ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 3, с. 196–204

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 591.3

ЭКСПРЕССИЯ ГОМОЛОГА *ENGRAILED* У ЛИЧИНОК И ЮВЕНИЛЕЙ АННЕЛИДЫ *ALITTA VIRENS* РАСКРЫВАЕТ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СЕГМЕНТОВ ИЗ ЗОНЫ РОСТА

© 2023 г. А. И. Кайров[a], В. В. Козин[a, *]

[a]*Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия*

**e-mail: v.kozin@spbu.ru*

Поступила в редакцию 15.01.2023 г.
После доработки 03.05.2023 г.
Принята к публикации 04.05.2023 г.

Эволюционное происхождение сегментации до сих пор остается загадкой для исследователей. У членистоногих одним из важнейших и наиболее консервативных участников генетической программы сегментации является ген *engrailed*. Ортологи этого гена были выявлены у аннелид, однако их роль неоднозначна: если у одних видов их экспрессия предшествует разделению тела на сегменты, то у других – нет. Мы изучили экспрессию *engrailed* у нереидной полихеты *Alitta virens* в ходе метаморфоза и формирования первых постларвальных сегментов. Полученные данные свидетельствуют в пользу возможной вовлеченности этого гена в процесс формирования сегментов из зоны роста у *A. virens*. На личиночных стадиях *engrailed* экспрессируется в нейроэктодермальных клетках, в зоне роста, а также в метамерно расположенных рядах эпидермальных клеток на передней границе каждого сегмента. При переходе от метатрохофоры к стадии нектохеты кольцевой домен экспрессии в зоне роста расширяется, а затем разделяется на два. Со временем расстояние между этими кольцевыми доменами увеличивается, что объясняется ростом зачатка первого постларвального сегмента. Формирование следующих постларвальных сегментов происходит сходным путем. Обобщив полученные нами результаты и имеющиеся в литературе данные, мы сопоставили паттерны экспрессии *engrailed* у аннелид и членистоногих. Наш анализ свидетельствует об отсутствии консерватизма в паттернировании сегментов, последовательно развивающихся из зоны роста у первичноротых. Мы предполагаем, что у *A. virens* удлинение переднезадней оси происходит одновременно со спецификацией нового сегмента. Эти особенности отличаются от известных моделей работы зоны роста и указывают на возможность существования специфичного для нереид механизма сегментации.

Ключевые слова: сегментация, Annelida, Nereididae, личиночное развитие, метаморфоз, элонгация оси, ген полярности сегментов *engrailed*, паттерн экспрессии

DOI: 10.31857/S0475145023030035, **EDN:** ZRAFGE

ВВЕДЕНИЕ

Сегментированными считают три группы билатерально-симметричных животных: членистоногие, хордовые и аннелиды. Однако до сих пор нет единого мнения по поводу происхождения сегментации, которая могла возникнуть либо у общего предка всех билатерий, либо эволюционировать в разных таксонах независимо (Chipman, 2018, 2020a).

Среди членистоногих процесс становления сегментации наиболее изучен у *Drosophila melanogaster* (Chipman, 2020b). В результате сложных взаимодействий между генами материнского эффекта и зиготическими генами происходит единовременное паттернирование бластодермы на метамерные участки, на границах которых активируется экспрессия “генов полярности сегментов”: *wingless* (*wnt1*) и *engrailed* (*en*). Они отвечают за создание системы координат внутри сегмента и являются “маркерами” сегментации. Однако дрозофила обладает сильно модифицированным развитием: она имеет длинную зародышевую полоску, лишенную зоны роста. Эти особенности существенно затрудняют сравнительное изучение механизмов развития сегментированного плана строения.

Более подходящими объектами для эволюционного анализа феномена сегментации признаны насекомые с короткой зародышевой полоской, одним из представителей которых является жук *Tribolium castaneum*. Несмотря на различия в молекулярно-генетических механизмах сегментации у насекомых, гены *wingless* и *engrailed* у триболиума выполняют ту же функцию, что и у дрозо-

филы. Более того, "гены полярности сегментов" являются наиболее консервативными регуляторами метамеризации тела у всех членистоногих – паттерны их экспрессии с периодичностью в один сегмент отмечены у насекомых, ракообразных, хелицеровых и многоножек (Patel et al., 1989a; Damen, 2002; Hughes, Kaufman, 2002).

Гомологи "генов полярности сегментов" были выявлены и у представителей кольчатых червей. Была охарактеризована экспрессия *wingless* и *engrailed* у нереидных полихет (Prud'homme et al., 2003; Steinmetz et al., 2011; Козин и др., 2019a), а также у *Capitella teleta*, *Hydroides elegans, Chaetopterus* sp., *Pristina leidyi*, *Helobdella* sp. (Patel et al., 1989b; Bely, Wray, 2001; Seaver et al., 2001; Seaver, Kaneshige, 2006). Паттерны экспрессии этих генов у нереид *Platynereis dumerilii* и *Alitta virens* позволяют предположить их участие в создании метамерного плана строения: *engrailed* экспрессируется в ряду клеток на передней границе сегмента, а *wingless* – на задней границе, что соответствует распределению продуктов генов-ортологов в парасегментах у насекомых. Однако у других аннелид отсутствует привязка экспрессии *wingless* и *engrailed* к межсегментным границам, что ставит под сомнение их участие в разметке всего тела на метамерные области (Seaver, Kaneshige, 2006).

Кроме того, экспрессия *engrailed* у аннелид была описана либо на личиночных стадиях, либо в ходе регенерации или анаморфного роста (т.е. последовательного появления сегментов из зоны роста) взрослых червей, но не была охарактеризована при переходе от личиночного к постларвальному развитию (т.е. в конце метаморфоза и при появлении первых постларвальных сегментов). Чтобы прояснить молекулярно-генетические основы последовательного формирования сегментов из зоны роста и определить, насколько эволюционно консервативен при этом паттерн экспрессии *engrailed*, мы изучили динамику распределения мРНК этого гена при метаморфозе и у молодых ювенильных особей беломорской полихеты *A. virens*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелых особей *A. virens* отлавливали в окрестностях Морской Биологической Станции (МБС) СПбГУ (губа Чупа, Кандалакшский залив Белого моря). Искусственное оплодотворение и содержание эмбриональной культуры производили по описанной ранее методике (Дондуа, 1975). Эмбрионы и ранние личиночные стадии культивировали при 14°C, на стадии ранней нектохеты (180 часов после оплодотворения, ч.п.о.) температуру поднимали до 20°C.

Развитие беломорских *A. virens* в естественных и лабораторных условиях было описано в работах Дондуа (1975) и Свешникова (1978). Эмбриогенез характеризуется гетероквадрантным спиральным дроблением и эпиболической гаструляцией. В конце вторых суток после оплодотворения появляется округлая плавающая лецитотрофная личинка трохофора (рис. 1а). Ресничный шнур прототрох опоясывает тело личинки по экватору, отделяя эписферу (переднюю половину) от гипосферы (задней половины). В гипосфере расположены зачаток передней кишки (стомодеум) и незамкнутый ресничный венчик телотрох, который отграничивает область будущего пигидия. При использованных нами температурных условиях стадия трохофоры длится приблизительно с 44 до 90 ч.п.о. Трохофора плавно преобразуется в метатрохофору (рис. 1б), у которой вытягивается гипосфера и появляются метамерно расположенные структуры – пучки щетинок и ресничные шнуры паратрохи. На заднем конце поздней метатрохофоры развиваются две лопасти пигидия, между которыми внутрь впячивается зачаток задней кишки. Стадия метатрохофоры длится приблизительно с 91 до 170 ч.п.о. После появления функционирующих конечностей (трех пар параподий) и закладки головных придатков (антенн и перистомиальных усиков) наступает стадия нектохеты (рис. 1в). В строении нектохеты выделяют переднюю терминальную область (простомиум), несущий перистомиальные усики скрытый (нулевой) сегмент, три щетинконосных сегмента, зону роста и пигидий. Нектохеты поначалу обитают в планктоне, а затем оседают на дно. Постепенно у нектохет увеличивается область пигидия, а в передней ее части за счет клеток зоны роста формируется первый постларвальный сегмент. Переход от личинки к ювенильной особи (рис. 1г) происходит асинхронно, но не ранее 300 ч.п.о. Ювенильные черви с четырьмя щетинконосными сегментами начинают питаться и из предпигидиальной зоны роста образуются новые постларвальные сегменты.

Личинок и ювенилей фиксировали в 4% формальдегиде на 1.75× PBS/0.1% Tween-20 на ночь при 4°C с последующей отмывкой в PBS/0.1% Tween-20 и дегидратацией в 100% метаноле. Для работы отбирали следующие стадии: поздняя метатрохофора (156 ч.п.о.), ранняя нектохета (180 ч.п.о.), поздняя нектохета (210 ч.п.о.), ювениль с формирующимся четвертым сегментом (300 ч.п.о.), ювениль с полностью сформированным четвертым сегментом (330 ч.п.о.), пятисегментная ювениль (420 ч.п.о.). Фиксации хранили при –20°C.

Для гибридизации *in situ* использовали от 50 до 100 объектов каждой стадии. Гибридизацию *in situ* производили согласно описанному ранее протоколу (Shalaeva et al., 2021). Инкубация с мечеными дигоксигенином РНК-зондами продолжалась 48 ч; окрашивание в BCIP/NBT шло от 20 до 40 ч.

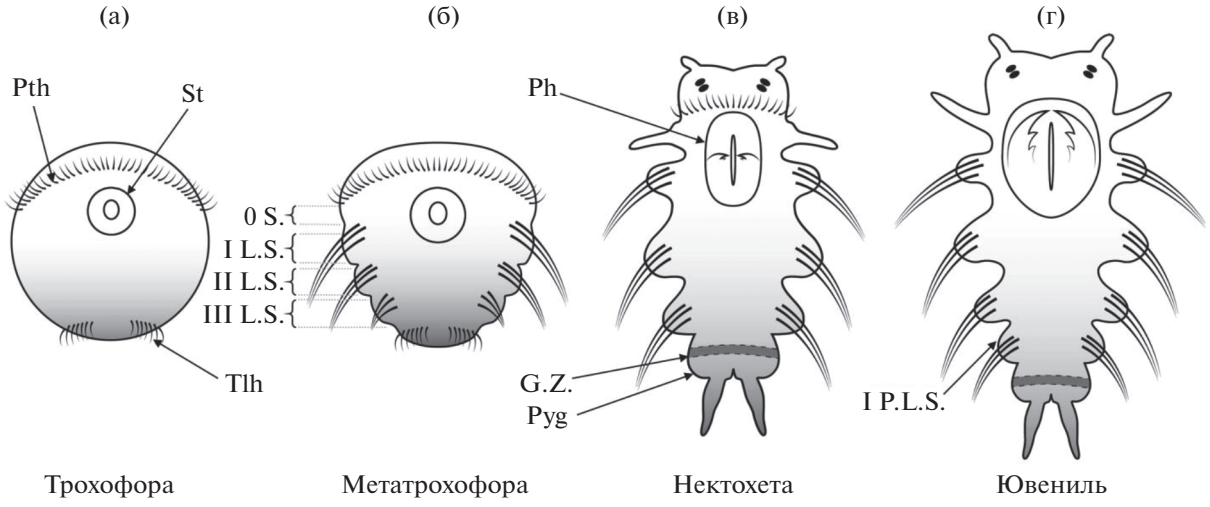

Рис. 1. Стадии постэмбрионального развития *Alitta virens*. Относительные размеры тела соблюдены, передний конец направлен вверх. (а) Трохофора. (б) Метатрохофора. (в) Нектохета. (г) Ювенильная особь с четырьмя щетинконосными сегментами. Pth – прототрох, St – стомодеум, Tlh – телотрох, Ph – глотка, G.Z. – зона роста, Pyg – пигидий, I, II, III L.S. – первый, второй и третий ларвальный сегмент, 0 S. – нулевой сегмент, I P.L.S. – первый постларвальный сегмент.

Для визуализации результатов хромогенной гибридизации *in situ* методом дифференциального интерференционного контраста (DIC) использовали микроскоп Axio Imager D1 (Carl Zeiss), оснащенный цифровой фотокамерой AxioCam ICc5 (Carl Zeiss). Обработку изображений проводили в программе ImageJ. Схемы создавали в программах Adobe Illustrator и Microsoft PowerPoint.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На стадии поздней метатрохофоры мРНК *engrailed* экспрессируется на вентральной стороне тела личинки: в отдельных клетках нейроэктодермы и в поверхностных эпидермальных клетках ближе к латеральным сторонам. Эпидермальные домены экспрессии образуют короткие, метамерно расположенные полоски, прилежащие к передней границе сегментов и не доходящие до середины тела (рис. 2а, 2а", 3а). Метамерные полосы экспрессии отмечены во всех сегментах: как в трех щетинконосных, так и в нулевом сегменте (непосредственно кзади от прототроха). Также точечный сигнал выявляется в поверхностных и глубинных клетках нейроэктодермы; паттерн экспрессии при этом является билатерально-симметричным (рис. 2а, 3а). В области пигидия мРНК *engrailed* экспрессируется в кольце клеток, расположенных между задней бороздой третьего сегмента и телотрохом. Этот задний кольцевой домен экспрессии включает как поверхностные, так и лежащие в глубине клетки, которые все вместе соответствуют локализации будущей зоны роста (см. Обсуждение). Кроме того, мРНК *engrailed* выявляется в четырех группах близкорасположенных клеток на эписфере ближе к дорсальной стороне тела, а также в клетках глотки (рис. 2а, 2а').

На стадии ранней нектохеты паттерн экспрессии остается схожим с таковым у поздней метатрохофоры: метамерные домены экспрессии на вентролатеральных сторонах тела сохраняются, как и экспрессия в эписфере и нейроэктодерме (рис. 2б). Самое важное изменение паттерна происходит в пигидии: кольцевой домен экспрессии расширяется в переднезаднем направлении (рис. 2б', 3б) и охватывает на поверхности не менее двух рядов клеток (вместо одного поверхностного ряда клеток на стадии поздней метатрохофоры). Именно в этот момент происходит закладка молекулярной границы будущего первого постларвального сегмента.

На стадии поздней нектохеты экспрессия мРНК *engrailed* в области пигидия представлена двумя кольцевыми доменами: один расположен кзади от борозды третьего сегмента, а другой находится в более каудальном положении (рис. 2в, 2в', 3в). При этом метамерные домены экспрессии на территории ларвальных сегментов исчезают. После обособления четвертого сегмента, когда уже образована борозда, отделяющая его от пигидия, один домен экспрессии находится на передней границе четвертого сегмента, а другой – на переднем крае пигидия, т.е. сзади от последней борозды (рис. 2г, 3г). На более поздних стадиях мРНК *engrailed* экспрессируется в группе поверхностных вентролатеральных клеток на передней морфологической границе пигидия и непосредственно на территории пигидия в более заднем положении по отношению к первой группе клеток (рис. 2д, 3д). Эти метамерные домены, по-види-

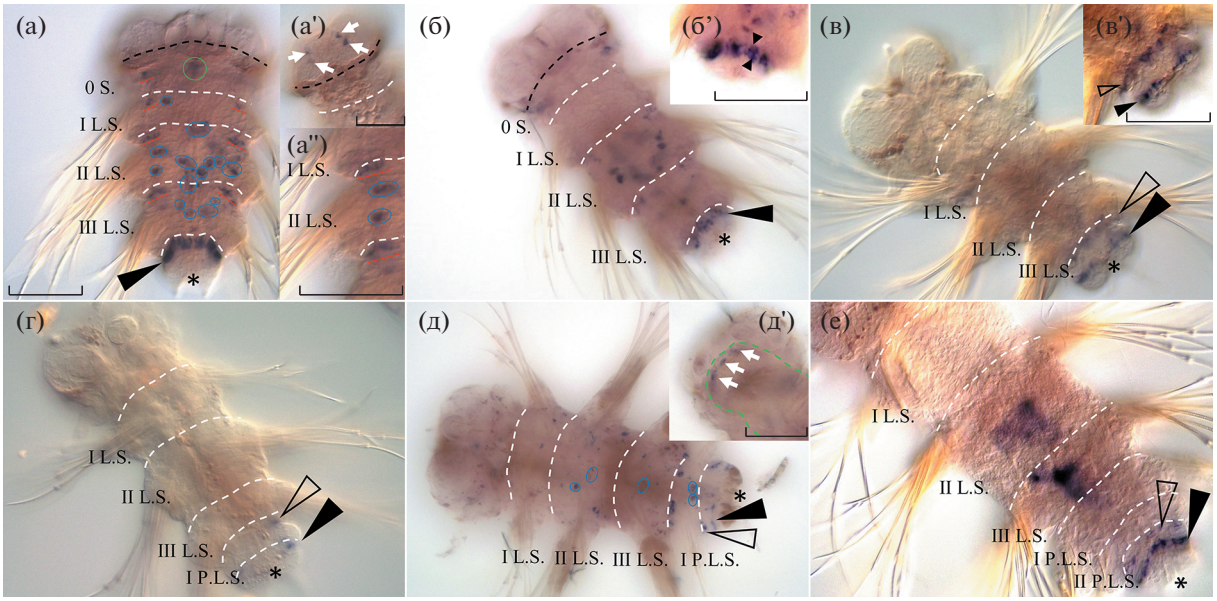

Рис. 2. Экспрессия *engrailed* в ларвальном и постларвальном развитии *A. virens*. На всех фотографиях вид с вентральной стороны, если не указано обратное. Звездочка – задний конец тела и пигидий, черный наконечник стрелки – передняя граница пигидия и приуроченный к ней домен экспрессии, контурный наконечник стрелки – передняя граница формирующегося постларвального сегмента, белые пунктирные линии – границы сегментов, черный пунктир – положение прототроха. Метамерные полосы экспрессии, приуроченные к передней границе сегмента, подчеркнуты красной линией. I, II, III L.S. – щетинконосные ларвальные сегменты, P.L.S. – постларвальные сегменты, 0 S. – нулевой сегмент. (а) Поздняя метатрохофора, 156 ч.п.о. Экспрессия *engrailed* выявлена в отдельных нейроэктодермальных клетках (обведено синим контуром), метамерных вентролатеральных рядах эпидермальных клеток (красные линии), а также на переднем крае глотки (обведено зеленым контуром). (а') Передний конец тела, вид с дорсальной стороны. В составе эписферы (кпереди от черной пунктирной линии) видны 4 кластера лежащих вплотную друг к другу клеток (белые стрелки), экспрессирующих *engrailed*. (а'') Крупный план вентролатерального участка туловища, на котором видны два метамерных домена экспрессии (красный контур). (б) Ранняя нектохета, 180 ч.п.о. Кольцевой домен экспрессии *engrailed* на границе пигидия состоит из двух рядов поверхностных клеток. (б') Крупный план заднего конца тела, наконечники стрелок указывают на два соседних ряда *engrailed*+ клеток. (в) Поздняя нектохета, 200 ч.п.о. Экспрессия в нейроэктодермальных клетках пропадает; на территории пигидия есть два отдельных ряда клеток, экспрессирующих *engrailed* (наконечники стрелок). (в') Крупный план заднего конца тела. (г) Стадия обособления первого постларвального сегмента, 300 ч.п.о. (д) Ювениль с полностью сформированным четвертым сегментом, 330 ч.п.о. Изображение получено путем совмещения серии фотографий одного объекта в разных фокусах. (д') Увеличенное изображение переднего конца тела. Видны *engrailed*+ клетки (белые стрелки) на переднем крае глотки (зеленая пунктирная линия). (е) Ювениль с 5 сегментами, 420 ч.п.о. Вид с дорсальной стороны. мРНК *engrailed* выявляется в двух поперечных полосах клеток в пигидии – происходит закладка границы шестого сегмента. Темно-синее окрашивание в центре тела – неспецифический фон в пищевых частицах в полости кишки. Масштабный отрезок – 50 мкм.

мому, маркируют зачаток формирующегося пятого (второго постларвального) сегмента. Аналогичная картина наблюдается и при закладке шестого сегмента, территория которого ограничена спереди и сзади непрерывными поперечными полосами *Engrailed*-положительных клеток (рис. 2е). У четырехсегментных червей экспрессия (которая практически отсутствовала на стадии поздней нектохеты) вновь выявляется в клетках нейроэктодермы ларвальных сегментов. Кроме того, у ювенилей появляется экспрессия мРНК *engrailed* в клетках переднего края глотки (рис. 2д').

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе впервые была описана экспрессия гена *engrailed* при переходе к постларвальному развитию у полихет. Полученные данные позволяют предполагать участие продукта этого гена в паттернировании зачатков сегментов у *A. virens*. Анализ сведений об экспрессии регуляторных генов, динамике клеточной пролиферации и дифференцировке сегментарных органов у *A. virens* и у близкородственного вида *P. dumerilii* позволяет охарактеризовать особенности развития сегментов у представителей семейства Nereididae (рис. 1). К таким особенностям относится следующее: почти одновременная и относительно ранняя спецификация всех личиночных сегментов еще в эмбриогенезе (Prud'homme et al., 2003; Steinmetz et al., 2011; Kozin et al., 2016); формирование метамерной соматической мускулатуры и конечностей у планктонной личинки (Fischer et al., 2010; Balavoine, 2014; Козин, Костюченко, 2016); появление локальной области клеточной пролиферации в предпигидиальной зоне роста на стадии нектохеты,

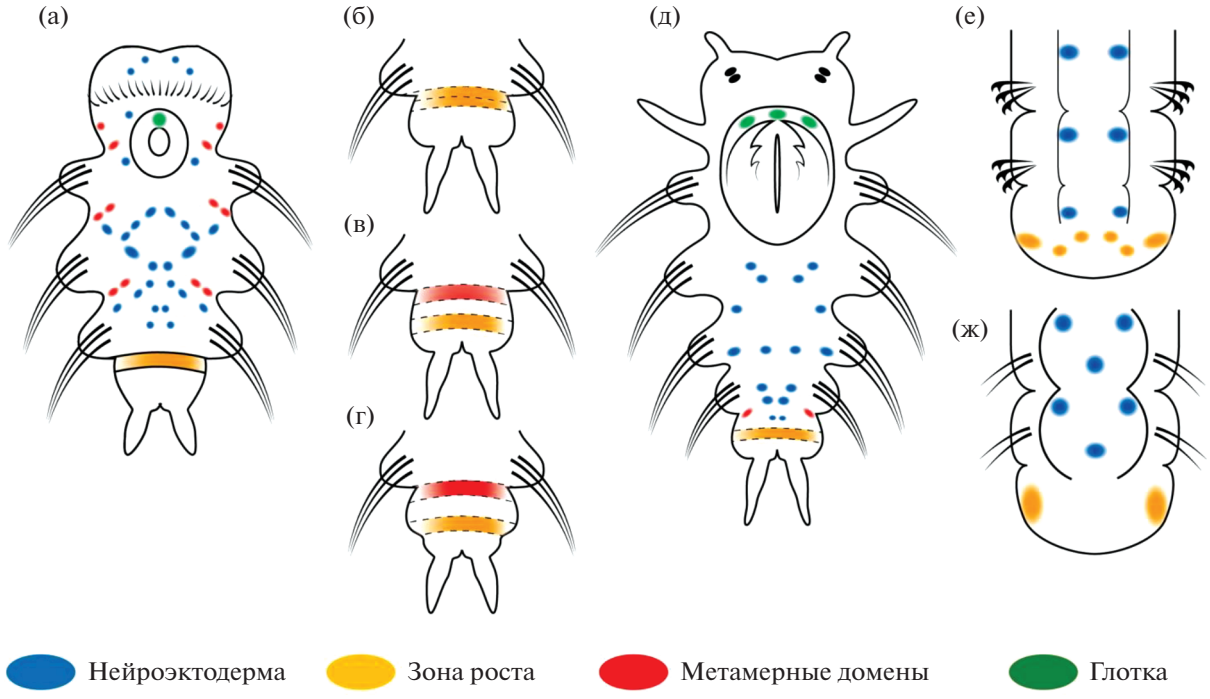

Рис. 3. Паттерны экспрессии *engrailed* в ходе анаморфного роста у аннелид. Домены экспрессии обозначены цветной заливкой: красный цвет – метамерные эпидермальные домены, синий – нейроэктодермальные клетки, желтый – область зоны роста, зеленый – клетки глотки. Передний конец тела направлен вверх. (а–д) *A. virens*: (а) – поздняя метатрохофора, (б–г) – задний конец тела нектохеты при формировании зачатка первого постларвального сегмента, (д) – ювенильная особь. (е) Задний конец тела пресноводной олигохеты *Pristina leidyi* (по Bely, Wray, 2001). (ж) Задний конец тела седентарной полихеты *Capitella teleta* (по Seaver, Kaneshige, 2006).

т.е. задолго до оседания личинки (Gazave et al., 2013; Козин и др., 2019б); начало формирования постларвального сегмента в виде одного ряда *Engrailed*-положительных клеток, которые соответствуют передней границе сегмента; последующий рост зачатка сегмента в длину кпереди от пигидия. У нереид *engrailed* экспрессируется у заднего конца тела, начиная со стадии протрохофоры (Prud'homme et al., 2003; Steinmetz et al., 2011). Мы предполагаем, что этот задний поперечный домен активности *engrailed*, расположенный кпереди от телотроха, маркирует молекулярную границу, вдоль которой формируется зона роста. Данная область пространственно соответствует экспрессии маркеров мультипотентности, таких как *Vasa* и *Nanos* (Kozin, Kostyuchenko, 2015; Козин и др., 2019б; Kostyuchenko, 2022). При расширении и последующем разделении этого домена на две полосы экспрессии *Engrailed* у нектохет *A. virens* происходит активное разрастание пигидия (рис. 3а–3г). Однако в его пределах уже определена передняя граница будущего четвертого сегмента, а задняя часть сегмента, вероятно, продолжает формироваться за счет пролиферации *Engrailed*-негативных клеток (Козин и др., 2019б). Это указывает на то, что у *A. virens* накопление клеточного материала будущего сегмента и его спецификация происходят одновременно, а не последовательно.

Поскольку у разных аннелид характер экспрессии *engrailed* сильно отличается (рис. 3), выявленные нами особенности паттернирования сегментов нереид могут иметь различную эволюционную трактовку. Гипотетически, раннее паттернирование зачатка сегмента с участием *engrailed* может являться анцестральной чертой аннелид. На это указывает метамерный (с периодичностью в один сегмент) паттерн экспрессии *engrailed*, появляющийся еще до морфологического обособления сегментов, а также экспрессия этого гена в зоне роста большинства исследованных аннелид (рис. 3). Однако ни у кого из них, кроме нереид, *engrailed* не образует протяженные домены экспрессии в виде полос или колец, которые расположены метамерно и отражают одинаковое позиционное значение (т.е. маркируют переднюю границу по окружности всего сегмента – и вентрально, и дорсально, и латерально). В основном, экспрессию *engrailed* у аннелид выявляли в сериальных органах – нефридиях, ганглиях ЦНС, щетинконосных мешках (Seaver et al., 2001; Prud'homme et al., 2003; Seaver, Kaneshige, 2006) (рис. 3). Поэтому можно предположить, что изначально у предка аннелид *engrailed* принимал участие в спецификации различных метамерно расположенных структур. В филогенетической линии, ведущей к нереидам, этот ген мог быть кооптирован в генную регуляторную сеть, управляющую созданием и разметкой морфоге-

нетического поля всего сегмента. В этом случае особенности сегментации нереид (ранняя спецификация всех личиночных сегментов еще в эмбриогенезе; ускоренное формирование сегментарных органов у планктонной личинки) возникли в эволюции вторично.

Вероятно, предпосылкой к совершенствованию механизмов сегментации, которые обеспечили акселерацию развития сегментированных личинок нереид, было накопление в яйце значительных запасов желтка, обеспечившее переход к лецитотрофии. Эволюционный переход от планктотрофии к лецитотрофии связан с гетерохронными изменениями, заключающимися в более поздней дифференцировке пищеварительных органов и более раннем появлении дефинитивных (ювенильных) признаков, к которым относится и сегментация. В крайнем случае подобной гетерохронии свободноживущая личинка исчезает, а все сегменты дифференцируются еще в эмбриогенезе, как это происходит у пиявок (Kuo, 2017). Дальнейшие исследования молекулярно-генетической регуляции формирования сегментов аннелид помогут определить, какой из описанных сценариев более справедлив.

Еще одной интересной особенностью нереид является наличие мРНК *engrailed* в клетках нейроэктодермы. У многих животных *engrailed* необходим для правильного формирования нервной системы. У позвоночных показано совместное участие *engrailed* и *FGF8* в функционировании истмусового организатора (isthmus organizer) на границе среднего и заднего мозга (Omi, Nakamura, 2015), а также в спецификации некоторых групп нейронов (Ekker et al., 1992). У насекомых и ракообразных *engrailed* экспрессируется в ганглиях брюшной нервной цепочки (Patel et al., 1989a). Для кузнечика *Schistocerca americana* показана роль этого гена в определении судьбы нейробластов срединной линии: после запуска транскрипции *engrailed* нейробласты начинают продуцировать глиальные предшественники вместо нейральных (Condron et al., 1994). У иглокожих транскрипты *engrailed* выявляются в радиальной нервной системе у ювенильных животных (Byrne et al., 2005). У аннелид *A. virens, P. dumerilii, Chaetopterus* sp., *C. teleta* и *P. leidyi engrailed* также экспрессируется в нейральных и нейроэктодермальных клетках (Bely, Wray, 2001; Seaver et al., 2001; Seaver, Kaneshige, 2006; Steinmetz et al., 2011). Таким образом, одной из возможных анцестральных функций *engrailed* можно считать участие в нейральной дифференцировке.

Широкомасштабный сравнительный анализ паттернов экспрессии *engrailed* (Vellutini, Hejnol, 2016) показал, что у многих животных его активность приурочена к областям, где формируются перетяжки между различными органами и структурами, как, например, перешеек (isthmus rhombencephali) между задним и средним мозгом у позвоночных, граница между отделами тела личинок брахиопод и полухордовых, край раковинной железы моллюсков и т.д. Обобщая известные гипотезы, можно заключить, что разметка пограничных территорий между морфологически обособленными частями тела также могла являться анцестральной функцией *engrailed*. По всей видимости, экспрессия *engrailed* не была изначально связана с закладкой сегментов. Мы предполагаем, что в ходе эволюции *engrailed* неоднократно вовлекался в процессы развития сегментированного плана строения. Когда произошло это эволюционное событие у аннелид остается невыясненным. Это могло случиться у общего предка всех аннелид или же только в филогенетической линии, ведущей к нереидным полихетам.

Приведенные нами оригинальные и литературные данные свидетельствуют о том, что характер развития постларвальных сегментов у *A. virens* не соответствует обеим существующим моделям функционирования зоны роста (зоны добавления сегментов, SAZ) – и телобластической, и диффузной. Это обстоятельство ставит вопрос о наличии у нереид уникального механизма анаморфного роста. По имеющимся данным пока невозможно предложить новую модель формирования сегментов из зоны роста, однако стоит провести сравнительный анализ уже установленных закономерностей сегментации разных животных.

Отличием от телобластической SAZ, характерной для зародышей поясковых аннелид и некоторых ракообразных из класса Malacostraca, является отсутствие в постларвальном развитии беспоясковых аннелид телобластов и стереотипного паттерна деления их потомков (Zattara, 2020). Кроме того, представление о телобластах, как о мультипотентных стволовых клетках (Balavoine, 2014; Chipman, 2020a) не позволяет интерпретировать таким образом SAZ нереид (Niwa et al., 2013), поскольку экспрессия “генов полярности сегментов” в зоне роста (*engrailed* у *A. virens* и других аннелид (рис. 3), *wnt1* и *hh* у *Perinereis nuntia*) предполагает гораздо более ограниченные потенции ее клеток. Модель диффузной SAZ применима к зоне роста большинства членистоногих и зародышам позвоночных (в отношении пресомитной мезодермы и хвостовой почки). Эта модель предусматривает циклические изменения активности генов (осцилляции экспрессии генов “pair-rule” и Notch сигналинга) в обширной популяции клеток (Williams, Nagy, 2017; Diaz-Cuadros et al., 2021) (рис. 4), чего не наблюдается у аннелид. И у членистоногих, и у позвоночных молекулярные маркеры полярности сегментов/сомитов начинают экспрессироваться вдоль новых границ только после спецификации всей территории метамера, тогда как у *A. virens* экспрессия *engrailed* маркирует переднюю границу зачатка задолго до завершения наработки клеточного материала сегмента и его спецификации. Таким образом, мы приходим к заключению о неприменимости описанных выше моделей к постэмбриональному периоду онтогенеза аннелид.

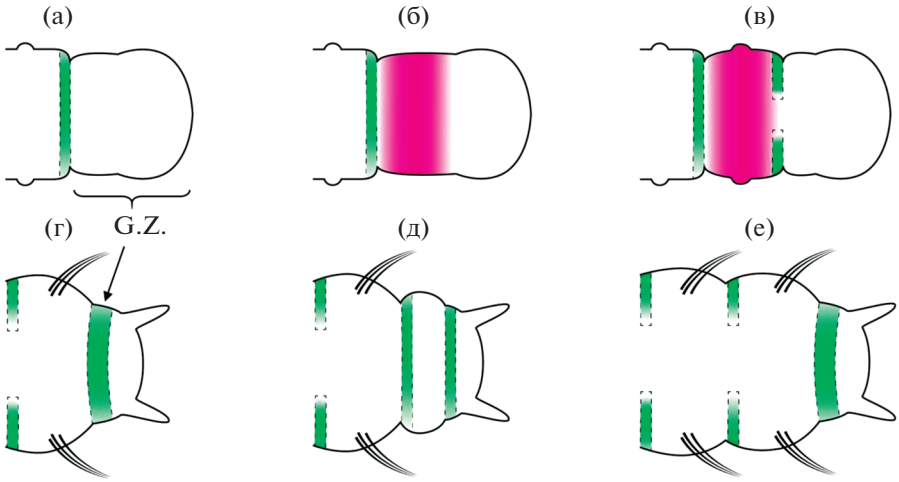

Рис. 4. Схема последовательного образования сегментов у членистоногих (а–в) (по Williams, Nagy, 2017) и аннелиды *A. virens* (г–е). Зеленая заливка – области экспрессии *engrailed*, пурпурный – область спецификации нового сегмента, G.Z. – зона роста. (а) Накопление клеточного материала в зоне роста (область кзади от последней полосы экспрессии *engrailed*). (б) Спецификация парасегмента в передней части зоны роста вследствие осцилляций экспрессии генов “pair-rule” и Notch сигналинга. (в) Обособление сегмента, связанное с окончательным определением границ (закладка новой полосы экспрессии *engrailed*), и начало морфогенезов (формирование зачатков конечностей и межсегментных борозд). (г) Расширение кольцевого домена экспрессии *engrailed* в зоне роста является первым этапом закладки нового сегмента, когда, по-видимому, устанавливается молекулярный профиль клеток на его передней границе. (д) Накопление клеточного материала за счет пролиферации ведет к обособлению двух доменов экспрессии *engrailed*, которые отделяют сегментарный зачаток от предшествующего сегмента (спереди) и от пигидия (сзади). Механизмы спецификации сегментарного зачатка аннелид остаются неизвестными. (е) Морфогенез, рост и дифференцировка нового сегмента сопровождаются постепенным сокращением домена экспрессии *engrailed* вдоль межсегментной борозды.

Поскольку вопрос о единстве эволюционного происхождения сегментов аннелид и членистоногих до конца не решен, следует рассмотреть закономерности их развития с учетом представленных данных. Паттерны экспрессии *engrailed* у нереид и членистоногих сходны тем, что последовательное появление полос экспрессии происходит до морфологического обособления сегментов. С помощью функциональных экспериментов для членистоногих доказано участие *engrailed* в процессах паттернирования и морфогенеза сегментов (Gustavson et al., 1996; Lim, Choe, 2020). Можно предположить, что *engrailed* выполняет сходные функции и у *A. virens*. Однако соотношение процессов удлинения оси (создания клеточного материала), спецификации и поляризации сегментов, а также вовлеченные в это гены, по-видимому, сильно отличаются у аннелид и членистоногих (Balavoine, 2014).

У членистоногих с терминальным ростом сначала образуется материал парасегментов (рис. 4а), который подвергается спецификации (рис. 4б), а потом окончательно устанавливаются границы, маркированные полосами экспрессии “генов полярности сегментов” (рис. 4в) (Williams, Nagy, 2017). При этом экспрессия *engrailed* в зоне роста отсутствует, но транскрипты этого гена выявляются в клетках на передних границах парасегментов, соответствующих задним границам дефинитивных сегментов. Кроме насекомых, экспрессия *engrailed* приурочена к задней границе сегментов у многоножек, ракообразных, хелицеровых, онихофор и тихоходок (Patel et al., 1989a; Damen, 2002; Hughes, Kaufman, 2002; Gabriel, Goldstein, 2007; Janssen, 2017; Lim, Choe, 2020). Таким образом, в отличие от членистоногих, у *A. virens* консервативный “пограничный” паттерн *engrailed* возникает еще до полной детерминации зачатка сегмента (рис. 4). Мы предполагаем, что у *A. virens* сначала происходит спецификация передней границы сегмента, а затем задней, что сопровождается наработкой клеточного материала соответствующего сегмента. Это говорит о кардинальных различиях в механизмах сегментации нереид и метамерных Ecdysozoa.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюционное происхождение таких комплексных признаков, как сегментация, является принципиально важным и нерешенным вопросом биологии. В настоящее время анализ сегментированного плана строения происходит на уровне сравнения молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития сегментов в разных таксонах. Этот анализ существенно ограничен недостатком детальных описательных и функциональных исследований сегментации у беспоясковых кольчатых червей. Изучив один из наиболее консервативных генов-маркеров сегментации *engrailed*, мы сопоставили паттерны экспрессии его ортологов у аннелид и членистоногих, а также проанализировали применимость существующих моделей

SAZ к аннелидам. Это позволило нам заключить, что образование сегментов из зоны роста в постларвальном развитии нереид обладает рядом особенностей. Мы предполагаем, что спецификация сегмента *A. virens* идет параллельно с удлинением переднезадней оси, так как сначала определяется передняя граница сегмента (маркером которой служит экспрессия мРНК *engrailed*), далее следует достраивание его задних территорий, а затем появляется окончательная задняя граница (борозда между сегментом и пигидием). Анализ закономерностей экспрессии *engrailed* у билатерий позволяет предположить, что анцестральной ролью этого гена следует считать регуляцию нейральной дифференцировки и создание пограничных территорий. Вовлечение *engrailed* в процессы паттернирования зачатков сегментов у нереид (а возможно и у всех аннелид), членистоногих и хордовых, по-видимому, происходило независимо. Дальнейшие исследования должны определить, какие закономерности работы *engrailed* и других генов, паттернирующих сегменты, были унаследованы нереидами от общего предка кольчатых червей, а какие возникли в эволюции позднее. Это позволит провести полноценное сравнение функционирования генетического репертуара сегментированных животных и реконструировать эволюционную историю сегментации более достоверно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование выполнено на базе Морской Биологической Станции (УНБ “Беломорская”) СПбГУ, РЦ ММ, РЦ РМиКТ и РЦ КМ СПбГУ. Выражаем благодарность Роману Петровичу Костюченко за предоставленную плазмиду с фрагментом кДНК *engrailed A. virens* и обсуждение текста рукописи. Благодарим Надежду Андреевну Филиппову за помощь в создании иллюстраций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась при поддержке гранта РНФ № 21-74-00055, https://rscf.ru/project/21-74-00055/.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В отношении объектов исследования соблюдались применимые этические нормы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дондуа А.К. Влияние актиномицина Д и сибиромицина на эмбриональное и личиночное развитие *Nereis virens* (Sars.) // Онтогенез. 1975. Т. 6. № 5. С. 475–484.

Козин В.В., Борисенко И.Е., Костюченко Р.П. Участие канонического сигнального пути Wnt в определении полярности тела и клеточной идентичности у Metazoa: новые данные о развитии губок и аннелид // Изв. РАН. Сер. биол. 2019а. № 1. С. 19–30.

Козин В.В., Костюченко Р.П. Эволюционный консерватизм и вариабельность развития мезодермы у Spiralia: неповторимый паттерн нереидных полихет // Изв. РАН. Сер. биол. 2016. № 3. С. 265–275.

Козин В.В., Шалаева А.Ю., Филиппова Н.А., Костюченко Р.П. Как строится тело личинки полихет? История ларвального развития и метаморфоза *Alitta virens* (Annelida: Nereididae) // Труды VII Международной научно-практической конференции “Морские исследования и образование (MARESEDU-2018)” Том IV (IV). Тверь: ООО “ПолиПРЕСС”, 2019б. С. 81–85.

Свешников В.А. Морфология личинок полихет. М.: Наука, 1978. 152 с.

Balavoine G. Segment formation in Annelids: patterns, processes and evolution // Int. J. Dev. Biol. 2014. V. 58. P. 469–483.

Bely A.E., Wray G.A. Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression // Development. 2001. V. 128. № 14. P. 2781–2791.

Byrne M. et al. Engrailed is expressed in larval development and in the radial nervous system of *Patiriella* sea stars // Dev. Genes Evol. 2005. V. 215. № 12. P. 608–617.

Chipman A.D. The evolution and development of segmented body plans // Evolutionary Developmental Biology / Eds. Nuno de la Rosa L., Muller G. Springer, Cham. 2018. P. 1–10.

Chipman A.D. (ed.) Cellular Processes in Segmentation. CRC Press, 2020a. 299 p.

Chipman A.D. The evolution of the gene regulatory networks patterning the *Drosophila* Blastoderm // Current Topics in Developmental Biology. 2020b. V. 139. P. 297–324.

Condron B.C., Patel N.H., Zinn K. Engrailed controls glial/neuronal cell fate decisions at the midline of the central nervous system // Neuron. 1994. V. 13. № 3. P. 541–554.

Damen W.G.M. Parasegmental organization of the spider // Development. 2002. V. 129. № 5. P. 1239–1250.

Diaz-Cuadros M., Pourquié O., El-Sherif E. Patterning with clocks and genetic cascades: Segmentation and regionalization of vertebrate versus insect body plans // PLoS Genet. 2021. V. 17. № 10. P. e1009812.

Ekker M. et al. Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes // Development. 1992. V. 116. № 4. P. 1001–1010.

Gabriel W.N., Goldstein B. Segmental expression of Pax3/7 and Engrailed homologs in tardigrade development // Dev. Genes Evol. 2007. V. 217. № 6. P. 421–433.

Gazave E., Béhague J., Laplane L., Guillou A., Préau L., Demilly A., Balavoine G., Vervoort M. Posterior elongation in the annelid *Platynereis dumerilii* involves stem cells molecularly related to primordial germ cells // Dev. Biol. 2013. V. 382. № 1. P. 246–267.

Gustavson E. et al. The *Drosophila* engrailed and invected genes: partners in regulation, expression and function // Genetics. 1996. V. 142. № 3. P. 893–906.

Fischer A.H., Henrich T., Arendt D. The normal development of *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida) // Front Zool. 2010. V. 7. № 1. P. 31.

Hughes C.L., Kaufman T.C. Exploring myriapod segmentation: the expression patterns of even-skipped, engrailed, and wingless in a Centipede // Developmental Biology. 2002. V. 247. № 1. P. 47–61.

Janssen R. A molecular view of onychophoran segmentation // Arthropod Structure & Development. 2017. V. 46. № 3. P. 341–353.

Kostyuchenko R.P. Nanos is expressed in somatic and germline tissue during larval and post-larval development of the Annelid *Alitta virens* // Genes. 2022. V. 13. № 2. P. 270.

Kozin V.V., Kostyuchenko R.P. Vasa, PL10, and Piwi gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens* // Dev. Genes Evol. 2015. V. 225. № 3. P. 129–138.

Kozin V.V., Filimonova D.A., Kupriashova E.E., Kostyuchenko R.P. Mesoderm patterning and morphogenesis in the polychaete Alitta virens (Spiralia, Annelida): Expression of mesodermal markers *Twist*, *Mox*, *Evx* and functional role for MAP kinase signaling // Mech. Dev. 2016. V. 140. P. 1–11.

Kuo D.-H. The polychaete-to-clitellate transition: An EvoDevo perspective // Developmental Biology. 2017. V. 427. № 2. P. 230–240.

Lim J., Choe C.P. Functional analysis of engrailed in *Tribolium* segmentation // Mechanisms of Development. 2020. V. 161. P. 103594.

Omi M., Nakamura H. Engrailed and tectum development // Develop. Growth Differ. 2015. V. 57. № 2. P. 135–145.

Patel N.H., Kornberg T.B., Goodman C.S. Expression of engrailed during segmentation in grasshopper and crayfish // Trends in Genetics. 1989a. V. 107. № 2. P. 201–212.

Patel N.H. et al. Expression of engrailed proteins in Arthropods, Annelids, and Chordates // Cell. 1989b. V. 58. № 5. P. 955–968.

Prud'homme B. et al. Arthropod-like expression patterns of engrailed and wingless in the annelid *Platynereis dumerilii* suggest a role in segment formation // Current Biology. 2003. V. 13. № 21. P. 1876–1881.

Seaver E.C. et al. The spatial and temporal expression of Ch-en, the engrailed gene in the polychaete *Chaetopterus*, does not support a role in body axis segmentation // Developmental Biology. 2001. V. 236. № 1. P. 195–209.

Seaver E.C., Kaneshige L.M. Expression of 'segmentation' genes during larval and juvenile development in the polychaetes *Capitella* sp. I and *H. elegans* // Developmental Biology. 2006. V. 289. № 1. P. 179–194.

Shalaeva A.Y., Kostyuchenko R.P., Kozin V.V. Structural and functional characterization of the FGF signaling pathway in regeneration of the polychaete worm *Alitta virens* (Annelida, Errantia) // Genes. 2021. V. 12. № 6. P. 788.

Steinmetz P.R.H., Kostyuchenko R.P., Fischer A., Arendt D. The segmental pattern of otx, gbx, and Hox genes in the annelid *Platynereis dumerilii* // Evol. Dev. 2011. V. 13. № 1. P. 72–79.

Vellutini B.C., Hejnol A. Expression of segment polarity genes in brachiopods supports a non-segmental ancestral role of engrailed for bilaterians // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. P. 32387.

Williams T.A., Nagy L.M. Linking gene regulation to cell behaviors in the posterior growth zone of sequentially segmenting arthropods // Arthropod Structure & Development. 2017. V. 46. № 3. P. 380–394.

Zattara E. Axial regeneration in segmented animals a post-embryonic reboot of the segmentation process // Cellular Processes in Segmentation 2020. P. 255–292.

Expression of the *engrailed* Homologue in Larvae and Juveniles of the Annelid *Alitta virens* Characterizes the Formation of Segments from the Growth Zone

A. I. Kairov[1] and V. V. Kozin[1, *]

[1]*Department of Embryology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

**e-mail: v.kozin@spbu.ru*

The evolutionary origin of segmentation remains to be a mystery. In arthropods, the *engrailed* gene is recognized as one of the most important and conservative members of the segmentation developmental program. Orthologues of this gene have been identified in annelids, but their role is interpreted ambiguously, because in some species their expression precedes subdivision of the body into segments, but in others it does not. Here we studied the expression of *engrailed* in the nereid polychaete *Alitta virens* during metamorphosis and development of the first postlarval segments. Our data support the possible involvement of this gene in the process of segment formation from the growth zone in *A. virens*. At the larval stages, *engrailed* is expressed in neuroectodermal cells, in the growth zone, as well as in metameric epidermal cell rows at the anterior boundary of each segment. Upon transition from the metatrochophore to the nectochaete stage, the circular expression domain in the growth zone expands and then resolves into two serial domains. Over time, the distance between these circular domains increases indicating the growth of the first postlarval segment anlage. Formation of subsequent postlarval segments occurs in a similar way. Analyzing our results and literature data, we compared *engrailed* expression patterns in annelids and arthropods. Our work indicates an absence of conservation in patterning of sequentially developing segments from the growth zone in protostomes. We suggest that in *A. virens* the anteroposterior axis elongation occurs simultaneously with the specification of a new segment. These features differ from the known models of the growth zone and indicate the possibility that nereids have a specific mechanism of segmentation.

Keywords: segmentation, Annelida, Nereididae, larval development, metamorphosis, axis elongation, segment polarity gene *engrailed*, expression pattern