

УДК 577.218, 593.953

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *HOX*-КЛАСТЕРА В РАННЕМ ЛИЧИНОЧНОМ РАЗВИТИИ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)

© 2025 г. Н. В. Агеенко¹, О. В. Ежова^{2, *}, К. В. Киселев³, А. И. Лукиных²,
академик РАН В. В. Малахов²

Поступило 30.08.2024 г.

После доработки 17.09.2024 г.

Принято к публикации 20.09.2024 г.

Проведена количественная оценка экспрессии 11-ти генов *Hox*-кластера морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (*SiHox1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9/10, 11/13a, 11/13b, 11/13c*) в личинках ранних стадий развития: бластулы – 13 часов после оплодотворения (ч.п.о.), гастролы – 35 ч.п.о., стадии призмы – 46 ч.п.о., эхиноплютеусов – 4 и 9 суток п.о. На стадии бластулы экспрессируются гены *SiHox-7, 11/13b* и *11/13c*; для последнего ранняя активация отмечена впервые для правильных морских ежей. На стадиях гастролы и призмы наблюдается очень низкий уровень экспрессии. На стадии плютеуса происходит резкое усиление экспрессии всех генов *Hox*-кластера. Обсуждаются нарушения временной коллинеарности при экспрессии *Hox*-генов у иглокожих.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, бластула, гастролы, стадия призмы, плютеус

DOI: 10.31857/S2686738925010034, **EDN:** tdjqkg

Регуляторные гены *Hox*-кластера определяют последовательную закладку структур животного вдоль передне-задней оси тела [1, 2]. У базальной группы Cephalochordata экспрессия 15-ти *Hox*-генов осуществляется с пространственной и временной коллинеарностью: гены начинают экспрессироваться не одновременно, а последовательно друг за другом от 3' конца *Hox*-кластера к 5' концу и при этом – от передних к задним сегментам тела развивающегося зародыша [3, 4]. Однако в различных группах Deuterostomia наблюдаются те или иные нарушения принципа коллинеарности при экспрессии *Hox*-генов, а также обнаруживаются различные

изменения в самом составе *Hox*-кластера. У правильных морских ежей *Hox*-кластер содержит 11 генов: *Hox1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9/10, 11/13a, 11/13b, 11/13c* [5, 6], хотя данные о порядке расположения генов в *Hox*-кластере оказались противоречивыми: обнаружилась транслокация передней группы генов *Hox1, 2, 3* с 3' на 5' конец *Hox*-кластера. Близкий по своему составу набор генов в *Hox*-кластере описан для морских лилий [7]. У остальных классов Echinodermata отмечены различные дополнительные “сокращения” в *Hox*-кластере [4]. При этом у представителей типа Nemichordata, сестринского к Echinodermata, набор генов в *Hox*-кластере близок к морским ежам [8, 9]. Помимо изменений в порядке расположения генов в *Hox*-кластере, у некоторых иглокожих было обнаружено нарушение временной коллинеарности при экспрессии *Hox*-генов: экспрессия начинается не с передней группы генов, а с центральной и задней групп генов *Hox*-кластера [10, 11]. Данные об организации *Hox*-кластера и о ходе экспрессии регуляторных генов *Hox* в разных группах животных накапливаются постепенно, при этом постоянно корректируются и ложатся в основу новых эволюционных гипотез. Наша работа посвящена идентификации и анализу количественной оценки экспрессии генов *Hox*-кластера на ранних этапах личиночного развития правильного

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского” Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН), Владивосток, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии” ДВО РАН (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН), Владивосток, Россия

*e-mail: olga_ejova@mail.ru

морского ежа с непрямым развитием *Strongylocentrotus intermedius*.

Объектом исследования стали личинки ранних стадий развития *S. intermedius* (рис. 1): бластула — 13 часов после оплодотворения (ч.п.о.), гастрюла — 35 ч.п.о., стадия призмы — 46 ч.п.о., эхиноплютеус — 4 суток п.о. и эхиноплютеус — 9 суток п.о. Все эксперименты по оплодотворению и развитию морских ежей были выполнены на МБС “Восток” Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (ННЦМБ ДВО РАН). Сбор животных проводили в заливе Восток Японского моря. Перед выполнением экспериментов животных содержали в ваннах с проточной аэрированной водой и перед началом эксперимента промывали два-три раза фильтрованной морской водой, обработанной ультрафиолетом. Нерест индуцировали инъекцией 1-2 мл 0,5М раствора хлорида калия в полость аристотелева фонаря. Личинки были получены искусственным оплодотворением и в дальнейшем культивированы при 18°C.

Тотальную РНК экстрагировали из яйцеклеток и личинок ранних стадий развития морского ежа *S. intermedius* при помощи набора “Yellow Solve” (Clonogen, Санкт-Петербург, Россия). Количественную оценку выделенной тотальной РНК проводили спектрофотометрически (Shimadzu, Япония). Комплементарную ДНК (кДНК) получали с помощью набора для обратной транскрипции (Силекс, Москва, Россия), используя 1–3 мкг выделенной тотальной РНК. Для проведения обратно-транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) использовали 50 мкл реакционной смеси, содержащей однократный ОТ буфер (буфер для проведения ОТ-ПЦР), по 0,24 мМ каждого из 4 дезокси-нуклеотидтрифосфатов (dNTP), 0,2 мМ олиго-(dT)₁₅ праймера, 200 единиц активности MMLV-обратной транскриптазы. Реакцию проводили при 37°C в течение 2 ч. Образцы полученных продуктов (0,5 мкл)

были затем амплифицированы при помощи ПЦР. Для нормализации различий в качестве и количестве полученной кДНК, используемой в каждом эксперименте по проведению ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), для морского ежа *S. intermedius* в качестве эндогенного контроля были использованы ген актина (Генбанк: DQ229162) и ген убиквитина (Генбанк: LOC754856). Данные были получены в результате пяти независимых экспериментов. Праймеры для генов актина и убиквитина, используемые в проведении ПЦР-РВ, ранее были описаны [12].

Секвенирование осуществляли на секвенаторе ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) на базе Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН). Секвенирование каждого транскрипта было проведено не менее трех раз.

Для теоретического дизайна специфических праймеров для ПЦР-РВ генов морского ежа *S. intermedius* мы проанализировали нуклеотидную последовательность генов *Hox*-кластера близкого вида *S. purpuratus* [13, 14]. Все данные и соответствующие инструменты запроса и визуализации доступны через SpBase, общедоступную базу данных генома морского ежа (<http://www.spbase.org/SpBase/gnaseq/>) и через базу данных биопроектов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>), регистрационный номер PRJNA81157. На основе полученных данных секвенирования выполнен дизайн специфических праймеров для проведения ПЦР-РВ. Для создания праймеров была использована программа Primer Blast от NCBI.

Количественная оценка уровня экспрессии *Hox*-генов *S. intermedius* проводилась индивидуально для каждого гена в относительных единицах (о.е.), где за условное значение “1” был взят уровень амплификации данного гена в неоплодотворенных

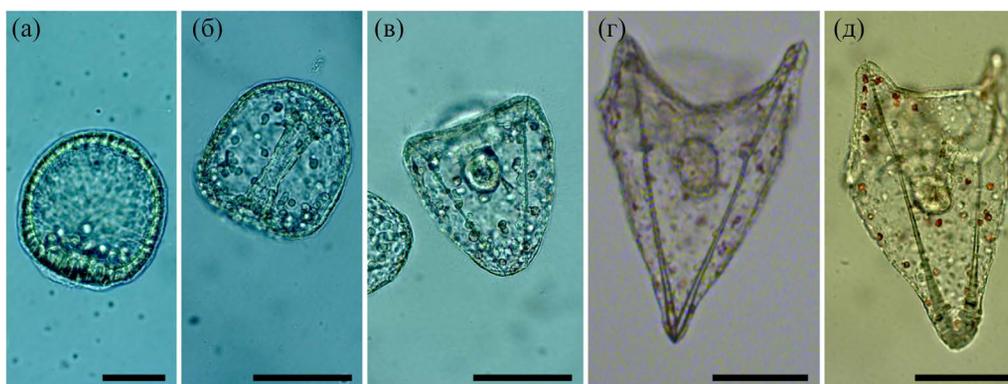


Рис. 1. Личинки ранних стадий развития *Strongylocentrotus intermedius*, взятые для исследования: А — бластула, 13 ч.п.о., Б — гастрюла, 35 ч.п.о., В — стадия призмы, 46 ч.п.о., Г — эхиноплютеус, 4 суток п.о., Д — эхиноплютеус, 9 суток п.о. Масштаб: 50 мкм.

яйцеклетках. В результате были получены данные количественной оценки уровней экспрессии всех 11-ти *Hox*-генов морского ежа *S. intermedius* в личинках ранних стадий развития (рис. 2).

На стадии бластулы (13 ч.п.о.) уровень экспрессии *Hox*-генов в основном снижается по сравнению с яйцеклетками (т.е. не достигает 1 о.е.). Исключение составляют только гены *SiHox7*,

11/13b и *11/13c*, их экспрессия возрастает (рис. 2). У другого вида морского ежа *S. purpuratus* на стадии бластулы (24 ч.п.о.) отмечен высокий уровень экспрессии двух генов – *SpHox7* и *11/13b* [10, 15, 16]. У плоского морского ежа с прямым развитием *Peronella japonica* отмечена ранняя активация всех трех генов – *PjHox7*, *11/13b* и *11/13c* – уже на стадии бластулы (6–10,5 ч.п.о.) [11].

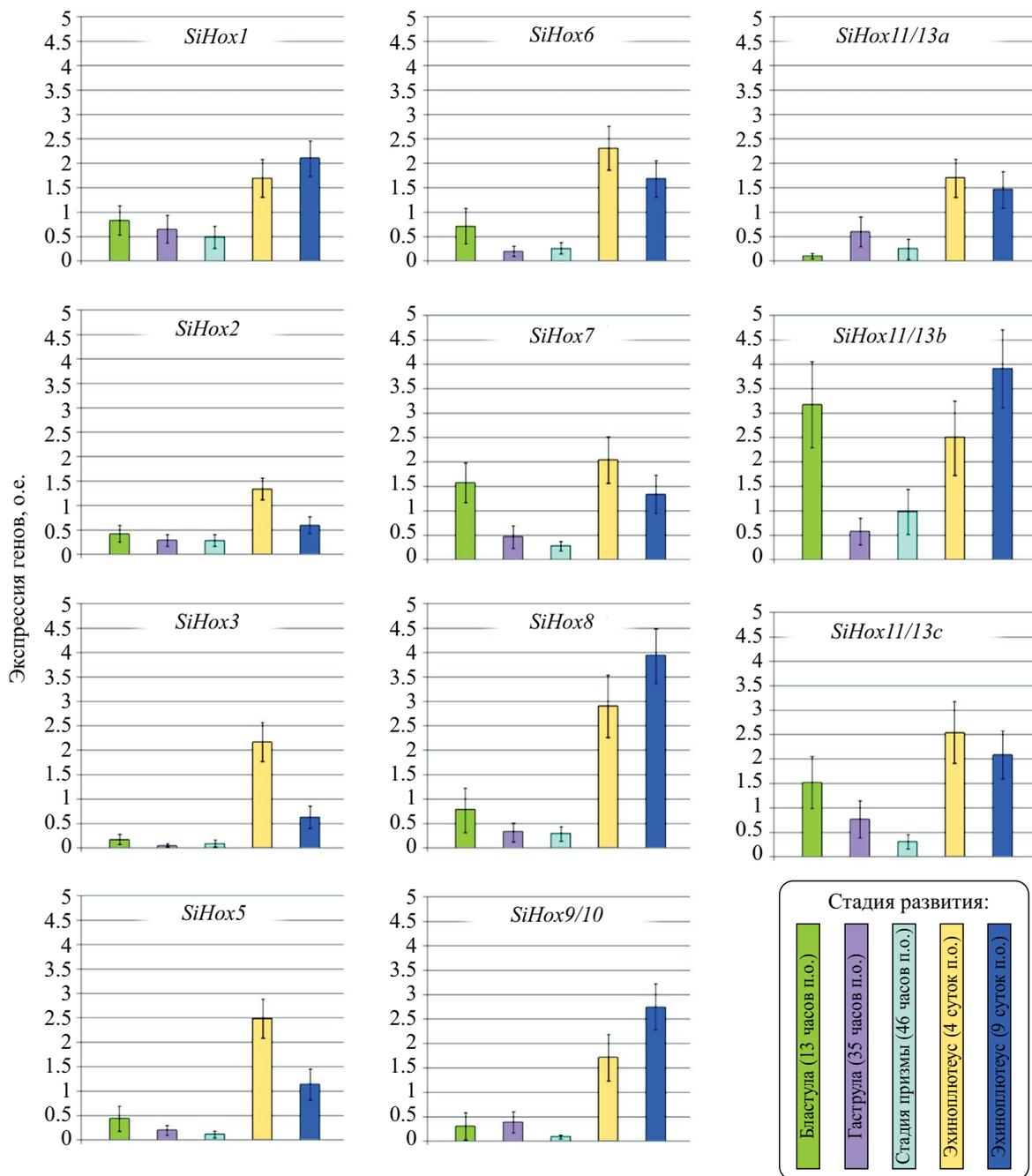


Рис. 2. Результаты количественной оценки экспрессии генов *Hox*-кластера *Strongylocentrotus intermedius* на ранних стадиях личиночного развития (в относительных единицах – о.е.).

На стадиях гастролы (35 ч.п.о.) и призмы (46 ч.п.о.) уровень экспрессии *SiHox*-генов очень низкий. Незначительно возрастает на стадии гастролы только экспрессия гена *SiHox11/13a*; уровень экспрессии всех остальных генов продолжает снижаться (рис. 2). Литературные сведения по *S. purpuratus* в отношении экспрессии *Hox*-генов показывают, что у этого морского ежа в ходе гастролы (21–36 ч.п.о.) возрастает экспрессия соседнего гена – *SpHox11/13b* [15], резко снижаясь на стадии поздней гастролы (48 ч.п.о.) [10]. Однако наше исследование показало, что у морского ежа *S. intermedius* уже через 35 ч.п.о. наблюдается резкое снижение экспрессии гена *SiHox11/13b*, хотя на стадии призмы наблюдается незначительное усиление экспрессии этого гена, впрочем, все еще на очень низком уровне по сравнению с бластулой (рис. 2). У *P. japonica* на стадии гастролы (13–15 ч.п.о.) к уже экспрессирующимся генам *PjHox7*, *11/13b*, *11/13c* добавляется экспрессия *PjHox9/10*, а на стадии призмы (18–21 ч.п.о.) экспрессируются гены *PjHox1*, *7*, *8*, *9/10* и *11/13b*, а экспрессия гена *PjHox11/13c* прекращается и больше не возобновляется, по крайней мере, на ранних этапах развития [11].

При формировании плютеуса *S. intermedius*, на 4-е сутки после оплодотворения, происходит резкая активация всех 11-ти генов *Hox*-кластера (рис. 2). Затем, на 9-е сутки после оплодотворения наблюдается возрастание уровня экспрессии генов *SiHox1*, *8*, *9/10* и *11/13b* и незначительное снижение экспрессии генов *SiHox5*, *6*, *7*, *11/13a* и *11/13c*, хотя уровень их экспрессии по-прежнему выше, чем на стадиях гастролы и призмы. Уровень экспрессии генов *SiHox2* и *SiHox3* на 9-е сутки падает ниже 1 о.е. (рис. 2). Согласно литературным данным, резкое возрастание экспрессии *Hox*-генов (*SpHox2*, *3*, *4/5*, *7*, *8*, *9/10*, *11/13a* и *11/13b*) характерно и для личинок *S. purpuratus* в возрасте 14 и 21 суток [10]. У плютеусов *P. japonica* в возрасте от 1,5 до 4 суток наблюдается значительная экспрессия большинства генов *Hox*-кластера, за исключением *PjHox6*, экспрессия которого очень невелика, и *PjHox11/13c*, который вообще не экспрессируется после ранней гастролы [11].

Полученные нами данные подтверждают, что у морских ежей наиболее ранняя активация характерна не для передней группы *Hox*-генов, а для генов центральной и задней групп *Hox*-кластера – *Hox7*, *11/13b* и *11/13c*. Такая же особенность наблюдается при развитии голотурии *Apostichopus japonicus*, у которой на стадии бластулы (12–20 ч.п.о.) экспрессируются гены центральной и задней групп *Hox*-кластера – *AjHox7*, *8*, *11/13a* и *11/13b*. На стадии гастролы (24–34 ч.п.о.) к ним добавляется экспрессия генов *AjHox1*, *5* и *11/13c* [17]. У стебельчатой морской лилии *Metacrinus rotundus* на стадии бластулы (20 ч.п.о.) вообще не обнаружена экспрессия *Hox*-генов; правда, в исследовании были задействованы

только гены *MrHox1*, *2*, *4*, *5*, *7*, *8*, *9/10* и *11/13c* [18]. На стадии гастролы (40 ч.п.о.) у *M. rotundus* экспрессируется только *MrHox7*, затем через 2 суток п.о. начинает экспрессироваться *MrHox8* (53 ч.п.о.) и через 4 суток п.о. – *MrHox5*, *7*, *8* и *9/10* [18]. Таким образом, во всех известных исследованиях временной экспрессии *Hox*-генов у иглокожих на самых ранних стадиях развития наблюдается “молчание” генов передней группы *Hox*-кластера и экспрессия генов центральной и задней групп.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам водолазной службы ННЦМБ ДВО РАН за сбор особей морского ежа *S. intermedius* для проведения исследования. Также авторы признательны Шуклову Алариху Артемовичу и Шукловой Владимире Артемовне за предоставление возможности для подготовки рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ 23–14–00047.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных были соблюдены. В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет финансовых или каких-либо иных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peterson K.J., Arenas-Mena C., Davidson E.H. The A/P axis in echinoderm ontogeny and evolution: evidence from fossils and molecules // *Evolution and Development*. 2000. Vol. 2. No. 2. P. 93–101.
2. Рожнов С.В. Переднезадняя ось иглокожих и перемещение рта в их историческом и индивидуальном развитии // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2012. № 2. С. 203–212.
3. Wada H., Garcia-Fernández J., Holland P.W. Co-linear and segmental expression of amphioxus *Hox*

- genes // *Developmental Biology*. 1999. Vol. 213. No. 1. P. 131–141.
4. David B., Mooi R. How *Hox* genes can shed light on the place of echinoderms among the deuterostomes // *EvoDevo*. 2014. Vol. 5. 22.
 5. Martinez P., Rast J.P., Arenas-Mena C., et al. Organization of an echinoderm *Hox* gene cluster // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 1469–1474.
 6. Cameron R.A., Rowen L., Nesbitt R., et al. Unusual gene order and organization of the sea urchin *Hox* cluster // *J. Exp. Zool. B: Mol. Dev. Evol.* 2006. Vol. 306. P. 45–58.
 7. Mito T., Endo K. PCR survey of *Hox* genes in the crinoid and ophiuroid: evidence for anterior conservation and posterior expansion in the echinoderm *Hox* gene cluster // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2000. Vol. 14. No. 3. P. 375–388.
 8. Aronowicz J., Lowe C.J. *Hox* gene expression in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* and the evolution of deuterostome nervous systems // *Integr. Comp. Biol.* 2006. Vol. 46. P. 890–901.
 9. Freeman R., Ikuta T., Wu M., et al. Identical genomic organization of two hemichordate *Hox* clusters // *Curr. Biol.* 2012. Vol. 22. No. 21. P. 2053–2058.
 10. Arenas-Mena C., Martinez P., Cameron R.A., et al. Expression of the *Hox* gene complex in the indirect development of a sea urchin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 13062–13067.
 11. Tsuchimoto J., Yamaguchi M. *Hox* expression in the direct-type developing sand dollar *Peronella japonica* // *Dev. Dyn.* 2014. Vol. 243. P. 1020–1029.
 12. Ageenko N.V., Kiselev K.V., Odintsova N.A. Expression of pigment cell-specific genes in the ontogenesis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // *J. Evid.-Based Complementary Altern. Med.* 2011. 730356.
 13. Tu Q., Cameron R.A., Worley K.C., et al. Gene structure in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* based on transcriptome analysis // *Genome Res.* 2012. Vol. 22. No. 10. P. 2079–2087.
 14. Tu Q., Cameron R.A., Davidson E.H. Quantitative developmental transcriptomes of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // *Dev. Biol.* 2014. Vol. 385. No. 2P. 160–167.
 15. Angerer L.M., Dolecki G.J., Gagnon M.L., et al. Progressively restricted expression of a homeo box gene within the aboral ectoderm of developing sea urchin embryos // *Genes Dev.* 1989. Vol. 3. No. 3. P. 370–383.
 16. Dobias S.L., Zhao A.Z., Tan H., et al. *SpHbox7*, a new Abd-B class homeobox gene from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*: insights into the evolution of *hox* gene expression and function // *Dev. Dyn.* 1996. Vol. 207. No. 4. P. 450–460.
 17. Kikuchi M., Omori A., Kurokawa D., et al. Patterning of anteroposterior body axis displayed in the expression of *Hox* genes in sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Development Genes and Evolution*. 2015. Vol. 225. No. 5. P. 275–286.
 18. Hara Y., Yamaguchi M., Akasaka K., et al. Expression patterns of *Hox* genes in larvae of the sea lily *Metacrinus rotundus* // *Development Genes and Evolution*. 2006. Vol. 216. No. 12. P. 797–809.

EXPRESSION OF *HOX* CLUSTER GENES IN EARLY LARVAL DEVELOPMENT OF SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)

N. V. Ageenko¹, O. V. Ezhova², *, K. V. Kiselev³, A. I. Lukinykh²,
Academician of the RAS V. V. Malakhov²

¹*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (NSCMB FEB RAS), Vladivostok, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

³*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences Vladivostok, Russia*

*e-mail: olga_ejova@mail.ru

The quantitative assessment of the expression of 11 genes of the *Hox* cluster of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (*SiHox1*, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9/10, 11/13a, 11/13b, 11/13c) in the larvae at early developmental stages (blastula – 13 hours post fertilization (h.p.f.), gastrula – 35 h.p.f., prism stage – 46 h.p.f., echinoplutei – 4 and 9 days p.f.) was carried out. At the blastula stage, the expression of the *SiHox-7*, *11/13b*, and *11/13c* is observed; as for the latter the early activation was noted for the first time for regular sea urchins. At the gastrula and prism stages, a very low level of expression is observed. At the pluteus stage, there is significant increase of the expression of all *Hox* cluster genes. Breakages of temporal colinearity during the expression of *Hox* genes in echinoderms are discussed.

Keywords: real-time PCR, blastula, gastrula, prism stage, pluteus