

## НЕУПРОЩАЕМАЯ СЛОЖНОСТЬ *НОХ*-ГЕНА: ПУТЬ К КАНОНИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ *НОХ*-КЛАСТЕРА

### Обзор

© 2024 М.А. Кулакова\*, Г.П. Маслаков, Л.О. Полюшкевич

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии,  
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: m.kulakowa@spbu.ru

Поступила в редакцию 29.11.2023

После доработки 22.03.2024

Принята к публикации 27.03.2024

Эволюция крупных таксонов часто связана с появлением новых генных семейств. У всех многоклеточных животных, кроме губок и гребневиков, в геноме присутствуют *Нох*-гены – важнейшие регуляторы развития. Каноническая функция *Нох*-генов состоит в коллинеарном паттернировании отделов тела билатеральных животных. Эта общая функция реализуется при помощи сложных, тонко скоординированных механизмов, не все из которых эволюционно консервативны и до конца понятны. Мы полагаем, что появлению этой регуляторной сложности предшествовал этап кооперации между более древними морфогенетическими программами или их отдельными элементами. Следы этих программ могут присутствовать у современных животных для реализации неканонических *Нох*-функций. Неканонические функции *Нох*-генов нацелены на поддержание терминальной специфичности нервных клеток, аутофагию, оогенез, догастрюляционный эмбриогенез, передачу сигналов путём вертикального переноса и ряд общебиологических процессов. Эти функции реализуются при помощи базовых свойств гомеодоменного белка и могли стать триггером для эволюции *ParaNох*зоа, а затем и *Nephrozoa*. В нашем обзоре рассмотрены некоторые из них.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гомеодомен, ANTP, *Нох*-гены, неканонические функции *Нох*-генов, Metazoa, *ParaNох*зоа, *Nephrozoa*, нейрогенез, аутофагия в развитии, оогенез, вертикальный сигналинг.

DOI: 10.31857/S0320972524060012 EDN: XMVUUG

### ВВЕДЕНИЕ

История возникновения многоклеточных животных прочно связана с появлением нового класса транскрипционных факторов – ANTP (*Antennapedia*), принадлежащего к суперклассу гомеодоменных белков [1]. Быстрая структурная и функциональная эволюция генов ANTP привела к появлению самой многочисленной и разнообразной клады животного мира, которую сейчас называют *ParaNох*зоа [2]. В эту кладу входит приблизительно 7 млн видов билатеральных животных (*Bilateria*), примерно 10 тысяч видов кишечнополостных (*Cnidaria*) и несколько видов пластинчатых (*Placozoa*). Название кладу указы-

вает на эволюционную границу внутри Metazoa, которая обособляет таксоны с *Нох/ParaНох*-генами (*Нох* – Homeotic Homeobox) от гребневиков и губок, у которых этих генов нет [2–5].

*Нох*-гены были первыми генами, для которых показали участие в развитии и эволюции [6]. Их открытие привело к появлению новой науки – эволюционной биологии развития (*EvoDevo*), и сделало *Нох*-гены самой изучаемой группой среди всех гомеобоксных генов у животных. Гомеобокс – консервативный участок первичной последовательности, который кодирует ДНК-связывающий мотив гомеодомен, нужный *Нох*-белку для взаимодействия с энхансерами подконтрольных генов-мишеней [7, 8]. *Нох*-гены организованы в кластер, т.е. физически сцеплены. Традиционно их подразделяют на 9 паралогических групп (PG1–8 и PG9/14). Принцип классификации по паралогическим группам основан на различиях в последовательностях *Нох*-белков и их относительных позициях

Принятые сокращения: ANTP – *Antennapedia*; GRN – генная регуляторная сеть; *Нох* – Homeotic Homeobox; *Ubx* – *Ultrabithorax*.

\* Адресат для корреспонденции.

в кластерах. Уровень эволюционной консервативности внутри паралогической группы (например, между *lab* (PG1) мухи и *Hox1* (PG1) ланцетника) всегда выше, чем по сравнению с геном вне неё (между *lab* (PG1) и *pb* (PG2) мухи). В целом, структурная экспансия *Hox*-кластера и формирование большинства паралогических групп произошли до появления трёх крупных клад *Bilateria* [9, 10].

Главная черта *Hox*-кластера – способность к коллинеарной экспрессии. Коллинеарность – это соответствие между расположением генов на хромосоме и порядком их экспрессии вдоль передне-задней оси тела [11, 12]. Чем ближе *Hox*-ген к 3'-концу кластера, тем ближе к переднему концу эмбриона он будет работать. Такую коллинеарность называют пространственной. Коллинеарность также может быть временной (темпоральной), когда гены экспрессируются последовательно во времени, начиная с 3'-конца кластера [13].

Кластер *Hox*-генов – результат тандемных *cis*-дупликаций предковой последовательности, начиная с единственного прото-*Hox*-гена, который принадлежал к семейству NK [14, 15]. Это событие произошло до того, как образовались сестринские ветви *Bilateria* и *Cnidaria*, потому что *Hox*-гены, принадлежащие к паралогическим группам PG1, PG2 и PG4/14, уже есть в обеих ветвях [16]. Эти паралогические группы появились в результате диверсификации *cis*-дубликатов по двум сценариям: неофункционализации и субфункционализации. В первом случае копия приобретает новую функцию, а во втором – предковая функция разделяется между копиями [17]. Кластер может быть целым (компактным или релаксированным) или содержать перестройки и разрывы (поломки), вплоть до полной атомизации [18–21]. Целостность *Hox*-кластера принципиальна для поддержания темпоральной коллинеарности, но не важна для пространственной [22].

Парадоксальным образом *Hox*-гены одновременно консервативны и функционально пластичны. Они универсальны на этапе становления билатерального плана организации и видоспецифичны на уровне локальных паттернов, например, при формировании щетинок на ногах у разных видов *Drosophila* [23]. Это системное свойство известно как масштабируемость. В случае *Hox*-генов оно проявляется на онтогенетическом и филогенетическом уровнях.

Ошеломляющее многообразие билатеральных животных – результат быстрой эволюции программ развития, одновременно устойчивых и пластичных. Билатеральные животные сохраняют общий план организации за счёт консервативных участников и «участков» генных регуляторных сетей, которые начинают работать вскоре после завершения дробления и нужны для регионализа-

ции и паттернирования. Особенно ярко это видно на примере позвоночных и других сегментированных животных, для которых выделяют филотипический период или стадию «зоотипа» [24]. В этот период представители одного типа (или подтипа) максимально похожи друг на друга морфологически (например, все позвоночные на стадии фарингулы). На уровне молекулярной регуляции сходство ещё шире, поскольку сегментированные животные из разных типов (позвоночные, членистоногие, аннелиды) незадолго до или во время гастрюляции начинают упорядоченно экспрессировать *Hox*-гены [25–27]. Графическое выражение концепции зоотипа – песочные часы, где уровень перетяжки соответствует началу коллинеарной транскрипции *Hox*-кластеров вдоль передне-задней оси тела. Такая экспрессия концептуально сходна у любых сегментированных *Bilateria*, несмотря на существенные различия в механизмах реализации. *Hox*-белки детерминируют судьбу клеток в широких пространственных доменах эмбриона вдоль передне-задней оси тела. В этот ранний период их мишенями становятся гены сигнальных путей и факторов транскрипции, наборы которых будут качественно и количественно различаться в зависимости от *Hox*-кода. Такая разница в конечном счёте приведёт к морфологическим и функциональным различиям между участками эмбриона.

Эту функцию традиционно рассматривают как базовую, то есть **каноническую**. Именно её подразумевают, когда речь заходит о роли *Hox*-генов в развитии, и для этого есть несколько причин. Во-первых, животные, у которых мы наблюдаем раннюю коллинеарную транскрипцию *Hox*-генов в широких пространственных доменах (т.е. регионализующую функцию), принадлежат к трём надтипам – *Deuterostomia*, *Ecdysozoa* и *Lophotrochozoa*, которые объединяются в кладу *Nephrozoa*. Вероятность того, что такая функция *Hox*-генов возникла в этих группах независимым (конвергентным) образом, выглядит ниже вероятности её прямого наследования от общего предка всех *Nephrozoa*. Во-вторых, последовательная во времени ранняя активация генов *Hox*-кластера всегда связана с регионализацией, а такой способ включения зависит от целостного или минимально повреждённого кластера [22, 28]. Если структура кластера определяет его регионализующую функцию и при этом целый кластер априори считается первичным, то логично предположить, что и сама эта функция неразрывно связана с возникновением *Hox*-кластера.

Узкое место в «песочных часах» – показатель отсутствия изменчивости, доступной для отбора, поэтому можно смело говорить, что работа *Hox*-генов определяет план организации,

по крайней мере, сегментированных Bilateria. Однако при таком подходе остаются неразрешимые вопросы к начальным этапам эволюции системы. Координированная во времени и пространстве ранняя векторная экспрессия Нох-кластеров выглядит очень сложной. Трудно представить начальные и промежуточные шаги, сформировавшие эту гиперсеть. Кроме того, если каноническая функция Нох-генов первична, то последний общий предок Nephrozoa – сложное животное, не уступающее по уровню организации ланцетнику, дрозофиле или платинереису, что уводит нас к старому парадоксу о неупрощаемой сложности. Возможно, среди множества функций Нох-генов, которые не входят в число канонических, существуют такие, которые дают подсказку о первичном состоянии Нох-регуляции в линии ParaNохозоа и её последующей эволюции. В нашем обзоре рассмотрены некоторые из них.

### НОХ-ГЕНЫ И НЕЙРОГЕНЕЗ

Чем древнее признак, тем с большей вероятностью его можно встретить у филогенетически удалённых друг от друга потомков вида, который этот признак приобрёл. Впервые идею о том, что анцестральная функция Нох-генов – паттернирование нервной системы, высказал Хорди Гарсиа Фернандес [29], и не без основания. Если вынести за скобки каноническую функцию Нох-генов, то остаётся самая распространённая и самая устойчивая к полочкам функция – контроль над нейрогенезом [30–32]. Контроль сохраняется даже у тех животных, которые отказались от ранней регионализующей функции (пиявки, аппендикулярии, коловратки) или используют её в отрыве от спецификации передне-задней оси (моллюски) [19–21, 33–36]. Примечательно, что у большинства изученных моллюсков именно в ганглиях нервной системы прослеживаются признаки Нох-коллинеарности [21, 35, 36].

Современные экспериментальные методы позволяют локально включать или выключать избранные гены на разных стадиях развития модельных животных (нематода, дрозофила, мышь). Эти эксперименты обнаружили важную закономерность. Оказалось, что Нох-гены не просто определяют клеточные территории, в которых закладываются нейробласты. Они контролируют пути их дифференцировки и, что особенно любопытно, устанавливают терминальную специфичность зрелых постмитотических нейронов [32]. Терминальная специфичность (neuronal terminal identity) приводит нейрон к функциональному состоянию. Он начинает формировать нейриты, синтезировать нейропептиды, белки, необходимые для про-

изводства нейротрансмиттеров, рецепторы к ним и компоненты ионных каналов. Все эти и многие другие изменения в постмитотических нейронах происходят за счёт не родственных друг другу регуляторных белков, которые называются терминальными селекторами. Один из таких селекторов у нематоды *Caenorhabditis elegans* – Unc-3 (ортолог EBF/Olf/Collier) – определяет терминальную дифференцировку холинергических двигательных нейронов (мотонейронов). Белок Unc-3 напрямую связывается с цис-регуляторными сайтами генов биосинтеза ацетилхолина, ионных каналов и множества других генов, но работает он не один, а в содружестве с разными Нох-белками, которые действуют как его кофакторы. Разные Нох-белки (в зависимости от участка тела) задают разницу в количестве и длине нейритов, синаптических связях и электрической активности мотонейронов. Эта общая схема справедлива и для других типов нейронов (сенсорных, двигательных и промежуточных) с другими терминальными селекторами [37]. Важно, что Нох-белки нужны червю не только для верной настройки нейрона в момент его терминальной дифференцировки, но и для его дальнейшей работы. Показано, что Нох-белок *C. elegans* Lin-39 (PG4/5) необходим во взрослой жизни для поддержания терминальной специфичности подконтрольных мотонейронов [38, 39].

Нематода просто устроена, и у взрослого червя (гермафродита) всего 302 зрелых нейрона [40]. Мозг взрослой *Drosophila* содержит порядка 200 тыс. нервных клеток [41], но их дифференцировка, нацеленность на мишени и количество синапсов определяются сходными процессами. Нейробласты мухи приобретают уникальные судьбы под действием Нох-белков [42], и, что более удивительно, под Нох-контролем находится формирование нервно-мышечных синапсов [31, 43]. Существует гипотеза, согласно которой сборка синаптического контакта между нейроном и мышечной клеткой возможна в том случае, если они экспрессируют один и тот же Нох-белок (или набор Нох-белков). Это справедливо по крайней мере для одной модельной системы, где Нох-белок Dfd (PG4) напрямую включает экспрессию анкирина (Ankyrin2-XL; синаптический белок) и выключает экспрессию Con (адгезивный белок, селективно работающий в нейромышечных синапсах другого типа) в мотонейронах и мышцах, которые они иннервируют [43].

Наконец, у *Drosophila* описан тип нейронов (leucokinergetic neurons), для которых Нох-белки из комплекса BX-C (Ubx (Ultrabithorax), abd-A (abdominal A), Abd-B (abdominal B)) являются прямыми терминальными селекторами, поскольку включают (Ubx, abd-A) и выключают (Abd-B) синтез нейропептида лейкокинина [44].

Не вдаваясь в подробности, заметим, что у млекопитающих (мышь, человек) обнаружены принципиально сходные правила установления пронеуральных территорий, дифференцировки нейронов и их постмитотических настроек под контролем *Нох*-генов [30]. Показано, что у млекопитающих тоже есть *Нох*-белки, которые работают терминальными селекторами мотонейронов [45] и нужны во взрослом состоянии. Развитие заднего мозга контролируют 24 *Нох*-гена, и они продолжают работать в сформированном мозге взрослых мышей [46]. Развитие переднего мозга у позвоночных – *Нох*-независимый процесс. Тем удивительней, что в постнатальном неокортексе и таламусе мышцы начинают экспрессироваться *Нох*-гены из нескольких передних паралогических групп (PG1, 3-5) [46].

Итак, современные экспериментальные данные, полученные на разных модельных животных, подводят нас к мысли, что предковая функция *Нох*-генов – терминальная дифференцировка нейронов, вероятнее всего двигательных. У этой гипотезы есть сильная теоретическая и доказательная базы. Во-первых, недавно стало известно, что гомеобокс-содержащие факторы в целом имеют тенденцию запускать и поддерживать нейрогенные дифференцировки. В геноме *C. elegans* закодированы 102 гомеодомен-содержащих белка из разных семейств, которые селективно и комбинаторно работают терминальными селекторами или их партнёрами в зрелых нейронах [47, 48]. Поэтому спецификация нейронов при помощи *Нох*-белков – частный случай общего принципа.

Во-вторых, в генных регуляторных сетях (Gene Regulatory Networks; GRNs) прямая связь между высокоуровневыми регуляторными генами и генами терминальных дифференцировок может указывать на предковое состояние системы. Согласно гипотезе интеркалярной эволюции, регуляторные гены-посредники, которые формируют сложную архитектуру GRNs, разворачивающуюся в период регионализации и паттернирования – результат эволюционных интеркаляций (вставок) между исходным мастер-геном и его мишенью, например, между гомеобоксным геном *Pax6* и светочувствительным трансмембранным белком родопсином [49–51]. *Нох*-гены универсальным образом причастны к установлению и поддержанию терминальной спецификации нейронов у первичноротых и вторичноротых животных, что допускает существование просто организованного предка всех Nephrozoa, который использовал *Нох*-гены с той же целью. Изначально простые GRNs такого предка постепенно и независимо друг от друга усложнялись в разных эволюционных линиях за счёт вовлечения новых кладоспецифичных генов под контроль *Нох*-кластера, а гетерохронные сдви-

ги сместили начало активности всех участников к более ранним срокам развития и привели их экспрессию к каноническому виду. Возможно, уже на первых этапах этого эволюционного процесса *Нох*-гены координировали формирование синапсов между двигательными нейронами и мышцами. Поэтому общий принцип коллинеарной транскрипции *Нох*-генов роднит *Drosophila* и млекопитающих на уровне двух зародышевых листков – эктодермального и мезодермального. Важно, что принцип интеркалярной эволюции допускает приращение GRNs путём дубликации мастер-гена и субфункционализации генов-потомков с частичным сохранением предковой функции [51].

У этой привлекательной гипотезы есть внутренние противоречия. Во-первых, для того, чтобы специфицировать нейроны, не нужна физическая сцепленность терминальных селекторов. Большинство гомеобоксных генов, которые создают нейтральный код у нематоды, не собраны в кластеры [47, 48].

Во-вторых, уровень сложности последнего общего предка всех Nephrozoa остаётся под вопросом, потому что его *Нох*-кластер уже состоял по меньшей мере из 7 или 8 генов, а именно из пяти передних (PG1–5), одного или двух срединных (PG6/8) и одного постериорного (PG9/14) [9]. Известно, что функции генов из разных паралогических групп существенно перекрываются [52], а это значит, что предковый кластер сформировался очень быстро, до того, как его участники начали сильно различаться спектрами своих мишеней. Если количественная информация, реализуемая *Нох*-белками, была в какой-то момент важнее качественной (паралог-специфичной), это могло подтолкнуть *Нох*-кластер к быстрой структурной экспансии с минимальной дивергенцией участников. При этом паралог-специфические функции стали появляться позже. Такое объяснение выглядит логичным, но оставляет вопросы: почему *Нох*-белки из разных паралогических групп качественно важны для спецификации нейронов и почему эти белки различаются структурно, а некоторые из их паралог-специфических функций консервативны (общие для Nephrozoa)? Создаётся впечатление, что отбор двигал эволюцию *Нох*-кластера сразу в нескольких направлениях, и это объяснимо, если нейрогенная функция не была единственной. Так это или нет, можно выяснить, обратившись к базальным таксонам.

За пределами группы Nephrozoa экспрессия *Нох*-генов изучена менее подробно, но известно, что маленькие и разорванные кластеры Acoelomorpha (сестринская ветвь Nephrozoa, ранее относимая к плоским червям) работают в нервной, мышечной и репродуктивной системах [53–56]. В единственном исследовании на эмбрионах [53]

показано, что три *Нох*-гена *Convolutriloba longifissura* (PG1, PG5 и PG9/14) коллинеарно включаются в пронеиральных территориях вскоре после гастрюляции. Два гена из трёх чуть позже или одновременно с этим событием работают в паренхиматозных внутренних доменах.

*Нох*-гены книдарий изучены довольно подробно [57–59] и экспрессию некоторых из них можно ассоциировать с нервной системой, например, *Hox1* (PG1) *Clytia hemisphaerica* работает в статоцистах, а *Anthox1* (PG9-подобный) – в апикальном султанчике у планул *Nematostella vectensis*. Однако на фоне разнообразных нейральных дифференцировок, в которых участвуют другие гомеобоксные гены книдарий, это очень скромный результат [60, 61]. Удивительно, что многие нейротрансмиттеры (в том числе ацетилхолин) и ферменты их биогенеза синтезируются у книдарий не в нейронах, а в клетках кишки [62]. Трудность анализа экспрессионных данных заключена ещё и в том, что прямое соответствие генов из *Нох*/*ПагаНох*-классов у книдарий и билатерий неочевидно из-за сильной дивергенции или утраты ортологов [63]. И всё же среди генов, которые устойчиво попадают в категорию «PG1-подобные» или «PG2-подобные», нет прямых регуляторов нейрогенеза, зато есть гены с широкими доменами экспрессии на уровне эктодермы и энтомезодермы.

Итак, до появления последнего общего предка *Nephrozoa*, на уровне *Ascoelomorpha*, *Нох*-гены уже были заняты в нескольких разных программах развития. Их функции у книдарий тоже не унифицируются до единственной и не завязаны на терминальную спецификацию нейронов. Путь от общего предка книдарий и билатерий до современных *Nephrozoa* сопровождался структурной экспансией *Нох*-кластера и сложными, скрытыми для нас перестройками регуляторных отношений между древними программами развития. Часть этих программ могла опираться на общие паралог-неспецифические функции *Нох*-генов, которые работают в отрыве от пространственной коллинеарной транскрипции. Мы предполагаем, что эти функции остались у современных животных, и чтобы их исследовать, нужно обратить внимание на общебиологические процессы, в которых задействованы *Нох*-гены. Существует некоторое количество примеров, где особенно ярко реализуется паралог-неспецифическая функция *Нох*-генов. Рассмотрим их в следующих разделах.

### НОХ-БЕЛКИ КОНТРОЛИРУЮТ ТАЙМИНГ РАЗВИТИЯ ПРИ ПОМОЩИ АУТОФАГИИ

Аутофагия – это процесс клеточной деградации, необходимый для поддержания гомеостаза

клетки и обновления её цитоплазматических компонентов. Аутофагия высококонсервативна, и её влияние на разнообразные биологические функции описано у широкого круга организмов: от растений и дрожжей до человека [64]. Для билатерий аутофагия является важным инструментом раннего развития, так как она принимает участие в клеточных дифференцировках и тканевых перестройках [65, 66]. Например, у личинок дрозофилы активность аутофагии очень высока в жировом теле L3-бродячей (L3W) стадии, когда личинка быстро растёт и претерпевает метаморфоз, но не у более молодой L3-кормящейся (L3F) стадии. Было показано, что переход из стадии L3F в L3W контролируется экдизоном, и основными регуляторами аутофагии в этом случае выступают *Нох*-белки, которые подавляют преждевременную аутофагию на стадии L3F [67]. При нормальном развитии в жировом теле L3F-личинки обнаружена совместная неколлинеарная локализация *Нох*-белков из нескольких паралогических групп. Здесь *Нох*-белки подавляют экспрессию генов *atg* (18 генов), ответственных за аутофагию. Показано, что нокауты по отдельным *Нох*-генам (*Dfd*, *Scr*, *Ubx*, *abd-A*, *AbdB*) не приводят к преждевременному запуску аутофагии. Только единовременное выключение экспрессии всех *Нох*-паралогов в эксперименте на личинке L3F инициирует этот процесс [67]. Наоборот, пролонгированная экспрессия исследованных *Нох*-генов ингибирует аутофагию в клетках жирового тела личинок. Такие особи переходят в блуждающую стадию на 6–7 дней позже, чем контрольные, и это указывает на то, что принудительное поддержание экспрессии *Нох*-генов приводит к задержке развития дрозофилы. Таким образом, в жировом теле личинок универсальная активность *Нох*-белков несёт временную, а не пространственную информацию, регулируя наступление аутофагии на нужном этапе развития. Стоит отдельно отметить, что в культуре фибробластов млекопитающих *Нох*V8 и *Нох*A9 тоже подавляют аутофагию. Эти же белки оказывают сходное действие на личинку дрозофилы при трансгенезе [67]. Эти предварительные исследования не исключают паралог-неспецифического участия *Нох*-генов в контроле аутофагии у последнего общего предка насекомых и позвоночных, но требуют проведения дополнительного анализа на широком круге объектов.

### ЗАЧЕМ НОХ-ГЕНЫ РАБОТАЮТ ДО НАЧАЛА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ?

У многоклеточных животных *Нох*-гены не экспрессируются в тотипотентных и плюрипотентных клетках, поскольку эта экспрессия ин-

дуцирует дифференцировку. В эмбриональных стволовых клетках млекопитающих Нох-локусы имеют амбивалентный эпигенетический статус. Их гистоновый код содержит как репрессивные, так и пермиссивные метки [68]. Эти клетки не экспрессируют *Нох*-гены, но могут быстро начать это делать в случае дополнительных разрешающих сигналов, что приведёт их к началу дифференцировочного пути.

Несмотря на запрет работы *Нох*-генов в тотипотентных клетках, их материнские транскрипты были обнаружены в ооцитах млекопитающих (мышь, корова и человек [69]), амфибий (*Xenopus laevis* [70]), аннелид (*Platynereis dumerilii* [71]), многоножек (*Strigamia maritima* [72], *Trigoniulus corallinus* [73]), перепончатокрылых (муравьи трибы *Camponotini* [74]), декапод (*Macrobrachium olfersii* [75]) и даже у гидроидного полипа *Clitya hemisphaerica* [58]. Причём у всех животных, кроме *X. laevis*, в ооцитах экспрессировались гены из нескольких паралогических групп.

Структура ооцитарных транскриптов *Нох*-генов может дать подсказку об их функциях. На примере многоножки *Strigamia maritima* (Chilopoda) [72] было показано, что материнские РНК *Нох*-генов полиаденилированы, но некоторые из них не содержат открытой рамки считывания. Возможно, часть материнских РНК многоножки относится к классу регуляторных (белок-некодирующих) РНК. С другой стороны, транскрипты *Нох*-генов в ооцитах млекопитающих деаденилированы [69]. Это объяснимо, если такие материнские транскрипты нужны для поздних этапов развития и запасаются в стабильной (нетранслируемой) форме [76]. Кроме того, в ядрах ооцитов и в клетках ранних эмбрионов млекопитающих (мышь, корова) был обнаружен белок НОХВ9 [77], а белки Ubx и AbdA найдены в ооцитах муравьёв [74].

Очевидно, что ооцитарная функция *Нох*-генов отличается от канонической, поскольку представители разных паралогических групп локализуются в одной-единственной клетке. Консервативность этого явления говорит о его неслучайной природе. Пока не существует удачных экспериментов, однозначно указывающих на функции ооцитарных транскриптов *Нох*-генов, но можно выдвинуть несколько гипотез.

Не исключено, что большая часть материнских транскриптов *Нох*-генов не транслируются. Они могут быть элементом эпигенетической настройки зиготического генома. Известно, что некодирующая РНК часто работает каркасом для сборки белков ремоделинга хроматина, нацеливая их на подконтрольные локусы. Эта функция описана в том числе и для регуляторных РНК, которые считываются с *Нох*-кластеров позвоночных животных [78], и согласуется с наличием

транскриптов без открытой рамки считывания в ооцитах *Strigamia*. Важность некодирующей РНК в первых делениях дробления была показана на эмбрионах мыши [79].

С другой стороны, РНК-матрицы *Нох*-генов могут транслироваться. Например, белок НохВ9 присутствует в ядрах ооцитов (как зрелых, так и незрелых) и в ядрах клеток ранних эмбрионов [77]. Это не исключает раннюю функцию *Нох*-генов, направленную на оогенез. Известно, что у мыши ряд транскриптов *Нох*-генов и их кофакторов уже присутствует на стадии растущего ооцита [80]. Любопытно, что гомеодоменный белок Nobox из одноимённого семейства, одновременно близкого к ANTP- и PRD-классам [81], присутствует в ооцитах мыши и регулирует работу важных для оогенеза генов [82]. Нельзя исключить, что ооцитарные матрицы и белки *Нох*-генов нужны для транскрипционного контроля ранних зиготических генов [83].

*Нох*-белки могут быть не только транскрипционными регуляторами, но и регуляторами клеточного цикла, сплайсинга РНК, репликации и репарации ДНК [84–86]. Так, у некоторых *Нох*-белков есть сайты распознавания для серин/треонин-киназы ATM [87], чья роль в репарации двуниевых разрывов ДНК широко известна [88]. Как минимум для одного *Нох*-белка позвоночных, НохВ7, было экспериментально показано участие в этом процессе [85]. В эпителиальных клетках молочной железы НохВ7 увеличивает вероятность негомологичного соединения концов ДНК, связываясь с комплексом из гетеродимеров Ku70/80 (белками, узнающими двуцепочечные разрывы) и ДНК-протеинкиназой [85]. Экспрессия НохВ7 стимулирует работу ДНК-протеинкиназы, что коррелирует с эффективностью репарации, тогда как при нокауте по НохВ7 этот эффект пропадает. Кроме того, *Нох*-белки способствуют сборке пререпликативных комплексов. Например, НохD13 и НохC13 в различных клеточных культурах взаимодействуют при помощи гомеодоменов с белками пререпликативных комплексов ORC и Cdc6 [86, 89, 90]. Несмотря на то что упомянутые функции *Нох*-белков были описаны не в эмбриогенезе, мы предполагаем, что они всё же могут участвовать в первых стадиях развития многоклеточных животных. В раннем развитии синхронные деления бластомеров протекают с минимальным интервалом (нет G1- и G2-фаз цикла), поэтому для успешного завершения этапа дробления необходима очень точная настройка молекулярной машинерии ооцита. В данном случае ооцитарные *Нох*-белки могут ускорять сборку пререпликативных комплексов и усиливать репарацию ДНК для поддержания целостности генетического материала зародыша.

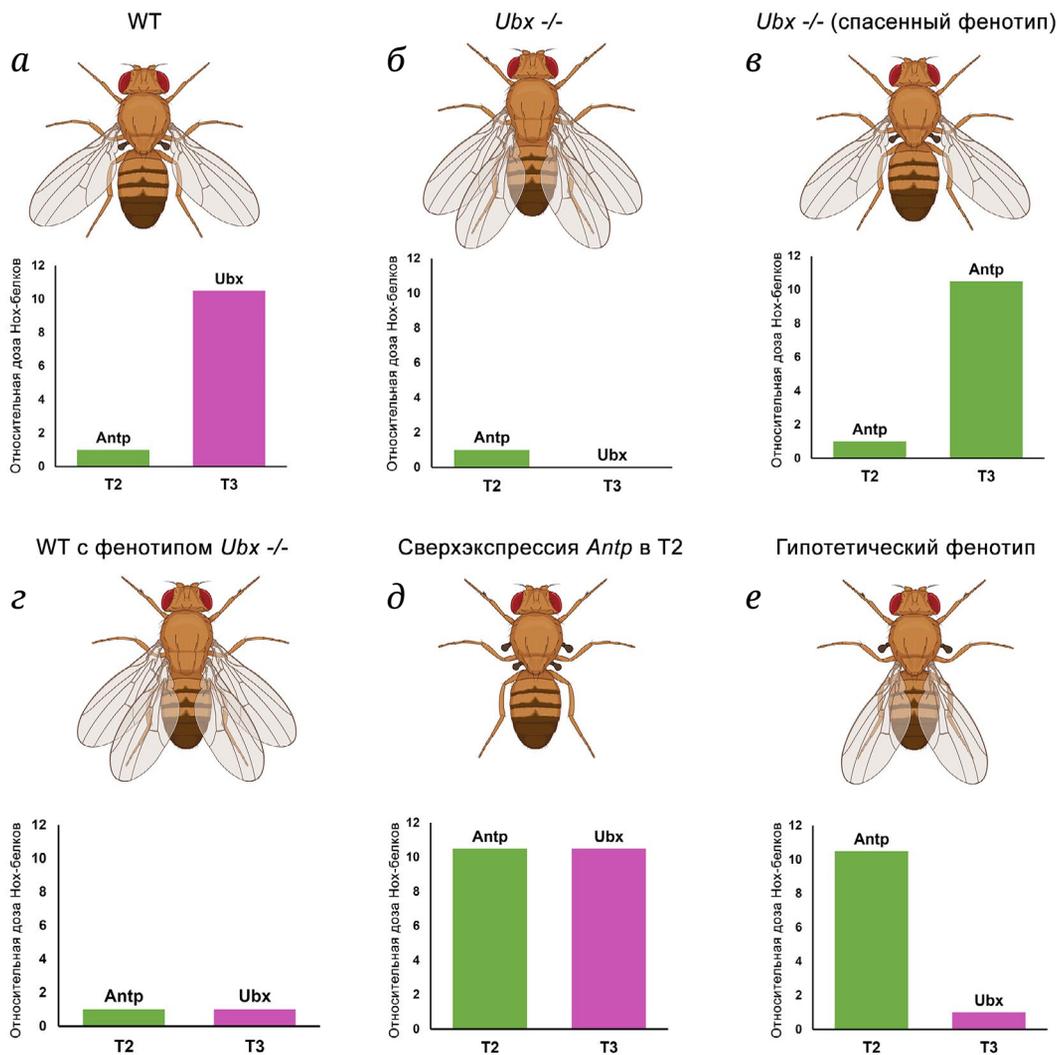
Безусловно, роль *Нох*-генов в оогенезе не прояснится без функциональных тестов на широком круге моделей. Не исключено, что ооцитарные РНК и белки *Нох*-генов могут быть «транскрипционным шумом» или побочными продуктами предыдущих этапов оогенеза [91].

**ДОЗАЗАВИСИМЫЕ ФУНКЦИИ НОХ-БЕЛКОВ**

Существуют дозозависимые функции *Нох*-белков, реализующиеся, когда морфология зачатка определяется их концентрацией [92]. У млекопитающих *Нох*-белки в дозозависимой манере задают морфологию позвонков [93] и устанавливают число и длину пальцев [94]. В обоих случаях постепенное снижение дозы *Нох*-белков усиливает выраженность морфологических изменений. Так,

при постепенном снижении дозы любого белка из постериорных паралогов *НохА*- и *НохD*-кластеров (*Нохd11*, *Нохd12*, *Нохa13*, *Нохd13*) пальцы линейно и паралог-независимо укорачиваются в зависимости от доли мутантных аллелей *Нох*-генов [94].

У беспозвоночных животных самый наглядный пример дозозависимой функции *Нох*-белков – регуляция морфологии крыльев. Эта функция описана у насекомых из разных клад и, по всей видимости, является универсальной для диверсификации формы и размера крыльев на втором (Т2) и третьем (Т3) грудных сегментах [92]. В её выполнении задействованы белки *Antp* и *Ubx*. У *Drosophila* дикого типа белок *Antp* присутствует только в Т2, а белок *Ubx* – в Т3, причём концентрация *Antp* в Т2 ниже, чем концентрация *Ubx* в Т3 (рис. 1, а) [95]. У мутантов *Ubx*<sup>-/-</sup> вместо гальтера на Т3 образуется пара крыльев (рис. 1, б).



**Рис. 1.** Влияние дозы *Antp*- и *Ubx*-белков на фенотип *Drosophila*. а – «Дикий тип» (на рисунке обозначен как WT); б – мутант *Ubx*<sup>-/-</sup>; в – доза *Antp* в Т3 на уровне *Ubx* в норме восстанавливает фенотип; г – доза *Ubx* в Т3 на уровне *Antp* в Т2 приводит к формированию крыла; д – доза *Antp* в Т2 на уровне *Ubx* в Т3 приводит к формированию гальтера; е – гипотетический фенотип, близкий к наблюдаемому у вееркрылых (отряд Strepsiptera), который может быть смоделирован на *Drosophila*. Иллюстрация подготовлена по данным статьи Paul et al. (2021) и Merabet, Carnesecchi (2024) [92, 95]

Если у таких мутантов повысить дозу Antp в T3 до уровня Ubx, то восстанавливается нормальный фенотип (на T3 образуются гальтеры (рис. 1, в) [95]. Наоборот, при снижении дозы Ubx в T3 вместо гальтер вырастают летательные крылья (рис. 1, з) [95]. Также при повышении дозы Antp в T2 вместо крыльев появляются гальтеры (рис. 1, д) [95].

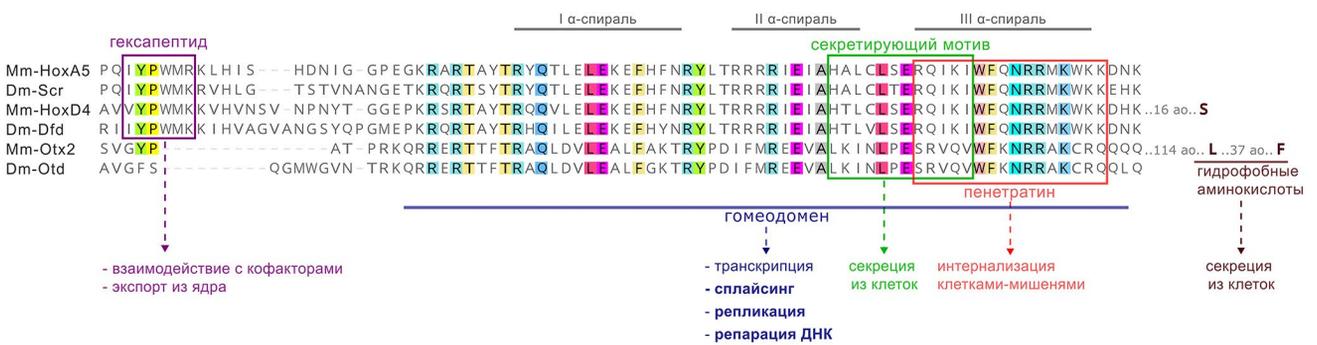
**НОХ-ФАКТОРЫ МОГУТ СЕКРЕТИРОВАТЬСЯ**

Сложность, с которой сталкивается исследователь, решивший прояснить анцестральную функцию гомеобоксных генов из класса ANTP, связана с тем, что такая функция изначально не была единственной, по крайней мере, на уровне Metazoa. Это следует из устройства многозадачных гомеодоменных белков ANTP-класса (рис. 2). Ещё в конце прошлого столетия было обнаружено, что синтетический гомеодоменный белок из 60 аминокислотных остатков, повторяющий последовательность гомеодомена Antp *Drosophila*, может проникать сквозь мембраны нервных клеток крысы без посредничества каких-либо рецепторов. После проникновения он транспортируется в ядро и повышает уровень дифференцированности реципиентных клеток [96]. Позже выяснилось, что естественные гомеодоменные белки Emx1, Emx2, Engrailed-2 (En2), Noxa5, Noxb4, Noxc8, Knotted1, Otx2, Pax6 и Vax1 обнаруживаются в клетках, которые не экспрессируют их мРНК [97].

Оказалось, что способность к межклеточному переносу, подобно сигнальной молекуле или молекуле морфогена, есть у большинства гомеодо-

менных белков, в том числе за пределами класса ANTP [97–100]. Механизм, при помощи которого это происходит, ещё не вполне понятен. Известно, что секреция и интернализация зависят от двух перекрывающихся мотивов, локализованных в наиболее консервативных участках гомеодомена [100]. Кроме того, секреция зависит от отдельных гидрофобных аминокислот за пределами гомеодомена (рис. 2) [97]. Создаётся впечатление, что гомеодоменные белки способны попадать в любые типы клеток путём макропинацитарного эндоцитоза, но эффективность процесса зависит от устройства гликокаликса принимающей клетки [97, 101].

Во впечатляющем исследовании 2019 года [97] на способность к секреции и переносу были протестированы 162 человеческих гомеодоменных белка из разных классов, причём тест проводили одновременно на трёх разных культурах клеток (секреция – HEK 293T, GT1-7 и MDCK; интернализация – HeLa). Показано, что эффективность секреции сильно зависит от типа клеток и от характеристик первичной последовательности самих гомеодоменных белков. К примеру, белки EN2, NOXC8, PAX6 и VAX1 секретируются во всех трёх клеточных культурах, а NOXA5 и OTX2 – только в двух. Десять белков, в числе которых оказался только один Нох (НОХА10), не секретируются вовсе, что, впрочем, не исключает такой возможности в других типах клеток. Все протестированные белки (включая не секретируемые) оказались способны к интернализации. Это значит, что именно секреция гомеодоменных белков – определяющий этап трансдукции, на котором клетки контролируют этот процесс.



**Рис. 2.** Структурные мотивы белков из класса ANTP и их участие в реализации функций Нох-белков. Схема описывает функциональное значение основных доменов Нох-факторов. Гомеодомен, наиболее консервативный участок белков ANTP-класса, необходим Нох-факторам для реализации как канонических (транскрипция), так и неканонических функций. Помимо гомеодомена, высокая степень консервативности также характерна для короткого гексапептидного мотива, с помощью которого Нох-белки взаимодействуют с кофакторами [102]. Удивительно, что транспортная способность Нох-факторов также обуславливается этими доменами: гомеодомен содержит секретирующий и интернализующий (пенетратин) мотивы, а консервативный остаток триптофана в гексапептиде необходим Нох-белкам для экспорта из ядра [103]. Для некоторых Нох-факторов показано, что их секреция может зависеть от отдельных гидрофобных аминокислот, локализованных в менее консервативных сайтах белка [97]. Цветными буквами в последовательностях отмечены консервативные позиции, цветными рамками окружены мотивы, неканонические функции выделены жирным шрифтом, Mm – *Mus musculus*, Dm – *Drosophila melanogaster*, ao – аминокислотные остатки

Гомеодоменные белки способны распространяться на два-три клеточных диаметра подобно паракринным сигнальным факторам, но есть примеры их обширной диффузии. У мыши белок *Otx2* синтезируется в сосудистом сплетении, секретруется в спинномозговую жидкость и накапливается по всей коре головного мозга [104].

Важно, что эндогенные белки преимущественно работают как транскрипционные факторы. Сразу после трансляции их захватывают кареоферины, распознающие сигнал ядерной локализации, и транспортируют в ядро. Экзогенные белки демонстрируют более широкий спектр функций. Показано, что секретруемый *Otx2* мыши перемещается в митохондрии, где связывается с митохондриальными АТР-синтазами и усиливает синтез АТР [105]. Ранее сообщалось, что экзогенный *En2* у *Xenopus* накапливается в конусах роста нейронов, управляет нацеливанием их аксонов на мишени и косвенно усиливает трансляцию [106].

Эти примеры не исключают проникновения экзогенных белков в ядра, где они запускают транскрипцию собственных мРНК и других специфических мишеней. Классический пример такого рода – вертикальный сигналинг во время гастрюляции у *Xenopus*. Было показано, что Нох-белки из пресомитной мезодермы последовательно включают экспрессию собственных *Нох*-генов в нейроэктодерме гастрюлы, т.е. происходит копирование позиционной информации из одного зародышевого листка в другой [104]. Прямой обмен транскрипционными факторами между слоями клеток координирует работу программ развития без посредничества морфогенов и сигнальных каскадов.

Поразительно, что сигнальная и регуляторная функции в общих случаях обеспечиваются здесь одним и тем же эволюционно древним, консервативным мотивом – гомеодоменом. Возможность решить две задачи при помощи одного инструмента могла использоваться для координации роста и развития первыми *Metazoa*, ещё до возникновения современных отношений между лигандами, способными перемещаться на большие расстояния (*long range signaling*), их мессенджерами и мишенями [104].

#### КАК НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ПРИВЕЛИ РАБОТУ НОХ-КЛАСТЕРА К КАНОНИЧЕСКОМУ ВИДУ?

Координированная работа *Нох*-генов, необходимая для выполнения канонической функции, остаётся большой эволюционной загадкой потому, что это многособытийный процесс. Он складывается из:

- эпигенетической настройки *Нох*-локусов, в том числе за счёт регуляторных РНК, закодированных в *Нох*-кластерах;

- установления топологически-ассоциированных доменов (TADs), которые стабилизируются в соответствии с положением клеток вдоль переднезадней оси;

- ответов на разнонаправленные сигналы морфогенов (ретиноевой кислоты, *Wnt*, *Fgf*, *Vmp*) в трёхмерных координатах эмбриона;

- согласованной экспрессии в клетках разных зародышевых листков за счёт уникального для гомеодоменных белков механизма – вертикального сигналинга;

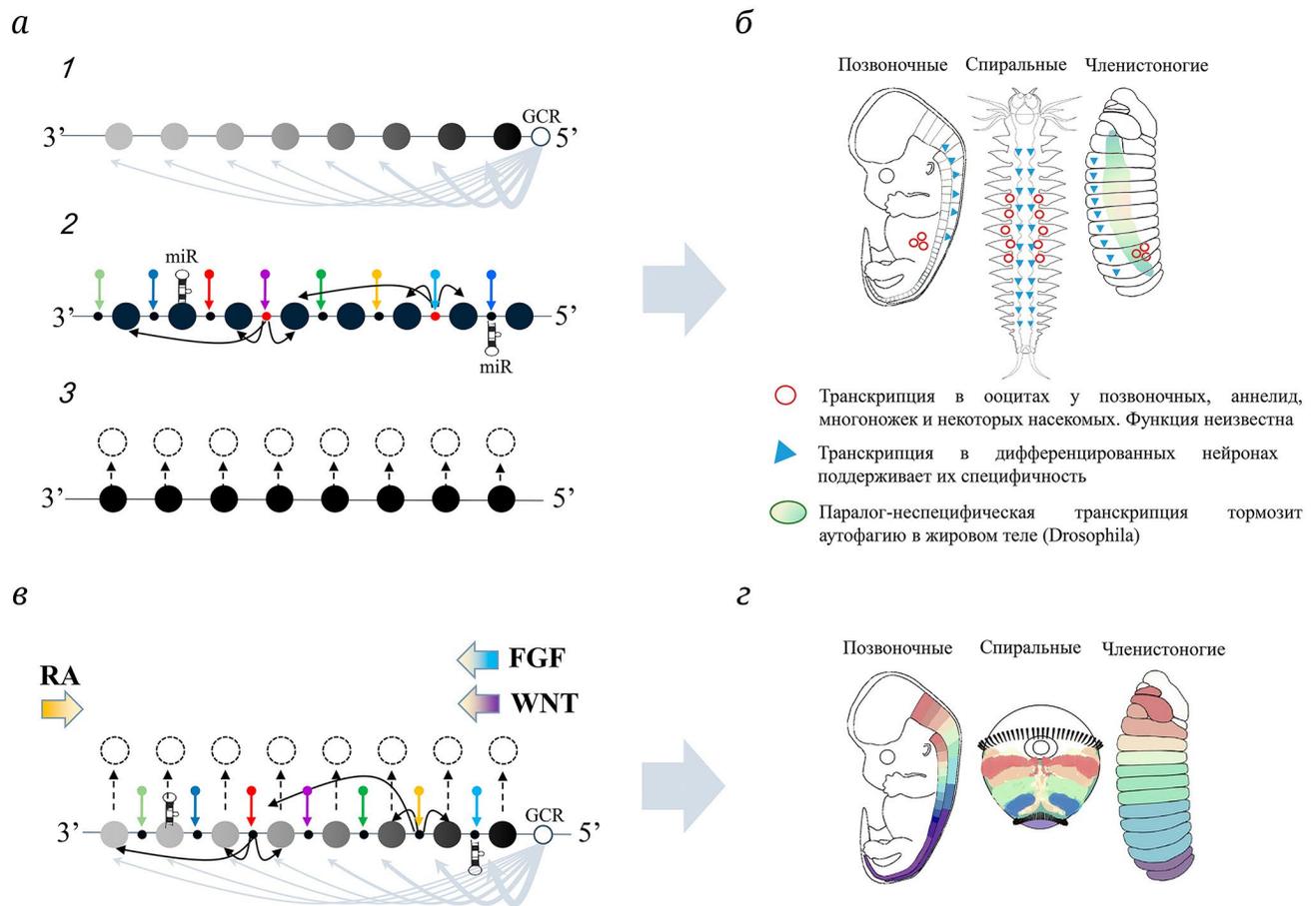
- ответа на индивидуальные сигналы вышестоящих регуляторных белков, которые могут включать/выключать индивидуальные гены;

- реципрокных взаимодействий *Нох*-генов (постериорная супрессия и не только).

Некоторые из регуляторных механизмов представлены на рис. 3.

Как на основе неканонических функций могла возникнуть эта очень сложная картина? Возможно, разные способы регуляции *Нох*-кластера, нужные для выполнения отдельных задач, были кооптированы в новую программу. Интуитивно верным кажется предположение, что эта новая программа – гастрюляция в её «билатеральном варианте». На эту мысль наводит временная сопряжённость активации *Нох*-кластера и гастрюционных процессов у вторичноротых животных. Кроме того, есть данные о преадаптации – два *Нох*-гена книдарии *Nematostella vectensis* (передний, *NvAx6*, и срединно-постериорный, *NvAx1*) важны для гастрюляции и спецификации орально-аборальной оси. Сайты их экспрессии маркируют оральный и аборальный полюса, а морфолиновый нокдаун подавляет гастрюляцию [107]. Однако эти гены не образуют кластер и работают в разных зародышевых листках. У *Drosophila* осевой паттерн *Нох*-генов устанавливается до начала гастрюляции, и пока нет исследований, где бы достоверно подтверждалось или опровергалось участие *Нох*-генов в гастрюляции у членистоногих. У некоторых спиральных животных (аннелиды, брахиоподы, моллюски) ранняя активация *Нох*-генов совпадает с началом или продолжением гастрюляции, но функциональные тесты пока отсутствуют [26, 108, 109].

С высокой степенью уверенности можно утверждать, что у последнего общего предка билатеральных животных *Нох*-кластер был один. Этот кластер мог использоваться для решения нескольких разных задач, например, для спецификации двигательных нейронов, установления нервно-мышечных синапсов и для какой-то из функций, требующих количественного изменения



**Рис. 3.** Управление транскрипцией Нох-кластера. *а* – Некоторые механизмы контроля над Нох-кластером у билатеральных животных. 1 – GCR (Global Control Region), глобальный контролирующий элемент. Регуляторные элементы этого типа описаны у позвоночных; 2 – локальные *cis*-регуляторные модули (индивидуальные и обобщательные), сайт-специфичные транскрипционные факторы и микроРНК (miR), закодированные в последовательностях Нох-кластеров. Присутствуют у первичноротых и вторичноротых животных; 3 – вертикальный сигналинг – описан у позвоночных. *б* – Неканонические функции *Нох*-генов, которые могут быть реализованы при помощи отдельных элементов контроля. *в* – Упрощённая схема регуляции Нох-кластера во время реализации канонической функции осевого паттернирования. Не все из механизмов представлены на схеме и не все из представленных универсальны. У членистоногих не найдены GCR и не показан вертикальный сигналинг. Спиральные животные в целом плохо изучены на уровне активационных механизмов Нох-кластера, но среди них есть объекты с темпоральной коллинеарностью и изначальной мезодермальной транскрипцией. RA (Retinoic Acid), FGF и WNT – градиенты морфогенов

транскриптов в ответ на стимул (вероятно, концентрацию морфогена). Такая древняя функция могла быть связана с аутофагией, контролем над пролиферацией или гаметогенезом. Важно, что эта функция обеспечивалась градиентным распределением Нох-белков вдоль оси и удерживала *Нох*-гены в кластере. Предок *Nephrozoa* мог использовать весь кластер или какие-то гены из него для управления гастрюляцией, но в линии современных *Ascoelomorpha* (сестринская ветвь *Nephrozoa*) это не так, потому что все *Нох*-гены *Convolutriloba* включаются после гастрюляции [53].

Разные способы управления одним и тем же кластером, очевидно, давали сбои, и какие-то из aberrантных вариантов подхватывались отбором. В эволюции билатеральных животных из линии *Nephrozoa* могли произойти два важных собы-

тия – объединение нескольких систем регуляции Нох-кластера в одной программе и гетерохронный сдвиг её активации в сторону более раннего развития. Наименее катастрофичный вариант предполагает серию гетерохронных сдвигов коллинеарной экспрессии *Нох*-генов во внутренних, мезодермальных по происхождению структурах вплоть до стадии гастрюлы. После этого при помощи вертикального сигналинга *Нох*-гены начали коллинеарно включаться в прилегающей эктодерме (будущей нейроэктодерме), и животные приобрели новый мощный инструмент для контроля над ранним развитием. Этот инструмент легко масштабировался в зависимости от градиента морфогенов, он координировал развитие эктодермальных и мезодермальных тканей и был эволюционно пластичен за счёт многих элементов

управления, пришедших из более древних программ. Возможно, именно этот новый молекулярный механизм «детонировал» и вызвал «Кембрийский взрыв», потому что мог быстро изменять раннее развитие.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие неканонических функций *Hox*-генов определяется самой структурой гомеодомениального белка, который может работать не только транскрипционным фактором, но и регулятором общебиологических процессов, таких как репарация ДНК, репликация, трансляция и сплайсинг РНК.

Модель «песочных часов», при всей наглядности, оставляет неканонические функции *Hox*-генов невидимыми. Согласно модели «обратных песочных часов» (Inverse hourglass model), которая справедлива для Metazoa в целом [110], существует принципиальное сходство в работе генов на самых ранних этапах развития (плюрипотентное состояние клеток, дробление) и на более поздних (дифференцировка, органогенез). Однако животные из разных типов будут сильно различаться ансамблями регуляторных генов и характером их вовлечённости в морфогенез в середине развития (mid-developmental transition), как раз между дроблением и коммитированной дифференцировкой [110]. Именно эти различия и определяют фундаментальную разницу между типами внутри Metazoa. Иными словами, можно выявить отдельные наборы сигнальных путей и транскрипционных факторов, которые взаимодействуют в период установления планов организации Metazoa. Их частная совокупность формирует облик типа. Оказалось, что гомеобоксные гены в целом и *Hox*-

гены в частности не попадают в категорию таких «типоспецифичных» регуляторов, потому что в дивергентный период развития их функции шире и консервативней.

Мы предполагаем, что у прото-*Hox*-гена изначально уже был широкий репертуар функций, причём часть из них опиралась на сигнальную природу его белка. Животные из ветви ParaHoxozoa оказались наследниками этой регуляторной сложности и приумножили её за счёт кооперации между программами развития, в которых использовались разные функциональные возможности *Hox*-белков. Эти программы возникали на разных этапах эволюции, и их следы сохранились у современных животных в виде отдельных паралог-неспецифических и дозозависимых функций.

**Вклад авторов.** М.А. Кулакова – концепция и руководство работой; М.А. Кулакова, Г.П. Маслаков, Л.О. Полюшкевич – написание текста; М.А. Кулакова, Г.П. Маслаков, Л.О. Полюшкевич – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт Российского научного фонда (проект № 23-24-00426).

**Благодарности.** В работе использовали программное обеспечение для анализа последовательностей Geneious® 2023.2.1, доступ к которому был предоставлен ресурсным центром «ЦКП Хромас» Санкт-Петербургского государственного университета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Данная статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Degnan, B. M., Vervoort, M., Larroux, C., and Richards, G. S. (2009) Early evolution of metazoan transcription factors, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19**, 591-599, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.008>.
2. Ryan, J. F., Pang, K., Mullikin, J. C., Martindale, M. Q., and Baxevanis, A. D. (2010) The homeodomain complement of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* suggests that Ctenophora and Porifera diverged prior to the ParaHoxozoa, *EvoDevo*, **1**, 9, <https://doi.org/10.1186/2041-9139-1-9>.
3. Pang, K., and Martindale, M. Q. (2008) Developmental expression of homeobox genes in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, *Dev. Genes Evol.*, **218**, 307-319, <https://doi.org/10.1007/s00427-008-0222-3>.
4. Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N. H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., and Carpenter, M. L. (2008) The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans, *Nature*, **454**, 955-960, <https://doi.org/10.1038/nature07191>.
5. Pastrana, C. C., DeBiasse, M. B., and Ryan, J. F. (2019) Sponges lack ParaHox genes, *Genome Biol. Evol.*, **11**, 1250-1257, <https://doi.org/10.1093/gbe/evz052>.
6. Lewis, E. B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, *Nature*, **276**, 565-570, <https://doi.org/10.1038/276565a0>.
7. Корчагина Н., Бакаленко Н., Кулакова М. (2010) *Hox*-кластер и эволюция морфогенозов, *Онтогенез*, **41**, 353-363.

8. Hubert, K. A., and Wellik, D. M. (2023) Hox genes in development and beyond, *Development*, **150**, <https://doi.org/10.1242/dev.192476>.
9. De Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S. B., and Balavoine, G. (1999) Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution, *Nature*, **399**, 772-776, <https://doi.org/10.1038/21631>.
10. Balavoine, G., de Rosa, R., and Adoutte, A. (2002) Hox clusters and bilaterian phylogeny, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **24**, 366-373, [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(02\)00237-3](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(02)00237-3).
11. Dressler, G. R., and Gruss, P. (1989) Anterior boundaries of Hox gene expression in mesoderm-derived structures correlate with the linear gene order along the chromosome, *Differentiation*, **41**, 193-201, <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1989.tb00747.x>.
12. Duboule, D., and Dolle, P. (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes, *EMBO J.*, **8**, 1497-1505, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03534.x>.
13. Duboule, D. (1994) Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony, *Dev. Suppl.*, 135-142.
14. Larroux, C., Fahey, B., Degnan, S. M., Adamski, M., Rokhsar, D. S., and Degnan, B. M. (2007) The NK homeobox gene cluster predates the origin of Hox genes, *Curr. Biol.*, **17**, 706-710, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.008>.
15. Copley, R. R. (2023) The ancestry of Antennapedia-like homeobox genes, *bioRxiv*, 2023.2003.2014.532566, <https://doi.org/10.1101/2023.03.14.532566>.
16. DuBuc, T. Q., Ryan, J. F., Shinzato, C., Satoh, N., and Martindale, M. Q. (2012) Coral comparative genomics reveal expanded Hox cluster in the cnidarian-bilaterian ancestor, *Integr. Comp. Biol.*, **52**, 835-841, <https://doi.org/10.1093/icb/ics098>.
17. Lynch, V. J., Roth, J. J., and Wagner, G. P. (2006) Adaptive evolution of Hox-gene homeodomains after cluster duplications, *BMC Evol. Biol.*, **6**, 86, <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-86>.
18. Duboule, D. (2007) The rise and fall of Hox gene clusters, *Development*, **134**, 2549-2560, <https://doi.org/10.1242/dev.001065>.
19. Seo, H. C., Edvardsen, R. B., Maeland, A. D., Bjordal, M., Jensen, M. F., Hansen, A., Flaas, M., Weissenbach, J., Lehrach, H., Wincker, P., Reinhardt, R., and Chourrout, D. (2004) Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*, *Nature*, **431**, 67-71, <https://doi.org/10.1038/nature02709>.
20. Fröblius, A. C., and Funch, P. (2017) Rotiferan Hox genes give new insights into the evolution of metazoan bodyplans, *Nat. Commun.*, **8**, 9, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00020-w>.
21. Lee, P. N., Callaerts, P., De Couet, H. G., and Martindale, M. Q. (2003) Cephalopod Hox genes and the origin of morphological novelties, *Nature*, **424**, 1061-1065, <https://doi.org/10.1038/nature01872>.
22. Monteiro, A. S., and Ferrier, D. E. (2006) Hox genes are not always Colinear, *Int. J. Biol. Sci.*, **2**, 95-103, <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.95>.
23. Stern, D. L. (1998) A role of Ultrabithorax in morphological differences between *Drosophila* species, *Nature*, **396**, 463-466, <https://doi.org/10.1038/24863>.
24. Slack, J. M., Holland, P. W., and Graham, C. F. (1993) The zootype and the phylotypic stage, *Nature*, **361**, 490-492, <https://doi.org/10.1038/361490a0>.
25. Lemaire, L., and Kessel, M. (1997) Gastrulation and homeobox genes in chick embryos, *Mech. Dev.*, **67**, 3-16, [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00102-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00102-0).
26. Kulakova, M., Bakalenko, N., Novikova, E., Cook, C. E., Eliseeva, E., Steinmetz, P. R., Kostyuchenko, R. P., Dondua, A., Arendt, D., Akam, M., and Andreeva, T. (2007) Hox gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa), *Dev. Genes Evol.*, **217**, 39-54, <https://doi.org/10.1007/s00427-006-0119-y>.
27. Michaut, L., Jansen, H. J., Bardine, N., Durston, A. J., and Gehring, W. J. (2011) Analyzing the function of a hox gene: an evolutionary approach, *Dev. Growth Differ.*, **53**, 982-993, <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2011.01307.x>.
28. Fröblius, A. C., Matus, D. Q., and Seaver, E. C. (2008) Genomic organization and expression demonstrate spatial and temporal Hox gene colinearity in the lophotrochozoan *Capitella* sp. I, *PLoS One*, **3**, e4004, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004004>.
29. Garcia-Fernández, J. (2005) The genesis and evolution of homeobox gene clusters, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 881-892, <https://doi.org/10.1038/nrg1723>.
30. Philippidou, P., and Dasen, J. S. (2013) Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization, *Neuron*, **80**, 12-34, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.020>.
31. Joshi, R., Sipani, R., and Bakshi, A. (2021) Roles of *Drosophila* Hox genes in the assembly of neuromuscular networks and behavior, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 786993, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.786993>.

32. Feng, W., Li, Y., and Kratsios, P. (2021) Emerging roles for hox proteins in the last steps of neuronal development in worms, flies, and mice, *Front. Neurosci.*, **15**, 801791, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.801791>.
33. Kourakis, M. J., Master, V. A., Lokhorst, D. K., Nardelli-Haeffliger, D., Wedeen, C. J., Martindale, M. Q., and Shankland, M. (1997) Conserved anterior boundaries of Hox gene expression in the central nervous system of the leech *Helobdella*, *Dev. Biol.*, **190**, 284-300, <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8689>.
34. Samadi, L., and Steiner, G. (2010) Expression of Hox genes during the larval development of the snail, *Gibbula varia* (L.)—further evidence of non-colinearity in molluscs, *Dev. Genes Evol.*, **220**, 161-172, <https://doi.org/10.1007/s00427-010-0338-0>.
35. Hinman, V. F., O'Brien, E. K., Richards, G. S., and Degnan, B. M. (2003) Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliotis asinina*, *Evol. Dev.*, **5**, 508-521, <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2003.03056.x>.
36. Barrera Grijalba, C. C., Rodríguez Monje, S. V., Gestal, C., and Wollesen, T. (2023) Octopod Hox genes and cephalopod plesiomorphies, *Sci. Rep.*, **13**, 15492, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42435-0>.
37. Kratsios, P., Kerk, S. Y., Catela, C., Liang, J., Vidal, B., Bayer, E. A., Feng, W., De La Cruz, E. D., Croci, L., Consalez, G. G., Mizumoto, K., and Hobert, O. (2017) An intersectional gene regulatory strategy defines subclass diversity of *C. elegans* motor neurons, *Elife*, **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.25751>.
38. Feng, W., Li, Y., Dao, P., Aburas, J., Islam, P., Elbaz, B., Kolarzyk, A., Brown, A. E., and Kratsios, P. (2020) A terminal selector prevents a Hox transcriptional switch to safeguard motor neuron identity throughout life, *Elife*, **9**, <https://doi.org/10.7554/eLife.50065>.
39. Li, Y., Osuma, A., Correa, E., Okebalama, M. A., Dao, P., Gaylord, O., Aburas, J., Islam, P., Brown, A. E., and Kratsios, P. (2020) Establishment and maintenance of motor neuron identity via temporal modularity in terminal selector function, *Elife*, **9**, <https://doi.org/10.7554/eLife.59464>.
40. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., and Brenner, S. (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **314**, 1-340, <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>.
41. Raji, J. I., and Potter, C. J. (2021) The number of neurons in *Drosophila* and mosquito brains, *PLoS One*, **16**, e0250381, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250381>.
42. Estacio-Gómez, A., and Díaz-Benjumea, F. J. (2014) Roles of Hox genes in the patterning of the central nervous system of *Drosophila*, *Fly (Austin)*, **8**, 26-32, <https://doi.org/10.4161/fly.27424>.
43. Friedrich, J., Sorge, S., Bujupi, F., Eichenlaub, M. P., Schulz, N. G., Wittbrodt, J., and Lohmann, I. (2016) Hox function is required for the development and maintenance of the *Drosophila* feeding motor unit, *Cell Rep.*, **14**, 850-860, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.077>.
44. Estacio-Gómez, A., Moris-Sanz, M., Schäfer, A. K., Perea, D., Herrero, P., and Díaz-Benjumea, F. J. (2013) Bithorax-complex genes sculpt the pattern of leucokinergic neurons in the *Drosophila* central nervous system, *Development*, **140**, 2139-2148, <https://doi.org/10.1242/dev.090423>.
45. Catela, C., Chen, Y., Weng, Y., Wen, K., and Kratsios, P. (2022) Control of spinal motor neuron terminal differentiation through sustained *Hoxc8* gene activity, *Elife*, **11**, <https://doi.org/10.7554/eLife.70766>.
46. Hutlet, B., Theys, N., Coste, C., Ahn, M. T., Doshishti-Agolli, K., Lizen, B., and Gofflot, F. (2016) Systematic expression analysis of Hox genes at adulthood reveals novel patterns in the central nervous system, *Brain Struct. Funct.*, **221**, 1223-1243, <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0965-8>.
47. Reilly, M. B., Cros, C., Varol, E., Yemini, E., and Hobert, O. (2020) Unique homeobox codes delineate all the neuron classes of *C. elegans*, *Nature*, **584**, 595-601, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2618-9>.
48. Hobert, O. (2021) Homeobox genes and the specification of neuronal identity, *Nat. Rev. Neurosci.*, **22**, 627-636, <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00497-x>.
49. Sheng, G., Thouvenot, E., Schmucker, D., Wilson, D. S., and Desplan, C. (1997) Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6/eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors, *Genes Dev.*, **11**, 1122-1131, <https://doi.org/10.1101/gad.11.9.1122>.
50. Gehring, W. J., and Ikeo, K. (1999) *Pax 6*: mastering eye morphogenesis and eye evolution, *Trends Genet.*, **15**, 371-377, [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01776-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01776-x).
51. Gehring, W. J. (2005) New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors, *J. Hered.*, **96**, 171-184, <https://doi.org/10.1093/jhered/esi027>.
52. Merabet, S., and Mann, R. S. (2016) To be specific or not: the critical relationship between Hox and TALE proteins, *Trends Genet.*, **32**, 334-347, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.004>.
53. Hejnol, A., and Martindale, M. Q. (2009) Coordinated spatial and temporal expression of Hox genes during embryogenesis in the acoel *Convolutriloba longifissura*, *BMC Biol.*, **7**, 65, <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-65>.
54. Moreno, E., Nadal, M., Baguña, J., and Martínez, P. (2009) Tracking the origins of the bilaterian Hox patterning system: insights from the acoel flatworm *Symsagittifera roscoffensis*, *Evol. Dev.*, **11**, 574-581, <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00363.x>.

55. Moreno, E., De Mulder, K., Salvenmoser, W., Ladurner, P., and Martínez, P. (2010) Inferring the ancestral function of the posterior *Hox* gene within the bilateria: controlling the maintenance of reproductive structures, the musculature and the nervous system in the acoel flatworm *Isodiametra pulchra*, *Evol. Dev.*, **12**, 258-266, <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2010.00411.x>.
56. Moreno, E., Permanyer, J., and Martinez, P. (2011) The origin of patterning systems in bilateria-insights from the *Hox* and *ParaHox* genes in Acoelomorpha, *Genom. Proteom. Bioinform.*, **9**, 65-76, [https://doi.org/10.1016/s1672-0229\(11\)60010-7](https://doi.org/10.1016/s1672-0229(11)60010-7).
57. Finnerty, J. R., and Martindale, M. Q. (1999) Ancient origins of axial patterning genes: *Hox* genes and *ParaHox* genes in the Cnidaria, *Evol. Dev.*, **1**, 16-23, <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.1999.99010.x>.
58. Chiori, R., Jager, M., Denker, E., Wincker, P., Da Silva, C., Le Guyader, H., Manuel, M., and Quéinnec, E. (2009) Are *Hox* genes ancestrally involved in axial patterning? Evidence from the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria), *PLoS One*, **4**, e4231, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004231>.
59. Nong, W., Cao, J., Li, Y., Qu, Z., Sun, J., Swale, T., Yip, H. Y., Qian, P. Y., Qiu, J. W., Kwan, H. S., Bendena, W., Tobe, S., Chan, T. F., Yip, K. Y., Chu, K. H., Ngai, S. M., Tsim, K. Y., Holland, P. W. H., and Hui, J. H. L. (2020) Jellyfish genomes reveal distinct homeobox gene clusters and conservation of small RNA processing, *Nat. Commun.*, **11**, 3051, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16801-9>.
60. Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., and Chera, S. (2009) Origins of neurogenesis, a cnidarian view, *Dev. Biol.*, **332**, 2-24, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.05.563>.
61. Faltine-Gonzalez, D., Havrilak, J., and Layden, M. J. (2023) The brain regulatory program predates central nervous system evolution, *Sci. Rep.*, **13**, 8626, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35721-4>.
62. Oren, M., Brickner, I., Appelbaum, L., and Levy, O. (2014) Fast neurotransmission related genes are expressed in non nervous endoderm in the sea anemone *Nematostella vectensis*, *PLoS One*, **9**, e93832, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093832>.
63. Steinworth, B. M., Martindale, M. Q., and Ryan, J. F. (2023) Gene loss may have shaped the Cnidarian and Bilaterian *Hox* and *ParaHox* complement, *Genome Biol. Evol.*, **15**, <https://doi.org/10.1093/gbe/evac172>.
64. Reggiori, F., and Klionsky, D. J. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell, *Eukaryot. Cell*, **1**, 11-21, <https://doi.org/10.1128/ec.01.1.11-21.2002>.
65. Wada, Y., Sun-Wada, G. H., Kawamura, N., and Aoyama, M. (2014) Role of autophagy in embryogenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **27**, 60-66, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.010>.
66. Tsukamoto, S., Kuma, A., and Mizushima, N. (2008) The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition, *Autophagy*, **4**, 1076-1078, <https://doi.org/10.4161/auto.7065>.
67. Banreti, A., Hudry, B., Sass, M., Saurin, A. J., and Graba, Y. (2014) *Hox* proteins mediate developmental and environmental control of autophagy, *Dev. Cell*, **28**, 56-69, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.024>.
68. Sachs, M., Onodera, C., Blaschke, K., Ebata, K. T., Song, J. S., and Ramalho-Santos, M. (2013) Bivalent chromatin marks developmental regulatory genes in the mouse embryonic germline *in vivo*, *Cell Rep.*, **3**, 1777-1784, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.032>.
69. Paul, D., Bridoux, L., Rezsöhazy, R., and Donnay, I. (2011) *HOX* genes are expressed in bovine and mouse oocytes and early embryos, *Mol. Reprod. Dev.*, **78**, 436-449, <https://doi.org/10.1002/mrd.21321>.
70. Kondo, M., Yamamoto, T., Takahashi, S., and Taira, M. (2017) Comprehensive analyses of *hox* gene expression in *Xenopus laevis* embryos and adult tissues, *Dev. Growth Differ.*, **59**, 526-539, <https://doi.org/10.1111/dgd.12382>.
71. Maslakov, G. P., Kulishkin, N. S., Surkova, A. A., and Kulakova, M. A. (2021) Maternal transcripts of *Hox* genes are found in oocytes of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Nereididae), *J. Dev. Biol.*, **9**, <https://doi.org/10.3390/jdb9030037>.
72. Chipman, A. D., Ferrier, D. E., Brena, C., Qu, J., Hughes, D. S., Schröder, R., Torres-Oliva, M., Znassi, N., Jiang, H., Almeida, F. C., Alonso, C. R., Apostolou, Z., Aqrabi, P., Arthur, W., Barna, J. C., Blankenburg, K. P., Brites, D., Capella-Gutiérrez, S., Coyle, M., Dearden, P. K., et al. (2014) The first myriapod genome sequence reveals conservative arthropod gene content and genome organisation in the centipede *Strigamia maritima*, *PLoS Biol.*, **12**, e1002005, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002005>.
73. Qu, Z., Nong, W., So, W. L., Barton-Owen, T., Li, Y., Leung, T. C. N., Li, C., Baril, T., Wong, A. Y. P., Swale, T., Chan, T. F., Hayward, A., Ngai, S. M., and Hui, J. H. L. (2020) Millipede genomes reveal unique adaptations during myriapod evolution, *PLoS Biol.*, **18**, e3000636, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000636>.
74. Rafiqi, A. M., Rajakumar, A., and Abouheif, E. (2020) Origin and elaboration of a major evolutionary transition in individuality, *Nature*, **585**, 239-244, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2653-6>.
75. Jaramillo, M. L., Ammar, D., Quispe, R. L., Bonatto Paese, C. L., Gruending, A. P., Müller, Y. M., and Nazari, E. M. (2022) Identification of *Hox* genes and their expression profiles during embryonic development of the emerging model organism, *Macrobrachium olfersii*, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **338**, 292-300, <https://doi.org/10.1002/jez.b.23118>.

76. Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., and Navarro, P. A. (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence, *Theriogenology*, **71**, 836-848, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>.
77. Sauvegarde, C., Paul, D., Bridoux, L., Jouneau, A., Degrelle, S., Hue, I., Rezsohazy, R., and Donnay, I. (2016) Dynamic pattern of HOXB9 protein localization during oocyte maturation and early embryonic development in mammals, *PLoS One*, **11**, e0165898, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165898>.
78. Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., and Chang, H. Y. (2007) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human *HOX* loci by noncoding RNAs, *Cell*, **129**, 1311-1323, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>.
79. Iyyappan, R., Aleshkina, D., Zhu, L., Jiang, Z., Kinterova, V., and Susor, A. (2021) Oocyte specific lncRNA variant *Rose* influences oocyte and embryo development, *Noncoding RNA Res.*, **6**, 107-113, <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2021.06.001>.
80. Kageyama, S., Gunji, W., Nakasato, M., Murakami, Y., Nagata, M., and Aoki, F. (2007) Analysis of transcription factor expression during oogenesis and preimplantation development in mice, *Zygote*, **15**, 117-128, <https://doi.org/10.1017/s096719940700411x>.
81. Holland, P. W., Booth, H. A., and Bruford, E. A. (2007) Classification and nomenclature of all human homeobox genes, *BMC Biol.*, **5**, 47, <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-47>.
82. Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N., and Matzuk, M. M. (2004) NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression, *Science*, **305**, 1157-1159, <https://doi.org/10.1126/science.1099755>.
83. Jukam, D., Shariati, S. A. M., and Skotheim, J. M. (2017) Zygotic genome activation in vertebrates, *Dev. Cell*, **42**, 316-332, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.026>.
84. Carnesecchi, J., Boumpas, P., van Nierop, Y. S. P., Domsch, K., Pinto, H. D., Borges Pinto, P., and Lohmann, I. (2022) The Hox transcription factor Ultrabithorax binds RNA and regulates co-transcriptional splicing through an interplay with RNA polymerase II, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 763-783, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1250>.
85. Rubin, E., Wu, X., Zhu, T., Cheung, J. C., Chen, H., Lorincz, A., Pandita, R. K., Sharma, G. G., Ha, H. C., Gasson, J., Hanakahi, L. A., Pandita, T. K., and Sukumar, S. (2007) A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair, *Cancer Res.*, **67**, 1527-1535, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-06-4283>.
86. Salsi, V., Ferrari, S., Ferraresi, R., Cossarizza, A., Grande, A., and Zappavigna, V. (2009) HOXD13 binds DNA replication origins to promote origin licensing and is inhibited by geminin, *Mol. Cell Biol.*, **29**, 5775-5788, <https://doi.org/10.1128/MCB.00509-09>.
87. Primon, M., Hunter, K. D., Pandha, H. S., and Morgan, R. (2019) Kinase regulation of HOX transcription factors, *Cancers (Basel)*, **11**, <https://doi.org/10.3390/cancers11040508>.
88. Lavin, M. F., and Kozlov, S. (2007) ATM activation and DNA damage response, *Cell Cycle*, **6**, 931-942, <https://doi.org/10.4161/cc.6.8.4180>.
89. Comelli, L., Marchetti, L., Arosio, D., Riva, S., Abdurashidova, G., Beltram, F., and Falaschi, A. (2009) The homeotic protein HOXC13 is a member of human DNA replication complexes, *Cell Cycle*, **8**, 454-459, <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7649>.
90. Marchetti, L., Comelli, L., D'Innocenzo, B., Puzzi, L., Luin, S., Arosio, D., Calvello, M., Mendoza-Maldonado, R., Peverali, F., Trovato, F., Riva, S., Biamonti, G., Abdurashidova, G., Beltram, F., and Falaschi, A. (2010) Homeotic proteins participate in the function of human-DNA replication origins, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 8105-8119, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq688>.
91. Vieux, K. F., and Clarke, H. J. (2018) CNOT6 regulates a novel pattern of mRNA deadenylation during oocyte meiotic maturation, *Sci. Rep.*, **8**, 6812, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25187-0>.
92. Merabet, S., and Carnesecchi, J. (2024) Hox dosage and morphological diversification during development and evolution, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **152-153**, 70-75, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.11.009>.
93. Horan, G. S., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A., and Behringer, R. R. (1995) Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed, *Genes Dev.*, **9**, 1667-1677, <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1667>.
94. Zákány, J., Fromental-Ramain, C., Warot, X., and Duboule, D. (1997) Regulation of number and size of digits by posterior *Hox* genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13695-13700, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13695>.
95. Paul, R., Giraud, G., Domsch, K., Duffraisse, M., Marmigère, F., Khan, S., Vanderperre, S., Lohmann, I., Stoks, R., Shashidhara, L. S., and Merabet, S. (2021) Hox dosage contributes to flight appendage morphology in *Drosophila*, *Nat. Commun.*, **12**, 2892, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23293-8>.
96. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1864-1868, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>.

97. Lee, E. J., Kim, N., Park, J. W., Kang, K. H., Kim, W. I., Sim, N. S., Jeong, C. S., Blackshaw, S., Vidal, M., Huh, S. O., Kim, D., Lee, J. H., and Kim, J. W. (2019) Global analysis of intercellular homeodomain protein transfer, *Cell Rep.*, **28**, 712-722.e713, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.056>.
98. Lucas, W. J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., and Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata, *Science*, **270**, 1980-1983, <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1980>.
99. Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2015) Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system, *Neuron*, **85**, 911-925, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.019>.
100. Spatazza, J., Di Lullo, E., Joliot, A., Dupont, E., Moya, K. L., and Prochiantz, A. (2013) Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed, *Pharmacol. Rev.*, **65**, 90-104, <https://doi.org/10.1124/pr.112.006577>.
101. Joliot, A. H., Triller, A., Volovitch, M., Pernelle, C., and Prochiantz, A. (1991) alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide, *New Biol.*, **3**, 1121-1134.
102. Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Bérenger, H., Pradel, J., and Graba, Y. (2003) The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions, *Dev. Cell*, **4**, 761-768, [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00126-6).
103. Duffraisse, M., Paul, R., Carnesecchi, J., Hudry, B., Banreti, A., Reboulet, J., Ajuria, L., Lohmann, I., and Merabet, S. (2020) Role of a versatile peptide motif controlling Hox nuclear export and autophagy in the *Drosophila* fat body, *J. Cell Sci.*, **133**, <https://doi.org/10.1242/jcs.241943>.
104. Bardine, N., Lamers, G., Wacker, S., Donow, C., Knoechel, W., and Durston, A. (2014) Vertical signalling involves transmission of Hox information from gastrula mesoderm to neurectoderm, *PLoS One*, **9**, e115208, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115208>.
105. Kim, H. T., Kim, S. J., Sohn, Y. I., Paik, S. S., Caplette, R., Simonutti, M., Moon, K. H., Lee, E. J., Min, K. W., Kim, M. J., Lee, D. G., Simeone, A., Lamonerie, T., Furukawa, T., Choi, J. S., Kweon, H. S., Picaud, S., Kim, I. B., Shong, M., and Kim, J. W. (2015) Mitochondrial protection by exogenous Otx2 in mouse retinal neurons, *Cell Rep.*, **13**, 990-1002, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.075>.
106. Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., and Holt, C. (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons, *Nature*, **438**, 94-98, <https://doi.org/10.1038/nature04110>.
107. DuBuc, T. Q., Stephenson, T. B., Rock, A. Q., and Martindale, M. Q. (2018) Hox and Wnt pattern the primary body axis of an anthozoan cnidarian before gastrulation, *Nat. Commun.*, **22**, 1-12, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04184-x>.
108. Schiemann, S. M., Martín-Durán, J. M., Børve, A., Vellutini, B. C., Passamaneck, Y. J., and Hejnol, A. (2017). Clustered brachiopod Hox genes are not expressed collinearly and are associated with lophotrochozoan novelties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1913-1922, <https://doi.org/10.1073/pnas.1614501114>.
109. Salamanca-Díaz, D. A., Calcino, A. D., de Oliveira, A. L., Wanninger, A. (2021). Non-collinear Hox gene expression in bivalves and the evolution of morphological novelties in mollusks, *Sci. Rep.*, **11**, 1-12, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82122-6>.
110. Levin, M., Anavy, L., Cole, A. G., Winter, E., Mostov, N., Khair, S., Senderovich, N., Kovalev, E., Silver, D. H., Feder, M., Fernandez-Valverde, S. L., Nakanishi, N., Simmons, D., Simakov, O., Larsson, T., Liu, S. Y., Jerafi-Vider, A., Yaniv, K., Ryan, J. F., Martindale, M. Q., et al. (2016) The mid-developmental transition and the evolution of animal body plans, *Nature*, **531**, 637-641, <https://doi.org/10.1038/nature16994>.

## **IRREDUCIBLE COMPLEXITY OF *HOX* GENE: A PATH TO THE CANONICAL FUNCTION OF THE HOX CLUSTER**

### **Review**

**M. A. Kulakova\*, G. P. Maslakov, and L. O. Poliushkevich**

*Department of Embryology, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia; e-mail: m.kulakowa@spbu.ru*

The evolution of major taxa is often associated with the emergence of new gene families. In all multicellular animals except sponges and comb jellies, the genomes contain *Hox* genes, which are crucial

regulators of development. The canonical function of *Hox* genes involves the collinear patterning of body parts in bilateral animals. This general function is implemented through complex, precisely coordinated mechanisms, not all of which are evolutionarily conserved and fully understood. We suggest that the emergence of this regulatory complexity was preceded by a stage of cooperation between more ancient morphogenetic programs or their individual elements. Footprints of these programs may be present in modern animals to execute non-canonical *Hox* functions. Non-canonical functions of *Hox* genes are involved in maintaining terminal nerve cell specificity, autophagy, oogenesis, pre-gastrulation embryogenesis, vertical signaling, and a number of general biological processes. These functions are realized by the basic properties of homeodomain protein and could have triggered the evolution of ParaHoxozoa and Nephrozoa subsequently.

*Keywords:* homeodomain, ANTP, *Hox* genes, non-canonical functions of *Hox* genes, Metazoa, ParaHoxozoa, Nephrozoa, neurogenesis, developmental autophagy, oogenesis, vertical signaling