

Санкт-Петербургский государственный университет

Филимонова Дарья Алексеевна

Активность MAP-киназного сигнального каскада в раннем развитии  
полихеты *Alitta virens*

Выпускная квалификационная работа по направлению подготовки «Биология»  
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»  
профиль «Клеточная и молекулярная биология, биотехнология»

Работа выполнена на кафедре эмбриологии СПбГУ  
(И.о. зав. кафедрой – к.б.н., доцент Р.П. Костюченко)

Научный руководитель:  
ст. преподаватель, к.б.н. В.В. Козин

Санкт-Петербург

2017

## Содержание

Введение .....	4
Обзор литературы .....	5
Спиральное дробление .....	5
Особенности спирального дробления, номенклатура и генеалогия клеточных линий .....	5
Гетеро-и гомоквадрантное спиральное дробление .....	6
Детерминированность и регуляция в спиральном дроблении .....	7
Дупликация туловищных структур как демонстрация индукционных взаимодействий ...	9
Способности изолированных бластомеров различных линий к автономному развитию у объектов с гетероквадрантным спиральным дроблением .....	10
Процессы регуляции при установлении клеточных судеб в гомоквадрантно дробящемся зародыше .....	12
Возможные механизмы эмбриональной индукции .....	12
Экспериментальное удаление бластомеров в зародышах гетероквадрантно дробящихся представителей, роль производных квадранта D .....	12
Взаимодействия клеток в зародыше, установление контактов .....	13
Эмбриональный организатор .....	14
Эмбриональный организатор в зародыше моллюсков .....	14
Эмбриональный организатор в зародыше аннелид .....	15
MAP-киназный сигнальный путь .....	17
Роль MAP-киназного каскада в развитии <i>Spiralia</i> .....	17
MAP-киназный сигнальный каскад и функционирования эмбрионального организатора в зародыше моллюсков .....	17
Роль MAP-киназного каскада в развитии полихет .....	21
Материалы и методы .....	24
Получение эмбриональной культуры синхронного развития <i>Alitta virens</i> .....	24
Фиксация эмбрионального материала .....	24

Иммуноцитохимические исследования .....	25
Анализ материала методом конфокальной микроскопии и последующая обработка данных.....	26
Результаты и обсуждение .....	27
Внутриклеточная локализация сигнала .....	27
Активность MAP-киназы на стадии восьми бластомеров .....	28
Активность MAP-киназы на стадии 16 бластомеров .....	29
Активность MAP-киназы на стадии 17 бластомеров (Выделение 3d) .....	31
Активность на стадии 23 бластомеров .....	33
Активность на стадии около 32 бластомеров .....	35
Прослеживание активности MAP-киназного каскада в отдельных клеточных линиях ...	37
Эволюционная интерпретация .....	41
Выводы .....	43
Благодарности.....	44
Литература .....	44

## Введение

Эмбрионы животных со спиральным дроблением (объединяемых в группу Spiralia) – многообещающая модель для исследования сигнальных каскадов в морфогенетических процессах. В экспериментах по удалению и пересадке бластомеров было показано существование индуктивных взаимодействий в зародышах моллюсков и аннелид, однако ее молекулярная природа до последнего времени оставалась загадкой. Первые данные о путях межклеточной коммуникации в раннем развитии Spiralia были получены на моллюсках и показали существование в зародыше эмбрионального организатора – клетки 3D. Исследования молекулярных основ его определения и функционирования выявили ключевого участника индукционных событий – MAP-киназный сигнальный каскад, отвечающий за установление эмбриональных осей и индукцию личиночных и дефинитивных структур в эмбрионах многих видов. Однако дальнейшие исследования продемонстрировали существенную вариабельность участия MAP-киназного каскада в развитии Spiralia. Относительно же развития аннелид был продемонстрирован широкий спектр клеток, выполняющих функцию организатора в зародыше, не согласующийся с консервативной ролью 3D в развитии моллюсков. Роль MAP-киназного сигнального каскада, изученная на небольшом числе представителей аннелид, также не может быть сведена к общему среди Spiralia консенсусу. Изучение организующих событий у зародышей полихет, таким образом, представляет особенный интерес ввиду малоизученности этого вопроса и его важности для эволюционных построений.

**Цель работы:** Выявить участие MAP-киназного сигнального пути в раннем эмбриональном развитии нереидной полихеты *Alitta virens*.

### Задачи:

1. Выявить у зародышей *A. virens* активную форму MAP-киназы Erk1/2 и определить её внутриклеточную локализацию.
2. Проанализировать приуроченность активности MAP-киназного сигнального пути к определённым линиям клеток.
3. Определить временной период активности MAPК для анализа возможной связи с происходящими морфогенетическими событиями.
4. Выявить общие и частные закономерности участия MAP-киназного сигнального каскада в развитии Spiralia и у *A. virens*.

## Обзор литературы

### Спиральное дробление

#### Особенности спирального дробления, номенклатура и генеалогия клеточных линий

Для спирального дробления характерно стереотипное расположение клеток. В результате делений с чередующимися косо направленными бороздами дробления происходит отделение от крупных желток-содержащих клеток (макромеров) более мелких клеток (микромеров), таким образом, что потомство каждого из четырёх макромеров занимает определённую область зародыша (квадрант).

Первые два цикла дробления происходят вдоль анимально-вегетативной оси оплодотворённой яйцеклетки и приводят к формированию четырёх клеток-родоначальниц квадрантов. Эти квадранты обозначаются А, В, С и D соответственно, согласно предложенной Эдвином Конклиным номенклатуре (Conklin, 1897). У зародышей многих *Spiralia* первые деления дробления симметричны и порождают примерно равные по размеру клетки. В других же случаях происходят ассиметричные деления, и, как правило, один из макромеров (родоначальник квадранта D) значительно превосходит по размеру остальные. В обоих случаях каждый из четырёх макромеров в последующих циклах дробления отделяет к анимальному полюсу относительно небольшую дочернюю клетку (микромер). Веретёна делений дробления при этом имеют наклон около  $30^\circ$  относительно анимально-вегетативной оси, сменяющийся в следующем цикле дробления на противоположный.

В некоторых случаях (особенно это характерно для дробящихся зародышей немертин) микромеры превышают по размеру макромеры. В номенклатуре макромеры обозначаются заглавными буквами (1A, 1B, 1C, 1D), а их потомки-микромеры – прописными (1a, 1b, 1c, 1d). Цифрой перед буквой обозначается порядковый номер «спирального» деления дробления, в ходе которого образовалась клетка. Обычно в ходе дробления образуются четыре поколения микромеров, хотя у некоторых видов можно наблюдать и пятое. Разумеется, сами микромеры также претерпевают циклические дробления, также отделяя дочерние клетки с сохранением симметрии зародыша. При построении генеалогии дочерняя клетка, отделяющаяся по направлению к анимальному полюсу, получает индекс  $q^1$ , а более вегетативная –  $q^2$ . В некоторый момент спиральный рисунок дробления зародыша нарушается проявлениями билатеральной симметрии. В

большинстве случаев первые признаки появления билатеральной симметрии демонстрируют клетки квадранта D. Так это происходит в группах аннелид и моллюсков, демонстрирующих канонический рисунок спирального дробления. В результате деления микромера 4d образуются две клетки-предшественника мезодермы (или мезэнтодермы), обозначаемые MR и ML (мезобласт левый и мезобласт правый). Эти клетки дают начало билатерально симметричным полоскам мезодермальных (мезэнтодермальных) клеток у зародышей моллюсков и аннелид. Также могут рано демонстрировать билатерально симметричный паттерн дробления клетки 2d (соматобласт) и, в случае моллюсков, 1d<sup>121</sup> (Dohle, 1999).

После выделения клеточных линий происходит гаструляция — морфогенетический процесс, в ходе которого клетки перемещаются, так что пространственно разделяются зачатки зародыша — эктодерма, мезодерма и энтодерма.

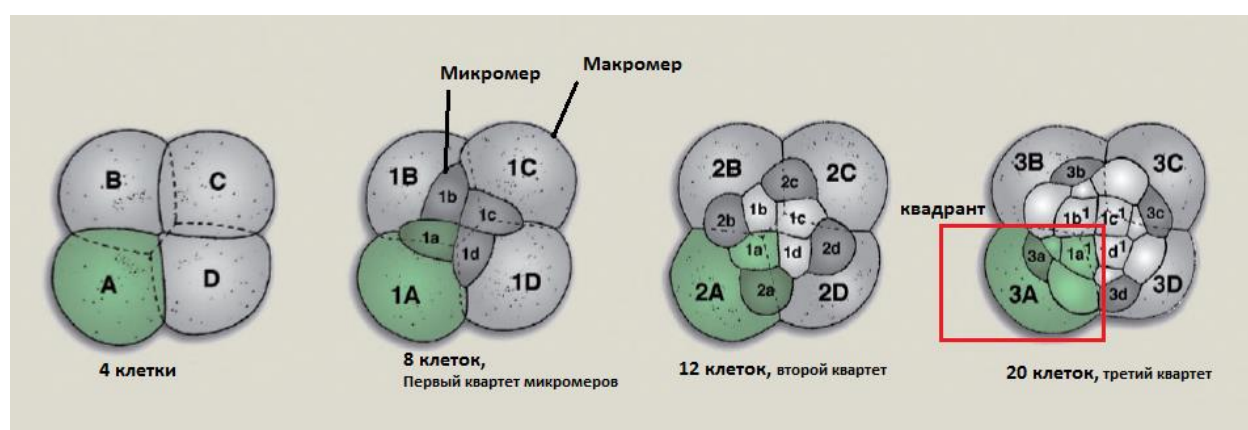


Рисунок 1: Гомоквадрантное спиральное дробление. По Henry, 2014.

### Гетеро-и гомоквадрантное спиральное дробление

Спецификация клеточных линий в строго определённых областях зародыша происходит благодаря направленной сегрегации цитоплазматических факторов яйца в процессе дробления. Однако, количество запасённых материнских продуктов и степень зависимости от них зародыша в развитии может сильно варьировать. Можно выделить две стратегии развития спирально дробящихся животных по степени перенесения раннего развития под контроль запасённых материнских молекул.

Первая из них именуется *гомоквадрантным* спиральным дроблением, где первые 2 цикла дробления равноценны. Образующиеся квадранты почти неразличимы на начальных стадиях дробления, так как в равной мере обеспечены запасёнными в яйце факторами.

Вторая имеет название *гетероквадрантного* спирального дробления. В этом случае, в результате изменений положения веретён дробления происходит сегрегация материнских

детерминант и питательных веществ. Для моллюсков и аннелид характерно, что макромеры С и D превышают объём А и В, и, более того, макромер D, несущий детерминанты для развития мезэнтодермы, может превышать сестринские клетки по объёму в несколько раз.

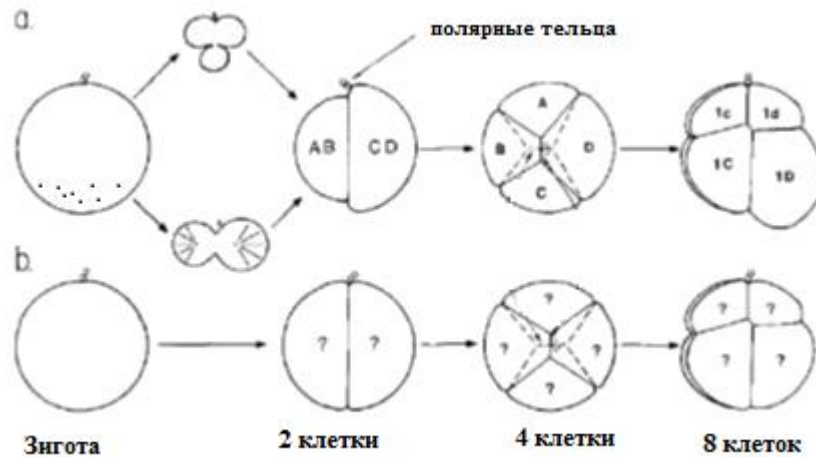


Рисунок 2. Гомоквадрантное (а) и гетероквадрантное (б) спиральное дробление. По Martindale, 1985.

## Детерминированность и регуляция в спиральном дроблении.

### Полярная лопасть и её роль в развитии по гетероквадрантному типу

Количество цитоплазмы, наследуемой макромером D, иногда бывает настолько велико, что, для сохранения синхронности дробления и контроля над распределением детерминант, у ряда моллюсков и аннелид выработался механизм выделения её в отдельный компартмент. Этот компартмент называется *полярной лопастью* и представляет собой выпячивание части клетки, в той или иной степени изолированное от той области, где закладывается веретено деления. Полярная лопасть закладывается в первом, или в нескольких первых циклах дробления. Можно провести условное деление полярных лопастей у изученных представителей на два класса. Многие виды формируют значительного размера полярные лопасти, составляющие 25-33% объёма яйцеклетки, как, например, зародыши *Ilyanassaobsoleta* (Clement, 1952), *Sabellaria cementarum* (Hatt, 1932; Novikoff, 1938; Render, 1983); *Mytilus edulus* (Rattenbury and Berg, 1954); *Dentalium dentale* (Van Dongen, 1976 a,b). У зародышей других видов полярные лопасти маленькие, содержащие около 1% от объёма цитоплазмы яйцеклетки, как например, моллюски *Bithynia tentaculata* (Cather and Verdonk, 1974; Cather et al., 1976) и *Crepidula fornicata*

(Dohmen and Lok, 1975; Dohmen and van der Mey, 1977), полихеты *Chaetopterus variopedatus* (Henry, 1986) и *Autolytus fasciatis* (Allen, 1964), а также вестиментиферы *Lamellibrachia* и *Escarpia* (Young et al., 1996).

Выяснение роли полярной лопасти в развитии эмбриона, проведённое путём её удаления, показало, что её отсутствие вызывает тяжёлые дефекты развития. Так, согласно данным Клемента (Clement, 1952), удаление полярной лопасти у моллюска *Ilyanassa obsoleta* нарушает паттерн развития квадранта D и в дальнейшем приводит к формированию слабо оформленной личинки, несущей множество длинных ресничек, имеющей энтодермальные и пигментные клетки, но не обнаруживающей наличия раковины, ноги, глаз и сердца. Также в зародыше присутствовало некоторое количество мезодермальных производных, однако все потомки 4d формировали энтодерму. Автор отмечает, что удаление клетки 4D, наследующей большую часть содержимого полярной лопасти, не приводило к серьёзным дефектам. Таким образом, автор делает вывод, что детерминанты полярной лопасти важны для установления судьбы квадрантов и функционирования мезобластов (Crampton, 1896; Clement, 1952). Подобные данные были получены и на других представителях Spiralia – моллюсках *Dentalium* (Wilson, 1904) *Ilyanassa*, *Urosalpinx* и *Anachis* (Crampton and Wilson, 1895), полихете *Sabellaria* (Hatt, 1932; Novikoff, 1938) и других (Clement 1952; van Dongen and Geilenkirchen 1975; van Dongen 1976a, b). Исследователи отмечали, что у радиализованной в результате удаления полярной лопасти личинки все квадранты имеют характеристики вентральных (т.е. квадрантов В).

Интересно, что хотя ампутация составляющей менее 1% от объёма яйца полярной лопасти у *Bithynia* приводило к уже знакомому результату (отсутствие билатеральной симметрии, мезодермальных полосок, глаз, раковины и др.) (Cather and Verdonk, 1974), некоторые другие объекты, также формирующие небольшие полярные лопасти, показывали значительно меньшие отклонения от нормы. Так, у *Chaetopterus variopedatus* удаление полярной лопасти сказывалось только на развитии фотоцитов (Henry, 1986), а на развитии *Crepidula fornicata* оно не сказывалось вовсе. Однако, в последнем случае было показано, что удаление клетки 4d ведёт к образованию радиально симметричной, дезорганизованной личинки (Henry et al., 2006).

Эти данные привели исследователей к выводу, что детерминанты, критически необходимые для развития, наследуются квадрантом D и являются необходимым



условием его формирования, а также оказывают влияние на производные других квадрантов.

### Дупликация туловищных структур как демонстрация индукционных взаимодействий

Ещё одним свидетельством в пользу наличия в яйце спиралей дорсализующих детерминант, и, одновременно с тем, неопровержимым доказательством способности эмбриона спирально дробящегося животного к регуляции, стала серия экспериментов по экспериментальной индукции сдвоенных зародышей.

В 1930 году Альберт Тайлер опубликовал статью о получении сдвоенных эмбрионов воздействием на оплодотворённые яйца факторами, вызывающими равномерное распределение цитоплазматических детерминант в сестринские бластомеры. Удвоение наблюдалось для полихет *Chaetopterus* и *Nereis* и двустворчатого моллюска *Cumingia* при воздействии на яйцо давлением, центрифугированием, повышенной и пониженной температурой и недостатком кислорода (Tyler, 1930).

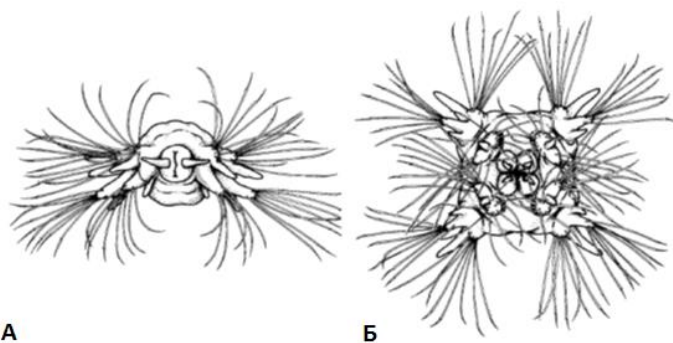
О способности зародыша спиралей формировать дополнительную эмбриональную ось в результате установления двух дорсальных квадрантов сообщали и эксперименты других учёных (Guerrier et al., 1978; Henry and Martindale, 1987; Render, 1989).

Подробно этот эффект был исследован в лаборатории А. Фишера на примере искусственного нарушения распределения детерминант в дробящемся яйце *Platynereis dumerelii* (Dorresteijn et al., 1987). Исследователи использовали в опыте цитохалазин Б - ингибитор актиновых филаментов, препятствующий образованию в делящейся клетке сократимого кольца, и тем самым, разделению цитоплазмы.

При обработке цитохалазином Б зародыша полихеты было отмечено наличие «счётчика делений»: при снятии эффекта ингибитора зародыш дробился так, будто предыдущее деление дробления закончилось успешно. При этом дробление проходило в меридиональной плоскости и приводило к формированию двух приблизительно равных по объёму бластомеров. При культивировании таких зародышей большая часть завершала развитие в состоянии «вечной бластулы» без следов каких-либо эмбриональных осей, однако, развитие некоторых зародышей продолжалось и приводило к формированию животных с удвоенными туловищными структурами. При исследовании морфологии таких животных у них было обнаружено две нервные цепочки и удвоенное количество

связанных с ней мезодермальных структур, а также дупликация пароподий. Эти животные имели в туловищном отделе две дорсальные и две вентральные стороны, расположенные друг относительно друга под углом в 90 градусов.

Авторами был сделан вывод, что в результате равномерного распределения цитоплазматических детерминант между бластомерами CD и АВ произошло образование двух дорсовентральных осей тела, перпендикулярных друг другу (Dorresteijn et al., 1987).



*Рисунок 3. Нормальный ювенильный червь P.dumerilii (А) и червь с дублированными туловищными структурами (Б), вид сзади, на (А) дорсальная сторона сверху, вентральная – снизу, на (Б) дорсальная сторона сверху и снизу, вентральная сторона слева и справа. По Dorresteijn et al., 1987.*

Все приведенные данные свидетельствуют о том, что производные дорсального квадранта выполняют в зародыше гетероквадрантно дробящихся моллюсков и аннелид роль эмбрионального организатора. Притом для способности к индуктивным взаимодействиям и спецификации дорсальной судьбы необходимы материнские детерминанты, содержащиеся в материале полярной лопасти или цитоплазме бóльшего макромера (D), образующегося при неравноценном распределении цитоплазмы между сестринскими макромерами. Таким образом, уже на стадии четырёх бластомеров можно говорить об определении судеб квадрантов и наличии эмбриональных осей у этих представителей спирально дробящихся животных.

### Способности изолированных бластомеров различных линий к автономному развитию у объектов с гетероквадрантным спиральным дроблением

Данные о способностях изолированных бластомеров к независимому развитию предоставляет нам ставшая классическим примером статья Крэмптона (Crampton, 1896),

где оно исследовалось на примере гетероквадрантно дробящихся моллюсков *Ilyanassa*, *Urosalpinx* и *Anachis*.

Было показано, что изолированные бластомеры, развивающиеся в экспериментальных условиях, образуют те же части зародыша, что и в норме, восполнения утраченных структур не происходит.

Бластомеры, изолированные на двухклеточной стадии, дают зародыш, сходный с соответствующей половиной нормального. В производных бластомера CD можно наблюдать образование крупной клетки, соответствующей 4d. Однако не происходит установления клеточных контактов и гастрюляционных движений, и вскоре клетки дезинтегрируются и погибают.

Важно отметить, что производные квадранта АВ показывают гораздо лучшее соответствие своим аналогам в нормальном зародыше, чем CD. Изолированный бластомер АВ способен сформировать все функциональные производные этих квадрантов, включая бьющиеся реснички, тогда как полученный из бластомеров CD зародыш менее организован, не способен сформировать реснички, а также мезодермальные полосы.

Изолированные на стадии 8 бластомеров микромеры первого квадранта способны проходить деления согласно их нормальному состоянию. Однако, макромеры, изолированные на соответствующей стадии, способности к дальнейшему развитию не показали, но макромер, отделённый вместе с микромером, способны сформировать одну четвёртую часть зародыша, также как и отделённый на стадии четырёх клеток макромер - родоначальник квадранта (Crampton, 1896).

Эти наблюдения были подтверждены работами многих исследователей, в их числе Гесса, отметившего, что материал полярной лопасти индуцирует формирование клетки 4d и дорсальных признаков, однако, его потомки в частичных зародышах дают только энтодермальные производные (Hess, 1956).

Таим образом, можно резюмировать, что клетки гетероквадрантно дробящихся представителей имеют высокую детерминированность судеб, однако, для образования полноценной личинки требуются взаимодействия клеток, в особенности критичные для образования мезодермальных полосок. Детерминанты, содержащиеся в цитоплазме полярной лопасти, обеспечивают автономное определение дорсального квадранта.

## Процессы регуляции при установлении клеточных судеб в гомоквадрантно дробящемся зародыше

Другая картина наблюдается при микрохирургических операциях над зародышами гомоквадрантно дробящихся представителей. Было показано, что зародыши многих видов способны к частичной регуляции, в том числе, установлению дорсального квадранта при удалении клетки-предшественника 3D на стадиях, предшествующих отделению четвёртого квартета микромеров (Van den Biggelaar, 1976; Martindale et al., 1985; Henry, 2002 и другие). Более того, при разделении зародыша моллюска *Crepidula fornicata* (как уже упоминалось, имеющего полярную лопасть, но, согласно наблюдениям авторов и экспериментам по её удалению, демонстрирующего гомоквадрантный тип развития) обе половинки способны некоторое время продолжать развитие, сходное с нормальным, причём в каждой из них устанавливается квадрант, демонстрирующий признаки дорсальности (Henry and Perry, 2008).

## Возможные механизмы эмбриональной индукции

### Экспериментальное удаление бластомеров в зародышах гетероквадрантно дробящихся представителей, роль производных квадранта D

Чтобы выяснить роль конкретных производных квадранта D в развитии, Клемент предпринял на *Ilyanassa* серию экспериментов по экстирпации бластомеров (Clement, 1962). Так, личинка, полученная умерщвлением бластомера D на четырёхклеточной стадии (т.е. из производных ABC) развивалась до свободноплавающей стадии. При этом наблюдалось отсутствие ноги, сердца, кишечника, оформленной раковины, и, в большинстве случаев, глаз. Теми же дефектами характеризовались личинки в эксперименте, где макромер удалялся после третьего цикла дробления (ABC+1d). Полученные после следующего цикла дробления удалением 2D личинки повторяли картину предыдущих, однако были способны формировать неполноценную раковину. Разительно отличались зародыши, полученные уничтожением 3D по завершении пятого цикла дробления (ABC + 1d + 2d + 3d). Многие из этих зародышей были способны сформировать вельюм, глаза, ногу и нормальную раковину. Кишечник и сердце, являющиеся производными мезэнтобласта, во всех случаях отсутствовали. Автор отметил также значительный разброс способностей к развитию среди этой группы. В результате удаления клетки 4D в пятом цикле были получены совершенно нормальные личинки.

Выводом из этого исследования стало следующее предположение: детерминирующее воздействие полярной лопасти на производные квадрантов ABC приходится на период формирования третьего квартета микромеров. (Clement, 1962).

### Взаимодействия клеток в зародыше, установление контактов

Голландский эмбриолог ван ден Биггелаар в своих работах уделил особое внимание взаимодействию клеток в зародышах моллюсков. Им были подробно изучены и описаны контакты бластомеров на ранних стадиях развития. Так, Ван ден Биггелаар пишет, что в развитии гомоквадрантно дробящейся *Patella* активно происходят процессы установления и разрыва контактов между макромерами и анимальными микромерами (van den Biggelaar, 1977).

На стадиях с 8 до 32 бластомеров изначально неразличимые между собой макромеры контактируют вначале с микромерами первого квартета, затем с микромерами второго квартета и вегетативно лежащими потомками микромеров первого квартета. При этом накрест лежащие макромеры (B и D) имеют большее количество клеточных контактов, чем сестринские клетки (A и C). К стадии 32х бластомеров анимально лежащие потомки первого квартета и макромеры вновь приходят в контакт благодаря врастанию макромеров в полость бластулы и вытяжению микромеров им навстречу. Все четыре макромера вступают в контакт, но через некоторое время основная площадь взаимодействия с микромерами приходится на макромеры квадрантов B и D. Постепенно можно наблюдать, что один из этих макромеров уходит вглубь зародыша, а другой устанавливает контакт с микромерами всех четырёх квадрантов. С этого момента данный макромер определяется как 3D, после чего пауза в дроблении завершается и с отделением 4d можно наблюдать первые признаки билатеральной симметрии, говорящие об установлении в зародыше дорсовентральной оси.

Эти наблюдения дали основания полагать, что спецификация 3D происходит на этой стадии и для неё имеет значение взаимодействие макромеров и анимальных микромеров (van den Biggelaar, 1977).

Подобная же картина наблюдалась ван Ден Биггелааром и в развитии *Lymnaea*, за исключением того, что макромер 3D является единственной клеткой, врастающей в полость бластулы (van den Biggelaar, 1976).

Предложенная модель определения квадранта D в ходе анимально-вегетативных взаимодействий была протестирована экспериментами по удалению одного или

нескольких микромеров. Действительно, они показали, что квадрант D формируется макромером, имеющим наибольшее количество контактов на стадии перед пятым циклом дробления. Даже в случаях, когда возможно выделить по морфологическим особенностям клетку-предшественника 3D, после удаления прилежащих микромеров зародыш претерпевает регуляцию и дорсальный квадрант устанавливается на стороне другого макромера, имеющего наибольшее количество контактов с оставшимися. Если же удалялся весь первый квадрант микромеров, зародыш оставался радиализованным, все его квадранты демонстрировали характеристики вентральных (Arnolds et al., 1983; Martindale et al., 1985).

Для окончательной проверки модели, Мартиндейл и коллеги провели серию экспериментов, обрабатывая зародыши *Lymnaea palustris* цитохалазином B - реагентом, угнетающим работу цитоскелета - на стадии 24 клеток, таким образом предотвращая контакт 3D и анимальных микромеров. В результате дифференцировки D-квадранта не наблюдалось, а зародыш оставался радиально симметричным (Martindale et al., 1985).

Результаты перечисленных исследований (van den Biggelaar, 1976; van den Biggelaar and Guerrier 1979; Arnolds et al. 1983, Martindale et al., 1985, Boring, 1986) дают основания предполагать, что анимально-вегетативные взаимодействия, происходящие в интервале между формированием третьего и четвёртого квартета микромеров, необходимы для установления нормальной симметрии в вегетальной полушарии личинки при гомоквадрантном спиральном дроблении.

Эти данные также доказывают, что при гомоквадрантном дроблении квадранты имеют равные потенции к развитию вплоть до отделения третьего квартета микромеров. Индукционные взаимодействия, приводящие к установлению идентичности квадрантов и функционированию эмбрионального организатора, приходятся на промежуток между четвёртым и пятым циклом дробления, когда зародыш имеет около 32 бластомеров.

## Эмбриональный организатор

### Эмбриональный организатор в зародыше моллюсков

В результате вышеописанных экспериментов была установлена исключительная роль в развитии моллюсков макромера 3D, который, в свою очередь, индуцируется анимальными макромерами к приобретению или проявлению организующей способности. Для

уточнения природы этого взаимодействия были проведены эксперименты с воздействием на развивающиеся зародыша ингибиторов белкового транспорта, брефелдина А и монензина (Gonzales et al., 2007). Эти вещества, нарушающие процессинг и секрецию белков, блокировали, таким образом, клеточный сигналинг в зародышах на выбранной стадии. Как и предполагали исследователи, обработкой ингибиторами в период до выделения 4d достигалось образование радиализованной личинки с характерными дефектами, аналогичными полученным удалением полярной лопасти и бластомера 3D в уже описанных экспериментах. Радиализация в результате воздействия брефелдина и монензина была показана для гастропод *Patella vulgata* и *Lymnaea stagnalis*, хитона *Mopalia muscosa* и скафоподы *Antalis entails* (Gonzales et al., 2007).

### Эмбриональный организатор в зародыше аннелид

С целью проверить, применима ли гипотеза о существовании в зародыше спирально дробящегося животного клетки-организатора на другие группы, была проведена серия исследований на аннелидах.

Изучение воздействия брефелдина А и монензина на зародыши гомоквадрантно дробящихся полихет *Arctonoe vittata* и *Serpula columbiana* на стадиях с 32 до 62 клеток (период до первого билатерально симметричного дробления) приводило к формированию радиально симметричных (или, в некоторых случаях, показывающих признаки четырёхлучевой симметрии) личинок. (Gonzales et al., 2007).

Также важно отметить, что авторы изучили анимально-вегетативные контакты, и не отметили установления контактов между макромерами и анимальными микромерами у *O. fusiformis* и *S. columbiana*, но, притом, клетки на соответствующей стадии слегка изменяли форму и незначительно выпячивались в полость бластоцеля. Напротив, зародыш *A. vittata* демонстрирует формирование клеточных контактов. Сближение макромера 4D, микромера 4d и анимальных микромеров,  $1q^{111}$  и  $1q^{112}$ , после их формирования на 44-клеточной стадии и незадолго до установления билатеральной симметрии.

Неожиданные результаты, однако, дали эксперименты по удалению бластомеров. Как минимум у двух исследованных полихет макромер 3D не является эмбриональным организатором.

Так, в зародыше *Capitella teleta* функции организатора выполняет микромер 2d. Удаление этого бластомера приводит к нарушению билатеральной симметрии, отсутствию дорсовентральной разметки головных структур, а также нарушает развитие

мезодермальных производных и нервной системы. Так же как для клетки 3D в развитии моллюсков, для бластомера 2d было показано установление клеточных контактов с анимальными микромерами. Удаление бластомеров 3D и 4d не влияет на развитие личинки. Кроме того, удаление основных источников мезодермы у этого вида, 3d и 3c, не оказывало влияния на другие структуры, что подвергает сомнению связь между клетками-предшественниками мезодермы и организующей способностью (Amiel et al., 2013).

Не менее выбивающиеся из общей картины результаты дало исследование индукционных взаимодействий в зародыше олигохеты *Tubifex tubifex*, где источником организующего воздействия являются два бластомера, 2d<sup>11</sup> и 4d одновременно. В случае уничтожения одного из бластомеров, дорсовентральная ось не формируется, у зародыша нарушаются гастрюляционные морфогенезы. Зародыш, лишённый и 2d<sup>11</sup>, и 4d, развивается в слабо дифференцированную массу клеток. Однако, такие зародыши можно «спасти» гомотопической, а в значительном количестве случаев даже гетеротопической (в 11% случаев формируется практически нормальный организм, в 77% очевидно наличие дорсовентральной оси) пересадкой донорских 2d<sup>11</sup> и 4d. При трансплантации донорских бластомеров 2d<sup>11</sup> и 4d на вентральную сторону зародыша развивались животные с удвоенными головами (Y-фенотип) или головами и хвостами (X-фенотип). При этом тип проявления дубликации зависел от ориентации трансплантируемых бластомеров (Nakamoto et al., 2011).

Таким образом, в зародышах аннелид также как и в эмбрионах моллюсков наблюдается существование эмбрионального организатора, однако не соблюдается идентичность клеток, осуществляющих организующее воздействие.

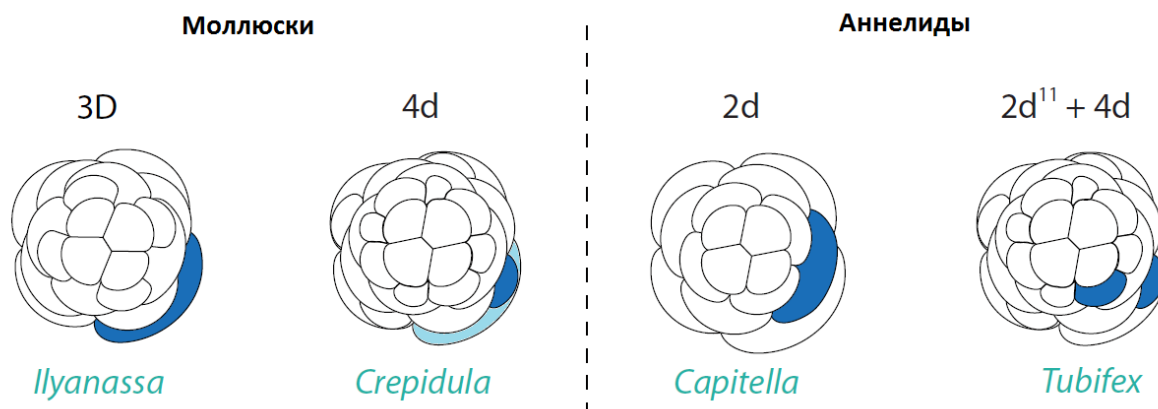


Рисунок 4. Клетки, являющиеся источником организующего воздействия, в зародышах *Spiralia*. Клетка-организатор выделена цветом, её номенклатурное обозначение указано над схемой. По Seaver, 2014.



## MAP-киназный сигнальный путь

Поиски возможных участников организующих событий привели к каскаду митоген-ассоциированных протеинкиназ (Lambert, Nagy, 2001). MAP-киназный сигнальный каскад состоит из трех последовательно фосфорилирующих друг друга консервативных белков (Raf (MAPKKK), Mek (MAPKK), Erk (MAPK)) с киназным доменом и большого количества регуляторных факторов. Особого внимания здесь заслуживает двойная специфичность киназы, Erk, которая для приобретения сигнальных свойств должна быть фосфорилирована по уникальному для других киназ паттерну - остаткам Tyr204/187 и Thr202/185, что делает её удобным объектом для проведения цитохимических исследований активности каскада в виду малой вероятности пересечения сигнальных путей. Активированная MAP-киназа Erk (от англ. **extracellular signal-related kinase**), в свою очередь, фосфорилирует белки-мишени, которые принадлежат системам клеточного цитоскелета и метаболизма, пролиферации и дифференцировки, а локализуются эти эффекторы в цитоплазме, митохондриях, ЭПР и, в особенности, в ядре (Plotnikov et al., 2011; Yang et al., 2013). Одной из основных мишеней MAP-киназного сигнального каскада является важный фактор транскрипции СВР/p300.

## Роль MAP-киназного каскада в развитии *Spiralia*

### MAP-киназный сигнальный каскад и функционирования эмбрионального организатора в зародыше моллюсков

В 2001 году группой Дэвида Ламберта была обнаружена и описана активация MAP-киназного сигнального пути в зародыше *Ilyanassa obsoleta*. MAPK впервые выявляется в 3D вскоре после отделения третьего квартета микромеров, и затем в микромерах, прилежащих к 3D, перед отделением от него 4d на стадии 32х бластомеров (Lambert, Nagy, 2001).

В ходе дальнейшего развития активация MAPK распространяется на небольшую группу дорсолатерально расположенных микромеров. Проведённые авторами опыты по ингибированию MAPK показали нарушения в спецификации 3D и клеточных линий, нуждающихся в индукционном сигнале организатора, аналогичные получаемым удалением полярной лопасти.

Далее роль этого каскада была исследована роль MAPK каскада в развитии трёх видов гомоквадрантно дробящихся моллюсков. У хитона *Chaetopleurula* улитки *Tectura* и прудовика *Lymnaea* MAP-киназный путь активировался на соответствующей стадии в бластомере 3D, обработка ингибитором приводила к сходным радиализованным личинкам. Единственным отличием паттера активации этого каскада от показанного на *Puynassa* стало то, что сигналинг не затрагивал анимальные микромеры. Основываясь на полученных данных, авторы предположили консервативную роль MAPK сигналинга в событиях индукции у моллюсков (Lambert, Nagy, 2003).

С предложенной моделью хорошо согласуются данные, полученные на морском блюдечке *Testudinalia testudinalis* (Козин и др., 2013). Активация MAPK была отмечена вскоре после того, как презумптивный 3D вытягивается и приходит в контакт с анимальными микромерами (приблизительно полчаса после отделения третьего квартета микромеров). Ингибирование MAPK-сигналинга при помощи U0126 приводило к формированию личинок с нарушениями в строении, однако же не влияло на установление дорсо-вентральной оси.

Ещё один исследованный моллюск, *Haliothis asinine* демонстрирующий гомоквадрантное дробление, относится к Vetigastropoda. MAPK-сигнал впервые детектируется в одном из накрест-лежащих макромеров через 15-40 минут после 5 цикла дробления, что совпадает с периодом, когда накрест-лежащий макромер занимает центральную позицию в полости зародыша. Полное ингибирование сигналинга на этой стадии приводит к формированию трохофор безо всяких узнаваемых структур в посттрохальном регионе, что напоминает полученные в опытах с нарушением сигналинга 3D у других гастропод.

Авторами было отмечено два фенотипа: при низких концентрациях ингибитора присутствовали эктодермальные структуры, но отсутствовала мезодерма, при более высоких – наблюдались нарушения в гастрюляции и формирование личинок без сформированных посттрохальных структур. Авторы предполагают, что в эмбрионе *H. asinina* MAPK одновременно вовлечён в спецификацию клеточной линии 3D и в индукцию организаторной активности D квадранта, последнее – требующее более интенсивного, и, возможно, более продолжительного уровня MAPK активности. Таким образом, хотя активация MAPK сочтена необходимой для формирования энтомезодермы и установления идентичности претрохальных квартетов микромеров, спецификация и разметка эктодермальных клеток не находится под необходимым контролем MAPK. Также, очевидно, для установления дорсо-вентральной оси используется другой сигнальный путь. Авторы предполагают возможность её установления ранее, в результате

ассиметричного распределения материнских детерминант в ранних циклах дробления. (Кооп et al. 2007)

Исчерпывающее исследование роли MAP-киназного сигнального каскада было проведено на гастроподe *C. fornicata*. Брюхоногий моллюск *C. fornicata*, близкий сосед *I. obsoleta* по эволюционному древу, формирует небольшие полярные лопасти в течение двух первых клеточных делений. Однако, эти лопасти не являются строго необходимыми для развития моллюска, и могут быть удалены (Henry et al., 2006), в результате чего деления протекают нормально и приводят к формированию всего спектра личиночных структур, включая такие производные D квадранта как сердце и глаза. Для дальнейшего выяснения роли запасённых материнских детерминант авторы сдавливали зиготы перед достижением двухклеточной стадии, что приводило к перемешиванию цитоплазмы яйца, однако аномалий развития также не наблюдалось. Разделённые на двухклеточной стадии бластомеры в части случаев проходили деления, соответствующие таковым в составе интактного эмбриона («12-клеточной стадии») Бластомеры «AB» или «BC», изолированные в результате лизиса презумптивной клетки-прародительницы линии D, развивались, и в части случаев формировали мезодермальные структуры (глаза, часть раковины).

Роль первого квартета микромеров в регуляции развития и спецификации D квадранта у *C. fornicata* была выявлена при удалении этого квартета клеток индуцированным микроинъекциями красителя лизисом вскоре после их формирования на 8-клеточной стадии. Все подвергнутые процедуре зародыши развивались в радиализованные личинки, претерпевшие «экзогаструляцию». (такие зародыши выглядят как трёхчастная прозрачная масса клеток в форме замкнутой трубки, присоединённая одним концом к богатым желтком производным макромеров).

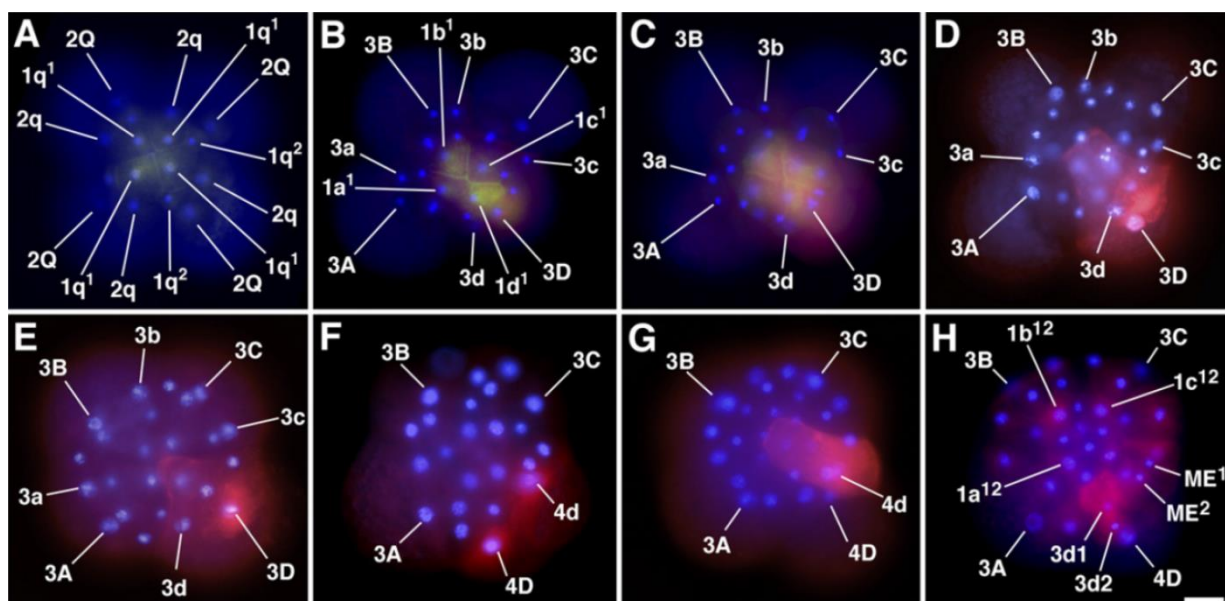


Рисунок 5. Активация MAP-киназного каскада в раннем развитии *Crepidula fornicata* (Henry, Perry, 2008).

В зародыше *C. fornicata* активация MAPK сначала выявляется в потомках первого квартета микромеров (сильнее -  $1a^1-1d^1$ , менее интенсивно - в  $1a^2-1d^2$ ) в течение второй половины 16-клеточной стадии, до отделения третьего квартета микромеров (20-клеточная стадия у зародыша *C. fornicata*).

Впоследствии MAPK активируется в 3D непосредственно перед достижением 24-клеточной стадии и на всём её протяжении, а затем – в 4d на 25-клеточной стадии, на которой также наблюдается активация в небольшой группке анимальных микромеров.

Используя ингибитор киназы MAPK (МАРКК, МЕК), исследователи продемонстрировали, что активация MAPK на протяжении периода с поздней 16-клеточной до ранней 24-клеточной стадии необходима для спецификации 3D макромера.

Это соответствует временному отрезку, на котором потомки первого квартета микромеров специфицируют макромер квадранта D. Активация MAPK в 3D или же анимальных микромерах позднее, на протяжении 24-клеточной стадии, не требуется для функционирования эмбрионального организатора, 4d.

Эти и некоторые другие исследованные представители моллюсков дали основание утверждать, что роль MAPK в развитии не представляет собой консервативного признака, а скорее представлена некоторым спектром выполняемых функций.

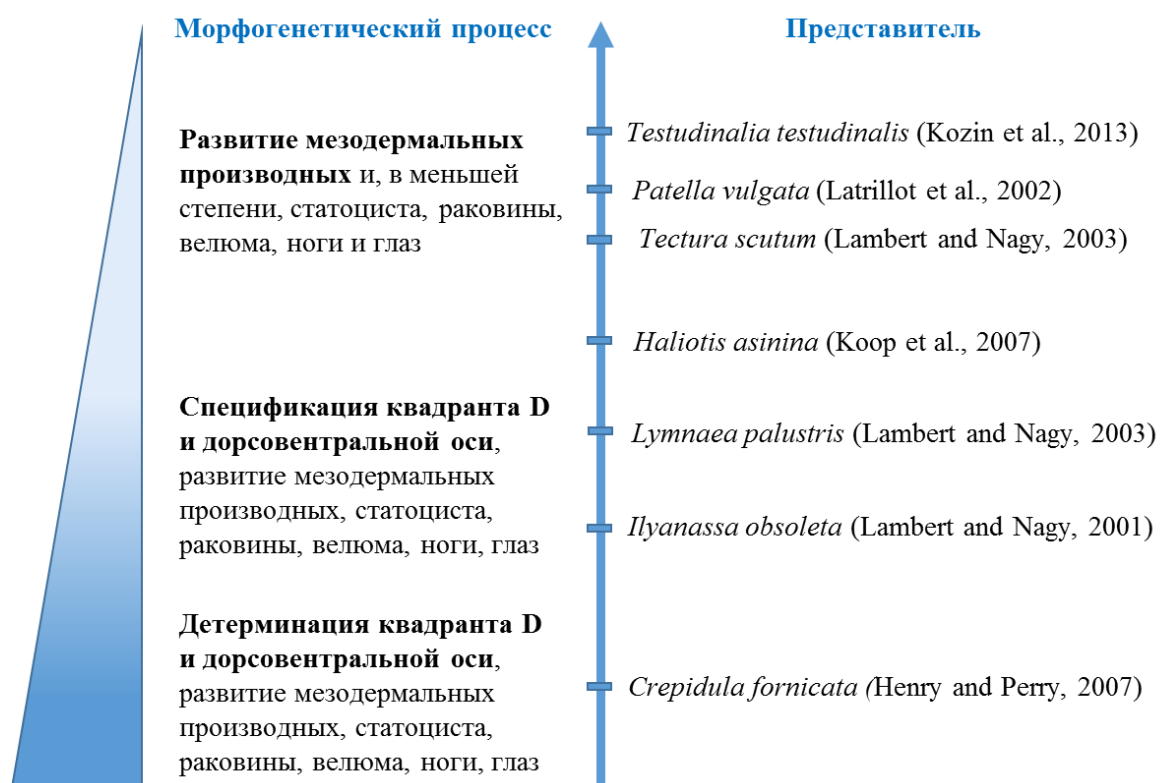


Рисунок 6. Вариабельность степени участия MAP-киназного сигнального пути в развитии различных видов моллюсков.

## Роль MAP-киназного каскада в развитии полихет

Роль MAP-киназного сигнального пути в развитии полихет была протестирована на небольшом количестве объектов. Впервые активность MAP-киназного пути была показана в развитии полихеты *Hydroides hexagonum* (Lambert and Nagy, 2003).

Полихета *Hydroides hexagonum* показывает активацию исключительно в одной клетке, энтомезобласте 4d, потомке клетки 3D. Ингибиторный анализ роли этого каскада в эмбрионе данного вида авторами не проводился. Однако, на основании предложенной ими гипотезы, а также того факта, что в развитии *A. vittata* именно 4d демонстрирует установление клеточных контактов, можно сделать предположение о сдвиге организующей активности на более поздний срок и делегировании её энтомезобласту.

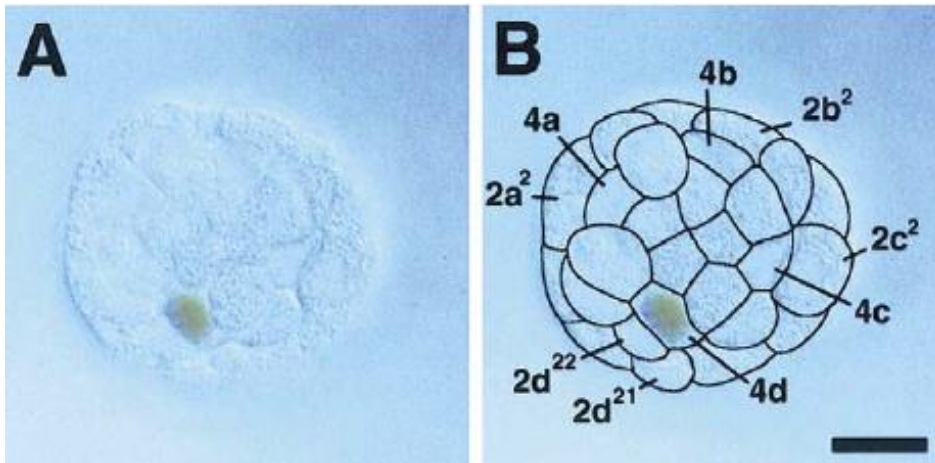


Рисунок 7. Активная форма *Erk 1/2* в бластомере *4d* зародыша полихеты *Hydroides hexagonum* (Lambert and Nagy, 2003).

Вторым исследованным объектом является полихета *C. teleta*. В её развитии активация каскада была отмечена на стадии гаструляции в клетках, окружающих бластопор. (Amiel et al., 2013). Очевидно, в функционирование эмбрионального организатора, в роли которого, как уже упоминалось, выступает клетка *2d*, здесь вовлечены другие сигнальные каскады.



Рисунок 8. Активная форма *Erk1/2* в ядрах окружающих бластопор клеток гаструлирующего зародыша полихеты *Capitella teleta* (Amiel et al., 2013).

Таким образом, данные, полученные исследованием группы аннелид, требуют расширения наших представлений о механизмах возникновения и функционирования

эмбрионального организатора в зародышах спирально дробящихся животных. В особенности полезными может оказаться изучение роли MAP-киназного сигнального каскада, так как паттерны активации этого каскада в эмбрионах *C.teleta* и *H. Hexagonum* предполагают значительные эволюционные изменения роли этого каскада в развитии аннелид, в противовес относительно консервативной модели его активации в бластомере 3D, наблюдаемой в группе моллюсков.



## Материалы и методы

### Получение эмбриональной культуры синхронного развития *Alitta virens*

Половозрелые (эпитокные) самцы и самки *Alitta virens* отлавливались в окрестностях МБС СПбГУ (Кандалакшский залив Белого моря) во время нереста. Полученные от стимулированных механическим воздействием животных половые продукты анализировали под микроскопом для контроля качества производителей, затем производили оплодотворение и постановку культуры согласно методике, разработанной А.К. Дондуа (1975). Ооциты, выметанные самкой, отбирались в чистую ёмкость с небольшим количеством воды. Затем проводилось три отмывки фильтрованной морской водой. К ооцитам прибавлялась небольшими порциями сперма до достижения соотношения спермии/яйцеклетки 1:4. После этого полученную культуру разбавляют, дают осесть оплодотворённым яйцеклеткам, формирующим слизистую массу, и сливают воду, освобождая культуру от несвязавшихся спермиев. После доливают необходимое количество фильтрованной морской воды и помещают ёмкость на автоматическую мешалку, где зародыши будут культивироваться при достаточной аэрации. Через 14 – 16 часов после оплодотворения, когда зародыши пройдут стадию выделения 4d, культуру центрифугируют для отделения от слизи. В дальнейшем культуру снимают с мешалки и размещают в ёмкостях с большой площадью поверхности. Зародыши культивировались при температуре +14-15 °С.

### Фиксация эмбрионального материала

Выбор подлежащих фиксации партий зародышей осуществлялся при наблюдении живого материала в оптический микроскоп, стадии определяли согласно описанной хронологии (Костюченко и Дондуа, 2006). Для фиксации нами были выбраны следующие стадии: 8 бластомеров (около 8 часов после оплодотворения, третий цикл дробления), 16 бластомеров (8 ч 40 мин, четвёртый цикл), 17 бластомеров (9 ч 40 мин, начало пятого цикла дробления), 23 бластомера (10 ч 30 мин, пятый цикл), формирование соматобласта 4d (12–13 чпо, начало шестого цикла дробления).

Зародыши фиксировали 4% раствором формальдегида на 1,75х фосфатном буфере (PBS) с 0,1% Tween 20. Перед фиксацией зародыши обрабатывали жидкостью для удаления желточной оболочки (ЖУЖО).



ЖУЖО (TCMFSW) (pH 8,0) состоит из свежеприготовленных солей: Tris (конечная концентрация – 50 мМ), NaCl (495 мМ), KCl (9,7 мМ), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (27,6 мМ), NaHCO<sub>3</sub> (2,3 мМ), ЭДТА (6,4 мМ) на дистиллированной воде (Костюченко, 1999; Kozin et al., 2016).

Эмбриональный материал помещали на сито, несколько раз промывали фильтрованной морской водой для удаления слизи, затем помещали на 3-5 минут в жидкость для удаления желточной оболочки. Обработкой этим реагентом достигается отслаивание или полное удаление желточной оболочки, что приводит к более рыхлому и свободному расположению бластомеров, облегчающему идентификацию клеточных линий. Достижение нужного воздействия ЖУЖО на зародыш контролировали под микроскопом. После обработки ЖУЖО зародыши быстро отмывали 1.75xPBS и фиксировали 4% раствором формальдегида на 1,75xPBS в течение ночи при +4°C. Зафиксированный материал проводился через спирты повышающейся концентрации (30°-50°-70° этиловый спирт) и помещался на хранение в 70° этиловый спирт при температуре – 20°C.

Для проверки предположения, что обработка ЖУЖО может вызывать появление активной формы Erk1/2 в виду участия MAP-киназ в ответе клетки на стресс, нами были также сделаны фиксации без использования ЖУЖО. Иммуоцитохимический анализ не показал различий в выявлении сигнала между зародышами, фиксированным с использованием ЖУЖО и фиксированными без дополнительной обработки.

Большая часть использованных в работе фиксаций ранних стадий развития *A. virens* была предоставлена В.В. Козиным и Р.П. Костюченко.

### Иммуоцитохимические исследования

Подбор антител к Erk1/2 осуществляли, сопоставляя предоставленную производителем антител последовательность с транскриптомной и геномной базой данных нереидной полихеты *P. dumerilii*.

Для иммуоцитохимического исследования использовали антитела к активной (дважды фосфорилированной по остаткам Tyr204/187 и Thr202/185) киназе Erk1/2 - rabbit anti-Phospho-p44/42 MAPK (Cell Signaling #4370), в разведении 1:100; а также антитела, выявляющие белки цитоскелета - mouse anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma T5168), в разведении 1:2000 и mouse anti- $\beta$ -tubulin (Sigma T4026), в разведении 1:200. В качестве вторичных антител

использовали AF488-conjugated anti-rabbit (Invitrogen A11034), и Cy5-conjugated anti-mouse (Jackson ImmunoResearch 715-175-150), разведение 1:400.

Материал регидратировали в спиртах понижающейся концентрации (по 5 мин в 50% и 25% этиловом спирте) и промывали 5 раз по 5 мин в РВТ (1х фосфатный буфер PBS pH 7,4 + 0,1% Triton X-100 + 0,1% азид натрия). Для пермеабилзации желточной оболочки объекты обрабатывали протеиназой К (100 мкг/мл) при +22°C в течение 30 сек, после чего отмывали в 2 сменах глицина на РВТ (2 мг/мл) и 5 сменах РВТ. Забивку проводили 2 ч в 5% овечьей сыворотке на РВТ. Инкубация в первичных антителах в 2,5% сыворотке на РВТ продолжалась 1–2 дня при +4°C. После отмывок в РВТ (6 раз в течение как минимум 2 ч) добавляли раствор флуоресцентных вторичных антител и инкубировали 1-2 суток. Отмывки от вторичных антител сочетали с окрашиванием ядерной ДНК в DAPI (Sigma) в течение 1–2 ч. Объекты пропитывали в 90% глицерине с 10% РВТ и хранили при -20°C.

#### Анализ материала методом конфокальной микроскопии и последующая обработка данных

Данные о локализации иммунофлуоресцентного сигнала в зародышах собирали при помощи конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica Microsystems), при этом делали серии снимков с шагом в 1-2 мкм, позволяющие делать трёхмерные реконструкции объекта. Для получения данных со светооптического уровня применяли метод дифференциального интерференционного контраста (DIC, оптика Номарского).

Анализ реконструкций производили в программе LAS AF Lite (Leica Microsystems), также позволяющей создавать максимальные Z-проекции. Проекции упорядочивали на слайдах программы Microsoft PowerPoint, затем на каждой проекции идентифицировали и обозначали бластомеры и характер обнаруженного в них сигнала.

## Результаты и обсуждение

### Внутриклеточная локализация сигнала

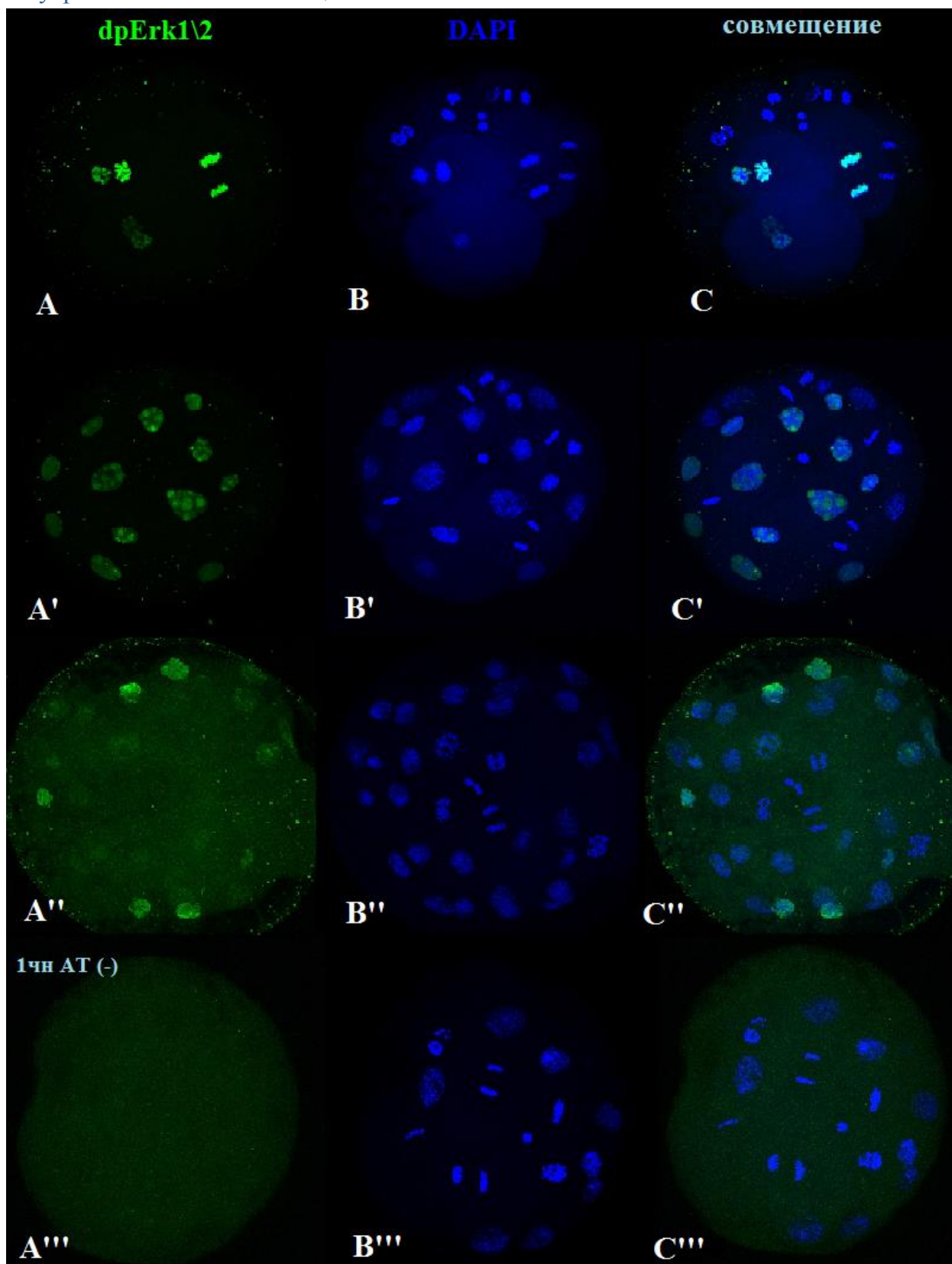


Рисунок 7. Распределение активной формы MAP-киназы в ходе дробления у *A. virens*. Иммуноцитохимическое выявление dpErk1/2 (зеленый канал) и окраска DAPI на ДНК (синий), максимальная проекция конфокального Z-стека. Вид с анимального полюса. В каждой строке (A-

С) представлен один и тот же зародыш. А-С– стадия 8 клеток, А'-С' – 23 клеток, А''-С''– 32 кл, А'''-С'''– контрольный препарат, не инкубированный в растворе первичных антител. Разные каналы показаны в вертикальных рядах: А– антитела к dpErk1/2, В – DAPI; С – совмещение всех каналов.

Активная форма Erk1/2 выявлялась на всех четырёх изученных стадиях развития. Сигнал в клетке колокализовался с хроматином, что является примечательной особенностью данного объекта, так как до сих пор чисто ядерная локализация активной формы Erk1/2 была отмечена исключительно в развитии *C. teleta*.

#### Активность MAP-киназы на стадии восьми бластомеров

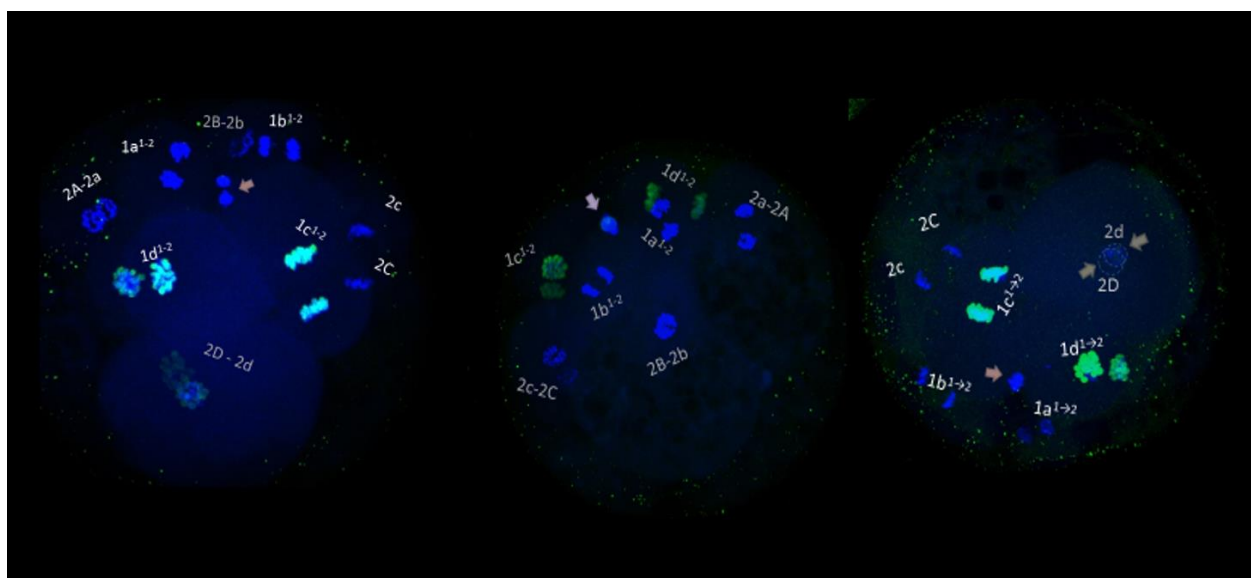


Рисунок 1. Зародыши в третьем - начале четвёртого цикла дробления.

Вид с анимального полюса зародыша. Зелёным обозначен сигнал активной формы Erk, синим – окрашенный DAPI хроматин. Красная стрелка указывает положение редуционных телец, серая – наличие плохо видимого в общей проекции сигнала.

На стадии 8 бластомеров происходит синхронное деление всех 8 клеток зародыша, наблюдаемое на стадии анафазы. Однако, сигнал выявляется специфически в трёх из них, а именно - 1d, 1c и 1D, образующих дорсальную сторону зародыша.

Таблица 1.

Номенклатурное обозначение клетки	Наличие или отсутствие фосфорилированного белка Erk1/2	Количество объектов, демонстрирующих эту картину	Стадия клеточного цикла
1a	нет	5/5	Поздняя анафаза, телофаза
1b	нет	4/4	Поздняя анафаза, телофаза

1c	присутствует	4/4	Телофаза, поздняя анафаза
1d	присутствует	6/6	Телофаза, поздняя анафаза
1A	нет	4/4	Телофаза, поздняя анафаза
1B	нет	4/4	Телофаза, поздняя анафаза
1C	нет	3/4	Телофаза, поздняя анафаза
1D	присутствует	5/6	Телофаза, поздняя анафаза

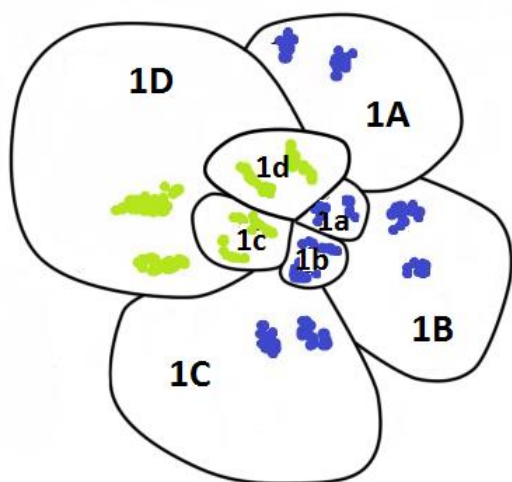


Рисунок 8. Схема-развёртка зародыша на стадии 8 бластомеров. Зелёным обозначен сигнал активной формы Erk, синим – окрашенный DAPI хроматин. На основе схем из Костюченко и Дондуа, 2006.

#### Активность MAP-киназы на стадии 16 бластомеров

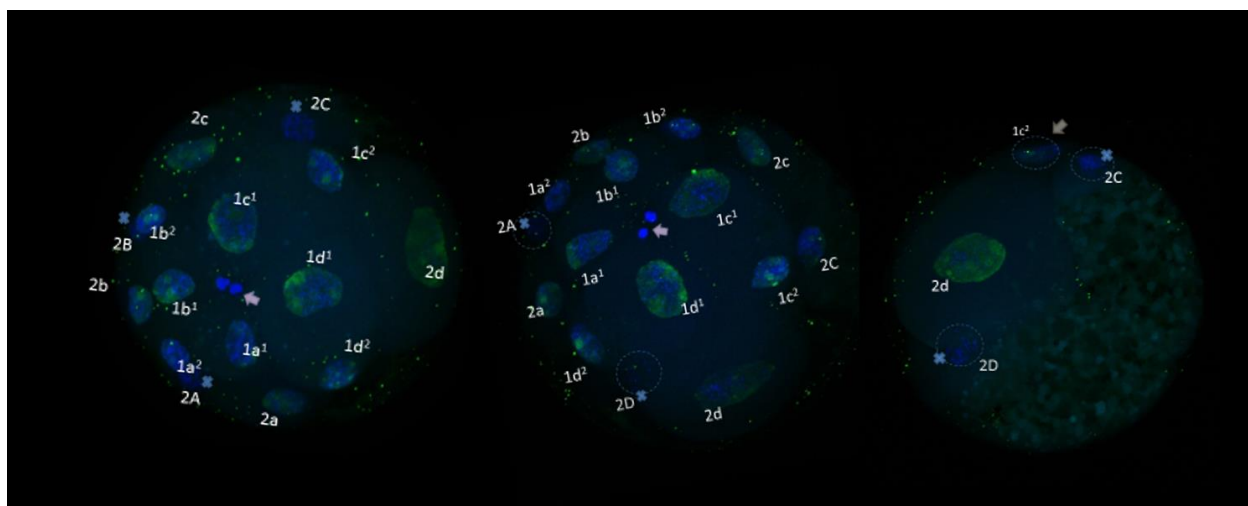


Рисунок 2. Зародыши в четвёртом цикле дробления.

*Вид с анимального полюса зародыша (1,2), вегетативного (3). Вид с анимального полюса зародыша. Зелёным обозначен сигнал активной формы Erk, синим – окрашенный DAPI хроматин. Стрелка указывает положение редукционных телец. Синими крестами обозначены ядра бластомеров, не несущие сигнал*

Следующий наблюдаемый период приходится на период покоя после завершения четвёртого цикла дробления, все бластомеры находятся в интерфазе. Мы наблюдаем появление сигнала в дочерних микромерах первого квартета ( $1q^1$ ,  $1q^2$ ) а также в микромерах второго квартета ( $2q$ ). Однако, мы не детектируем сигнала в ядрах макромеров ( $2Q$ ).

Таблица 2.

Номенклатурное обозначение клетки	Наличие или отсутствие фосфорилированного белка Erk1/2	Количество объектов, демонстрирующих эту картину	Стадия клеточного цикла
$1a^1$	Присутствует	2/2	Интерфаза
$1a^2$	Присутствует	2/2	Интерфаза
$1b^1$	Присутствует	3/3	Интерфаза
$1b^2$	Присутствует	3/3	Интерфаза
$1c^1$	Присутствует	4/4	Интерфаза
$1c^2$	Присутствует	3/3	Интерфаза
$1d^1$	Присутствует	2/2	Интерфаза
$1d^2$	Присутствует	2/2	Интерфаза
2a	Присутствует	2/2	Интерфаза
2A	Нет	2/2	Интерфаза
2b	Присутствует	2/2	Интерфаза
2B	Нет	2/3	Интерфаза
2c	Присутствует	3/3	Интерфаза
2C	Нет	3/5	Интерфаза
2d	Присутствует	5/5	Интерфаза
2D	Нет	2/2	Интерфаза



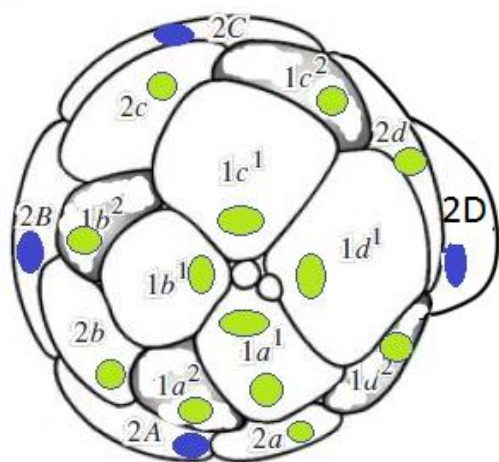


Рисунок 3. Схема-развёртка зародыша на стадии 16 бластомеров. Зелёным обозначен сигнал активной формы *Erk*, синим – окрашенный DAPI хроматин.  
(На основе схем из Костюченко и Дондуа, 2006.)

### Активность MAP-киназы на стадии 17 бластомеров (Выделение 3d)

По мере вступления зародышей в пятый цикл дробления сигнал пропадает в клетке 2d и микромерах первого квартета (эти бластомеры мы наблюдаем в про- или метафазе). Сигнал также отсутствует в макромерах 2A, 2B, и 2C, находящихся в профазе, но присутствует в хромосомном материале макромера 2D, который мы наблюдаем в телофазе разделения на 3d и 3D, а также в ядрах бластомеров 3d и 3D.

Таблица 3.

Номенклатурное обозначение клетки	Наличие или отсутствие фосфорилированного белка Erk1/2	Количество объектов, демонстрирующих эту картину	Стадия клеточного цикла
1a <sup>1</sup>	Нет	3/3	Профаза
1a <sup>2</sup>	Присутствует	3/3	Интерфаза
1b <sup>1</sup>	Присутствует	1/2	Интерфаза
	Нет	1/2	Профаза
1b <sup>2</sup>	Присутствует	2/2	Интерфаза

1c <sup>1</sup>	Нет	2/2	Профаза, метафаза
1c <sup>2</sup>	Присутствует	2/2	Интерфаза
1d <sup>1</sup>	Нет	3/3	Анафаза, метафаза
1d <sup>2</sup>	Присутствует	2/2	Интерфаза
2a	Присутствует	3/3	Интерфаза
2A	Нет	3/3	Профаза
2b	Присутствует	3/3	Интерфаза
2B	Нет	1/1	Профаза
2c	Присутствует	2/2	Интерфаза
2C	Нет	2/2	Профаза
2d	Нет	3/3	Профаза, метафаза
3d	Присутствует	1/1	Интерфаза
3D	Присутствует	3/3	Телофаза

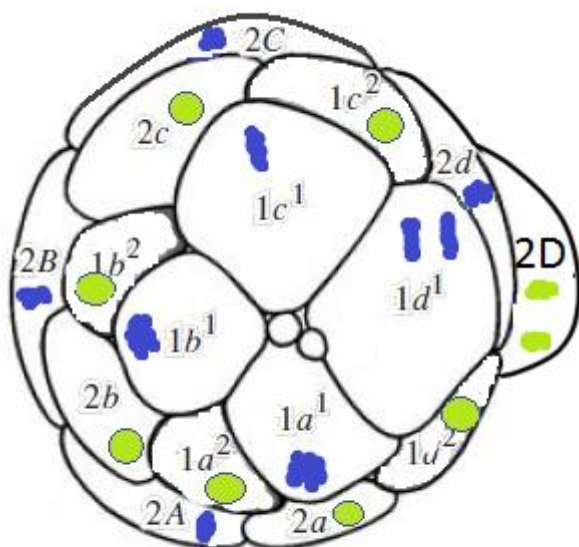


Рисунок 4. Схема-развёртка зародыша на стадии 17 бластомеров. Зелёным обозначен сигнал активной формы Eтk, синим – окрашенный DAPI хроматин.  
(На основе схем из Костюченко и Дондуа, 2006.)



## Активность на стадии 23 бластомеров

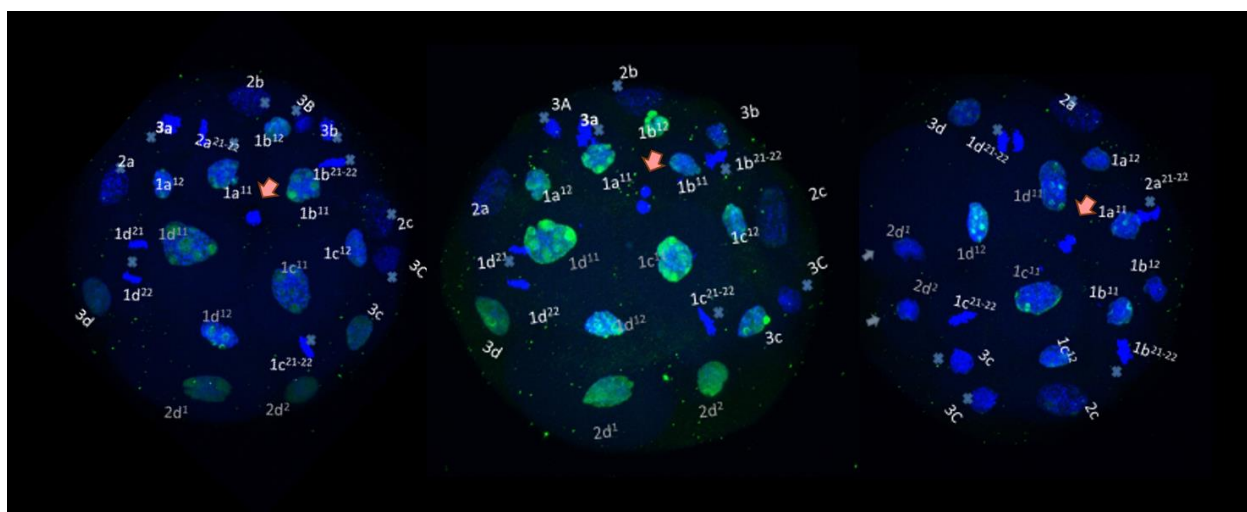


Рисунок 5. Зародыши в пятом цикле дробления.

Вид с анимального полюса зародыша. Зелёным обозначен сигнал активной формы Erk, синим – окрашенный DAPI хроматин. Красные стрелки указывают положение редуционных телец. Синими крестами обозначены ядра бластомеров, не несущие сигнал

По завершении следующего, пятого цикла дробления, активность MAP-киназного каскада демонстрируют нам ядра анимальных микромеров и макромер 3D, а также первый микромер третьего квартета, 3d. В микромерах второго квартета сигнал исчезает, за исключением дочерних бластомеров линии 2d. Также не имеют сигнала макромеры 3A, 3B и 3C (где уже началась конденсация хроматина перед отделением следующего квартета) и линии анимальных микромеров  $1q^{21-22}$ , находящиеся в анафазе.

Таблица 4.

Номенклатурное обозначение клетки	Наличие или отсутствие фосфорилированного белка Erk1/2	Количество клеток, демонстрирующих эту картину	Стадия клеточного цикла
$1a^{11}$	Присутствует	4/4	Интерфаза
$1a^{12}$	Присутствует	4/4	Интерфаза
$1a^2$	Нет	4/4	Метафаза
$1b^{11}$	Присутствует	4/4	Интерфаза
$1b^{12}$	Присутствует	4/4	Интерфаза
$1b^2$	Нет	4/4	Метафаза, анафаза
$1c^{11}$	Присутствует	4/4	Интерфаза
$1c^{12}$	Присутствует	4/4	Интерфаза

1c <sup>2</sup>	Нет	4/4	Метафаза
1d <sup>11</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1d <sup>12</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1d <sup>2</sup>	Нет	4/4	Анафаза
2a	Нет	3/4	Интерфаза
2A	Нет	2/2	Телофаза
	3a	Присутствует	1/1
	3A	Присутствует	Интерфаза
2b	Нет	3/3	Интерфаза
3b	Нет	1/2	Начало интерфазы
	Присутствует	1/2	Начало интерфазы
3B	Нет	1/1	Начало интерфазы
2c	Нет	4/4	Интерфаза
3c	Присутствует	3/4	Интерфаза
3C	Нет	4/4	Интерфаза
2d <sup>1</sup>	Присутствует	3/3	Интерфаза, начало интерфазы
2d <sup>2</sup>	Присутствует	2/2	Интерфаза, начало интерфазы
3d	Присутствует	4/4	Интерфаза
3D	Присутствует	1/1	Интерфаза

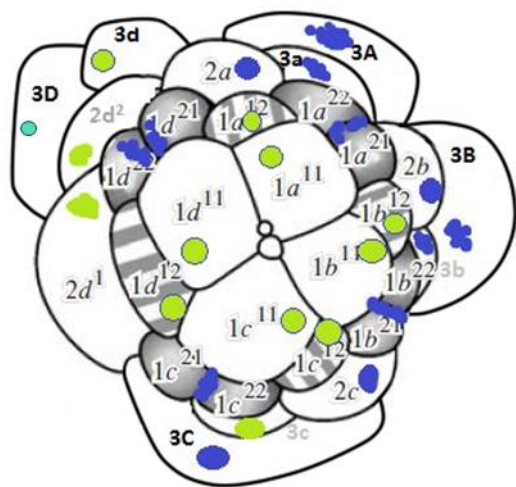


Рисунок 6. Схема-развёртка зародыша на стадии 8 бластомеров. Зелёным обозначен сигнал активной формы Erk, синим – окрашенный DAPI хроматин. (На основе схем из Костюченко и Дондуа, 2006.)

## Активность на стадии около 32 бластомеров

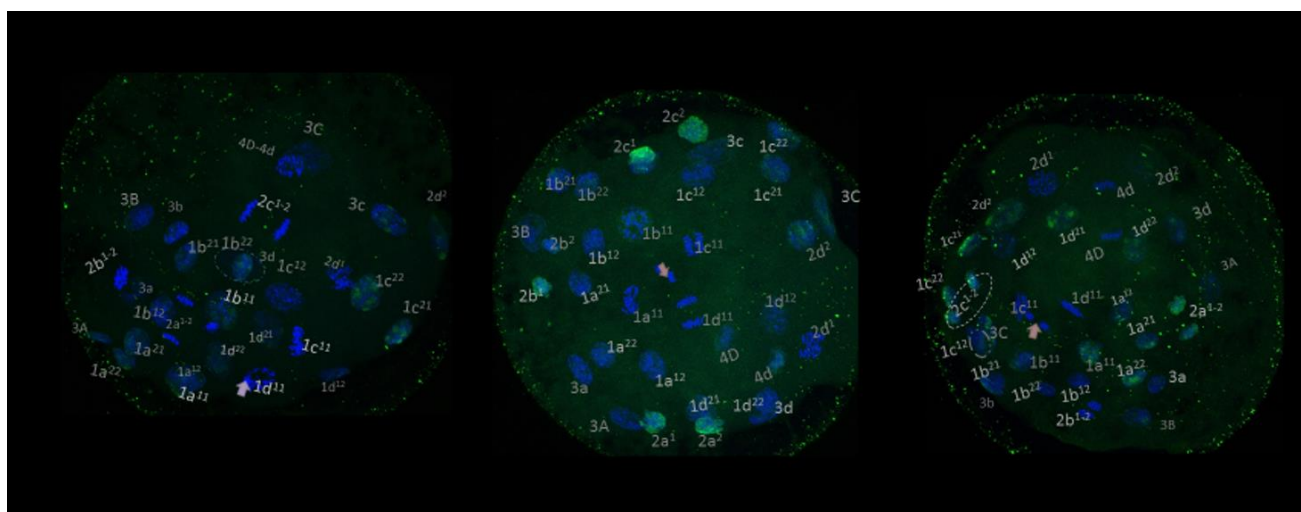


Рисунок 7. Зародыши в шестом цикле дробления.

Вид с анимального полюса зародыша. Зелёным обозначен сигнал активной формы Erk, синим – окрашенный DAPI хроматин. Красная стрелка указывает положение редукционных телец, серая – наличие плохо видимого в общей проекции сигнала. Синими крестами обозначены ядра бластомеров, не несущие сигнал.

После шестого цикла дробления активная форма Erk1/2 детектируется в большинстве клеток зародыша, а именно  $1a^{11}$ ,  $1b^{11}$ ,  $1q^{12}$ ,  $1q^{21}$ ,  $1q^{22}$ ,  $2abc$ ,  $2d^2$ ,  $3Q$ . Ни в одном случае не наблюдалось сигнала в микромерах  $1c^{11}$  и  $1d^{11}$ , демонстрирующих стадии метафазы и анафазы, а также в микромере  $2d^2$ , наблюдавшемся в анафазе.

На этой стадии достигается значительная асинхронность культуры, благодаря чему мы наблюдаем некоторый разброс стадий развития. За этот временной промежуток можно отметить появление сигнала в клетках  $2a$ ,  $2b$  и  $2c$ , отсутствующего в менее продвинутых зародышах (где эти клетки наблюдаются в анафазе), и детектируемого в более продвинутых, находящихся на стадии телофазы. Это же наблюдение верно и для макромера  $3D$ , где сигнал также отсутствует, но появляется в телофазе выделения  $4d$ . Напротив, сигнал в бластомерах  $1q^{21}$ ,  $1q^{22}$  и  $3d$ , наблюдающихся в течение всего периода на стадии интерфазы, демонстрирует постепенное угасание.

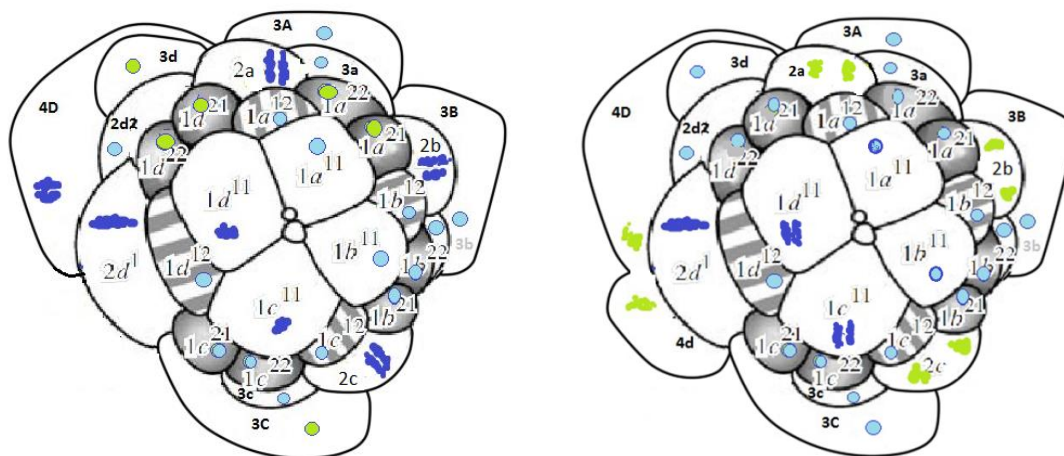


Рисунок 8. Схема-развёртка зародыша на стадии 32х бластомеров. Зелёным обозначен сигнал активной формы Erk, синим – окрашенный DAPI хроматин. (На основе схем из Костюченко и Дондуа, 2006.)

Таблица 5.

Номенклатурное обозначение клетки	Наличие или отсутствие фосфорилированного белка Erk1/2	Количество клеток, демонстрирующих эту картину	Стадия клеточного цикла
1a <sup>11</sup>	Присутствует	3/4	Интерфаза
	Нет	1/4	Профаза
1a <sup>12</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1a <sup>21</sup>	Присутствует, теряет интенсивность в продвинутых зародышах	4/4	Интерфаза
1a <sup>22</sup>	Присутствует, теряет интенсивность в продвинутых зародышах	4/4	Интерфаза
1b <sup>11</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1b <sup>12</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1b <sup>21</sup>	Присутствует	3/3	Интерфаза
1b <sup>22</sup>	Присутствует	3/3	Интерфаза
1c <sup>11</sup>	Нет	4/4	Метафаза
1c <sup>12</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1c <sup>21</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1c <sup>22</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
1d <sup>11</sup>	Нет	4/4	Метафаза

1d <sup>12</sup>	Присутствует	3/4	Интерфаза
1d <sup>21</sup>	Присутствует, теряет интенсивность в продвинутых зародышах	4/4	Интерфаза
1d <sup>22</sup>	Присутствует, теряет интенсивность в продвинутых зародышах	4/4	Анафаза
2a	Нет	2/2	Анафаза
	Присутствует	2/2	Телофаза
3a	Присутствует	3/4	Интерфаза
3A	Присутствует	4/4	Интерфаза
2b	Нет	2/2	Анафаза
	Присутствует	2/2	Телофаза
3b	Присутствует	3/4	Интерфаза
3B	Присутствует	4/4	Интерфаза
2c	Нет	2/2	Анафаза
	Присутствует	2/2	Телофаза
3c	Присутствует, теряет интенсивность в продвинутых зародышах	3/4	Интерфаза
3C	Присутствует, теряет интенсивность в продвинутых зародышах	4/4	Интерфаза
2d <sup>1</sup>	Нет	4/4	Метафаза
2d <sup>2</sup>	Присутствует	4/4	Интерфаза
3d	Присутствует, теряет интенсивность в продвинутых зародышах	4/4	Интерфаза
3D	Нет	2/2	Анафаза
	Присутствует	2/2	Телофаза

### Прослеживание активности MAP-киназного каскада в отдельных клеточных линиях

Поскольку паттерн активации показал зависимость наличия активированных форм Erk1/2 от стадии развития и конкретной клеточной линии, собранные данные были нанесены на генеалогическое древо бластомеров.

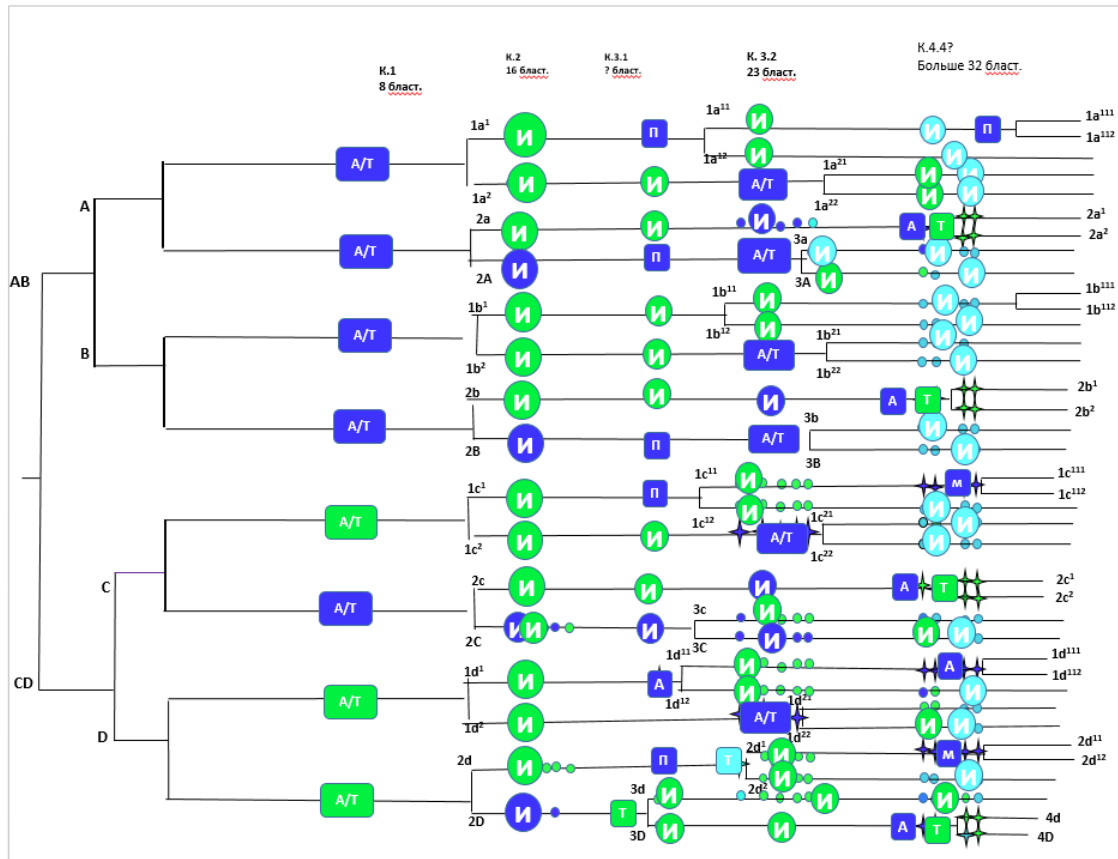


Рисунок 9. Генеалогия бластомеров *A. viresns*. Активная форма MAPK отмечена зеленой заливкой, синяя заливка – отсутствие сигнала *drErk1/2*. И – интерфаза, П – профазы, М – метафаза, А/Т – анафаза/телофаза.

*Появление, исчезновение и сохранение сигнала в процессе дробления и выделения клеточных линий, демонстрируемое бластомерами квадранта А*

В обеих клетках линии А, макромере 1А и микромере 1а, мы не видим сигнала на момент их наблюдения в анафазе четвёртого цикла дробления. Линия 1а не имеет сигнала на момент разделения на  $1a^1$  и  $1a^2$  (наблюдаем расхождение хромосом в анафазе). Затем, как мы наблюдаем на стадии 2 (16 бластомеров), обе клетки приобретают яркий сигнал, детектируемый в интерфазных ядрах. Несколько позже, к моменту выделения 3d, сигнал пропадает в линии  $1a^1$ , к моменту вступления этого бластомера в профазу следующего цикла дробления. На стадии 3.2 (23 бластомеров) подобный яркий сигнал наблюдается и в обеих клетках-потомках  $a^1(1a^{11}-1a^{12})$ , также находящихся в интерфазе. К стадии 4 (32х клеток) в клетке  $1a^{11}$  сигнал относительно слабый, затухает по мере конденсации хроматина перед разделением на  $1a^{111}$   $1a^{112}$ . В клетке  $1a^{12}$  сигнал остаётся стабильно слабым.



Бластомер  $1a^2$  на стадии 17 бластомеров по-прежнему демонстрирует сигнал в интерфазном ядре, исчезающий к стадии 23х бластомеров, когда мы наблюдаем клетки в метафазе деления на  $1a^{21-22}$ . Появляется вновь на стадии 32х клеток, сигнал в интерфазных ядрах, вначале яркий, постепенно затухающий.

В макромере 1А и его потомках, 2а и 2А, сигнал до разделения отсутствует. В линии микромера второго квартета 2а мы впервые наблюдаем сигнал в интерфазных ядрах на стадии 16 кл. Сигнал сохраняется на стадии 17 клеток, затем, к стадии 3.2, исчезает из ядер. На стадии 4.4 происходит разделение на  $2a^1$  и  $2a^2$ ; мы видим, как сигнал, отсутствовавший в анафазе, появляется в телофазе, при этом отмечая его высокую интенсивность.

В линии макромера 2А сигнал не наблюдается как до разделения микромера и макромера (стадия 1), так и в дочернем макромере (стадия 2). Активная форма белка появляется в конце стадии 3.2, в телофазе после разделения 3а и 3А. Обнаруживается в интерфазных ядрах обеих клеток, 3а и 3А, в течении стадий 3.2 и 4, но в 3а быстрее теряет интенсивность. Тем не менее, сохраняется на протяжении стадии 4.

*Появление, исчезновение и сохранение сигнала в процессе дробления и выделения клеточных линий, демонстрируемое бластомерами квадранта В.*

Паттерны обнаружения активной формы Eгk1/2 в линии потомков макромера В идентичны паттернам, описанным для линии потомков макромера А, за единственным отличием в сохранении сигнала клеткой  $1b^{11}$  до конца стадии 4.

*Появление, исчезновение и сохранение сигнала в процессе дробления и выделения клеточных линий, демонстрируемое бластомерами квадранта С.*

На стадии 1 два из четырёх анимальных микромеров первого квартета, 1с и 1d, демонстрируют яркий сигнал. Различия между микромерами квадрантов А, В и С, D сохраняются и далее. Линии микромеров, родоначальниками которых являются клетки 1с и 1d, заметно опережают линии сестринских микромеров 1а и 1b и показывают отличия в паттерне активации Eгk1/2. Так, на стадии 3.1, в то время как ядра сестринских клеток находятся в интерфазе, мы наблюдаем их в профазе и анафазе соответственно. Хромосомный материал 1с и 1d не показывает сигнала Eгk1/2, в отличие от ядер 1а и 1b на той же стадии. Второе отличие в паттерне дробления приходится на стадию 4, где клетки  $1c^1$  и  $1d^1$  находятся на продвинутых стадиях деления (профаза и метафаза,

соответственно), и не несут сигнала, в отличие от соответствующих производных двух других квадрантов.

Поведение сигнала в линии потомков макромера С также слегка отличается от описанного для квадрантов А и В. Так, сигнал в клетке 2С неоднократно замечен на стадии 2 (16 бластомеров). К стадии 3.1 он, тем не менее, не детектируется, как и в сестринских макромерах 2А и 2В. После разделения к моменту наблюдения на стадии 3.2 на линии 3с и 3С (наблюдаем в интерфазе), мы детектируем сигнал в дочернем микромере, 3с, но не в макромере. Вновь сигнал появляется в 3С к стадии 32х клеток и постепенно теряет интенсивность на протяжении стадии 4.

*Появление, исчезновение и сохранение сигнала в процессе дробления и выделения клеточных линий, демонстрируемое бластомерами квадранта D.*

Клетка 1D – единственный макромер, демонстрирующий наличие активной Erk1/2 на стадии 8 клеток (мы наблюдаем его в материале хромосом на стадиях поздней анафазы и телофазы). Затем, на стадии 3.1, сигнал активен в клетке 2d но исчезает в 2D (наблюдаем интерфазные ядра). На стадии 3.2 мы видим яркий сигнал в момент образования клеток 3D и 3d. На этой и в течение последующей стадии 3.2 мы наблюдаем сигнал в 3D, не детектируемый на протяжении этого периода в сестринских макромерах (3С, 3А, 3В). Этот сигнал исчезает в начале стадии 4 (мы наблюдаем анафазные хромосомы), но вновь появляется в телофазе отделения соматобласта, 4d.

Сигнал в линии потомков 2d сохраняется вплоть до стадии 4, где его демонстрирует клетка 2d<sup>2</sup>, но теряет 2d<sup>1</sup>, находящаяся в метафазе.

Полученные данные говорят о многократном вовлечении MAP-киназного сигнального пути в процессы раннего развития *A. virens*. Наиболее ранняя зарегистрированная активация MAPK в бластомерах дорсальной стороны восьмиклеточного зародыша указывает на возможность ранних индуктивных взаимодействий, определяющих или закрепляющих за бластомерами С и D квадранта их специфические судьбы. Обращает на себя внимание и тот факт, что сигнал активной Erk1/2 появляется в линиях клеток, опережающих по темпам прохождения митотического цикла своих гомологов из других квадрантов. Это справедливо для бластомеров 1с и 1d, 1D, 2D и 3D. Данную закономерность можно попытаться увязать с наследованием большей части свободной от желтка (т.н. активной) цитоплазмы именно этими клетками. Для спирального дробления, особенно гетероквадрантного, давно предполагается существование цитоплазматических



детерминантов развития по тому или иному пути (Wilson, 1904). Можно предположить, что именно содержание активной (полярной) цитоплазмы обуславливает запуск каскада MAPK. Это всецело подтверждается в опытах по удалению полярной лопасти у *I. obsoleta*, в результате которых появление дифосфорилированной Erk1/2 не наблюдалось (Lambert, Nagy, 2001). Результаты экспериментов по ингибированию MAP-киназного сигналинга у *A. virens* указывают на его функциональную значимость именно на стадиях до разделения 3D (Kozin et al., 2016), когда эта клетка является единственным dpErk1/2<sup>+</sup> макромером.

Таким образом, описанный нами паттерн активности MAP-киназного пути хорошо согласуется с экспериментальными данными, полученными на зародышах моллюсков и аннелид. Мы предполагаем участие каскада MAPK в определении судьбы квадранта D и его возможной роли организатора у *A. virens*.

### Эволюционная интерпретация

Спиральный тип дробления демонстрирует нам две стратегии развития – гомоквадрантное дробление, считающееся анцестральным, где судьбы клеточных линий определяются в результате индуктивных взаимодействий между анимальными микромерами и микромерами, и гетероквадрантное, где установление клеточных судеб делегировано материнским детерминантам. По меньшей мере, для клады моллюсков оно является продвинутым признаком (Henry, 2014). Анцестральность же гомоквадрантного типа дробления в группе полихет является дискуссионным вопросом.

Обнаруженный нами паттерн активности MAP-киназного каскада не соотносится с представлениями о функционировании организатора у изученных полихет *Capitella* и *Hydroides*. Неожиданно, он проявляет сходство с картиной, наблюдавшейся при исследовании этого каскада у гетероквадрантно дробящихся гастропод *Crepidula* и *Pyanassa*. Так, во всех трёх случаях вначале была отмечена активация этого каскада в анимальных микромерах, затем – в макромере 3D, и после – в 3D и большом количестве анимальных микромеров. Также, как в зародыше *Crepidula*, так и в зародыше *Alitta*, наблюдается активность и в потомках клетки 3D – макромере 4D и мезентобласте 4d.

Исключительной особенностью является то, что в развитии *A. virens* мы наблюдаем специфичную для дорсальной стороны зародыша активацию MAPK (1d, 1c и 2D). Мы склонны рассматривать гипотезу, что это происходит вследствие раннего установления дорсальной судьбы в зародыше. Косвенным подтверждением тому могут считаться

отличия в скорости дробления и паттернах дальнейшей активности MAPK в клетках-потомках этих линий.

Было бы заманчиво считать, что мы детектировали активную форму MAP-киназы на протяжении длительного периода с пятого по начало шестого циклов дробления, следами анцестральной программы развития, так как по сравнению с другими исследованными объектами, *Alitta virens* представляет собой наиболее базальную ветвь филогенетического древа полихет.

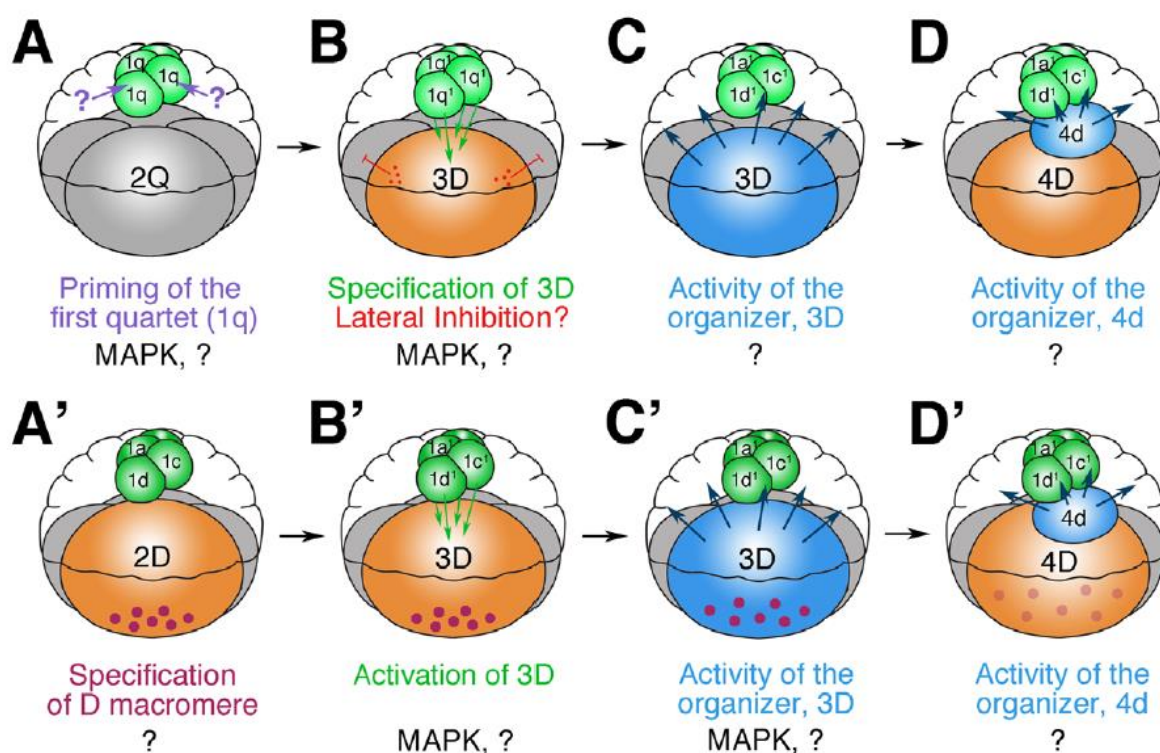


Рисунок 107. Спецификация квадранта D и активность эмбрионального организатора у *Spiralia*. (По Henry, 2014).

A–D – гомоквадрантное спиральное дробление. Линия D определяется в результате взаимодействия с анимальными макромерами в период 5-6 цикла дробления (зеленые и красные стрелки).

A'–D' – гетероквадрантное спиральное дробление. Линия D детерминирована материнскими факторами (розовые точки), но индукционное взаимодействие играет роль в её спецификации и/или воздействии на производные других квадрантов.

## Выводы

1. Активная дифосфорилированная форма Erk1/2 вовлечена в развитие зародыша *A. virens* на стадиях дробления. При этом наблюдается исключительно ядерная локализация данного белка.
2. Паттерны активации MAPK специфичны для конкретных линий бластомеров, в частности для квадранта D. В ходе дробления активная форма Erk1/2 может неоднократно появляться и исчезать в ряду клеточных поколений.
3. На дорсальной стороне зародыша наблюдается дифференциальная активация MAPK в конце третьего и четвертого митотического цикла, а также в макромере 3D в начале пятого цикла.
4. Характер пространственной активности MAP-киназного сигнального пути уникален для исследованного вида полихет, но показывает сходство с описанным для *Spiralia* паттерном в анимальных микромерах и мезэнтодермальном бластомере 3D.

## Благодарности

Хочу выразить благодарность моему научному руководителю, В.В. Козину, за предоставленное время, ресурсы, и за искреннюю заинтересованность в моём развитии. Также хочу поблагодарить Р.П. Костюченко, В.И. Ефремова и других сотрудников кафедры эмбриологии за практические советы и моральную поддержку.

## Литература

1. Дондуа А.К. Влияние актиномицина Д и сибиромидина на эмбриональное и личиночное развитие *Nereis virens* (Sars.) // Онтогенез. 1975. 6. № 5. 475–484.
2. Козин В.В., Бабаханова Р.А., Костюченко Р.П. Участие MAP-киназного сигналинга в спецификации клеточных линий и дорсовентральной оси у примитивной гастроподы *Testudinalia testudinalis* (Patellogastropoda, Mollusca) // Онтогенез. 2013. 44. № 1. 42–56.
3. Костюченко Р.П. Процессы ооплазматической сегрегации и формирования клеточной линии трохобластов в раннем развитии *Nereis virens* // 1999.
4. Костюченко Р.П., Дондуа А.К. Закономерности формирования прототроха в эмбриональном развитии полихеты *Nereis virens* // Онтогенез. 2006. 37. № 2. 91–99.
5. Amiel A.R., Henry J.Q., Seaver E.C. An organizing activity is required for head patterning and cell fate specification in the polychaete annelid *Capitella teleta*: New insights into cell–cell signaling in Lophotrochozoa // *Dev Biol*. 2013. 379. № 1. 107–122.
6. Biggelaar J. a. M. van den. Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgata* // *J. Morphol*. 1977. 154. № 1. 157–186.
7. Biggelaar J.A.M. van den, Guerrier P. Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusk *Patella vulgata* // *Developmental biology*. 1979. 68. № 2. 462–471.
8. Biggelaar J.A.M. van den. Development of dorso ventral polarity preceding the formation of the mesentoblast in *Lymnaea stagnalis* // *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Series C Biological and Medical Sciences*. 1976. 79. № 2. 112–126.

9. Clement A.C. Development of *Ilyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages // *J. Exp. Zool.* 1962. 149. № 3. 193–215.
10. Clement A.C. Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. I. The role of the polar lobe in determination of the cleavage pattern and its influence in later development // *J. Exp. Zool.* 1952. 121. № 3. 593–625.
11. Conklin E.G. The embryology of *Crepidula*, a contribution to the cell lineage and early development of some marine gasteropods // *J. Morphol.* 1897. 13. № 1. 1–226.
12. Dohle W. The ancestral cleavage pattern of the clitellates and its phylogenetic deviations // *Hydrobiologia.* 1999. 402. 267–283.
13. Dorresteijn A.W.C., Bornewasser H., Fischer A. A correlative study of experimentally changed first cleavage and Janus development in the trunk of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta) // *Roux Arch Dev Biol.* 1987. 196. № 1. 51–58.
14. Gonzales E.E., Zee M. van der, Dictus W.J.A.G., Biggelaar J. van den. Brefeldin A or monensin inhibits the 3D organizer in gastropod, polyplacophoran, and scaphopod molluscs // *Dev Genes Evol.* 2007. 217. № 2. 105–118.
15. Henry J.J. Conserved Mechanism of Dorsoventral Axis Determination in Equal-Cleaving Spiralian // *Developmental Biology.* 2002. 248. № 2. 343–355.
16. Henry J.J., Perry K.J. MAPK activation and the specification of the D quadrant in the gastropod mollusc, *Crepidula fornicata* // *Dev Biol.* 2008. 313. № 1. 181–195.
17. Henry J.Q. Spiralian model systems // *Int. J. Dev. Biol.* 2014. 58. 389–401.
18. Henry J.Q., Perry K.J., Martindale M.Q. Cell specification and the role of the polar lobe in the gastropod mollusc *Crepidula fornicata* // *Developmental Biology.* 2006. 297. № 2. 295–307.
19. Koop D., Richards G.S., Wanninger A., Gunter H.M., Degnan B.M. The role of MAPK signaling in patterning and establishing axial symmetry in the gastropod *Haliotis asinina* // *Dev Biol.* 2007. 311. № 1. 200–212.
20. 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. 140. 1–11.
21. Lambert J.D., Nagy L.M. MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusc *Ilyanassa obsoleta* // *Development.* 2001. 128. № 1. 45–56.
22. Lambert J.D., Nagy L.M. The MAPK cascade in equally cleaving spiralian embryos // *Dev Biol.* 2003. 263. № 2. 231–241.

23. Lartillot N., Lespinet O., Vervoort M., Adoutte A. Expression pattern of Brachyury in the mollusc *Patella vulgata* suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria // *Development*. 2002. 129. № 6. 1411–1421.
24. Martindale M.Q., Doe C.Q., Morrill J.B. The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorsoventral polarity in the equal-cleaving spiralian, *Lymnaea palustris* // *Roux Arch Dev Biol*. 1985. 194. № 5. 281–295.
25. Nakamoto A., Nagy L.M., Shimizu T. Secondary embryonic axis formation by transplantation of D quadrant micromeres in an oligochaete annelid // *Development*. 2011. 138. № 2. 283–290.
26. Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011. 1813. № 9. 1619–1633.
27. Rattenbury J.C., Berg W.E. Embryonic segregation during early development of *Mytilus edulis* // *J. Morphol*. 1954. 95. № 3. 393–414.
28. Render J.A. The second polar lobe of the *Sabellaria cementarium* embryo plays an inhibitory role in apical tuft formation // *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*. 1983. 192. № 3–4. 120–129.
29. Seaver E.C. Variation in spiralian development: insights from polychaetes // *Int. J. Dev. Biol*. 2014. 58. 457–467.
30. Tyler A. Experimental production of double embryos in annelids and mollusks // *J. Exp. Zool*. 1930. 57. № 3. 347–407.
31. Wilson E.B. Experimental studies in germinal localization. II. Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium* // *J. Exp. Zool*. 1904. 1. № 2. 197–268.
32. Yang S.-H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation // *Gene*. 2013. 513. № 1. 1–13.