

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 591

**УЧАСТИЕ MAP-КИНАЗНОГО СИГНАЛИНГА В СПЕЦИФИКАЦИИ  
КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ДОРСОВЕНТРАЛЬНОЙ ОСИ  
У ПРИМИТИВНОЙ ГАСТРОПОДЫ *TESTUDINALIA TESTUDINALIS*  
(*PATELLOGASTROPODA*, *MOLLUSCA*)**

© 2013 г. В. В. Козин, Р. А. Бабаханова, Р. П. Костюченко

Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9  
E-mail: kostyuch@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.11 г.  
Окончательный вариант получен 15.08.12 г.

Известно, что спецификация клеточных линий во время развития у Spiralia обеспечивается материнскими факторами. Однако недавние исследования продемонстрировали важность индуктивных процессов, существенным элементом которых служит клеточный сигналинг. Наши данные дают основания говорить о зависимой спецификации ряда клеточных линий на ранних стадиях развития моллюска *Testudinalia testudinalis* (*Testudinalia tessellata*, *Patellogastropoda*), в том числе, когда происходит определение клетки 3D, сопровождающееся изменением формы и установлением контактов с анимальными микромерами одним из макромеров третьего квартета. Именно в этот момент в бластомере-организаторе 3D была отмечена активация MAPK. При анализе влияния блокатора MAP-киназного пути U0126 на развитие *Testudinalia* нами было показано, что наибольший эффект ингибитора наблюдается при культивировании зародышей до шестого цикла дробления, при этом следует отметить, что имеется шкала корреляции выраженности дефектов и повышения концентрации. При длительном содержании объектов в растворе U0126 у значительной части личинок отмечено отсутствие функционирующего ретрактора, дезорганизация мышечной системы, ненормальное строение раковины (вплоть до полного отсутствия), паруса, ноги, мантийной складки. В то же время ни в одном из экспериментов не было получено полного нарушения спецификации дорсовентральной оси, приводящего к развитию личинки с четырехлучевой радиальной симметрией. Это говорит в пользу существования разных молекулярных механизмов определения вторичной оси тела среди животных группы Spiralia.

*Ключевые слова:* Spiralia, моллюски, клеточные линии, спецификация, цитодифференциация, оси зародыша, сигналинг, MAPK, эволюционный консерватизм.

DOI: 10.7868/S0475145013010035

Раскрытие механизмов детерминации клеточных линий и становления осевых отношений является актуальной задачей биологии развития. На примере представителей группы Spiralia, т.е. животных со спиральным типом развития (Аннелиды, Моллюски, Немертины и др.) исследования в этой области имеют более чем вековую историю. Однако сложность решения поставленных задач в немалой степени определяется многоуровневым взаимодействием в эмбриогенезе животных различных элементов генетических регуляторных сетей, управляющих как спецификацией определенного домена зародыша, так и клеточной пролиферацией, дифференциацией и морфогенезом.

Spiralia – группа типов животных, различающихся во взрослом состоянии строением тела. Молекулярный анализ, однако, в целом указывает на

близкородственные филогенетические отношения между представителями различных типов внутри этой группы (Peterson, Eernisse, 2001; Mallatt, Winchell, 2002; Nielsen, 2001, 2003; Baguna, Riutort, 2004). Кроме того, зародыши этих животных характеризуются высоким сходством развития, в частности дробление, гастрюляция и личиночный органогенез протекают в высшей степени сходно, вплоть до совпадения проспективного значения отдельных бластомеров (см. Иванова-Казас, 1995), а анализ клеточных линий обнаруживает потрясающий уровень консерватизма программ развития (Render, 1991, 1997; Dictus, Damen, 1997; Boyer et al., 1996, 1998; Maslakova et al., 2004; Henry, Martindale, 1998; Ackermann et al., 2005; Kostyuchenko, Dondua, 2006).

Характерной особенностью *Spiralia* является развитие с личинкой трохофорного типа, начальные этапы которого осуществляются путем так называемого спирального дробления. Получившиеся в ходе второго деления зиготы четыре клетки (позднее и совокупность потомков каждой из них) называют квадрантами (см. Иванова-Казас, 1975). Каждому квадранту принято давать буквенное обозначение *A*, *B*, *C* или *D*. Когда такие клетки одинаковы в размерах, дробление называют гомоквадрантным, если хотя бы одна из четырех клеток отличается по размеру – гетероквадрантным. В последнем случае, как правило, квадрант *D* является самым крупным. Он расположен на дорсальной стороне зародыша и во всех случаях спирального типа развития играет особую роль, являясь источником энтодермы и значительной части эктодермы тела животного. При эволюционно более древнем гомоквадрантном спиральном дроблении (Иванова-Казас, 1995) квадранты на ранних стадиях развития не отличаются друг от друга, пока не появятся признаки нарушения радиальной симметрии в пользу билатеральной путем изменения положения бластомеров и вычленения по морфологическим признакам квадранта *D*. До тех пор, пока квадранты неразличимы, макромеры принято обозначать буквой *Q* (или *M*), а микромеры – *q(m)*.

Изначально классическими экспериментами по изоляции или удалению бластомеров (Wilson, 1904a, b; Costello, 1945; Clement, 1952 и др.) было обосновано представление о том, что у *Spiralia* спецификация разнообразных клеточных линий во время развития личинки трохофоры обеспечивается материнскими факторами, которые синтезируются во время оогенеза. Как полагают, после оплодотворения эти детерминанты, иРНК и/или белки, в ходе оплазматической сегрегации попадают в строго определенные бластомеры и дают начало специализированным клеточным клонам, которые используются как при формировании органов личинки, так и на более поздних стадиях развития. Однако уже классические эксперименты позволяли сделать вывод и о вероятных регулятивных процессах.

Так, Вилсон (Wilson, 1904b) описывает серию экспериментов с ранними зародышами моллюска *Dentalium*, развитие которого происходит с образованием сначала в ходе первого, потом второго деления дробления особого временного выроста, так называемой полярной лопасти. Каждый раз эта лопасть соединена тонким цитоплазматическим мостиком с одним из образующихся бластомеров и в конечном итоге наследуется бластомером *D*. Согласно результатам опытов по разделению бластомеров (Wilson, 1904a, b), из четырех имеющихся квадрантов только *D* способен к образованию клеток, дающих начало энтодерме. Если полярную лопасть, удалить, то такие “прооперирован-

ные” зародыши не образуют мезодермальные плоскости. Исследование постгастрюляционных зародышей (т.е. личинок), у которых была удалена первая полярная лопасть, показало отсутствие у них зачатков большинства органов, образование которых прямо или косвенно связано с мезодермой: зачатков раковинной железы, ноги и собственно целома.

Клемент (Clement, 1952, 1956, 1967, 1986a, b), на другом виде моллюсков, *Ilyanassa obsoleta*, пришел к выводу, что удаление как первой полярной лопасти, так и квадранта *D* или макромера *D* до отделения клетки *2d* приводит к резкому подавлению морфогенеза: у таких зародышей не образуются сердце и кишечник, а также раковина, глаза, нога и статоцист. Результаты, полученные Клементом, позволяют говорить о роли материала полярной лопасти у *Ilyanassa* при 1) детерминации линии клеток целомической мезодермы и ее производных и 2) детерминации структур, развивающихся из других клеток, под влиянием индукции со стороны производных энтодермы.

Позже было показано, что развитие некоторых эктодермальных производных зародышей и личинок *Ilyanassa obsoleta* требует индуктивных взаимодействий между микромерами и макромером квадранта *D* уже на стадии восьми бластомеров (Sweet, 1998).

Удаление у *Ilyanassa* полярной лопасти или макромеральной линии *D* вплоть до стадии сразу после образования *3D*, приводит к формированию радиально-, а не билатерально-симметричной личинки, т.е. личинки, не обладающей дорсовентральной осью (Clement, 1952, 1962). В своих экспериментах Клемент (Clement, 1962) обнаружил, что макромер *3D* индуцирует микромеры в период между формированием третьего квартета микромеров и мезентобласта *4d*, на стадии 24–28 клеток, т.е. незадолго до деления *3D* на дочерние бластомеры *4D* и *4d*. Долгое время место начала индукции и молекулярная природа индуктивного сигнала оставались неизвестными.

Важно отметить, что факт взаимодействий между анимальными микромерами и макромером *3D* отмечен и для животных с гомоквадрантным делением дробления, когда морфологически не выражены процессы асимметричного наследования на самых ранних циклах дробления. Так, зародыши моллюска *Patella vulgata* до стадии третьего квартета макромеров обладают четырехлучевой радиальной симметрией без признаков дорсовентральной полярности. Однако, вскоре после образования этих макромеров, один из них вытягивается и приходит в контакт с анимальными микромерами. Такой вытянутый макромер становится *3D*, т.е. мезодермообразующим и маркирующим дорсальную сторону, естественно, что и сами зародыши, начиная с этого момента, и личинки имеют

выраженную дорсовентральную ось (van den Biggelaar, 1977). При этом показано, что для эффекта дорсализации и мезодермализации необходима взаимная индукция макромера *3D* и анимальных микромеров (van den Biggelaar, Guerrier, 1979; Damen, Dictus, 1994, 1996).

Исключительная роль макромера *3D*, как в случае гомо-, так и гетероквадрантного спирального развития, позволяет называть этот бластомер эмбриональным организатором, т.к. он индуцирует разные судьбы (клеточные линии) у контактирующих с ним клеток и необходим для организации нормальных осевых отношений зародыша и в последствие личинки (Lambert, Nagy, 2001; Gonzales et al., 2007a). Существенным элементом индуктивных процессов, которые наряду с автономной спецификацией играют важную роль в раннем развитии *Spiralia*, служит так называемый сигналинг, т.е. молекулярные механизмы передачи сигналов от одной клетки к геному другой. МАРК (от англ. *mitogen activated protein kinase*) — первый известный элемент такой сигнальной системы у *Spiralia* (Lambert, Nagy, 2001, 2003). Сигнальный путь МАРК-киназы ERK (от англ. *extracellular signal-related kinase*) состоит из каскада последовательно фосфорилирующих друг друга консервативных белков с киназным доменом, эффекторами которого являются системы клеточного цитоскелета, пролиферации и дифференцировки (Ferrell, 1996; Garington, Johnson, 1999; Schohl, Fagotto, 2002; Sakaguchi et al., 2004). Этот каскад дифференциально активируется у зародыша *Ilyanassa* именно на стадии, когда происходит взаимодействие между макромером *3D* и микромерами, и первоначально активную форму МАРК обнаруживают в этом бластомере, однако вскоре сигнал появляется и в микромерах, что, как полагают, говорит о распространении индукционных взаимодействий, исходящих от *3D*. И, действительно, ликвидация источника сигнала, макромера *3D*, предотвращает нормальную активацию МАРК в микромерах (Lambert, Nagy, 2001).

Последние данные, полученные на нескольких видах моллюсков и одном виде полихет говорят в пользу участия каскада МАРК-киназы ERK в событиях раннего развития, причем, если у моллюсков как с гетероквадрантным типом спирального дробления (*Ilyanassa obsoleta*), так и с гомоквадрантным (*Chaetopleura apiculata*, *Patella vulgata*, *Tectura scutum*, *Haliotis asinina*, *Lymnaea palustris*) (Lambert, Nagy, 2001, 2003; Koop et al., 2007; Henry, Perry, 2008), активность сигналинга с участием МАРК-киназы обнаруживает бластомер-индуктор *3D*, у полихеты *Hydroides hexagonus* МАРК-киназный путь впервые проявляется у прямого потомка бластомера *3D* — микромера *4d*, производные которого служат источником образования мезодермы личинки и будущего червя (Lambert, Nagy, 2003). С целью понимания эволюции механизмов

спецификации клеточных линий и осевых отношений в раннем развитии *Spiralia*, безусловно, важно выяснить, насколько универсальны подобные различия между моллюсками и аннелидами. Однако на настоящем этапе исследований не менее важно понять степень универсальности подобных механизмов в развитии моллюсков, прежде всего наиболее примитивных, таких как *Patellogastropoda*. Поскольку имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о заметных отличиях в масштабе вовлечения МАРК-киназного каскада у разных видов и возможной корреляции роли МАРК со степенью примитивности животного, первоочередной задачей представляется проверка этих предположений на большем числе объектов.

В ходе настоящего исследования нами описаны этапы раннего развития примитивного моллюска *Testudinalia testudinalis* (*T. tessellata*, *Patellogastropoda*, *Mollusca*), представителя наиболее древней группы гастропод (Bouchet, Rocroi, 2005; Nakano, Ozawa, 2007), и проведен анализ возможного участия МАРК-киназного пути сигналинга в процессах ранней спецификации клеточных линий и дорсовентральной оси у данного объекта. Активация МАРК была выявлена иммуоцитохимически в бластомере-организаторе *3D*. Применение специфического блокатора МАРКК вызвало существенные нарушения развития отдельных тканей и органов, если действие ингибитора приходилось на стадии до шестого клеточного цикла. На основе экспериментальных данных мы предполагаем, что МАРК каскад может многократно вовлекаться в процессы взаимодействия бластомеров на этапах раннего дробления. Вместе с тем, очевидно, что спецификация мезодермы и дорсовентральной оси у *Testudinalia* лишь отчасти увязана с МАРК-киназным сигналингом, и обеспечивается в отличие от эволюционно продвинутых форм моллюсков в большей степени за счет иных, пока неизвестных механизмов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал был собран на Морской биологической станции Санкт-Петербургского государственного университета в губе Чупа Белого моря. В конце июня — начале июля половозрелые особи *Testudinalia testudinalis* (*Testudinalia tessellata*, *Gastropoda*, *Mollusca*) были собраны во время отлива, все дальнейшие работы производились в лабораторных условиях, где животных помещали в чашки Петри большого размера отдельно. Полученные от разных самок яйца отмывали отдельно в двух сменах чистой морской воды, после чего производили искусственное осеменение. Для предотвращения полиспермии сперму разводили морской водой, контролируя концентрацию сперматозоидов под микроскопом. Через 10 мин после добавления спермы яйца отмывали однократно морской

водой. Культивирование проводили в профильтрованной морской воде при температуре 16°C в кристаллизаторах небольшого объема.

На ранних стадиях развития партии зародышей *Testudinalia* (по 200–300 объектов) помещали в раствор МЕК-ингибитора U0126 (“Promega”, США) с конечной концентрацией 10 либо 40 мМ. Каждая серия опытов, в которую брали материал от одной пары родителей, была проведена не менее двух раз. Эксперименты с использованием различной концентрации МЕК-ингибитора проводились по принципиально сходной схеме (рис. 5), где варианты опытов (i, I–IV) различались моментом начала инкубации и временем содержания в растворе ингибитора: (i) начиная с четырехклеточной стадии (1 ч 30 мин развития) – общей продолжительностью 4 ч 20 мин, (I) начиная со стадии 16-ти бластомеров (2 ч 50 мин развития) в течение 3 ч, (II) после отделения третьего квартета микромеров (3 ч 30 мин развития) – всего 2 ч 20 мин, (III) с 4 ч 10 мин развития (до деления макромеров третьего квартета) – всего 1 ч 40 мин, (IV) с 4 ч 50 мин развития (во время начала деления макромеров третьего квартета) – всего 1 ч. Так, время начала экспериментов (i) и (I) отличалось на 80 минут, а в экспериментах (I–IV), объекты помещали в ингибитор через каждые 40 минут и во всех случаях были отмыты несколько раз в чистой морской воде в 5 ч 50 мин развития (на стадии ранней гаструлы), после чего развивались без ингибитора до момента фиксации при достижении в контроле личиночных стадий велигера двух и трех дней развития. Так как маточный раствор МЕК-ингибитора U0126 был приготовлен на DMSO, в контроле к соответствующему опыту в культуру зародышей добавляли DMSO до получения той же концентрации, что и в опыте. Анализ показал, что указанная концентрация не оказывает видимого эффекта на развитие.

Нормальное развитие изучали как на живом, так и фиксированном материале. С целью решения вопроса о возможном существовании выраженных процессов ооплазматической сегрегации и для приготовления постоянных тотальных препаратов часть объектов фиксировали жидкостью Ценкера и выдерживали в галлоцианине (“Fluka”, Германия) 8 часов при комнатной температуре (Пирс, 1962; Kostyuchenko, Dondua, 2000). В остальных случаях фиксацию материала осуществляли в 4%-ном формалине на фосфатном буфере, хранение материала производили в 70° этаноле при –20°C. С целью точного определения стадии развития часть материала фиксировали на момент помещения партии зародышей в раствор МЕК-ингибитора. В дальнейшем такой материал анализировали стандартными методами микроскопии светлого поля и дифференциального интерференционного контраста (DIC), а также иммуноцитохимии, используя антитела против  $\alpha$ -ту-

булина (для выявления клеточных границ и ресничек) или актина (для окраски мышц) (“Sigma”, США) в качестве первичных, и противомышинные, конъюгированные с FITC (“Sigma”, США) – в качестве вторичных. Специфическую окраску на ДНК проводили с помощью красителя DAPI (“Sigma”, США). Кроме того, часть фиксированного материала этих контрольных партий подвергали обработке иммуноцитохимическими методами для выявления активности MAP-киназного каскада. В качестве первичных антител использовали anti-diphosphorylated ERK1/2 (4370 “Cell Signaling”, США) при разведении 1 : 200, в качестве вторичных – антитела, конъюгированные с Alexa 488 (“Invitrogen”, США).

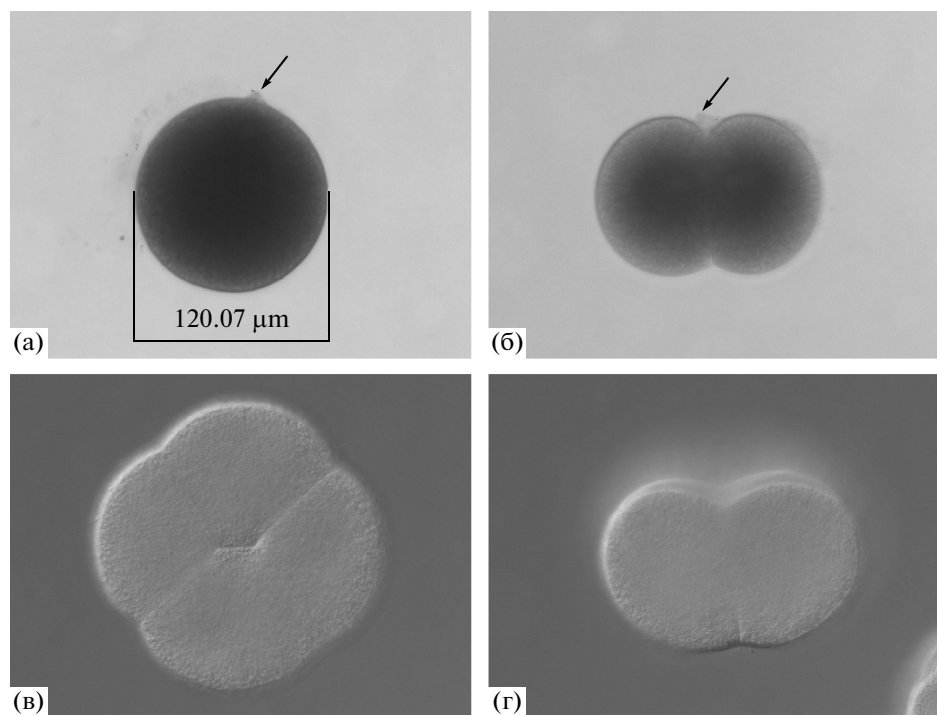
Материал анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SPE и флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1, оснащенного дифференциальным интерференционным контрастом (DIC), приставкой ApoTome, камерами AxioCam ICc3 и AxioCam MRm и программным обеспечением AxioVision 4.8 (“Carl Zeiss”, Германия). Морфометрические измерения производили, используя программу AxioVision 4.8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Нормальное развитие Testudinalia*

*T. testudinalis* имеет обычное для примитивных гастропод развитие с лецитотрофной пелагической личинкой и плавным эволютивным метаморфозом. Оплодотворение наружное, в месте сбора происходит в середине лета, когда литораль прогревается до 15–20°C. Самцы выметывают белые струи спермы, в присутствии которой самки выделяют светло-коричневые ооциты сферической формы. Размеры ооцитов после фиксации составляют 115–120 мкм в диаметре.

После слияния гамет и слабовыраженной кортикальной реакции начинается созревание ооцита: на анимальном полюсе последовательно образуются мелкие редуцированные тельца (рис. 1а). Как и у всех изученных Patellogastropoda, спиральное дробление имеет гомоквадрантный характер с различимыми по размерам микро- и макромерами. При этом признаков ооплазматической сегрегации, т.е. специфического распределения особых доменов цитоплазмы в отдельные бластомеры, как на морфологическом уровне, так и при окрашивании нуклеиновых кислот с помощью галлоцианина не наблюдается. В результате меридионального и равного деления зиготы формируются два несколько уплощенных не отличающихся друг от друга бластомера (рис. 1б). Второе деление также меридиональное и равномерное. Таким образом, при температуре +16°C через 1 ч 30 мин развития зародыш *T. testudinalis* состоит из четырех внешне одинаковых клеток-основательниц четырех эмбриональных квадрантов (рис. 1в, 1г; рис. 2а).



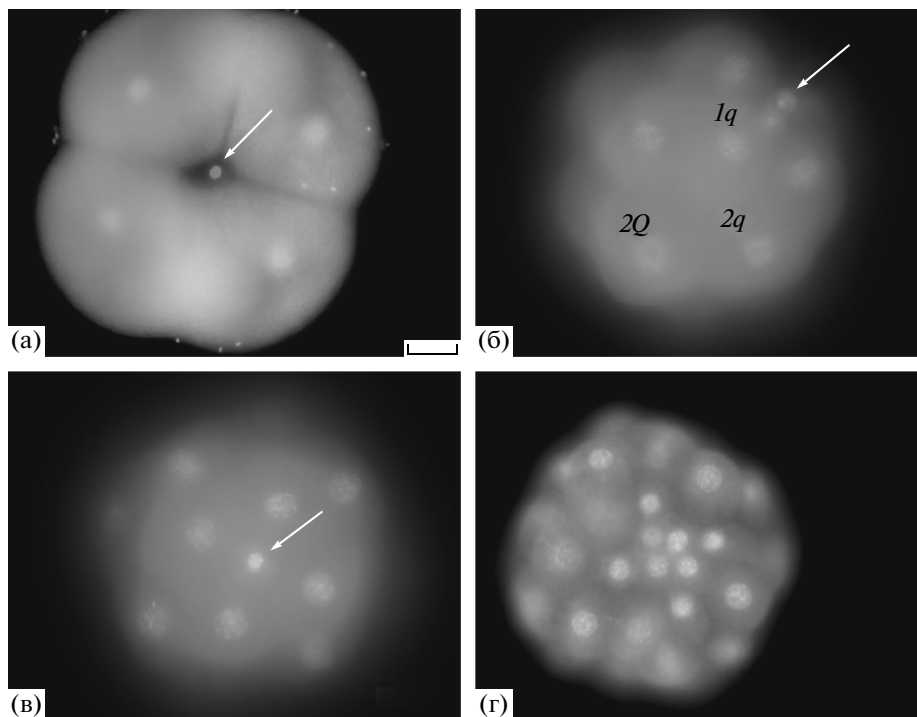
**Рис. 1.** Зародыши *Testudinalia testudinalis* на ранних стадиях развития. (а, б) — окраска галлоцианином, микроскопия светлого поля; (в, г) — неокрашенные препараты, микроскопия по методу дифференциального интерференционного контраста (DIC). (а) — зигота; (б) — 2 бластомера, латеральная проекция; (в, г) — на стадии четырех бластомеров зародыш имеет уплощенную форму: вид с вегетативного полюса (в) и (г) сбоку. Стрелкой обозначены полярные тельца на анимальном полюсе.

В ходе третьего клеточного цикла образуются четыре макромера (*IQ*) и четыре микромера первого квартета (*Iq*). Макромеры — несколько более крупные клетки, занимающие вегетативный полюс зародыша, микромеры, расположенные на анимальном полюсе, по размерам незначительно уступают макромерам.

Третье деление дробления является первым “спиральным” дроблением в ходе развития *Testudinalia*. Анализ расположения веретен говорит о том, что в результате закладки борозд дробления под небольшим углом к плоскости экватора первый квартет микромеров оказывается смещенным дексиготропно по отношению к соответствующим сестринским клеткам макромерам.

Борозды четвертого и нескольких последующих циклов спирального деления дробления также закладываются под небольшим углом к плоскости экватора. Однако в результате поворота осей веретен деления каждый раз примерно на  $90^\circ$  по отношению к осям веретен предыдущего цикла образующиеся анимальные бластомеры смещаются относительно соответствующих вегетативных сестринских клеток (с чередованием леотропного и дексиготропного смещения) (рис. 2б, 2в, 2г). При этом зародыш перестает быть уплощенным по анимально-вегетативной оси и приобретает сферическую форму.

Первые четыре деления дробления синхронны во всех четырех квадрантах и при  $16^\circ\text{C}$  проходят каждые 40 минут. Однако уже в ходе четвертого раунда наблюдается неодновременное деление клеток разных квартетов (рис. 2б, 2в). После отделения третьего квартета микромеров, при переходе к стадии 32-х бластомеров (3 ч 30 мин развития), продолжительность клеточных циклов увеличивается, а в делениях клеток разных квадрантов появляется асинхронность. Интересно отметить, что именно в этот момент (к 4 ч 10 мин развития) один из макромеров *3Q*, изменяя свою форму, вытягивается в полость слабо развитого бластоцеля и приходит в контакт с анимально расположенными микромерами (рис. 3а, 3б). Эта клетка, ее ядро и цитоплазма, особенно в месте контакта с анимальными микромерами, активно метится антителами против фосфорилированной формы ERK1/2 (рис. 3в, 3г). Именно этот бластомер становится макромером *3D*, маркирующим дорсальную сторону зародыша и дающим в ходе следующего деления мезентобласт *4d*. Активация MAPK в клетке *3D* продолжается около часа, при этом в зародышах после инкубирования с ингибитором U0126 сигнал активированной MAP киназы отсутствует (не показано). Достоверных данных об активности MAPK в иных бластомерах в ходе раннего дробления получить не удалось, хотя опыты со специфи-



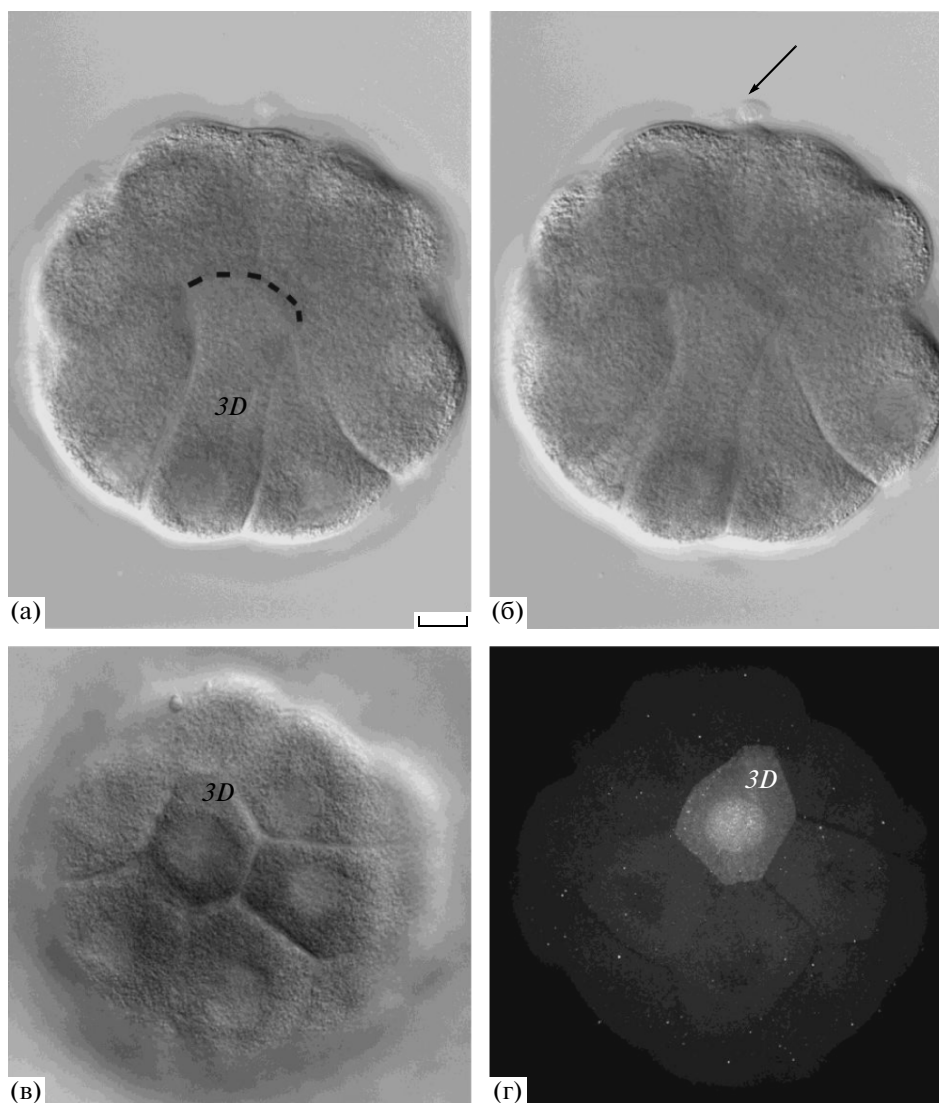
**Рис. 2.** Стадии дробления зародышей *Testudinalia*. Окраска тубулина иммуноцитохимическим методом с помощью антител против  $\alpha$ -тубулина, хромосомного материала DAPI, флуоресцентная микроскопия. (а) — 4 бластомера, вид с анимального полюса; (б, в) — стадия 12 бластомеров, латеральная проекция (б) и вид с анимального полюса (в), квадранты не различаются между собой, деления дробления идут синхронно в разных квадрантах, но не в квартетах бластомеров; (г) — переход к стадии 64 клеток, вид с анимального полюса. Стрелкой обозначены полярные тельца на анимальном полюсе. Масштаб 20 мкм.

ческим ингибитором U0126 указывают на возможность неоднократной активации каскада на стадиях дробления (см. ниже). Гастрюляция у *T. testudinalis* происходит путем плотного врастания и эпиболлии.

Эмбриогенез завершается формированием просто устроенной пелагической личинки трохофоры. Тело трохофоры опоясывает состоящий из ресничных клеток (трохобластов) прототрох. Следует отметить, что, несмотря на отсутствие массивных эмбриональных оболочек, изначально биение ресничек прототроха не приводит к активному движению зародышей. Лишь спустя некоторое время, к 7 ч развития объекты начинают вращаться, не отрываясь от субстрата, и только потом переходят к плаванию в толще воды. Прототрох делит тело личинки на анимально расположенную претрохальную область (эписферу) и посттрохальную область (гипосферу), занимающую вегетативное положение. В центре эписферы находится апикальный орган, увенчанный пучком длинных ресничек — т. н. апикальный (теменной) султанчик. В гипосфере на противоположном вегетативном полюсе расположен телотрох.

На вторые сутки развития трохофора превращается в велигера, у которого помимо ларвальных структур присутствуют и зачатки дефинитивных

органов. Прототрох трансформируется в парус (velum), который у *Testudinalia* не расчленен на лопасти и имеет примитивное строение (рис. 4). Претрохальный регион велигера уплощается, а апикальный султанчик вскоре исчезает. В посттрохальной области на дорсальной стороне развивается раковинная железа, которая начинает формировать личиночную раковину (протоконх). Раковина сначала имеет блюдцевидную форму, а затем с ростом внутренностного мешка становится более выпуклой и цилиндрической, оставаясь прозрачной примерно до полутора суток развития, когда начинается ее обызвествление (рис. 4). К дистальному концу протоконха крепится главный личиночный ретрактор. Этот мускул, ветви которого тянутся через все тело велигера к эписфере и основанию ноги (рис. 8а), по достижении кальцифицированной раковины ригидности, позволяет почти полностью втягивать парус в протоконх. Такая реакция происходит, если личинку потревожить, в частности, при манипуляциях, в связи с чем зафиксированные объекты выглядят компактно, и раковина полностью заполнена живой тканью. На вентральной стороне между раковинной и парусом развивается изначально парный зачаток ноги, на задне-спинной стороне снабженный крышечкой (operculum). На третий день развития, во



**Рис. 3.** Зародыши *Testudinalia* 4 ч 10 мин развития: после отделения третьего квартета микромеров один из макромеров вытягивается по направлению к анимальным blastomeres и приходит с ними в контакт, становясь blastomere 3D. (а, б) – один и тот же зародыш в разных оптических плоскостях, латеральная проекция; (в, г) – вид с вегетативного полюса. (а, б, в) – неокрашенные препараты, DIC; (г) – иммуноцитохимическое выявление активной MAP-киназы в макромере 3D, конфокальная микроскопия. Стрелкой обозначено полярное тельце на анимальном полюсе, пунктирной линией – граница макромера 3D и анимальных микромеров. Масштаб 20 мкм.

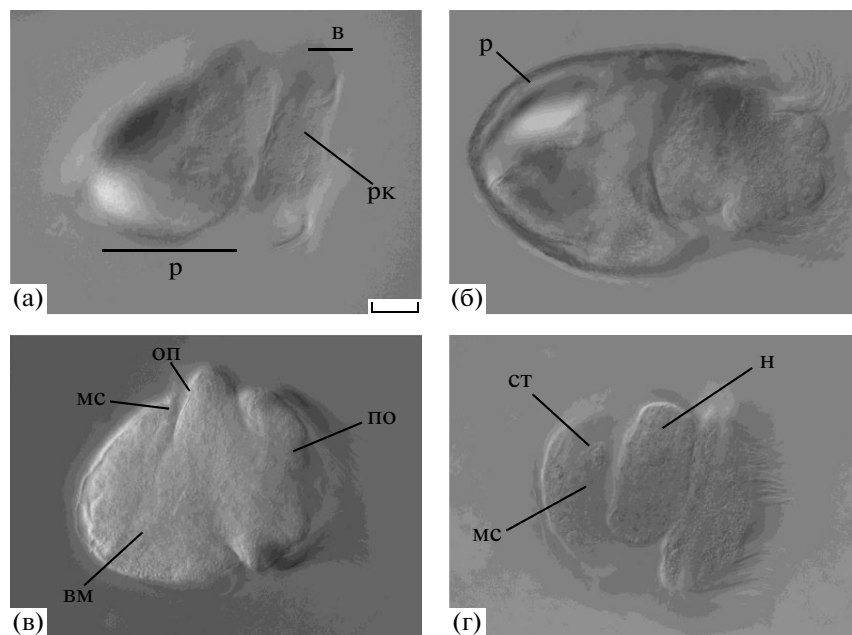
время метаморфоза в ювенильную форму, личинки претерпевают торсию. Достигнув 4–5-дневного возраста, велигеры оседают и ползают по субстрату с помощью ноги, хотя еще способны изредка плавать на небольшие расстояния, используя парус.

#### *Влияние MEK-ингибитора U0126 на развитие Testudinalia*

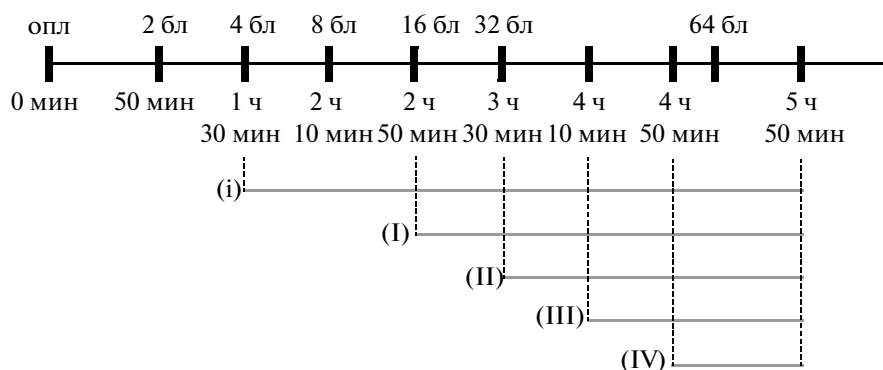
В ходе экспериментов зародышей *Testudinalia* на ранних стадиях развития выдерживали в растворе MEK-ингибитора U0126 в фильтрованной морской воде (конечная концентрация 10 или 40 μM). Объекты помещались в ингибитор соглас-

но схеме рис. 5. Во всех вариантах эксперимента материал отмывали от ингибитора на стадии ранней гаструлы (5 ч 50 мин после оплодотворения). Влияние ингибитора анализировали на живом и фиксированном материале, на стадиях, когда в контроле наблюдались велигеры, после двух и трех дней развития. Специфичность U0126 подтверждается отсутствием сигнала активированной MAP-киназы в клетке 3D после обработки этим ингибитором.

Прежде всего, следует отметить, что во всех экспериментах с использованием 40 μM U0126, за исключением (IV), наблюдалась явная задержка развития. Так, когда к 7 часам развития в контроле и



**Рис. 4.** Нормальное развитие *Testudinalia*. Личинка велигер, DIC. (а, б) – общий вид личинки 60 часов (а) и 73 часа развития (б), раковина перестает быть прозрачной из-за процесса обызвествления, на третий день развития происходит торсия; (в) – личинка 48 часов развития, раковина начинает терять свою прозрачность; (г) – личинка 42 часа развития, раковина хорошо развита, но еще прозрачная. Велум (в), раковина (р), ресничные клетки (рк), внутренностный мешок (вм), мантийная складка (мс), претрохальная область (по), оперкулум (оп), нога (н), статоцист (ст). Масштаб 20 мкм.

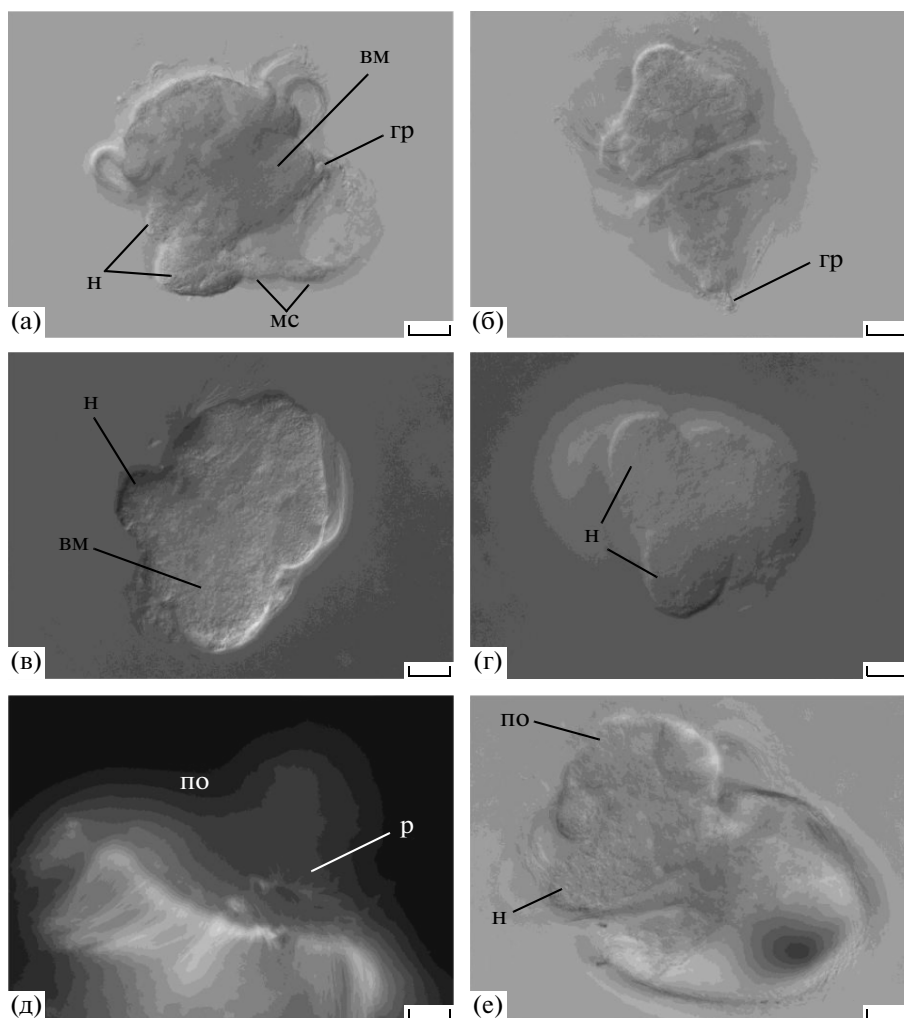


**Рис. 5.** Схема проведения эксперимента. Серыми линиями обозначены периоды содержания зародышей в растворе МЕК-ингибитора U0126.

№ (IV) уже были активно плавающие трохофоры, в экспериментах (I) и (II) объекты лежали на дне неподвижно, хотя и демонстрировали биение ресничек прототроха, а в случае (III), кроме того, были отмечены единичные вращающиеся у дна экземпляры. Рост и дифференцировка различных зачатков велигера также сильно отставали в экспериментальных культурах (I–III) по сравнению с контролем и № (IV). Кроме того, у обработанных U0126 объектов наблюдалась дезорганизация мышечной системы, и была в той или иной мере искажена реакция на раздражение: прекращалось биение ресничек, но не всегда парус втягивался в раковину. Детальная морфология личи-

нок была изучена после фиксации велигеров на стадии двух дней развития. У личинок в контроле (рис. 4в) к этому времени хорошо развитая, но еще прозрачная раковина начинала обызвествляться и была полностью заполнена живой тканью (внутренностный мешок, по крайней мере, часть ноги и велума). Тело компактизовано, на зачатке ноги присутствует крышечка (operculum), прижатая сзади мантийной складкой. Претрохальная область с расположенным в центре пучком длинных ресничек апикального султанчика уплощена. Антитела против актина хорошо выявляют на этой стадии главный и добавочный личиночный ретрактор (рис. 8а).





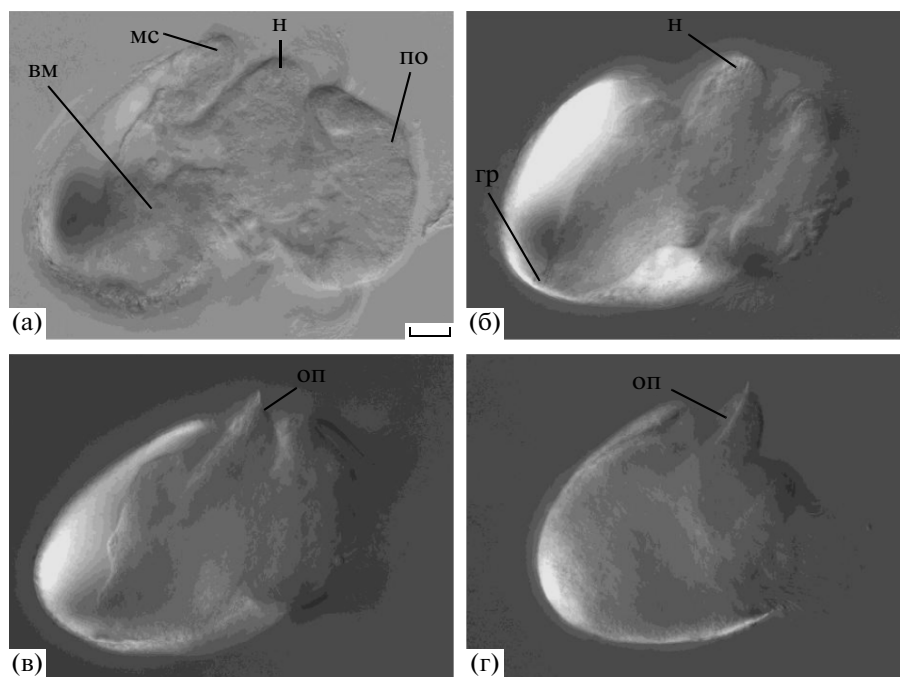
**Рис. 6.** Морфология двухдневных личинок *Testudinalia* после инкубации зародышей в МЕК-ингибиторе U0126 в экспериментах (i) и (I). (а, б, в, г, е) – микроскопия по методу DIC, (д) – окраска тубулина иммуноцитохимическим методом с помощью антител против  $\alpha$ -тубулина, флуоресцентная микроскопия. (а, б, в, д, е) – вид сбоку; (г) – вентральная проекция. (а, б) – результаты опыта по схеме (i), 10  $\mu$ M U0126; (в, г, д) – результаты эксперимента (I), 40  $\mu$ M U0126; (е) – результаты эксперимента (I), 10  $\mu$ M U0126. Материал внутренностного мешка (вм), материал мантийной складки (мс), нога (н), место прикрепления главного личиночного ретрактора (гр), претрохальная область (по), реснички на эписфере вне прототроха (р). Масштаб 20 мкм.

#### Морфология личинок в эксперименте (i)

Морфология двухдневных личинок, после длительного воздействия U0126 по схеме (i) даже в низкой концентрации 10  $\mu$ M, имеет отчетливо ненормальный характер (рис. 6а, 6б). Начавший обызвестляться недоразвитый протоконх не примыкает плотно к телу и деформирован. Для личинок характерна выпуклая претрохальная область и отсутствие длинных ресничек апикального органа. Зачаток ноги разделен терминально на две лопасти и лишен крышечки. Материал мантии не формирует складку и не примыкает к ноге и сильно недоразвитому внутренностному мешку. В большинстве случаев (80%,  $n = 20$ ) главный личиночный ретрактор прикреплен к раковине (рис. 6а, 6б).

#### Морфология личинок в эксперименте (I)

Двухдневные личинки, обработанные 40  $\mu$ M U0126 по схеме (I), имели явные аномалии строения, не отмеченные в экспериментах с меньшим временем экспозиции: раковина, велум, внутренностный мешок и зачаток ноги сильно недоразвиты: имеют ненормальное строение и меньше по размеру, чем в контроле (рис. 6в, 6г). Протоконх необызвествлен, имеет вид прозрачной пленочки или отсутствует вовсе. Претрохальная область выпуклая, конусовидная (рис. 6в). Клетки прототроха ненормальной формы (треугольные, призматические), лежат рыхло и не в один ряд, за пределами которого на эписфере встречаются отдельные оресниченные участки (рис. 6д). Зачаток ноги разделен терминально на две лопасти (рис. 6г) и ли-



**Рис. 7.** Морфология двухдневных личинок *Testudinalia* после инкубации зародышей в MEK-ингибиторе U0126 в экспериментах (II), (III), (IV), микроскопия по методу DIC, вид сбоку. (а) – результаты опыта по схеме (II), 10  $\mu\text{M}$  U0126; (б, в, г) – результаты экспериментов (II), (III) и (IV), соответственно, 40  $\mu\text{M}$  U0126. Материал внутренностного мешка (вм), мантийная складка (мс), нога (н), место прикрепления главного личиночного ретрактора (гр), претрехальная область (по), оперкулюм (оп). Масштаб 20  $\mu\text{m}$ .

шен крышечки. Мантийная складка не выражена. Дезорганизованный внутренностный мешок плотно примыкает к раковине, место крепления главного личиночного ретрактора удается идентифицировать с трудом, а мышечные волокна антителами против актина не выявляются.

При использовании концентрации 10  $\mu\text{M}$  в экспериментах по схеме (I), значительных дефектов развития не наблюдалось. Претрехальная область у личинок была выпуклая, раковина обезвестлена, деформирована в месте прикрепления ретрактора (рис. 6е). Морфология велигеров напоминала таковую в эксперименте (II). На третьи сутки развития, так же как и в контроле, личинки претерпевали торсию и внешне не отличались от интактных.

#### *Морфология велигеров в эксперименте (II)*

В эксперименте (II) с использованием 40  $\mu\text{M}$  U0126 двухдневные велигеры демонстрировали незначительные дефекты развития (рис. 7б). Раковина была кальцифицирована, иногда деформирована, варьирующего размера. Велюм втянут в протоконх лишь в 25% случаев ( $n = 30$ ), у остальных объектов претрехальная область выпуклая, трохобласты сильно вытянуты по анимально-вегета-

тивной оси, раковина примерно на 1/3 свободна от живой ткани. Место прикрепления главного личиночного ретрактора хорошо видно, хотя сам мускул заметно тоньше, чем в контроле и содержит меньшее количество волокон, а добавочный личиночный ретрактор отсутствует (рис. 8б). Такой паттерн нарушений свидетельствует о явной дезорганизации мышечной системы, хотя и не полной. В отдельных случаях (не более 10%) обнаружить оперкулюм не удалось, а зачаток ноги был слегка разделен терминально на две лопасти.

После обработки зародышей в течение 2 ч 20 мин после отделения третьего квартета микромеров 10  $\mu\text{M}$  раствором MEK-ингибитора велигеры имели сходную морфологию, как и в случае опытов по той же схеме, но с более высокой концентрацией U0126 (40  $\mu\text{M}$ ) (рис. 7а). На третьи сутки развития личинки претерпевали торсию и внешне не отличались от личинок в контроле.

#### *Морфология двухдневных велигеров в эксперименте (III)*

MEK-ингибитор U0126, даже в концентрации 40  $\mu\text{M}$ , при содержании в нем зародышей по схеме эксперимента (III) имел незначительное влияние на дальнейшее развитие *Testudinalia* (рис. 7в). В хо-

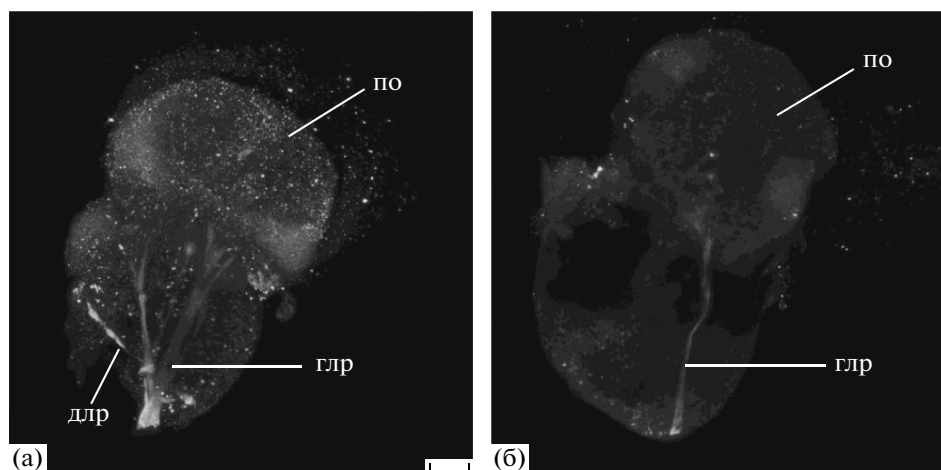


Рис. 8. Окрашивание антителами против актина мышечной системы двухдневных личинок *Testudinalia* в норме (а) и эксперименте (II), 40  $\mu$ M U0126 (б), вид сбоку, конфокальная микроскопия. Главный личиночный ретрактор (глр), добавочный личиночный ретрактор (длр), претрохальная область (по). Масштаб 20 мкм.

де этой серии опытов были получены личинки, похожие на таковые в партии (IV). Велигеры обладали кальцифицированной, но более прозрачной, чем в случае (IV) раковины. В большинстве случаев (60%,  $n = 30$ ) вельюм был втянут в раковину. У экземпляров с выставленным наружу вельюмом около 1/3 объема протоконха (вентральная часть) было свободно от живой ткани. Оперкулюм присутствовал у всех личинок.

#### Морфология двухдневных велигеров в эксперименте (IV)

Двухдневные велигеры после обработки 40  $\mu$ M U0126 по схеме эксперимента (IV) мало отличались от таковых в контроле и имели следующую морфологию: раковина обызвествлена, почти непрозрачна, нормального размера с присутствием некоторого полиморфизма по этой характеристике. У преобладающего большинства (87%,  $n = 30$ ) вельюм втянут в протоконх. Раковина почти полностью заполнена живой тканью у всех объектов. Во всех случаях обнаружена крышечка (operculum) (рис. 7г).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые описаны ранние этапы нормального развития *Testudinalia testudinalis*, относящейся к наиболее древней группе гастропод (Patellogastropoda) (Bouchet, Rocroi, 2005; Nakano, Ozawa, 2007) и предпринята попытка оценить участие MAP-киназного каскада в процессах спецификации клеточных линий и вторичной оси тела.

Развитие *T. testudinalis* проходит с типичным для Patellogastropoda гомоквадрантным дроблением, явно выраженной стадией перехода от четы-

рехлучевой симметрии к билатеральной через механизм изменения формы и положения в целом одного из макромеров третьего квартета и вычленения квадранта *D* с последующей сменой спирального дробления билатеральным делением клеток зародыша (см. Иванова-Казас, 1995). На самых ранних этапах дробления зародыши *Testudinalia* имеют уплощенную форму, но постепенно претерпевают компактизацию и становятся сферическими. Сам факт относительно свободного расположения blastomeres на стадиях 4–16 клеток и последующая гораздо более плотная укладка клеток в зародыше при переходе к 32-клеточной стадии позволяет предположить межклеточные индукционные взаимодействия уже на ранних этапах дробления. Важно также отметить, что в отличие от *Patella vulgata* (van den Biggelaar, 1977), наиболее изученного моллюска из группы Patellogastropoda, синхронность раннего дробления у *Testudinalia* относительная и наблюдается между квадрантами зародыша, но не между квартетами blastomeres.

Известно, что у ряда моллюсков макромер 3*D* выполняет функцию организатора (Clement, 1962; van den Biggelaar, Guerrier, 1979; Damen, Dictus, 1994, 1996; Lambert, Nagy, 2001, 2003). При этом процесс индукции у моллюсков, как правило, не однонаправленный. Так, и у примитивной *Patella* спецификация дорсовентральной оси и судьбы части клеточных линий происходит только при взаимодействии макромера 3*D* и анимальных микромеров (van den Biggelaar, Guerrier, 1979; Damen, Dictus, 1994, 1996), и у эволюционно продвинутой *Plyanassa* определение клеточной судьбы во многих клонах зависит от взаимодействия макромера линии *D* и анимальных микромеров на той же стадии (Lambert, Nagy, 2001). В то же время у моллюска *Crepidula fornicata* таким организатором выступает 4*d*, дочерняя клетка 3*D* (Henry et al., 2006), специ-

фикация которой в свою очередь зависит от индукции со стороны микромеров первого квартета на стадии 16–24 клеток макромера линии *D* (Henry, Perry, 2008).

Момент спецификации макромера *3D* у моллюсков совпадает с активацией MAPK сигнального пути, что было показано для целого ряда видов (*Ilyanassa obsoleta*, *Chaetopleura apiculata*, *Patella vulgata*, *Tectura scutum*, *Haliotis asinina*, *Lymnaea palustris*, *Crepidula fornicata*) (Lambert, Nagy, 2001, 2003; Lartillot et al., 2002a; Koop et al., 2007; Henry, Perry, 2008). Причем, если у зародыша *Ilyanassa* MAPK дифференциально активируется именно в клетке *3D*, когда происходит взаимодействие между макромером *3D* и микромерами, а затем передается дорсальным микромерам, непосредственно лежащим на макромере *3D*, и постепенно на микромеры, расположенные более вентрально (Lambert, Nagy, 2001), то у *Crepidula fornicata* активация MAPK происходит сначала в анимальных микромерах и необходима для запуска MAPK пути в *3D* (Henry, Perry, 2008). У более примитивных моллюсков активация этого каскада отмечена только в *3D* (Lartillot et al., 2002a; Lambert, Nagy, 2003). Подавление активности сигнального пути MAPK приводит к существенным нарушениям в развитии организмов, выраженных в разной степени как на органно-тканевом уровне, так и на уровне становления дорсовентральной оси, что позволило говорить о крайней необходимости MAPK для спецификации blastомера-организатора *3D/4d*.

С помощью антител против фосфорилированной формы ERK1/2 нам удалось отчетливо выявить активность MAP-киназы в раннем развитии *T. testudinalis* (рис. 3г). Сигнал активной MAPK был обнаружен примерно через полчаса после отделения третьего квартета микромеров в одном из макромеров и сохранился в этой клетке и после перехода к билатеральному паттерну дробления. Этот blastомер имел характерную вытянутую форму, занимал дорсальное положение и начинал делиться позже остальных макромеров, что дает основания определить его как клетку *3D* (рис. 3). Таким образом, избирательная активация каскада MAPK в презумптивном blastомере *3D* у примитивных гастропод *Patella*, *Tectura* и *Testudinalia* свидетельствует о возможности вовлечения этого сигналинга в механизм спецификации как самого *D* квадранта/клетки-организатора *3D*, так и индуцируемых им клеточных линий.

Результаты экспериментов с использованием ингибитора MAP-киназного пути U0126 говорят о существенной роли, которую данный сигналинг играет в определении судьбы различных клеточных линий. Так, длительная экспозиция (со стадии 4-х blastомеров до стадии ранней гастролы) в ингибиторе даже низкой концентрации (10  $\mu\text{M}$ ) приводила к значительным дефектам развития прак-

тически всех органов и частей тела (рис. 6а, 6б). Фактически столь же существенные нарушения морфогенезов и дифференцировок наблюдались при инкубации зародышей, начиная со стадии 16 blastомеров при высоких концентрациях ингибитора (40  $\mu\text{M}$ ) (рис. 6в, 6г, 6д), однако применение низких концентраций уже на этой стадии не имело таких катастрофических последствий (рис. 6е), а на более поздних эффект и вовсе был практически незаметным. Из полученных нами описательных и экспериментальных данных можно сделать вывод, что основные этапы спецификации с участием MAP-киназы у *Testudinalia* затрагивают период до шестого цикла дробления, в т.ч. стадии формирования и существования макромеров третьего квартета, т.е. когда морфологически оформляется blastомер *3D* (рис. 3). В то же время, результаты опытов с низкими концентрациями U0126 позволяют предположить, что процесс активации MAPK у *Testudinalia* вовлекается в индукционные взаимодействия между blastомерами несколько раз в ходе раннего дробления, в т.ч. и на стадии до 16 blastомеров. Об этом свидетельствуют и наши данные, полученные в ходе предварительных исследований, когда короткие (на время одного цикла деления дробления) экспозиции в растворе U0126 с концентрацией 10  $\mu\text{M}$  на стадиях 4–16 blastомеров приводили к незначительным нарушениям развития (Бабаханова и др., 2010). Важность ранней активации MAPK (в микромерах первого квартета еще до появления *3D*) была продемонстрирована и у *Crepidula fornicata* (Henry, Perry, 2008). При этом ряд ученых (например, Henry, Perry, 2008) отмечали сложность выявления активной формы MAPK ERK1/2 у моллюсков, предполагая, что антитела не могут выявлять низкую концентрацию активной MAPK *in situ*.

У всех Spiralia клетка *4d*, потомок *3D*, является источником энтомезодермы, которая у моллюсков дает целый набор мышц, включая систему личиночного ретрактора (у *Patella*, *Crepidula*, *Ilyanassa*), личиночное сердце и почку (Clement, 1986b; Dicitus, Damen, 1997; Render, 1997; Hejnlol et al., 2007). У *Haliotis asinina* (Vetigastropoda) в зачатке этой части мезодермы была обнаружена экспрессия генов-гомологов консервативных регуляторов развития мезодермы (*Mox*, *COE*) (Hinman, Degnan, 2002; Koop et al., 2007), которая существенно изменялась или исчезала вовсе после обработки зародышей на ранних стадиях дробления ингибитором U0126 (Koop et al., 2007).

Вторая часть мезодермы — эктомезодерма — происходит у разных моллюсков из различных микромеров второго и третьего кварталов (Hejnlol et al., 2007), и дает начало мышцам, в том числе и части личиночного ретрактора у *Patella* и *Crepidula*. В эктомезодерме с начала гастрюляции экспрессируются гомологи генов *fork head* и *gooseoid* (Lartillot et al., 2002b), а на более поздних стадиях —

добавок к ним — *twist* и *Mox* (Nederbragt et al., 2002; Koop et al., 2007). Было также установлено, что после инкубации эмбрионов в U0126 (даже с использованием низкой концентрации 10  $\mu$ M) экспрессия *Mox* полностью исчезала из клеток эктодермы (Koop et al., 2007). Естественно, что изменение экспрессии генов-спецификаторов мезодермы при воздействии МЕК-ингибитором сопровождалось нарушением развития мезодермальных производных.

По существующей модели (для постторсионного велигера) (Damen, Dictus, 2002) втягивание велаума и ноги в раковину осуществляется благодаря сокращению главного личиночного ретрактора и расслаблению добавочного ретрактора и поперечного мускула. В экспериментах с применением U0126 у разных гастропод на живом и фиксированном материале отмечали либо более или менее полную, либо частичную дезорганизацию системы личиночного ретрактора (Lambert, Nagy, 2001, 2003; Koop et al., 2007; Henry, Perry, 2008). По результатам наших исследований на *Testudinalia*, с увеличением времени и концентрации МЕК-ингибитора усиливалась и степень выраженности нарушений как в мышечной системе (в том числе и функционально — неспособность втягивать парус в раковину), так и в других мезодермальных производных внутренностного мешка. При воздействии на зародыши ингибитором U0126 на стадии перехода к 32 клеткам можно говорить скорее о частичной, но не полной дезорганизации системы личиночного ретрактора (рис. 8б). В то же время, следует отметить, что MAP-киназный каскад, очевидно, лишь отчасти управляет развитием мезодермы, в дополнение каким-то иным основным механизмам спецификации.

Другой важный аспект нашего исследования: ни в одном из экспериментов, проведенных на исследуемом виде моллюсков, не было получено полного нарушения спецификации дорсовентральной оси, приводящего к развитию личинки с четырехлучевой радиальной симметрией. При этом следует учесть, что выявленные нами аномалии в строении ресничного кольца, а именно формы и положения трохобластов, могут косвенно свидетельствовать об ограниченном участии MAP-киназного каскада в становлении дорсовентральной оси. Отсутствие эффекта радиализации личинок даже при очень высоких концентрациях U0126 было отмечено и для моллюска *Patella vulgata* (Lartillot et al., 2002a), в то время как для ряда других моллюсков, как правило, не относящихся к примитивным Patellostropoda, эффект нарушения спецификации дорсовентральной оси при блокировании активации MAPK был неоднократно показан. При этом важно иметь в виду, что, если для моллюсков *Ilyanassa* (Lambert, Nagy, 2001) и *Crepidula* (Henry, Perry, 2008) эффект радиализации личинок наблюдается даже при применении

низких концентраций блокатора U0126 (10  $\mu$ M), то для моллюсков *Tectura* (Lambert, Nagy, 2003) и *Haliotis* (Koop et al., 2007) такого рода нарушения обнаруживаются только при использовании очень высоких концентраций ингибитора (50  $\mu$ M). Интересно, что для полихет в экспериментах с неспецифическими блокаторами клеточного сигналинга была продемонстрирована зависимость спецификации дорсовентральной оси (Gonzales et al., 2007b), однако до сих пор нет данных, свидетельствующих об участии в этом процессе именно пути MAPK. Это говорит в пользу существования и других молекулярных механизмов определения вторичной оси тела среди животных группы Spiralia.

Таким образом, в ряду моллюсков от наиболее примитивных к более эволюционно продвинутым наблюдается усиление роли MAP-киназного каскада в развитии мезодермального зачатка и определения дорсовентральной оси. Однако, очевидно, что MAPK сигналинг работает в дополнение к каким-то более древним и фундаментальным механизмам спецификации клеточных линий и вторичной оси, как минимум у аннелид и моллюсков, но, вероятно, и у всех Spiralia.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 07-04-00201).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабаханова Р.А., Смирнова Н.П., Кондакова Е.А., Стрекаловский И.В., Костюченко Р.П. Влияние ингибитора активации MAPK U0126 на развитие моллюска *Testudinalia tessellata* // XI научная сессия Морской Биологической станции СПбГУ. Тезисы докладов. 2010. С. 56–57.
- Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосибирск: Наука, 1975. 372 с.
- Иванова-Казас О.М. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука, 1995. 565 с.
- Пирс Э. Гистохимия. М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. 962 с.
- Ackermann C., Dorresteyn A., Fischer A. Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida: Polychaeta) // J. Morphol. 2005. V. 266. P. 258–280.
- Baguna J., Riutort M. The dawn of bilaterian animals: the case of acoelomorph flatworms // Bioessays. 2004. V. 26. P. 1046–1057.
- Bouchet P., Rocroi J.-P. Classification and nomenclator of gastropod families // Malacologia. 2005. V. 47. P. 1–397.
- Boyer B.C., Henry J., Martindale M.Q. Dual origins of mesoderm in a basal member of the spiralian clade: cell lineage analyses in the polyclad turbellarian *Hoploplana inquilina* // Dev. Biol. 1996. V. 179. P. 329–338.
- Boyer B.C., Henry J., Martindale M.Q. The cell lineage of a polyclad turbellarian embryo reveals close similarity to coelomate spiralian // Dev. Biol. 1998. V. 204. P. 111–123.

- 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. V. 121. P. 593–626.
- Clement A.C.* Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. II. The development of isolated blastomeres // *J. Exp. Zool.* 1956. V. 132. P. 427–446.
- Clement A.C.* Development of *Ilyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages // *J. Exp. Zool.* 1962. V. 149. P. 193–216.
- Clement A.C.* The embryonic value of micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. I. The first quartet cells // *J. Exp. Zool.* 1967. V. 166. P. 77–88.
- Clement A.C.* The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. II. The second quartet cells // *Int. J. Invertebr. Repr. Develop.* 1986a. V. 9. P. 139–153.
- Clement A.C.* The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. III. The third quartet cells and the mesentoblast cell, *4d* // *Int. J. Invertebr. Repr. Develop.* 1986b. V. 9. P. 155–168.
- Costello D.P.* Experimental studies of germinal localization in *Nereis*. I. The development of isolated blastomeres // *J. Exp. Zool.* 1945. V. 100. P. 19–66.
- Damen P., Dictus W.J.A.G.* Cell lineage of the prototroch of *Patella vulgata* (Gastropoda, Mollusca) // *Dev. Biol.* 1994. V. 162. P. 364–383.
- Damen P., Dictus W.J.A.G.* Newly-discovered muscle in the larva of *Patella coerulea* (Mollusca, Gastropoda) suggests the presence of a larval extensor // *Contrib. Zool.* 2002. V. 71. P. 37–45.
- Damen P., Dictus W.J.A.G.* Spatial and temporal coincidence of induction processes and gap-junctional communication in *Patella vulgata* (Mollusca, Gastropoda) // *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1996. V. 205. P. 401–409.
- Dictus W.J.A.G., Damen P.* Cell-lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata* (Mollusca) // *Mech. Dev.* 1997. V. 62. P. 213–226.
- Ferrell J.E.* MAP kinases in mitogenesis and development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1996. V. 33. P. 1–60.
- Garrington T.P., Johnson G.L.* Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. V. 11. P. 211–218.
- Gonzales E.E., van der Zee M., Dictus W.J., van den Biggelaar J.* Brefeldin A or monensin inhibits the 3D organizer in gastropod, polyplacophoran, and scaphopod molluscs // *Dev. Genes Evol.* 2007a. V. 217. P. 105–118.
- Gonzales E.E., van der Zee M., Dictus W.J., van den Biggelaar J.* Brefeldin A and monensin inhibit the D quadrant organizer in the polychaete annelids *Arctonoe vittata* and *Serpula columbiana* // *Evol. Dev.* 2007b. V. 9. P. 416–431.
- Hejnol A., Martindale M.Q., Henry J.Q.* High-resolution fate map of the snail *Crepidula fornicata*: the origins of ciliary bands, nervous system and muscular elements // *Dev. Biol.* 2007. V. 305. P. 63–76.
- Henry J., Martindale M.Q.* Conservation of the spiralian developmental program: cell lineage of the nemertean, *Cerebratulus lacteus* // *Dev. Biol.* 1998. V. 201. P. 253–269.
- Henry J.J., Perry K.J.* MAPK activation and the specification of the D quadrant in the gastropod mollusc, *Crepidula fornicata* // *Dev. Biol.* 2008. V. 313. P. 181–195.
- Henry J.Q., Perry K.J., Martindale M.Q.* Cell specification and the role of the polar lobe in the gastropod mollusc *Crepidula fornicata* // *Dev. Biol.* 2006. V. 297. P. 295–307.
- Hinman V.F., Degnan B.M.* *Mox* homeobox expression in muscle lineage of the gastropod *Haliotis asinina*: evidence for a conserved role in bilaterian myogenesis // *Dev. Genes Evol.* 2002. V. 212. P. 141–144.
- 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. V. 311. P. 200–212.
- Kostyuchenko R.P., Dondua A.K.* Development of the prototroch in embryogenesis of *Nereis virens* (Polychaeta) // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2006. V. 37. № 2. P. 69–76.
- Kostyuchenko R.P., Dondua A.K.* Ooplasmic segregation and formation of embryonic morphological axes in the polychaete *Nereis virens* // *Russian Journal of Developmental Biology.* 2000. V. 31. № 2. P. 95–105.
- Lambert J.D., Nagy L.M.* MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusc *Ilyanassa obsoleta* // *Development.* 2001. V. 128. P. 45–56.
- Lambert J.D., Nagy L.M.* The MAPK cascade in equally cleaving spiralian embryos // *Dev. Biol.* 2003. V. 263. P. 231–241.
- Larillot 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.* 2002a. V. 129. P. 1411–1421.
- Larillot N., Le Gouar M., Adoutte A.* Expression patterns of *fork head* and *gooseoid* homologues in the mollusc *Patella vulgata* supports the ancestry of the anterior mesoderm across Bilateria // *Dev. Genes Evol.* 2002b. V. 212. P. 551–561.
- Mallat J., Winchell C.J.* Testing the new animal phylogeny: first use of combined large-subunit and small-subunit rRNA gene sequences to classify the protostomes // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 19. P. 289–301.
- Maslakova S., Martindale M.Q., Norenberg J.L.* Fundamental properties of spiralian cleavage program are displayed by the basal nemertean *Carinoma tremaphoros* (Palaeonemertea; Nemertea) // *Dev. Biol.* 2004. V. 267. P. 342–360.
- Nakano T., Ozawa T.* Worldwide phylogeography of limpets of the order Patellogastropoda: Molecular, morphological and palaeontological evidence // *J. of Molluscan Studies.* 2007. V. 73. P. 79–99.
- Nederbragt A.J., Lespinet O., van Wageningen S., van Loon A.E., Adoutte A., Dictus W.J.A.G.* A lophotrochozoan *twist* gene is expressed in the ectomesoderm of the gastropod mollusk *Patella vulgata* // *Evol. Dev.* 2002. V. 4. P. 334–343.
- Nielsen C.* Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla, 2nd edition. New York: Oxford Univ. Press, 2001. 563 pp.

- Nielsen C. Defining phyla: morphological and molecular clues to metazoan evolution // *Evol. Dev.* 2003. V. 5. P. 386–393.
- Peterson K.J., Eernisse D.J. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: interferences from morphology and 18S rDNA gene sequences // *Evol. Dev.* 2001. V. 3. P. 170–205.
- Render J.A. Fate maps of the first quartet micromeres in the gastropod *Ilyanassa obsoleta* // *Development.* 1991. V. 113. P. 495–501.
- Render J.A. Micromere fate maps in the gastropod *Ilyanassa obsoleta* // *Dev. Biol.* 1997. V. 189. P. 301–310.
- Sakaguchi A., Matsumoto K., Hisamoto N. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans* // *J. Biochem.* 2004. V. 136. P. 7–11.
- Schohl A., Fagotto F. Beta-catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development // *Development.* 2002. V. 129. P. 37–52.
- Sweet H.C. Specification of the first quartet micromeres in *Ilyanassa* involves inherited factors and position with respect to the inducing D macromere // *Development.* 1998. V. 125. P. 4033–4044.
- van den Biggelaar J.A.M. Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgata* // *J. Morphol.* 1977. V. 154. P. 157–186.
- van den Biggelaar J.A.M., Guerrier P. Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusk *Patella vulgata* // *Dev. Biol.* 1979. V. 68. P. 462–471.
- Wilson E.B. Experimental studies on germinal localization. I. The germ-regions in the egg of *Dentalium* // *J. Exp. Zool.* 1904a. V. 1. P. 1–72.
- Wilson E.B. Experimental studies on germinal localization. II. Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium* // *J. Exp. Zool.* 1904b. V. 1. P. 197–268.

## Functional Role for MAP Kinase Signaling in Cell Lineage and Dorso-Ventral Axis Specification in the Basal Gastropod *Testudinalia testudinalis* (Patellogastropoda, Mollusca)

V. V. Kozin, R. A. Babakhanova, and R. P. Kostyuchenko

*Department of Embryology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

*e-mail: kostyuch@mail.ru*

**Abstract**—In Spiralia, the specification of cell lines in the course of development is provided by maternal factors. However, recent studies demonstrated the importance of inductive processes whose significant element is cellular signaling. Our data allow us to speak of the dependent specification of a number of cell lines at the early stages of development of the mollusk *Testudinalia testudinalis* (*Testudinalia tessellate*, Patellogastropoda), including the period when the determination of the 3D cell takes place, which is accompanied by a change in the shape and establishing of contacts with animal micromeres by one of the macromeres of the third quartet. It is exactly at this moment that activation of MARK was registered in the 3D blastomere-organizer. An analysis of the influence of the U0126 blocker of the MAP-kinase way on the development of *Testudinalia* showed that the greatest effect of the inhibitor is observed during the cultivation of embryos until the sixth cycle of fragmentation. It should be noted that a scale of correlation of the degree of defects and increase in concentration exists. Absence of the functioning retractor, disorganization of the muscle system, and abnormal structure of the shell (to the extent of complete absence of the shell), as well as velum, foot, and mantle fold, were observed in a considerable part of larvae after a lengthy upkeep of the objects in the U0126 solution. At the same time, none of the experiments showed a complete disruption of the specification of the dorsoventral axis, which produces a larva with a four-ray radial symmetry. This attests in favor of the existence of various molecular mechanisms of determination of the secondary body axis among the animals from the group Spiralia.v

**Keywords:** Spiralia, mollusks, cell lines, specification, cytodifferentiation, embryo axes, signaling, MARK, evolutionary conservatism.