их ортологов у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Также было проведено аналогичное сравнение для генов, экспрессирующихся в Шпемановском организаторе (*Gooseoid*), в туловищном отделе (*HoxB9*) и в среднем отделе мозга (*Otx2*). В результате мы установили, что экспрессия генов, необходимых для развития конечного мозга (*Anf* и *FoxG1*) у речной миноги активируется на гораздо более поздних стадиях развития, чем у шпорцевой лягушки. При этом, у остальных проанализированных генов подобной гетерохронии не наблюдается. Если считать, что динамика экспрессии выбранных генов-регуляторов определяет динамику программ, ответственных за эмбриональное развитие, то обнаруженная нами гетерохрония в начале экспрессии *Anf* и *FoxG1* в эмбриогенезе миноги и шпорцевой лягушки свидетельствует об относительно более поздней спецификации зачатка конечного мозга у миноги. В свою очередь, в силу биогенетического закона, это может свидетельствовать о сравнительно недавнем, по сравнению с другими отделами ЦНС, появлении конечного мозга в эволюции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные

Взрослые половозрелые особи *Lampetra fluviatilis* были выловлены в Ленинградской области. Зародыши получались путем искусственного оплодотворения в лабораторных условиях. Икра половозрелых самок сдаивалась в контейнер и ак-

тивировалась в растворе 0.1× MMR (температура 12°C) в течение 3 минут при постоянном помешивании. После активации в раствор добавлялась сперма половозрелого самца, икра инкубировалась 10 минут при постоянном помешивании. После оплодотворения икра дважды промывалась раствором 0.1× MMR. Инкубация осуществлялась в чашках Петри (9 см) на 12 градусах по Цельсию. 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 (Sive et al., 2000), стадии определялись согласно таблицам нормального развития Nieuwkoop and Faber (Nieuwkoop and Faber, 1967).

### Обратная транскрипция-ПЦР

Для количественного ПЦР в реальном времени были отобраны три группы по 50 зародышей *L. fluviatilis* 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 мл водой, очищенной в приборе milli-Q. Для ПЦР использовалась стандартная программа из 40 циклов с горячим стартом. Данные ПЦР импортировались в Microsoft Excel и анализировались методом  $\Delta\Delta C_t$ . Нормализация полученных результатов проводилась по двум контрольным генам: орнитиндекарбоксилазе (*ODC*) и фактору элонгации (*EF1alpha*). Для количественного ПЦР в реальном времени использовались следующие пары праймеров:

*Lanf*-ОТ-ПЦР-прямой GGCCCTCGCACGTCCTTCA и

*Lanf*-ОТ-ПЦР-обратный CTCGTCCACGCCGACTCT;

*FoxG1*-ОТ-ПЦР-прямой CTTTCGGGACTTACCGTTCCA и

*FoxG1*-ОТ-ПЦР-обратный CCACTTGACTTTGCTGCTGA;

*Otx2*-ОТ-ПЦР-прямой GCAGAGCGGCGGGCAGAGCAA и  
*Otx2*-ОТ-ПЦР-обратный CCTCTCAGAGCACCTGGAАСТТ;  
*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-прямой GACACGAGGACAACCGAGAG и  
*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-обратный ATCACATCACACGGGCASAA;  
*HoxB9*-ОТ-ПЦР-прямой CTGCCCTACACCAAGTTCC и  
*HoxB9*-ОТ-ПЦР-обратный GATCTTCACCTGGCGCTCG;  
*EF1alpha*-ОТ-ПЦР-прямой AGAACGTGTCTGTCAAGGATGT  
и *EF1alpha*-ОТ-ПЦР-обратный  
TAGCCGGCATTGATCTGGCCA; *ODC*-ОТ-ПЦР-прямой  
CCGTCGGTATCATCGCCAAG и  
*ODC*-ОТ-ПЦР-обратный CGAAGAGGATGCAGTTGAAG;  
*X. laevis*:  
*OTX2a*-ОТ-ПЦР-прямой TTCAATGCTGACTGCTTGGAT и  
*OTX2a*-ОТ-ПЦР-обратный AGATGAGGTTTGGCCCGAG;  
*FoxG1*-ОТ-ПЦР-прямой AACCAAGCAGGGCTGGCAGAA и  
*FoxG1*-ОТ-ПЦР-обратный CCGCTCTATCCATAAAGGTG;  
*Xanf1*-ОТ-ПЦР-прямой CCGCAGAAGAGGAGACAAAG и  
*Xanf1*-ОТ-ПЦР-обратный TAGTGAAAGCAGTTCGGGGT;  
*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-прямой AGTGCCTCACCAAATGCTCC и  
*Goosecoid*-ОТ-ПЦР-обратный GTGAAGATGGTCTGTGCCT;  
*HoxB9*-ОТ-ПЦР-прямой AAAGTGTGTGAAGCCAACGC и  
*HoxB9*-ОТ-ПЦР-обратный TTCTTTCTGGAGGAGCGAGC;  
*EF*-ОТ-ПЦР-прямой TCATACAGCTCATATTGCTTGTAAGT и  
*EF*-ОТ-ПЦР-обратный CAAGTGGAGGATAGTCTGAGAA;  
*ODC*-ОТ-ПЦР-прямой GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC и  
*ODC*-ОТ-ПЦР-обратный TTCGGGTGATTCCTTGCCAC.  
*Гибридизация in situ*

Фрагменты генов *Lanf*, *FoxG1* и *Otx2* для гибридизации *in situ* были получены методом ОТ-ПЦР с использованием следующих пар праймеров:

*FoxG1*-прямой GCCTCAACAAGTGCTTCGTGAAGGT и  
*FoxG1*-обратный GTTATATACAGTTTGTATTTACAAGCCAT;  
*Otx2*-прямой GCAGAGCGGCGGGCAGAGCAA и  
*Otx2*-обратный CCTCTCAGAGCACCTGGAАСТТ;  
*Lanf*-прямой CGGCGCTCCAGAAGTTCATTCTC и  
*Lanf*-обратный CACCGCGCGGAGCTGCGACTCG.

Для ПЦР использовался набор фирмы Evrogen с полимеразой Encuslo. Полученные кДНК фрагменты были клонированы в вектор *pAL2-T* (Evrogen) и отсекуены.

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 гибридационный буфер содержали: 50% формамид, 5× SSC, 100 мкг/мл гепарин, 100 мкг/мл tRNA, 5 mM EGTA, 1% CHAPS, 2% Tween20. После предгибридации (1 ч 70°C), зародыши ин-

кубировались ночь на 70°C в гибридизационном буфере, содержащем 5 мкг/мл Dig-меченой РНК пробы, промывались (дважды в гибридизационном буфере, дважды в двухкратном растворе SSC 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 алкалинной фосфатазой (фирмы Roche, разведение 1 : 1500 в блокирующем буфере) в течение ночи на 4°C.

Затем эмбрионы были 8 раз промыты в буфере МАВТ (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 (заподыши помещались в 4% агарозные блоки).

Фотографирование производилось на стереомикроскопе Leica M205.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Гены, выбранные для сравнения программ развития конечного мозга и туловищного отдела у эмбрионов миноги и шпорцевой лягушки*

В качестве маркеров динамики разворачивания генетических программ развития конечного мозга и туловищного отдела тела эмбрионов миноги и шпорцевой лягушки были использованы паттерны экспрессии следующих генов: *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid* и *HoxB9*. Далее приводится краткая характеристика каждого из этих генов.

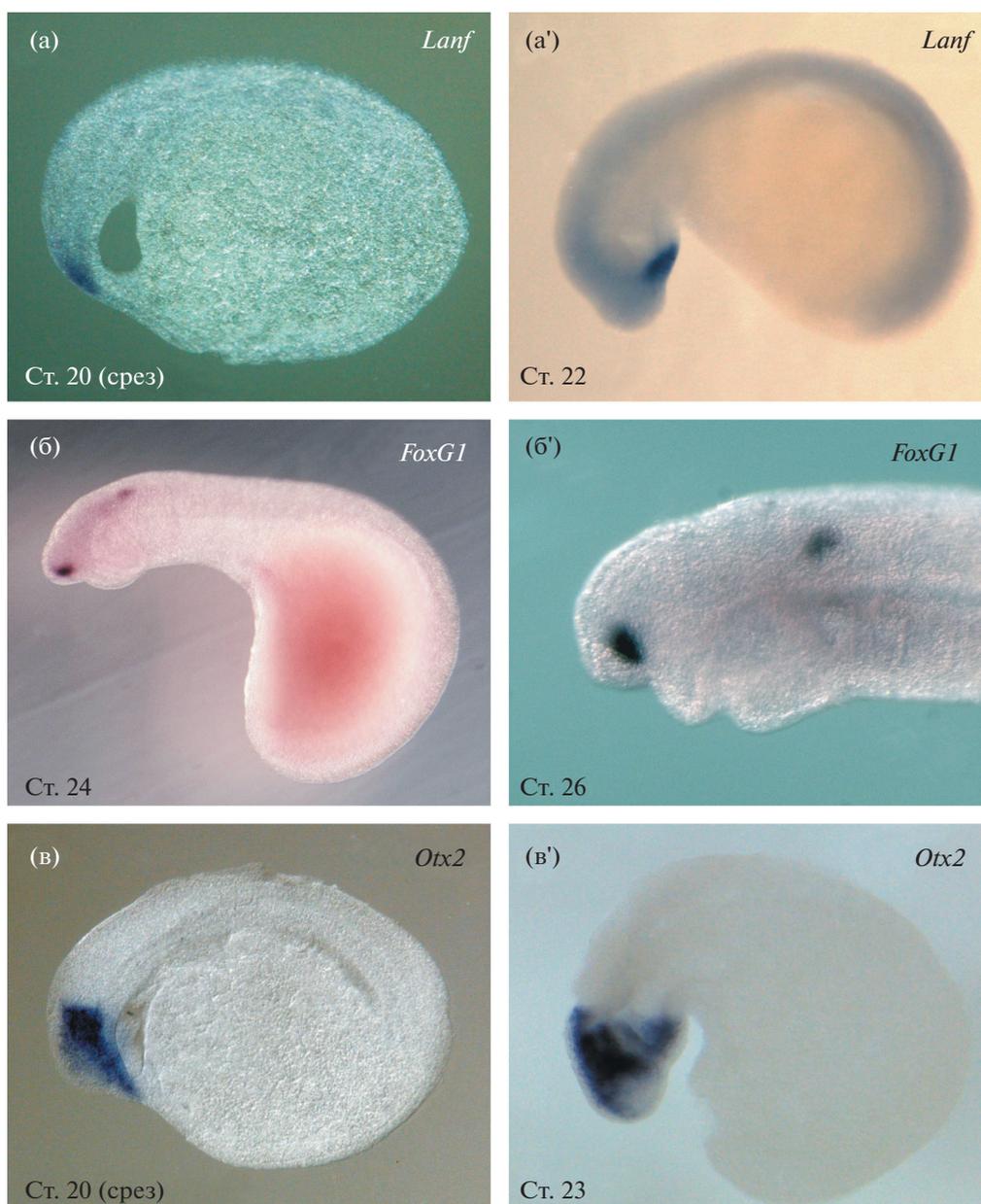
Гомеобоксные гены класса *Anf/Hesx1* (далее *Anf*) являются одним из ключевых регуляторов развития переднего мозга позвоночных. Впервые ген *Anf* был описан в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН в 1992 году у шпорцевой лягушки (Zaraisky et al., 1992). Исследования, проведенные впоследствии 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, 2007; Eroshkin et al., 2002; Martynova et al., 2004; Bayramov et al., 2004). Нам удалось обнаружить и клонировать кДНК гомологов *Anf* у трех видов миног *Lethenteron camtschaticum*, *Lampetra fluviatilis* и *Petromyzon marinus* (Bayramov et al., 2016). Экспрессия гена *Lanf* обнаруживается у речной миноги методом гибридизации *in situ* начиная со стадии поздней нейрулы (ст. 20 по Tahara, 1988) на переднем конце формирующейся нервной системы (рис. 1а, 1а'). Как уже отмечалось нами ранее

(Байрамов и др., 2017), такой пространственный паттерн экспрессии *Lanf* у миног в целом соответствует паттерну экспрессии генов *Anf* у других групп позвоночных.

Поскольку впервые в эволюции конечный мозг появляется именно у миног, обнаружение у представителей этой группы гомологов гена *Anf* стало важным подтверждением выдвинутой нами ранее гипотезы о том, что появление у позвоночных генов класса *Anf* могло быть одним из ключевых факторов, создавших условия для возникновения у них конечного мозга (Bayramov et al., 2016; Байрамов и др., 2017). В частности, мы показали, что у миноги, так же, как у шпорцевой лягушки, *Anf* ингибирует экспрессию *Otx2* в области будущего переднего мозга, тем самым как бы “очищая” переднюю часть нервной пластинки от экспрессии этого регулятора развития более каудальных отделов мозга. Это позволяет клеткам в передней части нервной пластинки начать экспрессировать один из важнейших регуляторов развития конечного мозга – *FoxG1*.

Белок, кодируемый геном *FoxG1*, относится к семейству Forkhead-связывающих транскрипционных факторов и играет ключевую роль в индукции и пространственной организации развития конечного мозга у позвоночных. Эксперименты по подавлению и усилению его функции показали, что *FoxG1* участвует в развитии нейронов вентральной (подкорковой) зоны конечного мозга. Экспрессия *FoxG1* в переднем отделе мозга достаточно консервативна у разных групп позвоночных и, поэтому этот ген часто применяется в качестве маркера данного отдела мозга (Kumamoto, Hanashima, 2017). У всех исследованных позвоночных *FoxG1* (ранее также известный как *BF-1*), является одним из первых транскрипционных факторов, экспрессирующихся в передней части нервной пластинки – области будущего конечного мозга и в дальнейшем его экспрессия сохраняется до зрелых стадий (Danesin, Houart, 2012). Было показано, что ген *FoxG1* имеет важное значение для многих аспектов развития конечного мозга и выживания нейронов в коре головного мозга у взрослых организмов. Нокаут *FoxG1* у рыб и мышей приводит к редукции вентральной области конечного мозга, что отражается в вентральной экспансии маркеров дорсальной части конечного мозга (Martynoga et al., 2005, Danesin et al., 2009). У человека мутации гена *FOXG1* приводят к нарушениям развития, таким как синдром Ретта, эпилепсия, постнатальная микроцефалия, тяжелая умственная отсталость, нарушения речи, дискинезия и гипогенез мозолистого тела (Kortum et al., 2011; Danesin, Houart, 2012).

Пространственный паттерн экспрессии *FoxG1* у речной миноги в целом соответствует паттернам экспрессии *FoxG1* у других позвоночных, в том



**Рис. 1.** Паттерны экспрессии генов *Lanf*, *FoxG1* и *Otx2* в раннем развитии Европейской речной миноги показаны методом гибридизации *in situ*. а – на стадии 20 ген *Lanf* экспрессируется в передней части нервной системы – области будущего теленцефалона и диенцефалона. а' – на стадии 22 уровень экспрессии гена *Lanf* уменьшается в области переднего мозга и возрастает в ротовой эктодерме и гипофизарной плакоде. б, б' – ген *FoxG1* экспрессируется в области будущего теленцефалона и ушных плакодах. в – на стадии 20 ген *Otx2* экспрессируется в области будущего переднего и среднего отделов мозга. в' – на стадии 23 ген *Otx2* экспрессируется в области будущего промежуточного и среднего отделов мозга.

числе у шпорцевой лягушки. В тоже время имеется и ряд отличий. Так, экспрессия *FoxG1* у миноги впервые в развитии детектируется в формирующихся ушных плакодах и вентральной части теленцефалона (рис. 1б, 1б'). При этом у миноги *FoxG1* совсем не экспрессируется в дорзальной части теленцефалона, тогда как у других позвоночных экспрессия этого гена в теленцефалоне

носит градиентный характер, с возрастанием интенсивности от дорзальной части к вентральной (Danesin, Houart, 2012). Также у миноги в отличие от других позвоночных экспрессия *FoxG1* не обнаруживается в формирующихся глазных структурах, что может объясняться особенностью развития этих структур у миног. В отличие от челюстноротых у миног наблюдается

двухступенчатое развитие глаза и зрительного нерва. На эмбриональной стадии глаз покрыт толстой непрозрачной кожей, хрусталик незрелый что, возможно, указывает на примитивное состояние зрительной системы позвоночных (Melendez-Ferro et al., 2002; Suzuki et al., 2015). В этот период образуется небольшое количество волокон зрительного нерва. Позже в онтогенезе формируются новые оптические волокна, и после метаморфоза у взрослых миног развиваются полноценные глазные камеры.

Гомеодоменный транскрипционный фактор *Otx2* играет важную роль в формировании переднего мозга и развитии глазных структур (Beby, Lamonegrie, 2013). Было показано, что эктопическая экспрессия *Otx2* приводит у шпорцевой лягушки к уменьшению размеров туловищного отдела и появлению вторичной железы вылупления (Boyl et al., 2001). Фактор *Otx2* вовлечен в молекулярный механизм, обеспечивающий дифференцировку глутаматэргических нейронов в таламусе путем репрессии транскрипционного регулятора *Mash1*. Кроме развития нейронов таламуса, *Otx2* также вовлечен в дифференцировку и последующее развитие и пролиферацию мезенцефалических дофаминэргических предшественников. Нокаут *Otx2* летален, а у гомозиготных эмбрионов полностью отсутствуют структуры переднего и среднего отделов мозга. При экспериментальном понижении уровня экспрессии гена *Otx2* наблюдаются нарушения развития средних отделов мозга (Bozzy, Simeone, 2014).

Экспрессия гомеобоксного гена *Gooseoid (Gsc)* наблюдается в первичном эмбриональном организаторе как у позвоночных, так и у беспозвоночных (Blum et al., 1992; Broun et al., 1999). При экспериментальной эктопической экспрессии на брюшной стороне, то есть в области противоположной нормальному месту экспрессии, *Gsc* эффективно индуцирует образование вторичных эмбриональных осей у шпорцевой лягушки (Cho et al., 1991). Эта способность *Gsc* имитировать активность Шпемманновского организатора объясняется его хорошо охарактеризованной способностью репрессировать транскрипцию генов, участвующих в функционировании сигнальных каскадов *Wnt8a* и *VMP4* у разных групп позвоночных. Кроме того, активно исследуется роль гена *Gsc* в регуляции подвижности и миграционного поведения клеток (Ulmer et al., 2017).

Ген *HoxB9*, экспрессирующийся в эктодермальной и мезодермальной тканях, с момента его описания применяется в качестве маркера задних отделов нервной системы (Sharpe et al., 1987).

#### Сравнение временных паттернов экспрессии выбранных генов в раннем развитии миноги и шпорцевой лягушки

Колоколообразный профиль временной экспрессии *Anf* у миноги похож на профиль экспрессии его ортолога у шпорцевой лягушки: достаточно резкое возрастание и последующий спад на более поздних стадиях развития (рис. 2). Однако, в отличие от шпорцевой лягушки у миноги выявляется отчетливая гетерохрония в экспрессии этого гена на сравнительно более поздние стадии развития. Так, по данным qRT-PCR, у шпорцевой лягушки возрастание экспрессии *Anf* наблюдается еще до начала нейруляции, на стадии поздней гастрюлы, в то время как у миноги данный ген начинает активно экспрессироваться только начиная со стадии поздней нейрулы, что соответствует и данным полученным с помощью метода гибридизации *in situ* (ст. 20 по Tahara, 1988) (рис. 2).

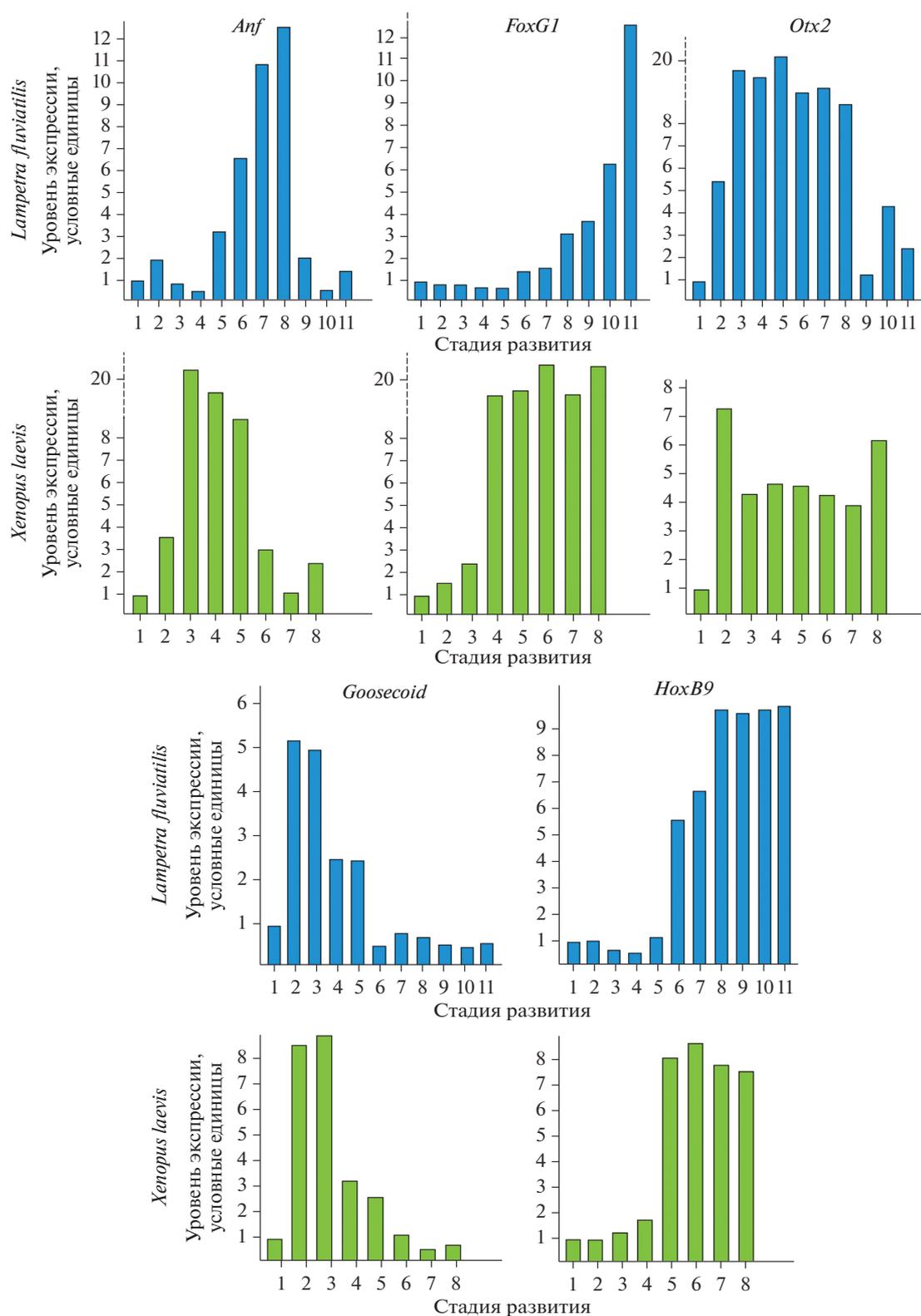
Похожая гетерохрония наблюдается у миноги и в случае гена *FoxG1*. Уровень экспрессии этого гена у речной миноги поддерживается на очень низком уровне во время гастрюляции и нейруляции и начинает повышаться только на стадии роста головы (стадия 21, Tahara, 1988) (рис. 2). После этого постепенное увеличение экспрессии отмечается на стадиях 23, 24 и 26.

В отличие от миноги у шпорцевой лягушки *FoxG1* начинает экспрессироваться уже в конце гастрюляции — начале нейруляции в клетках зачатка конечного мозга. Проведенный нами анализ экспрессии *FoxG1* у шпорцевой лягушки также показал активацию экспрессии этого гена на стадии ранней нейрулы (рис. 2).

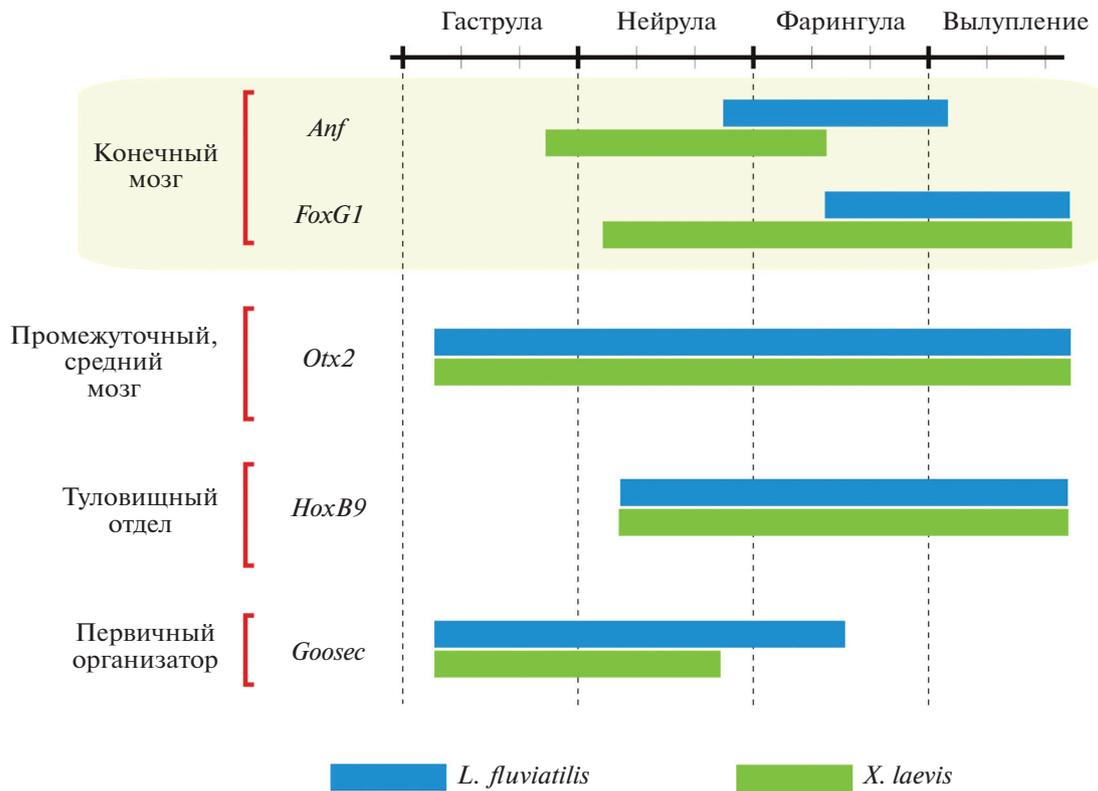
Наиболее наглядно гетерохронию экспрессии *FoxG1* у миноги можно продемонстрировать, если использовать в качестве временного счетчика для сравнения стадий у разных видов количество образовавшихся к данной стадии сомитов (Gorodilov, 1992, 2010). Так, если у остальных изученных позвоночных, *FoxG1* начинает впервые экспрессироваться в зачатке конечного мозга в диапазоне от пресомитной стадии у шпорцевой лягушки до стадии 5–6 сомитов у рыб и млекопитающих (Tao, Lai, 1992; Toresson et al., 1998; Zhao et al., 2009) что в целом соответствует стадии ранней нейрулы, то у миног экспрессия этого гена обнаруживается в области конечного мозга только на стадии 22 сомитов, т.е. уже после окончания нейруляции (стадия 22 по Tahara, 1988).

Для проверки специфичности полученных результатов, полученных по генам *Lanf* и *FoxG1*, мы провели аналогичный сравнительный анализ для ряда других генов регуляторов раннего развития позвоночных.

Ген *Otx2* у миног экспрессируется в передней части формирующейся нервной системы (рис. 1в, 1в')



**Рис. 2.** Анализ динамики экспрессии генов *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid* и *HoxB9* у речной миноги и шпорцевой лягушки, проведенный методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Обозначение проанализированных стадий развития: *L. fluviatilis*: 1 – бластула, 2 – ранняя гаструла, 3 – поздняя гаструла, 4 – ранняя нейрула, 5 – поздняя нейрула, 6 – стадия головного выроста-1, 7 – стадия головного выроста-2, 8 – стадия головного выроста-3, 9 – начало самопроизвольных движений, 10 – стадия вылупления, 11 – 3 суток после вылупления. *X. laevis*: 1 – бластула, 2 – ранняя гаструла, 3 – поздняя гаструла, 4 – ранняя нейрула, 5 – поздняя нейрула, 6 – стадия 20 (по Nieuwkoop, Faber, 1967), 7 – стадия 23 (по Nieuwkoop, Faber, 1967), 8 – стадия 28 (по Nieuwkoop, Faber, 1967).



**Рис. 3.** Схема проведенного сравнительного анализа динамики экспрессии исследованных генов у речной миноги и шпорцевой лягушки.

и его экспрессия начинается уже на стадии поздней гастрюлы как у миноги, так и у шпорцевой лягушки (рис. 2).

Ген *HoxB9*, экспрессия которого обнаруживается в туловищном и хвостовом отделах (Sharpe et al., 1987) также не обнаруживает гетерохронии у миног и амфибий (рис. 2).

Ген *Goosecoid* – один из наиболее ранних маркеров индукции осевых структур и у миног и у амфибий активируется на стадии ранней гастрюлы (рис. 2).

Таким образом, на основе проведенного анализа можно заключить, что гетерохрония не является типичным явлением для всех проанализированных генов, участвующих в развитии осевых структур и мозга у миног, а характерна только для генов, вовлеченных в дифференцировку конечного мозга – генов *Anf* и *FoxG1*. Полученные результаты представлены в виде схемы на рис. 3.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Выявленная гетерохрония экспрессии *Lanf* и *FoxG1* у миноги, как одного из наиболее древних представителей позвоночных, может отражать тот факт, что конечный мозг является самым эволюционно молодым отделом головного мозга.

Согласно гипотезе Геккеля, эволюционные инновации могут успешней проходить естественный отбор если они появляются на более поздних стадиях эмбриогенеза, поскольку в этом случае они вносят меньше нарушений в базовую программу онтогенеза (Richardson, Keuck, 2002; Raff, Raff, 2009). Сравнительно поздняя экспрессия *Lanf* и *FoxG1* у миноги, выявленная в этой работе, на уровне экспрессии генов подтверждает более позднюю дифференцировку конечного мозга в онтогенезе миног по сравнению с представителями более эволюционно продвинутых позвоночных. Поскольку на сегодняшний день миноги являются наиболее древними из существующих представителей позвоночных, эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что конечный мозг является наиболее эволюционно молодым отделом мозга, который мог появиться у предков позвоночных на поздних стадиях их эмбрионального развития.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ**

Работа выполнена за счет гранта РФФИ (проект № 18-04-00015). Эксперименты по ОТ-ПЦР на зародышах шпорцевой лягушки выполнены за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00098). Получение серий образцов кДНК ранних стадий раз-

вития шпорцевой лягушки выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 18-29-07014 МК).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними приняты в ИБХ РАН, ASPA'1986 и Хельсинкской декларацией были соблюдены.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Г.В. Ермакова — инкубация зародышей речной миноги, подготовка образцов и проведение гибридизации *in situ*, фототрафирование, подготовка рисунков.

А.В. Кучерявый — получение половозрелых производителей и живых зародышей речной миноги.

А.Г. Зарайский — планирование экспериментов, написание статьи.

А.В. Байрамов — планирование экспериментов, подготовка образцов тотальной РНК и ОТ-ПЦР, написание статьи, подготовка рисунков.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bayramov A.V., Ermakova G.V., Eroshkin F.M. et al.* The presence of the *Anf/Hesx1* homeobox in lampreys indicates that it may play important role in telencephalon emergence // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 39849.
- Bayramov A.V., Martynova N.Yu., Eroshkin F.M. et al.* The homeodomain-containing transcription factor *X-nkx-5.1* inhibits expression of the homeobox gene *Xanf-1* during the *Xenopus laevis* forebrain development // *Mechanism of Development.* 2004. V. 121. P. 1425–1441.
- Beby F., Lamonerie T.* The homeobox gene *Otx2* in development and disease // *Exp. Eye. Res.* 2013. V. 111. P. 9–16.
- Blum M., Gaunt S.J., Cho K.W. et al.* Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene *goosecoid* // *Cell.* 1992. V. 69. P. 1097–1106.
- Boyl P.P., Signore M., Annino A. et al.* *Otx* genes in the development and evolution of the vertebrate brain // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2001. V. 19. № 4. P. 353–363.
- Bozzi Y., Simeone A.* *Otx* genes and seizure susceptibility // *Molecular & Cellular Epilepsy.* 2014. V. 1. e74.
- Broun M., Sokol S., Bode H.R.* *Cngsc*, a homologue of *goosecoid*, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra* // *Development* 1999. V. 126. P. 5245–5254.
- Cho K.W., Blumberg B., Steinbeisser H. et al.* Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *goosecoid* // *Cell.* 1991. V. 67. P. 1111–1120.
- Danesin C., Peres J.N., Johansson M. et al.* Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by *Foxg1* // *Dev. Cell.* 2009. V. 16. № 4. P. 576–587.
- Danesin C., Houart C.* A Fox stops the Wnt: implications for forebrain development and diseases // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. № 4. P. 323–330.
- 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.
- 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.
- 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.
- Feinberg T.E., Mallatt J.* The evolutionary and genetic origins of consciousness in the Cambrian Period over 500 million years ago // *Front Psychol.* 2013. V. 4. P. 667.
- Gorodilov Y.N.* Rhythmic processes in lower vertebrate embryo genesis and their role for developmental control // *Zool. Sci.* 1992. V. 9. P. 1101–1111.
- Gorodilov Y.N.* The biological clock in vertebrate embryogenesis as a mechanism of general control over the developmental organism // *Russian J. Developmental Biology.* 2010. V. 41. P. 243–260.
- Kortüm F., Das S., Flindt M. et al.* The core *FOXP1* syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis // *J. Med. Genet.* 2011. V. 8. № 6. P. 396–406.
- Kumamoto T., Hanashima C.* Evolutionary conservation and conversion of *Foxg1* function in brain development // *Dev. Growth. Differ.* 2017. V. 59. № 4. P. 258–269.
- Kuraku S., Kuratani S.* Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences // *Zoolog. Sci.* 2006. V. 23. № 12. P. 1053–1064.
- 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.
- Martynoga B., Morrison H., Price D.J. et al.* *Foxg1* is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis // *Dev. Biol.* 2005. V. 283(1). P. 113–127.
- Meléndez-Ferro M., Villar-Cheda B., Abalo X.M. et al.* Early development of the retina and pineal complex in the sea lamprey: comparative immunocytochemical study // *J. Comp. Neurol.* 2002. V. 442. № 3. P. 250–265.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal Table of *Xenopus laevis* // Amsterdam: North Holland, 1967.
- Raff R.A., Raff E.C.* Evolution in the light of embryos: seeking the origins of novelties in ontogeny // *Forms and Function in Developmental Evolution* / Eds. Laubichler M.D., Maienschein J. 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.

- Roth M., Bonev B., Lindsay J. et al. FoxG1 and TLE2 act cooperatively to regulate ventral telencephalon formation // *Development*. 2010. V. 137. № 9. P. 1553–1562.
- Sive H., Grainger R.M., Harland R.M. Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, 2000.
- Sharpe C.R., Fritz A., De Robertis E.M. et al. A homeobox-containing marker of posterior neural differentiation shows the importance of predetermination in neural induction // *Cell*. 1987. V. 50. № 5. P. 749–758.
- Suzuki D.G., Murakami Y., Escriva H. et al. A comparative examination of neural circuit and brain patterning between the lamprey and amphioxus reveals the evolutionary origin of the vertebrate visual center // *J. Comp. Neurol.* 2015. V. 523. № 2. P. 251–261.
- Tahara Y. Normal stages of development in the lamprey, *Lampetra reissneri* (Dybowski) // *Zoological Science*. 1988. V. 5. P. 109–118.
- Tao W., Lai E., Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain // *Neuron*. 1992. V. 8. № 5. P. 957–666.
- 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.
- Ulmer B., Tingler M., Kurz S. et al. A novel role of the organizer gene Goosecoid as an inhibitor of Wnt/PCP-mediated convergent extension in *Xenopus* and mouse // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 43010.
- 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.
- Zhao X.F., Suh C.S., Prat C.R. et al. Distinct expression of two foxg1 paralogues in zebrafish // *Gene. Expr. Patterns*. 2009. V. 9. № 5. P. 266–272.
- Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Ерошкин Ф.М. и др. Гомеобоксный ген семейства *Anf*, обнаруженный у тихоокеанской миноги *Lethenteron camtschaticum*, подтверждает гипотезу о важности появления генов *Anf* для возникновения конечного мозга в эволюции позвоночных // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 4. С. 241–251.

## Heterochrony of the Expression of *Lanf* and *Foxg1* in Lamprey Confirms the Appearance of the Telencephalon as an Evolutionarily Young Superstructure in the Central Nervous System of Vertebrates

G. V. Ermakova<sup>1</sup>, A. V. Kucheryavyy<sup>2</sup>, A. G. Zaraisky<sup>1</sup>, and A. V. Bayramov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

<sup>2</sup>*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: andrbayr@gmail.com

One of the most important evolutionary innovations of vertebrates is a complex structured telencephalon which provides higher forms of nervous activity in animals and humans. This work is devoted to the study of the appearance of the telencephalon in the early stages of vertebrate evolution. At the same time, there is reason to believe that lampreys, due to their evolutionary antiquity, could retain some ancient expression patterns of genes that regulate the development of the brain in the very first vertebrates. The study of the features of spatio-temporal expression patterns of key genes that regulate the development of the forebrain in lampreys compared with other vertebrates can help to understand the molecular mechanisms underlying the appearance and evolutionary development of this unique structure of vertebrates. This article presents the results of analysis of the dynamics of gene expression of *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid* and *HoxB9* in the early stages of development of the European river lamprey *Lampetra fluviatilis*. It was shown that lamprey genes involved in telencephalon differentiation (*Lanf* and *FoxG1*) exhibit heterochrony of expression compared with more evolutionarily advanced representatives of vertebrates. This fact confirms the idea that the telencephalon, being the most evolutionarily young part of the brain, could appear in vertebrate ancestors as a superstructure in the late stages of their embryonic development.

**Keywords:** *Lanf*, *FoxG1*, *Otx2*, *Goosecoid*, *HoxB9*, cyclostomates, *Lampetra fluviatilis*, telencephalon development, heterochrony