

Статья посвящена 120-летию  
со дня рождения выдающегося российского генетика,  
академика Бориса Львовича Астаурова

## СВИДЕТЕЛЬСТВА РАННЕЙ АКТИВАЦИИ ЗИГОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА В РАЗВИТИИ АННЕЛИДЫ *OPHELIA LIMACINA*

© 2025 г. М. Г. Гринберг, И. Е. Борисенко, В. В. Козин\*

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург,  
199034 Россия

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

Поступила в редакцию 31.01.2025 г.

После доработки 27.02.2025 г.

Принято к публикации 03.03.2025 г.

Ключевым событием раннего эмбрионального развития является активация зиготической экспрессии генов. Механизмы данного процесса хорошо изучены всего у нескольких модельных объектов, которые не отражают всего разнообразия типов развития и способов определения клеточной судьбы. Среди билатерально-симметричных животных практически неисследованными в отношении активации генома остаются представители клады Spiralia, демонстрирующие феноменальный консерватизм и детерминативность клеточных линий. В данной работе с помощью транскриптомного анализа изучена активация зиготического генома у беломорской аннелиды с гомоквадрантным спиральным дроблением *Ophelia limacina*. Показано, что зиготическая транскрипция начинается уже на стадии 8 бластомеров и приводит к повышению уровня экспрессии тысяч генов, в том числе компонентов сигнальных путей Wnt и TGF- $\beta$ , а также транскрипционных факторов, включая Sox2 — консервативного регулятора плюрипотентности и активации генома у позвоночных. Полученные данные расширяют представления о вариативности молекулярных механизмов активации зиготического генома и вновь поднимают вопрос о возможном эволюционном консерватизме участников данного процесса.

**Ключевые слова:** зиготическая активация генома (ZGA), maternal to zygotic transition (MZT), Sox2,  $\beta$ -катенин, спиральное дробление, зависимая спецификация, аннелиды, Spiralia, транскриптомный анализ

DOI: 10.31857/S0475145025010028, EDN: KVFILB

### ВВЕДЕНИЕ

Раннее развитие животных находится под контролем материнских РНК и белков, которые наследуются вместе с цитоплазмой ооцита. Материнские факторы направляют начальные этапы эмбриогенеза, однако управление процессами развития на более поздних стадиях переходит под контроль генома зародыша и de novo синтезируемых регуляторных молекул (Vastenhouw et al., 2019; Onichtchouk and Driever, 2016). Этот переход часто сопровождается замедлением клеточных циклов и началом асинхронных делений клеток, что называется переходом средней бластулы (mid-blastula transition, MBT) (O'Farrell et al., 2004).

Переход контроля над эмбриогенезом от материнских факторов к зиготическим, maternal-to-zygotic transition (MZT), представляет собой скоординированную серию молекулярных событий: деградацию материнских транскриптов и активацию генома зародыша (Vastenhouw et al., 2019; Tadros and Lipshitz, 2009). На первом этапе происходит уничтожение материнских РНК, которое осуществляется за счет активности микроРНК (например, *lin-41* у *Caenorhabditis elegans* и *miR-430* у *Danio rerio*) (Lee et al., 2014). Параллельно с этим начинают происходить эпигенетические модификации, которые увеличивают доступность хроматина и создают условия для запуска транскрипции. Ключевым этапом MZT является активация зиготического

генома (Zygotic Genome Activation, ZGA) — процесс, при котором начинается экспрессия собственных генов. Первые волны транскрипции при этом приводят к преимущественной экспрессии генов транскрипционных факторов, участвующих в определении клеточных судеб и разметке зародыша, а также генов, кодирующих компоненты межклеточного сигналинга (Tadros and Lipshitz, 2009). Исследования на модельных объектах показали, что в процессах активации генома важную роль играют пионерные транскрипционные факторы, такие как Pou5f3, Nanog и белки семейства SoxB1 (такие как Sox2 и Sox19b) у позвоночных, а также Zelda у *Drosophila melanogaster*. Данные факторы могут связывать закрытый хроматин и способствовать повышению его доступности для других транскрипционных факторов, а также иницируют транскрипцию первых зиготических генов (Onichtchouk and Driever, 2016; Barral and Zaret, 2024).

Механизмы MZT были глубоко изучены на ограниченном количестве классических модельных организмов. Тем не менее эта небольшая выборка продемонстрировала значительное разнообразие в динамике перехода к зиготической экспрессии генов. Различия между животными в основном включают разные временные рамки MZT, а также наличие или отсутствие выраженного изменения характера клеточных делений, как это наблюдается при переходе средней бластулы у ряда позвоночных (Tadros and Lipshitz, 2009; Lee et al., 2014; Vastenhouw et al., 2019).

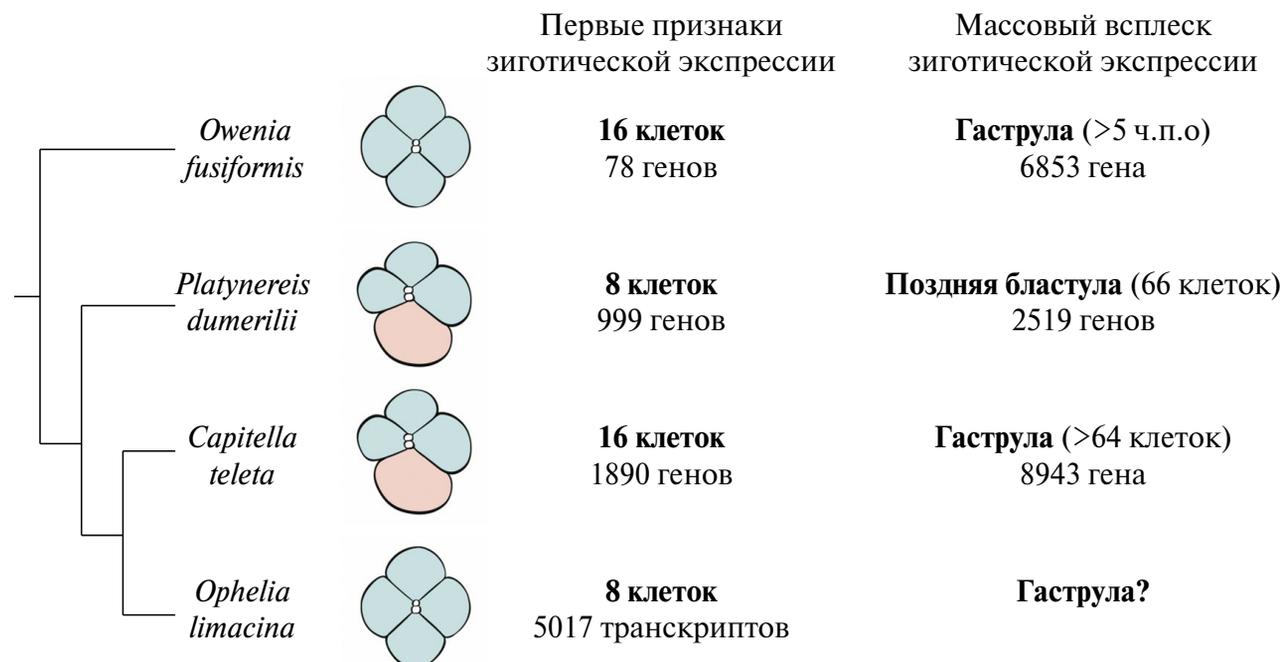
Группа Spiralia, включающая порядка половины типов современных билатеральных животных, остается наименее изученной в данном контексте. Особый интерес вызывает стереотипное эмбриональное развитие представителей этой группы, характеризующееся ранним определением клеточных судеб (Henry, 2014). Этот процесс традиционно связывается с неравномерным распределением материнских детерминант, а не с межклеточной коммуникацией, для которой требуется активация генома зародыша. Эксперименты по ингибированию транскрипции актиномицином Д и радиационному подавлению ядерных функций обосновали мнение, что у животных с детерминативным (мозаичным) развитием (полихеты, моллюски, асцидии) зиготический контроль морфогенетических событий начинается только на постгастрюляционных стадиях (Дондуа, 1979). Однако современные транскриптомные данные, полученные

на эррантной аннелиде с гетероквадрантным спиральным дроблением *Platynereis dumerilii*, показывают, что основной переход к зиготической экспрессии происходит к началу гастрюляции после завершения программы спирального дробления и определения множества клеточных судеб (Chou et al., 2016). Однако в том же исследовании было показано, что уже на стадии 8 клеток (рис. 1) начинается экспрессия небольшого числа генов, включая ряд регуляторов развития: *hes-like1*, *bmp2/4*, *fzd5/8* и *nodal*. Кроме того, недавняя работа Лианг и соавторов (Liang et al., 2024) продемонстрировала, что ZGA у базальной аннелиды с гомоквадрантным дроблением *Owenia fusiformis* и седентарной аннелиды с гетероквадрантным дроблением *Capitella teleta* происходит на стадии 16 клеток (рис. 1). Эти ранние волны экспрессии включают ряд регуляторных генов, таких как *FoxQ2*, а также компоненты сигнальных путей TGF- $\beta$  и Wnt в случае *C. teleta*. Важно отметить, что исследованную выборку аннелид сложно назвать репрезентативной: для *Platynereis* и *Capitella* характерно наличие эволюционно продвинутых признаков, таких как лецитотрофия и гетероквадрантность, подразумевающая ускоренную и автономную спецификацию клеточных линий; для *Owenia* описаны такие анцестральные черты, как гомоквадрантное дробление с ярко выраженной зависимой спецификацией клеток, однако ее базальное филогенетическое положение и сильно дивергировавшая планктотрофная личинка митрария (Carrillo-Baltodano et al., 2021) не позволяют уверенно экстраполировать особенности ее развития на остальных аннелид. Для выявления общих закономерностей ZGA у аннелид и Spiralia в целом представляется необходимым расширить выборку, включив в исследование представителей кроновой радиации аннелид (Pleistannelida) с гомоквадрантным планктотрофным развитием.

В нашей работе с помощью методов транскриптомики мы проанализировали экспрессию генов у неоплодотворенной яйцеклетки и стадии 8 бластомеров беломорской седентарной аннелиды *Ophelia limacina*, для которой характерно гомоквадрантное спиральное дробление и типичная планктотрофная личинка трохофора (Nikishin et al., 2019).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В данной работе был проанализирован локальный ресурс — референсный транскриптом



**Рис. 1.** Филогенетическое положение аннелид, исследованных на предмет активации зиготического генома методами транскриптомики. В столбцах указан: 1) тип спирального дробления (изображение зародыша с одноцветной заливкой — гомоквадрантное дробление, изображение с двухцветной заливкой — гетероквадрантное); 2) стадия развития с первыми признаками ZGA и количество статистически значимо ир-регулируемых генов (транскриптов); 3) стадия эмбриогенеза, на которой выявлено наибольшее количество ир-регулируемых генов (ч.п.о. — часы после оплодотворения).

*O. limacina*. Сборка проводилась на основе парно-концевых прочтений длиной 150 п.н., полученных по технологии Illumina с помощью *rnaSPAdes* (v.3.15.5) со стандартными параметрами. Контиги, похожие более чем на 95% (обе цепи), были кластеризованы с помощью CD-HIT-est (v.4.8.1). Химерные контиги и контиги с низким покрытием прочтениями были отфильтрованы с помощью Transrate (v.1.0.3). Среди оставшихся контигов были найдены потенциальные белок-кодирующие последовательности с помощью Transdecoder (v.5.7.1) с использованием баз данных Pfam и Uniref90. Аннотация обнаруженных транскриптов выполнялась с использованием онлайн-сервиса *eggNOG-mapper* (v.2).

Для анализа применялись библиотеки парно-концевых прочтений тотальной РНК, полученные на стадиях неоплодотворенной яйцеклетки и 8 бластомеров (7 часов после оплодотворения при +12°C), по три биологические повторности на каждую стадию. Очистка прочтений от адаптерных последовательностей проводилась с помощью *FastP* (v.0.23.2) со стан-

дартными параметрами, а деконтаминация осуществлялась с использованием *Kraken2* (v.2.1.3) с применением базы данных PlusPF (2022-06-07). Картирование прочтений на транскриптом выполнялось с помощью *Salmon* (v.1.10.2). Анализ дифференциальной экспрессии проводился в *DESeq2* (v.1.44.0), при этом дифференциально экспрессируемые транскрипты определялись по следующим пороговым значениям:  $|\text{Log Fold Change}| \geq 1.5$ ;  $p\text{-value} < 0.05$ . Анализ обогащения терминами генной онтологии (GO) выполнялся в *topGO* (v.2.56.0), при этом в анализ включались только термины, связанные минимум с 25 генами. Кластеризация GO-терминов по семантической схожести проводилась с использованием *rrvgo* (v.1.16.0). Визуализация данных осуществлялась в *ggplot2* (v.3.5.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

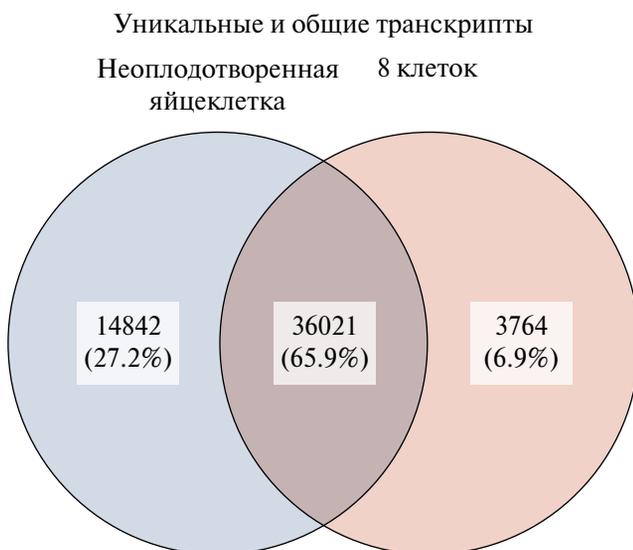
В первую очередь нами была проведена качественная оценка разнообразия РНК на стадиях неоплодотворенной яйцеклетки и 8 клеток. Из 67 065 последовательностей транскриптома *O. limacina* 54 627 транскриптов присутствуют

(> 1 TPM во всех повторностях) на обеих исследуемых стадиях развития. При этом для яйца характерно как большее число транскриптов (50 863), так и большее количество уникальных последовательностей (27.2% от общего набора), по сравнению с 8-клеточным зародышем (39 785 последовательностей, 6.9% уникальных). Важно отметить, что наличие уникальных транскриптов на стадии 8 клеток является косвенным свидетельством начала зиготической транскрипции, поскольку они не могут быть унаследованы от материнского запаса РНК (рис. 2).

Для того чтобы детальнее описать различия между стадиями, нами был проведен анализ дифференциальной экспрессии (рис. 3). Было выявлено 5017 транскриптов, которые статистически значимо повысили свою экспрессию на стадии 8 клеток по сравнению с яйцом. В то же время 10 160 транскриптов понизили свой уровень экспрессии к данной стадии. Мы интерпретируем это как начало экспрессии генов зародыша и деградирующие материнские транскрипты соответственно. Примечательно, что активация зиготического генома носит массовый характер, поскольку up-регуляции подвергаются несколько тысяч транскриптов, что значительно превышает показатели, зарегистрированные у других исследованных аннелид в начале зиготической транскрипции. При этом у *O. fusiformis* и *C. teleta*, для которых показана более поздняя активация зиготического гено-

ма — на стадии 16 клеток — деградация материнских транскриптов в основном приурочена к переходу от 8 к 16 бластомерам. Наблюдаемые различия во времени массовой активации зиготической экспрессии между *O. limacina* и другими исследованными аннелидами могут иметь объективный характер, связанный с известной пластичностью механизмов ZGA (Heun et al., 2014). К примеру, у млекопитающих этот момент может быть приурочен к стадиям от 2 до 16 бластомеров. Однако не стоит исключать и возможные технические причины различий, в т.ч. синхронность развития разных видов и фазу клеточного цикла, на которой фиксировали зародышей.

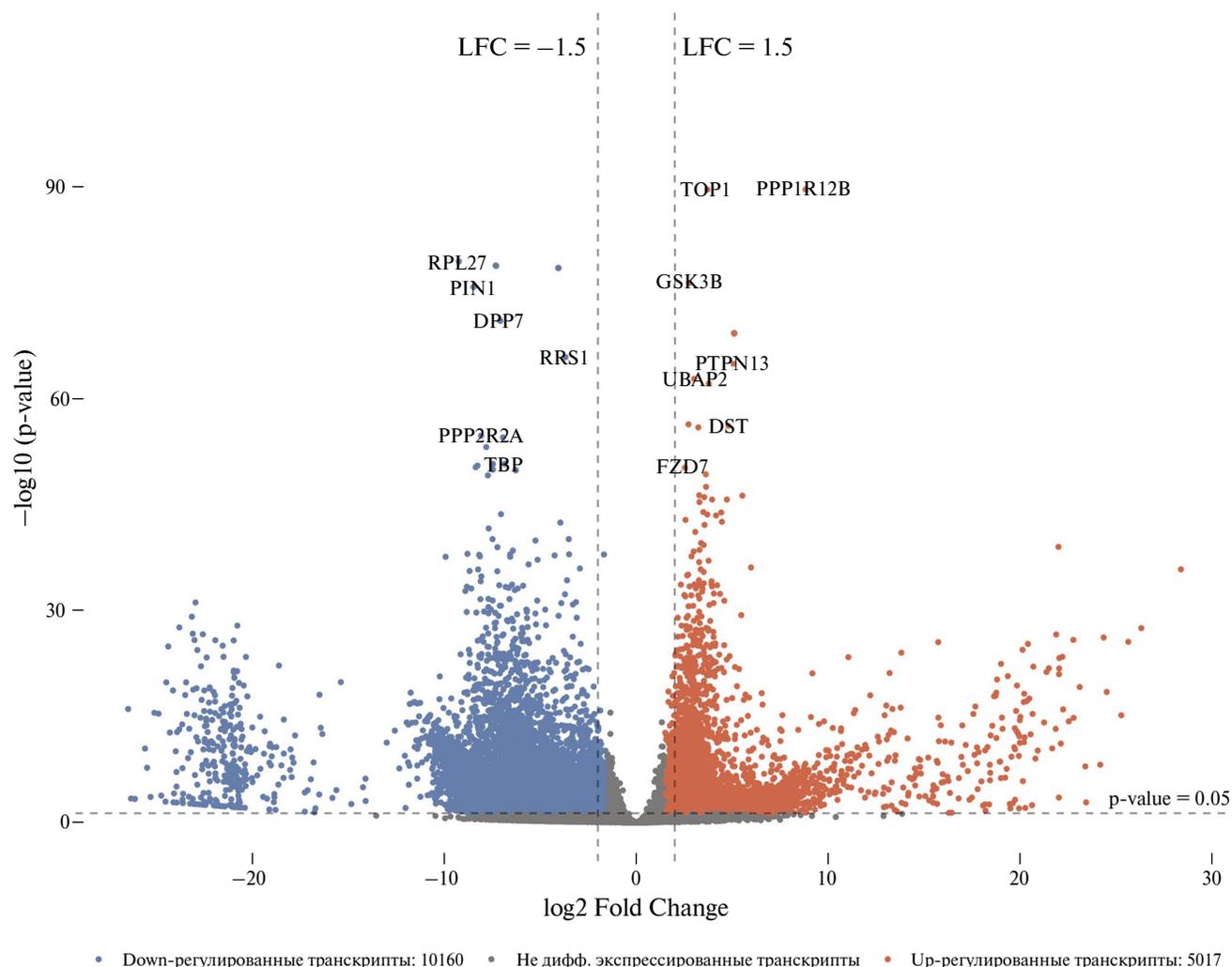
Анализ обогащения терминами GO в категории “Biological process” для up-регулируемых транскриптов показал наибольшее обогащение терминов, связанных с определением клеточной судьбы и организацией клеточных отростков (рис. 4а). В то же время для down-регулируемых транскриптов наиболее обогащенными оказались термины, связанные с транспортом мембранных пузырьков и убиквитинированием белков (рис. 4б), что можно связать с процессами созревания ооцита после оплодотворения и кортикальной реакцией. Соответствующие внутриклеточные компоненты приурочены к самым ранним этапам развития и, по-видимому, подвергаются массовой элиминации с началом дробления зародыша.



**Рис. 2.** Диаграмма Венна, отражающая количество уникальных и общих транскриптов (с уровнем экспрессии > 1 TPM во всех повторностях) для неоплодотворенной яйцеклетки и 8-клеточного зародыша.

Для более детальной оценки функций транскриптов, экспрессирующихся в результате зиготической активации генома, была проведена кластеризация GO-терминов на основе их семантической схожести (рис. 5). В результате были выявлены термины, связанные с транскрипцией, процессингом мРНК, активностью микроРНК, модификациями хроматина и регуляцией экспрессии генов, что соответствует известным молекулярным процессам, сопровождающим активацию зиготического генома би-латерий (Vastenhouw et al., 2019).

Среди up-регулируемых транскриптов, идентифицированных по доменам PFAM, были обнаружены транскрипционные факторы (рис. 6), включая гомолог пионерного транскрипционного фактора Sox2, транскрипты генов, участвующих в определении клеточных судеб, включая FoxQ2, факторы Gata, Hes, а также ряд гомеобокс-содержащих транскрипционных

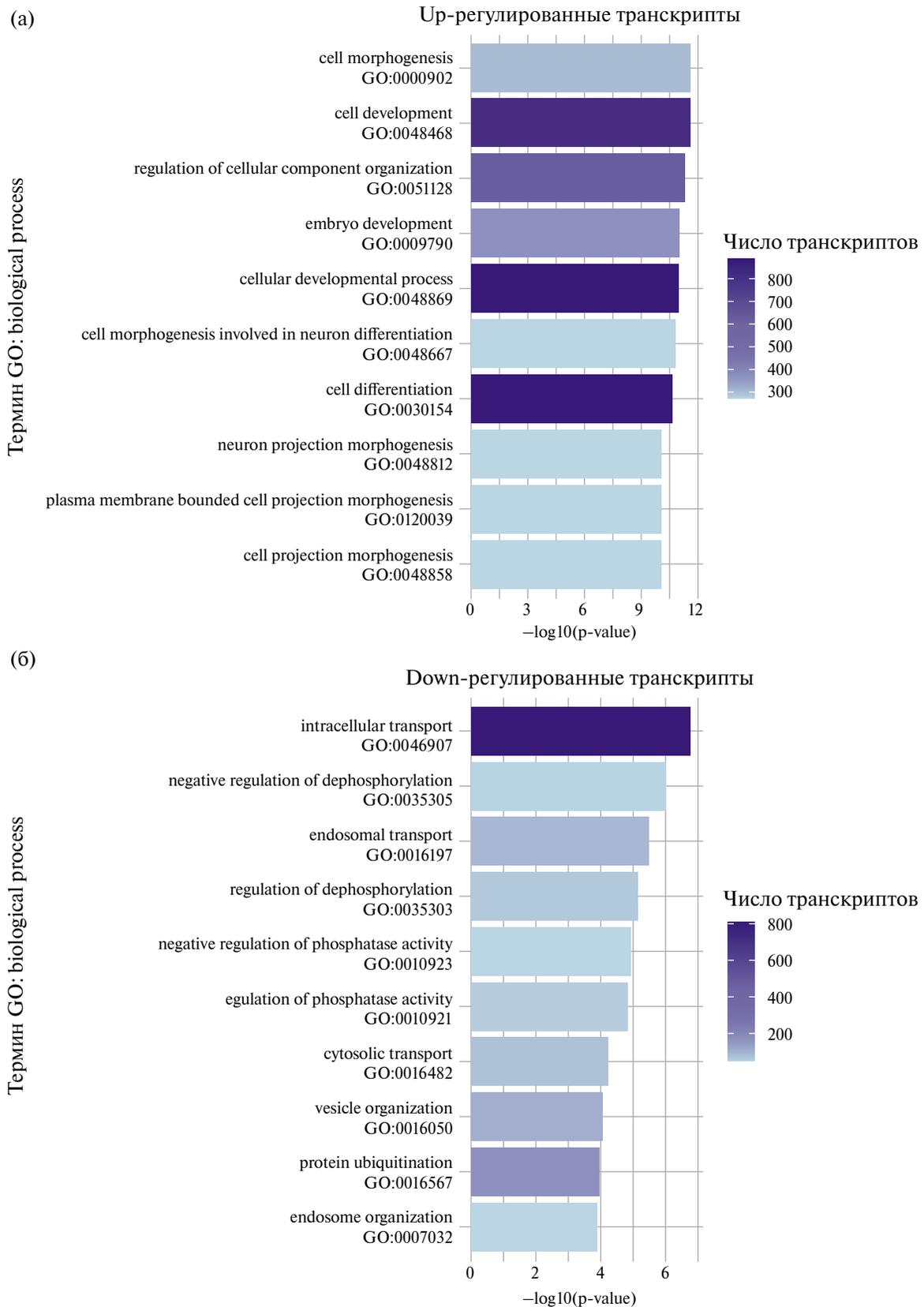


**Рис. 3.** График Volcano для сравнения стадии 8 клеток с неоплодотворенной яйцеклеткой. Отмечены гены с наименьшим  $p$ -value и имеющие аннотацию.

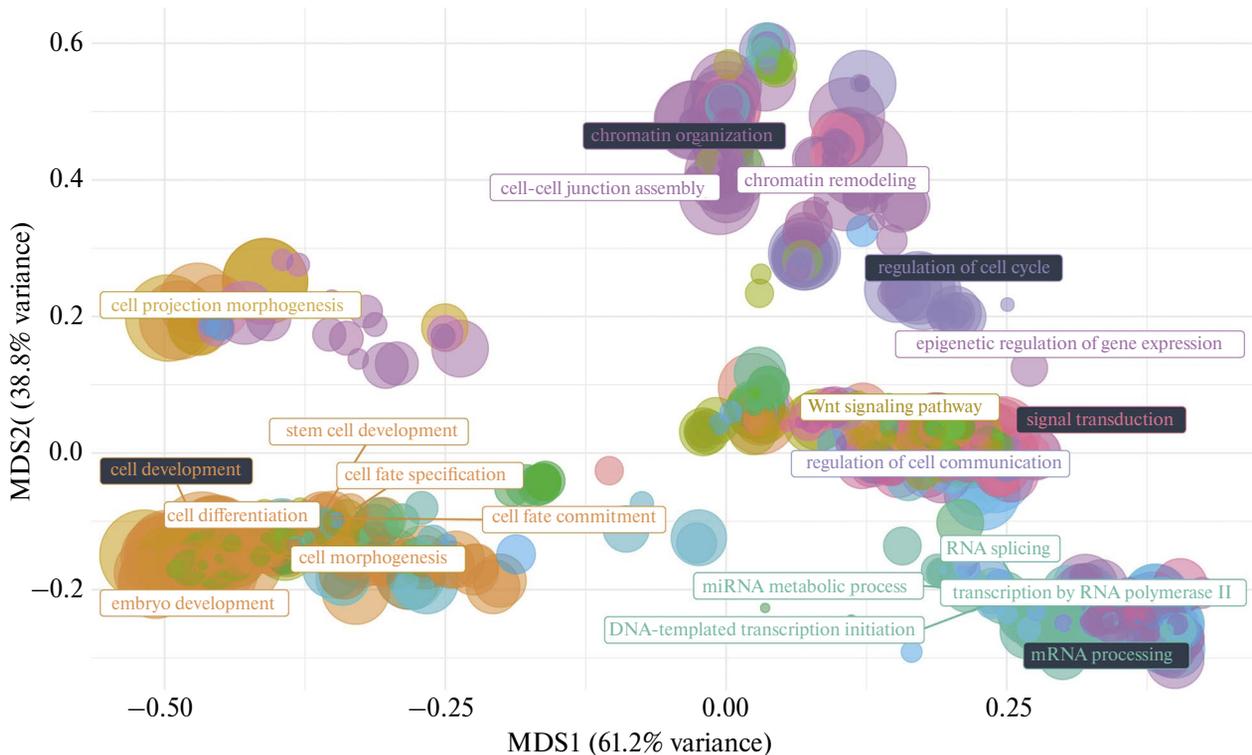
факторов, таких как Cdx (cad), Nох, Nkx и другие. Кроме того, на стадии восьми клеток повышается экспрессия ряда компонентов сигнальных путей Wnt (лиганды,  $\beta$ -катенин, рецептор Fzd и др.) и TGF- $\beta$  (лиганды, Smad), которые могут участвовать в ранних процессах разметки зародыша уже на этапе дробления. Для компонентов Wnt, в частности  $\beta$ -катенина, такая роль была описана у многих представителей Spiralia (Козин и др., 2019).

Интересным наблюдением является то, что указанные первые экспрессируемые гены *O. limacina* во многом пересекаются с первыми транскриптами, обнаруженными в работах на *Platynereis* (Hes, Fzd, Bmp) (Chou et al., 2016), *Capitella* (лиганды Wnt, Fzd, Fox)

и *Owenia* (FoxQ2) (Liang et al., 2024), что свидетельствует о наличии некоторого уровня консервативности процессов активации генома и первичной разметки зародыша у аннелид. При этом у *O. limacina* зиготическая активация генома, по всей видимости, происходит уже к стадии восьми клеток — раньше, чем у *Capitella* и *Owenia*, но сходно с *Platynereis*. При этом *Owenia*, у которой в ходе ZGA активируется всего 78 генов, большинство из которых не обнаруживаются у *Ophelia*, оказывается наименее похожей на последнюю, несмотря на идентичный тип дробления. Вероятно, данные отличия обусловлены филогенетическим положением *Owenia*, что подчеркивает необходимость анализа других аннелид с гомоквадрантным дроблением.



**Рис. 4.** Гистограммы обогащенных GO-терминов в категории “Biological process” для up-регулируемых генов (а) и down-регулируемых генов (б), полученных в результате анализа дифференциальной экспрессии. Термины отсортированы по уровню значимости. Цветовая шкала соответствует количеству транскриптов, относящихся к данному термину.



**Рис. 5.** Многомерное шкалирование GO-терминов в категории “Biological process” для up-регулируемых генов, кластеризованных по семантической схожести. Ключевые термины GO отмечены подписями с темным фоном. Каждый круг отображает определенный GO-термин. Одинаковые цвета обозначают семантически наиболее сходные термины. Размер круга отражает уровень значимости.

Открытыми остаются вопросы о роли первых транскрибируемых генов в ранней сегрегации клеточных линий зародыша, а также о механизмах активации генома и их возможном разнообразии. В частности, *Sox2*, рассматриваемый как потенциальный фактор активации генома у *O. limacina*, ранее не был обнаружен среди ранних зиготических генов у других представителей Spiralia. Традиционно *Sox2* рассматривают консервативным участником ZGA исключительно у позвоночных, тогда как у беспозвоночных основная функция генов семейства SoxB1 связана с нейрогенезом (Sur et al., 2017). Однако гомологи *SoxB1 D. melanogaster* способны дублировать функции *Sox2* в поддержании плюрипотентного состояния эмбриональных стволовых клеток мыши (Niwa et al., 2016), что указывает на необходимость дополнительного изучения этого гена у беспозвоночных. Отдельного внимания заслуживает отсутствие транскриптов *Sox2* на стадии яйца у *O. limacina* (рис. 6), что может указывать на участие других пионерных факторов в активации зиготического генома, а также на возмож-

ное наличие у *Sox2* и иных функций, специфичных для раннего развития.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование выполнено на базе ББС МГУ и РЦ “Вычислительный центр СПбГУ”.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

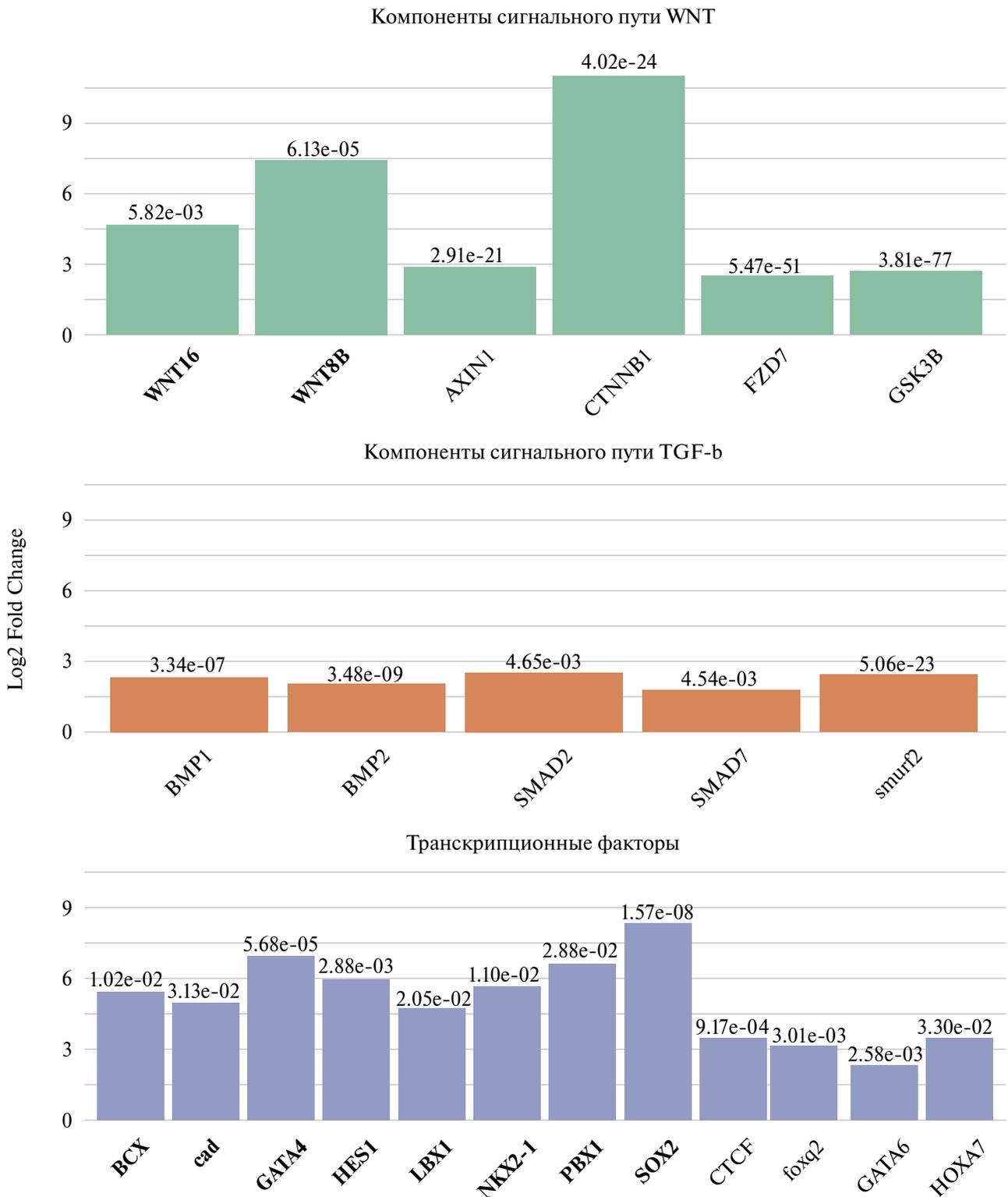
Работа выполнялась при поддержке гранта РНФ № 23-74-10046, <https://rscf.ru/project/23-74-10046/>.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В отношении объектов исследования соблюдались применимые этические нормы.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.



**Рис. 6.** Гистограммы изменения уровня экспрессии компонентов сигнальных путей WNT, TGF- $\beta$ , а также транскрипционных факторов, обнаруженных в результате анализа дифференциальной экспрессии. Высота столбцов отражает  $\log_2(\text{Fold Change})$ , число над каждым столбцом —  $p$ -value. Жирным шрифтом отмечены гены, для которых характерно отсутствие экспрессии в яйце (0 TPM во всех повторностях).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дондуа А.К. Репрограммирование контроля над развитием в раннем онтогенезе многоклеточных животных // Журнал общей биологии. 1979. Т. 60. С. 530–543.
2. Козин В.В., Борисенко И.Е., Костюченко Р.П. Участие канонического сигнального пути Wnt в определении полярности тела и клеточной идентичности у Metazoa: Новые данные о развитии губок и аннелид // Известия Российской академии наук. Серия Биологическая. 2019. № 1. С. 19–30. <https://doi.org/10.1134/S000233291901003X>
3. Barral A., Zaret K.S. Pioneer factors: Roles and their regulation in development. // Trends in Genetics. 2024. V. 40(2). P. 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.10.007>
4. Carrillo-Baltodano A.M., Seudre O., Guynes K., Martín-Durán J.M. Early embryogenesis and organogenesis in the annelid *Owenia fusiformis* // EvoDevo. 2021. V. 12(1). P. 5. <https://doi.org/10.1186/s13227-021-00176-z>
5. Chou H.-C., Pruitt M.M., Bastin B.R., Schneider S.Q. A transcriptional blueprint for a spiral-cleaving embryo // BMC Genomics. 2016. V. 17(1). P. 552. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2860-6>
6. Henry J.Q. Spiralian model systems // The International Journal of Developmental Biology. 2014. V. 58(6–8). P. 389–401. <https://doi.org/10.1387/ijdb.140127jh>
7. Heyn P., Kircher M., Dahl A., Kelso J., Tomancak P., Kalinka A.T., Neugebauer K.M. The Earliest Transcribed Zygotic Genes Are Short, Newly Evolved, and Different across Species // Cell Reports. 2014. V. 6. P. 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.030>
8. Lee M.T., Bonneau A.R., Giraldez A.J. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition // Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2014. V. 30. P. 581–613. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013027>
9. Liang Y., Wei J., Kang Y., Carrillo-Baltodano A.M., Martín-Durán J.M. Cell fate specification modes shape transcriptome evolution in the highly conserved spiral cleavage (p. 2024.12.25.630330) // bioRxiv. 2024. <https://doi.org/10.1101/2024.12.25.630330>
10. Nikishin D., Rimskaya-Korsakova N., Kremnyov S., Bagayeva T., Khranova Y., Semenova M., Kosevich I., Kraus Y., Vortsepneva E., Lavrov A., Prudkovsky A. (2019). Atlas of the White Sea Invertebrates Development. 3rd Summer Course on Embryology of Marine Invertebrates, June 9–30, 2019, WSBS MSU, Russia.
11. Niwa H., Nakamura A., Urata M., et al. The evolutionally-conserved function of group B1 Sox family members confers the unique role of Sox2 in mouse ES cells // BMC Evolutionary Biology. 2016. V. 16(1). P. 173. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0755-4>
12. O'Farrell P.H., Stumpff J., Su T.T. Embryonic cleavage cycles: How is a mouse like a fly? // Current Biology. 2004. V. 14(1). P. R35–45. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.022>
13. Onichtchouk D., Driever W. Zygotic Genome Activators, Developmental Timing, and Pluripotency // Current Topics in Developmental Biology. 2016. V. 116. P. 273–297. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.12.004>
14. Sur A., Magie C., Seaver E., Meyer N. Spatiotemporal regulation of nervous system development in the annelid *Capitella teleta* // EvoDevo. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.1186/s13227-017-0076-8>
15. Tadros W., Lipshitz H.D. The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts // Development. 2009. V. 136(18). P. 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
16. Vastenhouw N.L., Cao W.X., Lipshitz H.D. The maternal-to-zygotic transition revisited // Development. 2019. V. 146(11). ArtNo. dev161471. <https://doi.org/10.1242/dev.161471>

## Evidence of Early Zygotic Genome Activation in Development of the Annelid *Ophelia limacina*

M. G. Grinberg, I. E. Borisenko, V. V. Kozin\*

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

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

A key event in early embryonic development is activation of zygotic gene expression. The mechanisms of this process have been well studied in only a few model organisms, which do not fully reflect the diversity of developmental patterns and cell fate determination strategies. Among bilaterian animals, representatives of the Spiralia clade, which exhibit remarkable conservation and determinative specification of cell lineages, remain largely unexplored in terms of genome activation. In this study, we used transcriptomic analysis to investigate zygotic genome activation in the White Sea annelid *Ophelia limacina*, which exhibits homoquadrant (equal) spiral cleavage. We demonstrate that zygotic transcription begins as early as the 8-cell stage, leading to the up-regulation of thousands of genes, including components of the Wnt and TGF- $\beta$  signaling pathways, as well as transcription factors such as Sox2—a conserved regulator of pluripotency and genome activation in vertebrates. These findings broaden our understanding of the variability of molecular mechanisms underlying zygotic genome activation and raise new questions regarding the potential evolutionary conservation of key factors involved in this process.

*Keywords:* zygotic genome activation (ZGA), maternal to zygotic transition (MZT), Sox2,  $\beta$ -catenin, spiral cleavage, conditional specification, annelids, Spiralia, transcriptomic analysis