

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

БАКАЛЕНКО
Надежда Игоревна

**Анализ экспрессии Нох-генов в ходе постларвального
развития полихеты *Alitta virens* (Annelida, Lophotrochozoa)**

специальность: 03.03.05 – биология развития,
эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2014

Работа выполнена в лаборатории экспериментальной эмбриологии кафедры эмбриологии Биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Дондуа Арчил Карпезович
Санкт-Петербургский государственный университет

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, ведущий
Научный сотрудник
Воронежская Елена Евгеньевна
Институт Биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН

доктор биологических наук, профессор
Самсонова Мария Георгиевна
Санкт-Петербургский государственный
политехнический университет

Ведущее учреждение: Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН

Защита состоится “ ” 2014 г. в часов на заседании совета Д 212.232.12 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, СПбГУ, биолого-почвенный факультет, кафедра

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. М. Горького СПбГУ

Автореферат разослан “ ” 2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Л. А. Мамон

Общая характеристика работы.

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Центральное место в современной биологии развития занимает изучение молекулярных механизмов контроля морфогенеза. Пристальное внимание исследователей привлекают консервативные регуляторные гены, контролирующие этапы индивидуального развития. Среди таких генов важнейшее место занимают Нох-гены.

Группа Bilateria включает три эволюционные ветви: Deuterostomia (хордовые, полухордовые, иглокожие), Ecdysozoa (членистоногие, нематоды, киноринхи, приапулиды и пр.) и Lophotrochozoa (аннелиды, плоские черви, моллюски, сипункулиды, брахиоподы, мшанки и форониды) (de Rosa et al., 1999). Так сложилось, что основные модельные объекты молекулярной биологии развития принадлежат только к двум ветвям – Ecdysozoa и Deuterostomia. На примере различных представителей позвоночных и членистоногих были показаны основные закономерности работы ключевых генов многих регуляторных каскадов, в частности Нох-генов. Для этих генов характерна кластерная организация, являющаяся структурным свидетельством происхождения Нох-генов путем тандемной дупликации, высокая консервативность и коллинеарность экспрессии. Пространственная коллинеарность означает, что расположение доменов экспрессии генов Нох-кластера (расположение передних границ этих доменов) соответствует позициям самих генов в кластере: чем ближе к 3'концу кластера расположен ген, тем ближе к переднему концу тела будет область его экспрессии. Для многих организмов характерна и временная коллинеарность, то есть время активации Нох-генов также коррелирует с их расположением на хромосоме – чем ближе к 3'концу расположен ген, тем раньше он будет активирован (Kmita and Duboule, 2003). Основная функция Нох-генов – регионализация и спецификация переднезадней оси тела животного.

Для ветви Lophotrochozoa исследования экспрессии и функций Нох-генов находятся на начальном этапе. Между тем, Lophotrochozoa – группа непревзойденная по числу разнообразных планов организации тела и очень перспективная для изучения эволюции морфогенезов. Имеющиеся на сегодняшний день данные отрывочны и разрознены для представителей разных таксонов Lophotrochozoa. Например, у исследованных моллюсков Нох-гены сохранили свою каноническую функцию осевой регионализации только на уровне ганглиев нервной системы, но в то же время оказались задействованы в морфогенезах различных, специфичных для этой группы структур, – венчика рук каракатицы, ноги и раковины брюхоногих (Lee et al., 2003; Hinman et al., 2003; Samadi and Steiner, 2010). Ряд Нох-генов представителей типа Platyhelminthes - планарий из рода *Dugesia*, упорядоченно экспрессируются вдоль переднезадней оси, однако коллинеарность передних границ экспрессии инвертирована (Orie et al., 1999). В целом, среди Lophotrochozoa наиболее подробно изучена экспрессия Нох-генов на представителях типа Annelida. У пиявки *Helobdella* спецификация сегментов происходит независимо от Нох-генов. Они начинают экспрессироваться значительно позже, в ганглиях формирующейся нервной системы (Kourakis et al., 1997). Polychaeta традиционно рассматривается как базальный класс Annelida (Brusca and

Bruska, 2002). Для представителей этой группы характерно не прямое развитие, проходящее через стадии трохофорной личинки (это общая черта полихет со многими другими классами Lophotrochozoa) и сегментированной личинки. Затем полихета проходит метаморфоз, после которого формируются постларвальные сегменты. Многообразие полихет выражено в разнообразии их сегментной морфологии. Среди полихет есть формы с морфологически сходными сегментами (как, например, представители семейства Nereididae) и гетерономно сегментированные животные, у которых сегменты организованы в тагмы. Границы доменов экспрессии Нох-генов двух гетерономно сегментированных полихет – *Chaetopterus* и *Capitella* – соотносятся с морфологическими границами отделов тела. Такая картина экспрессии согласуется с канонической функцией Нох-генов в установлении морфологической специфичности частей тела вдоль переднезадней оси. Объект нашего исследования – бродячая гомономно сегментированная полихета семейства Nereididae *Alitta (Nereis) virens*. В 1999 году Т. Ф. Андреева клонировала 11 Нох-генов этой полихеты. *A. virens* в ходе постларвального развития формирует новые сегменты из задней зоны роста практически всю жизнь. Никаких явных морфологических границ в теле *Alitta* нет. Какова может быть роль Нох-генов в этом случае?

Для большинства полихет характерна первичная гетерономия сегментов, основанная на фундаментальных различиях в способе закладки, строении и способности к регенерации ларвальных и постларвальных сегментов (Иванов, 1944; Беклемишев, 1964). В частности, ларвальные сегменты обособляются почти одновременно, путем метамеризации общей соматической пластинки, в них не образуются половые продукты и не формируются метанефридии (есть только протонефридии) (Иванов, 1944; Fischer, 2010). Постларвальные сегменты формируются последовательно из субтерминальной зоны роста, снабжены метанефридиями, и в них могут образовываться половые продукты. Для множества полихет характерно наличие и ларвального, и постларвального способа сегментации. Однако существуют группы, которые используют лишь один из этих механизмов. Полихеты семейства Dinophilidae характеризуются наличием только «ларвальных» сегментов, а тело представителей Polygordiidae состоит только из постларвальных сегментов. Такая вариабельность наводит на мысль, что ларвальная и постларвальная сегментация – это отдельные «модули», контролирующиеся разными морфогенетическими программами развития. В этом случае, мы вправе ожидать, что экспрессия Нох-генов в ларвальном и постларвальном развитии полихет, в частности, *Alitta virens*, будут различаться.

Цель данной работы: исследовать характер экспрессии Нох-генов на различных стадиях постларвального роста полихеты *Alitta virens*.

В связи с этим были поставлены следующие **задачи:**

1. Описать экспрессию всех 11 Нох-генов *A. virens* в постларвальный период.
2. Оценить соответствие постларвальной экспрессии Nvi-Нох-генов универсальному для Нох-кластера правилу пространственной коллинеарности.
3. Соотнести характер экспрессии генов Нох-кластера с планом организации ювенильного червя.
4. Оценить соответствие характера экспрессии Нох-генов в ларвальный и постларвальный период гипотезе о первичной гетерономии сегментов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Формирование постларвальных сегментов *A. virens* сопровождается коллинеарной экспрессией Нох-генов.
2. Ларвальное и постларвальное развитие полихет находится под контролем разных морфогенетических программ, что подтверждается различиями в закономерностях экспрессии Нох-генов на этих этапах онтогенеза.
3. На основании полученных данных было сформулировано предположение о возможной функции Нох-генов в постларвальный период. Она связана с установлением и поддержанием позиционных значений в границах постоянно растущего тела.
4. Наличие антисмысловых транскриптов Нох-генов у представителя Lophotrochozoa указывает на возможную универсальность этого явления среди Bilateria.

Научная новизна работы.

Данная работа описывает экспрессию Нох-генов в ходе постларвального развития полихеты *Alitta virens*. Помимо данного исследования, постларвальная экспрессия Нох-генов к настоящему моменту исследована только у одной полихеты – *Capitella teleta* (Capitellidae) (Frobius et al., 2008). Филогенетическая удаленность полихет этого семейства от базовых представителей типа делает ее не самым удачным объектом для поиска анцестральных морфогенетических программ. *Alitta virens* относится к более примитивным полихетам. Анализ закономерностей её развития на уровне регуляторных программ необходим для понимания эволюционных стратегий, которые легли в основу масштабной дивергенции билатеральных животных.

Полученные нами данные о наличии антисмысловых транскриптов Нох-генов являются первыми данными такого рода для всех представителей Lophotrochozoa.

Теоретическое и практическое значение работы.

Результаты диссертации вносят вклад в представления о стратегии использования Нох-генов у мало изученной в этом отношении группы Lophotrochozoa. Обнаруженные нами существенные различия в характере экспрессии Нох-генов в ларвальном и постларвальном развитии являются аргументом в пользу представления о первичной гетерономии сегментов полихет. Уникальная картина постларвальной экспрессии Нох-генов *A. virens* позволила нам выдвинуть гипотезу о возможной функции этих генов в постоянно растущем теле, построенном из морфологически сходных сегментов. Обнаруженная транскрипция антисмысловых последовательностей свидетельствует о возможной регуляции экспрессии Нох-генов с помощью длинных некодирующих РНК. Полученные результаты могут использоваться в материалах курсов по эволюции, генетике и биологии развития.

Личный вклад автора.

Все экспериментальные процедуры, описанные в работе, были выполнены автором при поддержке и помощи коллектива лаборатории экспериментальной эмбриологии. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с научным коллективом лаборатории.

Апробация работы.

Основные положения работы доложены и обсуждены на 13-ом конгрессе Европейского сообщества эволюционной биологии (Тюбинген, Германия, 2011), конференции «Progress In Understanding The Origins of Biodiversity» (Ювяскюля,

Финляндия, 2012) и конференции европейского сообщества Evo Devo (Лиссабон, Португалия, 2012).

Объём и структура диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования, их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 144 наименования. Материалы диссертации изложены на 139 страницах и проиллюстрированы 58 рисунками.

Материалы и методы.

1. Культивирование животных. Половозрелые особи *A. virens* были собраны в губе Чупа, Белое море, в окрестностях Морской биологической станции Зоологического института РАН «Картеш». Животных отлавливали у поверхности воды в период выхода на нерест (июнь-июль). Постановка и выращивание культуры эмбрионов производилась при 10.5°C. Культуру ювенильных особей содержали в лаборатории экспериментальной эмбриологии в следующих условиях: температура 18°C, соленость 23 ‰, искусственная морская вода (Red Sea salt).

2. Животных фиксировали в 4% PFA в течение суток. Для фиксации отбирали животных на стадиях поздней нектохеты, начала постларвальной сегментации (4-6 сегментов), после формирования дефинитивной головы (10-12 сегментов), черви размером 15-20, 25 и 30 и более сегментов.

3. Фрагменты Нох-генов *Alitta virens* были получены Т.Ф. Андреевой и С. Cook в лаборатории молекулярной биологии Зоологического музея Университета г. Кэмбридж, Великобритания. Фрагменты всех генов, кроме *Nvi-Hox3* и *Nvi-Post1*, были встроены в pGEM®-T Easy Vector (Promega). *Nvi-Hox3* и *Nvi-Post1* были вставлены в pBluescript II SK+ (Fermentas). Последовательность векторов позволяет получать смысловые и антисмысловые зонды с разных промоторов (T7 and Sp6).

4. Матрицы для синтеза зондов были получены с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Mastercycler personal (Eppendorf). Качество прохождения ПЦР проверялось с помощью гельэлектрофореза. Для очистки матрицы использовался QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN) и протокол фирмы производителя.

5. Дигоксигенин-меченые РНК-зонды синтезировались по протоколу Roche. Концентрация и размер полученных РНК-зондов оценивались с помощью электрофореза в агарозном геле с использованием маркера RNA Ladder, Low range (MBI Fermentas). Полученные РНК-зонды проходили очистку с использованием RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) по протоколу фирмы производителя. Зонды хранились в гибридизационном буфере при -20°C. Антисмысловые зонды использовались для выявления смысловых транскриптов. Смысловыми зондами обнаруживались антисмысловые транскрипты.

6. Гибридизация *in situ* на тотальных препаратах (WMISH). Зонд (РНК, комплементарная изучаемому транскрипту), содержит модифицированный дигоксигенином нуклеотид, и присутствие гибридной молекулы в тканях целого животного выявляется антителами к дигоксигенину. Антитела ассоциированы со щелочной фосфатазой, которая гидролизует субстрат (в нашем случае BM-purple, Roche) с образованием окрашенного и нерастворимого продукта. Таким образом, синяя

окраска клеток маркирует домены экспрессии анализируемого транскрипта. Метод позволяет точно определить пространственно-временные характеристики экспрессии любого транскрипта, в том числе и антисмыслового. Для улучшения проникаемости зонда проводилась обработка коллагеназой (Sigma) в течение 5 - 15 мин в зависимости от возраста (плотности кутикулярного покрова) червя и инкубация в SDS/Tween буфере 30 мин. Обработка Протеиназой К (Sigma) производилась в течение 8-15 мин. Температура предгибридизации и гибридизации составляла 65°C. Температура отмывок от зонда - 67°C. Инкубация с антителами Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments from sheep (Roche) (1:4000) проводилась в течение ночи при температуре +4°C. Окрашивание проводилось при 37°C. Время развития цветной реакции составляло 12 часов для большинства генов и до 48 часов для транскриптов с низким уровнем экспрессии (*Nvi-Hox2*, *Nvi-Lox4* и антисмысловых транскриптов *Nvi-antiHox5* и *Nvi-antiHox7*). Полный протокол приведен в основном тексте диссертации.

7. Получение и обработка изображений. Результаты были проанализированы и были получены фотографии на микроскопе DMRXA (Leica), оснащенного цифровой камерой DC500 (Leica) с использованием оптики Номарского в ресурсном центре Санкт-петербургского Государственного Университета «Chromas». Перед микроскопическим анализом черви заключались в гвоздичное масло. Оптические срезы были собраны с помощью программы Helicon Focus. Яркость, контрастность и цветовые параметры всех изображений были скорректированы с помощью программы Adobe Photoshop CS5.

Результаты и обсуждение

Краткое описание постларвального развития полихеты *Alitta virens*.

Постларвальный рост червя начинается с момента закладки четвёртого (первого постларвального) сегмента. Постларвальные сегменты последовательно, один за другим формируются из субтерминальной зоны роста. На стадии 6-8 сегментов первый хетоносный сегмент сливается с головой, его параподии сильно редуцируются, утрачивают хеты, их нейро- и нотоподиальные выросты начинают расти и преобразуются во вторую пару перистомиальных цирр. После этой стадии, второй хетоносный сегмент личинки становится первым туловищным сегментом ювенильного животного. Образование новых сегментов продолжается значительную часть жизни и прекращается у ~200 сегментного червя.

Экспрессия *Nvi*-Нох генов.

В данной работе была проанализирована экспрессия всех 11 Нох-генов *Alitta virens*, начиная со стадии поздней нектохеты и до появления 30го – 35го постларвального сегмента. Было обнаружено, что все Нох-гены *A. virens* экспрессируются в ходе постларвального развития. Картины экспрессии *Nvi*-Нох-генов позволяют разделить их на несколько групп.

1. В первую группу попадают гены *Nvi-Hox1*, *Nvi-Hox4*, *Nvi-Hox5* и *Nvi-Lox5*. У личинки передние границы доменов их экспрессии соответствуют первому (*Nvi-Hox1*), второму (*Nvi-Hox4*) и третьему (*Nvi-Hox5* и *Nvi-Lox5*) ларвальным сегментам. Эти границы остаются стабильными при метаморфозе и сохраняются на всех

исследованных стадиях постларвального развития. В ходе постларвального развития экспрессия генов этой группы затрагивает, в основном, эктодерму и ганглии брюшной нервной цепочки (рисунок 1).

Nvi-Hox1. У ювенильных червей, начиная со стадии 10 сегментов, градиент экспрессии *Nvi-Hox1* имеет вид двухвершинной кривой. Максимум экспрессии приходится на первый туловищный (второй ларвальный) сегмент, затем экспрессия затухает и возобновляется в нейромерах последней трети тела. При этом самые молодые сегменты и зона роста свободны от экспрессии *Nvi-Hox1* (рисунок 1). Рисунок экспрессии в передних и задних сегментах сильно различается. Последующий рост червя приводит к пропорциональному «растягиванию» градиента экспрессии *Nvi-Hox1*. Этот ген имеет также дополнительные домены экспрессии – в глотке и в пигидиальных и перистомиальных циррах.

Nvi-Hox4. Градиент экспрессии *Nvi-Hox4* в нервной системе также выглядит двувершинным, поскольку в срединных сегментах уровень транскрипта ниже, чем в передних и задних сегментах. Передняя граница локализована в первом туловищном (втором ларвальном) сегменте. Экспрессия интенсивна не только в нервной системе, но и в сегментной эктодерме и эктодерме параподий (рисунок 1). В эктодерме образуется заднепередний градиент экспрессии.

Nvi-Hox5. У ювенильных червей каждый новообразованный сегмент, сформировавший параподии, начинает экспрессировать *Nvi-Hox5*. В самых молодых сегментах, зоне роста и пигидии транскрипт *Nvi-Hox5* не обнаруживается. Рисунок экспрессии имеет вид широкого дугообразного градиента, минимумы которого приходятся на самые первые и самые последние сегменты тела (рисунок 1). Экспрессия *Nvi-Hox5* в нервной системе сохраняет переднюю границу на уровне второго туловищного сегмента (третьего ларвального). Передняя граница экспрессии в сегментной эктодерме локализована на 2-3 сегмента ближе к заднему концу, чем область экспрессии в нервной системе. В ходе роста червя картина экспрессии принципиально не меняется.

Nvi-Lox5. На различных этапах постларвального роста транскрипт *Nvi-Lox5* выявляется в нейромерах передних сегментов, начиная со второго туловищного (третьего ларвального). В середине тела уровень транскрипции низкий, но резко увеличивается в молодых сегментах (рисунок 1). У сформировавшихся червей экспрессия имеет вид несимметричного двускатного градиента. Передняя граница зоны экспрессии сохраняется на уровне 2го туловищного (3го ларвального) сегмента.

Таким образом, экспрессия генов этой группы имеет градиентный характер. Форма градиента для каждого гена имеет свои особенности. Все гены имеют четкие передние границы экспрессии, установленные еще в ходе развития личинки. Передние границы доменов экспрессии коллинеарны. Области экспрессии *Nvi-Hox1* и *Nvi-Hox5* не имеют четких задних границ, т.к. по мере добавления новых сегментов они постоянно смещаются назад.

2. Во вторую группу мы включили гены *Nvi-Hox7*, *Nvi-Lox4*, *Nvi-Lox2* и *Nvi-Post2*. Экспрессия этих генов также имеет градиентный характер. Интенсивность окрашивания максимальна в задних, самых молодых сегментах, и уменьшается по направлению к переднему концу, т.е. формируется заднепередний градиент экспрессии (рисунок 2).

Nvi-Hox7. В ходе постларвальной сегментации *Nvi-Hox7* формирует заднепередний градиент экспрессии в сегментной эктодерме, в эктодерме пароподий и в постларвальных нейромерах (рисунок 2). Градиент экспрессии пропорционален растущему телу червя. Передняя граница экспрессии локализована на уровне третьего ларвального сегмента у четырехсегментного червя, но по мере роста сдвигается на несколько сегментов назад, так что у 15-30-сегментных червей она обнаруживается на уровне пятого-седьмого сегмента.

Nvi-Lox4. Транскрипт *Nvi-Lox4* диффузно распределён в поверхностных клетках брюшной нервной цепочки и не образует чёткого, метамерно повторяющегося паттерна (рисунок 2А). Экспрессия не затрагивает эктодермальную зону роста (рисунок 2В), но слабая транскрипция заметна в мезодерме молодых сегментов (рисунок 2Б). На всех исследованных стадиях мы обнаруживаем очень слабую экспрессию *Nvi-Lox4*, что может быть связано как с низким уровнем его экспрессии, так и с небольшим размером зонда (302 н).

Nvi-Lox2. Транскрипт *Nvi-Lox2* обнаруживается в зоне роста, нейромерах и эктодерме молодых постларвальных сегментов и пигидии. Передняя граница экспрессии локализована на уровне третьего ларвального сегмента у 4-сегментного червя, но по мере роста сдвигается на несколько сегментов назад, так что у 15-30-сегментных червей она обнаруживается на уровне шестого-восьмого сегмента (рисунок 2).

Nvi-Post2. С наступлением постларвального периода, экспрессия распространяется на зону роста и молодые постларвальные сегменты (рисунок 2). Транскрипт обнаруживается в ганглиях вентральной нервной цепочки и эктодерме этих сегментов. Стационарной передней границы у экспрессии *Nvi-Post2* нет.

Таким образом, экспрессия генов этой группы имеет вид заднепередних градиентов. Зоны экспрессии не имеют четких передних границ и постоянно смещаются назад по мере роста червя, однако и в этом случае в пространственном расположении доменов прослеживается коллинеарность. Возможно, *Nvi-Lox4* ее нарушает, т.к. по нашим данным, градиент его экспрессии короче, чем *Nvi-Lox2*, однако слабый уровень сигнала не позволяет нам говорить о точной локализации границ экспрессии этого гена.

3. *Nvi- Hox2, Nvi-Hox3*.

Nvi-Hox2 у ювенильного червя имеет яркий домен экспрессии в кольце крупных мезодермальных клеток в проекции эктодермальной зоны роста. Для *Nvi-Hox2* характерна слабая диффузная экспрессия в эктодерме только что сформировавшихся сегментов, которая быстро исчезает. На поздних сроках экспрессия по-прежнему выявляется в мезодерме зоны роста, а также в небольших группах клеток, залегающих по средней линии, в центре каждого нейромера. Кроме того, у 8-10 сегментных червей появляется новый домен экспрессии в глотке. Этот домен сохраняется на всех изученных стадиях.

Nvi-Hox3. Экспрессия *Nvi-Hox3* соотносится с субтерминальной зоной роста, начиная от стадии ранней нектохеты. У ювенильных червей всех исследованных стадий рисунок экспрессии имеет вид сплошного кольца в прилежащей к пигидию эктодерме зоны роста.

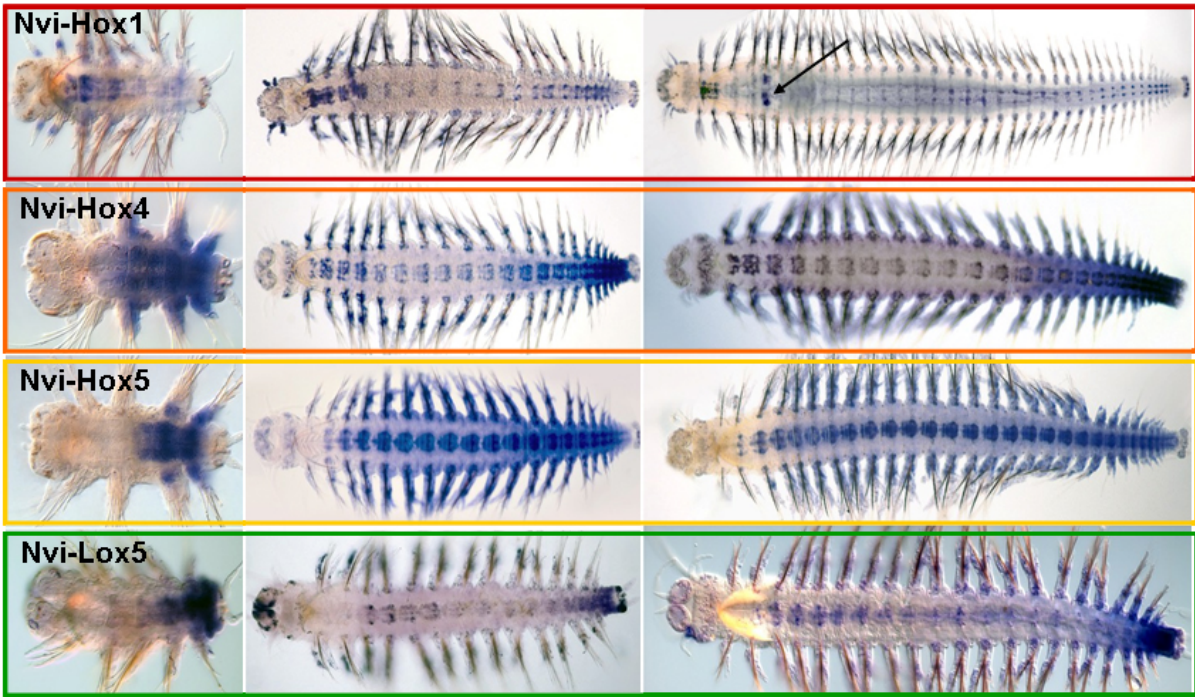


Рисунок 1. Экспрессия генов *Nvi-Hox1* (в красной рамке), *Nvi-Hox4* (в оранжевой рамке), *Nvi-Hox5* (в желтой рамке), *Nvi-Lox5* (в зеленой рамке) на различных этапах постларвальной сегментации. Стрелкой отмечена экспрессия *Nvi-Hox1* в глотке. На всех изображениях представлен вид с вентральной стороны, передний конец слева

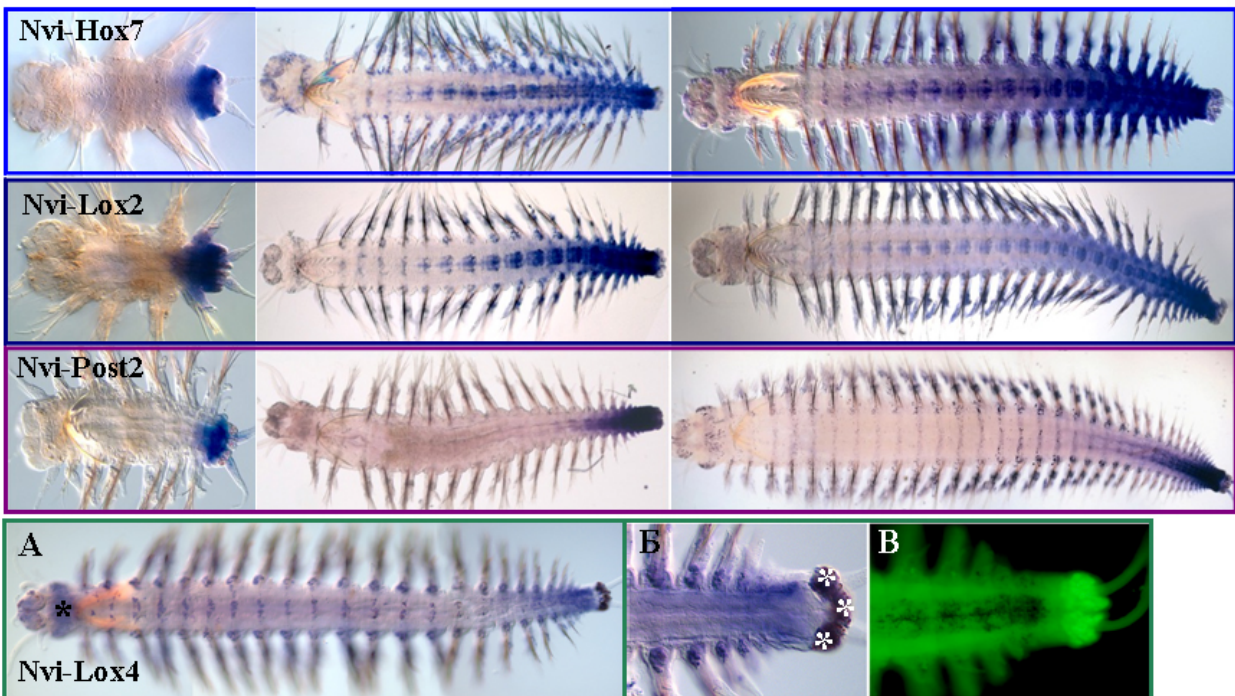


Рисунок 2. Экспрессия генов *Nvi-Hox7* (в синей рамке), *Nvi-Lox2* (в темно-синей рамке), *Nvi-Post2* (в фиолетовой рамке) на различных этапах постларвальной сегментации. В зеленой рамке *Nvi-Lox4*. (А) Общий вид; (Б) Задний конец тела, мезодерма; (В) Задний конец тела, поверхность. Знаком * отмечен фон. На всех изображениях представлен вид с вентральной стороны, передний конец слева.

4. *Nvi-Post1*. Этот ген имеет тканеспецифическую экспрессию в хетоносных мешках развивающихся параподий.

Таким образом, большинство *Nvi-Hox*-генов (8 из 11) формируют градиенты экспрессии в центральной нервной системе и эктодерме *A. virens*. Эти градиенты сильно перекрываются, но их размах и форма уникальны для каждого гена. Домены их экспрессии постоянно смещаются в соответствии с меняющимися пропорциями растущего червя, тем не менее, в пространственном расположении большинства из них прослеживается коллинеарность. Многие гены имеют дополнительные домены экспрессии в параподиях (*Nvi-Hox1*, *Nvi-Hox5*, *Nvi-Hox7*, *Nvi-Hox4*), в циррах (*Nvi-Hox1* и *Nvi-Post2*) и в глотке (*Nvi-Hox1*, *Nvi-Hox2*), *Nvi-Post1* специфицирует щетинконосные мешки.

Для всех изученных билатеральных животных существует корреляция границ доменов экспрессии *Hox*-генов с морфологическими границами отделов тела (Hughes and Kaufman, 2002).

Из всех исследованных полихет наибольшей морфологической сложностью обладает личинка *Chaetopterus*. Она состоит из трех тагм (А, В и С), причем существуют морфологические отличия не только между сегментами разных тагм, но и в пределах одной тагмы (В). На поздних этапах личиночного развития *Chaetopterus* задние границы экспрессии *Hox*-генов *CH-Hox1*, *CH-Hox2* совпадают с границей между тагмами А и В, а задняя граница *CH-Hox5* маркирует границу морфологически различных сегментов внутри тагмы В (Irvine and Martindale, 2000).

Тело *Capitella teleta* состоит из грудного и брюшного отделов. Морфологическая разница между торакальными и брюшными сегментами не велика. В ходе развития границы экспрессии некоторых *Hox*-генов стабилизируются в области перехода между грудной и брюшной тагмой (Frobius et al, 2008).

Alitta virens – гомономно сегментированный червь. В этом случае домены экспрессии большинства *Hox*-генов не имеют стабилизированных задних границ, они заканчиваются на уровне молодых сегментов или зоны роста. Домены экспрессии охватывают значительную часть постларвального тела и сильно перекрываются (рисунок 3).

Таким образом, степень разделенности доменов экспрессии *Hox*-генов коррелирует со степенью регионализации тела. Чем морфологически однообразнее сегменты тела, тем сильнее перекрываются зоны экспрессии *Hox*-генов. Эта закономерность была показана ранее для других билатеральных животных, например для представителей различных классов *Arthropoda* (Hughes and Kaufman, 2002).

Нох-гены в ларвальной и постларвальной программе развития полихет.

Как уже упоминалось выше, существуют значительные отличия в способе формирования и морфологических признаках ларвальных и постларвальных сегментов полихет, позволяющие говорить об их первичной гетерономии. Наши данные об экспрессии *Hox*-генов в онтогенезе *Alitta virens* позволяют обсуждать различия в молекулярных механизмах паттернирования ларвальных и постларвальных сегментов.

Ранее мы исследовали экспрессию *Hox*-генов у *Alitta virens* и *Platynereis dumerilii* при развитии личинки (Kulakova et al., 2007). Гены *Nvi-Hox1*, *Nvi-Hox4*, *Nvi-Hox5*, *Nvi-Lox5*

и *Nvi-Post2* демонстрируют классический коллинеарный рисунок экспрессии в процессе метаморфоза сферической трохифоры в сегментированную нектохету. Передние границы экспрессии последовательно приурочены к границам трёх хетоносных сегментов и пигидия. Гены *Nvi-Hox7*, *Nvi-Lox4* и *Nvi-Lox2*, экспрессируются в предпигидиальной области (на территории будущей зоны роста) на стадии поздней нектохеты, незадолго до начала постларвальной сегментации, не принимая участия в развитии личиночных структур (Kulakova et al, 2007) (рисунок 3). *Nvi-Post1* связан с тканеспецифичной дифференцировкой хетоносных мешков.

Обнаруженная нами градиентная экспрессия *Nvi-Hox*-генов в ходе постларвального развития *A. virens* отличается от их экспрессии у личинки. Обращают на себя внимание следующие принципиальные отличия:

1. Каждый ларвальный сегмент экспрессирует определенный набор *Hox*-генов. Например, в первом сегменте личинки обнаруживаются транскрипты *Nvi-Hox1*, *Nvi-Hox2* и *Nvi-Hox3*, во втором к ним добавляется *Nvi-Hox4* и т.д. При этом *Nvi-Hox5* и *Nvi-Lox5* никогда не обнаруживаются в первом или втором сегментах, а *Nvi-Post2* не экспрессируется ни в одном из сегментов личинки. В каждом постларвальном сегменте экспрессируются все *Hox*-гены, но не одновременно. Профиль экспрессии *Hox*-генов меняется в зависимости от положения сегмента вдоль переднезадней оси тела (рисунок 4). Интересно, что нейральная экспрессия генов другого кластера - кластера *ParaHox*-генов, подчинена у *Alitta* тому же правилу – все постларвальные (но не ларвальные) нейромеры экспрессируют каждый из *ParaHox*-генов, но в разный период (Kulakova et al., 2008).

2. При формировании плана тела нектохеты экспрессируется всего 7 *Hox*-генов, в то время как еще 3 срединных гена (*Nvi-Hox7*, *Nvi-Lox4*, *Nvi-Lox2*) не принимают значимого участия в морфогенезе личинки. Эти гены начинают экспрессироваться на территории будущей зоны роста, и затем активно экспрессируются в растущем постларвальном теле червя. Кроме того, экспрессия гена *Nvi-Post2* у личинки выявляется только в пигидии, но не в ларвальных сегментах. При этом интересно отметить, что у личинки работают наиболее эволюционно консервативные, «древние» *Hox*-гены. Предполагается, что *Hox*-кластер общего предка *Bilateria* включал 7 *Hox*-генов: гены PG1-PG5, 1 ген центральной группы (PG6-8) и 1 один ген задней группы (PG9+) (de Rosa et al, 1999). Именно такой набор *Hox*-генов и экспрессируется у личинки *A. virens* – *Nvi-Hox1* - *Nvi-Hox5*, срединный ген *Nvi-Lox5* и задний ген *Nvi-Post2*. Дальнейшая эволюция *Bilateria* сопровождалась независимой дупликацией и дивергенцией последовательностей срединных и задних *Hox*-генов в разных эволюционных ветвях. Так, для *Deuterostomia* характерны центральные гены *Hox6-Hox8*, для ветви *Ecdysozoa* характерны такие центральные гены, как *ftz*, *Antp*, *Ubx* и *AbdA*, а для *Lophotrochozoa* – *Lox5*, *Hox7*, *Lox2* и *Lox4*. Похожая ситуация произошла с задними генами *Protostomia*. Характерные для *Ecdysozoa* *AbdB/php-3* (*Arthropoda*, *Nematoda*, *Priapulida*, *Onychophora*) и *nob-1/HB4* (*Nematoda*, *Priapulida*) появились независимо от *Post1* и *Post2* *Lophotrochozoa* (de Rosa et al., 1999). Таким образом, в ларвальном теле работают наиболее старые, консервативные *Hox*-гены, в постларвальном к этому набору добавляются «новые», специфичные для представителей *Lophotrochozoa*. Эти различия говорят в пользу представления о первичной гетерономии ларвальных и

постларвальных сегментов не только на морфологическом, но и на молекулярном уровне, на уровне программ развития.

К сожалению, на настоящий момент существует очень мало данных, позволяющих сравнить молекулярные механизмы ларвального и постларвального развития полихет. В частности, экспрессия Нох-генов и в ларвальном, и в постларвальном развитии изучена только на одной полихете, кроме *Alitta virens* – *Capitella teleta*. Эта полихета принадлежит к филогенетически далекому от Nereididae семейству Capitellidae (Frobisius et al., 2008). У *C. teleta* сложно организованная, многосегментная личинка, 9 сегментов которой быстро формируются в переднезаднем направлении из латеральной зоны роста (вегетативной пластинки), а еще 4 образуются последовательно, из субтерминальной зоны роста (Seaver et al., 2005). На ранних стадиях личиночного развития, пока сегменты формируются из латеральной зоны роста, характер экспрессии Нох-генов *Capitella*, как и *Alitta*, в целом сходен с их экспрессией у других билатеральных животных и подчиняется тем же правилам. На поздних личиночных стадиях, когда начинает работать задняя зона роста, картина экспрессии CapI-Нох-генов меняется. Если сравнивать экспрессию Нох-ортологов у поздней личинки *C. teleta* и у ювенильного *A. virens*, для многих генов обнаруживается принципиальное сходство характера экспрессии. Так, гены *Hox1*, *Hox4* и *Lox5* у обоих видов имеют как передние, так и задние домены экспрессии. При этом в обоих случаях экспрессия имеет градиентный характер (Frobisius et al., 2008). После оседания и метаморфоза личинки картина экспрессии Нох-генов *Capitella* вновь меняется. Сходство между ювенильным червём *A. virens* и поздней личинкой *C. teleta* может указывать на существование анцестральной программы, в которой Нох-гены экспрессировались широко, то есть в сегментной эктодерме, нервной системе и зоне роста. В линии Capitellidae эта программа задействована только на стадии поздней «личинки».

Дискуссии по поводу первичной гетерономности ларвальных и постларвальных сегментов полихет продолжаются давно. Ряд исследователей (Иванов, Беклемишев, Remane) предполагают, что первичная гетерономия ларвальных и постларвальных сегментов является примитивной чертой для всего класса Polychaeta. Некоторые из них (Беклемишев, Свешников) считают эволюционно более древним ларвальный способ сегментации, а последовательное формирование постларвальных сегментов из зоны роста рассматривают как вторично приобретенный онтогенетический механизм. Андерсон, напротив, примитивным считает постларвальный способ сегментации (Giangrande and Gambi, 1998).

Постларвальная экспрессия Нох-генов у представителей двух эволюционно далеких друг от друга семейств *A. virens* и *C. teleta* сильно отличается от ларвальной, что может свидетельствовать о консервативности этих различий. Также важно, что картины постларвальной экспрессии Нох-генов отличаются у разных видов сильнее, чем ларвальные. Возможно, это свидетельствует в пользу представления о постларвальном способе сегментации как эволюционно более новом механизме, в который Нох-гены разных групп полихет включались независимо. Однако исследования всего двух представителей обширного и разнообразного класса Polychaeta недостаточны для однозначных выводов. Вариабельность экспрессии Нох-генов изученных представителей этой группы животных подчеркивает необходимость сравнительных

исследований экспрессии регуляторных генов, в том числе генов Нох-кластера, у представителей различных семейств полихет.

Возможные функции Нох-генов в постларвальном развитии *Alitta virens*.

Ларвальная и постларвальная программы полихет не похожи в отношении экспрессионной активности Нох-генов. Какова может быть функция этих генов у нереидных полихет, сегментирующихся большую часть жизни? Как соотносится судьба отдельного сегмента, позиция которого постоянно меняется относительно переднезадней оси с транскрипционным статусом Нох-кластера?

Создание и поддержание позиционной информации.

Нереида *A. virens* состоит из большого числа морфологически сходных сегментов. Большинство Нох-генов *A. virens* экспрессируется в эктодерме сегментов и нервной системе постларвальных сегментов. В каждом постларвальном сегменте, только что сформировавшемся в зоне роста, экспрессируется одновременно большинство Нох-генов (кроме *Nvi-Hox1* и *Nvi-Hox5*). По мере смещения сегмента от зоны роста к переднему концу, профиль экспрессии Нох-генов, которые в нем транскрибируются, меняется: «включаются» *Nvi-Hox5* и *Nvi-Hox1*, а экспрессия *Nvi-Post2* и других генов с заднепередним градиентом постепенно ослабевает. Иными словами, меняется позиция сегмента – меняется и профиль экспрессии Нох-генов в каждом конкретном сегменте (рисунок 4).

Поскольку это происходит не скачкообразно, а постепенно, экспрессия приобретает вид широко перекрывающихся градиентов. Прямым следствием такого поведения системы являются индивидуальные профили Нох-экспрессии в каждом сегменте.

Мы предполагаем, что система транскрипционных градиентов Нох-генов необходима для создания и поддержания позиционных значений для каждого из сегментов. В пределах постоянно растущего тела такая система регуляции позволяет «присвоить» каждому метамеру собственный «Нох-код», который постепенно меняется в соответствии с текущей позицией сегмента относительно терминальных структур – головы и пигидия. В этом случае «Нох-код» нужен не для морфологической, а для позиционной спецификации. Наша гипотеза хорошо объясняет сложную дифференциальную активность Нох-генов в ряду морфологически сходных сегментов у нереид, поскольку единственный признак, по которому эти сегменты действительно отличаются друг от друга – их позиция вдоль основной оси тела.

Создание и поддержание позиционной информации может оказаться необходимым при корректной регенерации заднего конца тела, к которой способны полихеты семейства Nereididae. При утрате части тела необходимо быстрое переопределение позиций сегментов в соответствии с новыми границами. Поскольку работа Нох-кластера часто согласована за счёт общих регуляторных элементов и системы обратных связей, можно ожидать, что весь их комплекс будет легко реорганизовывать экспрессию при позиционном сбое. Экспрессия Нох-генов *Alitta virens* во время регенерации заднего конца тела подтверждает это предположение (Novikova et al., 2013). Действительно, для целого ряда Нох-генов показано очень быстрое (4-18 часов после отрезания заднего

конца тела) изменение картины экспрессии. В результате этих изменений, сегменты, ставшие последними в результате операции, приобретают характерный для концевых сегментов профиль экспрессии Нох-генов. Пролиферация клеток в области отреза, формирование бластемы и формирование нового пигидия начинается много позже, чем реорганизуется Нох-паттерн.

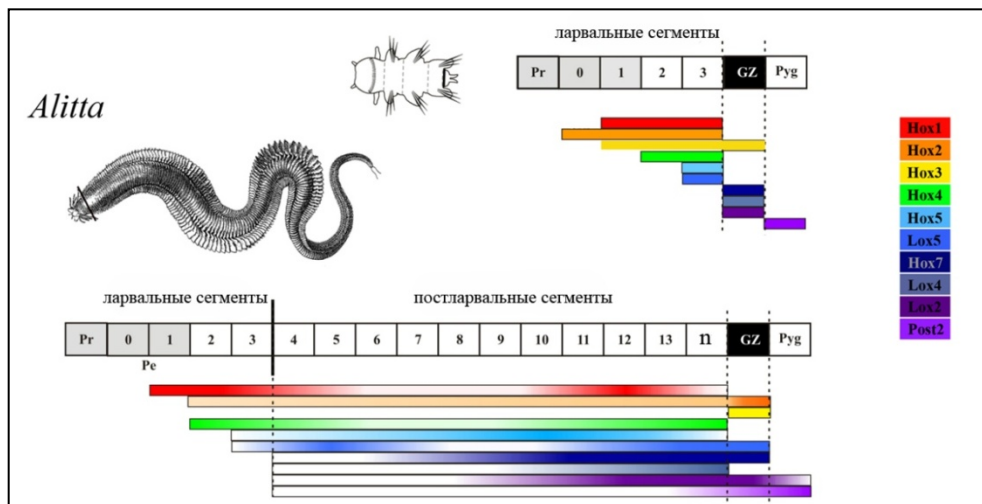


Рисунок 3. Схема экспрессии Нох-генов в ларвальном и постларвальном развитии *Alitta virens*. Pr – простомиум, Pe – перистомиум, GZ – зона роста, Pyg – пигидий.

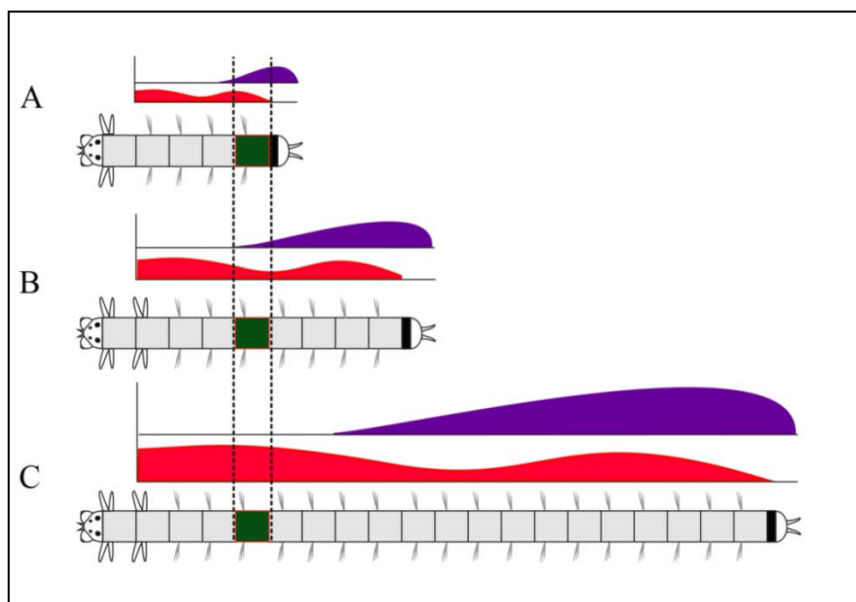


Рисунок 4. В качестве примера показано изменение экспрессии двух Нох-генов в одном сегменте червя в ходе сегментации (сегмент выделен зеленым). Красным изображен градиент экспрессии *Nvi-Hox4*, фиолетовым – *Nvi-Post2*. (А) Сегмент только появился из зоны роста и является самым последним. Оба гена экспрессируются в нем на высоком уровне. (В) По мере роста червя добавляются новые сегменты, выделенный сегмент смещается к середине тела. Уровень экспрессии обоих генов падает. (С) Выделенный сегмент оказывается одним из передних. В этом случае уровень экспрессии *Nvi-Hox4* в нем повышается, а экспрессия *Nvi-Post2* исчезает.

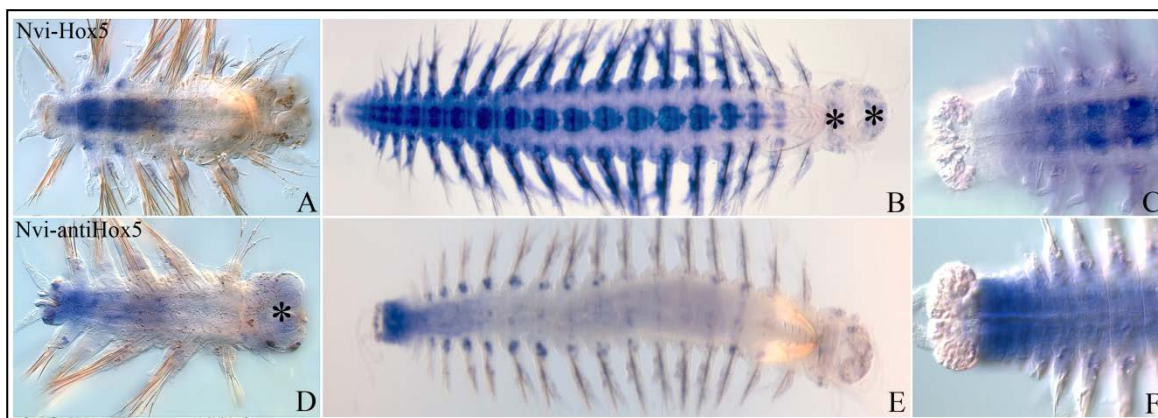


Рисунок 5. Экспрессия *Nvi-Hox5* (A-C) и *Nvi-antiHox5* (D-F). Знаком * отмечен фон. На всех изображениях представлен вид с вентральной стороны, передний конец слева.

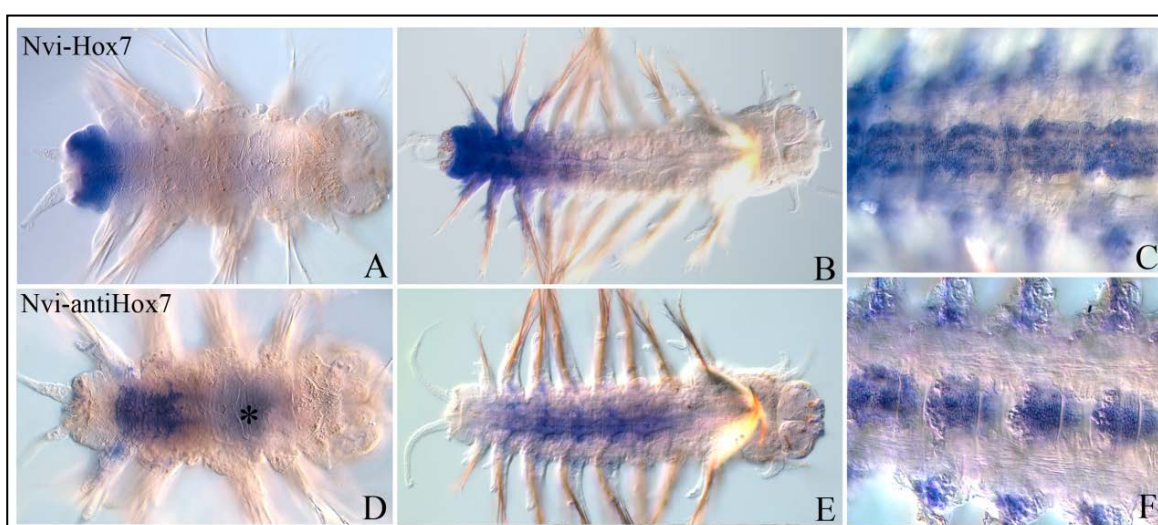


Рисунок 6. Экспрессия *Nvi-Hox7* (A-C) и *Nvi-antiHox7* (D-F). На фотографиях C и F представлены фрагменты середины тела червей размером около 20 сегментов. Знаком * отмечен фон. На всех изображениях представлен вид с вентральной стороны, передний конец слева.

Градиентная экспрессия *Hox*-генов у взрослого животного обнаружена у двух других организмов, способных к репаративной регенерации – планарии *Dugesia japonica* (Turbellaria; Platyhelminthes) и тритона *Pleurodeles waltl* (Amphibia, Vertebrata). В обоих случаях экспрессионный профиль *Hox*-генов меняется при регенерации (Orii et al., 1999; Nogi and Watanabe, 2001; Nicolas et al., 2003).

Возможно, во всех этих случаях *Hox*-гены выступают в качестве носителей позиционной памяти, необходимой для эффективной репаративной регенерации. Филогенетическая удаленность полихет, плоских червей и амфибий позволяет предположить, что использование генов *Hox*-кластера для создания и поддержания позиционной информации очень древнее явление.

Нох-гены в регионализации и спецификации нервной системы.

Рисунки экспрессии различных *Hox*-генов в ганглиях брюшной нервной цепочки *A. virens* выглядят неодинаково. Возможно, *Hox*-гены *A. virens* принимают участие в

спецификации определенных типов нейронов внутри ганглия. Известно, что Нох-гены другой полихеты этого семейства, *Platynereis dumerilii*, определенно экспрессируются в различных частях нейромеров (Pfeifer et al., 2012), а Нох-гены пиявки *Helobdella* имеют сильно отличающиеся рисунки экспрессии в ганглиях (Kourakis et al., 1997). В целом, экспрессия Нох-генов в развитии нервной системы обнаружена у представителей членистоногих, позвоночных, асцидий и полихет (Frobisius et al., 2008; Ikuta et al., 2004; Tara et al., 2009). У некоторых животных нервная система – единственная структура, в которой выявляется упорядоченная коллинеарная экспрессия Нох-генов (Kourakis et al., 1997; Hinman et al., 2003; Ikuta et al., 2004). Участие в регионализации нервной системы вдоль переднезадней оси является, возможно, наиболее консервативной функцией Нох-генов.

Антисмысловые транскрипты.

Транскрипт *Nvi-antiHox5* обнаруживается в зоне роста и самых молодых сегментах, то есть именно там, где не выявляется смысловой транскрипт *Nvi-Hox5* (рисунок 5). Зоны локализации смыслового и антисмыслового транскриптов слегка перекрываются в смежных областях. *Nvi-antiHox5* не имеет стационарной границы в постларвальном теле, и его домен постоянно смещается кзади, сохраняя при этом относительную пропорциональность растущему телу. В целом, границы областей локализации смыслового и антисмыслового транскриптов постоянно смещаются таким образом, что между ними всегда остается небольшая зона перекрывания.

В начале постларвального роста антисмысловой транскрипт *Nvi-antiHox7* выявляется в ганглии третьего сегмента, то есть кпереди от домена экспрессии собственно *Nvi-Hox7* (рисунок 6А, D). Передняя граница области его транскрипции стационарна. На дальнейших этапах постларвального роста перекрывание зон локализации увеличивается, но передняя граница *Nvi-antiHox7* всегда находится кпереди от *Nvi-Hox7* (рисунок 6В, E). Смысловой и антисмысловой транскрипты обнаруживаются в пределах одних и тех же ганглиев, но рисунки их экспрессии сильно отличаются (рисунок 6С, F). Возможно, эти RNA экспрессируются в разных группах нейронов.

В нашей работе впервые показано присутствие антисмысловых транскриптов Нох-генов у животных из ветви Lophotrochozoa. Регуляция работы Нох-кластера за счёт некодирующих РНК известна для млекопитающих и артропод (Rinn et al., 2007, Brena et al., 2006). Более 200 разнонаправленных и разноразмерных некодирующих транскриптов считываются с последовательностей четырёх Нох-кластеров человека (Rinn et al., 2007). Наша находка указывает на универсальность такого способа регуляции среди билатеральных животных.

Антисмысловые РНК Нох-генов полихеты имеют цитоплазматическую локализацию. Их функции и биогенез нам неизвестны, но, исходя из существующих примеров, можно предположить участие антисмысловых РНК в эпигенетической настройке работы Нох-кластера. Они могут участвовать в транскрипционной и трансляционной репрессии своих мишеней – белок-кодирующих РНК. Картины экспрессии *Nvi-antiHox5* и *Nvi-antiHox7* указывают на возможность контроля ими

смещающихся передних (в случае *Nvi-Hox7*) или задних (в случае *Nvi-Hox5*) границ экспрессии смысловых транскриптов.

Заключение

Жизненный цикл, включающий трохофору, нектохету и стадию постларвальной сегментации, широко распространен среди представителей типа Annelida, и, по-видимому, является анцестральным для этой группы животных (Giangrande and Gambi, 1998). В разных таксонах встречаются многочисленные случаи утраты какой-либо из этих стадий. Мы предполагаем, что этапы развития аннелид контролируются независимыми морфогенетическими программами. Какова роль Нох-генов в каждой из них?

Трохофора – первичная личинка. Такая личинка формируется в результате быстрого и детерминированного развития, при котором пространственная упорядоченность структур тела задается инвариантностью клеточных линий. Такое развитие не требует сложной генетической программы паттернирования пространства зародыша, так что формирование первичной личинки, как правило, Нох-независимый процесс. Возможны специфичные дифференцировки некоторых клеток с участием отдельных Нох-генов (Arena-Mena et al., 2000; Kulakova et al., 2007), но в регионализации переднезадней оси трохофоры *A. virens* Нох-кластер не задействован.

Коллинеарная экспрессия семи Нох-генов вдоль переднезадней оси обнаружена при метаморфозе трохофоры в сегментированную нектохету *Alitta virens*. Нектохета является вторичной личинкой. Общий план тела вторичных личинок (геометрия осей и основные системы органов) соответствует плану взрослого животного (Sly et al., 2003). На этом этапе задействованы сложные многоуровневые генетические программы регионализации тела. Одним из важнейших элементов этих программ является кластер Нох-генов, паттернирующий переднезаднюю ось. В ходе развития нектохеты различных аннелид (представителей Errantia *Alitta virens* и *Platynereis dumerillii*, представителя Sedentaria *Capitella teleta* и представителя Chaetopteridae *Chaetopterus sp.*) Нох-гены экспрессируются в соответствии с теми же правилами, что и Нох-гены других членистоногих и позвоночных – экспрессия коллинеарна, границы экспрессионных доменов соответствуют местам закладки упорядоченных по оси морфологических структур. Это дает основания предполагать, что и функция Нох-генов аннелид на этом этапе та же – регионализация и спецификация переднезадней оси тела (Kulakova et al., 2007; Irvine and Martindale, 2000; Frobius et al., 2009).

Постларвальная сегментация у многих аннелид, особенно у представителей группы Errantia, продолжается долгое время, практически всю жизнь. В этом случае позиция каждого сегмента относительно переднезадней оси постоянно меняется. В представленной работе мы описали картины экспрессии всех 11 Нох-генов *Alitta virens* (Nereididae, Errantia, Annelida) в ходе постларвального роста этого червя. Мы показали, что картины экспрессии большинства Нох-генов *A. virens* на этом этапе развития имеют вид геноспецифичных градиентов в эктодерме и брюшной нервной цепочке. Полученные результаты выявляют существенные отличия в характере экспрессии Нох-генов у ювенильного червя и нектохеты, и позволяют говорить о первичной гетерономности

ларвальных и постларвальных сегментов на уровне генетических программ развития. Мы предположили, что и функция Нох-генов на постларвальном этапе онтогенеза может быть иной, отличной от ларвальной. Мы считаем, что система перекрывающихся градиентов экспрессии Нох-генов у *A. virens* определяет и поддерживает позиционные значения каждого из многочисленных сегментов, как бы задает координаты точки на переднезадней оси, в которой сегмент находится на данном этапе развития животного.

Наличие отдельных морфогенетических программ, контролирующих каждый из трех этапов онтогенеза кольчатых червей, способных к частично независимой эволюции, может быть основой для создания морфологического разнообразия представителей этой группы. Сложный многоступенчатый онтогенез аннелид – прекрасный материал для изучения эволюции морфогенетических программ. Чем шире круг изучаемых объектов, тем точнее наши представления о путях эволюции, поэтому необходимо исследовать молекулярные механизмы развития (в частности, работу генов Нох-кластера) представителей различных групп Annelida.

Присутствие антисмысловых транскриптов Нох-генов может оказаться ключом к разгадке «ползущих» границ экспрессии Нох-генов у растущих червей. Это первые данные о наличии длинных антисмысловых РНК Нох-генов у представителя группы Lophotrochozoa. Мы, безусловно, планируем дальнейшее исследование антисмысловых транскриптов Нох-генов нерейдных аннелид.

Выводы

1. В период постларвального роста полихеты *A. virens* экспрессируются все гены Нох-кластера.
2. Передние границы доменов экспрессии Нох-генов у ювенильного червя коллинеарны предполагаемому порядку расположения генов в кластере.
3. Отсутствие чётких границ зон экспрессии Нох-генов в постларвальном теле коррелирует с отсутствием морфологически выраженных отделов тела.
4. Каждый из постларвальных сегментов, в отличие от ларвальных, в процессе онтогенеза экспрессирует полный набор Нох-генов, причём экспрессия в каждом конкретном сегменте возникает и угасает в специфическое для каждого гена время.
5. Постларвальная экспрессия Нох-генов *A. virens* отличается от ларвальной, что согласуется с теорией первичной гетерономии сегментов.
6. В постларвальный период развития *A. virens* транскрибируются антисмысловые последовательности некоторых Нох-генов, и эта экспрессия имеет возрастную динамику.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Бакаленко Н.И.**, Новикова Е.Л., Елисеева Е.В. и Андреева Т.Ф. Нох-гены в развитии и эволюции билатеральных животных. Вестник СПбГУ. 2004; 3:4, с. 116-121
2. Новикова Е.Л., **Бакаленко Н.И.**, Кулакова М.А, Елисеева Е.В., Костюченко Р.П., Андреева Т.Ф., Дондуа А.К. Нох-гены в ларвальном развитии nereид *Nereis virens* и *Platynereis dumerilii*. Вестник СПбГУ. 2004; 3:4, с. 109-115
3. Kulakova, M., **Bakalenko N.**, Novikova E., Cook C. E., Eliseeva E., Steinmetz P., Kostyuchenko R. P., Dondua A., Arendt D., Akam M., Andreeva T. Hox gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa). *Dev Genes Evol.* 2007; 217:39-54.
4. Корчагина Н. М., **Бакаленко Н. И.**, Кулакова М. А. Нох-кластер и эволюция морфогенозов. *Онтогенез*, 2010, т. 41, №5, 353-363.
5. **Бакаленко Н.И.**, Новикова Е.Л., Кулакова М.А. Регуляторная эволюция, Нох-гены и личинки билатеральных животных. «Известия РАН: серия биологическая». 2012; 2: 249-256.
6. **Bakalenko NI**, Novikova EL, Nesterenko AY and Kulakova MA. Hox gene expression during postlarval development of the polychaete *Alitta (Nereis) virens*. *EvoDevo.* 2013; 4:13
7. Novikova EL, **Bakalenko NI**, Nesterenko AY and Kulakova MA. Expression of Hox genes during regeneration of nereid polychaete *Alitta (Nereis) virens* (Annelida, Lophotrochozoa). *EvoDevo.* 2013: 4:14

Тезисы:

1. Е.Л. Новикова, М.А. Кулакова, **Н.И. Бакаленко**, Е.В. Елисеева, Т.Ф. Андреева. Экспрессия генов Нох-кластера в постларвальном развитии полихеты *Nereis virens* в норме и при регенерации. 2004, *Цитология*, 46, (10), стр. 931-932.
2. **Н.И. Бакаленко**, Т.Ф. Андреева. Анализ экспрессии гена *Nvi-hox6* в развитии полихеты *Nereis virens*. 2005, *Онтогенез*, т. 36, №5, стр. 370-371.
3. **Бакаленко Н. И.**, Кулакова М. А., Новикова Е. Л., Михайлова К. А., Нестеренко А. Ю., Андреева Т. Ф. Нох гены *Nereis virens*: генетический контроль становления переднезадней оси тела нектохеты и взрослого животного. VII научная сессия Морской Биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета. Тезисы докладов. 2007, стр. 92-93.
4. Korchagina N.M., **Bakalenko N.I.**, Novikova E.L., Kulakova M.A., Akam M.E., Andreeva T.F. Characteristics of Hox-genes expression in the postlarval development of *Nereis virens*. *Perspectives on the Evolution of Animal Form.* Budapest, Nov. 2008. Cambridge university press. Cambridge, 2008, p. 13
5. **Бакаленко Н. И.**, Кулакова М. А., Киселев А. М., Старунов В. В., Лаврова О. Б. Экспрессия гомеобохсодержащих генов *Nvi-Hox2*, *Nvi-Hox3* и *Nvi-Cad* в субтерминальной зоне роста полихеты *Nereis virens*. Сборник тезисов Международной научной конференции "Каспар Фридрих Вольф и современная биология развития", 2009, 30-31.

6. **Бакаленко Н.И.**, Новикова Е.Л. и Кулакова М.А. Экспрессия генов Hox кластера в постларвальном развитии и при регенерации *Alitta (Nereis) virens* и *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Всероссийская конференция «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии», ПИН РАН, 2011. Сборник тезисов, с.7-9.
7. Novikova Elena, **Bakalenko Nadezhda** and Kulakova Milana, Hox gene cluster in ontogenesis of *Alitta (Nereis) virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelidae, Polychaete), Symposium at the European Society for Evolutionary Biology (ESEB) meeting, 2011, Tuebingen, Germany. Abstract book, p 958.
8. Novikova E.L., **Bakalenko N.I.** and Kulakova M.A. Morphogenetic basis of polychaete body plan diversification. Progress In Understanding The Origins of Biodiversity", 2012, University of Jyväskylä, Finland. Материалы конференции, с. 5.
9. **Bakalenko Nadezda**, Novikova Elena, Kulakova Milana. Hox cluster in postlarval ontogenesis of nereid polychaetes. European Evo Devo Conference, Lisbon, 2012, Abstract book, p. 150
10. Novikova Elena, **Bakalenko Nadezhda**, Kulakova Milana. Expression dynamics of Hox cluster in regeneration of polychaete *Alitta (Nereis) virens* (Annelida, Lophotrochozoa). European Evo Devo Conference, Lisbon, 2012, Abstract book, p. 215
11. **Бакаленко Н.И.**, Новикова Е.Л., Кулакова М.А. Нох-гены и многоступенчатый онтогенез полихет. «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция», всероссийская конференция с международным участием, 2013 г, Тезисы докладов, с. 61.